

Tesis Doctoral

Métodos de molienda seca y húmeda en molino planetario para la obtención y caracterización de fracciones de amaranto y su aplicación como agente encapsulante

Roa Acosta, Diego Fernando

2015-08-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Roa Acosta, Diego Fernando. (2015-08-28). Métodos de molienda seca y húmeda en molino planetario para la obtención y caracterización de fracciones de amaranto y su aplicación como agente encapsulante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Roa Acosta, Diego Fernando. "Métodos de molienda seca y húmeda en molino planetario para la obtención y caracterización de fracciones de amaranto y su aplicación como agente encapsulante". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-08-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**Métodos de molienda seca y húmeda en molino planetario para la
obtención y caracterización de fracciones de amaranto y su aplicación
como agente encapsulante**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Química Industrial

Diego Fernando Roa Acosta

Director de Tesis: Dra. Marcela Patricia Tolaba
Director Asistente de Tesis: Dr. Patricio Román Santagapita
Consejero de Estudios: Dra. Marcela Patricia Tolaba

**Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales**

Buenos Aires, 2015

RESUMEN

MÉTODOS DE MOLIENDA SECA Y HÚMEDA EN MOLINO PLANETARIO PARA LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES DE AMARANTO Y SU APLICACIÓN COMO AGENTE ENCAPSULANTE

El estudio de la molienda seca y húmeda del grano de amaranto es importante para darle valor agregado a los productos derivados del procesamiento del grano y de esta manera posicionarlo en el mercado como una fuente alternativa de almidón y proteínas. El advenimiento de los molinos de alto impacto brinda la posibilidad de combinar simultáneamente la etapa de maceración y trituración del grano en la molienda húmeda, además de realizar transformaciones termo-mecánicas en la molienda seca del grano.

En la presente tesis se analizaron las distintas etapas en la obtención de fracciones enriquecidas, harinas y almidones modificados del grano de amaranto por medio de un molino abrasivo y de un molino planetario de bolas, profundizando además sobre la caracterización fisicoquímica, estructural y funcional de los productos de molienda.

Por otra parte, se estudió el uso de las fracciones de molienda como potenciales matrices en la encapsulación de un antioxidante modelo (β -caroteno), analizando su estabilidad en condiciones de almacenamiento a temperatura y humedad relativa controladas.

El presente trabajo permitió optimizar los parámetros de la molienda abrasiva obteniendo dos fracciones enriquecidas (amilácea y lípido-proteica) de alto potencial tecnológico. Las propiedades estructurales y funcionales de la fracción amilácea obtenida por molienda seca de alto impacto fueron dependientes de la energía aplicada, afectando la gelatinización, la absorción de agua y la solubilidad. La molienda húmeda mostró una mejora en la recuperación de almidón, reduciendo el contenido proteico y el tiempo de proceso respecto al método tradicional. La fracción amilácea mostró una elevada capacidad encapsulante, mejorando la retención de β -caroteno, protegiéndolo frente al tratamiento térmico, así como durante la humidificación.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al desarrollo de métodos experimentales a escala laboratorio que sean más convenientes para la obtención de fracciones enriquecidas, harinas modificadas y almidón de amaranto con alto potencial tecnológico.

Palabras claves: fraccionamiento, molienda de alto impacto, harina modificada, almidón modificado, propiedades funcionales, cristalinidad, encapsulación, β -caroteno.

ABSTRACT

DRY AND WET GRINDING METHODS IN PLANETARY BALL MILL TO OBTAIN AND CHARACTERIZE FRACTIONS OF AMARANTH AND ITS APPLICATION AS AN ENCAPSULATING AGENT

The study of dry and wet milling of amaranth grain is of great importance to the adding of value to products derived from grain processing and to the positioning of amaranth in the market as an alternative source of starch and protein. The introduction of high-impact mills allows the simultaneous combination of the stage of soaking and crushing of the grain in the wet milling, as well as thermo-mechanical transformations in amaranth dry grinding.

This study analyzed the various stages in the obtention of enriched fractions, modified starches and flours of amaranth grain, through an abrasive mill and a planetary ball mill. In addition, the study made a profound analysis of the physicochemical, structural and functional characteristics of grinding products.

Furthermore, the use of milling fractions as potential matrices in encapsulating a model antioxidant (β -carotene) was also study by analyzing its stability under controlled temperature and relative humidity storage conditions.

This work helped to optimize the parameters of the abrasive grinding obtaining two enriched fractions (starchy and lipid-protein) of high technological potential. The structural and functional properties of the starchy fraction obtained through high-impact dry milling were dependent on the applied energy, affecting the gelatinization, water absorption and solubility. The wet milling showed a better starch recuperation, reducing the protein content and the process duration in relation to the traditional method. The starchy fraction showed a huge encapsulating capacity, improving the retention of β -carotene by protecting it from the thermal treatment and humidification.

The results of the present study contribute to the development of laboratory scale methods that are more convenient to obtain enriched fractions, modified starch and amaranth flour with high technological potential.

Keywords: fractioning, high impact milling, modified flour, modified starch, functional properties, crystallinity, encapsulation, β -carotene.

AGRADECIMIENTOS

A ti Señor Jesucristo por rodearme de personas maravillosas que no dudaron en brindarme su amistad y consejos en todo tiempo y lugar.

A la Doctora Marcela Tolaba por transmitirme sus conocimientos y por guiarme de forma clara a través de este proceso de aprendizaje.

Al Doctor Patricio Román Santagapita por enseñarme a pensar en forma analítica y crítica cada resultado obtenido.

A la Doctora Maria del Pilar Buera por permitirme desarrollar las actividades investigativas en su laboratorio y por su codirección en la beca de Conicet.

A todos mis compañeros de trabajo, por la sincera amistad.

A todos los docentes e investigadores del departamento de industrias, por el gran conocimiento aportado.

A la Universidad de Buenos Aires, por la formación académica y los subsidios otorgados para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca concedida.

A mi querida esposa Mónica, por su amor y apoyo incondicional en todo este proceso.

A mis padres Eduardo y Cecilia, a mi hermano Oscar y a toda mi familia por fortalecerme con su inmenso cariño.

*¡A quién tengo en el cielo sino a ti, Señor Jesucristo!
Si estoy contigo, ya nada quiero en la tierra
Podrá desfallecer mi cuerpo y mi espíritu
Pero el Señor Jesús fortalece mi corazón
Él es mi herencia eterna.*

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	10
1.1	GENERALIDADES DEL GRANO DE AMARANTO.....	10
1.1.1	HISTORIA Y ACTUALIDAD.....	10
1.1.2	AMARANTO, ¿POSIBLE ALIMENTO FUNCIONAL?.....	12
1.1.3	CONDICIONES AGRONÓMICAS.....	13
1.1.4	ESTRUCTURA DEL GRANO.....	14
1.1.5	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO.....	15
1.1.5.1	Proteínas de amaranto.....	15
1.1.5.2	Lípidos de amaranto.....	16
1.1.5.3	Otros nutrientes.....	16
1.1.5.4	Almidón de amaranto.....	17
1.2	MOLIENDA SECA Y HUMEDA DEL GRANO DE AMARANTO.....	21
1.2.1	TIPOS DE MOLINOS.....	23
1.2.2	MODELOS PREDICTIVOS EN MOLIENDA.....	26
1.2.2.1	Modelos de predicción “energía-tamaño”.....	26
1.2.2.2	Modelo de distribución de tamaño.....	27
1.3	CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR MOLIENDA SECA Y HUMEDA.....	28
1.3.1	SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE PERLADO MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES Y MEDICIÓN DE COLOR.....	28
1.3.2	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FT-IR).....	30
1.3.3	DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO.....	30
1.3.4	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X.....	32
1.3.5	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	33
1.4	APLICACIÓN DE ALMIDONES EN ENCAPSULACIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	34
1.4.1	ENCAPSULACIÓN DE β -CAROTENOS EN MATRICES DE ALMIDON.....	34
1.4.2	DETERMINACIÓN DE LOS CAROTENOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.....	36

2.	OBJETIVOS.....	39
3.	MATERIALES Y METODOS.....	40
3.1	GRANO DE AMARANTO.....	40
3.2	OBTENCION DEL GRANO DE AMARANTO PERLADO MEDIANTE MOLIENDA ABRASIVA.....	40
3.2.1	MOLIENDA ABRASIVA.....	40
3.2.2	DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BENHKEN.....	40
3.3	OBTENCION DE HARINAS MEDIANTE MOLIENDA DE ALTO IMPACTO.....	41
3.3.1	MÉTODO (I) EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE ROTACIÓN Y EL TIEMPO DE MOLIENDA.....	41
3.3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL RED DOEHLERT.....	44
3.3.3	MÉTODO (II) EN FUNCIÓN DE LA ENERGÍA DE MOLIENDA.....	44
3.3.4	MODELOS DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO.....	45
3.3.5	MODELOS DE ENERGÍA DE MOLIENDA EN FUNCIÓN DE LA REDUCCION DE TAMAÑO.....	45
3.4	OBTENCION DE ALMIDON MEDIANTE MOLIENDA HUMEDA DE ALTO IMPACTO.....	45
3.4.1	MOLIENDA HÚMEDA TRADICIONAL (CONTROL).....	45
3.4.2	MOLIENDA HÚMEDA ASISTIDA EN MOLINO PLANETARIO.....	46
3.4.3	DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BENHKEN.....	46
3.5	CAPACIDAD ENCAPSULANTE DE MATRICES DE AMARANTO OBTENIDAS POR MOLIENDA SECA Y HUMEDA.....	48
3.5.1	PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES DE HARINA Y ALMIDÓN CON β -CAROTENO.....	48
3.5.2	PREPARACIÓN DE LA MATRIZ HARINA Y ALMIDÓN CON β - CAROTENO.....	49
3.5.3	EXTRACCIÓN DEL β -CAROTENO SUPERFICIAL Y ENCAPSULADO DE LA MATRIZ.....	49
3.5.4	EFFECTOS DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE β -CAROTENO.....	51
3.5.5	EFFECTO DE LA HUMEDAD RELATIVA DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE β CAROTENO.....	52
3.5.6	DETERMINACIÓN DE LAS ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE LAS MATRICES DE AMARANTO.....	52
3.6	CARACTERIZACIÓN DE LAS PRODUCTOS OBTENIDOS.....	53
3.6.1	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL GRANO DE AMARANTO.....	53

3.6.2	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERLADO MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	53
3.6.2.1	Determinación del área aparente del grano perlado.....	53
3.6.2.2	Índice de perlado basado en el área aparente del grano perlado.....	54
3.6.3.3	Grado de dispersión (G.D) de la distribución de área aparente.....	54
3.6.3	ÍNDICE DE PERLADO EN FUNCIÓN DE LA MASA DEL GRANO.....	54
3.6.4	DETERMINACIÓN DEL CAMBIO DE COLOR DEL GRANO DEBIDO AL PERLADO.....	55
3.6.5	DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS DE LAS FRACCIONES DE MOLIENDA.....	55
3.6.6	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES DE MOLIENDA.....	55
3.6.7	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE FRACCIONES DE MOLIENDA.....	56
3.6.8	DIFRACTOMETRIA DE RAYOS-X (DRX) DE FRACCIONES DE MOLIENDA.....	56
3.6.9	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA Y SOLUBILIDAD DE FRACCIONES DE MOLIENDA.....	58
3.6.10	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) DE LAS FRACCIONES DE MOLIENDA.....	58
3.6.11	PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS FRACCIONES DE MOLIENDA.....	59
3.6.12	MICROSCOPIA DEL ALMIDÓN.....	60
3.6.12	ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE.....	60
3.6.13	DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD MOLECULAR POR MEDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	61
3.5.14	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
4.	RESULTADOS.....	63
4.1	MOLIENDA ABRASIVA.....	63
4.1.1	ENSAYOS PRELIMINARES DE PERLADO. DETERMINACIÓN DEL RANGO OPERATIVO.....	63
4.1.2	SELECCIÓN DEL RANGO DE HUMEDAD.....	64
4.1.3	SELECCIÓN DEL RANGO DE LA CARGA DEL MOLINO.....	64
4.1.4	SELECCIÓN DEL TIEMPO DE PERLADO.....	64
4.1.5	DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN.....	67
4.2	MOLIENDA SECA DE ALTO IMPACTO.....	78
4.2.1	ENSAYOS PRELIMINARES.....	78
4.2.2	MODELADO DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO POR MEDIO DEL MODELO DEL ROSIN-RAMLER-BENNET (RRB).....	79

4.2.3	DISEÑO EXPERIMENTAL RED DE DOEHLERT.....	82
4.2.4	EFFECTOS DE LAS CONDICIONES DE PROCESO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	84
4.2.5	EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE PROCESO EN LA ENERGÍA DE MOLIENDA.....	88
4.2.6	RELACIÓN ENTRE LA ENERGÍA DE MOLIENDA Y EL TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	90
4.3	CARACTERIZACION DE LAS HARINAS OBTENIDAS MEDIANTE MOLIENDA ABRASIVA Y DE ALTO IMPACTO.....	92
4.3.1	CONTENIDO DE LÍPIDOS, PROTEÍNA Y CARBOHIDRATOS DE LAS FRACCIONES FA Y FLP OBTENIDAS POR MOLIENDA ABRASIVA Y DE IMPACTO.....	92
4.3.2	CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA FT-IR DE LAS FRACCIONES FA Y FLP OBTENIDAS POR MOLIENDA ABRASIVA Y DE IMPACTO.....	93
4.3.3	DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS HARINAS OBTENIDAS POR MOLIENDA DE ALTO IMPACTO DE LA FRACCIÓN FA.....	98
4.3.4	PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN DE LAS HARINAS OBTENIDAS POR MOLIENDA DE ALTO IMPACTO DE LA FRACCIÓN FA.....	99
4.3.5	COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LAS HARINAS OBTENIDAS POR MOLIENDA DE ALTO IMPACTO DE LA FRACCIÓN FA.....	101
4.3.6	CALORIMETRÍA DE LAS HARINAS OBTENIDAS MEDIANTE MOLIENDA DE ALTO IMPACTO DE LA FRACCIÓN FA.....	104
4.3.7	DETERMINACIÓN DE LA CRISTALINIDAD POR DIFRACCIÓN DE RAYOS-X Y ESPECTROSCOPIA FT-IR DE LAS HARINAS OBTENIDAS POR MOLIENDA DE ALTO IMPACTO DE LA FRACCIÓN FA.....	107
4.4	MOLIENDA HUMEDA DE LA FRACCION AMILACEA ASISTIDA MEDIANTE MOLINO DE ALTO IMPACTO.....	112
4.4.1	DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BENHKEN.....	112
4.4.2	EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE MOLIENDA SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL ALMIDÓN.....	115
4.4.3	CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN OBTENIDO POR MOLIENDA ALCALINA ASISTIDA EN UN MOLINO DE ALTO IMPACTO.....	119
4.5	CAPACIDAD ENCAPSULANTE DE MATRICES DE AMARANTO OBTENIDAS POR MOLIENDA SECA Y HÚMEDA	122
4.5.1	EVALUACIÓN DE LAS MATRICES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE β -CAROTENO.....	122
4.5.2	EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE ESTABILIDAD TÉRMICA DEL β -CAROTENO ENCAPSULADO EN LA FRACCIÓN AMILÁCEA MOLIDA (FA/BM).....	131

4.5.3	EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD DEL β -CAROTENO ENCAPSULADO EN LAS MATRICES AMILÁCEAS MOLIDAS ALMACENADAS A DIFERENTES HUMEDADES RELATIVAS.....	136
5.	CONCLUSIONES.....	149
6.	BIBLIOGRAFIA	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL GRANO DE AMARANTO

1.1.1 Historia y actualidad

El amaranto (*Amaranthus spp.*) es una dicotiledónea que tuvo enorme importancia en la alimentación de los pueblos de la América Precolombina. El amaranto, nombre derivado del griego que significa "inmortal" e "inmarchitable", es uno de los más antiguos cultivos alimenticios conocidos. Alimento de recolectores y cazadores tanto en América del Norte como del Sur antes de la práctica de la agricultura doméstica, el amaranto fue adoptado separadamente en los Andes y en México junto con el maíz, el frijol y el calabacín.

Las muestras arqueológicas del grano de amaranto, halladas en Tehuacán, Puebla, datan del año 4.000 a.C., e indican que probablemente se originó en América Central y del Sur. Los registros históricos revelan que el amaranto era consumido tanto en forma vegetal (sus hojas y tallo) como cereal, y la producción de este grano estuvo en su máximo apogeo durante los períodos Maya y Azteca en Centroamérica. La civilización Maya probablemente fue una de las primeras en usar el amaranto como cultivo de alto rendimiento, mientras las civilizaciones Azteca e Inca de Perú tardaron más en reconocer su importancia.

El amaranto pertenece a la familia Amarantácea, cuyas hojas y semillas son consumidas como alimento en varias partes del mundo. La planta presenta una florescencia tipo panoja, siendo por eso considerada como un falso cereal. Las especies de amaranto más cultivadas y que fueron recomendadas por la NASA son: *Amaranthus cruentus* (México, África, Caribe, Asia y América del sur), *Amaranthus caudatus* (América de Sur) y *Amaranthus hypochondriacus* (India, México y Estados Unidos) (Breene., 1991).

Los primeros estudios que se realizaron sobre el amaranto fueron hace 30 años en Estados Unidos, logrando obtener información respecto a sus propiedades nutricionales y características agronómicas de su cultivo (Zanaro, 2012). En los últimos años se han incrementado las investigaciones sobre el uso de los diferentes componentes del grano, ya que ha mostrado excelentes propiedades funcionales para uso industrial y comercial. A partir de los '80, se ha renovado el interés por el amaranto debido a que posee

propiedades interesantes y únicas, como por ejemplo su bajo contenido de amilosa, menor tamaño en el gránulo (menor a 3µm), contenido y calidad proteica (Lorenz., 1981). El amaranto no es genéticamente modificado y rara vez causa alergias debido a la ausencia de gluten. Por lo tanto, podría ser utilizado en alimentos en individuos sensibles a las alergias, como los pacientes celíacos y como ingrediente en formulaciones especiales para infantes (Coulter y Lorenz., 1990). Por otra parte, en muchos países de América del Sur hay una presión económica para reducir las importaciones de alimentos, lo que fomentaría la producción local y el consumo de amaranto. Actualmente, los agrónomos, nutricionistas y profesionales de la industria alimentaria están evaluando al amaranto en relación al genotipo, condiciones agronómicas y de procesamiento industrial con el fin de fomentar aún más el cultivo como un grano especial en América Latina así como en Europa y Asia (Amaranth future food., 2000). Con el fin de ser usado regularmente por la industria, la producción tiene que cumplir con la cantidad y calidad requeridas por la industria manufacturera de alimentos; se espera que con el interés del sector industrial privado y el apoyo de políticas gubernamentales, el grano de amaranto entre a competir con los cereales en el mercado de la alimentación humana y animal.

El principal productor del grano es China con 150 mil hectáreas cultivadas, seguida por India y Estados Unidos de América. Si bien no se tienen cifras exactas, se cuenta con información que permite inferir que entre los países que participan en el comercio mundial de Amaranto, los más importantes en América latina son: Argentina que tiene una participación del 49%; en segundo lugar de importancia está Perú con 45%; en el tercer lugar se encuentra México con 3%, seguido de Bolivia con 0,4%, y Ecuador con 0,3% (Zanaro, 2012)

El Amaranth Future Food es un proyecto que subvenciona la Unión Europea e integran seis países, uno de los cuales es la Argentina. Su objetivo es incrementar el uso y productividad del amaranto para realizar una contribución significativa a la seguridad alimentaria, a la diversificación de la agricultura y a la generación de ingresos. En ese marco, se llevan a cabo experiencias relacionadas con mecanismos de resistencia a plagas, salinidad y sequía, control de malezas, usos industriales y aspectos funcionales en alimentos y beneficios para la salud. Por ejemplo, en suelos argentinos y del sur europeo se cultivan 18 variedades para identificar los mejores genotipos que se desarrollan en los diferentes suelos.

El contenido porcentual de proteína, grasa y fibra del amaranto es superior en comparación a los cereales comunes, como trigo, maíz, arroz integral y avena. Además de esto, la proteína de amaranto es considerada de mayor calidad debido a su contenido de lisina y otros aminoácidos esenciales, que son deficientes en los cereales (Teutonico y Knorr., 1995; Bressani y col., 1989). Con respecto a la composición de lípidos, Yanez y col. (1994) reportaron grandes proporciones de ácido linoleico y ácido esteárico, los cuales proporcionan una fuente importante de ácidos grasos insaturados. El grano de amaranto presenta un contenido de almidón cercano al 62% lo cual hace que sea una fuente potencial de almidón para ser usado como ingrediente en la formulación de alimentos (Perez y col., 1993).

1.1.2 Amaranto, ¿posible alimento funcional?

El concepto de alimento funcional está en estrecha relación con el paradigma de nutrición y salud. Entre las propiedades de los alimentos que le aportan características de “alimento funcional” está la actividad antioxidante, la actividad hipocolesterolémica y la actividad hipoglucemiante. En las últimas décadas se le ha dado una gran importancia al aporte de compuestos bioactivos que puede tener un alimento. Estos compuestos se definen como componentes de los alimentos que condicionan actividades fisiológicas y celulares que resultan en efectos beneficiosos para la salud y no se clasifican como nutrientes, es decir no son esenciales para la vida. Normalmente, están en pequeñas concentraciones en los alimentos y actúan como antioxidantes, inhibidores o inductores de actividades enzimáticas, actividades de receptores o de expresión de genes, entre otras. Los compuestos bioactivos tienen un gran potencial para la fortificación de alimentos (Kahlon y Smith., 2004). Los compuestos bioactivos dan origen a lo que se conoce como alimentos funcionales, los cuales se definen como “alimentos procesados que demuestran mejorar una o más funciones del organismo, además del valor nutritivo propio de los mismos” (Cavazos y Gonzalez., 2013). Estos alimentos son importantes en la medida que presenten beneficios directos y comprobables al individuo que los consuma. Estos beneficios pueden ser tanto preventivos, como reducir el riesgo de una enfermedad; o reactivos, mejorando el estado de salud del individuo (Cavazos y Gonzalez., 2013). Existe un cierto escepticismo entre los consumidores en relación a ellos, debido principalmente a la veracidad de las propiedades que se les atribuyen y al inadecuado control de dichas propiedades, y son

pocos los países que tienen legislación adecuada al respecto. Para aumentar la confianza de los consumidores en los alimentos funcionales, se están haciendo esfuerzos a nivel mundial por hacer pruebas clínicas que entreguen información fidedigna y demuestren sus cualidades saludables (Arvanitoyannis y Van Houwelingen-Koukaliaroglou., 2005). En el caso del amaranto, estas propiedades funcionales se asocian a la fracción lipídica, a la fracción fenólica y la fibra dietética, es decir al contenido de ciertos tipos de lípidos, como el escualeno y los fitoesteroles, y de polifenoles existiendo numerosos trabajos en la bibliografía que demuestran sus propiedades antioxidantes (Cai y col., 2006).

1.1.3 Condiciones agronómicas

El amaranto es una planta de ciclo fotosintético C4 con alta plasticidad, que se adapta a diferentes tipos de clima y suelo. El buen rendimiento del grano depende de las condiciones de temperatura, precipitación, fecha de siembra y del tipo de suelo en que se siembre (Alejandre y Gómez., 1986). El amaranto de la especie *A. cruentus* L., presenta una buena germinación y desarrollo a temperaturas intermedias sobre los 29° C. El amaranto de la especie *A. hypochondriacus* L., presenta su mejor adaptación en localidades de clima templado con temperaturas intermedias sobre los 14° C (Reyna., 1983).

La producción de grano de amaranto puede incluso lograrse en condiciones secas y calientes con un promedio mínimo de 200 mm de lluvia al año, siendo la planta tolerante a la sequía; su crecimiento es rápido durante la época calurosa y requiere mucho menos agua que el cultivo del maíz (Aguilar., 1978).

Una de las causas que influyen negativamente en el rendimiento del grano en el amaranto, es el crecimiento secundario, descrito por Grubben y Sloten (1981), el cual se manifiesta cuando las precipitaciones son menores a los 150 mm, o superiores a los 400 mm, mediante la formación de pequeñas hojas en las flores substituyendo a la formación de grano, lo que causa disminución del rendimiento en el periodo del crecimiento reproductivo.

1.1.4 Estructura del grano

El amaranto presenta un grano pequeño, de cerca de 0,9 a 1,7 mm. Las semillas son lisas, brillantes y de color amarillo crema, doradas y hasta negras (**figura 1**), poseen notables propiedades nutricionales y se considera un pseudocereal (Breene., 1991). La **figura 2** muestra en detalle dos cortes de la semilla donde se puede apreciar la distribución de las diferentes partes del grano.

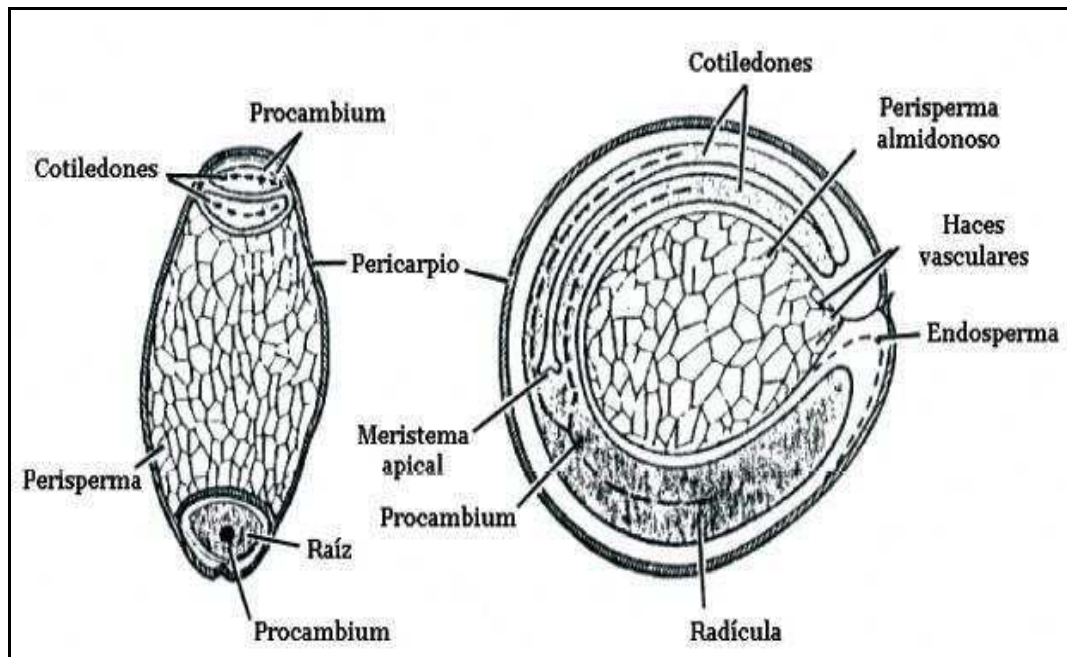
Figura 1. Semillas de amaranto *s.p*



El pericarpio es una capa de células pigmentadas y cumple la función de protección de la semilla. Está fuertemente asociada con el perisperma, no observándose paredes celulares entre ambas estructuras. El embrión está unido a las células de la gruesa pared del endospermo.

El endospermo se consume durante el desarrollo del embrión hasta casi desaparecer en la semilla madura. La mayor porción del endospermo remanente está unida al pericarpio alrededor de la radícula y alrededor de las puntas de los cotiledones. El embrión de forma anular, se localiza periféricamente al perisperma, sus células varían en forma y tamaño, conteniendo cuerpos esféricos incrustados en una matriz esponjosa.

Figura 2. Estructura morfológica del grano de amaranto.



Adaptada de Zanaro, (2012)

Mientras que, el perisperma constituye el tejido de almacenamiento, sus células presentan pequeños gránulos poliédricos que contienen almidón formado por amilosa y amilopectina. Debido a la estructura y morfología del amaranto, es posible obtener diferentes fracciones con distinta composición, por medio de diferentes métodos de molienda, con el fin de diversificar el uso industrial del grano.

1.1.5 Composición química del grano

1.1.5.1 Proteínas de amaranto

Se ha estudiado el contenido proteico de algunas especies de amaranto: la especie *A. cruentus* mostró un contenido proteico entre 13 y 18% mientras que en *A. Hypochondriacus* fue de 18% (Irving y col., 1981). Esta variación en el contenido de proteínas entre especies se debe a factores tales como: diferentes cultivares, condiciones ambientales, región de cultivo, estación del año, tratamientos de fertilización (Saunders y Becker., 1984). Según Becker y col. (1981), el factor de conversión del nitrógeno para *A. edulis* fue de 5,85; mientras que para otras especies los valores fueron entre 5,2 y 6,25. Una de las características más importantes del amaranto, es su gran contenido de proteínas que puede oscilar entre (14 y 19% p/p) ricas en triptófano y metionina,

además de poseer un balance muy equilibrado de aminoácidos esenciales no presenta deficiencia en lisina (0,34 gLys/g N), aminoácido que comúnmente es limitante en los cereales (Teutonico y Knorr., 1995; Bressani., 1989). A lo anterior se suma una alta eficiencia proteica (P.E.R entre 1,5 y 2,1) y digestibilidad de 74,2% (Paredes-Lopez., 1989). Las principales fracciones proteicas presentes en el amaranto son albúminas, globulinas y glutelinas. Las dos últimas constituyen las principales proteínas de reserva del grano las cuales se encuentran ubicadas en el embrión y endospermo. Respecto a la fracción de globulinas encontramos las de tipo 7S (minoritarias) y 11S y las globulinas-P características del amaranto (Avanza y Añon., 2001).

1.1.5.2 Lípidos de amaranto

El contenido de lípidos en el grano de amaranto varía entre 4,8 a 8,1% según Saunders y Becker (1984), aunque se han encontrado especies con contenidos de lípidos superiores como *A. spinosus* (17%) y *A. tenuifolius* (19,3%) (Singhal y Kulkarni., 1988). El ácido linoleico es el ácido graso insaturado que se encuentra en mayor proporción, seguido por los ácidos oleico y palmítico. El aceite de amaranto presenta una gran insaturación, cerca del 70% corresponde al ácido linoleico, 20% ácido esteárico y 1% ácido linolenico. Tanto la proteína como los lípidos se encuentran generalmente en el germen del grano (Betschart y col., 1981).

1.1.5.3 Otros nutrientes

Otro nutriente que ha cobrado importancia actualmente es la fibra dietaria, la cual se encuentra en el grano de amaranto en cantidades que van desde 9 al 16%, que es más fina y blanda que la del trigo (Tosí y col., 2000). El grano presenta además altas concentraciones de calcio, fósforo, hierro, potasio, zinc y vitaminas del complejo B, así como, niveles bajos de factores anti-nutricionales, haciendo de este grano un producto de gran interés para la formulación de alimentos (Tosí y col., 2000).

1.1.5.4 Almidón de amaranto

El almidón es el constituyente principal de la alimentación mundial, debido a esto es de gran importancia alimenticia, además es una importante materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos procesados. Se calcula que la producción mundial de almidón está cerca de 39,4 millones de toneladas métricas, siendo extraídas principalmente desde el maíz, el trigo y la papa; cerca del 50% del almidón total, se utiliza en productos alimenticios (Calzetta, 2007).

El almidón (48%-62%) es el principal componente del grano de amaranto y está compuesto principalmente por dos bio-macromoléculas, amilosa y amilopectina (**figura 3**). La proporción entre ambas varían según la especie siendo el grado de amilosa dependiente del grado de maduración (Calzetta, 2007). La amilosa es un biopolímero esencialmente lineal que presenta uniones alfa-1-4-glucosídicas con pocas ramificaciones en los enlaces alfa-1-6-glucosídicas (**figura 4**), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón de Daltons. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilos están situados en el exterior de la hélice concediéndole un carácter hidrofílico (**figura 4**). La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa, los almidones de maíz comúnmente conocidos como ricos en amilosa que existen comercialmente poseen contenidos aparentes de masa alrededor del 52% y del 70-75% (Marcone y col., 2001).

La **amilopectina** es un polisacárido que se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular parecida a la de un árbol: las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 25-30 unidades lineales de glucosa (ver **figuras 3** y detalle en **figura 4**). La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes. Algunos almidones están constituidos exclusivamente por amilopectina y son conocidos como céreos. La amilopectina en presencia de agua caliente proporciona soluciones claras y de alta viscosidad, mientras que la amilosa tiene una tendencia a la retrogradación (Belitz y Grosch., 1988). En la amilopectina se pueden distinguir 3 tipos de cadenas: a)

cadena corta de amilosa sin grupos OH en el carbono 6; b) cadenas con uno o más grupos OH en el carbono 6; c) cadenas con grupo reductor.

Figura 3. Estructura de la amilopectina y amilosa.

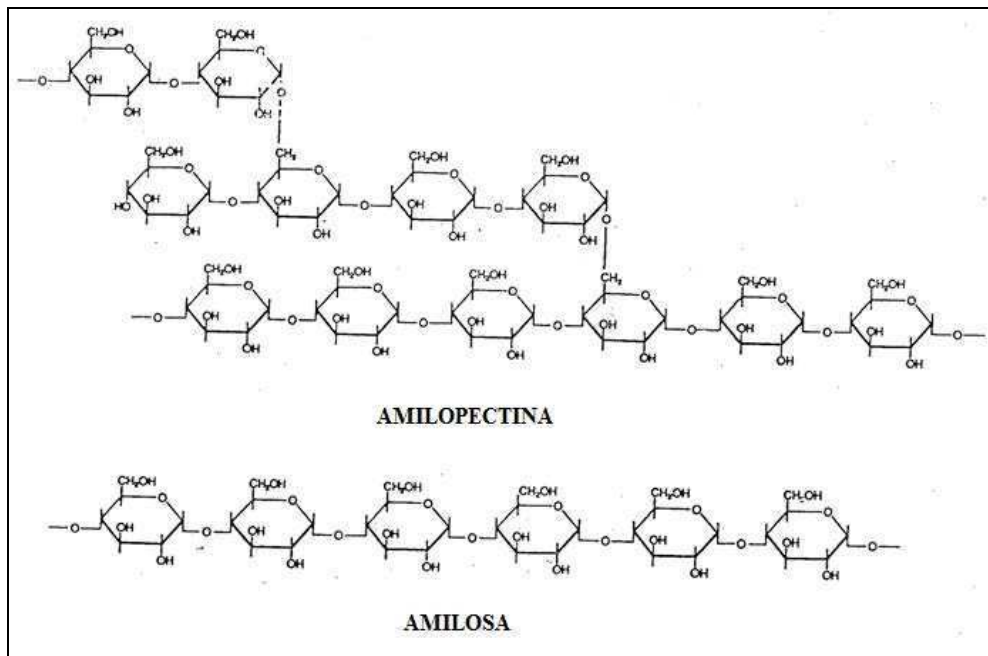
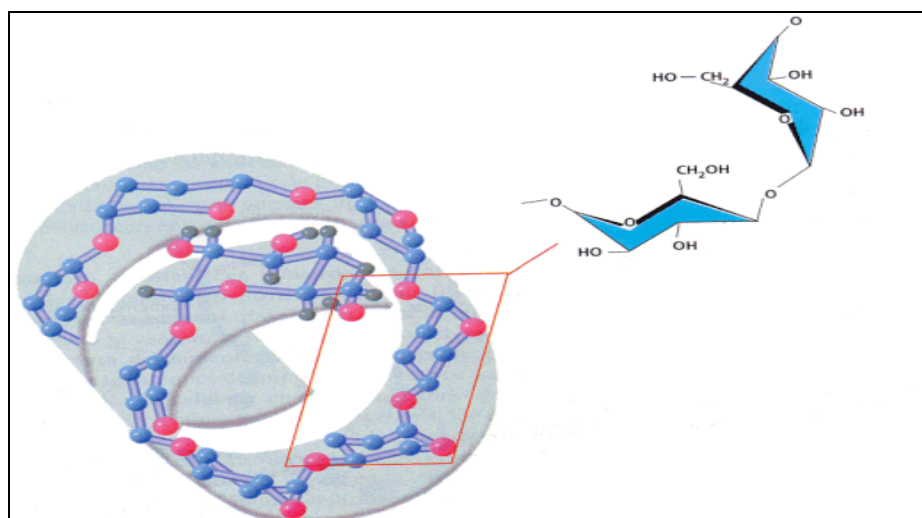


Figura 4. Estructura helicoidal de la amilosa



Las moléculas de amilosa y amilopectina están asociadas entre sí por medio de puentes de hidrogeno formando regiones cristalinas. Entre estas regiones cristalinas existe regiones amorfas, en las cuales las moléculas no están organizadas (**figura 5**).

La región cristalina mantiene la estructura del gránulo y controla el comportamiento del almidón en presencia de agua. Es por este motivo que el gránulo de almidón tiene una capacidad limitante de absorción de agua, aunque se compone de polímeros solubles o parcialmente solubles.

Los gránulos de almidón (**figura 6**) son de tamaño muy pequeño con un diámetro de 0,5-2 μ m (Marccone y col., 2001), comparados a los del arroz, 3-8 μ m (Champagne., 2004) y de menor tamaño que los encontrados en la papa, 100 μ m (Breene., 1991).

Los gránulos son de forma esférica o poligonal (Saunders y col., 1984), con rangos de temperatura de gelatinización entre los 65°C y 83°C, los cuales tienden a formar geles débiles debido a su bajo contenido en amilosa dependiendo de la especie (Radosavljevic y col., 1998).

La mayoría de las variedades cultivadas de amaranto son de origen ceroso, con cerca del 98 al 100 % de amilopectina; sin embargo algunos autores han encontrado contenidos de amilosa cercanos al 20%.

Lorenz (1981) observó que el almidón de *A hypochondriacus* presentó un contenido de amilosa del 7,2 mientras que Becker y col (1981) describieron valores de amilosa que variaban entre 0% y 22% para el *A hypochondriacus* y de 5 a 7% para *A caudatus*, mientras que Calzetta (2007) observó valores de 7 y 6% de amilosa en *A cruentus*.

Las características anteriores hacen que el almidón de amaranto juegue un papel importante en el desarrollo de la industria de alimentos como espesante para sopas, sustituto de grasa en las salsas y en la fabricación de productos panificados en general así como en la elaboración de pastas (Kong y col., 2008). Mientras que en el sector no alimentario se utiliza como aditivo en la elaboración de cosméticos, films biodegradables y papel (Choi y col., 2004)

Figura 5. Estructura de la amilopectina. A: molécula de amilopectina. B: disposición de las regiones cristalinas y amorfas. C: orientación de las moléculas de amilopectina en un corte de un gránulo de almidón. D: detalle de una región de doble hélice. Farroni, 2012

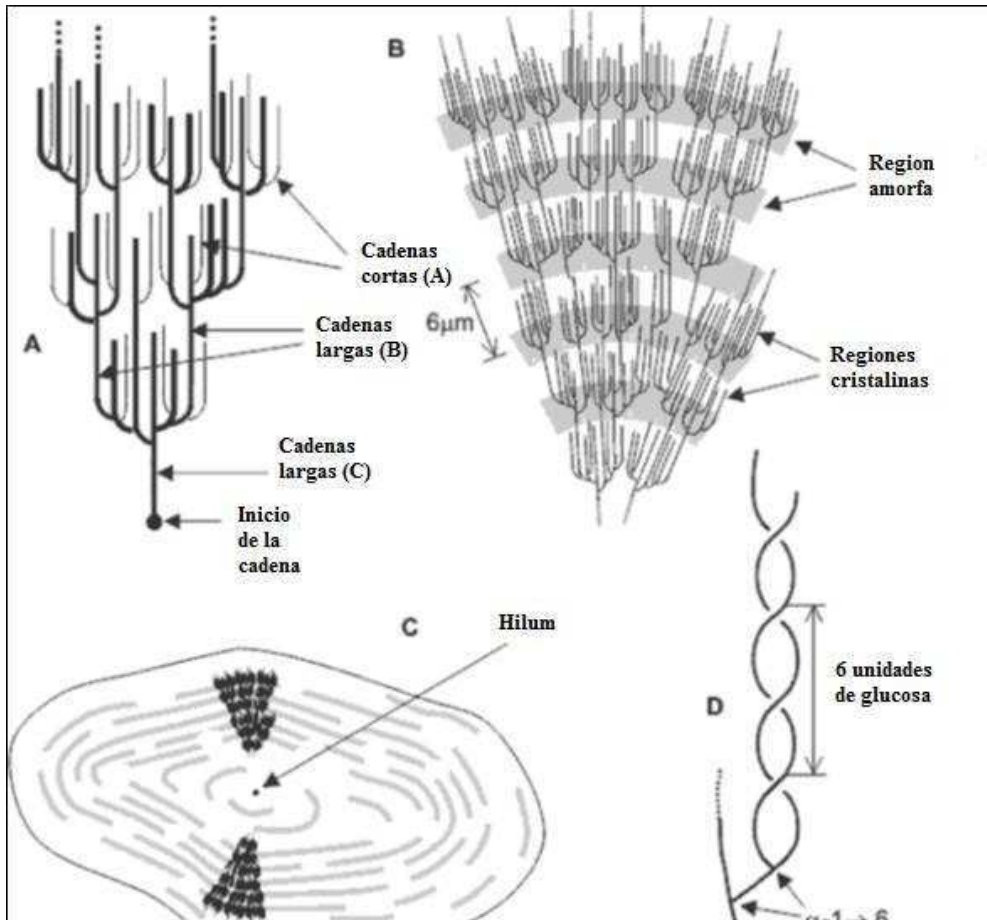
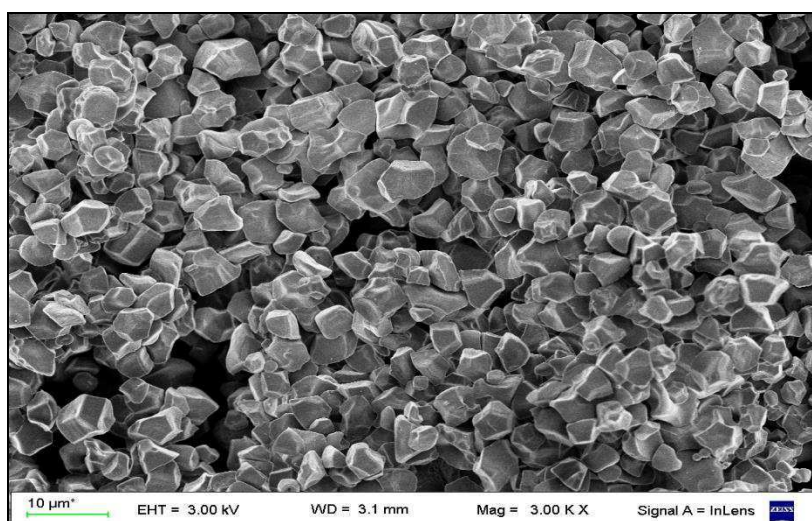


Figura 6. Gránulos de almidón de amaranto.



1.2 MOLIENDA SECA Y HUMEDA DEL GRANO DE AMARANTO

La molienda es una operación unitaria que reduce el volumen promedio de las partículas en una muestra sólida. La reducción se lleva a cabo dividiendo o fraccionando la muestra por medios mecánicos hasta el tamaño deseado. Los principios mecánicos de reducción más empleados en las máquinas de molienda son compresión, impacto, fricción de cizalla y cortado. En los cereales y semillas el propósito de la molienda es la obtención de productos intermedios que puedan ser utilizados posteriormente en la fabricación de alimentos (Zanaro, 2012).

La molienda se puede realizar por vía seca o húmeda, en la molienda seca se busca separar las partes estructurales del grano: endospermo, germen y salvado (**figura 2**), mientras que en la molienda húmeda se utilizan aditivos químicos en solución acuosa con el objetivo de separar los componentes del grano: almidón, proteína, aceite y fibra. A nivel industrial, la molienda húmeda se aplica básicamente a pocos cereales, entre ellos está el maíz, el trigo y el arroz (Calzzeta., 2006). En el caso específico del grano de amaranto no se dispone hasta el momento de un método eficaz de molienda húmeda que permita la industrialización a gran escala. Sin embargo, a nivel de laboratorio se han desarrollado estudios con éxito que han permitido aumentar el conocimiento tecnológico del grano y que en algunos casos se llevaron a escala piloto.

Los avances en la molienda húmeda de amaranto, comenzaron con el estudio de la estructura y morfología del grano de amaranto para identificar las diferentes fracciones del grano y su composición característica. Betschart (1981) procesó el grano de amaranto en un equipo Strong-Scott para el perlado de cebada y obtuvo una fracción con un contenido de proteína superior a la de harina de grano entero. Myer y Fox (1997) propusieron adaptar el proceso de molienda húmeda de maíz al amaranto y estudiaron el efecto del perlado del grano en los rendimientos de las fracciones obtenidas (proteína, almidón y fibra) en las diferentes etapas del proceso.

En este estudio se utilizaron 3 muestras, el grano entero (control), grano totalmente perlado y una mezcla 50:50 de grano entero y grano perlado. El amaranto perlado fue preparado utilizando una perladora de cebada Strong-Scott, luego fueron macerados en una solución de álcali (1% NaOH, pH =13) por 24 horas con agitación suave. El almidón recuperado tenía una pureza del 98%, mostrando una mayor recuperación cuando se utilizó el grano entero, debido a las pérdidas por lixiviación que ocurrían con

el grano perlado. Los resultados también mostraron que la recuperación de germen está comprometida durante el proceso. Mediante este procedimiento los autores mencionados lograron recuperar un 52% del almidón presente.

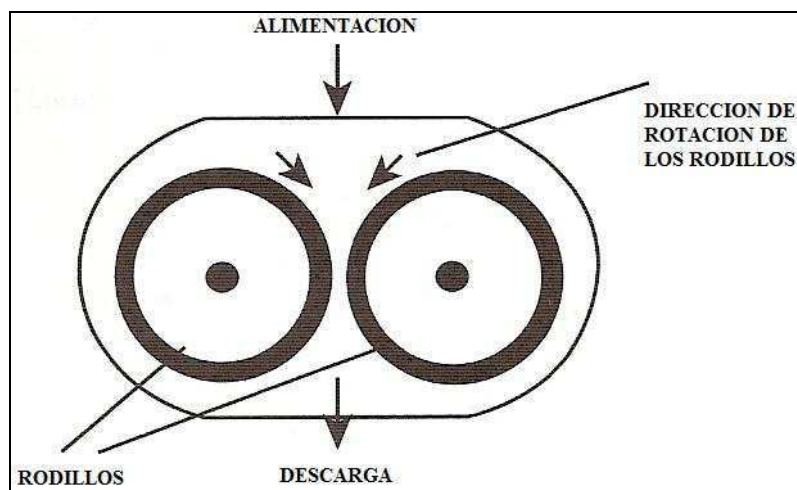
Se ha propuesto la maceración en soluciones ácidas o alcalinas a diferentes temperaturas entre 25-50°C, variando el tiempo de remojo del grano en la solución con el objetivo de aumentar el rendimiento del almidón (Pérez y col., 1993; Calzetta y col., 2006). Los diversos tratamientos utilizados para la aislación de los diferentes compuestos químicos del grano de amaranto han sido adaptados y aplicados por varios autores (Myers y Fox., 1994; Mundliger., 1998; Radosavljevic y col., 1998; Malinski y col., 2003). Todos los autores mencionados obtuvieron resultados favorables en cuanto a la pureza del almidón en detrimento de la recuperación de la misma fracción. Estas extracciones presentaron además algunos inconvenientes como la sedimentación de proteínas y fibras muy finas dentro de la fracción amilácea, contaminándola debido a que se procesa el grano entero. Otro inconveniente relevante es el asociado al tratamiento de efluentes debido al uso de agentes químicos, lo que incide considerablemente en el aumento de los costos de proceso. Por esta razón Tosi y col (2000) desarrollaron un prototipo de molino para la molienda diferencial de amaranto en escala piloto, con base a un método abrasivo que consigue desprender en forma selectiva las distintas partes anatómicas del grano, de diferente composición. En condiciones de trabajo de régimen continuo se producen dos corrientes de molienda, lo que permite obtener, por vía exclusivamente física después del tamizado y de una clasificación neumática, una harina de alto contenido proteico y otra enriquecida en almidón. Este tipo de molienda diferencial requirió el acondicionamiento de la humedad del grano a fin de adecuar su gradiente o perfil, disminuyendo su valor en el exterior pero manteniendo el nivel original en el interior a fin de separar limpiamente las partes del grano. Los mayores rendimientos de harina de alta proteína se obtuvieron con el grano acondicionado a 90°C durante 3 minutos y a 70°C durante 7 minutos, siendo el contenido de proteína de la fracción enriquecida de 40%. Más recientemente Lindeboom (2005) utilizó un molino de laboratorio que opera mediante abrasión tangencial (TADD) con el fin de eliminar el salvado de las semillas de quínoa y obtuvo dos fracciones con diferente contenido proteico. El procedimiento requirió de un acondicionamiento previo que consistió en atemperar las semillas a 15,5% b.s durante 16 horas, para facilitar la remoción del salvado. Por medio de este proceso se obtuvieron dos tipos de almidón: el tipo A con una pureza del 97% y el tipo

B con una pureza del 53%, de la misma manera se obtuvieron dos fracciones proteicas: la tipo A con un 77% de proteína y la tipo B con un 45%. El éxito encontrado en la combinación de la molienda seca y húmeda para obtener diferentes fracciones del grano con aplicaciones en la industria alimentaria, ha despertado en particular el interés en el procesamiento de los pseudocereales.

1.2.1 Tipos de molinos

La elección del equipo para llevar a cabo una operación de molienda depende de las siguientes variables: mecanismo de stress (tensión mecánica), tamaño del material de entrada y salida, propiedades del material, características del medio donde se realiza la molienda, la capacidad del equipo y su relación con otras operaciones unitarias. En el molino de rodillos (**figura 7**) el mecanismo de stress se aplica en la parte superior e inferior del material, provocando la atrición del material con el recipiente y de esta manera logrando reducir el tamaño de partícula. En los molinos de martillo el mecanismo de stress es aplicado en la superficie del material a altas velocidades (10 – 200 m/s), lo cual provoca el impacto entre el material y el recipiente (**figura 8**) (Rhodes, 2008).

Figura 7. Molino de rodillo



Existen equipos como el molino de bolas, en el cual, el mecanismo de stress se aplica mediante atrición e impacto. En este tipo de molinos, se pueden llevar a cabo moliendas

por vía seca y húmeda obteniendo partículas finas menores a 50 μm (Rhodes, 2008) (figura 9). Recientemente, se han desarrollado nuevos modelos de molinos a bolas conocidos como los molinos planetarios, los cuales simulan la órbita de un planeta alrededor de un eje.

Figura 8. Molino de martillos.

