UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

"INFLUENCIA DEL GERMEN EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS (B_1, B_2, G_1, G_2) EN HARINAS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO POR EL MÉTODO TRADICIONAL."

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q. LINETH JULIANA VEGA ROJAS

DIRIGIDO POR

Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDO POR

Dra. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO
NOVIEMBRE 2015
MÉXICO

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

"INFLUENCIA DEL GERMEN EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS (B_1, B_2, G_1, G_2) EN HARINAS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO POR EL MÉTODO TRADICIONAL."

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de la

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Q. Lineth Juliana Vega Rojas

Dirigido por:

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Co-dirigido por:

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez

SINODALES

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Presidente

Firma

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez
Secretario

Firma

Dra. Alejandra Rojas Molina
Vocal

Alejandra Rojas M.
Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

Firma

Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio
Suplente

Firma

M.S.P Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro universitario
Querétaro, Qro
Noviembre 2015

RESUMEN

El proceso de nixtamalización del maíz promueve cambios físicos y químicos en sus componentes con un efecto importante en las propiedades organolépticas y en el valor nutrimental del producto final. Frecuentemente, el maíz está contaminado con aflatoxinas (AFs) producidas por los hongos del género *Aspergillus,* las cuales provocan efectos adversos en la salud. La nixtamalización es una alternativa para inhibir la presencia de las AFs en el maíz. Adicionalmente, los ácidos grasos (AG) presentes en el grano pueden desempeñar un papel protector contra las AFs. El objetivo de este trabajo fue evaluar la contribución del germen de maíz en las propiedades físicas, químicas y los niveles de AFs en harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional elaboradas a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ (0.7, 1.4 y 2.1 % m/m) y tiempos de reposo (0, 3, 6 y 9 h). Los cambios morfológicos y estructurales del germen de maíz nixtamalizado se evaluaron mediante SEM y difracción de rayos X. Se determinó y comparó el contenido de calcio por espectrometría de absorción atómica, el perfil de viscosidad y la distribución de tamaño de partícula en harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen. Adicionalmente, se extrajo el aceite a partir del germen de maíz nixtamalizado y crudo para analizar su contenido de AG, índice de saponificación (IS) e índice de peróxido (IP). Finalmente, se cuantificó el contenido de AFs (B_1, B_2, G_1, G_2) en harinas con y sin germen. Se detectaron cambios microestructurales en el germen de maíz nixtamalizado. Así mismo, se mostró la presencia de compuestos cristalinos ($CaCO_3$) en el germen con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo. El contenido de calcio en las harinas de maíz nixtamalizado con germen fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) comparado con las harinas desgerminadas. Las harinas sin germen mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en el valor del pico máximo de viscosidad aparente. La distribución del tamaño de partícula en las harinas de maíz nixtamalizado desgerminadas y con germen fue más homogénea a tiempos de reposo prolongados y se obtuvieron harinas con partículas más finas al incrementar la concentración de $Ca(OH)_2$ utilizada en el proceso. No se detectaron cambios significativos en el contenido de AG del aceite extraído del germen de maíz nixtamalizado comparado con el germen nativo. En el IS de las muestras experimentales fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) el efecto de la concentración de $Ca(OH)_2$ con respecto al tiempo de reposo. El IP en todas las muestras experimentales resultó mayor al límite máximo permitido por la NMX F-154-SCFI-2005. La presencia del germen y la concentración de $Ca(OH)_2$ empleada en el proceso de nixtamalización ($p \leq 0.05$) tuvieron un efecto significativo en el contenido de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y aflatoxinas totales. Finalmente, estos resultados muestran evidencia de la importancia del germen en las propiedades físicas, químicas y en la reducción de la contaminación por aflatoxinas en las harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional, siendo la concentración de 1.4 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 6 h de reposo, donde se detectaron que las propiedades fisicoquímicas y nutrimentales de las harinas resultan más adecuadas y aportan un mayor beneficio a la salud de la población.

Palabras clave: germen, nixtamalización, ácidos grasos, aflatoxinas.

SUMMARY

The nixtamalization process promotes physical and chemical changes in corn components with a significant impact on the organoleptic properties and the nutritional value of the final products. Corn is frequently contaminated with aflatoxins (AFs) produced by fungi *Aspergillus* species. The AFs cause adverse health effects. Nixtamalization is an alternative to reduce the presence of AFS in corn. Additionally, it has been reported that the fatty acids (FA) in the corn may have a protective role against AFs. Nevertheless, during the nixtamalization process, the FA react with $Ca(OH)_2$ thus losing this protective effect. The aim of this study was to evaluate the contribution of germ in the physical, chemical and AFs levels in processed corn flour obtained by the traditional method at different processing conditions (0.7, 1.4, 2.1% w/w $Ca(OH)_2$ and 0, 3, 6, 9 h steeping time). The morphological and structural changes of nixtamalized corn germ were evaluated by SEM and X-ray diffraction. Calcium concentration in corn flours with and without germ was determined by atomic absorption spectrometry. Furthermore, the viscosity profile and the particle size distribution of samples were studied. Additionally, the oil from corn germ was extracted in order to evaluate the FA content, saponification index (SI) and peroxide index (PI). Finally, the levels of AFs (B_1, B_2, G_1, G_2) in nixtamalized corn flours with and without germ were quantified. Microstructural changes were detected in nixtamalized corn germ. In addition, it is showed the presence of crystalline compounds ($CaCO_3$) in the germ of corn nixtamalized with 2.1% (w/w) of $Ca(OH)_2$ and 9 h of steeping time. Calcium content in nixtamalized corn flours with germ was significantly higher ($p \leq 0.05$) compared to corn flours without germ. The flours without germ showed statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in the peak value of apparent viscosity compared to corn flours with germ. The particle size distribution in nixtamalized corn flours with germ and without germ was homogeneous at long steeping times and finer flour was obtained by increasing the concentration of $Ca(OH)_2$ used in the process. No significant changes were detected in FA content of oil extracted from germ of nixtamalized corn samples compared to oil from native corn. The effect of the concentration of $Ca(OH)_2$ in SI of experimental samples was significantly ($p \leq 0.05$) higher compared to the steeping time. The IP in all experimental samples was higher than the maximum allowed by the NMX F-154-SCFI-2005. The presence of the germ and the concentration of $Ca(OH)_2$ used in the nixtamalization process ($p \leq 0.05$) had a significant effect on aflatoxin B_1, B_2, G_1 and total aflatoxin concentrations in nixtamalized corn flours. Finally, these results show evidence of the importance of the germ in the physical and chemical properties of nixtamalized corn flours obtained by the traditional method and reduction of aflatoxins contamination in these foodstuffs. Corn flours obtained with 1.4% w/w of $Ca(OH)_2$ and 6 h of steeping time showed suitable chemical, physical and nutritional properties to improve consumer health and organoleptic properties of final products.

Keywords: germ, nixtamalization process, fatty acids, aflatoxins.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera llevado a cabo sin el apoyo de estas personas e instituciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por todo el apoyo económico que me brindo para llevar a cabo este trabajo.

Al proyecto FOMIX: QRO-2014-C03-250289 por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Isela Rojas y Dra.Elsa Gutierrez por toda la paciencia y apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Magda Carvajal Moreno del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, D.F) por todo el apoyo técnico y aportación científica.

A mis sinodales Dra. Alejandra Rojas, Dr. Moustapha Bah y Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio por sus comentarios y recomendaciones.

A la Dra. Guadalupe Alcocer García, Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química

A mis compañeros y amigos del posgrado Ronna, Jesús “chuy” y Alfredo “peyo” quienes siempre me animaron en tiempos difíciles y por su grata compañía durante estos dos años.

A la Dra. Beatriz Millán y la Msc Alicia del real del Centro de física aplicada y tecnología avanzada (CFATA) de la UNAM, Juriquilla por el soporte técnico.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García por todos sus consejos personales y académicos, por su compañía y sobre toda por su paciencia en este proceso.

ÍNDICE GENERAL

Contenido **Página**

RESUMEN 2
SUMMARY 4
AGRADECIMIENTOS 5
ÍNDICE GENERAL i
ÍNDICE DE CUADROS v
ÍNDICE DE FIGURAS vii
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
2.1 Origen del maíz 3
2.2 Morfología del grano de maíz 3
2.2.1 Pericarpio 4
2.2.2 Endospermo 4
2.2.3 Germen 5
2.2.4 Cofia 6
2.3 Composición química del maíz 7
2.3.1 Almidón 7
2.3.2 Proteína 8
2.3.3 Fibra 8
2.3.4 Minerales 8
2.3.5 Ácidos grasos 9
2.4 Importancia de los ácidos grasos en la dieta 10
2.4.1 Ácidos grasos presentes en el germen de maíz 11
2.4.2 Composición de los ácidos grasos del germen de maíz 12
2.4.3 Sales de los ácidos grasos del germen de maíz 13
2.5 Producción de maíz a nivel mundial 13

2.5.1 Consumo de maíz y tortilla en México 14

2.6 Nixtamalización 15

2.6.1 Producción de harinas instantáneas de maíz nixtamalizado 18

2.6.2 Difusión de Calcio 18

2.6.3 El proceso de nixtamalización como estrategia para incrementar la ingesta de calcio en la dieta 19

2.7 Transformaciones estructurales y morfológicas del maíz durante la nixtamalización 20

2.7.1 Cambios morfológicos 20

2.7.2 Cambios estructurales 21

2.8 Transformaciones fisicoquímicas del maíz durante la nixtamalización 22

2.8.1 Perfiles de viscosidad aparente 22

2.8.2 Distribución de tamaño de partícula 24

2.8.3 Índice de peróxido e Índice de saponificación 25

2.9 Transformaciones nutrimentales del grano de maíz durante la nixtamalización..... 27

2.9.1 Contenido de ácidos grasos 28

2.9.2 Contenido de calcio 29

2.10 Contaminación de maíz por aflatoxinas 29

2.10.1 Generalidades de las aflatoxinas 30

2.10.2 Biosíntesis y biotransformación de las aflatoxinas 32

2.10.3 Colonización del hongo 34

2.10.4 Como actúan las AFs en el ser humano 36

2.10.5 Importancia de la nixtamalización en el control de AFs 38

2.10.6 Importancia de los componentes químicos del maíz en el control de aflatoxinas40

3. JUSTIFICACIÓN 41

4. HIPOTESIS 43

5. OBJETIVOS 44

6. MATERIALES Y MÉTODOS 46

6.1 Preparación de la muestra 46

6.2 Nixtamalización de maíz..... 46

6.2.1 Separación manual de germen 47

6.3 Morfología y cristalinidad del germen de maíz..... 47

6.3.1 Cambios estructurales en el germen..... 48

6.3.2 Cambios morfológicos en el germen 48

6.4 Molienda y distribución de tamaño de partícula 49

6.5 Perfiles de viscosidad aparente..... 51

6.6 Determinación de la concentración de calcio en germen, harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG) 52

6.7 Extracción de aceite a partir del germen..... 54

6.8. Determinación de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico de aceite del germen de maíz por cromatografía de gases 55

6.9 Índice de peróxido 58

6.10 Índice de Saponificación..... 59

6.11 Extracción y cuantificación de aflatoxinas de las harinas..... 61

6.11.1 Obtención de estándares y curvas de calibración 63

6.11.2 Derivatización de las aflatoxinas para su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)..... 64

6.11.3 Condiciones para la Cromatografía de líquidos de alta resolución 65

6.12 Análisis estadístico..... 66

6.13 Cuadro metodológico y diseño experimental 67

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 69

7.1 Caracterización morfológica del germen nativo y nixtamalizado mediante SEM-HV70

7.2 Contenido de calcio en germen, harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y desgerminadas (HMN-SG) 75

7.3 Caracterización por difracción de Rayos X (DRX) del germen de maíz extraído del grano de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso 78

7.4 Perfiles de viscosidad de las harinas de maíz nixtamalizado y cocido con germen y sin germen a diferentes condiciones de proceso 80

7.5 Distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz nixtamalizado y cocidas con germen y sin germen a diferentes condiciones de proceso 83

7.6 Contenido de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico en aceite de germen de maíz 87

7.7 Índice de peróxido y saponificación 89

7.8 Cuantificación de aflatoxinas 93

7.8.1 Curvas de calibración de las aflatoxinas 94

7.8.2 Identificación y cuantificación de Aflatoxinas en HMN y HMN-SG 94

8. CONCLUSIONES 99

9. REFERENCIAS 101

ANEXOS 112

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Distribución ponderal de las principales partes del grano	6
2	Composición química proximal de las principales estructuras del grano de maíz (g/100g)	7
3	Contenido de minerales del maíz	9
4	Composición total de aceite en el maíz	9
5	Composición del aceite de maíz en términos de ácidos grasos	12
6	Producción y consumo de maíz en México	14
7	Ingesta diaria per cápita en gramos	15
8	Características físico-químicas del aceite de maíz	27
9	Notificación de micotoxinas en UE 2008-2012	30
10	Valores del volumen estándar de calcio	53
11	Cantidades para la esterificación metílica	55
12	Condiciones de acondicionamiento	57
13	Harina de maíz nixtamalizadas con diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$	61
14	Concentraciones para las curva de calibración de las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2	64
15	Diseño Experimental	67
16	Rendimiento de harinas de maíz nixtamalizado y cocidas (HMN, HMN-SG y HMC, HMC-SG)	83
17	Contenido de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico en el germen de maíz nativo y nixtamalizado a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo	88
18	Índice de saponificación e Índice de peróxido.	90
19	Regresiones lineales obtenidas en las curvas de calibración	94

para las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2, tiempos de retención promedio detectados para cada aflatoxina y coeficientes de correlación

20 Concentraciones de aflatoxinas (ng mL^{-1}) en harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen, harinas de maíz cocido con germen y sin germen y harinas de maíz crudo 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura anatómica del grano de maíz	3
2	Micrografías de germen nativo	5
3	Ácidos grasos	11
4	Proceso tradicional de nixtamalización	18
5	Micrografía de la estructura del escutelo del germen del grano maíz	22
6	Perfil de viscosidad	25
7	Distribución de tamaño de partícula	26
8	Mecanismo de Peroxidación lipídica	28
9	Estructuras de las Aflatoxinas	32
10	Ruta biosintética de las Aflatoxinas	34
11	Ruta de biotransformación de AFB_1	50
12	Granos de maíz infectados naturalmente con Aspergillus flavus	52
13	Ruta de activación metabólica de las AFB_1	53
14	Contenido de aflatoxinas reducido durante las operaciones involucradas en el proceso de tortilla y frituras por el proceso tradicional e industrial	55
15	Sistema computarizado para nixtamalización	63
16	Difractómetro de rayos X Rigaku	64
17	Microscopio electrónico de barrido de alto vacío (SEM)	65
18	Instrumentación para molienda y distribución de tamaño de partícula	66
19	Determinación de perfiles de viscosidad	68
20	Determinación de calcio	70

21	Instrumentación para la extracción del aceite del germen de maíz	71
22	Etapas de la determinación de Índice de peróxido	75
23	Índice de saponificación	76
24	Proceso de extracción de aflatoxinas	78
25	Espectrofotómetro UV-visible	80
26	Proceso de derivatización	81
27	Cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de fluorescencia Agilent Technologies	82
28	Cuadro metodológico	84
29	Historias de cocción de harina de maíz	86
30	Micrografía del germen de maíz sin tratamiento	87
31	Micrografía del germen de maíz cocido y nixtamalizado a 92 °C	90
32	Contenido de Calcio (g/100g) en germen y harinas de maíz	93
33	Difractogramas del germen de maíz	95
34	Perfiles de viscosidad para harinas de maíz	97
35	Gráfica diferencial de distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz cocido (HMC) y harinas de maíz nixtamalizado (HMN)	99
36	Gráfica diferencial de distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz cocido sin germen (HMC-SG) y harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG)	101
37	Picos cromatográficos correspondientes a las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 obtenidos en el HPLC a una concentración de 64 ng mL^{-1}	109

1. INTRODUCCIÓN

El maíz en sus diversas formas de consumo es el alimento principal en la dieta de la población mexicana. El consumo promedio de maíz *per capita* es de 342 g/día, el cual es mayor con respecto a otros cereales como el trigo (98 g/dia) y el arroz (14 g/día) (FAO, 2009). México se encuentra entre los primeros diez países productores y consumidores de maíz; no obstante, su producción no es suficiente para cubrir el consumo interno, por lo que se encuentra entre los primeros cinco países importadores de maíz (SE, 2012). En México y algunos países de Centroamérica la mayoría de productos a base de maíz son sometidos a un tratamiento térmico-alcalino conocido como nixtamalización (Rodríguez et al*.,* 2008). La nixtamalización adiciona calcio al maíz y genera cambios en sus componentes, provocando transformaciones en las propiedades fisicoquímicas y un mejoramiento en la calidad nutricional del producto final (Gutiérrez et al*.*, 2007).

Acorde con algunos reportes proporcionados por la FAO (1993) se indica que las poblaciones que ingieren grano de maíz desgerminado obtendrán menor cantidad de ácidos grasos, ya que el germen es responsable de más del 35 % de ácidos grasos presentes en el maíz integro (Klaus y Karel, 1991). En este sentido es importante señalar que en el aceite del germen de maíz se encuentran algunos ácidos grasos esenciales para el organismo como son el ácido linolénico y linoleico, considerados ácidos grasos omega-3 y omega-6 respectivamente (Williams, 2000). Sin embargo, durante el proceso de nixtamalización, los lípidos son modificados por una reacción de saponificación entre los ácidos grasos libres y el hidróxido de calcio utilizado en el proceso, formando sales de calcio de ácidos alifáticos y desencadenándose la formación de especies reactivas de oxígeno (Yahuaca-Juárez et al., 2013). Fernández-Muñoz et al. (2002) y Rojas-Molina et al. (2009) demostraron que los cambios en las propiedades físicas y químicas de las harinas de maíz están en función de las condiciones del proceso y almacenamiento. Por otro lado, Bressani et al., (2001) caracterizaron las propiedades físicas y químicas de las harinas de maíz nixtamalizado por el método

industrial y comprobó que la distribución y tamaño de partícula, así como la absorción de agua están asociadas con la aceptabilidad y funcionalidad de la tortilla. La distribución del tamaño de partícula y el desarrollo de viscosidad aparente se consideran criterios importantes que garantizan buenos atributos de textura en los productos nixtamalizados que son deseables para el consumidor (Palacios-Fonseca et al*.,* 2009). Adicionalmente, el perfil de viscosidad de las harinas elaboradas con maíz nixtamalizado también depende de la formación de un complejo fibra soluble-insoluble y la exudación de la amilosa del gránulo de almidón durante el desarrollo de la viscosidad (Cornejo-Villegas., et al 2010). De la misma manera, Méndez-Montealvo et al. (2007) demostraron que la molienda del nixtamal, la mezcla entre el almidón parcialmente gelatinizado con los lípidos presentes en el grano son factores que influyen en el desarrollo de viscosidad de las harinas.

La mayoría del maíz destinado a la industria molinero-tortillera y harinera han sido contaminados por insectos, ácaros, bacterias y hongos los cuales atacan en el campo y durante el almacenamiento del grano (Vázquez-Durán et al., 2014). Muchos de los hongos producen sustancias tóxicas (micotoxinas) que causan daño a los humanos y a los animales que las consumen, las aflatoxinas son producidas por el hongo *Aspergillus flavus y A. parasiticus*, y se ha demostrado que son altamente peligrosas para el ser humano (Marin et al., 2013). La nixtamalización puede ser una alternativa para inhibir la presencia y/o el poder mutagénico de las aflatoxinas en el maíz (Torres et al., 2001).

Con base en las investigaciones señaladas anteriormente, el propósito de este trabajo fue evaluar por primera vez, el efecto del germen de maíz en las propiedades físicas, químicas y los niveles de aflatoxinas de harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional elaboradas a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo, a fin de identificar las condiciones de proceso para obtener harinas nixtamalizadas con las propiedades reológicas y nutrimentales apropiadas para consumo humano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Origen del maíz

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». Desde el punto de vista botánico, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada. La flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. El cultivo del maíz tuvo su origen con toda probabilidad en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7000 años, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América (FAO, 1993).

2.2 Morfología del grano de maíz

A continuación se describirán las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano las cuales son: pericarpio o cáscara, endospermo, germen y pilorriza o cofia (Figura 1).

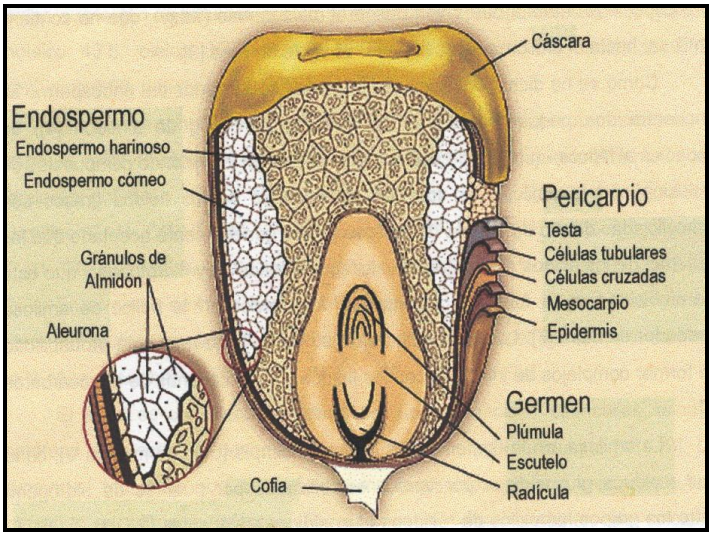


Figura 1. Estructura anatómica del grano de maíz (Hoseney, 1991).

2.2.1 Pericarpio

El pericarpio comúnmente llamado “cáscara”, es la parte más externa del grano. Esta estructura recubre por completo al endospermo y al germen, también se le conoce como cubierta seminal. Las capas que conforman el pericarpio desde la parte más externa del grano hacia el interior son: 1) epidermis, 2) mesocarpio, 3) células cruzadas, 4) células tubulares y 5) testa.

Desde el punto de vista morfológico, el pericarpio está constituido por un conjunto de fibras de celulosa (23 %) inmersas dentro de una matriz formada por hemicelulosa (67 %). Ambas estructuras están compuestas de cadenas construidas a partir de monómeros de glucosa unidas mediante puentes glucosídicos, en ellas se incluyen los ácidos poliurónicos, que son polisacáridos con grupos ácidos en el carbono 6 de la unidad monosacárida. Otro componente importante del pericarpio es la lignina, aunque no es un polisacárido, aparece generalmente asociada a las fibras de celulosa cuyas unidades estructurales son derivadas del 3,4 dihidroxifenil-propano (Watson, 2003).

2.2.2 Endospermo

El endospermo está conformado en su mayoría por células alargadas en cuyo interior se encuentran los paquetes de gránulos de almidón en forma esférica o poliédrica con un diámetro entre 5 a 30 µm (Schoch y Maywald, 1956). En el grano de maíz se distinguen dos tipos de endospermo: el suave o harinoso y el duro, cuya relación está asociada con la dureza del grano. Ambos tipos de endospermo están comprimidos por la matriz proteínica que encapsula los gránulos de almidón. El endospermo harinoso se localiza en la fisura central del grano, en donde los gránulos de almidón recién formados se depositan, los cuales al aumentar de tamaño dan lugar a que la matriz proteínica se estire y se torne más delgada. El endospermo duro se encuentra principalmente en las partes laterales del grano. La matriz proteínica que lo recubre es más gruesa y resistente, la cual comprime los gránulos de almidón, mismos que adquieren una forma poliédrica; no presentan cavidades aéreas y son de aspecto traslúcido. La estructura más externa del endospermo se llama capa de aleurona y lo separa del

pericarpio, igualmente la sub-aleurona cubre y delimita al endospermo y al germen (Watson, 2003; Rojas, 2008).

2.2.3 Germen

El germen formado por el embrión y el escutelo almacena nutrimentos y hormonas, los cuales son movilizados a todo el grano por enzimas sintetizadas durante las etapas iniciales de la germinación (Logan et al., 2001). La radícula que da origen al nuevo embrión, contiene todas las enzimas esenciales, nutrientes y material genético para producir una nueva planta de maíz.

