

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOCRISTALES DE
ALMIDÓN, DE PAPA AMARGA Y TUNTA, EMPLEANDO EL
MÉTODO DE TAGUCHI”**

Presentada por:

ELIZABETH FIORELA PEÑA CARRASCO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2023

Document Information

Analyzed document	DOCUMENTO DE TESIS_EPG 2022 - FIRMADO CEVS.pdf (D156755526)
Submitted	2023-01-23 23:05:00
Submitted by	
Submitter email	cevs@lamolina.edu.pe
Similarity	6%
Analysis address	cevs.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Tesis Hidrólisis - Final - Revisado 291021-FORMATO - PM_revisado 22.12.21 CVS.docx Document Tesis Hidrólisis - Final - Revisado 291021-FORMATO - PM_revisado 22.12.21 CVS.docx (D125557704) Submitted by: pmartinezt@lamolina.edu.pe Receiver: pmartinezt.unalm@analysis.arkund.com		22
SA	Marisol Luque null-1.docx Document Marisol Luque null-1.docx (D111763393)		3
SA	tesisrocioescarcenaquispe OK.pdf Document tesisrocioescarcenaquispe OK.pdf (D124211590)		1
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / DOCUMENTO FINAL DE TESIS DANIEL ISHARA.pdf Document DOCUMENTO FINAL DE TESIS DANIEL ISHARA.pdf (D154022705) Submitted by: ibp@lamolina.edu.pe Receiver: ibp.unalm@analysis.arkund.com		1
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Tesis - Mayra Galecio Rojas_final.docx Document Tesis - Mayra Galecio Rojas_final.docx (D142783571) Submitted by: pmartinezt@lamolina.edu.pe Receiver: pmartinezt.unalm@analysis.arkund.com		8
W	URL: https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_bioteecnologia/MB30-Luz_del_Carmen_Q... Fetched: 2020-12-03 19:42:36		6
SA	borrador de tesis revisada 5121 (1).docx Document borrador de tesis revisada 5121 (1).docx (D91861818)		1
SA	TFM_DianaMoránTuya_2021.pdf Document TFM_DianaMoránTuya_2021.pdf (D95784797)		2
W	URL: http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/8/98.pdf Fetched: 2021-07-27 22:34:45		2

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOCRISTALES DE
ALMIDÓN, DE PAPA AMARGA Y TUNTA, EMPLEANDO EL
MÉTODO DE TAGUCHI”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

ELIZABETH FIORELA PEÑA CARRASCO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

**Ph. D. Mariana Inga Guevara
PRESIDENTE**

**Dra. Carmen Velezmoro Sánchez
ASESOR**

**Mg. Sc. Patricia Martínez Tapia
CO-ASESOR**

**M. Sc. Franciso Sañas Valerio
MIEMBRO**

**Dr. Eduardo Morales Soriano
MIEMBRO**

Dedicatoria

A mis padres, Escolástico y Gregoria, por ser las personas que más admiro y mi fuente de fortaleza e inspiración.

A mis queridos hermanos, Anibal, Japer, César y Omar, por brindarme todos sus cuidados y consejos en mi crecimiento y generar los recuerdos y experiencias más felices de mi vida.

AGRADECIMIENTO

- A PROCIENCIA – CONCYTEC en el marco de la convocatoria Proyectos de Investigación Básica y Aplicada 2017-02 [Convenio N° 153-2017-FONDECYT], por el financiamiento del presente trabajo de investigación.
- Al Dr. Manuel Cervantes Uc y Dr. Jorge Uribe Calderón, investigadores del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por los análisis realizados en sus instalaciones.
- Al Instituto Geofísico del Perú (IGP) por su apoyo en el análisis de distribución tamaño de partícula de los almidones hidrolizados.
- A la Dra. Carmen Velezmoro y Mg. Sc. Patricia Martínez por brindarme su valiosa orientación, aportes y enseñanzas que me ayudaron a terminar esta investigación y seguir construyendo mi vida profesional.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. LA PAPA AMARGA.....	3
2.1.1. Variedad ocucuri morado o negra.....	5
2.1.2. Producción de papa amarga	6
2.2. TUNTA.....	7
2.3. NANOCRISTALES DE ALMIDÓN.....	9
2.4. OBTENCIÓN DE NANOCRISTALES DE ALMIDÓN.....	10
2.4.1. Hidrólisis ácida.....	11
2.4.2. Pretratamientos de la hidrólisis ácida	13
2.5. PROPIEDADES DE LOS NANOCRISTALES DE ALMIDÓN	15
2.5.1. Tamaño de partícula.....	15
2.5.2. Cristalinidad relativa	16
2.5.3. Gelatinización	17
2.5.4. Estructura funcional	17
2.5.5. Potencial zeta	18
2.6. MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN.....	19
2.7.1. Arreglos ortogonales	20
2.7.2. El diseño robusto.....	21
2.7.3. La relación señal-ruido (S/R).....	21
2.7.4. Metodología de Taguchi	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	24
3.2. MUESTRA	24
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	24
3.3.1. Materiales.....	24
3.3.2. Equipos.....	24
3.3.3. Reactivos.....	25
3.4. MÉTODO DE ANÁLISIS	25
3.4.1. Determinación de tamaño de partícula	25
3.4.2. Morfología electrónica de barrido	26
3.4.3. Difracción de rayos X.....	26

3.4.4. Rendimiento de los nanocrisales de almidón (%)	26
3.4.5. Espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR).....	27
3.4.6. Propiedades térmicas	27
3.4.7. Potencial zeta.....	27
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
3.5.1. Obtención de nanocrisales del almidón de papa y tunta	27
3.6. ESQUEMA EXPERIMENTAL	29
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
3.7.1. Evaluación del tamaño de partícula	30
3.7.2. Optimización por el método de Taguchi.....	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. OBTENCIÓN DE LOS NANOCRISTALES	33
4.2. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA	34
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCRISTALES.....	36
4.3.1. Difracción de rayos X	36
4.3.2. Análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	39
4.3.3. Propiedades térmicas.....	41
4.4. OPTIMIZACIÓN POR EL MÉTODO DE TAGUCHI	43
4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCRISTALES OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO ÓPTIMO	46
4.5.1. Morfología.....	47
4.5.2. Potencial zeta.....	49
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
IX. ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Producción de papa en el departamento de Puno (1998-2014)	6
Cuadro 2: Cantidad de tunta en El Collao – Puno (2017)	7
Cuadro 3: Destino de la tunta para su comercialización 2017	8
Cuadro 4: Información histórica de consumo tunta.....	8
Cuadro 5: Diseño de experimentos enfoque clásico versus Taguchi	19
Cuadro 6: Arreglo ortogonal L ₉	21
Cuadro 7: Fórmulas para la relación S/R.....	22
Cuadro 8: Esquema experimental.....	30
Cuadro 9: Niveles de los factores para el diseño multifactorial categórico	31
Cuadro 10: Diseño multifactorial categórico para la evaluación del tamaño.....	31
Cuadro 11: Niveles de los factores para el arreglo ortogonal L ₄ (2 ³)	32
Cuadro 12: Diseño ortogonal L ₄ (2 ³) de Taguchi	32
Cuadro 13: Valores de los ratios de lo almidones nativos y sus nanocristales.....	41
Cuadro 14: Parámetros de gelatinización del almidón nativo de papa amarga (PON) y los nanocristales de papa	41
Cuadro 15: Parámetros de gelatinización del almidón nativo de tunta (TON) y de los nanocristales de tunta.....	42
Cuadro 16: Valores de grado de cristalinidad relativa (%)	44
Cuadro 17: Valores de rendimiento (R %)	44
Cuadro 18: Condiciones óptimas para la obtención de nanocristales	45
Cuadro 19: Características del nanocristal óptimo	46
Cuadro 20: Valores de tamaño de partícula para el almidón de tunta	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Origen de <i>S. x ajanhuiri</i> , <i>S. x juzepczukii</i> y <i>S. x curtilobum</i> , especies cultivadas con sabor amargo y tolerancia a las heladas.....	3
Figura 2 : Papa Ocucuri Morada.....	5
Figura 3 : Representación esquemática de los NCA obtenidos usando (a) H ₂ SO ₄ y (b) HCl como agentes hidrolizantes.....	12
Figura 4 : Estructura del ácido cítrico.....	13
Figura 5 : Ilustración del mecanismo de molienda, bolas grandes (A) y bolas pequeñas (B).....	14
Figura 6 : Pasos involucrados en el uso de la metodología Taguchi	23
Figura 7 : Flujo de operaciones del proceso de obtención de nanocristales de almidón de papa amarga y tunta.....	29
Figura 8 : Rendimiento (porcentaje) de los almidones hidrolizados obtenidos de cada tratamiento.....	33
Figura 9 : Curvas de distribución de tamaño de las partículas de almidón hidrolizado de papa amarga (A: tratamientos sin molienda, B: tratamientos con molienda).....	34
Figura 10: Curvas de distribución de tamaño de las partículas de almidón hidrolizado de tunta (A: tratamientos sin molienda, B: tratamientos con molienda)	35
Figura 11: Patrón de difracción de rayos X del almidón nativo de papa amarga (PON) (A) y los nanocristales de almidón de papa amarga (B)	37
Figura 12: Patrón de difracción de rayos X del almidón nativo de tunta (TON) (A) y los nanocristales de almidón de tunta (B)	37
Figura 13: Espectros FTIR de almidón nativo de papa amarga (PON) y de los nanocristales de almidón de papa amarga (A) y espectro FTIR de almidón nativo de tunta (TON) y de los nanocristales de almidón de tunta (B) (espectros PON y TON obtenidos de Martínez <i>et al.</i> 2022).....	39
Figura 14: Termogramas del almidón nativo de papa amarga (PON) y de los nanocristales de almidón de papa (A) y termogramas del almidón nativo de tunta (TON) y de los	

nanocristales de almidón de tunta (B) (termogramas de PON y TON obtenidos de Martínez <i>et al.</i> 2022)	43
Figura 15: Valores señal/ruido (S/R, ETA), para cada factor.....	44
Figura 16: Micrografías MEB de almidón de tunta (A) y nanocristales de almidón de tunta (B).....	48
Figura 17: Distribución de potencial zeta de la muestra de nanocristal de almidón de tunta.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Aplicación del método de Taguchi para la optimización de procesos y desarrollo de productos en diferentes áreas biológicas y/o biotecnológicas	65
Anexo 2: Determinación de tamaño partícula por DLS	68
Anexo 3: Determinación de potencial zeta.....	70
Anexo 4: ANVA de diseño multifactorial categórico	71
Anexo 5: Estadísticos del método de Taguchi.....	72

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue diseñar el proceso y optimizar los parámetros para la síntesis de nanocristales a partir de almidones de papa amarga Ocucuri negra (*Solanum curtilobum*) y de su respectiva tunta; mediante hidrólisis con un ácido orgánico. Se utilizó un diseño multifactorial categórico para estimar el efecto de los factores (molienda, concentración de almidón en la suspensión, concentración de ácido y tipo de almidón). Se determinó que el factor molienda tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el proceso de obtención de nanocristales de almidón. La optimización del proceso se realizó por el método de Taguchi, donde los factores considerados fueron: concentración de almidón, concentración de ácido orgánico y tipo de almidón molido, para lo cual se utilizó el diseño ortogonal $L_4(2^3)$, y las variables respuesta optimizadas fueron: la cristalinidad relativa y el porcentaje de rendimiento, buscando en ambos casos su maximización. Las condiciones óptimas se obtuvieron con el criterio de “mayor es mejor”. Se determinaron las propiedades morfológicas (mediante microscopía electrónica de barrido), estructurales (difracción de rayos X, FTIR), térmicas (DSC) y físicas (distribución de tamaño, potencial zeta) a los nanocristales de almidón obtenidos con el tratamiento óptimo. Los nanocristales de almidón obtenidos presentaron diámetros hidrodinámicos en un rango de 118 – 399 nm y valores de cristalinidad relativa en un rango de 12,56 – 26,2 por ciento.

Palabras clave: Tunta, nanocristales de almidón, hidrólisis ácida, ácido cítrico, optimización, método de Taguchi.

SUMMARY

The objective of the research was to design the process and optimize the parameters of the synthesis of nanocrystals from bitter potato starch *Ocucuri negra* (*Solanum curtilobum*) and its respective tunta; prepared by hydrolysis using an organic acid. A categorical multifactorial design was used to estimate the effect of the factors (ball milling, starch concentration in the slurry, acid concentration and type of starch). It was determined that the ball milling factor had a significant effect ($p < 0,05$) in the synthesis of starch nanocrystals. The optimization of the process was employed by the Taguchi method where the factors considered were: starch concentration, organic acid concentration and type of milled starch, for which the $L_4 (2^3)$ orthogonal array was used and the optimized response variables were: relative crystallinity and yield percentage, the target for both was their maximization. The optimal conditions were obtained considering the "bigger is better" criterion. The morphological (by scanning electron microscopy), structural (by X-ray diffraction, FTIR), thermal (by DSC) and physical (by dynamic light scattering, zeta potential) properties of the starch nanocrystals obtained with the optimal conditions were determined. The starch nanocrystals presented hydrodynamic diameters in a range of 118 – 399 nm and relative crystallinity values in a range of 12,56 – 26,52 percent.

Keywords: Tunta, starch nanocrystals, acid hydrolysis, citric acid, optimization, Taguchi's method.

I. INTRODUCCIÓN

El mercado de almidones está en constante crecimiento, lo que lleva a una búsqueda continua de productos con características específicas que cumplan con los requisitos de la industria. En el año 2020, el Perú importó 21 066 t de almidón de papa (Koo 2021), porque la producción nacional no llega a cubrir la demanda interna. En el año 2018 la producción nacional fue de 9 752 t de almidón de diferentes fuentes botánicas y la demanda interna fue de 37 533 t (Chávez y Choy 2020). La falta de estudios en la gran diversidad de variedades de papas nativas, que se encuentran en el Perú, para clasificarlas y designarlas a la producción de almidón genera una falta de uniformidad en el producto final de los almidones nativos.

La producción de almidón modificado es una alternativa que se ha desarrollado para superar una o más limitaciones de los almidones nativos, y así aumentar la utilidad de este polímero en aplicaciones industriales (Gonçalves *et al.* 2014). La modificación por hidrólisis ácida, una escisión de los enlaces glucosídicos, es uno de los métodos para la modificación del almidón nativo. En general, las regiones amorfas se hidrolizan más rápidamente en comparación con la región cristalina y el residuo después de una hidrólisis ácida prolongada consiste en partes cristalinas de amilopectina resistentes a los ácidos (Ahmed y Auras 2011). Industrialmente, los almidones modificados con ácido se preparan tratando la suspensión de almidón con ácidos minerales (HCl/H₂SO₄) durante varios períodos de tiempo (Hoover 2000). Estos ácidos generan humos tóxicos y subproductos no deseados (Muller 2000; Babu *et al.* 2015). Actualmente, se busca disminuir el uso de los ácidos minerales. Los ácidos orgánicos son considerados nutricionalmente inofensivos y se emplean en la industria alimentaria como aditivos para una gran cantidad de productos, además son reconocidos como seguros (GRAS) para el consumo humano (Navaf *et al.* 2021).

La hidrólisis ácida se emplea para modificar significativamente la estructura granular y las propiedades funcionales del almidón. Durante la última década, los nanocristales de

almidón (NCA) han atraído un interés creciente debido no solo a su tamaño nano sino también debido a su abundancia y a su naturaleza renovable, biodegradable y biocompatible. Debido a que el almidón es amigable con el medio ambiente las nanopartículas obtenidas de éste se presentan como uno de los biomateriales prometedores para la utilización novedosa en alimentos, cosméticos, medicinas y en diversos materiales compuestos (Lin *et al.* 2011).

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue sintetizar y caracterizar los nanocristales de almidón (NCA) de papa amarga y tunta. Y los objetivos específicos fueron:

- Diseñar el proceso y optimizar los parámetros de síntesis de nanocristales de almidón, considerando como factores: la concentración de ácido orgánico, la concentración de almidón en la suspensión, molienda y tipo de almidón (papa o tunta).
- Caracterizar los nanocristales de almidón obtenidos mediante diferentes técnicas instrumentales (morfológicas, estructurales y térmicas).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA PAPA AMARGA

A través del tiempo los agricultores andinos han desarrollado cultivos resistentes a la helada y a la sequía, los mismos que pueden sembrarse en alturas mayores a los 3.800 metros sobre el nivel del mar. Entre estas especies está el grupo de las papas amargas (*S. juzepczukii* y *S. curtilobum*), las que pertenecen a la gran familia de las papas nativas. Se consideran a *S. x ajanhuiri* (diploide), *S. x juzepczukii* (triploide) y *S. x curtilobum* (pentaploide) como especies híbridas separadas derivadas de cruces entre domesticados y parientes silvestres (Figura 1). En general, estas papas tienen gran adaptación a las zonas altoandinas donde, a diferencia del otro grupo grande de papas nativas comunes o dulces (*Solanum tuberosum* sub especie *Andigena*), no experimentan mayores limitaciones para su normal desarrollo a pesar de las extremas condiciones climáticas a esas altitudes (Gianella 2004).

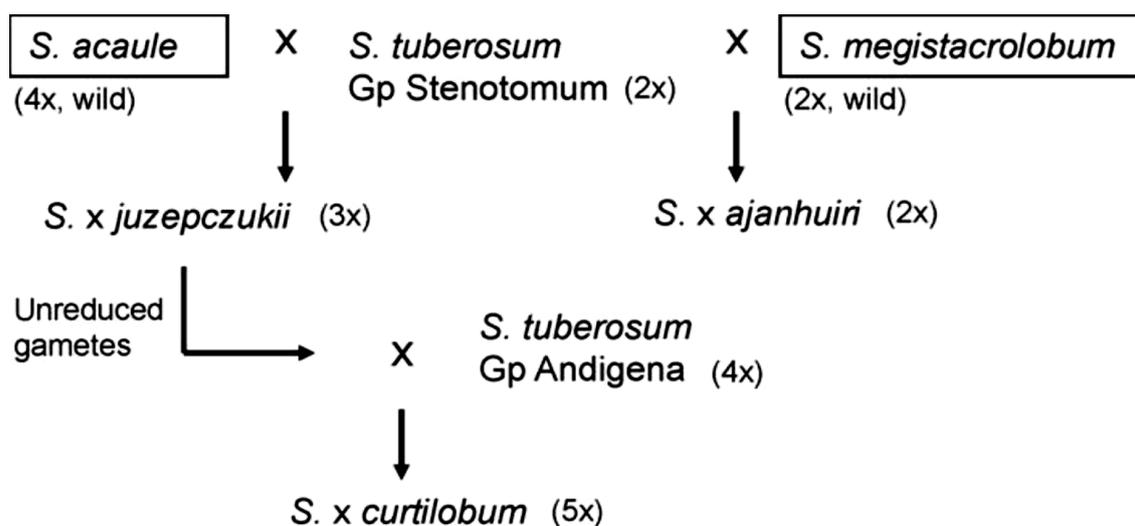


Figura 1: Origen de *S. x ajanhuiri*, *S. x juzepczukii* y *S. x curtilobum*, especies cultivadas con sabor amargo y tolerancia a las heladas

Fuente: Bradshaw y Ramsay (2009)

Las papas amargas están constituidas por tres especies:

- **Especie DIPLOIDE** ($2n = 2x = 24$), :*S. x ajanhuiri*,
- **Especie TRIPLOIDE** ($2n = 3x = 36$): *Solanum x juzepczukii*
- **Especie PENTAPLOIDE** ($2n = 5x = 60$): *Solanum x curtilobum*

Estas especies, se originaron de la especie silvestre *Solanum acaule* Bitt por hibridaciones naturales (Huamán 1983 citado por Cahuana y Arcos 2002).

Solanum curtilobum, se originó del cruzamiento natural entre especies híbridas *Solanum x juzepczukii* y *Solanum tuberosum ssp andígena* ($2n = 4x = 48$). Constituye un híbrido de segunda generación de cruzamiento y se caracteriza por su mediana tolerancia a las heladas (soportan hasta $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$), de alta capacidad productiva, tolerantes a periodos de sequía y son susceptibles a la verruga. Las variedades más representativas de esta especie son los denominados Ocucuris o choquepitos (Cahuana y Arcos 2002).

Las papas amargas reciben esta denominación porque presentan un sabor amargo y desagradable, por su alto contenido de glicoalcaloides (mayores de 20 mg/100g de peso fresco). La papa común tiene un tenor de glicoalcaloides menor de 12 mg/100g. Asimismo, la papa amarga presenta un contenido significativo de azúcar (de 0,3 a 0,5 por ciento) y alrededor de 12 por ciento de almidón (Canqui y Morales 2009). Estos glicoalcaloides hacen que las papas al estado fresco, no sean aptas para el consumo; por lo que, los tubérculos de estas especies de papa, se someten a un proceso de transformación para la obtención de chuño negro y chuño blanco (conocido como moraya en quechua y tunta en las zonas de habla aymara). Aunque, se ha comprobado que después de 4 ó 5 meses de almacenamiento en oscuridad, es posible consumir en forma fresca, ya que los glicoalcaloides y otros componentes del tubérculo (carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y principalmente el agua) han sufrido pérdidas por respiración, brotamiento, transpiración y cambios cualitativos y, posiblemente hay mayor transformación de almidón en azúcares durante el proceso de almacenamiento (Cahuana y Arcos 2002; Palomino *et al.* 2009).

La papa amarga es un producto estratégico de elevado impacto para la alimentación de la población rural, a la que proporciona el mayor porcentaje de calorías con relación a los demás alimentos de la dieta diaria. Es uno de los productos alimenticios de mayor

producción en zonas altas y frías, ya que se cultiva entre los 3,500 a 4,000 m de altitud. La papa amarga presenta ventajas comparativas por su alta tolerancia a bajas temperaturas (hasta -5° C) y resistencia prolongada a periodos de deficiencia hídrica (sequías), características que confieren al cultivo un alto valor de tolerancia a las condiciones climáticas adversas del Altiplano. Entre las propiedades que explican en parte estas características de adaptabilidad, se tiene la estructura morfológica propia del cultivo, que al tener un hábito de crecimiento arrosetado y follaje apretado, proporciona una resistencia natural a las heladas y granizadas; además posee un sistema radicular profundo, lo que le confiere resistencia a la sequía (Canqui y Morales 2009).