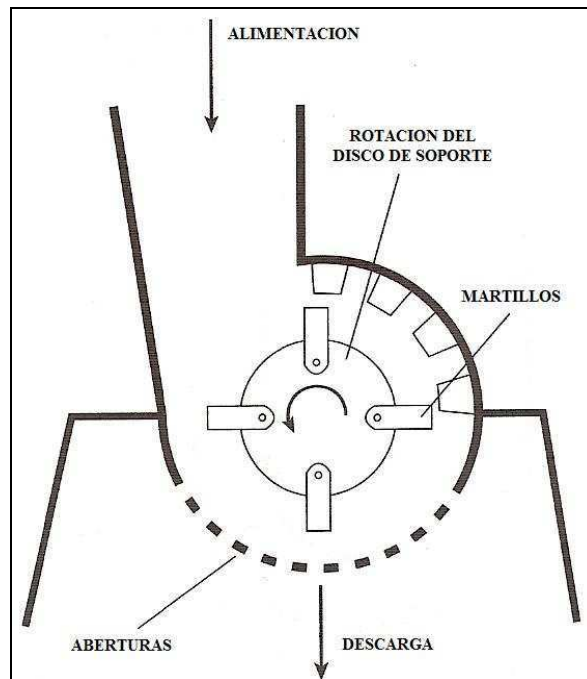
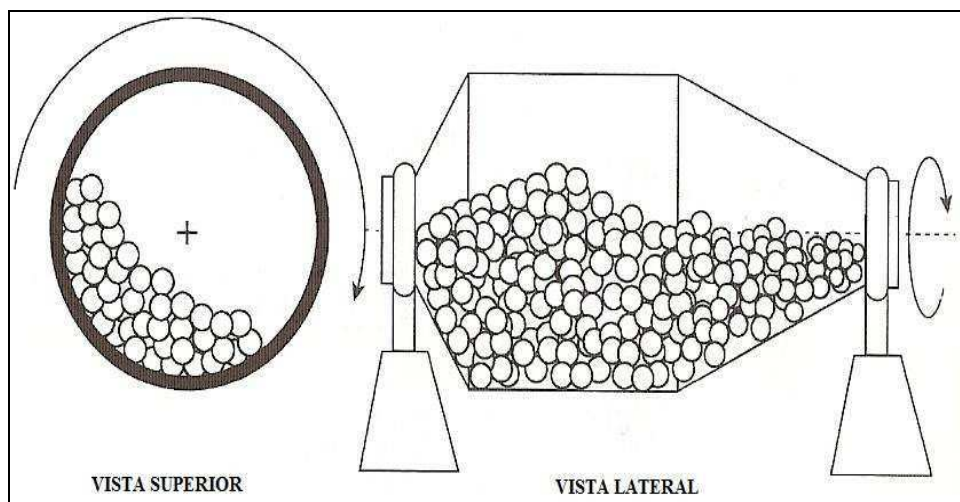
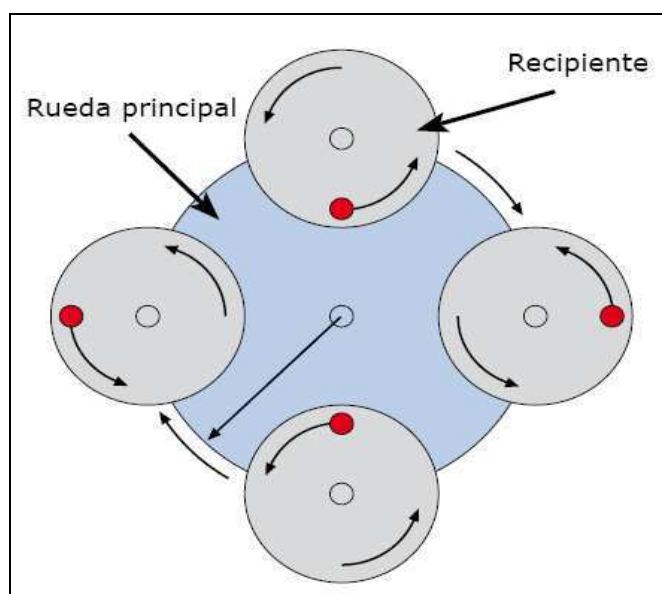


Figura 9. Molino de bolas



Los molinos de bolas planetario hace honor a su nombre asemejando su rotación sobre un eje de la misma manera que lo hace un planeta (**figura 10**). Este movimiento genera una diferencia de velocidades entre el recipiente y las bolas, lo cual se traduce en una acción combinada de fuerzas de choque y fricción que libera una gran cantidad de energía dinámica. La gran interacción de dichas fuerzas es responsable del alto grado de trituración que se puede alcanzar en este tipo de molinos (<http://www.retsch.es>)

Figura 10. Representación del giro del molino planetario



Tomada de (www.retsch.es)

Recientemente este tipo de molinos se han comenzado a utilizar en el campo alimentario, más específicamente en la modificación física del almidón. Los métodos tradicionalmente empleados para modificar la estructura cristalina del almidón se basan en métodos químicos, como lo son: acidólisis (Nakazawa y Wang., 2003), oxidación (Wang y Wang., 2000), procesos de oxidación enzimáticos (Zhang y Oates., 1999) generando altos costos en las etapas de manejo de efluentes en los procesos de producción. Por lo tanto la activación mecánica por medio del molino planetario surge como una herramienta útil en la modificación de la estructura del almidón, reduciendo sus regiones cristalinas e incrementando su reactividad para algunos propósitos (Huang y col, 2007; Liu y col., 2011).

1.2.2 Modelos predictivos en molienda

1.2.2.1 Modelos de predicción “energía-tamaño”

A pesar del gran número de estudios en el ámbito de los sistemas de fractura no existe una única fórmula conocida que prediga eficazmente la energía requerida para reducir un material desde un tamaño inicial de partícula a otro menor. Sin embargo existen tres modelos semiempíricos, cada uno eficaz en su rango de trabajo, cuyas predicciones pueden aproximarse satisfactoriamente a los valores experimentales de los ensayos de molienda. A estos tres modelos clásicos se los conocen como leyes de molienda y se representan por medio de las ecuaciones de Rittinger, Kick y Bond (Rhodes, 2008). Estas leyes pueden ser expresadas mediante la ecuación general propuesta por Holmes (1957) y Hukki (1961) (**ecuación 1**).

$$\frac{\partial E}{\partial x} = -C(1/x^{n_1}) \quad \text{Ec. 1}$$

Cuando $n_1 = 2$, $C = C_r$ (Rittinger); si $n_1 = 1$, $C = C_k$ (Kick); si $n_1 = 1,5$; $C = C_b$ (Bond)

Sobre la base de este modelo, distintos autores han sugerido que para predecir el requerimiento energético de partículas grandes se debe utilizar la ecuación de Kick, para muy finas el modelo de Rittinger y para partículas de tamaño intermedio la ley de Bond (Rhodes, 2008).

Como los molinos de bolas son diseñados para obtener partículas finas, la ecuación que se debe utilizar para modelar el consumo energético en función del tamaño de partículas es la Ley de Rittinger (**ecuación 2**).

$$Wr = Cr \left(\left(\frac{1}{B} \right) - \left(\frac{1}{A} \right) \right) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde W es energía de molienda por unidad de masa en kJ/kg, Cr es el coeficiente de molienda de Rittinger, A es el tamaño de partícula del material a moler al momento de la carga y B es el tamaño de partícula después de molido.

Como es sabido en las operaciones de molienda solo se emplea un 2% de la energía para la trituración del material, este porcentaje produce la aparición de nuevas superficies, el resto se pierde en la deformación plástica de las partículas, deformación de las partes metálicas de la maquinaria, fricciones entre partículas, rozamiento de las partículas con las paredes de la maquinaria, calor, ruido y vibraciones.

Las desviaciones que presentan en la práctica las leyes de molienda se deben a (Rhodes, 2008):

- a) Se considera que la desintegración produce partículas de igual forma que las iniciales (isostenia), es decir, que al desintegrar partículas de forma cúbica se producen cubitos o si se parte de esferas se producen esferitas. Este principio no es válido.
- b) Se supone que los materiales son isótropos (igual resistencia en todas direcciones) sin embargo son anisotrópicos.
- c) No se considera que los productos a desintegrar pueden tener grietas superficiales (lugares donde se comienza a desintegrar el material sin consumo de energía).
- d) No se tienen en cuenta ni las deformaciones elásticas, ni que el producto se mueve dentro de la máquina, lo que produce rozamientos con disipación de calor desde el material.

1.2.2.2 Modelo de distribución de tamaño

La representación gráfica de una dispersión de tamaño de partículas generalmente se describe mediante la distribución de frecuencia o/y la distribución acumulada. Este gráfico representa una distribución característica cuando se trata de alimentos en polvo. Existen diferentes funciones para simular la distribución de tamaño: el modelo de distribución normal (**Ecuación 3**), la ecuación de Gates-Gaudin-Schumann y el modelo de distribución de Rosin-Rammler-Bennett (**Ecuación 4**), entre otros (Barbosa-Cánovas., 2005).

Materiales con una *distribución normal* son relativamente raros en el área de alimentos y se encuentran principalmente en polvos obtenidos mediante procesos químicos como la condensación y precipitación. Sin embargo, la importancia de esta función, es que brinda una distribución idealizada del error basada en la suposición de que los errores elementales se combinan al azar para producir el efecto observado.

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{\frac{-1}{2}\left[\frac{x-\mu}{\sigma}\right]^2\right\}; \quad -\infty < x < \infty \quad \text{Ec. 3}$$

La ecuación (3) muestra la función de distribución normal, donde (x) es el tamaño de partícula, (μ) es el tamaño medio de partícula y (σ) es la desviación estándar de la muestra.

La ecuación de Rosin-Ramler-Bennet (RRB) fue introducida en 1933, y es ampliamente usada en la caracterización de la distribución del tamaño de partículas cuando existen apartamientos respecto de la distribución normal (Barbosa-Cánovas., 2005). Usualmente la función se presenta en términos de frecuencia acumulada e involucra dos parámetros:

$$F(x) = 1 - \exp\left(-\left(\frac{x}{x_{63}}\right)^{n_2}\right) \quad \text{Ec. 4}$$

Donde $F(x)$ es la distribución acumulada, (x) es el tamaño de partícula, (X_{63}) es el tamaño de partícula correspondiente al 63,2% de la distribución acumulada y (n_2) es definido como el índice de homogeneidad. Valores bajos de (n_2) indican una dispersión más amplia de tamaño, mientras que para valores altos de (n_2) se tiene una menor dispersión. Yan y Barbosa (1997) modelaron las diferentes funciones de distribución en varios sistemas de alimentos como: azúcar, harina de maíz y leche desgrasada, concluyendo que la aplicación de estos modelos son una buena herramienta para caracterizar la calidad y el tamaño de los diferentes polvos alimenticios.

1.3 CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR MOLIENDA SECA Y HUMEDA

La obtención de fracciones del grano de amaranto con diferente composición química y la modificación de estas mediante los procedimientos de molienda, genera la necesidad de caracterizarlos fisicoquímicamente para conocer las nuevas propiedades adquiridas por estas fracciones, y de esta manera determinar su posible aplicación.

1.3.1 Seguimiento del proceso de perlado mediante análisis de imágenes y medición de color

El color es una característica importante de los alimentos y su percepción brinda información importante sobre su calidad y estado de conservación (León y col., 2006). La percepción del color está influenciada por varios factores como: La distribución de la energía espectral del iluminante, las condiciones bajo las cuales el color es visto, la sensibilidad del observador y las características espectrales del objeto con respecto a la absorción, reflexión y transmisión de la luz (Farroni, 2011). Con el objeto de conseguir una adecuada caracterización objetiva del color se crearon sistemas de medida que

emplean "espacios de color" dentro de los cuales un punto, que corresponde a un color determinado, está representado por las llamadas "coordenadas de color" que permiten la especificación completa en el espacio tridimensional (Caivano, 1995). De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el desarrollado por la CIE (Comisión Internationale de l'Éclairage) en 1931 (CIE, 1993), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios. La Comisión Internationale de l'Éclairage ha desarrollado otros sistemas de color cuyas coordenadas pueden ser interconvertidas matemáticamente. El espacio CIELAB de 1976 utiliza tres coordenadas para describir el color: L^* , a^* y b^* . El parámetro L^* representa la luminosidad del material y su valor varía en un rango de 0, que corresponde al color negro, hasta 100, que es el blanco. a^* varía de verde a rojo y b^* varía de azul a amarillo con valores que van desde -120 a 120 para ambos casos y representan las coordenadas cromáticas de este espacio. En particular los cambios de color y luminosidad se han asociado a la etapa de perlado de granos, en el caso del arroz suele usarse el índice de blancura como una medida del grado de pulido alcanzado durante el proceso de elaboración para la obtención de arroz blanco (Courtois y col., 2010).

Para el estudio de superficies heterogéneas como los alimentos, se han utilizado ampliamente los sistemas computarizados de adquisición y análisis de imágenes. Estos sistemas utilizan dispositivos para la adquisición de imágenes, computadoras y programas de procesamiento de las imágenes para simular el rol de los ojos y el cerebro (Yam y col., 2004; Mendoza y col., 2006; Pedreschi y col., 2006; 2007; Balabán., 2008; Purlis y Salvadori., 2009; Farroni., 2011). La toma de imágenes mediante una cámara fotográfica o mediante un escáner y su posterior procesamiento por medio de programas adecuados se presenta como una alternativa interesante para sistemas heterogéneos, debido a que puede seleccionarse el área de análisis en forma precisa excluyendo el fondo y los sectores de la imagen que no interesan (Balabán., 2008; Farroni., 2011;). Con respecto a los granos y semillas, el análisis de imágenes ha sido propuesto para evaluar características morfológicas así como también para determinar el rendimiento en grano entero de arroz en base a la reducción del área aparente de los granos debido al quebrado durante el descascarado y pulido del grano (Yadav y Jindal., 2001)

1.3.2 Caracterización mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR)

El análisis de la espectroscopia infrarroja mediante la transformada de Fourier ha sido ampliamente usado para evaluar la composición del producto así como para determinar las modificaciones químicas inducidas por los diferentes tipos de procesamiento a los que son sometidos los alimentos. Esta técnica fue usada por Shrestha y col., (2010) para estudiar los cambios en el orden molecular provocado por el proceso de extrusión en los almidones de maíz con alto contenido de glucosa. La formación de puentes de hidrogeno entre los componentes de la mezcla fue confirmado usando espectroscopia FT-IR por Jiménez-Elizondo y col., (2009), quienes desarrollaron películas biodegradables a partir del grano de amaranto. Liu y col., (2011) determinaron cambios en la relación cristalino/amorfo en el almidón de maíz cuando este producto fue procesado en un molino de bolas. Capron y col., (2007) estudiaron el efecto del contenido de humedad sobre la estructura molecular de muestras de almidón de maíz por espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FT-IR). Estos autores analizaron principalmente los cambios relacionados a la transición vítrea en función del contenido de agua y de la relación cristalino/amorfo. Durante la aislación de la proteína en semillas de sésamo, el análisis FT-IR reveló que el tratamiento con calor así como el uso de aditivos químicos (NaCl y sulfato de amonio) a bajas concentraciones inducían cambios en la conformación de la proteína, mientras a altas concentraciones de los aditivos, la conformación de la proteína era más estable (Achouri y col., 2012). Cabe destacar el trabajo de Tapia-Blacido y Col., (2006) quienes describieron los espectros FT-IR de films elaborados en base a fracciones del grano de amaranto: harina, harina desgrasada, almidón, proteína-lípidos y proteína. Otros autores (Fabian y Shultz., 2002) describieron que la banda cercana a 3000 cm^{-1} estaba asociada a la presencia de lípidos (estiramiento del enlace CH-CH₂), las bandas entre 1500 y 1600 cm^{-1} correspondían a las proteínas (estiramiento del enlace N-H), mientras que las bandas en la región comprendida entre 950 y 1150 cm^{-1} se podían asociar al almidón (estiramiento del enlace C-O) (Cremer y Kalentu., 2003)

1.3.3 Determinación del comportamiento reológico.

El conocimiento de las propiedades reológicas de la dispersión de harina/almidón en agua es importante para el control de las condiciones de proceso, el diseño del sistema de flujo y para estimar la textura de los alimentos (Rao, 1999a). Debido al uso relevante

del almidón por parte de la industria como espesante, estabilizador coloidal y adhesivo para la modificación de la textura en los alimentos, surge la necesidad de conocer su comportamiento reológico en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos que los contienen. Kulp (1973) determinó que el tamaño del gránulo afecta la composición, propiedades reológicas y transiciones de fase producidas al calentar una dispersión de almidón. Biliaderis (1986) señaló que la pérdida del orden de los componentes del almidón, amilosa y amilopectina puede estar relacionada con cambios irreversibles en sus propiedades, como hinchamiento, formación de pasta y disolución. Rao (1999a) expresó que tanto el efecto de la concentración como el de la temperatura deben ser tenidos en cuenta durante el procesamiento y almacenamiento de las dispersiones que contienen almidón ya que afectan las propiedades reológicas. Por otra parte, es sabido que las condiciones de molienda seca y húmeda pueden afectar las propiedades reológicas de las fracciones de harina obtenida o bien de los diferentes compuestos extraídos mediante la molienda húmeda (Bhattacharya, 1994, 1996; Wang y col., 1999; Hsu y col., 2000; Singh y col., 2003; Calzetta, 2007; Zanaro, 2012).

En la mayoría de los estudios reológicos se utilizan el viscoamilógrafo Brabender, el analizador rápido de viscosidad (RVA) o los viscosímetros rotatorios, los cuales permiten medir la viscosidad de las pastas de almidón (Wiesenborn y col., 1994) o de mezclas de harinas. Por otra parte el reómetro se usa para evaluar las propiedades viscoelásticas de los almidones (Hsu y col., 2000). Singh y col (2003) estudiaron la microestructura de las pastas/geles de almidón, para entender la relación entre composición química y propiedades viscoelásticas características de algunos almidones, mientras que Rivas-González y col., (2008); Bello-Pérez y Paredes-López., (2006, 2009) y Bello-Pérez y col., (1996, 2010) analizaron aspectos morfológicos, fisicoquímicos y estructurales de diversos almidones, estableciendo la relación entre el origen botánico del almidón y sus características para la formación de pastas. En el mismo sentido Fiorda y col (2013) y Saenz-Penella y col (2012), obtuvieron buenos resultados cuando estudiaron las propiedades de flujo (viscosidad) y viscoelasticidad mediante reología dinámica de diferentes mezclas de harina de amaranto con almidón de mandioca. Siendo la harina de amaranto sometida a un proceso severo de modificación de sus propiedades mediante el molino planetario de bolas, es lógico pensar sobre la necesidad de investigar de qué manera afecta este proceso el comportamiento viscoso de las fracciones de amaranto resultantes.

1.3.4 Caracterización mediante difracción de Rayos-X.

Mucha de la información acerca de las propiedades cristalinas del gránulo de almidón ha sido adquirida mediante el uso de la difracción de rayos-X. Con base a estos estudios, el patrón de difracción del almidón puede clasificarse en tres formas, tipo A, B y C. El patrón de difracción tipo A esta principalmente asociada a los cereales, el tipo B es usualmente obtenido a partir de almidones de tubérculos, mientras el patrón C es una mezcla de los tipos A y B. La principal diferencia entre los tipos de almidones es la diferencia en la organización del agua y la estructura de doble hélice de la molécula. Los almidones de tipo A forman estructuras más cerradas al agua, mientras los de tipo B son más abiertas (Wu y Sarko., 1978; Imberty y Pérez., 1988; Imberty y col., 1988).

El almidón es un polímero semicristalino con baja e imperfecta cristalinidad, su patrón de difracción se caracteriza por tener: baja intensidad, picos de difracción anchos, ruidos con alta intensidad y gran dispersión debido al componente amorfo. Uno de los métodos más usados para identificar la estructura cristalina y la organización molecular dentro de los almidones nativos y procesados es la difracción de barrido de grandes ángulos (Kavesh y Shultz., 1969). Usualmente, en un patrón de difracción de una muestra 100% cristalina su línea de base es muy fácil de describir mediante una línea recta o un polinomio de menor grado. En el caso de los polímeros semicristalinos es muy diferente debido a la contribución de la región amorfa en el patrón de difracción, el cual puede adquirir alguna forma compleja. Por lo tanto, el grado de cristalinidad de un polímero semicristalino se calcula con base a las áreas cristalinas y amorfas obtenidas en cada patrón de difracción.

Debido a la dificultad que existe en la determinación manual de la línea de base, Zobel (1988) propuso la utilización de una serie de algoritmos matemáticos para seleccionar la línea de base correcta. Este autor obtuvo una reproducibilidad satisfactoria en base a este método al aplicarlo para determinar la cristalinidad de diferentes polímeros. De la misma manera Bruckner (2000) utilizó un procedimiento de suavizado (con base en algoritmos matemáticos) para separar las regiones amorfas de los picos de difracción, mediante los cuales pudo identificar los picos característicos de varias clases de almidones (tipos A, B y C). La determinación de la cristalinidad en los almidones es importante, ya que ésta influye en sus propiedades funcionales tales como: viscosidad, gelatinización (propiedades térmicas), capacidad de absorción de agua y solubilidad (Morrison y Tester., 1994; Sanguanpong y col., 2003). Por lo tanto algunos autores han

investigado mediante esta técnica, el efecto que diferentes procesos físicos usados como herramienta para la modificación de almidones tienen sobre la cristalinidad (Jane y col., 1992; Cheetham y Leping., 1998; Tamaki y col., 1998; Chen y col., 2003; Huang y col., 2007; Devi y col., 2009).

1.3.5 Caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Las transiciones de orden/desorden que ocurren durante el calentamiento de una suspensión acuosa de gránulos de almidón han sido investigadas usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Donovan, 1979; Hoover, 2001; Kaur, 2002). En esta técnica se mide la temperatura y el flujo de calor asociados con transiciones de fase específicas, ya sean de primer orden como la gelatinización del almidón puro o en la harina y de segundo orden como la transición vítrea (Añón y Jovanovich., 2000). La gelatinización ocurre inicialmente en las regiones amorfas, y se extiende a las regiones cristalinas del granulo, debido a los débiles puentes de hidrogeno que se forman en la región amorfa (Morrison y Tester., 1994). Las diferencias en las temperaturas de transición entre los distintos almidones pueden ser atribuidas a la diferencia en el grado de cristalinidad. Altas temperaturas de gelatinización han sido reportadas para muestras con alta cristalinidad, la cual promueve estabilidad estructural y hace que los gránulos sean más resistentes a la gelatinización (Singh y col., 2003). Con referencia al almidón de amaranto, Calzetta (2007) analizó mediante calorimetría DSC suspensiones de almidón con diferente contenido de agua. Los picos observados en los termogramas presentaron una temperatura de inicio (T_i) de 64,7°C y una temperatura de pico (T_p) de 76,1°C. Pereira (2004) informó una entalpía de gelatinización de 12,6J/g de almidón seco, siendo $T_i = 68,3^\circ\text{C}$ y $T_p = 76,1^\circ\text{C}$. Zanaro (2012) observó temperaturas de gelatinización de 63,8°C (T_i) y 74,8°C (T_p) cuando determinó las propiedades térmicas (calorimetría DSC) de fracciones de harina de amaranto enriquecida en proteína (contenido de almidón: 30%, contenido de proteína: 40%). En el caso de harina de amaranto, Tapia-Blacido (2006) observó que los valores de las temperaturas de gelatinización de la harina fueron superiores a la de los correspondientes almidones. Según este autor esto es debido a la presencia de lípidos y proteínas en la harina que se encuentran formando complejos y/o interactuando con el almidón. Por lo tanto la calorimetría DSC ha resultado satisfactoria para la determinación de las propiedades relativas a la gelatinización en cereales y derivados.

1.4 APLICACIÓN DE ALMIDONES EN ENCAPSULACIÓN DE ANTIOXIDANTES

1.4.1 Encapsulación de β -carotenos en matrices de almidón.

Los pigmentos carotenoides son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza y son responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas y vegetales. El β -caroteno es un importante miembro de la familia de los carotenoides, el cual se encuentra presente en muchas frutas y vegetales tales como zanahoria, batata, calabaza, papaya, carambola, melocotón, espinaca, brocoli, col, entre otras (Rodríguez-Amaya., 2002; Chandrika y Col., 2003; Kandlakunta., 2008). Actualmente, el mayor interés en los carotenos no solo es debido a su actividad pro-vitámica A, sino también a su acción antioxidante en la dieta dado que es capaz de atrapar y eliminar radicales libres, reduciendo de esta manera el stress oxidativo en el cuerpo (Young y Lowe., 2001; Rao y Honglei., 2002). Cuando los carotenos son incorporados dentro de los alimentos con el fin de generar algún color o para impartir una característica funcional, éstos quedan expuestos a procesos de isomerización y oxidación que pueden alterarlos. Una solución para prevenir este problema es el uso de la microencapsulación, una técnica comúnmente usada para incrementar la estabilidad de carotenoides (Cai y Corke., 2000; Matioli y Rodríguez-Amaya., 2002; Higuera-Ciapara y col., 2004; Shu y col., 2006; Sutter y col., 2007; Laos y col., 2007; Loksawan., 2007).

La microencapsulación es una técnica por medio de la cual los ingredientes sensibles son empacados dentro de un material de revestimiento. El material de revestimiento protege al ingrediente sensible de reacciones adversas, previene la pérdida de ingredientes volátiles y permite controlar la liberación del ingrediente encapsulado (Shahidi y Han., 1993; Vos y col., 2010). La microencapsulación tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria como material protector de colorantes (Krishnan y col., 2005; Shaikh y col., 2006; Vaidya y col., 2006), “flavors” (Bertolini y col., 2001; Reineccius, 2004; Tobitsuka y col., 2006; Karathanos y col., 2007), vitaminas (Madziva y col., 2005; Righetto y Netto., 2006; Wegmuller y col., 2006) y otros ingredientes alimentarios sensibles.

Se han desarrollado varias técnicas para microencapsulación de ingredientes funcionales, las cuales se han clasificado de acuerdo a la naturaleza del método empleado. Existen procedimientos físicos que requieren la mezcla mecánica del

componente activo con el componente encapsulante seguida de la evaporación del medio dispersante; procesos químicos que se basan en la afinidad química, molecular y estructural entre el componente activo y el agente encapsulante. Los siguientes son algunos procesos utilizados para la encapsulación: coacervación, inclusión molecular, secado por atomización y liofilización, entre otros.

El secado por atomización y liofilización son los métodos comúnmente utilizados para encapsular ingredientes alimenticios. Mediante estos métodos se obtiene polvo a partir de una mezcla líquida, produciendo partículas que protegen el material activo en matrices formadas generalmente por polímeros. Estas técnicas se realizan básicamente en tres pasos: preparación de la emulsión, homogenización y eliminación del solvente.

El primer paso consiste en dispersar el material activo en una solución del agente encapsulante con el cual es inmiscible, el material encapsulante debe tener buenas propiedades de emulsificación, baja viscosidad, alto contenido de sólidos, esto con la finalidad de disminuir el tiempo de secado, formar una película con alto contenido de sólidos alrededor de las gotas de material activo y aumentar la retención del mismo. El segundo paso, es la homogenización de la emulsión, la cual consiste en crear pequeñas gotas del ingrediente en la solución encapsulante, formando una emulsión fina; algunas veces es necesario la adición de agentes emulsificantes para lograr una buena homogenización. Finalmente se realiza la eliminación del solvente que puede darse a altas temperaturas (atomización mediante secado spray por ejemplo) o bajas temperaturas (liofilización). En esta etapa la mezcla del agente activo y del encapsulante, ya homogenizados, entran en la cámara de secado donde simultáneamente se forma la matriz sólida y se elimina el solvente (Madene y col., 2006; Shu y col., 2006).

Diferentes materiales de cobertura son usados en la industria alimentaria tales como gomas, celulosa, proteínas y almidones (Jackson y Lee., 1990). La goma arábiga, un excelente material de cobertura que ha sido muy usado debido a su poder emulsificante y a la gran capacidad para retener volátiles, hoy es menos aplicado debido a su alto costo y fuentes limitadas, lo cual hace que se busque otro tipo de materiales alternativos (Wilson y Shah., 2007). La búsqueda de sustitutos parciales o totales de la goma arábiga se ha incrementado recientemente, revalorizando el uso del almidón como material de cobertura, gracias a su abundancia y bajo costo. Sin embargo, el almidón nativo posee ciertas limitaciones funcionales que afectan su eficiencia y han restringido su uso como

agente encapsulante. Para superar estos problemas de funcionalidad han sido propuestas técnicas de modificación con el fin de adaptar las propiedades del almidón a las condiciones deseables. Las dextrinas, ciclodextrinas y almidones hidrolizados, entre otros, resultaron ser los agentes encapsulantes más aptos (Krishnany col., 2005; Karathanos y col., 2007; Murua-Pagola y col., 2009). Estos materiales tienen la ventaja de tener bajo costo, flavor neutro y buena protección a la oxidación. Sin embargo como carecen de características emulsificantes, varios investigadores han utilizado este tipo de materiales en combinación con agentes emulsificantes tales como gelatina, proteínas del suero y tween 80 (Sheu y Rosenberge., 1995; Cardoso y col., 2001; Barbosa y col., 2005; Porrarud y Pranee., 2010).

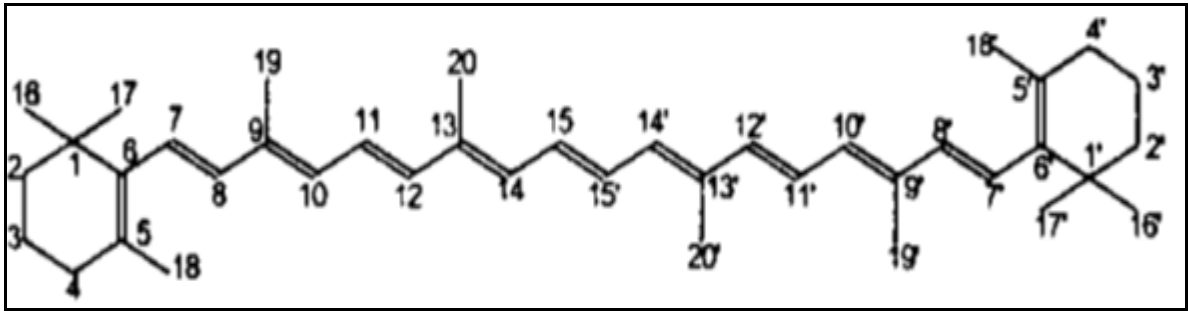
La capacidad de la molienda de alto impacto para lograr un alto grado de disgregación junto con su potencial para producir polvo activado se presenta como una interesante técnica para generar modificaciones termo-mecánicas en harinas y almidones que pueden resultar útiles como agentes encapsulantes alternativos.

1.4.2 Determinación de los carotenos mediante espectroscopia de UV-VIS.

El sistema de dobles enlaces conjugados presentes en el cromóforo, hace que sea posible la absorción de luz dando a los carotenoides su color atractivo y proporcionando el espectro de absorción visible que sirve como base para su identificación y cuantificación. El color permite a los analistas monitorear las diferentes etapas de degradación de los carotenos. A partir del espectro UV/Vis es posible obtener características propias del cromóforo tanto respecto a las longitudes de onda de absorción máxima (λ_{\max}) como al mismo tiempo permite identificar la forma del espectro (estructura fina espectral).

El β -caroteno presenta 9 insaturaciones en la cadena del polieno y 2 en los anillos (**figura 11**), absorbe a longitudes de onda medias en comparación a otros carotenoides con un λ_{\max} a 425, 450, 478nm (Rodríguez-Amaya, 2001) (**Figura 12**). Para dar una idea de la estructura fina del espectro, se utiliza el índice III/II %, que es una relación de las absorbancias a dos λ_{\max} (**Figura 12**). Esta notación tiene en cuenta la relación de la altura del pico de absorción de mayor absorbancia, designado III, y el pico de absorción de mayor λ , designado II, teniendo el mínimo entre los dos picos como la línea de base, multiplicado por 100 (Britton, 1995).

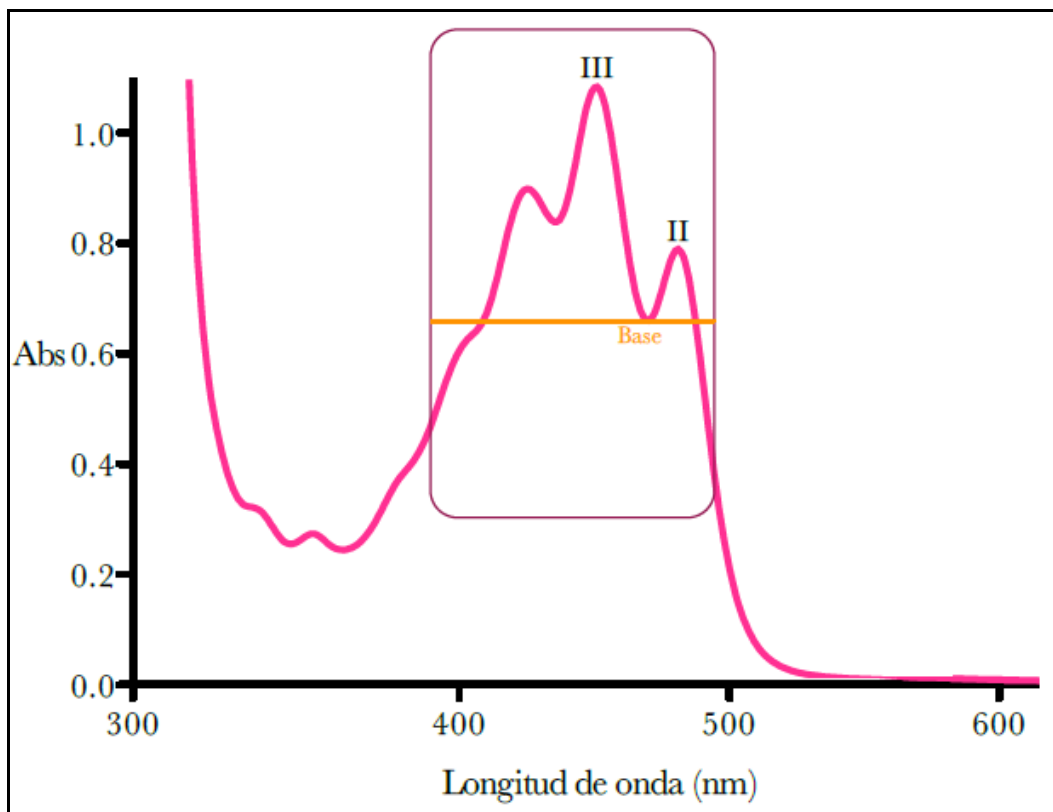
Figura 11. Estructura molecular del β -caroteno



Tomada de Rodríguez-Amaya, (2001)

Los carotenoides en solución siguen la ley Beer-Lambert, por lo tanto su absorbancia está directamente relacionada a la concentración. Por lo anterior, los carotenoides pueden ser cuantificados espectrofotométricamente. Los carotenos altamente insaturados son propensos a la isomerización y oxidación. El calor, la luz y los ácidos promueven la isomerización de los *trans*carotenos, su usual configuración, a la forma *cis*, resultando algunas veces en la pérdida de color y proactividad vitamínica A (Britton, 1995)

Figura 12. Espectro de absorbancia en Uv/visible del β -caroteno



La degradación oxidativa es la principal causa de la extensiva pérdida de los carotenos, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y esta a su vez es estimulada por la presencia de luz, enzimas, metales, co-oxidantes e hidroperóxidos; por lo tanto, la isomerización y oxidación de los carotenos puede ocurrir durante el procesamiento y almacenamiento de los productos alimenticios (Rodríguez-Amaya,2001). Por esta razón, resultaría importante estudiar el efecto protector de las matrices almido-proteicas de amaranto a diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) en la retención de los carotenos.

2. OBJETIVOS

El objetivo general fue estudiar el potencial del grano de amaranto referido a la producción de diferentes fracciones de molienda y su aplicación a un caso específico de interés para la industria. Para ello se propone explorar estrategias de molienda que combinen la molienda abrasiva con la molienda de alto impacto por vía seca y húmeda.

Objetivos específicos

1. Estudiar la molienda abrasiva del grano de amaranto. Seleccionar las variables operativas y determinar el efecto de las mismas en el grado de perlado y el contenido de lípidos y proteína. Optimizar el proceso para la obtención de fracciones de amaranto enriquecidas (amilácea y lípido-proteica).
2. Determinar el efecto de la velocidad de rotación y el tiempo de operación en la distribución de tamaño de partícula (DTP) de la harina obtenida por molienda seca de la fracción amilácea en un molino planetario de bolas. Evaluar modelos que relacionan energía-tamaño para simular la cinética de molienda.
3. Caracterizar las fracciones de amaranto obtenidas por molienda abrasiva y molienda de alto impacto mediante las propiedades físicas, funcionales y estructurales.
4. Determinar el efecto de la energía de molienda y las concentraciones de aditivos en la recuperación del almidón de amaranto obtenido mediante molienda húmeda asistida en molino planetario de bolas. Caracterizar el almidón mediante el contenido proteico y sus propiedades estructurales y térmicas.
5. Evaluar la potencialidad de la fracción amilácea y el almidón nativo molidos como agentes encapsulantes de β -caroteno y estudiar la estabilidad de las mismas durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y humedades relativas.

3. MATERIALES Y METODOS

La **figura 13** resume los procedimientos realizados en la obtención y estudio de las fracciones FA y FLP del grano de amaranto, cuyos detalles experimentales serán comentados en profundidad. Los procesos descritos utilizaron el mismo grano de amaranto, estudiando tres tipos de molienda con interés industrial, obteniendo almidones y fracciones ricas en almidón y proteína, para emplearlas como posibles agentes encapsulantes de un antioxidante modelo.

3.1 GRANO DE AMARANTO

El grano de amaranto (*Amaranthus cruentus*) fue provisto por Cereales Naturales S.R.L (Lomas del Mirador, Argentina) el cual fue cosechado al oeste de la provincia de Buenos Aires. Los granos se tamizaron con el fin de remover el material extraño y luego fueron almacenados en bolsas de polipropileno a 4°C hasta su uso.

3.2 OBTENCION DEL GRANO DE AMARANTO PERLADO MEDIANTE MOLIENDA ABRASIVA

3.2.1 Molienda abrasiva

El amaranto perlado o fracción rica en almidón (FA) y la fracción lipo-proteica (FLP) fueron obtenidas mediante una molienda abrasiva del grano amaranto, usando un molino arrocero de laboratorio Suzuki MT- 95 (Suzuki, San Pablo, Brazil), el cual separa automáticamente el amaranto perlado (rendimiento de la fracción amilácea FA, 70 %) y la fracción de germen + salvado (rendimiento de la fracción lipo-proteica FLP, 28%) provenientes de la cámara de pulido del molino. Como el molino no fue diseñado para el grano de amaranto, el proceso de molienda abrasiva fue optimizado a partir de un diseño experimental, que se detalla a continuación.

3.2.2 Diseño experimental Box-Benhken

Para analizar el efecto de las condiciones de operación como la humedad, carga y tiempo, sobre el índice del perlado del grano (IP), índice de perlado tradicional (IPT), concentración de proteína y grasa, grado de dispersión del perlado (Span-IP) y

luminosidad mediante los componentes CIELAB, se empleó el método de superficies de respuesta (MSR) bajo el diseño experimental Box-Benkehn. Los rangos de humedad (8% - 12%b.s.), carga (100g - 200g) y tiempo (30 min - 90 min) fueron estimados con base en ensayos previos.

Cada una de las respuestas estudiadas (Z_K , $K=1, \dots, p$) se modeló en función de las condiciones de molienda en términos de las variables codificadas usando un polinomio de segundo grado (Khuri y Cornell, 1987):

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i < j}}^n a_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec } 5)$$

Dónde a_0 , a_i y a_{ii} representan los coeficientes correspondientes a los términos constante, lineal y cuadrático respectivamente. La interacción entre los factores estudiados está dada por el coeficiente a_{ij} .

Se aplicó una codificación lineal asignando los valores codificados 1 y -1 a los extremos superior e inferior del rango experimental establecido para cada una de las variables. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa estadístico Statgraphics Plus ® versión 5.1 (Statistical graphics Corporation, Princeton, New Jersey, Estados Unidos de América).

3.3 OBTENCION DE HARINAS MEDIANTE MOLIENDA DE ALTO IMPACTO

3.3.1 Método (I) en función de la velocidad de rotación y el tiempo de molienda

Las muestras (FA) previamente obtenidas en la molienda abrasiva y la muestra control (grano entero) fueron molidas en un molino planetario de bolas, según el esquema mostrado en **figura 14**. Se usó un PM-100 molino planetario de bolas (Retsch, Haan Mettman, Alemania) provisto de una jarra cilíndrica de acero inoxidable de (500mL).

Figura 13. Esquema ilustrativo de materiales y métodos.

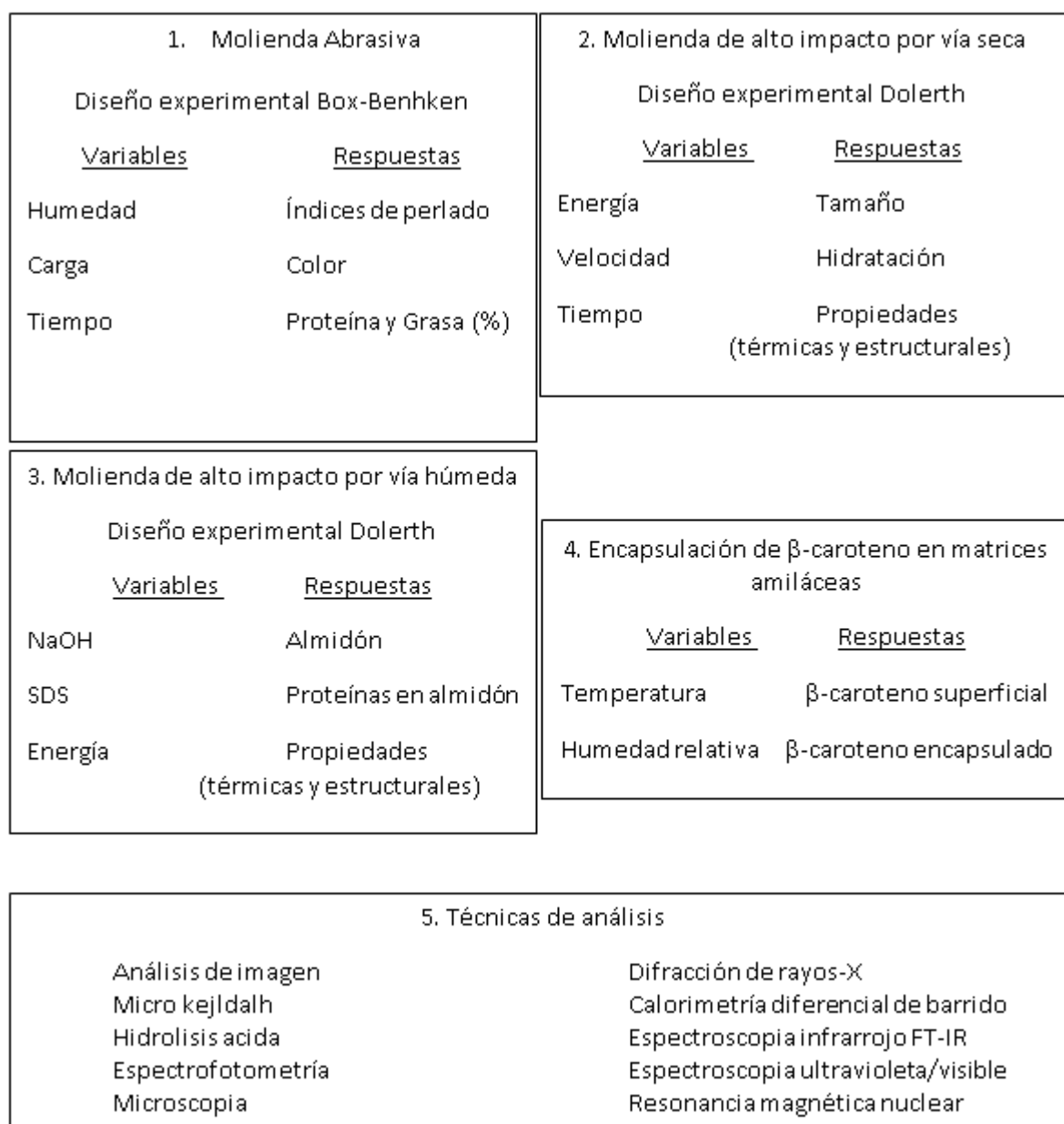
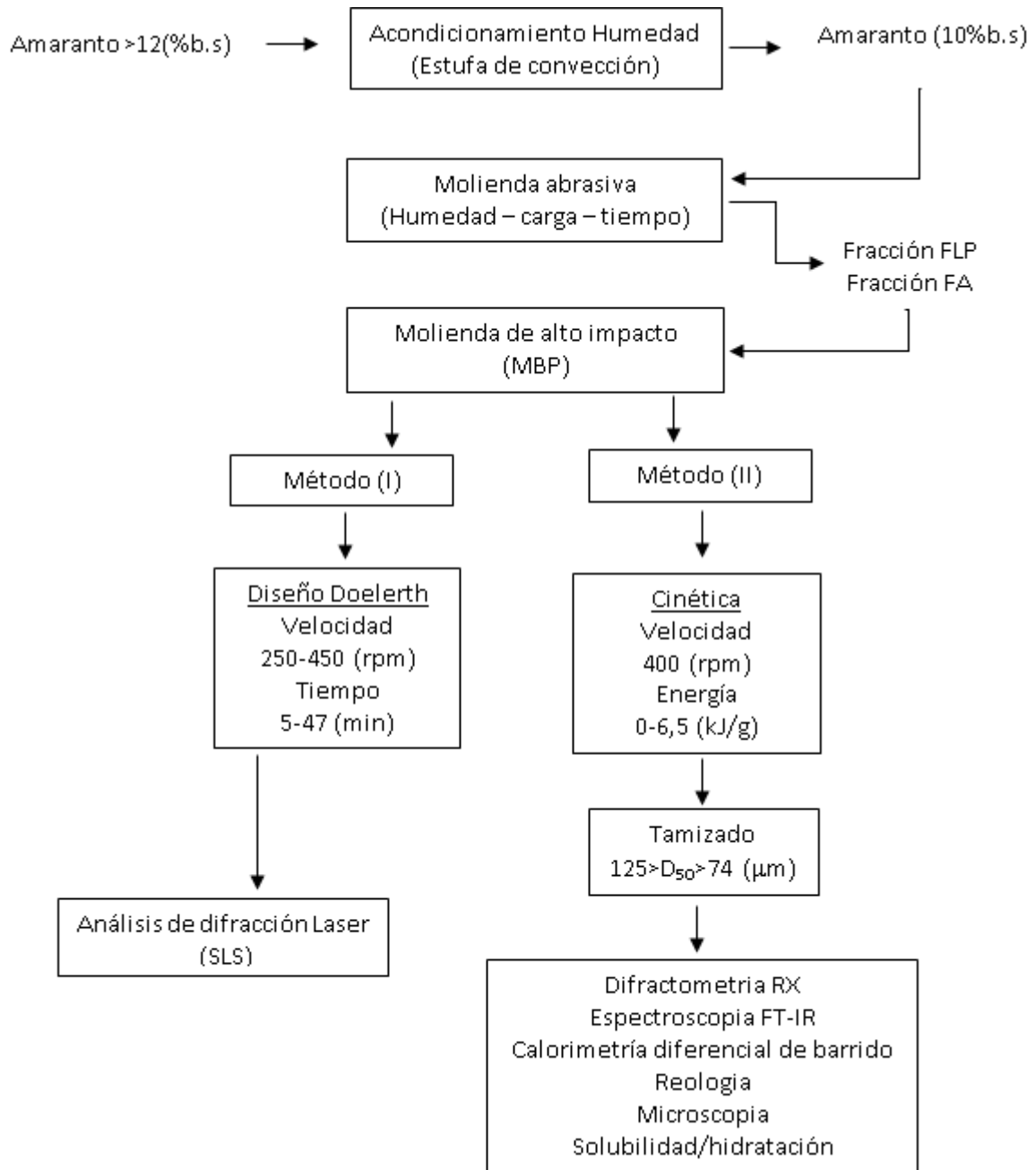


Figura 14. Esquema ilustrativo de la etapa de molienda abrasiva y de alto impacto.



Las muestras de amaranto y las bolas de acero inoxidable ($\phi=10\text{mm}$) en relación (1:5) se colocaron dentro de la jarra cilíndrica hasta completar la tercera parte de su capacidad. La molienda se realizó con base a un diseño experimental en red de Doehlert, el cual involucra 3 niveles de velocidad de rotación (250-350-450rpm) y

varios niveles de tiempo comprendidos entre 5 y 47 minutos (Método I), con un intervalo de contragiro por cada minuto de molienda. El contragiro favorece la eficiencia de la molienda dado que propicia el impacto evitando que la carga de bolas deslice sobre la superficie interna de la jarra.

3.3.2 Diseño experimental red Doehlert

Para analizar el efecto de las condiciones de operación como la velocidad, tiempo y energía de molienda sobre los índices de reducción de tamaño (D_{50} y D_{63}) así como sobre los índices homogenización (Span y n_2), se empleó el método de superficies de respuesta (MSR) bajo el diseño experimental Matriz de Doehlert. Los rangos velocidad (250- 450rpm) y tiempo (30 - 90min) fueron estimados con base en ensayos previos

3.3.3 Método (II) en función de la energía de molienda

El molino planetario de bolas PM100 posee la función energía, esta función permite determinar la energía total aportada al vaso de molienda. Esta energía total está definida como la diferencia entre la energía consumida para el accionamiento del vaso de molienda lleno (material + bolas) y la energía requerida para el vaso de molienda vacío (energía al ralentí). Primero se determina por un período corto de tiempo la energía consumida al ralentí, que es considerada por la electrónica del equipo como el punto cero o línea de base, al igual que cuando se determina la tara en una balanza. La energía que sobrepasa el nivel de ralentí es considerada la energía de molienda. El molino proporciona el valor de energía de molienda en kJ, la energía específica de molienda se obtuvo en kJ/g considerando la masa de muestra introducida en la jarra del molino. Las muestras (FA) previamente obtenidas en la molienda abrasiva y la muestra control fueron molidas en un molino de bolas planetario, según el esquema mostrado en **figura 14**. La molienda se llevó a cabo a una velocidad de rotación constante de 400 rpm y 5 niveles de energía específica (0,92-1,63-2,87-4,75-6,52 kJ/g) aplicando contragiro cada 30 s (método II)

3.3.4 Modelos de distribución de tamaño.

Se usó el modelo de distribución normal (**Ecuación 3**) con el fin de ajustar los datos de granulometría a una curva tipo gaussiana. Para determinar si los datos de granulometría obtenidos bajo diferentes condiciones de molienda se ajustan a una distribución normal, se calcularon por medio del programa informático STATGRAPHICS Centurion XVI.I., utilizando las pruebas de *Chi-cuadrado*, *Estadístico W de Shapiro-Wilk*, *prueba de Sesgo y curtosis estandarizada*. Cuando los datos no ajustaron según el comportamiento normal de distribución, fue necesario modelarlos mediante la función Rosin-Rammler-Bennet (**Ecuación 4**).

3.3.5 Modelos de energía de molienda en función de la reducción de tamaño.

Se usó el modelo generalizado de reducción de tamaño (**Ecuación 1**) con el fin de determinar la constante e índice de molienda (n_1). Con el valor del índice de molienda se determinó el modelo de reducción de tamaño más indicado (**Ecuación 2**). La regresión no lineal de datos se realizó por medio del programa informático STATGRAPHICS Centurión XVI.I.

3.4 OBTENCION DE ALMIDON MEDIANTE MOLIENDA HUMEDA DE ALTO IMPACTO

3.4.1 Molienda húmeda tradicional (control).

El almidón de amaranto fue aislado mediante el procedimiento de molienda húmeda alcalina desarrollado por Calzetta y col, (2006). El remojo de los granos se realizó a 25°C durante 24 horas, usando solución de NaOH (0,25% p/v) (Sigma Chemical Co, San Luis, Estados Unidos de América).

La relación grano : solución fue de 1:3 (gramo a mililitro). El almidón aislado fue secado mediante el procedimiento de liofilización durante 48h y luego fue almacenado en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso.

3.4.2 Molienda húmeda asistida en molino planetario.

La muestra (FA) previamente obtenida en la molienda abrasiva fue molida en un molino planetario de bolas. Se usó un PM-100 molino planetario de bolas (Retsch) provisto de una jarra cilíndrica de circonio de (500mL), según el esquema descrito en la **figura 15**.

Las muestras de amaranto (FA) y las bolas de circonio ($\phi=10\text{mm}$) en relación (1:5) se colocaron dentro de la jarra cilíndrica, luego se adicionó la solución de maceración hidróxido de sodio-dodecilsulfato sódico (NaOH-SDS como se comenta en la siguiente sección) en relación (1:1,2) a la masa de amaranto (FA) y se procedió a la molienda del material a una velocidad constante de 400rpm y diferentes niveles de energía de acuerdo al diseño experimental (**figura 15**).

Las condiciones de operación se optimizaron a partir de un diseño experimental, como se comenta en la siguiente sección. Luego de la molienda, se le adicionó una solución de maceración al material molido en relación (1:1) y se agitó por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó en un equipo Rolco modelo 350T (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina) obteniéndose dos fracciones de diferente densidad y color.