El embrión (Figura 2) representa el 10 % de la estructura y se desarrolla durante la germinación. Por otro lado, el escutelo (Figura 2) comprende el 90 % restante del germen; en esta estructura se encuentran presentes los lípidos como componentes mayoritarios en forma de gotas microscópicas denominadas esferomas o cuerpos grasos (CG) con un diámetro de 1 a 1.3 micras y compuestas por una membrana de proteínas y lípidos. De igual manera, el escutelo almacena los nutrientes durante la geminación. La superficie del escutelo está en contacto con el endospermo (Klaus y Karel, 1991; Watson, 2003).

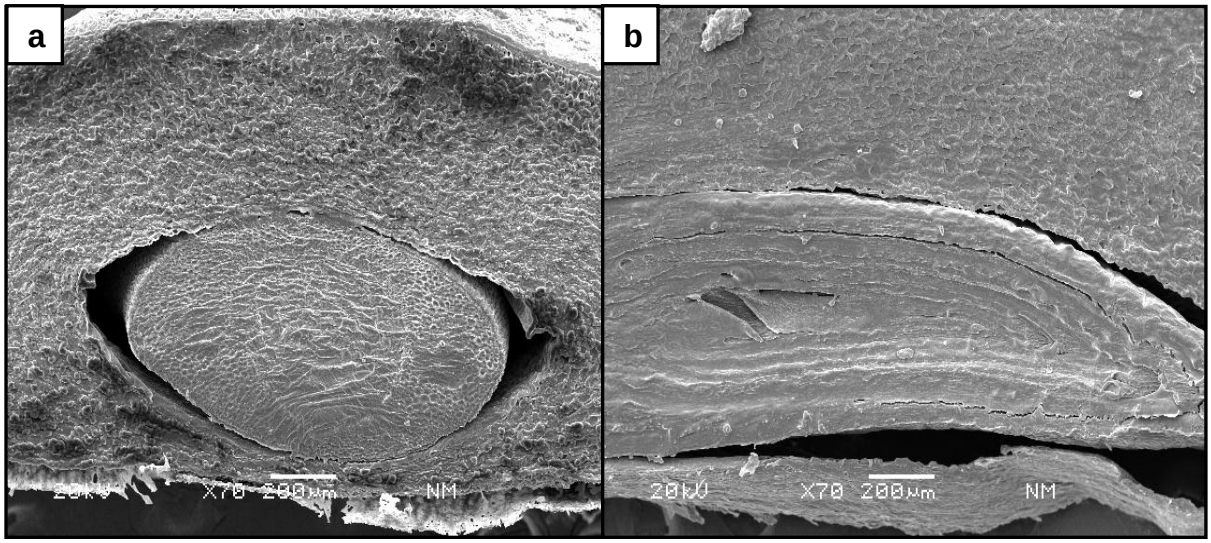


Figura 2. Micrografías de germen nativo. a) corte transversal del germen. b) corte longitudinal del germen.

2.2.4 Cofia

La cofia constituye la fracción minoritaria del grano y representa menos del 1 % del peso del grano de maíz. La cofia es una estructura fibrosa que mantiene al grano unido con el olote y por la cual se transportan los nutrientes que el grano necesita durante la etapa de crecimiento. Esta estructura está constituida principalmente por celulosa; entre la base del germen y la punta se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar que funciona como sello del grano cuando éste ha alcanzado cierta madurez.

Dentro de la cofia se expone una capa circular café oscura conocida como capa negra que se encuentra en contacto con la base del germen y del endospermo. Esta capa separa y probablemente tiene la función de sellar la punta al grano, la cual es empleada como barrera que protege al grano contra la invasión de insectos y microorganismos. La cofia se encuentra conectada con la capa de células tubulares del pericarpio, lo que permite la distribución de nutrientes, la difusión de agua y de calcio hacia el endospermo (Klaus y Karel, 1991; Serna, 1996).

La distribución ponderal de las distintas partes del grano se indica en el Cuadro 1. El endospermo es la parte mayoritaria del grano y le corresponde cerca del 83 % de su peso, en tanto que al germen y al pericarpio le corresponde el 11 y el 5 % respectivamente de su peso total. El resto del grano lo constituye la pilorriza, estructura cónica que junto con el pedicelo une el grano a la espiga (FAO, 1993).

Cuadro 1. Distribución ponderal de las principales partes del grano.

Estructura	Porcentaje de distribución ponderal
Pericarpio	5-6
Aleurona	2-3
Endospermo	80-85
Germen	10-12

Fuente: FAO, 1993

2.3 Composición química del maíz

Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química como se puede observar en el Cuadro 2. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 84%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0.1 %). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87 %), aproximadamente 9 % de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo (FAO, 1993).

Por último, el germen se caracteriza por presentar contenidos elevados de grasa cruda (34 %), proteína (20 %) y minerales (11 %).

Cuadro 2. Composición química proximal de las principales estructuras del grano de maíz (g/100g).

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	4	9	**20**
Extracto etéreo	1	1	**34**
Fibra cruda más hemicelulosa	84	2	**14**
Cenizas	0.3	0.2	**10**
Almidón	7	87	**8**
Azúcar	0.5	0.5	**12**

Fuente: Klaus y Karel, 1991

2.3.1 Almidón

El componente químico principal del grano de maíz es el almidón, al que corresponde hasta el 72-73 % del peso del grano. Otros hidratos de carbono son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades que varían del 1 al 3 %. El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30 % del almidón. El polímero amilopectina también consiste de unidades de glucosa, pero en forma ramificada y constituye hasta el 70-75 % del almidón. La composición del almidón viene determinada genéticamente. En el maíz común, ya sea con un endospermo de

tipo dentado o córneo, el contenido de amilosa y amilopectina del almidón es tal como se ha descrito anteriormente, en el caso del maíz ceroso éste se caracteriza por contener un almidón formado totalmente por amilopectina (Boyer y Shannon, 1987).

2.3.2 Proteína

Las proteínas constituyen después del almidón el siguiente componente químico del grano por orden de importancia. En las variedades comunes, el contenido de proteínas puede oscilar entre el 8 y el 11 % del peso del grano, y en su mayor parte se encuentran en el endospermo. Las proteínas de los granos del maíz han sido estudiadas ampliamente, y según Landry y Moureaux (1970, 1982), están formadas por lo menos por cinco fracciones distintas. Conforme a su descripción, las albúminas, las globulinas y el nitrógeno no proteíco totalizan aproximadamente el 18 % del nitrógeno total con proporciones del 7 %, 5 % y 6 % respectivamente.

2.3.3 Fibra

Después de los hidratos de carbono (principalmente almidón), las proteínas y las grasas, la fibra dietética es el componente químico del maíz que se halla en cantidades mayores. Los hidratos de carbono complejos del grano de maíz se encuentran en el pericarpio y la pilorriza o cofia, aunque también en las paredes celulares del endospermo y en menor cantidad en las del germen.

2.3.4 Minerales

La concentración de cenizas en el grano de maíz es aproximadamente del 1.3 %, sólo ligeramente menor que el contenido de fibra cruda. El contenido de minerales de algunas muestras de maíz de Guatemala se indica en el Cuadro 3. Los factores ambientales influyen probablemente en dicho contenido. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio del 11 %, comparado con menos del 1 % en el endospermo. Por lo tanto, el endospermo proporciona cerca del 78 % de todos los minerales del grano. El mineral que más abunda es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio. Como sucede con la mayoría de

los granos de cereal, el maíz tiene un bajo contenido de Ca y de oligoelementos (FAO, 1993).

Cuadro 3. Contenido de minerales del maíz.

Mineral	Concentración (mg/100 g)
P	299.6 ± 57.8
K	324.8 ± 33.9
Ca	48.3 ±12.3
Mg	107.9 ± 9.4
Na	59.2 ± 4.1
Fe	4.8 ± 1.9
Cu	1.3 ± 0.2
Mn	1.0 ± 0.2
Zn	4.6 ± 1.2

Fuente: Bressani et al., 1989

2.3.5 Ácidos grasos

En el germen de maíz se encuentra entre el 81 y el 85 % del aceite total del grano. El aceite está constituido en su mayoría por triglicéridos y otros tipos de lípidos minoritarios (Watson, 2003). El germen contiene un 25-30 % de aceite obtenido de una molienda seca, en tanto que en una molienda húmeda se obtiene entre 45 – 50 % de aceite. En el Cuadro 4 se muestra la composición total de aceite en el maíz.

Cuadro 4. Composición total de aceite en el maíz.

Componente	Aceite crudo (%)	Aceite Refinado (%)
Triglicéridos	95.6	98.8
Ácidos grasos libres	1.7	0.03
Ceras	0,05	0.0
Fitoesteroles	1.2	1.1
Tocoferoles	0.06	0.05

Fuente: White, 2003

2.4 Importancia de los ácidos grasos en la dieta

Las grasas son combinaciones de muchos ácidos grasos diferentes, todos con funciones específicas en el cuerpo, y se les nombra con base a su estructura química, que puede ser saturada o no saturada. Los ácidos grasos saturados (SFA) son una cadena de átomos de carbono, similar a una cadena de eslabones, y no tienen enlaces dobles. Los ácidos grasos no saturados tienen dobles enlaces dentro de la cadena de carbono, lo que hace que la estructura se doble. Los ácidos grasos insaturados que tienen un doble enlace entre dos átomos de carbono se denominan ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). Aquellos que tienen más de un doble enlace se denominan ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y se definen también con base en dónde se encuentra el primer enlace doble dentro de la cadena de carbono (Figura 3). Los PUFA se conocen como ácidos grasos omega 3 y omega 6. Dos de estos ácidos grasos poliinsaturados son esenciales, lo que significa que deben ser consumidos en la dieta porque no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano. Estos dos ácidos grasos son el ácido linoleico, que es un ácido graso omega 6, y el ácido α-linolénico, que es un ácido graso omega 3 (CISAN, 2011).

De acuerdo a lo mencionado por Herrera et al. (2006) la relación de ácidos grasos omega 6: omega 3 (2:1) ha perdido el equilibrio porque el consumo de omega 6 ha aumentado y no corresponde a esta proporción que se recomienda desde el punto de vista nutricional. La evidencia es clara en cuanto a que las grasas omega 6 (ácido linoleico) son esenciales para un óptimo funcionamiento del cuerpo y para el mantenimiento de la salud. Todos los estudios demuestran su función en la reducción del colesterol total y en la reducción del riesgo de enfermedad cardiaca coronaria (CISAN, 2011).

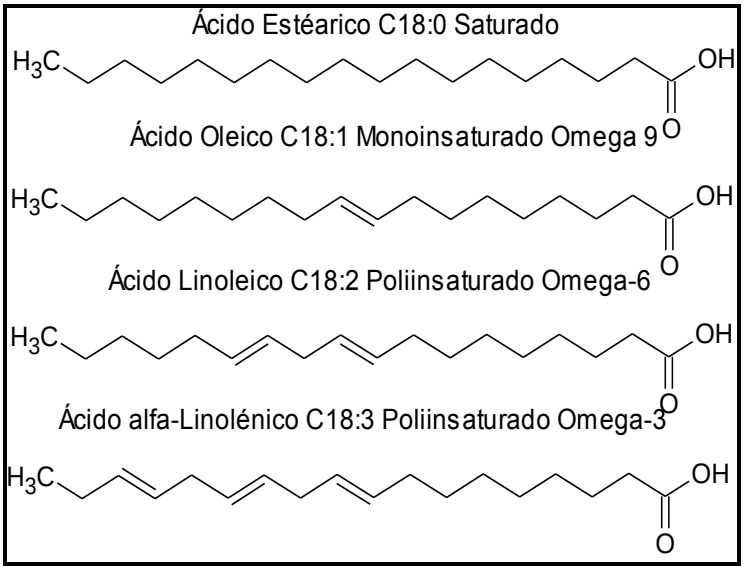


Figura 3. Ácidos grasos.

En el aceite del germen de maíz se encuentran ácidos grasos esenciales como son los ácidos α-linolénico y linoleico; como se mencionó anteriormente son considerados a ácidos grasos esenciales omega 3 y omega 6 respectivamente. El ácido araquidónico también está involucrado en la misma ruta biosintética del omega 6. Por otro lado, el ácido oleico es un ácido grasos omega 9 que del mismo modo a diferencia de los ácidos grasos omega 6, no se consideran ácidos grasos esenciales (Williams, 2000).

2.4.1 Ácidos grasos presentes en el germen de maíz

Cuando el maíz es sometido a un tratamiento térmico alcalino los lípidos presentes en el germen fijan calcio por medio de la formación de sales de ácidos grasos alifáticos o porque de la hidrólisis de los enlaces de éster de los ácidos grasos contenidos en mono, di y triglicéridos, forman ácidos grasos saponificados y glicerol (Yahuaca-Juárez et al., 2013). Las sales de calcio son las portadoras de calcio que se incorporan en las capas periféricas del endospermo durante el proceso de nixtamalización. Por el contrario, el calcio que se fija en el pericarpio es desechado en el nejayote (licor alcalino de cocción), debido a que la hemicelulosa del pericarpio se degrada solubilizándose.

Por lo tanto, el calcio contenido en los productos nixtamalizados como las tortillas es atribuido principalmente al calcio fijado al germen (Reed, 2001).

Martínez-Flores et al. (2006) menciona que la calidad nutrimental de lípidos extraído disminuye a medida que la cantidad de hidróxido de calcio utilizado en el proceso de nixtamalización aumenta. De igual manera en tiempos de reposo prolongados, el incremento en el contenido de calcio en el grano de maíz durante la nixtamalización podría estar relacionado con la formación de sales a través de la interacción del calcio con los ácidos grasos del germen (Gutiérrez et al., 2007) y la interacción con los ácidos grasos.

2.4.2 Composición de los ácidos grasos del germen de maíz

El aceite del grano de maíz se encuentra fundamentalmente en el germen y está determinado genéticamente de acuerdo a la variedad de maíz. El Cuadro 5 muestra la composición del aceite de maíz, en el cual se puede observar el nivel bajo de ácidos grasos saturados como son el ácido palmítico y el ácido esteárico con un valor promedio de 9 % y 3 % respectivamente. Por el contrario, el aceite de este cereal contiene niveles relativamente elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoleico con un valor promedio de 40 %.

Por otra parte, se han encontrado cantidades reducidas de ácido linolénico y araquidónico. Adicionalmente, el aceite de maíz es relativamente estable, por contener únicamente pequeñas cantidades de ácido linolénico 0.7 % y niveles elevados de antioxidantes naturales presentes en frutas, legumbres, verduras, hortalizas y cereales. El aceite de maíz goza de gran reputación a causa de la distribución de sus ácidos grasos, fundamentalmente ácido oleico y linoleico. Teniendo en cuenta esto, quienes consumen maíz degerminado obtienen menos aceite y ácidos grasos que quienes consumen el grano entero (FAO, 1993).

Cuadro 5. Composición del aceite de maíz en términos de ácidos grasos.

Ácido Graso	%
Palmítico (C16:0)	7-11
Mirístico (C14:0)	1-2
Esteárico (C18:0)	3-4
Oleico (C18:1)	25-35
Linoleico (C18:2)	50-60

Fuente: Klaus y Karel, 1991

2.4.3 Sales de los ácidos grasos del germen de maíz

Reed. (2001) caracterizó las sales de calcio formadas en el proceso de nixtamalización a través de la saponificación de los ácidos grasos presentes en el germen con $Ca(OH)_2$. Por medio de análisis termogravimétrico, difracción de rayos x y espectroscopia infrarroja se reportó el comportamiento térmico de las sales de ácidos grasos expuestas a elevadas temperaturas simulando las condiciones en las que están expuestos en varios procesos industriales. Estos autores concluyeron que la descomposición de las sales de los ácidos grasos que se forman en el germen durante la nixtamalización ocurre a temperaturas superiores a las reportadas para este proceso. La solubilidad de las sales de ácidos grasos se ve afectada por la carga en la que se encuentra el calcio en las diferentes sales. Las sales de los ácidos grasos con iones monovalentes son solubles en agua, en tanto que las sales formadas con iones divalentes como el calcio (Ca^{+2}) son insolubles en agua (Reed, 2001). También se ha reportado que la digestibilidad de los ácidos grasos en el organismo disminuye con la presencia de iones calcio. La formación de sales de ácidos grasos reduce la absorción de grasa y energía absorbida por el organismo contribuyendo a la disminución de colesterol en la sangre; sin embargo, afecta la absorción de ácidos grasos esenciales para el organismo (Fleischman et al., 1967; Bierenbaum et al., 1972; Denke et al., 1993).

2.5 Producción de maíz a nivel mundial

En el mundo se cosechan cerca de 160 millones de hectáreas de maíz, el 21 % de la cosecha corresponde a EE.UU. seguido de China con un 20 %, Brasil con 8 %, India y la Unión Europea con un 5 % para cada uno y México con 4 %.

El nivel de producción de maíz depende de la superficie destinada al cultivo y de los rendimientos del mismo. En el caso de Estados Unidos de Norteamérica es el país que más superficie destina a este cultivo y cuenta con uno de los rendimientos más elevados del mundo (9.6 toneladas por hectárea), razón por la cual es el primer productor de dicho grano. Le sigue China que destina casi la misma superficie a este cultivo, pero cuyo rendimiento es menor (5.3 toneladas

por hectárea), esto hace que su producción sea aproximadamente 50 % menor a la correspondiente a los Estados Unidos de Norteamérica.

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA sus siglas en inglés) indica que la producción mundial de maíz ascendió a 829 millones de toneladas. Sin embargo, la cantidad de maíz que se produce en México no es suficiente para abastecer el consumo del país, por lo que se encuentra entre los primeros cinco países importadores de este cereal (Cuadro 6) (SE, 2012).

Cuadro 6. Producción y consumo de maíz en México (Millones de toneladas)

2009/2010		**2010/2011**		**2011/2012**	
Producción	Consumo	Producción	Consumo	Producción	Consumo
20.374	**30.200**	21.130	**29.000**	20.500	**30.300**

Fuente: **SE 2012**

2.5.1 Consumo de maíz y tortilla en México

El consumo de maíz en el mundo aumentó a partir del año 2003, dicho aumento se explica principalmente por una mayor demanda por parte de los Estados Unidos de Norteamérica. Este incremento surgió a partir del año 2008 cuando se inicia el plan a 20 años para sustituir la gasolina por etanol obtenido a partir de maíz. Este hecho marcó el inicio de la era en la que diversos productos alimentarios se comenzaron a utilizar para uso no alimentario, reduciéndose de esta manera la disponibilidad del maíz para el consumo humano y animal (SE, 2012).

Garcia-Uriguen, (2012) determinó la ingesta diaria de tortilla y sus derivados a través de seis niveles socioeconómicos, los cuales están representados en el Cuadro 7. En el cuadro anterior el segmento E es el más vulnerable desde el punto de vista adqusisitivo y representa el 6.7 % de la población, D es el segundo segmento más pobre del país, el cual representa el 18.3 % de la población, D+ se considera el segmento más representativo de la sociedad mexicana y constituye el 35.8 % de la población, C es denominado el

nivel medio, se encuentra por arriba del promedio poblacional de bienestar, representa 17.9 % de la población, C+ segundo estrato con más alto nivel socioeconómico y comprende el 14 % de la población. Por último A/B es el estrato con el más alto nivel de vida e ingresos en el país y representa el 7.2 % de la población. Por otro lado, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el 2011 menciona que el consumo *per capita* humano (kg) de maíz amarillo y blanco para el 2011 incrementó un 3.6 % respecto al año pasado, pero del mismo modo CONEVAL en el 2010 reporta el consumo diario de tortilla por persona dependiendo de las zonas, señalando que en la zona rural se consumen aproximadamente 217.9 g, en tanto que en las zonas urbanas se consume 155.4 g de tortilla.

Cuadro 7. Ingesta diaria *per cápita* en gramos.

Concepto	A/B	C+	C	D+	D	E
Tortilla de maíz	75.9	89.9	125.1	153	160.4	113.4
Derivados de maíz	20.5	20.1	16.5	27.1	56.4	153.5

Fuente: Garcia-Uriguen, 2012

2.6 Nixtamalización

La nixtamalización es un proceso tradicional desarrollado en México, el cual consiste en un tratamiento térmico-alcalino al que se somete el maíz para la elaboración de productos como la tortilla, tostadas, nachos, tamales, atole entre otros. Este proceso inicia con la cocción del grano de maíz en una solución de hidróxido de calcio al 1 % (m/v) entre 20 y 70 minutos. Posteriormente, se deja reposar entre 3-14 horas, transcurrido este tiempo, el agua de cocción llamado *nejayote* se drena y el maíz remojado conocido como *nixtamal* se lava dos veces con agua para remover exceso de cal, fragmentos de pericarpio, endospermo, germen e impurezas que pudieran estar presentes en el grano. Por último, los granos de maíz húmedo se muelen para obtener un granulado o masa con el que se elaboran las tortillas. Por otra parte, el granulado se seca para obtener harinas instantáneas de maíz nixtamalizado (NMX-187-SSA1/SCFI-2002) (Rodríguez et

al., 2008). El diagrama de flujo para llevar a cabo el proceso tradicional de nixtamalización se presenta en la Figura 4.

La nixtamalización tiene los siguientes propósitos: 1) iniciar la remoción parcial del pericarpio, 2) permitir la difusión del calcio en el grano, 3) facilitar la disponibilidad de proteínas, 4) permitir la gelatinización parcial del gránulo de almidón (Rooney et al., 1999). El hidróxido de calcio usado en la nixtamalización actúa sobre los componentes de las paredes celulares y transforma la hemicelulosa en gomas solubles, también provoca la saponificación de los lípidos presentes en el grano e interactúa con las proteínas que se encuentran alrededor de los gránulos de almidón (Rooney et al., 1999; Reed, 2001).

Khan et al. (1982) compararon dos métodos de nixtamalización: el tradicional o artesanal y el método comercial o industrial. No obstante que el método artesanal generó mayor pérdida de materia seca, se elaboraron las mejores tortillas en lo que se refiere a textura, sabor, color y aceptabilidad. El procedimiento de cocción bajo presión utilizado en el método comercial produce una masa pegajosa y tortillas de aspecto desagradable (FAO, 1993). En el proceso de nixtamalización comercial, el grano de maíz es cocido por un sistema de inyección en la presencia de $Ca(OH)_2$, el maíz cocido es lavado para remover el exceso de cal y tierra con un molino de martillo, evitando con ello la etapa de reposo. En otros procesos industriales el grano de maíz es sometido a una etapa de cocción por 30-50 min aproximadamente, seguido de un remojo por 60-120 min y por último, el maíz cocido y remojado se lava, por lo que la etapa de reposo es más corta comparada con la que se emplea en el proceso de nixtamalización tradicional (Bressani et al., 1997; Gutiérrez et al., 2007; Rojas et al., 2009). Aunque en la nixtamalización comercial se emplea básicamente los mismos pasos que el proceso artesanal, el granulado obtenido se somete a dos operaciones unitarias adicionales como el secado y la molienda, lo que genera como producto principal una harina nixtamalizada, la cual se puede convertir en otros productos nixtamalizados, mientras que en la nixtamalización tradicional se obtiene como producto principal la masa nixtamalizada, la diferencia más importante entre estos dos productos es el porcentaje de humedad en harina aproximadamente es del 38

% y en la masa este valor es del 46 %. Sin embargo, las condiciones de proceso varían y esto afecta la calidad de los productos finales, por lo que se obtienen tortillas con diferente textura y sabor (Bello-Pérez et al., 2002; Rodríguez et al., 2008).

Por su parte, Bressani et al. (2004) demostraron que el tiempo de reposo tiene un efecto significativo en el incremento del contenido de calcio en el grano de maíz nixtamalizado. Así mismo, Rojas et al. (2009) reportaron que el contenido de calcio de harina de maíz obtenida del proceso de nixtamalización tradicional incrementa con el tiempo de reposo y la temperatura de cocción.