2.1.1. Variedad ocucuri morado o negra

El cultivar de papa nativa amarga Ocucuri morado es de suma importancia en la región de Puno, por su origen, difusión, buen comportamiento, volumen de producción y calidad para la elaboración de chuño blanco. Su cultivo se realiza desde tiempos muy antiguos en las diferentes localidades donde se produce actualmente. El nombre vernacular Ocucuri Morado, por su similitud a su forma y color de tubérculo, proviene de la “masa o bola de ceniza de cañihua” que se usa para la elaboración de “llujta”, subproducto que se utiliza en el pijchado de coca (Palomino *et al.* 2009).

El cultivar Ocucuri morado (Figura 2), anualmente se cultiva una extensión de 450 a 480 hectáreas que representa el uno por ciento de la superficie total cultivada de papa en la región de Puno. Se cultiva en las zonas agroecológicas de Suni o Altiplano, Circunlacustre y muy poco en Ceja de Selva y, generalmente, no se consume en forma fresca, por su alto contenido de sabor amargo, pero si en forma procesada, ya sea en forma de tunta o chuño negro en diversos tipos de potajes de la región de Puno (Palomino *et al.* 2009).



Figura 2 : Papa Ocucuri Morada

Fuente: Cahuana y Arcos (2002)

2.1.2. Producción de papa amarga

Actualmente, el 16 por ciento de la producción anual de papa es nativa y se exporta alrededor de 500 toneladas en presentaciones precocidas congeladas y chips (Andina 2022). Las papas nativas amargas (*S. juzepczukii* y *S. curtilobum*), constituyen el 2,5 por ciento de la superficie total de papa de nuestro país y en el 2013, de 50 mil ha sembradas de papa, 8 mil fueron de las variedades amargas (INEI 2014 citado por Ramos 2016). La superficie cosechada en Puno durante los últimos 20 años (1981 -2000) constituye en promedio 29839 ha; de las cuales, a la papa dulce corresponde aproximadamente el 80 por ciento y, a las papas amargas el 20 por ciento. El rendimiento promedio es de 6.1 t/ha; además, no hay diferencias significativas entre variedades dulces y amargas en el rendimiento (Cahuana y Arcos 2002). En el Cuadro 1 se presenta la producción de papa (tn) en el departamento de Puno (1998-2014).

Cuadro 1: Producción de papa en el departamento de Puno (1998-2014)

Año	Superficie cosechada (Ha)			Pérdidas (Ha)	Producción (TM)			Rendimiento (TM/Ha)		
	Papa Amarga	Papa Dulce	Total		Papa Amarga	Papa Dulce	Total	Papa Amarga	Papa Dulce	Total
1998	11,279	33,836	45,115	25	73,687	233,341	306,958	6,5	6,9	6,8
1999	9,845	29,535	39,380	150	82,740	262,008	344,748	8,4	8,9	8,7
2000	9,328	37,313	46,641	58	86,752	310,349	397,101	9,3	9,3	9,3
2001	-	-	37,142	4,099	-	-	314,095	-	-	8,4
2002	-	-	47,099	195	-	-	479,644	-	-	10,1
2003	-	-	46,670	1,372	-	-	477,698	-	-	10,2
2004	-	-	46,928	1,971	-	-	433,100	-	-	9,2
2007	-	-	49,079	619	-	-	485,785	-	-	9,9
2008	-	-	48,341	2,187	-	-	465,246	-	-	9,6
2009	-	-	49,897	525	-	-	506,227	-	-	10,1
2010	-	-	51,796	621	-	-	576,638	-	-	11,1
2012	7,714	43,715	51,429	3,613	85,089	482,523	567,612	11,0	11,0	11,0
2013	8,002	47,530	55,532	853	92,585	550,450	643,035	11,6	11,6	11,6
2014	5,721	51,487	57,208	737	66,933	602,559	669,492	11,7	11,7	11,7
Total	51,890	243,415	72,257	17,025	487,787	2,441,229	6,667,379			

Fuente: Julca (2016)

2.2. TUNTA

La producción de las papas amargas que pertenecen a las especies de *Solanum juzepczukii*, *Solanum curtilobum* y *Solanum ajanhuiri* casi exclusivamente se destinan a la elaboración de chuño y tunta o moraya, debido a que los tubérculos tienen alto contenido de glicoalcaloides que limita su consumo en forma fresca o directa. En el Altiplano de Perú y Bolivia, el 40 a 50 por ciento del volumen total de producción de la papa se destina para el procesamiento de chuño negro y chuño blanco (tunta) porque es una de las formas de conservación de alimentos por periodos largos de tiempo, ya que estos subproductos pueden almacenarse por varios años, constituyéndose en una fuente importante de carbohidratos y calorías (Arcos y Holguin 2010). En el departamento de Puno, las zonas de mayor producción de tunta se encuentran en la provincia de El Collao, principalmente en el distrito de Ilave, destacando Chijichalla, Chingani Jarani, Concahui y otros. Le siguen en importancia las provincias de Lampa, Yunguyo, Azángaro y San Román (Quenta *et al.* 2018). En el Cuadro 2 se presenta la oferta de tunta en El Collao (Puno).

Cuadro 2: Cantidad de tunta en El Collao, Puno (2017)

Mercado	Volumen (Tm)	Porcentaje
Chijichaya	891,72	75
Ullacachi	62,5	5
Jarani	37	3
Otras comunidades	196,75	17
Total	1187,97	100

Fuente: Quenta *et al.* (2018)

El chuño blanco (tunta) procesado de las variedades nativas, tales como: Ccompis, Imilla Negra, Locka y Piñaza, tiene buena demanda en los mercados de Desaguadero, Arequipa, Cusco, Tacna, Moquegua y entre otros (Arcos y Holguin 2010). En el Cuadro 3 y 4 se presenta el destino de su comercialización y su demanda histórica, respectivamente.

Cuadro 3: Destino de la tunta para su comercialización 2017

Mercado	Volumen (Tm)	Porcentaje
Desaguadero	593,99	50
Arequipa	356,39	30
Juliaca	118,8	10
Ilave	29,1	2,5
Puno	89,1	7,5
Total	1187,38	100

Fuente: Quenta *et al.* (2018)

Cuadro 4: Información histórica de consumo tunta

Año	Volumen (Tm)
2012	998,34
2013	1010,45
2014	1096,34
2015	1101,76
2016	1078,12
2017	1187,38

Fuente: Quenta *et al.* (2018)

Según la Norma Técnica Peruana (011.400:2007) la tunta es un alimento elaborado mediante un proceso de deshidratación de tubérculos a través de sucesivos congelamientos (con protección solar), sumergido en agua corriente (río) y secado al sol. Y de características físicas de color blanco, superficie áspera con hendiduras propio de los ojos del tubérculo que le dio origen.

La elaboración de tunta es considerada un método antiguo de conservación de la papa, donde las papas se liofilizaban naturalmente en las montañas altas y frías, un proceso que ha continuado en uso hasta el día de hoy (Hawkes, 1990 citado por Bradshaw y Ramsay 2009) dando como resultado un producto muy apreciado por la población de los pueblos de los países andinos. El procesamiento del chuño por remojo es un preludio necesario para el consumo de papas amargas ya que elimina los glicoalcaloides tóxicos. Por lo tanto, es probable que haya sido más generalizado cuando los andinos usaban solo papas

silvestres. También da un producto deshidratado que puede almacenarse durante varios años y utilizarse cuando escasean las papas frescas (Bradshaw y Ramsay 2009).

El chuño, producto de papa procesada tradicionalmente, es un componente importante de la dieta de las poblaciones indígenas del altiplano de Perú y Bolivia. El chuño se prepara después de la temporada principal de cosecha en junio y julio, cuando las heladas intensas de la noche se alternan con altos niveles de radiación solar durante el día y la humedad es baja. Se reconocen comúnmente dos tipos de chuño: blanco y negro. El procesamiento de chuño blanco, también conocida como moraya (en las zonas de habla quechua) o tunta (en las zonas de habla aymara), implica la exposición prolongada de los tubérculos al agua (corriente) para reducir el contenido de glicoalcaloides de las especies de papa amarga que se utilizan con frecuencia: *Solanum ajanhuiri* ($2n = 2x = 24$), *S. juzepczukii* ($2n = 3x = 36$) y *S. curtilobum* ($2n = 5x = 60$). A diferencia del chuño blanco, que se lava o se sumerge en un río o estanque para eliminar los glicoalcaloides, el chuño negro no está expuesto a agua durante su elaboración (De Haan *et al.* 2011).

2.3. NANOCRISTALES DE ALMIDÓN

Los almidones nativos y modificados se usan comúnmente en la industria alimentaria (Martínez *et al.* 2019a) Una alternativa reciente para mejorar las propiedades físicoquímicas o agregar nuevas funcionalidades en los almidones es modificar estas macromoléculas desde la micro hasta la nanoescala (Alves *et al.* 2021) y, recientemente, los almidones a escala nanométrica se están utilizando como materiales novedosos que presentan propiedades físicas, químicas, reológicas y funcionales únicas debido a su pequeño tamaño y gran área de superficie (Da Rosa Zavareze *et al.* 2019). En los últimos años, un nuevo uso industrial del almidón, la producción de nanocristales de almidón, ha atraído una atención sustancial debido a su tamaño a nanoescala, bajo costo, abundancia, biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad (LeCorre *et al.* 2012).

La ciencia y la tecnología de las partículas es un área de investigación interdisciplinaria en rápido crecimiento, que trata de explorar las relaciones entre las propiedades micro y macroscópicas de los materiales granulares. En cuanto al tamaño, la palabra “nano” se refiere a la milmillonésima parte de un metro (10^{-9} m) y la nanotecnología incluye la fabricación y manipulación de materiales particulados con tamaños inferiores a 100 nm

(Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria – EFSA, 2011 citado por Kumari *et al.* 2020). Sin embargo, se reporta que en el área del almidón la nanoescala se puede considerar de 1 a 999 nm, ya que estas partículas son heterogéneas en forma y tamaño (Qiu *et al.* 2020 citados por Tagliapietra *et al.* 2021).

Los nanosistemas basados en almidón se clasifican comúnmente en dos grupos principales: nanocristales de almidón (NCA) y nanopartículas de almidón (NPA). Los NCA se obtienen por hidrólisis de la fase amorfa del gránulo de almidón, eliminando principalmente la amilosa hasta lograr partículas de tamaño nanométrico. Por otro lado, las NPA son partículas casi completamente amorfas. Se ha informado que las NPA tienden a tener partículas de mayor tamaño que las NCA y que, en ambos casos, su tamaño y morfología pueden controlarse mediante el método de síntesis (LeCorre *et al.* 2011; LeCorre *et al.* 2012 citados por Zabala 2020). Se utilizan varias terminologías para describir los nanocristales de almidón: cristalitas de almidón, nanocristales de almidón, almidón microcristalino y almidón hidrolizado; todos se refieren a la porción cristalina del almidón obtenida por hidrólisis o desintegración física (Le Corre *et al.* 2011 citados por Da Rosa Zavareze *et al.* 2019). Como la mayoría de la parte amorfa del almidón se han hidrolizado de la estructura del almidón, los NCA han mostrado una estructura más organizada y una cristalinidad más alta (> 40 por ciento) que los gránulos de almidón común (~ 25 por ciento). Las NCA se componen principalmente de estructuras similares a plaquetas con un diámetro nanométrico y, como resultado de su alta cristalinidad, pueden soportar altas temperaturas, como las que se encuentran en el procesamiento de alimentos y materiales. (Kumari *et al.* 2020). Debido a estas características, se consideran la fuente renovable más prometedora de nanorrelleno para refuerzo de polímeros o como estabilizador de emulsión (Xu *et al.* 2014).

2.4. OBTENCIÓN DE NANOCRISTALES DE ALMIDÓN

Los protocolos más utilizados en la preparación de nanocristales a partir de almidón se basan principalmente en la hidrólisis ácida, empleando ácidos minerales, debido a su simplicidad y capacidad de control. Sin embargo, existen algunos problemas asociados con el método; la hidrólisis ácida requiere mucho tiempo y el rendimiento o la recuperación de nanocristales de almidón es bajo (Amini y Razavi 2016). En busca de métodos más eficientes, algunos investigadores utilizan pretratamientos como:

ultrasonido (Amini y Razavi 2016), molienda (Dai *et al.* 2018) y enzimático (Kim *et al.* 2012). Un pretratamiento deseado rompería el gránulo de almidón, o crearía poros en el gránulo de almidón, de modo que se produzca una mejor difusión del ácido a través del gránulo de almidón (Hu *et al.* 2015).

2.4.1. Hidrólisis ácida

Las condiciones de hidrólisis durante el proceso de extracción (como el tipo de ácido, la concentración de ácido, la temperatura y el tiempo) afectan el tamaño y el rendimiento de los nanocristales de almidón (Lin *et al.* 2011).

La hidrólisis con ácidos es un método típico para generar NCA. La porción cristalina de los gránulos de almidón se puede aislar por hidrólisis ácida de las regiones amorfas utilizando ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H₂SO₄). Se cree que el ácido ataca preferentemente las regiones amorfas del gránulo a una temperatura más baja que la temperatura de gelatinización (Jenkins y Donald 1997 citados por Kumari *et al.* 2020), lo que resulta en la disolución de la porción amorfa, mientras que las laminillas altamente cristalinas e insolubles en agua permanecen intactas (Wang, Truong y Wang 2003 citados por Kumari *et al.* 2020). El residuo que queda después de la hidrólisis ácida se compone principalmente de estructuras de partículas altamente cristalinas y similares a plaquetas con un tamaño de nanoescala. La cristalinidad relativamente alta de los NCA obtenidos después de la hidrólisis ácida los hace térmicamente muy estables. La mayoría de los almidones exhiben una hidrólisis inicial rápida, seguida de una hidrólisis lenta (Jayakody y Hoover 2002 citados por Kumari *et al.* 2020). A la rápida hidrólisis inicial de las regiones amorfas de los gránulos le sigue la lenta erosión de las regiones cristalinas. Varios parámetros, como la fuente botánica del almidón y el grado relativo de cristalinidad de los almidones, el tipo y la concentración de ácido y las condiciones de tiempo y temperatura de la hidrólisis afectan el grado de hidrólisis y, en consecuencia, tienen un efecto considerable en el rendimiento y la calidad de los NCA producidos por hidrólisis (LeCorre, Bras y Dufresne 2012 citados por Kumari *et al.* 2020).

De los dos ácidos principales utilizados en la síntesis de NCA, el ácido sulfúrico permite velocidades de hidrólisis más rápidas y mayores rendimientos, mientras que la hidrólisis del ácido clorhídrico consume más tiempo. Normalmente, las partículas de tamaño

nanométrico se pueden obtener después de 5 a 7 días de hidrólisis de H_2SO_4 , mientras que esto puede llevar hasta 15 días usando HCl. (Kim *et al.* 2015 y Putaux *et al.* 2003 citados por Zabala 2020). Además, durante la hidrólisis del H_2SO_4 se incorporan grupos sulfato en la superficie de la NCA, aumentando su dispersabilidad y estabilidad en solución acuosa, en comparación con la NCA obtenida por hidrólisis del HCl. (Angellier *et al.* 2006 citados por Zabala 2020). La Figura 3 muestra una representación esquemática de la modificación superficial de la NCA obtenida mediante el uso de diferentes agentes hidrolizantes.

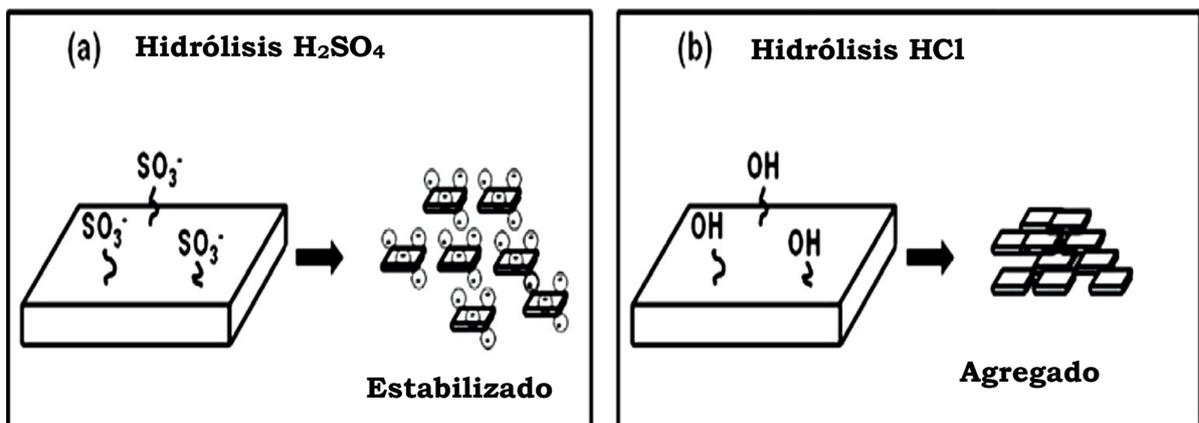


Figura 3 : Representación esquemática de los NCA obtenidos usando (a) H_2SO_4 y (b) HCl como agentes hidrolizantes

Fuente: Zabala (2020)

Se pueden utilizar diferentes tipos de ácidos para la modificación del almidón, como los ácidos minerales y los ácidos orgánicos. Sin embargo, los agentes modificadores (ácidos) pueden actuar de diferentes maneras sobre las estructuras del almidón. Los ácidos minerales o inorgánicos son llamados fuertes porque en solución liberan una alta cantidad de iones (protones), en tanto que los ácidos orgánicos son llamados débiles por la baja cantidad de iones que generan. Los ácidos orgánicos son sustancias que poseen al menos un grupo carboxílico en su molécula y son solubles en agua (Scapinello *et al.* 1998). Dentro de los ácidos orgánicos carboxílicos, más conocidos y de mayor importancia en la industria alimentaria, se tienen: acético, cítrico y propiónico. El ácido cítrico (AC) es el ácido orgánico compuesto por tres ácidos carboxílicos (Figura 4) por lo que es considerado como el más fuerte de los ácidos orgánicos.

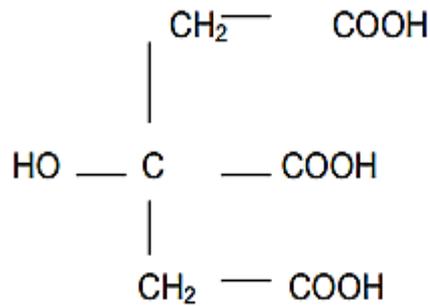


Figura 4 : Estructura del ácido cítrico

Fuente: García *et al.* (1999)

Recientemente, se ha utilizado el ácido oxálico para obtener nanocristales de almidón de maíz ceroso cuyo objetivo fue desarrollar un nuevo método eficiente para la preparación de NCA con altos rendimientos (Zhou *et al.* 2020).

2.4.2. Pretratamientos de la hidrólisis ácida

a. Molienda

La molienda es una técnica ambientalmente limpia para la producción de nanopartículas de almidón y puede afectar directamente las características fisicoquímicas de los almidones, formando nanopartículas más amorfas (Campelo *et al.* 2020).

Patel *et al.* (2016) y Lu *et al.* (2018) observaron una fuerte reducción en la cristalinidad de las nanopartículas con el aumento del tiempo de molienda. Además, Lin *et al.* (2016) mencionan que en el proceso de formación de nanoalmidón, por medio de la molienda, los gránulos de almidón y las bolas de molienda se agitan simultáneamente en los recipientes de molienda a alta velocidad y todo tipo de fuerzas, incluyendo impacto, fricción, colisión, cizallamiento y la extrusión actúan sobre los gránulos de almidón. Esta acción violenta resulta en daños que ocurrieron inicialmente en las grietas granulares y los gránulos grandes se dividieron en partículas más pequeñas. Sin embargo, cuando la bola de molienda es grande, se observaron numerosos espacios entre las bolas, como se muestra en la Figura 5A, que no se ven afectados por la acción mecánica y, por lo tanto, reducirá el efecto de molienda. Cuando las bolas de molienda son pequeñas, el área de las zonas no afectadas disminuye, como se muestra en la Figura 5B y el área de contacto entre las bolas de molienda y el polvo de almidón aumenta y se mejora el efecto de la acción mecánica, por lo tanto, se pueden obtener partículas más pequeñas.

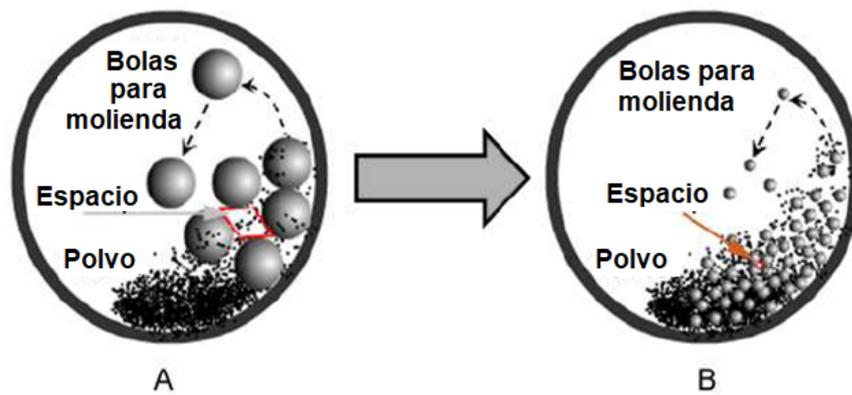


Figura 5 : Ilustración del mecanismo de molienda, bolas grandes (A) y bolas pequeñas (B)

Fuente: Lin *et al.* (2016)

b. Hidrólisis enzimática

El pretratamiento enzimático aumentó la fragmentación de los gránulos de almidón, permitiendo la difusión del ácido en los gránulos y haciendo que las regiones amorfas fueran más selectivas e hidrolizables (Tagliapietra *et al.* 2021). La hidrólisis ácida y la entalpía de fusión aumentaron cuando los gránulos de almidón de arroz ceroso se trataron previamente con α -amilasa, lo que indica que la hidrólisis fue selectiva en las regiones amorfas. El pretratamiento enzimático del almidón antes de la hidrólisis ácida reduce el tiempo de días a horas y aumenta el rendimiento. Es un proceso que ahorra tiempo, pero el costo es muy alto (Kumari *et al.* 2020).

c. Ultrasonido

Los nanocristales de almidón aislados con ácido sulfúrico o clorhídrico tienden fácilmente a agregar las micropartículas formadas, especialmente cuando se secan los nanocristales de almidón para formar polvos. El tratamiento ultrasónico no solo acortó la duración de la hidrólisis y mejoró el rendimiento de los nanocristales de almidón, sino que también rompió los agregados de manera efectiva. En general, existen dos métodos de ultrasonificación para tratar la suspensión de nanocristales de almidón; uno es usar ultrasonidos una vez al día en la suspensión durante la hidrólisis; la otra es aplicar ultrasonidos a la redispersión de los precipitados de almidón obtenidos de la hidrólisis del almidón nativo. El tratamiento ultrasónico durante la hidrólisis ácida conserva la estructura cristalina del almidón nativo y puede aumentar efectivamente el rendimiento de los nanocristales de almidón (Hu *et al.* 2014).

