

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALMIDONES
MODIFICADOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTES
ENCAPSULANTES DEL BIOINSECTICIDA *Bacillus
thuringiensis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ANA PRISCILA GARCÍA RODRÍGUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. FERNANDO MARTÍNEZ BUSTOS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALMIDONES
MODIFICADOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTES
ENCAPSULANTES DEL BIOINSECTICIDA *Bacillus
thuringiensis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ÍNGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ANA PRISCILA GARCÍA RODRÍGUEZ

DIRIGIDA POR

Dr. FERNANDO MARTÍNEZ BUSTOS

SINODALES

Dr. FERNANDO MARTÍNEZ BUSTOS
DIRECTOR

Dra. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS
SINODAL

Dra. SILVIA AMAYA YANO
SINODAL

M. en C. MARCELA GAYTÁN MARTÍNEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL.

Contenido.	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.	viii
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1 Bioinsecticidas.	3
II.1.1 Historia de los insecticidas microbiales.	3
II.1.2 Desarrollo y formulación de bioinsecticidas.	5
II.1.3 Excipientes.	6
II.1.3.1 Soportes o matrices acarreadoras.	7
II.1.3.2 Fagoestimulantes.	7
II.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> .	9
II.2.1 Características del cristal.	10
II.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	10
II.2.3 Resistencia por parte del insecto a <i>Bacillus thuringiensis</i> .	11
II.2.4 Ventajas y limitaciones del uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	12
II.2.5 Factores que afectan a los bioinsecticidas.	13
II.3 Aceite esencial de naranja.	14
II.4 Microencapsulación.	15
II.4.1 Morfología de las microcápsulas.	16
II.4.2 Métodos de microencapsulación.	17
II.4.3 Secado por aspersion.	17
II.4.4 Ventajas y desventajas del secado por aspersion.	19
II.4.5 Agentes encapsulantes convencionales.	20
II. 5 Almidón.	21
II.5.1 Generalidades del almidón.	21
II. 5.2 Estructura del almidón.	24

II.5.2.1 Amilosa.	24
II.5.2.2 Amilopectina.	25
II.5.3 Cambios estructurales del almidón por tratamientos hidrotérmicos.	26
II.5.3.1 Gelatinización.	26
II.5.3.2 Propiedades reológicas.	28
II.5.3.3 Gelación.	30
II.5.3.4 Retrogradación.	31
II.5.4 Almidón nativo.	31
II.5.4.1 Almidón de amaranto.	32
II.5.4.2 Almidón de maíz alto en amilopectina (ceroso).	33
II.5.5 Almidón modificado.	34
II.5.5.1 Tipos de modificaciones del almidón.	34
II.5.5.1.1 Reacciones de Conversión.	34
II.5.5.1.2 Reacciones de sustitución.	35
II.5.5.1.3 Reacciones de entrecruzamiento.	35
II.5.5.2 Almidón modificado por fosfatación.	36
II.5.5.3 Almidón modificado por succinatación.	37
II.5.5.4 Modificación por extrusión termoplástica.	37
II.5.6 Reducción del tamaño del gránulo de almidón.	40
II.5.6.1 Funcionamiento del molino de alta energía Spex.	41
III. HIPÓTESIS.	43
IV. OBJETIVOS.	44
IV.1 Objetivo general.	44
IV.2 Objetivos específicos.	44
V. METODOLOGÍA.	45
V.1 Materiales.	45
V.1.1 Grano de amaranto.	45
V.1.2 Almidón nativo de maíz ceroso.	45
V.1.3 Bioinsecticida.	45

V.1.4 Aceite esencial de naranja.	45
V.2 Métodos.	46
V.2.1 Extracción del almidón de amaranto.	46
V.2.2 Análisis químico proximal de los almidones nativos.	46
V.2.2.1 Humedad.	46
V.2.2.2 Cenizas.	47
V.2.2.3 Extracto etéreo.	47
V.2.2.4 Determinación del contenido de proteína cruda.	48
V.2.2.5 Contenido de amilosa.	49
V.2.3 Reducción de tamaño de partícula.	50
V.2.3.1 Pre-tratamiento.	50
V.2.3.2 Molienda en molino de alta energía Spex.	50
V.2.4 Modificaciones químicas de los almidones nativos.	51
V.2.4.1 Hidrólisis ácida.	51
V.2.4.2 Fosfatación.	51
V.2.4.3 Succinación.	52
V.2.5 Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados.	53
V.2.5.1 Cristalinidad.	53
V.2.5.2 Morfología del gránulo del almidón.	53
V.2.5.3 Perfil de viscosidad.	54
V.2.5.4 Propiedades térmicas.	54
V.2.5.5 Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción en agua (IAA).	55
V.2.5.6 Tamaño de partícula.	56
V.2.5.7 Grado de sustitución de fósforo.	56
V.2.5.8 Grado de sustitución de succinato.	58
V.2.6 Producción de microcápsulas.	59
V.2.7 Caracterización de las microcápsulas.	59
V.2.7.1 Actividad de agua.	59

V.2.7.2 Caracterización morfológica externa de las microcápsulas.	59
V.2.7.3. Recuento bacteriano del bioinsecticida <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>Kurstaki</i> HD-1.	60
V.2.7.4 Recuento bacteriano de las microcápsulas.	60
V.2.7.5 Tinción de Gram.	61
V.3 Diseño de experimentos y análisis estadístico.	61
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	62
VI.1 Rendimiento de la extracción del almidón de amaranto.	62
VI.2 Caracterización química de los almidones nativos.	62
VI.2.1 Humedad.	62
VI.2.2 Cenizas.	62
VI.2.3 Extracto etéreo.	63
VI.2.4 Proteína cruda.	64
VI.2.5 Contenido de amilosa.	64
VI.2.6 Perfil de viscosidad.	65
VI.2.7 Propiedades térmicas.	68
VI.2.8 Morfología y tamaño del gránulo de almidón.	71
VI.3 Caracterización del almidón con reducción de tamaño de partícula.	73
VI.3.1 Tamaño de partícula.	73
VI.3.2 Difracción de rayos X y cristalinidad.	74
VI.3.3 Propiedades de pasta.	77
VI.3.4 Propiedades térmicas.	80
VI.3.5 Índice de absorción en agua e índice de solubilidad de agua.	82
VI.3.6 Morfología del gránulo de almidón.	84
VI.4 Caracterización de los almidones modificados por tratamiento químico y extrusión.	86
VI.4.1 Propiedades de pasta.	86

VI.4.2 Propiedades térmicas.	91
VI.4.3 Índice de absorción en agua e índice de solubilidad de agua.	93
VI.4.4 Grado de sustitución de fósforo.	96
VI.4.5 Grado de sustitución de succinato.	98
VI.4.6 Morfología del gránulo de almidón.	99
VI.5 Caracterización de las microcápsulas.	101
VI.5.1 Actividad de agua.	101
VI.5.2 Morfología de las microcápsulas.	102
VI.5.3 Tamaño de partícula.	105
VI.5.4 Morfología macroscópica y microscópica del <i>B. thuringiensis</i> .	106
VI.5.5 Rendimiento.	109
VII. CONCLUSIONES.	113
VII. BIBLIOGRAFÍA.	115

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro		Página
1	Tipos de coberturas usadas en microencapsulación.	20
2	Características de los gránulos de almidón de diversas fuentes.	22
3	Caracterización química del grano de amaranto y de los almidones en estado nativo.	65
4	Perfil de viscosidad de los almidones nativos de maíz ceroso y amaranto determinados por RVA (Rapid Visco Analyser).	66
5	Propiedades térmicas de los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso obtenidas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	70
6	Tamaño de gránulo de los almidones nativos.	73
7	Tamaño de gránulo del almidón de amaranto.	74
8	Porcentaje de cristalinidad relativa en el almidón nativo y con tratamiento.	77
9	Perfil de viscosidad de los almidones de amaranto.	78
10	Propiedades térmicas de los almidones de amaranto antes y después del tratamiento con el molino de alta energía.	81
11	Índices de solubilidad y absorción de agua del almidón de amaranto.	83
12	Perfil de viscosidad de los almidones nativos y modificados.	88
13	Propiedades térmicas de los almidones nativos e hidrolizados.	92
14	Índices de solubilidad y absorción de agua de los almidones nativos y modificados.	94
15	Contenido de fósforo y grado de sustitución de los almidones nativos y fosfatados por extrusión termoplástica.	97
16	Contenido de succinil y grado de sustitución de los almidones succinatados.	98
17	Actividad de agua de las microcápsulas preparadas con los almidones modificados.	102

18	Diámetro medio de partícula de microcápsulas de <i>B. thuringiensis</i> preparadas con diferentes materiales de pared.	105
19	Recuento bacteriano y rendimiento de las microcápsulas.	111

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1	Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transición.	9
2	Estructura general de una microcápsula.	15
3	Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas.	16
4	Esquematación de un secador por aspersion.	18
5	Estructura de los componentes del almidón.	26
6	Perfil viscoamilográfico del almidón de maíz normal de maíz.	29
7	Representación del almidón fosfatado con TPS.	36
8	Representación del almidón modificado OSA.	37
9	Esquema de extrusor de tornillo simple y sus componentes.	38
10	Perfil de viscosidad de los almidones nativos de maíz ceroso y amaranto.	67
11	Termogramas de gelatinización de los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso.	70
12	Microfotografías de almidón de amaranto en estado nativo.	72
13	Microfotografías de almidón de maíz ceroso en estado nativo.	72
14	Patrones de difracción de rayos X, para almidones provenientes de diversas fuentes.	74
15	Patrones de difracción de rayos X del almidón de amaranto.	76
16	Perfil de viscosidad de los almidones de amaranto.	79
17	Termogramas de gelatinización de los almidones de amaranto antes y después del tratamiento con el molino de alta energía.	82
18	Microfotografías del almidón de amaranto hidrolizado.	85
19	Microfotografías del almidón de amaranto con reducción de tamaño de gránulo a 8000x.	86
20	Perfil de viscosidad de los almidones.	90
21	Termogramas de gelatinización de los almidones nativos y modificados.	93

22	Microfotografías de los almidones modificados por hidrólisis ácida (HCl 3.4 %, 50°C por 6 horas).	99
23	Microfotografías de los almidones fosfatados por extrusión termoplástica a 500x.	100
24	Microfotografías de los almidones succinatados por extrusión termoplástica a 500x.	101
25	Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de maíz ceroso a 2500 X.	103
26	Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de amaranto a 2500X.	104
27	Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de amaranto con reducción de tamaño de partícula a 2500X.	104
28	<i>B. thuringiensis</i> utilizado como material activo en la encapsulación.	107
29	Morfología macroscópica del <i>B. thuringiensis</i> contenido en las microcápsulas elaboradas con almidón.	108
30	Tinción de Gram a las 36 h con un aumento de 100x del <i>B. thuringiensis</i> contenido en las microcápsulas elaboradas con almidón.	109

RESUMEN.

El uso de microorganismos entomopatógenos como el *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos plaga es una alternativa al uso de los productos químicos que son nocivos para el medio ambiente y el ser humano. Sin embargo, la viabilidad de estos bioinsecticidas se ve afectada por algunos factores ambientales como la radiación ultravioleta y el lavado cuando son asperjados sobre las plantas infectadas. El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar almidones modificados por extrusión de amaranto, maíz ceroso y amaranto con reducción de tamaño de partícula para su aplicación como materiales de pared en la producción de microcápsulas de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *Kurstaki* HD-1 mediante secado por aspersión. Se realizó la extracción del almidón de amaranto obteniendo un rendimiento del 32.22 % y se caracterizaron los almidones en estado nativo. Después se redujo el tamaño de gránulo del almidón de amaranto con un molino de alta energía consiguiendo una disminución del 17.83 %. Posteriormente los almidones se hidrolizaron con ácido clorhídrico (50°C, 3.4 % HCl, 6 h); fueron modificados mediante extrusión termoplástica con tripolifosfato de sodio (4 g/100g de almidón) o bien mediante el método convencional con anhídrido n-octenil succínico (4 mL/100g de almidón) y posteriormente extrudidos. Se caracterizaron los almidones modificados observando un aumento en la solubilidad, cambios morfológicos, en las propiedades de pasta y térmicas de los mismos; obteniendo materiales con propiedades adecuadas como baja viscosidad, alta solubilidad y superficies activas, para ser empleados como materiales de pared. Finalmente mediante secado por aspersión se produjeron microcápsulas de *Bacillus thuringiensis* y aceite esencial de naranja como fagoestimulante con superficies libres de grietas y baja actividad de agua. Las microcápsulas obtenidas con almidón de amaranto fosfatado y con maíz ceroso succinatado son las que mostraron un mayor rendimiento del material activo mientras que las muestras con almidón de amaranto succinatado con y sin reducción de tamaño de gránulo son las que presentaron menor rendimiento. Finalmente se concluye que estos almidones modificados poseen un gran potencial como agentes encapsulantes de *Bacillus thuringiensis*.

I. INTRODUCCIÓN.

Los productos químicos han constituido el recurso principal para el control de plagas agrícolas debido a que sus efectos son más rápidos que cualquier otra forma de represión, por lo que han llegado a ser indispensables para el cuidado de la agricultura; sin embargo, diversos factores como la pérdida de eficacia, el mal uso, la aparición de nuevas plagas, la contaminación del ambiente, los peligros de intoxicación y las enfermedades provocadas al hombre, entre otros, han despertado el interés de los investigadores, agricultores y de la población en general para disminuir su uso y buscar nuevas alternativas para el control de insectos.

El control biológico es una de las opciones que se han estado utilizando desde hace varias décadas, esta actividad utiliza organismos naturales y/o modificados genéticamente o bien sus partes o productos con actividad insecticida para reducir el efecto de las plagas. El *Bacillus thuringiensis* es la principal bacteria entomopatógena que se ha usado especialmente en contra de lepidópteros. Este microorganismo se caracteriza por la producción de cristales proteicos de naturaleza proteica, los cuales son responsables de su actividad tóxica. Desafortunadamente la viabilidad y actividad del *Bacillus* se ven afectadas por factores ambientales como los rayos UV. Es por esto que su empleo se ha visto limitado debido a la falta de tecnologías alternativas que le brinden protección al microorganismo. La microencapsulación es un término que se refiere al proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son introducidas en una matriz o sistema pared con los objetivos de impedir su pérdida, para protegerlos o bien evitar su deterioro; para su posterior liberación en condiciones controladas. Actualmente existen comercialmente diversos agentes encapsulantes, sin embargo, la mayoría de estos, son de costo elevado y son importados, lo cual limita su disponibilidad. Es por ello que se hace necesaria la búsqueda de nuevos materiales con propiedades encapsulantes.

El almidón es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza aunque de manera nativa sus aplicaciones se ven limitadas debido a sus propiedades

intrínsecas; de manera que se requiere modificarlo para darle las características necesarias y obtener productos de mejor calidad.

De esta manera, en la búsqueda de respuestas e innovación en materiales encapsulantes, el objetivo del presente trabajo será, obtener y caracterizar almidones fosfatados y succinatados por extrusión termoplástica de almidón de amaranto sin y con reducción de tamaño de partícula (a manera de incrementar el área superficial) y de maíz ceroso, para producir microcápsulas de *Bacillus thuringiensis* por medio de la tecnología de secado por aspersión.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Bioinsecticidas.

Las plagas tanto urbanas como rurales son una amenaza constante para la salud y la calidad de vida humana, así como la causa de grandes pérdidas económicas en los cultivos (Dulmage y col., 1990). Hasta ahora la única forma de controlar estos insectos conocidos como plaga, se basa en la aplicación de pesticidas químicos, aunque ello trae como consecuencia problemas ecológicos; por lo tanto el uso irracional de los agroquímicos ha sido causa de contaminación ambiental, en especial a finales de la Segunda Guerra Mundial con el surgimiento de plaguicidas de origen órgano-sintético, que al desequilibrar el balance ecológico, han disminuido la biodiversidad, mientras que sus residuos tóxicos han contaminado los alimentos e inducido resistencia en los insectos plaga (Karamanlidou y col., 1991).

Una posible alternativa para solucionar este problema es el control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente y/o sus productos para reducir los efectos de insectos plaga (Galán y col., 1996). Se reporta la existencia de más de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para el control microbiano de insectos, en relación a su diversidad se señalan hongos, virus, protozoarios y bacterias, siendo las últimas las de mayor importancia. Entre las bacterias más sobresalientes se encuentran las del género *Bacillus* y se señala que *Bacillus thuringiensis* (*Bth*) es una de las bacterias entomotóxicas con mayor potencial para la producción de un bioinsecticida (Badii y col., 1996). Un bioinsecticida es considerado como el producto bacteriano o actividad bacteriana que da como resultado la muerte de un insecto (Abarca y col., 1992). Los bioinsecticidas se han propuesto como alternativa para controlar plagas de insectos en agricultura.

II.1.1 Historia de los insecticidas microbiales.

El estudio de las enfermedades de los insectos empezó en el siglo XIX aunque no en relación al control de insectos plaga sino para controlar enfermedades de espe-

cies comerciales, como el gusano de seda *Bombyx mori*. El italiano Agostino Bassi fue el primero en demostrar experimentalmente la naturaleza infecciosa de la enfermedad de los insectos, en su estudio de 1835 sobre la enfermedad de la muscardina blanca de los gusanos de seda, causada por el hongo *Beauveria bassiana*. Louis Pasteur efectuó trabajos sobre otras enfermedades del gusano de seda en 1865-1870, en Francia. La primera sugerencia del uso de patógenos de insectos como insecticidas microbiales fue realizada en 1836 por Bassi, quien propuso que los cadáveres putrefactos de insectos muertos podrían ser mezclados con agua y ser rociados en el follaje para matar insectos. Las primeras pruebas de campo de este concepto fueron conducidas en 1884 por Elie Metchnikoff, quien usó la muscardina verde, *Metarhizium anisopliae* en pruebas de campo contra larvas del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventris*, causando del 55-80% de mortalidad (Van y col., 2007).

No obstante a la gran diversidad de microorganismos, pocas bacterias destacan como causantes de enfermedades infecciosas en los insectos, entre ellas, las bacterias entomopatógenas de mayor importancia se encuentran en el orden Eubacterial, específicamente en la familia Bacillaceae y en el género *Bacillus*, dentro del cual representan un alto potencial como agentes de control microbiano *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Paenibacillus lentimorbus*, entre otros (Badii y col., 1996).

B. thuringiensis fue descubierto en 1901 por el científico japonés Shigetane Ishiwata de unos aislamientos de larvas del gusano de seda *Bombix mori* que presentaban la enfermedad del sotto y fue redescubierta en 1911, por el científico Ernst Berliner de larvas de la palomilla de la flor del mediterráneo *Anagasta kuehniella* en la provincia de Thuringia, Alemania, convirtiéndose en el primer científico que dio la descripción de esta bacteria, reportando la presencia de un cuerpo paraesporal, sin embargo, no lo relacionó con la actividad tóxica del microorganismo. En 1916, Auki y Chigasaki encontraron que la actividad de esta bacteria era debida a toxinas presentes en los cultivos esporulados aunque no en cultivos jóvenes de células vegetativas. Hannay sugirió en 1953, que el cristal

paraesporal era el agente tóxico. Años más tarde, en 1954 Angus demostró que las proteínas cristalinas, producidas por *B. thuringiensis* durante el curso de esporulación, eran responsables de la actividad insecticida (Mireles, 2006). En 1938, el laboratorio Libec de Francia produjo el Sporeine®, fue el primer producto comercial hecho a base de *B. thuringiensis* disponible para el control del gusano barrenador de la harina. Desafortunadamente, este producto se usó por un corto periodo debido a la Segunda Guerra Mundial (Rosas, 2009).

A pesar de diversas interrupciones, la investigación en este agente de biocontrol continuó dando lugar al desarrollo y la comercialización de productos. A partir de entonces, más de cien formulaciones se han colocado en el mercado mundial, representando actualmente más del 90% del comercio de los bioinsecticidas (Rosas, 2008). El continente americano es responsable de la producción del 50% de este mercado, principalmente Estados Unidos y Canadá; América Latina, por su parte, tiene una producción aproximada del 8 al 10% del total, y la mayor aplicación de ellos se dirige al control forestal y agrícola de lepidópteros; sin embargo, gracias a la continua investigación, algunos productos de *B. thuringiensis* han sido especialmente diseñados para insectos de otros órdenes (Rosas, 2009).

II.1.2 Desarrollo y formulación de bioinsecticidas.

Los bioplaguicidas pueden ser desarrollados en formulación líquida (como concentrados emulsionantes o suspensiones acuosas) o sólida (como polvos para reconstituir o polvos mojables, polvos para espolvoreo, granulados, gránulos dispersables en agua, comprimidos y pastillas).

El desarrollo de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas que garanticen la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. La etapa inicial comprende el aislamiento del microorganismo y la evaluación de su actividad biocontroladora, seguido de su caracterización y conservación para mantener sus características genéticas y fisiológicas (Vega, 2007). Posteriormente se requiere la definición de un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva del inóculo que permita una buena relación costo-rendimiento en la

producción. Se continua con los estudios de pre-formulación y formulación que buscan lograr la combinación correcta de excipientes, con el fin de garantizar la estabilidad del producto en condiciones de almacenamiento y durante su aplicación (Fernández y Juncosa, 2002). Las últimas etapas involucran la estandarización de procesos, la elaboración de fórmulas maestras de producción, la determinación de dosis y formas de aplicación, la realización de estudios de toxicidad y de impacto ambiental, la ejecución de ensayos de campo, la realización de estudios de mercado y patentamiento entre otros.

La pre-formulación y formulación son etapas fundamentales en el desarrollo de un bioplaguicida, una vez que la formulación asegura que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto estable, seguro, efectivo, fácil de aplicar y aceptable para su uso. Sin embargo, para desarrollar un producto con esas características, es indispensable realizar previamente un estudio de pre-formulación para determinar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del principio activo solo o en combinación con los auxiliares de formulación (Vega, 2007).

II.1.3 Excipientes.

Las formulaciones generalmente se encuentran integradas por dos componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora (hongos, bacterias, virus, nematodos, etc.) y los excipientes los cuales se refieren al vehículo que puede ser sólido o líquido y a los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del ingrediente activo. Los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas. Los retos en el desarrollo de los bioinsecticidas son asegurar la estabilidad biológica y física del producto durante su almacenamiento y distribución, mejorar las características físicas y químicas del producto, que el producto sea de fácil aplicación y la protección del agente activo de los factores ambientales (Cross y Polonenko, 1996).

II.1.3.1 Soportes o matrices acarreadoras.

Debido a que el principio activo del bioinsecticida debe ser acarreado por un soporte o una matriz inerte, muchos compuestos se han evaluado y utilizado para este fin. Uno de los polímeros que se ha utilizado con más éxito para el desarrollo de las formulaciones es el almidón de maíz (Rosas, 2008), ya que éste presenta versatilidad debido a las ventajas de protección y adherencia que proporciona al principio activo; el almidón de yuca también fue utilizado en una formulación de *B. thuringiensis* que fue desarrollada contra larvas de *S. exigua* mostrando buenos resultados. Otros soportes utilizados, como las partículas de maíz quebrado, la arcilla o el salvado de trigo no han arrojado resultados tan exitosos, debido a que éstos no se adhieren a las superficie de las hojas, y su uso está restringido a ciertas partes de las plantas, como por ejemplo en el cogollo del maíz o en la superficie del suelo para el control de plagas de esta área (Gillespie y col., 1994) lo que reduce sensiblemente su uso. Otro producto que ha sido utilizado como soporte de formulación es la harina de maíz (McGuire y col., 1996; Támez y col., 1996), aunque cuando sufre un proceso de nixtamalización ha demostrado una alta efectividad reteniendo la actividad tóxica de *B. thuringiensis* hasta por dos años, lo que implica una posible comercialización del producto (Támez y col., 1998).

II.1.3.2 Fagoestimulantes.

No obstante con el uso de soportes adecuados, las formulaciones han tenido que ser mejoradas debido a que el comportamiento de los insectos es un fenómeno complejo. Muchos insectos lepidópteros dejan de alimentarse después de la primera ingestión de *B. thuringiensis*, evitando así consumir una dosis letal de este patógeno (Gillespie y col., 1994). Esta conducta hace que el insecto ingiera dosis sub-letales del patógeno obteniéndose bajos porcentajes de mortalidad. Posiblemente esto es causado porque las δ -endotoxinas no estimulan los receptores que se encuentran en el aparato bucal de la larva y, por tanto, sólo son detectadas después de que el alimento ha entrado en el tracto digestivo. Se han realizado muchos esfuerzos para aumentar la efectividad en campo de los

insecticidas microbianos, las sustancias que estimulan el gusto o fagoestimulantes, son precisamente el tipo de sustancias utilizadas para este fin (Rosas, 2008).

Desde hace varias décadas se ha demostrado la utilidad de los fagoestimulantes en las formulaciones, debido a que la palatabilidad es un factor muy importante cuando el entomopatógeno tiene que ser ingerido para ser efectivo (Guillespie y col., 1994). Anteriormente, algunos extractos obtenidos de la planta de algodón mostraron potencial como fagoestimulantes en *A. grandis* (Maxwell y col., 1963). Se ha demostrado que el extracto acuoso de los granos de maíz estimulaba más eficientemente la alimentación en las larvas de *H. virescens*, que los extractos acuosos de algodón, los pétalos de sus flores o bien los pelos de maíz. Sin embargo, no sólo los extractos de plantas demostraron esta capacidad, en los años siguientes otros componentes fueron estudiados con esta finalidad, una mezcla de harina y aceite de semilla de algodón, azúcar y *Tween 80* constituyó un fagoestimulante con resultados muy exitosos (Bell y Romine, 1980), que a la fecha está comercialmente disponible con el nombre de *Coax®*; sin embargo no es útil para todos los insectos ya que en el caso de *Diatraea saccharalis*, fue el menos aceptado de tres fagoestimulantes evaluados, en este caso la caña de azúcar en polvo fue el mejor fagoestimulante seguido de la sacarosa (Rosas y col., 2003).

Existe una gran variedad de compuestos que se han utilizado como fagoestimulantes tales como: aceite vegetal (Tamez y col., 1999), aceite de maíz o azúcar pulverizado, follaje de maíz deshidratado, germen de trigo, caseína, mezclas de sales, suplementos vitamínicos, hexano y etanol (Bartelt y col., 1990). Además del *Coax®* existen algunos otros de tipo comercial como *Pheast®*, *Gusto®*, *Entice®* y *Mo-Bait®*, que han sido comparados en el comportamiento alimenticio que causan a varias especies de lepidópteros, provocando una elevada respuesta aquellos que contienen altos porcentajes de proteína en lugar de aquellos que contienen mayores cantidades de azúcares (Farrar y Ridgway, 1994), aunque esta respuesta puede variar de un insecto a otro.

Recientemente se determinó que el glutamato monosódico, que es un potenciador de sabor utilizado en la industria alimenticia, causa efectos fagoestimulantes en *C.*

rosaceana que es una plaga importante de las manzanas. El glutamato monosódico incrementó el potencial tóxico de formulaciones comerciales; aunque requiere un estudio extenso para ser aplicado en campo, es un producto que resulta muy económico y que puede añadirse a diversas formulaciones (Rosas, 2008).

II.2 *Bacillus thuringiensis*.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es un bacilo (células vegetativas en forma de bastoncillos) gram-positivo, aerobio estricto, flagelado y esporulado que está morfológicamente relacionado con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* pero el *Bt* se diferencia por la formación de un cuerpo paraesporal o cristal de proteína (Figura 1) que está constituido por proteínas denominadas como delta-endotoxinas también conocidas como Cry o Cyt, estos cristales se forman durante la esporulación y tienen propiedades insecticidas (Soberón y Bravo, 2007); el cristal es liberado al medio ambiente cuando se degrada la pared celular (autólisis) al final de la esporulación (Mireles, 2006). A *Bt* se le considera ubicua, pues se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. (Soberón y Bravo, 2007).

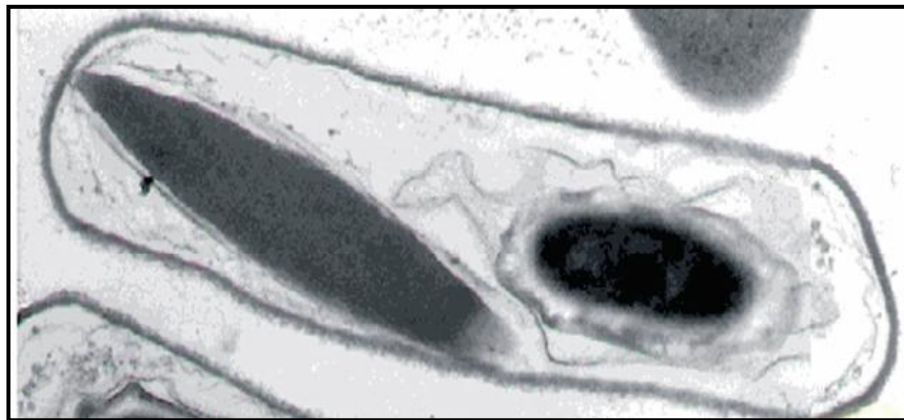


Figura 1. Micrografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transición. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso (Soberón y Bravo, 2007).

II.2.1 Características del cristal.

Las inclusiones paraesporales de *Bt* sintetizadas durante el proceso de esporulación, presentan más de 20 formas diferentes tales como: bipiramidales, cuboides, irregulares, rectangulares, esféricos romboides, cuadrados triangulares, cuyos tamaños varían desde los 350 nm de diámetro en algunos cristales irregulares a los 2 μ m de longitud en muchos bipiramidales. Cada inclusión cristalina está constituida por proteínas de una o varias clases (δ - endotoxina o proteínas cry) que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (Mireles, 2006).

Existe una forma de clasificación de los cristales en base a su espectro de actividad insecticida, en donde los cristales tipo Cry I son tóxicos para lepidópteros (destacando por su interés agronómico especies de Cossidae, Gelechiidae, Lymantriidae, Noctuidae, Pieridae, Pyralidae, Thaumetopoetidae, Tortricidae e Yponomeutidae), los Cry II para lepidópteros y dípteros (especies de Tephritidae, Culicidae, Muscidae, Simuliidae y Tipulidae), los tipo Cry III para coleópteros (especies de Chrysomelidae, Curculionidae, Tenebrionidae y Scarabeidae), los Cry IV para dípteros y los Cry V para lepidópteros, nemátodos y coleópteros, recientemente nuevas proteínas han sido aisladas contra nemátodos, trematodos, ácaros, colémbolos y protozoarios (Orietta y Larrea, 2002).

II.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general se acepta que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana (Soberón y Bravo, 2007).

Una vez ingeridos los cristales por las larvas, estos pasan intactos a través del primer tramo del tubo digestivo. El pH alcalino del intestino medio del insecto, así como las características y la composición del cristal, hacen que este sea solubilizado liberando péptidos sin actividad insecticida denominados “protoxinas”.

Simultáneamente, las protoxinas, son activadas por la acción de las proteasas intestinales, serían proteasas principalmente. En el caso de las proteínas Cry1 (peso molecular de 130 kDa), el fragmento resultante de la activación produce una proteína de alrededor de 60 kDa. Posteriormente, las toxinas Cry se unen a la membrana de las células del intestino a través de receptores o sitios de unión específicos en dos pasos. El primero, de carácter reversible, consiste en la interacción entre la toxina y el receptor y el segundo paso, de carácter irreversible, da lugar al complejo toxina-receptor. Una vez unida la proteína Cry al receptor, se desarrollan una serie de cambios conformacionales en la proteína que provocan que el dominio I interactúe y se inserte en la membrana apical (Mireles, 2006). El poro o apertura de las membranas por la acción de las proteínas Cry que conduce a una variación en su permeabilidad, permite una entrada de agua al interior de las células debido a su elevada concentración de solutos no difusibles. El canal iónico formado permite el libre flujo de iones (principalmente K⁺) y líquidos provocando la hinchazón de la membrana, lisis celular y la muerte del insecto (Orietta y Larrea, 2002). El insecto hospedero detiene su ingesta de alimento y muere en un plazo de 2 a 6 días (Niedmann y Meza, 2006).

II.2.3 Resistencia por parte del insecto a *Bacillus thuringiensis*.

La habilidad de los insectos para sobreponerse y adaptarse al estrés ambiental hace que los métodos de control se vuelvan ineficientes, como sucede con el uso excesivo de algunos plaguicidas. Hasta el momento aparecen pocos informes de resistencia a *B. thuringiensis*. Dos ejemplos son *Plutella xylostella* en repollo en Asia y *Plodia interpunctella*, plaga de productos almacenados. En el laboratorio se ha demostrado la posibilidad de que el insecto desarrolle resistencia al uso continuado de *B.thuringiensis*. Es importante señalar que los resultados de laboratorio no pueden extrapolarse a las condiciones de campo, porque las condiciones ambientales y la presión de selección natural juegan un papel importante (Orietta y Larrea, 2002).

Cualquier alteración provocada en cualquiera de los pasos involucrados en el modo de acción de *B. thuringiensis* es capaz de provocar el desarrollo de resistencia. Bioquímicamente se han identificado tres mecanismos de resistencia: 1) alteración en el sitio de unión de la toxina a la membrana o metabolismo de las toxinas, 2) modificación de la actividad proteolítica en el intestino del insecto e 3) incremento en la velocidad de reparación de tejido epitelial dañado. Fisiológicamente, porque parece existir una disminución de sensibilidad en los receptores; y finalmente por conducta, porque disminuye la habilidad del insecto para aceptar el bioinsecticida (Mireles, 2006).

Se han desarrollado diferentes estrategias para disminuir la posible resistencia a esta bacteria. Una de las más utilizadas es el uso de programas de manejo integrado de plagas. Otra estrategia es el uso de productos a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, con diferentes tipos de δ -endotoxinas (Orietta y Larrea, 2002).

II.2.4 Ventajas y limitaciones del uso de *Bacillus thuringiensis*.

Entre las ventajas del uso de *B. thuringiensis* se encuentra: que ha mostrado una alta especificidad en el ataque hacia las larvas de insectos plaga e inocuidad para otros organismos como mamíferos, incluyendo otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (Soberón y Bravo, 2007); además, para incrementar o proteger su actividad insecticida puede mezclarse con otras sustancias; otra ventaja es que en las condiciones adecuadas puede tener una vida de anaquel prolongada en forma de producto seco y concentrado. Y cada vez se disminuyen más los costos de producción debido a los avances tecnológicos, microbiológicos y genéticos, lo que lo hace competitivo frente a los insecticidas químicos (Abarca y col., 1992).