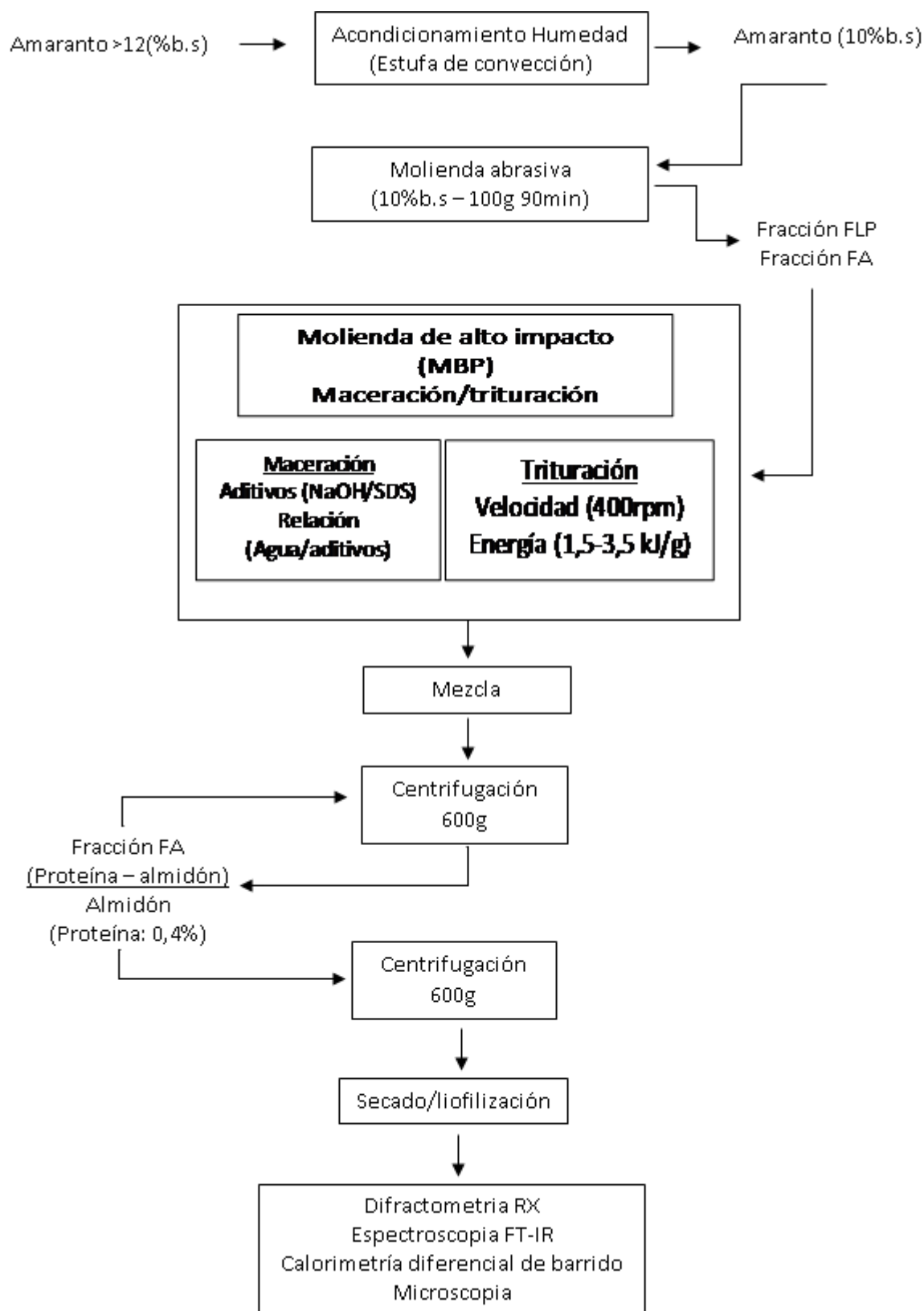
La fracción proteica se extrajo manualmente mediante una espátula y la fracción inferior correspondiente al almidón se purificó en etapas sucesivas, luego se neutralizó y finalmente se liofilizó y almacenó en bolsas de polipropileno a 5°C hasta su uso.

3.4.3 Diseño experimental Box-Benhken

Para analizar el efecto de las condiciones de operación como la concentración del álcali (NaOH), concentración de tensioactivo (SDS) y energía de molienda, sobre la recuperación de almidón y contenido de proteína, se empleó el método de superficies de respuesta bajo el diseño experimental de Box-Benhken.

La concentración de hidróxido de sodio varió entre 0,1 y 0,3%p/v, la concentración de tensioactivo (SDS) entre 0,3 y 1,5%p/v mientras que el nivel de energía de molienda estuvo comprendido entre 1,5kJ/g y 3,5kJ/g.

Figura 15. Esquema ilustrativo de la etapa de molienda húmeda de alto impacto.



3.5 CAPACIDAD ENCAPSULANTE DE MATRICES DE AMARANTO OBTENIDAS POR MOLIENDA SECA Y HUMEDA

Con el fin de determinar las matrices con mejor eficiencia encapsulante se prepararon 6 sistemas de diferente composición y tratamiento, las cuales se definieron de la siguiente manera:

- AN: almidón nativo gelatinizado.
- AN-Ge: Almidón gelatinizado con aditivo de gelatina.
- AN/BM: Almidón molido.
- AN-Ge/BM: Almidón molido con aditivo de gelatina.
- FA/BM: Fracción molida rica en almidón.
- FA-Ge/BM: Fracción molida rica en almidón con aditivo de gelatina.

Las fracciones FA fueron obtenidas mediante molienda seca, la cual involucró un tratamiento de 6,5 kJ/g de molienda de alto impacto, mientras que la fracción AN fue obtenida mediante molienda húmeda en condiciones óptimas y posteriormente molida a 6,5 kJ/g. En la **figura 16** se muestran las etapas del proceso de encapsulación. La etapa de preparación consistió en dos pasos: Emulsificación y Liofilización

3.5.1 Preparación de las emulsiones de harina y almidón con β -caroteno

Las dispersiones (FA-Ge/B; AN-Ge/MB; AN-Ge) se prepararon de la siguiente manera: a 2g de FA o AN, se le adicionaron 0,02g de gelatina, luego se agregó agua bidestilada hasta completar una dispersión al 5%. Posteriormente se calentaron hasta 95°C por 20 minutos en baño termostático, esto con el fin de provocar la gelatinización total del almidón. Este procedimiento se realizó tanto para las muestras nativas como para las muestras molidas, de forma tal de evitar diferencias producto de la técnica empleada. Luego las dispersiones fueron enfriadas hasta 25°C y posteriormente se les adicionó 40mg de una solución de β -caroteno en aceite de girasol.

Con el fin de homogenizar la mezcla, las emulsiones fueron tratadas en un equipo Ultraturrax T18B (IKA®-WerkeGMBH & CO.KG, Staufen, Alemania) a 15.500 rpm (velocidad 4) por un tiempo de 10min con intervalos de 5 min de agitación y 1 min de reposo, para evitar el calentamiento de la emulsión. La punta de dispersión utilizada fue la S18N-10G, con un diámetro de rotor 7,5 mm, obteniendo según el fabricante una finura final en las emulsiones entre 1-10 μ m (IKA, 2013). Las muestras FA/MB y

AN/MB fueron preparadas de acuerdo al anterior procedimiento pero con la excepción de la adición de gelatina.

3.5.2 Preparación de la matriz harina y almidón con β -caroteno

Volúmenes de 1mLy 2mL de emulsión fueron puestos en viales de 5mL, posteriormente se adicióno nitrógeno líquido (-196°C) con el fin de congelar la emulsión formando una matriz sólida. Esta matriz fue liofilizada por 48h con el objetivo de eliminar agua y formar una matriz amorfa.

En todos los casos se utilizó un liofilizador modelo ALPHA 1-4 LD2 (MartinChristGefriertrocknungsanlagen GMBH, Alemania), el cual opera a una temperatura de -56°C y una presión de 0,04 mbar.

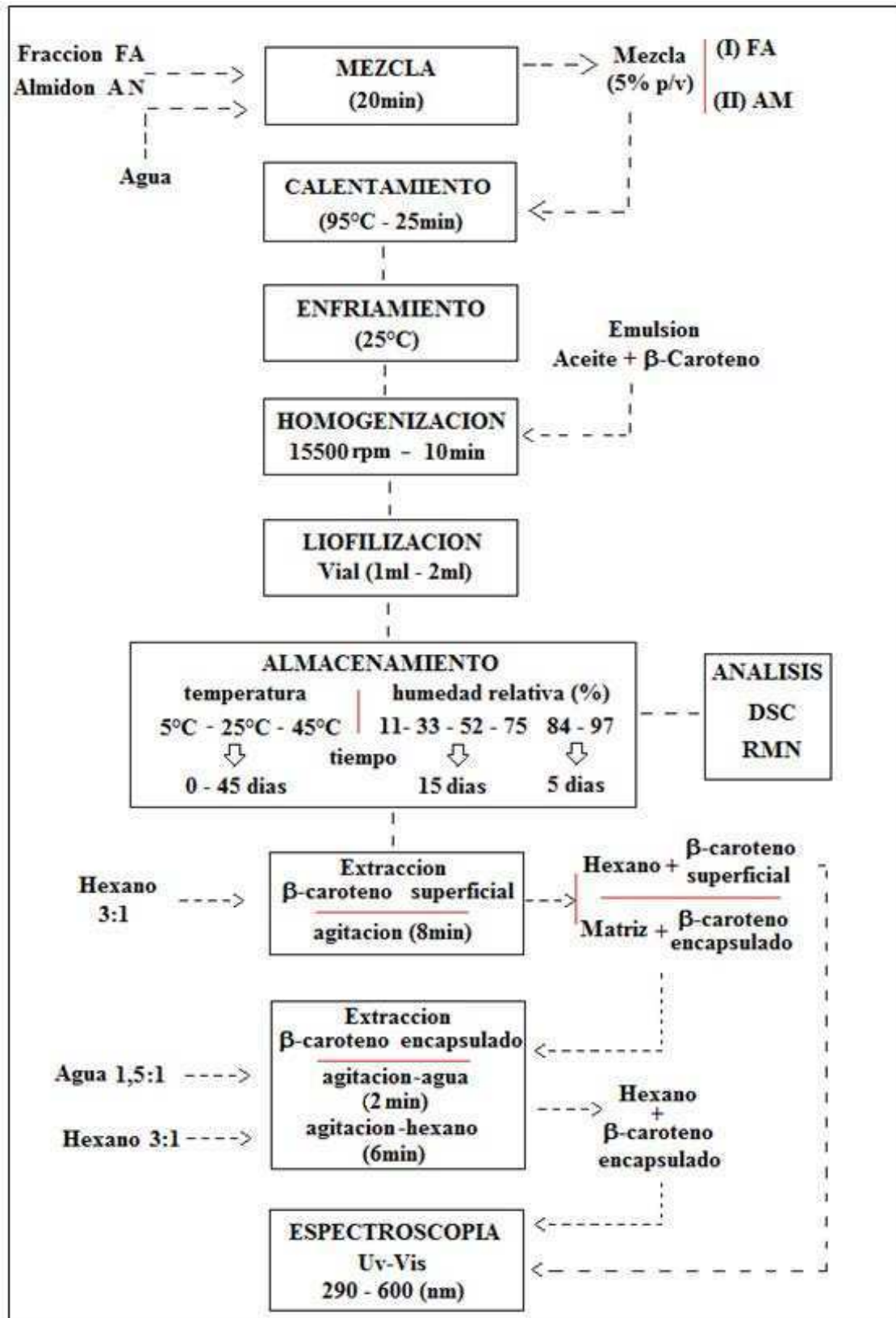
El secado secundario fue realizado a temperatura ambiente, debido a que el liofilizador no controla la temperatura de los estantes. Finalizada la liofilización, los viales fueron sellados y cubiertos en papel aluminio para posteriormente ser almacenados en un *freezer* convencional (-18°C) hasta su uso en los ensayos de estabilidad.

3.5.3 Extracción del β -caroteno superficial y encapsulado de la matriz

A cada vial de 5mL se le adicionó 3mL de hexano y se agitó durante 8 minutos con el fin de desprender la matriz solida de la pared del recipiente. El tiempo de extracción se estableció con base a ensayos preliminares; un tiempo de extracción menor conduce a la sobreestimación del β -caroteno encapsulado, mientras que un tiempo mayor afecta la integridad de la matriz y provoca la subestimación del β -caroteno encapsulado.

Sobre una alícuota del extracto se determinó el β -caroteno superficial mediante espectrofotometría UV/Vis utilizando un Jasco V-630 UV-VIS (JASCO Inc., Maryland, Estados Unidos de

Figura 16. Esquema ilustrativo de la etapa de encapsulación.



América). Luego la solución de hexano restante se descartó y el residuo (matriz sólida) se lavó nuevamente con 2mL de hexano. Posteriormente a la matriz sólida libre de β -caroteno superficial, se le adicionó 1,5mL de agua bidestilada y se agitó durante 5 minutos con el objeto de lograr la solubilización de la matriz y la liberación del β -caroteno encapsulado. Luego se adicionaron 3mL hexano para lograr extraer el β -caroteno libre, y finalmente se realizó la determinación mediante espectrofotometría UV/Vis.

3.5.4 Efectos de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de β -caroteno

Para determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la degradación del β -caroteno se utilizaron dos sistemas modelos (FA/MB) y (AN-Ge/MB), los cuales se sometieron a 3 temperaturas de incubación diferentes (5°C; 25°C; 45°C) por un periodo de tiempo de 0, 3, 7, 11, 17, 24, 45 días. Todas las muestras se mantuvieron cubiertas en papel aluminio para evitar la degradación de β -caroteno por efecto de la luz. Las muestras almacenadas a 5°C se mantuvieron en heladera, las de 25°C y 45°C se situaron en sendas estufas de convección forzada FAC modelo SR71 (FAC, SRL, Argentina). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Se empleó un modelo de reacción de primer orden con el fin de seguir la degradación del β -caroteno, donde la velocidad de degradación es proporcional a la concentración (C_t) bajo condiciones de temperatura constante. El modelo se basa en la aproximación clásica usada en las reacciones químicas (**Ecuación 6**) la cual define que la velocidad de reacción es constante (k) y que depende de la temperatura de acuerdo a la ley de Arrhenius (**Ecuación 7**)

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{Ec } 6)$$

$$k = k_{\infty} e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (\text{Ec } 7)$$

Donde k_{∞} es un factor pre-exponencial (s^{-1}), E_a como la energía de activación (J^*mol^{-1}) y R como la constante de los gases ($J^*mol^{-1}*K^{-1}$)

3.5.5 Efecto de la humedad relativa de almacenamiento sobre el contenido de β -caroteno

Con el fin de obtener sistemas con diferente contenido de agua, las muestras se incubaron durante 20 días a 25°C en desecadores al vacío en atmósfera de humedad relativa (HR) controlada y protegidas de la luz. Para esto se emplearon las siguientes soluciones salinas saturadas (calidad analítica, Merck): LiCl (HR 11%), MgCl₂ (HR 33%), MgNO₃ (HR 52%), NaCl (HR 75%), KCl (HR 84%) KNO₃ (HR 97%) (Greenspan., 1977). Con relación a las muestras almacenadas a 84%HR y 97%HR estas se incubaron por 5 días. En las muestras de alta humedad relativa se verificó la ausencia de crecimiento fúngico observando con lupa estereoscópica antes de ser utilizadas y descartando aquellas que presentaban desarrollo de hongos. Después del tiempo de incubación, se determinó el contenido de húmeda y de β -caroteno superficial y encapsulad.

3.5.6 Determinación de las isotermas de adsorción de las matrices de amaranto

El contenido de agua se midió gravimétricamente por secado a 105 °C hasta peso constante (AACC 44-16) en estufa de circulación forzada. Los resultados se expresaron en gramos de agua por cada 100 gramos de materia seca (% bs). La actividad de agua se midió por punto de rocío utilizando un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA). Las mediciones se realizaron a 25°C por triplicado y se informó el valor promedio con su respectivo desvío estándar. A partir de los resultados obtenidos se graficó la curva de adsorción de agua la cual se ajustó mediante la ecuación de GAB de Guggenheim-Anderson-de Boer (**Ecuación 8**). Esta ecuación son ampliamente utilizada en modelos de alimentos y se aplica en un amplio rango de actividad de agua como el empleado en este trabajo (Lomauro y col., 1985. Furmaniak y col., 2009).

$$\frac{a_w}{m} = \left(\frac{1}{m_o C k} \right) + \left(1 - \frac{2}{C} \right) a_w + \left(\frac{(1/C) - 1}{m_o} k \right) a_w^2 \quad \text{Ec. 8}$$

Donde:

m: Es el contenido de agua en base seca.

a_w: Es la actividad de agua expresada como HR/100.

C: Es la constante de Guggenheim y está relacionada con el calor de sorción de agua correspondiente a la monocapa.

k: Es un factor que corrige las propiedades de las moléculas de agua de la multicapa respecto del agua libre.

m_0 : Es el contenido de agua correspondiente a la monocapa.

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS PRODUCTOS OBTENIDOS

3.6.1 Determinación de la composición de las diferentes fracciones del grano de amaranto

La composición química del grano entero, grano perlado de amaranto y de sus diferentes fracciones obtenidas mediante los procesos de molienda seca y húmeda fue determinada por triplicado usando los métodos oficiales: contenido de agua (AOAC 2000, 925.09 método); almidón (AACC 1995, 76–11 método); proteína (AOAC 2005, 960.52 método); grasa (AOAC2005, 925.12 método); cenizas (AOAC 2005, 923.03 método).

3.6.2 Determinación del índice de perlado mediante análisis de imágenes

3.6.2.1 Determinación del área aparente del grano perlado

Las imágenes fueron adquiridas por triplicado mediante un scanner Hewlett-Packard PSC 1610. Para aumentar el contraste de la imagen se utilizó un fondo negro opaco y se adoptó una escala milimetrada como referencia. Cada imagen contenía aproximadamente 300 granos de amaranto perlado (FA). La imagen capturada se procesó con el programa de acceso libre ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Las diferentes etapas del análisis de imagen involucraron: establecer la escala de trabajo (7800 pixel/mm), binarizar la imagen (Courtois y col., 2010), y realizar la determinación del tamaño de partícula dentro del rango 0,2-1,4mm². Este rango resultó de ensayos previos donde se estableció que valores inferiores a 0,2mm² eran polvo o aglomeración de polvos, y valores superiores a 1,4 mm² indicaban posible uniones de los granos .El programa ImageJ proporciona los siguientes parámetros para la caracterización de la distribución de área aparente: A₁₀, A₅₀, A₉₀ (que representan los

valores del área aparente correspondientes al 10%, 50% y 90% de la distribución acumulada) y media aritmética y desviación estándar de las áreas aparentes.

3.6.2.2 Índice de perlado basado en el área aparente del grano perlado

El valor del índice de perlado (IP) se calculó en base a la **ecuación (8)** utilizando las áreas aparentes del grano obtenidas mediante al análisis de imágenes:

$$IP = 100 \times (1 - AA/AC) \quad Ec. 9$$

Donde el término (*AA*: es el área aparente del grano perlado obtenida mediante el análisis de imagen) y (*AC*: es el área aparente del grano entero obtenida mediante el análisis de imagen). Cabe señalar que se utilizan los valores correspondientes a la mediana de la distribución de área aparente (*A₅₀*).

3.6.2.3 Grado de dispersión (G.D) de la distribución de área aparente

El valor del grado de dispersión (*GD*) se calculó con base a la distribución de frecuencia acumulada del área aparente del grano, obtenido mediante al análisis de imágenes. El grado de dispersión-se calculó según:

$$GD = \frac{A_{90} - A_{10}}{A_{50}} \quad Ec. 10$$

Dónde *A₁₀*, *A₅₀* y *A₉₀* son los valores del diámetro aparente correspondientes al 10%, 50% y 90% de la distribución acumulada.

3.6.3 Índice de perlado en función de la masa del grano

El valor del índice de perlado tradicional (IPT) se calculó con base a la diferencia de masa del grano obtenida después de la molienda por abrasión.

$$IPT = 100 \times \frac{\text{masa del grano perlado}}{\text{masa del grano entero}} \quad Ec 11$$

3.6.4 Determinación del cambio de color del grano debido al perlado

Se utilizó un fotocolorímetro Minolta modelo CM-508-d (Japón) con el iluminante CIE D65 y un campo de observación de 2°. A los granos perlados de amaranto se les midió por triplicado las funciones de color (L , a , b) componentes del sistema CIELAB y también se calculó la función ΔE mediante la **ecuación (12)**.

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0.5} \quad \text{Ec. 12}$$

3.6.5 Determinación de la distribución del tamaño de partículas de las fracciones de molienda

El tamaño de partículas de las diferentes muestras fue medido por el método de difracción láser (SLS, static light scattering) en un equipo Mastersizer 2000 con un dispositivo hidro2000 UM como unidad dispersante (Malvern Instruments, Worcester shire, Reino Unido). La velocidad de la bomba de flujo fue de 1800 rpm, el índice de refracción (IR) de la fase dispersante fue de 1,330 (agua) y el correspondiente al almidón fue 1,535 siendo la absorptividad de 0,001. El equipo opera realizando 10 barridos sobre cada muestra y proporciona la distribución de tamaño de partícula en términos de fracción volumétrica así como también medidas de tendencia central y homogeneidad de la muestra. Los diámetros $D_{4/3}$ fueron utilizados para determinar los percentiles así como la dispersión de la distribución tamaño fue calculada usando la (**Ecuación 10**), reemplazando las áreas por los diámetros, donde 10, 50 y 90% representan el volumen de partícula con diámetros menor o igual a D_{10} , D_{50} y D_{90} respectivamente.

3.6.6 Preparación de muestras para la caracterización de las fracciones de molienda

Las muestras molidas se tamizaron usando un dispositivo vibracional Zonytest (modelo EJR200; Buenos Aires, Argentina) y varios tamices: tamiz no. 60 (250 μ m), no. 80 (177 μ m), no. 120 (125 μ m) y no. 200 (74 μ m). El residuo retenido en el último tamiz (125-74 μ m) fue seleccionado para los diferentes análisis (Martínez-Bustos y col., 2007; Zhang y col., 2010).

3.6.7 Espectroscopia infrarroja de fracciones de molienda

Los espectros FT-IR se obtuvieron mediante un espectrómetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos de América) con cristal de ZnSe y diamante de única reflexión, con ángulo de 45°. Se utilizó este accesorio debido a que las muestras fueron colocadas directamente en el mismo, sin necesidad de preparación previa de la muestra, obteniendo una muy buena relación señal/ruido. Los espectros fueron adquiridos en el modo reflexión entre 600 y 4000 cm^{-1} , el equipo proporciona el espectro promediando 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Se obtuvo un espectro “background” del aire antes de obtener el espectro de cada muestra. Cada sistema se midió por triplicado a 25°C.

El análisis espectral fue realizado usando el programa Spectrum versión 6.3.5 (Perkin Elmer, Inc.); el espectro promedio de cada muestra se obtuvo a partir de los triplicados. El cristal mostró gran absorbancia (alrededor del 95 % de la luz incidente) en la región espectral entre 1,800 y 2,500 cm^{-1} , por lo que esta región fue sustraída. La línea de base fue corregida, y el espectro fue normalizado (entre 0 y 1) para la presentación de las figuras.

Se registró la altura de la señal de reflectancia para cada espectro a los siguientes valores de longitud de onda: 996, 1014, 1039, 1075, y 1145 cm^{-1} ; la relación de intensidad de las bandas (996/1014) y (1039/1014) fueron usadas como índices convenientes para las cadenas cortas de almidón (**figura 5**) (Lopez-Rubio y col., 2008; Shrestha y col., 2010; Liu y col., 2011). La intensidad de la relación de las bandas a los 1145 y 1075 cm^{-1} (1145/1075) fue usada con un índice conveniente del contenido de almidón en las muestras, ya que estas no fueron afectadas con los cambios en las cadenas cortas de almidón.

La altura de las bandas correspondientes a las proteínas (1640 y 1540 cm^{-1}) y lípidos (2923, 2853 y 1740 cm^{-1}) fueron también estudiadas y se relacionaron con la banda principal del almidón (996 cm^{-1}), a fin de establecer en cada uno de los espectros coeficientes normalizados entre los principales constituyentes de las muestras.

3.6.8 Difractometría de Rayos-X (DRX) de fracciones de molienda

Los difractogramas de Rayos-X fueron obtenidos mediante un Difractometro Philips modelo X'Pert MPD (PANalytical B.V, Almelo, Holanda), modo $\theta - 2\theta$, fuente de radiación de CuK (0.1542 nm) a 40 kV y 35 mA, con un ángulo de barrido desde 6° hasta 32° y un paso de $0,03^\circ$ por segundo.

El grado de cristalinidad fue calculado a partir de las áreas amorfas y cristalinas de cada patrón de difracción, después del procesamiento del difractograma. El procesamiento de los datos se llevó a cabo según lo expresado por Bruckner (2000), el cual utilizó un procedimiento de alisado (suavizado) en cada patrón de difracción, con el fin de eliminar el exceso de ruido en la señal y de esta manera poder identificar los picos característicos de los polímeros estudiados.

El procedimiento de suavizado realizado a cada patrón de difracción fue el siguiente: primero, los difractogramas se corrigieron en función de la línea de base y se suavizaron cada 15 datos, con el fin de reducir el ruido en el difractograma patrón, para esto se utilizó la función Savitzky-Golay (SG). Luego se realizó un proceso iterativo de acuerdo a los siguientes pasos: (1) utilización de la función Savitzky-Golay al juego de datos; (2) el nuevo patrón suavizado es comparado, punto por punto, con el difractograma previo, seleccionando los menores valores de las dos intensidades; (3) al patrón resultante (intensidades mínimas) se le realiza nuevamente el proceso de iteración y de esta manera se completa el ciclo de suavizado hasta obtener un área sin picos de refracción. Todas las muestras fueron obtenidas dentro de un máximo de 30 ciclos y el número de datos por cada ciclo fueron menos de 40.

El procesamiento de datos fue realizado mediante el uso del programa OriginPro version 8.0 (OringinLab Corporation, Northampton, Estados Unidos de América) y Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos de América). La media y la desviación estándar fueron reportados por duplicado.

El grado de cristalinidad fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación y fue expresado como porcentaje:

$$\text{Grado de Cristalinidad (\%)} = \frac{I_c}{I_a - I_c} \times 100 \quad \text{Ec. 13}$$

Donde I_a es el área amorfa y I_c es el área cristalina en los difractograma (Zhang y col., 2010)

3.6.9 Determinación del índice de absorción de agua y solubilidad de fracciones de molienda

El índice de absorción de agua (IAA) fue determinado usando el método de Chiang y Yeh (2002) con algunas modificaciones. Dos gramos de harina molida fueron dispersados en 30 mL de agua destilada y calentados en baño de agua a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 minutos. El contenido fue luego centrifugado a $1000 \times g$ por 10 minutos. Se pesó el sedimento y el sobrenadante se decantó y fue llevado a sequedad para determinar el contenido de sólidos. El índice de solubilidad de agua (ISA) fue determinado mediante la evaporación del sobrenadante durante toda la noche, obteniendo el contenido de los sólidos disueltos. Se informa el promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de duplicados. El (IAA) y (ISA) fueron calculados mediante las siguientes expresiones (14 y 15, respectivamente):

$$IAA = \frac{\text{peso del sedimento}}{\text{peso del solido seco}} \quad \text{Ec. 14}$$

$$ISA = \frac{\text{peso de los solidos disueltos en el sobrenadante}}{\text{peso de los solidos secos}} \times 100 \quad \text{Ec. 15}$$

3.6.10 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las fracciones de molienda

Las determinaciones se llevaron a cabo en un calorímetro Mettler-Toledo modelo DSC 822 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suiza), calibrado con indio ($156,6^\circ\text{C}$) plomo ($327,5^\circ\text{C}$) y zinc ($419,6^\circ\text{C}$). Para los experimentos de gelatinización, se llenó cada cápsula de aluminio ($40\mu\text{l}$) con aproximadamente 3mg de harina (FA) o almidón (AN) y 3 veces su peso de agua bidestilada, luego se selló la capsulas y se mantuvo por 24h a 5°C para asegurar el equilibrio e hidratación de la muestra. Posteriormente se sometieron a calentamiento programado de 30°C a 95°C a una velocidad de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, calentando simultáneamente una capsula vacía como referencia. Los termogramas fueron analizados mediante el programa informático Mettler Star obteniendo como parámetros las temperaturas de gelatinización de inicio (T_o), pico (T_p) y final (T_e), junto con la entalpía de gelatinización (ΔH).

Por otro lado, se estudiaron las muestras liofilizadas FA/BM y AN-Ge/BM conteniendo β -caroteno humidificadas a las diferentes HR en el rango 11 a 97 % con el fin de

determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) de las mismas. Se define la T_g como el salto producido por la línea de base (cambio de capacidad calorífica). Se utilizaron entre 10 y 15 mg por muestra, y la velocidad de barrido fue de 10°C/min.

Los valores obtenidos de T_g fueron modelados mediante la ecuación de Gordon y Taylor (Gordon y Taylor., 1952)

$$T_g = \frac{W_1 T_{g1} + kW_2 T_{g2}}{W_1 + kW_2} \quad Ec \ 16$$

Dónde T_{g1} y T_{g2} son las temperaturas de inicio de las transiciones vítreas de los sólidos amorfos y del agua pura respectivamente, W es la fracción en masa de cada componente (subíndice 1 para los sólidos y 2 para el agua) y k una constante que caracteriza el efecto de un segundo componente (en este caso el agua) sobre la T_g .

3.6.11 Propiedades reológicas de las fracciones de molienda

Las dispersiones de harina de amaranto perlado (4% y 8% g/100mL) fueron obtenidas mediante la mezcla de harinas con agua bidestilada, la cuales fueron agitadas durante 30 minutos a 25°C, luego la dispersión de harina fue calentada en baño de agua a 95°C durante 30 minutos con agitación constante. Al final del periodo de calentamiento la dispersión de harina fue enfriada hasta 25°C e inmediatamente fue transferida a la cubeta del viscosímetro rotacional. Con el fin de evaluar la estabilidad de las dispersiones con el tiempo, las dispersiones gelatinizadas se almacenaron a 4°C durante 24 horas.

Las propiedades de flujo de las diferentes fracciones de harinas se determinaron mediante un viscosímetro rotacional (Brookfield DV-LVT; Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, Estados Unidos de América). Las mediciones fueron hechas a diferentes velocidades de rotación correspondientes a un rango de torque en 10 – 100%. Para bajas viscosidades se utilizó un (UL/Y) adaptador con un (UL) eje. La muestra dentro de la cubeta del viscosímetro se mantuvo a 25°C.

$$\tau = K \dot{\gamma}^{n3} \quad Ec. \ 17$$

Los datos obtenidos fueron modelados mediante la ley de la potencia (**Ecuación 17**). Donde τ (Pa) corresponde al esfuerzo de corte y $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) corresponde a la velocidad de corte. Los parámetros reológicos determinados fueron el índice de consistencia (K ; $Pa s^n$) y el índice de flujo (n_3 ; adimensional)

3.6.12 Microscopía del almidón

Las determinaciones se realizaron en el Centro de Microscopías Avanzadas, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM), con cañón por emisión de campo marca Zeiss modelo Supra 40 (Carl Zeiss; Oberkochen, Alemania), para obtener imágenes digitales de alta resolución de las muestras de harina y almidón. Las muestras se colocaron sobre una cinta conductora de carbono de doble adhesión, la cual se fijó previamente a un soporte circular de aluminio del microscopio y se metalizaron recubriéndolas con una fina capa de oro. Se empleó un voltaje de aceleración de 3 kV y aumentos de 3000 x y 10000 x.

3.6.12 Espectroscopia ultravioleta/visible

Se utilizó un espectrofotómetro Jasco V-630 UV-VIS (JASCO Inc., Maryland, Estados Unidos de América) para determinar la concentración de β -caroteno presente en cada uno de los sistemas estudiados así como para cada uno de los tratamientos aplicados, se utilizó una alícuota de β -caroteno extraído con hexano de cada sistema Ramoneda y col (2010) y se midió en un rango de 300 a 600nm. Una vez obtenido el espectro, se corrigió la línea de base en los casos que fuera necesario (programa Spectra Manager JASCO Inc), y de acuerdo con lo reportado por varios autores (Wayne y col., 2002, Hyman y col., 2004) se utilizó la ley de Lambert-Beer para obtener la concentración de un cromóforo en solución. Para los cálculos del contenido de β -caroteno se utilizó el coeficiente de extinción molar ($145.300 M^{-1}cm^{-1}$, Britton, 1995) y el peso molecular del β -caroteno (536,9 g/mol). Los valores se expresan en contenido de β -caroteno por gramo de muestra (almidón o FA) en base seca. En muchos casos, se estudió el contenido de β -caroteno remanente, que representa el contenido de β -caroteno para cada sistema (en mg de β -caroteno/ g de muestra en base seca) antes de un determinado

tratamiento (L_0) respecto al contenido de β -caroteno en el mismo sistema (en mg de β -caroteno/ g de muestra en base seca) para dicho tratamiento (L) y el contenido de β -caroteno remanente fue expresado en porcentaje según la relación β -caroteno remanente = $100 * (L/L_0)$. Todas las muestras se midieron por triplicado.

3.6.13 Determinación de la movilidad molecular por medio de resonancia magnética nuclear (RMN)

Se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear de bajo campo (*LF-NMR*) resuelta en el tiempo con el objetivo de estimar la movilidad molecular de los protones (de los sólidos y del agua) en las muestras deshidratadas y posteriormente humidificadas a diferentes HR. Para todas las determinaciones se empleó un equipo Bruker Minispec mq20 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania), con un campo magnético operando a 0,47 T a una frecuencia de resonancia de 20 MHz.

Las muestras se colocaron en tubos específicos provistos por el proveedor (Bruker Biospin GmbH) de 10 mm de diámetro externo y 20 cm de altura, con la ayuda de un sacabocado, hasta una altura de 1cm aproximadamente, tratando que las paredes del tubo no fueran tocadas por la muestra, de forma tal que las muestras no excedan la región activa de la bobina de radiofrecuencia. Las muestras fueron equilibradas a $25,00 \pm 0,01$ °C en un baño térmico (Haake, modelo Phoenix II C35P, Termo Electrón Corporation GmbH, Karlsruhe, Alemania). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El análisis de T2 por FID se utilizó para estudiar la movilidad de los protones asociados a la matriz sólida registrándose suficientes ecos de manera que la línea de base fuera cero y que el T2 fuera determinado por el envolvente del decaimiento del eco. Se ajustó una ecuación biexponencial a los datos de las curvas de decaimiento.

Dónde: I es la intensidad de la señal de RMN al tiempo t. El tiempo de relajación T2s corresponde a los protones de la fracción menos móvil. A1 es proporcional a la cantidad de protones en el estado representado por T2s. T2L corresponde al tiempo de relajación los protones de la fracción más móvil y A2 es proporcional al número de protones en el estado T2L.

$$I = A_1 e^{\frac{-t}{T2s}} + A_2 e^{\frac{-t}{T2L}} \quad Ec 18$$

3.5.14 Análisis estadístico

El efecto de la energía de molienda sobre: el grado de cristalinidad, los índices FT-IR, las propiedades de hidratación/solubilidad, propiedades reologías, térmicas y en el tamaño de partícula de las fracciones enriquecidas en almidón (FA), así como el efecto de la temperatura y humedad sobre el contenido de β -caroteno en las matrices, fueron evaluadas mediante el análisis ANOVA (nivel de confianza $\alpha=0.05$ %) con un Tukey's post-test usando el programa Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos de América). En algunos casos, el valor p fue calculado mediante el t-test con el fin de analizar las diferencias entre muestras. La correlación (entre los datos de IR con WAXS) y la regresión no lineal fueron hechos mediante el mismo programa.

4. RESULTADOS

Los resultados encontrados en este estudio comprendieron:

- 4.1** Efecto y optimización de las variables de proceso (humedad del grano, carga del molino, tiempo) en la molienda abrasiva del grano de amaranto.
- 4.2** Efecto de las variables de proceso (velocidad, tiempo, energía) en el tamaño de partícula de las harinas de amaranto obtenidas por molienda de alto impacto.
- 4.3** Caracterización de las fracciones obtenidas por molienda abrasiva (punto óptimo) y mediante molienda de alto impacto (efecto de la energía de molienda).
- 4.4** Efecto y optimización de las variables de proceso de la molienda húmeda asistida en molino planetario de bolas (energía, concentraciones de álcali y tensoactivo) para la obtención de almidón de amaranto.
- 4.5** Evaluación del potencial encapsulante de matrices con base a fracciones de molienda de amaranto. Estabilidad de las matrices durante el almacenamiento en función de las condiciones de temperatura y humedad relativa.

4.1 MOLIENDA ABRASIVA

4.1.1 Ensayos preliminares de perlado. Determinación del rango operativo

Se llevaron a cabo con el propósito de explorar el uso del molino arrocero para el perlado del grano de amaranto y establecer el rango experimental de cada variable operativa para definir el diseño experimental. Usualmente a) se procesa arroz cáscara con un contenido de agua de 12 % (base seca, b.s.) aproximadamente; b) la carga de este molino es para 100 g de arroz cáscara, un grano con geometría y tamaño muy diferente al del amaranto; c) el grado de molienda tradicional se calcula con base a la masa de salvado y germen removida. El diseño de la cámara pulidora del molino arrocero es tal que bastan 2 minutos de procesamiento para lograr el pulido del arroz removiendo el salvado y el germen. Sin embargo se desconoce si la operación es factible y no existen antecedentes acerca del tiempo requerido para lograr el perlado eficaz del grano de amaranto.

4.1.2 Selección del rango de humedad

Generalmente se acepta que humedades inferiores a 12% b.s son consideradas como seguras para mantener la calidad en los granos. Llevar el grano a humedades inferiores a 8% b.s requiere tiempos largos de secado y un gran costo energético. Por lo tanto el rango de humedad elegido fue entre 12% – 8% b.s.

4.1.3 Selección del rango de la carga del molino

La cámara del molino arrocero fue diseñada para manejar un volumen de 160 cm³ de arroz, con el fin de mantener la eficiencia de la cámara de pulido, se determinó que el anterior volumen es equivalente a 128 g de amaranto, entonces, para explorar el efecto de la carga de molienda en el perlado del amaranto se eligió una masa máxima de 200 gramos y una mínima de 100 g de amaranto.

4.1.4 Selección del tiempo de perlado

Se prepararon 7 muestras (128g por muestra) por duplicado y se procesaron durante tiempos comprendidos entre 0 y 120min. Luego se determinó el peso del grano perlado o fracción FA de cada muestra para calcular el índice tradicional de perlado (IPT). Posteriormente se realizó el escaneo de las fracciones FA por triplicado, para obtener imágenes que fueron analizadas por medio del programa ImageJ el cual proporcionó el área aparente y el número de granos por muestra.

La selección se llevó a cabo basándose en ensayos de cinética de perlado utilizando amaranto con un contenido inicial de humedad del 12,0±0,2% (b.s.) y carga fija del molino (128 g de amaranto). En este caso se utilizó el índice de perlado (IP) calculado en base a la mediana del área aparente determinada mediante análisis de imágenes. En la **Tabla 1** se muestran los valores del índice de perlado (IP) calculados mediante la **ecuación (9)** y con fines comparativos se incluyeron también los valores del índice de perlado tradicional (**Ecuación 11**), calculado en base al peso de la fracción de grano perlado. El criterio fue determinar el tiempo máximo posible de perlado del grano de amaranto, evitando básicamente el empastado del molino y el calentamiento excesivo del producto (que podría provocar deterioro de la calidad). Se puede observar en la **tabla 1** que un incremento en el tiempo de operación provocó en general un aumento de

los índices de perlado. El índice IPT varió entre 0% (0 min) y 31,4% (120 min). Por otro lado el índice IP se incrementó desde 0% a 40±2% alcanzando su máximo valor a los 90 minutos de perlado.

Tabla 1. Valores de los índices de perlado IPT e IP durante la molienda abrasiva del grano de amaranto.

Muestra	Tiempo (min)	Área (mm ²)	Masa del grano (g)	Índice IPT (%)	Índice IP (%)
1	0	1,1 ± 0,1 ^a	128 ± 0,5 ^a	0 ^f	0 ^e
2	20	0,94 ± 0,09 ^{ab}	112 ± 5 ^b	13 ± 1 ^e	9,4 ± 0,9 ^d
3	40	0,84 ± 0,06 ^{bc}	102 ± 5 ^c	20,4 ± 0,9 ^d	19,2 ± 1,4 ^c
4	60	0,85 ± 0,08 ^{bc}	96 ± 4 ^{cd}	25,2 ± 1,1 ^{bc}	20,6 ± 1,8 ^c
5	70	0,76 ± 0,06 ^c	94 ± 4 ^{cd}	26,4 ± 1,3 ^b	29 ± 2 ^b
6	90	0,62 ± 0,04 ^d	92 ± 5 ^d	28,5 ± 1,6 ^{ab}	40 ± 2 ^a
7	120	0,76 ± 0,08 ^{bc}	88 ± 7 ^d	31,4 ± 2,4 ^a	30 ± 3 ^b

^{e,f} Los índices IPT e IP son iguales a cero a tiempo= 0 por definición. La diferencia de letras indica (a-d) diferencias significativas (p<0,05) sobre los índices. El valor de la desviación estándar está incluido.

Sin embargo a los 120 minutos de perlado el índice IP descendió hasta 30 ± 3% como consecuencia de un incremento del área aparente del grano. Visualmente se verificó aglomeración de polvo en la superficie del grano que fue perlado durante 120 minutos. Posiblemente la aglomeración se vio favorecida por el aumento de la temperatura del grano, provocada por efecto de la fricción dentro de la cámara de pulido. Experimentalmente pudo corroborarse que la temperatura se incrementaba con el tiempo de perlado superando los 45°C para tiempos de perlado mayores a 90 minutos. Con el objeto de evitar empastado del molino, aglomeración y deterioro del grano perlado por excesivo calentamiento se estableció 90 minutos como tiempo máximo.

Tabla 2. Variables reales y codificadas del diseño de Box-Benhken empleado en el estudio de la molienda abrasiva.

Muestra	Humedad del grano (%b.s)	Masa de amaranto (g)	Tiempo de molienda (min)	Variable codificada X1	Variable codificada X2	Variable codificada X3
1	10	200	90	0	1	1
2*	10	150	60	0	0	0
3	12	200	60	1	1	0
4	12	150	30	1	0	-1
5*	10	150	60	0	0	0
6	10	200	30	0	1	-1
7	8	150	30	-1	0	-1
8	8	150	90	-1	0	1
9	10	100	30	0	-1	-1
10	10	100	90	0	-1	1
11	12	150	90	1	0	1
12	8	100	60	-1	-1	0
13	12	100	60	1	-1	0
14	8	200	60	-1	1	0
15*	10	150	60	0	0	0
Control	12	100	0	-----	-----	-----

*Réplicas del punto central del diseño, Variables codificadas: Humedad: X1, Carga: X2, Tiempo: X3.

El límite inferior del rango experimental fue 30 minutos en orden a obtener un grado apreciable de perlado. Por lo tanto el rango operativo para el tiempo estuvo comprendido entre 30 y 90 minutos. Cabe señalar además, que los resultados encontrados evidencian la mayor sensibilidad del índice IP para detectar precozmente la

aglomeración del polvo. Este fenómeno quedó enmascarado al utilizar el índice tradicional de perlado IP.

4.1.5 Diseño experimental de Box-Behnken

Se realizaron 15 ensayos de molienda abrasiva en condiciones diferentes, con el fin de determinar la condición óptima de abrasión para obtener una fracción de molienda FA con bajo nivel de proteína y grasa. Para este estudio se empleó un diseño experimental de Box-Behnken, mediante el cual se estudió el efecto de 3 variables de proceso (humedad del grano, carga del grano en la cámara pulidora y tiempo de operación) sobre el contenido de proteína/grasa, índices IP/IPT, luminosidad L y cambio de color ΔE de la fracción FA obtenida.

En la **tabla 2** se pueden observar las diferentes condiciones experimentales de operación (valor real) así como también los valores codificados correspondientes de acuerdo al diseño experimental aplicado. Se adoptó una codificación lineal entre los valores reales y codificados, al valor real mínimo se le asignó un valor codificado de (-1) y al valor real máximo un valor codificado de (1). El punto central del diseño experimental (0, 0, 0) están representado por los ensayos N° 2, 5 y 15.

En la **tabla 3** podemos observar el valor de los índices empleados para el seguimiento de la molienda abrasiva del grano, los cuales son afectados por las condiciones de operación. Los datos mostraron un aumento máximo en los índices IP e IPT cercano al 40% así como una disminución en los contenidos de proteína (hasta un 68%) y grasa (hasta un 78%), revelando el efecto que tienen las variables de operación sobre las características del grano de amaranto perlado.

La **tabla 4** muestra los resultados del análisis de superficies de respuesta que da cuenta de los principales efectos de las variables de procesamiento sobre los diferentes índices para evaluar la eficacia de la molienda abrasiva del grano de amaranto. Los diferentes índices fueron modelados mediante un polinomio de segundo grado (**Ecuación 5**), encontrándose que las interacciones resultaron no significativas. Se puede observar el efecto cuadrático muy significativo del tiempo sobre todas las respuestas estudiadas, el efecto significativo de la humedad del grano (**tabla 4**) en IP y el efecto significativo de la carga sobre todos los índice con excepción de IP. Los índices se ajustaron

satisfactoriamente con la **Ecuación 5**, con una variación del r^2 (0,868 a 0,959), los cuales explicaron más del 95% de la variabilidad de los datos en la región estudiada.

Tabla 3. Valores de los índices de perlado y del contenido de proteína y grasa de las fracciones FA obtenidas por molienda abrasiva en función de las condiciones de proceso.

Muestra	Índice I.P	Índice I.P.T	Contenido de Proteína (%)	Contenido de Grasa (%)
1	37,1	22,0	11,3	5,2
2, 5, 15*	40,0	28,1	9,2	4,1
3	34,3	25,8	9,4	4,1
4	14,8	8,9	13,9	6,8
6	27,6	10,2	12,8	6,8
7	21,9	9,9	11,0	4,8
8	36,2	31,1	6,7	2,5
9	31,4	15,5	11,9	5,1
10	41,9	39,8	5,0	1,5
11	36,2	22,7	10,4	4,7
12	39,1	30,0	7,8	2,9
13	39,1	35,4	5,6	1,9
14	41,0	24,5	9,6	3,9
Control	0,0	0,0	15,5	6,9

*Punto central del diseño

Error relativo %: IP (4,6%); IPT (6,0%); Proteína (2%); Grasa (6,6%)

Tabla 4: Efectos de las condiciones de operación sobre los índices IP, IPT, contenido de proteína y grasa de las fracciones FA.

Coeficiente		IP	IPT	%Proteína	%Grasa
Constante	a0	40,00	28,11	9,23	4,10
Lineal	a1	-1,73 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,37 ^{ns}
	a2	-1,43 ^{ns}	-4,77 ^{***}	1,60 ^{**}	1,08 ^{**}
	a3	6,96 ^{***}	8,87 ^{***}	-2,03 ^{**}	-1,19 ^{**}
Cuadrático	a1.1	-4,46 ^{**}	-1,46 ^{ns}	-0,44 ^{ns}	-0,48 ^{ns}
	a2.2	2,80 ^{ns}	2,27 ^{ns}	-0,70 ^{ns}	-0,42 ^{ns}
	a3.3	-8,28 ^{***}	-8,51 ^{***}	1,73 [*]	1,04 [*]
Interacción	a1.2	-1,66 ^{ns}	-1,02 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,30 ^{ns}
	a1.3	1,79 ^{ns}	-1,85 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,16 ^{ns}
	a2.3	-0,24 ^{ns}	-3,12 ^{ns}	1,35 ^{ns}	0,52 ^{ns}
Correlación	r ²	0,956	0,959	0,875	0,868

a ***, **, * : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo.

En la **figura 17** se muestra la superficie de respuesta estimada donde se observa una región IP de color celeste donde se localiza el valor óptimo del índice (IP = 45,8), las condiciones operativas bajo las cuales se obtiene este valor máximo de IP son las siguientes: 10,2%b.s humedad, 100g de amaranto y 73 minutos de molienda. El análisis de los efectos de las variables de procesamiento, mostró que un aumento en el tiempo óptimo de molienda, así como, la disminución de la humedad optima, provocan un efecto desfavorable en el I.P.

En la **figura 18** se muestra la superficie de respuesta estimada donde se observa una región IPT de color celeste, en la cual se localiza el valor óptimo del índice (IPT = 39,46) las condiciones operativas bajo las cuales se obtiene este valor son las siguientes: 9,54%b.s humedad, 100g de amaranto y 82 minutos de molienda.

Figura 17. Superficie de respuesta estimada del índice IP.

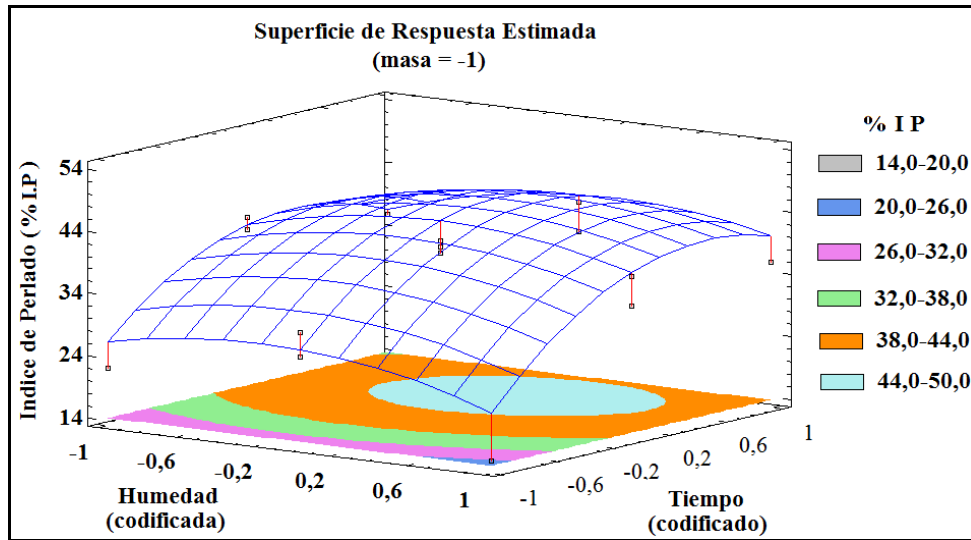
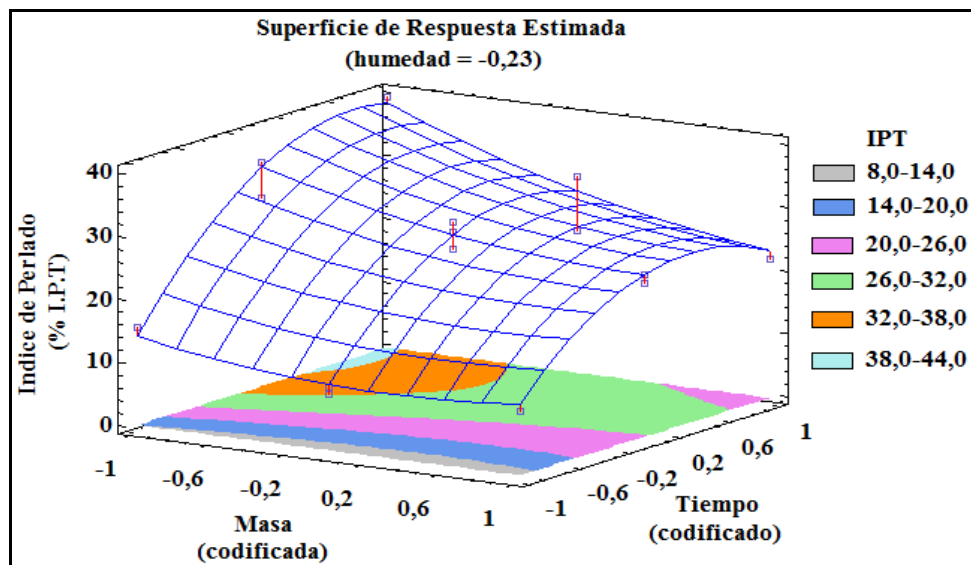


Figura 18. Superficie de respuesta estimada del índice IPT.



El análisis de los efectos de las variables de procesamiento reveló que el tiempo de molienda incide favorablemente en el aumento del IPT, tiempos de moliendas superiores al óptimo inducen aumento de la temperatura en la piedra de abrasión como en el grano, provocando aglomeración del material así como la disminución en el IPT.

En las **figuras 19 y 20** se observan las superficies de respuestas estimadas en la cual se muestra una región de color gris donde se localizan los valores mínimos de proteína (4,69%) y grasa (1,23) masa respectivamente. Las condiciones operativas bajo las cuales se

obtiene estos valores son: 8,04%b.s humedad, 100g de amaranto y 90 minutos de molienda.

Figura 19. Superficie de respuesta estimada del contenido de proteína.