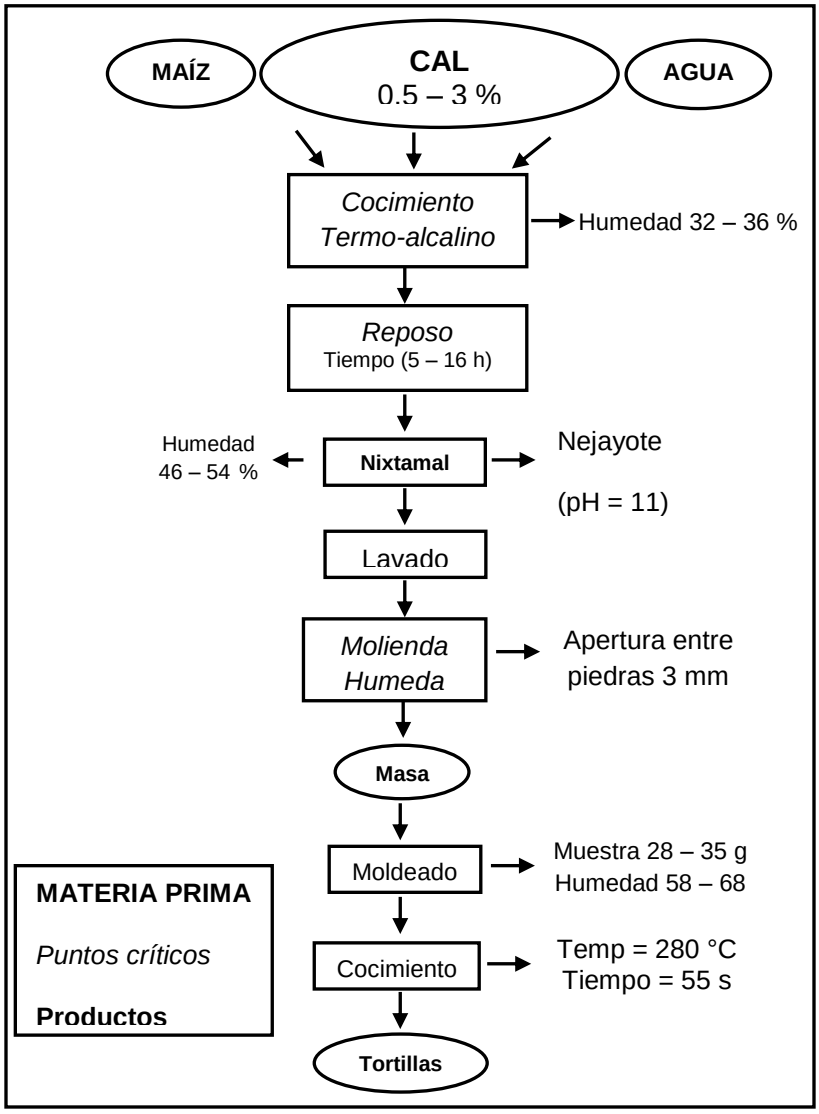


Figura 4. Proceso tradicional de nixtamalización.

2.6.1 Producción de harinas instantáneas de maíz nixtamalizado

En México en el año de 1949 se desarrolló el proceso para la elaboración de harinas de maíz, con la finalidad de prolongar la vida de anaquel de la masa como subproducto del proceso de nixtamalización. A inicios del siglo XXI, se destaca un 47.5 % más de consumo de tortillas elaboradas con harina nixtamalizada por el método comercial, esto es porque se reducen labores intensivas y tediosas del proceso de fabricación de la masa (cocimiento, reposo, molienda) del método tradicional; el producto se presume, es más homogéneo, existe un mejor control higiénico durante su elaboración, lo que permite aumentar su vida de anaquel (Gómez-Aldapa et al., 1996). Sin embargo, su principal desventaja es que contienen menos del 50 % de calcio que una harina nixtamalizada producida por el proceso artesanal. Lo anterior, debido a la remoción intencional del pericarpio en la etapa de lavado del proceso de nixtamalización comercial (Rodríguez et al., 2008; Rojas et al., 2009).

Po el contrario en Suramérica, especialmente en Colombia y Venezuela, el grano de maíz utilizado para preparar arepas, empanadas y pasabocas, no es sometido a un proceso de nixtamalización. El grano de maíz utilizado para preparar las arepas es fraccionado por un procedimiento mecánico que elimina intencionalmente el pericarpio y la mayor parte del germen, este producto es conocido como maíz trillado. Las harinas obtenidas de maíz trillado tienen menor contenido de fibra y grasa, por esta razón son enriquecidas para mejorar su valor nutrimental (Cuevas et al., 1985; Pineda-Gómez et al., 2012a).

2.6.2 Difusión de Calcio

Se pudo demostrar que la difusión de calcio se inicia con el pericarpio, seguido por el germen y por último en el endospermo (Reed, 2001). Por el contrario Gutiérrez et al. (2007) señalaron que la difusión de calcio ocurre de manera quasi-simultánea en el pericarpio, endospermo y germen. Fernández-Muñoz et al. (2004) reportaron que el contenido de calcio en las harinas integrales de maíz, pericarpio, endospermo y germen no mantiene una relación directamente proporcional con el tiempo de reposo. Esto es debido a que la difusión del ión calcio es un proceso no lineal, lo cual obedece a la morfología del grano. El grano

es un sistema de multicapas (pericarpio, endospermo, germen) y estas capas exhiben diferentes propiedades fisicoquímicas. La solución alcalina promueve los cambios fisicoquímicos en la estructura del pericarpio, permitiendo la entrada directa de $Ca(OH)_2$ y agua al interior del endospermo y germen a través de la piloriza (Gutiérrez et al., 2007).

El germen es la segunda parte anatómica del maíz, después del pericarpio, que presenta una mayor absorción y retención de calcio al ser sometido al proceso de nixtamalización tradicional (Fernández-Muñoz et al., 2004; Gutiérrez et al., 2007). Esto es ocasionado por la presencia de células tubulares en el pericarpio que tienen la función de distribuir y conducir el agua-calcio en el grano. Después y durante el proceso de nixtamalización en el que se produce una saturación de calcio, las células tubulares pueden distribuir el exceso de calcio del germen hacia el pericarpio y endospermo (Serna, 1996).

2.6.3 El proceso de nixtamalización como estrategia para incrementar la ingesta de calcio en la dieta

El maíz junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los animales y los seres humanos, pero el contenido de calcio está por debajo de los requerimientos de la nutrición humana, ya que el aporte de calcio de los cereales equivale a un 45 % del valor de la leche (Reed, 2001). La leche y sus derivados son la principal fuente de calcio en la dieta de los seres humanos. Los lácteos tienen la ventaja adicional de ser buena fuente de proteína y otros micronutrientes, que son importantes para la salud ósea y la salud en general (IOF, 2006).

En los países en desarrollo, como México, la ingesta de calcio de productos lácteos es limitada, debido principalmente a su alto costo. Por el contrario, el consumo de habas, maíz y vegetales como nopal es más frecuente y menos costoso. La eficiencia de la absorción de calcio a partir de fuentes vegetales es similar a la de los productos lácteos. Todo depende de la concentración de los inhibidores de calcio tales como el ácido oxálico, ácido fítico o fibra dietética (Aguilera et al., 2013). De acuerdo a un estudio hecho por Spencer

et al. (1988) el alto contenido de fosforo en la dieta mexicana tiene un efecto negativo en el depósito de calcio en el hueso.

Si bien el proceso de nixtamalización eleva los niveles de calcio en la dieta diaria, este proceso no fija suficiente calcio para alcanzar la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de este mineral para adultos que es de 1000 mg; razón por la cual los productos de maíz nixtamalizados no pueden constituir la única fuente de calcio en la dieta (Reed, 2001). El contenido de calcio en el grano de maíz nixtamalizado es mayor cuando se incrementa la temperatura de proceso y el tiempo de reposo; sin embargo, es importante señalar que el aumento en la concentración de calcio en el grano no es directamente proporcional al tiempo de reposo, ya que a tiempos de reposo prolongados ocurre una disminución en el contenido de calcio del maíz nixtamalizado debido a pérdida de materia seca, la cual se asocia con la solubilización del pericarpio en el nejayote (Gutiérrez et al., 2007; Rojas et al., 2009).

2.7 Transformaciones estructurales y morfológicas del maíz durante la nixtamalización

El grano de maíz en su estado nativo tiene características morfológicas y estructurales que lo identifican, las cuales se modifican cuando el maíz es sometido a un tratamiento termo-alcalino y varían dependiendo de las variables de proceso que se utilicen. Estos cambios físicos y químicos conllevan efectos notorios en las aplicaciones de las harinas nixtamalizadas dependiendo de los productos que se quieran obtener.

2.7.1 Cambios morfológicos

Por medio de imágenes morfológicas obtenidas por SEM (Scanning Electron Microscopy), Gutiérrez et al. (2007) identificaron la presencia de calcio por la apariencia de áreas blancas en el endospermo y pericarpio sometido a diferentes temperaturas y tiempos de reposo. Así mismo, se comprobó la presencia de microporos en el pericarpio lo cual confirma que el grano de maíz sufre un proceso de percolación durante el proceso de nixtamalización lo que permite la entrada de calcio y agua al interior del grano. Watson (2003) describió

la morfología del grano de maíz, diferenció las partes que componen el germen, embrión y escutelo y los subcomponentes de estas. En el embrión se identificó el mesocotil una región de paquetes vasculares longitudinales de 10 µm que unen al embrión y escutelo y el coleoptilo (Cp) de forma alargada. En el escutelo (Figura 5) se pueden identificar diferentes tejidos que lo componen. El epitelio (EL) es la capa de células que limita con el endospermo duro, la parénquima son células cilíndricas cortas con paredes delgadas que contienen muchos orificios y espacios intercelulares que facilitan el movimiento de material entre células y está compuesto por células que contienen núcleo, citoplasma, algunos gránulos de almidón y algunos cuerpos grasos (CG) que contienen aceite. La epidermis es una capa de células que rodean la cavidad embrionaria (Watson, 2003).

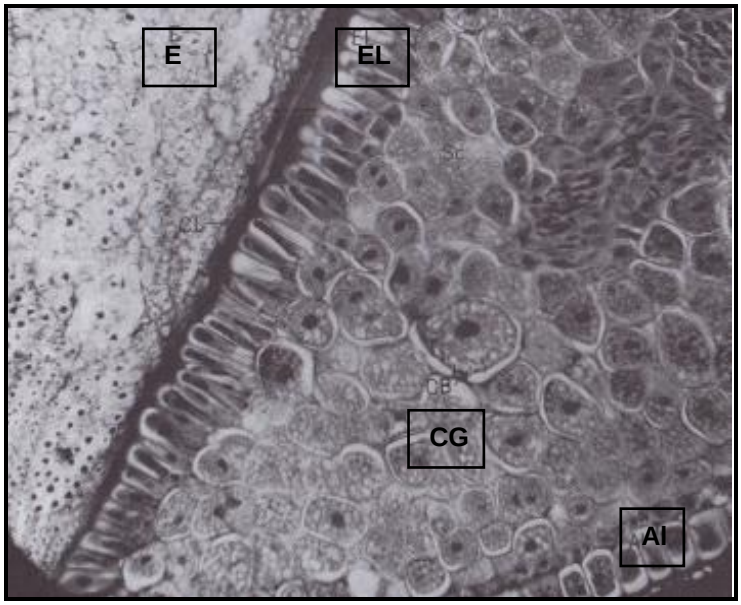


Figura 5. Micrografía de la estructura del escutelo del germen del grano maíz. Se muestra la presencia de la aleurona (Al), cuerpos grasos (CG), la capa epitelial (EL) y el endospermo (E) (Watson, 2003).

2.7.2 Cambios estructurales

La técnica de difracción de Rayos X ya ha sido utilizada para estudiar las transformaciones estructurales en el grano de maíz nixtamalizado. Reed (2001) utilizó esta herramienta para analizar el empaquetamiento de las sales de calcio de los ácidos grasos presentes en el germen dentro de una red cristalina y poder

explicar el comportamiento térmico de la estructura sólida, ya que esto tiene gran influencia en la digestibilidad de alimentos debido a la presencia de sales de ácidos grasos. En otro estudio realizado por Gutiérrez et al. (2007) evidenciaron la presencia de calcio en el endospermo del grano de maíz con alta calidad proteínica (QPM), en donde se identificó la estructura cristalina de carbonato de calcio.

2.8 Transformaciones fisicoquímicas del maíz durante la nixtamalización

Las características fisicoquímicas de las harinas nixtamalizadas son criterios importantes que deben de tomarse en cuenta para la elaboración de productos nixtamalizados como la tortilla y sus derivados. Algunos de los criterios empleados para describir las propiedades fisicoquímicas de las harinas son el tamaño de partícula, el perfil de viscosidad aparente, así como las transformaciones químicas que experimentan algunos componentes de las harinas; los cuales son considerados como parámetros para el control de calidad de los productos finales (Fernández-Muñoz et al., 2011).

2.8.1 Perfiles de viscosidad aparente

La viscosidad es la fuerza que se le aplica a un material (fluido) para cambiar su estado original, cuando esta fuerza es proporcional al cambio que se genera en el fluido se conoce como fluidos newtonianos, por ejemplo la miel, cuando esta fuerza no es lineal a la deformación generada se refiere a fluidos no newtonianos donde el ejemplo más claro es una solución de agua con almidón. Cuando se habla de viscosidad real se hace referencia a un sistema donde hay condiciones normales y constantes, contrario a la viscosidad aparente donde se tienen en cuenta ciertas condiciones como la agitación, temperatura, etc (Malkin, 1994). En este sentido, Fernández-Muñoz et al. (2011) señalan que el perfil de viscosidad puede ser considerado como un reflejo de los cambios que se producen en los gránulos de almidón durante la gelatinización. Así mismo, Acosta-Osorio et al. (2011) mencionan que la viscosidad aparente está dada por una suspensión acuosa de almidón durante agitación, donde está involucrada la influencia de la relación almidón-agua y el área superficial del almidón que está en contacto con el agua. Adicionalmente, estos autores consideran que el fenómeno

responsable del desarrollo de la viscosidad es la gelatinización definida como una propiedad del almidón muy importante, porque indica los cambios o transiciones que sufre la estructura cristalina y la funcionalidad del almidón.

En el perfil de viscosidad se observa un hinchamiento del almidón a medida que aumenta la temperatura, lo que conduce a una transferencia de agua en la suspensión de agua asociada con los componentes del almidón, amilosa y amilopectina. Una vez que se alcanza una temperatura entre 60-70 °C disminuye la organización molecular de los gránulos de almidón y se pierde la estructura cristalina del almidón. Este este proceso permite un incremento en la viscosidad aparente y la solubilidad del almidón (Bertonili, 2010). Cornejo-Villegas et al. (2013) describe el perfil de viscosidad de harinas de maíz para diferentes tamaños de partícula. En la Figura 6 se identifica la región 1 que indica la absorción de agua de los gránulos más pequeños de almidón, la región 2 corresponde a la gelatinización del almidón, en la región 3 se localiza el pico de viscosidad está caracterizado por un incremento en la viscosidad aparente, en la región 4 la viscosidad aparente disminuye y la temperatura permanece constante, esto indica un estado de desorden en el almidón debido a la liberación de moléculas de amilosa hacia el exterior del gránulo de almidón. Por último, en la región 5 se observa nuevamente un incremento en la viscosidad como consecuencia de un proceso de enfriamiento y un posible proceso de retrogradación del almidón.

La viscosidad aparente para una harina de maíz nixtamalizado puede depender de varios factores: Las partículas de tamaño más grueso resultan en un pico de viscosidad más bajo, que se atribuye a que dichas partículas tienen una capacidad muy limitada para absorber agua (Palacios-Fonseca et al., 2009); es decir, a medida que el tamaño de partícula de la harina nixtamalizada (cúmulos de almidón) disminuye, se incrementa el pico de viscosidad porque hay más absorción de agua (Fernández-Muñoz et al., 2011). Por otra parte, el tiempo de reposo tiene una relación lineal con el aumento en el pico de viscosidad para todos los tamaños de partícula hasta las 7 horas de reposo (Cornejo-Villegas et al., 2013).

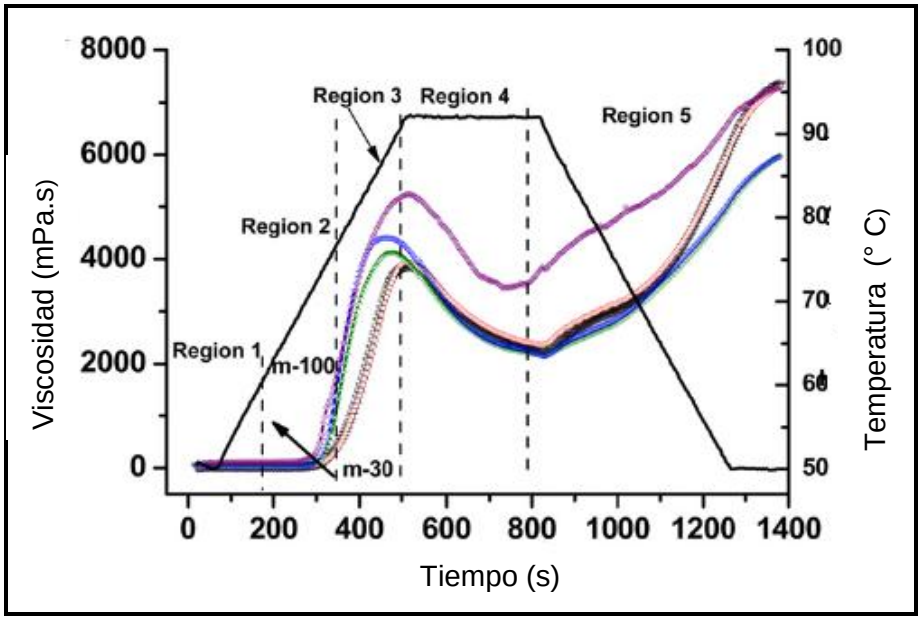


Figura 6. Perfil de viscosidad (Cornejo-Villegas et al., 2013).

2.8.2 Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula define la granulometría de agregados o conglomerados. Este parámetro se utiliza para conocer la homogeneidad o polidispersión de las partículas presentes en una muestra, por lo que es una propiedad intrínseca y es un criterio importante para la aplicación de las harinas de maíz (Gómez et al., 1991). Se ha sugerido que las partículas pequeñas son responsables de la absorción de agua, cohesión, plasticidad, rolabilidad, suavidad de la masa y textura de las tortillas (Montemayor et al., 1983).

Se ha reportado que el tamaño de partícula además de influir en la textura de los productos nixtamalizados, tiene un efecto importante en el contenido de calcio y en los perfiles de viscosidad aparente de las harinas de maíz nixtamalizado, lo cual se ve reflejado en la calidad nutrimental de la tortilla. Estos dos parámetros se ven afectados con el tiempo de reposo y contenido de humedad (Cornejo-Villegas et al., 2013). La proporción en la que se encuentran las partículas de diferente tamaño en las harinas determinan la aplicación y funcionalidad de los alimentos que se elaboran con dichas harinas (Sahai et al., 2001).

Para determinar el tamaño de partícula o rendimiento de las harinas utilizadas en la elaboración de productos nixtamalizados, se aplica la norma NMX-F-046-S-1980, la cual establece que por lo menos el 75 % del material debe pasar por el tamiz 60 USA. El procedimiento consiste en un tamizado, que separa mezclas con partículas de diferente tamaño por una serie de tamices o mallas, de tal forma que las partículas atraviesen por los orificios de la malla y las de mayor tamaño quedan retenidas en las mallas iniciales. Mediante una gráfica diferencial se obtiene la distribución de tamaño, donde se gráfica: *Xi vs Dpi* (Figura 7a). También se puede interpretar el rendimiento de las harinas de maíz mediante una gráfica acumulativa, donde se tienen en cuenta los valores de fracción en masa acumulada (*FMTA)* y fracción en masa retenida acumulada que atraviesa la malla *(FMPR) versus* la abertura de cada malla (Figura 7b).

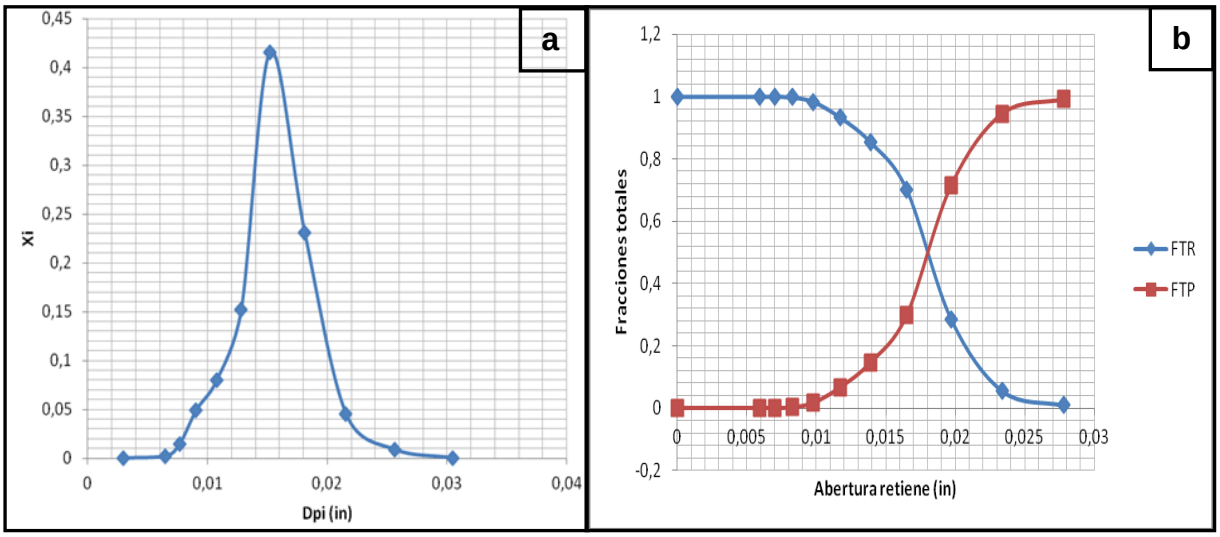


Figura 7. Distribución de tamaño de partícula. a) gráfica diferencial de harina de maíz nixtamalizado. b) gráfica acumulativa de harinas de maíz nixtamalizado

2.8.3 Índice de peróxido e Índice de saponificación

Los métodos más comunes empleados para evaluar el grado de deterioro o descomposición en un aceite son el índice de saponificación (IS) y el índice de peróxido (IP) (Yahuaca-Juárez et al., 2013). El aceite no es un producto estable y cuando es sometido al proceso de nixtamalización se generan factores responsables de su baja estabilidad como la luz, oxígeno, temperatura, contenido

de ácidos grasos insaturados, metales y presencia o ausencia de antioxidantes (Martínez-Flores et al*.,* 2006).

De acuerdo con la norma NMX-F-154-SCFI 2005 el índice de peróxido permite conocer el grado de oxidación de un aceite, proporciona información de un fenómeno que sufren los ácidos grasos bien conocido como rancidez, el cual puede ser producido por una auto-oxidación de ácidos grasos (Knothe y Dunn, 2003 y Yahuaca-Juárez et al., 2013a). Este proceso consiste en tres etapas fundamentales. La etapa 1 involucra la formación de radicales libres (lípido radical) que pueden originarse por la presencia de un ácido graso insaturado y especies reactivas de oxigeno (-OH), 2). La etapa 2 se denomina de propagación y se refiere cuando radical de un ácido graso (molécula muy inestable) reacciona fácilmente con oxígeno molecular para formar radicales hidroperóxidos, los cuales pueden reaccionar con otros ácidos grasos produciendo un radical de ácido graso diferente (reacción en cadena) y peróxidos o hidroperóxidos que marca el inicio de la siguiente etapa. La etapa 3 o de terminación en donde los productos primarios de la oxidación (hidroperóxidos y peróxidos) se degradan en aldehídos, cetonas, ácidos, lactonas y alcoholes que son considerados los productos secundarios de la reacción (Figura 8). El índice de peróxido es importante en para evaluar los productos primarios de la oxidación de los lípidos (Porter et al., 1995; Lam y Proctor, 2003; Yahuaca-Juárez et al*.,* 2013a).

La norma NMX-F-174-SCFI 2006 establece el método para determinar el índice de saponificación de un aceite o grasa, el cual permite conocer la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la muestra. La Norma Mexicana NMX-F-030-SCFI 1985 menciona las especificaciones físicas y químicas que debe de cumplir un aceite comestible puro de maíz, en el que se encuentra el índice de saponificación (mg KOH/g) con un intervalo de 187-197. En el Cuadro 8 se indican las características físico-químicas de referencia para aceite vegetal comestible.