En cuanto a las limitantes se encuentran que el estrecho rango de huésped ocasiona que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana. También, la reducida permanencia en el ambiente hace necesario un profundo conocimiento de la biología y comportamiento de la plaga que se quiere

controlar, ya que una toxina puede ser activa para los estadios larvarios, pero disminuir o incluso no ser tóxica para los adultos. Por lo tanto, los tiempos y formas de aplicación deben seleccionarse cuidadosamente. La experiencia con la aspersión de las esporas y cristales en hojas de plantas muestra una limitada viabilidad de esas esporas principalmente por la acción germicida de la luz visible y UV y otros factores ambientales como la lluvia, el viento y la competencia de otros microorganismos, entre otras (Sánchez y Peña, 2000). Otra limitante ha sido la utilización de Bt para el control de insectos barrenadores y chupadores, ya que su aplicación se ha dado tradicionalmente como producto asperjado, y el hábito alimenticio de estos insectos impiden la ingestión de la toxina Cry. Por último, existe el riesgo de desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de Bt como aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry (Soberón y Bravo, 2007).

II.2.5 Factores que afectan a los bioinsecticidas.

La distribución ecológica y el funcionamiento de las poblaciones microbianas están fuertemente influenciados por factores abióticos diversos. Las superficies aéreas de las plantas se encuentran sujetas a fluctuaciones en la temperatura, radiación solar, humedad relativa y superficial, movimiento del aire circundante (Rosas, 2008).

El movimiento del agua y del aire contribuye a la dispersión pasiva de los microorganismos (Van y col., 2007). La lluvia puede provocar la redistribución y lavado, teniendo como consecuencia que el tamaño de población de los biocontroladores pueda verse afectada en zonas donde la precipitación es relativamente alta, afectando la eficiencia del control biológico. Teniendo en cuenta que la aplicación de algunos agentes de biocontrol se ubican principalmente sobre el haz de las hojas externas, se puede asumir que la actividad biocontroladora puede verse afectada por las altas temperaturas que podrían alcanzar estas hojas. Los bioplaguicidas de aplicación foliar requieren en sus formulaciones coadyuvantes como humectantes que provean alguna protección contra la

deseccación o la presencia de aceites que promuevan la adherencia a las hojas y la colonización del agente biocontrolador sobre la capa hidrofóbica de la superficie y la reducción de la pérdida de humedad (Vega, 2007).

La radiación ultravioleta (C=100-280 nm, B=280-315 nm y A=315-400 nm) puede tener efectos biológicos y ecológicos. La radiación UV C puede causar daños a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico en los organismos; la radiación UV B puede causar daños directos en el DNA, y la radiación UV A puede causar lesiones indirectas en la molécula de DNA (Nigel y Dylan, 2003).

II.3 Aceite esencial de naranja.

Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que corresponden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que transmiten a los aceites el aroma que los caracteriza (Martínez, 2007).

Presentan una fragancia especial, son incoloros o amarillentos, se alteran fácilmente al contacto con el aire, debido al fenómeno de oxidación, con densidad menor que la del agua e índice de refracción elevado, son ópticamente activos, solubles en disolventes orgánicos. En el aceite de flores de naranjo dulce se destaca la presencia mayoritaria de α -pineno, β -pineno, linalool, sabineno, α -terpineno, mirceno, aldehído benzoico, metil antranilato, farnesol y citral (Martínez y Agostini, 2004).

Los líquidos oleosos pueden microencapsularse emulsificándolos primero uno de ellos en una disolución acuosa del agente de recubrimiento y sometidos, posteriormente, al proceso de secado por atomización. En este caso, al producirse la evaporación del agua, las gotitas de aceite son microencapsuladas por el material formador de la película. Con este procedimiento, pueden prepararse los denominados aceites sólidos, que contienen, generalmente, sustancias

aromatizantes que se utilizan en preparados farmacéuticos, o perfumes que se emplean en la industria cosmética (Lozano, 2009).

II.4 Microencapsulación.

Durante los últimos años se ha aumentado el interés por desarrollar técnicas de microencapsulación de microorganismos, encaminadas a mantener la estabilidad de la fase interna en condiciones de almacenamiento y condiciones extremas en campo. El tamaño de partícula de las microcápsulas debe encontrarse entre 0.2-5,000 μm . Se diseñan para proteger el microorganismo, controlar su liberación de manera que sea gradual en condiciones de campo o mejorar las características de almacenamiento o manipulación (Vega, 2007).

La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema de pared con el objetivo de impedir su pérdida y para protegerlos. Las aplicaciones de las técnicas de encapsulación han ido incrementándose en la industria debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad (Murúa y col., 2009).

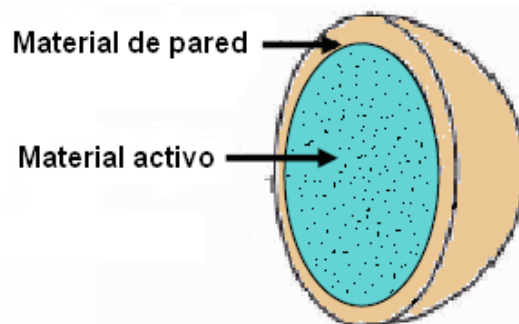


Figura 2. Estructura general de una microcápsula (Lozano, 2009).

El material que es cubierto o encapsulado, frecuentemente es líquido, aunque puede ser un gas o una partícula sólida, recibe varios nombres, tales como fase interna, material activo o relleno. El material que forma la cubierta es referido como

matriz, material de pared, acarreador, membrana o cobertura (Figura 2) y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Murúa y col., 2009).

La liberación posterior bajo condiciones controladas del material encapsulado puede llevarse a cabo por diversos mecanismos, que pueden ser: disolución normal en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o cambios en la presión osmótica (Martínez, 2007).

II.4.1 Morfología de las microcápsulas.

Las microcápsulas presentan una amplia variedad de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden presentar una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) (Shahidi y Han 1993). Generalmente se pueden clasificar en: microcápsulas de sistema reservorio o capsular y microcápsulas en sistema matricial.

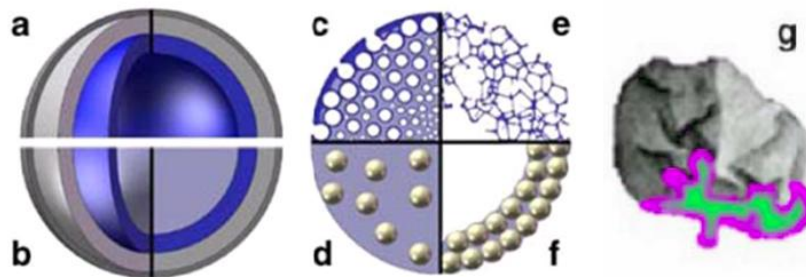


Figura 3. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas (Vehring, 2008).

a) Sistema reservorio o capsular: el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se haya envuelto por una fina película del material de recubrimiento. En la Figura 3a se puede observar el caso de una microcápsula con el interior lleno; o bien con el interior parcialmente vacío creando una microcápsula hueca (Figura 3b) (Lozano, 2009).

b) Sistema matricial: el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Se puede tener una estructura en forma de espuma en donde el material activo se encuentra repartido en toda la microcápsula y la cubierta o bien permanece intacta (Figura 3c) o bien en una estructura abierta en forma de red (Figura 3e). También se pueden encontrar microcápsulas en las que el material activo está disperso en la matriz que sirve como cubierta, tanto como esfera llena (Figura 3d) como en la periferia (Figura 3f). La forma de las microcápsulas podrá ser esférica o bien presentar una forma irregular (Figura 3g) (Lozano, 2009).

II.4.2 Métodos de microencapsulación.

Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes (Brazel, 1999). En general, estos métodos pueden ser divididos en: procesos físicos, entre los que se encuentran el secado por aspersion, la extrusión y el recubrimiento por aspersion; procesos fisicoquímicos, que incluyen la coacervación simple o compleja y el atrapamiento en liposomas; y procesos químicos como la polimerización interfacial y la inclusión molecular (Ré, 1998). La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

II.4.3 Secado por aspersion.

Es ampliamente usado en la industria debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, en particular es empleado en la deshidratación de leche. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Yáñez y col., 2006).

Consiste, en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, ya sea como disolución o como dispersión, atomizándolo en forma de finas gotas sobre una corriente de aire caliente. Cuando las pequeñas gotas del líquido se ponen en contacto con el aire a mayor temperatura, se produce una rápida evaporación del disolvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra disuelto en él (Martínez, 2007). En la Figura 4 se presenta la esquematización de un secador por aspersion de laboratorio. Un equipo de secado por atomización se compone, esencialmente, de un sistema de alimentación del líquido, un dispositivo de atomización, que por lo general consiste en una boquilla de atomización, una cámara de secado y un sistema colector del producto seco. Generalmente las partículas de sabor encapsuladas mediante secado por aspersion presentan un tamaño de partícula de 10-150 micras (Porzio, 2004).

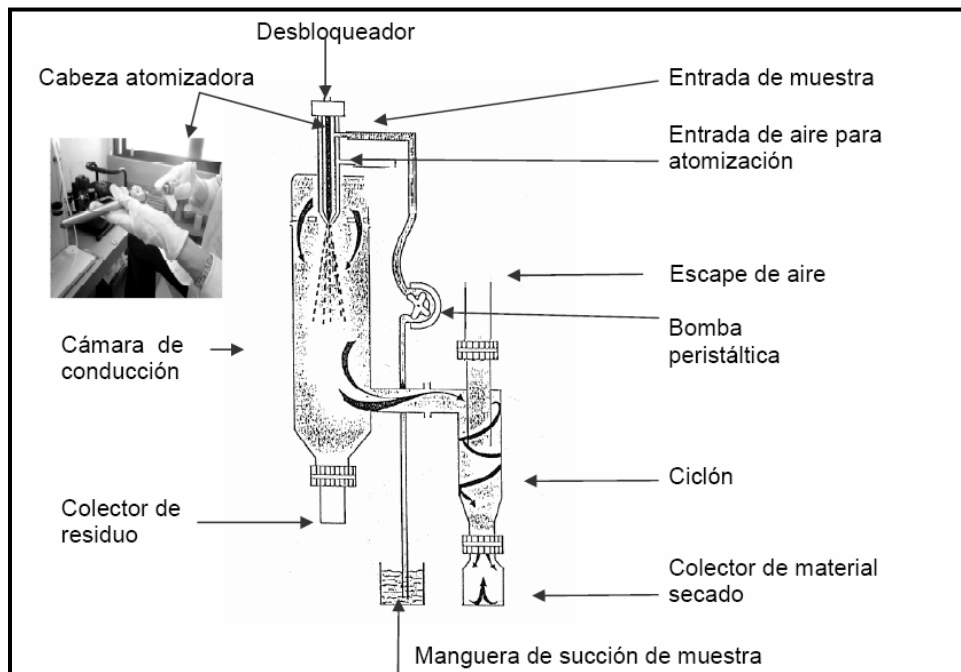


Figura 4. Esquematización de un secador por aspersion (Martínez, 2007).

Para efectuar la microencapsulación, el material de recubrimiento se disuelve en un disolvente apropiado y en esta disolución se dispersa la sustancia, sólida o líquida, que va a servir como material activo. La dispersión, en estado líquido, preparada en estas condiciones, se suele introducir en la cámara de secado con aire en

contracorriente. El aire caliente proporciona el calor de evaporación requerido para la separación del disolvente, cuando el disolvente se evapora, el material de recubrimiento envuelve las partículas del material activo (Lozano, 2009), formando una película en la superficie de las gotas retardando la difusión de la molécula de la fase interna, mientras que las moléculas de agua difunden rápidamente y migran a la superficie vaporizándose, produciéndose en esta forma la microencapsulación (Porzio, 2004). Las propiedades fisicoquímicas de los polvos obtenidos por secado por aspersión dependen de algunas variables de proceso como: las características del líquido alimentado (viscosidad, tamaño de partícula, velocidad de flujo) y del aire de secado (temperatura y presión), así como el tipo de atomizador. Por lo tanto es importante optimizar el proceso de secado, con el fin de obtener productos con mejores características (Tonon y col., 2008).

II.4.4 Ventajas y desventajas del secado por aspersión.

Las principales ventajas del secado por aspersión son: que se tiene control de los parámetros de calidad del producto así como especificaciones concretas; los alimentos sensibles al calor, los productos biológicos, y los productos farmacéuticos se pueden secar a presión atmosférica y a bajas temperaturas, en ocasiones, se emplea la atmósfera inerte; el secado por aspersión permite la producción de grandes cantidades en una operación continua y con un equipo relativamente simple; el producto entra en contacto con las superficies del equipo en condiciones anhidras, simplificando así los problemas de la corrosión y de selección de materiales costoso en la construcción del equipo; se producen partículas relativamente uniformes, esféricas y con casi la misma de proporción de compuestos que en la alimentación líquida y puesto que la temperatura de funcionamiento del gas puede extenderse de 150 a 600 °C, la eficacia es comparable a la de otros tipos de secadores directos.

Algunas de las desventajas del secado por aspersión son: falla si se requiere un producto a granel de alta densidad; en general no es flexible, es decir, una unidad diseñada para la atomización fina puede no poder producir un producto grueso, y

viceversa; para una capacidad dada, se necesita generalmente una evaporación mayor que con otros tipos de secadores y hay una alta inversión inicial comparada a otros tipos de secadores continuos (Mujumdar, 1995).

II.4.5 Agentes encapsulantes convencionales.

Los acarreadores ideales para el proceso de secado por aspersión deben tener un alto grado de solubilidad, tener baja viscosidad a altos niveles de sólidos (<300 Cp a un contenido de sólidos >35%), propiedades emulsificantes, buenas propiedades de secado, carácter no higroscópico, sabor tenue, no reactivos, y ser de bajo costo (Porzio, 2004). En el Cuadro 1 se muestra los principales tipos de coberturas usadas como agentes de microencapsulación. El tipo de material encapsulante tendrá influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las propiedades mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Ré, 1998).

Cuadro 1. Tipos de coberturas usadas en microencapsulación (Yáñez y col., 2006).

Tipo de Cobertura	Cobertura específica
Gomas	Gomas arábica, agar, alginato de sodio y carragenina.
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa y jarabes de maíz.
Celulosas	Carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etil celulosa y acetilcelulosa.
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites y grasas.
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio y silicatos.

Si el producto a encapsular debe resistir la acción de las bases de un medio acuoso, el material de la pared deberá ser hidrofóbico por naturaleza y proporcionar una buena barrera contra el agua, por lo tanto, la pared depositada tiende a seguir el contorno del núcleo y la forma final del producto capsular es afectada por la configuración del núcleo.

La resistencia de la pared puede ser controlada por varios medios, incluyendo la selección del espesor de la pared, uso de aditivos como plastificantes y postratamientos de la pared por medios químicos o físicos. La permeabilidad de la pared es una de las propiedades más importantes en varias aplicaciones de las cápsulas. La necesidad de una baja permeabilidad previene la pérdida del material nuclear o la oclusión de los materiales ambientales. En el caso donde un material nuclear es también susceptible a la acción oxidante del oxígeno o agua de vapor, los factores de permeabilidad involucran la exclusión de estos (Martínez, 2007).

El agente de microencapsulación más conocido para aplicaciones en alimentos es la goma Arábica. Es el material encapsulante tradicional usado en el proceso de secado por aspersión (Reineccius 1991). La goma Arábica es una goma que crece naturalmente en el Oriente Medio y África. Debido a que esta goma se obtiene de estas áreas, es costosa y su disponibilidad y calidad son imprevisibles. El costo y el suministro limitado de goma Arábica han conducido al desarrollo de nuevas alternativas de materiales encapsulantes utilizados en el secado por aspersión, motivo por el cual, la industria se encuentra en la búsqueda de un sustituto de esta goma que proporcione una vida de anaquel estable y que sea de bajo costo. Los productos derivados del almidón se han sugerido para tal uso (Murúa y col., 2009).

II. 5 Almidón.

II.5.1 Generalidades del almidón.

El almidón ocupa una posición única entre los carbohidratos utilizados en alimentos. Este polímero es el carbohidrato de reserva mayoritario en muchas plantas superiores y es considerado el biopolímero natural más abundante después de la celulosa (Liu, 2005). El almidón constituye una fuente de energía esencial para muchos organismos, especialmente el humano. Desde el punto de vista nutricional, el almidón es el principal componente de la dieta humana, representa una fracción importante en un gran número de productos agrícolas como los cereales (maíz, trigo, arroz) cuyo contenido de almidón está entre 30 y 80 %,

leguminosas (fríjol, chícharo, haba) de 25 a 50 % de almidón, en tubérculos (papa, yuca) en los que el almidón representa entre un 60 o 90 % de la materia seca (Hoseney, 1991).

El almidón se deposita en los órganos de las plantas en forma de gránulos relativamente densos, insolubles en agua, con un tamaño entre 1 y 100 micrómetros, una composición química y morfología que depende de la especie vegetal (Liu, 2005). La variación morfológica y composición química en los gránulos de almidón (Cuadro 2), son características que afectan las propiedades funcionales de los gránulos, así como también su susceptibilidad al ataque enzimático (Guzmán y Paredes, 1995).

Cuadro 2. Características de los gránulos de almidón de diversas fuentes (Bello y Paredes, 1999; Agustiano, 2004).

Fuente de almidón	Tamaño en μm	Forma	Amilopectina %
Amaranto	1	Poligonal	75-99
Maíz	20	Poligonal	75
Maíz ceroso	30	Poligonal	97-99
Papa	35	Ovalada	80
Tapioca	18	Truncada, redonda	89
Trigo	25	Ovalada, truncada	73
Arroz	7	Redonda, poligonal	83
Cebada	23	Redonda, elíptica	78
Triticale	19	Esférica	76-77
Plátano	10-40	Elíptica	70-75
Sorgo	35	Esférica	75
Centeno	28	Redonda o lenticular	73
Avena	7	Poliédrica	77

En términos moleculares, el gránulo de almidón es una estructura altamente organizada. Cuando los gránulos son observados bajo la luz polarizada de un microscopio, aparece una cruz típica de birrefringencia, como dos bandas interceptándose (denominada cruz de Malta), la cual indica que existe un alto grado de orden molecular dentro del gránulo (Liu, 2005).

El agua es un componente integral de la estructura del gránulo y participa en el importante proceso de hidratación que toma lugar durante la gelatinización y en el subsecuente hinchamiento y disolución del gránulo. La estructura del gránulo de almidón también depende de la forma en que los polímeros de amilosa y amilopectina se asocian a través de enlaces intermoleculares de hidrógeno (Liu, 2005).

Los gránulos están constituidos de regiones amorfas y regiones cristalinas. Las macromoléculas de almidón presentan una organización radial, en la que el hilum (origen del crecimiento del gránulo) representa la región menos ordenada (Baker y col., 2001). En el nivel más externo de organización se encuentran las cubiertas cristalina (dura) y semicristalina (suave) alternadas. Las cubiertas son delgadas hacia el exterior del gránulo y el hilum se encuentra en el centro. La presencia de enlaces α -(1-6) en la amilopectina es responsable de la formación de zonas amorfas y cristalinas alternadas. Las estructuras de dobles hélices formadas por cadenas adyacentes de amilopectina dan lugar a la capa cristalina, mientras que los puntos de ramificación constituyen las regiones amorfas. Se ha sugerido que algunas moléculas de amilosa están localizadas en las regiones amorfas interaccionando con las cadenas ramificadas de la amilopectina. Estas regiones amorfas del gránulo de almidón son susceptibles a reacciones químicas, por tanto, éstas pueden ser removidas por acción de ácidos o pueden reaccionar con grupos funcionales. Las regiones amorfas son los principales elementos estructurales de hinchamiento del gránulo nativo (Liu, 2005).

Los gránulos de almidón cuando se extraen y se secan tienen la apariencia de un polvo blanco y son insolubles en agua fría. En forma general presentan una composición química con bajos contenidos de proteína, cenizas, lípidos y el resto, lo forma el almidón propiamente dicho; estos constituyentes en muchas ocasiones juegan un papel importante en las propiedades funcionales del almidón (Agustiniano, 2004). El almidón es una de las materias primas más importantes en aplicaciones industriales. En su forma nativa granular, el almidón tiene aplicaciones limitadas. Sin embargo, usando modificaciones químicas y físicas, el almidón ha

sido aplicado a una gran variedad de productos industriales incluyendo ingredientes alimentarios, plásticos basados en almidón e industrias del papel y textil (Liu, 2005).

II. 5.2 Estructura del almidón.

El almidón está compuesto esencialmente (98-99%) de un polímero de D-glucosa, químicamente, el almidón está formado por dos polímeros de diferente estructura, una lineal llamada amilosa y otra ramificada denominada como amilopectina. La relación de los dos polisacáridos varía de acuerdo con el origen botánico del almidón y es uno de los materiales más complejos de la naturaleza (Liu, 2005).

II.5.2.1 Amilosa.

Los almidones modificados genéticamente (almidones cerosos) contienen menos del 15% de amilosa, mientras que los almidones normales están compuestos de 20-35% de amilosa y los almidones con altos contenidos de amilosa cerca de 40% (Tester y col., 2004).

La amilosa (Figura 5a) es un polímero lineal de 250 a 2000 unidades de glucosa. Es un α -glucano de cadena relativamente larga y lineal que contiene aproximadamente 99% de enlaces α -(1-4), aunque se ha reportado un bajo grado de ramificación y de cadenas de poca longitud unidas a la cadena central por enlaces α -(1-6). El tamaño de su estructura depende del origen botánico y de los métodos de extracción (Tester y col., 2004). La amilosa tiene un peso molecular de aproximadamente 10^5 - 10^6 g/mol (Mua y Jackson, 1997; Buléon y col., 1998).

Dichas ramificaciones se encuentran de manera espaciada e infrecuente, lo que permite observar que la amilosa se comporta como un polímero lineal, aunque es típicamente ilustrada como una estructura de cadena lineal por motivos de simplicidad, la amilosa es a menudo helicoidal la cual se forma con 6 unidades de glucosa por giro de la hélice. El interior de la hélice contiene los átomos de hidrógeno y debido a esto es susceptible a formar complejos con moléculas hidrófobas como yodo, ácidos grasos o hidrocarburos, en este tipo de complejos los

grupos hidrofílicos (hidroxilos) de la cadena están orientados hacia el exterior y los hidrófobos (átomos de hidrógeno) hacia el interior de la cavidad (Flores, 2004)

La abundancia de grupos hidroxilo a lo largo de las moléculas de amilosa imparte propiedades hidrofílicas al polímero, dándole mayor afinidad por el agua. Debido a su naturaleza lineal, su movilidad y la presencia de numerosos grupos hidroxilo a lo largo de las cadenas del polímero, las moléculas de amilosa tienden a orientarse de forma paralela y acercarse lo suficiente como para permitir la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes. Como resultado, la afinidad de los polímeros por el agua se reduce y la solución que forman se vuelve opaca (Liu, 2005).

II.5.2.2 Amilopectina.

El polímero de amilopectina (Figura 5b) es más grande que el de amilosa y es altamente ramificado. Su estructura consiste en residuos de D-glucopiranosos unidos por enlaces α - (1-4) (aproximadamente 95%) y 5% de enlaces α -(1-6). La amilopectina es una de las moléculas biológicas de mayor tamaño y su peso molecular se encuentra en el rango de 10^6 a 10^9 g/mol, dependiendo del origen botánico del almidón (Tester y col., 2004). El gran tamaño y la naturaleza ramificada de la amilopectina reduce su movilidad en solución y elimina la posibilidad de niveles significativos de enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes. En promedio, la amilopectina tiene un punto de ramificación no aleatorizado cada 20 o 25 residuos de glucosa (Thompson, 2000).

La amilosa posee cadenas largas, rectas, conocidas por formar películas fuertes y flexibles. La amilopectina, debido a su estructura ramificada, no forma películas fuertes, sino que se caracteriza por su claridad y estabilidad cuando forma geles y puede mostrar una tendencia levemente mayor hacia la absorción o ligación de sabores (Murúa y col., 2009). Dependiendo de la fuente la amilopectina es el principal componente en la mayoría de los almidones (entre 70-80%), alcanzando en cierto casos, niveles de hasta 98-99% en los almidones tipo cerosos. El almidón presenta numerosas propiedades funcionales que dan lugar a diversas aplicaciones

en alimentos u otras ramas industriales. El almidón es utilizado como agente espesante, de cobertura, gelificante, adhesivo y como agente encapsulante. Algunas de estas funcionalidades son únicas del polímero debido a la estructura de amilosa y amilopectina y su organización. La gelatinización, retrogradación y formación de pasta son los tres fenómenos más importantes que definen la funcionalidad del almidón en sus diferentes aplicaciones (Liu, 2005).

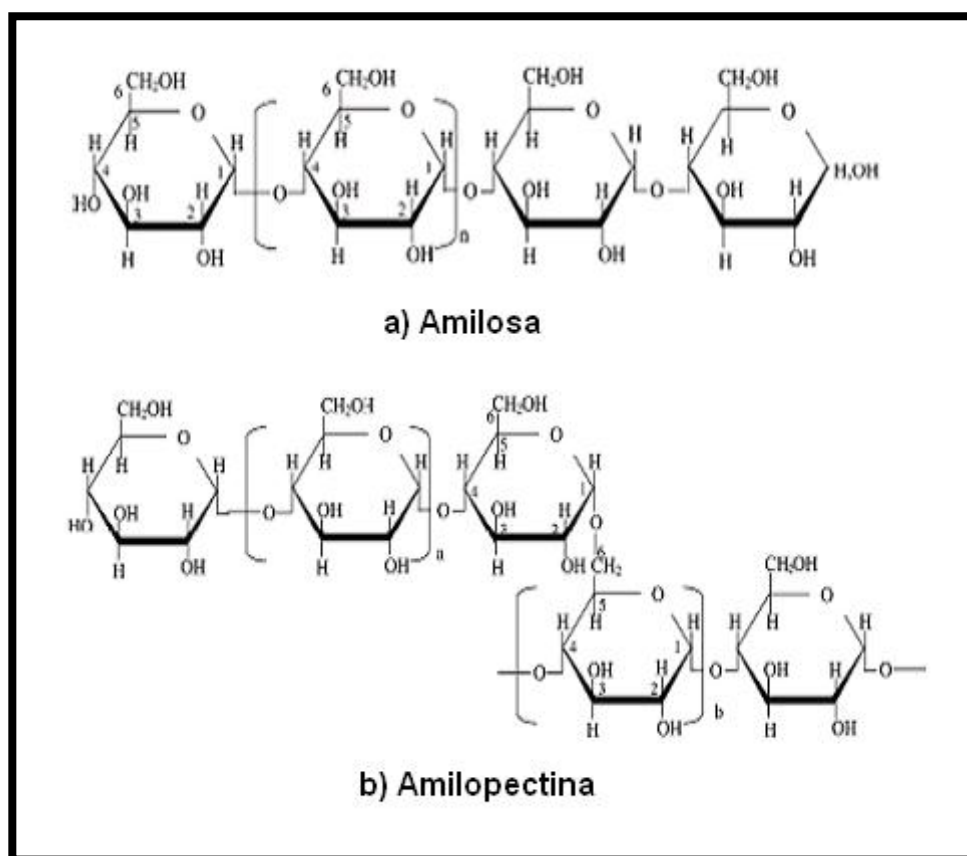


Figura 5. Estructura de los componentes del almidón: (a) estructura lineal de amilosa y (b) estructura ramificada de amilopectina (Murúa y col., 2009).

II.5.3 Cambios estructurales del almidón por tratamientos hidrotérmicos.

II.5.3.1 Gelatinización.

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, los cambios que experimenta el almidón comienzan al aplicar calor a una suspensión. La gelatinización es la

pérdida del orden molecular dentro del gránulo de almidón que conduce a cambios irreversibles tales como hinchamiento granular (de 3 a 10 veces su propio peso), fusión de cristales, pérdida de birrefringencia, incremento de viscosidad y solubilización.

Cuando los gránulos de almidón son calentados en presencia de agua, ocurre una transición de fase. El punto de gelatinización inicial y el rango en el cual ésta ocurre dependen de la concentración, método de observación, tipo de gránulo y la heterogeneidad dentro de la población granular bajo observación (Atwell y col., 1988). Cuando en el almidón se le agrega agua a temperatura ambiente, esta penetra ligeramente, pudiendo retener el gránulo cerca del 30% en su peso seco, el gránulo se hincha ligeramente y su volumen se incrementa cerca del 5%. El cambio del volumen y la absorción de agua son reversibles y el calor del sistema está por debajo de la temperatura de gelatinización por lo que no sufrirá cambios; pero al ser calentado a temperaturas más altas resultan irreversibles sus cambios (Hoseney, 1998).

La temperatura a la cual el almidón empieza a sufrir estos cambios es referida como la temperatura de gelatinización. Esta temperatura varía de acuerdo con la fuente del almidón y su tamaño de partícula. El calentamiento del almidón en agua causa una ruptura de los puentes de hidrógeno entre las cadenas del almidón por tanto debilita al gránulo (Liu, 2005).

Se cree que el hinchamiento inicial toma lugar en las regiones amorfas del gránulo donde los puentes de hidrógeno son menos numerosos y el polímero es más susceptible al ser disuelto. A medida que la estructura comienza a disolverse, el gránulo se embebe con agua y se hincha. La amilosa se difunde hacia el agua y la amilopectina queda dentro del gránulo para finalmente perder su estructura. Las estructuras moleculares de los constituyentes del almidón contribuyen al incremento de la viscosidad (Figura 6) (Biliaderis, 1991).

El incremento de la viscosidad en las primeras etapas del calentamiento se debe principalmente a la liberación de la amilosa. En las últimas etapas, el incremento

continuo de la viscosidad se debe a interacciones del material extragranular y al hinchamiento de los gránulos. La viscosidad de la pasta alcanza un nivel máximo cuando el mayor porcentaje de gránulos hinchados está presente lo cual se refiere como pico de viscosidad o viscosidad máxima, además de encontrarse algunos gránulos altamente hinchados, dañados, y fragmentados debido a la agitación continua (Martínez, 2007).

Al someter a una suspensión de almidón a un ciclo de temperatura (mayor de 90°C) y a esfuerzo mecánico constante, los gránulos se desintegran. Las moléculas de amilosa generalmente lixivian dentro de la solución y sufren un alineamiento, ocasionando un gran decremento en la viscosidad (Beta y col., 2001). Este fenómeno a menudo es conocido como viscosidad mínima, el cual está gobernado principalmente por la ruptura de los gránulos y el alineamiento de la amilosa.

II.5.3.2 Propiedades reológicas.

Se han utilizado numerosas técnicas para caracterizar las propiedades reológicas del almidón durante el proceso de calentamiento. Entre éstas se encuentra el análisis de viscosidad a través de un viscosímetro RVA (Rapid Visco Analyzer). Las propiedades reológicas del almidón están relacionadas con su microestructura y son influenciadas por diversos factores, tales como la proporción de amilosa/amilopectina, la presencia de compuestos minoritarios, la longitud de las cadenas de moléculas de amilosa y amilopectina, la concentración de almidón, esfuerzo de corte, temperatura y tratamiento hidrotérmico (Eerlingen y col., 1997).

Un típico perfil de viscosidad obtenido con un equipo Rapid Visco Analyzer se muestra en la Figura 6, en la cual también están representados los cambios estructurales de los gránulos de almidón de maíz normal.

Los gránulos de almidón son generalmente insolubles en agua a temperaturas menores a los 50°C, exhibiendo una baja viscosidad. Cuando los gránulos son calentados, éstos absorben una gran cantidad de agua y se hinchan, incrementando la viscosidad del medio. La temperatura a la cual comienza este incremento de viscosidad es conocida como temperatura de gelatinización.

A medida que la temperatura se incrementa y se mantiene por un período de tiempo, los gránulos colapsan y ocurre una subsecuente alineación de los polímeros del almidón, lo que disminuye la viscosidad aparente de la pasta (Liu, 2005). A medida que el sistema es enfriado, una re-asociación entre las moléculas de almidón, especialmente de amilosa, ocurre a diferentes grados. En suficiente concentración, esto usualmente ocasiona la formación de un gel que incrementa nuevamente la viscosidad hasta alcanzar un punto final. Esta fase de la curva de viscosidad es comúnmente conocida como región de retrogradación, en la cual, la pasta libera agua. Esta liberación de agua es llamada sinéresis y en productos con una larga vida de anaquel representa un problema grave (Liu, 2005).

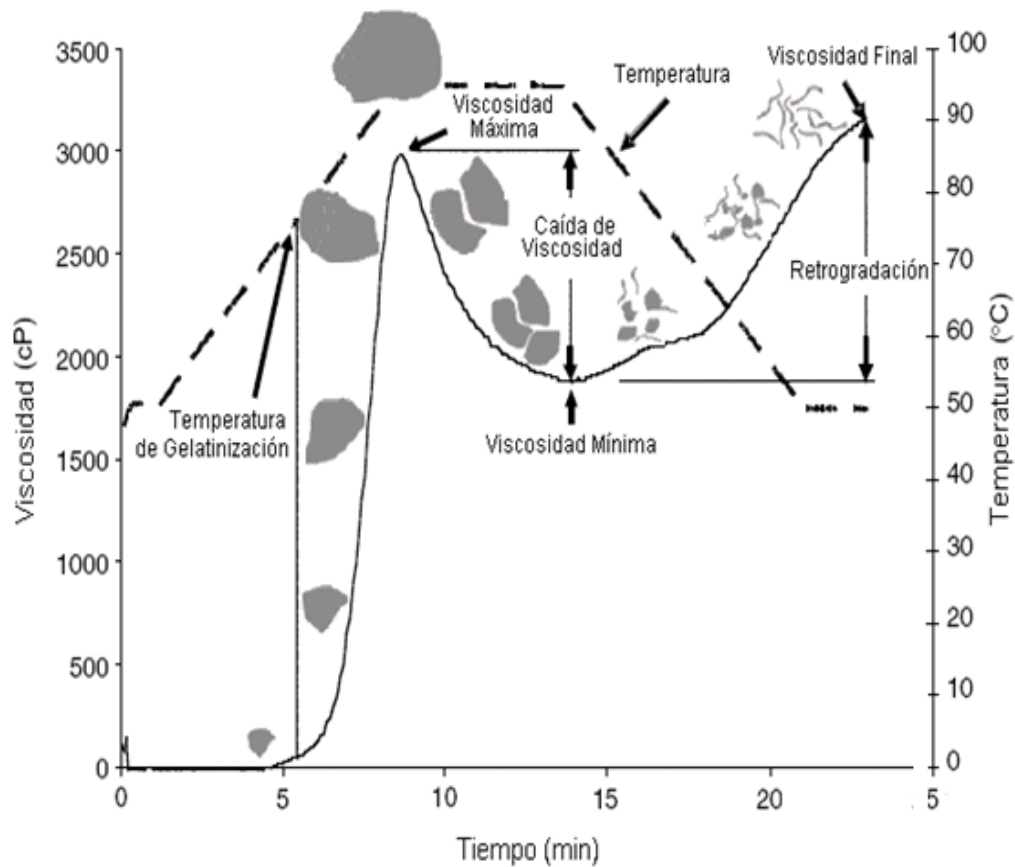


Figura 6. Perfil viscoamilográfico del almidón de maíz normal de maíz (Liu, 2005).