2.5. PROPIEDADES DE LOS NANOCRISTALES DE ALMIDÓN

2.5.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es uno de los análisis más importantes en la producción de nanocristales porque confirma la eficiencia de las condiciones del proceso de nanometrización del almidón. Además, es importante entender su influencia cuando se aplica a productos como emulsiones o películas. La heterogeneidad del tamaño de partícula puede explicarse por las diferencias en los tipos de almidón y la dificultad de obtener imágenes bien definidas de nanocristales no agregados. Algunas nanopartículas superan los 1000 nm debido a la aglomeración (Lin *et al.* 2020 citados por Tagliapietra *et al.* 2021). La fuente botánica también puede influir en el tamaño de los nanocristales de almidón, diferentes fuentes botánicas (maíz, tapioca, frijol mungo, papa, cebada y garbanzo) presentaban nanocristales en el rango de 25,5 a 117,1 nm, lo que puede estar influenciado por el patrón cristalino o por el contenido de amilosa de los almidones nativos (Xu *et al.* 2014 citados por Tagliapietra *et al.* 2021).

Las principales técnicas de caracterización de tamaño de partícula se basan en mediciones de granulometría láser. Angellier *et al.* (2004) informaron sobre el uso de un Malvern Mastersizer (que mide partículas de 0,05 a 900 μm) para determinar las condiciones óptimas de preparación para nanocristales de almidón. Más recientemente, se utilizó la dispersión de luz dinámica para medir el tamaño de las partículas utilizando un Malvern Zetasizer (con un tamaño máximo que oscila entre 0,3 nm y 10 micras). Sin embargo, los resultados de esta técnica de granulometría pueden ser fácilmente perturbadas por sedimentación, agregación o formas mal definidas (Le Corre y Dufresne 2013).

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS): permite determinar el tamaño de partículas en suspensión hasta rangos del orden de los nanómetros, el uso del movimiento Browniano de las partículas en suspensión permite alcanzar estos límites de sensibilidad, adicionalmente este método no altera de ninguna manera la matriz de estudio debido a que es una técnica no destructiva (Uribe *et al.* 2013).

La técnica de difracción láser: es una técnica de medición de tamaño de partícula ampliamente utilizada para materiales que van desde cientos de nanómetros hasta varios milímetros en tamaño. Mide las distribuciones de tamaño de partícula mediante la

variación angular de la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Los parámetros se reportan con base al máximo tamaño de partícula dado para un porcentaje de volumen de la muestra. Los percentiles son definidos como X_aB (X = parámetro, usualmente D para diámetro, a = distribución de la ponderación, como por ejemplo “ v ” de volumen, B = porcentaje de la muestra debajo de este tamaño de partícula. Por ejemplo, el $Dv50$ sería el máximo diámetro de partícula que existe debajo del 50 por ciento del volumen de la muestra. Los percentiles más comúnmente reportados son los $Dv10$, $Dv50$ y $Dv90$ (Tabín del Pinal 2021).

2.5.2. Cristalinidad relativa

El almidón nativo es un biopolímero de forma granular que presenta regiones amorfas y semicristalinas. La semicristalinidad da lugar a los diferentes patrones de cristalinidad denominados A, B y C. El patrón A, característico de los almidones de cereales, presenta los picos principales (2θ) a 15° , 17° , 18.1° y 23.3° , y un débil pico a 11.2° . El patrón B, característico de los tubérculos y del almidón de maíz con alto contenido de amilosa, presenta los picos principales (2θ) a 5.5° , 15.2° , 17.2° , 22.3° y 24.0° – 24.7° . El estándar tipo C se considera una mezcla en diferentes proporciones de los tipos A y B, siendo característico de los almidones de leguminosas y de algunas raíces como el almidón de yuca (Tagliapietra *et al.* 2021).

El grado de cristalinidad define la relación entre la masa de las regiones cristalinas y la masa total de los nanocristales, y debe ser del 100 por ciento para los nanocristales de polisacáridos, pero debido a la eliminación incompleta de las regiones amorfas, puede dar como resultado un menor grado de cristalinidad (Kumari *et al.* 2020). A diferencia de los nanocristales de celulosa, los nanocristales de almidón no son casi 100 por ciento cristalinos sino 45 por ciento cristalinos con variaciones dependiendo sobre el origen botánico. El grado de cristalinidad permanece bajo incluso después de la hidrólisis ácida, lo que demuestra que una cantidad importante de materiales no organizados permanece en la suspensión de los nanocristales de almidón. También se encontraron que los nanocristales de almidón preparados por hidrólisis ácida retuvieron el mismo tipo cristalino que su contraparte nativa (Le Corre y Angellier 2014). Cuando los almidones granulares se tratan durante mucho tiempo a temperaturas por debajo de la gelatinización y soluciones de HCl o H_2SO_4 , la región amorfa se degrada, lo que da como resultado un

residuo de cristalinidad relativa (CR) más grande (área del pico/área de difractograma total) en comparación con el almidón de origen (Xiong *et al.* 2021 citados por Tagliapietra *et al.* 2021).

2.5.3. Gelatinización

Se ha demostrado que las temperaturas de transición de gelatinización y la amplitud de la endoterma de gelatinización aumentan con la hidrólisis ácida. Sin embargo, se ha informado que la influencia de la hidrólisis ácida sobre la entalpía de gelatinización varía con la fuente de almidón y el tiempo de hidrólisis. Dado que la hidrólisis ácida ataca preferentemente a las regiones amorfas en el gránulo, los cristalitas se desacoplan y ya no se desestabilizan por las partes amorfas. En consecuencia, los cristalitas de almidón de los almidones tratados con ácido se funden a una temperatura más alta y el intervalo de temperatura de transición es más amplio. Las temperaturas de transición más altas podrían deberse a hélices dobles de amilopectina más largas que en la molécula de amilopectina no hidrolizada, donde los puntos de ramificación podrían reducir la longitud de los segmentos que forman la hélice (Hoover 2000).

Estos análisis son de gran importancia porque definen las condiciones térmicas en las que se pueden aplicar las nanopartículas y en qué proceso se mantendrán estables. En general, las nanoestructuras de almidón tienen características térmicas diferentes a las de los almidones nativos y pueden estar relacionadas con fuentes botánicas, estructuradas, tipos de ácidos utilizados en la hidrólisis y el método de producción de nanocristales (Tagliapietra *et al.* 2021).

2.5.4. Estructura funcional

La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica utilizada para caracterizar la estructura ordenada del almidón. La región del espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) entre 1050 y 950 cm^{-1} es sensible a las estructuras de orden de corto alcance de la doble hélice. Por tanto, la relación de intensidad de las bandas FTIR a 1022 y 1044 cm^{-1} es un indicador de la cristalinidad del almidón. La intensidad de la banda a 1022 cm^{-1} disminuye al aumentar el estado amorfo. Generalmente, esta relación de intensidad se usa para comparar cómo cambia la cristalinidad del almidón nativo a través de modificaciones físicas y químicas (Van Soest *et al.* 1995).

Según Pozo *et al.* (2018) la comparación de espectros FTIR de almidones de diferentes variedades basados en la relación de absorbancia 1047/1022 y 1022/995 cm^{-1} se ha utilizado para estimar el nivel de estructura ordenada dentro de los gránulos de almidón. Los almidones de papa y de maíz con alto contenido de amilosa muestran un orden de nivel más alto en el borde de los gránulos que el trigo y el maíz ceroso, y que FTIR es una técnica engañosa para discriminar polimorfos. Sin embargo, Warren *et al.* (2016) con una gama más amplia de almidones secos mostró una débil correlación entre la relación de absorbancia de ambos picos y XRD. En todos estos trabajos se tomó el espectro FTIR con reflectancia interna total atenuada (ATR), por lo que el nivel de orden se refiere únicamente a la superficie del gránulo de almidón.

2.5.5. Potencial zeta

El concepto de potencial zeta (Z) se ha aplicado con mucho éxito en el campo de la ciencia coloidal para comprender las interacciones coloidales y controlar la estabilidad de un sistema coloidal. La magnitud de Z da una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Generalmente, cuando todas las partículas tienen un valor de Z, positiva o negativa, grande (donde la positividad y la negatividad es mayor o menor que +30 mV y -30 mV), se repelen entre sí y la dispersión es estable. Por otro lado, cuando las partículas tienen valores bajos de Z, no habrá fuerza para evitar que las partículas se agreguen (Wongsagonsup *et al.* 2005).

Cuando los nanoalmidones se aplican como sistemas dispersos en diferentes solventes o en emulsiones alimentarias/farmacéuticas, los valores de potencial zeta son esenciales para predecir la estabilidad de estos sistemas ante fenómenos físicos relacionados con la inestabilidad de las soluciones coloidales (como formación de crema, aglomeración, decantación y otros). Los sistemas coloidales pueden considerarse termodinámicamente estables si los valores del potencial zeta son superiores a ± 30 mV. Debido a su naturaleza química, los almidones nativos no tienen valores elevados de potencial zeta, lo que hace inviable su aplicación en sistemas coloidales. Sin embargo, dependiendo del pH de la solución, el almidón puede adquirir cargas superficiales debido a la presencia de proteínas y lípidos residuales de la extracción. El valor del potencial zeta es un parámetro importante cuando se aplican nanopartículas de almidón en emulsiones y soluciones. Cuantificar el valor de potencial zeta del almidón, sin ningún tipo de aplicación, parece

un parámetro sin sentido ya que las cargas superficiales de estas nanopartículas pueden ser modificadas por otros ingredientes durante la producción de la emulsión (Tagliapietra *et al.* 2021).

2.6. MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN

La optimización de nuevos procesos puede ser una de las actividades que consume más tiempo durante el desarrollo de productos o métodos. Los altos costos de los equipos, los reactivos y el tiempo del personal pueden retrasar el proceso de optimización y dificultar el desarrollo e implementación de nuevas metodologías. Un enfoque alternativo utiliza arreglos ortogonales para reducir la cantidad de experimentos requeridos. Un método ortogonal comúnmente utilizado es el diseño de Taguchi, ampliamente aplicado para la optimización de procesos de ingeniería (Ballantyne *et al.* 2008) (Anexo 1). La diferencia entre el diseño de experimento clásico y el enfoque de Taguchi se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Diseño de experimentos enfoque clásico versus Taguchi

	Enfoque clásico	Enfoque Taguchi
Filosofía	Énfasis en técnicas estadísticas, matemáticas	Modelos de diseño de sistemas, parámetros y tolerancias con un objetivo
Propósito	Mejorar la eficiencia de la adquisición de información.	Mejora de la eficiencia y la ingeniería de calidad
Objetivo	Detectar las causas para el cumplimiento de las especificaciones	Se esfuerza por la robustez
Contenido	Detección de causas	Eliminación del impacto de las causas
Diseño	Múltiples técnicas estadísticas	Arreglos ortogonales, gráficos lineales, diseño de arreglo interno/externo
Interacciones	Intenta dar cuenta de todas las interacciones	Minimiza las interacciones entre los factores de control (prefiere los efectos principales)

«continuación»

Metodología	Sigue estrictamente las estadísticas, suposición de igual variabilidad	Desarrollo de métodos rentables
Diferencias técnicas	Énfasis en la prueba F, interacciones tratadas defensivamente, suposición de distribución multivariante	Diseño de parámetros para ruido (S/N), prefiere los efectos principales, énfasis en seleccionar características con buena aditividad, enfoque de función de pérdida para el diseño de tolerancia

Fuente: Rao *et al.* (2008)

2.7.1. Arreglos ortogonales

Los arreglos ortogonales son diseños propuestos por Taguchi que, como su nombre lo indica, tienen la propiedad de ortogonalidad, misma que también poseen los diseños factoriales clásicos. Se dice que una matriz de diseño es ortogonal si sus columnas son linealmente independientes, lo cual se tiene si la multiplicación de dos columnas cualesquiera es igual a cero (Gutiérrez y De La Vara 2008).

Las columnas de un arreglo ortogonal (AO) representan los parámetros experimentales a optimizar y las filas representan los ensayos individuales (combinaciones de niveles). Las columnas son ortogonales por pares, es decir, para cada par de columnas (parámetros) todas las combinaciones de niveles de parámetros ocurren el mismo número de veces. Un AO representa solo una pequeña fracción del diseño experimental factorial completo (Packianather *et al.* 2000). En el método de Taguchi se hace uso sistemático de arreglos ortogonales para investigar los efectos principales y, a veces, las interacciones de dos factores. Un ejemplo de arreglo ortogonal de Taguchi se denota por $L_{18}(3^6)$ para indicar dieciocho tratamientos y seis factores con tres niveles cada uno. Cabe señalar que el factorial completo de seis factores con tres niveles sería de 729 tratamientos, que se reduce a 18 utilizando el método de Taguchi (Rao *et al.* 2008).

En el Cuadro 6 se muestra un OA común para parámetros que se prueban en tres niveles diferentes

Cuadro 6: Arreglo ortogonal L₉

Nº Prueba	Columna/parámetro			
	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Fuente: Packianather *et al.* (2000)

2.7.2. El diseño robusto

Los productos/procesos no solo se ven afectados por factores controlables, sino también por factores que son incontrolables o difíciles de controlar. Estos últimos factores se conocen como factores de ruido, que hacen que una característica se desvíe de su nivel deseado y/o especificado. Dado que la eliminación de los factores de ruido es poco práctica y, a menudo, imposible, el método de Taguchi busca minimizar los efectos del ruido y determinar el nivel óptimo de los factores controlables importantes basándose en el concepto de robustez. El objetivo es crear un diseño de producto/proceso que sea insensible a todas las combinaciones posibles de los factores de ruido incontrolables y que, al mismo tiempo, sea eficaz y rentable como resultado de establecer los factores controlables clave en ciertos niveles (Mitra 2016). La relación S/R es un índice de solidez de la calidad y muestra la magnitud de la interacción entre los "factores de control" y los "factores de ruido". Los factores de control y de ruido deben asignarse a diferentes grupos para el estudio de la robustez, lo que es significativamente diferente del enfoque del diseño de experimento tradicional, donde no hay distinciones entre los factores de control y de ruido (Rao *et al.* 2008).

2.7.3. La relación señal-ruido (S/R)

Taguchi generalizó el concepto de la relación señal-ruido (relación S/R) como se usa en la industria de la comunicación y lo aplicó para la evaluación de sistemas de medición, así como para la función de productos y procesos. La relación S/R es una escala de

medición que se ha utilizado en la industria de las comunicaciones durante casi un siglo. Cuanto mayor sea la relación S/R, mejor será la calidad (Barrett 2007).

La relación S/R es un índice de robustez de la calidad y muestra la magnitud de la interacción entre los "factores de control" y los "factores de ruido" y es un estimador lógico de alguna medida de desempeño (Rao *et al.* 2008). Los factores controlables se separan en dos grupos principales: (i) factores de control: que afectan la variabilidad en una respuesta; y (ii) factores de señal: que afectan solo la respuesta media subyacente. El término señal, o valor promedio de la característica, representa el componente deseable, que preferiblemente estará cerca de un valor objetivo especificado. El término ruido representa el componente indeseable y es una medida de la variabilidad de la característica de salida, que preferentemente será lo más pequeña posible. Los factores de control son los factores que el investigador puede especificar libremente para mejorar la relación S/R. Sus niveles se seleccionan para minimizar la sensibilidad del rendimiento del producto a todos los factores de ruido Taguchi combinó estos dos componentes en una medida conocida como relación señal-ruido (S/R) y al resultado de esta relación se le denomina ETA (Packianather *et al.* 2000). Las expresiones matemáticas para la relación S/R dependen de las tres situaciones (el objetivo/nominal es mejor, más pequeño es mejor y más grande es mejor) y se mide en decibelios usando las fórmulas que se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Fórmulas para la relación S/R

Más grande es mejor	$S/R = -10 \log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right]$
Más pequeño es mejor	$S/R = -10 \log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right]$
Nominal es mejor	$S/R = -10 \log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - m)^2 \right]$

Donde: Y_i = es el valor de respuesta, n = es el número de repeticiones, m = el valor objetivo (nominal) de la respuesta

Fuente: Packianather *et al.* (2000)

2.7.4. Metodología de Taguchi

Según Rao *et al.* (2008) la metodología de Taguchi consta principalmente de cuatro pasos, como se ilustra en un diagrama de flujo que se muestra en la Figura 6.

Paso uno - Fase de planificación: Se debe tener una comprensión general del proceso/producto para investigar el efecto de las variables en la característica de rendimiento de salida o para optimizar cualquier proceso.

Paso dos - Fase de conducción: se realizan experimentos diseñados utilizando arreglos ortogonales especiales.

Paso tres - Fase de análisis: se analizan los datos de los experimentos y se predicen las condiciones óptimas.

Paso cuatro - Fase de implementación: Se realizan experimentos de seguimiento para verificar los resultados obtenidos e implementar soluciones.

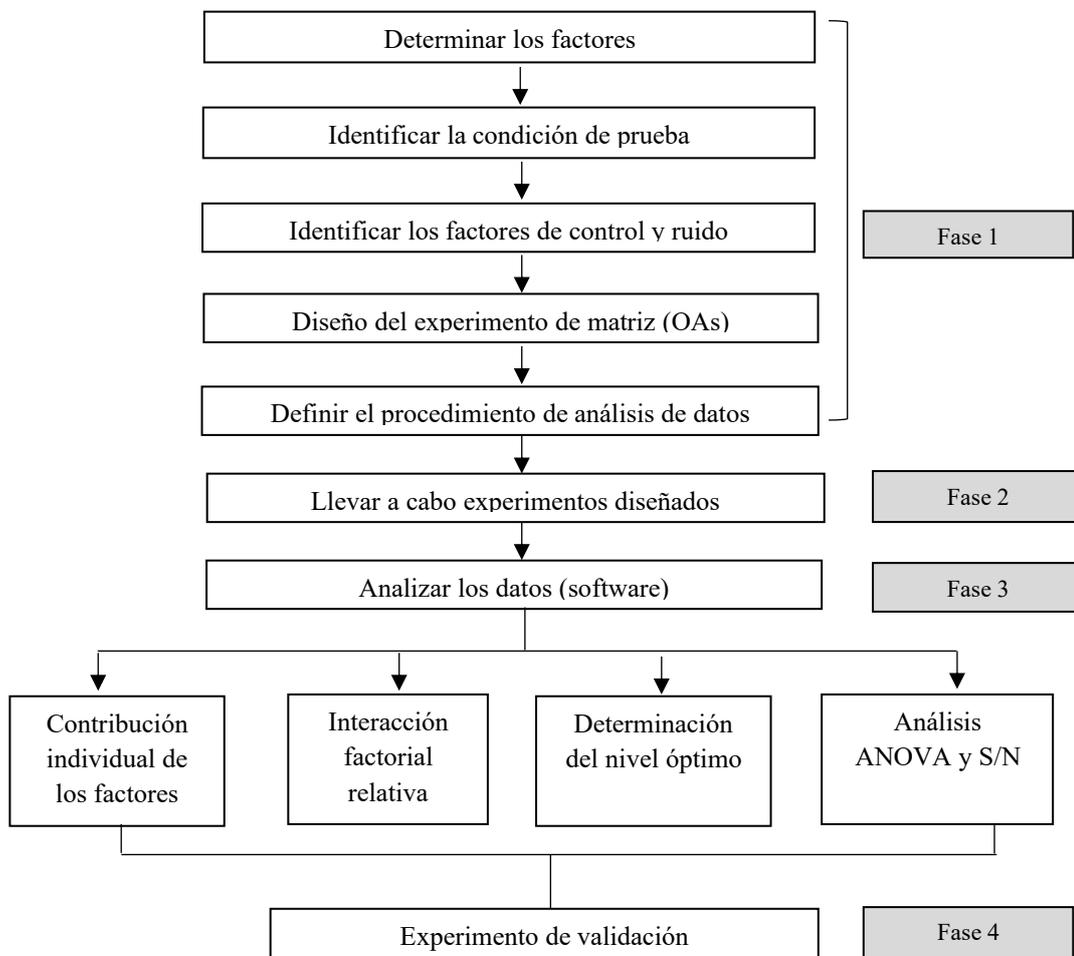


Figura 6: Pasos involucrados en el uso de la metodología de Taguchi

Fuente: Rao *et al.* (2008)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio asignado al Grupo de Investigación de Propiedades de Biopolímeros y sus Aplicaciones de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2. MUESTRA

Se utilizaron los almidones nativos obtenidos de la papa amarga y la tunta del cultivar Ocucuri Negra (*Solanum curtilobum*) procedente de la comunidad campesina de Jallamilla, Ilave (región Puno).