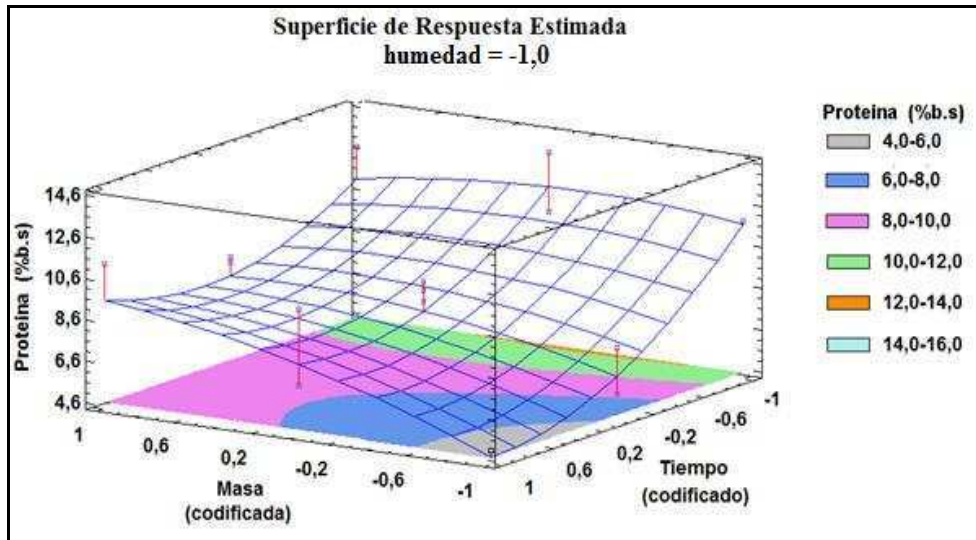
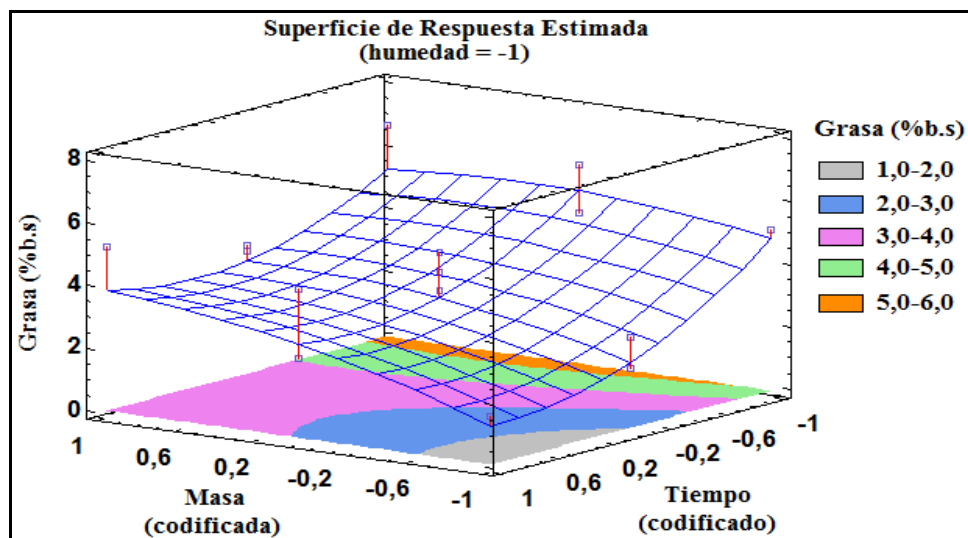


Figura 20. Superficie de respuesta del contenido de grasa.



El análisis de los efectos de las variables de procesamiento, mostró que un aumento en el tiempo de molienda tiene un efecto favorable en el contenido de proteína y grasa, mientras que, el aumento de la masa del grano en la cámara de pulido tiene un efecto desfavorable, ya que al aumentar la carga disminuye el área de contacto entre el grano y la piedra de abrasión.

En la **tabla 5** podemos observar el valores de luminosidad, parámetros a y b (CIELAB) y ΔE , empleados para seguir el cambio de color ocurrido durante la molienda abrasiva del grano. Los datos mostraron un aumento máximo en la luminosidad (L) del 30%, así como, el aumento del ΔE cercano al 22%, revelando el efecto que tienen las variables de operación sobre las características del grano perlado.

La **tabla 6** muestra los resultados del análisis de superficies de respuesta que da cuenta de los principales efectos de las variables de procesamiento sobre los diferentes índices de color empleados para evaluar la eficacia de la molienda abrasiva del grano de amaranto.

Los diferentes índices fueron modelados mediante un polinomio de segundo grado (**Ecuación 5**), encontrándose que las interacciones resultaron no significativas. Se puede observar el efecto cuadrático muy significativo del tiempo y el efecto lineal significativo de la carga del grano en la cámara pulidora sobre la luminosidad y el ΔE . Los índices se ajustaron satisfactoriamente mediante la **Ecuación (5)**, con una variación del r^2 (0,886 a 0,947), los cuales explicaron más del 95% de la variabilidad de los datos en la región estudiada.

En las **figura 21 y 22** se muestran las superficies de respuestas estimadas donde se observa una región de color naranja, en esta región se localiza los valores óptimos de la luminosidad ($L= 75,3$) y diferencia de color ($\Delta E = 21,1$).

Las condiciones operativas bajo las cuales se obtienen estos valores máximos para la L y ΔE son similares con respecto a la carga del grano en la cámara de pulido (100g), pero cambian un poco en relación a la humedad (12 - 11,4%b.s) y al tiempo de molienda (60 - 69min) respectivamente.

El análisis de los efectos de las variables de procesamiento, mostró que un aumento en el tiempo óptimo de molienda, así como, el aumento de la carga del grano en la cámara pulidora, provocan un efecto desfavorable en la luminosidad y ΔE .

Tabla 5. Valores luminosidad (L) y el cambio de color (ΔE) de las fracciones FA obtenidas por molienda abrasiva en función de las condiciones de proceso.

Muestra	Luminosidad L	Parámetro (a)	Parámetro (b)	ΔE
1	63,5	3,4	20,5	17,3
2, 5, 15*	71,0	1,2	16,3	12,4
3	67,8	2,8	21,2	6,4
4	62,6	3,7	24,4	19,4
6	60,6	3,6	21,8	12,2
7	67,6	2,6	21,3	19,7
8	72,9	0,9	16,3	12,9
9	69,3	2,3	22,7	17,0
10	71,4	1,5	19,0	14,2
11	67,5	2,0	18,4	19,0
12	73,5	1,0	18,2	22,7
13	76,0	0,2	15,5	13,9
14	68,1	2,5	19,4	18,9
Control	58,2	5,6	28,6	0,0

*Punto central del diseño

Error relativo %: L (1,7%); a (8,3%); b (5,4%)

Como se pudo observar anteriormente el análisis de las superficies de respuestas dio como resultado que los índices (IP e IPT), el contenido (proteína-grasa), así como la luminosidad y ΔE , sirven como indicadores en el seguimiento de la molienda abrasiva del grano de amaranto. Finalmente se llevó a cabo la optimización multirespuesta teniendo en cuenta todas las variables: IP, IPT, L y los contenidos de proteína y grasa.

Tabla 6. Efectos de las condiciones de operación sobre la luminosidad (L) y el cambio de color (ΔE) en las fracciones FA.

Coeficiente		L	ΔE
Constante	a0	71,58	18,54
Lineal	a1	-0,50 ^{ns}	-1,14 ^{ns}
	a2	-3,75 ^{***}	-3,49 ^{***}
	a3	1,37 ^{ns}	2,72 ^{***}
Cuadrático	a1.1	1,13 ^{ns}	-0,12 ^{ns}
	a2.2	-1,37 ^{ns}	-1,42 ^{ns}
	a3.3	-4,01 ^{***}	-5,29 ^{***}
Interacción	a1.2	-0,7 ^{ns}	-1,29 ^{ns}
	a1.3	-1,15 ^{ns}	0,09 ^{ns}
	a2.3	0,20 ^{ns}	-0,40 ^{ns}
Correlación	r ²	0,947	0,886

a ^{***}, ^{**}, ^{*} : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo;

En **tabla 7** se observa los valores de deseabilidad predictiva/observada, así como, los valores de los diferentes índices utilizados en el seguimiento de la molienda abrasiva del grano de amaranto. Se observa también que la condición experimental que satisface en gran medida la función deseabilidad desde el punto estricto del diseño es la muestra 10, la cual corresponde a adecuar la humedad inicial del grano a 10%b.s, manteniendo la carga del grano en 100g en la cámara de pulido por un tiempo de procesamiento de 90 minutos.

La **figura 23** muestra la superficie de respuesta de la deseabilidad, en la región de color naranja se puede apreciar el rango de máxima deseabilidad comprendido entre 0,8-1,0 en el cual se ubican las muestras 10 y 13.

Figura 21. Superficie de respuesta estimada de la luminosidad (L).

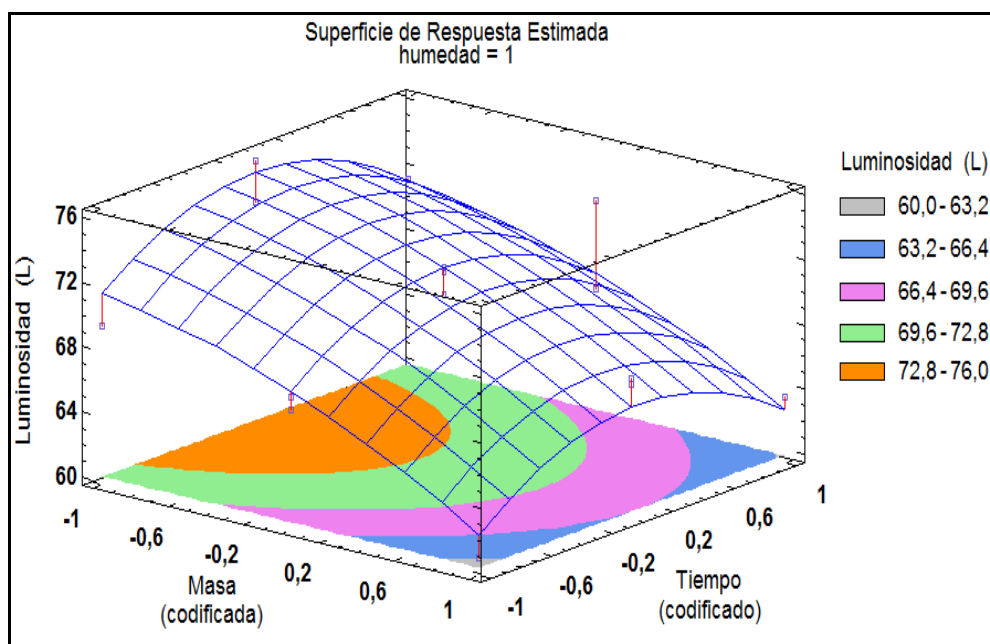


Figura 22. Superficie de respuesta estimada del cambio de color (ΔE).

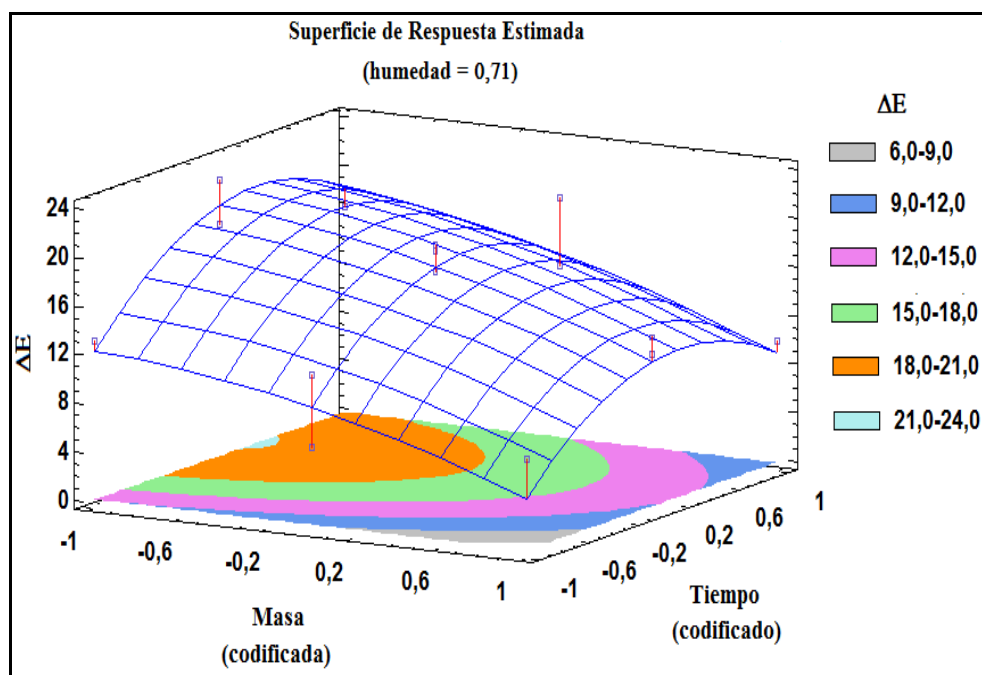


Tabla 7. Deseabilidad predictiva de los diferentes métodos utilizados en el seguimiento de la molienda abrasiva.

Muestra	IPT	IP	Proteína (%)	L	Deseabilidad predictiva	Deseabilidad observada
1	22,0	37,1	11,3	63,5	0,41	0,37
2	30,0	39,1	9,3	70,5	0,68	0,67
3	25,8	34,3	9,4	67,8	0,45	0,55
4	8,93	14,8	13,9	66,8	0,13	0,0
5	28,47	40,0	8,7	72,2	0,68	0,71
6	10,2	27,6	12,8	60,6	0,10	0,0
7	9,93	21,9	11,1	67,6	0,0	0,19
8	31,07	36,2	6,7	72,8	0,70	0,78
9	15,5	31,4	11,9	69,2	0,32	0,36
10	39,8	41,9	4,9	71,3	0,89	0,92
11	22,67	36,2	10,4	67,5	0,56	0,50
12	30,0	39,1	7,8	73,4	0,86	0,78
13	35,4	39,1	5,6	75,9	0,88	0,91
14	24,5	40,9	9,6	68,1	0,63	0,58
15	25,87	40,9	9,7	71,9	0,68	0,65

La **tabla 8** se muestran los contenidos de proteína, grasa y carbohidratos del grano entero de amaranto y de las dos fracciones FA y FLP que se obtienen después de la molienda abrasiva.

Puede observarse un aumento significativo en los contenidos de grasa y de proteína en la fracción FLP, esto se debe a la acción abrasiva del molino, la cual desprende el germen y las capas constitutivas del pericarpio que son las partes anatómicas del grano ricas en estos compuestos.

Por otro lado, el endospermo liberado del salvado constituye la fracción enriquecida en almidón o fracción amilácea (FA). Posteriormente las fracciones (FA) y (FLP) se caracterizaron mediante diferentes técnicas fisicoquímicas. La fracción FA fue utilizada como materia prima en los procesos de molienda seca y de molienda húmeda, los cuales se describen en las siguientes secciones.

Figura 23. Superficie de respuesta estimada de los valores de deseabilidad.

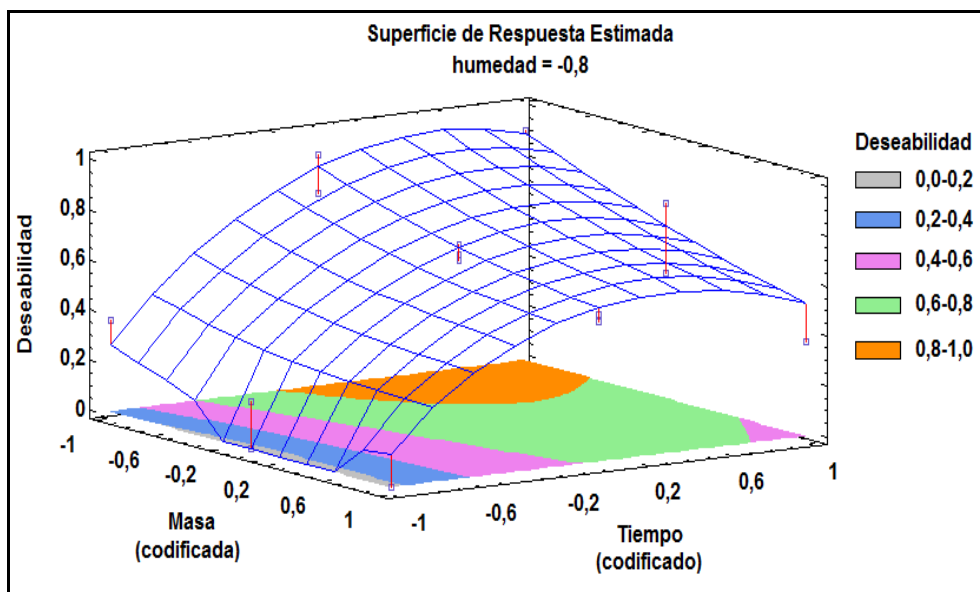


Tabla 8. Composición química del grano entero y de las fracciones obtenidas en la molienda abrasiva

Muestra	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
Grano entero	16,8 ± 0,1 ^b	7,7 ± 0,1 ^b	73,0 ± 0,4 ^b
FA	5,0 ± 0,1 ^c	1,5 ± 0,1 ^c	87,7 ± 0,4 ^a
FLP	46,6 ± 0,2 ^a	23,2 ± 0,1 ^a	25,2 ± 0,3 ^c

Las diferentes letras (a-c) en cada columna representan diferencias significativas.

FA: fracción amilácea; FLP: fracción lípido-proteica

4.2 MOLIENDA SECA DE ALTO IMPACTO

Se realizaron ensayos en un molino planetario de bolas, con el objeto de obtener harinas modificadas con granulometría y propiedades características. Se estudió el efecto de las variables operativas, la velocidad y el tiempo de molienda, sobre las propiedades de las harinas modificadas.

Se realizaron algunos ensayos preliminares para determinar la relación R1 adecuada (R1: masa de bolas/ masa de muestra), luego se establecieron las condiciones de velocidad y tiempo de molienda de acuerdo con el diseño experimental matriz de Doehlert.

Las harinas obtenidas presentaron diferente distribución granulométrica y las mismas fueron modeladas mediante el modelo de Rosin-Ramler-Bennet. Finalmente se aplicó el modelo de Holmes-Hukki, que relaciona la energía de molienda con la reducción del tamaño de partícula. Posteriormente se estudiaron las propiedades funcionales, fisicoquímicas y estructurales de las harinas modificadas en función de las condiciones de molienda.

4.2.1 Ensayos preliminares

Para desarrollar una molienda eficiente en un molino planetario de bolas, deben establecerse primeramente algunos parámetros como lo son el tamaño de bolas, la cantidad de masa a moler, la velocidad de rotación del molino y el tiempo de operación. Por la tanto, en este trabajo resultó útil definir la relación (masa de bolas /masa de amaranto) más eficiente, así como, el efecto de la velocidad y del tiempo de molienda.

Se realizaron ensayos preliminares con el fin de determinar la relación R1 (masa de bolas/masa de amaranto) más conveniente para disminuir el tamaño de partícula en términos de la mediana de la distribución de tamaño (D_{50}).

Se fijó la masa de bolas en 800g ya que esta cantidad corresponde a 1/3 del volumen de la jarra de molienda (condición recomendada por el fabricante para llevar a cabo la molienda), además se fijó la velocidad y el tiempo de molienda en 350 rpm y 30 minutos respectivamente (tiempo en el cual se logran cambios significativos).

Tabla 9. Valores de la relación R1 y diámetro mediano D_{50} a diferentes condiciones

Muestra	Masa de bolas (g)	Masa de amaranto-FA (g)	Relación R1	D_{50} (μm)	Color harina
1	800	320	2,5	565 ± 13	normal
2	800	288	3,5	438 ± 11	normal
3	800	160	5	201 ± 8	normal
4	800	133	6,5	251 ± 9	oscuro

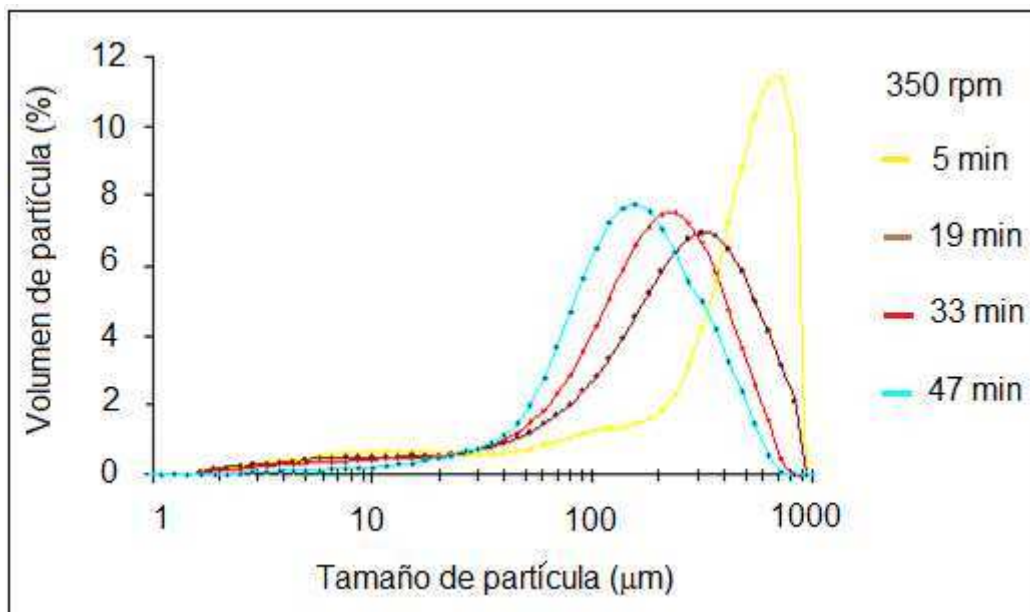
En la **tabla 9** se observa que las condiciones de la muestra 3 son las que dan como resultado un D_{50} menor, por lo tanto, la relación R1:5 fue seleccionada para la molienda seca en el molino planetario. También se observa que un aumento en R1 provoca más fricción y choques entre las bolas, por lo tanto, se pierde eficiencia en la molienda y contaminación de la muestra (color oscuro en las harinas).

4.2.2 Modelado de la distribución de tamaño por medio del modelo del Rosin-Ramler-Bennet (RRB)

Las distribuciones de tamaño correspondientes a los puntos del diseño experimental, se determinaron mediante el análisis de las muestras en un equipo Mastersizer 2000. Los datos obtenidos mostraron que todas las muestras tenían asimetría, es decir, que presentaron diferencias entre las medidas de tendencia central (media, mediana y moda).

Las distribuciones obtenidas se muestran en la **figura 24**, donde se graficó el volumen de partículas (%) “versus” tamaño de partícula (μm), puede apreciarse que las distribuciones presentan cola hacia el lado izquierdo (asimetría negativa). Este tipo de distribución no sigue un comportamiento normal o de campana de Gauss, por lo tanto para simular la distribución de tamaño se utilizó la ecuación de Rosin-Ramler-Bennet (RRB) la cual es adecuada para distribuciones sesgadas.

Figura 24. Distribución de tamaño de partícula de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto a partir de la fracción amilácea (FA).



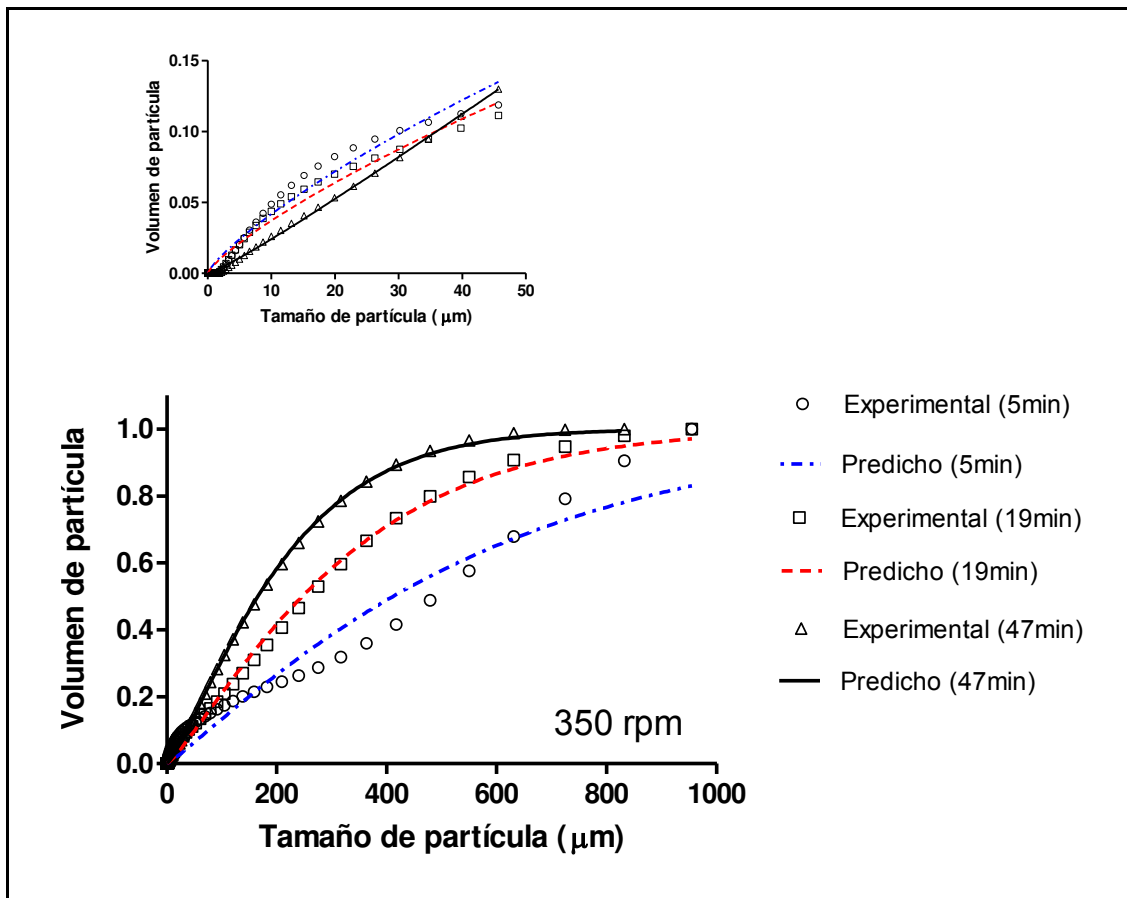
La **figura 24** muestra las distribuciones del tamaño de partículas de las harinas obtenidas a una velocidad de 350 rpm en función del tiempo de molienda.

En la figura se observa el desplazamiento de la distribución hacia valores de tamaños menores a medida que se incrementa el tiempo de molienda. También se puede observar el cambio de la forma de la distribución de “picuda” (5 min) a formas “achatadas” (19 min – 47 min).

Todos los puntos del diseño experimental fueron modelados por la ecuación de RRB (**Ecuación 4**), la cual ajustó satisfactoriamente, permitiendo la determinación de los dos parámetros característicos: el índice “n2” relacionado con la homogeneidad o dispersión de la muestra, y el diámetro D_{63} (diámetro característico).

En la **figura 25** se muestra el ajuste de la distribución de partículas mediante el modelo de RRB para las harinas obtenidas a velocidad constante de 350 rpm y tiempos variables (5-47) minutos. Puede observarse que la bondad de ajuste resultó más satisfactoria al incrementar el tiempo de molienda.

Figura 25. Modelado de la distribución de tamaño de partícula (volumen acumulado) mediante la ecuación de RRB de las harinas obtenidas a 350 rpm y tiempos variables. Se detalla en la imagen superior la región de tamaño de partícula inferior a 60 μm .

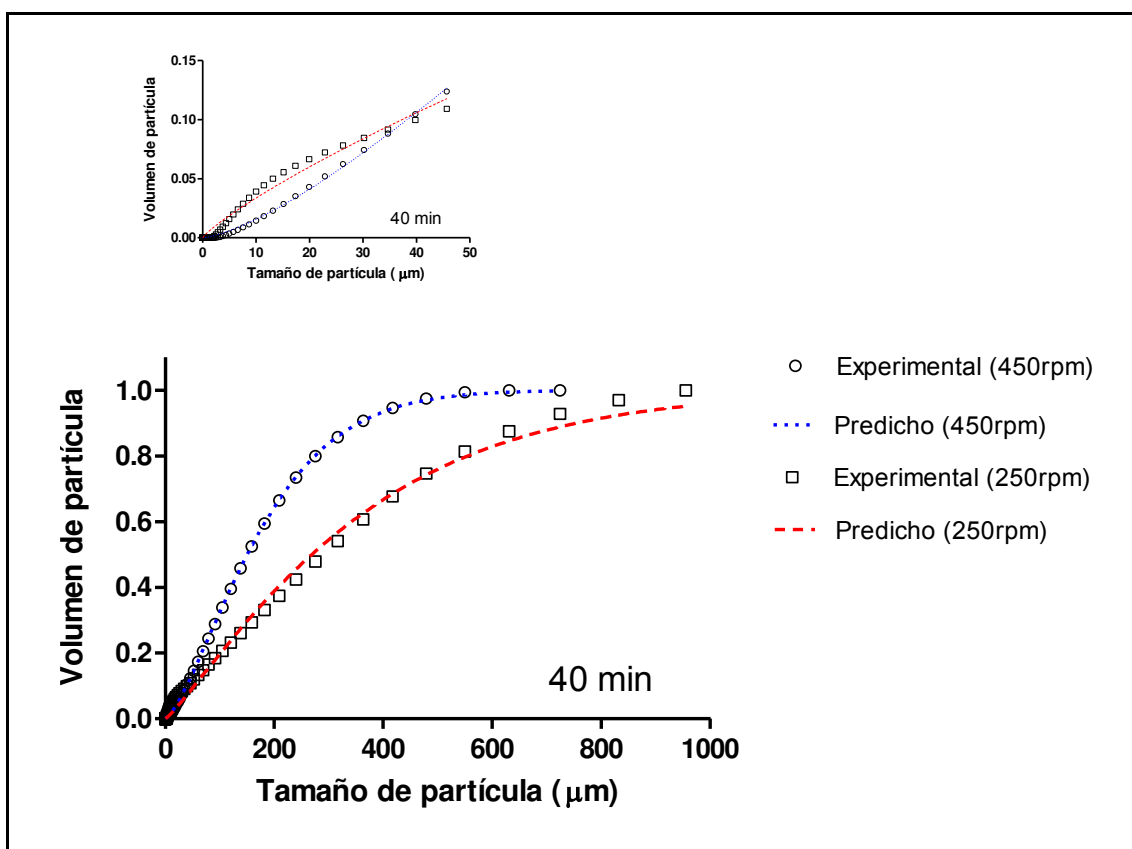


En la **figura 26**, se observa que el aumento en la velocidad de rotación de 250 rpm a 450 rpm produce un mejor ajuste de los valores experimentales apreciándose mayor coincidencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

En general, la ecuación de RRB resultó útil a la hora de modelar la granulometría de las harinas de amaranto, brindando información específica acerca de la homogeneidad de la harina así como del diámetro característico.

Los efectos cuantitativos de las variables de procesamiento (velocidad de rotación y tiempo de molienda) sobre los parámetros de la distribución de tamaño se determinaron mediante el modelo de RSM en la siguiente sección.

Figura 26. Modelado de la distribución de tamaño (volumen acumulado) mediante la ecuación de RRB de las harinas obtenidas a 40 min y velocidad variable. Se detalla en la imagen superior la región de tamaño de partícula inferior a $60\mu\text{m}$.



4.2.3 Diseño experimental red de Doehlert

Los ensayos de molienda seca se realizaron con base en el diseño en red de Doehlert. Este diseño comprende dos factores: la velocidad de rotación y el tiempo de molienda. Se investigó el rango de velocidades comprendido entre 250 y 450 rpm descartándose mayores velocidades debido al intenso calentamiento de la muestra, el cual provocaba una especie de cementación de la misma por fusión de los componentes del grano. Por otra parte se exploró el rango experimental del tiempo de molienda comprendido entre 5 y 33 minutos con el propósito de explorar la región donde se lograba menor tamaño de partícula.

En la **tabla 10** se pueden observar las diferentes condiciones experimentales de operación (valor experimental), así como, los valores codificados correspondientes de acuerdo al diseño aplicado.

Se adoptó una codificación lineal entre los valores reales y codificados, al valor experimental mínimo de velocidad se le asignó un valor codificado de (-0,87) y al valor experimental máximo un valor codificado de (0,87) estableciéndose tres niveles de velocidad. Para el tiempo se establecieron cinco niveles, al valor del tiempo mínimo se le asignó un valor codificado de (-1) y al máximo tiempo un valor máximo codificado de (1). El punto central del diseño experimental (0,0) están representado en la tabla por los ensayos N° 4, 5 y 6.

Tabla 10. Variables reales y codificadas del diseño en red de Doehlert empleado en el estudio de la molienda de alto impacto.

Muestra	Velocidad de molienda (rpm)	Tiempo de molienda (min)	Velocidad codificada (X ₄)	Tiempo codificada (X ₅)
1	250	12	-0,87	-0,5
2	250	26	-0,87	0,5
3	350	5	0,00	-1
4*	350	19	0,00	0
5*	350	19	0,00	0
6*	350	19	0,00	0
7	350	33	0,00	1
8	450	12	0,87	-0,5
9	450	26	0,87	0,5

*Réplicas del punto central del diseño, Variables codificadas: Velocidad: X₄, Tiempo: X₅.

4.2.4 Efectos de las condiciones de proceso sobre la distribución de tamaño de partícula

Se analizó el efecto de la velocidad y el tiempo de molienda sobre los parámetros del modelo de RRB y también sobre la mediana y el Span de la distribución de tamaño, debido a que son frecuentemente usados para la caracterización granulométrica de polvos. La **tabla 11** muestra los valores de la mediana (D_{50}) y del Span obtenidos mediante el análisis de la distribución de tamaño, así como, los valores del diámetro (D_{63}) e índice (n_2) obtenidos por el modelo RRB. También se incluyeron en la tabla los valores de la energía que se consume en el proceso de molienda.

Tabla 11. Fracciones FA obtenidas mediante molienda de alto impacto, evaluación de los diámetros característicos D_{50} y D_{63} e índices de dispersión Span y n_2

Muestra	Diámetro $D_{50}(\mu\text{m})$	Span (adimensional)	Diámetro $D_{63}(\mu\text{m})$	Índice RRB (n_2)	Energía de molienda (kJ/g)
1	486	1,25	564	1,34	0,126
2	316	0,98	399	1,01	0,267
3	488	1,09	559	1,15	0,159
4*	259	1,17	336	1,20	0,559
5*	259	1,18	335	1,22	0,591
6*	242	1,17	314	1,22	0,579
7	200	1,37	257	1,38	0,886
8	200	1,24	262	1,24	0,785
9	149	1,46	193	1,46	1,629
Control	234	2,64	315	2,24	---

Con fines comparativos, se determinaron los mismos parámetros para harina obtenida en un molino de cuchillas marca Dekalab (Buenos Aires, Argentina), la cual se adoptó como muestra control. La muestra control mostró un diámetro D_{50} ($233,6\mu\text{m}$) el cual

representa una reducción del 26% del tamaño del grano perlado (880 μm), mientras las harinas obtenidas en el molino de alto impacto alcanzaron un tamaño mínimo de D_{50} (149,4 μm) correspondiente al 17% del tamaño inicial (ver muestra 9). Resultados análogos se encontraron al comparar el control con el diámetro característico D_{63} . En relación a la dispersión de la población se observó una marcada reducción de los índices de dispersión (Span, n_2) lo cual indica la mayor homogeneidad (al menos 45% más homogéneo) de las harinas obtenidas en el molino planetario respecto del control.

El análisis estadístico por medio de la superficie de respuesta se observa en la **tabla 12** la cual muestra los efectos significativos de las variables en el proceso de molienda seca sobre los diámetros característicos D_{50} y D_{63} , así como, en los índices de dispersión Span y n_2 .

Tabla 12. Efectos de las condiciones de operación sobre los diámetros característicos D_{50} y D_{63} e índices de dispersión Span y n_2

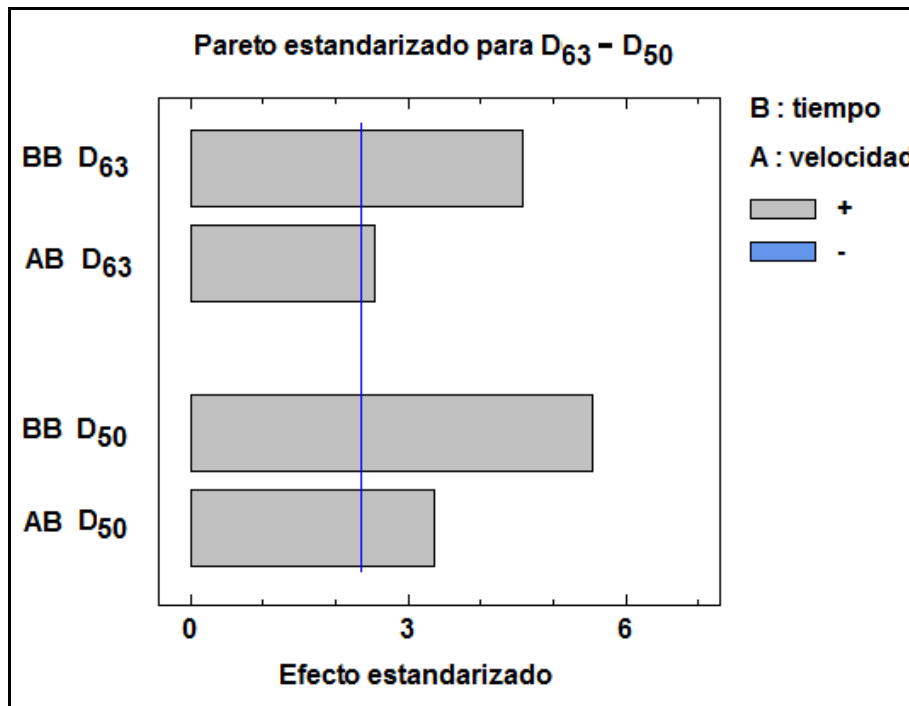
Coeficiente		Diámetro $D_{50}(\mu\text{m})$	Span (adimensional)	Diámetro $D_{63}(\mu\text{m})$	Índice RRB (n_2)
Constante	a0	253,4	1,17	328,3	1,2
Lineal	a1	-130,6***	0,13*	-146,2***	0,10 ^{ns}
	a2	-132,9***	0,08 ^{ns}	-139,7***	0,06 ^{ns}
Cuadrático	a1.1	15,5 ^{ns}	0,06 ^{ns}	8,4 ^{ns}	0,04 ^{ns}
	a2.2	90,7**	0,06 ^{ns}	79,3**	0,05 ^{ns}
Interacción	a1.2	69,3**	0,28**	55,4*	0,32*
Correlación	r2	0,992	0,894	0,992	0,857

a ***, **, * : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo.

El tiempo y la velocidad de molienda mostraron un afecto lineal muy significativo en la reducción de tamaño; por otra parte, el efecto cuadrático del tiempo y de la interacción fueron más significativos en poblaciones de menor tamaño, este efecto se visualiza al comparar los diámetros D_{63} y D_{50} . En la **figura 27** puede apreciarse el incremento del efecto de la interacción (tiempo-velocidad) y del efecto cuadrático del tiempo de

molienda en el diámetro D_{50} con respecto al diámetro D_{63} . Es decir que el efecto de las condiciones de molienda depende del tamaño de partícula alcanzado. Los índices de dispersión (Span, n_2) resultaron afectados tanto por la interacción de las variables de proceso como también, pero en menor medida, por el efecto de la velocidad de rotación.

Figura 27. Efecto de la interacción del tiempo-velocidad de molienda sobre poblaciones de partículas de diferente tamaño.



Las **figuras 28 y 29** muestran el comportamiento de los diámetros característicos D_{50} y D_{63} respectivamente. Los efectos de la velocidad y el tiempo son similares para los diámetros característicos D_{50} y D_{63} , destacándose que para obtener diámetros D_{50} y D_{63} de menor tamaño, se debe trabajar a 450 rpm por un rango de tiempo entre 24 y 27 minutos obteniéndose de esta manera diámetros mínimos D_{50} y D_{63} de $137,2\mu\text{m}$ y $181,4\mu\text{m}$ respectivamente. Si se prolonga el tiempo de molienda, comienza a sentirse el efecto cuadrático negativo del tiempo, donde la eficiencia de molienda se ve reducida debido a la aglomeración del polvo y el empastado del molino.

Figura 28. Superficie de respuesta estimada del diámetro D_{50} .

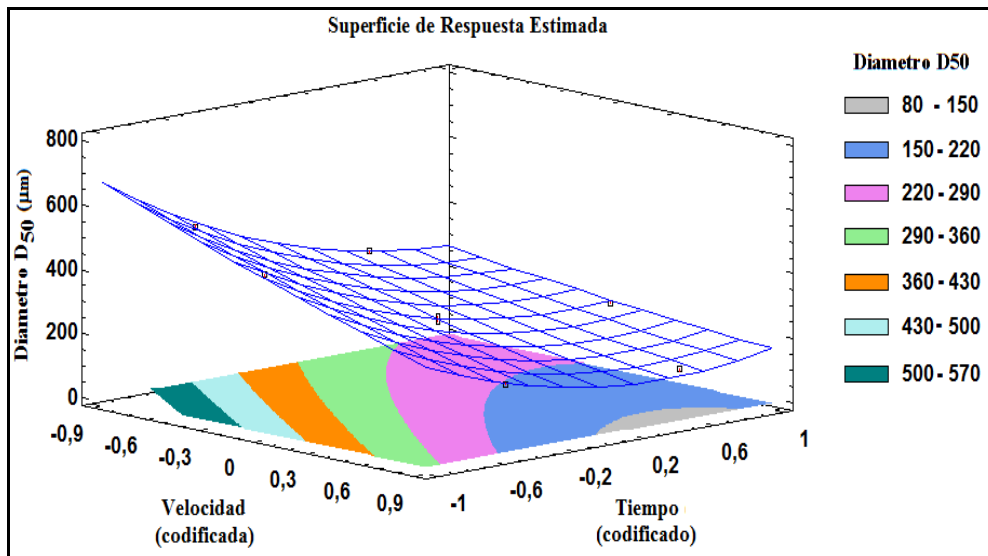
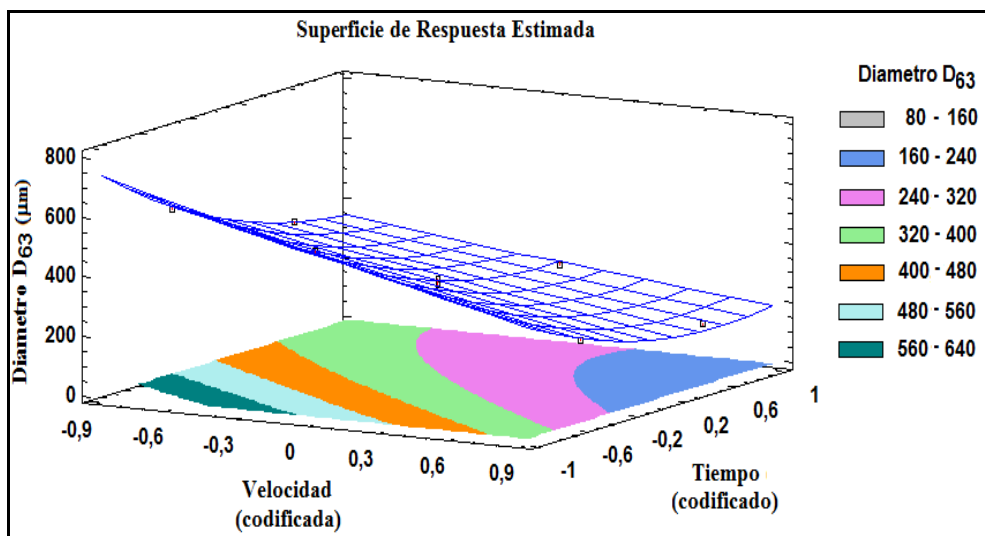


Figura 29. Superficie de respuesta estimada del diámetro D_{63} .



En las **figuras 30 y 31** puede observarse el comportamiento de los índices de dispersión bajo los efectos de la velocidad y tiempo de molienda. El efecto de las variables de proceso es similar tanto para el Span como para el índice n_2 (región gris), observándose el aumento de la dispersión (regiones coloreadas) cuando la interacción de las variables se incrementa. Cabe señalar que la mayor homogeneidad puede conseguirse combinando alta velocidad y bajo tiempo o baja velocidad y alto tiempo.

Figura 30. Superficie de respuesta estimada del Span.

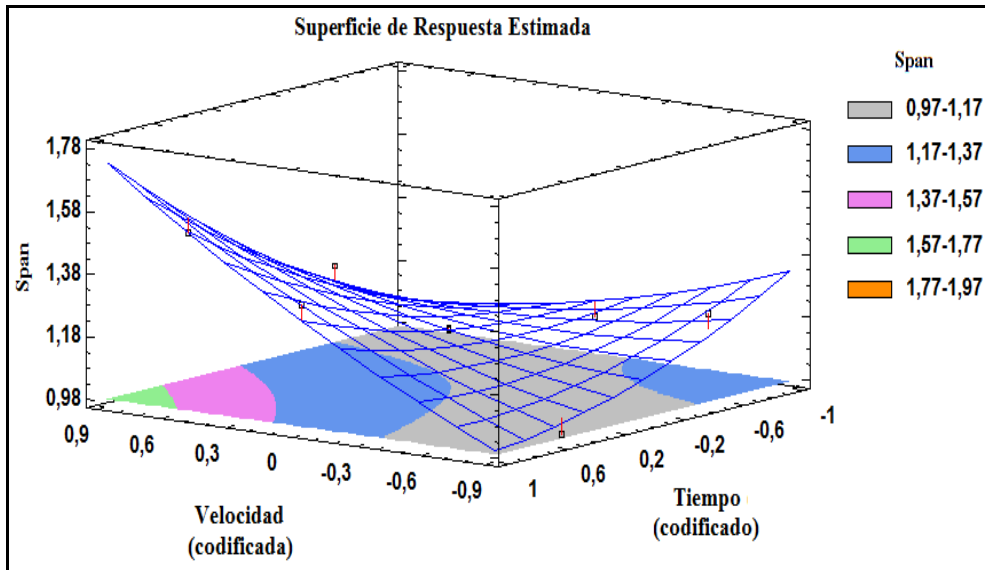
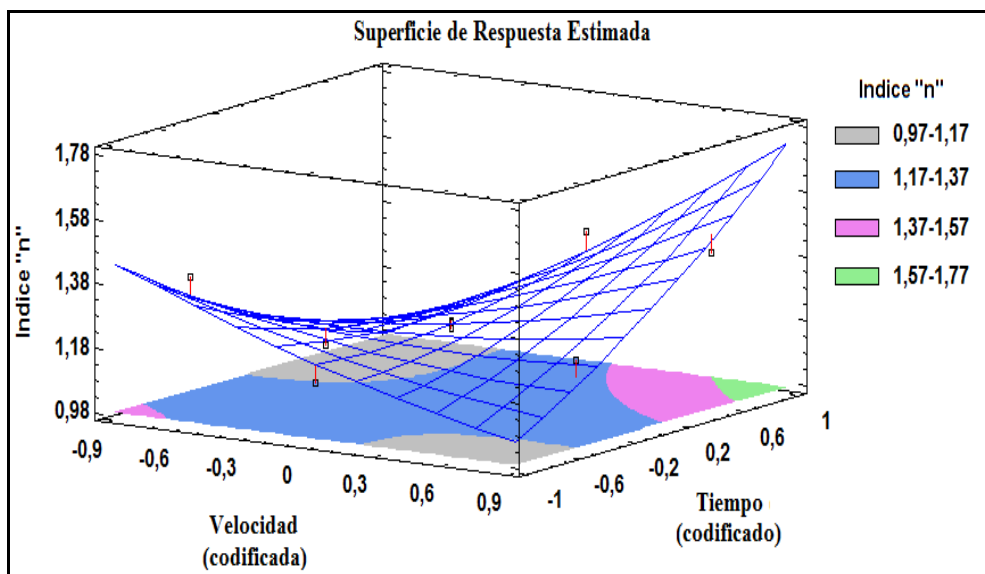


Figura 31. Superficie de respuesta estimada del índice n2.



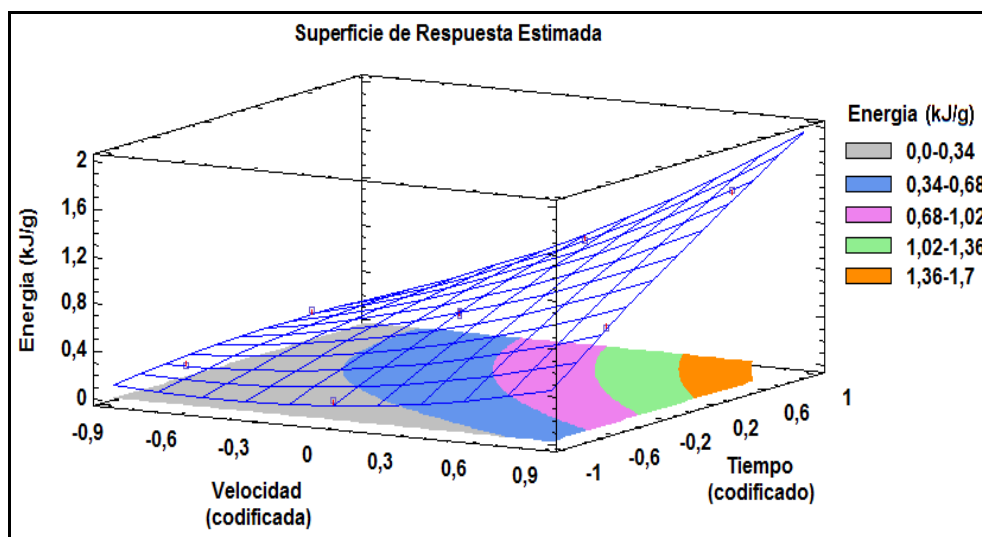
4.2.5 Efecto de las condiciones de proceso en la energía de molienda

La energía de molienda es la energía suministrada exclusivamente al contenido de la jarra (bolas + muestra), los valores de energía se obtuvieron mediante una función programable del molino planetario para cada punto del diseño experimental (Tabla 11). Se aplicó el método MSR para ajustar la energía de molienda en función de la velocidad

de rotación y del tiempo de molienda (**Tabla 10**) mediante un polinomio de segundo grado.

La **figura 32** muestra la superficie de respuesta obtenida, puede apreciarse el significativo efecto de la velocidad y del tiempo sobre la energía de molienda. El análisis de los datos mostró que el efecto de la velocidad es mayor que el efecto del tiempo, además se observó un efecto significativo de la interacción velocidad-tiempo en la energía de molienda. El efecto del tiempo sobre la energía de molienda es especialmente notable para el mayor nivel de velocidad (transición desde región azul hacia región naranja). Mientras que el efecto de la velocidad es más marcado al incrementar el tiempo.

Figura 32. Superficie de respuesta estimada de la energía de molienda.



El polinomio de segundo grado que predice la energía involucrada en el proceso de molienda ajustó satisfactoriamente ($r^2 = 0,991$) los resultados experimentales, la ecuación puede observarse a continuación:

$$E = 0,554 + 0,583*(v) + 0,406*(t) + 0,196*(v^2) + 0,406*(v)*(t) \quad (\text{Ec.19})$$

Donde (E) es la energía de molienda, (v) es la velocidad de giro del molino planetario y (t) es el tiempo de molienda.

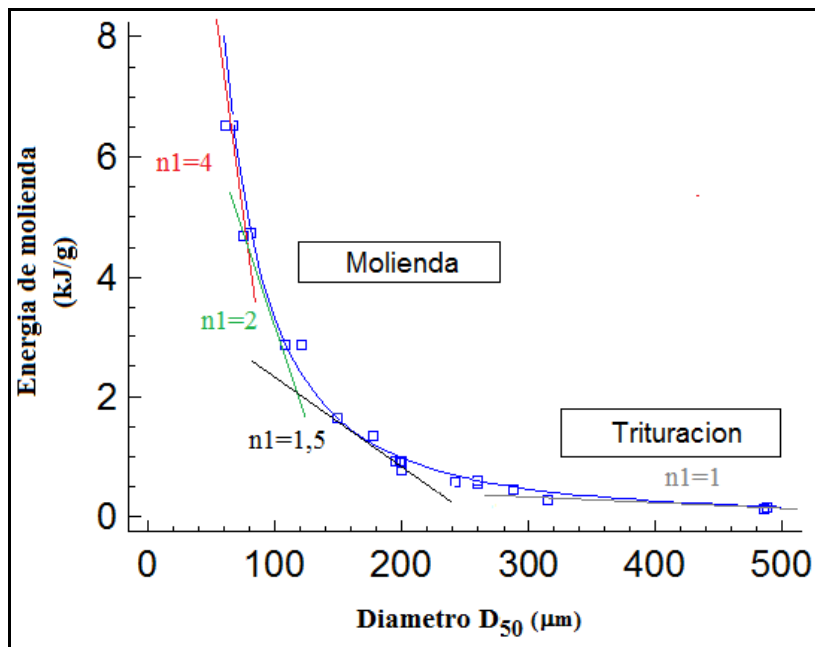
4.2.6 Relación entre la energía de molienda y el tamaño de partícula

Para este análisis se extendió el rango de energía hasta 6,5 kJ/g (**Tabla 11**) con el fin de alcanzar menores tamaños de partícula. La **figura 33** muestra la evolución del proceso de disgregación en función de la energía de molienda. Puede apreciarse la buena concordancia entre los valores experimentales y predichos mediante el modelo de Holmes (Ec. 1), cuya expresión integral es:

$$E = [C/1 - n_1] \left[(D_{50f})^{1-n_1} - (D_{50i})^{1-n_1} \right] \quad Ec\ 20$$

Dónde D_{50i} y D_{50f} son los valores de la mediana al inicio y al final del proceso respectivamente. Los valores de C y n_1 fueron 608 ± 18 kJ/[g $\mu\text{m}^{(1-n)}$] y $2,7 \pm 0,1$ respectivamente obteniéndose un ajuste muy satisfactorio ($r^2 = 0,991$). En la figura también se pueden observar los ajustes de las diferentes regiones donde el índice (n_1) va adquiriendo distintos valores (de 1 a 4).