II.5.3.3 Gelación.

La gelación se define como el estado inmediato que sigue a la gelatinización del almidón. Cuando el almidón es calentado, el comportamiento de la suspensión de gránulos de almidón cambia a medida que la suspensión se convierte en una dispersión de gránulos hinchados, gránulos parcialmente desintegrados y gránulos molecularmente dispersos. El producto gelatinizado es llamado pasta de almidón. En general, la pasta de almidón puede describirse como un sistema de dos fases compuesto de una fase dispersa de gránulos hinchados y una fase continua de amilosa que ha sido lixiviada del gránulo (Ring 1985). Cuando ocurre la agregación de amilosa con segmentos lineales de amilopectina durante el enfriamiento, resulta la formación de un gel fuerte.

La gelación de la amilosa se lleva a cabo mucho más rápido que la de la amilopectina. La gelación de la amilosa implica una fuerte tendencia de reasociarse a través de la formación de enlaces de hidrógeno con moléculas adyacentes, formando redes por la asociación entre las cadenas de la misma. La amilosa usualmente gelifica afuera del gránulo inmediatamente después de la gelatinización. La amilopectina generalmente permanece adentro del gránulo hinchado, donde lentamente recristaliza. Los geles de almidón están en la categoría de geles compuestos, donde los gránulos hinchados ricos en amilopectina están embebidos en una red de amilosa (Biliaderis, 1991).

En diversos almidones, la textura y la viscosidad de la pasta resultante cambian cuando es enfriada. La pasta o el gel se forman en función del contenido de amilosa; en general a mayor contenido de amilosa, mayor firmeza del gel. De forma general, la amilopectina es la responsable de la absorción de agua y por lo tanto del hinchamiento del gránulo del almidón, mientras que la amilosa actúa solamente como un diluyente provocando que se produzca la retrogradación una vez que es liberada al medio acuoso y que éste sea enfriado (Martínez, 2007).

II.5.3.4 Retrogradación.

Los polímeros de almidón solubilizados y algunos fragmentos granulares insolubles al comenzar el enfriamiento tienen la tendencia de reasociarse. La retrogradación se define como el proceso que ocurre cuando las moléculas de almidón se re-asocian y forman una estructura ordenada durante el almacenamiento. En una etapa inicial, dos cadenas pueden asociarse y finalmente, bajo condiciones favorables, resultar un orden cristalino (Atwell y col., 1988).

La retrogradación del almidón está influenciada por la fuente botánica, la estructura fina de amilopectina y la proporción de amilosa/amilopectina del gránulo. En genotipos no mutantes de almidón, la amilosa es responsable de los cambios reológicos y estructurales de geles de almidón en un corto plazo (<1 día) (Goodfellow y Wilson, 1990). La molécula de amilopectina es responsable de cambios estructurales reológicos de geles de almidón a largo plazo (Murúa y col., 2009).

Como se ha visto la retrogradación consiste en dos procesos: a) gelación de las moléculas de amilosa exudadas del gránulo durante la gelatinización y b) recristalización de la amilopectina (Biliaderis, 1991).

II.5.4 Almidón nativo.

Los almidones nativos de diferentes fuentes vegetales presentan propiedades únicas, que en gran medida son utilizadas por los procesos de alimentos para necesidades específicas (Martínez, 2007). En los procesos industriales donde éste funciona como aditivo o materia prima, puede usarse en su forma nativa sin haberse sometido mediante algún tratamiento de estabilización o modificación previa. Los almidones nativos, representan para la industria un elemento abundante, económico y de fácil obtención, ya que son espesantes aceptables para alimentos preparados en una sola etapa de cocimiento y consumo. Sin embargo, los almidones nativos tradicionales han limitado su uso en el sector alimentario debido a que pierden integridad durante su procesamiento (Light, 1990). En

muchos casos, el almidón nativo podría dar un producto económico, aunque de pobre calidad.

II.5.4.1 Almidón de amaranto.

El amaranto es una planta antigua que pertenece a la familia *Amaranthaceae*, se cree que se originó en el centro y sur de América. Los miembros del género *Amaranthus* están ampliamente distribuidos en todo el mundo en las regiones tropicales, subtropicales y templadas (Gamel y col., 2006). La palabra amaranto significa "eterno" en griego, que parece adecuada para la historia de este cultivo (Bello y col., 1998).

El amaranto es una planta alta, con hojas muy grandes, que produce pequeñas semillas. Debido a la utilidad de toda la planta y su resistencia a la sequía y al clima caliente, el amaranto tiene un gran potencial económico. La producción mundial anual se ha estimado en 470×10^6 toneladas (Calzetta y Suárez, 2001). La composición de los granos de amaranto (en base seca) es de 7.6% lípidos, 15.5% proteína, 50-60% almidón, 3.2% cenizas, 0.06% taninos y 17.7% fibra dietética total (Wu y Corke, 1999). El grano es rico en aminoácidos como lisina, metionina y cisteína, ácidos grasos insaturados, escualeno, hierro, calcio, zinc, vitamina E y complejo B.

El grano de amaranto, un pseudocereal, contiene aproximadamente el 50-60% de almidón, que se localiza principalmente en el perispermo, los gránulos tienen una forma esférica o poligonal. Además del alto contenido de almidón, un interés particular en este almidón se basa en el tamaño de gránulos pequeños, de 1-3 μ m de diámetro, y el contenido de amilopectina 92-95% (Calzetta y Suárez, 2001). La extracción del almidón de las semillas de amaranto es muy difícil debido a los pequeños gránulos de almidón y al contenido de proteínas relativamente elevado de las semillas. Algunos científicos han tratado de desarrollar nuevos métodos para la extracción del almidón para mejorar el procesamiento y las cualidades del producto (Choia y col., 2004). Por lo tanto, los gránulos tienen una gran área de superficie por unidad de peso cuando se compara con la de la mayoría de otros

almidones, lo que sugiere una amplia variedad de posibles aplicaciones. El amaranto se ha clasificado como almidón ceroso por el alto contenido de amilopectina (Bello y col., 1998). Los usos potenciales para el almidón de amaranto incluyen polvos finos para cosméticos, plásticos biodegradables, en la industria del papel, como sustituto de grasa y como espesante de alimentos para las sopas, las aderezos y salsas (Choia y col., 2004).

II.5.4.2 Almidón de maíz alto en amilopectina (ceroso).

El maíz es el cereal más importante y significativo después del trigo en los mercados mundiales. El producto de mayor volumen producido en la molienda de maíz húmeda es el almidón, recuperado en forma purificada con una eficiencia de 93 a 96% con respecto al volumen de almidón contenido en el grano de maíz. El almidón del maíz industrializado es un polvo blanco fino altamente purificado, conteniendo solamente cerca de 0.25% de proteína, menos de 0.1% de minerales y 0.65% de grasa. Existen cuatro clases de almidón de maíz: el almidón del maíz normal que contiene 25% de amilosa; el del maíz ceroso que contiene casi 100% de amilopectina y dos clases correspondientes a maíces amiláceos, de alto contenido de amilosa, uno tiene 55% y el otro entre 70 y 75 %.

El almidón de maíz alto en amilopectina (ceroso), es un tipo especial de maíz derivado de una mutación ($wx = Waxy$) introducida en 1908 desde China a EE.UU., aunque después se encontraron muchas líneas dentadas Americanas. Su nombre deriva por la apariencia cerosa del endospermo en un corte longitudinal del grano. El almidón de los maíces cerosos presenta gránulos de forma irregular, similar en su tamaño a los maíces normales. Los almidones de alto contenido de amilosa también tienen forma irregular, aunque, tienden a ser más suaves y de menor tamaño (entre 5 y 15 μm), dependiendo de la variedad. El almidón de maíz se representa naturalmente como gránulos casi esféricos de 5 a 30 μm de diámetro (14 μm , en promedio). La facilidad para formar gel, la retrogradación, junto con la adhesividad, la habilidad para formar películas y la digestibilidad, combinadas con

su bajo costo, hacen al almidón de maíz un material útil para la manufactura de productos alimenticios e industriales (Inglett, 1970).

II.5.5 Almidón modificado.

Los almidones modificados; son aquellos a los que se les ha realizado algún tratamiento o proceso para desarrollar propiedades funcionales deseables, tales como solubilidad, viscosidad, textura, adhesión, dispersión y tolerancia al calor (Kim y col., 1999). El almidón modificado tiene numerosas aplicaciones funcionales en diversas áreas; confiriendo adhesión, evitando el endurecimiento, produciendo polvos, estabilizando emulsiones, encapsulando, facilitando el flujo, dando firmeza a espumas, melificando, glaseando, retirando humedad, moldeando, así como estabilizante y espesante (Light, 1990).

II.5.5.1 Tipos de modificaciones del almidón.

De acuerdo con (Light, 1990), los almidones se modifican por vía química, física o por hibridación. Las modificaciones químicas incluyen procesos como la conversión, las ligaciones cruzadas, la estabilización (sustitución) y la adición de grupos lipofílicos, los productos con esta modificación generalmente; son usados en la encapsulación o estabilización de emulsiones.

II.5.5.1.1 Reacciones de Conversión.

Los métodos más comunes de conversión en la industria de almidón incluyen hidrólisis ácida, oxidación, piroconversión y conversión enzimática (Qi y Xu, 1999). Las propiedades de almidones convertidos pueden variar dependiendo del tipo o base de almidón utilizado y el proceso de conversión, como por ejemplo el tiempo de conversión y método utilizado (ácido, oxidante, enzima, calor o la combinación de éstos) (Thomas y Atwell, 1999).

Los almidones convertidos por hidrólisis ácida o enzimática presentan diferentes características dependiendo en gran medida del grado de conversión, es decir, el grado al cual se han hidrolizado las moléculas del almidón. La conversión es

acompañada por la interrupción de la estructura cristalina de los polímeros del almidón y de su reducción a moléculas más pequeñas (Vasanthan y col., 2001).

II.5.5.1.2 Reacciones de sustitución.

Para minimizar o prevenir la retrogradación de almidón, el polímero es sustituido o estabilizado introduciendo grupos monofuncionales químicos, tales como acetilo o hidroxi-propilo a lo largo de las cadenas poliméricas, con la formación de enlaces éster o éter que impiden una reasociación de las moléculas de amilosa. La sustitución disminuye la temperatura de gelatinización y estabiliza el almidón previniendo la re-asociación de las cadenas que causan la retrogradación de los polímeros después de tratamientos hidrotérmicos. Los almidones sustituidos son particularmente útiles en alimentos refrigerados o congelados (Thomas y Atwell, 1999).

II.5.5.1.3 Reacciones de entrecruzamiento.

Probablemente el tipo de modificación química de almidón más común es el entrecruzamiento o derivatización del almidón mediante el uso de reactivos multifuncionales capaces de formar enlaces éter o éster intermoleculares entre grupos hidroxilo de las moléculas de almidón. Los enlaces covalentes formados por entrecruzamiento actúan como refuerzo de la estructura granular, controlando el hinchamiento y produciendo almidones que pueden tolerar altas temperaturas, esfuerzos de corte y condiciones ácidas. El entrecruzamiento altera la gelatinización del gránulo de almidón; se requiere de una mayor energía para separar las moléculas, por lo que se incrementa la temperatura de gelatinización. La viscosidad máxima desarrollada es mayor debido a que el almidón retiene su estructura molecular; se presenta una retrogradación muy pequeña o nula. La combinación de reacciones de sustitución y entrecruzamiento ha demostrado proveer al almidón de estabilidad contra la degradación ácida, térmica y mecánica; además, retardan la retrogradación durante el almacenamiento. Los almidones con

una doble modificación son ampliamente usados en aderezos de ensalada, alimentos enlatados, pudines y alimentos congelados (Wurzburg, 1986).

II.5.5.2 Almidón modificado por fosfatación.

Los almidones fosfatados están diseñados para superar las deficiencias mostradas por los almidones nativos y pueden llevarse a cabo a través de la esterificación de los grupos hidroxilos con agentes fosforilantes, tales como el tripolifosfato de sodio, el meta fosfato de sodio y el oxiclورو de fósforo (Kim y col., 1999; Sitohy, 2000). En la Figura 7 se muestra la representación de un almidón fosfatado con TPS. De acuerdo a la FDA, el fósforo residual en el almidón para uso alimenticio está regulado en base al agente fosfatante empleado. Para el almidón modificado por TPS el límite en el grado de sustitución (GS) está establecido en 0.04 (Kim y col., 1999).

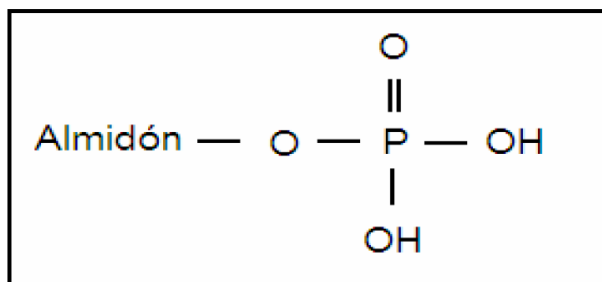


Figura 7. Representación del almidón fosfatado con TPS (Martínez, 2007).

El reactivo de tripolifosfato de sodio (TPS) es un anhídrido parcial del ácido ortofosfórico y es utilizado para formar ortofosfatos de almidón monoéster con un GS de 0.02. Puede usarse a temperaturas moderadas (100°C a 120°C) en la fosfatación del almidón. El almidón fosfatado por esterificación ha sido preparado para alcanzar niveles de fosfatación mayores del 2% por la vía de los métodos convencionales. Sin embargo, la fosfatación mediante el método de extrusión termoplástica, normalmente producen almidones fosfatados a un nivel mucho menor de fósforo que van del 0.1 al 0.4% (Kim y col., 1999).

II.5.5.3 Almidón modificado por succinatación.

Los ésteres de almidón succinatado son preparados comercialmente por la reacción básica de anhídridos de alquencil succínico con el almidón granular en suspensión acuosa. La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2, 3, y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa. El anhídrido más utilizado para esta modificación es el octenilsuccinato (OSA) (Martínez, 2007). En la Figura 8 se muestra la representación de un almidón OSA.

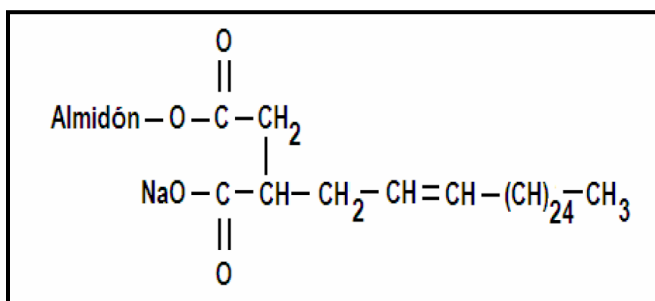


Figura 8. Representación del almidón modificado OSA (Martínez, 2007).

Los almidones OSA son efectivos emulsificadores por tener grupos bifuncionales tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (Tesh y col., 2002). A diferencia de los surfactantes típicos, los almidones alquencil succinatados forman películas fuertes en la interfase aceite/agua, proporcionando a la emulsión resistencia a la reaglomeración. Las soluciones acuosas de los almidones alquencil succinatados y en particular almidón OSA, han sido usadas para estabilizar concentrados de sabor en bebidas, aceite en aderezos, para encapsular sabores, aromas y vitaminas en formulaciones mediante secado por aspersión (Shogren y col., 2000).

II.5.5.4 Modificación por extrusión termoplástica.

La palabra extrudir describe un proceso de formado por el paso forzado de materiales suaves o plastificados a través de dados con orificios, por presión. El extrusor está constituido básicamente de un alimentador, un preacondicionador, un tornillo sin-fin, un cilindro enchaquetado, una matriz y un sistema de corte; se

comporta como intercambiador de calor debido al flujo de calor entre las paredes del cilindro, el tornillo y el material alimentado. De forma general el material acondicionado es alimentado al extrusor para ser transportado mediante un tornillo sinfín a través del cañón (Figura 9).

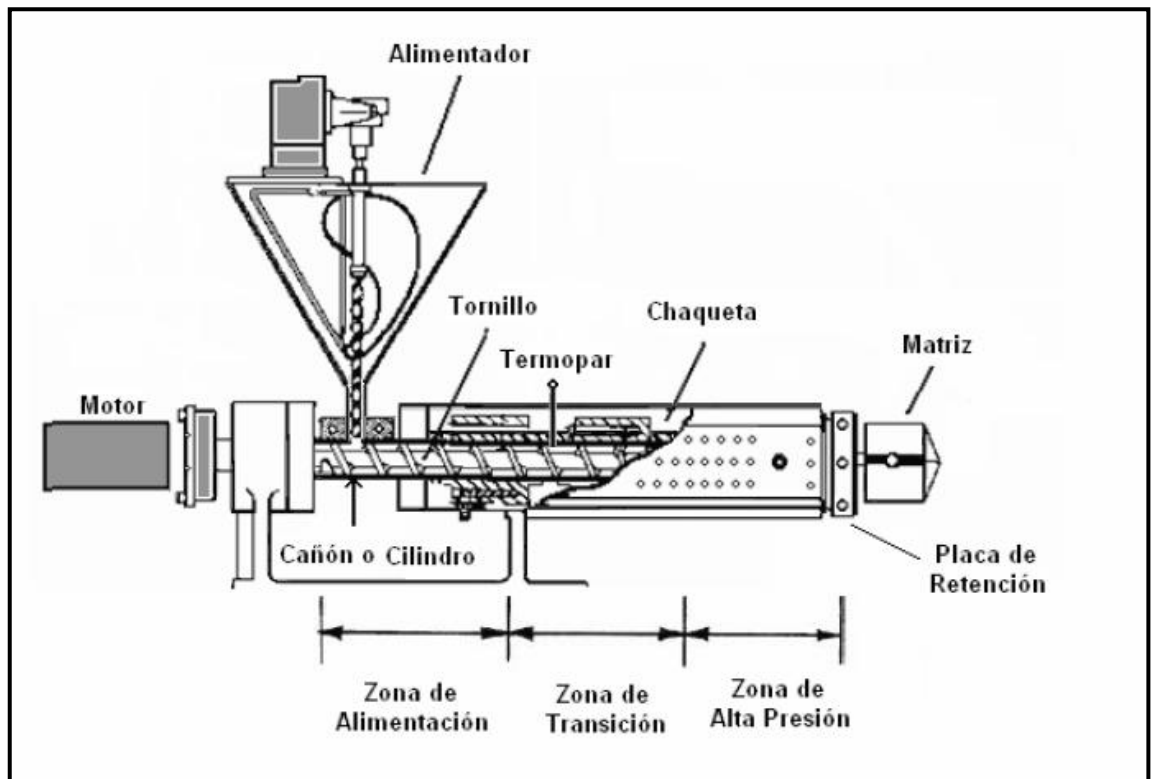


Figura 9. Esquema de extrusor de tornillo simple y sus componentes (Murúa y col., 2009).

Los mayores cambios que sufre el material, se realizan dentro del cañón del extrusor, con ayuda del tornillo sinfín. Debido al calor que se genera por la energía mecánica que produce el tornillo, la misma transferencia de calor y la presión que va ejerciendo el material a través de los giros del tornillo a una velocidad dada provoca que se susciten transformaciones para formar un material viscoso y plastificado. El alineamiento de macromoléculas que dan pauta a la formación de nuevas estructuras, desnaturalización de proteínas y gelatinización del almidón son algunos de los cambios que se presentan. La presión de vapor de agua de la masa que fluye dentro del cañón está relacionada con la temperatura a la que se

encuentra, produciendo una mayor presión antes de emerger por el dado del extrusor. Una vez en contacto con la presión ambiental sufre un cambio brusco de presión, lo que provoca que el agua contenida en el material se evapore instantáneamente, induciendo así la expansión del producto al salir por el dado del extrusor, lo que lleva a la formación de nuevas texturas (Harper, 1990).

Bajo las condiciones de extrusión, los gránulos de almidón se hidrolizan o gelatinizan, lo cual depende de una combinación de calor y atrito mecánico. Los gránulos de almidón son hidrolizados conforme pasan a través del extrusor y esta acción mecánica, expone el interior de los gránulos cristalinos. El trabajo mecánico y el flujo de los ingredientes viscosos en el extrusor requieren de la entrada de una gran cantidad de energía mecánica para mover el tornillo, la cual se pierde como calor a causa del aumento de la temperatura. Con el atrito, algunas grandes moléculas de almidón se rompen en cadenas más cortas (dextrinización) y muestran una mayor solubilidad en agua. El resultado de la gelatinización y la dextrinización es una masa plastificada o fundida que puede ser extrudida a través del dado para moldearse, y que se expande cuando las altas temperaturas y la humedad interna cambian al evaporarse el agua y esta a su vez sale por el dado (Harper, 1990).

Las aplicaciones más comunes de los extrusores son la producción de botanas expandidas, cereales instantáneos, bases para sopas y bebidas, alimentos infantiles, proteínas vegetales texturizadas y productos de confitería. Recientemente han sido usados como reactores químicos para producir almidones modificados, hidrolizar almidón con ácido o enzimas, reestructurar y mejorar productos cárnicos y tostar cacao y café (Martínez, 2007).

La tecnología de extrusión es un proceso de alta temperatura y corto tiempo que presenta grandes ventajas en relación a otros procesos de preparación de alimentos, como gran versatilidad, construcción simple, fácil operación, bajo costo de tratamiento de la muestra, producción continua y propiedades físicas uniformes, alta capacidad de producción por unidad de área, ausencia de efluentes, tiempos cortos de proceso, y como principal ventaja, la acción continua de operaciones

unitarias (mezcla, cizallamiento, cocimiento, secado y texturización), en un único, eficiente y rápido proceso (Watano y col., 2002).

II.5.6 Reducción del tamaño del gránulo de almidón.

El tamaño de gránulo es una propiedad característica del almidón. Por ejemplo el almidón de maíz tiene un diámetro promedio de 15 micras, el de trigo tiene entre dos rangos de 20-35 y de 2-10 micras, el de papa tiene un tamaño promedio de 40 micras, el de arroz es de 5 micras y el de amaranto tiene un tamaño promedio de 1-2 micras. El tamaño de partícula del almidón ha recibido mucha atención debido a su importancia en determinar el sabor y textura como sustituto de grasa (Daniel y Whistler, 1990) y las propiedades de tensión en películas de plástico biodegradable (Lim y col., 1992). Daniel y Whistler (1990) reportaron que el gránulo de almidón de 2 micras de diámetro es similar a la micela lipídica y que tiene ventajas como sustituto de grasa. Lim y col., (1992) reportaron una correlación lineal entre el espesor de las películas y el tamaño de partícula. La molienda en Molino de alta energía (la fragmentación de los gránulos de almidón) provoca una disminución en la cristalinidad, disminución en la temperatura de gelatinización y en la viscosidad, incrementa el índice de absorción de agua e índice de solubilidad en agua. Todos los almidones nativos molidos exhiben un efecto de ensanchamiento endotérmico. Las endotermas son menores que en el caso de los almidones nativos sin molienda, indicando que la molienda destruye la cristalinidad y el arreglo de doble hélice. La cristalinidad en ambos almidones disminuye y la resolución de los picos disminuye fuertemente (Flores, 2004).

El rompimiento mecánico de almidones para su fuerza de aplicación como molino de bolas ha sido mostrado como efectivo en almidón de maíz, particularmente después de un pretratamiento para debilitar la estructura granular. Uno de los pretratamientos investigados es la hidrólisis ácida (Sanguanpong y col., 2003).

Rengaswami (1998) indica que el orden de estructura tridimensional del segmento de amilopectina es responsable de la cristalinidad del gránulo de almidón, mientras que los segmentos de amilosa forman la dominante área amorfa. La pérdida de

resolución en el pico (ensanchamiento y reducción de la altitud) refleja la pérdida de cristalinidad y el incremento en el componente amorfo de la estructura (Zobel, 1988).

Sanguanpong y col., (2003) realizaron tratamientos ácido y molienda con molino de bolas a almidón de yuca presentando que todas las muestras exhiben un patrón, en donde la intensidad de pico incrementa con el tiempo de hidrólisis, y disminuye cuando incrementa el tiempo de molienda tanto para almidones nativos molidos y almidones hidrolizados molidos respectivamente. Aunque la hidrólisis ácida conduce a una alta cristalinidad subsecuentemente la molienda en molino de bolas conduce a una disminución de cristalinidad. Los gránulos de almidón contienen más defectos o puntos débiles, permitiendo una fractura o ruptura en pequeñas partículas de almidón. Concluyen estos autores que debido a la eliminación de capas de cadenas hidratadas amorfas, los gránulos son más susceptibles al daño mecánico (más quebradizos, más defectos).

Existen reportes acerca de la modificación del tamaño de gránulo en almidones de maíz (Jane y col., 1992). Los estudios previos realizados a almidones de trigo ceroso han sugerido que los gránulos de almidón ceroso pueden ser sustancialmente más susceptibles al daño mecánico que los gránulos que contienen amilosa (Bettge y col., 2000). El almidón de maíz ceroso es más susceptible al daño por molienda con molino de bolas que el almidón de maíz normal. Después de la molienda en molino de bolas el porcentaje de almidón dañado en almidón ceroso es el doble que el almidón normal, esto puede ser causado lógicamente por la composición y diferencias estructurales de estos dos almidones. La amilosa en almidón normal fue mucho menos afectada con el daño físico comparada con la amilopectina (Tester, 1997; Bettge y col., 2000).

II.5.6.1 Funcionamiento del molino de alta energía Spex.

Un molino agitador como el molino SPEX, que muele aproximadamente 10 ± 20 g de polvo en poco tiempo, son normalmente usados en los laboratorios de investigación o para propósitos de cribado-mezclado. Estos molinos son

manufacturados por SPEX CertiPrep Metuchen, NJ. El molino posee un vial o contenedor cilíndrico (de nylamid o acero inoxidable) siendo este el tipo más común, conteniendo la muestra y las bolas para molienda de un mismo diámetro o mezcla de diferentes diámetros, de diversos materiales como vidrio, zirconio, acero inoxidable, etc., asegurado con una abrazadera y girando enérgicamente con movimientos oscilatorios varias miles de veces por minuto. El movimiento agitador oscilatorio es combinado con los movimientos laterales al final del vial, o con señales infinitas de movimiento. Con cada balance del vial las bolas impactan contra la muestra y el fin del vial, moliendo y mezclando la muestra. Debido a la amplitud (aproximadamente 5 cm.) y velocidad (aproximadamente 1200 rpm) del movimiento de la abrazadera, las velocidades de las bolas son altas (en el orden de 5 m/s) y por consiguiente la fuerza del impacto de las bolas es extraordinariamente grande. Por lo tanto, estos molinos pueden ser considerados como una variedad de alta-energía (Flores, 2004).

El calor local generado durante la molienda puede causar pérdida de cristalinidad y el desarrollo de un líquido fundido, altamente viscoso (Barron y col., 2001; Sanguanpong y col., 2003).

II. HIPÓTESIS.

Es posible utilizar almidones modificados por extrusión termoplástica como materiales de pared en la producción de microcápsulas de bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* por medio del proceso de secado por aspersión.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo general.

Obtención y caracterización de almidones modificados para su uso como matrices en la microencapsulación del bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* serovariedad *Kurstaki* HD-1.

IV.2 Objetivos específicos.

- Extracción del almidón de amaranto.
- Reducción del tamaño de partícula del almidón de amaranto.
- Obtención y caracterización de almidones de amaranto, maíz ceroso y amaranto con reducción de tamaño de partícula modificados mediante fosfatación por el proceso de extrusión termoplástica.
- Obtención y caracterización de almidones succinatados y extrudidos de amaranto, maíz ceroso y amaranto con reducción de tamaño de partícula utilizando anhídrido 2-octenil succínico y extrusión termoplástica.
- Producción y caracterización de microencapsulas mediante secado por aspersión del bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) y un fagoestimulante para insectos empleando los almidones modificados como materiales de pared.

V. METODOLOGÍA.

Este proyecto se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro, bajo la dirección del Doctor Fernando Martínez Bustos.

V.1 Materiales.

Como materiales de pared se utilizaron almidones modificados de amaranto y maíz ceroso; como material activo para el proceso de microencapsulación se usó un bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* serovariedad *Kurstaki* HD-1 y aceite esencial de naranja como fagoestimulante.

V.1.1 Grano de amaranto.

El grano de amaranto fue donado por la Unidad Experimental de Chapingo cosecha 2009.

V.1.2 Almidón nativo de maíz ceroso.

Este almidón fue adquirido de National Starch.

V.1.3 Bioinsecticida.

Mezcla de cristales y esporas producidos a partir de Bt-HD1 la cual fue aislada, purificada caracterizada y donada por el grupo de investigación en biotecnología del CINVESTAV Unidad Zacatenco.

V.1.4 Aceite esencial de naranja.

Donado por Food Specialities, México. Densidad de 0.83 g/ml y utilizado como fagoestimulante.

V.2 Métodos.

V.2.1 Extracción del almidón de amaranto.

La extracción se realizó de acuerdo al método reportado por Uriyapongson y Duarte (1994) con algunas modificaciones. 1Kg de grano de amaranto se colocó en un recipiente y se agregaron 1.5 L de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N de manera que el grano quedó totalmente cubierto por la solución, se dejó 24 h en reposo con agitación repentina. Se lavó el grano con agua hasta retirar totalmente los residuos de NaOH, posteriormente, se realizó una molienda húmeda con hielo en un molino de piedras (Fumasa), la suspensión de amaranto molido fue tamizada, con la finalidad de obtener el almidón, a través de una serie de mallas con abertura de 841 μm , 595 μm , 420 μm , 250 μm , 177 μm , 149 μm , 74 μm y 62.5 μm mientras se enjuagaba el residuo que quedó en la malla con una solución fría de bisulfito de sodio (NaHSO_3) 0.1N. Se centrifugó la suspensión a 2500rpm por 10min en un equipo Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K, el precipitado fue extendido en recipientes de aluminio y secado en un horno Felisa a 40°C, luego se molió en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y finalmente se tamizó por una malla con abertura de 250 μm .

V.2.2 Análisis químico proximal de los almidones nativos.

V.2.2.1 Humedad.

El contenido de humedad se determinó de acuerdo al método 934.0 descrito por la AACC (2000) con algunas modificaciones. Se colocaron recipientes de aluminio por una hora en un horno Felisa a temperatura de 110°C, una vez transcurrido este tiempo los recipientes fueron colocados en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente, posteriormente fueron pesados. Se tomaron 2.0 g de muestra previamente homogenizada en los recipientes de aluminio, nuevamente los recipientes fueron colocados en la estufa a 110°C por 12 horas. Los recipientes se

dejaron enfriar hasta temperatura ambiente dentro de un desecador para luego ser pesados. Los cálculos se determinaron con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{w_2 - w_3}{w_2 - w_1} \times 100$$

Donde:

w_1 : masa del recipiente vacío (g).

w_2 : masa del recipiente con la muestra antes del secado (g).

w_3 : masa del recipiente con la muestra después del secado (g).

V.2.2.2 Cenizas.

Esta técnica fue realizada de acuerdo a lo descrito por el método 942.05 de la AACC (2000) con algunas modificaciones. Se colocaron 2.0 g de muestra en un crisol de porcelana a peso constante, el cual se colocó a fuego directo para quemar el material hasta que ya no se desprendieran humos. El crisol fue llevado a una mufla Felisa para efectuar la calcinación completa por 5 horas a 550°C. Posteriormente se dejó enfriar la muestra por 8 horas dentro de la mufla, para luego transferir el crisol a un desecador y una vez que éste llegó a temperatura ambiente fue pesado. Para la determinación del porcentaje total de cenizas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(X_2 - X_1)}{m} \times 100$$

Donde:

X_1 : masa del crisol vacío (g).

X_2 : masa del crisol con las cenizas (g).

m : masa de la muestra (g).

V.2.2.3 Extracto etéreo.

La determinación del extracto etéreo, se realizó de acuerdo al método 30.10 descrito por la AACC (2000) con algunas modificaciones. Se colocaron 2.0 g de muestra en un dedal o cartucho el cual se cubrió con algodón. El cartucho fue

introducido en el cuerpo extractor del equipo Soxhlet para luego colocar un matraz bola de 250 mL en la parte inferior de éste llevado previamente a peso constante y ocupado hasta 2/3 partes de su volumen con éter etílico; se conectó el refrigerante al cuerpo del extractor, el agua se hizo circular por el refrigerante y se comenzó el calentamiento hasta que se obtuvo una frecuencia de 2 gotas por segundo y la extracción se efectuó durante 5 horas, después del tiempo transcurrido de extracción se suspendió el calentamiento, se retiró el dedal y se recuperó el solvente para finalmente colocar el matraz bola en un horno Felisa a 110°C permitiendo la total evaporación del éter hasta obtener un peso constante. Para calcular el porcentaje de extracto etéreo total se utilizó la siguiente relación.

$$\% \text{Extracto etéreo} = \frac{P_2 - P_1}{P} \times 100$$

Donde:

P₁: masa del matraz vacío (g).

P₂: masa del matraz con muestra después de la evaporación del solvente (g).

P: masa de la muestra (g).

V.2.2.4 Determinación del contenido de proteína cruda.

Se utilizó el método 32.1.22 de la AACC (2000) con algunas modificaciones, en un equipo micro Kjeldhal Gerhardt. Se colocó 1.0 g de muestra en base seca (b. s.) y desengrasada en un tubo Kjeldhal, se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y un comprimido del catalizador de sulfato de cobre (II) y sulfito de potasio (0.5 g de CuSO₄·5H₂O y 5.0 g de K₂SO₄). Se puso el tubo Kjeldhal en el digestor dejándolo digerir hasta que alcanzó una coloración verde claro, la solución se dejó enfriar, posteriormente se colocó en el destilador. En un matraz Erlenmeyer con 25 mL del indicador (verde de bromocresol y rojo de metilo en una solución al 4% de ácido bórico), se recolectó el destilado; al tubo con la muestra se le agregaron de 10 a 15 mL de hidróxido de sodio (NaOH al 40%) y se destilaron por lo menos 100 mL. Finalmente el contenido del matraz fue titulado con solución

estándar de ácido clorhídrico (HCl 0.1 N). Para determinar el porcentaje de nitrógeno y de proteína se utilizaron las siguientes relaciones:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(V)(N_{\text{ác.}})(0.014)}{(m)} \times 100$$

$$\% \text{Proteína} = (\% \text{Nitrógeno})(\text{Factor})$$

Donde:

V: Volumen de ácido utilizado (mL).