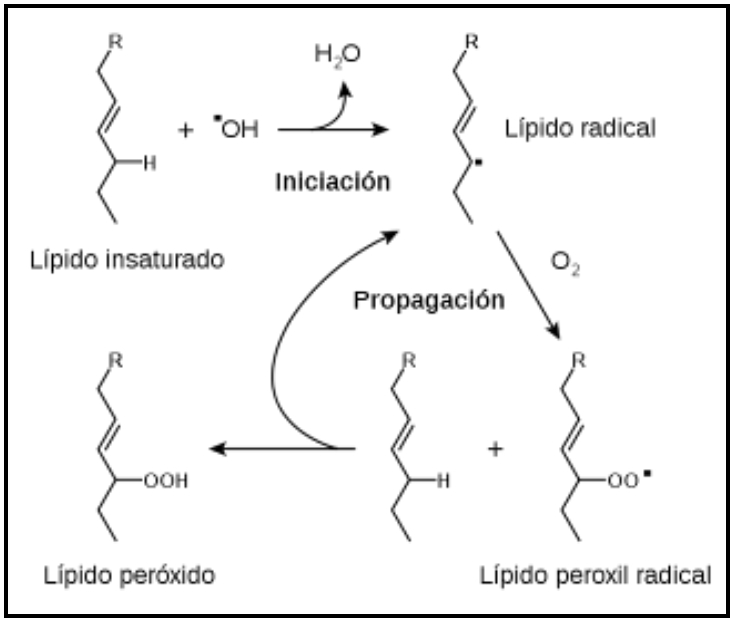


Figura 8. Mecanismo de Peroxidación lipídica

Cuadro 8. Características físico-químicas del aceite de maíz.

Parámetro	Mínimo	Máximo	Método de prueba
Estabilidad (horas OSI a 110°C)	5	---	NMX-F-017-SCFI-2005
Ácidos grasos *trans* %	---	3.5	NMX-F-089-SCFI-2008
Humedad y materia volátil %	---	0.05	NMX-F-211-SCFI-2006
Índice de Peróxido meq/kg	**----**	**2.0**	NMX-F-154-SCFI-2005
Ácidos grasos libres como ácido oleico %	---	0.05	NMX-F-101-SCFI-2006
Índice de Yodo g I_2/ 100g	107	135	NMX-F-152-SCFI-2011

Fuente: Norma Mexicana NMX-F-223-SCFI 2011

2.9 Transformaciones nutrimentales del grano de maíz durante la nixtamalización

Como se mencionó anteriormente en el Cuadro 2 el germen es la estructura anatómica encargada de contener el 34% de ácidos grasos del grano de maíz, la composición del aceite de maíz tiene un gran valor nutrimental ya que contiene los tres ácidos grasos esenciales en la dieta del ser humano (Williams,

2000). La formación de sales de estos ácidos grasos durante el proceso de nixtamalización tiene efectos negativos en la disponibilidad de los ácidos grasos en el organismo humano (Reed, 2001).

El contenido de calcio en los productos nixtamalizados es importante desde el punto de vista nutrimental, debido a la importancia del calcio en la dieta humana (Cornejo-Villegas et al., 2010)

2.9.1 Contenido de ácidos grasos

Los trabajos relacionados con las modificaciones que experimentan los ácidos grasos del germen del maíz nixtamalizado son muy limitados, entre éstos se puede citar el trabajo realizado por Martínez-Bustos et al. (2001), quienes encontraron diferencias en el contenido de ácidos grasos entre el germen crudo y nixtamalizado con 1.5 g kg^{-1} de cal y 15 horas de reposo. El porcentaje de ácidos grasos disminuyó de la siguiente manera: en el ácido mirístico fue entre 0.08 y 0.05, en el ácido palmítico fue de 15.95 a 14.62, en el ácido esteárico desde 3.04 hasta a 2.65, en el ácido oleico de 36.6 a 33.722. Sin embargo, se presentó un incremento en el ácido linoleico y ácido linolénico de 43.5 a 47.28 y 0.92 a 0.96 respectivamente. La disminución del contenido de ácidos grasos para germen nixtamalizado es atribuido a la liberación de estos durante la etapa de cocción y reposo, combinado con la probabilidad de interacción entre el hidróxido de calcio y los ácidos grasos, generando sales saponificables de estos ácidos grasos lo que dificulta su extracción. Los autores anteriormente señalados no estudiaron las variaciones en el perfil de los ácidos grasos del germen nixtamalizado a otras condiciones de proceso.

El análisis del perfil de acidos grasos de un aceite se realiza por cromatografía de gases. La Norma Mexicana NMX-F-017-SCFI-2005 establece el método para determinar la composición de ácidos grasos en un aceite de origen vegetal. Este método se aplica a los ésteres metílicos de ácidos grasos que tengan de 8 a 24 átomos de carbono y que provengan de aceites vegetales. Esta Norma Mexicana no es aplicable a ácidos grasos oxidados, polimerizados o epoxidados.

2.9.2 Contenido de calcio

Gutiérrez et al. (2007) demostraron que el germen es la segunda estructura del grano (la primera es el pericarpio) que fija mayor contenido de calcio durante la nixtamalización. Así mismo, estos autores mencionan que el contenido de calcio retenido en el grano nixtamalizado es mayor a tiempos prolongados de reposo y a mayores temperaturas empleadas durante el proceso. Es importante destacar que las harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional contienen un mayor contenido de calcio comparadas con las harinas de maíz nixtamalizado comerciales. Esto es de gran importancia desde el punto de vista nutrimental, especialmente en México, ya que los productos nixtamalizados como la tortilla constituyen la principal fuente de calcio para la población en general (Rojas et al., 2009).

La distribución de tamaño de partícula también tiene influencia en el contenido de calcio de las harinas de maíz nixtamalizado, ya que se ha observado que las partículas de menor tamaño tienen un mayor contenido de este mineral (Palacios-Fonseca et al., 2009).

2.10 Contaminación de maíz por aflatoxinas

Desde 1920 se ha reportado la contaminación de maíz por el hongo *Aspergillus*, pero sólo hasta 1970 se considera un problema grave (Payne, 1983).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, más conocida como FAO expone que aproximadamente el 25 % de los cereales producidos en el mundo están contaminados con micotoxinas, de acuerdo a la información presentada en el Cuadro 9, el sistema de alerta rápida para los alimentos y semillas (RASFF) realizó un reporte anual en el 2012 en el cual informa que la mayor cantidad de notificaciones de alerta por micotoxinas es por las aflatoxinas (Marin et al., 2013).

Cuadro 9. Notificación de micotoxinas en UE 2008-2012.

Micotoxinas	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Aflatoxinas	902	638	649	585	484	3258
Deoxinivalenol (DON)	4	3	2	11	4	24
Fumonisinas	2	1	3	4	4	14
Ocratoxina A	20	27	34	35	32	148
Patulina	3					3
Zearalenona	2				4	6
Total	933	669	688	635	525	3450

Fuente: RASFF, 2012

La agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) en el 2002 clasifica a las aflatoxinas como un agente cancerígeno probado, para humanos (Grupo 1) (IARC, 2012)

2.10.1 Generalidades de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, conocidos como micotoxinas (Figura 9). Estas toxinas están formadas por anillos heterocíclicos oxigenados (anillos de pentenonas y lactonas) y son producidas en pequeñas cantidades por varias especies del hongo *Aspergillus.* Las aflatoxinas, se pueden encontrar principalmente en cereales, frutos secos y especias. El maíz está frecuentemente contaminado con *A. flavus* que produce aflatoxinas B_1, B_2 y por *A. parasiticus* que produce aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 alcanzando una tasa máxima de producción en el quinto día, momento en que el hongo llega a la fase estacionaria de crecimiento. El nombre de estas cuatro aflatoxinas se debe al color de la fluorescencia que emiten bajo la luz ultravioleta. Las AF tipo B tienen fluorescencia Azul (Blue) y las de tipo G tienen una fluorescencia verde (Green). Las aflatoxinas son termo-resistentes, estables a temperaturas elevadas hasta de 260 °C la aflatoxina B_1 de cereales, llegando a 320°C la aflatoxina M_1 de los lácteos. Las aflatoxinas son inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV (Liu et al., 2006; Nakai et al., 2008; Marin et al., 2013).

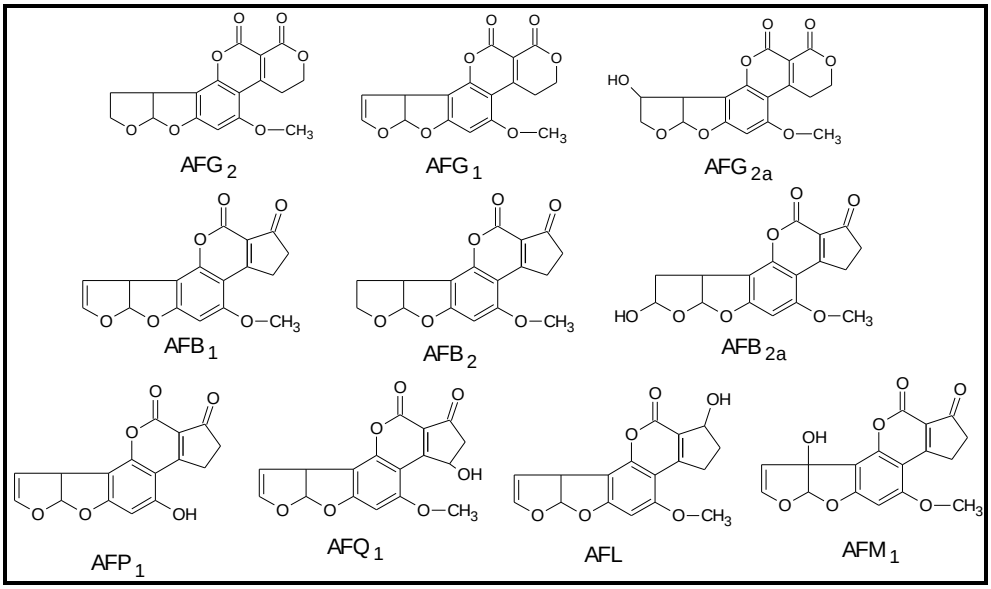


Figura 9. Estructuras de las Aflatoxinas (Steyn et al., 1980).

Algunos alimentos son sometidos a ciertos procesos físicos, los cuales pueden generar susceptibilidad en las aflatoxinas. Rustom (1997) señala que la temperatura juega un papel importante en la destrucción de las aflatoxinas. Bajo condiciones de cocción normales, las temperaturas promedio que se alcanzan están cerca a los 150 °C por lo que las aflatoxinas B_1 y G_1 no se destruyen. A pesar de esto, la reducción de estas micotoxinas también depende del grado de contaminación inicial, el tipo de Aflatoxina, el alimento en el que se encuentre, la temperatura y el tiempo de cocción. Por otro lado, el cambio de pH de ácido a básico juega un papel importante en la inactivación de las aflatoxinas a temperaturas superiores a 100 °C, donde ocurre una hidrólisis alcalina que abre el anillo de lactona seguida por una descarboxilación, lo que desencadena una pérdida de fluorescencia y poder mutágeno (Torres et al., 2001). Al igual que la temperatura, la presencia de compuestos con carga eléctrica y la humedad en los alimentos son un factor clave para la destrucción de las aflatoxinas. En alimentos con mayor porcentaje de humedad la destrucción es más sencilla. La presencia de agentes oxidantes y reductores (peróxido de hidrógeno, ozono, hipoclorito de sodio) puede modificar la estructura de las aflatoxinas ocasionando pérdida de la fluorescencia (Castillo-Urueta et al., 2011).

2.10.2 Biosíntesis y biotransformación de las aflatoxinas

Las aflatoxinas pertenecen a la familia de las dihidrofurano-cumarinas y están clasificadas en dos grupos de acuerdo a su estructura química. Las aflatoxinas B_1, B_2, B_{2a}, P_1, Q_1, L, M_1 pertenecen al grupo de las difuro-cumaro-ciclopentenonas y las aflatoxinas G_1, G_2, G_{2a} pertenecen al grupo de las difuro-cumaro-lactonas (Nakai et al., 2008).

Las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 provienen de la misma ruta biosintética (Figura 10) y son producidas naturalmente por el mismo hongo. Las aflatoxinas son compuestos policetónicos que favorecen reacciones de condensación en la ruta metabólica de los ácidos grasos (Ehrlich et al., 2002). Este proceso que consta de aproximadamente 23 reacciones de óxido-reducción, donde se inicia con la formación de una unidad iniciadora hexanoil a partir del acetato y malonil CoA, por la acción de dos genes de ácido graso sintetasa (*fas-1* y *fas-2*).

Posteriormente, esta unidad iniciadora se extiende a ácido norsolorínico (NOR), primer precursor estable, por acción de la policétido sintetasa (*pksA*). Por último, NOR sufre entre 12 y 15 transformaciones enzimáticas hasta llegar a la formación de versicolorina A y B, a partir de la versicolorina A surgen las aflatoxinas B_1 y G_1 por medio de un intermediario llamado dimetil-esterigmatocistina y por otro lado, la versicolorina B produce aflatoxinas B_2 y G_2 por medio de la dihidro-dimetil-esterigmatocistina (Sweeney y Dobson, 1999; Scherm et al., 2005).

En la Figura 10 también se puede observar que las AFB_1 y AFG_1 provienen del mismo intermediario (O-metil esterigmatocistina) y se diferencian de las aflatoxinas B_2 y G_2 que provienen de otro intermediario (Dihidro O-metil esterigmatocistina) por la presencia de una insaturación entre el C_{8-9} del furano, lo cual tiene un efecto en la toxicidad de estas AFs. Su efecto tóxico, cancerígeno y mutágeno tiene el siguiente incremento $AFB_1 > AFG_1 > AFG_2 > AFB_2$ (Castillo-Urueta et al., 2011).

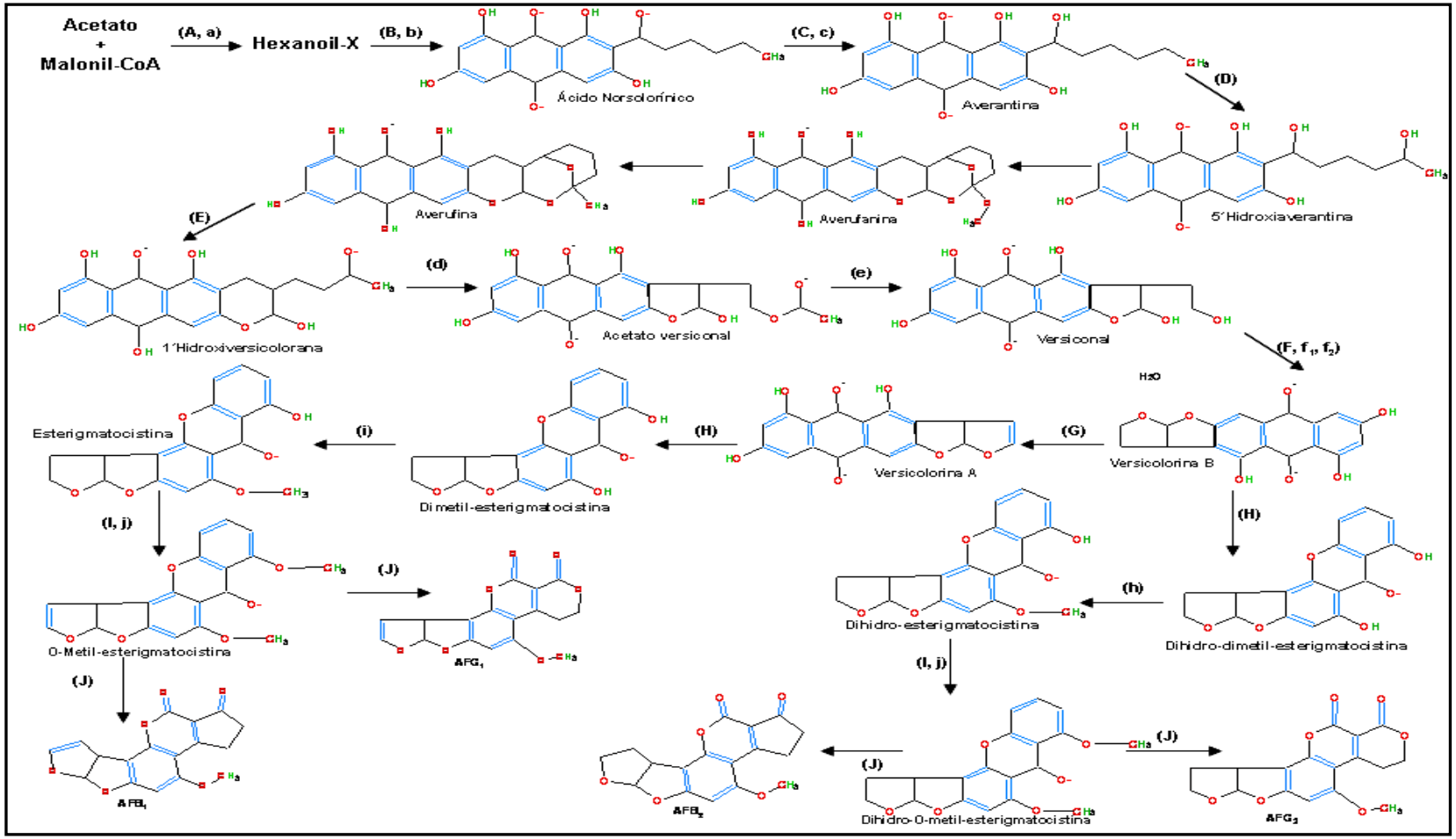


Figura 10. Ruta biosintética de las Aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999). Enzimas involucradas: (a) lipasa sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, (d) acetato hemicetal versiconal reductasa, (e) estereasa, (f_1) versicolorina B sintetasa, (f_2) versiconil ciclasa, (g) desaturasa, (h) O-metiltransferasa (MT-II), (i) O-metiltransferasa, (j) O-metiltransferasa (MT-I). Genes involucrados: (A) *fas-1A* y *fas-2A*, (B) pksA, (C) *nor1, norA*, (D) *avnA*, (E) *avfl (avflB* y *avflW),* (F) *vbs,* (G) verB, (H) *ver1A* y *aflS,* (I) *omtA* y (J) *ord1.*

Se detectó que concentraciones pequeñas de AFB_1 no producen alta toxicidad, ya que la mayoría de esta toxina se biotransforma, en el hígado de los mamíferos, en altas cantidades de metabolitos hidroxilados (AFM_1, AFM_2, AFP_1, AFQ_1 y AFL) menos tóxicos (Figura 11), debido a un proceso de desintoxicación. Las aflatoxinas no son solubles en agua y el hígado las biotransforma en hidroxilados para que sean solubles en agua y pueden ser excretados por la orina, fluídos biliares y por la leche, ayudando a bajar los altos niveles de AFB_1 y disminuir su toxicidad (Eaton y Ramsdell, 1992). Aun así, el organismo puede acumularlos y estar en peligro (Hsieh, 1983).

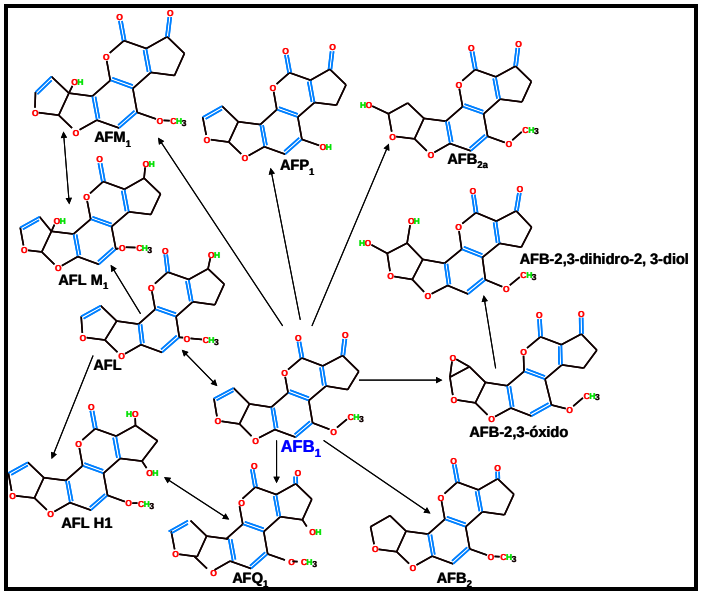


Figura 11. Ruta de biotransformación de AFB_1 (Eaton et al., 1994).

2.10.3 Colonización del hongo

La producción de aflatoxinas está asociada al estrés que sufre la planta en su etapa de desarrollo, este estrés puede estar relacionado con falta de agua, competencia con maleza, fertilidad inadecuada, sequías y plagas de insectos. La contaminación y propagación del hongo se favorece durante la pre-cosecha, pos-cosecha, y especialmente en la etapa de almacenamiento. En el deterioro físico del grano de maíz, generado por los insectos, estos abren heridas por donde

puede penetrar el hongo, y se contamina el maíz (Torres et al., 2001; Marin et al., 2013).

Como se menciona anteriormente, la planta de maíz es vulnerable a la contaminación por el hongo en su etapa de desarrollo. Payne et al. (1988) y Dolezal et al. (2014) describen la colonización del estigma y continúa por medio de canales hacia el interior del grano, esto puede llevar mínimo 8 días. Ritchie et al. (1997) citan que la planta puede ser atacada por el hongo en sus seis etapas de desarrollo: emisión de estigmas (R1), ampolla (R2), leche (R3), masa (R4), diente (R5) y maduración fisiológica (R6). Anderson et al. (1975) observaron que la infección por *A. flavus* en granos lesionados por insectos se observa en la etapa R3. Payne et al. (1988) determinaron que en granos no lesionados la acumulación de aflatoxinas es en la etapa R5. Por último Reese et al. (2011) inocularon granos en etapas R2-R5 e identificaron susceptibilidad a la infección por *A.flavus* (Dolezal et al., 2014).

La colonización dentro del grano inicia en la cofia o tip cap, seguido por el embrión y escutelo del germen, por último, se distribuye en el endospermo y pericarpio por medio de células o canales tubulares, de igual manera las aflatoxinas puede crecer directamente en el pericarpio y endospermo (Payne, 1983). Del mismo, Keller et al. (1994) hacen referencia que *A. flavus* y *parasiticus* coloniza tejidos ricos en aceite, desde el embrión hacia el endospermo. Por otro lado se menciona que el endospermo, tejido rico en almidón, permite el crecimiento y la propagación de *A. flavus* en el grano, pero no es el tejido preferido por el huésped, ya que se detectó la presencia de *A. flavus* en el germen después de 72 h de inoculación con el hongo (Dolezal et al., 2013). Pese a las discrepancias sobre la colonización del grano de maíz Dolezal et al. (2014) confirmaron que la *A. flavus* coloniza el endospermo duro (Figura 12e), el cual una vez deteriorado es sustituido por el endospermo harinoso. En general, la consistencia del almidón es diferente, lo que afecta la apariencia física del grano infectado comparado con granos no infectados. También se puede observar cómo cambia notablemente la apariencia del germen tornándose descolorido y arrugado (Figura 12).

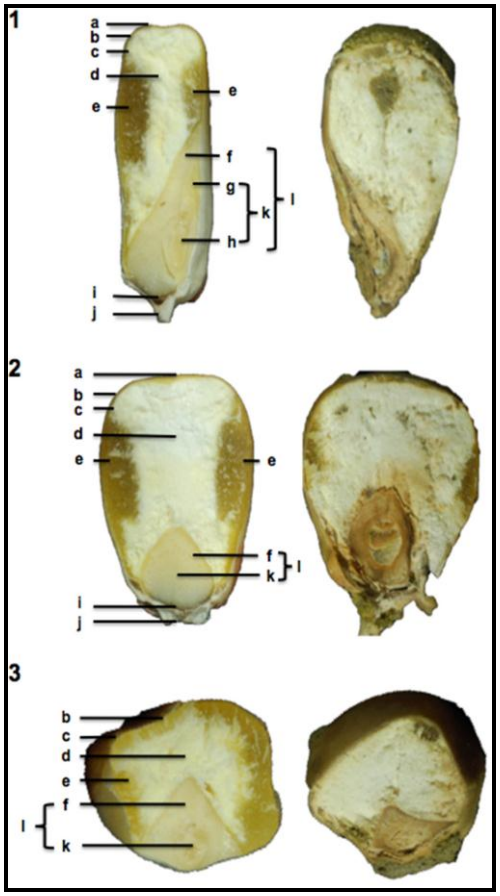


Figura 12. Granos de maíz infectados naturalmente con *Aspergillus flavus* (Dolezal et al., 2014) Partes del grano: a. corona, b. pericarpio, c. aleurona, d. endospermo harinoso, e. endospermo duro, f. escutelo, g. plumilla, h. raíz primaria, i. células de transferencia, j. pedicelo, k. embrión y l. germen.