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. Materiales

- Bandeja de secado Pyrex®
- Bolsas Ziploc de polietileno
- Materiales de vidrio diversos (placas Petri grandes, matraces Erlenmeyer con tapa rosca de 500 ml, probetas, fiolas con tapa de 1000 ml, vasos precipitados de 250 ml, baguetas, etc.).
- Papel aluminio
- Pipetas de Pasteur
- Silica Gel (Fisher Chemical, España)
- Tamiz de 12" diámetro, N° 120 (125 µm) en Acero Inoxidable (Marca RICELI)
- Tubos para centrífuga

3.3.2. Equipos

- Agitador magnético (Heidolph®, modelo MR Hei-Tec, Alemania)
- Analizador de tamaño de partícula NanoBrook (Brookhaven Instruments, modelo 90 Plus, USA)

- Analizador de tamaño de partícula (Malvern Instruments Ltd., modelo Mastersizer S, Reino Unido)
- Balanza analítica (Ohaus®, modelo Explorer, USA)
- Balanza de precisión (AND®, modelo GX-6002A, UK)
- Balanza infrarroja para medición de humedad (Mettler Toledo®, modelo MJ33, USA)
- Centrífuga (Eppendorf®, modelo 5804 R, Alemania)
- Difractómetro con tubo con ánodo de cobre ($\lambda=1.54060\text{\AA}$) y geometría Bragg-Brentano (θ - θ) (Bruker, modelo D8 ADVANCE. Alemania)
- Microcalorímetro Diferencial de Barrido con celdas de acero inoxidable Hastelloy® (TA Instruments, modelo MCDSC, USA)
- Espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier equipado y atenuador de reflectancia total (ATR) (Shimadzu, modelo IRPrestige-21, Japón)
- Estufa de aire caliente (MMM, modelo Venticell55, Alemania)
- Incubadora de laboratorio con agitación orbital (MRC, modelo TOU-120, Israel)
- Liofilizador (Millrock Technology, modelo STELLAR®, USA)
- Microscopio electrónico de barrido (Carl ZEISS, modelo EVO MA10, Alemania)
- Molino eléctrico (s/m)
- Molino planetario de bolas (Retsch, modelo PM100, Alemania)
- Potenciómetro (CRISON, modelo Basic20, España)
- Refrigeradora-Congeladora (BOSH®, modelo KAD62V40, Alemania)

3.3.3. Reactivos

- Ácido cítrico anhidro para síntesis (Merck®, Alemania)
- Bicarbonato de sodio p.a. (Movilab, Argentina)
- Etanol absoluto p.a. (Merck®, Alemania)

3.4. MÉTODO DE ANÁLISIS

3.4.1. Determinación de tamaño de partícula

a) Medición de partículas de tamaño micro

Se utilizó el método reportado por Sevenou *et al.* (2000) con ligeras modificaciones. El análisis del tamaño de las partículas se realizó con dispersión de luz láser de ángulo bajo (LALLS, acrónimo en inglés) usando el analizador Malvern Mastersizer S (Malvern

instrument Ltd, Worcester, Reino Unido). Se eligió un modo de análisis polidisperso y un índice de refracción de 1.533 para almidón con una adsorción de 0.001. Se dispersó una muestra de 100 mg en 20 ml de agua destilada. Los resultados se procesaron con el *software* Mastersizer Sv2.19.

b) Medición de partículas de tamaño de nano

Se utilizó la metodología descrita por Wu *et al.* (2022) con ligeras modificaciones. El diámetro medio de las partículas, la distribución del tamaño y el índice de polidispersidad (PDI, acrónimo en inglés) de los nanocristales (NC) se caracterizaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, acrónimo en inglés) con un analizador de tamaño de partícula escala nanométrica Brookhaven modelo 90 plus (Anexo 2).

3.4.2. Morfología electrónica de barrido

Se utilizó la metodología descrita por Niu *et al.* (2020) con ligeras modificaciones. Las características morfológicas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (Carl ZEISS, modelo EVO MA10, Alemania) a un voltaje de aceleración de 20 kv y una amplificación de 1500X.

3.4.3. Difracción de rayos X

Se utilizó la metodología descrita por Duan *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. La estructura cristalina de las muestras se analizó utilizando un difractómetro de rayos X D8 ADVANCE (Bruker, Alemania) con rayos Cu-K α ($\lambda=1.54060\text{\AA}$). La cristalinidad relativa se calculó utilizando el *software* PeakFit v4.12 SeaSolve.

3.4.4. Rendimiento de los nanocristales de almidón (porcentaje)

El rendimiento de los NCA se determinó como un porcentaje del peso seco de los nanocristales liofilizados en relación con el peso seco inicial del almidón nativo como lo describe Xu *et al.* (2014).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso de nanocristales de almidón (b.s)}}{\text{peso inicial del almidón nativo (b.s)}} \times 100$$

3.4.5. Espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR)

Se utilizó la metodología descrita por Mukurumbira *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR-ATR) de las muestras se registraron en el espectrofotómetro FTIR IRPrestige-21 utilizando el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). La resolución fue de 4 cm^{-1} y se realizaron un total de 20 escaneos y un rango de frecuencia de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} en el modo de transmitancia.

3.4.6. Propiedades térmicas

Se siguió la metodología descrita por Saeng-On y Aht-Ong (2017) con ligeras modificaciones. El comportamiento de la transición térmica de las muestras se examinó mediante un calorímetro diferencial de barrido (MCDSC, TA Instruments, USA). La mezcla del polvo (20 mg) y el agua ultra pura (60 mg) se colocaron en una celda de acero inoxidable y se sellaron herméticamente. Luego, la mezcla se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante una hora antes del análisis. Se usó una celda vacía como referencia. La temperatura que se aplicó a las muestras fue $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Las temperaturas y la entalpía de gelatinización de las muestras se obtuvieron del pico endotérmico.

3.4.7. Potencial zeta

Se siguió la metodología descrita por Wei *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. El potencial zeta se determinó en presencia de KCl 1 mM a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando Brookhaven DLS modelo 90Plus. La concentración de la muestra en agua utilizada fue 0,02 por ciento (p/v). Las mediciones se realizaron por triplicado y se reportaron los valores promedio utilizando el *software* BIC Zeta Potential Analyzer (Anexo 3).

3.5.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1. Obtención de nanocristales del almidón de papa y tunta

Se diseñó el flujo de operaciones se presenta en la Figura 7, tomando como referencia la metodología de Dai *et al.* (2018) quienes obtuvieron nanocristales de maíz por el método de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico. A continuación, se detalla el procedimiento que se determinó en esta investigación:

- **Molienda:** La molienda de los almidones se realizó con el molino planetario de bolas (Retsch, modelo PM100, Alemania). Brevemente, se pesó el almidón de papa amarga o de tunta (40 g, base seca) en el recipiente de molienda (de óxido de circonio) con las billas de 3 mm de diámetro (de óxido de circonio) y se añadieron 120 ml de etanol absoluto para dispersar el almidón. La operación se realizó a una velocidad de rodadura de 300 rpm durante 15 min.
- **Secado:** El almidón molido fue separado por un tamiz de acero inoxidable (N° 120) y finalmente se secó en estufa a 40 °C por 24 h.
- **Hidrólisis:** Se prepararon suspensiones de almidón molido de papa amarga o de tunta empleando soluciones de ácido cítrico. Las suspensiones se prepararon en matraces Erlenmeyer, los cuales fueron colocados en el *shaker* orbital (MRC, modelo TOU-120, Israel) a 40 °C por 15 días con agitación constante de 150 rpm.
- **Centrifugación:** Terminado el período de hidrólisis, el almidón fue lavado con agua destilada y separado con dos centrifugaciones sucesivas (4500 rpm durante 15 min),
- **Neutralización:** Posteriormente, el material suspendido en agua se neutralizó con una solución de bicarbonato de sodio (1,2 g/2 l) hasta alcanzar un pH neutro.
- **Liofilización:** El material obtenido fue congelado a -40 °C y el hielo contenido fue sublimado a 40 °C, 100 mTorr.
- **Almacenamiento:** El producto liofilizado (nanocristales de almidón) fue acondicionado en un mortero, tamizado y almacenado en contenedores herméticos para su posterior caracterización.

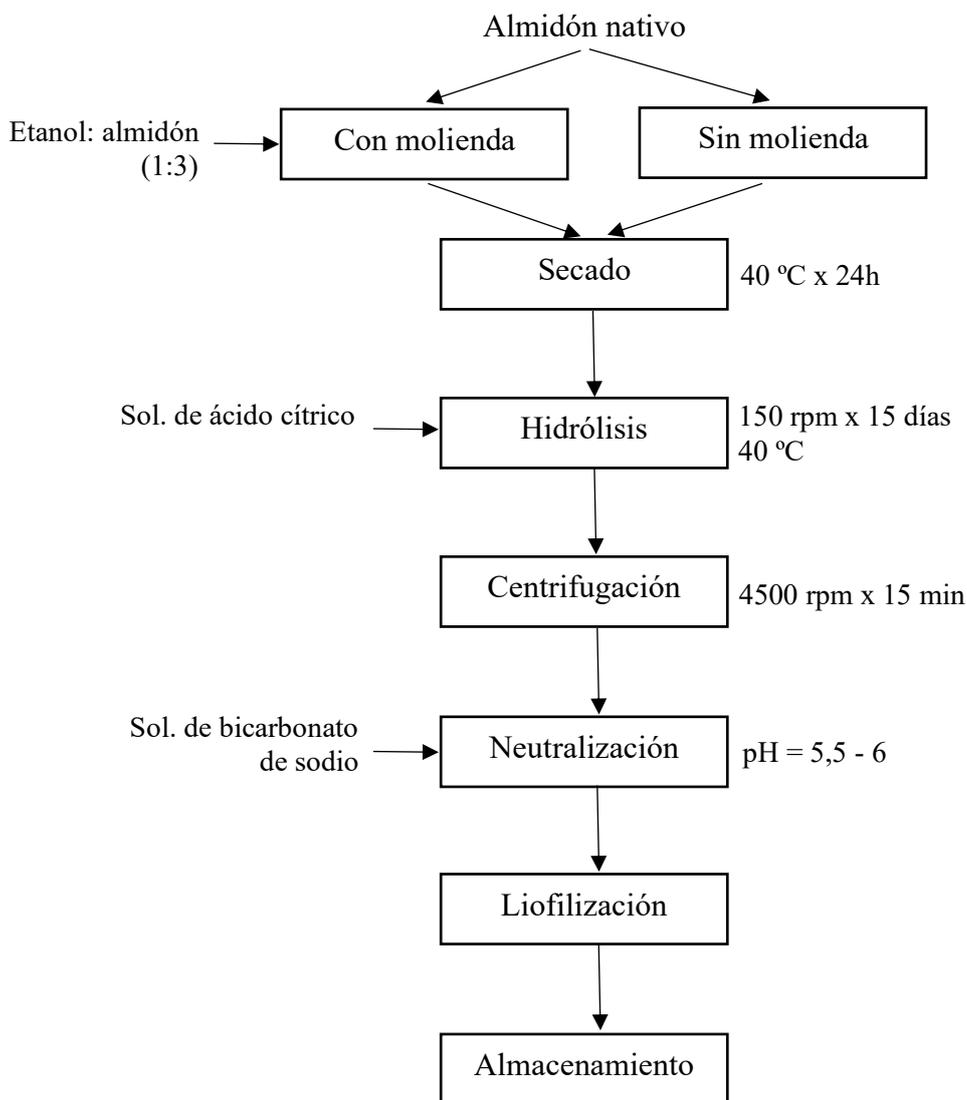


Figura 7: Flujo de operaciones del proceso de obtención de nanocristales de almidón de papa amarga y tunta

3.6. ESQUEMA EXPERIMENTAL

Las etapas de la investigación se muestran en el Cuadro 8.

Etapa 1: Obtención de los nanocristales

Para la obtención de los nanocristales de almidón se utilizaron almidones de papa amarga y de tunta con y sin molienda, siguiendo la metodología descrita en la Figura 7. Asimismo, se evaluó el rendimiento de los nanocristales.

Etapa 2: Evaluación del tamaño de partícula y selección de nanocristales

Se evaluó el efecto significativo de la molienda por medio de la medición de tamaño de partícula de los cristales obtenidos. Y se seleccionó para la caracterización y optimización los tratamientos que presentaron tamaño a escala nanométrica.

Etapa 3: Caracterización de los nanocrisales

Se realizaron las siguientes evaluaciones en los nanocrisales: propiedades estructurales medidas con FTIR y XRD, así como sus propiedades térmicas medidas por MCDSC con el objetivo de evidenciar las características de los nanocrisales obtenidos después de la molienda y continuar con el proceso de optimización.

Etapa 4: Optimización del proceso

Se optimizó el proceso utilizando el método de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4(2^3)$.

Etapa 5: Caracterización morfológica, estructural y térmica del tratamiento óptimo

Se realizó la caracterización de los nanocrisales obtenidos con las condiciones óptimas.

Cuadro 8: Esquema experimental

ETAPA 1 OBTENCIÓN DE NANOCRISTALES	ETAPA 2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCRISTALES	ETAPA 3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO	ETAPA 4 CARACTERIZACIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO
	P5 P6 P7 P8 T5 T6 T7 T8		ÓPTIMO "MAYOR ES MEJOR"
Controles: *TAMAÑO *RENDIMIENTO	*TEMPERATURA Y ENTALPÍA DE GELATINIZACIÓN *FTIR *CRISTALINIDAD	*CRISTALINIDAD *RENDIMIENTO	*MEB *POTENCIAL ZETA

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.7.1. Evaluación del tamaño de partícula

Se aplicó un diseño multi factorial categórico que estimó el efecto de los cuatro factores (tipo de almidón, concentración de almidón, concentración de ácido cítrico y tiempo de molienda). El diseño fue un factorial estándar, que constó de todas las combinaciones de

los niveles de los factores (Cuadro 9 y 10). Hubo un total de 16 tratamientos y una réplica. Se utilizó el valor-*p* en la tabla ANVA para determinar la significación estadística de cada uno de los factores. Un valor-*p* inferior a 0,05, tiene un efecto estadísticamente significativo en la variable respuesta con un nivel de confianza del 95,0 por ciento. En esta etapa se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS® CENTURION XVI.

Cuadro 9: Niveles de los factores para el diseño multifactorial categórico

Factores	Niveles	
	1	2
Concentración de almidón (% almidón/solución ácido cítrico) (p/p)	10	20
Concentración de ácido cítrico (% ácido cítrico/agua) (p/p)	10	20
Tipo de almidón	Papa	Tunta
Molienda	Sin molienda	Con molienda

Cuadro 10: Diseño multifactorial categórico para la evaluación del tamaño

N.º TRATAMIENTO/ NOMBRE DEL TRAT.	RÉPLICA	FACTORES/NIVELES			
		TIPO DE ALMIDON	CONCENTRACION ALMIDON	CONCENTRACION ACIDO CÍTRICO	MOLIENDA
1	1	PAPA (1)	(1)	(1)	(1)
2	1	PAPA (1)	(1)	(1)	(2)
3	1	PAPA (1)	(1)	(2)	(1)
4	1	PAPA (1)	(1)	(2)	(2)
5	1	PAPA (1)	(2)	(1)	(1)
6	1	PAPA (1)	(2)	(1)	(2)
7	1	PAPA (1)	(2)	(2)	(1)
8	1	PAPA (1)	(2)	(2)	(2)
9	1	TUNTA (2)	(1)	(1)	(1)
10	1	TUNTA (2)	(1)	(1)	(2)
11	1	TUNTA (2)	(1)	(2)	(1)
12	1	TUNTA (2)	(1)	(2)	(2)
13	1	TUNTA (2)	(2)	(1)	(1)
14	1	TUNTA (2)	(2)	(1)	(2)
15	1	TUNTA (2)	(2)	(2)	(1)
16	1	TUNTA (2)	(2)	(2)	(2)

3.7.2. Optimización por el método de Taguchi

Se aplicó el diseño experimental correspondiente del método de Taguchi con arreglo ortogonal L₄ (2³) (Cuadro 11 y 12). Las variables respuestas fueron la cristalinidad relativa (porcentaje) (Y₁) y el porcentaje de rendimiento de los nanocristales de almidón

(Y₂). El efecto de los factores y las condiciones óptimas fueron analizadas utilizando el *software* STATISTICA 10 StatSoft.Inc®, empleando el criterio de “mayor es mejor”.

Cuadro 11: Niveles de los factores para el arreglo ortogonal L₄ (2³)

Factores	Niveles	
	1	2
Concentración de almidón (% , almidón/solución ácido cítrico)	1	2
Concentración de ácido cítrico (% , ácido cítrico/agua)	1	2
Tipo de almidón molido	1	2

Cuadro 12: Diseño ortogonal L₄ (2³) de Taguchi

Réplica	Tratamiento	Factores/Niveles		
		X ₁ (Tipo de almidón)	X ₂ (Concentración de ácido cítrico)	X ₃ (Concentración de almidón)
1	1	Papa (1)	1	1
1	2	Papa (1)	2	2
1	3	Tunta (2)	1	2
1	4	Tunta (2)	2	1
2	1	Papa (1)	1	1
2	2	Papa (1)	2	2
2	3	Tunta (2)	1	2
2	4	Tunta (2)	2	1

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE LOS NANOCRISTALES

En esta investigación, la obtención de los nanocrisales se realizó siguiendo el flujo de operaciones diseñado para tal fin y que se presenta en el acápite 3.5. El rendimiento de la hidrólisis (porcentaje) para cada experimento se muestra en la Figura 8.

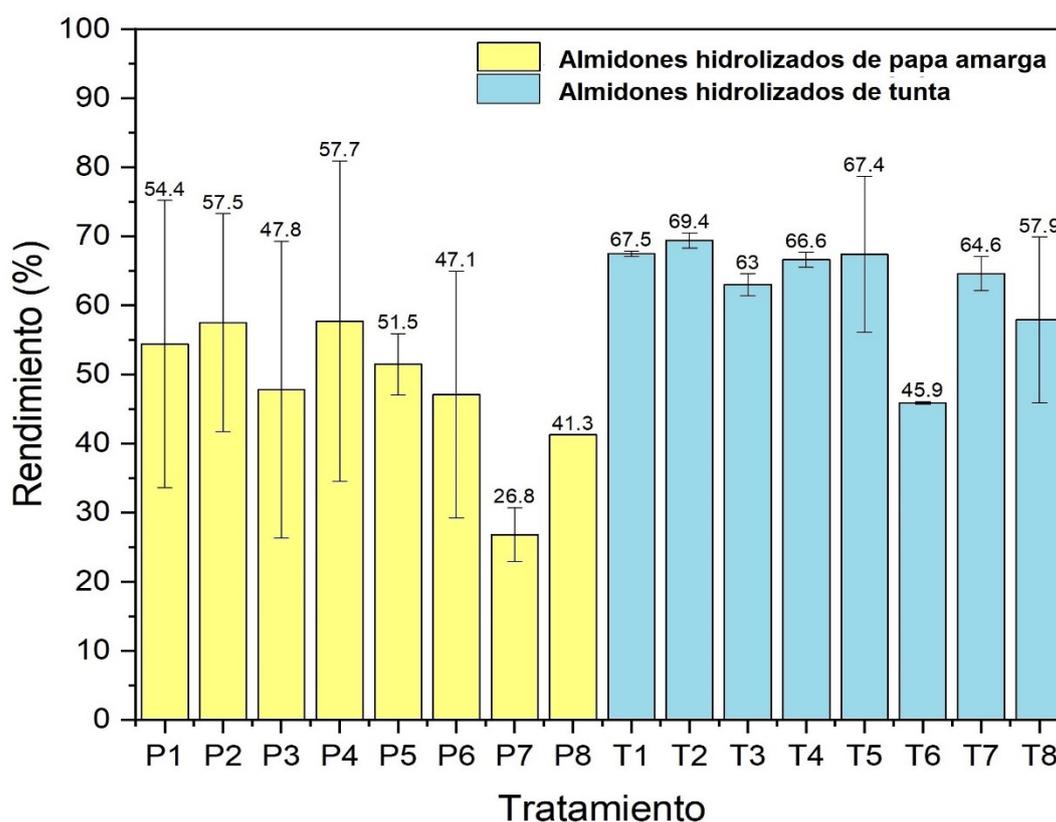


Figura 8 : Rendimiento (porcentaje) de los almidones hidrolizados obtenidos de cada tratamiento

El rendimiento se definió como los gramos de producto liofilizado por gramos de almidón en la mezcla inicial (Le Corre *et al.* 2012). Después del proceso de hidrólisis ácida, se obtuvieron mayores valores de rendimiento para nanocrisales de tunta (45,9 – 69,4 por ciento) que para los nanocrisales de papa (26,8 a 57,7 por ciento). Aun así, estos valores son mayores a los reportados por Xu *et al.* (2014) cuyos valores oscilaron entre el 8,8 por ciento para el nanocrisales de almidón de papa y 35,7 por ciento para el almidón de frijol,

utilizando una hidrólisis con ácido sulfúrico por cinco días. También, reportan rendimientos promedio de nanocristales para los almidones de maíz, cebada, tapioca y garbanzos que fueron 14,1, 18,2, 15,1 y 16,8 por ciento, respectivamente. Angellier *et al.* (2004) reportaron similares resultados de rendimiento, de alrededor de 15 por ciento, para almidón de maíz céreo. Los rendimientos más bajos de nanocristales del almidón podrían implicar que el almidón está más hinchado y, por lo tanto, es más susceptible a la degradación en las condiciones empleadas para la hidrólisis ácida (Jane *et al.* 1997 citado por Xu *et al.* 2014). Por el contrario, el mayor rendimiento de nanocristales del almidón indica una mayor resistencia de los gránulos de almidón al proceso de hidrólisis ácida (Kim *et al.* 2012).

4.2. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

Las Figuras 9 y 10 muestran las curvas de distribución de tamaño de las partículas de almidones hidrolizados de papa amarga y de tunta con y sin molienda. Se observó que todas las muestras presentaron una distribución monomodal, es decir, se observó una sola población de partículas. Es evidente que la posición y la forma de los picos de los almidones hidrolizados sin molienda (P1 – P4) fueron similares (Figura 9A, 10A); mientras que, los picos de los almidones hidrolizados con molienda (P5 – P8) mostraron que este procedimiento alteró considerablemente la dispersión de las partículas de los almidones hidrolizados (Figura 9B, 10B).