N: Normalidad del ácido clorhídrico.

m: Masa de la muestra (g).

Factor: el factor de conversión para cereales es de 6.25

V.2.2.5 Contenido de amilosa.

Esta determinación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Williams y col., (1970). Se pesaron 20 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 10 mL de una solución 0.5 N de hidróxido de potasio (KOH) y se mantuvo en agitación continua (con un agitador magnético) por 5 min o hasta que estuviera totalmente disperso el almidón, posteriormente se llevó el volumen cuidadosamente hasta la marca de aforo. Se tomó un alícuota de 10 mL de la solución de almidón en un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionaron 5 mL de ácido clorhídrico 0.1 N (HCl), 0.5 mL de reactivo de yodo (20 g de yoduro de potasio y 2.0 g de yodo resublimado en un matraz volumétrico de 100 mL se disuelven y se afora con agua destilada, luego se toman 10 mL de esta solución y se añaden en un matraz volumétrico de 100 mL se disuelven y se afora cuidadosamente con agua destilada). El volumen se llevó hasta la marca de aforo, la solución se dejó en reposo por 5 min y la absorbancia del color azul fue medida a 625 nm en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC) y se comparó contra un blanco como referencia.

Para realizar la curva de calibración se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL las siguientes relaciones amilosa (mg)/amilopectina(mg): 2/8, 4/16, 6/24, 8/32,

10/40 y 12/48 y después se les dio el mismo tratamiento y lectura que a los 20 mg de muestra mencionados con anterioridad.

V.2.3 Reducción de tamaño de partícula.

El almidón nativo de amaranto fue sometido al proceso de reducción de tamaño de partícula en un molino de alta energía Spex. Tanto la hidrólisis ácida como la molienda que se explican a continuación se llevaron a cabo de acuerdo al método reportado por Flores (2004) con ciertas modificaciones.

V.2.3.1 Pre-tratamiento.

Se colocaron 90.9 g (base seca) de almidón nativo de amaranto en 200 mL de una solución al 4.3% de ácido clorhídrico (HCl) w/w. La suspensión se puso en baño María con agitación a una temperatura de $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 4 h. Una vez transcurrido el tiempo se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%, posteriormente se centrifugó la suspensión a 6000 rpm, por 10 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K, el sedimento se lavó 2 veces con agua destilada; para luego secar la pasta de almidón en un horno Felisa a 40°C por 12 h. Finalmente el almidón fue molido en un equipo Mini Pulvex 100 y tamizado por una malla con abertura de 250 μm .

V.2.3.2 Molienda en molino de alta energía Spex.

Se colocaron en un recipiente de nylamid 4.0 g del almidón tratado previamente con ácido, alcohol etílico al 96% (en relación 1:1, almidón/alcohol etílico, w/w) y bolas de zirconio de 10.2 mm de diámetro (g de almidón/g de bolas de zirconio, 1:8, w/w); el recipiente fue colocado en un molino de bolas (Spex modelo 8000L, SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ, USA) a 1200 rpm durante una hora para la reducción del tamaño de gránulo del almidón. Finalmente el almidón fue molido en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y tamizado por una malla con abertura de 250 μm .

V.2.4 Modificaciones químicas de los almidones nativos.

Se modificaron el almidón de amaranto con tamaño de partícula reducido y los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso con tripolifosfato de sodio (TPS), y anhídrido n-octenil succínico, de acuerdo a la siguiente metodología.

V.2.4.1 Hidrólisis ácida.

Como etapa previa a la aplicación de los agentes de fosfatación y succinatación a los almidones se llevó a cabo una hidrólisis ácida con el objetivo de hacer más eficiente el grado de sustitución de los mismos y aumentar su solubilidad. Los almidones fueron hidrolizados de acuerdo a lo reportado por Zambrano y Camargo (2001). Se preparó una suspensión de almidón al 40% de sólidos con una solución que contenía ácido clorhídrico (HCl) en una concentración de 3.4% con respecto a los sólidos de almidón. La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ en un baño María, manteniéndose en agitación constante durante 6 horas. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10% y la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm, durante 10 minutos en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K.

El sedimento se recuperó y lavó dos veces con agua destilada para eliminar residuos de ácido. La pasta de almidón fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 45°C por 24 h, después el almidón fue molido en un equipo Mini Pulvex modelo 100 y se tamizó con una malla de 250 μm para su posterior modificación química.

V.2.4.2 Fosfatación.

La fosfatación se llevó a cabo por extrusión termoplástica, con tripolifosfato de sodio (TPS) de acuerdo al método reportado por Murúa y col., (2009) con algunas modificaciones, en un extrusor de laboratorio de tornillo simple, diseñado y manufacturado por Cinvestav-IPN. Se adicionaron 4 g de TPS (Tripolifosfato de Sodio) a 100 g de almidón (base seca) previamente hidrolizado. Las muestras de almidón de amaranto fueron acondicionadas al 25% de humedad y la muestra de

maíz ceroso al 20%. Para adicionar el TPS éste fue suspendido en la mitad del volumen del agua necesaria para ajustar la humedad del almidón, la suspensión se dejó con agitación magnética y se fueron agregando gotas de HCl concentrado hasta la disolución del TPS; posteriormente la solución de TPS se asperjó directamente junto con la mitad de agua restante al almidón. Finalmente las muestras se guardaron en bolsas de polietileno a 4°C durante 12 h para su posterior extrusión.

Para la extrusión de las muestras de amaranto las temperaturas del barril fueron de 50°C, 130°C y 170°C para la zona de alimentación, de transición y de alta presión respectivamente. Se utilizó una velocidad de tornillo de 80 rpm, una velocidad de alimentación de 35 g/min (15 rpm), relación de compresión del tornillo de 2:1 y un dado con un diámetro de salida de 4.5 mm. Para la muestra de maíz ceroso las temperaturas fueron de 70-80°C, 130°C y 180°C para la zona de alimentación, de transición y de alta presión respectivamente. Se utilizó una velocidad de tornillo de 80 rpm, una velocidad de alimentación de 70 g/min (30 rpm), relación de compresión del tornillo de 3:1 y un dado con un diámetro de salida de 4.0 mm. Las muestras extrudidas fueron secadas en un horno Felisa a 40°C por 24 h, molidas en un equipo Mini Pulvex México, modelo 100 y se pasó a través de la malla de 250 µm para homogenizar el tamaño del almidón.

V.2.4.3 Succinación.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Jeon y col. (1999) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión en agua al 30-35% de sólidos del almidón (base seca) sometido previamente a una hidrólisis ácida, se mantuvo en agitación constante y se le adicionó por goteo, anhídrido n-octenil succínico en una proporción de 2 mL/50 g de almidón en base seca, durante dos horas y se ajustó continuamente a un pH de 8.0-8.5 con una solución de NaOH al 3%. Se mantuvieron las mismas condiciones durante un tiempo total de 6 horas. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 y la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm, durante 10 minutos en una centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo

Z513K. Se llevaron a cabo dos lavados del sedimento con agua destilada para eliminar residuos del reactivo. La pasta del almidón succinatado fue secada en un horno Felisa a una temperatura de 40 °C por 24 h, luego molido en un equipo y cribado en una malla de 250 μm . El almidón modificado fue extrudido en las condiciones descritas para el almidón de maíz ceroso fosfatado.

V.2.5 Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados.

V.2.5.1 Cristalinidad.

Se realizó un análisis de difracción de rayos X de las siguientes muestras: del almidón de amaranto nativo, del hidrolizado con una solución al 4.3% de HCl y del sometido al proceso de reducción de tamaño de partícula.

El análisis fue realizado de acuerdo al método reportado por Flores (2004). Las muestras fueron empacadas en un portamuestras de vidrio con una profundidad de 0.5mm y montadas en un difractómetro de Rayos- X (Rigaku modelo Ultima DMax-2100, Rigaku Denki Co. Ltd, Japón). Los difractogramas fueron obtenidos con un barrido de ángulo Bragg de 5°-40° sobre una escala de 2θ , con intervalos de 0.02, operando a 30 KV y 16 mA, con una radiación de $\text{CoK}\alpha$ y una longitud de onda $\lambda = 1.78899 \text{ \AA}$. La cristalinidad de las muestras fue obtenida con el software JADE 5.0 Materials Data INC. 1994.

V.2.5.2 Morfología del gránulo del almidón.

Se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por Gunning y col. (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mBar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 KV, aproximadamente 50 μA de corriente, un detector GSE (Gaseous Secondary Electron) y un spotsize del láser de 3.8-4.6. Las muestras de los almidones nativos y modificados fueron fijadas en portamuestras de aluminio con

semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a diversos aumentos.

V.2.5.3 Perfil de viscosidad.

La viscosidad de los almidones nativos y modificados fue evaluada utilizando un equipo Rapid Visco Analyzer (RVA) modelo Super 4 (Newport Scientific Pty Ltd, Sydney Australia). Las mediciones se realizaron de acuerdo a lo reportado por Murúa y col., (2009). Se colocaron 2.5 g (base seca) de muestra cribada por una malla con abertura de 250 μm , adicionando la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar un peso total de 28g de suspensión en un recipiente de aluminio. La muestra se colocó en el viscosímetro, el cual produce una agitación rápida durante 10 s, para luego estabilizarse a velocidad constante de 75 rpm. La temperatura inicial de 50°C es mantenida durante un minuto y posteriormente la temperatura es elevada a 92°C a una velocidad de calentamiento de 5.6°C/min. Una vez alcanzada la temperatura indicada, ésta se mantiene constante durante 5 minutos; el enfriamiento se lleva a cabo a la misma velocidad de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 50°C. La temperatura final se mantiene constante durante dos minutos y el tiempo total de la prueba es de 23 minutos manteniendo una agitación constante durante todo el análisis.

V.2.5.4 Propiedades térmicas

Esta técnica fue efectuada de acuerdo a la metodología descrita por Narváez y col. (2007) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo los análisis térmicos se usó un calorímetro diferencial de barrido (DSC Mettler Toledo modelo 821). 3 mg de muestra molida con tamaño de partícula de 250 μm (cribada con malla de 60 mesh) y 7 mg de agua destilada fueron colocados en un crisol de aluminio de 40 μL , posteriormente sellado con una prensa Mettler Toledo. El crisol se colocó en el equipo; la muestra fue sometida a una rampa de calentamiento de 30 a 100°C, con una tasa de 10°C/min. Del termograma obtenido se determinaron los siguientes

parámetros: temperatura de inicio (T_o), temperatura final (T_c), temperatura de pico (T_p), así como la entalpía de gelatinización (ΔH_G).

V.2.5.5 Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA).

Estos análisis se les realizaron a los almidones en estado nativo y a los modificados, de acuerdo al método descrito por Anderson y col. (1969). Se colocaron 2.5 g (base seca) de almidón en un tubo de centrifuga de 50 ml, se adicionaron 40 ml de agua destilada a 30°C, se tapó y agitó el tubo por un minuto. Los tubos fueron mantenidos a una temperatura de 30°C en un baño María, en agitación constante durante 30 minutos. A continuación las muestras fueron centrifugadas en un equipo (Hermle Labortechnik, Germany modelo Z513K) a 3000 rpm durante 10 minutos. Se registró el peso del residuo sólido y el sobrenadante se vació en un crisol de aluminio a peso contante, el líquido decantado se secó en un horno Felisa a temperatura de 110° C.

El sedimento del tubo se pesó y se registró el peso del residuo de evaporación para emplearse en las siguientes relaciones.

$$IAA = \frac{R_{cent}}{M - Revap}$$

$$ISA = \frac{Revap}{M} \times 100$$

Donde:

IAA: índice de absorción en agua.

ISA: índice de solubilidad en agua.

R_{cent} : masa del residuo de centrifugación.

Revap: masa del residuo de evaporación.

M: masa en base seca de la muestra.

V.2.5.6 Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula de los almidones nativos, modificados y de las microcápsulas se obtuvo con las micrografías obtenidas del microscopio electrónico de barrido con la ayuda del software Image J versión 1.33o.

V.2.5.7 Grado de sustitución de fósforo.

El grado de sustitución de fósforo se determinó de acuerdo al método descrito por Smith y Caruso (1964) con algunas modificaciones. Las muestras de almidón nativo y fosfatado por extrusión se lavaron con una solución de etanol al 65% (v/v) y después con metanol anhidro para eliminar los fosfatos libres, posteriormente las muestras se secaron en un horno Felisa a 40°C por 24 horas. Se colocaron 5.0 g de muestra molida y tamizada en una malla con abertura de 250 µm, en un crisol de porcelana grande. Se agregaron 10 ml de acetato de zinc dihidratado $[Zn(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2]$ al 10% distribuyéndolo uniformemente en toda la muestra. El crisol se colocó en un plato caliente hasta que el líquido se evaporó totalmente, a continuación se calentó a fuego directo hasta carbonizar la muestra y se introdujo en una mufla Felisa a una temperatura de 550°C durante 2 horas.

El crisol se enfrió hasta temperatura ambiente y el residuo se humedeció con 3 ml de ácido nítrico (HNO₃) al 29%. La muestra fue calentada en un plato caliente hasta evaporar el contenido líquido y se colocó en la mufla a 550°C por 30 minutos.

Después de alcanzar la temperatura ambiente, las paredes del crisol se lavaron con 10 ml de ácido nítrico al 29% y se adicionaron 15 ml de agua. El crisol fue cubierto con un vidrio de reloj, la solución residual se calentó hasta comenzar a hervir y se mantuvo así durante 10 minutos. Se enfrió el crisol a temperatura ambiente y se filtró su contenido a través de papel Whatman N° 1 en un matraz volumétrico de 100 ml. La transferencia del residuo se complementó adicionando 10 ml de agua al crisol en repetidas ocasiones, se aforó y mezcló. Una alícuota de 25 mL (que no contenga más de 2.4 mg de fósforo) se pipeteó en un matraz volumétrico de 100 ml. En otro matraz volumétrico fue preparado un blanco con 25 ml de agua destilada.

Los siguientes reactivos fueron adicionados a ambos matraces: 20 ml de ácido nítrico (HNO_3) al 29%, 20 ml de vanadato de amonio (NH_4VO_3) al 0.25% y 10 ml de solución de molibdato de amonio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$] al 5%. Ambas soluciones se diluyeron hasta aforar con agua destilada y se mezclaron vigorosamente, se dejó reposar durante 20 minutos hasta su lectura en el espectrofotómetro.

Se colocó el blanco en una celda de cuarzo y se determinó la absorbancia de la solución a 460 nm en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC) esta lectura se uso como referencia para fijar el valor de cero absorbancia, posteriormente se leyó la muestra.

Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de fósforo que contenían 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg de fósforo en 25mL agua destilada, se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL y se preparó un blanco con 25mL de agua destilada. A cada matraz se agregaron los siguientes reactivos en el orden indicado, agitando después de cada adición: 10 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 29%, 10 mL de vanadato de amonio (NH_4VO_3) al 0.25% y 10mL de molibdato de amonio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$] al 5%. Todas las soluciones se aforaron con agua destilada agitando vigorosamente y se dejaron en reposo durante 10 min antes de su lectura en un espectrofotómetro (UV- Visible Spectrometer Cintra 20 GBC).

La concentración de fósforo (mg/100ml) de la soluciones que contenían la muestras se obtiene de la ecuación de la curva de calibración. Las relaciones empleadas para determinar la concentración y el grado de sustitución de fósforo son las siguientes:

$$\% \text{Fósforo} = \frac{\text{CVF}}{1000 \text{ M}} \times 100$$

$$\text{GS}_{\text{Fósforo}} = \left(\frac{162\text{P}}{3100 - 124\text{P}} \right)$$

Donde:

C: contenido de fósforo (mg/ 100 mL) obtenido de la curva de calibración.

V: volumen de la dilución (es 100 ml si no se altera este volumen al diluir la muestra filtrada).

F: factor de dilución.

M: cantidad de muestra (g).

GS_{Fósforo}: grado de sustitución de fósforo

P: porcentaje de fósforo del almidón fosfatado.

V.2.5.8 Grado de sustitución de succinato.

El grado de sustitución de succinato se determinó de acuerdo al método descrito por Praful y Rekha (2002) con algunas modificaciones. Esta determinación se le realizó a los almidones nativos y a los modificados, se colocó 1.0 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se adicionaron 50 mL de una solución de etanol-agua (75% v/v). La mezcla se agitó y se mantuvo a 50°C durante 30 min. A continuación se enfrió y se agregaron 40mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N, esta mezcla se mantuvo durante 72 h con agitación ocasional. El exceso de álcali fue titulado con una solución estándar de ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. La solución se dejó en reposo por 2 h, si al transcurrir este tiempo la solución ha cambiado nuevamente su coloración se debe titular nuevamente. Las muestras de almidón nativo fueron usadas como blancos.

El porcentaje de succinato y el grado de sustitución de las muestras fue calculado usando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Succinato} = \frac{(B - M) \times 0.1 \times N}{W} \times 100$$

$$GS = \frac{162 \times S}{10000 - (99 \times S)}$$

Donde:

B: volumen gastado en la titulación del blanco (mL).

M: volumen gastado en la titulación de la muestra (mL).

N: normalidad del ácido.

W: cantidad de muestra (g).

GS=: grado de sustitución de succinato.

S: porcentaje de succinato del almidón succinatado.

V.2.6 Producción de microcápsulas.

Este método se llevó a cabo de acuerdo a lo escrito por Bertolini y col. (2001) con algunas modificaciones. Las microcápsulas preparadas con los almidones modificados fueron obtenidas mediante el proceso de secado por aspersión en un secador SD-Basic de LabPlant (Huddersfield, UK). Para preparar las muestras de los almidones modificados para la encapsulación, se tamizaron con una malla de abertura de 250 μm . Se preparó una emulsión en agua a 40°C con 30% de sólidos (p/p) del material de pared, luego se incorporó 4% de aceite esencial de naranja como fagoestimulante (p/p), la mezcla fue homogenizada con un Ultraturrax IKA T-18 Basic a 14000 rpm durante cinco minutos, posteriormente se agregó una proporción del 6.0% (v/p) del bioinsecticida de toxicidad controlada producido a partir de Bt-HD1 respecto a los sólidos de almidón modificado y se homogeneizó nuevamente la emulsión a 5000 rpm por 3 min. La emulsión se mantuvo en agitación constante durante el secado. Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada de 180°C y temperatura del aire de salida de 110°C +/- 5°C. Las microcápsulas obtenidas fueron recolectadas y almacenadas a 4°C para su posterior análisis.

V.2.7 Caracterización de las microcápsulas.

V.2.7.1 Actividad de agua.

Para la determinación de la actividad de agua de las microcápsulas se empleó un equipo Aqua Lab CX- 2, de acuerdo al método 978,18 de la A.O.A.C. (1999) con algunas modificaciones. Las muestras fueron colocadas en contenedores propios del equipo y la medición se realizó a 25 °C.

V.2.7.2 Caracterización morfológica externa de las microcápsulas.

Se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda) en condiciones de bajo vacío, de acuerdo con la metodología descrita por Gunning (1999) con algunas modificaciones. La manera de preparar la

muestra y las condiciones del equipo fueron las mismas que las mencionadas anteriormente en el apartado V.2.5.2 acerca de la morfología del gránulo de almidón.

V.2.7.3 Recuento bacteriano del bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* serovariedad *Kurstaki* HD-1.

El recuento bacteriano se realizó por duplicado por el método de vaciado en placa. Se tomó una alícuota de 1 mL del bioinsecticida y se colocó en 9 mL de diluyente de peptona, la dilución se homogeneizó con la ayuda de un bortex; a continuación se tomó 1 mL de la primera dilución y se colocó en 9 mL de diluyente de peptona se homogeneizó la dilución y posteriormente se tomó 1 mL de la segunda dilución para ponerlo nuevamente en 9 mL de diluyente de peptona; se continuó haciendo 8 diluciones más de la misma manera. Después se tomó 1 mL de la 3°, 6°, 7°, 9° y 11° dilución y se colocaron en cajas Petri para luego agregar de 15- 20 mL de Agar Nutritivo y homogeneizarlas. Posteriormente las cajas se incubaron (incubadora Thermo Forma) a 30°C por 36 h y al transcurrir este tiempo se realizó el recuento con la ayuda de un contador de colonias Felisa.

V.2.7.4 Recuento bacteriano de las microcápsulas.

El recuento bacteriano se realizó por duplicado por el método de vaciado en placa. Se tomaron 0.10 g de microcápsulas y se colocaron en 0.9 mL de diluyente de peptona posteriormente con la ayuda de un bortex se rompieron las microcápsulas. Se toman 0.5 mL de la dilución anterior en 4.5 mL de diluyente de peptona y se realizaron 5 diluciones más de la muestra colocando 1 mL de muestra de la dilución anterior en 9 mL de diluyente de peptona y así sucesivamente para cada nueva dilución, se debe de homogeneizar cada dilución con ayuda del bortex antes de tomar cada alícuota. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la 3°, 5°, 6° y 7° dilución y se colocaron en cajas Petri para luego agregarles Agar Nutritivo y homogeneizarlas. A continuación las cajas fueron incubadas (incubadora Thermo Forma) a 30°C durante 36 h y se realizó el recuento de colonias (contador de

colonias Felisa), las cajas se dejaron por 72 h en la incubadora para después realizarles la tinción de Gram.

V.2.7.5 Tinción de Gram.

Este método se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Rodríguez y col. (2006) con algunas modificaciones. Se le realizó tinción de Gram a las colonias que se desarrollaron a las 36 h mantenidas en incubación. Para realizar el frotis se colocó una gota de solución fisiológica (solución de cloruro de sodio, NaCl al 0.9%) en un portaobjetos limpio y seco; se tomó un asa y se flameó en un mechero, se espera a que se enfríe y con ésta se tomó un poco de la colonia a analizar para colocarla en la gota de solución fisiológica y extender la muestra en el portaobjetos con la ayuda del asa. Para fijar la muestra se pasó el portaobjetos por la flama del mechero (no de manera directa) teniendo cuidado de que el calor no sea excesivo. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.

Para la tinción se le agregó el colorante de cristal violeta al frotis en una cantidad suficiente como para cubrirlo por completo. Se dejó actuar al colorante por 1 min al transcurrir este tiempo, se enjuagó el portaobjetos con agua. Después se le añadió lugol al portaobjetos en la misma cantidad que el colorante anterior se dejó en reposo por 1 min y se enjuagó nuevamente con agua y luego con etanol al 95% o con acetona, hasta que ya no surgió líquido azul. Nuevamente fue lavado con agua y se esperó a que se secase el portaobjetos; a continuación el frotis fue teñido con safranina y se dejó actuar por 1 min, luego se enjuagó de nuevo con agua y se dejó secar. Posteriormente el frotis se observó al microscopio óptico.

V.3 Diseño de experimentos y análisis estadístico.

Se realizó un diseño de experimentos totalmente aleatorio. Las muestras se examinaron con un análisis de varianza y la comparación de medias mediante pruebas de rango múltiple de Tukey considerando alta significancia a una $P \leq 0.05$, utilizando el paquete computacional JMP 5.0.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.1 Rendimiento de la extracción del almidón de amaranto.

Se obtuvo un rendimiento del 32.22% del almidón extraído con respecto a la cantidad de grano que se utilizó. Este resultado es muy similar a lo reportado por Uriyapongson y Rayas (1994) los cuales obtuvieron rendimientos que variaron de 30.4% a 39.3% al extraer almidón de *Amaranthus cruentus*. El amaranto tiene un contenido de almidón del 50-60%, sin embargo, su tamaño tan pequeño (1-3 μm) dificulta la sedimentación del gránulo, por lo que el rendimiento de extracción es bajo con respecto al contenido total de almidón.

VI.2 Caracterización química de los almidones nativos.

VI.2.1 Humedad.

La determinación de humedad se realizó por diferencia de pesos debido a la pérdida de agua por la evaporación de la misma en la muestra. En el Cuadro 3 se presenta el resultado obtenido del contenido de humedad de los almidones nativos y del grano de amaranto como se puede observar el almidón de maíz ceroso (9.80%) y el grano de amaranto (9.35%) contienen un mayor porcentaje de humedad que el almidón de amaranto (7.42%). En general los cereales se caracterizan por su bajo contenido de humedad de 9 a 12%. Choi y col., (2004) reportaron valores de 11.5% y 11.3% de humedad para el grano y almidón de *Amaranthus cruentus* respectivamente; por otro lado Manni y col., (2008) obtuvieron un contenido de humedad de 6.47% en el almidón de *Amaranthus mantegazzianus*; valores distintos a los presentados en este estudio lo cual se puede deber a ciertos factores como a las condiciones de almacenamiento.

VI.2.2 Cenizas.

Las cenizas son el residuo inorgánico que queda de la incineración de la materia orgánica (Guzmán, 2010). Como se puede observar en el Cuadro 3 el grano de

amaranto presentó un contenido de cenizas de 3.10% lo que concuerda con la literatura en donde se reportan valores de 3.06% en *Amaranthus caudatus* y 3.3% en *Amaranthus hypochondriacus* variedad Tulyehualco (Gamel y col., 2006; Barba y col., 2009). El almidón de amaranto presentó un contenido de cenizas de 0.47% y en tanto que el almidón de maíz ceroso presentó un 0.10%. Uriyapongson y Rayas (1994) reportan un contenido de cenizas de 0.22% en el almidón de *Amaranthus hypochondriacus* x *A. hybridus* y 0.02% en el almidón de maíz ceroso; Choi y col., (2004) obtuvieron un valor de 1.2% en el almidón de *Amaranthus cruentus*. El mayor contenido de cenizas en el almidón de amaranto respecto al almidón ceroso, se debe a que el grano de amaranto está constituido por una cantidad importante de minerales como fósforo, potasio, magnesio, hierro y calcio, entre otros (Gamel y col., 2006); que no son eliminados por completo durante la extracción del almidón. Jiranuntakul y col., (2011) reportaron un contenido de cenizas en el almidón de maíz ceroso de 0.36 %.

VI.2.3 Extracto etéreo.

El extracto etéreo es un conjunto de sustancias extraídas con solventes (ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, ceras, ácidos grasos libres, etc.) (Guzmán, 2010). En el Cuadro 3 se muestra que el grano de amaranto presentó un 6.73% de extracto etéreo valor muy similar a lo señalado por Gamel y col., (2006) que obtuvieron un valor de 7.07% en el grano de *Amaranthus caudatus*, ellos señalan que el contenido de aceite en el grano de amaranto es más alto comparado con otros cereales por ejemplo el maíz contiene 4.5%, el trigo 2.1% y el arroz 2.1% aproximadamente. Uriyapongson y Rayas (1994) reportan valores de extracto etéreo de 1.23% a 1.40% en almidones de *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* x *A. hybridus* respectivamente, resultados muy similares a lo encontrado en este trabajo. De acuerdo a Choi y col., (2004) el amaranto contiene de 6.0-9.0% de grasa, especialmente escualenos los cuales usualmente son encontrados en animales marinos. Jiranuntakul y col., (2011) encontraron un valor de 0.07 % de extracto etéreo en el almidón de maíz ceroso. Las diferencias entre lo

reportado en la literatura y lo que se expresa en el presente trabajo son causadas por las condiciones de cultivo, la especie y el método de extracción utilizado.

VI.2.4 Proteína cruda.

El análisis proteico es una digestión de la muestra en un medio ácido en donde se determina el contenido de nitrógeno total disponible para luego con la ayuda de un factor obtener la cantidad de proteína cruda en la muestra (Guzmán, 2010). Uriyapongson y Rayas (1994) encontraron un contenido de proteína de 0.15% en el almidón de maíz ceroso comercial como se puede observar en el Cuadro 3 es un valor muy similar al obtenido en este trabajo (0.16%). Jiranuntakul y col., (2011) señalaron un valor de 0.24 % de proteína cruda en el almidón de maíz ceroso. Manni y col., (2008) reportaron un contenido de proteína en el almidón de *Amaranthus mantegazzianus* de 1.47%, menor que el encontrado en el presente trabajo; esta diferencia se debe al método usado en la extracción del almidón. Barba y col., (2009) reportaron que el grano de *Amaranthus hypochondriacus* variedad Tulyehualco contiene 15.0% y la variedad Nutrisol un 15.3%. El contenido de proteína (aproximadamente 14-17%) en el grano de amaranto es más alto que en otros cereales y de buena calidad. Tiene un alto porcentaje de aminoácidos sulfurados (metionina y cisteína), lisina y leucina. Dentro de las proteínas más representativas se encuentran albuminas, 11S-globulina (amarantina), globulina-P y glutelinas (Tapia y col., 2007).

VI.2.5 Contenido de amilosa

El contenido de amilosa es un factor importante que afecta las propiedades del almidón, como la capacidad de hinchamiento, la solubilidad y la formación de geles (Choi y col., 2004). En el Cuadro 3, se observa que el almidón de amaranto presentó 12.38% de amilosa y el de maíz ceroso 1.41%. Uriyapongson y Rayas (1994) reportaron un contenido de amilosa de 5.79% y 6.81% en *Amaranthus hypochondriacus* x *A. hybridus* y *Amaranthus cruentus* respectivamente. Ellos mencionan que el contenido de amilosa en el almidón de amaranto es muy variable

ya que existen especies completamente no cerosas y otras tipos waxy (entre 0.2 y 25% aproximadamente de amilosa). Wu y Corke (1999) analizaron diversas especies de *Amaranthus* y encontraron contenidos de amilosa que van desde 7.8% hasta 34.3%. Agustiano (2004) señaló que el contenido de amilosa en el almidón de maíz ceroso varía de 1% hasta 3%. Jiranuntakul y col., (2011) encontraron un contenido de amilosa de 2.06% y Zheng y col., (1999) reportaron un valor de 1.1% ambos trabajos se refieren al almidón de maíz ceroso.

Cuadro 3. Caracterización química del grano de amaranto y de los almidones en estado nativo

Muestra	% Humedad	% Cenizas	% Extracto etéreo	% Proteína cruda	% Amilosa
Grano amaranto	9.35 b	3.10 a	6.73 a	14.96 a	nd
Almidón nativo de amaranto	7.42 c	0.47 b	1.20 b	3.37 b	12.38 a
Almidón nativo de maíz ceroso	9.80 a	0.10 c	0.13 c	0.16 c	1.41 b

Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). nd= no determinado.

VI.2.6 Perfil de viscosidad.

Por lo general los almidones en estado nativo presentan una naturaleza hidrofílica, son poco solubles en agua fría y producen pastas de alta viscosidad al ser suspendidos en agua y calentados, estas propiedades son deseadas sólo en ciertas aplicaciones. En la Figura 10 se muestran los viscoamilogramas del almidón de amaranto y maíz ceroso, así como en el Cuadro 4 se muestran los datos obtenidos de los viscoamilogramas acerca del perfil de viscosidad de los almidones en estado nativo; se observa que el almidón de maíz ceroso presenta durante el ciclo de calentamiento una viscosidad mayor que el almidón de amaranto. Esta diferencia se atribuye al contenido de amilosa, lípidos y proteínas; la amilosa de cierta manera actúa como diluyente e inhibidor del hinchamiento del gránulo, especialmente en la presencia de lípidos ya que pueden llegar a formar complejos insolubles durante el hinchamiento y la gelatinización. En estudios anteriores se ha

demostrado que la viscosidad máxima del almidón aumenta cuando el almidón se purifica para disminuir el contenido de proteínas (Jiranuntakul y col., 2011).

La disminución en la viscosidad después de que ésta alcanza su punto máximo refleja la fragilidad del gránulo hinchado que se rompe a consecuencia de la agitación continua (Uriyapongson y Duarte, 1994). Ambos almidones presentan una viscosidad de retrogradación pequeña en comparación con almidones provenientes de otras fuentes lo cual es debido al bajo contenido de amilosa que posee el almidón de amaranto y de maíz ceroso (Pérez y col., 1993). Sin embargo, el almidón de amaranto fue bastante estable durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento lo que resultó en valores bajos de viscosidad de ruptura y de retrogradación lo cual muestra que puede ser usado en la industria alimenticia como espesante o estabilizante.

Cuadro 4. Perfil de viscosidad de los almidones nativos de maíz ceroso y amaranto.

Muestra	Visc. máxima (cP)	Visc. mínima (cP)	Visc. de ruptura (cP)*	Visc. final (cP)	Visc. de retrogradación (cP)**	Tiempo de visc. máxima (min)
Maíz ceroso nativo	2590.00 a	896.50 b	1693.50 a	1194.50 a	298.00 a	6.13 a
Amaranto nativo	1771.00 b	1135.00 a	636.00 b	1203.50 a	68.50 b	6.10 a

Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

*Viscosidad de ruptura= Visc. Máxima - Visc. Mínima.

** Viscosidad de retrogradación= Visc. Final - Visc. Mínima.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura; Wu y Corke (1999) encontraron una amplia variación en las propiedades de pasta entre las especies de amaranto y entre genotipos dentro de las especies, atribuyéndolo principalmente a las diferencias en el contenido de amilosa reportaron viscosidades máximas que van desde 1040 cP hasta 2880 cP, mínimas de 960 a 2230 cP, finales de 900 a 2890 cP, de ruptura de -140 a 860 cP y de retrogradación de -60 a 1210 cP.

Paredes y col. (1994) reportaron que el almidón de amaranto presenta una baja viscosidad debido a que posee cadenas de corta longitud las cuales no contribuyen tanto a la generación de viscosidad del líquido, solución o emulsión como las cadenas largas desde el punto de vista reológico. Choi y col. (2004) señalaron que los gránulos de gran tamaño tienden a generar mayor viscosidad lo cual está de acuerdo con los resultados del presente trabajo ya que el almidón de maíz ceroso generó mayor viscosidad que el almidón de amaranto.