2.10.4 Como actúan las AFs en el ser humano

La ingesta de alimentos contaminados con aflatoxinas produce una enfermedad en animales y humanos llamada aflatoxicosis. Esta puede desencadenar efectos crónicos por ingerir niveles bajos (ng kg^{-1}) a moderados de AFs (µg kg^{-1}), los cuales se manifiestan en baja absorción de nutrientes, crecimiento lento, baja respuesta a vacunas, inmunodepresión, cáncer y problemas renales. También puede producir efectos agudos al ingerir niveles medios (µg kg^{-1}) a altos de aflatoxinas (mg kg^{-1}) y sus síntomas son hemorragias, diarreas, daños al hígado, abortos, edema, alteración en la digestión, en el metabolismo de los alimentos, y en ocasiones la muerte (Bennett y Klich, 2003; Castillo-Urueta et al., 2011). Los estudios epidemiológicos muestran que el

hepatocarcinoma (HCC) comúnmente se origina junto con la cirrosis y que hay una interacción sinérgica entre la hepatitis B y la AFB_1 para el desarrollo del HCC (McKillop et al., 2006). Williams y Wilson. (1999) mencionaron que hay un aumento de cáncer y de hepatocarcinomas en regiones donde aumentó la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolizadas por enzimas hepáticas como el citocromo P450, las isoformas involucradas en este proceso son CYP3A4, 3A5 y 1A2, las cuales transforman a la AFB_1 a su forma activa AFB_1-8,9-exo-epóxido y 8,9-endo-epóxido. La AFB_1-8,9-exo-epóxido reacciona con el ADN formando el aducto 8,9-dihydro-8-(N_7-guanil)-9-hidroxi AFB_1 (AFB_1-N_7-Gua).Eeste aducto se elimina en fluidos humanos y deja un sitio apurínico, el cual puede producir una mutación por interaccionar con otro nucleótido. El aducto estable AFB_1-formamidoporimidina (AFB_1-FAPY), se forma por la apertura del anillo de imidazol de la guanina. (Figura 13) (Woo et al., 2011; Marin et al., 2013).

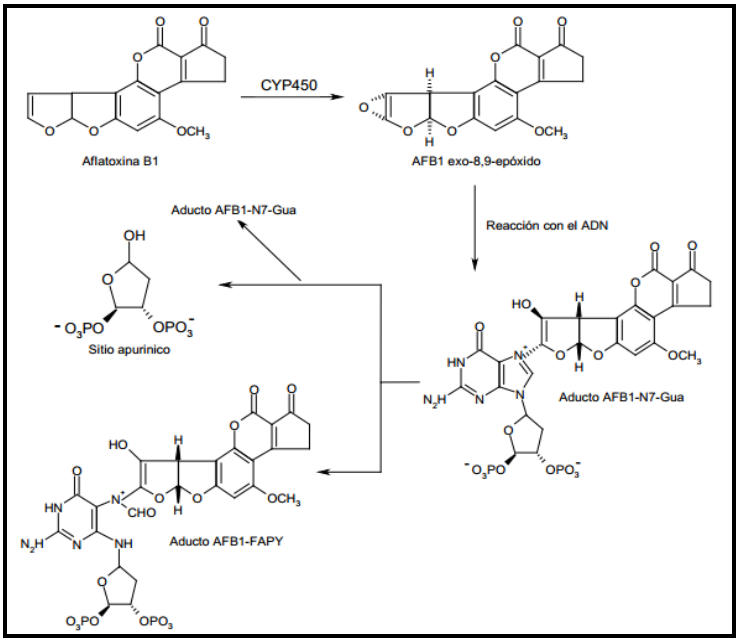


Figura 13. Ruta de activación metabólica de las AFB_1 (Smela et al., 2001).

Woo et al. (2011) observaron una transversión característica G:C a T:A en el codón 249 del gen p53 inducida por el aducto AFB_1-DNA en pacientes con HCC, determinando al aducto AFB_1-DNA como un biomarcador de riesgo de HCC

por exposición a aflatoxinas. Igualmente se demostró que el aducto AFB_1-FAPY es un potente bloqueador de la replicación del ADN, e induce hasta seis veces más la transversión G:C a T:A (AG**G**C → AG**T**C) lo cual explica parcialmente la mutagenicidad inducida por la AFB_1 (Smela et al., 2002).

Los aductos AFB_1-DNA pueden ser disminuidos por la acción catalítica de la Glutatión-S-transferasa (GST) por medio de un ataque nucleofílico del grupo S-H del glutatión sobre metabolitos electrofílicos (AFB_1) o derivados xenobióticos y endógenos. Esto da lugar a la formación de conjugados AFB_1-Glutatión, lo cual aumenta la solubilidad de la aflatoxina permitiendo rápidamente su excreción (Figura 15). Del mismo modo, la acción de la GST protege al ADN o evita la formación del aducto AFB_1-DNA (Woo et al., 2011; Gross-Steinmeyer et al., 2012).

2.10.5 Importancia de la nixtamalización en el control de AFs

El maíz está frecuentemente contaminado con aflatoxinas que son transferidas directamente a las tortillas (Castillo-Urueta et al., 2011). De Arriola et al. (1988) y Torres et al. (2001) reportaron que durante la cocción alcalina del grano de maíz con CaO (1-3 %) los niveles de aflatoxinas en masa disminuyeron en 97 % y en tortillas se redujo en un 98 %.

Torres et al. (2001) estudió las etapas involucradas en la producción de tortillas y frituras de maíz por el método de nixtamalización tradicional e industrial, observando se observa que el proceso de nixtamalización tradicional es más efectivo en la reducción del contenido de aflatoxinas, debido a que involucra la ebullición del maíz en una solución alcalina y una etapa de reposo (Figura 14).

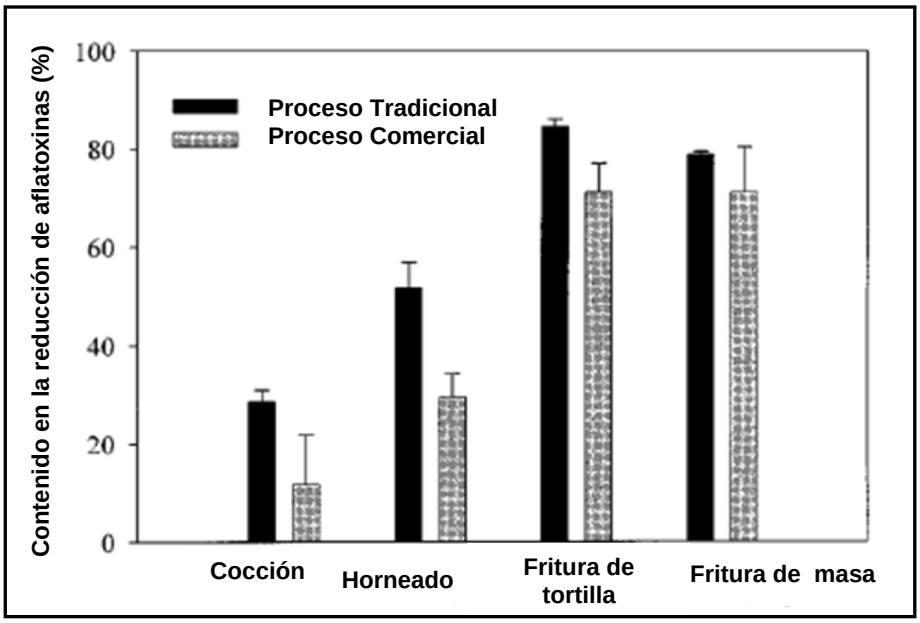


Figura 14. Contenido de aflatoxinas reducido durante las operaciones involucradas en el proceso de tortilla y frituras por el proceso tradicional e industrial (Torres et al., 2001)

Hay varios estudios contradictorios acerca de la nixtamalización como método de control de las aflatoxinas, ya que no modifican de manera permanente todas las aflatoxinas presentes en el maíz (Giddey et al., 1977; Price y Jorgensen, 1985; Torreblanca et al., 1986); Torres et al. (2001) mencionan que la conversión de la molécula de aflatoxina a su forma original en medio ácido se deberá considerar si el pH de los productos tratados no fue lo suficientemente alcalino (pH=9.5). Por otro lado, Moctezuma-Zarate. (2002) y Price y Jorgensen (1985) señalan la reactivación del efecto mutágeno de las aflatoxinas durante el pH ácido de cada una de las etapas de la digestión humana, comprobando que las aflatoxinas no son eliminadas, por lo que el riesgo de cáncer por su acumulación en el ADN es un peligro permanente. En un rango de pH 5-7.5 las aflatoxinas continúan siendo activas biológica y químicamente y en pH ácidos del fluido gástrico en el estómago (2.5 pH) y pH básicos de la nixtamalización (11 a 12) se disfraza o enmascara tanto el efecto mutágeno como la fluorescencia de las aflatoxinas (Moctezuma-Zarate, 2002). La acidificación y posterior neutralización de la masa (pH= 6-8) cierra el anillo de lactona generando la activación de la aflatoxina que recobra su fluorescencia.

De acuerdo a Torres et al. (2001), el tratamiento térmico alcalino que se le aplica al maíz durante la nixtamalización causa una hidrólisis en el anillo de lactona de la aflatoxina formando sales solubles en agua, las cuales se pierden en los lavados o se retienen en el nejayote. Moctezuma-Zarate (2002) menciona la eliminación del nejayote como una alta posibilidad de eliminación de aflatoxinas y no los cambios de pH generados por la cal utilizada en la nixtamalización. La reducción en la fluorescencia no siempre significa reducción de la toxicidad.

2.10.6 Importancia de los componentes químicos del maíz en el control de aflatoxinas

El tiempo prolongado de exposición del maíz frente al hongo patógeno *Aspergillus flavus*, ha hecho que este cereal desarrolle mecanismos de protección mediante el desarrollo de compuestos como flavonoides, monoterpenos, indoles, carotenoides, etc., con propiedades antimutágenas y anticancerígenas, estos han sido llamados elementos de interferencia (Huang et al., 1994; Namiki, 1994; Burgos-Hernández et al., 2001a) En un estudio realizado por Burgos-Hernández et al. (2001b) se evaluaron extractos de maíz, los cuales fueron fraccionados por cromatografía en capa fina (TLC), donde se midió la actividad anti-mutagénica contra AFB_1 por medio de la prueba de Ames. Así mismo, se elucidaron los posibles compuestos responsables de la anti-mutagenicidad en algunas fracciones de maíz. Se identificó al ácido linoléico como uno de los compuestos y se mencionó que uno de los mecanismos de acción del ácido linoléico es interactuar con el mutágeno (AFB_1) para evitar la disponibilidad de la AFB_1 y no generar interacción con el ADN bacterial (*Salmonella typhimurium*). El ácido linoléico tiene la capacidad de suprimir la activación metabólica *in vitro* de AFB_1 (Firozi et al., 1986). Finalmente, se ha reportado el papel de los ácidos grasos como inhibidores de la generación de superóxidos y peróxidos de hidrogeno por vía mitocondrial (Burgos-Hernández el at., 2001a).

3. JUSTIFICACIÓN

El maíz es uno de los alimentos básicos en la dieta de la población mexicana, donde la tortilla constituye la principal fuente de carbohidratos como fuente de energía, así como de lípidos, específicamente de algunos ácidos grasos esenciales como es el ácido linoleico presente en el germen del maíz. No obstante, la ingesta de maíz aún en cantidades moderadas por un tiempo prolongado se convierte en una amenaza constante debido a su contaminación con micotoxinas, lo cual puede ocurrir desde la etapa de desarrollo del grano y principalmente durante la cosecha. Las micotoxinas que representan mayor riesgo para la salud del ser humano son las aflatoxinas que se encuentran con mayor frecuencia en los cereales. Adicionalmente, se ha reportado que el grano de maíz es colonizado por el hongo *Aspergillus flavus*, ésta colonización inicia en los tejidos ricos en almidón como lo es el endospermo (Keller et al., 1994; Dolezal et al., 2013). Por otra parte se ha señalado que un tiempo prolongado de exposición del maíz al hongo *A. flavus* favorece que este cereal desarrolle mecanismos de protección mediante la síntesis de compuestos como lípidos (ácidos grasos), flavonoides, monoterpenos, indoles, etc., con propiedades antimutágenas y anticancerígenas (Burgos et al., 2001a). A este respecto, se ha reportado que el ácido linoleico tiene la capacidad de suprimir la activación metabólica *in vitro* de la aflatoxina B_1, a través de la interacción química directa de éste ácido (omega-6) con la aflatoxina (Burgos et al. 2001b).

Uno de los cambios químicos que experimenta el grano de maíz durante la nixtamalización es el incremento en su contenido de calcio, siendo el germen una de las estructuras en donde se fija una mayor cantidad de este mineral (Gutiérrez et al., 2007). La fijación del calcio en el germen durante la nixtamalización ocurre a través de la reacción de saponificación entre el $Ca(OH)_2$ y los ácidos grasos (Martínez-Flores et al., 2006). La nixtamalización del maíz con concentraciones de $Ca(OH)_2$ mayores al 1 % induce cambios en los lípidos modificando sus propiedades nutraceúticas mediante reacciones de oxidación (Yahuaca-Juárez et al,. 2013). Por otra parte, es importante destacar que la adhesividad de las harinas

de maíz nixtamalizado está determinada por diferentes parámetros como son su contenido de calcio, la composición química del grano de maíz y la distribución de tamaño de partícula. La textura y adhesividad de las harinas del maíz nixtamalizado se pueden predecir a través del perfil de viscosidad con el cual se determinan las aplicaciones y la calidad de las harinas instantáneas de maíz nixtamalizado (Fernández-Muñoz et al., 2011). Adicionalmente, se ha propuesto que la nixtamalización puede constituir una alternativa para reducir los niveles de aflatoxinas en el maíz y disminuir sus efectos adversos contra la salud (Torres et al., 2001). Sin embargo, como ya se ha señalado, este proceso provoca cambios en el aceite de maíz dando lugar a la formación de radicales libres, los cuales pueden representar un peligro potencial para la salud humana.

Acorde con la información anteriormente señalada, resulta evidente la importancia del estudio de las trasformaciones físicas, químicas y nutrimentales que experimenta el germen del maíz sometido al proceso de nixtamalización a diferentes condiciones de proceso, a fin de conservar las propiedades funcionales y reducir la contaminación por aflatoxinas de los productos a base de maíz destinado al consumo humano.

4. HIPOTESIS

Los lípidos, componentes mayoritarios del germen de maíz, experimentan transformaciones físicas y químicas en el grano de maíz nixtamalizado asociadas a la concentración de $Ca(OH)_2$ y al tiempo de reposo utilizado durante este proceso; así mismo, algunos lípidos presentes en el germen del maíz desempeñan un papel protector contra las aflatoxinas. Por lo tanto, el germen de maíz contribuirá de manera significativa en las propiedades físicas, químicas y en la reducción de los niveles de aflatoxinas en las harinas de maíz nixtamalizado.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del germen de maíz en las propiedades físicas, químicas y los niveles de aflatoxinas de harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional elaboradas a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo, a fin de identificar las condiciones de proceso para obtener harinas nixtamalizadas con las propiedades reológicas y nutrimentales apropiadas para consumo humano.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Analizar los cambios estructurales y morfológicos del germen de maíz nixtamalizado por el método tradicional modificando el tiempo de reposo y concentración de $Ca(OH)_2$, con el fin de asociarlo con el calcio fijado en el germen.

5.2.2 Analizar la viscosidad aparente y distribución de tamaño de partícula en las harinas de maíz nixtamalizado íntegro y desgerminado a diferentes condiciones de proceso, para determinar la contribución del germen en estas propiedades.

5.2.3 Determinar la concentración de calcio fijado en las harinas de maíz nixtamalizado íntegro y desgerminado con el propósito de conocer la contribución del germen en la concentración de este mineral en las harinas de maíz nixtamalizado.

5.2.4 Analizar el contenido de algunos ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico) en el aceite extraído del germen de maíz nixtamalizado a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo para identificar las condiciones de proceso en donde la pérdida de éstos ácidos grasos esenciales sea menor.

5.2.5 Determinar los índices de saponificación y peroxidación de los lípidos presentes en el germen nixtamalizado, con el propósito de identificar las

condiciones de proceso en donde éstos índices se encuentren dentro del rango permitido por la NMX-F-223-SCFI 2011.

5.2.6 Identificar y cuantificar diferentes aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 y G_2) en harinas de maíz nixtamalizado íntegro y desgerminado, a fin de determinar el efecto del germen en la concentración de dichos compuestos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación de la muestra

Se utilizó maíz híbrido PUMA (Monsanto) cosechado en el 2013. Inicialmente el grano de maíz se tamizó con una criba móvil con un tamaño de orificio de 4.0 mm para eliminar basura, productos extraños, polvo, etc. Posteriormente, se utilizó una criba de 8.0 mm para seleccionar aproximadamente 10 kg de granos maíz de tamaño homogéneo y eliminar granos picados, rotos y dañados por plaga.

6.2 Nixtamalización de maíz

El proceso de nixtamalización del maíz se realizó de acuerdo con el método descrito por Gutiérrez et al. (2007); en donde se nixtamalizaron 300 g de maíz en 600 mL de agua destilada con diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ (0, 0.7, 1.4 y 2.1 m/m) a 92 °C. Este procedimiento se realizó de manera simultánea en dos recipientes por separado dentro del mismo sistema de calentamiento bajo las mismas condiciones. Se determinó el contenido de humedad con 2 g de maíz en una termobalanza (Sartorius Mouisture Analizer MA35, Germany). La etapa de cocción se finalizó una vez que el grano de maíz alcanzó un contenido de humedad del 36 %, en este momento se apagó el sistema. Después de la etapa de cocción, el maíz se sometió a la etapa de reposo, en la cual el grano cocido se remojó durante 0, 3, 6, 9 h en el líquido de cocción. Posteriormente, el grano se lavó dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de calcio e impurezas y se drenó con ayuda de un colador por 3-4 minutos. El maíz de uno de los recipientes (300 g) se molió en un molino manual (Corona 1x 6, México) y se secó en una estufa (Quincy lab 40GC, USA) a 40 °C durante 8 h. Los 300 g de restantes se utilizaron para realizar la extracción manual del germen, el maíz sin germen se molió y se secó en una estufa a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esta metodología se desarrolló en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos del CFATA- UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) Campus Juriquilla. El equipo utilizado para nixtamalizar el grano de maíz consiste de un reservorio de cocción donde se colocan los dos recipientes en donde se

nixtamalizan dos porciones de grano de maíz (300 g cada una) de manera simultánea. El reservorio está conectado a una computadora (DELL OPTIPLEX 7010), cuyo propósito es mantener un control en la temperatura de dicho reservorio durante la etapa de cocción y registrar la temperatura durante la etapa de cocción y de reposo de las muestras, a fin de garantizar la reprodubilidad de las mismas (Figura 15).

Figura 15. Sistema computarizado para nixtamalización.

6.2.1 Separación manual de germen

Los granos de maíz lavados y drenados se secaron a temperatura ambiente durante 40 min para facilitar el desprendimiento del germen y poder separarlo del pericapio, cofia y endospermo. Finalmente, el germen aislado se secó a 35 °C en una estufa (Quincy lab 40GC, USA) durante 8 h y posteriormente fue almacenado en refrigeración hasta su análisis.

6.3 Morfología y cristalinidad del germen de maíz

Las muestras de germen nixtamalizado, cocido y crudo (GN, GC, GCr) secas y molidas se hicieron pasar por una malla 60 USA, debido al requerimiento de la técnica de Difracción de Rayos X.

6.3.1 Cambios estructurales en el germen

El estudio de difracción de rayos X se realizó de acuerdo al método reportado por Rodríguez et al. (1996). El análisis se llevó acabo con 2 g de muestra en un difractómetro de polvos modelo D 5000 marca Rigaku operando a 35 kv y 15 mA, con una radiación de CuK, con longitud de onda 1.5406 A° (Figura 16). Los datos se recolectaron de 4 a 30° a una velocidad de 0.1 s^{-1} y un tiempo de conteo por punto de 5 s. El análisis se llevó a cabo por triplicado empleando el software Difracción/AT, SOCAVIN VI.2.

Figura 16.Difractómetro de rayos X Rigaku.

6.3.2 Cambios morfológicos en el germen

Una parte del germen obtenido de los granos procesados se destinó para evaluar las transformaciones morfológicas de esta estructura. Por tal motivo se realizaron cortes longitudinales y transversales a partir del germen congelado con nitrógeno líquido para posteriormente realizar una fractura manual. El efecto del tratamiento térmico-alcalino en cada una de los componentes del germen se evaluó a través de la técnica de microscopía electrónica de barrido de alto vacío (SEM-HV).

El germen se fijó en un porta muestras de aluminio, con cinta de doble grafito, por último se realizó un recubrimiento con oro por pulverización catódica.

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido a alto vacío Marca JEOL (JSM-6060LV) (Figura 17). Las condiciones del análisis consistieron en una aceleración de electrones a 20 kV y de 12-20 Pa de presión. Las imágenes fueron obtenidas por una señal de electrones secundarios.

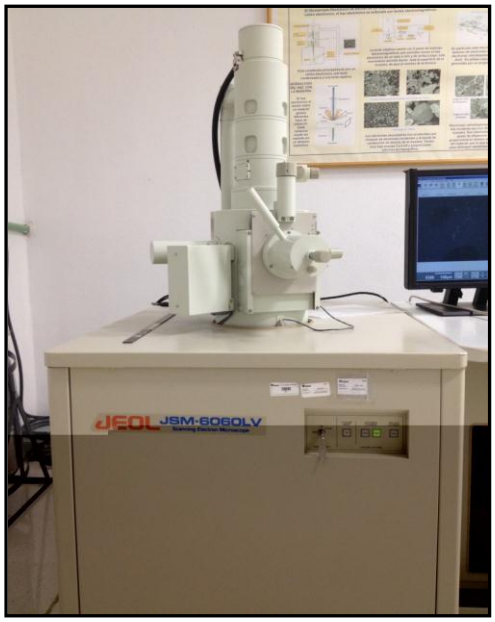


Figura 17. Microscopio electrónico de barrido de alto vacío (SEM).

6.4 Molienda y distribución de tamaño de partícula

La molienda de las muestras obtenidas de la nixtamalización se realizó en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos CFATA, UNAM Campus Juriquilla en un molino de martillos PULVEX 200 equipado con una criba de 0.8 mm (Figura 18a).

Después de obtener las harinas maíz nixtamalizado con germen (HMN) y sin germen (HMN-SG) y harinas de maíz cocidas con germen (HMC) y sin germen (HMC-SG) se prosiguió en realizar la distribución de tamaño de partícula en el laboratorio de la Unidad Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. La granulometría de agregados o conglomerados se define como el método para determinar la distribución del tamaño de partículas, se emplean tamices normalizados y numerados. Su apertura de la malla está indicada en una placa metálica soldada al tamiz. El procedimiento se realizó de acuerdo a ASAE

Standards (1995). Se seleccionó la serie de tamices USA rigurosa de acuerdo con la Norma NMX-046-S-1980 y con número de mallas: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70,80, 100 y charola. Así mismo; se utilizó un Ro-Tap (U,S. estándar Modelo KH59986-60) (Figura 18b y c). Cada una de las mallas se pesó y registró su peso incluyendo la charola. Los tamices se acomodaron en pila en orden descendente del número (Figura 18c).