Figura 33. Curva de energía de molienda en función de la mediana (D_{50}) de la distribución de tamaño de partícula.



Se puede considerar que la disgregación comprende dos etapas, la primera ocurre al inicio de la molienda donde el grano de amaranto perlado es reducido a partículas de hasta $300\mu\text{m}$ este proceso es conocido como trituración. La segunda es la etapa de molienda donde el tamaño de partícula se va reduciendo a costa de un mayor gasto

energético. En la **figura 33** se observa que al inicio del proceso de reducción de tamaño el valor del índice (n_1) es igual a 1, lo que indica que la energía necesaria para llevar a cabo el proceso es independiente del tamaño inicial de las partículas en otras palabras esta etapa del proceso puede ser modelado convenientemente por la ecuación de Kick. Si se sigue entregando energía al sistema el valor del índice (n_1) aumenta hasta 1,5 mostrando que esta parte del proceso puede modelarse mediante la ecuación de Bond, la cual establece una relación lineal entre la energía necesaria para llevar a cabo la pulverización y la raíz cuadrada del tamaño de partícula. Cuando el valor de (n_1) es igual a 2 se tiene un proceso de molienda fina, el cual es descrito satisfactoriamente por la clásica ecuación de Rittinger (**Ecuación 2**). Este modelo expresa que la energía consumida en el proceso es proporcional a la nueva superficie creada. Por lo tanto, el proceso de reducción de tamaño del grano de amaranto es un proceso diverso el cual puede modelarse en condiciones reales de trabajo mediante cualquiera de las ecuaciones anteriores, teniendo siempre en cuenta el rango de tamaño estudiado.

El proceso de molienda logró reducir el diámetro mediano (D_{50}) desde $880\mu\text{m}$ (tamaño del grano perlado) hasta $68\mu\text{m}$, utilizando $6,5\text{kJ/g}$. Puede observarse en la **figura 33** el proceso de trituración ($n_1=1$) donde ocurre la mayor reducción del tamaño ($500\mu\text{m}$ hasta $250\mu\text{m}$) utilizando una pequeña cantidad de energía $0,5\text{kJ/g}$. También se observa el crecimiento exponencial de la curva para tamaños de partícula menores a $150\mu\text{m}$ indicando que se necesita más energía para cambios pequeños de tamaño, por lo tanto el proceso de molienda va perdiendo eficiencia. Por otra parte, esa energía excedente del proceso de molienda se pierde en: deformaciones elásticas de partículas antes de romperse, fricción entre partículas, disipación de la energía en forma de ruido, vibraciones y calor, entre otras. El modelo generalizado propuesto (**Ecuación 1**) proporcionó un ajuste muy satisfactorio ($r^2 = 0,991$) de la relación entre energía y tamaño, con un valor de n_1 de 2,7 para todo el rango de tamaño barrido. La bondad del ajuste puede apreciarse claramente en la **Figura 33** (línea azul). El apartamiento del valor predicho por Rittinger ($n_1 = 2$) señala que en el caso de la molienda de alto impacto, parte de la energía no se utiliza para crear nueva superficie sino que disipa en forma de calor modificando las propiedades de la harina. Definidos los factores que afectan la producción energética en el molino planetario de bolas y el modelo de molienda, se estudiará en la sección siguiente el efecto de la energía sobre las propiedades estructurales, térmicas y físicas de las harinas obtenidas.

4.3 CARACTERIZACION DE LAS HARINAS OBTENIDAS MEDIANTE MOLIENDA ABRASIVA Y DE ALTO IMPACTO

El proceso de molienda es una operación que permite obtener diferentes tipos de harinas desde el punto de vista granulométrico y funcional. Por esta razón en esta sección abarcaremos los cambios en las propiedades físicas, funcionales y estructurales que se generan en las fracciones de molienda obtenidas dentro del rango experimental establecido.

4.3.1 Contenido de lípidos, proteína y carbohidratos de las fracciones FA y FLP obtenidas por molienda abrasiva y de impacto

El grano de amaranto fue procesado en un molino de abrasión en condiciones óptimas (humedad=10%, b.s.; carga=100 g; tiempo= 90 min) produciendo dos fracciones, una amilácea (FA) y la otra lípido-proteica (FLP) a las cuales se les determinaron los constituyentes principales.

En la **tabla 13** puede observarse respecto al grano entero un incremento del 20% en el contenido de almidón en la fracción FA, mientras que disminuyó considerablemente el contenido de proteínas (70%) y el de lípidos (80%). Por otra parte, el contenido de lípidos se triplica y el de proteínas se multiplica por 2,77 en la fracción FLP en relación al grano entero.

La molienda de impacto no afectó el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos en las fracciones FA obtenidas en el molino planetario usando una energía de molienda de 6,52 kJ/g. Cabe señalar que los niveles de enriquecimiento en las fracciones FA y FLP de esta tesis fueron similares a los obtenidos por Tosi y col. (2000) y por Lindembom y col. (2009) quienes lograron separar las fracciones del grano de amaranto combinando procesos de secado y molienda diferencial.

La fracción FA fue procesada en el molino planetario de bolas utilizando 5 niveles de energía, los cuales están comprendidos entre 0,92kJ/g y 6,52kJ/g, con el objetivo de obtener harinas con diferentes características, las cuales fueron analizadas por varios métodos. Además se preparó una harina control por medio de un molino de cuchillas considerando que este tipo de proceso no genera ningún daño en la estructura del granulo de almidón.

Tabla 13. Composición del grano de amaranto y de las fracciones obtenidas por molienda abrasiva (FA, FLP) y por molienda de alto impacto (FA molida).

Fracción del grano	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
Grano entero	7,7 ± 0,1 ^b	16,8 ± 0,1 ^b	73,0 ± 0,4 ^b
Fracción FA	1,5 ± 0,1 ^c	5,0 ± 0,1 ^c	87,7 ± 0,4 ^a
Fracción FLP	23,2 ± 0,1 ^a	46,6 ± 0,2 ^a	25,2 ± 0,3 ^c
Fracción FA molida	1,5 ± 0,1 ^c	5,0 ± 0,1 ^c	87,7 ± 0,4 ^a

La diferencia de letras indica (a-c) diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre la composición. El valor de la desviación estándar está incluido.

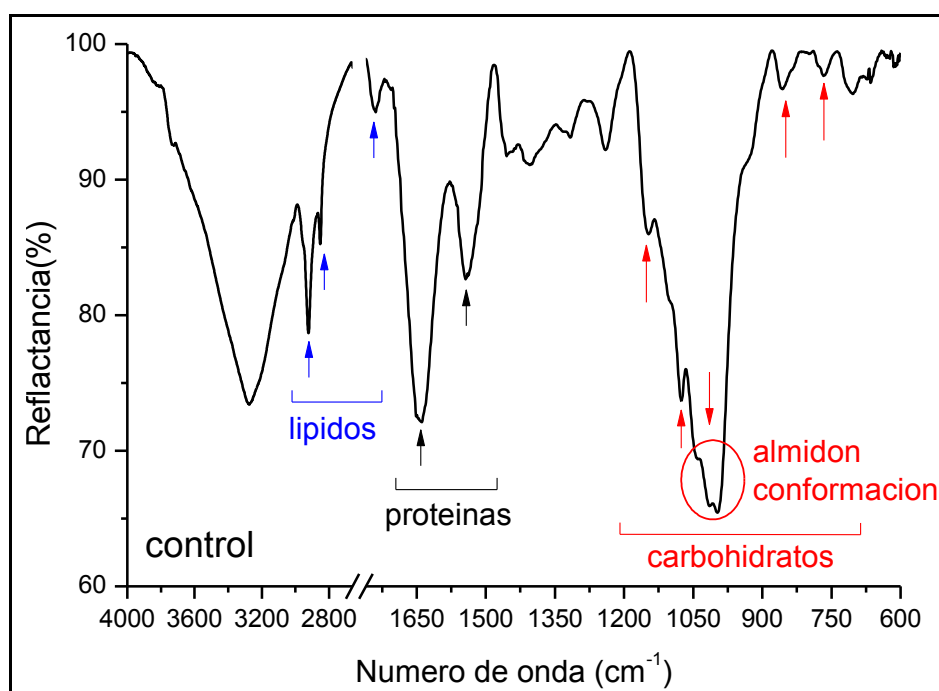
4.3.2 Caracterización por espectroscopia FT-IR de las fracciones FA y FLP obtenidas por molienda abrasiva y de impacto

La **figura 34** muestra un espectro completo de los componentes del grano de amaranto en el cual fue posible identificar 3 áreas separadas para el análisis de carbohidratos, proteínas y lípidos.

La asignación de bandas, basada en datos de bibliografía para harina de amaranto, se puede apreciar en la **tabla 14**. Según Tapia-Blácido (2005) la banda principal a los 996 cm^{-1} puede atribuirse al estiramiento del enlace C-O y C-O-C, generalmente esta banda muestra dos hombros a los 1014 cm^{-1} y 1039 cm^{-1} atribuibles al estiramiento C-O y C-O-H, siendo este último pico más intenso que el primero. Las características de los picos anteriores están asociadas principalmente a la conformación de carbohidratos. Las bandas asociadas a las proteínas pueden observarse a los 1640 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} que corresponden al estiramiento de los enlaces C=O de la amida I y a la vibración del enlace N-H de la amida II respectivamente (Cremer and Kaletunç., 2003; Barth., 2007).

La contribución de los lípidos puede ser observada en las bandas a 2923, 2853 y 1740 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos del C-H. Espectros con características similares fueron obtenidos por Tapia-Blácido (2006) cuando analizaron películas hechas a base de harina y almidón de amaranto. Las fracciones FA y FLP obtenidas mediante la molienda abrasiva fueron analizadas mediante espectroscopia FT-IR con el fin de analizar los espectros característicos determinando a su vez, si las operaciones de molienda abrasiva y de impacto generan un cambio en sus estructuras internas.

Figura 34. Espectro completo FT-IR del grano de amaranto.



La **figura 35** muestra los espectros de la harina control y de las fracciones FA y FLP. Los espectros de las fracciones FA y FLP muestran los mismos picos principales de reflectancia observados en la muestra control. Se puede observar en el espectro correspondiente a FA un pico de gran intensidad a una longitud de onda de 996 cm^{-1} superior al de la muestra control, indicando un enriquecimiento de almidón en la fracción FA.

Por otro lado, en el espectro de la muestra FLP se observan picos de gran intensidad a longitudes de onda de 2923 cm^{-1} , 2853 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , siendo las intensidades superiores a las correspondientes en las muestras control y FA; dejando en evidencia el enriquecimiento de lípidos y proteínas en la fracción FLP.

Cabe aclarar que la forma del pico a 996 cm^{-1} de la fracción FLP es diferente a los de la muestra control y FA, revelando que la principal contribución a esta banda puede ser atribuida a la fibra que fue removida del grano mediante la molienda abrasiva.

Tabla 14. Picos de reflectancia en el espectro FT-IR de las fracciones de amaranto

Pico (cm ⁻¹)	Picos de reflectancia	Referencia
3275	OH, (estiramiento)	Tapia-Blácido, 2006
2923	C-H (estiramiento) CH ₂ antisimétrico	Cremer & Kaletunç, 2003
2853	C-H (estiramiento) CH ₂ simétrico	Cremer & Kaletunç, 2003
1740	Grupo ester carbonilo (estiramiento)	Tapia-Blácido, 2006
1640	Amida I (estiramiento C=O)	Barth, 2007
1540	Amida II (flexión N-H)	Barth, 2007
1240	O-H (flexión)	Tapia-Blácido, 2006
1147	C-O (estiramiento) C-O-H	Jiugao y col, 2005
1076	C-O (estiramiento) C-O-H	Jiugao y col, 2005
1039-1015	C-O (estiramiento) C-O-H	Tapia-Blácido, 2006
996	C-O (estiramiento) C-O-C	Tapia-Blácido, 2006
850	C-O (estiramiento) C-O-C	Tapia-Blácido, 2006
750	C-O (estiramiento) C-O-C	Tapia-Blácido, 2006

La **tabla 15** muestra las bandas principales presentes en el espectro FT-IR de las diferentes fracciones obtenidas mediante los diversos tratamientos de molienda y envejecimiento. Con el fin de evitar minimizar errores y mejorar el análisis, los espectros fueron normalizados y se informó la relación entre bandas tomando como base la de mayor intensidad que fue la del almidón (996 cm⁻¹).

Figura 35. Espectro completo FT-IR de las fracciones FLP y FA obtenidas mediante la molienda abrasiva

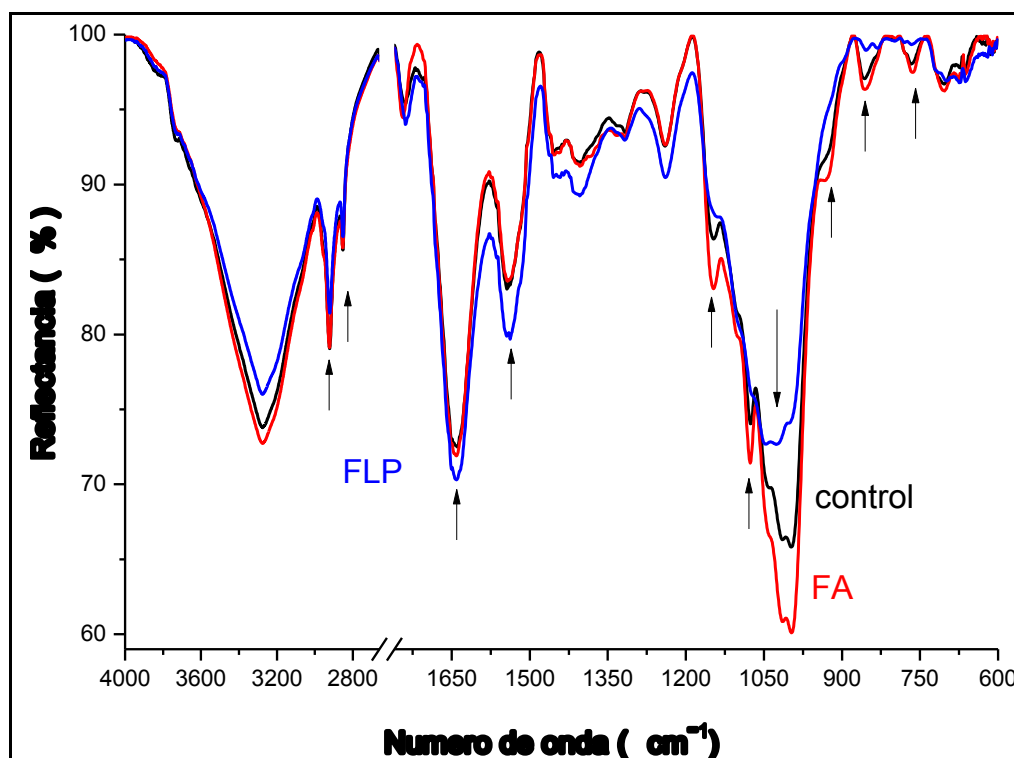


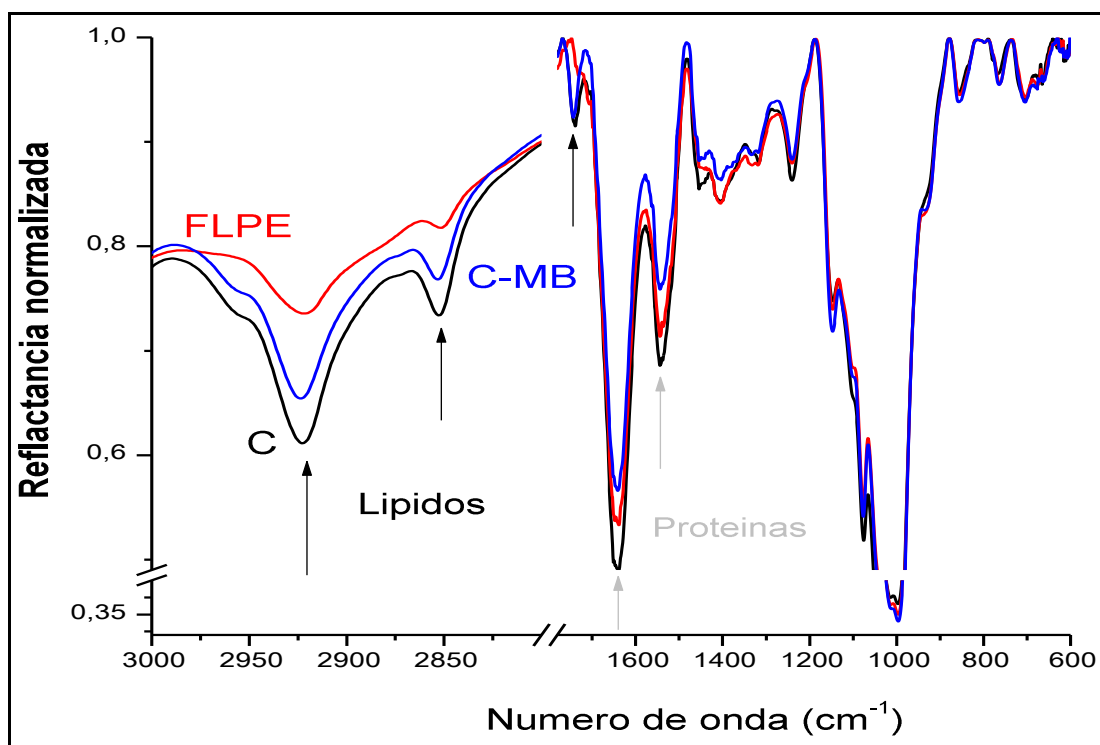
Tabla 15. Intensidad relativa de las bandas características FT-IR usando una banda de almidón (996 cm^{-1} ó 1014 cm^{-1}) como referencia

Fraccion	Banda almidón		Banda lípido	Banda proteína	
	996/1014	1039/1014	2923/996	1640/996	1540/996
C	$1,020 \pm 0,004^{ab}$	$0,896 \pm 0,004^b$	$0,35 \pm 0,05^b$	$0,76 \pm 0,04^b$	$0,46 \pm 0,03^b$
C-MB	$1,029 \pm 0,001^a$	$0,840 \pm 0,009^d$	$0,280 \pm 0,003^{bc}$	$0,66 \pm 0,02^c$	$0,37 \pm 0,02^{cd}$
FA	$1,017 \pm 0,004^b$	$0,87 \pm 0,02^c$	$0,30 \pm 0,02^b$	$0,678 \pm 0,007^b$	$0,378 \pm 0,007^c$
FA-MB	$1,020 \pm 0,001^{ab}$	$0,796 \pm 0,005^f$	$0,23 \pm 0,03^{cd}$	$0,62 \pm 0,01^c$	$0,34 \pm 0,01^d$
FLP	$0,957 \pm 0,007^d$	$0,99 \pm 0,01^a$	$0,48 \pm 0,08^a$	$1,07 \pm 0,05^a$	$0,68 \pm 0,02^a$
FLPE	$1,022 \pm 0,002^{ab}$	$0,830 \pm 0,003^d$	$0,237 \pm 0,004^d$	$0,70 \pm 0,02^b$	$0,41 \pm 0,02^{bc}$

C-MB: grano de amaranto obtenido mediante molienda de alto impacto C: grano de amaranto control, FA: fracción amilácea obtenida mediante molienda abrasiva, FA-MB: fracción amilácea obtenida mediante molienda de alto impacto, FLP: fracción lípido-proteica obtenida mediante molienda abrasiva, FLPE: fracción lípido-proteica obtenida por molienda abrasiva y almacenada por 6 meses. Las diferentes letras (a-g) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada relación de intensidad. Los valores de desviación estándar están incluidos. C-MB y FA-MB: 350 rpm, 47 min

Como se observa en la **tabla 15** hubo un aumento de 0,76 hasta 1,07 en la relación 1640/996 y desde 0,46 hasta 0,68 en la relación 1540/996 en la muestra FLP frente al control, lo cual indica el enriquecimiento de proteínas en la fracción FLP obtenida por molienda abrasiva. De la misma manera, se observó en la fracción FLP un aumento de 0,35 a 0,48 en la relación 2923/996 asociada a los lípidos. En contraste en la muestra FA se pudo observar un descenso en la intensidad de las bandas asignadas a las proteínas y lípidos respecto al control, indicando el empobrecimiento de proteínas y lípidos en la fracción FA. Con relación al tratamiento de molienda de alto impacto, puede observarse el efecto que tiene el proceso en la reducción de la intensidad relativa de reflectancia desde 0,76 a 0,66 en la banda 1640/996 y desde 0,46 a 0,37 en la banda 1540/996 de la muestra control con respecto a la muestra molida C-BM.

Figura 36. Espectro FT-IR de la fracción lípido-proteica FLP (envejecida FLPE) y la muestra molida (C-BM) con respecto al control, mostrando el efecto de la molienda y del envejecimiento.



Según Prabhasankar and Rao (2001) la desnaturalización de proteínas puede ocurrir en la molienda de alto impacto o de fricción, debido a la elevada energía que se produce durante la molienda. Por otra parte, se observó un descenso en la intensidad en estas

mismas muestras desde 0,35 hasta 0,28 en la banda 2923/996 debido al daño ocasionado en los lípidos, este efecto fue muy similar al encontrado en la muestra FLPE, la cual fue almacenada a 5°C durante 6 meses.

En la **figura 36** puede observarse la variación de la intensidad de las bandas. Con relación al efecto de la molienda de alto impacto sobre las bandas características del almidón se observó una reducción de la relación de intensidad $1,039/1,014 \text{ cm}^{-1}$ desde 0,890 (fracción C) hasta 0,796 (fracción FA-BM) indicando que la estructura ordenada del gránulo de almidón fue parcialmente destruida por el tratamiento de molienda de alto impacto. Mientras que el tratamiento de molienda abrasiva no provocó cambios significativos en esta relación de intensidad. La relación entre la intensidad de las bandas obtenidas por FT-IR y la intensidad de los difractogramas obtenidos por DRX se estudia en la próxima sección.

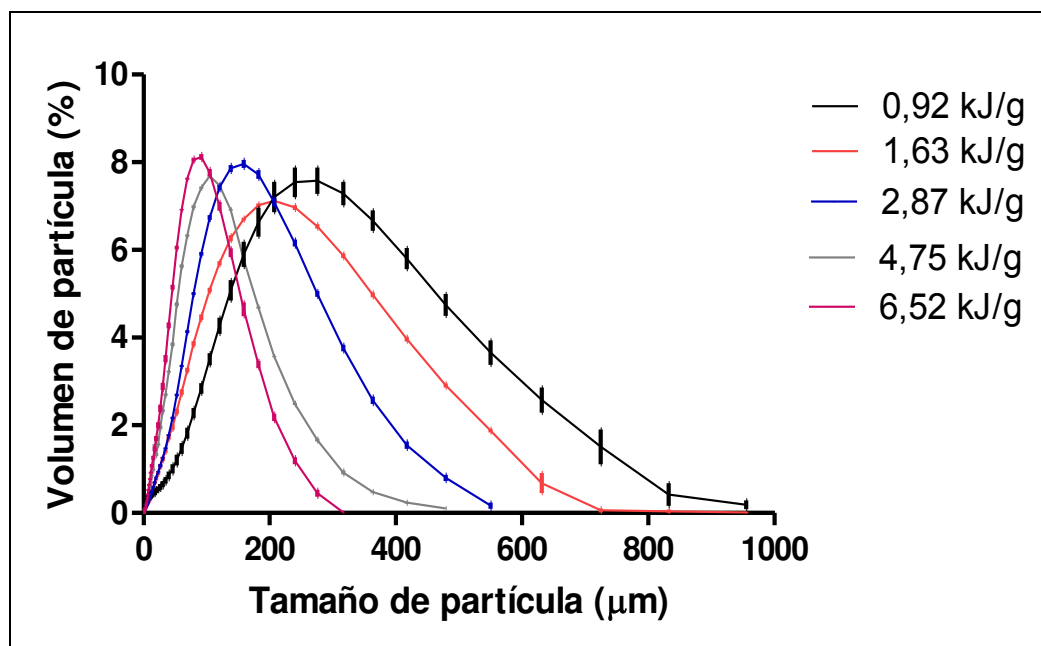
4.3.3 Distribución de tamaño de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto de la fracción FA

La evolución de la granulometría en las harinas obtenidas mediante la molienda de alto impacto se puede observar en la **figura 37** en función de la energía de molienda. Todas las curvas de distribución granulométrica mostraron asimetría positiva (cola de la curva a la derecha), la cual va disminuyendo con el incremento de la intensidad de la molienda produciendo harinas más homogéneas.

La **tabla 16** muestra los valores de la mediana D_{50} (μm) y del Span de las harinas obtenidas a diferentes niveles de energía. Puede observarse en relación al control, una reducción del diámetro D_{50} con aumento del Span cuando se incrementa la energía a 0,92 kJ/g, este comportamiento refleja el deterioro inicial de la homogeneidad en la muestra debido a que la ruptura del grano genera partículas de tamaño variado; esto hace que el valor de Span aumente.

Sin embargo, tanto el D_{50} como el Span muestran una tendencia decreciente al incrementar el nivel de energía. Después de 0,92kJ/g la relación energía/tamaño toma una forma exponencial, mostrando que cada vez es menos eficiente reducir el tamaño, por lo tanto, esa energía (no utilizable en la reducción de tamaño) se emplea en la modificación de los componentes del grano.

Figura 37. Distribución granulométrica de las fracciones FA obtenida con diferentes niveles de energía.



4.3.4 Propiedades de hidratación de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto de la fracción FA.

Se puede observar en la **tabla 16** el efecto significativo de la energía de molienda sobre las propiedades de hidratación. El aumento de la intensidad de molienda provoca simultáneamente el incremento en los índices de absorción y solubilidad de agua. Posiblemente al incremento del área superficial y a la generación de partículas de menor tamaño en comparación al granulo de almidón.

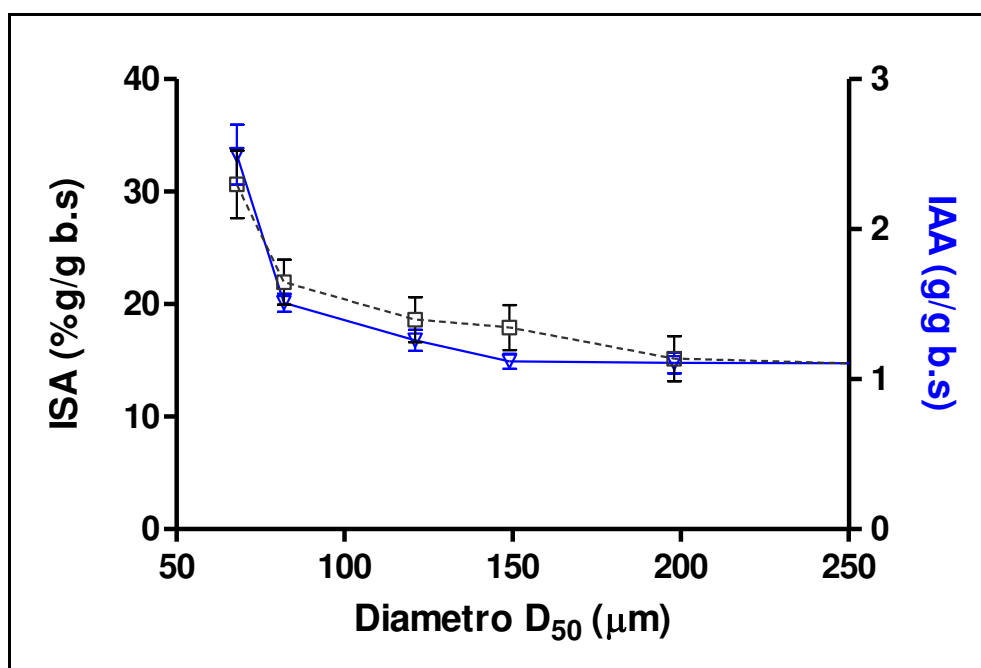
Se observan respecto al control, diferencias significativas en los índices IAA e ISA cuando se incrementa la energía entre 0,92kJ/g y 1,63kJ/g. al final del proceso de molienda se obtiene una fracción FA modificada con un índice de solubilidad (3,2) y absorción (2,3) veces mayor al observado en la harina control. En la **figura 38** puede visualizarse la evolución de los índices de IAA e ISA en función de la mediana de la distribución de tamaño de partícula.

Tabla 16. Fracciones FA obtenidas mediante molienda de alto impacto, evaluación del diámetro D₅₀, Span y de los índices de absorción y solubilidad en agua.

Energía de molienda (kJ/g)	Diámetro D ₅₀ (μm)	Span (adimensional)	IAA (%g/g b.s)	ISA (g/g b.s)
0,0	929 ± 76 ^a	0,25 ± 0,03 ^e	1,09 ± 0,07 ^d	10 ± 3 ^d
0,92	201 ± 3 ^b	2,03 ± 0,03 ^b	1,11 ± 0,07 ^d	15 ± 2 ^c
1,63	150,4 ± 0,5 ^c	2,104 ± 0,004 ^a	1,12 ± 0,05 ^d	18 ± 2 ^{bc}
2,87	121,7 ± 0,6 ^d	1,91 ± 0,01 ^c	1,26 ± 0,07 ^c	19 ± 2 ^b
4,75	82,1 ± 0,9 ^e	1,89 ± 0,01 ^d	1,61 ± 0,06 ^b	22 ± 2 ^b
6,52	68,0 ± 0,5 ^f	1,87 ± 0,01 ^d	2,5 ± 0,2 ^a	31 ± 3 ^a

La diferencia de letras (a-f) indica diferencias significativas (p<0,05) sobre los valores de cada columna. El valor de la desviación estándar está incluido.

Figura 38. Comportamiento de los índices IAA e ISA en relación al diámetro D₅₀ de partícula.



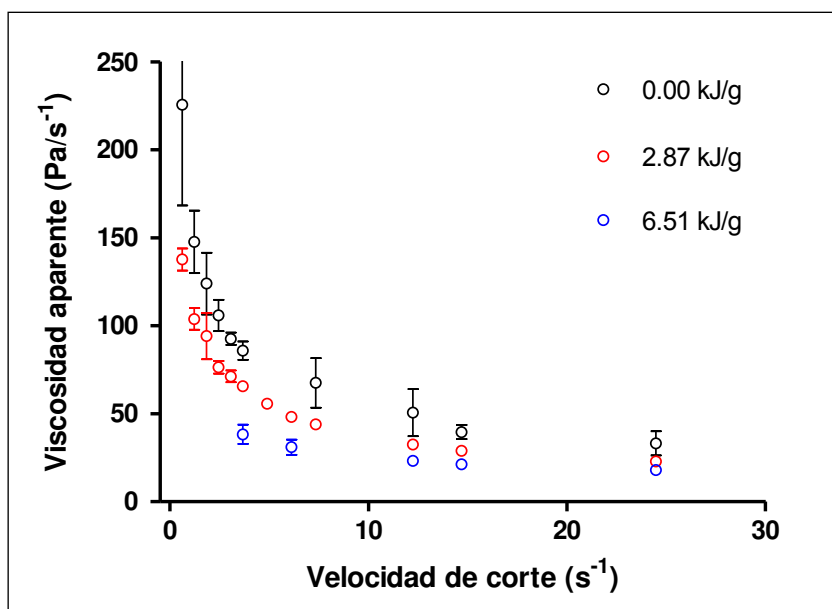
La molienda realizada en el molino planetario fue capaz de reducir el tamaño de partícula y simultáneamente mejorar las propiedades de hidratación y solubilidad, lo que

permitiría adecuar la harina para el proceso de molienda húmeda alcalina, logrando que los aditivos químicos hagan contacto más efectivamente con el granulo de almidón. La modificación de las propiedades de hidratación provocada en molinos de martillo y bolas también fue estudiada por Chandra y col (2007) y Silva y col (2011), los cuales encontraron que una menor granulometría de las harinas de trigo incrementaba las propiedades de hidratación de modo similar al encontrado en este trabajo.

4.3.5 Comportamiento reológico de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto de la fracción FA.

El molino planetario modificó la granulometría así como las propiedades de hidratación de las harinas, bajo esta expectativa se hicieron estudios del comportamiento de la viscosidad en dispersiones harina/agua al 4% y 8% p/v. El efecto de la energía de molienda sobre la viscosidad de las dispersiones en función de la velocidad de corte se muestra en las **figuras 39 y 40** a diferentes concentraciones.

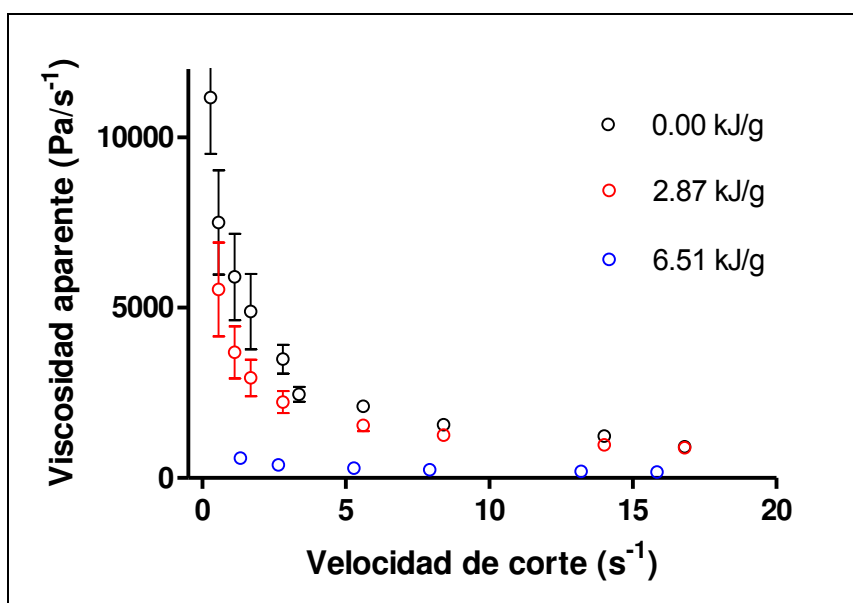
Figura 39. Viscosidad aparente de las dispersiones (4 g harina modificada/100mL) a 25°C en función de la velocidad de corte y la energía de molienda.



La viscosidad aparente descendió con el aumento de la velocidad de corte, revelando el carácter pseudoplástico de todos los sistemas. Se observa que a mayor concentración de harina, la dispersión es más viscosa, esto se debe a la mayor capacidad de formar

enlaces entre los compuestos del almidón. Este comportamiento pseudoplástico de la viscosidad con la velocidad de corte, también lo observaron Ibanoglu y col (1999) y Manohar y col (1998), cuando estudiaron el comportamiento de la viscosidad aparente en alimentos semilíquidos para el desayuno.

Figura 40. Viscosidad aparente de las dispersiones (8 g harina modificada/100mL) a 25°C en función de la velocidad de corte y la energía de molienda.



Los datos de las curvas de viscosidad aparente fueron modelados por medio de la ley de la potencia (**Ecuación 17**) y se obtuvieron los valores del coeficiente de consistencia (K) y el índice de flujo (n_3), los cuales pueden ser observados en las **tablas 17 y 18** respectivamente. Al cabo de 24 h se repitieron las mediciones de viscosidad para las mismas muestras; todos los resultados del ajuste mediante la ley de la potencia, obtenidos para 0h y 24h se pueden observar en las tablas mencionadas en función de la concentración de la dispersión (4% y 8% p/v).

En la **tabla 17** se observa el incremento de los valores de consistencia (K) con el aumento de la concentración a valor constante de energía de molienda. El aumento de la consistencia se debe a la presencia de amilosa y amilopectina las cuales facilitan la formación de redes moleculares (Autio y Eliasson., 2009). La habilidad para formar redes se va perdiendo con el incremento de la intensidad de la molienda debido a la ruptura del granulo del almidón, inhibiendo el proceso de gelatinización.

Tabla 17. Índice de consistencia (k) de las dispersiones de harina de amaranto a 25°C en función de la concentración y el tiempo de almacenamiento ⁽¹⁾.

Energía de molienda (kJ/g)	Índice de consistencia (K) al 4% g/ml (0h) ¹	Índice de consistencia (K) al 4% g/ml (24h) ¹	Índice de consistencia (K) al 8% g/ml (0h) ¹	Índice de consistencia (K) al 8% g/ml (24h) ¹
0,0	172 ± 18 ^a	56,2 ± 3,1 ^a	5845 ± 590 ^a	3773 ± 102 ^a
0,92	159 ± 14 ^{ab}	53,2 ± 3,2 ^a	4899 ± 159 ^a	3462 ± 141 ^{ab}
1,63	129 ± 4 ^{ab}	37,5 ± 0,5 ^b	4736 ± 96 ^a	3277 ± 66 ^{bc}
2,87	126 ± 3 ^b	34,5 ± 1,6 ^b	3856 ± 214 ^b	3079 ± 65 ^c
4,75	95 ± 4 ^c	31 ± 1 ^c	2365 ± 142 ^c	2054 ± 93 ^d
6,52	58 ± 8 ^d	24,2 ± 1,7 ^d	606 ± 28 ^d	678 ± 15 ^e

La diferencia de letras (a-f) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre los valores de cada columna. El valor de la desviación estándar está incluido.

Puede observarse la poca variación de la consistencia (K) después de 24h de almacenamiento especialmente en las muestras obtenidas a 4,75kJ/g y 6,52kJ/g. Este comportamiento indica que la molienda intensa dificulta el fenómeno de la retrogradación en el almidón, conservándose la solubilidad de la amilosa y amilopectina modificadas y evitando la sinéresis.

Todas las muestras (4% - 8% p/v) en el tiempo 0h mostraron un incremento en el valor del índice (n3) con el aumento de la intensidad de molienda. Este comportamiento se debe al proceso de molienda, el cual provoca el rompimiento de las asociaciones de intra-intermoleculares del gránulo del almidón, aumentando la solubilidad y afectando los procesos de hidratación e hinchamiento del gránulo.

Un comportamiento similar (aumento del carácter newtoniano) fue observado por Hasjim y col (2012) cuando estudiaron el efecto de la molienda de alto impacto de arroz usando un molino de martillo.

Tabla 18. Índice de flujo (n_3) de las dispersiones de harina de amaranto a 25°C en función de la concentración y el tiempo de almacenamiento ⁽¹⁾.

Energía de molienda (kJ/g)	Índice(n_3) al 4% g/ml (0h) ¹	Índice(n_3) al 4% g/ml (24h) ¹	Índice (n_3) al 8% g/ml (0h) ¹	Índice(n_3) al 8% g/ml (24h) ¹
0,0	0,47 ± 0,01 ^c	0,46 ± 0,09 ^a	0,28 ± 0,05 ^d	0,60 ± 0,04 ^a
0,92	0,48 ± 0,04 ^c	0,43 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,02 ^d	0,58 ± 0,02 ^a
1,63	0,49 ± 0,04 ^c	0,42 ± 0,09 ^a	0,39 ± 0,02 ^d	0,56 ± 0,02 ^a
2,87	0,51 ± 0,01 ^c	0,41 ± 0,07 ^{ab}	0,48 ± 0,02 ^{bc}	0,55 ± 0,05 ^{ab}
4,75	0,56 ± 0,02 ^b	0,36 ± 0,02 ^{bc}	0,53 ± 0,01 ^b	0,52 ± 0,03 ^b
6,52	0,64 ± 0,04 ^a	0,30 ± 0,08 ^c	0,56 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,02 ^c

La diferencia de letras (a-d) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre los valores de cada columna. El valor de la desviación estándar está incluido.

En la **tabla 18** también se puede observar el incremento del índice (n_3) después de 24h de almacenamiento principalmente en las dispersiones al 8% p/v. Este comportamiento se debe al proceso de retrogradación del almidón que ocurre durante el almacenamiento; las moléculas de amilosa logran formar redes organizadas expulsando agua al exterior y aumentando la solubilidad. Sin embargo, las muestras molidas intensamente (4,75kJ/g a 6,52kJ/g) mostraron una reducción en el valor del flujo (n_3) indicando que la estructura inicial de la dispersión se mantuvo durante el almacenamiento.

La molienda de alto impacto va reduciendo la capacidad de retrogradación a medida que se incrementa la intensidad de la molienda proporcionando mayor estabilidad a la dispersión lo cual es de interés en el desarrollo de alimentos semilíquidos.

4.3.6 Calorimetría de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto de la fracción FA.

La gelatinización del almidón es una transición de la estructura semicristalina del gránulo de almidón a una estructura amorfa. Esta transición ocurre durante el calentamiento del gránulo de almidón en una solución acuosa. Las temperaturas y

entalpías de gelatinización de los almidones han sido estudiadas por numerosos autores ((Morrison y Tester, 1994; Campanella y col., 2002; Chen y col., 2003; Dhital y col., 2010a, 2011; Han., 2007,).

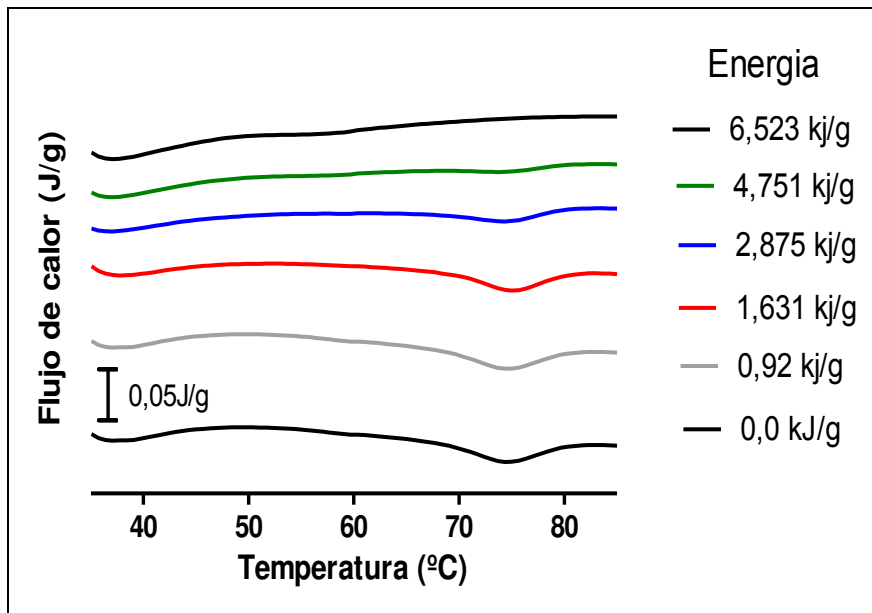
Tabla 19. Temperaturas y entalpías de gelatinización de las fracciones FA obtenidas por molienda de alto impacto.

Energía de molienda (kJ/g)	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)
0,0	65,2 ± 1,2 ^a	73,8 ± 0,2 ^a	80,8 ± 1,2 ^a	7,9 ± 0,2 ^a
0,92	67,5 ± 0,7 ^a	74,5 ± 0,1 ^a	80,3 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,1 ^b
1,63	64,9 ± 5,5 ^a	74,3 ± 0,9 ^a	80,2 ± 0,1 ^a	5,4 ± 0,1 ^c
2,87	67,8 ± 1,1 ^a	74,3 ± 0,4 ^a	79,7 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,2 ^d
4,75	62,5 ± 0,9 ^b	69,9 ± 0,4 ^b	79,8 ± 0,3 ^b	1,9 ± 0,1 ^d
6,52	49,3 ± 0,8 ^c	57,1 ± 0,2 ^c	79,1 ± 0,01 ^c	0,3 ± 0,1 ^e

La diferencia de letras (a-e) indica diferencias significativas (p<0,05) sobre los valores de cada columna. El valor de la desviación estándar está incluido.

La **tabla 19** reporta los valores de las temperaturas (T_{onset} , T_{peak} , T_{endset}) y entalpía de gelatinización (ΔH) de las harinas que fueron molidas a diferentes niveles de energía. Los valores de la entalpía descendieron significativamente en comparación al valor de la entalpía de la muestra control desde $7,9 \pm 0,2$ J/g hasta $0,34 \pm 0,01$ J/g para el mayor nivel de energía de molienda. Una reducción significativa en la entalpía de gelatinización de $14,1$ J/g hasta $0,13$ J/g y desde $6,8$ J/g hasta $0,9$ J/g fue observada por Han y col. (2007) y Loubes y col. (2013) respectivamente, cuando estudiaron la molienda de arroz en un molino planetario de bolas. Mientras que, Sanguanpong y col. (2003) y Martinez-Bustos y col. (2007) reportaron que la entalpía de gelatinización del almidón de mandioca disminuía con la pérdida de cristalinidad.

Figura 41. Termogramas de las fracciones FA obtenidas mediante molienda de alto impacto



Por lo tanto la molienda de alto impacto redujo la entalpía de gelatinización del almidón en la harina FA, provocando la disrupción de las regiones cristalinas y el rompimiento o despolimerización de la amilopectina y amilosa, y de esta manera disminuyó su capacidad para gelatinizar.

Las muestras intensamente molidas mostraron una disminución en la temperatura de inicio de la gelatinización (T_{onset}) como puede apreciarse en la **tabla 19**. Este fenómeno también se muestra en el termograma (**figura 41**) donde puede observarse el corrimiento hacia menores temperaturas del pico endotérmico en las harinas molidas a 6,52 kJ/g y simultáneamente va desapareciendo el pico a medida que se incrementa la energía de molienda. Este comportamiento es debido a la pérdida de cristalinidad del biopolímero, provocando que aún los fragmentos del grano puedan gelatinizar precozmente. Este fenómeno fue también observado por Singh y col. (2003) y Kaur y col. (2002) quienes reportaron bajas temperaturas de transiciones en el almidón de papa asociadas a la morfología y tamaños diferentes de los gránulos. De la misma manera, Han y col. (2007) y Huang y col. (2007) reportaron un descenso en los parámetros térmicos cuando molieron arroz y mandioca respectivamente en un molino planetario.

4.3.7 Determinación de la cristalinidad por difracción de rayos-X y espectroscopia FT-IR de las harinas obtenidas mediante molienda de alto impacto de la fracción FA.

El análisis de los datos de difracción de rayos-X de las fracciones FA fue dificultoso debido a la baja intensidad de los difractogramas ocasionado por la estructura semicristalina del almidón y a su interacción con el ruido de la señal.

La estructura cristalina del almidón está determinada por agrupaciones de cadenas de amilopectina conectadas por puentes de hidrogeno, arregladas paralelamente formando una estructura de doble hélice (fase cristalina), y por las cadenas de amilosa, las cuales son el componente dominante en la fase amorfa del almidón (Fiedorowicz y Para., 2006; Liu y col., 2011).

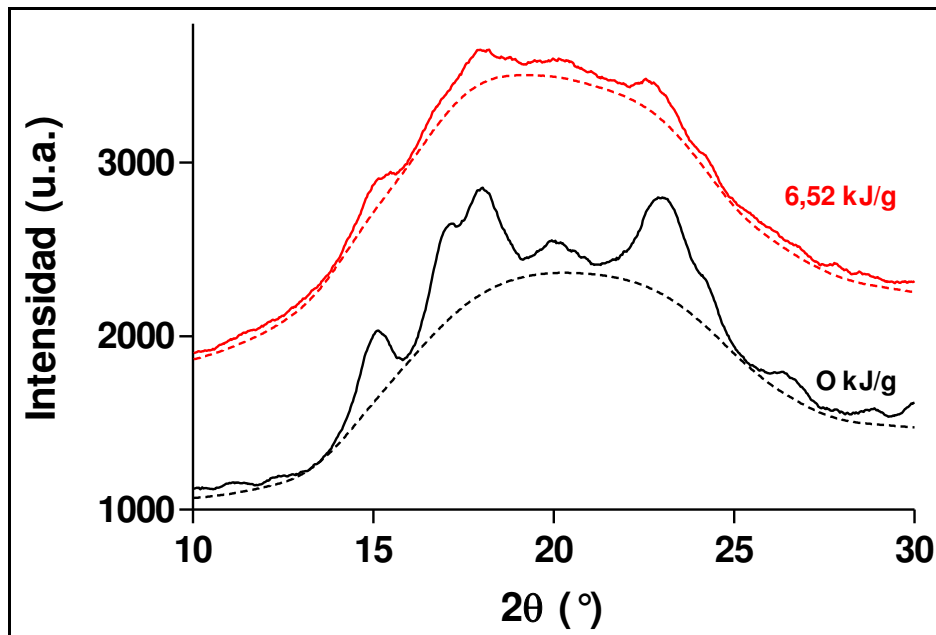
En el estudio de los difractogramas de rayos-X de almidón, la separación de la región cristalina de la amorfa es un paso crítico ya que la cristalinidad afecta directamente las propiedades físicas y químicas del almidón.

La **figura 42** ejemplifica la estimación de la región amorfa de la fracción FA control (0,0kJ/g) y la fracción FA intensamente molida (6,52kJ/g) a partir de los difractogramas obtenidos mediante el estudio de rayos-X.

Generalmente, las fracciones FA mostraron un pico ancho dominante correspondiente a la fase amorfa (líneas discontinuas), sobre la cual se ubican los picos de difracción de los cristales (línea continua).

La fracción FA mostró una estructura cristalina tipo-A con una fuerte refracción de los picos de Bragg a los 15°, 23° y un pico con hombro a los 17° y 18° característicos de los cereales. Cheetham y Tao (1998) y Han y col. (2007) reportaron estos mismos picos de difracción en maíz y arroz respectivamente. De la misma manera Liu y col, (2011) informaron que las muestras molidas pierden la estructura cristalina debido a la alta energía empleada durante la molienda a bolas.

Figura 42. Patrones de difracción de rayos-x de la fracciones FA control (0 kJ/g) y FA molida (6,52 kJ/g).

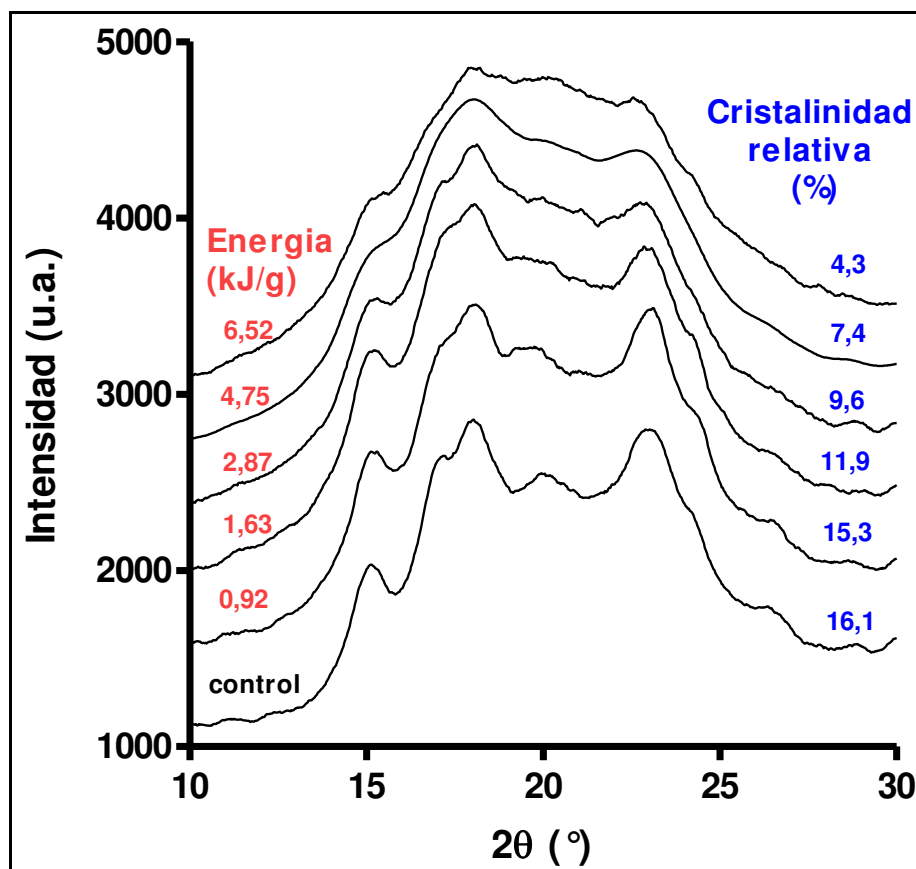


La **figura 43** muestra los difractogramas de las fracciones FA obtenidas a diferentes niveles de energía de molienda en el molino planetario de bolas.

Puede observarse como se reducen los picos de difracción en los difractogramas a medida que aumenta el nivel de energía de molienda, en la figura se presentan los valores de cristalinidad calculados en base a la **Ecuación (13)**. Se determinó que la cristalinidad de la fracción FA antes de moler era de 16,1% y que después de molida usando 6.52 kJ/g la fracción FA presenta una cristalinidad menor al 5%.

La pérdida de los cristales se debe a la fuerza mecánica aplicada durante la molienda la cual destruye el gránulo de almidón, provocando pérdida de la difracción en los cristales nativos, por lo tanto la porción cristalina descende mientras que la porción amorfa aumenta. Este fenómeno también fue observado por Martinez-Bustos y col. (2007) en la molienda intensa de almidón de mandioca.

Figura 43. Difractogramas de las fracciones FA obtenidas a diferentes niveles de energía.