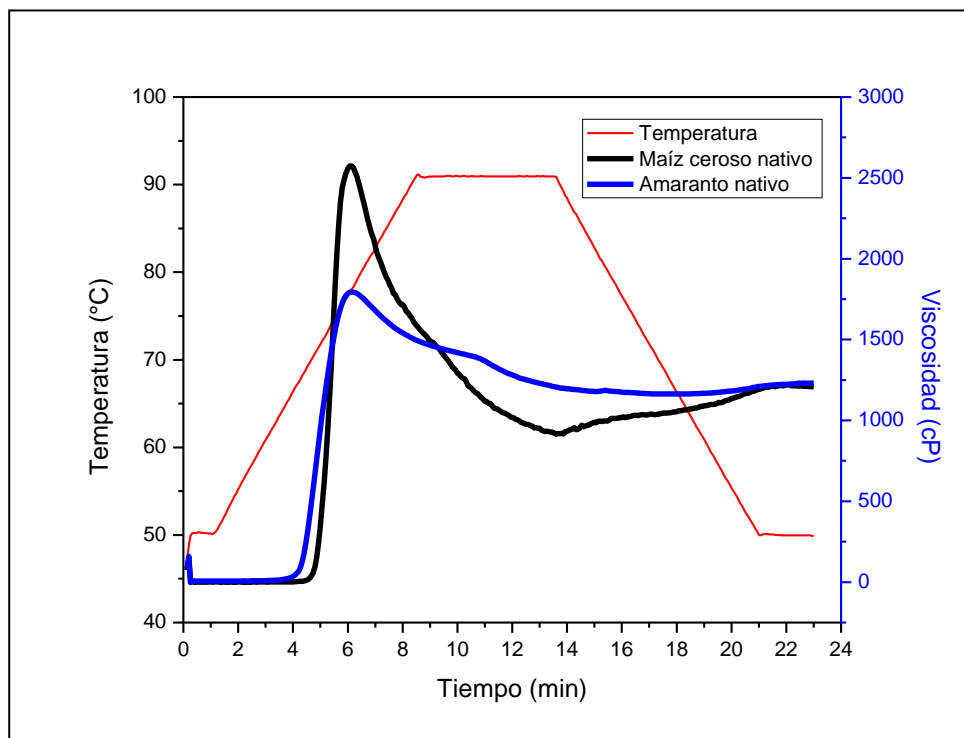


Figura 10. Perfil de viscosidad de los almidones nativos de maíz ceroso y amaranto.

Uriyapongson y Duarte (1994) reportan perfiles de viscosidad muy similares para el almidón de amaranto y el de maíz ceroso, además encontraron que el daño provocado al gránulo por el método de extracción afecta la viscosidad del almidón a mayor daño menor viscosidad. Jiranuntakul y col. (2011) señalaron que los almidones cerosos entre ellos el de maíz presenta una alta viscosidad, fácil rompimiento del gránulo y baja viscosidad de retrogradación en comparación con

los almidones normales y registró valores de 1005 y 219 cP para la viscosidad de ruptura y de retrogradación respectivamente del almidón de maíz ceroso.

El material de pared utilizado para la encapsulación mediante secado por aspersión debe presentar propiedades tales como alta solubilidad, baja viscosidad incluso con un contenido relativamente alto de sólidos en una suspensión, por lo que fue necesario mejorar las características intrínsecas del almidón nativo mediante la modificación química del polímero y así obtener un material adecuado para su uso como agente encapsulante (Murúa y col., 2009).

VI.2.7 Propiedades térmicas.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es parte de la técnica conocida como un análisis térmico, que ha permitido identificar en un sistema compuesto de almidón y agua las transiciones y modificaciones de la estructura del gránulo de almidón, verificar la asociación de fragmentos de amilosa y amilopectina (retrogradación) e identificar los cambios en sus características térmicas como consecuencia de tratamientos combinados de calor y humedad (Sandoval y col., 2005).

La gelatinización del almidón sigue una cinética de primer orden y se ha propuesto un modelo de este fenómeno el cual consta de dos etapas: un proceso de hinchamiento seguido de un rompimiento-disolución de los gránulos; también se ha propuesto que durante la gelatinización se produce la fusión del gránulo y que la estructura tanto molecular (doble hélice) como la cristalina son interrumpidas durante la gelatinización (Calzetta y Suárez, 2001).

En los almidones nativos, el orden molecular de doble hélice es significativamente mayor que el orden cristalino (Cooke y Gidley, 1992). Durante la gelatinización las estructuras de doble hélice y cristalinas son destruidas al mismo tiempo en los almidones nativos. La entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}) puede corresponder a la destrucción del orden de la doble hélice y se ilustra mediante las endotermas de DSC en el rango de 50-70°C (Colonna y col., 1992).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido ampliamente utilizada para estudiar el comportamiento térmico de gelatinización y retrogradación del almidón. La endoterma de fusión (o gelatinización) del almidón en el DSC proporciona la entalpía, así como también las temperaturas de fusión de la estructura cristalina del almidón, lo cual refleja el grado y la perfección de la cristalinidad (Durrani y Donald, 1995). La entalpía de fusión (ΔH) está a menudo directamente relacionada con la cantidad de cristales (estructura helicoidal doble o sencilla) del almidón (Liu y col., 2006). La temperatura de inicio (T_i) representa la temperatura de fusión de los cristales menos estables. La temperatura de pico (T_p) indica la temperatura de fusión de la mayoría de los cristales presentes en el almidón. La temperatura final (T_f) constituye la temperatura de fusión de los cristales más perfectos. El rango de temperatura de fusión (ΔT), es decir, $T_f - T_i$, indica el grado de heterogeneidad de los cristales (Biliaderis, 1992). Cuanto mayores sean las temperaturas de fusión (T_i , T_p , T_f) y el rango de temperatura de fusión (ΔT) sea más estrecho, más estables y uniformes son los cristales (Durrani y Donald, 1995).

En la Figura 11 se muestran los termogramas obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido de los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso; sus parámetros térmicos correspondientes (inicio T_i , pico T_p , final T_f y entalpía de gelatinización ΔH) se encuentran en el Cuadro 5. Como se observa el almidón de maíz ceroso presentó una T_i , T_p , T_f y un ΔH mayor que las obtenidas en el almidón de amaranto, este último requirió menor energía para la gelatinización del almidón en comparación con el almidón de maíz.

Baker y Rayas (1998) sugieren que hay regiones con mayor orden en el almidón de maíz ceroso en comparación con el de amaranto, ya que se requiere de temperaturas más altas para lograr el cambio de fase. Esto puede implicar una mayor compactación en la estructura molecular interna y un mayor grado de cristalinidad en el almidón de maíz ceroso que en el de amaranto (Qian y Kuhn, 1999) lo cual concuerda con los resultados arrojados por el análisis de Rayos-X (Figura 15 y Cuadro 8).

Cuadro 5. Propiedades térmicas de los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso obtenidas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Muestra	ΔH (J/g)	Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)
Amaranto nativo	10.49	64.20	69.41	75.26	11.06
Maíz ceroso nativo	15.19	64.68	70.28	77.75	13.07

Ti= Temperatura inicial de gelatinización, Tp= Temperatura máxima, Tf= Temperatura final de gelatinización, ΔH = Entalpía de gelatinización y ΔT = Tf-Ti.

Radosavljevic y col. (1998) encontraron que el método de extracción es un factor que puede inducir variaciones en las propiedades térmicas del almidón; ellos reportaron valores de Ti= 64.0 °C, Tp= 69.0 °C, Tf= 76.7 °C y ΔH = 15.0 J/g para el almidón de maíz ceroso, muy similares a los resultados obtenidos en este trabajo.

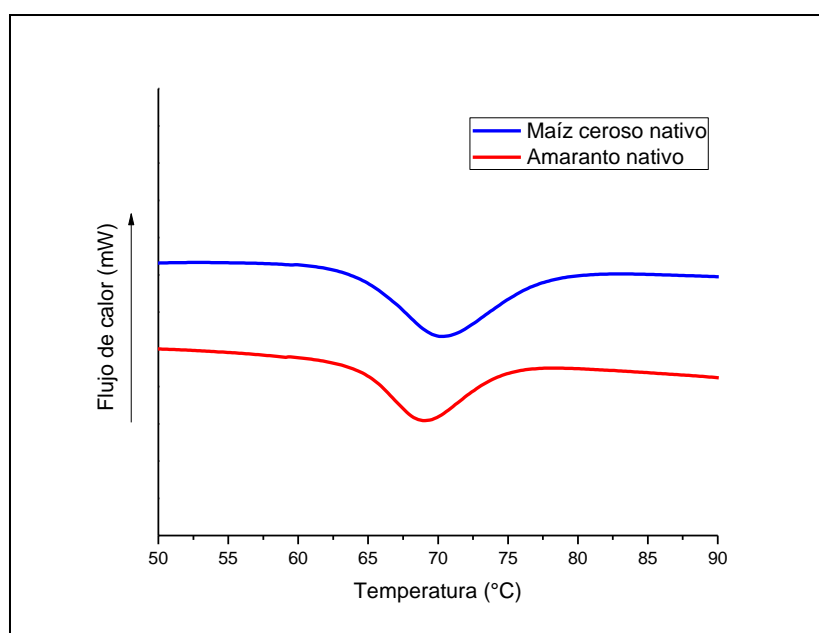


Figura 11. Termogramas de gelatinización de los almidones nativos de amaranto y maíz ceroso.

Uriyapongson y Rayas (1994) extrajeron almidón de *Amaranthus hypochondriacus* x *A. hybridus* siguiendo una metodología semejante a la utilizada en el presente trabajo y señalan los siguientes valores para las propiedades térmicas del almidón nativo: Ti= 63.3 °C, Tp= 67.8 °C, Tf= 75.9°C y ΔH = 20.2 J/g los cuales concuerdan

con los resultados obtenidos, las pequeñas variaciones pueden deberse a que son diferentes fuentes biológicas (clima, genotipo, etc). En el Cuadro 5 se registra un rango de gelatinización (ΔT) de 11.06 y 13.07 °C en los almidones de amaranto y maíz ceroso, respectivamente, estos resultados son similares a los encontrados por Jane y col. (1999), ellos reportaron un ΔT para el almidón de amaranto de 8.5 °C y de 10.4 °C en el almidón de maíz ceroso; esto puede atribuirse a que los gránulos de almidón de maíz ceroso posiblemente se encuentran más compactados en el grano en comparación con los gránulos del almidón de amaranto ya que el primero muestra un rango más amplio de gelatinización (ΔT) debido a que el proceso se da de manera más lenta (Narváez y col., 2006).

El valor de la entalpía de gelatinización del almidón se ve afectado por algunos factores como son la forma del gránulo, la presencia de fosfatos y el tamaño de gránulo (Singh y col., 2004). Las variaciones entre muestras en la estructura cristalina producen diferencias en las temperaturas de gelatinización. Los granos poco compactos tienen generalmente gránulos de almidón de grandes tamaños (>10 μm). La cristalinidad en los gránulos grandes de almidón es mayor que en los pequeños (<10 μm). Los gránulos con cristalinidad alta muestran altas temperaturas y entalpías de gelatinización (Narváez y col., 2006).

VI.2.8 Morfología y tamaño del gránulo de almidón.

En la Figura 12 se observa las micrografías a 2500x y 8000x del almidón nativo de amaranto. En estas micrografías se muestra la forma poligonal con bordes redondeados del gránulo y su tamaño que va de 1-2 μm , los gránulos están íntegros sin grietas, ni daño alguno por el proceso de extracción alcalina. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Choi y col., (2004) que utilizaron un tratamiento alcalino para la extracción del almidón; así como con lo reportado por Radosavljevic y col., (1998) los cuales utilizaron proteasas y un tratamiento alcalino para la extracción. Las diferencias entre los métodos de extracción no afectaron la forma ni el tamaño de los gránulos. En las micrografías se observa que el almidón de amaranto forma aglomerados Qian y Kuhn, (1999) afirman que este es un

fenómeno muy común en los gránulos pequeños el cual se atribuye a los residuos de proteína y lípidos que no son removidos durante la extracción del almidón.

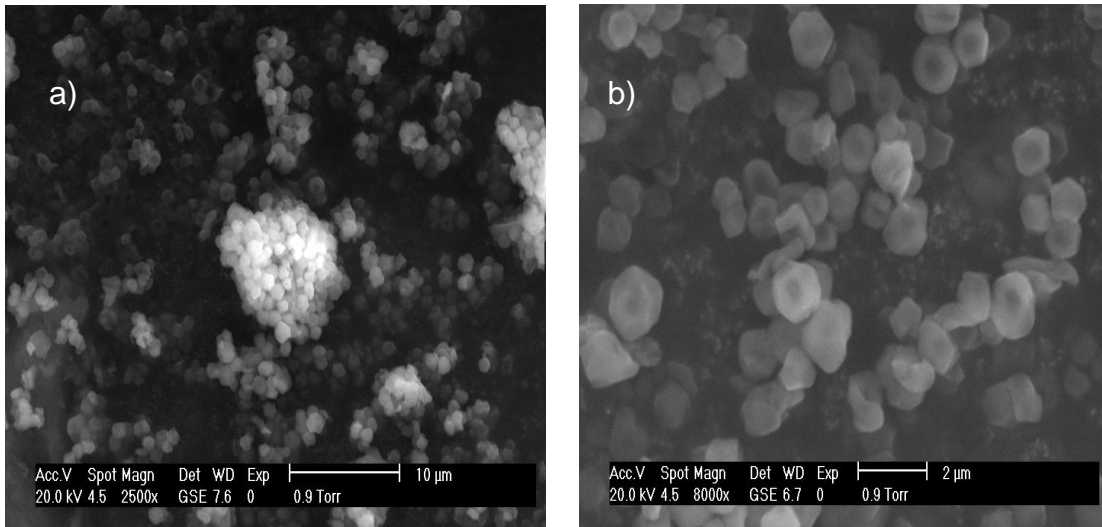


Figura 12. Microfotografías de almidón de amaranto en estado nativo a) a 2500x y b) a 8000x.

El almidón de maíz ceroso presentó una forma redondeada e irregular con tamaños de gránulo de 7-19 μm como se muestra en las micrografías de la Figura 13 y en el Cuadro 6.

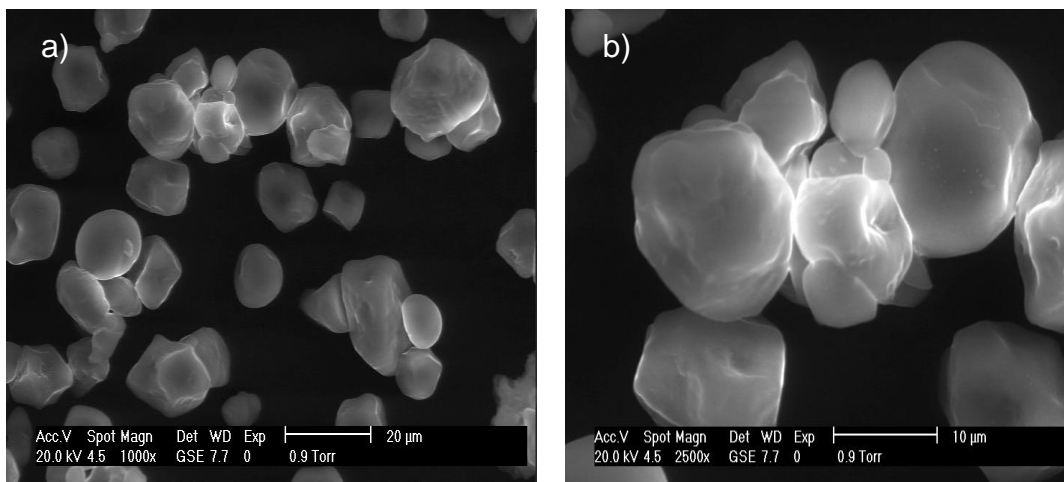


Figura 13. Microfotografías de almidón de maíz ceroso en estado nativo a) a 1000x y b) a 2500x.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Jiranuntakul y col., (2011) los cuales observaron tamaños de gránulo de 3-18 μm y una forma ovalada, redondeada o bien irregular en algunos gránulos de almidón de maíz ceroso en el caso del almidón de maíz normal obtuvieron un tamaño de gránulo más pequeño (2-9 μm) y una forma un poco más redondeada que el almidón de maíz ceroso.

En el Cuadro 6 se presentan los diámetros medios de los gránulos de los almidones de maíz ceroso y amaranto, es evidente la diferencia de dimensiones entre ambas muestras siendo el almidón de maíz ceroso el de mayor tamaño de gránulo. Se ha sugerido la posible utilización del almidón de amaranto como material de dispersión o revestimiento, debido a su gran área de superficie por unidad de peso (Choi y col., 2004).

Cuadro 6. Tamaño de gránulo de los almidones nativos.

Muestra (Almidón)	Diámetro medio de partícula (μm)
Amaranto	1.29 a
Maíz ceroso	15.78 b

Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

VI.3 Caracterización del almidón con reducción de tamaño de partícula.

VI.3.1 Tamaño de partícula.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados de la reducción del tamaño de los gránulos del almidón de amaranto como consecuencia del tratamiento en el molino de alta energía. En dicho cuadro, se presenta el diámetro de los gránulos del almidón nativo de amaranto, del hidrolizado antes de someterlo al molino de bolas (hid p/mol) y del que se obtuvo después del tratamiento con el molino de bolas (c/reducción); el tamaño fue reducido en un 17.83% aproximadamente. Flores (2004), reportó porcentajes de reducción del tamaño del gránulo de 18.04%, 28.0% y 25.0% para el almidón de yuca, maíz y jícama respectivamente, proporcionándoles el mismo tratamiento que se aplicó al almidón de amaranto.

Jane y col., (1992) obtuvieron una reducción del tamaño de gránulo en almidón de maíz de 11.94-12.33% utilizando para la medición el software Image Analyzer.

Cuadro 7. Tamaño de gránulo del almidón de amaranto.

Muestra (Almidón)	Diámetro medio de partícula (µm)
Amaranto nativo	1.29 a
Amaranto hid p/mol	1.26 a
Amaranto c/reducción	1.06 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

VI.3.2 Difracción de rayos X y cristalinidad.

La difracción de rayos X se ha utilizado para revelar la presencia y las características de la estructura cristalina de los gránulos de almidón, los cuales muestran patrones de difracción A, B y C dependiendo del origen botánico, los cuales se muestran en la Figura 14.

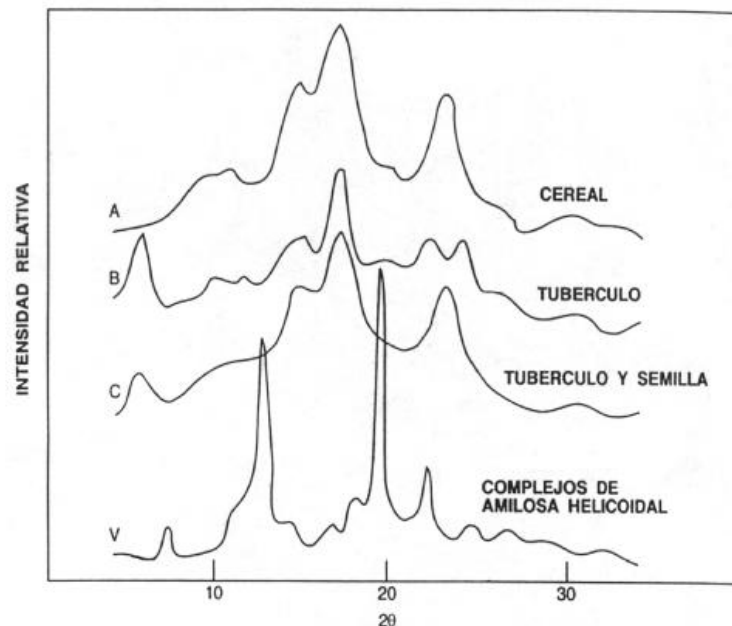


Figura 14. Patrones de difracción de rayos X, para almidones provenientes de diversas fuentes (Zobel, 1988).

Las dobles hélices que conforman las entidades cristalinas son esencialmente idénticas; sin embargo, el empaquetamiento en el patrón tipo A es más compacto y con bajo contenido de agua y por lo general es el tipo que tienen los almidones provenientes de cereales, mientras que el tipo B tiene una estructura más abierta con mayor hidratación y lo presentan los almidones provenientes de los tubérculos. Además de estas características, la longitud de cadena es más corta en el patrón tipo A que en el tipo B. El patrón de difracción tipo C representa una combinación de A y B y pertenece a los almidones extraídos de algunas semillas y raíces (Zobel, 1988). Por último existe un patrón denominado como V que es característico cuando se forma un complejo de inclusión o clatrato en el interior de la hélice de la amilosa. La estructura cristalina del gránulo de almidón ha sido atribuida directamente a la amilopectina (Rodríguez y col., 2001).

En la Figura 15 se muestra el patrón de difracción de rayos X de las muestras de almidón de amaranto nativo, con el tratamiento ácido antes de la molienda y la muestra de almidón obtenida después de la molienda en el molino de alta energía por último se utilizó amilopectina y almidón nativo de maíz ceroso a manera de comparación. Se observa en el difractograma que el almidón de amaranto y el de maíz ceroso presentan un patrón de rayos X tipo A ya que las picos más intensos aparecen en 15° , 17° , 18° y 23° ángulo de Bragg (2θ) de acuerdo a lo señalado por Zobel (1988).

Por otro lado, se puede observar en el Cuadro 8 que el almidón de maíz ceroso posee más cristalinidad que el de amaranto lo cual se debe a la menor proporción de amilosa en la estructura del gránulo de maíz ceroso en comparación con el de amaranto también se aprecia la disminución en la cristalinidad del almidón de amaranto después del tratamiento ácido y posteriormente a consecuencia del tratamiento con el molino de alta energía, la cristalinidad disminuyó proporcionalmente con el tratamiento. Esto también se ve reflejado en los difractogramas de la Figura 10; Zobel (1988), afirmó que la pérdida de resolución en el pico (ensanchamiento y reducción de la altitud) refleja la pérdida de cristalinidad y un incremento en el componente amorfo de la estructura.

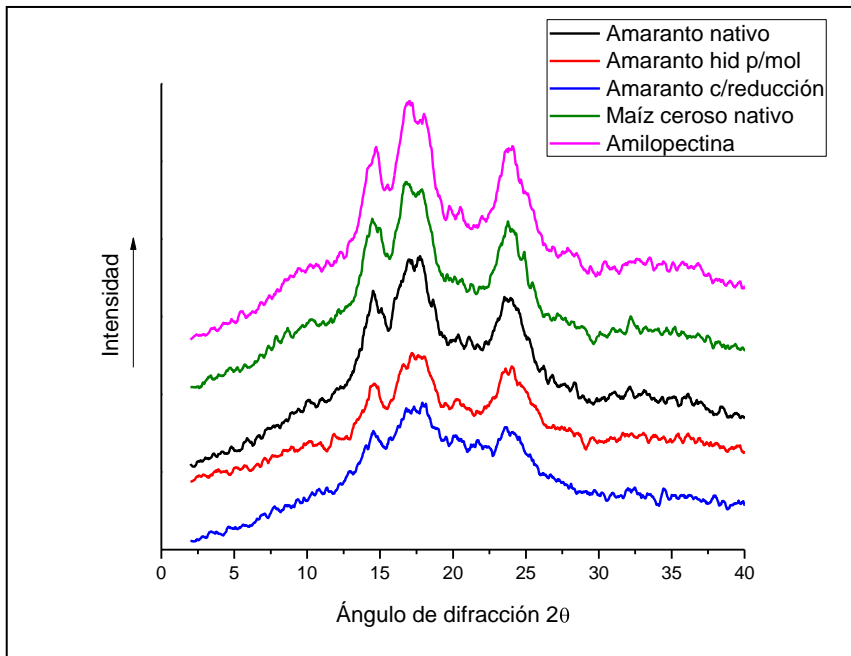


Figura 15. Patrones de difracción de rayos X del almidón de amaranto.

Martínez y col., (2007) reportaron una disminución en la cristalinidad del almidón de jícama y yuca después del tratamiento con el molino de alta energía también observaron que un incremento en el contenido de humedad durante el proceso de molienda produce una pérdida mayor de cristalinidad. Tamaki y col. (1998), estudiaron el efecto del tratamiento con molino de bolas en almidón de maíz normal, ceroso y alto en amilosa, ellos reportaron que conforme aumentaba el tiempo de molienda la cristalinidad disminuía hasta que los patrones de difracción desaparecieron después de 20 h de tratamiento quedando pequeños picos en el almidón alto en amilosa.

La disminución en la cristalinidad es causada por el grado de fragmentación de los gránulos del almidón y ocasionada por el daño mecánico de la molienda, la hidrólisis ácida, así como también por el incremento en la temperatura por la conducción o disipación de la energía mecánica (por efecto de la fricción generada durante la molienda) que afectó tanto las zonas amorfas como cristalinas (Sanguanpong y col., 2003).

Cuadro 8. Porcentaje de cristalinidad relativa en el almidón nativo y con tratamiento.

Muestra	%Cristalinidad
Amilopectina	20.72
Almidón de maíz ceroso	20.26
Almidón de amaranto nativo	18.99
Almidón de amaranto hid p/mol	14.30
Almidón de amaranto con reducción	10.14

Morrison y col. (1994) observaron que el daño mecánico a los gránulos de almidón causado por el tratamiento en el molino de bolas induce la pérdida progresiva del orden cristalino y la conversión de grandes regiones ordenadas en un material esencialmente amorfo y desordenado que tiene libre acceso a los agentes externos como al agua o a las enzimas amilolíticas.

VI.3.3 Propiedades de pasta.

Se obtuvieron las propiedades de pasta del almidón de amaranto antes de someterlo a la molienda, hidrolizado con 4.3% de ác. clorhídrico por 4 horas (Amaranto hid p/mol) y del almidón sometido a la molienda en el equipo de alta energía Spex 8000L (Amaranto c/reducción); en el Cuadro 9 se muestran los valores obtenidos de las propiedades de pasta de las muestras de almidón de amaranto en este se puede observar que la viscosidad máxima y final del almidón de amaranto hid p/mol son mayores que las del almidón c/reducción en cuanto a la viscosidad mínima, de ruptura y de retrogradación no muestran diferencia significativa entre muestras.

En la Figura 16 a se muestran los viscoamilogramas de los almidones de amaranto procesados (el almidón hidrolizado y con tratamiento en el molino de bolas) y en ellos se aprecia que durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento el almidón hidrolizado presenta mayor viscosidad que el almidón con tratamiento en el molino de alta energía.

En la Figura 16 b se muestran los perfiles de viscosidad del almidón de amaranto nativo y de los procesados y se puede observar la disminución en las propiedades de pasta de los almidones procesados en comparación con el almidón nativo de amaranto esto indica que hubo un cambio en la integridad del gránulo a causa de los procesos a los que fue sometido. Este fenómeno se atribuye a la fragmentación del gránulo producido por el proceso de molienda (Martínez y col., 2007).

Cuadro 9. Perfil de viscosidad de los almidones de amaranto.

Muestra	Visc. máxima (cP)	Visc. mínima (cP)	Visc. de ruptura (cP)*	Visc. Final (cP)	Visc. de retrogradación (cP)**	Tiempo de visc. máxima (min)
Amaranto hid p/mol	20.50 a	11.00 a	9.50 a	19.00 a	8.00 a	5.53 a
Amaranto c/reducción	15.50 b	7.50 a	8.00 a	13.50 b	6.00 a	4.77 a

Las medias con letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

*Viscosidad de ruptura= Visc. Máxima - Visc. Mínima. ** Viscosidad de retrogradación= Visc. Final - Visc. Mínima.

Flores (2004) reportó la disminución de la viscosidad en los almidones de maíz, yuca y jícama tratados con HCl (al 1.8, 2.5 y 4.3%) y molidos en el equipo de alta energía en comparación con sus respectivos almidones nativos, además señaló que conforme se aumentó la concentración de ácido la viscosidad fue en descenso a consecuencia de la hidrólisis que se provoca en las regiones amorfas disminuyendo la porción de amilosa y aumentando la de polímeros más ordenados y cristalinos difíciles de ser hidratados y que gelifiquen.

Martínez y col. (2007) reportaron que la viscosidad a 90°C del almidón de jícama y de yuca se ve disminuida con el aumento en el contenido de humedad de la muestra, estos autores añaden que la fragmentación de los gránulos producida por la molienda es favorecida por el aumento en la humedad; también señalan que el incremento en el tiempo de molienda en el equipo de alta energía es otro factor que provoca la disminución de la viscosidad esto es atribuido a la fricción mecánica y la energía (calor local) generada durante el proceso.

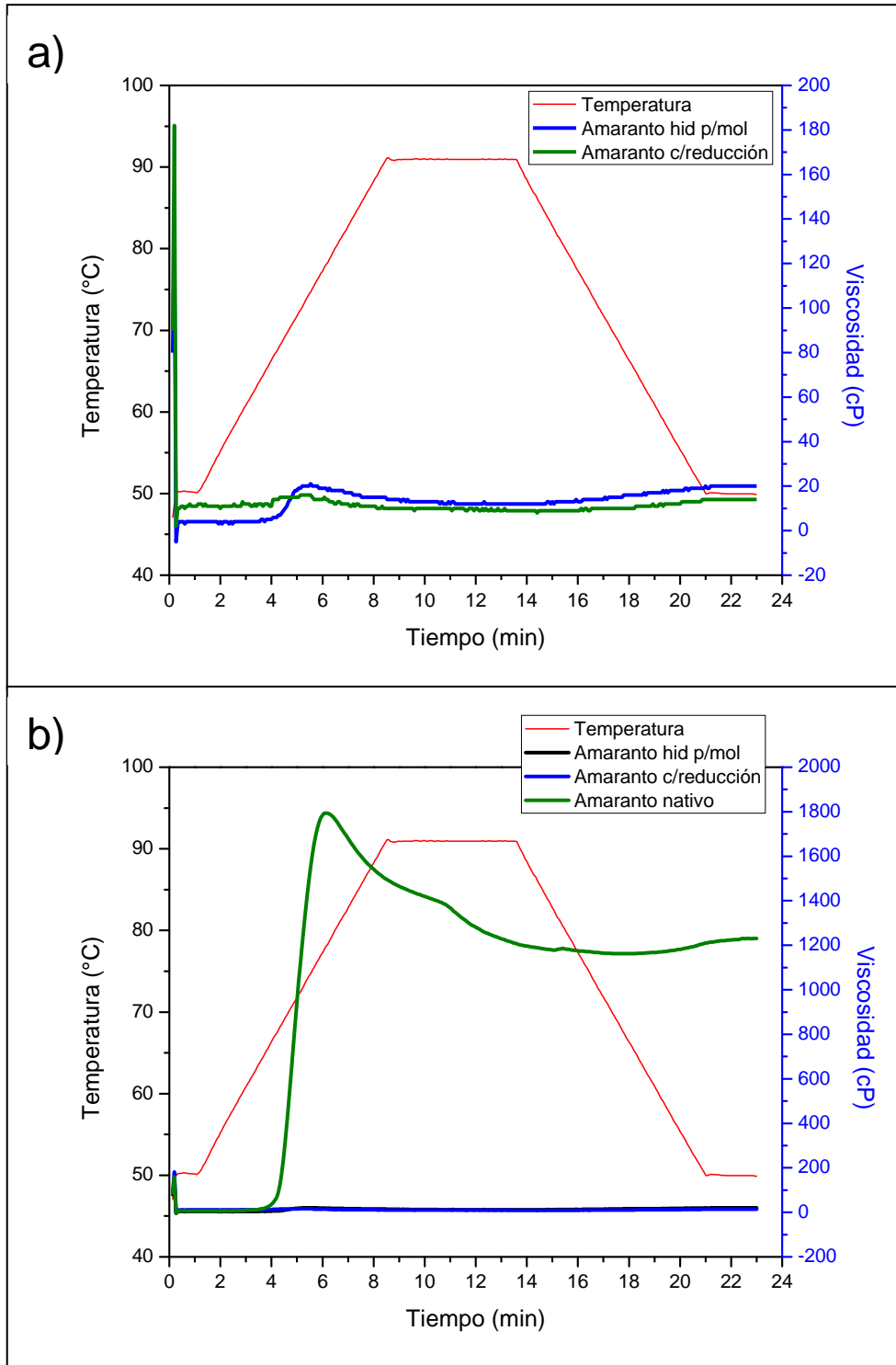


Figura 16. Perfil de viscosidad de los almidones de amaranto a) hidrolizado antes de la molienda y después del tratamiento en el molino de alta energía y b) almidón nativo y con tratamiento.

Morrison y Tester (1994) observaron que cuando el almidón de trigo es tratado en el molino de bolas, se obtienen distintos niveles de almidón dañado. La amilosa se ve afectada sólo después de la molienda severa, mostrando una ligera despolimerización. Alguna porción de la amilopectina se convierte en fragmentos de menor peso molecular y el tamaño molecular tiende a disminuir con el aumento del tiempo de molienda. El contenido de materiales solubles aumenta con el contenido de almidón dañado.

Se ha reportado que el incremento de almidón dañado causado por la molienda en el molino de bolas disminuye considerablemente los perfiles de viscosidad en almidones cerosos y normales. Es posible que la molienda cause la ruptura significativa de ciertos enlaces glicosídicos de las cadenas de amilopectina las cuales pueden causar caída de la viscosidad aparente (Flores, 2004).

VI.3.4 Propiedades térmicas.

Morrison y col. (1994) señalan que la temperatura de gelatinización es un índice acerca de la calidad del orden en la estructura de la amilopectina, mientras que la entalpía es el parámetro cuantitativo y éste último puede ser comparado con la criatalinidad o con el contenido de dobles hélices en la muestra.

En el Cuadro 10 se muestran los resultados obtenidos de las propiedades térmicas del almidón de amaranto nativo, el tratado con ácido clorhídrico (antes de la molienda) y el procesado en el molino de alta energía; en la Figura 17 se observan los termogramas de dichas muestras, en ellos se puede apreciar el pico o señal que refleja la transición del gránulo al estado gelatinizado (de un estado cristalino a uno amorfo), también se aprecia que los tratamientos aplicados al almidón provocaron cambios en las propiedades térmicas del mismo; como aumento en el rango de temperatura (ΔT) en la cual se produce la gelatinización y la disminución en la entalpía y en las temperaturas inicial y pico de gelatinización.

Los resultados del análisis térmico concuerdan con lo observado en los patrones de difracción de rayos x acerca del cambio o daño en la estructura cristalina causado por la fuerza mecánica del proceso de molienda (Huang y col., 2008). La variación

en T_i y ΔH también puede deberse a las diferencias en la cantidad de cadenas largas en la amilopectina, ya que se ha reportado que éstas requieren temperaturas más altas para ser disociadas completamente en comparación con las cadenas cortas (Singh y col., 2004).

Cuadro 10. Propiedades térmicas de los almidones de amaranto antes y después del tratamiento con el molino de alta energía.

Muestra	ΔH (J/g)	T_i (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)
Alm Nat Am	10.49	64.20	69.41	75.26	11.06
Alm Am Hid	9.03	63.67	68.8	75.21	11.54
Alm Am c/red	3.10	63.38	68.79	75.27	11.89

T_i = Temperatura inicial de gelatinización, T_p = Temperatura de pico, T_f = Temperatura final de gelatinización, ΔH = Entalpía de gelatinización y ΔT = $T_f - T_i$.

La acción del ácido fue predominante sobre la región amorfa, lo cual facilita la penetración de moléculas de agua, permitiendo un hinchamiento a menor tiempo, sin embargo, la penetración de las moléculas de agua a la región cristalina toma más tiempo lo que lleva a un amplio rango de temperatura, para completar el proceso de gelatinización (Flores, 2004).

Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por la literatura; Huang y col. (2008) observaron las propiedades térmicas del almidón de yuca y de maíz después de un tratamiento con el molino de bolas señalaron que las tres temperaturas (T_i , T_p y T_f) y el valor de la entalpía de gelatinización disminuyeron en comparación con el almidón sin tratamiento, también indican que después de dos horas de molienda la señal que corresponde al cambio de fase del almidón (gelatinización) desapareció en el termograma indicando un completo estado amorfo y de desorden en la muestra.

Martínez y col. (2007) reportaron una disminución en las temperatura de inicio, pico y final así como también en la entalpía del almidón de jícama y de yuca después del tratamiento con el molino de alta energía (durante 7.93 a 15 min) indicando que la molienda destruye la estructura de doble hélice terminando con el orden y la

cristalinidad de la muestra. Esta nueva zona amorfa formada a causa del daño por el tratamiento de molienda puede contener numerosos fragmentos de amilopectina de bajo peso molecular proporcionando mayor capacidad de solubilidad, accesibilidad al ataque enzimático y cambio en las propiedades térmicas como disminución o incluso ausencia de gelatinización endotérmica (Morrison y col., 1994).

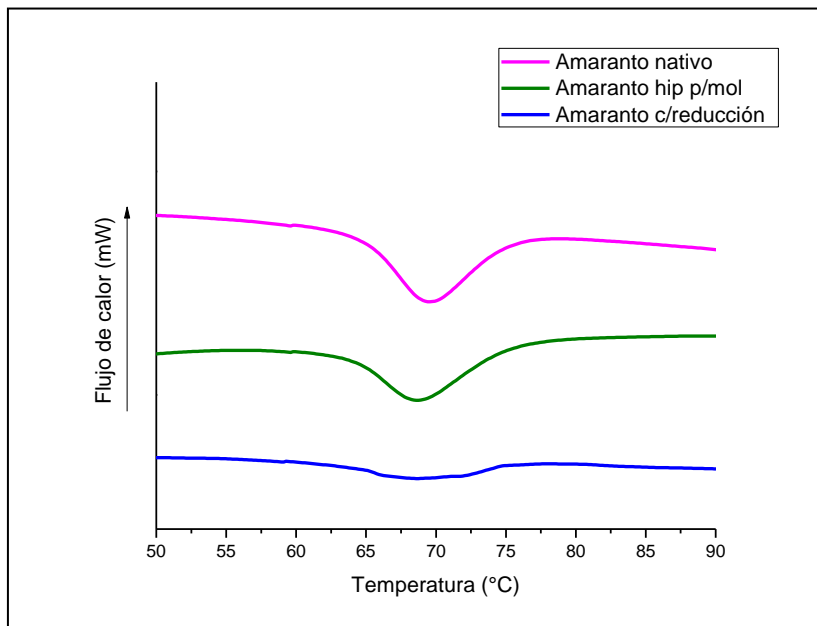


Figura 17. Termogramas de gelatinización de los almidones de amaranto antes y después del tratamiento con el molino de alta energía.

VI.3.5 Índice de absorción en agua e índice de solubilidad de agua.

El Índice de absorción de agua (IAA) se refiere a los gramos de agua que puede absorber 1 g de almidón en base seca cuando está en contacto con ésta durante cierto tiempo y a cierta temperatura (Guzmán, 2010). En el Cuadro 11 se presentan los valores obtenidos del IAA de las muestras de almidón de amaranto. Como se observa la muestra con hidrólisis antes del tratamiento con el molino de bolas (Hid p/mol) y la de almidón nativo tienen un valor menor de IAA y no hay diferencia significativa entre ellas ($p \leq 0.05$) en comparación con la muestra con reducción de tamaño de gránulo (c/red). Esto indica que después de la hidrólisis el gránulo no fue capaz de retener una mayor cantidad de agua, sin embargo, después de la

molienda la pérdida del orden estructural facilita la hidratación o penetración del agua y el incremento del área superficial debido a la reducción de tamaño puede ser otra razón para el aumento del IAA (Chen y col., 2010).

La variación en la capacidad de ligar o fijar agua obedece probablemente a las diferencias en la proporción de las zonas amorfas y cristalinas dentro del gránulo de almidón. La zona amorfa presenta una mayor capacidad de absorción de agua respecto a la región cristalina (Flores, 2004). También ha sido reportado que las diferencias de capacidad para absorber agua pueden ser atribuidas al grado de asociación intermolecular entre los polímeros de los almidones, debido a la fuerza de asociación entre los grupos hidroxilos y enlaces covalentes. Los valores bajos de absorción pueden estar relacionados con la asociación cercana de estos polímeros (Paredes y col., 1989). Martínez y col., (2007) reportaron valores de IAA de 3.21-3.83 y de 2.65-4.05 en almidón de jícama y yuca respectivamente variando el tiempo y la humedad del tratamiento en el molino de alta energía y observaron que al aumentar la temperatura del análisis o el tiempo de molienda el IAA también se incrementaba.

Cuadro 11. Índices de solubilidad y absorción de agua del almidón de amaranto.

Muestra (Almidón)	IAA	ISA (%)
Amaranto nativo	3.43 b	6.25 c
Am hidrolizado p/mol	3.44 b	11.56 b
Amaranto c/reducción	3.97 a	29.41 a

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El índice de solubilidad en agua (ISA) indica la cantidad de sólidos capaces de disolverse con el agua y se expresa en porcentaje (Guzmán, 2010). En el Cuadro 11 se aprecia que el ISA es mayor en las muestras con el tratamiento ácido y con la molienda en comparación con el almidón nativo. Esto está de acuerdo a lo reportado por Huang y col., (2008) que obtuvieron valores de solubilidad en almidón de yuca y maíz de 20 y 50% respectivamente, con 1 h de molienda; asimismo señalaron un incremento en la solubilidad del almidón conforme se aumentaba el

tiempo del tratamiento en el molino de bolas, ellos atribuyen esto a la agitación mecánica que es capaz de degradar la región cristalina del almidón permitiendo la entrada de agua al interior del gránulo.

Chen y col., (2010) observaron que conforme se disminuía el tamaño del gránulo del almidón de maíz el índice de solubilidad aumentaba. Estos autores lo atribuyeron al rompimiento progresivo de las estructuras de amilosa y amilopectrina con lo que se va disminuyendo la capacidad de absorción, además del aumento en el área de superficie. La alta energía generada por la fricción causa fragmentación en los gránulos de almidón ocasionando que el valor de ISA se incremente. Los gránulos sometidos a tratamientos con molino de bolas pierden su orden estructural y sufren daños en diferente grado. Los valores altos de ISA indican la presencia de grandes cantidades de sustancias solubles. Por lo tanto, el molino de alta energía conduce a la fragmentación del gránulo proveyéndole la capacidad de solubilización o suspensión en el agua durante periodos de tiempo prolongados (Martínez y col., 2007).

VI.3.6 Morfología del gránulo de almidón.

Las micrografías del almidón de amaranto hidrolizado con 4.3% de HCl antes de someterlo a la molienda con el equipo de alta energía se presentan en la Figura 18 y se aprecia que los gránulos de almidón tienen cierto daño en la superficie, algunos de ellos perdieron su forma llegando incluso a formar aglomeraciones; aunque otros se conservan intactos.

Sanguanpong y col. (2003) hidrolizaron el almidón de yuca antes de someterlo a la molienda de alta energía con 4% de HCl a 55°C por 6, 12 y 24 h, estos autores añadieron que a las 6 h el ataque del ácido únicamente ocurrió en la zona externa del gránulo modificando la superficie lisa del mismo por regiones un poco más ásperas; después de 12 h e incluso prolongando el tiempo a 24 h de hidrólisis había bastante corrosión e incluso hoyos en la superficie y se dio la aparición de partículas de menor tamaño.

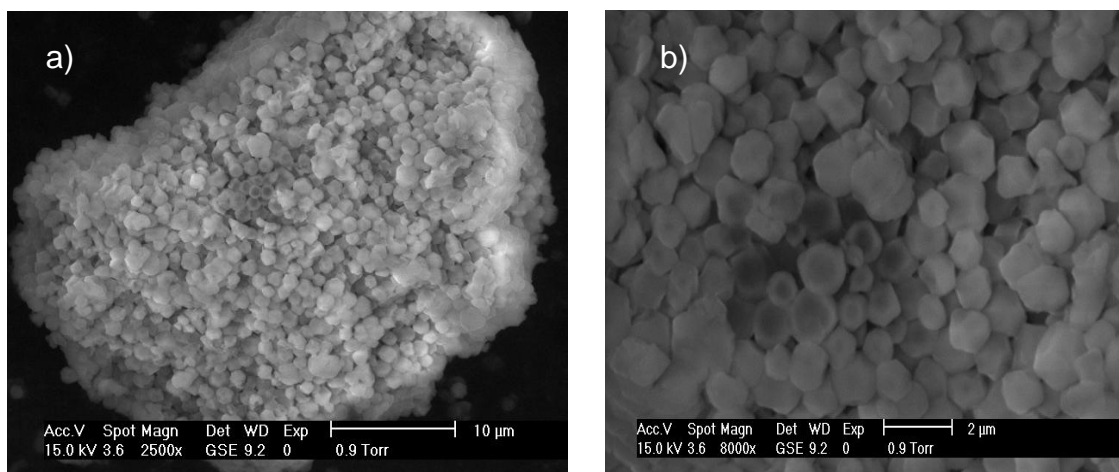


Figura 18. Microfotografías del almidón de amaranto hidrolizado a un aumento de a) 2500x y b) 8000x.

En la Figura 19 se presentan las micrografías del almidón de amaranto que recibió el tratamiento en el molino de bolas para la reducción de tamaño de gránulo. Como se observa varios de los gránulos están fracturados, este es el efecto ocasionado por los impactos de las bolas de zirconio aunque también se aprecian algunos gránulos que conservaron su forma y tamaño. La molienda de alta energía implica movimientos en tres direcciones ortogonales lo cual produce una colisión geométrica que lleva a la fragmentación de las partículas, con diferentes tipos de fracturas que dependen del ángulo de impacto (Maurice y Courtney, 1990; Martínez y col., 2007).

Los resultados señalados en el presente trabajo están de acuerdo con estudios anteriores. Tamaki y col., (1998) observaron los cambios en la estructura del almidón de maíz ceroso, normal y alto en amilosa a las 0, 20, 80 y 320 h de tratamiento en el molino de bolas señalaron que conforme transcurre el tiempo la superficie lisa de los gránulos se va perdiendo y se van formando cúmulos de los fragmentos que se van desprendiendo, hasta que los gránulos pierden por completo la forma y el tamaño que tenían inicialmente.

Jane y col., (1992) mostraron que el almidón de maíz después del tratamiento con molino de bolas (tratado con 70% de etanol y 2.5 % HCl a 25°C por 1.5h y 82°C por

2h y 8h en el molino de alta energía) presentó una forma más irregular y un tamaño de gránulo más pequeño en comparación con el almidón nativo; además señalaron la ausencia de la cruz de malta bajo la luz polarizada en el almidón con tratamiento como resultado de la disminución de simetría y orden en la muestra.

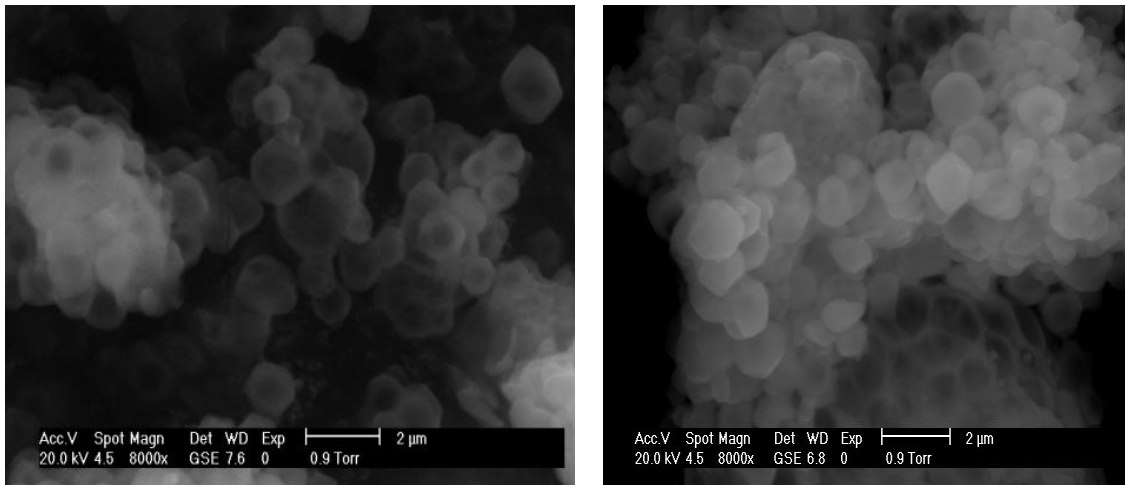


Figura 19. Microfotografías del almidón de amaranto con reducción de tamaño de gránulo a 8000x.

Martínez y col., (2007) reportaron gránulos de almidones de yuca y jícama hinchados, fracturados y con daño mecánico después del tratamiento por 15 min y con un contenido alto de humedad en el molino de alta energía; también señalan que cuando los gránulos de almidón se dispersan, se hinchan y absorben el agua disponible; se vuelven más susceptibles a la fragmentación mecánica. El daño mecánico es una transformación de la estructura de un orden a un desorden (amorfo) a través del rompimiento de enlaces intermoleculares.

VI.4 Caracterización de los almidones modificados por tratamiento químico y extrusión.

VI.4.1 Propiedades de pasta.

Los materiales convencionales que presentan una superficie activa se caracterizan por la presencia de grupos hidrofílicos y grupos hidrofóbicos en la molécula. Los voluminosos grupos hidrofílicos del succinato incrementan sustancialmente la

viscosidad de los almidones succinatados. En general los almidones modificados con anhídridos alquenil succínicos incrementan la viscosidad y disminuyen ligeramente la temperatura de gelatinización, mejoran la estabilidad de la pasta durante la retrogradación y en algunas ocasiones modifican la textura del almidón (Trubiano, 1989). Los monoésteres de almidón fosfatados son derivados aniónicos que presentan una viscosidad elevada, dispersiones más claras y estables que los almidones no modificados. Incrementos en el grado de sustitución (GS) disminuyen la temperatura de gelatinización (Solarek, 1989). Sin embargo, este es el efecto en la viscosidad que se espera obtener con las modificaciones de forma convencional, a continuación se presenta lo obtenido en el presente trabajo mediante el uso del proceso de extrusión.

Los almidones n-OSA no de-polimerizados son ocasionalmente utilizados en el secado por aspersión debido a su viscosidad elevada. Los almidones emulsificantes comerciales son sometidos a de-polimerización para reducir la viscosidad en una de tres maneras: hidrólisis ácida suave o hidrólisis ácida, pirodextrinización e hidrólisis enzimática (Murúa y col., 2009).

Los valores acerca del perfil de viscosidad de los almidones nativos y de los modificados se presentan en el Cuadro 12 en el cual se puede observar que después de los tratamientos de modificación (hidrólisis, fosfatación por extrusión y succinatación convencional con extrusión posterior) los valores de viscosidad disminuyeron considerablemente en comparación con los almidones nativos, es decir, que los almidones modificados son más estables durante el ciclo de temperatura, este fenómeno se observa tanto en las muestras del almidón de amaranto como en las de maíz ceroso. De acuerdo al análisis estadístico presentado en el Cuadro 12 no existen diferencias significativas entre los perfiles de los almidones modificados. El tiempo en el que se observa la viscosidad máxima de las muestras de almidones fosfatados y succinatados fue menor que para los almidones nativos e hidrolizados indicando que su estructura es menos ordenada (Shih y Daigle, 2003).

La conversión o hidrólisis involucra el tratamiento del gránulo de almidón con medios químicos y/o físicos para romper o fragmentar algunos o todos los gránulos de almidón, formando estructuras más débiles y disminuyendo por un lado su capacidad de hinchamiento cuando son calentadas en agua y por otro, disminuyendo el tamaño de las moléculas. Como resultado, la viscosidad de la solución producida cuando el almidón es calentado en agua se reduce, permitiendo que el almidón convertido o hidrolizado se disperse a mayores concentraciones de sólidos que el almidón sin modificar (Wurzburg, 1989).

Cuadro 12. Perfil de viscosidad de los almidones nativos y modificados.

Muestra	Visc. máxima (cP)	Visc. mínima (cP)	Visc. de ruptura (cP)	Visc. final (cP)	Visc. de retrogradación (cP)	Tiempo de visc. máxima (min)
Amaranto nativo	1771.0 b	1135.0 a	636.0 b	1203.5 a	68.5 b	6.1 a
Amaranto hidrolizado	21.0 c	12.5 c	8.5 c	22.5 b	10.0 c	5.3 a
Amaranto fosfatado	23.0 c	16.0 c	7.0 c	23.5 b	7.5 c	1.3 bc
Amaranto c/red fosfatado	15.5 c	4.5 c	11.0 c	8.0 b	3.5 c	1.3 bc
Amaranto succinatado	57.5 c	27.5 c	30.0 c	37.5 b	10.0 c	1.1 bc
Amaranto c/red succinatado	17.5 c	9.5 c	8.0 c	15.5 b	6.0 c	1.0 c
Maíz ceroso nativo	2590.0 a	896.5 b	1693.5 a	1194.5 a	298.0 a	6.1 a
Maíz ceroso hidrolizado	8.5 c	5.5 c	3.0 c	11.5 b	6.0 c	5.3 a
Maíz ceroso fosfatado	8.0 c	4.5 c	3.5 c	9.0 b	4.5 c	1.5 bc
Maíz ceroso succinatado	28.5 c	6.5 c	22.0 c	13.0 b	6.5 c	2.5 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por Kim y col. (1999) quienes fosfataron almidón de arroz (con tripolifosfato, trimetafosfato de sodio y una mezcla

50:50) mediante extrusión observando que después de la modificación los valores del perfil de viscosidad de las muestras eran menores que los del nativo.

Aunque se sabe que el entrecruzamiento generalmente aumenta la viscosidad por los enlaces intermoleculares que se forman, el proceso de extrusión causa daños en la estructura del gránulo de almidón y como resultado se tienen viscosidades máximas, mínimas, finales y tiempos de viscosidad máxima menores en comparación con los valores obtenidos para el almidón intacto, (Kim y col., 1999).

Murúa y col. (2009) observaron en los almidones de maíz normal y ceroso hidrolizados, fosfatados por extrusión termoplástica o succinatados convencionalmente (en condiciones similares a las de este estudio) perfiles de viscosidad menores en comparación con los almidones nativos o los modificados mediante métodos convencionales; atribuyendo este efecto a las condiciones severas a las que se somete a los almidones durante el proceso de extrusión.

En la Figura 20 a) se presentan la comparación entre los viscoamilogramas de los almidones nativos y de los modificados, se puede apreciar que prácticamente la viscosidad de los almidones modificados se mantiene estable durante todo el ciclo de temperatura además de ser baja en comparación con los perfiles de los almidones nativos. Esta es una característica común de los almidones extrudidos, en contraste con los nativos debido a la gelatinización parcial que se da durante la extrusión; además de la desintegración estructural del almidón debido a las condiciones de alta presión, temperatura y cizalla durante el proceso. Los gránulos de almidón dañados son más fácilmente penetrados por el agua, provocando una disminución en su temperatura de gelatinización pero produciendo bajos perfiles de viscosidad (Landerito y Wang, 2005).

La viscosidad es otra forma de evaluar el grado de degradación ocurrido durante el tratamiento térmico de materiales harinosos. Tratamientos severos destruyen la estructura granular del almidón, haciendo que la viscosidad disminuya (Thomas y Atwell, 1999).

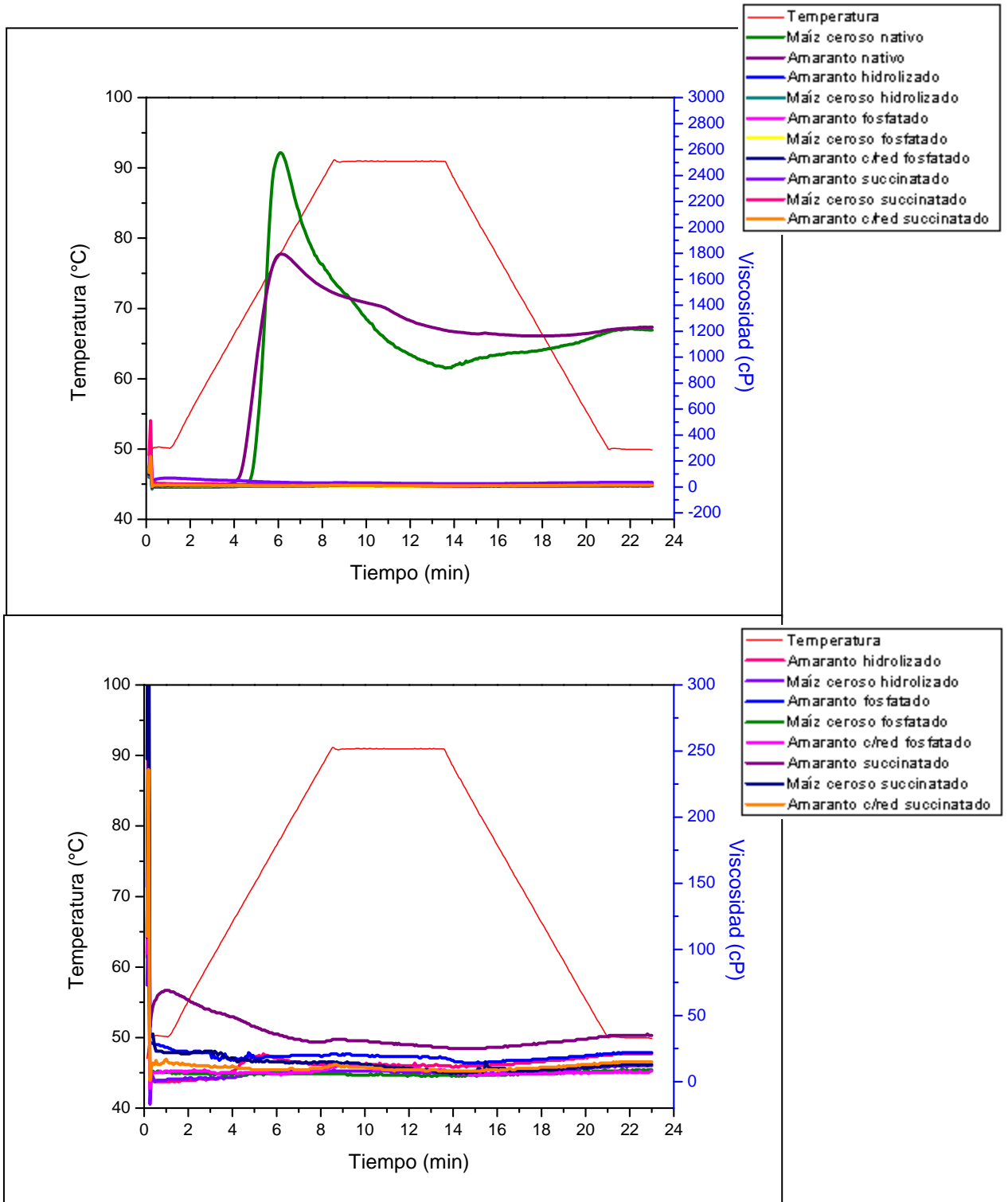


Figura 20. Perfil de viscosidad de los almidones a) comparación entre los almidones modificados y nativos y b) almidones hidrolizados, fosfatados y succinatados.

En la Figura 20 b) se presentan los viscoamilogramas únicamente de los almidones modificados y se puede observar que en general el perfil de viscosidad del almidón de amaranto succinatado presenta menos estabilidad teniendo una viscosidad máxima, mínima y final más alta que el resto.

Este aumento en la viscosidad del almidón de amaranto succinatado se debe muy posiblemente a tres razones: a una alta capacidad de hinchamiento del almidón provocada por la integración de grupos funcionales muy voluminosos como el octenil succinato, los cuales causan una reorganización estructural, repulsión y debilitamiento de la asociación intermolecular (impedimento estérico), facilitando la entrada de agua al gránulo aumentando su volumen; otra alternativa es el efecto asociativo de las cadenas hidrofóbicas del almidón succinatado, las cuales interactúan formando una especie de red que provoca un aumento en la viscosidad; por último, es conocido que la amilosa suele formar complejos con ciertos compuestos como alcoholes, yodo, ácidos grasos, surfactantes, con el octenil succinato etc., lo cual también es un factor que influye en el aumento de la viscosidad por lo que se ha reportado en estudios anteriores (Tukomane y Varavinit, 2008). El último caso explica por qué sólo el almidón de amaranto succinatado presenta el aumento de viscosidad, al poseer mayor cantidad de amilosa en comparación con el almidón de maíz ceroso, además de que es muy posible que este fenómeno tampoco se haya presentado en el almidón de amaranto con reducción de tamaño de gránulo por el daño estructural que causó la molienda.

VI.4.2 Propiedades térmicas.

En el Cuadro 13 se muestran las propiedades térmicas de los almidones nativos e hidrolizados, de manera general la entalpía de gelatinización de ambos almidones disminuyó después del tratamiento de hidrólisis, es decir, que se requirió una cantidad menor de energía para romper la estructura del gránulo después de la hidrólisis. En cuanto al rango de temperatura de gelatinización (ΔT) y a las temperaturas de gelatinización (T_i , T_p y T_f) de los almidones hidrolizados son mayores que los valores obtenidos en los almidones nativos, generalmente las

temperaturas de gelatinización se relacionan al grado de perfección de los cristales en el almidón (Bhandari y Singhal, 2002).

Flores (2004) obtuvo valores mayores en las temperaturas de gelatinización de almidones hidrolizados de maíz, jícama y yuca (HCl al 1.8, 2.5 y 4.3% por 4 horas) en comparación con las muestras nativas, lo cual fue atribuido a la hidrólisis predominante en las zonas amorfas dejando intactas las regiones cristalinas en las cuales penetra más difícilmente el agua retardando el proceso de gelatinización y dando como resultado una endoterma más a y formada a mayor temperatura, además, se planteó la posibilidad de la amplia formación de nuevos enlaces que establecieron una estructura que requiere mayor temperatura de transición para alcanzar la gelatinización.

Cuadro 13. Propiedades térmicas de los almidones nativos e hidrolizaados.

Muestra	ΔH (J/g)	Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)
Amaranto nativo	10.49	64.2	69.41	75.26	11.06
Amaranto hidrolizado	9.64	66.58	71.62	77.85	11.27
Maíz ceroso nativo	15.19	64.68	70.28	77.75	13.07
Maíz ceroso hidrolizado	6.48	65.11	72.63	83.62	18.51

Como se puede observar en la Figura 21 los almidones fosfatados y succi natados no presentaron endotermas de gelatinización. Esto se debe a la adición de grupos voluminosos como los succinatos y fosfatos los cuales ayudan en la desestabilización de la estructura del almidón, provocando una disminución en la resistencia a la termotransición (Landerito y Wang, 2005; Shih y Daigle, 2003).

Con la succinatación del almidón se da el debilitamiento de los enlaces de hidrógeno por la hidrofobicidad de los grupos alquenilos, contribuyen al hinchamiento de los gránulos a menores temperaturas provocando entalpías y temperaturas de gelatinización bajas y a mayor grado de sustitución se ven valores más bajos de las propiedades térmicas; a nivel molecular se da la ruptura de algunos enlaces de hidrógeno existentes entre las moléculas de almidón y la formación de nuevos enlaces que envuelven moléculas de agua dando como

resultado una estructura de menor orden y un aumento en la entropía (Bhandari y Singhal, 2002).

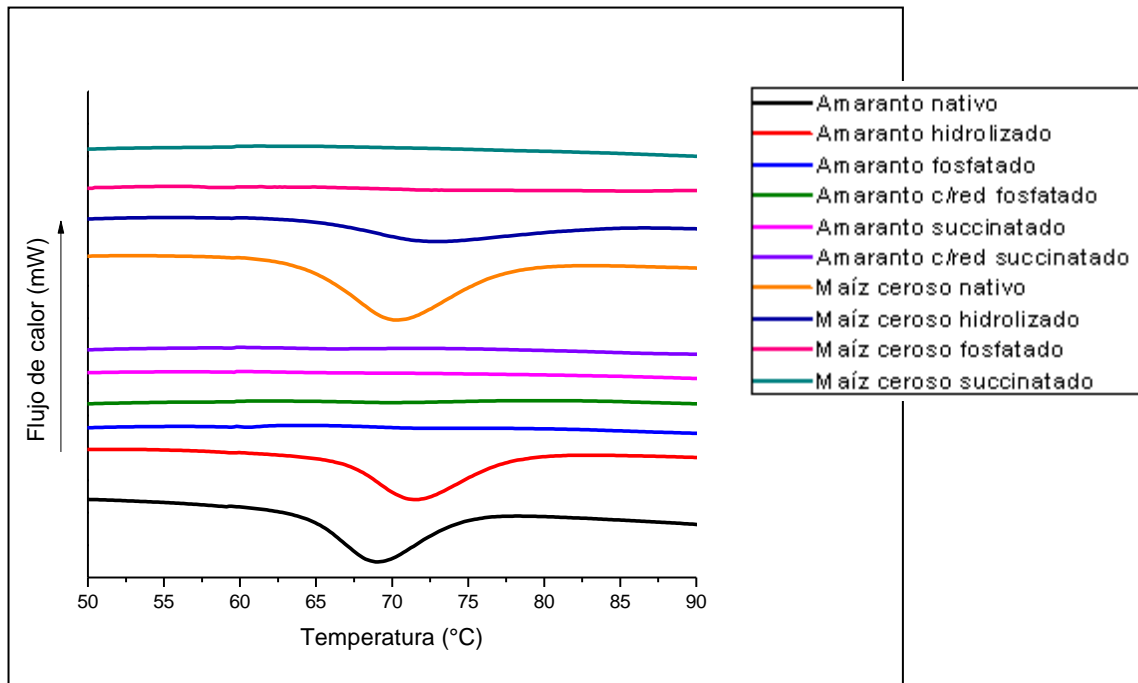


Figura 21. Termogramas de gelatinización de los almidones nativos y modificados.

Otro factor que también se debe de tomar en cuenta es el efecto del proceso de extrusión que da un cambio en la estructura cristalina ya que durante la extrusión, el almidón es sometido a alta cizalla, presión y temperatura. Los gránulos de almidón se rompen por cizallamiento y las regiones cristalinas de los gránulos son gelatinizadas parcialmente. Las cadenas de amilosa y amilopectina son despolimerizadas, pero en presencia de agua, algunas cadenas se reasocian mediante enlaces de hidrógeno antes de salir de la boquilla del extrusor todos estos efectos pueden ser parciales o bien afectar a los gránulos en su totalidad dependiendo de las condiciones en las cuales se lleva a cabo el proceso de extrusión (Guan y Hanna, 2004).

VI.4.3 Índice de absorción en agua e índice de solubilidad de agua.

Las propiedades de absorción y solubilidad en agua de materiales elaborados a partir de almidón son importantes, por ejemplo si estos se pretenden utilizar como

materiales de pared en el proceso de encapsulación, la solubilidad y dispersión en agua son propiedades deseadas, sin embargo, para elaborar otros productos no es conveniente que el material absorba agua ya que esto ocasiona cambios en las propiedades funcionales, estructurales, etc. del material (Guzmán, 2010).

En el Cuadro 14 se muestran los valores del ISA e IAA para los almidones nativos y modificados de amaranto y maíz ceroso, donde se puede observar que de manera general los almidones nativos e hidrolizados tuvieron un IAA menor que los modificados. Asimismo los almidones succinatados absorbieron más agua que los fosfatados. Las muestras de almidón de amaranto tiene IAA mayores que las de maíz ceroso lo cual es resultado del tamaño tan pequeño de gránulo que tiene el almidón de amaranto proporcionándole un área mayor de contacto con las moléculas de agua (Sitohy y col., 2000).

Cuadro 14. Índices de solubilidad y absorción de agua de los almidones nativos y modificados.

Muestra	IAA	ISA (%)
Amaranto nativo	3.43 e	6.25 g
Amaranto hidrolizado	3.31 e	11.50 f
Amaranto fosfatado	4.92 b	71.66 c
Amaranto succinatado	5.52 a	61.42 e
Amaranto c/red fosfatado	4.25 c	74.21 b
Amaranto c/red succinatado	5.04 b	67.47 d
Maíz ceroso nativo	2.68 f	2.92 h
Maíz ceroso hidrolizado	2.53 f	7.22 g
Maíz ceroso fosfatado	3.77 d	68.02 d
Maíz ceroso succinatado	4.86 b	83.92 a

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El almidón nativo requiere de agua caliente para poder absorberla debido a la compactación estructural y a los enlaces de hidrógeno de las moléculas dentro del gránulo. Después de la modificación, el efecto de repulsión entre los grupos incorporados facilita la penetración del agua en el gránulo; además de que el proceso de extrusión también contribuye al aumento de la capacidad de absorción (Landerito y Wang, 2005).

Se ha observado que en el caso de los almidones con bajo contenido de amilosa que conforme se aumenta el grado de sustitución de fósforo disminuye el índice de absorción; esto es posiblemente debido a la formación de entrecruzamientos entre los polímeros, disminuyendo su capacidad de hidratación (San Martín y col., 2004).

Cuando se modifica el almidón se produce una degradación de los biopolímeros de éste, formándose fragmentos que generalmente son solubles en agua; por ello el ISA es un buen indicador del grado de degradación (dextrinización) (Hevia y col., 2002).

En el Cuadro 14 se puede observar el comportamiento del ISA en los almidones nativos y modificados, en general los almidones fosfatados presentan índices mayores en comparación con los succinatos aunque en el caso del maíz ceroso ocurrió lo contrario. Se presentó un aumento en el ISA al realizar las modificaciones siendo los almidones de amaranto con y sin reducción de tamaño de gránulo fosfatados y el almidón de maíz ceroso succinatado los que resultaron más solubles con valores de ISA de 74.21, 71.66 y 83.92% respectivamente. El proceso de hidrólisis ácida y las severas condiciones de extrusión (alta temperatura y presión y bajo contenido de agua) causaron la dextrinización del almidón, resultando en valores de ISA superiores a 50% en los almidones modificados (Murúa y col., 2009).

Hevia y col., (2002) reportaron valores de IAA que varían de 2.27 a 2.50 y de ISA de 4.54 a 8.94% para el almidón nativo de *Amaranthus spp.* González y col., (2007) obtuvieron IAA en un rango de 1.75- 3.49 e ISA de 54.07- 72.58% en almidones de *Amaranthus cruentus* extrudidos con humedades de 120, 160 y 200 g/kg en base húmeda y utilizando temperaturas de 150, 175 y 200°C. Pérez y col., (1993) modificaron con tripolifosfato de sodio almidones de *A. hypocondriacus* y de *A. cruentus* obteniendo valores de ISA de 4.54 y 41.77, 3.89 y 21.58% en las muestras nativas y fosfatadas, respectivamente.