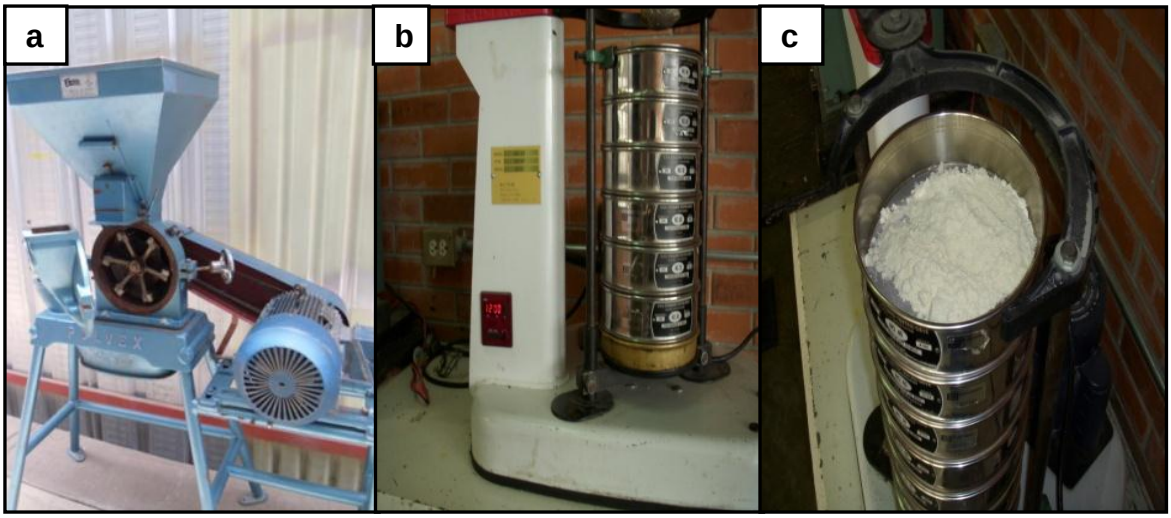


Figura 18. Instrumentación para molienda y distribución de tamaño de partícula. a) molino PULVEX 200. b) Ro-tap. c) serie de tamices USA

El procedimiento consistió en pesar 100 g de muestra y colocarlos en la parte superior del tamiz inicial (20). Posteriormente, se colocó la tapa y se acomodó en el Rotap programándose 12 min de agitación horizontal y vertical. Finalmente, se pesaron las fracciones retenidas en cada tamiz y en el plato.

Para la interpretación de los datos se tuvo en cuenta la abertura de los diámetros en pulgadas (*in*) de cada malla utilizada, la cantidad de harina retenida en cada malla y se calculó la fracción en masa (*Xi*) con la siguiente ecuación.

$$Xi = \frac{\text{Masa retenida}}{\text{Masa total}} \qquad \textbf{Ec. 1}$$

También se calculó el diámetro (*Dpi*) en cada fracción (*Xi*) y la fracción en masa acumulada (*FMRA*)

$$Dpi = \frac{\text{Abertura malla pasa + abertura malla retenida}}{2} \qquad \textbf{Ec. 2}$$

$$FMRA = (X_{i-1} + Xi) \qquad \textbf{Ec. 3}$$

X_{i-1}: Porcentaje de peso anterior

Xi: Porcentaje de peso inicial

$$\sum_{1=o}^{n} Xi \ (Sumatoria\ de\ fraccion\ masa$$

Por último, se calculó la fracción en peso retenida acumulada (*FMPA*) y también se registró *FMPA*: Fracción en masa retenida acumulada pasada obteniendo el cálculo con la ecuación 4.

$$FMPA = (1 - FMRA) \qquad \textbf{Ec. 4}$$

Estos cálculos se representaron en una tabla. Con los datos de la tabla se obtuvo una gráfica diferencial (*Xi vs Dpi)* (Figura 7a) para obtener la distribución de tamaño. El rendimiento de la harinas se representó mediante una gráfica acumulativa (Figura 7b) y compararlo con lo establecido por la norma NMX-046-S-1980, que específica que por lo menos el 75 % del material debe pasar por el tamiz 60 USA.

6.5 Perfiles de viscosidad aparente

El perfil de viscosidad aparente de las harinas de maíz nixtamalizadas con germen y sin germen se realizó con la muestra retenida en malla 60 USA.

Se utilizó un Reometro marca Anton Parr MCR 102 y una propela (ST24-2D/2V/2V/30) (Figura 19a). Se pesaron 3 g de muestra y 18 mL de agua en una celda para almidones de aluminio anodizado con cap 21 mL (CC 26/ST) (Figura 19b). La velocidad de calentamiento fue de 7.5 C/min y se eligió una rampa de calentamiento de la siguiente manera: Se inició la rampa de calentamiento en un rango de 50 a 90 °C, una vez alcanzado los 90 °C se mantuvo durante 5.3 minutos; posteriormente se inició la rampa de enfriamiento de 90 a 50ºC con una velocidad de agitación de 194 rpm.

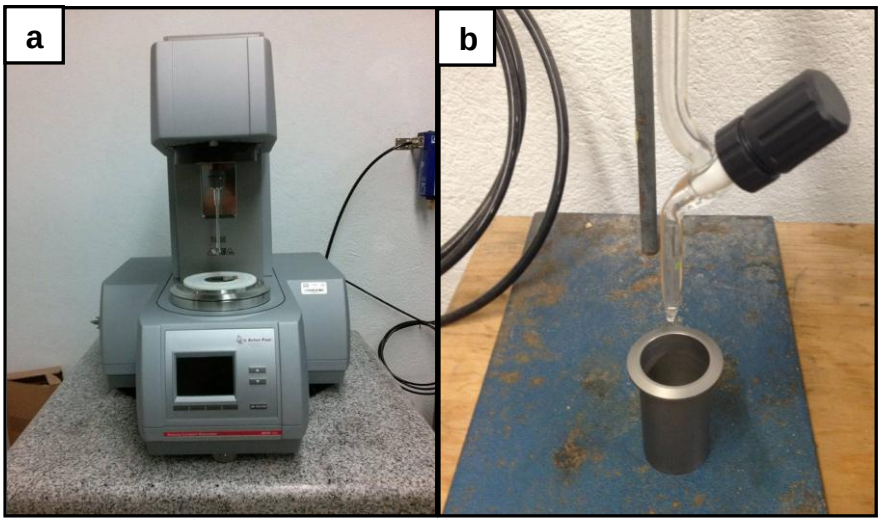


Figura 19. Determinación de perfiles de viscosidad. a) reómetro Anton Para MCNR102. b) preparación de la

6.6 Determinación de la concentración de calcio en germen, harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG)

Este análisis se realizó de acuerdo al método descrito por Fernández et al. (2004). La determinación del calcio endógeno es importante para conocer la concentración de calcio en el germen crudo, la fijación de calcio residual en el germen de maíz procesado debe plantearse a partir del calcio endógeno.

Para calcular la concentración de calcio en muestras experimentales se preparó una curva de calibración con un estándar de calcio de 1000 ppm.

$$C_1V_1=C_2V_2 \qquad \textbf{Ec. 5}$$

En donde:

C_1= Concentración estándar (1000 ppm)

V_1= Volumen estándar de calcio (ml)

C_2=Concentración (ppm)

V_2= Volumen a preparar (100 mL)

Despejando V_1 de la Ec.5

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \qquad \textbf{Ec. 6}$$

En la Ec.6 se sustituyeron los valores correspondientes y se obtuvieron los valores del volumen estándar de calcio (V_1)

Cuadro 10. Valores del volumen estándar de calcio.

Número de concentración	C_2 (ppm)	V_1 (mL)
1	0,5	0.05
2	1	0.1
3	2	0.2
4	3	0.3
5	4	0.4

Las muestras en polvo de germen, HMN y HMN-SG se hicieron pasar a través de un tamiz 30 USA. Se pesaron 0.25 g (Figura 20a) de muestra y se colocaron en los vasos del microondas para digerirlas y eliminar los residuos orgánicos que pueden influir en las mediciones. La digestión de las muestras se realizó agregando 10 mL de HNO_3 grado analítico y se dejaron reaccionar por 2 h hasta que se logró destruir la materia orgánica presente; posteriormente se colocaron un carrusel para digestión en el digestor de microondas (Figura 20b).

El proceso de digestión se realizó a tres rampas de calentamiento: La primera a partir de temperatura ambiente hasta 130 ºC en 4.30 min, la segunda de 130 ºC, hasta 150 ºC en 4 min y la última de 150 a 175 ºC en 4 min manteniendo la temperatura constante durante 15 minutos. La muestra digerida se filtró en una campana de extracción de gases, se le adicionó 1 mL óxido de lantano y se aforó a 50 mL de agua tridestilada. Las muestras ya disueltas se colocaron en un vaso de precipitado. Se introdujo el nebulizador a la muestra y se hizo incidir la luz de una lámpara de un cátodo hueco a través de una muestra vaporizada con una flama (Figura 20c).

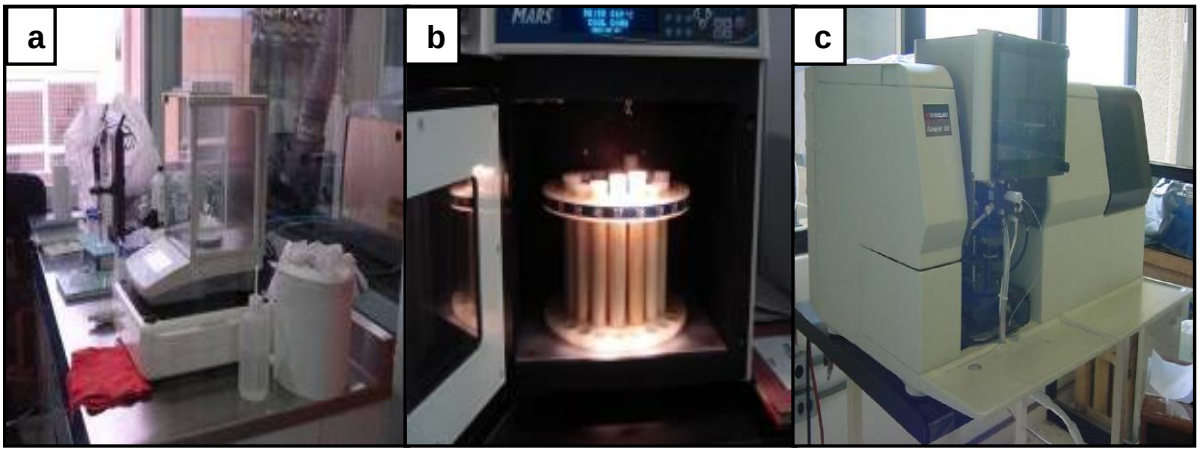


Figura 20. Determinación de calcio. a) Pesado de muestras. b) carrusel de vasos y c) Espectrofotómetro de absorción atómica

Las determinaciones se realizaron por duplicado en un espectrofotómetro VARIAN modelo AA-110 (Figura 20c). Las condiciones en que se operó el equipo fueron: aire (12 psi), acetileno (70 psi), flama 422.7 nm, lámpara con una corriente 10mA y una apertura de salida de 0.7 nm. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio Nacional De Fertilidad De Suelos y Nutrición Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La curva de calibración se realizó empleando un estándar de 1000 ppm de calcio y establecer el porcentaje de recuperación.

6.7 Extracción de aceite a partir del germen

La extracción del aceite a partir de las muestras de germen se realizó mediante un proceso de prensado mecánico para el cual se diseñó un extractor en forma de H en acero inoxidable 304 (Grado alimenticio) que se muestra en la Figura 21a. Se depositaron aproximadamente 35 g de germen a temperatura ambiente; posteriormente se procedió a realizar una presión mecánica de 10 Ton Fuerza con un embolo y una prensa hidráulica marca Mikells de banco con 15 cm de carrera y capacidad de 15 Ton-Fuerza (Figura 21b).

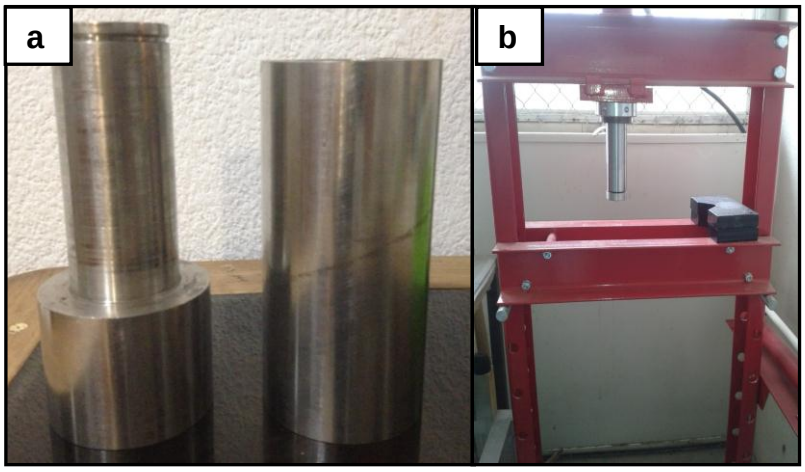


Figura 21. Instrumentación para la extracción del aceite del germen de maíz. a) extractor y b) prensa hidráulica Mikells.

6.8. Determinación de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico de aceite del germen de maíz por cromatografía de gases

La cuantificación de ácidos grasos se realizó mediante la Norma Mexicana NMX-F-017-SCFI-2005. Para este análisis se utilizó un cromatografo de gases capilar con un detector de ionización de flama y una columna DB-225 30 m-025 nm y 0.25 µm de grosor. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Cp 3800 CG. Para iniciar se prepararon los esteres metílicos, de acuerdo al siguiente Cuadro 11.

Cuadro 11. Cantidades para la esterificación metílica

Muestra (mg)	Matraz (mL)	NaOH 0.5 N (mL)	Reactivo BF3 en etanol (mL)
100-250	50	4	5
250-500	50	6	7
500-750	125	8	9
750-1000	125	10	10

Se adicionó el aceite en el matraz de reacción de 50 mL o 125 mL, se agregó la cantidad especificada de la solución de NaOH 0.5N en etanol y añadió una perla de ebullición. Posteriormente se conectó un condensador y se calentó la mezcla en un baño de vapor hasta que el aceite este en solución. Esto debe tardar

de 5 a 10 minutos. Se adicionó el reactivo de trifloruro de boro (BF3) en etanol a través del condensador y se mantuvo en ebullición durante 2 min. Se agregaron de 2 mL - 5 mL de heptano a través del condensador y se dejó en ebullición por un minuto más. Luego se retiró del baño de vapor, se desconectó el condensador y se añadió aproximadamente 15 mL de solución saturada de cloruro de sodio; se tapó el matraz y agitó vigorosamente por 15 segundos mientras la solución está aún tibia. Se agregó suficiente solución saturada de cloruro de sodio para que la solución de heptano con los ésteres metílicos flotara en el cuello del matraz. Por último se transfirió aproximadamente 1 mL de la solución de heptano a un tubo de ensayo y se completó con una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro. La solución de heptano seca se inyectó directamente al cromatógrafo de gases. Para recuperar los ésteres metílicos secos, se transfirió las fases de sal y de heptano a un embudo de separación de 250 mL. Se extrajo dos veces con porciones de 50 mL de éter de petróleo redestilado (punto de ebullición 30°C - 60°C). Se lavó los extractos combinados con porciones de 20 mL de agua hasta que estuvo libre de ácidos (se comprobó el agua con indicador de rojo de metilo), se secó con sulfato de sodio y se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno en un baño de vapor.

Para iniciar con la inyección de la muestra en el cromatógrafo se debió acondicionar la columna nueva estando desconectada del detector, se mantuvo aproximadamente 10°C arriba de la temperatura de operación con flujo de gas inerte de 20 mL/min - 60 mL/min por aproximadamente 16 h y 2 h adicionales a 20°C arriba de la temperatura de operación. En ningún caso se excedió la temperatura máxima recomendada por el fabricante. Después se determinó las condiciones de operación óptimas. Se seleccionaron las condiciones de prueba, tomando en cuenta las siguientes variables: largo y diámetro de la columna, temperatura de la columna, flujo del gas acarreador, resolución requerida, tamaño de la muestra para análisis y tiempo de análisis (Cuadro 12). El tamaño de la muestra se debió seleccionar de tal forma que el ensamble del detector y el electrómetro proporcionaran una respuesta lineal.

Cuadro 12. Condiciones de acondicionamiento.

Diámetro interno columna (mm)	Flujo gas transportador (mL/min)
2	15 - 25
3	20 - 40
4	40 - 60
Concentración de fase estacionaria (%)	**Temperatura (°C)**
5	175
10	180
15	185
20	185

El puerto de inyección se ajustó a una temperatura de aproximadamente 250 °C – 275 °C y el detector a una temperatura igual o mayor a la temperatura de la columna. El flujo de hidrógeno al detector de ionización de flama fue aproximadamente 0.5 - 1 veces la del gas acarreador, mientras que el flujo de aire aproximadamente 5 - 10 veces superior al del hidrógeno. Para Determinar la eficiencia y la resolución, se realizó el análisis de una mezcla de estearato de metilo y oleato de metilo en proporciones similares (por ejemplo, ésteres metílicos de manteca de cacao).

Después de procedió a evaluar los esteres metílicos del aceite; el volumen de la muestra para el análisis fue de 0.1 µL – 0.2 µL de la disolución de ésteres metílicos obtenido anteriormente. En el caso de existir ésteres que no estén en solución, se prepara una solución aproximadamente al 1 - 10 % y se inyecta 0.1 µL de esta solución. Si el objetivo es determinar componentes presentes solo en trazas, el tamaño de la muestra puede aumentarse (hasta diez veces). Se debe usar un estándar interno, sobre todo en determinaciones en donde no todos los ácidos grasos eluyeron. El estándar interno puede ser el éster metílico del ácido graso C13.

Cálculos:

El % de área del componente *i* expresado como ésteres metílicos es:

$$\frac{Ai}{\Sigma Ai} \times 100 \qquad \textbf{Ec. 7}$$

Donde:

Ai = Área del pico correspondiente al componente i

ΣAi = Suma de las áreas de todos los picos

6.9 Índice de peróxido

El índice de peróxido se determinó de acuerdo al método reportado por la norma mexicana NMX-F-154-SCFI-2005. Se pesaron 5.00 g ± 0.05 g de muestra en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se agregó 50 mL de la solución 3:2 de ácido acético-isooctano (Figura 22a). Se agitó para disolver la muestra y se adicionó 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio (KI). Se dejó reposar la solución durante un minuto, se agitó 3 veces durante este lapso de tiempo e inmediatamente se agregaron 30 mL de agua destilada. La solución anterior se tituló con tiosulfato de sodio 0.1 N a través de una adición gradual y con agitación vigorosa y constante. Se continuó la titulación hasta que el color amarillo desapareció casi totalmente (Figura 22b). Se agregaron 0.5 mL de la solución indicadora de almidón. Se continuó la titulación con agitación constante, especialmente al aproximarse el punto final, para liberar todo el yodo de la capa de solvente (Figura 22c). Se añadió el tiosulfato de sodio gota a gota hasta que el color azul desapareció (Figura 22d). Se realizó una prueba con un blanco de reactivos. La titulación del blanco no debió de exceder 0.1 mL de la solución tiosulfato de sodio 0.1N.

Cálculos:

Valor o índice de peróxido (miliequivalentes de peróxido/1000g muestra)

$$V.P = \frac{(M - T) \times N \times 1\,000}{\text{Peso muestra en g}} \qquad \textbf{Ec. 8}$$

Donde:

T = Volumen de tiosulfato de sodio de la titulación del blanco o testigo;

M = Volumen de tiosulfato de sodio de la titulación de la muestra, y

N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

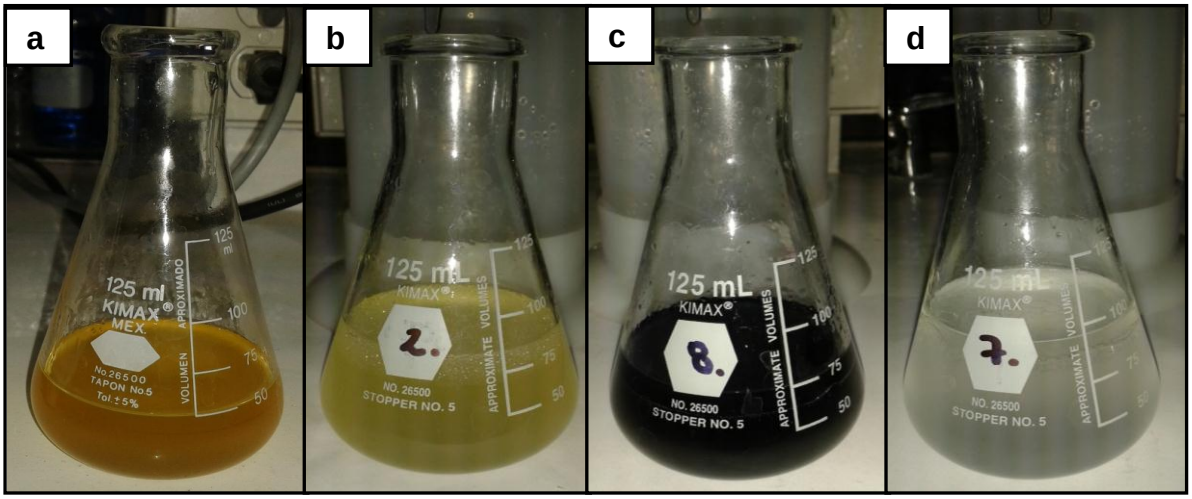


Figura 22. Etapas de la determinación de Índice de peróxido.

6.10 Índice de Saponificación

El índice de saponificación se realizó con la metodología descrita por la NMX-F-174-SCFI 2006. Se pesó una cantidad de muestra totalmente seca en un matraz erlenmeyer de tamaño tal que la titulación fue equivalente al 45 - 55 % del blanco. Normalmente esto requiere una muestra de 4 g – 5 g. Se agregaron 50 mL de potasa (KOH) alcohólica. Se preparó un blanco con los mismos reactivos y condiciones para las muestras a excepción de la adición del aceite. Se conectó un condensador al matraz y se llevó a ebullición lenta pero constante hasta que la muestra estuvo completamente saponificada (Figura 23a y b). Se requiere de 1 h

para muestras normales. Se aseguró el anillo de sello de vapor en el condensador para que no se levantara hasta el tope del condensador, o para evitar alguna pérdida. Después de que el matraz y el condensador se enfriaron bien, pero no lo suficiente para formar un gel, se lavó el interior del condensador con una pequeña cantidad de agua destilada. Se desconectó el condensador, se agregó aproximadamente 1 mL del indicador de fenolftaleína y se tituló con la solución 0.5 N de HCl (Figura 23c). Se registró el volumen de la solución requerida para la titulación.

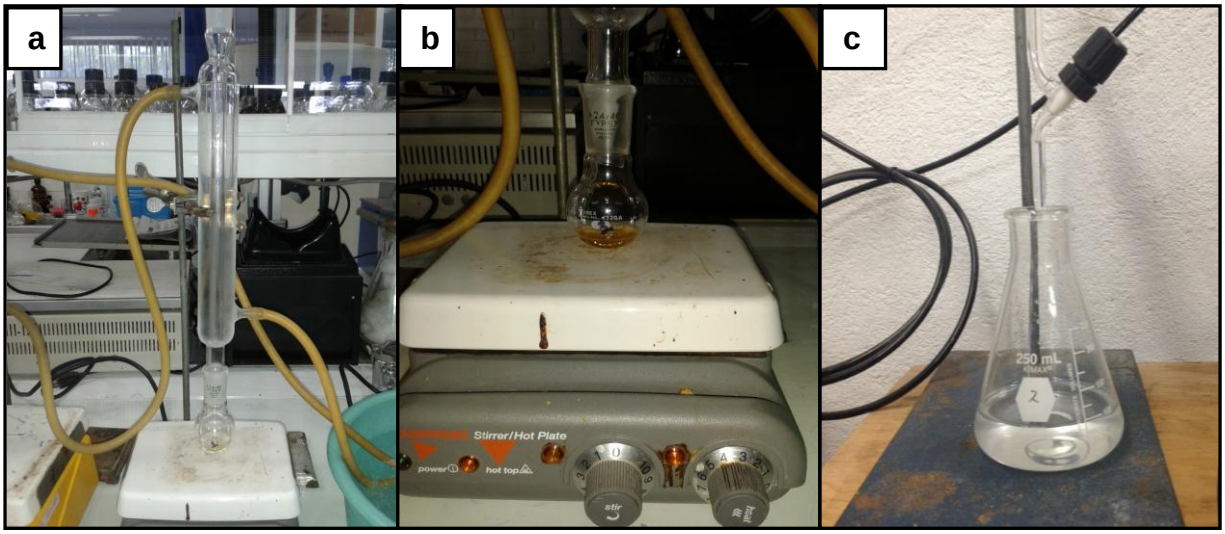


Figura 23. Índice de saponificación. a) y b) saponificación. c) titulación.