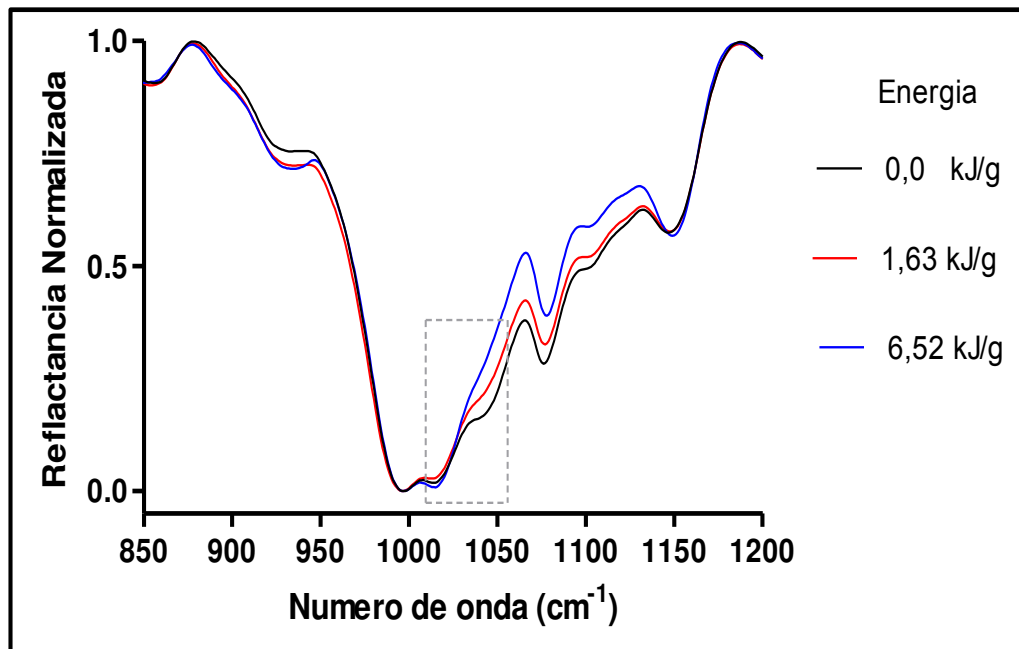
En trabajos previos se analizaron eficientemente por medio de espectroscopia FT-IR los cambios estructurales que le ocurren a los almidones durante los procesos de gelatinización y retrogradación (Goodfellow y col., 1990; Bernazzani y col., 2008). Por otro lado, otros autores han caracterizado al almidón amorfo por espectroscopía a una absorbancia cercana a la banda 1022cm^{-1} , mientras que la absorbancia cercana a la banda 1047cm^{-1} fue asignada a la región cristalina. La relación entre la banda $1047/1022$ y $996/1022$ han sido usada frecuentemente para cuantificar el grado de cristalinidad de los almidones (Sevenou y col. 2002; Capron y col. 2007; Liu y col. 2011). Por lo tanto en este trabajo se identificaron las principales bandas de absorción IR en el almidón de amaranto y luego se determinó la relación entre la cristalinidad y la intensidad mostrada en los espectros FT-IR de las diferentes fracciones FA, cuyos valores pueden observarse en la tabla 20.

Tabla 20. Cambio en la intensidad de las bandas características de los almidones obtenidas mediante espectroscopia FT-IR

Energía (kJ/g)	Intensidad de las bandas	
	996/1014	1039/1014
0 (control)	1017 ± 0,004 ^b	0,87 ± 0,02 ^a
0,92	1022 ± 0,005 ^{ab}	0,861 ± 0,002 ^a
1,63	1028 ± 0,001 ^a	0,821 ± 0,001 ^b
2,87	1026 ± 0,002 ^a	0,789 ± 0,002 ^c
4,75	1027 ± 0,002 ^a	0,767 ± 0,001 ^d
6,52	1010 ± 0,002 ^c	0,752 ± 0,003 ^e

Las diferentes letras (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada relación de intensidad

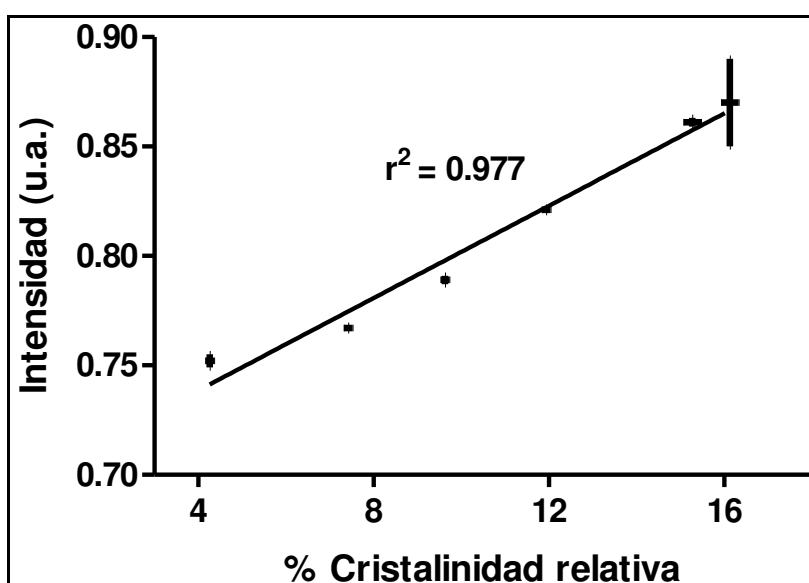
Figura 44. Espectro FT-IR de las fracciones FA obtenidas por medio de la molienda de alto impacto a diferentes niveles de energía.



En la **figura 44** se observa el espectro FT-IR de las fracciones FA obtenidas antes y después del proceso de molienda de alto impacto. Se pueden identificar los principales picos de absorción a 996cm^{-1} , los dos hombros característicos(amorfo/cristalino) a 1014cm^{-1} y 1039cm^{-1} y otras bandas relacionadas al almidón 1145 , 1075 , y 850cm^{-1} . La

diferencia en la región amorfo/cristalina se debe principalmente al pronunciamiento de la curva a medida que la fracción FA es molida, lo cual se aprecia claramente en el recuadro señalado en la **Figura 44**. Este pronunciamiento de la curva se debe a principalmente al descenso de la intensidad de la banda 1039cm^{-1} (región cristalina), por lo tanto, la molienda de alto impacto provoca un aumento de la región amorfa del almidón. Algunos autores han señalado el carácter irreversible de estos cambios (Xie y col., 2006; Liu y col., 2011).

Figura 45. Correlación entre la intensidad de los picos 1014cm^{-1} y 1039cm^{-1} en los espectros FT-IR y la cristalinidad obtenida por difracción de rayos-x.



La **figura 45** muestra una satisfactoria correlación entre la intensidad de la relación entre los picos 1014/1039 obtenidos por espectroscopia FT-IR y el porcentaje de cristalinidad obtenido mediante el análisis de los difractogramas obtenidos por rayos-x. Por lo tanto la espectroscopia FT-IR podría adoptarse como una herramienta buena, rápida y precisa para analizar la cristalinidad de las harinas.

4.4 MOLIENDA HUMEDA DE LA FRACCION AMILACEA ASISTIDA MEDIANTE MOLINO DE ALTO IMPACTO

En este trabajo se propone la obtención de almidón de amaranto por molienda húmeda alcalina en presencia de tensioactivo y asistida por molienda de alto impacto a partir de la fracción FA obtenida por molienda abrasiva. Se busca reemplazar las etapas de maceración y molienda húmeda del método tradicional de molienda húmeda, por la maceración y molienda húmeda simultánea en el molino planetario de bolas. Para determinar las condiciones más apropiadas para el proceso se evaluaron diferentes variables adoptándose un diseño experimental de Box-Behnken que involucra 15 ensayos con sus réplicas y triplicado del punto central. Las variables seleccionadas fueron: energía de molienda y concentraciones de álcali (NaOH) y tensioactivo (SDS). El rango de energía fue seleccionado de modo de evitar el daño termomecánico excesivo del gránulo de almidón, mientras que las concentraciones de aditivos químicos se seleccionaron en base a lo informado en bibliografía para molienda húmeda de cereales (Shirahama y col., 1974; Kinugasa y col., 2001; Calzetta y col., 2006)

4.4.1 Diseño experimental Box-Benhken

En la **tabla 21** se pueden observar las diferentes condiciones experimentales (valores experimentales de energía de molienda y concentraciones de álcali y tensioactivo), así como, los valores codificados correspondientes de acuerdo al diseño aplicado. Se adoptó para todas las variables una codificación lineal entre los valores reales y codificados; al valor experimental mínimo se le asignó un valor codificado de (-1) y al valor experimental máximo un valor codificado de (1). El punto central del diseño experimental (0,0,0) fue triplicado, el mismo está representado por los ensayos N° 7, 8 y 15. La **tabla 22** muestra el rendimiento y la calidad del almidón de amaranto obtenido en términos de: almidón recuperado (% p/p), cantidad de proteína en el almidón recuperado y sólidos disueltos (% p/v) en las aguas de proceso. Con fines comparativos, también se determinaron los anteriores parámetros en el almidón control, el cual fue obtenido por molienda húmeda tradicional, la cual consiste en remojar el grano de amaranto por 24h usando una concentración de NaOH de 0,25%p/v.

Tabla 21. Variables reales y codificadas del diseño experimental de Box-Benhken empleado en el estudio de la molienda húmeda asistida.

Muestra	Energía de molienda (kJ/g)	Hidróxido de sodio (%p/v)	Dodecil sulfato sódico (%p/v)	Variable codificada X6	Variable codificada X7	Variable codificada X8
1	3,5	0,3	0,9	1	1	0
2	2,5	0,1	0,3	0	-1	-1
3	2,5	0,3	0,3	0	1	-1
4	2,5	0,1	1,5	0	-1	1
5	1,5	0,2	1,5	-1	0	1
6	3,5	0,2	0,3	1	0	-1
7*	2,5	0,2	0,9	0	0	0
8*	2,5	0,2	0,9	0	0	0
9	1,5	0,3	0,9	-1	1	0
10	2,5	0,3	1,5	0	1	1
11	1,5	0,2	0,3	-1	0	-1
12	3,5	0,1	0,9	1	-1	0
13	3,5	0,2	1,5	1	0	1
14	1,5	0,1	0,9	-1	-1	0
15*	2,5	0,2	0,9	0	0	0
Control	0,0	0,25	0,0	-----	-----	-----

*Réplicas del punto central del diseño, Variables codificadas: Energía: X6, Hidróxido de sodio: X7, Dodecil sulfato sódico: X8.

Tabla 22. Almidón obtenido por molienda húmeda asistida en molino planetario, evaluación de la recuperación y pureza del almidón.

Muestra	Almidón Recuperado (%)	Sólidos disueltos (%)	Proteína en almidón (%)
1	46,0	11,4	0,33
2	53,8	13,8	0,25
3	56,8	11,1	0,36
4	46,3	15,3	0,24
5	49,2	14,9	0,23
6	50,0	12,9	0,27
7, 8, 15*	53,6	13,9	0,34
9	52,3	12,3	0,39
10	50,1	13,5	0,17
11	45,4	15,4	0,29
12	48,3	12,8	0,33
13	52,0	11,5	0,25
14	45,7	15,2	0,42
Control	48,5	9,4	0,73

*Punto central del diseño

Error relativo %: Almidón recuperado (1,5%); Sólidos disueltos (5,6%); Proteína en almidón (2,9%)

Mediante el método tradicional de molienda húmeda se logró recuperar un 48,5% del almidón con una pureza de 0,73 (g proteína/100g almidón), mientras que, mediante la molienda húmeda de alto impacto se recuperó entre un 47 y 57% de almidón con una pureza promedio de 0,30 (g proteína/100g almidón). Con la muestra 3 se logró obtener la mayor recuperación del almidón, lo cual involucró un tratamiento usando 2,5kJ/g y concentraciones de 0,3%p/v de NaOH y 0,3%p/v de SDS. Por otra parte, se logró

obtener un contenido mínimo de 0,17 (g proteína/100g almidón) muy inferior al valor control, mediante condiciones de alta concentración de tensioactivo SDS.

4.4.2 Efecto de las condiciones de molienda sobre el rendimiento y calidad del almidón

Se estudió cuantitativamente el efecto de las condiciones de proceso sobre recuperación, contenido de sólidos y de proteína mediante el método de superficies de respuesta. Los coeficientes del polinomio de segundo grado correspondientes a cada una de las respuestas estudiadas se muestran en la **Tabla 23** junto con el nivel de significación respectivo.

La **figura 46** representa la superficie de respuesta estimada del almidón recuperado en función de las variables del proceso. Se observa que todas las regiones de color a excepción del color rojo representan combinaciones de energía y concentración del NaOH en las cuales se logra recuperar almidón en cantidades mayores a la de la molienda tradicional (48,5%)

Figura 46. Superficie de respuesta estimada del almidón recuperado.

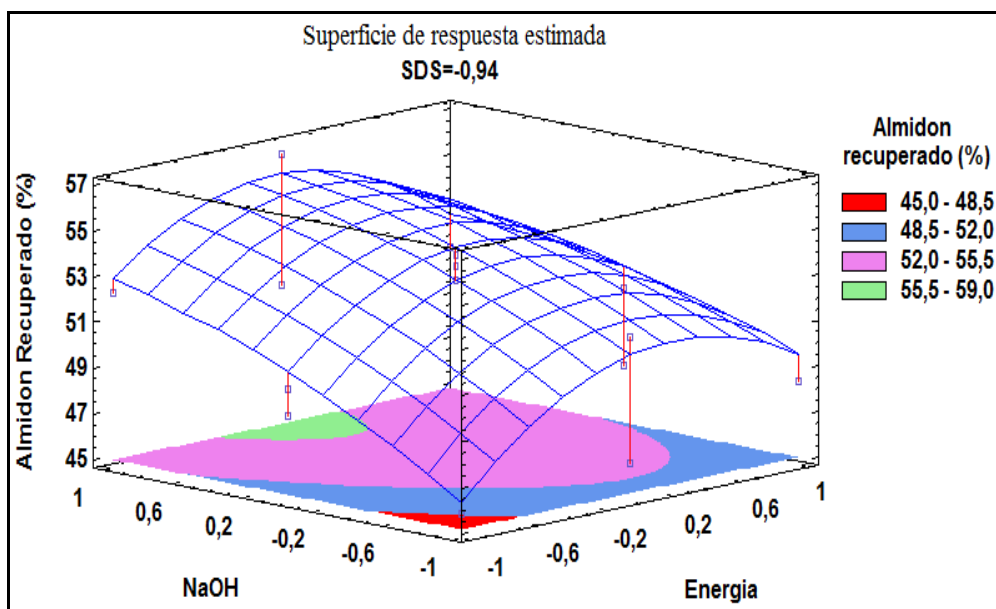


Tabla 23. Efectos de las condiciones de molienda húmeda asistida en molino planetario sobre el almidón recuperado, el contenido de proteína en el almidón y los sólidos disueltos.

Coeficiente		Almidón recuperado (%)	Proteína en el almidón (%)	Sólidos disueltos (%)
Constante	a0	53,37	0,34	13,83
Lineal	a1	0,24 ^{ns}	-0,019 ^{ns}	1,69 ^{***}
	a2	2,41 ^{***}	0,001 ^{ns}	0 ^{ns}
	a3	-1,98 ^{***}	-0,035 ^{**}	0,09 ^{ns}
Cuadrático	a1.1	-3,20 ^{***}	0,016 ^{ns}	0,13 ^{ns}
	a2.2	-0,80 ^{ns}	0,011 ^{ns}	-0,34 ^{ns}
	a3.3	-1,07 ^{ns}	-0,045 ^{***}	0,13 ^{ns}
Interacción	a1.2	-0,93 ^{ns}	0,007 ^{ns}	-0,23 ^{ns}
	a1.3	-0,55 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,3 ^{ns}
	a2.3	-0,05 ^{ns}	0,011 ^{**}	-0,34 ^{ns}
Correlación	r2	0,952	0,918	0,973

a ^{***}, ^{**}, ^{*} : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo

Si el objetivo es utilizar menor cantidad de NaOH que la empleada en la molienda tradicional (menor a 2,5%p/v), el análisis de los datos mostró que trabajando entre 2,5kJ/g y 2,8kJ/g y a concentraciones de SDS entre 0,34%p/v y 1,3%p/v, se logró aumentar la recuperación del almidón significativamente (mayor a 48,5%).

En la **tabla 23** se observa el efecto lineal muy significativo del NaOH sobre la recuperación de almidón, mientras que la energía de molienda afecta cuadráticamente, esto quiere decir que hay una región óptima de extracción, ya que si se emplean niveles de energía mayores aumenta la cantidad de sólidos disuelto haciendo que la eficiencia de recuperación disminuya (**figura 47**).

Figura 47. Superficie de respuesta estimada de los sólidos disueltos.

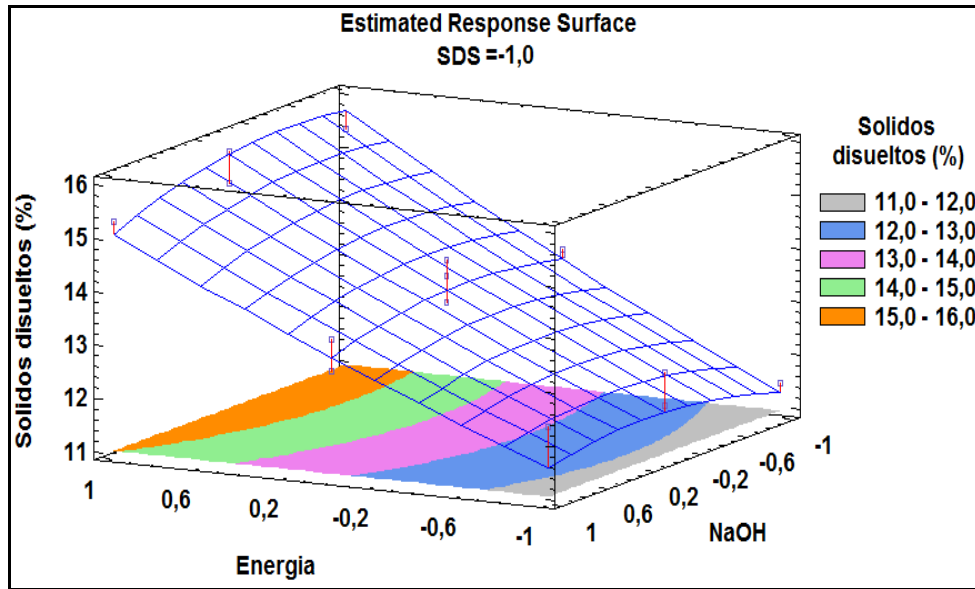
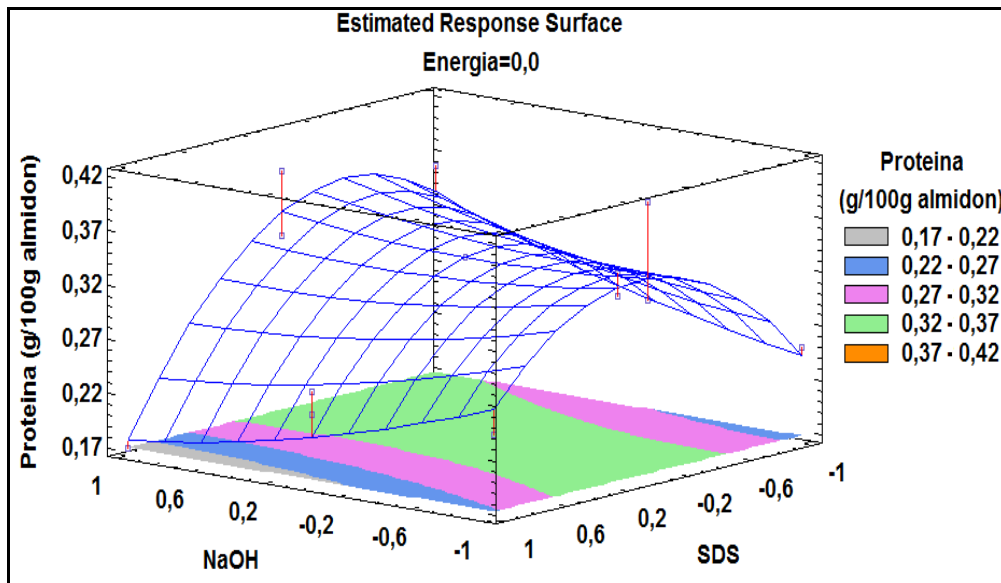


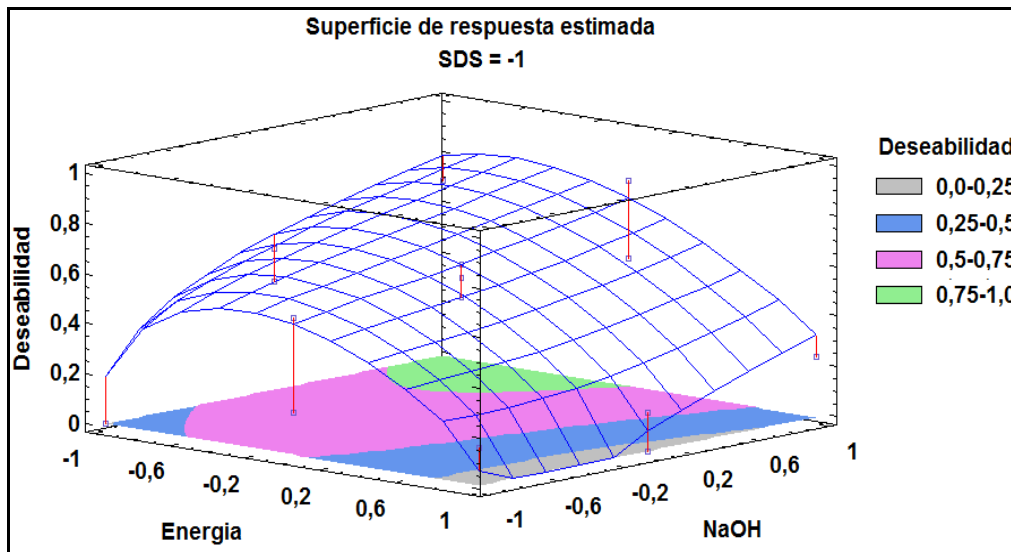
Figura 48. Superficie de respuesta estimada del contenido de proteína en el almidón.



Por otra parte, se observa en la misma tabla el efecto positivo del SDS y la interacción con NaOH sobre la cantidad de proteína remanente en el almidón. La **figura 48** muestra la superficie de respuesta estimada donde se observa que en todos los casos el contenido de proteína remanente fue menor a 0,73% (control). Los tensioactivos iónicos como el dodecil sulfato sódico (SDS, tensioactivo aniónico) provocan la desnaturalización de las proteínas, promoviendo cambios en la estructura terciaria y cuaternaria, al unirse a la

proteína formando complejos, lo que facilita la extracción de la misma (Kinugasa y col, 2001; Shirahama y col, 1974). En particular el SDS estabilizan la proteína desnaturizada formando una capa de solvatación micelar alrededor de la cadena polipeptídica (Shirahama y col, 1974).

Figura 49. Superficie de respuesta estimada de los valores de deseabilidad en la molienda húmeda.



A continuación se realizó una optimización multirespuesta, el criterio fue maximizar la recuperación de almidón minimizando simultáneamente la pérdida de sólidos. No se incluyó un criterio para el contenido de proteína debido a la alta pureza del almidón obtenida en todas las condiciones experimentales evaluadas. El resultado del análisis se puede observar en la figura 48, bajo condiciones de trabajo óptimas (región verde) se alcanzaron niveles de recuperación de almidón de 55% con un contenido de proteínas del 0,3% y un 11% de sólidos disueltos al utilizar 2,5 kJ/g, 0,3 % p/v de NaOH y 0,3 % p/v de SDS. Estos resultados son superiores a los publicados por Calzetta y col (2006) que bajo condiciones de molienda húmeda-ácida del grano de amaranto lograron recuperar un 45% del almidón con un contenido de proteína del 0,6%. Por otro lado los resultados de este trabajo fueron inferiores a los obtenidos por Villareal y col (2012), quienes obtuvieron una recuperación del 70% del almidón utilizando harina de amaranto en una solución alcalina-enzimática. El uso de enzimas en la molienda húmeda tiene la ventaja de producir mayor rendimiento y pureza y menor porcentaje de almidón dañado, sin embargo la principal desventaja es el mayor costo del proceso

(1,75 *versus* 0,76 U\$\$/kg almidón) en relación con el método alcalino (Lumdubwong y Seib, 2000).

En resumen la molienda húmeda asistida en molino planetario proporcionó una buena recuperación de almidón de alta pureza; por otra parte se trata de un método que en relación al control insume menor tiempo de maceración (4h “vs” 24 h) y requiere una menor relación agua/grano (1,2:1 “vs” 3:1) lo cual impacta favorablemente en el desarrollo sustentable asociado a la generación y tratamiento efluentes industriales.

4.4.3 Caracterización del almidón obtenido por molienda húmeda alcalina asistida en un molino de alto impacto.

Finalmente se realizó una caracterización del almidón obtenido en condiciones óptimas y su comparación con al almidón control en base a la evaluación de su composición y sus propiedades térmicas y estructurales.

Tabla 24. Almidón obtenido por molienda húmeda de alto impacto, evaluación de la cristalinidad, gelatinización e intensidad de la banda FT-IR (1014/1039)

Muestra	Energía (kJ/g)	Índice banda IR (1039/1014)	Cristalinidad (%)	Entalpía ΔH (J/g)
Óptimo	2,6	0,765 \pm 0,006 ^a	13,1 \pm 0,6 ^a	11,9 \pm 0,4 ^a
Control	0,0	0,779 \pm 0,005 ^a	13,5 \pm 0,8 ^a	12,8 \pm 0,6 ^a

Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada relación de intensidad

La **tabla 24** resume las características del gránulo de almidón obtenidos en condiciones óptimas en el molino planetario. Puede observarse que no hubo una variación significativa en las principales propiedades.

Figura 50. Microscopia del almidón obtenido mediante molienda húmeda de alto impacto

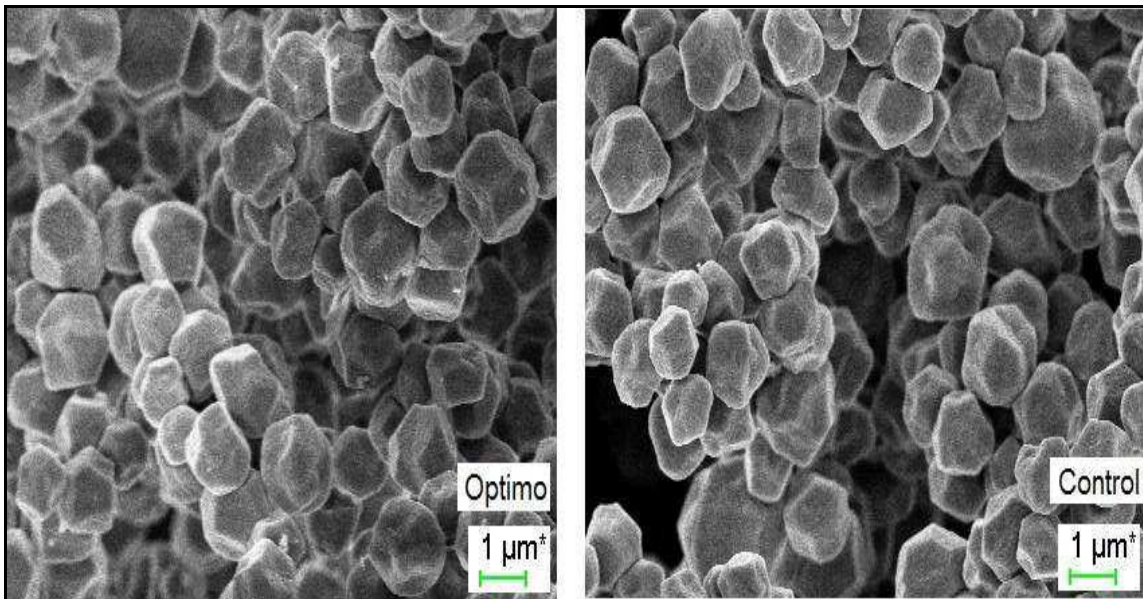


Figura 51. Patrón de difracción de rayos-x del almidón obtenido mediante molienda húmeda de alto impacto.

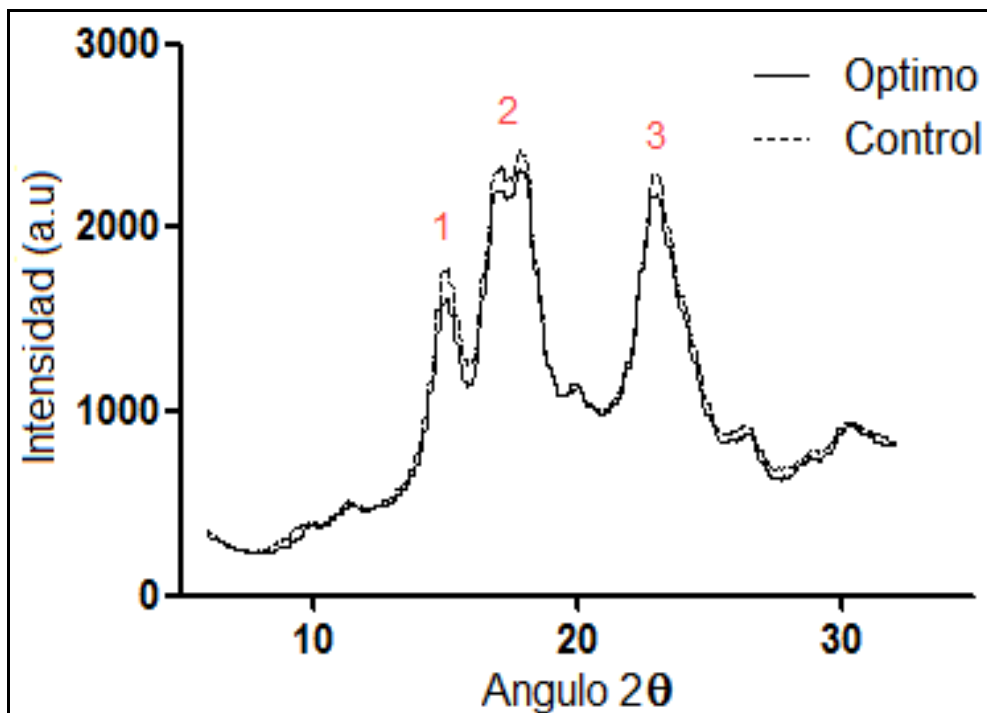
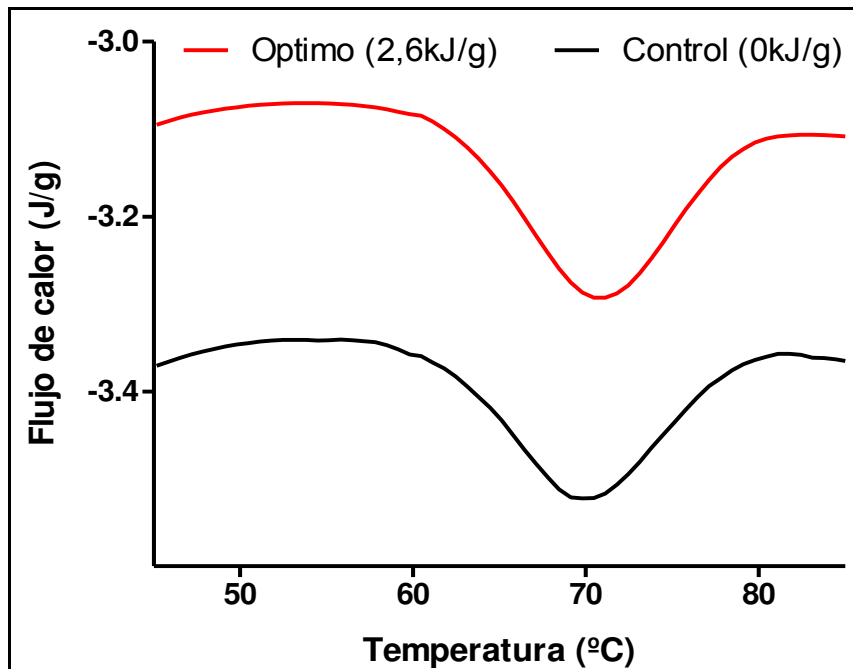


Figura 52. Termogramas del almidón obtenido mediante molienda húmeda de alto impacto.



La **figura 50** muestra la microscopía de los gránulos de almidón los cuales conservan su forma poliédrica con un tamaño promedio de $1\mu\text{m}$. La **figura 51** muestra el difractograma de RX típico de una estructura tipo-A tanto para el almidón control como para el almidón obtenido por molienda húmeda de alto impacto. La **figura 52** muestra el termograma del almidón donde se puede observar el pico endotérmico, el cual señala que el almidón obtenido por molienda húmeda asistida conservó su capacidad para gelatinizar. De acuerdo a los resultados encontrados el molino planetario surge como una técnica de disgregación eficaz para la recuperación del almidón que potencia el uso de agentes químicos y/o enzimáticos. Las condiciones óptimas proporcionaron almidón de amaranto de alta pureza con características similares a la del control por lo que puede considerarse que conserva su carácter de almidón nativo.

4.5 CAPACIDAD ENCAPSULANTE DE MATRICES DE AMARANTO OBTENIDAS POR MOLIENDA SECA Y HÚMEDA

En los últimos años el grano de amaranto ha despertado el interés de la industria debido a su alto valor nutricional, carácter microgranular e hipoalergénico y a su gran adaptabilidad en suelos poco fértiles. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo con el fin de aumentar su valor agregado como ingrediente en la formulación de productos alimentarios y no alimentarios. En el presente capítulo se investigó la capacidad encapsulante de matrices de amaranto obtenidas por medio de molienda seca (FA: fracción amilácea) y húmeda (AN: almidón nativo) y se evaluó el efecto emulsificante de las proteínas ($5,0\pm 0,1\%$) presentes en la fracción FA, diseñando sistemas con y sin gelatina (Ge) agregada. Se utilizaron 4 matrices (FA; FA+Ge; AN; AN+Ge) las cuales fueron sometidas a $6,5\text{kJ/g}$ de molienda intensiva en el molino planetario (BM) con el objetivo de estudiar el efecto de la molienda en la capacidad encapsulante. Además, se compararon con 2 matrices (AN; AN+Ge) sin moler. Una vez seleccionadas las matrices con mejor capacidad encapsulante, se evaluaron los efectos de la temperatura de almacenamiento ($5, 25$ y 45°C , durante 45 días) y de la humedad relativa (11, 33, 50, 75 y 84%) sobre la retención de β -caroteno (seleccionado como antioxidante modelo).

4.5.1 Evaluación de las matrices para la encapsulación de β -caroteno.

En la preparación de matrices para la encapsulación de antioxidantes, resulta importante la elección de los componentes de la matriz así como las propiedades funcionales de estos, para poder lograr una mayor eficiencia de encapsulación. Los almidones, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz y las gomas, han sido utilizados en procesos tecnológicos con el fin de proteger compuestos de interés para ser incluidos en alimentos. Debido a su alta disponibilidad y por su bajo costo, los almidones se convierten en una buena opción para la encapsulación (Madene y col., 2005). Sin embargo, el almidón nativo carece de propiedades funcionales adecuadas para lograr una efectiva encapsulación; por esta razón, algunos investigadores han modificado los almidones por medios químicos/enzimáticos obteniendo altos grados de hidrólisis, lo que ha resultado en un incremento importante en la capacidad de encapsulación de estos almidones modificados (Wagner y Warthesen., 1995; Chattopadhyaya y col., 1998; Krishnan y col., 2005; Karathanos y col., 2007; Murúa-Pagola y col., 2009). Utilizando

este principio y debido a que el almidón de amaranto posee un bajo porcentaje de amilosa (2,5%, Tari y col., 2003), se propone el uso de la molienda de alto impacto para generar cadenas de amilopectina de bajo peso molecular (Morrison y Tester., 1993) con el fin de incrementar la capacidad encapsulante del almidón de amaranto.

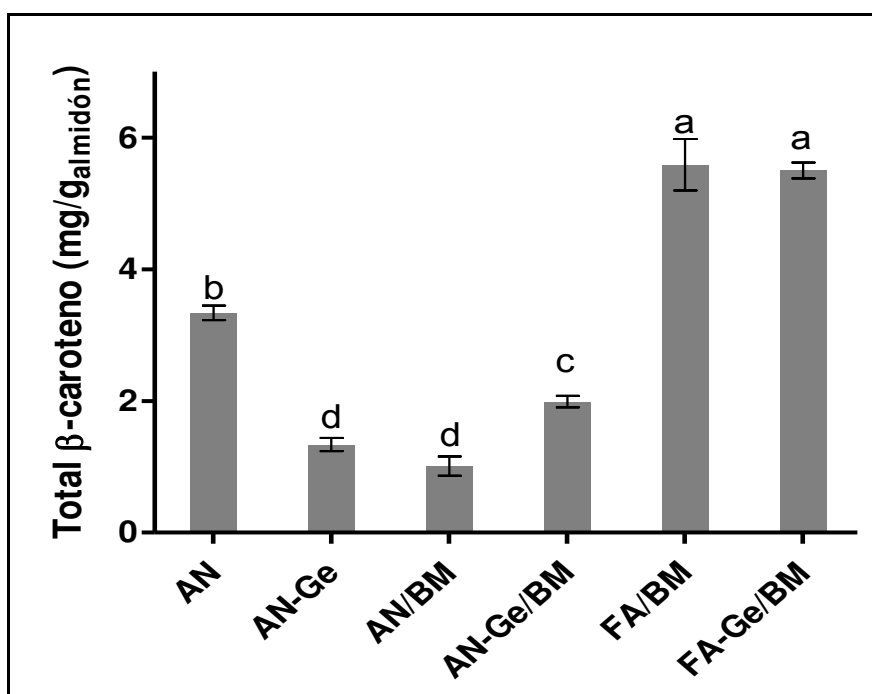
Algunos investigadores han creado nuevos materiales porosos a partir del gránulo de almidón con el objetivo de mejorar la retención de aromas; por ejemplo, Zhao y Whistler (1994) observaron que gránulos de almidón con tamaño menores a 3 μ m poseen una gran capacidad en la retención de aromas al ser combinados con agentes emulsificantes. Otros autores sostienen que un mayor porcentaje de amilosa favorece la formación de complejos de inclusión, mejorando la retención de aromas (Escher y col., 2000). Por otro lado, Boutboul y col. (2002) observaron que los puentes de hidrógeno que se forman por las interacciones polares entre los grupos hidroxilos del almidón y de los compuestos encapsulados, tienen un efecto significativo en la retención de estos compuestos en la matriz.

El uso de proteínas como material de protección también ha sido ampliamente utilizado ya que tienen la capacidad de formar emulsiones, películas, además de ser solubles en agua y biodegradables (Bruschi y col., 2003). Las proteínas también han sido usadas como materiales de cobertura en procesos de encapsulación, para suavizar la superficie del material encapsulado y mejorar la estabilidad de la matriz. Para ser usadas en la industria alimentaria, las proteínas seleccionadas deben mostrar una amplia gama de propiedades funcionales, las cuales están vinculadas a su estructura. Las proteínas del amaranto, especialmente las 7S-globulina y 11S-globulina, han demostrado muy buenas propiedades emulsificantes (Avanza y col., 2005; Condes y col., 2008; Bejarano-Lujan y col., 2010) lo cual es un factor importante en el proceso de encapsulación de compuestos no hidrosolubles.

La **figura 53** muestra la cantidad de β -caroteno total que pudo ser incorporado en las diferentes dispersiones. La figura muestra que la mayor cantidad de β -caroteno incorporado se obtuvo en las matrices a base de FA, mostrando que no hubo un efecto significativo en la adición de gelatina en la fracción que contenía las proteínas propias del amaranto. Si se compara las muestras molidas FA/BM, AN-Ge/BM y AN/BM puede observarse el efecto muy significativo de las proteínas nativas (FA) en la incorporación de β -caroteno en la mezcla, superando de manera clara, el efecto de la gelatina como agente emulsificante en la mezcla AN-Ge/BM (respecto a la muestra

AN/BM). Con referencia a la muestra AN/BM puede observarse que la adición de gelatina incrementa significativamente la cantidad de β -caroteno dentro de la emulsión, aunque de menor manera que la proteína nativa. La muestra de almidón molida AN/BM mostro un porcentaje alto de encapsulación, esto podría deberse a que la molienda intensiva rompe las cadenas largas de amilopectina a cadenas de menor tamaño (Morrison y Tester., 1993), lo cual podría aumentar los complejos de inclusión, reteniendo más cantidad de β -caroteno. Incluso, estos autores demostraron que estas cadenas poseen menor tamaño que las cadenas de amilosa, lo que podría facilitar los movimientos necesarios para que se produzca la inclusión. Por otro lado, la muestra de almidón no molida y sin gelatina (AN) mostró valores aparentemente contradictorios de contenido de β -caroteno total, dando valores inusualmente elevados. Esto se debe a la gran heterogeneidad que presentó la muestra luego de la dispersión, dispersando inadecuadamente el β -caroteno. Tanto la adición de gelatina (AN-Ge) como la molienda (AN/BM) permitieron una incorporación más homogénea del β -caroteno en toda la muestra, utilizando los mismos parámetros de homogenización/procesamiento.

Figura 53. Contenido total de β -caroteno en las matrices de almidón de amaranto de diferente composición y tratamiento.



Los valores de desvío estándar fueron incluidos. Las diferentes letras sobre las columnas (a-d) muestran diferencias significativas con un valor-p <0,05. FA: fracción amilácea; AN: almidón nativo; Ge: gelatina; BM: molienda de alto impacto

En la **figura 54** puede observarse que las fracciones elaboradas a base de FA lograron encapsular cerca del 50% de β -caroteno presente en la emulsión, mientras que la adición de gelatina en estas fracciones no tuvo un efecto significativo en la encapsulación.

En la **figura 53** se observa que el almidón nativo gelatinizado (AN) incorporó más β -caroteno en la emulsión en comparación a las otras fracciones AN, pero la mayor parte de este β -caroteno no pudo ser encapsulado (sólo un 20% fue encapsulado).

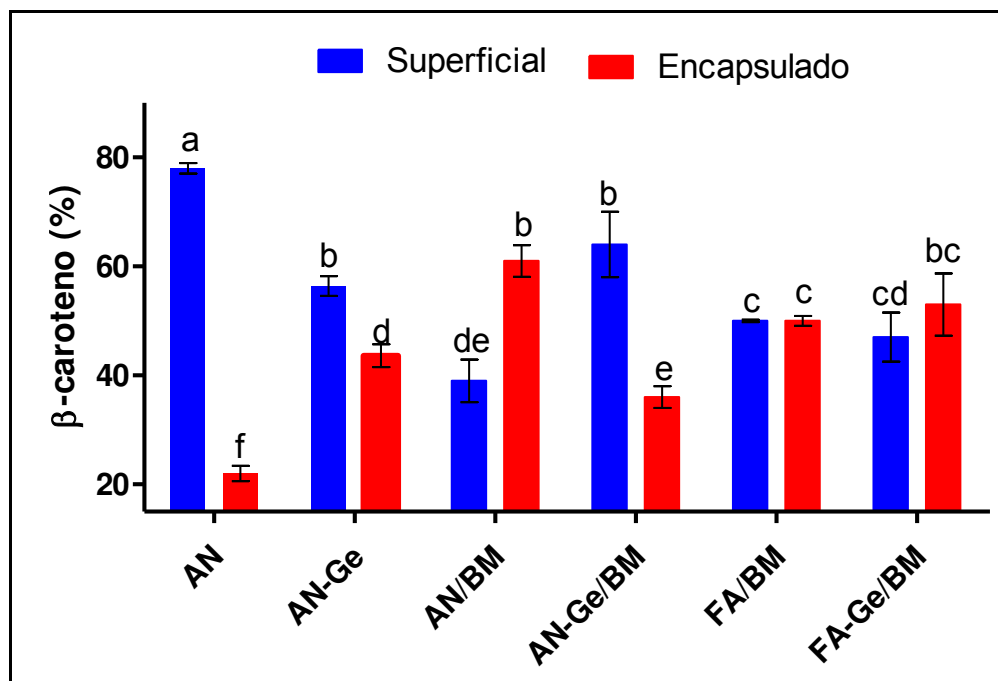
También se observa en la **figura 54** que la adición de gelatina disminuye el β -caroteno superficial y simultáneamente incrementa significativamente el β -caroteno encapsulado en la fracción AN-Ge, revelando el rol clave de la gelatina en el proceso.

Loksuwan (2007) encapsuló β -caroteno mediante secado por aspersion en matrices de almidón de tapioca nativo y modificado, encontrando % de encapsulación similares a los presentados en esta tesis. Estos autores encontraron además que el almidón modificado (hidrolizado) encapsuló una mayor cantidad de β -caroteno que el almidón nativo.

El efecto de la molienda de alto impacto se puede visualizar al comparar la muestra AN/BM vs. AN. En la **figura 54** puede observarse un incremento del 60% en el β -caroteno encapsulado en la AN/BM que fue sometida a un proceso de molienda de 6,52kJ/g en comparación al 20% del β -caroteno encapsulado en la muestra AN gelatinizada.

Con los resultados anteriores podemos decir que la operación de molienda de alto impacto mejora la capacidad encapsulante. Esto podría deberse a la reducción en el tamaño de las cadenas de amilopectina (Morrison y Tester, 1993) y al incremento del área superficial del polvo y las propiedades modificadas a partir de esto (como fuera discutido en el capítulo 5.3), mejorando así el contacto entre la matriz almidonosa y el β -caroteno.

Figura 54. Contenido porcentual de β -caroteno superficial y encapsulado en las matrices de almidón de amaranto de diferente composición y tratamiento.



Los valores de desvió estándar fueron incluidos. Las diferentes letras sobre las columnas (a-f) muestran diferencias significativas con un valor-p <0,05. FA: fracción amilácea; AN: almidón nativo; Ge: gelatina; BM: molienda alto impacto.

Al adicionar gelatina a la muestra AN/BM (AN-Ge/BM), si bien se reduce el porcentaje de β -caroteno encapsulado a costa de un aumento significativo del β -caroteno superficial, la cantidad de este en términos globales aumenta. Para poder explicar mejor este proceso, se calculó el rendimiento de encapsulación. La **tabla 26** muestra el rendimiento de encapsulación alcanzado para cada matriz elaborada. Un rendimiento cercano a 1 implica que por cada miligramo de β -caroteno encapsulado hay una cantidad similar superficial; un rendimiento mayor a 1 implica una mayor cantidad superficial, mientras que cuanto menor a 1 sea, mejor será la proporción de β -caroteno encapsulado.

En la **tabla 26** puede observarse que las matrices a base de FA y la matriz AN/BM alcanzan rendimientos menores a 1, obteniendo mejor rendimiento de encapsulación. Sin embargo, además del rendimiento es necesario tener en cuenta la cantidad de β -caroteno encapsulado. Las matrices a base de FA mostraron un rendimiento cercano a 1 y un contenido de β -caroteno elevado (mayor a $2,46 \pm 0,08$ mg/g_{almidón}), mientras que la matriz AN/BM sólo contiene $0,53 \pm 0,01$ mg/g_{almidón}. Por otro lado, la adición de gelatina

a la matriz AN/BM (muestra AN-Ge/BM), que mostraba una aparente contradicción por una disminución del porcentaje de encapsulación respecto a la muestra con gelatina (AN-Ge) o molida (AN/BM), muestra un aumento del contenido de β -caroteno total (**figura 53**) y por $g_{\text{almidón}}$ encapsulado y superficial (**tabla 26**). Esto podría deberse a un efecto de la proteína como estabilizante del β -caroteno compitiendo con la encapsulación del β -caroteno por el almidón molido, ocasionando un aumento del β -caroteno superficial. El porcentaje de β -caroteno encapsulado en las matrices FA y FA/BM fue de alrededor del 50%, que pueden considerarse valores aceptables según lo encontrado en bibliografía para sistemas similares (Tari y col., 2003).

Tabla 26. Rendimiento de encapsulación del β -caroteno en diferentes matrices.

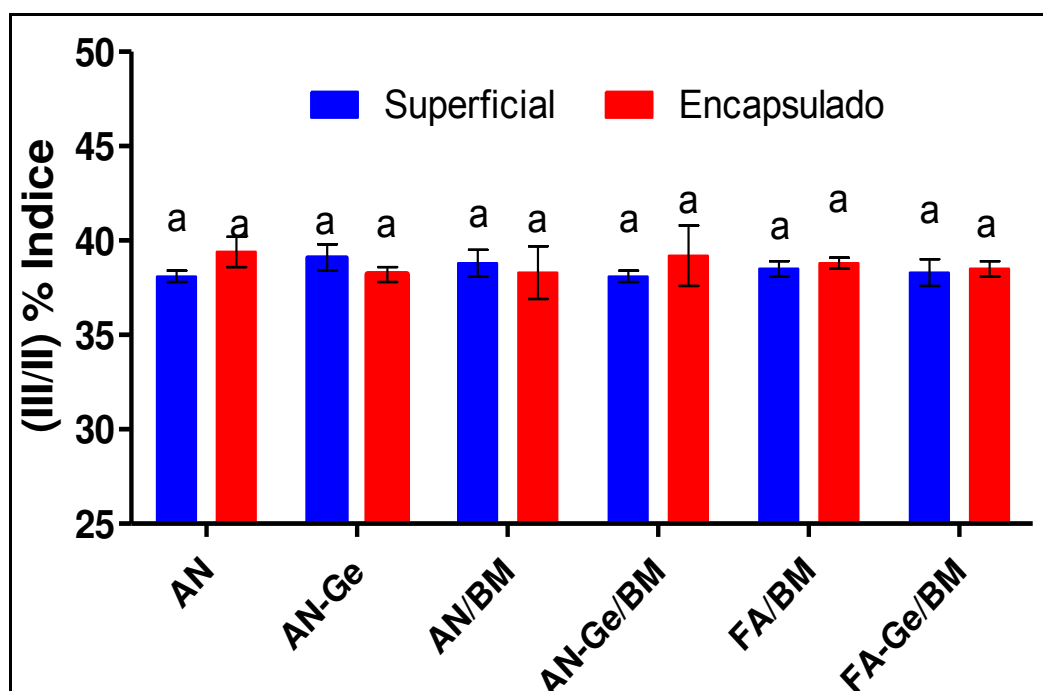
Matrices	β -caroteno superficial (mg/ $g_{\text{almidón}}$)	β -caroteno encapsulado (mg/ $g_{\text{almidón}}$)	Rendimiento β -caroteno (superficial/encapsulado)
AN	$1,18 \pm 0,09^b$	$0,33 \pm 0,01^d$	$3,5 \pm 0,1^a$
AN-Ge	$0,84 \pm 0,03^c$	$0,64 \pm 0,02^b$	$1,32 \pm 0,07^c$
AN/BM	$0,37 \pm 0,03^d$	$0,53 \pm 0,01^c$	$0,7 \pm 0,1^e$
AN-Ge/BM	$1,23 \pm 0,05^b$	$0,69 \pm 0,04^b$	$1,8 \pm 0,1^b$
FA/BM	$2,4 \pm 0,2^a$	$2,4 \pm 0,1^a$	$1,0 \pm 0,1^d$
FA-Ge/BM	$2,4 \pm 0,1^a$	$2,7 \pm 0,2^a$	$0,9 \pm 0,1^{de}$

Las diferentes letras (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada columna.

La cantidad de β -caroteno encapsulado en las matrices FA y FA/BM fue superior a las encontradas por Tari y col (2003) cuando encapsularon vainillina en almidón de amaranto utilizando como agente emulsionantes CMC y carragenato, pero fue ligeramente inferior cuando estos utilizaron goma guar. Sin embargo, es necesario aclarar que la diferencia entre estos resultados obedece también a los diferentes métodos de encapsulación empleados. Tari y col. (2003) utilizaron el gránulo de almidón entero para encapsular por secado por aspersion, aprovechando que forma aglomerados debido a su menor tamaño. En ese caso, estos autores mostraron que es preferible contar con un

bajo porcentaje de amilosa (2,5%) para obtener mayor eficiencia de encapsulación total de vainillina, obteniendo además bajos porcentajes de vainilla superficial. Estos resultados fueron atribuidos al bajo peso molecular de la amilosa en comparación al peso molecular de amilopectina, debido a que el aumento en el peso molecular disminuye la velocidad de difusión del componente retenido (Reineccius & Coulter., 1969). Por otro lado, es importante destacar que el protocolo de encapsulación utilizado por estos autores no se basa en la interacción/inclusión entre agente encapsulante y amaranto, que si se ve favorecido por un mayor porcentaje de amilosa.

Figura 55. Índice de estabilidad del β -caroteno en las matrices de almidón de amaranto de diferente composición y tratamiento.