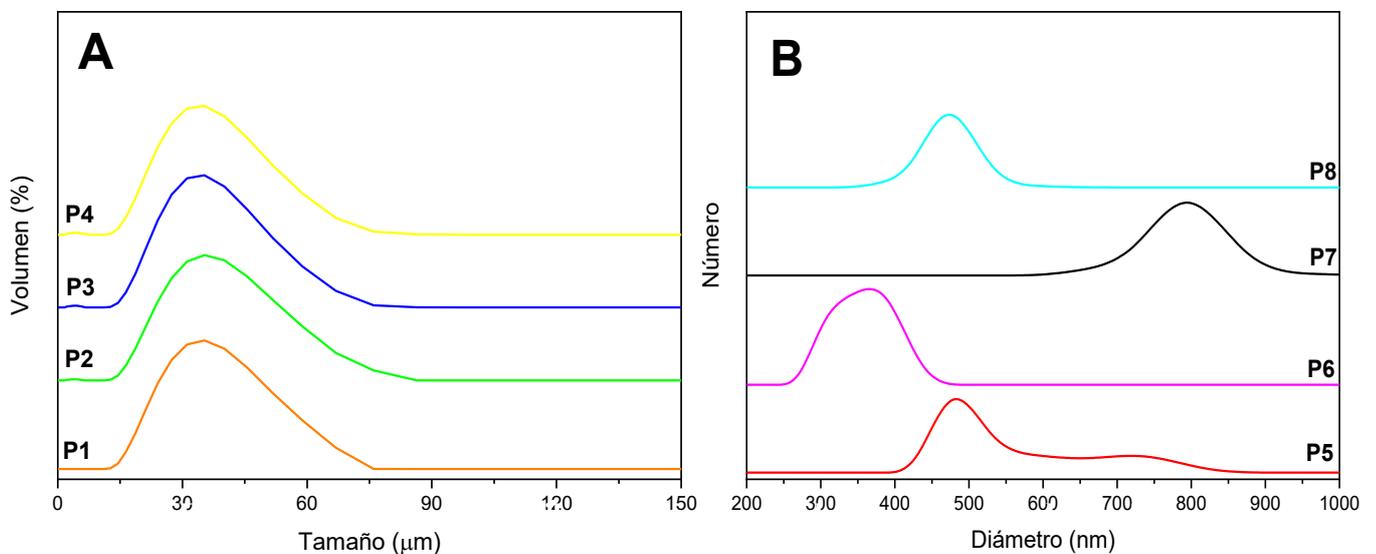


Figura 9: Curvas de distribución de tamaño de las partículas de almidón hidrolizado de papa amarga (A: tratamientos sin molienda, B: tratamiento con molienda)

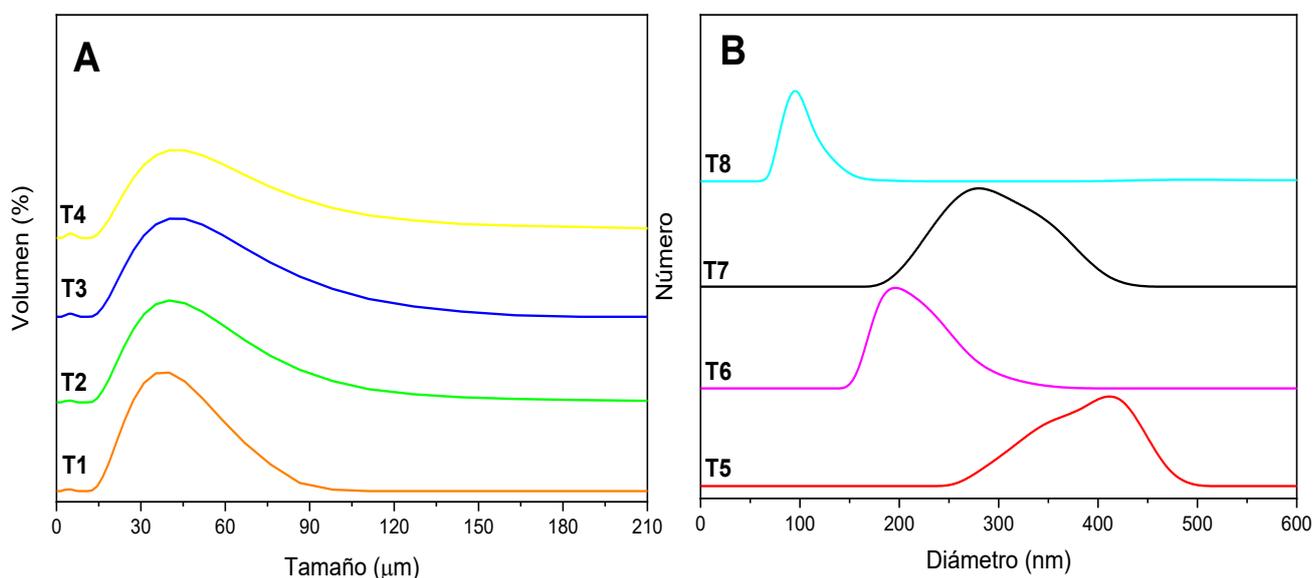


Figura 10 : Curvas de distribución de tamaño de las partículas de almidón hidrolizado de tunta (A: tratamientos sin molienda, B: tratamientos con molienda)

Márquez (2022) obtuvo almidones hidrolizados con una considerable reducción del tamaño de partícula, en el rango de 0,55 –1,13 μm cuando realizó una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico, a los almidones nativos de papas amargas y sus respectivas tuntas. Los nanocristales de almidón, generalmente, se presentan en forma de agregados que tienen un tamaño promedio de alrededor de 4,4 μm, lo que es evidenciado por difracción láser (Angellier *et al.* 2005 citados por Dufresne 2014). Por otra parte, Condés *et al.* (2015) informaron de tamaños de 823 nm y 1287 nm para nanocristales de almidón de maíz normal y céreo, respectivamente. Además, Mukurumbira *et al.* (2017) reportaron tamaños promedios de partículas de 260 – 220 nm para nanocristales de almidón de amadumbe.

El análisis de varianza (Anexo 4) determinó que el factor molienda tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el tamaño de partícula de los nanocristales obtenidos. Los tratamientos 5, 6, 7 y 8, para ambos almidones, fueron los que presentaron menor tamaño de partícula en un rango de 410 a 806 nm (nanocristales de almidón de papa) y 266 – 323 nm (nanocristales de almidón de tunta). Estos valores se encuentran dentro de lo reportado por diversos autores para que puedan ser considerados partículas de tamaño nano. Por otro lado, Dai *et al.* (2018) reportaron que el tiempo de molienda máximo recomendado para un pre-tratamiento de almidón, antes de la hidrólisis ácida, es de 30 minutos, dado que, a mayor tiempo de molienda, la cristalinidad relativa disminuyó drásticamente. Esto

indicó que las estructuras del almidón estaban significativamente dañadas y podrían no ser apropiadas para la producción de nanocristales de almidón.

Loubes *et al.* (2013) mencionan que los estudios de la molienda de almidón están frecuentemente asociados a tiempos prolongados (varias horas). Sin embargo, los efectos logrados mediante tiempos de molienda cortos no han sido suficientemente explorados. También, Dai *et al.* (2018) observaron que, la mayoría de los trabajos publicados se enfocaron en la influencia de la molienda sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón. Así, Ahmad *et al.* (2020) utilizaron un molino planetario, con una velocidad de rotación de 600 rpm durante 5 horas, para preparar nanopartículas de almidón de 9 – 12 nm de tamaño promedio. También, Lin *et al.* (2016) obtuvieron nanopartículas de almidón con un tamaño promedio de 120 nm, luego de someter el almidón de papa a un tratamiento de molienda de 90 minutos (800 rpm), aunque se alteró su cristalinidad, generándose así estructuras amorfas y distorsionadas. Además, Dai *et al.* (2018) utilizaron la molienda en combinación con la hidrólisis ácida para obtener nanocristales de almidón (67,2 – 743,9 nm) con mayor rendimiento en menos tiempo.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCRISTALES

Dado que solamente aquellos almidones que fueron sometidos a molienda, por el tamaño de partícula obtenido, se pueden considerar como nanocristales; a continuación, se presenta la caracterización de dichos tratamientos.

4.3.1. Difracción de rayos X

El almidón es un biopolímero que contiene gránulos semicristalinos con diferentes patrones polimórficos, incluidos los tipos A, B y C (Qin *et al.* 2016). A diferencia de las nanopartículas de almidón, la característica más importante de los nanocristales de almidón es su cristalinidad, que es esencial para ser considerados como tal, por lo que debe evitarse cualquier degradación de la estructura cristalina durante el proceso de preparación (Amini y Razavi 2016). Se utilizó la técnica de difracción de rayos X para estudiar el cambio en las estructuras cristalinas de las partículas de almidón de tamaño nanométrico en comparación con el almidón nativo obtenido de la papa amarga (PON) y de tunta (TON) y se muestran en las Figuras 11 y 12, respectivamente.

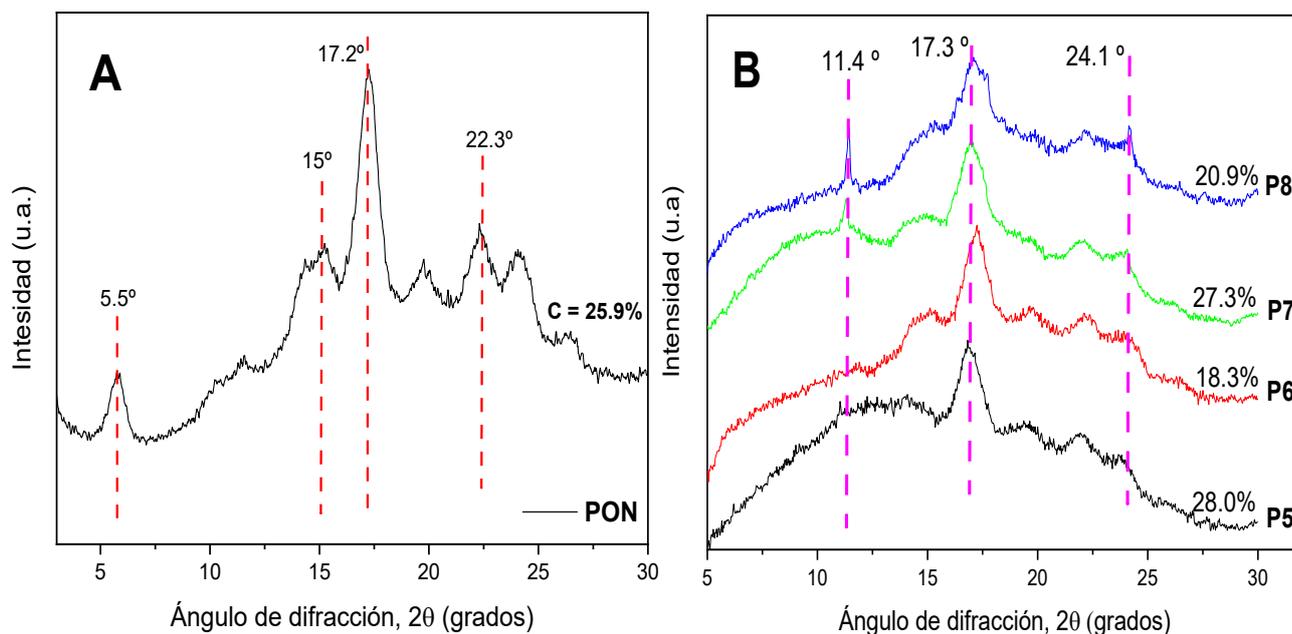


Figura 11 : Patrón de difracción de rayos X del almidón nativo de papa amarga (PON) (A) y los nanocristales de almidón de papa amarga (B)

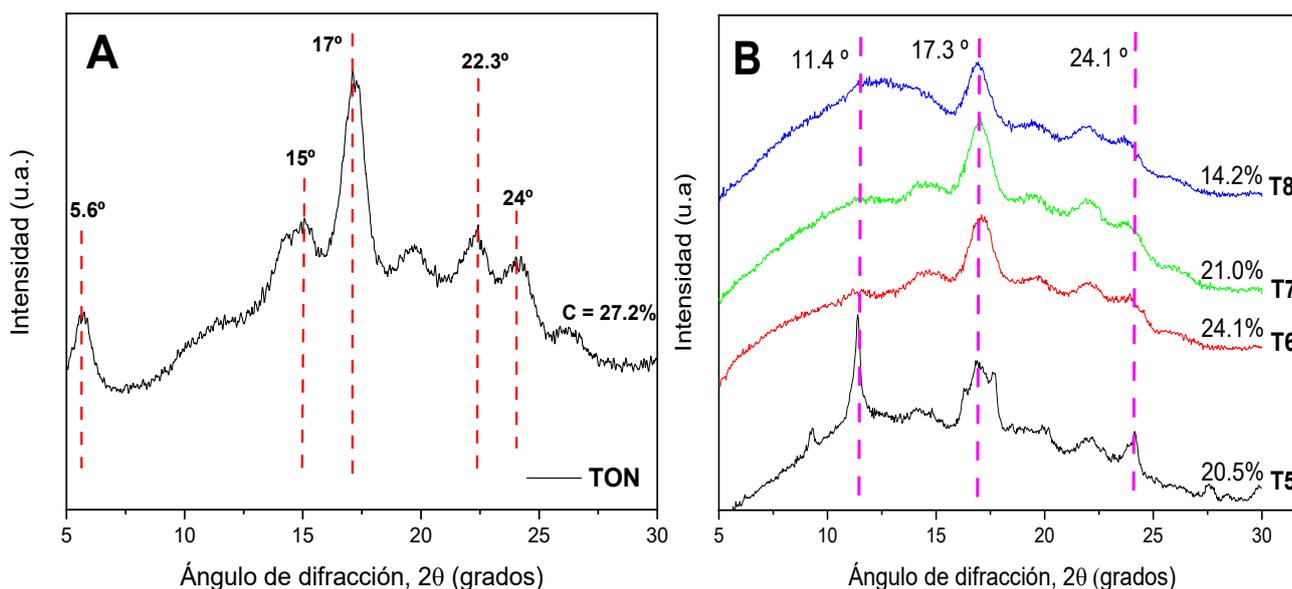


Figura 12 : Patrón de difracción de rayos X del almidón nativo de tunta (TON) (A) y los nanocristales de almidón de tunta (B)

El patrón de cristal del almidón de papa y tunta presentó una estructura de tipo B (Figura 11A y 12A), que es representativo de los almidones de tubérculo con picos de difracción principales a $5,5^\circ$, 15° , $17,2^\circ$, $22,3^\circ$ (Qin *et al.* 2016; Martínez *et al.* 2020). Por el

contrario, las muestras de nanocristales de almidón (Figura 10B y 11B) exhibieron nuevos picos de difracción a 11,4 °, 17,7 ° y 24,1 ° y la desaparición del pico de 5,5 ° para todos los tratamientos de almidones hidrolizados; esta observación sugiere que algunos arreglos cristalinos en los almidones de tipo B sufrieron una disrupción por la hidrólisis ácida (Kim *et al.* 2012).

En comparación con sus almidones nativos, que presentaron valores de 25,9 por ciento (almidón de papa) y 27,2 por ciento (almidón de tunta) la cristalinidad relativa de las muestras de nanocristales disminuyó ligeramente, presentando valores en un rango de 18,3 – 28 por ciento para nanocristales de almidón de papa y 14,2 – 24,1 por ciento para nanocristales de almidón de tunta. Estos valores son similares a los reportados por Mukurumbira *et al.* (2017) para nanocristales de almidón de amadumbe (21 – 29 por ciento) y para nanocristales de almidón de maíz se reportó valores de cristalinidad de 28,1 y 36,6 por ciento (Amini y Razavi 2016). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, si la cristalinidad relativa es inferior al 50 por ciento, indica que una cierta cantidad de material amorfo podría estar presente en los nanocristales producidos (Mukurumbira *et al.* 2017). Según Dufresne (2014) teóricamente, la cristalinidad relativa (proporción entre la masa de los dominios cristalinos y la masa total del nanocristal) de los nanocristales de almidón debería ser del 100 por ciento, pero en realidad la eliminación incompleta de las regiones amorfas de las cadenas superficiales menos ordenadas puede dar como resultado una menor cristalinidad relativa.

Similares resultados reportaron De la Concha *et al.* (2018) para almidones hidrolizados de amaranto y de maíz ceroso que mostraron una ligera disminución en la cristalinidad relativa a tiempos de hidrólisis prolongados (10 días). La disminución de la cristalinidad para tiempos de hidrólisis largos sugiere que el ácido degradó principalmente amilosa y cadenas largas de amilopectina, lo que llevó a un incremento en la proporción de cadenas cortas menos ordenadas. Esto corrobora hallazgos previos que establecieron que, en una primera etapa, la hidrólisis ácida afectó predominantemente a las regiones amorfas, por lo que el almidón residual tuvo una cristalinidad más refinada, sin embargo, a tiempos más largos, la degradación de los gránulos es tan severa que las regiones más cristalinas quedan expuestas a la acción hidrolítica (Utrilla-Coello *et al.* 2014). Además, Velásquez-Castillo *et al.* (2020) también mencionan que el bajo índice de cristalinidad de los

nanocristales de quinua (34,3 – 36,2 por ciento) podría deberse a la distribución de la longitud de la cadena de la amilopectina, que presenta una alta proporción de cadenas cortas frente a cadenas largas y un alto porcentaje de cadenas A de huella (grado de polimerización = 6–8) que podría ser demasiado corto para formar la estructura de doble hélice e inducir defectos estructurales en las regiones cristalinas de los gránulos.

4.3.2. Análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 13 muestra los espectros de FT-IR de los almidones nativos de papa amarga y tunta, así como de los nanocristales de almidón obtenido por hidrólisis con ácido cítrico. El análisis FT-IR se utilizó para determinar los grupos funcionales incorporados en los almidones hidrolizados, lo que se utilizó para conocer los efectos de los tratamientos en la estructura del almidón (Wijaya *et al.* 2019).

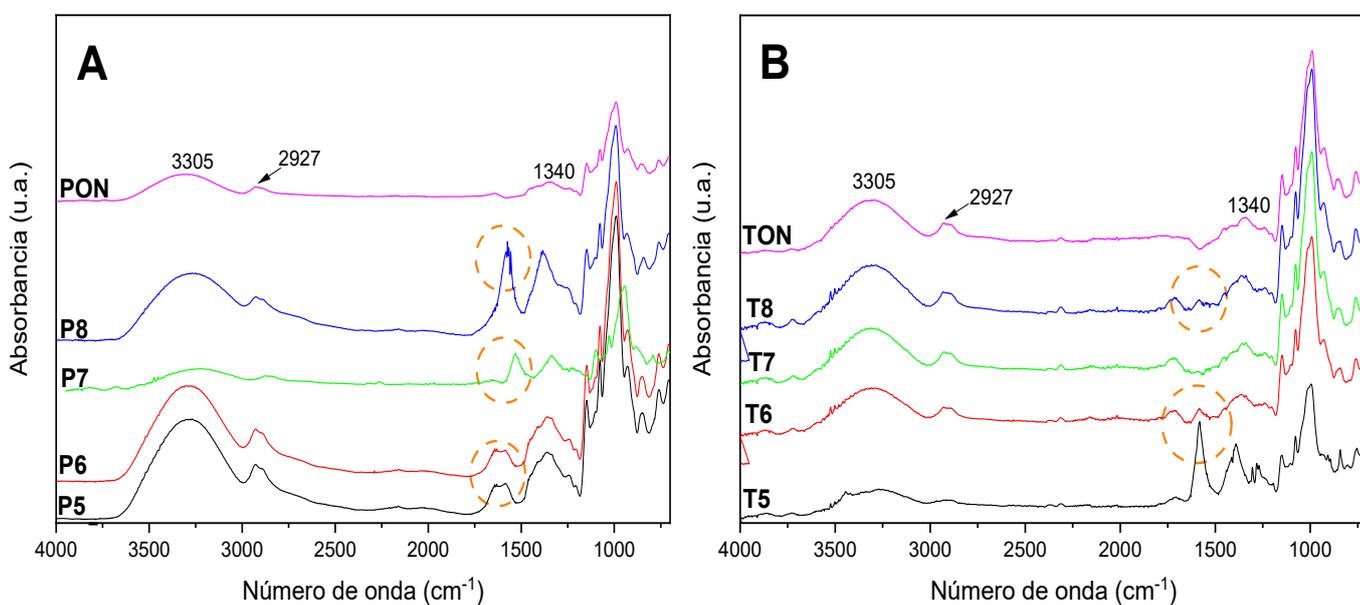


Figura 13 : Espectros FTIR de almidón nativo de papa amarga (PON) y de los nanocristales de almidón de papa amarga (A) y espectro FTIR de almidón nativo de tunta (TON) y de los nanocristales de almidón de tunta (B) (espectros PON y TON obtenidos de Martínez *et al.* 2022)

Los nanocristales de almidón obtenidos por hidrólisis ácida presentaron la aparición de una nueva banda a 1580 cm^{-1} comparado con sus contrapartes nativos (Martínez *et al.* 2022). En la Figura 13 se puede observar que en la región de diagnóstico se presentan dos picos en ambos espectros, el primero que se encuentra en la región de $3269,3\text{--}3305,9$

cm^{-1} , este es atribuido a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo de almidón, revelando el estiramiento del enlace O–H en unidades de glucosa (Hao *et al.* 2018). El segundo pico se encuentra en la región de $2926\text{--}2927.9 \text{ cm}^{-1}$ y corresponde al estiramiento y flexión del C–H del metileno (Saeng-on *et al.* 2017 y Santoyo-Aleman *et al.* 2019) y sólo en los espectros de las muestras de nanocristales de almidón se encuentra un pico en la región de $1573,9\text{--}1643,3 \text{ cm}^{-1}$ y que es atribuido a la vibración de flexión del H–O–H en el agua fuertemente unida presente en los nanocristales (Xu *et al.* 2005 citados por Hao *et al.* 2018; Saeng-on y Ant-Ong 2017). El aumento de la intensidad en la región $1573,9\text{--}1643,3 \text{ cm}^{-1}$ puede atribuirse a cambios en el enlace de hidrógeno inter e intramolecular de las moléculas de almidón resultantes del tratamiento de hidrólisis. La banda a 1644 cm^{-1} es el resultado del agua adsorbida en las regiones amorfas del almidón y se ha informado que varía según la cristalinidad (Kizil *et al.* 2002 citados por Makumbria *et al.* 2017). Diversos autores mencionan que los espectros FT-IR de los nanocristales de almidón comparten perfiles similares a los almidones nativos, lo que sugiere que los grupos funcionales permanecieron sin alteración después del proceso de hidrólisis ácida (Song *et al.* 2008; Dufresne y Castaño 2017; Hao *et al.* 2018; Velásquez-Castillo *et al.* 2019).