Cálculos:

$$\text{Índice de Saponificación} = \frac{(B-M)*(N)}{P} * 56.1 \qquad \textbf{Ec. 9}$$

Donde:

B = Volumen, mL 0.5 N HCl requeridos para titular el blanco

M = Volumen, mL 0.5 N HCl requeridos para titular la muestra

N = Normalidad de la solución de HCl

P = Peso de la muestra en g

56.1 = es el equivalente del hidróxido de potasio

6.11 Extracción y cuantificación de aflatoxinas de las harinas

Las muestras que se seleccionaron para ser sometidas a la extracción y cuantificación de aflatoxinas se muestran en el Cuadro 13. Para iniciar con la extracción de las AF se eligieron 6 harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen (HMN, HMN-SG), 1 harina de maíz cocida con germen y sin germen (HMC, HMC-SG) y 1 harina de maíz control (HMCr).

Cuadro 13. Harina de maíz nixtamalizadas con diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$.

	Nixtamalización (92°C)	
No. Muestra	**m/m $Ca(OH)_2$**	**T. de reposo (h)**
2	0	9
4	0.7	3
6	0.7	9
8	1.4	3
10	1.4	9
12	2.1	3
14	2.1	9
15[a]	--	--

[a]Maíz crudo (sin tratamiento)

Las harinas se eligieron de acuerdo a las siguientes consideraciones:

- **Tiempos de reposo**: Se eligen las muestras con tiempos de reposo de 9 h, característico de la nixtamalización tradicional, en tanto que las 3 h de reposo corresponden al tiempo de reposo empleado en la nixtamalización industrial y que corresponden a los más comúnmente empleados en México.
- **Concentraciones de $Ca(OH)_2$:** Se eligieron las 4 diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$, en el rango descrito por Torres et al. (2001), con objeto de conocer su efecto sobre el contenido de alfatoxinas.

La extracción de AFs consistió en licuar 25 g de muestra de harina con 100 mL de una mezcla de MeOH:H_2O_d (80:20 v/v) y 1 g de NaCl para clarificar (Figura 24a). Se centrifugaron los licuados en una centrífuga (ALC 4235 Cool

Working System, USA) a 4300 rpm por 10 min (Figura 24b), se decantaron y conservó el sobrenadante. Se tomaron 4 mL de sobrenadante y se diluyeron con 16 mL de PBS a 7.4 de pH. Previo a su elución a través de la columna se dejó que el sobrenadante alcanzara la temperatura ambiente y se debió equilibrar con 20 mL de una solución tampón de fosfato salino (PBS). Posteriormente, se pasó la solución por la columna de inmunoafinidad (Easi-Extract R-Biopharm Rhône LTD, UK) para aflatoxinas totales (AFt) lentamente (Figura 24c). Se lavó la columna con 20 mL de H_2O_d y la muestra se eluyó por gravedad con 1.5 mL de metanol grado HPLC seguido de 1.5 mL de H_2O_d con reflujo (Figura 24d). Los 3 mL de la solución eluida a través de la columna se dividieron en 2 viales ámbar, cada uno con 1.5 mL. Ambos viales se secaron en un horno a 40ºC. La cuantificación por cromatografía de líquidos (HPLC) se llevó a cabo en una de las muestras (viales) perfectamente seca.

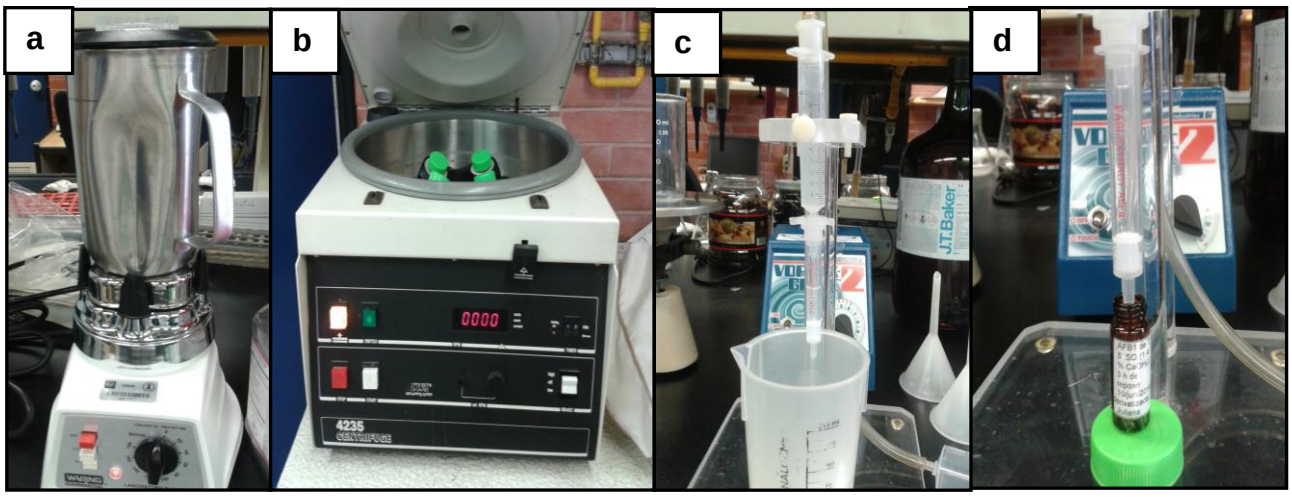


Figura 24. Proceso de extracción de aflatoxinas. a) homogenización de las muestras. b) proceso de centrifugado en refrigeración. c) elución de las aflatoxinas en columna de inmunoafinidad. d) recolección de las aflatoxinas después del proceso de elución

Para conocer la cantidad de aflatoxinas totales en las harinas se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Concentración}_{maíz} = 10C_x * C_z * \frac{100 \text{ mL MeOH:}H_2O_d}{25 \text{ g harina}}$$

Donde: $C_z = \frac{1\ mL\ (200\ \mu L\ ACN + 800\ \mu L\ Solución\ derivatizante)}{4\ mL\ sobrenadante}$

$C_{maíz} = 10\ C_x * \frac{1\ mL}{4\ mL} * \frac{100\ mL}{25\ g}$

$C_{maíz} = 10\ C_x * \frac{100\ mL}{100\ g}$ C_x = Concentración (ng mL^{-1}) de la Aflatoxina en el HPLC

$C_{maíz} = 10\ C_x * \frac{mL}{g}$ **Ec. 10**

6.11.1 Obtención de estándares y curvas de calibración

La preparación de los estándares consistió en diluir la aflatoxina pura en 1 mL de benceno:acetonitrilo (98:2 v/v). La concentración de cada estándar (1µg mL^{-1}) se calculó a partir de los pesos moleculares y coeficientes de extinción específicos de cada aflatoxina de acuerdo a las indicaciones del método oficial 970.44 (AOAC, 2005).

La elaboración de las curvas de calibración de cada una de las aflatoxinas se realizó empleando un espectrofotómetro UV-visible (Figura 25) (Genesys 10uv, Termo Electron Corporation. Madison Wisconsin, EEUU), el cual se ajustó a 0 de absorbancia mediante un blanco de solución benceno: acetonitrilo (98:2 v/v). Posteriormente, se realizó un barrido de 300 a 400 nm de las soluciones de cada una de las aflatoxinas (B_1, B_2, G_1, G_2) para determinar la longitud de onda máxima de absorción para cada una de ellas.

Figura 25. Espectrofotómetro UV-visible

A partir de la solución de 1µg mL^{-1} de cada AF (B_1, B_2, G_1, G_2 Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EEUU) se obtuvieron las curvas de calibración de cada AF, las cuales se pueden observar en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Concentraciones para las curva de calibración de las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2.

Aflatoxinas			
B_1 (ng mL^{-1})	**B_2 (ng mL^{-1})**	**G_1 (ng mL^{-1})**	**G_2 (ng mL^{-1})**
0.05	0.01	0.5	0.5
1	1	1	1
2	4	2	16
5	16	8	32
10	32	16	64
30	64	64	100
40	100	100	128

6.11.2 Derivatización de las aflatoxinas para su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para incrementar la fluorescencia de las Aflatoxinas se derivatizaron con ácido trifluoroacético (ATF) para que se llevara a cabo la reacción de transformación de aflatoxinas B_1 y G_1 (no fluorescentes) en sus hemiacetales B_{2a} y G_{2a} (altamente florescentes). Por otro lado la aflatoxinas B_2 y G_2 (fluorescentes) no sufrieron ninguna reacción de transformación durante la derivatización

Las eluciones secas procedentes de las columnas destinadas al análisis por HPLC se resuspendieron con 200 µL de acetonitrilo (ACN), en seguida se adicionaron 800 µL de solución derivatizante. La solución derivatizante se preparó con 5 mL de ácido trifluoroacético (ATF) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL de ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada. Posteriormete, la mezcla se agitó en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 s. Las muestras derivatizadas se mantuvieron en un baño María a 65°C por 10 min (Akiyama et al*.,* 2001; Kok, 1994) como se muestra en la Figura 26. Posteriormente, se inyectaron 60 µL de muestra por triplicado en el cromatógrafo de líquidos a temperatura ambiente empleando un *loop* de 20 µL para su análisis.

Figura 26. Proceso de derivatización.

6.11.3 Condiciones para la Cromatografía de líquidos de alta resolución

En este análisis se utilizó como fase móvil Agua:Acetonitrilo:Metanol (65:15:20, v/v/v) a una velocidad de un mL/min. La fluorescencia se detectó a una longitud de onda de excitación de 360-362 nm y una emisión de 425 nm para AFB_1. La cuantificación de aflatoxinas se realizó utilizando el programa Chem Station 32 (Series 1200). Se empleó una bomba isocrática (G1310A Series DE62957044), un detector de fluorescencia (G1321A Series DE 60456380) y un automuestreador (G1329A Series DE64761666) de la marca Agilent Technologies (Figura 27). La columna cromatográfica utilizada fue una Agilent Eclipse XDS-C18 de 4.6 × 150 mm con tamaño de partícula de 5 µm.

Figura 27. Cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de fluorescencia Agilent Technologies

6.12 Análisis estadístico

En el análisis de contenido de ácidos grasos, contenido de calcio, viscosidad aparente, índice de peroxidación e índice de saponificación se utilizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA de una sola vía) y aplicando la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos ($p < 0.05$) considerando el tiempo de reposo y la concentración de $Ca(OH)_2$ como factores de variación.

En la determinación del contenido de aflatoxinas se consideraron tres factores de variación: presencia del germen, concentración de $Ca(OH)_2$ y tiempo el reposo. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada una de las muestras analizadas. Para cada caso se calculó el promedio, la desviación estándar (SD) así como la significancia estadística con un análisis de varianza de 3 vías (ANOVA de 3 vías) y un post hoc Bonferroni para comparaciones múltiples. La prueba se realizó con un índice de confianza del 95 %.

El programa empleado para los análisis estadísticos anteriormente

señalados fue el SPSS versión 9.0.

6.13 Cuadro metodológico y diseño experimental

Para la primera etapa experimental las variables de entrada del sistema fueron la concentración de hidróxido de calcio (m/m) y el tiempo de reposo (h), cada uno de estas variables consta de 4 niveles a evaluar (0, 0.7, 1.4, 2.1) m/m $Ca(OH)_2$ y (0, 3, 6, 9) h. Se obtuvieron 14 muestras de las combinaciones de los 4 niveles de las dos variables. A continuación presenta el diseño experimental propuesto para llevar acabo todo el trabajo.

Cuadro 15. Diseño Experimental.

	NIXTAMALIZACIÓN (92°C)				
No. Muestra	**m/m $Ca(OH)_2$**	**T. Reposo (h)**	**No. Muestra**	**m/m $Ca(OH)_2$**	**T. Reposo (h)**
1	0	0	8	1.4	3
2	0	9	9	1.4	6
3	0.7	0	10	1.4	9
4	0.7	3	11	2.1	0
5	0.7	6	12	2.1	3
6	0.7	9	13	2.1	6
7	1.4	0	14	2.1	9

Por último, presento en un cuadro metodológico todas las técnicas y métodos utilizados para llevar acabo el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo.

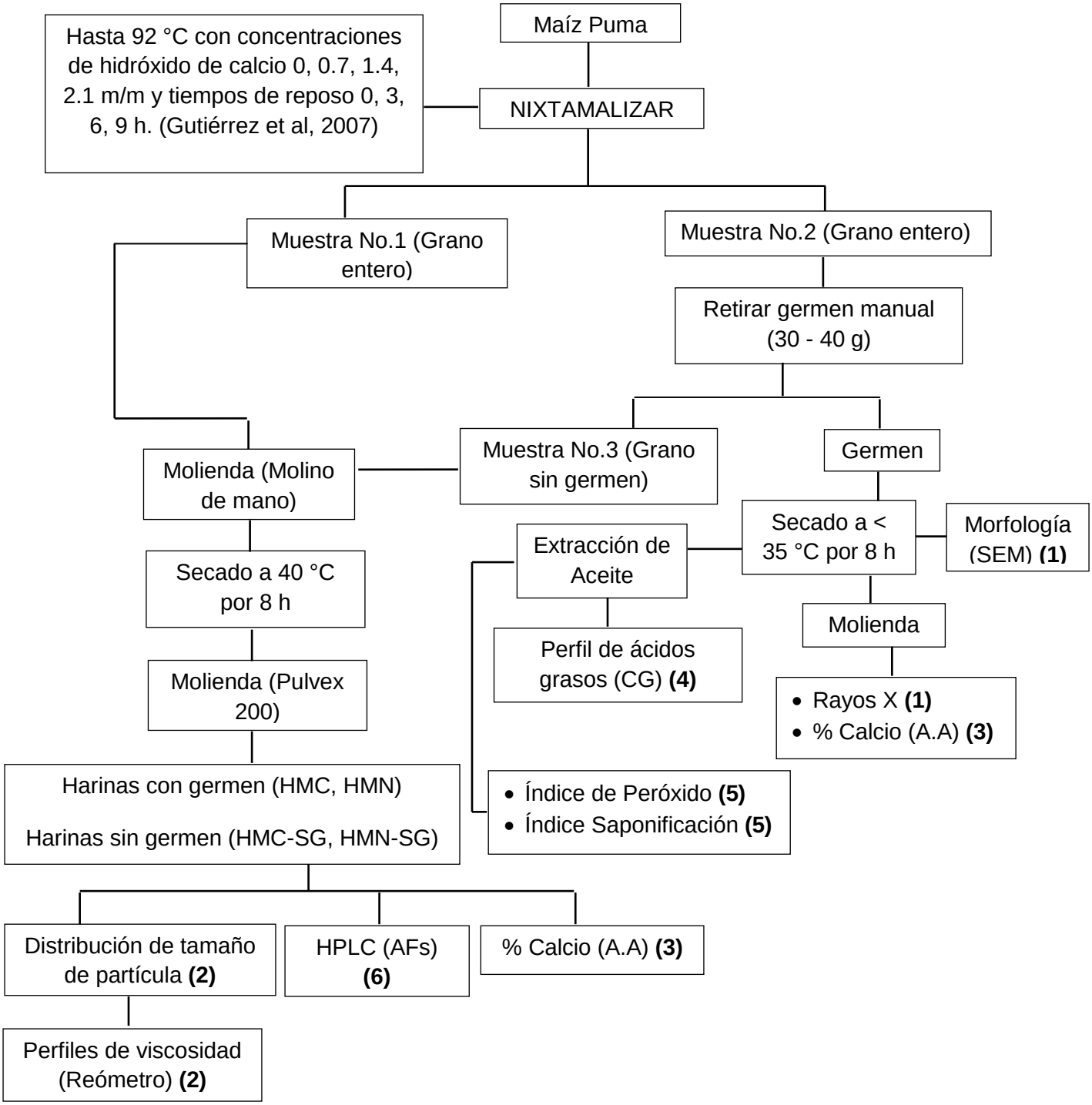


Figura 28. Cuadro metodológico

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron las siguientes muestras experimentales: Doce harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN), doce harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG), dos harinas de maíz cocido con germen (HMC) y dos harinas de maíz cocido sin germen (HMC-SG), al igual que dos muestras de germen cocido (GC) y doce muestras de germen nixtamalizado (GN).

En la Figura 29 se presentan las historias térmicas que se obtuvieron durante la elaboración de las unidades experimentales para cada recipiente. En la Figura 29a se presenta el perfil térmico para las harinas elaboradas con maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ correspondiente a la etapa de cocción, en tanto que en las Figura 29b, c y d pertenecen al perfil térmico de las muestras procesadas con 0.7, 1.4 y 2.4 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con tiempos de reposo de 3, 6 y 9 h respectivamente. La Figura 29a muestra una isoterma que se alcanza a una temperatura de cocción de 92 °C que se mantiene por un periodo de aproximadamente 40 minutos, durante el cual la muestra alcanza una humedad de 36 % que es el criterio empleado por Gutiérrez et al. (2007) para dar por finalizada la etapa de cocción y que coincide con el desprendimiento del pericarpio. En las Figura 29 b, c y d se muestra esta misma isoterma representado por el pico de las curvas que se mantiene por el mismo periodo de tiempo mostrado en la Figura 29a, así como un descenso en la temperatura de proceso que corresponde a la etapa de reposo de la nixtamalización donde cesa el calentamiento y las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente. Estos perfiles térmicos obtenidos durante las etapas de cocción y de reposo de las muestras son evidencia del rigor experimental observado para la preparación de las mismas, donde la repetibilidad y reproducibilidad se puede observar en el traslape de las gráficas obtenidas en eventos independientes.

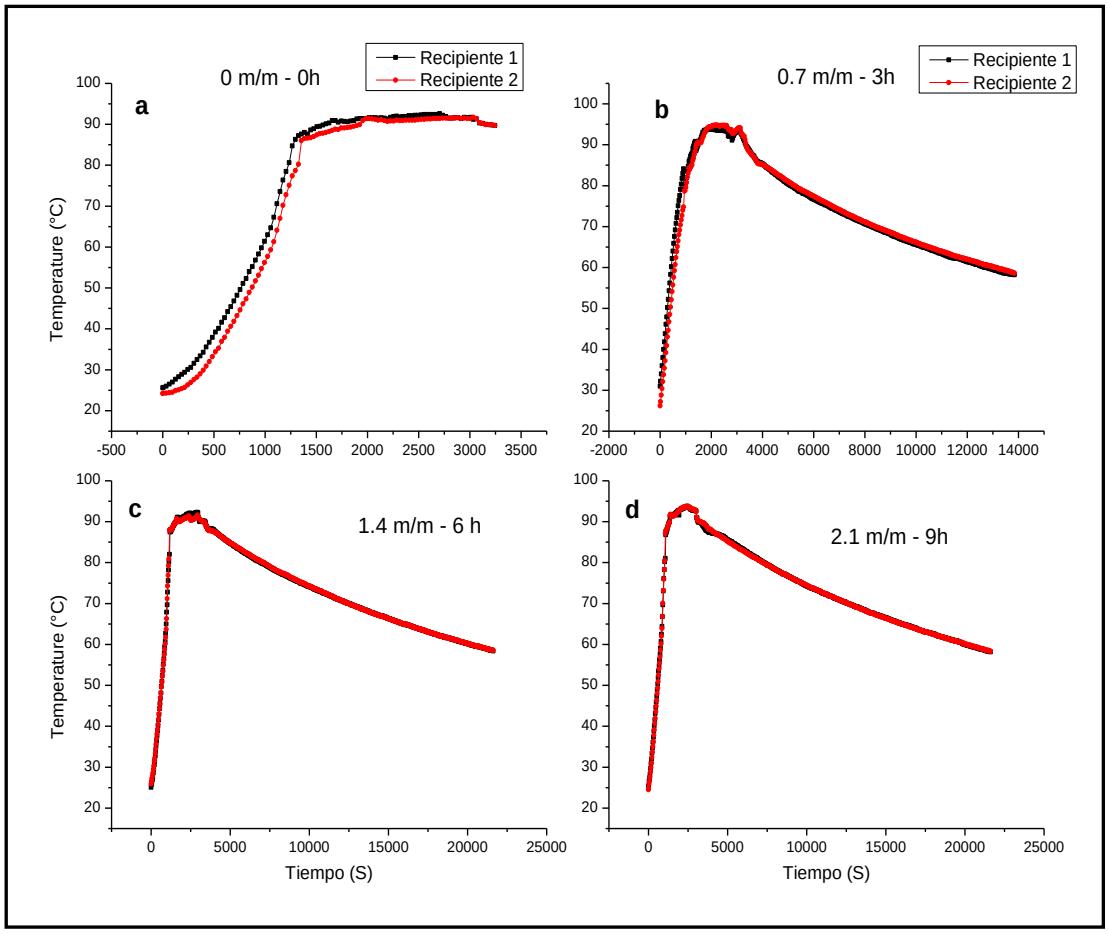


Figura 29. Historias de cocción de harina de maíz.

7.1 Caracterización morfológica del germen nativo y nixtamalizado mediante SEM-HV

La caracterización morfológica del germen nativo (crudo) se presenta en la Figura 30. En esta Figura se muestran micrografías correspondientes a las diferentes estructuras que constituyen el germen.