El índice (III/II) es la relación entre la altura del pico de absorción a la longitud de onda mayor (477nm se designó III) y el pico de absorción media (450nm se designó II), tomando el mínimo entre los dos picos como la base de línea. Los valores de desvío estándar fueron incluidos.

En la **figura 55** se observa el índice de estabilidad (III/II %) (En la sección 1.4.2 de la introducción se detalla su cálculo), que indica el estado estructural de los antioxidantes, mostrando posibles isomerizaciones o cambios estructurales de los carotenoides (Britton., 1995). Los picos de absorción máxima se mantuvieron en 478, 450 y 425nm (**figura 56**), los cuales son característicos del β -caroteno (nombrado también como β,β -

caroteno) (Britton., 1995). Los valores de índice III/II% obtenidos en el presente trabajo fueron cercanos a $37,5 \pm 0,5\%$ en vez del valor teórico de 25% (Britton., 1995; Rodríguez-Amaya., 2001), lo que podría hacer pensar en que el β -caroteno podría ser una mezcla de carotenoides. Según Rodríguez-Amaya (2001), los valores del índice (III/II%) para α -caroteno (conocido también como β,ϵ -caroteno) y γ -caroteno (conocido también como β,ψ -caroteno) (**figura 57**) son 55 y 40, respectivamente. Sin embargo, la posición de los picos corresponden al β -caroteno con todos sus enlaces *trans* (la presencia de enlaces *cis* cambia la forma del espectro, disminuyendo su intensidad y moviendo el máximo de los picos del espectro hacia menores longitudes de onda entre 2 y 6 nm) (Britton, 1995), mientras que el γ -caroteno posee máximos de absorción a mayores longitudes de onda (494, 462 y 437 nm) (Rodríguez-Amaya (2001).

Los compuestos de β,ϕ -caroteno y ϕ,ϕ -caroteno (**figura 57**), que son isómeros estructurales cuya única diferencia se encuentra en el grupo terminal arilo, poseen todas sus insaturaciones como *trans* y presentan los mismos máximos que los observados, pero sus valores de índice III/II no están publicados y al momento de la realización de esta tesis no se contaron con los patrones puros para realizar su determinación. Entonces, es posible que la discrepancia del valor obtenido en el índice se deba a que se partió de una mezcla de β,β -caroteno, β,ϕ -caroteno y ϕ,ϕ -caroteno. Se requerirá un análisis por HPLC de la muestra y de los tres patrones como control para clarificar este punto. Independientemente del valor inicial del índice, el mismo no mostró variaciones significativas en ninguna de las matrices (**figura 55**), lo que significa que la estructura del carotenoide encapsulado se mantuvo estable. Para simplificar la nomenclatura, se seguirá nombrando al carotenoide como β -caroteno. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados respecto a rendimiento de encapsulación y cantidad de β -caroteno encapsulado por gramo de almidón (**tabla 26**), la cantidad total de β -caroteno (**figura 53**) y el índice de estructura (**figura 55**), las matrices de encapsulación seleccionadas para el tratamiento térmico y la humidificación a humedades relativas controladas será la FA/BM.

Figura 56. Espectro de β -caroteno utilizado en el presente trabajo.

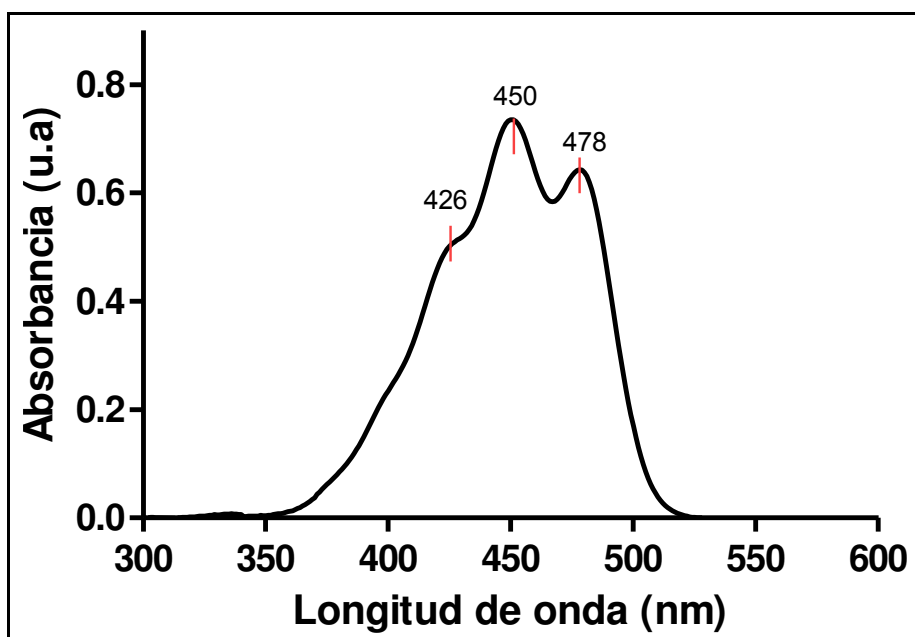
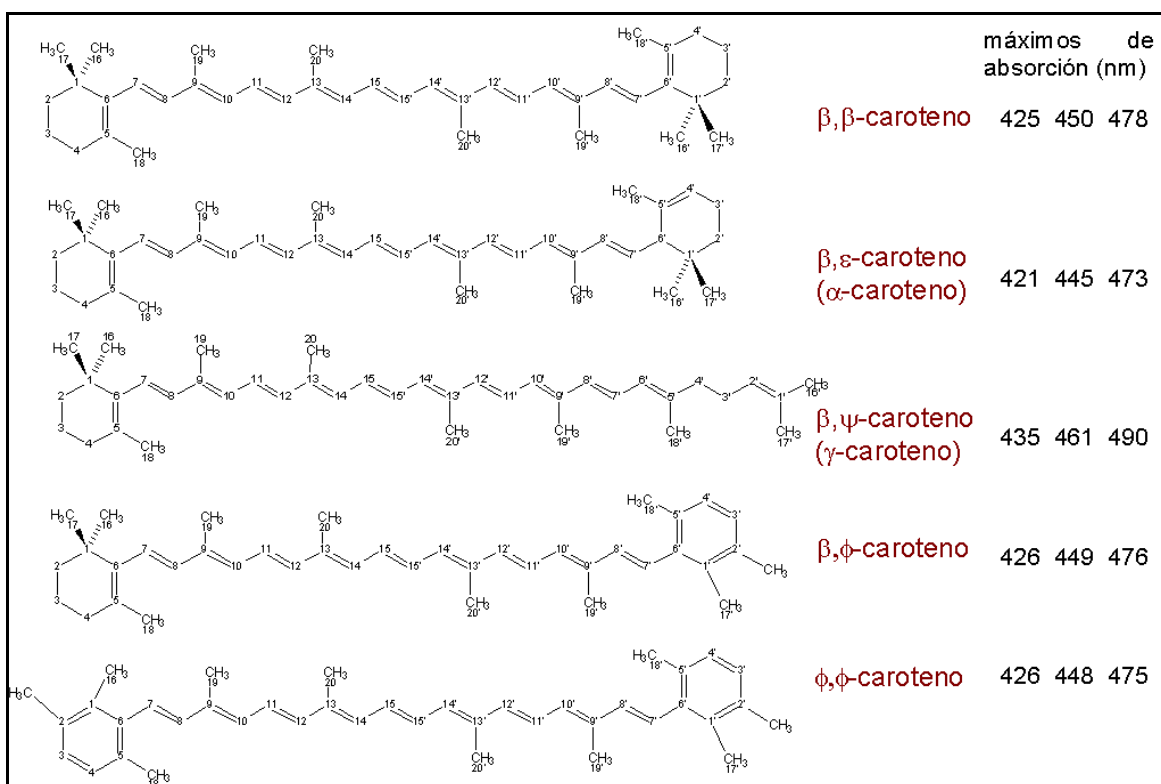


Figura 57. Estructuras de carotenos seleccionados y sus máximos de absorción.



Se eligió a esta matriz sobre la FA-Ge/BM dado que no hay diferencias significativas entre las matrices debido a la adición de gelatina, y además se explotando las proteínas propias del amaranto y la potencialidad tecnológica de la fracción FA. La matriz AN-Ge/BM se utilizará con fines comparativos en el ensayo de humidificación, de forma tal de completar la caracterización fisicoquímica de la matriz amilácea en ausencia de proteínas provenientes del grano.

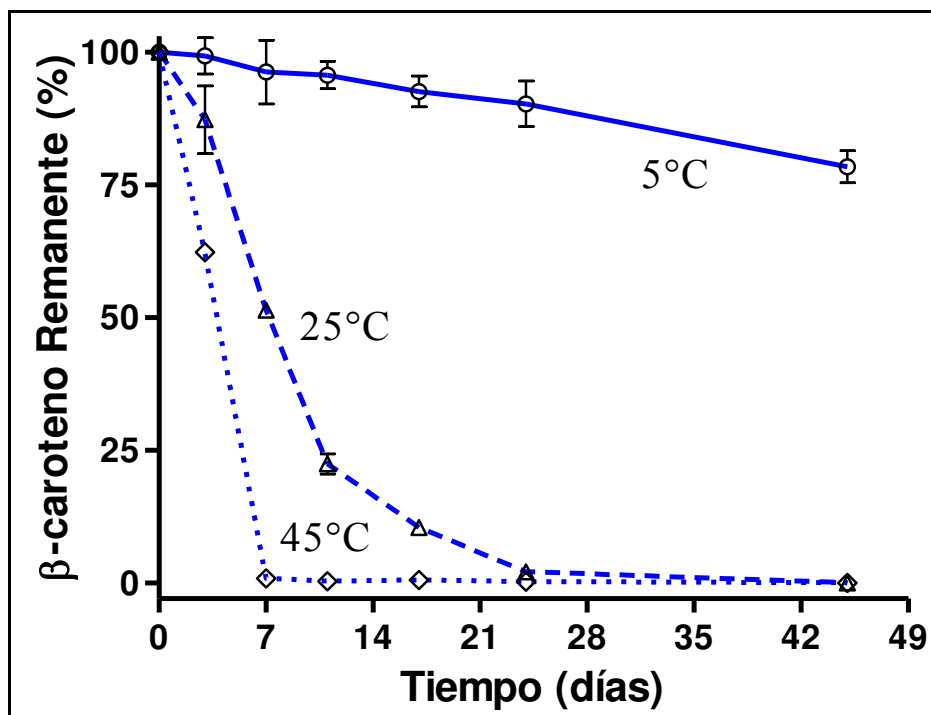
4.5.2 Evaluación de la cinética de estabilidad térmica del β -caroteno encapsulado en la fracción amilácea molida (FA/BM).

Los carotenos son propensos a los cambios estructurales debido a que son estructuras altamente insaturadas que pueden sufrir la isomerización de alguno de sus enlaces de *trans* a *cis*. Cuando sucede esto, los carotenos sufren pérdida de color y de su proactividad vitamínica A (Fennema, 1996). Los factores externos que promueven la isomerización son el calor, la luz, y los ácidos, entre otros (Rodríguez-Amaya, 2001). El principal mecanismo de degradación de los carotenoides en presencia de aire u oxígeno es la oxidación, debido al elevado número de dobles enlaces conjugados (Fennema., 1996). Sin embargo, esta degradación es dependiente del entorno en el que se encuentre el carotenoide, y la encapsulación y la compartimentalización (que se da en un tejido) lo protegen. Los principales productos de degradación son mono- y di-epóxidos, carbonilos y alcoholes.

En las **figuras 58** y **59** se puede observar la cinética de degradación del β -caroteno remanente superficial y encapsulado en la fracción amilácea molida (FA/BM) a diferentes temperaturas de almacenamiento (5, 25 y 45°C). La degradación del β -caroteno fue función de la temperatura utilizada: a mayor temperatura, mayor degradación. Por otro lado, se ve una mayor protección del β -caroteno encapsulado respecto al superficial, especialmente a 45 y 25°C.

Las muestras mantenidas a 5°C mostraron diferencias significativas con respecto al control recién a los 17 días de almacenamiento, con contenidos de β -caroteno remanente superficial y encapsulado de $96\pm 3\%$ y $93\pm 4\%$, respectivamente. Por otra parte, las condiciones de almacenamiento a 5°C afectaron de la misma manera al β -caroteno superficial como al encapsulado durante los 45 días del análisis. Al final del estudio (45 días) se conservó un $73\pm 4\%$ del β -caroteno encapsulado.

Figura 58. Comportamiento del β -caroteno superficial remanente en la fracción FA a diferentes temperaturas de almacenamiento durante 45 días.



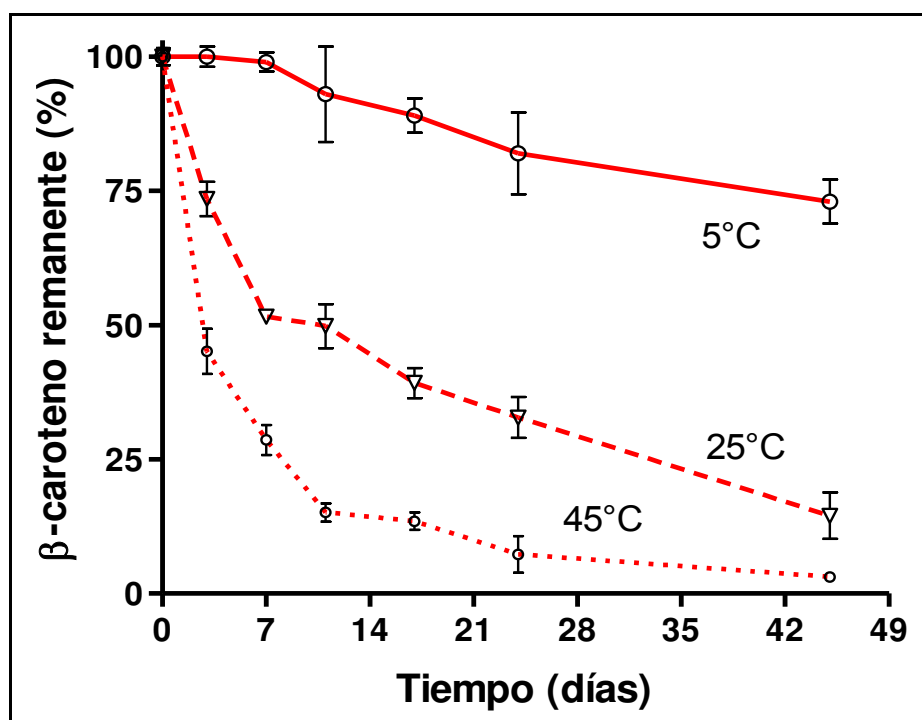
Las muestras almacenadas a 25°C mostraron diferencias significativas en el contenido de β -caroteno superficial y encapsulado en comparación al día cero. En esta condición de almacenamiento se pudo evidenciar el efecto protector de la matriz debido a que en el día 24 el β -caroteno superficial se ha degradado totalmente, mientras el encapsulado conserva un $33\pm 4\%$ del contenido inicial.

Al finalizar el estudio a 25°C se determinó que la matriz contenía un $14\pm 4\%$ de β -caroteno encapsulado. Por otra parte, el aumento de temperatura a 45°C afectó de manera rápida la degradación del β -caroteno superficial y encapsulado. En la **figura 58** se observa que a partir del día 7 el β -caroteno superficial estaba degradado, mientras que en la **figura 59** el β -caroteno encapsulado conservó un $29\pm 3\%$ del valor inicial, reflejando la capacidad protectora de la matriz FA aun a temperaturas altas. Al finalizar el estudio se determinó un $3,1\pm 0,4\%$ de β -caroteno encapsulado.

La degradación del β -caroteno por efecto de la temperatura también fue estudiada por Desobry y col. (1997) los cuales utilizaron maltodextrinas (DE=25), concluyendo que el

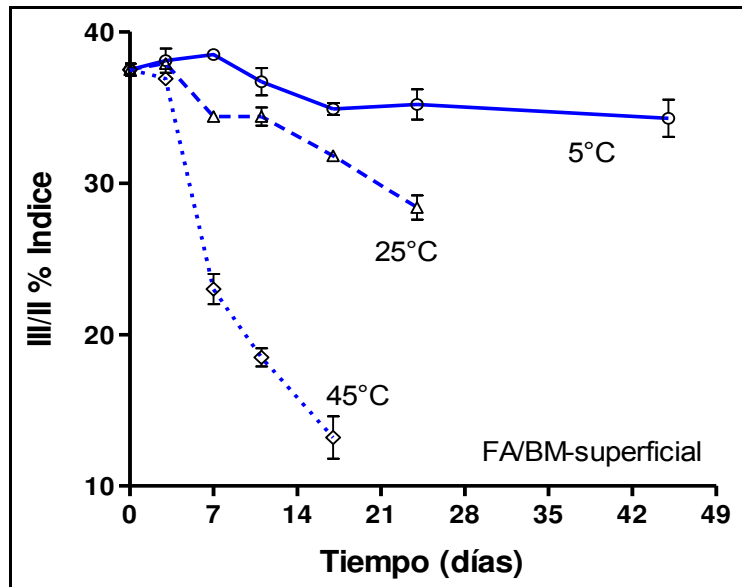
80% del β -caroteno se degradó en 7 días a 45°C mientras que las muestras almacenadas a 25°C conservaron un 30% del β -caroteno después de la segunda semana.

Figura 59. Comportamiento del β -caroteno encapsulado remanente en la fracción FA a diferentes temperaturas de almacenamiento durante 45 días.



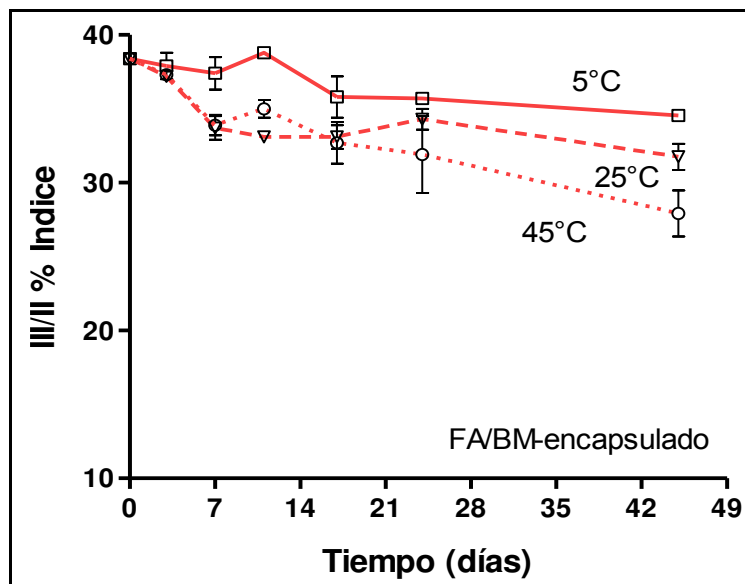
Spada y col. (2012) estudiaron la estabilidad del β -caroteno microencapsulado en almidón de *pinhao* (*Araucaria angustifolia*) por liofilización. Los autores obtuvieron altos porcentajes del caroteno en forma superficial (43%) cuando encapsulaban con el almidón nativo, mientras que este porcentaje se reducía hasta un 12% al hidrolizarlo (hasta un equivalente de DE =12). Además, estos autores observaron que la degradación del β -caroteno aumentaba tanto por temperatura como por exposición a la luz. Esta degradación era mayor a menor DE obtenido, lo que es equivalente a obtener una mayor proporción de sacáridos de cadena larga, que forman una barrera inflexible y permeable al oxígeno, permitiendo una menor oxidación y degradación del compuesto encapsulado (Wagner y Warthesen, 1995).

Figura 60. Índice de estabilidad del β -caroteno superficial remanente en la fracción FA a diferentes temperaturas de almacenamiento durante 45 días.



El índice (III/II) es la relación entre la altura del pico de absorción a la longitud de onda mayor (503nm se designó III) y el pico de absorción media (472nm se designó II), tomando el mínimo entre los dos picos como la base de línea. Los valores de desvió estándar fueron incluidos.

Figura 61. Comportamiento del índice de estabilidad (III/II) del β -caroteno encapsulado remanente en la fracción FA a diferentes temperaturas de almacenamiento durante 45 días.



El índice (III/II) es la relación entre la altura del pico de absorción a la longitud de onda mayor (503nm se designó III) y el pico de absorción media (472nm se designó II), tomando el mínimo entre los dos picos como la base de línea. Los valores de desvió estándar fueron incluidos.

Por otro lado, se analizó la influencia de la temperatura en la estructura del β -caroteno, a través del estudio de la estructura fina del espectro (índice III/II%). En la **figura 60** se observa que la temperatura afectó notablemente la estructura del β -caroteno superficial (**figura 60**) en comparación al β -caroteno encapsulado (**figura 61**), especialmente a temperaturas de almacenamiento superiores a 25°C, mostrando la importancia de la encapsulación como técnica de conservación y almacenamiento de moléculas lábiles. Si bien no es posible decir cuáles son las isomerizaciones de los dobles enlaces de *trans* a *cis* (hay 272 posibles isómeros potenciales, Fennema, 1996) provocadas por la temperatura, se observan cambios en la estructura fina del espectro del β -caroteno, afectando especialmente el pico de longitud de onda máxima (Britton, 1995).

La degradación del β -caroteno (cuyos datos se muestran en las **figuras 58 y 59** sigue una cinética de primer orden (Lavelli y col., 2007; Sutter y col., 2007 Spada y col., 2012). La **tabla 27** muestra los valores de las constantes de degradación de la cinética del β -caroteno superficial (k_s) y encapsulado (k_e). Los r^2 obtenidos para los ajustes fueron superiores a 0,95, en todos los casos. Las constantes obtenidas fueron fuertemente influenciadas por la temperatura de almacenamiento, reflejando la mayor conservación del β -caroteno encapsulado respecto al superficial, especialmente a 25 y 45°C. Es interesante notar como la k_e a 45°C es incluso menor que la k_s a 25°C, mostrando un claro efecto protector de la matriz sobre el β -caroteno encapsulado.

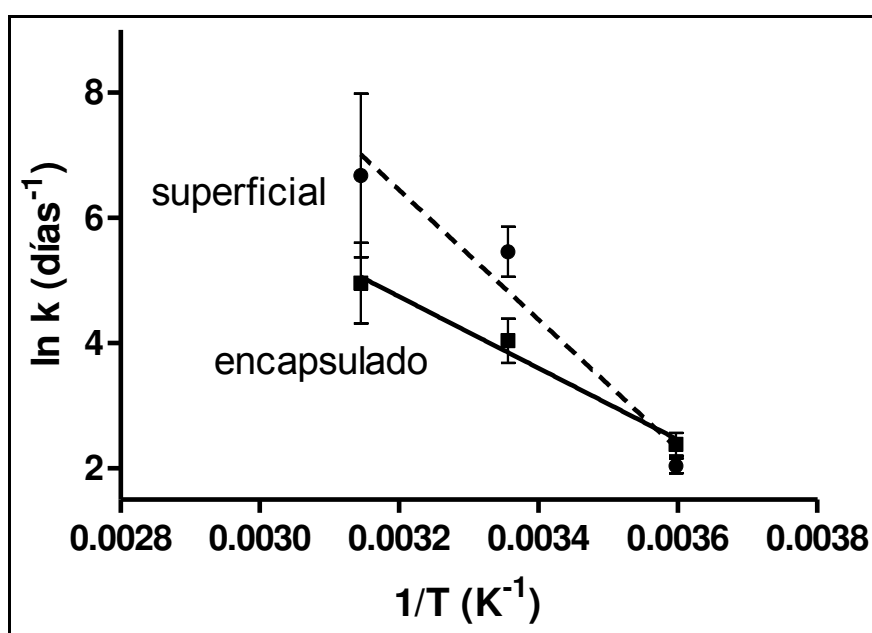
Para analizar la influencia de la temperatura sobre las constantes de degradación del β -caroteno, se realizó un gráfico de Arrhenius, que se muestra en la **figura 62**. Esta ecuación ya ha sido utilizada satisfactoriamente para describir la degradación de carotenoides con la temperatura (Hidalgo y Brandolini, 2008; Cisse y col., 2009). A partir de la ecuación de Arrhenius se obtuvieron los valores de energía de activación (E_a) involucrada en la degradación β -caroteno encapsulado y superficial, a partir de ajustes de r^2 0,98 y 0,95; respectivamente. Los valores de E_a obtenidos fueron de 86 y 48 \pm 6 kJ/mol para el β -caroteno superficial y encapsulado, respectivamente. Estos valores son relativamente similares a los reportados en bibliografía para la degradación del β -caroteno superficial o no encapsulado (Bechoff y col., 2010, Dhuique-Mayer y col., 2007). La mayor E_a obtenida para el β -caroteno superficial respecto al encapsulado implica que un es necesario un menor cambio de temperatura para degradar el β -caroteno superficial que el encapsulado.

Tabla 27. Constante cinética k (días⁻¹) del β -caroteno superficial y encapsulado a diferentes condiciones de almacenamiento.

Temperatura (°C)	Constante cinética k_s (días ⁻¹)	Constante cinética k_e (días ⁻¹)
5	-0,0053± 0,0003 ^e	-0,0075 ± 0,0006 ^f
25	-0,16± 0,01 ^b	-0,039± 0,003 ^d
45	-0,6± 0,1 ^a	-0,07 ± 0,01 ^c

Las diferentes letras (a-f) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las constantes.

Figura 62. Gráfico de Arrhenius mostrando la dependencia de las constantes de degradación de β -caroteno (k) con la temperatura.



4.5.3 Evaluación de estabilidad del β -caroteno encapsulado en las matrices amiláceas molidas almacenadas a diferentes humedades relativas.

Las muestras a base de FA/BM o AN-Ge/BM fueron almacenadas a diferentes condiciones de humedad relativa (HR) controlada entre 11 y 97%. La matriz AN-Ge/BM se utilizó con fines comparativos, de forma tal de completar la caracterización fisicoquímica de la matriz amilácea en ausencia de proteínas provenientes del amaranto.

El diagrama relativo de estabilidad elaborado por Labuza y col. (1972) muestra que la velocidad relativa de la oxidación de lípidos posee una curva del tipo U, observándose valores máximos a bajas y altas actividades de agua, y presentando un mínimo entre 0,3 y 0,5. Es importante destacar que la mayoría de los trabajos que evalúan la estabilidad del β -caroteno en función del contenido de agua lo hacen estudiando la estabilidad del β -caroteno en función del tiempo una vez que la matriz empleada alcanzó la humedad de equilibrio (Goldman y col., 1983; Selim y col., 2000; Lavelli y col., 2007; Ramoneda y col., 2011; Sutter y col., 2007).

En la presente tesis, se estudió en cambio la influencia del contenido de agua sobre la cantidad y estructura del β -caroteno luego de la humidificación entre 11 y 97% de HR, por lo que los resultados obtenidos no van a obedecer a la típica curva en U, ya que esta corresponde a velocidades relativas y no a contenido de caroteno.

Los resultados del contenido de β -caroteno remanente pueden verse en las **figuras 63 y 64** para las muestras FA/BM y AN-Ge/BM. Tanto el contenido de β -caroteno superficial como el encapsulado fueron afectados de la misma manera y en forma dependiente con la humedad de almacenamiento, aunque el contenido de β -caroteno encapsulado siempre fue mayor al superficial, mostrando la capacidad protectora de la matriz. Para ambas matrices, se observó una zona de mayor degradación entre 33% y 75% de HR (con un mínimo a 52%), mientras que las muestras almacenadas a humedades relativas superiores conservaron mayor cantidad de β -caroteno.

El hecho que no existan diferencias entre las dos matrices analizadas puede deberse a que tanto el mecanismo de encapsulación como el de protección sea el mismo para ambos sistemas. La única diferencia entre ellos está en el tipo de proteínas que tienen (las propias del grano de amaranto o la gelatina), y evidentemente esto no afecta a la estabilidad del β -caroteno a diferentes humedades de almacenamiento.

Es importante considerar que las muestras a 84 y 97% de HR pasan más rápido que la muestra de 75% por la zona de máximo deterioro, lo que explicaría los mayores valores de retención de β -caroteno.

Figura 63. Comportamiento del β -caroteno superficial y encapsulado remanente en la fracción FA/BM a diferente humedad relativa a 25°C. b.s.: base seca.

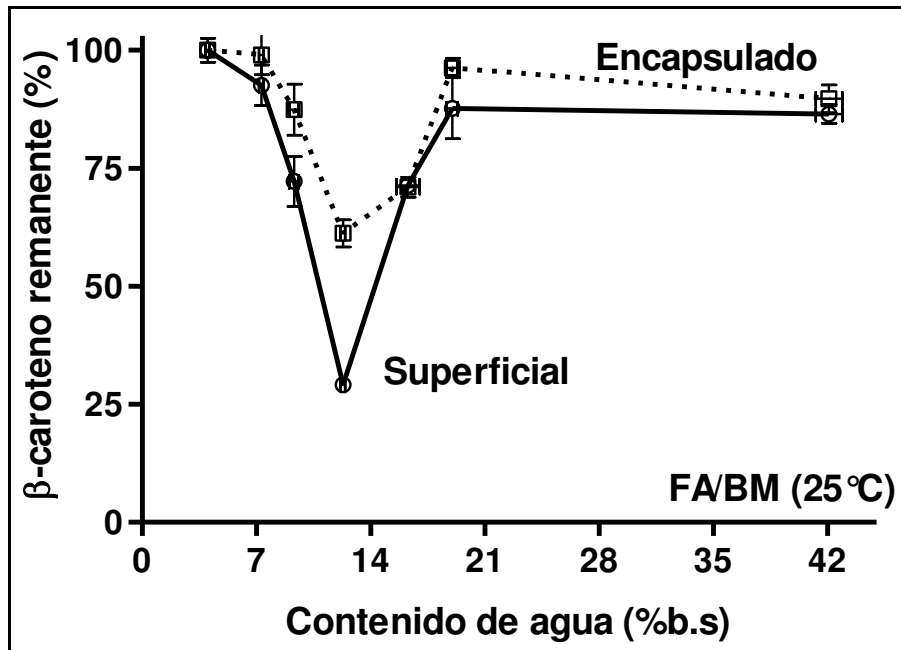
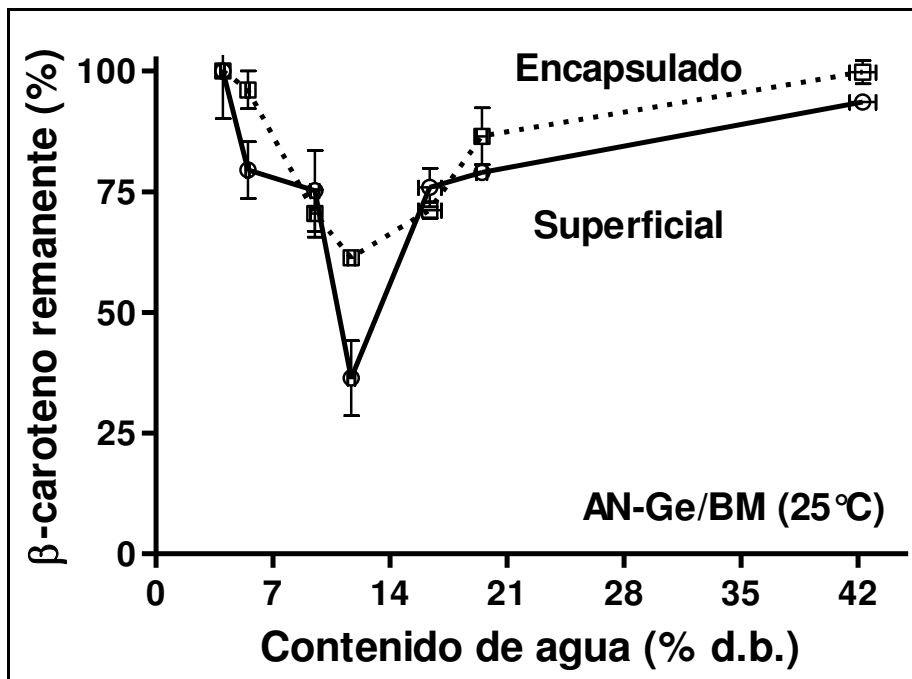
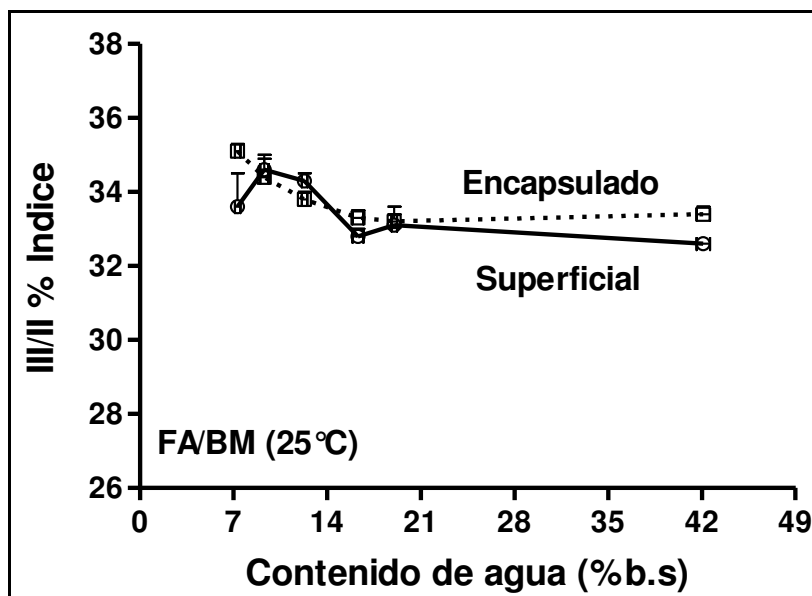


Figura 64. Comportamiento del β -caroteno superficial y encapsulado remanente en la fracción AN-Ge/BM a diferente humedad relativa a 25°C. b.s.: base seca.



La **figura 65** muestra el índice de estructura fina (III/II%) para la muestra FA/NM humidificada. A diferencia de lo observado en la sección anterior, el cambio del índice III/II% es pequeño y similar tanto para el β -caroteno encapsulado como para el superficial en la muestra FA/BM (**figura 65**). Esto deja en evidencia que los mecanismos de deterioro observados en función del contenido de agua provocan mínimos cambios (isomerizaciones, en este caso) en el β -caroteno, esté o no encapsulado. Es decir, estructuralmente, las diferencias en el contenido de agua no estarían afectando la estructura del β -caroteno a partir de cambios producidos por isomerizaciones. Por otro lado, es importante notar que hubo una ligera reducción de los valores del índice en las muestras humidificadas respecto a la muestra control (índice III/II% de $37,5 \pm 0,5$). Esta reducción implica que hubo una isomerización del β -caroteno que podría haberse ocasionado durante el tiempo de humidificación a 25°C . Sin embargo, esta reducción se explica observando las **figuras 60 y 61**, donde a 15 días (a 25°C) se observa un cambio similar en el índice.

Figura 65. Comportamiento del índice de estabilidad (III/II%) del β -caroteno superficial y encapsulado remanente en la fracción FA/BM a diferentes humedades relativas. b.s.: base seca.

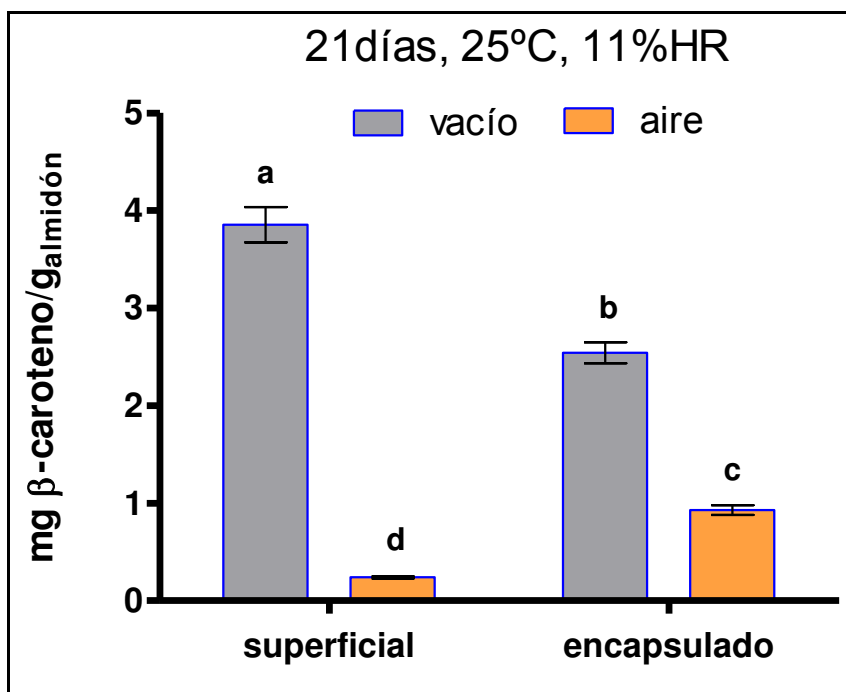


Golman y col. (1983) demostraron que la degradación de β -caroteno en matrices modelos de celulosa microcristalina deshidratadas al vacío y posteriormente

humidificadas en un rango de contenidos de agua entre 0 y 21% a 35°C se debe a la acción del oxígeno remanente en el espacio de cabeza luego del sellado de los viales. Sin embargo, el deterioro evaluado por estos autores corresponde a la degradación en función del tiempo, una vez que el vial fue sellado posteriormente a la humidificación. En ese caso, la curva de degradación obtenida es de forma sigmoidea, correspondiendo a una típica reacción autocatalítica en cadena, donde hay un primer período de inducción, un período rápido (propagación) y finalmente uno de retardo o terminación (Golman y col., 1983). En los experimentos mostrados en las **figuras 63 y 64**, el deterioro observado podría deberse a la oxidación generada por el oxígeno del aire al que estuvieron expuestas las muestras al ser sacadas del liofilizador. Si bien esa exposición fue por muy corto tiempo, podría haber bastado para iniciar la reacción de oxidación. Si se estudiara la cinética de degradación del β -caroteno en función del tiempo de humidificación (experimento que habría que realizar utilizando tantos desecadores como tiempos se quisieran medir, de forma tal de no exponer a las muestras al aire por el tiempo del ensayo) y si esta cinética siguiera una curva de degradación del tipo forma sigmoidea, se podría corroborar el mecanismo de degradación. La **figura 66** muestra el deterioro provocado por el oxígeno, que es más pronunciado para el β -caroteno superficial respecto al encapsulado. En este caso, el oxígeno presente en el espacio de cabeza fue suficiente para provocar una gran oxidación del caroteno superficial. Golman y col. (1983) habían observado cómo la concentración de oxígeno (entre 1 y 20%) provoca un aumento en la constante de la cinética de degradación del β -caroteno.

Con el fin de comprender la influencia de la estructura y de algunas propiedades fisicoquímicas de la matrices en los resultados de estabilidad del β -caroteno, así como obtener una completa caracterización fisicoquímica de la matriz, se analizaron diferentes propiedades de sorción, de movilidad y térmicas de las matrices. La actividad de agua y el contenido de humedad son parámetros considerados de importancia relevante en la estabilidad de alimentos, ya que, al estar expuestos a la humedad relativa del ambiente puede ganar o perder humedad hasta el nivel de equilibrio dado (Ronkart y col., 2006).

Figura 66. Cantidad de β -caroteno superficial y encapsulado luego de 21 días a 25°C en muestras en atmósfera de 11% de humedad relativa (vacío) y selladas luego de la liofilización (aire). Se muestran los desvíos estándar. Las diferentes letras (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada columna.



Este movimiento de agua, en productos de baja humedad, para alcanzar el equilibrio con el ambiente circundante es identificado con el término sorción y si el proceso es conducido a temperatura constante es posible establecer las isotermas de sorción de humedad (Bell y Labuza., 2000). De ese modo, las isotermas pueden ser de adsorción o desorción de humedad (Yana y col., 2008, Poaquiza, 2008; Sinija y Mishra, 2007; Ronkart y col., 2006; Mathlouthi y Roge, 2003) y gráficamente corresponden al contenido de agua en función de la actividad de agua (a_w), a una determinada temperatura. La **figura 67** muestra las isotermas de sorción de agua para las muestras FA/BM y AN-Ge/BM. Ambos sistemas poseen una isoterma muy similar entre sí con la típica forma sigmoidea (isoterma tipo II), característica de polímeros derivado de almidones (Ramoneda y col., 2011). La **figura 67** muestra las isotermas ajustadas a través del modelo de GAB aplicada hasta valores de a_w de 0,9 (Furmaniak y col., 2009). Los valores obtenidos de dichos ajustes se observan en la **tabla 28**. EL modelo de GAB toma en consideración conceptualmente a las multicapas y es el método más utilizado debido a su rango de validez.

Figura 67. Isotherma de sorción de agua para las muestras de fracción amilácea molida (FA/BM) y almidón nativo con gelatina molido (AN-Ge/BM) modeladas por GAB.

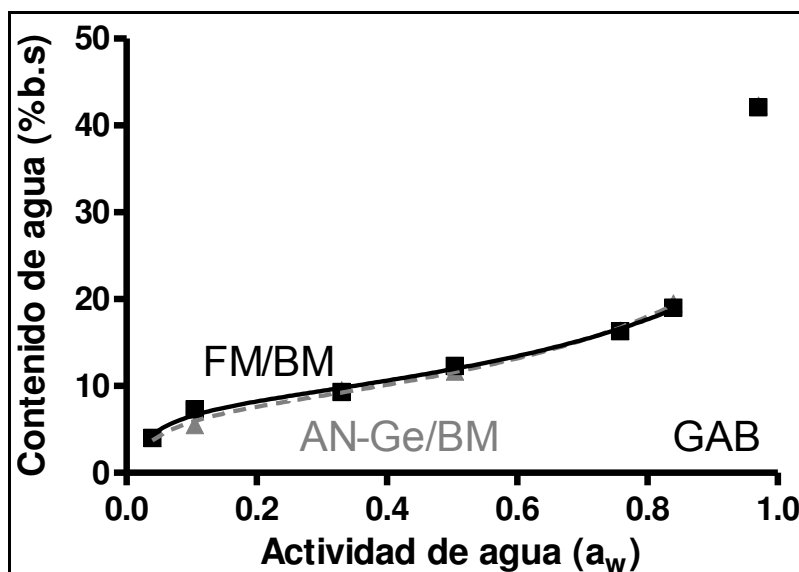


Tabla 28. Parámetros obtenidos mediante ajuste de las isotermas de adsorción de agua por el modelo de GAB y valor de superficie de sorción (S_w). Se incluye el error estándar.

Matriz	q_m (% g/g _{b.s.})	C	k	r^2	S_w (m ² /g)
FA/BM	8,3±0,7 ^a	38±11 ^a	0,68±0,04 ^a	0,9935	294±25 ^a
SN-Ge/BM	7,8±0,4 ^a	29±6 ^a	0,72±0,03 ^a	0,9973	277±14 ^a

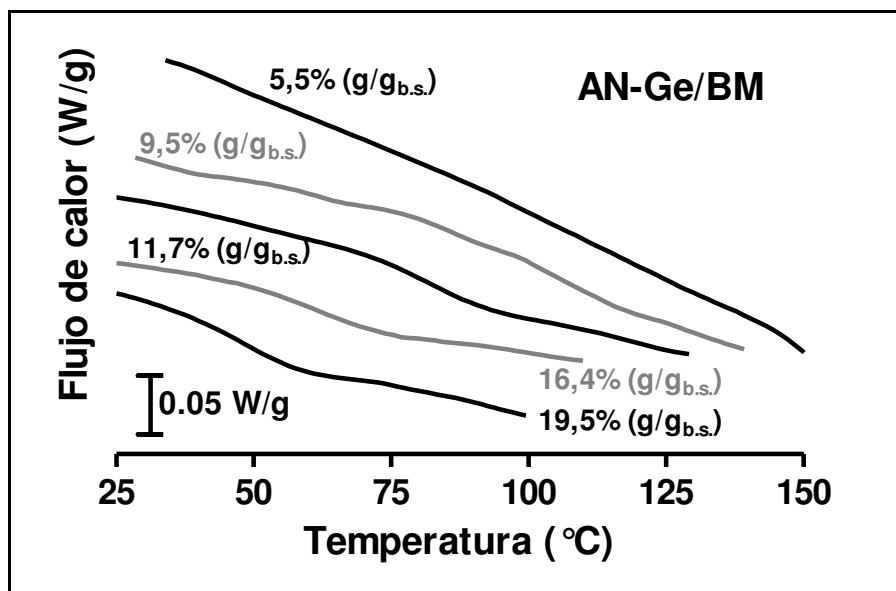
Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada columna

La ecuación de GAB permite obtener el valor de sorción de monocapa (q_m), que representa la cantidad de agua que cubre la superficie expuesta del sólido completamente con una capa de una molécula de espesor (van den Berg, 1981). La constante C de Guggenheim está relacionada con el calor de sorción del agua a la primera capa de sitios activos del sólido, mientras que la constante k es un factor que corrige las propiedades de las moléculas de agua de la multicapa respecto del agua libre. Los valores de sorción C y k encontrados no muestran diferencias significativas entre las muestras y fueron similares a los hallados en otros productos amiláceos (Samapundo y col., 2007, Sablani y col., 2009, Furmaniak y col., 2009). Conociendo el volumen de una molécula de agua, es posible calcular el área de sorción (S_w), que se muestra en

tabla 28. Los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas entre sí, y se encuentran en el rango de productos amiláceos (Farroni, 2011).

Debido al proceso de generación de los sistemas (liofilización), las moléculas del soluto fueron inmovilizadas mediante un rápido congelamiento y/o una rápida deshidratación, obteniendo de este modo un sólido amorfo. Uno de los parámetros claves de estudio en sistemas deshidratados corresponde a la determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g). La determinación de la curva de T_g para una muestra permite tener una noción de las regiones de estabilidad para un determinado sistema, conociendo las zonas correspondientes al estado amorfo y al de un líquido sobre enfriado o región gomosa. La T_g corresponde a la temperatura a la cual los vidrios empiezan a ablandarse y fluir (Sperling., 1986). Los sólidos amorfos existen en un estado de no-equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. El aspecto de un material vítreo es el de un sólido rígido quebradizo caracterizado por una altísima viscosidad (alrededor de 10^{12} a 10^{14} Pa.s) (Sperling., 1986). La movilidad molecular en los vidrios está restringida a vibraciones y movimientos rotacionales de rango corto (Sperling., 1986). Los cambios que ocurren en el estado vítreo, durante el llamado “envejecimiento físico”, son extremadamente lentos y por lo tanto, los sistemas se pueden considerar estables a cambios físicos y químicos (Levine y Slade., 1986; Slade y Levine., 1991; Jouppila., 1999). A temperaturas superiores a T_g , el sistema pasa del estado vítreo al de líquido sobre-enfriado, la viscosidad disminuye de aproximadamente 10^{12} a 10^3 Pa.s (Sperling., 1992), aumenta la movilidad molecular y los movimientos traslacionales, y en los sistemas porosos se produce encogimiento estructural como consecuencia de la disminución de viscosidad y aumento de fluidez de las paredes que sostienen su estructura. Debido a su efecto potencial de aumentar el coeficiente de difusión de los reactivos al ocurrir la transición vítrea, numerosos autores analizaron el efecto de ésta sobre la cinética de las reacciones químicas controladas por la difusión de los reactivos (Slade y Levine., 1991; Lievonen y Roos., 2002). Por lo tanto, para obtener mayor protección de un agente lábil encapsulado, es deseable que la muestra esté vítrea, ya que la velocidad de las reacciones de deterioro será baja y mucho menor respecto al estado gomoso.

Figura 68. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de muestras de liofilizadas humidificadas entre 11 y 84 % de humedad relativa. Las muestras corresponden a los sistemas obtenidos con almidón nativo tratado con molino a bolas y poseen gelatina (AN-Ge/BM). Los termogramas mostrados corresponden a los reescan. Se informan los contenidos de agua expresados en base seca (b.s.).



La **figura 68** muestra los reescans de los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de las muestras AN-Ge/BM. Dichos termogramas muestran una transición que se mueve a menores temperaturas a medida que aumenta el contenido de agua. Dicha transición corresponde a la T_g de las muestras, que disminuye debido al efecto plastificante del agua, ocasionando un aumento de movilidad en las mismas.

La **figura 69** muestra las curvas de T_g obtenidas para los dos sistemas analizados en función de la fracción de agua. Como era esperable, las curvas fueron muy similares para los dos sistemas, con valores de T_g elevados para todo el rango de contenidos de agua estudiados. Los datos obtenidos fueron ajustados con la ecuación Gordon y Taylor, cuyos valores se muestran en la **tabla 29**. Los valores de T_g hallados para el almidón de amaranto molido fueron de 192 ± 6 °C, cuyo valor es consistente (aunque un poco menor) con los valores de T_g reportados para almidones de otras fuentes ($243-278$ °C para maíz, Jouppila y Roos., 1997 y Zhong y Sun., 2005, respectivamente; 166 ± 9 °C para *grits* de maíz, Farroni., 2011).

Los menores valores de T_g hallados podrían deberse a la reducción del largo de las cadenas sacarídicas, producto de la molienda, si bien esto no se corroboró experimentalmente. La constante k permite caracterizar el efecto del agua sobre la T_g . Si el valor de la relación T_{g1}/T_{g2} es alto como en este caso (la T_g del segundo componente es mucho menor de la del primero), k también lo es, y el segundo componente tendrá un mayor efecto sobre la T_g del primero (Katkov y Levine., 2004). Los valores hallados coinciden con los valores reportados en bibliografía para almidones, que se encuentran en el rango 3,8 a 6,2 (Jouppila y Roos., 1997; Zhong y Sun., 2005; Farroni., 2011).

Figura 69. Curva de temperaturas de transición vítrea (T_g) para las muestras de fracción amilácea molida (FA/BM) y almidón nativo con gelatina molida (AN-Ge/BM) modeladas por Gordon y Taylor. Se incluye el desvío estándar.

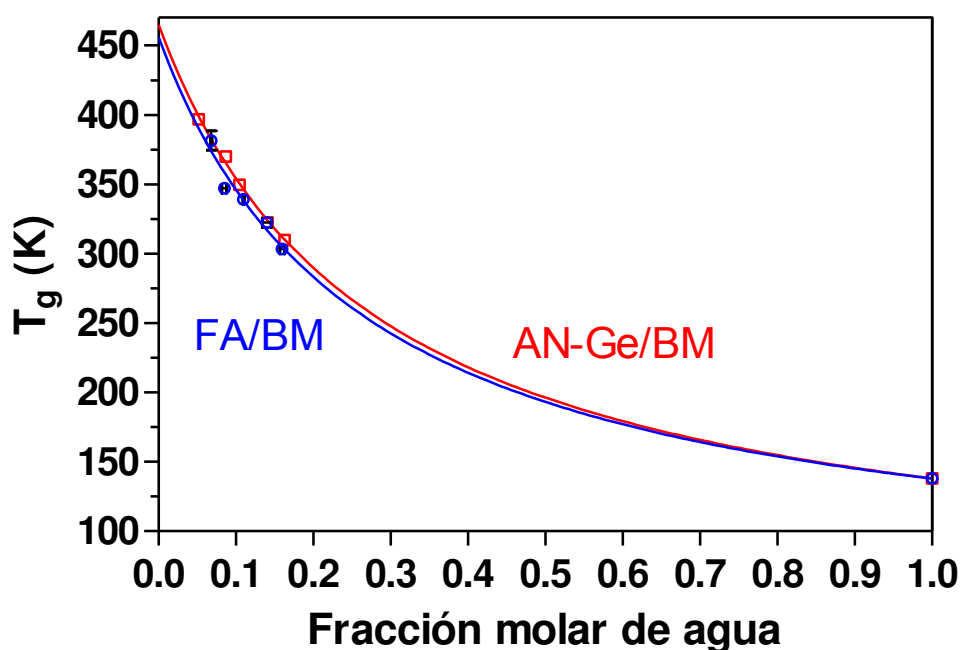


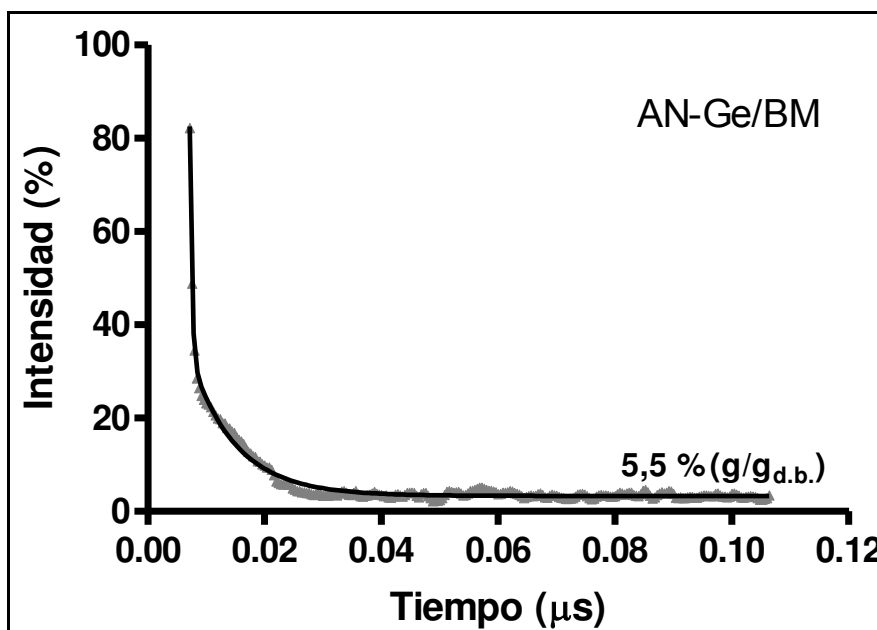
Tabla 29. Parámetros obtenidos mediante la ecuación Gordon y Taylor. Se incluye el desvío estándar.