Murúa y col., (2009) señalaron valores de IAA de 2.22, 2.43, 5.25 y 3.10 y de ISA de 2.6, 3.6, 87.98 y 86.84% para almidones de maíz ceroso nativo, hidrolizado,

fosfatado y succinatado, respectivamente con tratamientos y condiciones muy similares a las utilizadas en este trabajo. Martínez (2007) encontró en almidones nativos, fosfatados y succinatados de maíz ceroso y arroz IAA de 2.68 y 3.55, 1.79 y 2.27, 1.60 y 1.71 respectivamente; también señaló ISA de 2.96 y 5.1, 21.81 y 19.01, 14.3 y 21.26% para los mismos almidones y tratamientos respectivamente.

En general las diferencias entre el almidón de amaranto y el de maíz ceroso que se presentan en los valores de ISA e IAA pueden atribuirse a las variantes estructurales, la composición del gránulo en cuanto al contenido de amilosa-amilopectina, al tamaño de gránulo, fuerzas de interacción inter e intramoleculares en los gránulos, etc. (Martínez, 2007).

Finalmente, existe una fuerte relación entre el IAA y el ISA ya que se ha visto que ambos son el resultado de la pérdida estructural de la doble hélice. Se ha propuesto que la fuerza de enlace dentro de los gránulos de almidón afecta a su capacidad de absorción de agua, por lo tanto los gránulos con una estructura unida fuertemente muestran una baja capacidad de absorción y de solubilidad. De esta manera, con las modificaciones químicas que implican la introducción de ciertos grupos en los gránulos de almidón puede reducirse la fuerza de los enlaces ocasionando el incremento de la absorción y de la solubilidad en agua (Sitohy y col., 2000).

VI.4.4 Grado de sustitución de fósforo.

En el Cuadro 15 se muestran los valores obtenidos del contenido de fósforo y los valores del grado de sustitución (GS) calculados para los almidones nativos y fosfatados por extrusión termoplástica de amaranto y maíz ceroso. Se encontró cierta cantidad de fósforo en los almidones nativos en un porcentaje de 0.236 (GS= 0.012) en el almidón de amaranto y de 0.175 (GS= 0.009) en el de maíz ceroso. Zilli, (2005) encontró valores de GS de 0.011 en el almidón de maíz ceroso nativo y Pérez y col., (1993) reportó contenidos de fósforo de 0.46 y 0.13 en almidones nativos de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* respectivamente. El GS de fósforo encontrado en el almidón fosfatado de maíz ceroso y de amaranto con reducción

fue de 0.041 y el de amaranto fosfatado fue de 0.039 valores superiores a los encontrados por Zilli, (2005), que reportó valores de 0.023 a 0.026 para almidones de maíz y malanga fosfatados por extrusión.

Pérez y col., (1993) modificaron almidones de *A. hypocondriacus* y *A. cruentus* con tripolifosfato de sodio por el método convencional obteniendo un contenido de fósforo de 0.25 y 0.20% respectivamente. Chang y Lii, (1992) reportaron valores máximos de GS de 0.040 en almidones de maíz y yuca empleando 4% de TPS al 15% de humedad y 200 °C de temperatura de extrusión lo cual concuerda con lo señalado en este trabajo. Landerito y Wang, (2005) obtuvieron un contenido de fósforo de 1.637% en almidón de maíz ceroso fosfatado por extrusión con una combinación de tripolifosfato y trimetafosfato de sodio. Kim y col., (1999) encontraron un contenido de fósforo de 0.376% en almidón de arroz usando 4% de tripolifosfato de sodio a 180 °C.

Cuadro 15. Contenido de fósforo y grado de sustitución de los almidones nativos y fosfatados por extrusión termoplástica.

Muestra	% Fósforo	GS Fósforo
Amaranto nativo	0.236 d	0.012c
Amaranto fosfatado	0.729 c	0.039 b
Amaranto c/red fosfatado	0.750 b	0.041 a
Maíz ceroso nativo	0.175 e	0.009 d
Maíz ceroso fosfatado	0.769 a	0.041 a

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El conocimiento sobre los cambios estructurales en el gránulo de almidón causados por la modificación química es de importancia para la comprensión de los cambios en las propiedades funcionales, y para el desarrollo de almidones modificados con las propiedades deseadas. Se ha reportado que el entrecruzamiento de las cadenas del almidón es producido mayormente en la amilopectina. Otro factor que influye en el grado de entrecruzamiento es el tamaño del gránulo ya que se ha visto que los gránulos pequeños son derivatizados en mayor medida que los más grandes (Singh y col., 2007). Estos son algunos

factores por los que el almidón de maíz ceroso y el de amaranto con reducción de tamaño de gránulo obtuvieron los GS más altos.

VI.4.5 Grado de sustitución de succinato.

La FDA establece un nivel máximo de agregado de OSA como agente modificante de almidones para su utilización en alimentos del 3%. El grado de sustitución (GS) es el número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por unidad de glucosa. En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos con relación al porcentaje de succinato y grado de sustitución en los almidones succinatados. Se encontró que el almidón de maíz ceroso obtuvo al valor más alto de GS (0.041) siendo el almidón de amaranto el del menor GS (0.025).

Cuadro16. Contenido de succinil y grado de sustitución de los almidones succinatados.

Muestra	% Succinato	GS Succinato
Maíz ceroso succinatado	2.485 a	0.041 a
Amaranto c/red succinatado	2.012 ab	0.033 ab
Amaranto succinatado	1.537 b	0.025 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Estos resultados son mayores a los encontrados por Bhosale y Singhal (2006) quienes reportaron un máximo de 0.02 para almidón de amaranto (especie *paniculatus*) y maíz ceroso succinatados con 3% de anhídrido n-octenil succínico, a 30 °C, pH de 8.0 por 6 h y 24 h respectivamente. Manni y col., (2008) obtuvieron un GS de 0.025 en almidón de amaranto (*A. mantegazzianus*) succinatado con 3% de anhídrido n-octenil succínico. Jeon y col. (1999) reportaron un GS de 0.038 en almidón de maíz ceroso succinatado, llevando a cabo la esterificación con una concentración de anhídrido dodecenil succínico al 10% en condiciones similares a las descritas en este trabajo.

Después de la modificación química, los almidones n-OSA son efectivos emulsificantes debido a la adición de grupos bifuncionales (hidrofóbicos e hidrofílicos), característica necesaria para la retención de aceite durante la encapsulación (Tesch y col., 2002). Las diferencias en los valores del GS

reportados por otros autores y los encontrados en este trabajo pueden ser debidas a diferencias en las condiciones de la modificación, fuente de los almidones, métodos de análisis, al tipo y concentración empleada de los reactivos.

VI.4.6 Morfología del gránulo de almidón.

En la Figura 22 se presentan las microfotografías del almidón de maíz ceroso (a) y de amaranto (b) después de la hidrólisis con HCl al 3.4%, a 50 °C por 6 h; como se puede apreciar, en general la estructura granular del almidón se conservó, sin embargo, se alcanzan a observar algunas aglomeraciones, pequeños daños y cambios en la superficie de algunos gránulos estas observaciones están de acuerdo con lo reportado por Manni y col., (2008) quienes hidrolizaron almidón de amaranto antes de modificarlo y observaron aglomerados irregulares, pérdida parcial de la forma característica y puntos de penetración (pitting) en los gránulos.

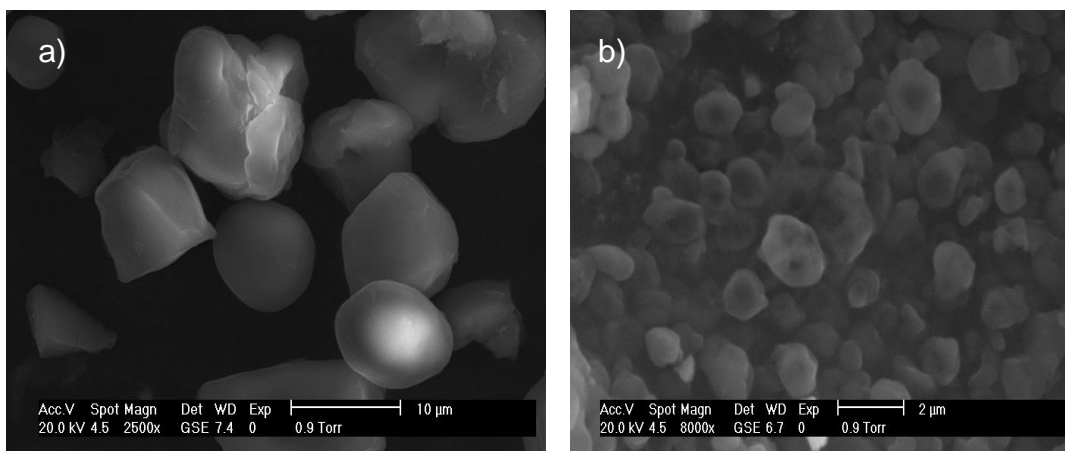


Figura 22. Microfotografías de los almidones modificados por hidrólisis ácida (HCl 3.4 %, 50°C por 6 horas). a) Maíz ceroso a 2500x, b) Amaranto a 8000x.

Jiping y col., (2007) hidrolizaron almidones con patrones de difracción del tipo B y C con HCl al 2.2 M, a 35 °C por 2, 4, 8, 16, y 32 días y en base a los resultados del SEM señalaron que el daño en el gránulo se va incrementando con el paso del tiempo y que la hidrólisis no se produce de manera uniforme, algunas áreas son más susceptibles, aunque en un principio el ácido actúa atacando únicamente la superficie y formando grietas para luego penetrar al interior. Además notaron que

los gránulos más pequeños se hidrolizan más rápidamente debido a que tienen una mayor superficie disponible.

Por otro lado se ha visto que la hidrólisis se realiza en dos etapas en la primera etapa no hay pérdida de birrefringencia lo que sugiere que el ácido ataca las partes amorfas, seguido por un ataque más lento en ambas fracciones sobre todo en la zona cristalina (Lee y col., 2006).

Posteriormente a la hidrólisis, el almidón fue modificado por extrusión (fosfatación) o bien modificado convencionalmente y posteriormente extrudido (succinatación), para darle al almidón propiedades deseadas en los materiales encapsulantes (características emulsificantes, alta solubilidad y baja viscosidad).

En las Figuras 23 (a, b, c) y 24 (a, b, c) se muestran las microfotografías de los almidones de amaranto y maíz ceroso modificados, se observa un cambio drástico en la estructura de estos, tanto en forma, como en tamaño, en comparación con los almidones nativos.

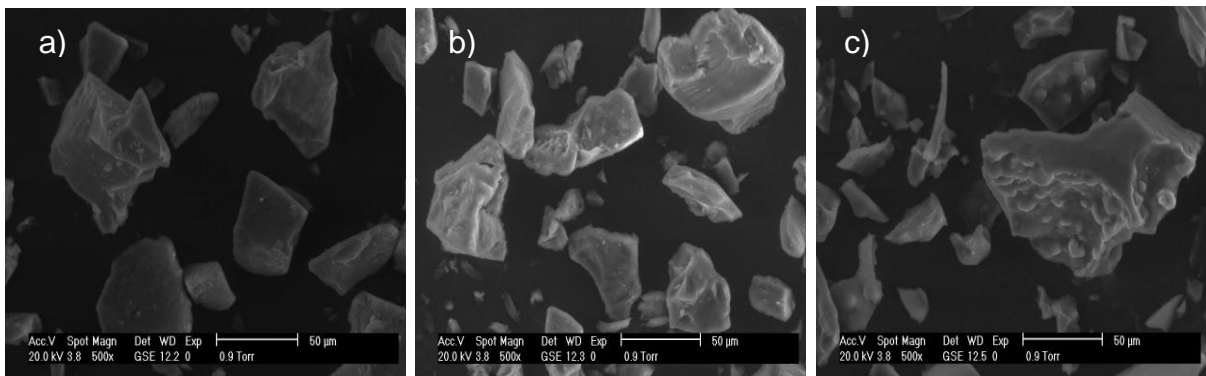


Figura 23. Microfotografías de los almidones fosfatados por extrusión termoplástica a 500x. a) Amaranto con reducción de tamaño de partícula, b) amaranto y c) maíz ceroso.

Debido al tratamiento severo del extrusor los almidones modificados sufren un mayor grado de hidrólisis o dextrinización con respecto a los almidones hidrolizados; esto se debe a la fragmentación de las cadenas de amilosa y amilopectina (Cereda, 2000).

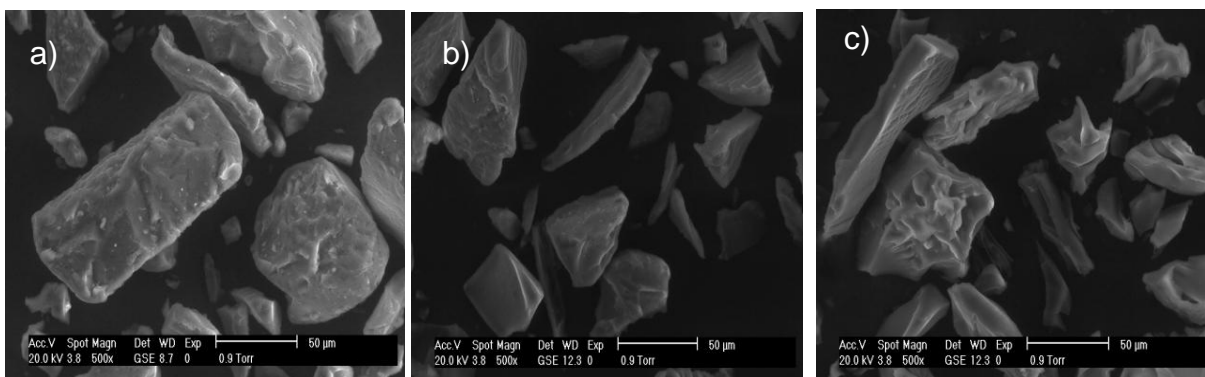


Figura 24. Microfotografías de los almidones succinatados por extrusión termoplástica a 500x. a) Amaranto con reducción de tamaño de partícula, b) amaranto y c) maíz ceroso.

VI.5 Caracterización de las microcápsulas.

VI.5.1 Actividad de agua.

El agua puede existir en los alimentos en forma libre, ligada y como agua de hidratación. Para ser aprovechada por los microorganismos debe encontrarse en una forma fácilmente disponible, es decir, libre (Fernández, 2000). Los microorganismos necesitan la presencia de agua en una forma disponible para desarrollarse y llevar a cabo sus funciones vitales. Cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con actividad de agua menor que la necesaria su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele estar asociada a la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de latencia (Guzmán, 2010).

La actividad de agua (a_w) está también relacionada, junto con otros factores como temperatura, exposición a la luz y al oxígeno, con la estabilidad y el tiempo de almacenamiento de los alimentos (Martínez, 2007). En el Cuadro 17 se presentan los valores de actividad de agua de las microcápsulas de almidones modificados, tomados inmediatamente después del secado. En general todas las muestras presentan valores bajos lo cual es conveniente para mantener la integridad física de la microcápsula y el estado de latencia del microorganismo.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Murúa y col. (2009) que produjo microcápsulas de aceite de naranja mediante secado por aspersión, utilizando como material de pared almidón modificado por extrusión, señaló valores de a_w de 0.147 y 0.145 para almidón fosfatado y succinatado, respectivamente.

Cuadro 17. Actividad de agua de las microcápsulas preparadas con los almidones modificados.

Microcápsulas	a_w
Amaranto succinatado	0.185 a
Amaranto fosfatado	0.136 d
Amaranto c/red succinatado	0.157 c
Amaranto c/red fosfatado	0.188 a
Maíz ceroso succinatado	0.174 b
Maíz ceroso fosfatado	0.171 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

VI.5.2 Morfología de las microcápsulas.

La microestructura afecta la funcionalidad, estabilidad y dispersión de las microcápsulas. Además los estudios de la morfología de las partículas durante o después del secado proporcionan información adecuada acerca de cómo se llevó a cabo el proceso, así como de los factores físicos y químicos que determinan la estructura de la cápsula. Las microcápsulas pueden presentar una amplia variedad de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) (Shahidi y Han, 1993).

En la Figura 25 se exponen las microfotografías de las microcápsulas preparadas con los almidones modificados de maíz ceroso; en la Figura 26 las realizadas con los almidones modificados de amaranto y finalmente en la Figura 27 las elaboradas con los almidones modificados de amaranto con reducción de tamaño de gránulo.

En general se observa que las microcápsulas obtenidas presentaron estructuras con superficie lisa, no regular, en forma de esferas irregulares con abolladuras, pero sin porosidades ni grietas. Se postula que las abolladuras pueden ser formadas por la contracción de las partículas durante el secado y enfriado (Escalona, 2004); además se obtuvieron cápsulas con una gran variedad de tamaños pertenecientes a la misma muestra, se produjeron cápsulas que van desde aproximadamente 5 μ m hasta 30 μ m.

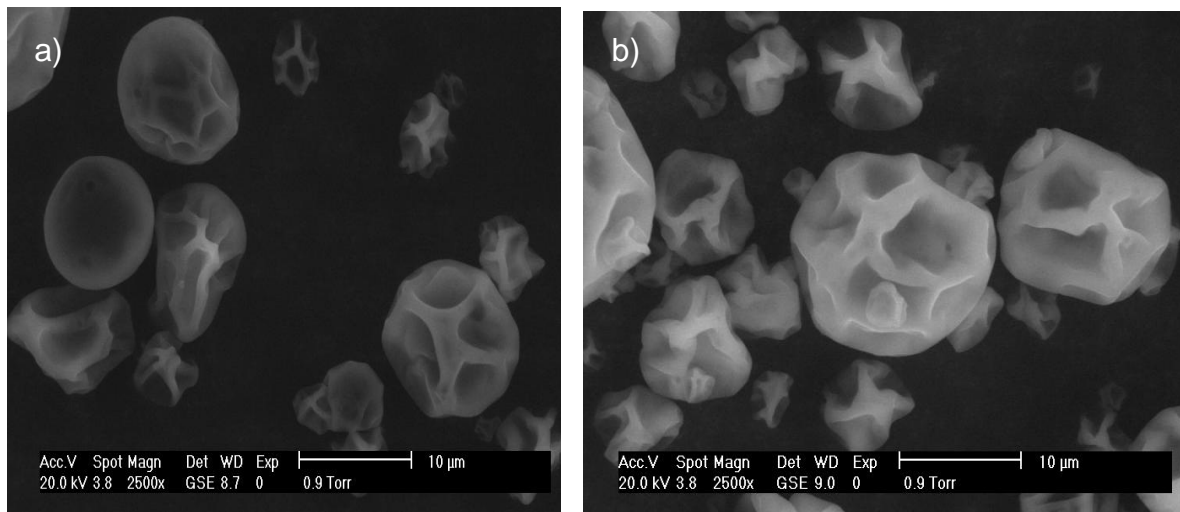


Figura 25. Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de maíz ceroso a 2500 X. a) Almidón fosfatado y b) almidón succinatado.

Jafari y col. (2007) reportaron una morfología muy similar a la señalada en este trabajo en microcápsulas de d-limoneno y de aceite de pescado obtenidas mediante secado por aspersión y utilizando como material de pared una mezcla de maltodextrinas y almidón modificado.

Por otro lado Krishnan y col. (2005) encapsularon oleorresina de cardamomo mediante secado por aspersión con goma arábica, maltodextrinas o almidón comercial modificado como materiales de pared e informaron que las microcápsulas fueron de diversos tamaños, con abolladuras y de formas irregulares, es decir, estructuras muy similares a las presentadas en este estudio.

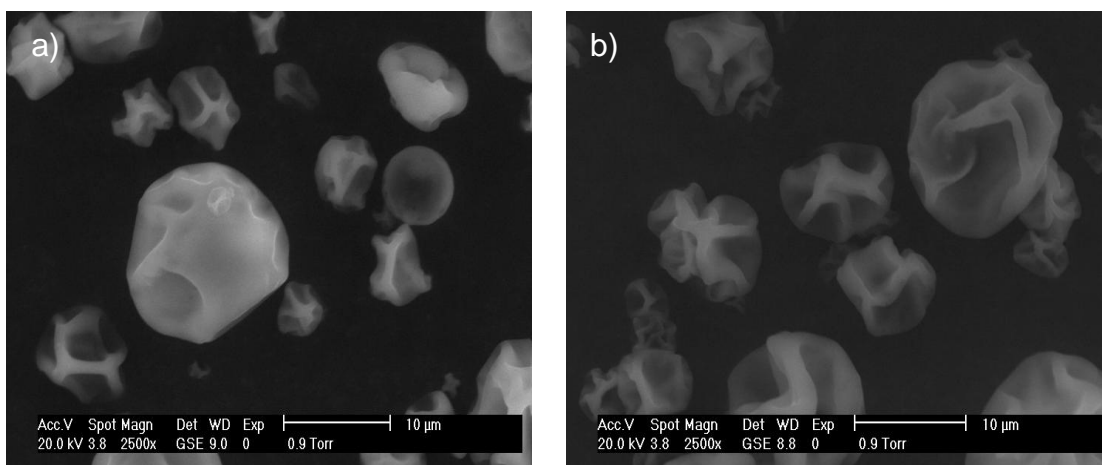


Figura 26. Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de amaranto a 2500X. a) Almidón fosfatado y b) almidón succinado.

Los espacios centrales en las cápsulas obtenidas, se atribuyen a la expansión de la microcápsula (o “ballooning”) asociada con el incremento de la temperatura al salir de la última etapa del secado por aspersión (Escalona, 2004). Para lograr una adecuada protección del material activo, se requiere que las paredes de las microcápsulas estén libres de fracturas o poros, además en ocasiones la presencia de indentaciones o concavidades afecta el libre flujo y las propiedades de reconstitución de los polvos (Murúa y col., 2009).

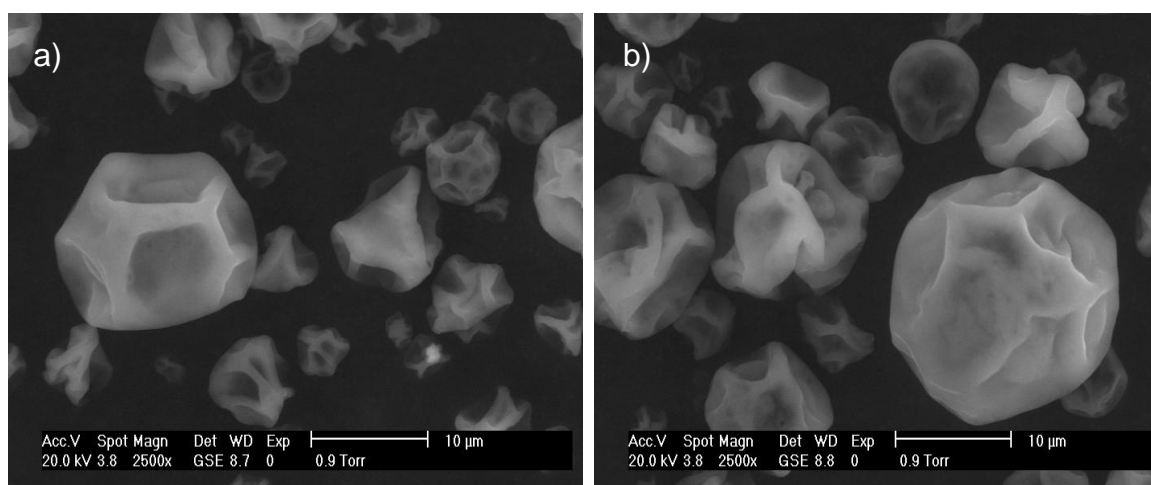


Figura 27. Microfotografía de las microcápsulas preparadas con almidón modificado de amaranto con reducción de tamaño de partícula a 2500X. a) Almidón fosfatado y b) almidón succinado.

VI.5.3 Tamaño de partícula.

Las mediciones del tamaño de partícula son comunes en todo proceso físico, mecánico o químico debido a que el comportamiento del material está relacionado directamente con las propiedades físicas de los productos (Murúa y col., 2009). Aunque hay diversas opiniones del intervalo de tamaño al que pertenecen las microcápsulas, puede decirse que van desde 0.2 a 5000 μm (Ré, 1998).

En el Cuadro 18 se muestran los diámetros medios de las microcápsulas obtenidas con los 6 diferentes materiales de pared; los cuales no muestran diferencias significativas entre ellos en cuanto al tamaño de partícula.

Estos resultados son similares a lo reportado por Guzmán (2010) que obtuvo tamaños de partícula de 13.12 y 7.55 μm para microcápsulas de almidones fosfatados de maíz ceroso y yuca respectivamente producidas por secado por aspersión con temperatura del aire de entrada de 180°C y temperatura del aire de salida de 110°C +/- 5°C.

Cuadro 18. Diámetro medio de partícula de microcápsulas de *B. thuringiensis* preparadas con diferentes materiales de pared.

Muestra (Microcápsulas)	Diámetro medio de partícula (μm)
Amaranto fosfatado	17.14 a
Maíz ceroso succinatado	16.38 a
Amaranto succinatado	15.09 a
Amaranto c/red succinatado	12.94 a
Maíz ceroso fosfatado	12.51 a
Amaranto c/red fosfatado	12.42 a

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Murúa y col. (2009) obtuvieron microcápsulas de almidones fosfatados por extrusión y succinatados y extrudidos con diámetros medios de partícula mayores que fueron de 29.09 y 32.71 μm mediante secado por aspersión en condiciones similares a las del presente trabajo.

El tamaño de partícula de las microcápsulas es primordialmente determinado por las propiedades físicas de la emulsión (como la viscosidad y la concentración de sólidos) y por los parámetros de operación durante el secado (temperatura, tamaño del orificio y presión de la boquilla de atomización). La influencia del tamaño de partícula en la eficiencia de encapsulación aún no es muy clara. Algunos trabajos previos han reportado que las partículas grandes tienen una mejor retención del contenido de aceite en comparación con las partículas pequeñas durante el secado por aspersión, sin embargo, otros estudios informan que las partículas con tamaños intermedios tienen mucha mayor retención que las partículas grandes y pequeñas (Jafari y col., 2007).

VI.5.4 Morfología macroscópica y microscópica del *B. thuringiensis*.

La tinción de Gram es diferencial y fue desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, permite observar la morfología celular, además de acuerdo con la estructura y espesor de la pared bacteriana se puede agrupar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas se visualizan de color morado como es el de caso del *Bacillus thuringiensis*, poseen una capa gruesa de peptidoglicanos y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas se observan al microscopio de color rosa o rojo tienen una capa más delgada de peptidoglicanos y poseen una membrana externa (Rodríguez y col., 2006).

En la Figura 28 a) se puede observar la morfología en agar nutritivo del *Bacillus thuringiensis* utilizado como material activo durante el proceso de microencapsulación y en la Figura 29 se presenta la morfología externa de los cultivos obtenidos en agar nutritivo de las muestras de microcápsulas elaboradas con diversos materiales de pared.

En general la morfología es la misma, en todas las muestras las colonias son circulares de bordes irregulares, de color crema a gris con aspecto harinoso u opaco y textura ligeramente rugosa semejante a la cera. Estos resultados son similares a los reportados por Carreras (2009) que obtuvo aislados de *B.*

thuringiensis y describió una morfología externa de las colonias en agar nutritivo muy similar a la descrita anteriormente.

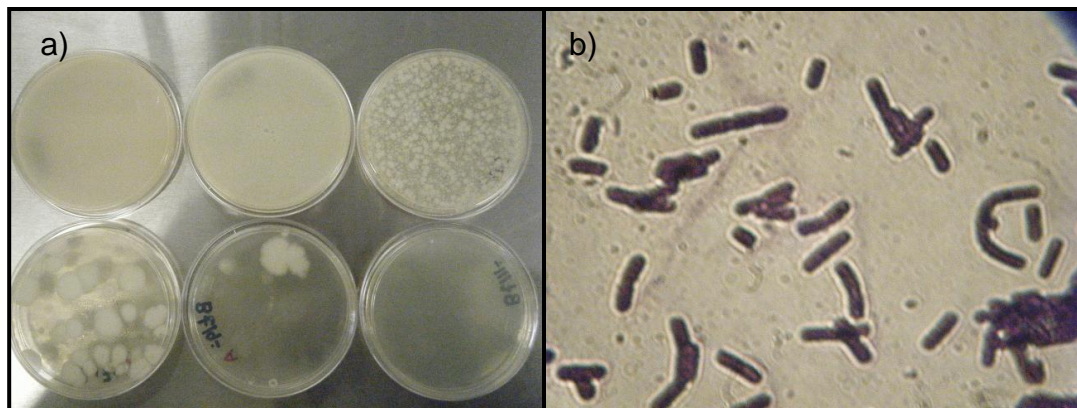


Figura 28. *B. thuringiensis* utilizado como material activo en la encapsulación. a) Morfología de las colonias en agar nutritivo b) tinción de Gram a las 36h vista a 100x.

Al realizar la comparación entre la morfología externa que presentó el *B. thuringiensis* utilizado como material activo (Figura 28a) y la morfología que se observa en las colonias desarrolladas en el agar pertenecientes a las microcápsulas elaboradas (Figura 29) se demuestra que las microcápsulas efectivamente contienen al *B. thuringiensis* porque la morfología es igual en todas las muestras.

En la Figura 28 b) se muestra la tinción de Gram del *B. thuringiensis* utilizado como material activo durante el secado mientras que en la Figura 30 se presenta la tinción de las muestras secadas con los diferentes materiales de pared; se puede observar en ambas imágenes a los bacilos Gram positivos con estructuras en forma de bastón alargado, con bordes redondeados, que forman cadenas corta. Con este análisis se comprueba la presencia del *B. thuringiensis* en las microcápsulas elaboradas mediante secado por aspersion. Realpe y col. (2002) realizaron el estudio de la morfología macroscópica (en agar base sangre) y microscópica (tinción de Gram) de varias especies del género *Bacillus* entre ellas *B. thuringiensis* obteniendo resultados muy semejantes a los reportados en el presente trabajo.

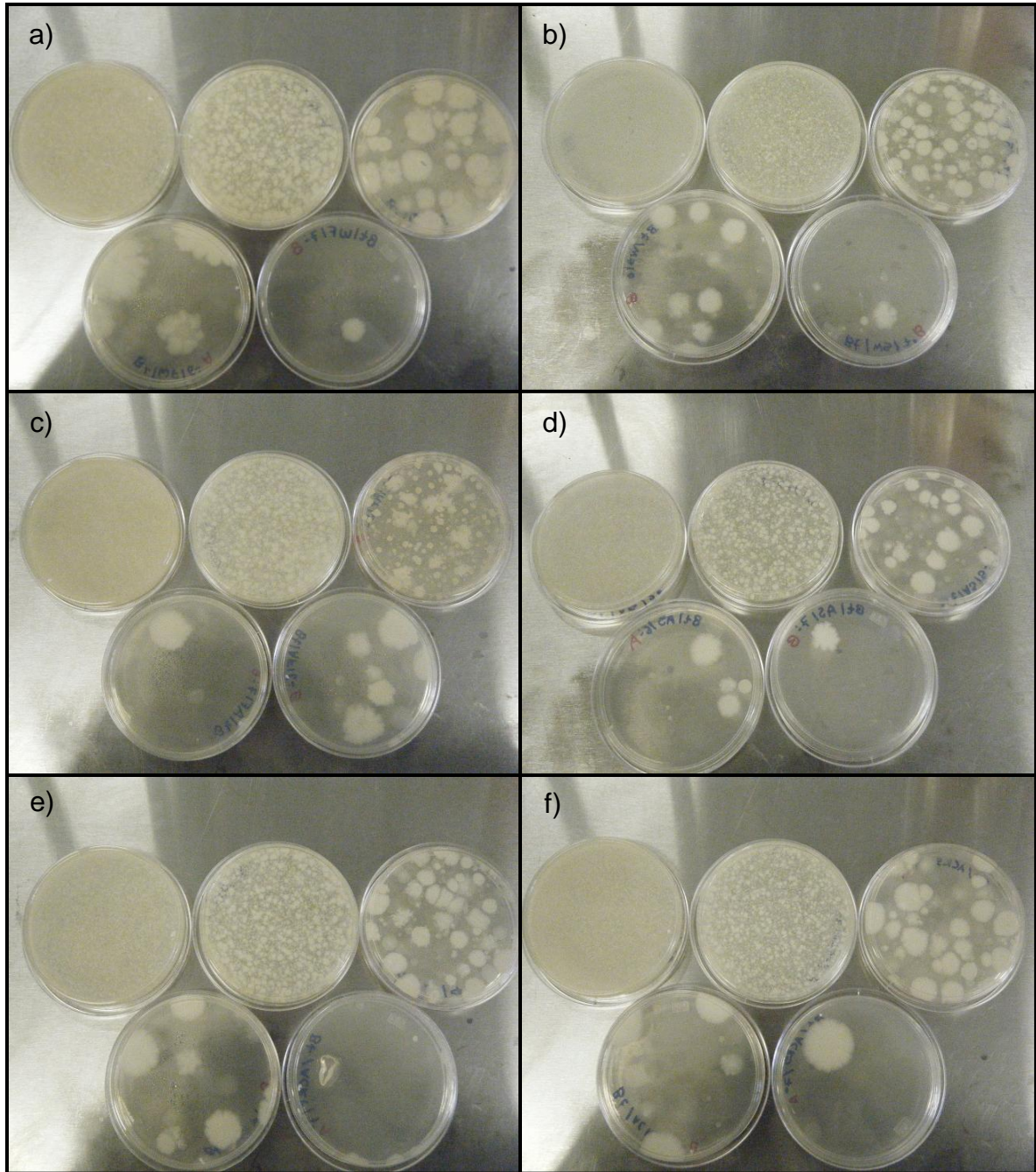


Figura 29. Morfología macroscópica del *B. thuringiensis* contenido en las microcápsulas elaboradas con almidón de a) maíz ceroso fosfatado, b) maíz ceroso succinatado, c) amaranto fosfatado, d) amaranto succinatado, e) amaranto con reducción de tamaño de gránulo fosfatado y f) amaranto con reducción de tamaño de gránulo succinatado.