Las bandas de absorbancia a 1022 y 1047 cm^{-1} son características de estructuras amorfas y cristalinas en el almidón, respectivamente (Van Soest *et al.* 1995; Ambigaipalan *et al.* 2011; Warren *et al.* 2016 citados por Martínez *et al.* 2019b). La relación de $1047/1022 \text{ cm}^{-1}$ se usa para expresar la relación de dominios cristalinos ordenados a dominios amorfos en almidones (Van Soest *et al.* 1995 citados por Martínez *et al.* 2019b) y la relación $995/1022 \text{ cm}^{-1}$ refleja una organización helicoidal (alineación de hélices en un orden de corto alcance) dentro de la lámina cristalina (Ambigaipalan *et al.* 2011 citados por Martínez *et al.* 2019b). En la Cuadro 13 se muestran los ratios para $1045/1022$ y $1022/995 \text{ cm}^{-1}$ para los almidones nativos y sus respectivos nanocristales.

Cuadro 13: Valores de los ratios de lo almidones nativos y sus nanocristales

Tratamiento	R (1047/1022)	R (995/1022)
P5	0,208	0,616
P6	0,207	0,613
P7	0,539	1,730
P8	0,301	1,036
T5	0,477	1,485
T6	0,460	1,471
T7	0,427	1,361
T8	0,475	1,509
Nativo PON	0,583	1,818
Nativo TON	0,617	1,883

Como se muestra en el Cuadro 13, los ratios de absorbancia a $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ para los nanocristales de almidón son menores a los valores obtenidos para los almidón nativos de papa amarga y de tunta. Zhou *et al.* (2020) reportaron valores de R (1047/1022) en el rango de 0,4286 – 0,4468 para nanocristales de almidón de maíz céreo obtenido con hidrólisis con ácido oxálico; valores que son similares a los obtenidos con la hidrólisis de de papa amarga y de tunta con ácido cítrico. Miao *et al.* (2011) sostienen que los nanocristales de almidón que presentan mayores valores de R (1047/1022) reflejan un mayor número de dominios ordenados.

4.3.3. Propiedades térmicas

El comportamiento térmico de los almidones nativos y sus correspondiente nanocristales se estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB). En el Cuadro 14 y Cuadro 15 se observan los parámetros de gelatinización para las nanocristales de papa y tunta, respectivamente.

Cuadro 14: Parámetros de gelatinización del almidón nativo de papa amarga (PON) y los nanocristales de papa

Muestra	T _i (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g) *
PON	54,93 ± 0,00	58,13 ± 0,01	64,67 ± 0,13	16,81 ± 0,31
P5	52,61 ± 0,64	68,40 ± 0,52	74,45 ± 0,83	1,05 ± 0,19
P6	55,20 ± 0,07	66,42 ± 0,45	74,79 ± 1,22	1,65 ± 0,73
P7	60,51 ± 1,19	64,23 ± 1,98	70,74 ± 1,78	0,25 ± 0,04
P8	59,69 ± 0,57	67,55 ± 3,98	76,80 ± 0,22	0,79 ± 0,09

*ΔH (J/g), entalpía de gelatinización (b.s)

Cuadro 15: Parámetros de gelatinización del almidón nativo de tunta (TON) y de los nanocristales de tunta

Muestra	1er pico endotérmico			
	T _i (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g) *
TON	54,98 ± 0,01	58,69 ± 0,01	64,67 ± 0,04	16,08 ± 0,34
T5	44,11 ± 0,15	49,47 ± 0,00	56,02 ± 0,03	1,09 ± 0,02
T6	44,21 ± 0,75	49,70 ± 1,36	56,66 ± 0,46	1,54 ± 0,02
T7	43,81 ± 0,60	49,53 ± 0,09	55,29 ± 0,38	2,40 ± 0,32
T8	45,07 ± 0,86	50,35 ± 0,64	56,96 ± 0,02	1,25 ± 0,22

Muestra	2do pico endotérmico			
	T _i (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g) *
T5	62,15 ± 1,05	65,78 ± 1,91	70,46 ± 0,87	0,78 ± 0,10
T6	61,41 ± 0,45	64,69 ± 0,48	69,12 ± 0,14	0,55 ± 0,15
T7	59,85 ± 0,44	62,25 ± 0,35	65,50 ± 0,14	0,34 ± 0,08
T8	61,23 ± 0,01	64,30 ± 0,38	69,46 ± 0,80	0,69 ± 0,19

*ΔH (J/g), entalpía de gelatinización (b.s)

Los almidones nativos (Figura 14) mostraron un gran pico endotérmico, característico de almidones nativos de papa (Martínez *et al.* 2021) que se extiende de 50 a 70 °C asignado a la gelatinización del almidón y la fusión de los cristalitos, (Atichokudomchai *et al.* 2012 citados por Haaj *et al.* 2016). Los nanocristales de almidón de papa amarga exhibieron un pequeño pico endotérmico alrededor de 60 y 77 °C; mientras que, los nanocristales de tunta presentaron dos picos endotérmicos, el primero alrededor de 44 y 57 °C y el segundo pico en el rango de 60 y 70 °C.

Estos valores son menores a los rangos de gelatinización para almidón de maíz céreo (65 – 80 °C) y su respectivo nanocrystal (78 – 90 °C) reportados por Haaj *et al.* (2016). Por otro lado, el comportamiento de los nanocristales de almidón de tunta fueron similares a los reportados por Le Corre *et al.* (2012) que observaron dos transiciones térmicas alrededor de 90 – 95 °C y 105 – 110 °C, para nanocristales de diversas fuentes botánicas. El primer pico se atribuye a la primera etapa de fusión de los cristalitos (desempaquetado de las dobles hélices), y la segunda transición, a la segunda etapa de fusión de cristalitos (desenrollado de las hélices). Sin embargo, Haaj *et al.* (2016) mencionaron que no se ha establecido un consenso sobre la transición térmica de los nanocristales, presumiblemente debido al número limitado de publicaciones y a la diferencia en el origen del almidón utilizado en la preparación de los mismos.

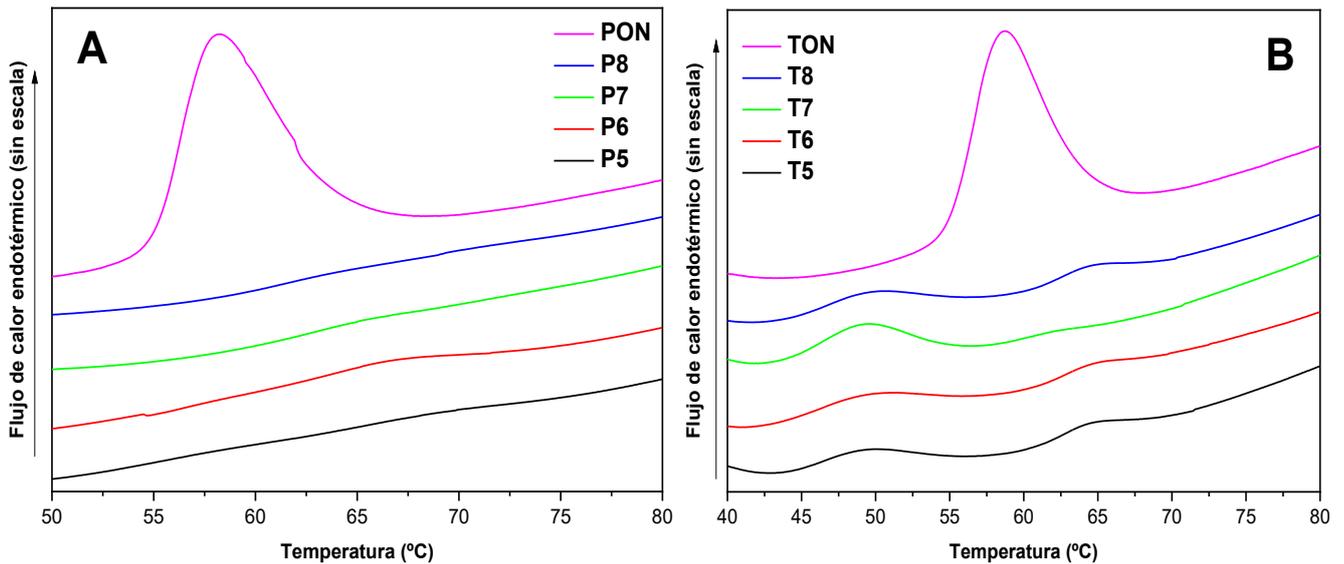


Figura 14 : Termogramas del almidón nativo de papa amarga (PON) y de los nanocristales de almidón de papa (A) y termogramas del almidón nativo de tunta (TON) y de los nanocristales de almidón de tunta (B) (termogramas de PON y TON obtenidos de Martínez *et al.* 2022)

La ausencia de una endoterma de fusión clara para los nanocristales se debió, probablemente, a su baja cristalinidad (poca presencia de cristalitos) y un mayor carácter amorfo. Además, Kim *et al.* (2012) reportaron que los picos endotérmicos de fusión para los almidones de tipo B (papa y almidones de maíz con alto contenido de amilosa) y el almidón de frijol mungo de tipo C desaparecieron después de la hidrólisis ácida.

4.4. OPTIMIZACIÓN POR EL MÉTODO DE TAGUCHI

El arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$, con dos niveles, fue usado en la optimización del proceso de obtención de nanocristales de almidón. Los factores que condicionan la obtención de nanocristales fueron: tipo de almidón, concentración de almidón y concentración de ácido cítrico; y estos maximizan el grado de cristalinidad y el rendimiento de los nanocristales. La optimización se realizó con una réplica, según el diseño experimental. Los valores señal/ruido (S/R) fueron obtenidos bajo tres condiciones de proceso, y se presentan en los Cuadros 16 y 17. De acuerdo con los principios del método de Taguchi, y estableciendo la condición de “mayor es mejor”, la máxima calidad del producto está indicada por la máxima relación S/R.

Cuadro 16: Valores de grado de cristalinidad relativa (%)

TRATAMIENTO	Cristalinidad Relativa (%)	S/R (db)
1	28,03 ± 1,34	28,95
2	20,85 ± 7,27	26,11
3	24,13 ± 1,87	27,64
4	20,97 ± 1,97	26,41

Promedio ± Desviación Estándar (n = 2)
S/R (db) = Valores Señal/Ruido (decibeles)

Cuadro 17: Valores de rendimiento (R %)

TRATAMIENTO	Rendimiento (%)	S/R (db)
1	51,47 ± 4,38	34,21
2	41,32 ± 0,01	32,32
3	45,92 ± 0,20	33,24
4	64,63 ± 2,49	36,21

Promedio ± Desviación Estándar (n = 2)
S/R (db) = Valores Señal/Ruido (decibeles)

En la Figura 15 se representa visualmente, a través de las relaciones S/R, el efecto de cada factor y también la combinación óptima de cada nivel en la obtención de nanocristales de almidón de papa amarga y de tunta.

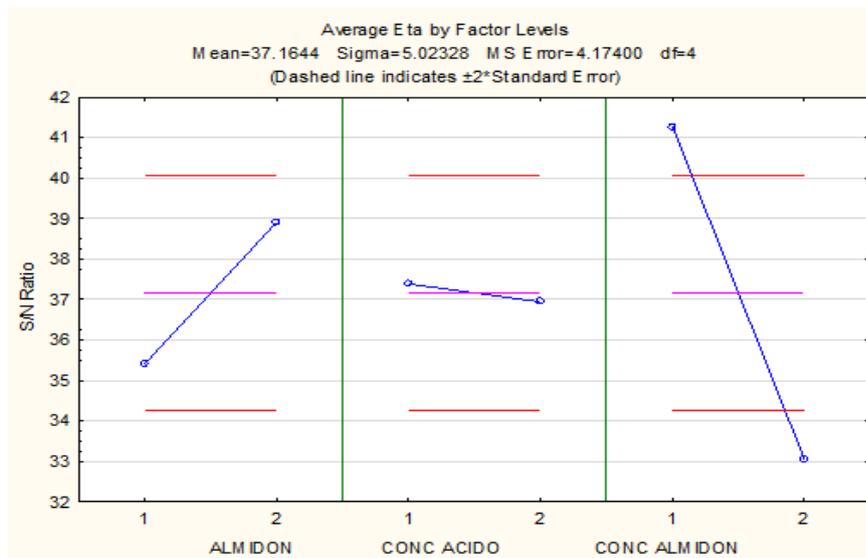


Figura 15 : Valores señal/ruido (S/R, ETA), para cada factor

Con base en los resultados del análisis ortogonal y en los análisis de relación S/R y ANOVA (Anexo 5), los parámetros óptimos para la cristalinidad relativa (porcentaje) y rendimiento (porcentaje) se presentan en el Cuadro 18. En este cuadro se puede ver que la concentración de almidón se optimizó en el nivel 1 (10 por ciento), la concentración de ácido se optimizó en el nivel 1 (10 por ciento) y el tipo de almidón en el nivel 2 (tunta).

Cuadro 18: Condiciones óptimas para la obtención de nanocristales

FACTOR	Nivel	Tamaño del efecto	Error estándar
ALMIDON	2	1,74812	1,4444646
CONC ÁCIDO	1	0,22187	1,4444646
CONC ALMIDÓN	1	4,10938	1,4444646
S/R esperado		43,24375	
Promedio = 37,1644 Sigma = 5,02328			

Según la relación S/R y la tabla de ANVA, se encontró que la concentración de almidón fue el principal factor que afectó el proceso de obtención de los nanocristales de almidón (Anexo 5). Además, Amini y Razavi (2016) reportaron que las muestras preparadas con una concentración más baja de ácido sulfúrico y de almidón eran más cristalinas que las preparadas con concentraciones mayores de ácido y en las mismas condiciones. Kumari *et al.* (2020) también informaron que la concentración de almidón afecta la cristalinidad, y las cadenas cortas de amilosa formaron mejor estructura de doble hélice a baja concentración de almidón en la suspensión (10 y 15 por ciento) pero a mayor concentración de almidón (20 y 25 por ciento) el movimiento de las cadenas moleculares de amilosa se inhibió, lo que resultó en una disminución de la cristalinidad de las nanopartículas.

No se ha encontrado trabajos de este tipo de proceso optimizados por el método de Taguchi; sin embargo, Angellier *et al.* (2004) realizaron una optimización de la preparación de suspensiones acuosas de nanocristales de almidón de maíz céreo utilizando una metodología de superficie de respuesta, logrando la producción de nanocristales de almidón después de 5 días de hidrólisis con H₂SO₄ (3,16 M) a 40 °C, agitación de 100 rpm y con una concentración de almidón de 14,69 por ciento en peso con un rendimiento de 15,7 por ciento.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCRISTALES OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO ÓPTIMO

En el Cuadro 19 se muestran las características estructurales, físicas y térmicas de los nanocrisales de almidón.

Cuadro 19: Características del nanocrystal óptimo

Propiedades	NCA
Cristalinidad (porcentaje)	26,5
Diámetro medio (nm)	267,3
Índice de polidispersidad	0,348
R (1047/1022cm ⁻¹)	0,477
R (995/1022cm ⁻¹)	1,485
Ti (°C)	63,4
Tp (°C)	67,1
Tf (°C)	71,7
Entalpía (J/g)	0,56
Potencial zeta (mV)	-8,71

La muestra de nanocrystal de almidón presentó un índice de polidispersidad de 0,348 que es un valor similar a lo encontrado por Velásquez-Castillo *et al.* (2020) para nanocrisales de quinua (0,34). Mientras que, Amini y Razavi (2016) reportan valores de PDI de 0,101 – 0,2809 para nanocrisales de almidón de maíz, y Haaj *et al.* (2016) valores de 0,218 para nanocrisales de almidón de maíz céreo que son menores a los valores encontrados en esta investigación. Según Jivan *et al.* (2013) valores altos de PDI sugieren que las partículas de los nanocrisales de almidón están presentes en forma de aglomerados, mientras que valores bajos del PDI representan nanocrisales más uniformes y homogéneos con una distribución de tamaño monomodal. Amini y Razavi (2016) mencionan que el índice de polidispersidad cerca de la unidad manifiesta una medición inadecuada y/o mala calidad de la muestra; a medida que aumenta la calidad de la medición o de la muestra, el índice tiende a cero. Estos autores reportaron PDI de 0,09 para muestras de nanocrisales de almidón de papa obtenidas por hidrólisis del almidón con ácido clorhídrico 3,7 M durante 24 días.

Los nanocrisales de almidón presentaron un diámetro hidrodinámico de 267,3 nm (Cuadro 19) que es evidentemente menor a los tamaños de los gránulos del almidón de tunta (Cuadro 20) cuyos tamaños son similares a los reportados por Singh y Kaur (2004).

Cuadro 20: Valores de tamaño de partícula para el almidón de tunta

Muestra	D [3;2] (μm)	D [4;3] (μm)	Dv (10) (μm)	Dv (50) (μm)	Dv (90) (μm)
TON	33,3	38,3	21,5	36,1	58,5

El tamaño de partícula de los nanocristales de tunta (267,3 nm) fue menor al reportado por De la Concha *et al.* (2018) para nanocristales de amaranto (376 nm) y nanocristales de maíz céreo (322 nm), ambos obtenidos por hidrólisis ácida (H_2SO_4 3,16 M) durante 10 días. Dularia *et al.* (2019) informaron que el tamaño de las nanopartículas de almidón de castaña obtenidos por hidrólisis ácida por siete días fue de 396 nm. Por su parte, Velásquez-Castillo *et al.* (2020) reportaron tamaños de nanocristales de quinua y maíz céreo de 243,4 nm y 394,9 nm, respectivamente, obtenidos por hidrólisis durante cinco días. Gujral *et al.* (2021) afirmaron que las diferencias en el tamaño de los nanocristales de almidón pueden deberse al tiempo de hidrólisis, pues a un mayor tiempo de hidrólisis se obtendrían partículas de menor tamaño.

4.5.1. Morfología

Las imágenes de las morfologías de las muestras de los nanocristales de almidón y su contraparte nativa fueron obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido (MEB) y se muestran en la Figura 16. Los gránulos del almidón nativo (Figura 16A) se asemejan entre sí y presentan una superficie lisa con formas elipsoidales o esféricas; en general, los gránulos de almidón más grandes son elipsoidales mientras que los más pequeños presentan una morfología redonda (Martínez *et al.* 2021). Los nanocristales de almidón observados con MEB (Figura 16B) permiten demostrar que el tratamiento del almidón de nativo con molienda y la hidrólisis ácida provocaron la ruptura de los gránulos en fragmentos más o menos submicrónicos a través del daño mecánico a la superficie del gránulo y la eliminación sinérgica de las regiones amorfas (Amini y Razavi 2016).

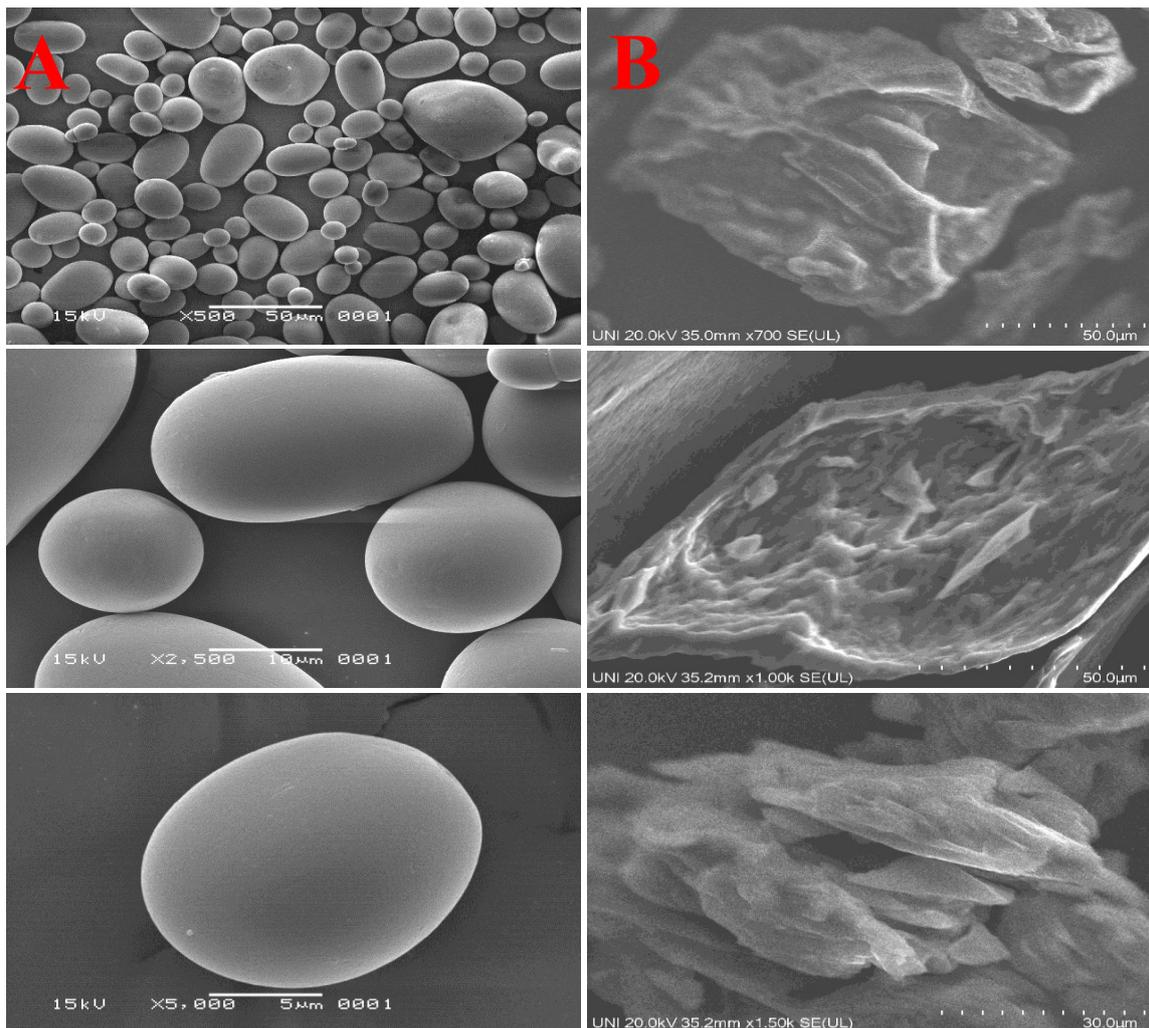


Figura 16: Micrografías MEB de almidón de tunta (A) y nanocristales de almidón de tunta (B)

Las micrografías de los nanocristales de almidón de tunta aparecieron como una forma aglomerada y con una superficie irregular y rugosa que es similar a la morfología reportada por Dularia *et al.* (2019) para nanopartículas de almidón de castaña. Estos autores mencionaron que las morfologías de nanopartículas de almidón con un diámetro promedio de 10 – 700 nm muestran una superficie irregular. Además, Gong *et al.* (2016) mencionaron que después de la hidrólisis, existen como agregados de formas irregulares que van desde varias decenas a cientos de nanómetros. Los bordes rugosos e irregulares de los nanocristales y sus agregados están menos definidos que los gránulos de almidón debido a la hidrólisis y la agregación durante el secado. Por lo tanto, es difícil identificar la morfología de un solo nanocristal debido a la agregación de éstos y la baja resolución de las imágenes MEB.