Matriz	T_g (K)	k	r^2
AN-Ge/BM	465 ± 6^a	$4,6 \pm 0,3^a$	$0,9993^a$
FA/BM	456 ± 23^a	5 ± 1^a	$0,9942^a$

Es importante notar que en el rango de 11 a 84% las muestras estuvieron almacenadas (a 25°C) por encima de su T_g . Por lo tanto, los cambios observados en las **figuras 63 y 64** no son función de un cambio drástico en la movilidad del sistema producido por un cambio de estado (de vítreo a gomoso). Todos los cambios que se observan en dichas figuras ocurrieron en el estado vítreo, así como los cambios observados durante el almacenamiento térmico (**figuras 58 y 59**).

Los estudios de movilidad por resonancia magnética nuclear (RMN) permiten entender diferencias en la movilidad molecular de los sistemas, que podrían tener impacto en las reacciones de deterioro (Grattard y col., 2002). La plastificación debido al aumento del contenido de agua induce un incremento tanto en la flexibilidad como en la movilidad molecular de los polímeros, provocando una disminución en el valor de T_g (Ferry., 1980). Existen numerosos estudios que muestran la influencia del agua en las propiedades físicas de almidones amorfos (Farhat y col., 1996; Farhat y col., 2003; Kalichevsky y Blanshard., 1992; Kalichevsky y col., 1992; Matveev y col., 2000). Es sabido que el almidón posee una componente inmóvil o rígida y otra móvil, que se caracterizan a partir del segundo momento y de los tiempos de relajación, respectivamente (Roudeaut y col., 2002). La **figura 70** muestra una curva de decaimiento obtenida por FID para una muestra de AN-Ge/BM. Debido a la cantidad de muestra empleada y debido al tiempo muerto de detección del detector (7 μ s) después del pulso de 90° empleado (secuencia FID), no fue posible modelar adecuadamente las poblaciones correspondientes a los protones inmóviles, y a partir de esto obtener los valores de segundo momento (Roudeaut y col., 2002; Van der Dries y col., 1998), que hubiesen dado información acerca de las interacciones almidón-almidón/almidón-agente encapsulado. Sin embargo, sí fue posible obtener información acerca de los tiempos de relajación (T_2) correspondientes a los protones móviles, que incluye a los protones del agua ligada. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 71**. Si bien las curvas fueron modeladas mediante un ajuste biexponencial, es necesario aclarar que sólo se muestran los resultados correspondientes a un único tiempo de relajación – correspondiente a los protones móviles- dado que el primer término del ajuste debería ajustar a una término gaussiano (Abragam., 1961; Roudeaut y col., 2002; Van der Dries y col., 1998) y no a uno exponencial. Es importante destacar que esta modificación no modificó el ajuste del T_2 obtenido.

Figura 70. Curva de decaimiento obtenida por FID para una muestra de almidón nativo tratado con molino a bolas conteniendo gelatina (AN-Ge/BM) liofilizada y humidificada a 11 % de humedad relativa.



Como era esperable de acuerdo a la información existente en literatura (Matveev y col. 2000; Roudeaut y col., 2002), los valores de T_2 aumentaron en función del contenido de agua. La **figura 71** muestra que la muestra AN-Ge/BM posee menores tiempos de relajación que la muestra FA/BM en función del contenido de agua. La menor movilidad obtenida por RMN se correlaciona con los mayores valores de T_g obtenidos en la muestra AN-Ge/BM. Sin embargo, estas diferencias en movilidad y en T_g no se manifiestan en los valores de β -caroteno remanente, mostrando la potencialidad de la fracción amilácea como agente encapsulante. Asimismo, es interesante notar que los cambios observados en la **figuras 63 y 64** no están directamente relacionados con cambios en la movilidad molecular en el sistema, como muestra la **figura 72**. En esta figura se puede observar que si bien el decaimiento del β -caroteno remanente sigue un aumento de la movilidad molecular para los sistemas humidificados entre 11 y 52 % de HR, esta tendencia se pierde (a la derecha de la línea punteada) para las muestras humidificadas a 75 y 84 % de HR. Es importante destacar que en este caso los T_2 calculados corresponden a una movilidad promedio, y por lo tanto no reflejan las reales movilidades que podría tener el β -caroteno superficial y encapsulado.

Figura 71. Efecto del contenido de agua en los tiempos de relajación transversal (T_2) obtenidas por FID de muestras de almidones liofilizadas humidificadas entre 11 y 97 % de humedad relativa. Las muestras corresponden a los sistemas obtenidos con almidón nativo tratado con molino a bolas y poseen gelatina (AN-Ge/BM) y a los sistemas de la fracción amilácea molida.

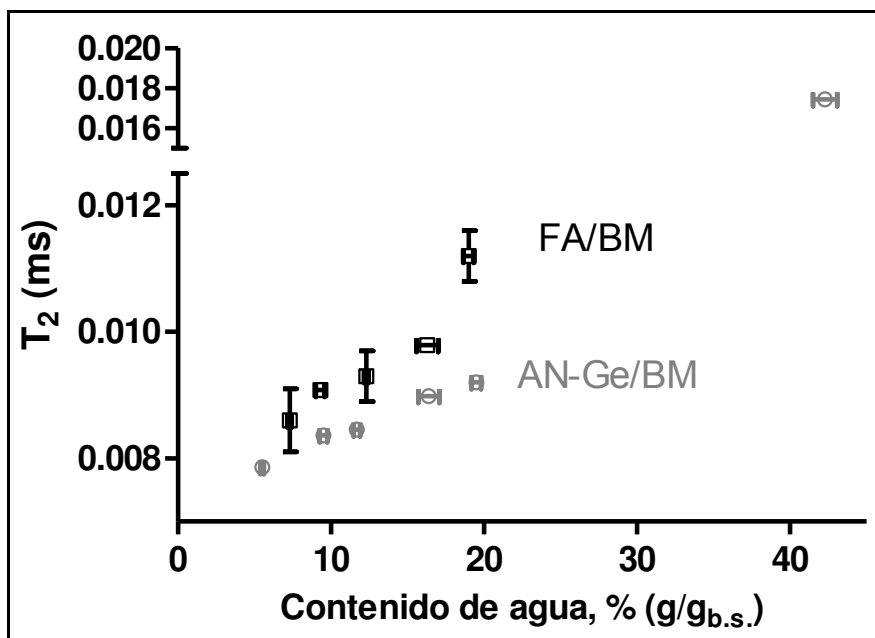
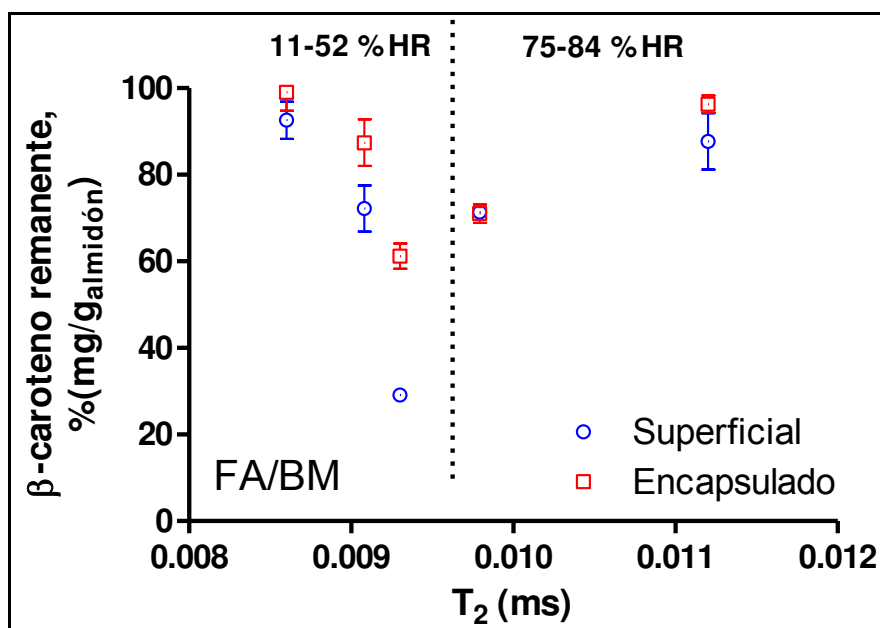


Figura 72. Porcentaje de β -caroteno remanente en función de los tiempos de relajación transversal (T_2) obtenidos por FID. Se destacan los valores de humedad relativa (HR) a los que fueron expuestas las muestras.



5. CONCLUSIONES

Se estudió el potencial del grano de amaranto con relación a la producción de diferentes fracciones de molienda y su aplicación como materia prima en la encapsulación y protección de un antioxidante modelo (β -caroteno) estudiando su estabilidad durante el almacenamiento. Para ello se exploraron diferentes estrategias de molienda que combinaron la molienda abrasiva con la molienda de alto impacto por vía seca y húmeda, utilizando principalmente un molino planetario de bolas.

Las conclusiones principales fueron las siguientes:

- 1) Mediante la optimización de la **molienda abrasiva del grano de amaranto**, se logro evaluar el efecto de la humedad del grano, la carga del molino y el tiempo sobre la cinética del proceso en términos del grado de perlado y el contenido de lípidos y proteína de las dos fracciones obtenidas: fracción amilácea (FA, 70%) y fracción lípido-proteica (FLP, 28%). Se desarrolló un método para determinar el grado de perlado (basado en el análisis de imágenes) y se analizó la composición de las fracciones de molienda mediante espectroscopía FT-IR. Estos resultados se correlacionaron satisfactoriamente con los métodos tradicionales: índice de perlado por gravimetría y análisis químico para determinar la composición.

Se encontró que los factores más influyentes fueron el tiempo y la carga del molino, y en menor medida la humedad. Utilizando el método de superficies de respuesta (MSR) se determinaron las condiciones apropiadas de perlado, las cuales requieren un contenido de humedad del grano de 10% b.s, 100 gramos de carga y 90 minutos de operación. En estas condiciones se obtuvieron las fracciones enriquecidas FA (88% almidón, 1,5% lípidos, 5% proteína) y FLP (47% proteína, 23% lípidos, 25% almidón).

- 2) Se estudió la **molienda seca de la fracción amilácea del grano de amaranto** (FA) en el molino planetario de bolas (MPB) determinándose, mediante el método MSR, el efecto de la velocidad de rotación y el tiempo de operación en la distribución de tamaño de partícula (DTP) de la harina obtenida. La energía específica de molienda se ajustó satisfactoriamente con un polinomio de

segundo grado en función de las variables operativas (velocidad y tiempo). Se estimaron los parámetros característicos de las DTP, las cuales se obtuvieron mediante difracción láser, usando la ecuación de Rosin Rammler Bennet que tiene en cuenta el sesgo característico de las distribuciones.

Se encontró que a) la cinética de la molienda seca puede simularse satisfactoriamente utilizando la ecuación generalizada que vincula la energía de molienda con el tamaño de partícula, siendo la mediana un parámetro adecuado y representativo de la distribución de tamaño. El apartamiento del modelo clásico de Rittinger señala la creciente importancia de la disipación térmica por debajo de 150 micrones; b) las propiedades de las harinas obtenidas a partir de la fracción amilácea (FA) fueron dependientes del nivel de energía de molienda en el MPB. Al incrementar el nivel de energía desde 0 a 6,5 kJ/g, se observó un drástico descenso en los valores de la entalpía de gelatinización (desde 8 a 0,3 J/g). También se apreció mediante difracción de RX una pérdida máxima de cristalinidad (73%), compatible con resultados de FT-IR (relación de intensidades de la banda 1014/1039) y un significativo aumento del índice de absorción de agua (hasta 2,3 veces el valor del control) y de la solubilidad (hasta 3,2 veces el valor del control). Las suspensiones de harina mostraron carácter pseudoplástico, la capacidad de retrogradación se redujo al incrementar la intensidad de la molienda obteniéndose dispersiones estables y aptas para el desarrollo de alimentos semilíquidos.

- 3) Se identificaron los **picos FT-IR característicos** de los principales componentes del grano de amaranto y de las diferentes fracciones obtenidas mediante la molienda. Mediante la relación de intensidad entre los picos característicos y el pico 996 cm^{-1} correspondiente al enlace glicosídico C–O–C del almidón, algunas características pudieron ser explicadas tales como: el incremento en el contenido de proteína y lípidos en la fracción FLP; descenso en el grado de cristalinidad en las muestra debido a la amorfización ocurrida durante el proceso de molienda; así como, el descenso en la intensidad en los enlaces C-H correspondientes a los lípidos, cuando las muestras fueron intensamente molidas y/o envejecidas.
- 4) Se estudió la **molienda húmeda asistida en molino planetario de bolas** para la obtención de almidón de amaranto a partir de la fracción amilácea (FA) en

relación con la molienda húmeda tradicional en medio alcalino que involucra etapas sucesivas de maceración y molienda húmeda. En base al diseño experimental de Box- Behnken y al método de las superficies de respuesta se determinó el efecto de la energía de molienda y concentraciones de álcali (NaOH) y tensioactivo (SDS) sobre la recuperación y la pureza del almidón.

Se encontró como resultado de la molienda húmeda asistida en MPB, una mejora en relación al control de hasta 17,5% en la recuperación de almidón y una reducción promedio del 59% del contenido proteico en el almidón. Cabe señalar además la eficacia de la maceración y molienda simultánea que posibilita este método, logrando respecto al control una significativa reducción del tiempo de proceso y de la relación agua: grano. La optimización demostró que se puede obtener almidón de alta pureza (0,25% de proteína) y buen rendimiento (54%) usando un nivel de energía de 2,5 kJ/g y concentraciones mínimas de álcali (0,1% p/v) y SDS (0,3% p/v). El almidón obtenido mantuvo el carácter nativo (gelatinización menor al 6%) y presentó un patrón tipo “A” en el difractograma de RX. Además mostró valores de cristalinidad y temperaturas de gelatinización similares a los del control. La microscopia SEM confirmó que los gránulos de almidón conservaron la forma (poliédrica) y el tamaño promedio (1 μ m).

- 5) Se investigó la **capacidad de las fracciones de molienda (almidón nativo y FA modificados en el MPB) para encapsular β -caroteno** (antioxidante modelo) en presencia o ausencia de gelatina agregada usando el método de liofilización. Se estudió la estabilidad durante el almacenamiento (45 días) a temperatura (5, 25, 45°C) y humedad relativa (11 -84%) controladas determinándose el contenido superficial y encapsulado del antioxidante por espectrofotometría UV/VIS.

Se encontró un efecto significativo de la proteína de amaranto en la retención de β -caroteno obteniéndose la mejor retención (50%; 2,8mg/g_{almidón}) con la fracción FA (5% de proteína). La energía de activación para la degradación del β -caroteno superficial duplicó el valor correspondiente para el encapsulado demostrándose la mayor estabilidad de este último frente a los cambios de temperatura. Tanto el contenido de β -caroteno superficial como el encapsulado fueron afectados de la misma manera y en forma significativa por la humedad

relativa de almacenamiento, aunque el contenido de β -caroteno encapsulado siempre resultó mayor al superficial, debido a la capacidad protectora de la matriz. Para ambas matrices, se observó una zona de mayor degradación comprendida entre 33% y 75% de HR (con un mínimo a 52%), mientras que las muestras almacenadas a humedades relativas superiores conservaron mayor cantidad de β -caroteno. El hecho de no haber encontrado diferencias entre las dos matrices analizadas puede deberse a que tanto el mecanismo de encapsulación como el de protección sea el mismo para ambos sistemas. La única diferencia entre ellos reside en el tipo de proteínas que tienen (las propias del grano de amaranto o la gelatina), y evidentemente esto no afectó a la estabilidad del β -caroteno expuesto a diferentes humedades relativas durante el almacenamiento.

- 6) Se realizó la **caracterización de las matrices utilizadas como agentes encapsulantes**. Las isotermas de sorción de agua para las muestras FA/BM y AN-Ge/BM mostraron la típica forma sigmoidea (isoterma tipo II), característica de polímeros derivado de almidones, ajustándose satisfactoriamente mediante el modelo de GAB. La temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras, disminuyó con el aumento de la humedad relativa debido al efecto plastificante del agua, lo cual ocasionó un aumento de movilidad en las mismas. Es importante destacar que en el rango de 11 a 84% las muestras estuvieron almacenadas (a 25°C) por encima de su valor de T_g . Por lo tanto, los cambios observados en las muestras almacenadas no pueden atribuirse a un cambio drástico en la movilidad del sistema producido por una transición de estado (de vítreo a gomoso). A partir de las conclusiones obtenidas en los puntos 5 y 6, se concluye que la matriz FA/BM posee una elevada potencialidad como agente encapsulante de compuestos hidrofóbicos desde el punto de vista tecnológico debido a las excelentes propiedades fisicoquímicas de la matriz amilácea (elevada T_g , adecuada superficie de sorción), explotando además a las proteínas propias del amaranto, evitando de esa forma la adición extra de un emulsificante.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis señalan la ventaja de combinar la molienda abrasiva con la molienda por vía seca o húmeda de alto impacto para facilitar la obtención de fracciones enriquecidas, harinas modificadas y almidón de amaranto.

Las limitaciones del molino arrocero para realizar el perlado del amaranto indican la necesidad de desarrollar un molino abrasivo específico para el grano de amaranto. Por otra parte la evaluación de los modelos clásicos de molienda para la simulación del proceso de disgregación del grano perlado señala un límite a 150 micrones a partir del cual se incrementa significativamente el porcentaje de energía disipada y la ineficiencia de la molienda. Sin embargo al traspasar este límite se favorece la activación del polvo posibilitando nuevas aplicaciones. La probada capacidad encapsulante de matrices a base de fracciones de molienda propicia el desarrollo futuro de la molienda de alto impacto para la obtención de almidones modificados termo-mecánicamente, o bien para el diseño de operaciones de mezcla y/o encapsulación de componentes activos “in situ” utilizando el molino planetario.

6. BIBLIOGRAFÍA

A

- AACC 76–11. (1995). Starch content method. Approved methods of the AACC (9th ed.). St Paul: American Association of Cereal Chemistry.
- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. (2012). Sesame protein isolate: fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46, 360-369.
- Abragam, A. (1961). Oxford University Press.
- AOAC 923.03. (2005). Ash of flour. Official methods of analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD.
- AOAC 925.09. (2000). Solids (total) and moisture in flour. Official methods of analysis, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD.
- AOAC 925.12. (2005). Acid hydrolysis method. Official methods of analysis, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD.
- AOAC 960.52. (2005). Microchemical determination of nitrogen. Official methods of analysis, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD.
- Aguilar, J. A. (1978). Monografía de la planta de la alegría. Memoria del grupo de Estudios Ambientales, A. C. 157-203 pp.
- Alejandre, I. G. y L. F. Gómez. (1986). Cultivo del amaranto en México. U. A. CH. Ed. Futura Texcoco, México. 27-56 pp.
- Amaranth future food. (2000). Community Research and Development Information service. Denmark.
- Añon, M.C. y Jovanovich, G. (2000). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Eds. Bartholomai, W. and Pilosof, A.M.R. EUDEBA, Argentina, 97-126.

Association of Official Analytical Chemists. (2000). AOAC 925.09. Solids (total) and moisture in flour. Official methods of analysis, 17th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.

Arvanitoyannis y Van Houwelingen-Koukaliaroglou. (2005). Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical reviews in food science and nutrition*. 45(5):385-404.

Autio Karin y Eliasson Ann-Charlotte. (2009). Starch Chemistry and Technology. A volume in Food Science and Technology. 579–587.

Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M. C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*. 19(5), 889–898.

B

Balabán M. O. (2008). Quantifying nonhomogeneous colors in agricultural materials part I: Method development. *Journal of Food Science* 73(9): 431-437.

Barbosa-Cánovas, G, Ortega-Rivas, E, Juliano, P, Yan, H., (2005). *Food Powders Physical Properties, processing and functionality*. Ed.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 1073–1101.

Basavarajappa, B. S., Shetty, H. S., & Prakash, H. S. (1991). Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds. *Seed Science Technology*, 19, 279–286.

Bechoff Aurelie. (2010). Investigating carotenoid loss after drying and storage of orange-fleshed sweet potato. PhD Thesis. University of Greenwich.

Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Betschart, A. A. (1981). A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science*, 46, 1175-1180.

Bejarano-Luján DL, Lopes da Cunha R, Flavia Maria Netto FM. (2010). Structural and rheological properties of amaranth protein concentrate gels obtained by different processes *Food Hydrocolloids* 24, 602-610

- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). Carbohydrates. In M. M. Burghageen, D. Hadziyev, P. Hessel, S. Jordan, & C. Sprinz (Eds.), *Food chemistry* (pp. 302–304). Berlin: Springer, Translators from the fourth German edition.
- Bell, L. N., & Hageman, M. J. (1994). Differentiating between the effects of water activity and glass transition dependent mobility on a soil state chemical reaction: aspartame degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2398, 2401.
- Bello-Pérez, L. A., Garcia-Suarez, F. J., Montealvo, G. M., Nascimento, J. R. O., Lajolo, F. M., & Cordenunsi, B. R. (2006). Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: a novel starch for application in food industry. *Starch*, 58, 283-291.
- Bello-Perez, L. A., Paredes-Lopez, O., Roger, P., & Colonna, P. (1996). Molecular characterization of some amylopectins. *Cereal Chemistry*, 73, 12–17.
- Bello-Pérez, L. A., and O. Paredes-López. (2009). Starches of some food crops, changes during processing and their nutraceutical potential. *Food Eng. Rev.* 1: 50-65.
- Bello-Pérez, L. A., M. M. Sánchez-Rivera, C. Núñez-Santiago, S. L. Rodríguez-Ambriz, and A. D. Román-Gutiérrez. (2010). Effect of the pearled in the isolation and the morphological, physicochemical and rheological characteristics of barley starch. *Carbohydrate Polymers* 81: 63-69.
- Bernazzani, P., Peyyavula, V. K., Agarwal, S., & Tatikonda, R. K. (2008). Evaluation of the phase composition of amylose by FTIR and isothermal immersion heats. *Polymer*, 49, 4150, 4158
- Bertolini, A.C., Siani, A.C. & Grosso, C.R.F. (2001). Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 780–785.
- Bhattacharya, S., & Bhattacharya, S. (1994). Flow behavior of cooked maize flour suspensions and applicability of mathematical models. *Journal of Food Process Engineering*. 17,263–278.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, S. (1996) Rheology of cooked debranned maize flour suspensions. *Journal of Food Engineering* 27:97–105.

- Biliaderis, C. G., Page C. M., Maurice, T. J., y Juliano, B. O. (1986). Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34(1): 6-14.
- Bodroza-Solarov, M., Filiocev, B., Kevresan, Z., Mandic, A., Simurina, O. (2008) Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *Journal of Food Process Engineering* 31:602-618.
- Boutboul, A., Giampaoli, G., Feigenbaum, A & Duvruet, V. (2002). Use of inverse gas chromatography with humidity control of the carrier gas to characterize aroma-starch interactions. *Food Chemistry*, 71, 387–392.
- Breene, w. m. (1991). Food uses of grain amaranth. *Cereal Foods World*, 36, 426–430.
- Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Food Review International*, 5, 13–38.
- Bressani, R. (2003). Amaranth. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press., 166–173.
- Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In: Britton G, Liaaen- Jensen S and Pfander H (eds) *Carotenoids: Vol. 1B: Spectroscopy*, 13–62. Birkhäuser, Basel
- Bruckner, S. (2000). Estimation of the background in powder diffraction patterns through a robust smoothing procedure. *Journal of Applied Crystallography*, 33, 977–979.
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B. & Gremiao, M.P.D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45–55.

C

- Cai, Y., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248–1252.
- Cai, Y. Z., Corke, H. & Wu, H. X. (2004). Amaranth. In: wright, c., corke, h. and walker, c. (eds) *Encyclopedia of Grain Science*. Oxford: Elsevier

Caivano J. L. (1995). *Sistemas de color*. Serie de difusión N°12. Facultad de Arquitectura y Diseño. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires.

Calucci, L., Capocchi, A., Galleschi, L., Ghiringhelli, S., Pinzino, C., Saviozzi, F., & Zandomenighi, M. (2004). Antioxidants, free radicals, storage proteins, puroindolines, and proteolytic activities in bread wheat (*Triticum aestivum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4274–4281.

Calzetta Resio, N., Tolaba, M., & Suárez, C. (2006). Effects of steeping conditions on wet-milling attributes of amaranth. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(2), 70–76.

Calzetta Resio, N. (2007). *Wet-milling of amaranth grain (A. cruentus)*. Study of the effects of processing conditions on yield and quality of its products and properties of the starchy fraction. PhD Thesis. Buenos Aires, Argentina: Department of Industry, University of Buenos Aires.

Campanella, O., Mix, N., Hamaker, B. (2002). Consequence of starch damage on rheological properties of maize starch pastes. *Cereal Chemistry* 79:897–901

Capron, I., Robert, P., Colonna, P., Brogly, M., & Planchot, V. (2007). Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymer*, 68, 249–259.

Cardoso, F.S.N., Grosso, C.R.F. & Vitali, A. (2001). Starch microcapsules obtained by spray drying and coated using fluidized bed. *Brazilian Journal of Food Technology*, 4, 131–136.

Carpinteri, A., & Pugno, N. (2002). A fractal comminution approach to evaluate the drilling energy dissipation. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics*, 26, 499–513.

Cavazos, A. & Gonzalez, E. (2013). Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Volume 12, Issue 4, 364–380.

Champagne, E. (2004). *Rice: Chemistry and Technology*, 3ed, Ed ET. Champagne, AACC, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.

- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., & Saddler, J.N. (2007). Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 67–93.
- Chandrika, U.G., Jansz, E.R., Wickramasinghe, S.N. & Warnasuriya, N.D. (2003). Carotenoids in yellow- and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L). *Journal of Science and Food and Agriculture*, 83, 1279–1282.
- Chattopadhyaya, S., Singhal, R.S. & Kulkarni, P.R. (1998). Oxidised starch as gum arabic substitute for encapsulation of flavours. *Carbohydrate Polymers*, 37, 143–144.
- Cheetham, N., & Tao, L. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: An X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymer*, 36, 277–284.
- Chen, J., Lii, Y., & Lu, S. (2003). Physicochemical and morphological analyses on damaged rice starches. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 283–289.
- Chiang, P., & Yeh, A. (2002). Effect of soaking on wet-milling of rice. *Journal of Cereal Science*, 35, 85–94.
- Choi, H., Kim, W. and Shin, M. (2004). Properties of Korean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches. *Starch*, 56, 469–477.
- Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C., & Dornier, M. (2009). Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the arrhenius, eyring, and ball models. *Journal of agricultural and food chemistry*. (14):6285-91.
- Condes, M., Scilingo, A., Añon, M. (2008). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *Food Science and Technology* 42 (2009) 963–970.
- Coulter, L., & Lorenz, K. (1990). Quinoa composition, nutritional value, food applications. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 23, 203.
- Courtois, F., Faessel, M., & Bonazzi, C. (2010). Assessing breakage and cracks of parboiled rice kernels by image analysis techniques. *Food Control*, 21, 567–572.

Cremer, D., & Kaletunç, G. (2003). Fourier transform infrared microspectroscopy study of the chemical microstructure of corn and oat flour-based extrudates. *Carbohydrate Polymers*, 52, 53–65.

D

Desobry, S.A., Netto, F.M., Labuza, T.P., 1997. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal Food Science*. 62, 1158–1162.

Devi, F., Fibrianto, K., Torley, J., & Bhandari, B. (2009). Physical properties of cryomilled rice starch. *Journal of Cereal Science*, 49, 278–284.

Dhital, S., Shrestha, A., Gidley, M. (2010). Effect of cryo-milling on starches: Functionality and digestibility. *Food Hydrocolloids* 24:152–163.

Dhital, S., Shrestha, A., Flanagan, B., Hasjim, J., & Gidley, M. (2011). Cryo-milling of starch granules leads to differential effects on molecular size and conformation *Carbohydrate Polymers* 84:1133–1140.

Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., & Amiot, M. (2007). Thermal Degradation of Antioxidant Micronutrients in Citrus Juice: Kinetics and Newly Formed Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 4209-4216.

Doblado-Maldonado, A., Pike, O., Sweley, J., & Rose, J. (2012). Key issues and challenges in whole wheat flour milling and storage. *Journal of Cereal Science*. 56, 119–126.

Donovan, J., Manach, C., Faulks, R., & Kroon, P. (2007). Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. In: Crozier, A., Clifford, M., Ashihara, H. (eds), *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. London, Blackwell Publishing, 303–351.

E

Escher, F., Nuessli, J., & Conde-Petit, B. (2000). Interactions of flavor release. In: *Flavour Release*. Ed by D. Roberts, & A. Taylor. 230–245.

F

H. Fabian., & W. Mäntele. Infrared spectroscopy of proteins, in: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, 2002, pp. 3399–3426

Farhat, L. A., Mitchell, J. R., Blanshard, J. M. V., & Derbyshire, W. (1996). A pulsed¹ H NMR study of the hydration properties of extruded maize–sucrose mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 30, 219–227.

Farhat, I. A., Mousia, Z., & Mitchell, J. R. (2003). Structure and thermomechanical properties of extruded amylopectin–sucrose systems. *Carbohydrate Polymers*, 52(1), 29–37.

Farroni, A. (2011). Transformaciones estructurales y fisico-químicas de maíces argentinos en la producción de alimentos obtenidos por procesos de gelatinización-laminación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

Fennema, O. (1996). *Food Chemistry*. New York, Marcel Dekker: 1144.

Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. New York: John Wiley & Sons.

Fiedorowicz, M., & Para, A. (2006). Structural and molecular properties of dialdehyde starch. *Carbohydrate Polymer*, 63, 360–366.

Fiorda, F., Manoel, S., Soares, Jr., Da-Silva, F., Grosmann, M., & Souto, L. (2013). Microestructure, texture and colour of gluten-free pasta made with amaranth flour, cassava starch and cassava bagasse. *Food Science and Technology* 54:132-138.

Furmaniak, S., Terzyk, A., Golembiewski, R., Gauden, P. & Czepirski, L. (2009). Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Research International* 42(8): 1203-1214.

Frost, K., Kaminski, D., Kirwan, G., Lascaris, E., & Shanks, R. (2009). Crystallinity and structure of starch using wide angle X-ray scattering. *Carbohydrate Polymer*, 78, 543–548.

G

Gordon, M. & Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the 2nd order transitions of synthetic rubbers. Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry* 2 2: 493-500.

Golman, M., Horev, B., & Saguy, I. (1983). Decolorization of β -Carotene in Model Systems Simulating Dehydrated Foods. Mechanism and Kinetic Principles.

Goodfellow B., & Colquhoun I. (1994). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. En: *Spectroscopic Techniques for Food Analysis*. W. Reingald. New York, VCH Publishers Inc: 87-145.

Grattard, N., Salaün, F., Champion, D., Roudaut, G., & Le Meste, M. (2002). Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. *Journal of Food Science*, 67(8), 3002–3010.

Grubben, G., & Sloten, D. (1981). Genetic Resources of Amaranths. International board for plant genetic resources. FAO-ONU

H

Han, M., Chang, M., & Kim, M. (2007). Changes in physicochemical properties of rice starch processed by ultra-fine pulverization. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50, 234–238.

Hasjim, J., Enpeng, Li., Dhital, S. (2012). Milling of rice grains: The roles of starch structures in the solubility and swelling properties of rice flour. *Starch-Stärke* 64:631–645

Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 94, Issue 4, pages 601–612,

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M. & Arguelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56, 41–45.

Holmes, J. A. (1957). Contribution to the study of comminution modified form of Kicks law. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 35, 125–141.

Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45, 253–267.

Hsu, S., S. Lu., & C. Huang. (2000). Viscoelastic changes of rice starch suspensions during gelatinization. *Journal Food Sciences*. 65: 215–220.

Huang, Z., Lu, J., Li, X., & Tong, Z. (2007). Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. *Carbohydrate Polymer*, 68, 128–135.

Hukki, R. T. (1961). Proposal of Solomonic settlement between the theories of von Rittinger, Kick and Bond. *Transactions of the American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers*, 220, 403–408.

Hyman, J.R., Gaus, J., Majid, R.F. (2004). A rapid and accurate method for estimating tomato lycopene content by measuring chromaticity values of fruit puree. *Journal of American society of horticulture science* 129(5): 717-72.

I

Ibanoglu S, Ibanoglu E (1999) Rheological properties of cooked tarhana, a cereal-based soup. *Food Research International* 32:29-33

Imberty A., & Perez S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers*, 27, 1205–1221.

Imberty A., Chanzy H., Perez S., Bule'on A., & Tran V. (1988). The double helical nature of the crystalline part of A-starch. *Journal Molecular Biol.*, 201,365–378.

Irving, D. W., Betschart, A. A., & Saunders, R. M. (1981). Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science*, 46, 1170e1174.

J

- Jackson, D. S., Gomez, M. H., Waniska, R. D., & Rooney, L.W. (1990). Effects of single-screw extrusion cooking on starch as measured by aqueous high-performance size-exclusion chromatography. *Cereal Chemistry*, 67, 529–532.
- Jane, J., Shen, L., Wang, L., & Maninga, C. C. (1992). Preparation and properties of small-particle corn starch. *Cereal Chemistry*, 69, 280–283.
- Jiménez-Elizondo, N., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F.-C. (2009). Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and polyvinyl alcohol. *Carbohydrate Polymer*, 75, 592–598.
- Jiugao, Y., Ning, W., & Xiaofei, M. (2005). The effects of citric acid on the properties of thermoplastic starch plasticized by glycerol. *Starch/Staerke*, 57, 494–504.
- Jouppila K. (1999). Crystallization of amorphous carbohydrates: studies on lactose and starch. Helsinki, Finlandia. Doctor.
- Jouppila K. y Roos Y. (1997). The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization. *Carbohydrate Polymers*. 32(2): 95

K

- Kahlon T. and Smith G. (2004). Rice bran: a health-promoting ingredient. *Cereal Foods World*. 49(4), 188-190.
- Kalichevsky, M. T., & Blanshard, J. M. V. (1992). A study of effect of water on the glass transition of 1:1 mixtures of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydrate Polymers*, 19, 271–278.
- Kalichevsky, M. T., Jaroszkiewicz, E. M., Ablett, S., Blanshard, J. M. V., & Lillford, P. J. (1992). The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR. *Carbohydrate Polymers*, 18, 77–88.
- Karathanos, V.T., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K. & Andrikopoulos, N.K. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 101, 652–658.
- Katkov I. I. y Levine F. (2004). Prediction of the glass transition temperature of water solutions: comparison of different models. *Cryobiology* 49(1): 62.

Kaur L, Singh Na, Singh N (2002). Some properties of potatoes and their starches II. Morphological, thermal and rheological properties of starches. *Food Chemistry* 79:183-192

Kavesh, S., & Shultz, J. (1969). Meaning and measurement of crystallinity in polymers. *Polymer engineering and science*, 5, 331–338.

Khuri, A.I. & Cornell, J.A. (1987) *Response surfaces: designs and analyses*. New York: Marcel Dekker, Inc. Ahmed J.

Kinugasa, T., Sanagi, K., Watanabe, K., y Takeuchi, H. (2001). Effect of interaction between protein and surfactant in aqueous phase on extraction rate of protein into reverse micellar solution. In *Society of Chemical Industry, Solvent Extraction for the 21st Century: proceedings of the ISEC '99 Vol.1* (pp.89-93). London: Society of Chemical Industry

Kong, X., Kasapis, S., Bao, J., & Corke, H., (2008). Effect of gamma irradiation on the thermal and rheological properties of grain amaranth starch. *Radiation Physics and Chemistry*. 78 954–960

Kong, X.L., Bao, J.S., Corke,H., (2009) .Physical properties of *Amaranthus* starch. *Food Chemistry*. 113,371–376.

Korus, J. (2001). Microencapsulation of flavours in starch matrix by coacervation method. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 10/51, 17–23.

Krishnan, S., Bhosale, R. & Singhal, R. (2005). Microcapsulation of cardomon oleoresin: evaluations of blends of gum arabic, maltodextrin and modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*. 61, 95–102.

Kulp, K. (1973). Characteristics of small-granule starch of flour wheat. *Cereal Chemistry*. 50: 666–679.

L

Labuza T. P., Mc Nally L., Gallagher D., Hawkes J. y Hurtado F. (1972). "Stability of intermediate moisture foods. I. Lipid oxidation." *Journal of Food Science* 37(1): 154-159.

- Laos, K., Lougas, T., Mandamets, A. & Vokk, R. (2007). Encapsulation of β -carotene from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice in furcellaran beads. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 395–398.
- Lavelli, V., Zanoni, B., & Zaniboni, A. (2007). Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. *Food Chemistry* 104 1705–1711.
- Lehmann, J. W. (1996). Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World*, 41, 399–411.
- León K., Mery D., Pedreschi F. y León J. (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food Research International* 39: 1084-1091.
- Levine H. y Slade L. (1986). Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohydrate Polymers* 6: 213-244
- Lievonen, S. M. y Roos, Y. H. 2002. Water sorption of food models for studies glass transition and reaction kinetics. *Journal Food Sciences.*, 67, 1758-1766.
- Lindeboom, N. (2005). Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (*chenopodium quinoa willd.*) A Phd Thesis Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan, Saskatoon
- Liu, T. Y., Ma, Y., Yu, S. F., Shi, J., & Xue, S. (2011). The effect of ball milling treatment on structure and porosity of maize starch granule. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4), 586–593.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated b carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928–935.
- Lomauro C. J., Bakshi A. S. y Labuza T. P. (1985). "Evaluation of food moisture sorption isotherm equations part I: Fruit, vegetable and meat products." *LWT - Food Science and Technology* 18(2): 111.
- Lopez-Rubio, A., Flanagan, M., Shrestha, A., Gidley, M., & Gilbert, E. (2008). Molecular rearrangement of starch during in-vitro digestion: Towards a better understanding of enzyme resistant starch formation. *Biomacromolecules*, 9, 1951–1958.

Lorenz, k. (1981). *Amarantus hypochondriacus* characteristics of the starch and baking potential of the flour. *Starch*. 33(5), 149–153.

Loubes M.A, Calzetta A.N, Tolaba M.P, Suarez (2012) Mechanical and thermal characteristics of amaranth starch isolated by acid wet-milling procedure. *Food Science and Technology*. 46:519-524

Lumdubwong, N. & Seib, P.A. (2000). Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. *Journal of Cereal Science*. 31, 63–74.

M

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 41, 1–21

Madziva, H., Kailasapathy, K. & Phillips, M. (2005). Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *Journal of Microencapsulation*. 22, 343–351.

Malinski E, Daniel J, Zhang X, and Whistler R. (2003). Isolation of Small Starch Granules and Determination of Their Fat Mimic Characteristics, *Cereal chemistry*, Volume 80, Number 1 Pages 1-4

Manohar R.S, Manohar B.N, Rao P.H. (1998) Rheological characterization of wheat porridge (cooked dalia), a semi-liquid breakfast food. *Cereal Chemistry* 27:103-108.

Marcone, M. F. (2001). Starch properties of *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth): a threatened plant species with potential benefits for the breeding/amelioration of present amaranth cultivars. *Food Chemistry*. 71, 61-66.

Martinez-Bustos, F., Lopez-Soto, M., San Martin-Martinez, E., Zazueta-Morales, J., & Velez-Medina, J. (2007). Effects of high energy milling on some functional properties of jicama starch (*Pachyrrhizus erosus* L. Urban) and cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Engineering*, 78, 1212–1220.

Mathlouthi, M. & Rogé, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food Chemistry* 82(1): 61.

Matioli, G., & Rodriguez-Amaya, D. (2002). Lycopene encapsulated with gum arabic and maltodextrin: stability study. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, 197–203.

Mathlouthi M. y Rogé B. (2003). "Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders." *Food Chemistry* 82(1): 61.

Mendoza F., Dejmek P. y Aguilera J. M. (2006). "Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis." *Postharvest Biology and Technology* 41(3): 285-295.

Morrison, W., & Tester, R. (1994). Properties of damaged starch granules. IV. Composition of ball-milled wheat starches and of fractions obtained on hydration. *Journal of Cereal Science*, 20, 69–77.

Morrison W. R., Tester R. F., Sanpe C., E., Law R. y Gidley M. J. (1993). "Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal starches." *Cereal Chemistry* 70(4): 385-391.

Mundigler, N. (1998). Isolation and determination of starch from amaranth (*Amaranthus cruentus*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Starch*, 50, 67-69.

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering* 91, 380–386.

Myers, D., & Fox, S. (1994). Alkali wet-milling characteristics of pearled and unpearled amaranth seed. *Cereal Chemistry*. 71(1), 96-99.

N

Nakazawa, Y., & Wang, J. (2003). Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, 338, 2871–2882.

P

- Paredes-Lopez, O., Schevenin, M. L., Hernandez, D., & Carabez-Trejo, A. (1989). Amaranth starch isolation and partial characterization. *Starch/Stärke*, 41, 203–207.
- Pedreschi F., León J., Mery D. y Moyano P. (2006). "Development of a computer vision system to measure the color of potato chips." *Food Research International* 36: 1092-1098.
- Pedreschi F., León J., Mery D., Moyano P., Pedreschi R., Kaack K. y Granby K. (2007). "Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips." *Journal of Food Engineering* 79(3): 786.
- Peiretti, G. (2009). Becoming real a new crop-25 years promoting the future of amaranth. In: Proceedings of the Amaranth Symposium, 22–23 October 2009. Buenos Aires, Argentina: La Plata. Book.
- Perez, E., Bahnassey, Y.A. and Breene, W.M. (1993). A Simple Laboratory Scale Method for Isolation of Amaranth Starch, *Starch/Stärke*. 45, 211-214
- Poaquiza, D. (2008). Determinación de isoterms y calor de sorción de humedad de panela granulada producida por las organizaciones paneleras de Ingapi y Pacto.
- Porrarud, S. & Pranee, A. (2010). Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal*, 17, 1031–1042.
- Prabhasankar, P., & Rao, P. H. (2001). Effect of different milling methods on chemical composition of whole wheat flour. *European Journal of Food Research and Technology*, 213, 465–469.
- Puncha-arnon, S., & Uttapap, D. (2003). Rice starch vs. rice flour: differences in their properties when modified by heat–moisture treatment. *Carbohydrate Polymer*, 91, 85–91.
- Purlis E. y Salvadori V. O. (2009). Modelling the browning of bread during baking. *Food Research International*. 42(7):865.

R

- Ramoneda, X., Ponce-Cevallos, P., Buera, M., & Elizalde, B. (2011). Degradation of β -carotene in amorphous polymermatrices. Effect of water sorption properties and physical state. *Journal Science Food Agriculture*. 91: 2587–2593
- Radosavljevic, M., Jane, J., & Johnson, J: Isolation of amaranth starch by diluted alkaline protease treatment; *Cereal Chemycal.*, 1998, Vol 75, pp 212-216.
- Rao M.A. (1999a) Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. *Rheology of fluid and semisolid foods* 25–58
- Rao, A.V. & Honglei, S. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, 22, 1125–1131.
- Reineccius, G, & Coulter, T. (1969). Flavour retention during drying. *Journal of Dairy Science*, 52, 1219–1222.
- Reyna, T. T. 1983. Requerimientos climáticos para el cultivo del Amaranto (*Amaranthus spp.*) en México. Memoria Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. 81-85 pp.
- Rhodes, M. (2008). Introduction to particle technology (pp. 314–318). New York, USA: Wiley.
- Righetto, A., & Netto, F. (2006). Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1020–1208.
- Rivas-González, M., Méndez-Montealvo, M., Sánchez-Rivera, M., Núñez-Santiago, y L. A. Bello- Pérez. (2008). Caracterización morfológica, molecular y fisicoquímica de almidón de plátano oxidado y lintnerizado. *Agrociencia* 42: 487-497.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A Scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry*, 78, 389–398.
- Ronkart, S., Blecker, C., Fougnyes, C., Van Herck, J.C. Wouters, J. and Paquot, M. (2006). Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and

environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrate polymers*, 63 (2) 210-217.

Roudaut, G., Dacremont, C., Vallès Pàmies, B., Colas, B., y Le Meste, M. (2002). Crispness: a critical review on sensory and material science approaches. *Trends in Food Science & Technology* 13(6-7): 217-227.

S

Sablani S. S., Bruno L., Kasapis S. y Symaladevi R. M. (2009). Thermal transitions of rice: Development of a state diagram. *Journal of Food Engineering* 90(1): 110.

Samapundo S., Devlieghere F., Meulenaer B. D., Atukwase A., Lamboni Y. y Debevere J. M. (2007). Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of whole yellow dent corn. *Journal of Food Engineering* 79(1): 168-175.

Sanz-Penella J.M, Wronkowska M, Soral-Smietana M, Haros M (2013) Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT-Food Science and Technology* 50:679-685

Sanguanpong, V., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Oates, C., Chinachoti, P., & Sriroth, K. (2003). Preparation and structural properties of small-particle cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 760–768.

Saunders, R. and Becker, R. (1984). *Amaranthus: A potential food and feed resource*. In: pomeranzy. (ed.) *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. v1. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 357–396.

Savitzky, A., & Golay, M. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36, 1627–1639.

Selim, K., Tsimidou, K., Biliaderis, G. (2000). Kinetic studies of degradation of saron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*, 71: 199-206.

Sevenou, O., Hill, E., Farhat, A., & Mitchell, R. (2002). Organization of the external region of starch granules as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 79–85.

- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 6, 13-35.
- Shaikh, J., Bhosale, R. & Singhal, R. (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, 94, 105–110.
- Sheu, T.Y. & Rosenberge, M. (1995). Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate Wall systems. *Journal of Food Science*, 60, 98–103.
- Shirahama, K., Tsujii, K., y Takagi, T. (1974). Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biochemistry*, 75, 309-319.
- Shrestha, K., Ng, C., Lopez-Rubio, A., Blazek, J., Gilbert, E., & Gidley, M. (2010). Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylose maize starch. *Carbohydrate Polymer*, 80(3), 699–710.
- Shu, B., Yu, W., Zhao Y., Liu, X. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 76:664-669.
- Silva, D., Couturier, M., Berrin, J., Buleon, A., & Rouau, X. (2011). Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 103, 192–200.
- Sinija, and Mishra, H.N. (2008). Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant (soluble) green tea powder and green tea granules. *Journal of Food Engineering*, 86 (4), 494-500.
- Singh J, Singh N (2003) Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloid* 17:63–72
- Slade L. y Levine H. (1991). "Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30: 115-360.
- Spada, J. Marczak, L. Tessaro, I. & Noreña, C. (2012). Microencapsulation of β -carotene using native pinhao starch, modified pinhao starch and gelatin by freeze-drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 186–194

Sperling L. H., (1986). *Introduction to Physical Polymer Science*. New York, John Wiley & Sons.

Sperling L. H., (2005). *Introduction to Physical Polymer Science*. New York, John Wiley & Sons.

Sutter, C., Buera, M., Elizalde, B. (2006). β -Carotene encapsulation in a manitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*, 332:45–54

T

Tamaki, S., Hisamatsu, M., Teranishi, K., Adachi, T., & Yamada, T. (1998). Structural change of maize starch granules by ball-mill treatment. *Starch/Staerke*, 50, 342–348.

Tapia-Blácido D (2006) Edible films based on amaranth flour and starch. PhD thesis. Department of Food Engineering, Campinas, SP, Brazil.

Tari, A., Uday, S., Annapure, S., Singhal, S., & Pushpa R. (2003). Starch-based spherical aggregates: screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers*, 53:45–51.

Tester, R. F. (1997). Properties of damaged starch granules: Composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. *Food Hydrocolloids*, 11(3), 293–301.

Teutonico, R., & Knorr, D. (1985). Amaranth composition, properties and applications of a redis covered food crop. *Food Technology*, 52, 49-60.

Tobitsuka, K., Miura, M. & Kobayashi, S. (2006). Retention of a European pear aroma model mixture using different types of saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5069–5076.

Tosi, E., Re, E., Lucero, H., & Masciarelli, R. (2000). Amaranth (*Amaranthus* spp.) grain conditioning to obtain hyperproteic flour by differential milling. *Food Science and Technology International*, 5, 60–63.

V

Vaidya, S., Bhosale, R., & Singhal, R. (2006). Microencapsulation of cinnamon oleoresin by spray drying using different wall materials. *Technology*, 24, 983–992.

Van den Dries, I., Van Dusschoten, D., & Hemminga, M. A. (1998). Mobility in maltose–water glasses studied with ^1H NMR. *Physical Chemistry B*, 102, 10483–10489.

Van den Dries, I. J., Van Dusschoten, D., Hemminga, M. A., & Van der Linden, E. (2000). Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomer glasses. *Journal of Physical Chemistry B*, 104, 10126–10132.

Van Den Berg C. y Bruin S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. En: *Water Activity: Influence on Food Quality*. L. Rockland y G. Stewart. New York, Academic Press: 1-61.

Villareal, C., Cruz, N., Juliano, B. (1994). Rice amylose analysis by near-infrared transmittance spectroscopy. *Cereal Chemistry* 71,292–296.

Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292–302.

W

Wagner, L., & Warthesen, J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048-1052.

Wang H, Sun D.W, Zeng Q, Lu Y (1999) Flow behavior and rheological models of rice flour pastes. *Journal of Food Process Engineering* 22:191–200.

Wang, J. & Wang, L. (2000). Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and rice starches. *Starch/Stärke*, 52, 296–304.

Wayne, W., Fish, P., Perkins, V., Collins, J.K. (2002). A Quantitative Assay for Lycopene That Utilizes Reduced Volumes of Organic Solvent. *Journal of food composition and analysis* 15: 309–317.

Wegmuller, R., Zimmermann, M., Buhr, V., Windhab, E & Hurrel, F. (2006). Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A for use in food fortification. *Journal of Food Science*, 71, 181–187.

Wiesenborn, D., Orr, P., Casper, H. & Tacke, B. (1994). Potato starch behaviour as related to some physical/ chemical properties. *J. Food Sci.* 59: 644–648

Wilson, N. & Shah, N.P. (2007). Review paper: microencapsulation of vitamins. *ASEAN Food Journal*, 14, 1–14.

Wu, H. & Sarko, A. (1978). The crystal structures of A-, B-, and C-polymorphs of amylose and starch. *Starch/Stärke*, 30, 73-78.

X

Xie, X., Liu, Q., & Cui, S.W. (2006). Studies on the granular structure of resistant starches (type 4) from normal, high amylose and waxy corn starch citrates. *Food Research International*, 39, 332–341.

X.Z. Han, O.H. Campanella, N.C. Mix, B.R. Hamaker, Consequence of starch damage on rheological properties of maize starch pastes, *Cereal Chemistry*, 79 (6) (2002), pp. 897–901

Y

Yan Z., Sousa-Gallagher M. J. y Oliveira F. A. R. (2008). "Shrinkage and porosity of banana, pineapple and mango slices during air-drying." *Journal of Food Engineering* 84(3): 430.

Yadav, BK, Jindal VK. (2001) Monitoring milling quality of rice by image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 33, 19–33.

Yam K. L. y Papadakis S. E. (2004). "A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces." *Journal of Food Engineering* 61(1): 137.

Yanez, G. A., & Walker, C. E. (1986). Effect of tempering parameters on extracts and ash of proso millet flours and partial characterisation. *Cereal Chemistry*, 63, 164–167.

Yañez, J., Salazar J., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, Ramos, E. (2005). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Mundo Alimentario*, 2:24-30

Young, A.J. & Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 20–27.

Z

Zanaro, N. (2012). Características viscoelásticas de aislados proteicos de amaranto obtenidos por molienda húmeda en medio ácido. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

Zhang, Z., Zhao, S., & Xiong, S. (2010). Morphology and physicochemical properties of mechanically activated rice starch. *Carbohydrate Polymer*, 79, 341–348.

Zhang, T., & Oates, G. (1999). Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. *Food Chemistry Volume 65*, Issue 2, May 1999, Pages 157–163

Zhao, J. & Whistler, R.L. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carrier. *Food Technology*, 48,104–105.

Zhong Z. y Sun S. (2005). "Thermal characterization and phase behavior of cornstarch studied by differential scanning calorimetry." *Journal of Food Engineering* 69(4): 453-459.

Zobel, H. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Staerke*, 40, 1–7.

Zuo, J.-Y. , Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2009). The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. *Ultrasonic Sonochemistry*, 16,462–468.