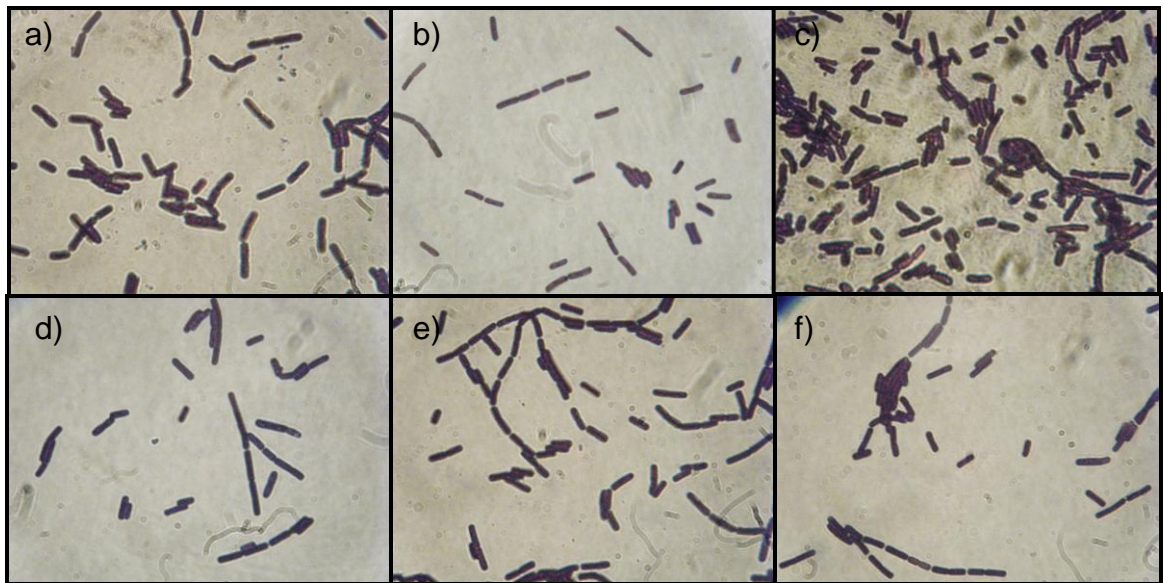


Figura 30. Tinción de Gram a las 36 h con un aumento de 100x del *B. thuringiensis* contenido en las microcápsulas elaboradas con almidón de a) maíz ceroso fosfatado, b) maíz ceroso succinatado, c) amaranto fosfatado, d) amaranto succinatado, e) amaranto con reducción de tamaño de gránulo fosfatado y f) amaranto con reducción de tamaño de gránulo succinatado.

VI.5.5 Rendimiento.

Debido a que la mayoría de los materiales activos son insolubles en soluciones acuosas, éstos existen como emulsiones. El proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión involucra la formación de una emulsión en la que pequeñas gotas del aceite o del material activo se encuentran dispersas y estabilizadas por los materiales acarreadores. Esta emulsión es atomizada dentro de una cámara de aire caliente en la que las gotas formadas son secadas (Murúa y col., 2009).

El rendimiento es un parámetro importante desde el punto de vista económico, teniendo en cuenta el costo elevado de la mayoría de los polímeros y de los principios activos empleados tradicionalmente. Es por lo tanto, conveniente recuperar en forma de microcápsulas la mayor cantidad posible del material de partida (Nakagawa y col., 2004). El rendimiento de microencapsulación refleja la

cantidad total del material activo que fue retenido en la microcápsula (Martínez, 2007).

Además existen algunos tipos de insectos en los que las esporas del *B. thuringiensis* muestran un efecto sinérgico en conjunto con los cristales parasporales durante el proceso de eliminación de las larvas. Este efecto sinérgico depende del tipo de insecto, esporas y cristales, la presencia de otros compuestos o ingredientes y las concentraciones de esporas y toxinas. Por otro lado la cuenta bacteriana es una determinación importante para conocer el efecto del secado por aspersión sobre el material activo (Zhou y col., 2008).

En el Cuadro 19 se presentan los resultados obtenidos acerca del recuento bacteriano y rendimiento en cuanto al material de pared y al activo de las microcápsulas elaboradas con los almidones modificados; como se puede observar las microcápsulas realizadas con almidón de amaranto fosfatado y con maíz ceroso succinatado son las que muestran mayor recuento bacteriano y rendimiento del material activo mientras que las muestras con almidón de amaranto succinatado con y sin reducción de tamaño de gránulo son las que arrojaron menor rendimiento del material de pared. Como ya se mencionó con anterioridad la concentración de sólidos y el tamaño de las capsulas son algunos factores que influyen en la protección del material activo durante el secado por aspersión; además de que las condiciones del proceso de secado son parámetros que tienen una gran relevancia en la cantidad de bacterias que sobreviven al finalizar este procedimiento. De manera general en todos los procesos de microencapsulación con los diversos materiales de pared se tuvo una reducción de un logaritmo después del proceso de secado en comparación con la cantidad de material activo colocada inicialmente (datos no mostrados).

Teera-Arunsiri y col. (2003) elaboraron microcápsulas de *B. thuringiensis subsp. aizawai* mediante secado por aspersión utilizando una mezcla de almidón de yuca nativo con almidón gelatinizado y otros reactivos como material de pared, con temperaturas de entrada de 120-180°C y de salida de 60-85°C reportando porcentajes de supervivencia de las esporas de 35-46% ($8.3-9.3 \times 10^8$ ufc/g)

demostrando que el *B. thuringiensis* es un microorganismo bastante estable al calor que puede resistir altas temperaturas en comparación con otros entomopatógenos; las variaciones encontradas en lo reportado por la literatura y los resultados obtenidos en el presente estudio son debidas a las diferencias en la formulación de las microcápsulas y a las condiciones de secado.

Cuadro 19. Recuento bacteriano y rendimiento de las microcápsulas.

Microcápsulas	Recuento bacteriano ufc/g	% Rendimiento material de pared	% Rendimiento del material activo
Amaranto fosfatado	4.61x10 ⁷ a	32.62	28.49 a
Amaranto c/red fosfatado	2.62x10 ⁷ b	29.92	14.86 b
Amaranto c/red succinatado	2.45x10 ⁷ b	24.53	11.39 b
Amaranto succinatado	1.94x10 ⁷ b	25.98	9.55 b
Maíz ceroso succinatado	4.37x10 ⁷ a	35.16	29.09 a
Maíz ceroso fosfatado	1.81x10 ⁷ b	38.77	13.32 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Zhou y col. (2008) observaron que durante el secado por aspersion de *B. thuringiensis*, el número de esporas viables disminuyó conforme se incrementó la temperatura de entrada, la de salida y la presión del aire de atomización; además reportaron la eficacia del secado por aspersion obteniendo un mayor número de esporas viables después del tratamiento y a menores costos en comparación con el secado por horno o mediante liofilización.

Los materiales encapsulantes que exhiben buenas características emulsificantes o formación de películas, típicamente muestran una mayor retención del material activo comparados con aquellos que carecen de ellas; ya que esta capacidad emulsificante del acarreador permite mantener dispersa la fase interna, por esta razón, la estabilidad de emulsión es considerada como un factor determinante en la selección de materiales encapsulantes. Algunos materiales presentan viscosidades muy altas a un contenido de sólidos bajo, lo que resulta en una pobre retención del material activo (Reineccius, 1991).

Los almidones fosfatados son considerados buenos estabilizantes de emulsiones más que verdaderos emulsificantes (Solarek 1989). Los almidones succinatados (OSA) contienen grupos bifuncionales que son hidrofílicos e hidrofóbicos, razón por la cual, después de su modificación química, estos almidones son emulsificantes efectivos, por lo que pueden formar películas fuertes en la interfase de agua/aceite, estabilizando de esta manera la emulsión (Tesch 2002).

Altas concentraciones de sólidos incrementan la retención del material activo durante el secado (entre 30 y 40%), reduciendo el tiempo necesario para formar la membrana semipermeable de la superficie de la cápsula. Se ha establecido que existe una fuerte dependencia del rendimiento de encapsulación con la proporción de sólidos en la emulsión (Martínez, 2007).

VII. CONCLUSIONES

El método de extracción del almidón de amaranto utilizado en el presente estudio fue efectivo con un rendimiento de extracción del 32.22% además de obtener un producto final con las características propias del almidón de amaranto. Con relación a la molienda de alta energía se logró una reducción del 17.83% del tamaño del gránulo del almidón de amaranto; el pre-tratamiento ácido y la molienda provocaron cambios estructurales que se reflejaron en una disminución en los perfiles de viscosidad, propiedades térmicas y cristalinidad relativa aunque el patrón de difracción de rayos X permaneció similar al del almidón nativo.

Durante este trabajo se obtuvieron y caracterizaron almidones de amaranto y maíz ceroso hidrolizados y fosfatados por extrusión o bien succinatados y extrudidos de esta forma se modificaron algunas propiedades de los almidones nativos y se consiguió aplicarlos en la encapsulación mediante secado por aspersión del bioinsecticida *Bacillus Thuringiensis* y de aceite de naranja a manera de fagoestimulante. El tratamiento de hidrólisis causó el rompimiento de ciertos enlaces, formando estructuras más débiles y provocando una disminución en la viscosidad de las muestras. Los almidones de maíz ceroso y los de amaranto con reducción de tamaño de gránulo obtuvieron mejores grados de sustitución ofreciendo una mejor superficie activa. El proceso de extrusión produjo materiales de pared con mejores características de solubilidad y viscosidad mediante la fragmentación de los gránulos; además de ocasionar cambios en la morfología y propiedades térmicas de los almidones. Asimismo de ser una tecnología innovadora, que permite la producción de materiales con ventajas como la ausencia de efluentes y menores costos en comparación con los métodos convencionales

La microencapsulación mediante secado por aspersión usando almidones modificados como material de pared mostró ser un proceso adecuado para la obtención de microcápsulas de *B. thuringiensis*; debido a que éstas ofrecen buenas características como baja actividad de agua, una morfología lisa, libre de poros y grietas, además de un alto contenido de esporas viables. Las microcápsulas elaboradas con almidón de amaranto fosfatado y de maíz ceroso succinatado

fueron las que obtuvieron mayores rendimientos en relación al material activo debido entre otras razones a que tenían alto índices de solubilidad lo que se vio reflejado en una buena dispersabilidad en la emulsión.

Las microcápsulas obtenidas con almidón de amaranto fosfatado y con maíz ceroso succinatado son las que mostraron un mayor recuento bacteriano y rendimiento del material activo. En todos los materiales de pared se tuvo una reducción de un logaritmo después del proceso de secado en comparación con la cantidad de material activo colocada inicialmente. En general los almidones modificados utilizados en este trabajo ofrecen un gran potencial para su uso como agentes encapsulantes del bioinsecticida *Bacillus Turingiensis*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000.** Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10° ed., American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, U. S. A.
- Abarca, C. C., Martínez, J. A., Caro, B. M. y Quintero, R. R. 1992.** Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. *Aisawai*. Universidad, Ciencia y Tecnología. 2 (3): 51-56.
- Agustiniano, J. C. 2004.** Obtención de almidón resistente mediante extrusión a partir de almidón de mango *Mangifera indica* L. (Var. Tommy Atkins). Yautepec, Morelos. Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en desarrollo de productos bióticos. 5-15.
- Anderson, R.A., Conway, H.F., Pfeife, F.F. y Griffin Jr., E.L. 1969.** Gelatinization of corn grits by roll-and extrusion-cooking. *Cereal Science Today*. 14 (1): 4-12.
- AOAC. 1999.** Official Methods of Analysis. 16° ed., S. Williams Published by the Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., U. S. A.
- Atwell, W. A., Hood, L. F., Lineback, D. R., Viarriano-Marston, E. y Zobel, H. F. (1988).** The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World*. 33: 306-311.
- Badii, M.H., Flores, A.E., Foreughbakhch, R., Quiroz, H. y Torres, R. 1996.** Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México: 21-47.
- Baker, A. A., Miles, M.J. y Helbert, W. 2001.** Carbohydrate research. Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*. 330 (2): 249-256.
- Baker, L. A y Rayas, P. 1998.** Retrogradation of amaranth starch at different storage temperatures and the effects of salt and sugars. *Cereal Chemistry*. 75 (3): 308-314.
- Barba, A. P. R., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera, L. M. 2009.** Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for

sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*. 49: 117-121.

Barron, C., Bouchet, B., Della, G., Gallant D. J. y Planchot V. 2001. Microscopical study of the destructuring of waxy maize and smooth pea starches by shear and heat at low hydration. *Journal of Cereal Science*. 33 (3): 289-300.

Bartelt, R. J., McGuire, M. R. y Black, D. A. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Entomology*. 19 (1): 182-189.

Bell, M. R. y Romine, C. L. 1980. Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. *Journal of Economic Entomology*. 73: 427-430.

Bello, L. A. y Paredes, O. 1999. El almidón, lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 50 (3): 29-33.

Bello, L. A., Colonna, P., Roger, P y Paredes, O. 1998. Macromolecular features of amaranth starch. *Cereal Chemistry*. 75 (4): 395-402.

Bertolini, A. C., Siani, A. C. y Grosso, R. F. 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray- drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 780-785.

Beta, T., Corke, H., Taylor, J. R. N., y Rooney, L. W. 2001. Effect of steeping treatment on pasting and thermal properties of sorghum starches. *Cereal Chemistry*. 78 (3): 303-306.

Bettge, A. D., Giroux, M. J. y Morris, C. F. 2000. Susceptibility of waxy starch granules to mechanical damage. *Cereal chemistry*. 77 (6): 750-753.

Bhandari, P. N. y Singhal, R. S. 2002. Effect of succinylation on the corn and amaranth starch pastes. *Carbohydrate Polymers*. 48: 233-240.

Bhosale, R. y Singhal, R. 2006. Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*. 66: 521-527.

Biliaderis, C. G. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Journal of Physiology and pharmacology*. 69 (1): 60-78.

- 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): 6–24.
- Biliaderis, C.G. 1992.** Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology*. 46 (6): 98–109.
- Brazel, C. S. 1999.** Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*. 44 (6): 388-393.
- Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, C., D’Hulst, C., Kossman, J. y Ball, S. 1998.** Starch granules structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23: 85-112.
- Calzetta, A. y Suarez, C. 2001.** Gelatinization kinetics of amaranth starch. *International Journal of Food Science and Technology*. 36: 441-448.
- Carreras, S. B. 2009.** Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de Cuba. *Fitosanidad*. 13 (2):109-115.
- Cereda, M.P. 2000.** Characterization of films of cassava starch by electron microscopy. *Journal of Food Technology*. 3: 91-95.
- Chang, Y. H. y Lii, C. Y. 1992.** Preparation of starch phosphate by extrusion. *Journal of Food Science*. 57: 203-205.
- Chen, C. J., Shen, Y. C. y Yeh, A. I. 2010.** Physico-chemical characteristics of media-milled corn starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9083-9091.
- Choi, H., Kim, W. y Shin, M. 2004.** Properties of Korean Amaranth Starch Compared to Waxy Millet and Waxy Sorghum Starches. *Starch/Stärke*. 56: 469–477.
- Colonna, P., Leloup, V., y Buléon, A. 1992.** Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal Clinical Nutrition*. 46 (2): S17-32.
- Cooke, D. y Gidley, M. J. 1992.** Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*. 227 (6): 103-112.

- Cross, J. V. y Polonenko D. R. 1996.** An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 446-454.
- Daniel, J. R. y Whistler, R. L. 1990.** Fatty sensory properties of polysaccharides. *Cereal Foods World*. 35: 825-826.
- Dulmage, H.T., Correa, J.A. y Gallegos-Morales G. 1990.** Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standarization and fermentation development. En: *Bacterial control of mosquitoes and black flies*. Rutgers University Pries, New Brunswick, N.J: 110-131.
- Durrani, C. M., y Donald, A. M. 1995.** Physical characterization of amylopectin gels. *Polymer Gels and Networks*. 3 (1): 1–27.
- Economic Entomology*. 91 (1): 86-93.
- Eerlingen, R.C., Jacobs, H., Block, K. y Delcour, J.A. 1997.** Effects of hydrothermal treatments on the rheological properties of potato starch. *Carbohydrate Research*. 297: 347-356.
- Escalona, S. E. 2004.** Encapsulados de luteína- enocianina y su aplicación en alimentos. Santiago de Chile. Universidad de Chile. Memoria para obtener el título de Ingeniero en alimentos. 22-25.
- Farrar, R. R. y Ridgway, R. L. 1994.** Comparative studies of the effects of nutrient based phagostimulants on six lepidopterous insect pests. *Journal of Economic Entomology*. 87: 44-52.
- Fernández, C. y Juncosa, R. 2002.** Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?. *Phytoma*. 141: 14-19.
- Fernández, E. 2000.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1ª ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro: 77-82.
- Flores, F. S. 2004.** Obtención de almidón con tamaño de partícula reducido mediante pulverizado mezclado con alta energía. México, D.F. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el grado de Maestro de Tecnología Avanzada. 41-45.
- Galán, L.J., García, J.A., Ellis, S.M., Quintero, Z.I. y Luna, H.A. 1996.** Production of *Bacillus thuringiensis*. En : *Avances en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México: 139-152.

- Gamel, T. H., Linssen, J. P., Mesallam, A. S., Damir, A. A. y Shekib, L. A. 2006.** Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 82–89
- Gillespie, R., McGuire, M. R. y Shasha, B. S. 1994.** Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*. 87 (2): 452-457.
- González, R., Carrara, C., Tosi, E., Añón, M. C. y Pilosof, A. 2007.** Amaranth starch-rich fraction properties modified by extrusion and fluidized bed heating. *LWT*. 40: 136-143.
- Goodfellow, B. J. y Wilson, R. H. 1990.** A Fourier transform IR study of the gelation of amylase and amylopectin. *Biopolymers*. 30: 1183-1189.
- Guan, J. y Hanna, M. A. 2004.** Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch. *Biomacromolecules*. 5 (6): 2329-2339.
- Gunning, Y.M., Gunning, P.A. y Kemsley, E. K. 1999.** Factors affecting the release of flavour encapsulated in carbohydrate matrixes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47 (12): 5198-5205.
- Guzmán, H. y Paredes, O. 1995.** Amylolitic enzymes and products derived from starch: A review. *Critical review in Food Science and Nutrition*. 35 (5): 373-403.
- Guzmán, M. J. 2010.** Almidones modificados y su aplicación como agentes de encapsulación. Orizaba, Veracruz. Instituto Tecnológico de Orizaba. Tesis para obtener el título de Ingeniería Química. 56-77.
- Harper, J.M. 1990.** Extrusión of foods. En: *Biotechnology and food process engineering*. Institute of Food Technologists, U. S. A.: 295-308.
- Hevia, F., Berti, M., Wilckens, R. y Yévenes, C. 2002.** Contenido de proteína y algunas características del almidón en semillas de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado en Chillan, Chile. *Agro Sur*. 30 (1): 24-31.
- Hoseney, R. C. 1991.** El almidón de los cereales. En: *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Reverté, Barcelona, España: 32-65.
- Hoseney, R. C. 1998.** *Principles of cereal Science and Technology*. 2 da. Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc., U. S.A.: 39-53.

Huang, Z. Q., Xie, X. L., Chen, Y., Lu, J. P. y Tong, Z. F. 2008. Ball-milling treatment effect on physicochemical properties and features for cassava and maize starches. *Comptes Rendus Chimie*. 11: 73-79.

Inglett, G. E. 1970. Corn in perspective. En: *Corn: culture, processing, products*. The Avi Publishing Company, Inc., U. S. A.: 1-5.

Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. 2007. Role of powder particle size on the encapsulation efficiency of oils during spray drying. *Drying Technology*. 25: 1091-1099.

Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M. y Kasemsuwan T. 1999. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*. 76 (5): 629-637.

Jane, J., Shen, L., Wang, L. y Maningat, C. C. 1992. Preparation and properties of small-particle corn starch. *Cereal Chemistry*. 69 (3): 280-283.

Jeon, Y.S., Viswanathan, A. y Gross, R.A. 1999. Studies of starch esterification: Reactions with alkenyl-succinates in aqueous slurry systems. *Starch/Stärke*. 51(2-3): 90-93.

Jiping, P., Shujun, W., Jinglin, Y., Hongyan, L., Jiugao, Y. y Wenyuan, G. 2007. Comparative studies on morphological and crystalline properties of B-type and C-type starches by acid hydrolysis. *Food Chemistry*. 105: 989-995.

Jiranuntakul, W., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Pucha-arnon, S. y Uttapap, D. 2011. Microstructural and physicochemical properties of heat-moisture treated waxy and normal starches. *Journal of Food Engineering*. 104: 246-258.

Karamanlidou, G., Lambropoulos, A.F., Kolais, S.I., Manosis, T., Ellar, D. y Kastritsis, C. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (8): 2277-2282.

Kim, C. T., Kyonggi, D., Shih, F. F., Champagne, E. T., y Daigle, K. 1999. Effects of phosphorylating salts and temperature on the preparation of rice starch phosphates by extrusion. *Starch/Stärke*. 51 (8-9): 260-286.

- Kim, C. T., Shih, F. F., Champagne, E. T. y Daigle, K. 1999.** Effects of phosphorylating salts and temperature on the preparation of rice starch phosphates by extrusion. *Starch/Stärke*. 51 (8-9): 280-286.
- Krishnan, S., Kshirsagar, A. C. y Singhal, R. S. 2005.** The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*. 62: 309-315.
- Landerito, N. A., y Wang, Y. J. 2005.** Preparation and properties of starch phosphates using waxy, common, and high-amylose corn starches. II. Reactive extrusion method. *Cereal Chem.* 82 (3): 271-276.
- Lee, J. H., Choi, H. W., Kim, B. Y., Chung, M. S., Kim, D. S., Choi, S. W., Lee, D. U., Park, S. J., Hur, N. Y. y Baik, M. Y. 2006.** Nonthermal starch hydrolysis using ultra high pressure: I. Effects of acids and starch concentrations. *LWT*. 39: 1125-1132.
- Light, J. M. 1990.** Modified food starches: why, what, where and how. *Cereal Foods World*. 35. 1081-1092.
- Lim, S., Jane, J., Rajagopalan, S. y Seib, P. A. 1992.** Effect of starch granule size on physical properties of starch filled polyethylene film. *Biotechnology Progress*. 8 (1): 51-57.
- Liu, H., Yu, L., Xie, F. y Chen, L. 2006.** Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*. 65 (3): 357–363.
- Liu, Q. 2005.** Understanding Starches and Their Role in Foods. In “Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications”. Taylor and Francis Group LLC, Boca raton, Florida: 311-349.
- Lozano, M. 2009.** Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Cartagena, España. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial. Tesis para obtener el título de Ingeniero Técnico Industrial. 1-19.
- Manni, D., Santiago, L., Andrich, O. y Grosso C. 2008.** 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales. Misiones, Argentina. 16, 10.
- Martínez, F., López, M., San Martín, E., Zazueta, J. J. y Velez, J. 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.

Martínez, G. y Agostini, J. P. **2004.** Aceites esenciales de flores de mandarina para el control de *Colletotrichum acuatatum* causante de la caída prematura de frutas en plantaciones cítricas. Citrusmisiones. 29: 3-16.

Martínez, L. **2007.** Obtención y caracterización de almidones de malanga, arroz y maíz ceroso modificados por extrusión termoplástica para su uso como encapsulantes de aceite esencial de naranja. Xalapa, Veracruz. Universidad Veracruzana Instituto de Ciencias Básicas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias. 19-54.

Maurice, D. R. y Courtney, T. H. **1990.** The physics of mechanical alloying: A first report. Metallurgical Transactions. A 21: 289–302.

Maxwell, F. G., Jenkins, J. N., Keller, J. C. y Parrot, W. L. **1963.** An arrestant and feeding stimulant for the boll weevil in water extracts of cotton- plant parts. Journal of Economic Entomology. 56: 449-454.

McGuire, M. R., Shasha, B. S., Eastman, C. E. y Oloumi, H. **1996.** Starch- and flour-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 89 (4): 863-869.

Mireles, M. M. **2006.** Análisis genético de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de zonas aguacateras y su evaluación tóxica contra *Argyrotaenia sp.* Reynosa, Tamaulipas. Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica. 1-32.

Morrison, W. R. y Tester, R. F. **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. y Gidley, M. J. **1994.** Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball-milled starches. Journal of Cereal Science. 19: 209-217.

- Mua, J.P. y Jackson, D. S. 1997.** Fine structure of corn amylase and amylopectin fractions with various molecular weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 3840-3847.
- Mujumdar, A.S. 1995.** Handbook of Industrial Drying. 2da. ed., Marcel Dekker, Inc. New York: 263-309.
- Murúa, B., Beristain, C. I. y Martínez, 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.
- Nakagawa, K., Iwamoto, S., Nakajima, M., Shono, A. y Satoh, K. 2004.** Microchannel emulsification using gelatine and surfactant-free coacervate microencapsulation. *Journal of Colloids and Interface Science*. 278 (1): 198-205.
- Narváez, E. D., Figueroa, J. D., Taba, S. y Rincón, F. 2006.** Kernel microstructure of Latin American races of maize and their thermal and rheological properties. *Cereal Chemistry*. 83 (6): 605-610.
- Narváez, E. D., Figueroa, J. D., Taba, S., Castaño, E. y Martínez, R. A. 2007.** Efecto del tamaño del gránulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30 (3): 269-277.
- Niedmann, L. y Meza, L. 2006.** Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica*. 66 (3): 235-246.
- Nigel, D. P. y Dylan, G. J. 2003.** Ecological roles of solar UV radiation: Towards and integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution*. 18 (1): 48-55.
- Orietta, F. y Larrea, V. 2002.** Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 64: 110-115.
- Paredes, O., Bello, L. A. y López, M. G. 1994.** Amylopectin: structural, gelatinization and retrogradation studies. *Food Chemistry*. 50: 411-417.
- Paredes, O., Schevenin, M. L., Hernández, D. y Cávevez, A. 1989.** Amaranth starch- isolation and partial characterization. *Starch/ Stärke*. 41 (6):205- 207.

- Pérez, E., Bahnassey, Y. A. y Breene, W. M. 1993.** Some chemical, physical and functional properties of native and modified starches of *Amaranthus hypocondriacus* and *Amaranthus cruentus*. *Starch/ Stärke*. 45 (6): 215-220.
- Porzio, M. A. 2004.** Flavor encapsulation: A convergence of science and art. *Food technology*. 58 (7): 40-49.
- Praful, N. B. y Rekha, S. S. 2002.** Studies on the optimisation of preparation of succinate derivatives from corn and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*. 47: 277-283.
- Qi, A. H. y Xu, A. 1999.** Starch-based ingredients for flavor encapsulation. *Cereal Foods World*. 44: 460-465.
- Qian, J. Y. y Kuhn, M. 1999.** Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* starch. *Starch/Stärke*. 51 (4): 116-120.
- Radosavljevic, M., Jane, J. y Johnson, L. A. 1998.** Isolation of amaranth starch by diluted alkaline-protease treatment. *Cereal Chemistry*. 75 (2): 212-216.
- Ré, M. I. 1998.** Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*. 16: 1195-1236.
- Realpe, M. E., Hernández, C. A. y Agudelo, C. I. 2002.** Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica*. 22 (002): 106-109.
- Reineccius, G. A. (1991).** Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*. 45: 144-149.
- Rengaswami, C. 1998.** X-Ray diffraction of food polysaccharides. *Advances in Food and Nutrition Research*. 42: 131-210.
- Ring, S. G. 1985.** Some studies on starch gelation. *Starch- Stärke*. 37 (3): 80-83.
- Rodríguez, E., Gamboa, M. M., Hernández, F. y García, J. D. 2006.** Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. 1ª ed. EUCR, Costa Rica: 63-67.
- Rodríguez, P., San Martín, E. y González, G. C. 2001.** Calorimetría diferencial de barrido y rayos- X del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superficies y vacío*. 13: 61-65.
- Rosas, N. M., 2008.** Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10 (1): 49-63.

- Rosas, N. M., 2009.** Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology*. 3: 28-36.
- Rosas, N. M., Arévalo, K., Pereyra, B., Medrano, H., Galán, L. J., Pérez, J. F. y Morales, L. H. 2003.** Elaboración de un bioinsecticida contra el gusano barreador de la caña de azúcar. *Ciencia UANL*. 6 (4): 491-496.
- San Martín, E., Aguilar, M. A., Espinosa, T., Pless, R. C. y Delia, Z. 2004.** Starch phosphates produced by extrusion: physical properties and influence on yogurt stability. *Starch/Stärke*. 56: 199-207.
- Sánchez, J. M. y Peña, J. J. 2000.** Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. *TERRA Latinoamericana*. 18 (004): 325-331.
- Sandoval, A., Rodríguez, E. y Fernández, A. 2005.** Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*. 146: 45-53.
- Sanguanpong, V., Chotineeranat, S., Piyachomkwan K., Oates, C. G., Chinachoti, P. y Sriroth, K. 2003.** Hydration and physicochemical properties of small- particle cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83 (2): 123-132.
- Sanguanpong, V., Chotineeranat, S., Piyachomkwan K., Oates, C. G., Chinachoti, P. y Sriroth, K. 2003.** Preparation and structural properties of small-particle cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83 (8): 760-768.
- Shahidi, F. y Han, X.Q. 1993.** Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33: 501-547.
- Shih, F. F. y Daigle, K. W. 2003.** Gelatinization and pasting properties of rice starch modified with 2-octen-1-ylsuccinic anhydride. *Nahrung/Food*. 47 (1): 64-67.
- Shogren, R. L., Vishwanathan, A., Felker, F. y Gross, R. A. 2000.** Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch/ Stärke*. 52: 196-204.
- Singh, J., Kaur, L. y Mc Carthy, O. J. 2007.** Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications. A review. *Food Hydrocolloids*. 21: 1-22.

Singh, K., Singh, N. y Kaur, M. 2004. Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches. *Journal of Food Engineering*. 64: 119-127.

Sitohy, M. Z., El-Saadany, S. S., Labib, S. M. y Ramadan, M. F. 2000. Physicochemical properties of different types of starch phosphate monoesters. *Starch/Stärke*. 52 (4): 101-105.

Smith, R.J. y Caruso, J.L. 1964. Determination of phosphorus and ash. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York: 42-46.

Soberón, M. y Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotechnología*. 14: 303-313.

Solarek, D. B. 1989. Phosphorylated starches and miscellaneous inorganic esters. En: *Modified starches: Properties and Uses*. 1ra. ed. O.B. Wurzburg, M. S. Eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 97-112.

starches. *Journal of Food Engineering*. 54: 167-174.

Tamaki, S., Hisamatsu, M., Teranishi, K., Adachi, T. y Yamada, T. 1998. Structural change of maize starch granules by ball-mill treatment. *Starch/ Stärke*. 50 (8): 342-348.

Tamez, P., Castro, R., Medrano, H., McGuire, M. R., Galán, L. J. y Luna, H. A. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *Journal of*

Tamez, P., García, C., Medrano, H., Galán, L. J. y Sandoval, C. F. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist*. 24 (1): 37-48.

Tamez, P., McGuire, M. R., Medrano, H., Galán, L. J., Shasha, B. S. y Vega, F. E. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 89 (6): 1424-1430.

Tapia, B. D., Mauri, A. N., Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A y Añón, M. C. 2007. Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Science*. 72 (5): E293-E300.

- Teera-Arunsiri, A., Suphantharika, M. y Ketunuti, U. 2003.** Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Journal of Economic Entomology*. 96 (2): 292-299.
- Tesch, S., Gerhards, Ch. y Schubert, H. 2002.** Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*. 54 (2): 167-174.
- 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: 293-301.
- Tester, R. F., Karkalas, J. y Qi, X. 2004.** Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 29: 151-165.
- Thomas, D. J. y Atwell, W. A. 1999.** Starch Modification. En: *Starch*. American Association of Cereal Chemists, U. S. A.: 31-39.
- Thompson, D.B. 2000.** On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*. 43: 223–239.
- Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M. D. 2008.** Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 88 (3): 411-418.
- Trubiano, P. C. 1989.** Succinate and Substituted Succinate Derivatives of Starch. En: *Modified starches: Properties and Uses*. 1ra. ed. O.B. Wurzburg, M. S. Eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 131-148.
- Tukomane, T. y Varavinit, S. 2008.** Influence of octenyl succinate rice starch on rheological properties of gelatinized rice starch before and after retrogradation. *Starch/ Stärke*. 60: 298-304.
- Uriyapongson, J. y Duarte, R. P. 1994.** Comparison of yield and properties of amaranth starches using wet and dry- wet milling processes. *Cereal Chemistry*. 71 (6): 571-577.
- Van, R. G., Hoddle, M. S. y Center, T. D. 2007.** Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. The Forest Health Technology Enterprise Team, Washington: 431-466.
- Vasanthan, T., Yeung, J. y Hoover. 2001.** Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. *Starch/Stärke*. 53: 616- 622.

- Vega, Y. L. 2007.** Evaluación y selección de auxiliares de formulación para la fotoestabilización de la levadura biocontroladora *Pichia onychis* frente a la radiación ultravioleta. Bogotá D. C. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis para obtener el título de Microbióloga Industrial. 21-42.
- Vehring, R. 2008.** Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*. 25 (5): 999-1022.
- Watano, S., Shimoda, E., y Osako, Y. 2002.** Measurement of Physical strength of pharmaceutical extruded pellets. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 50: 26-30.
- Williams, P. C., Kuzina, F. D. y Hlynka, I. 1970.** A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. *Cereal Chemistry*. 47: 411-421.
- Wu, H. y Corke, H. 1999.** Genetic diversity in physical properties of starch from a world collection of *Amaranthus*. *Cereal Chemistry*. 76 (6): 877–883.
- Wurzburg, O. B. 1986.** Nutritional aspects and safety of modified food starches. *Nutrition Reviews*. 44: 74-79.
- Wurzburg, O.B. 1989.** Converted Starches. En: *Modified starches: Properties and Uses*. 1ra. ed. O.B. Wurzburg, M. S. Eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 17-40.
- Yañez, F. J., Salazar, J. A., Chaires M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M. y Ramos, E. G. 2006.** Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Industria Alimentaria*. 1: 10-16.
- Zambrano, F. y Camargo, C. R. O. 2001.** Optimisation of the conditions for the acid hydrolysis of cassava starch to obtain a fat replacer. *Brazilian Journal of Food Technology*. 4: 147-154.
- Zheng, G. H., Han, H. L. y Bhatta, R. S. 1999.** Functional properties of cross-linked and hydroxypropylated waxy hull-less barley starches. *Cereal Chemistry*. 76 (2): 82-188.
- Zhou, X., Dong, J., Gao, J. y Yu Z. 2008.** Review. Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. *Food and Bioproducts processing*. 86: 37-42.

Zilli, H. O. 2005. Obtención y caracterización de almidones fosfatados de malanga criolla y maíz y su utilización en yogurt. Veracruz. Universidad Veracruzana. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias. 26-27.

Zobel, H. F. 1988. Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke*. 40 (2): 44-50.

Zobel, H. F. 1988. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/ Stärke*. 40 (1): 1-7.