Liu *et al.* (2021) reportaron que los cambios morfológicos se deben a la severa erosión ácida, la mayoría de los gránulos de los nanocristales de almidón de maíz y papa céreo se desintegraron por completo, lo que resultó en la formación de muchos fragmentos irregulares. Martins *et al.* (2022) reportaron que la acción del ácido fue más agresiva para los almidones de papa; los gránulos inicialmente tenían estructuras redondeadas que fueron modificadas durante el proceso. El ácido provocó roturas en los gránulos, reduciendo el tamaño y distribución de los gránulos y provocando fracturas en las estructuras. También se reportaron tendencias de los nanocristales a aglomerarse que atribuyeron a los numerosos grupos hidroxilos presentes en los nanocristales unidos por enlaces de hidrógeno (Mujtaba *et al.* 2019 citados por Martins *et al.* 2022).

4.5.2. Potencial zeta

El potencial zeta representa el grado de repulsión entre moléculas con cargas presentes en la dispersión (Bakrudeen *et al.* 2016 citados por Martins *et al.* 2022). Es una propiedad utilizada para caracterizar la carga superficial, influenciada por su composición y dispersión en el medio acuoso. Las medidas se utilizaron para estimar las fuerzas electrostáticas repulsivas entre partículas y proporcionaron una idea de la estabilidad de la suspensión de nanocristales (Costa *et al.* 2017). La distribución del potencial zeta de la muestra de nanocrystal de tunta se muestra en la Figura 17. El valor de potencial zeta, para esta muestra, tuvo una carga negativa y su valor fue de -8.71 mV. Este valor se encuentra dentro del rango de los valores reportados por Jiang *et al.* (2016) para las suspensiones de nanocristales de almidón de maíz céreo, que oscilaron entre -56 y -6,26 mV. Se espera que estas cargas negativas mejoren la estabilidad coloidal por repulsión electrostática entre las capas dobles y reduzcan la tendencia de los NCA a autoagregarse (Haaj *et al.* 2016). Los valores de potencial zeta por debajo de los -30 mV indican que la suspensión tiene estabilidad física en un sistema electrostático (Ren *et al.* 2016 citado por Martins *et al.* 2022). Un alto potencial de (> 30 mV y < -30 mV) se considera favorable para una buena estabilidad de las dispersiones preparadas (Naveen *et al.* 2020). Un valor de -8.71 de potencial zeta obtenidos junto con las altas tasas de polidispersión indican que los nanocristales de almidón tienen baja estabilidad y gran potencial de aglomeración (Martins *et al.* 2022).

Se produce un potencial zeta negativo debido al proceso utilizado para obtener los NCA, las cargas negativas en los nanocristales, hidrolizados con ácido sulfúrico, se deben a grupos sulfato derivados de la reacción de los grupos hidroxilo en la superficie de los nanocristales en una reacción de esterificación con ácido sulfúrico durante el proceso de hidrólisis ácida (Angellier *et al.* 2004; Haaj *et al.* 2016). La aplicación de ácido (H_2SO_4) en el proceso provoca la formación de grupos carboxilo negativos, ésteres y sulfatos de carácter negativo que pueden estar presentes en la superficie de los nanocristales (Jiang *et al.* 2016).

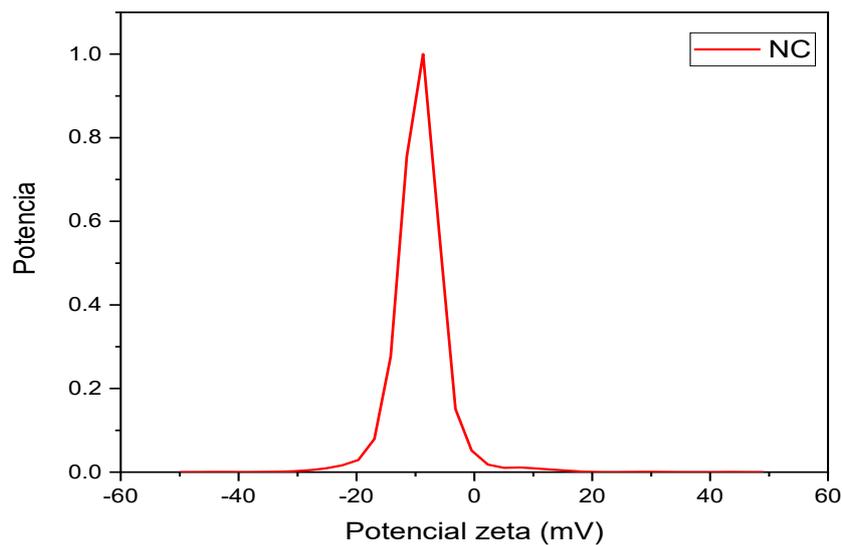


Figura 17: Distribución de potencial zeta de la muestra de nanocristal de almidón de tunta

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró diseñar un proceso para la obtención de nanocristales a partir de almidones de papas amargas y tuntas provenientes de la región Puno.
2. Los nanocristales de almidón obtenidos presentaron características de diámetros hidrodinámicos en un rango de 351,3 – 827,6 nm (papa) y 118 – 399 nm (tunta) y valores de cristalinidad relativa en un rango de 18,3 – 28,0 por ciento (papa) y 14,2 – 24,1 por ciento (tunta).
3. La molienda resultó significativa para la disminución del tamaño de partícula en la obtención de nanocristales de almidón.
4. El método de Taguchi fue una buena herramienta para determinar las condiciones óptimas (almidón molido de tunta, 10 por ciento de ácido y 10 por ciento de almidón) del proceso de obtención de nanocristales.
5. Las micrografías de los nanocristales de almidón obtenidas, las propiedades térmicas y los espectros FTIR, evidenciaron que el procedimiento diseñado para la hidrólisis de los almidones provocó cambios estructurales en los gránulos.
6. Los nanocristales de almidón, obtenidos con el uso de un ácido cítrico, presentaron altos valores de rendimiento (porcentaje) y representan una alternativa de obtención de nanocristales amigable con el ambiente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Modificar los nanocristales de almidón para dispersar y/o reducir su tendencia a aglomerarse.
2. Evaluar el comportamiento de los nanocristales de almidón en el reforzamiento de películas biodegradables.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M; Gani, A; Masoodi, F; Rizvi, H. 2020. Influence of ball milling on the production of starch nanoparticles and its effect on structural, thermal and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 151: 85-91.
- Ahmed, J; Auras, R. 2011. Effect of acid hydrolysis on rheological and thermal characteristics of lentil starch slurry. *LWT-Food Science and Technology* 44(4): 976-983.
- Alves, M; Chacon, W; Gagliardi, T; Agudelo, A; Monteiro, A; Ayala, G. 2021. Food Applications of Starch Nanomaterials: A Review. *Starch-Stärke* 73(11-12): 2100046.
- Amini, M; Razavi, A. 2016. A fast and efficient approach to prepare starch nanocrystals from normal corn starch. *Food Hydrocolloids* 57: 132-138.
- ANDINA. 2022. Agencia Peruana de Noticias Andina: Aprueban norma para impulsar buenas prácticas en cultivo de papa nativa (en línea, sitio web). Consultao 19 de abr. 2022. Disponible en [https://andina.pe/agencia/noticia-aprueban-norma-para-impulsar-buenas practicas-cultivo-papa-nativa-884638.aspx](https://andina.pe/agencia/noticia-aprueban-norma-para-impulsar-buenas-practicas-cultivo-papa-nativa-884638.aspx).
- Angellier, H; Choisnard, L; Molina-Boisseau, S; Ozil, P; Dufresne, A. 2004. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. *Biomacromolecules* 5(4): 1545-1551.
- Antony, J. 2014. *Design of experiments for engineers and scientists*. Segunda Edición. Oxford, Reino Unido. Elsevier. 151 p.
- Arcos, J; Holguín, V. 2010. Variedades de papas nativas con aptitud para procesamiento en tunta. In Memoria del XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa-ALAP 2010 y I Simposium Internacional de Recursos Genéticos de la Papa, Cuzco, Perú. Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA.

- Azin, M; Moravej, R; Zareh, D. 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* 40(4): 801-805.
- Babu, A; Parimalavalli, R; Rudra, S. 2015. Effect of citric acid concentration and hydrolysis time on physicochemical properties of sweet potato starches. *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 557-565.
- Ballantyne, K; Van Oorschot, R; Mitchell, R. 2008. Reduce optimisation time and effort: Taguchi experimental design methods. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1(1): 7-8.
- Barrett, J. 2007. Taguchi's quality engineering handbook. Editorial Taylor & Francis.
- Bradshaw, J; Ramsay, G. 2009. Potato origin and production. In *Advances in potato chemistry and technology*, Segunda Edición, Oxford, Reino Unido. Academic Press. 1-26 p.
- Caetano-Anollés, G; Schlarbaum, S; Trigiano, R. 1999. DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross mapping of flowering dogwood (*Cornus florida L.*) *Euphytica* 106(3): 209-222.
- Cahuana, R; Arcos, J. 2002. Variedades nativas y mejoradas de papa en Puno, Primera Edición, Lima, Perú. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Serie Libro N° 01-2002
- Campelo, P; Sant'Ana, A; Clerici, M. 2020. Starch nanoparticles: production methods, structure, and properties for food applications. *Current Opinion in Food Science* 33: 136-140.
- Canqui, F; Morales, E. 2009. Conocimiento local en el cultivo de la papa. Cochabamba, Bolivia. Fundación PROINPA. 267 p.
- Chavez, M; Choy, J. 2020. Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta procesadora de almidón a base de yuca (*Manihot esculenta*). Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad de Lima. 176 p.
- Chongkhong, S; Tongurai, C; Chetpattananondh, P; Bunyakan, C. 2007. Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. *Biomass and Bioenergy* 31(8): 563-568.
- Cobb, B; Clarkson, J. M. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research* 22(18): 3801-3805.

- Condés, M; Añón, M; Mauri, A; Dufresne, A. 2015. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids* 47: 146-157.
- Costa, É; de Souza, C; da Silva, J; Druzian, J. 2017. Hydrolysis of part of cassava starch into nanocrystals leads to increased reinforcement of nanocomposite films. *Journal of Applied Polymer Science* 134(41): 45311.
- Dąbrowski, W; Czekań-Kołodziej, U; Mędrala, D; Giedrys-Kalemba, S. 2003. Optimisation of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 218(1): 51-57.
- Da Rosa Zavareze, E; Kringel, D; Dias, A. 2019. Nano-scale polysaccharide materials in food and agricultural applications. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Oxford, Reino Unido. Academic Press. 85-128 p.
- Dasu, V; Panda, T; Chidambaram, M. 2003. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. *Process Biochemistry* 38(6): 877-880.
- Da Silva, N; de Lima, F; Fialho, R; Albuquerque, E; Velasco, J; Fakhouri, F. 2018. Production and Characterization of Starch Nanoparticles. Applications of Modified Starches. In *Applications of Modified Starches*, Londres, Reino Unido. IntechOpen. 42 p.
- Dai, L; Li, C; Zhang, J; Cheng, F. 2018. Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 180: 122-127.
- De Haan, S; Burgos, G; Ccanto, R; Arcos, J; Scurrah, M; Salas, E; Bonierbale, M. 2012. Effect of production environment, genotype and process on the mineral content of native bitter potato cultivars converted into white chuño. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(10): 2098-2105.
- De la Concha, B; Agama-Acevedo, E; Nuñez-Santiago, M; Bello-Perez, L; Garcia, H; Alvarez-Ramirez, J. 2018. Acid hydrolysis of waxy starches with different granule size for nanocrystal production. *Journal of Cereal Science* 79: 193-200.
- Duan, B; Sun, P; Wang, X; Yang, C. 2011. Preparation and properties of starch nanocrystals/carboxymethyl chitosan nanocomposite films. *Starch-Stärke* 63(9): 528-535.
- Dularia, C; Sinhmar, A; Thory, R; Pathera, A; Nain, V. 2019. Development of starch nanoparticles based composite films from non-conventional source-Water

- chestnut (*Trapa bispinosa*). International Journal of Biological Macromolecules 136: 1161-1168.
- Dufresne, A. 2014. Crystalline starch-based nanoparticles. Current Opinion in Colloid & Interface Science 19(5): 397-408.
- Dufresne, A; Castaño, J. 2017. Polysaccharide nanomaterial reinforced starch nanocomposites: A review. Starch-Stärke 69(1-2): 1500307.
- Fontani, S; Niccolai, A; Kapat, A; Olivieri, R. 2003. Studies on the maximization of recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein production in *Escherichia coli*: application of Taguchi robust design and response surface methodology for process optimization. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19(7): 711-717.
- Friedman, M; Levin, C. 2009. Analysis and biological activities of potato glycoalkaloids, calystegine alkaloids, phenolic compounds, and anthocyanins. In Advances in potato chemistry and technology, Segunda Edición, Oxford, Reino Unido. Academic Press. 127-161 p.
- García, M; Quintero, R; López. A. 1999. Biotecnología Alimentaria, México Distrito Federal, México. Editorial Limusa, S.A de C.V. 553-562 p.
- Gianella, T. 2004. Chuño blanco, "tunta" o "moraya": Un proceso natural de conservación. LEISA Revista de Agroecología: Manejando la postcosecha 20 (3): 29 –31.
- Gonçalves, P; Noreña, C da Silveira, N; Brandelli, A. 2014. Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound. LWT-Food Science and Technology 58(1): 21-27.
- Gong, B; Liu, W; Tan, H; Yu, D; Song, Z; Lucia, L. 2016. Understanding shape and morphology of unusual tubular starch nanocrystals. Carbohydrate Polymers 151: 666-675.
- Gujral, H; Sinhmar, A; Nehra, M; Nain, V; Thory, R; Pathera, A; Chavan, P. 2021. Synthesis, characterization, and utilization of potato starch nanoparticles as a filler in nanocomposite films. International Journal of Biological Macromolecules 186: 155-162.
- Gutiérrez, H; De La Vara, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos, Segunda Edición, Ciudad de México, México. Editorial Mc Graw Hill. 537 p.

- Haaj, S; Thielemans, W; Magnin, A; Boufi, S. 2016. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. *Carbohydrate Polymers* 143: 310-317.
- Hao, Y; Chen, Y; Li, Q; Gao, Q. 2018. Preparation of starch nanocrystals through enzymatic pretreatment from waxy potato starch. *Carbohydrate Polymers* 184: 171-177.
- Hellenäs, K. 1986. A simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by hplc; comparison with ELISA and a colorimetric method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37(8): 776-782.
- Hoover, R. 2000. Acid-treated starches. *Food Reviews International* 16(3): 369-392.
- Hu, F; Fu, S; Huang, J; Anderson, D; Chang, P. 2015. Structure and properties of polysaccharide nanocrystals. *Polysaccharide-Based Nanocrystals: Chemistry and Applications* 2015: 15-62.
- Jeney, C; Dobay, O; Lengyel, A; Ádám, É; Nász, I. 1999. Taguchi optimisation of ELISA procedures. *Journal of Immunological Methods* 223(2): 137-146.
- Jiang, S; Liu, C; Han, Z; Xiong, L; Sun, Q. 2016. Evaluation of rheological behavior of starch nanocrystals by acid hydrolysis and starch nanoparticles by self-assembly: A comparative study. *Food Hydrocolloids* 52: 914-922.
- Jivan, M; Madadlou, A; Yarmand, M. 2013. An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross-linking. *Food Chemistry* 141(3): 1661-1666.
- Julca, B. 2016. Impacto del gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) en la producción y comercialización del chuño blanco en las economías campesinas del departamento de Puno. Tesis Ec. Lima, Perú, UNALM. 148 p.
- Kallel, H; Zaïri, H; Rourou, S; Essafi, M; Barbouche, R; Dellagi, K; Fathallah, D. 2002. Use of Taguchi's methods as a basis to optimize hybridoma cell line growth and antibody production in a spinner flask. *Cytotechnology* 39(1): 9-14.
- Khoudoli, G; Porter, I; Blow, J; Swedlow, J. 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Science* 2(1): 1-12.
- Kim, H; Lee, J; Kim, J; Lim, W; Lim, S. 2012. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch-Stärke* 64(5): 367-373.
- Knuthsen, P; Jensen, U; Schmidt, B; Larsen, I. 2009. Glycoalkaloids in potatoes: Content of glycoalkaloids in potatoes for consumption. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(6): 577-581.

- Koo, W. 2021. Papa Fécula Perú Importación 2021 (en línea, sitio web). Consultado el 28 de abr. 2022. Disponible en <https://www.agrodataperu.com/2021/08/papa-fecula-peru-importacion-2021-julio.html>.
- Kumari, S; Yadav, B; Yadav, R. 2020. Synthesis and modification approaches for starch nanoparticles for their emerging food industrial applications: A review. *Food Research International* 128: 108765.
- Lawson, J. 2010. *Design and Analysis of Experiments with SAS*. Utah, USA. Chapman and Hall/CRC. 579 p.
- Le Corre, D; Bras, J; Dufresne, A. 2010. Starch nanoparticles: a review. *Biomacromolecules* 11(5): 1139-1153.
- Le Corre, D; Bras, J; Choisnard, L; Dufresne, A. 2012. Optimization of the batch preparation of starch nanocrystals to reach daily time-scale. *Starch-Stärke* 64(6): 489-496.
- Le Corre, D; Dufresne, A. 2013. Preparation of starch nanoparticles. *Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications*, 153-180.
- Le Corre, D; Angellier-Coussy, H. 2014. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive and Functional Polymers* 85: 97-120.
- Lin, N; Huang, J; Chang, P; Anderson, D; Yu, J. 2011. Preparation, modification, and application of starch nanocrystals in nanomaterials: A Review. *Journal of Nanomaterials* 2011:13
- Lin, H; Qin, L; Hong, H; Li, Q. 2016. Preparation of starch nanoparticles via high-energy ball milling. In *Journal of Nano Research* 40: 174-179.
- Liu, C; Li, K; Li, X; Zhang, M; Li, J. 2021. Formation and structural evolution of starch nanocrystals from waxy maize starch and waxy potato starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 180: 625-632.
- Loubes, M; Tolaba, M. 2014. Thermo-mechanical rice flour modification by planetary ball milling. *LWT-Food Science and Technology* 57(1): 320-328.
- Lu, X; Xiao, J; Huang, Q. 2018. Pickering emulsions stabilized by media-milled starch particles. *Food Research International* 105: 140-149.
- Márquez, M. 2022. Efecto de la hidrólisis ácida sobre las propiedades de almidones obtenidos de dos variedades de papa amarga y tunta. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. 106 p.

- Martínez, P; Peña, F; Gómez, Y; Vargas, G; Velezmoro, C. 2019a. Propiedades físicoquímicas, funcionales y estructurales de almidones nativos y acetilados obtenidos a partir de la papa (*Solanum tuberosum*) var. 'Única'. Revista de la Sociedad Química del Perú 85(3): 338-351.
- Martínez, P; Peña, F; Bello-Pérez, L; Núñez-Santiago, C; Yee-Madeira, H; Velezmoro, C. 2019b. Physicochemical, functional and morphological characterization of starches isolated from three native potatoes of the Andean region. Food Chemistry: X 2: 100030.
- Martínez, P; Vilcarromero, D; Pozo, D; Peña, F; Manuel Cervantes-Uc, J; Uribe-Calderon, J; Velezmoro, C. 2021. Characterization of starches obtained from several native potato varieties grown in Cusco (Peru). Journal of Food Science 86(3): 907-914.
- Martínez, P; Betalleluz-Pallardel, I; Cuba, A; Peña, F; Cervantes-Uc, J; Uribe-Calderón, J; Velezmoro, C. 2022. Effects of natural freeze-thaw treatment on structural, functional, and rheological characteristics of starches isolated from three bitter potato cultivars from the Andean region. Food Hydrocolloids, 2022: 107860.
- Martins, P; Gutkoski, L; Martins, V. 2018. Impact of acid hydrolysis and esterification process in rice and potato starch properties. International Journal of Biological Macromolecules 120: 959-965.
- Martins, P; Latorres, J; Martins, V. 2022. Impact of starch nanocrystals on the physicochemical, thermal and structural characteristics of starch-based films. LWT 156: 113041.
- May, N; Chappell, P. 2002. Finding critical variables for food heating. International Journal Of Food Science & Technology 37(5): 503-513.
- Miao, M; Jiang, B; Zhang, T; Jin, Z; Mu, W. 2011. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. Food Chemistry 126(2): 506-513.
- Mitra, A. 2016. Experimental Design and The Taguchi Method. In Fundamentals of quality control and improvement, Quinta Edición, Utah, USA. John Wiley & Sons. 559 – 663 p.
- Montgomery, D. 2003. Diseño y análisis de experimentos. Segunda Edición, Ciudad de México, México Grupo Editorial Iberoamericana SA. 589 p

- Moon, S; Li-Chan, E. 2004. Development of solid-phase microextraction methodology for analysis of headspace volatile compounds in simulated beef flavour. *Food Chemistry* 88(1): 141-149.
- Mukurumbira, A; Mariano, M; Dufresne, A; Mellem, J; Amonsou, E. 2017. Microstructure, thermal properties and crystallinity of amadumbe starch nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules* 102: 241-247.
- Muller, T. 2000. Sulfuric acid and sulfur trioxide. Kirk-Othmer In *Encyclopedia of Chemical Technology*, Quinta Edición, Utah, USA. John Wiley & Sons. 1040 p.
- Navaf, M; Sunooj, K; Aaliya, B; Sudheesh, C; Akhila, P; Sabu, S; ... & George, J. 2021. Talipot palm (*Corypha umbraculifera L.*) a nonconventional source of starch: Effect of citric acid on structural, rheological, thermal properties and in vitro digestibility. *International Journal of Biological Macromolecules* 182: 554-563.
- Naveen, N; Kurakula, M; Gowthami, B. 2020. Process optimization by response surface methodology for preparation and evaluation of methotrexate loaded chitosan nanoparticles. *Materials Today: Proceedings* 33: 2716-2724.
- Nikbakht, R; Sadrzadeh, M; Mohammadi, T. 2007. Effect of operating parameters on concentration of citric acid using electro dialysis. *Journal of Food Engineering* 83(4): 596-604
- Niu, W; Pu, H; Liu, G; Fang, C; Yang, Q; Chen, Z Huang, J. 2020. Effect of repeated heat-moisture treatments on the structural characteristics of nanocrystals from waxy maize starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 158: 732-739.
- NTP (Norma Técnica Peruana). 2007. Tubérculos procesados. Papa deshidratada. Tunta. Requisitos y definiciones. NTP 011.400:2007. Lima, Perú. 19 p.
- Omayio, D; Abong, G; Okoth, M. 2016. A review of occurrence of glycoalkaloids in potato and potato products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 4(3): 195-202.
- Oztop, M; Sahin, S; Sumnu, G. 2007. Optimization of microwave frying of potato slices by using Taguchi technique. *Journal of Food Engineering* 79(1): 83-91.
- Packianather, M; Drake, P; Rowlands, H. 2000. Optimizing the parameters of multilayered feedforward neural networks through Taguchi design of experiments. *Quality and Reliability Engineering International* 16(6): 461-473.
- Palomino, L; Pacheco, M; Cabrera, H; Pando, R; Morote, M; Cahuana, R; ... & Torres, R. 2009. Caracterización morfológica y agronómica de 61 variedades nativas de

- papa. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Lima, Perú. Consultado 10 de abr. 2022. Disponible <https://pgc-snia.inia.gob.pe:8443/jspui/handle/20.500.12955/86>
- Patel, C; Chakraborty, M; Murthy, Z. V. 2016. Fast and scalable preparation of starch nanoparticles by stirred media milling. *Advanced Powder Technology* 27(4): 1287-1294.
- Pozo, C; Rodríguez-Llamazares, S; Bouza, R; Barral, L; Castaño, J; Müller, N; Restrepo, I. 2018. Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. *Journal of Polymer Research* 25(12): 1-8.
- Qin, Y; Liu, C; Jiang, S; Xiong, L; Sun, Q. 2016. Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. *Industrial Crops and Products* 87: 182-190.
- Quenta, A; Quispe, R; Uruch, Á. 2018. Plan de Negocio para la Producción de la Tunta, Puno-Ilave, 2017. Tesis Ph.D. Tacna, Perú. Instituto de Educación Superior Tecnológico Privado John Von Neumann. 59 p.
- Ramos, E. 2016. Diversidad microbiana en la rizósfera de papas nativas amargas cultivadas en el altiplano puneño y su capacidad promotora de crecimiento vegetal. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú. UNALM.
- Rao, R; Kumar, C; Prakasham, R; Hobbs, P. 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 3(4): 510-523.
- Saeng-On, J; Aht-Ong, D. 2017. Production of starch nanocrystals from agricultural materials using mild acid hydrolysis method: Optimization and characterization. *Polymers from Renewable Resources* 8(3): 91-116.
- Salehi, Z; Sohrabi, M; Kaghazchi, T; Bonakdarpour, B. 2005. Application of down flow jet loop bioreactors in implementation and kinetic determination of solid-liquid enzyme reactions. *Process Biochemistry* 40(7): 2455-2460
- Santoyo-Aleman, D; Sanchez, L Villa, C. 2019. Citric-acid modified banana starch nanoparticles as a novel vehicle for β -carotene delivery. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(14): 6392-6399.
- Saudagar, P; Singhal, R. 2007. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology* 98(10): 2010-2017.

- Scapinello C; Garcia de Faria H; Furlán A; Shimmack M. 1998. Influência de Diferentes Níveis de Ácido Fumárico ou Ácido Acético sobre o Desempenho de Coelho em Crescimento. *R. Bras. Zootec* 27(5): 945-950.
- Sevenou, O; Hill, S; Farhat, I; Mitchell, J. 2002. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 31(1-3): 79-85.
- Shojaosadati, S; Babaeipour, V. 2002. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. *Process Biochemistry* 37(8): 909-914.
- Singh, N; Kaur, L. 2004. Morphological, thermal, rheological and retrogradation properties of potato starch fractions varying in granule size. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(10): 1241-1252.
- Song, S; Wang, C; Pan, Z; Wang, X. 2008. Preparation and characterization of amphiphilic starch nanocrystals. *Journal of Applied Polymer Science* 107(1): 418-422.
- Tabín del Pinal, J. 2021. Evaluación mediante correlación de la resistencia tardía a 28 días de un cemento tipo UG en función del tamaño de partícula, mediante el uso del granulómetro láser. Tesis Ph. D. Ciudad de Guatemala, Guatemala, USAC. 102 p.
- Tagliapietra, B; de Melo, B; Sanches, E; Plata-Oviedo, M; Campelo, P; Clerici, M. 2021. From Micro to Nanoscale: A Critical Review on the Concept, Production, Characterization, and Application of Starch Nanostructure. *Starch-Stärke* 73(11-12): 2100079.
- Tyssedal, J; Chaudhry, M. 2017. The choice of screening design. *Applied Stochastic Models in Business and Industry* 33(6): 662-673.
- Uribe, C; Lozada, W; Polo, E. 2013. Distribución del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz de la tetracarboxifenilporfirina de cobre (II) anclada al dióxido de titanio. *ITECKNE: Innovación e Investigación en Ingeniería* 10(2): 224-228.
- Utrilla-Coello, R; Hernández-Jaimes, C; Carrillo-Navas, H; González, F; Rodríguez, E; Bello-Perez, L; ... & Alvarez-Ramirez, J. 2014. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydrate Polymers* 103: 596-602.
- Van Soest, J; Tournois, H; de Wit, D; Vliegthart, J. 1995. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 279: 201-214.

- Velásquez-Castillo, L; Leite, M; Ditchfield, C do Amaral Sobral, P; Moraes, I. 2020. Quinoa starch nanocrystals production by acid hydrolysis: Kinetics and properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 143: 93-101.
- Wang, H; Liu, M; Hu, X; Li, M; Xiong, X. 2013. Electrochemical determination of glycoalkaloids using a carbon nanotubes-phenylboronic acid modified glassy carbon electrode. *Sensors* 13(12): 16234-16244.
- Warren, F; Gidley, M; Flanagan, B. 2016. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate Polymers* 139:35–42.
- Wei, B; Xu, X; Jin, Z; Tian, Y. 2014. Surface chemical compositions and dispersity of starch nanocrystals formed by sulfuric and hydrochloric acid hydrolysis. *PloS ONE* 9(2): e86024.
- Wei, B; Cai, C; Tian, Y. 2018. Nano-sized Starch: Preparations and Applications. In *Functional Starch and Applications in Food*, Jurong East, Singapur. Springer. 147-176 p.
- Wijaya, C; Ismadji, S; Aparamarta, H; Gunawan, S. 2019. Optimization of cellulose nanocrystals from bamboo shoots using Response Surface Methodology *Heliyon* 5(11): e02807.
- Wongsagonsup, R; Shobsngob, S; Oonkhanond, B; Varavinit, S. 2005. Zeta potential (ζ) and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. *Starch-Stärke* 57(1): 32-37.
- Wu, X; Xiao, Y; Zhang, B; Luo, F; Lin, Q; Ding, Y. 2022. Insights into the Relations between Particle Size and Physicochemical Properties of Starch Nanoparticles Prepared by Combining High-Speed Shearing with Precipitation. *Starch-Stärke* 74(1-2): 2100122.
- Xu, Y; Sismour, E; Grizzard, C; Thomas, M; Pestov, D; Huba, Z; ... & Bhardwaj, H. 2014. Morphological, structural, and thermal properties of starch nanocrystals affected by different botanic origins. *Cereal Chemistry* 91(4): 383-388.
- Yang, S; Zhu, J. 2002. Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug development and industrial pharmacy* 28(3): 265-274.
- Zabala, V. 2020. *Starch-based Nanomaterials*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Jurong East, Singapur. Springer. 35 p.

Zhou, L; Fang, D; Wang, M; Li, M; Li, Y; Ji, N; ... & Sun, Q. 2020. Preparation and characterization of waxy maize starch nanocrystals with a high yield via dry-heated oxalic acid hydrolysis. *Food Chemistry* 318: 126479.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Aplicación del método de Taguchi para la optimización de procesos y desarrollo de productos en diferentes áreas biológicas y/o biotecnológicas

Cuadro A: Aplicación del diseño de Taguchi en el área de salud

Área	Diseño Experimental (AO)	Objetivo	Referencia
Producción de proteína activadora de neutrófilos (NAP)	L₄ (2³)	Aumento de 2,91 veces en la proteína NAP recombinante	Fontani <i>et al.</i> (2013)
Crecimiento de líneas celulares de hibridomas y producción de anticuerpos.	L₈ (2⁷)	La producción de anticuerpos se vio afectada por la velocidad de agitación, la concentración del suero, la naturaleza del medio y las interacciones como la velocidad de agitación/naturaleza del suero y la velocidad de agitación/concentración del suero.	Kallel <i>et al.</i> (2002)
La camptotecina incorporó nanopartículas lipídicas sólidas como vehículos de liberación sostenida	L₉ (3⁴)	Las variables que afectaron el tamaño de las nanopartículas fueron la concentración de emulsionante, la presión de homogeneización y los crioprotectores como el manitol y la glucosa.	Yang <i>et al.</i> (2002)
Optimización del procedimiento ELISA	L₁₈ (6¹ × 3⁶)	Se optimizó el protocolo ELISA para la detección de fragmentos de cadena única de fagos variables (ScFv)	Jeney <i>et al.</i> (1999)

Fuente: Rao et al. (2008)

Cuadro B: Aplicación de métodos Taguchi en el procesamiento de alimentos

Área	Diseño Experimental (AO)	Objetivo	Referencia
Concentración de ácido cítrico por electrodiálisis	L ₉ (3 ⁴)	Las condiciones operativas óptimas determinadas fueron pH 7.5, 20 V, temperatura de 55 °C y caudal de 4 ml/min.	Nikbakht <i>et al.</i> (2007)
Calentamiento de productos alimenticios para lograr la seguridad microbiológica	L ₁₂ (2 ¹¹)	La concentración de puré de tomate en la salsa afectó el proceso Valor F ₀ (efecto letal)	May & Chappell, (2002)
Análisis HS-SPME* de compuestos volátiles en sabor a carne vacuna sostenida	L ₂₇ (3 ¹³)	Las variables que afectaron el análisis de HS-SPME fueron la temperatura de adsorción, el tiempo de adsorción y la fase de SPME.	Moon & Li-Chan, (2004)
Fritura en microondas de rodajas de patata	L ₂₇ (3 ³)	Las condiciones óptimas para freír con microondas fueron un nivel de potencia de microondas de 550 W, durante 2,5 min en aceite de girasol.	Oztop <i>et al.</i> (2007)

*HS-SPME = micro extracción en fase sólida de espacio de cabeza

Fuente: Rao *et al.* (2008)

Cuadro C: Aplicación del método Taguchi en diferentes procesos de fermentación

Área	Diseño Experimental (AO)	Objetivo	Referencia
Griseofulvina	L ₈ (2 ⁷)	El pH, la aireación y la agitación son parámetros significativos	Dasu <i>et al.</i> (2003)
Isomerización de glucosa a fructosa	L ₉ (3 ⁴)	El diámetro del tubo de tiro tiene el efecto máximo en condiciones óptimas	Salehi <i>et al.</i> (2005)
Ácido cítrico	L ₉ (3 ⁴)	Las condiciones de operación, como la baja tasa de aireación, la alta altura del lecho, el gran tamaño de las partículas y el alto contenido de humedad, maximizaron la producción de ácido cítrico.	Shojaosadati & Babaeipour (2002)

“continuación”

Biodiesel de grasa de palma	L ₉ (3 ⁴)	Las condiciones de operación para el proceso de esterificación continua son una relación molar de destilado ácido de metanol y PFAD (8:1) y 1,834 % en peso de H ₂ SO ₄ a 70 °C bajo su propia presión con un tiempo de retención (60 min)	Chongkhong <i>et al.</i> (2007)
Xilanasa	L ₁₆ (4 ⁵)	Aumento del 41,9 % en la producción de xilanasa	Azin <i>et al.</i> (2007)
Ácido clavulánico	L ₁₆ (4 ⁵)	Aumento del 9% en ácido clavulánico	Saudagar, & Singhal, (2007)

Fuente: Rao et al. (2008)

Cuadro D: Aplicación del diseño de Taguchi en biología molecular

Área	Diseño Experimental (AO)	Objetivo	Referencia
Optimización DAF	L ₉ (3 ⁴)	Optimización de las condiciones de la PCR, como la temperatura de hibridación, el cebador, el magnesio y la concentración de enzimas para DAF	Caetano-Anollés <i>et al.</i> (1999)
Toma de huellas dactilares AP-PCR	L ₉ (3 ⁴)	Optimización de los componentes de la PCR para una mejora máxima optimización del poder discriminatorio del método AP-PCR	Dąbrowski <i>et al.</i> (2003)
Optimización del protocolo de electroforesis en gel 2-D	L ₉ (3 ⁴)	Las condiciones de operación, como la baja tasa de aireación, la alta altura del lecho, el gran tamaño de las partículas y el alto contenido de humedad, maximizaron la producción de ácido cítrico.	Khoudoli <i>et al.</i> (2004)
Optimización PCR	L ₁₈	Optimización de la composición compleja del tampón de rehidratación utilizado en electroforesis en gel 2-D	Cobb & Clarkon (1994)

Fuente: Rao et al. (2008)

Anexo 2: Determinación de tamaño partícula por DLS

La metodología utilizada se detallada a continuación:

A. Tratamiento previo:

- Medida de la cantidad de material a dispersar (0,5 mg/mL)
- Dispersar en 10 mL de agua ultra pura
- Homogenización del material mediante sonicación y/o agitación.
- Filtrar material no dispersada o aglomerada.

B. Parámetros usados:

- Temperatura: 25 °C
- Líquido: H₂O ultrapura
- Ángulo de incidencia de la luz (689 nm): 90°
- Tiempo de análisis : 1:30 min
- Índice de refracción: 1,59

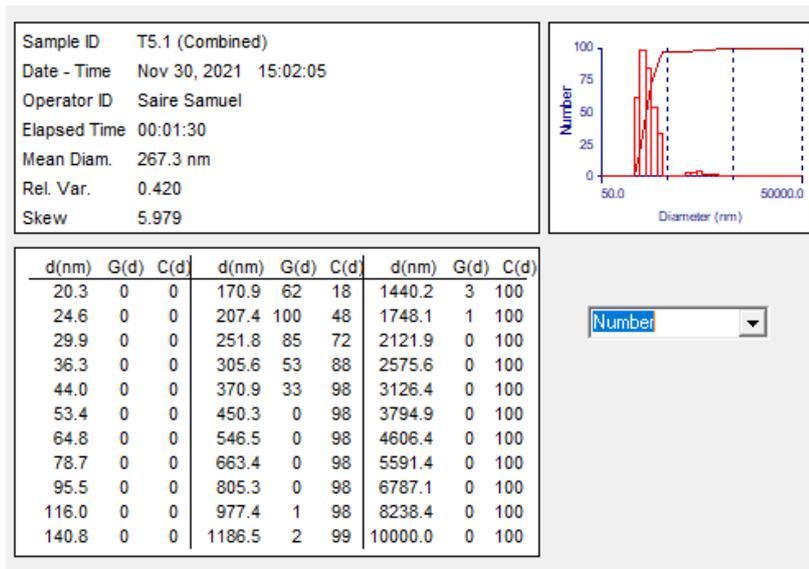
C. Procedimiento de análisis:

- 2,5 mL de la dispersión homogenizada se agregan en una cubeta de plástico transparente.
- Colocar la cubeta en el porta muestras del equipo.
- Introducir los parámetros de análisis
- Inicio del análisis

D. Software: BI-MAS 9KPSDW

Histograma: Se señala (barra verde) el diámetro (207 nm) con mayor número de conteos (G(d))

- Sumario de datos obtenidos:



Cuadro E: Valores de polidispersidad de la muestra óptima

Parámetros obtenidos	PROM.
Diámetro medio	267,3
	0,353
	0,342
Polidispersidad	0,348
	0,349

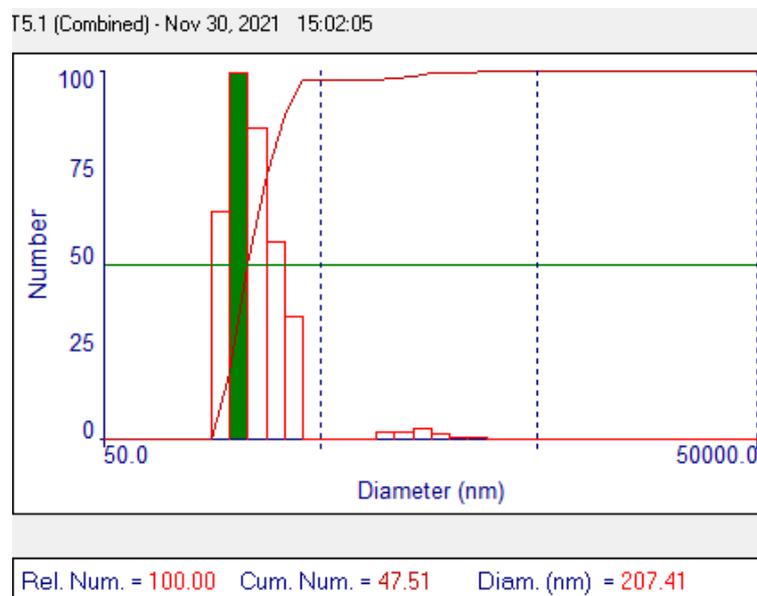


Figura A: Curva de distribución de tamaño de la muestra óptima

Anexo 3: Determinación de potencial zeta

La metodología utilizada se detallada a continuación:

Equipo: Brookhaven DLS modelo 90Plus

A. Tratamiento previo:

- Medida de la cantidad de material a dispersar
- Preparar una dispersion (100 mL) de 0,02 por ciento de la muestra con una solución de KCl 1mM.
- Dispersion por sonicación y/o agitación
- Agitación por 30 min

B. Parametros usados:

- Temperatura: 25 °C
- Liquido: solución de KCl 1Mm
- Solución resultante:
- pH 5,9
- Concentración: 0,2 mg/mL
- Luz laser: 659 nm
- Tiempo de analisis: 1:30 min

C. Procedimiento de análisis

- Colocar el sistema de electrodos en la solución de KCl 1mM por 30 min
- 1 mL de la dispersión homogenizada se agregan en una cubeta de plastico transparente.
- Colocar la cubeta-sistema de electrodos en el porta muestras del equipo.
- Introducir los parámetros de análisis
- Inicio del análisis

Anexo 4: ANVA de diseño multifactorial categórico

Cuadro F: Análisis de varianza para TAMAÑO - Tipo III Suma de cuadrados

<i>Fuente</i>	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Ratio-F	Valor-P
Principales Efectos					
A: TIPO DE ALMIDON	2.69993E7	1	2.69993E7	2.85	0.1062
B: CONCENTRACION ALMIDON	133683.	1	133683.	0.01	0.9066
C: CONCENTRACION ACIDO	807371.	1	807371.	0.09	0.7732
D: TIEMPO MOLIENDA	9.03062E9	1	9.03062E9	953.27	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3.17438E6	1	3.17438E6	0.34	0.5688
AC	6.26961E6	1	6.26961E6	0.66	0.4250
AD	3.61388E7	1	3.61388E7	3.81	0.0643
BC	1.42235E6	1	1.42235E6	0.15	0.7023
BD	346882.	1	346882.	0.04	0.8501
CD	1.58291E6	1	1.58291E6	0.17	0.6868
RESIDUAL	1.98939E8	21	9.47329E6		
TOTAL (CORRECTED)	9.30644E9	31			

The StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de TAMAÑO en contribuciones debidas a varios factores. Dado que se han elegido sumas de cuadrados de Tipo III (por defecto), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de todos los demás factores. Los valores P prueban la significación estadística de cada uno de los factores. Dado que un valor p es inferior a 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo en TAMAÑO con un nivel de confianza del 95,0 por ciento.

Anexo 5: Estadísticos del método de Taguchi

Cuadro G: Análisis de varianza

Effect	Analysis of Variance (Spreadsheet4 in ANALISIS TAGUCHI - TESIS 2022) Mean = 37.1644 Sigma = 5.02328				
	SS	df	MS	F	p
{1} Almidón	24.4475	1	24.4475	5.85709	0.072752
{2} Conc. Ácido	0.3938	1	0.3938	0.09435	0.774042
{3} Conc. Almidón	135.0957	1	135.0957	32.36598	0.004714
Residual	16.696	4	4.174		

Cuadro H: Promedio ETA por niveles de factor

Effect	Average Eta by Factor Levels (Spreadsheet4 in ANALISIS TAGUCHI-TESIS 2022) Mean = 37.1644 Sigma = 5.02328				
	Level	Means	Paramet. Estimate	St. Dev.	St. Error
{1} Almidón	1	35.41625	-1.74812	6.125312	1.471606
	2	38.9125	1.74812	5.497755	1.394184
{2} Conc. Ácido	1	37.38625	0.22187	3.339312	1.086566
	2	36.9425	-0.22187	8.283756	1.711359
{3} Conc. Almidón	1	41.27375	4.10938	2.158443	0.87357
	2	33.055	-4.10938	2.786001	0.992472