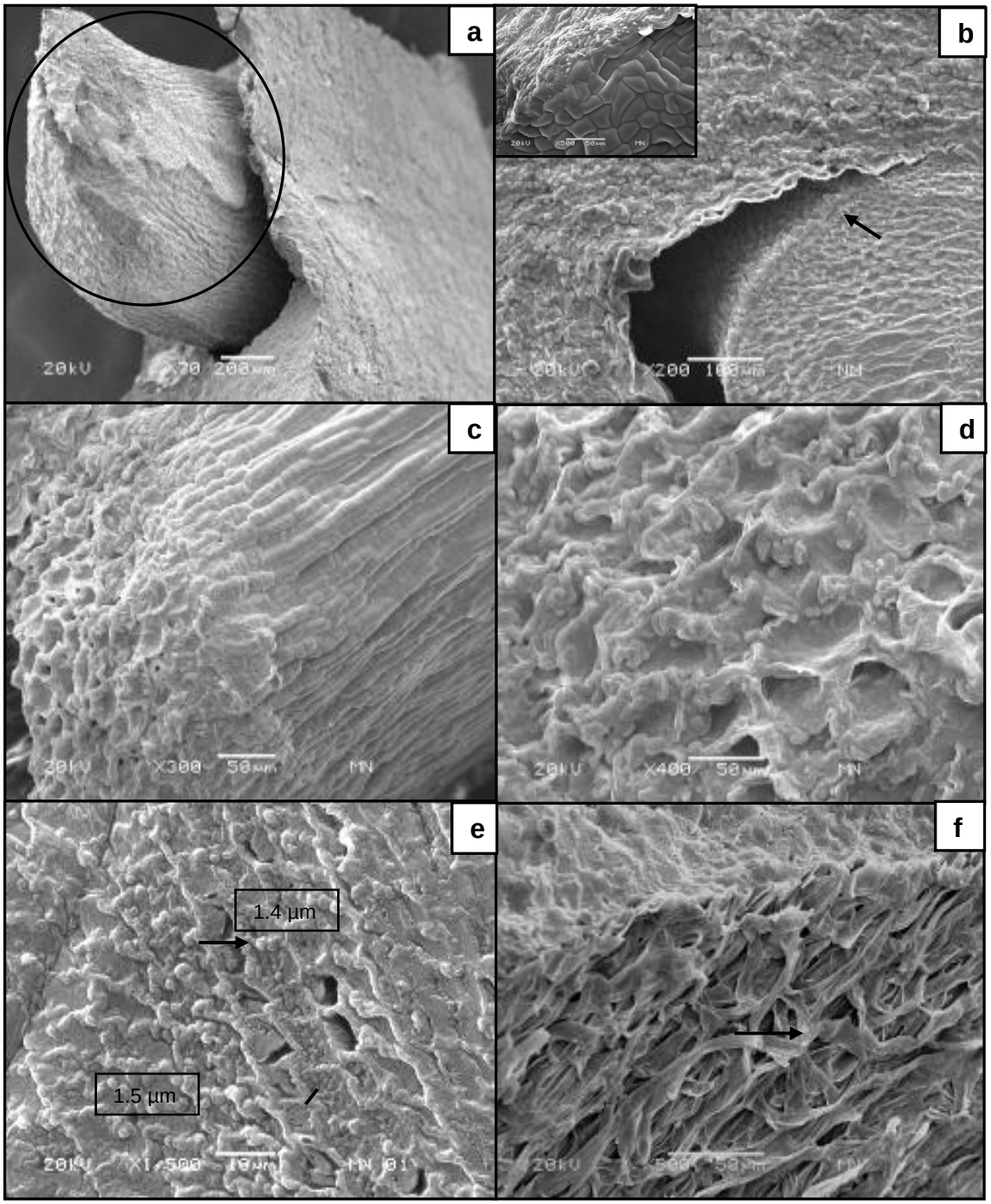


Figura 30. Micrografía del germen de maíz sin tratamiento. a) y b) corte transversal del germen; c) y d) corte transversal del embrión; e) y f) corte transversal del escutelo

El embrión (círculo en la Figura 30a) es la estructura localizada en el centro del germen y exhibe una forma semi-cónica, el escutelo está ubicado alrededor del embrión. Ambas estructuras están separadas por la cavidad embrionaria, la cual está delimitada por una monocapa de células cuticulares llamada epidermis, la cual presentan un empaquetamiento poligonal que se encuentra señalizada con una flecha en la Figura 30b y que se puede apreciar con mejor detalle en el inserto de esta Figura. En estas micrografías se puede comprobar que el embrión y el escutelo presentan diferentes morfologías debido a diferencias en su composición química, ya que en la primera estructura se localizan el 30.8 % de las proteínas del germen y en la segunda el 83 % de los triglicéridos del grano de maíz (Watson, 2003; Dolezal et al., 2014). La Figura 30c muestra un corte transversal del germen en donde se pueden apreciar los cilindros vasculares que se encuentran en el embrión reportadas previamente por Wolf et al. (1952). El diámetro de estos canales tubulares es de 30 a 50 µm como se observa en la Figura 30d, los cuales pueden constituir una vía para la entrada y distribución de agua y calcio hacia el interior del germen durante el proceso de nixtamalización. En la Figura 30e se presenta la superficie de un corte transversal del escutelo, donde se aprecia el tejido pro-vascular de la parénquima y la presencia de los cuerpos grasos o esferosomas. Estas estructuras son esféricas presentan un diámetro entre 1-1.3 µm, refractan la luz y están cubiertos por una membrana de 2.5 a 4 nm de espesor constituida de proteínas y lípidos (Klaus y Karel, 1991; Watson, 2003). En la Figura 30f se muestra otro aspecto de la parénquima donde se puede apreciar microfibrillas que constituyen las paredes celulares de esta estructura constituidas de hemicelulosa al igual que las paredes celulares del pericarpio. Estos espacios intracelulares permiten al transporte de materiales entre las células (Watson, 2003).

En la Figura 31 se muestran micrografías del germen de maíz (embrión y escutelo) cocido y nixtamalizado a diferentes concentraciones de proceso. El grano es considerado un sistema multicapas (pericarpio, endospermo y germen), por lo que la difusión de calcio en cada estructura anatómica que compone el grano es en función del tiempo de reposo. En las primeras horas de reposo ($0 < t < 7$) se presenta una difusión y permeabilidad del ión calcio en el pericarpio; lo que da a entender que la difusión del calcio en el germen es después de las 7 horas de reposo (Gutiérrez et al., 2007). En las Figuras 31a y b se muestra el escutelo y el embrión del germen de maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo, en la cual se puede observar un engrosamiento del tejido pro-vascular del parénquima en el escutelo y de los cilindros vasculares del embrión comparado con las dimensiones que presentan estas estructuras en el grano sin procesar (Figuras 30c y 30e), lo cual puede atribuirse a la absorción de agua por parte del tejido fibroso, así como a la desnaturalización de las proteínas presentes en el embrión y el escutelo. Sin embargo, dichas estructuras no han perdido su integridad. A este respecto, González et al., (2004) mencionan que las fibras de origen vegetal no se descomponen sino a temperaturas entre 285 y 340 °C.

En las Figuras 31c y 31e se muestra imágenes de la pared externa del escutelo nixtamalizado con 0.7 y 1.4 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 6 h de reposo, en donde se puede evidenciar la pérdida de la estructura reticular que se observa en el escutelo del germen sin procesar (Figuras 30e y 30f) por efecto del tratamiento térmico- alcalino. Así mismo, en la Figura 31g correspondiente al escutelo del germen del maíz procesado con 2.1 m/m $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo se observa la ruptura de la parénquima lo que permitió detectar la presencia de algunos gránulos de almidón (GA) y cuerpos grasos (CG) cuyos diámetros son diferentes entre sí siendo en los GA de 16.2 a 18.2 µm, en tanto que en los CG es de 1-1.3 µm (Watson, 2003). Es importante recordar que en el germen también se ha reportado la presencia de GA, no obstante su contenido en esta estructura es significativamente menor (34 %) con respecto al endospermo (76 %) (Watson, 2003).

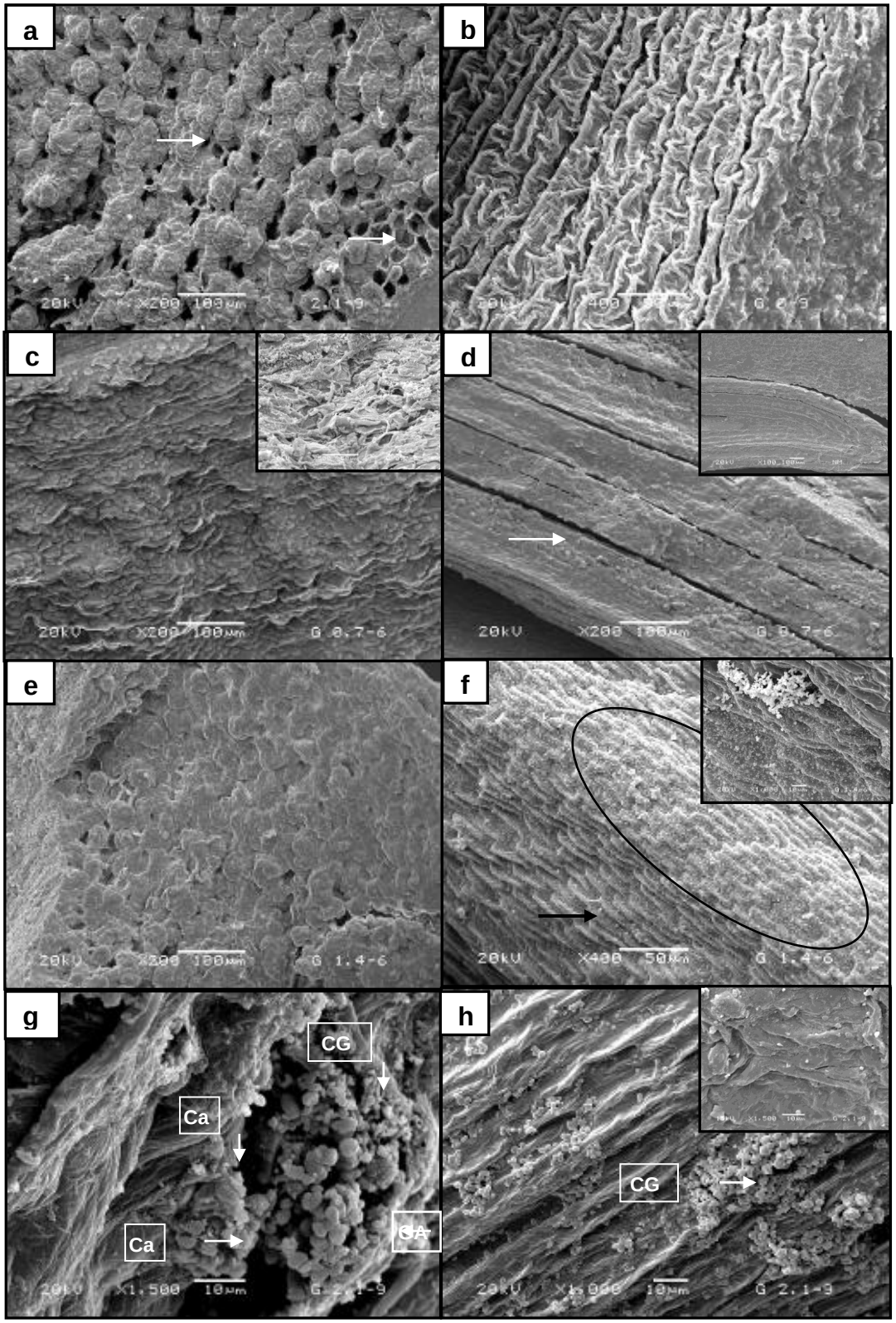


Figura 31. Micrografía del germen de maíz cocido y nixtamalizado a 92 °C. a) escutelo y b) embrión (0 % m/m $Ca(OH)_2$ y 9 h), c) escutelo y d) embrión (0.7 % m/m $Ca(OH)_2$ y 6 h), e) escutelo y f) embrión (1.4 % m/m $Ca(OH)_2$ y 6 h) y g) escutelo y h) embrión (2.1 % m/m $Ca(OH)_2$ y 9 h). CG: cuerpos grasos o esferomas, GA: gránulos de almidón.

los cilindros vasculares del embrión por efecto del tratamiento térmico alcalino, lo cual se puede observar con mejor detalle en el inserto (x100) de esta Figura. La Figura 31f corresponde a la capa externa del embrión del germen de maíz nixtamalizado con 1.4 m/m de $Ca(OH)_2$ y 6 h de reposo, donde se puede apreciar acumulaciones de gránulos blancos de menor tamaño en la superficie de esta estructura. La imagen del inserto de esta Figura (x1000) muestra evidencia que el tamaño de estas acumulaciones es menor con respecto al tamaño de los gránulos de almidón y los cuerpos grasos que se observan con mayor detalle en la Figura 31g. Por último, la Figura 31h muestra la superficie del embrión del maíz nixtamalizado con 2.1 m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo.

Los insertos de las Figuras 31c, f y h son ampliaciones a x500, x1000 x1500 respectivamente, los cuales corresponden a las acumulaciones de calcio que fueron identificadas previamente por Gutiérrez et al., (2010) y Valderrama-Bravo et al., (2010) en diferentes capas del pericarpio a diferentes condiciones del tratamiento termino alcalino. Estas acumulaciones fueron identificadas como compuestos cristalinos de calcio a través del análisis de difracción de rayos X que se presenta más adelante.

7.2 Contenido de calcio en germen, harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y desgerminadas (HMN-SG)

En la Figura 32 se muestra el contenido de calcio (g/100g) en germen cocido y germen nixtamalizado, harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y desgerminadas (HMN-SG) elaboradas con 0.7, 1.4 y 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo 0, 3, 6 y 9 h. En las Figuras 32a, b y c, se evidencia de que el contenido de calcio en las HMN, independientemente de la cantidad de $Ca(OH)_2$ utilizado, es significativamente mayor ($p \leq 0.05$) con respecto al contenido de este mineral en el germen cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ y HMN-SG. Esto es debido a que el germen se encuentra ubicado después del pericarpio y es la estructura del grano que retiene una cantidad importante de calcio (Gutiérrez et al., 2007). El contenido de calcio en las HMN presenta la misma tendencia que los datos reportados por Fernández-Muñoz et al., (2004) y Gutiérrez et al. (2007), en donde se observa que en las primeras horas de reposo (desde 0 hasta 9 h) el incremento

en el contenido de calcio en las muestras experimentales ocurre de manera directamente proporcional con el tiempo de reposo y la difusión del calcio en el grano ocurre principalmente a través del pericarpio, germen y capas externas del endospermo (Fernández-Muñoz et al., 2004; Gutiérrez et al., 2007). Es importante mencionar que en las HMN con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ el contenido de calcio disminuyó a las 6 h de reposo (Figura 32c), es probable que esta reducción sea debido a la remoción del pericarpio, germen y endospermo como resultado de un lavado excesivo del grano cocido (Fernández-Muñoz et al., 2004). Se ha señalado que la mayor parte del calcio retenido en el germen es en forma de sales de calcio resultantes de la reacción de saponificación entre el $Ca(OH)_2$ y los ácidos grasos presentes en esta estructura (Martínez-Bustos et al., 2001, Gutiérrez et al., 2001), así como la formación de carbonato de calcio, la cual se evidenció en las micrografías mostradas en la sección anterior y que ya ha sido detectado en la estructura del pericarpio (Rojas et al., 2009).

De acuerdo a un análisis ANOVA unidireccional se pudo determinar que el porcentaje de calcio en las muestras de harina con germen y sin germen es proporcional a la concentración de $Ca(OH)_2$ y tiempo de reposo utilizado en el proceso de nixtamalización; la variable que tuvo mayor efecto en el contenido de calcio en las muestras fue el germen seguido por el $Ca(OH)_2$ (Anexo 1).

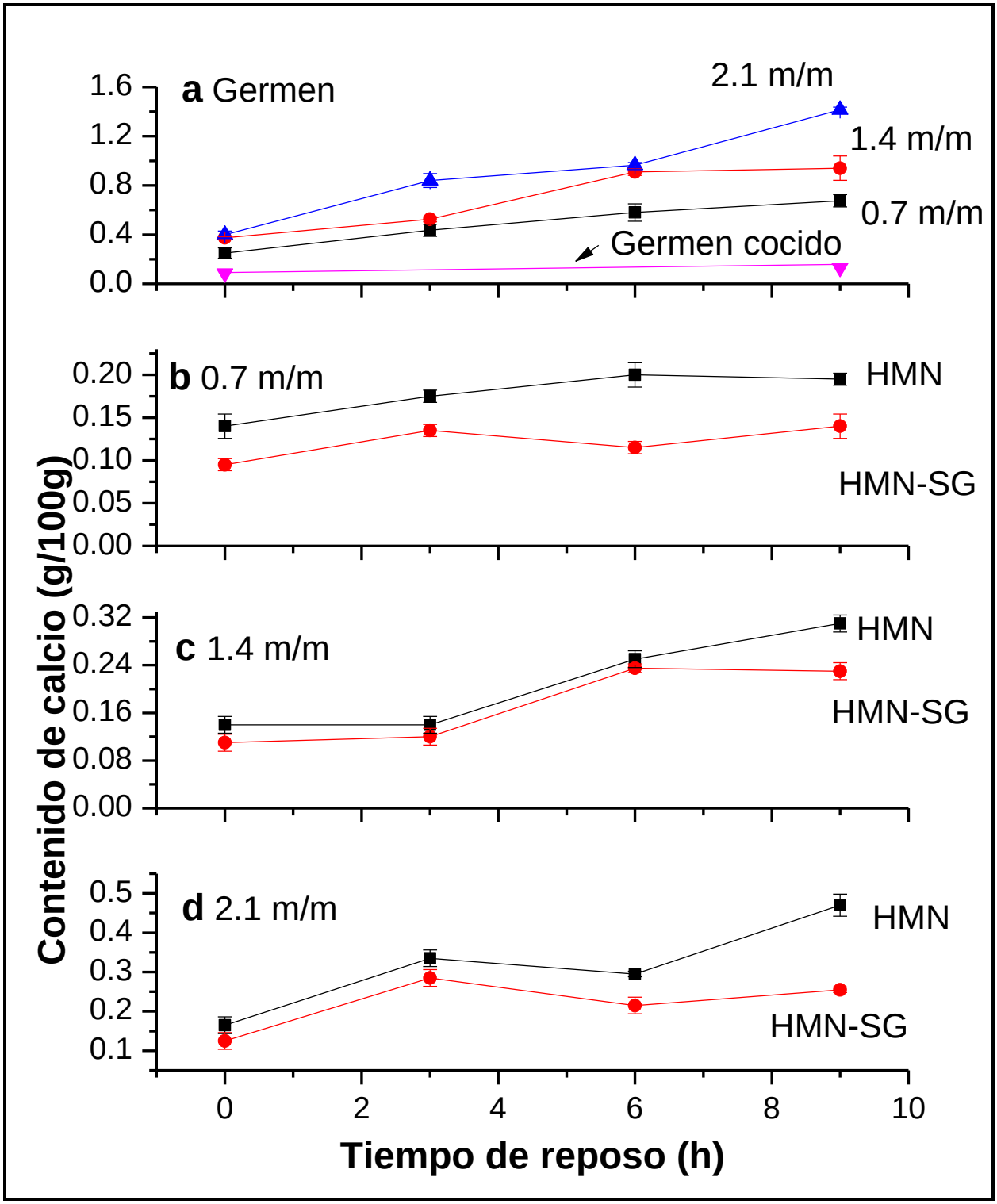


Figura 32. Contenido de Calcio (g/100g) en germen y harinas de maíz. Se probaron germen cocido y nixtamalizado, harinas de maíz nixtamalizado (HMN) y harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG).

7.3 Caracterización por difracción de Rayos X (DRX) del germen de maíz extraído del grano de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso

En la Figura 33 se presenta los patrones de difracción de rayos X del germen extraído de grano crudo (GCr), germen extraído de grano cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ y del germen extraído de grano de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso. En las Figura 33a, b, c y d se pudo observar un único pico cercano al valor de 20 ° en la escala 2θ y en donde fue evidente que la intensidad de este pico es mayor en el germen cocido y germen nixtamalizado respecto al germen extraído del grano sin procesar (GCr). En este sentido Fanta et al. (1999) han asociado un valor máximo a 2θ = 19.7 ° a la presencia de una estructura tipo V constituida por cadenas helicoidales de amilosa y ácidos grasos, los cuales se forman durante la cocción o calentamiento de un sistema (alimento) integrado por almidón-lípido. La formación de un complejo amilosa-ácido graso se confirma por la presencia de otros picos a 2θ = 7.4 ° y 13.1 ° en un sistema modelo constituido por una solución de amilosa y ácidos grasos puros con diferente longitud y grado de insaturación (Zabar et al., 2009). Estos picos no fueron detectados en las muestras analizadas probablemente debido a la presencia de compuestos amorfos en el germen como por ejemplo la hemicelulosa del parénquima localizado en el escutelo (Saulnier et al., 1993) y los mismos ácidos grasos libres como el ácido linoleico el cual no es cristalino en condiciones atmosféricas normales (Zabar et al., 2009).

Finalmente, cabe destacar que en el germen nixtamalizado 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo (Figura 33d) se detectó un pico en el valor de 29.52 ° en la escala 2θ con una dirección cristalográfica en 104 el cual fue identificado como $Ca(CO)_3$ (calcita) de acuerdo con el software del equipo (PDF # 47-1743). Este resultado concuerda con el análisis de microscopía electrónica de barrido (inserto de la Figura 31h), en donde se observaron acumulaciones de gránulos blancos en el germen de maíz nixtamalizado a estas condiciones de proceso y que corresponden al $Ca(CO)_3$.

Cabe mencionar que no se observó en los difractogramas para germen nixtamalizado con 0.7 y 1.4 m/m $Ca(OH)_2$ y 6 h de reposo (Figura 33c) el pico característico a la calcita en 29.52 °, debido a que esta calcita se encuentra en su forma amorfa por lo que el equipo no lo pudo identificar. A este respecto, resulta importante señalar que la técnica de difracción de rayos X es semicuantitativa y debe estar presenta más del 1 % del compuesto de interés para que esté sea identificado, por lo que posiblemente solo se observó $Ca(CO)_3$ en las muestras procesadas con altas concentraciones de $Ca(OH)_2$.

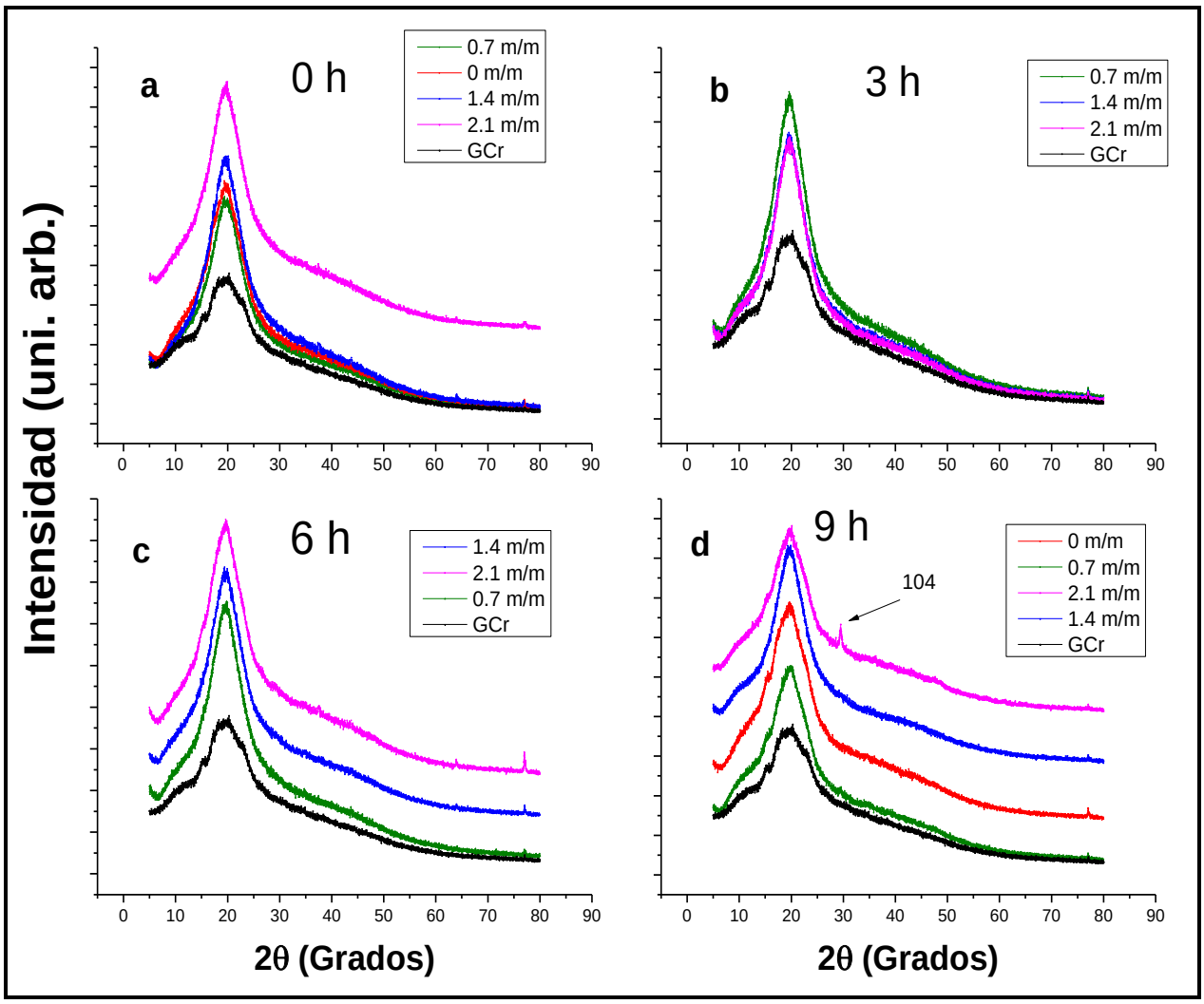


Figura 33. Difractogramas del germen de maíz. Se muestra germen crudo (GCr), germen cocido y nixtamalizado a 92 ºC.

7.4 Perfiles de viscosidad de las harinas de maíz nixtamalizado y cocido con germen y sin germen a diferentes condiciones de proceso

En la Figura 34 se presentan los perfiles de viscosidad de las harinas de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso con germen (HMN) y sin germen (HMN-SG), así como de las harinas elaboradas con maíz cocido desgerminadas (HMN-SG) y con germen (HMC) en ausencia de $Ca(OH)_2$ y por último, harinas con maíz crudo desgerminadas (HMCr-SG) y con germen (HMCr). La Figura 34a corresponde a las harinas de maíz crudo, donde se observó que las HMCr-SG mostraron una reducción del 10 % en el valor del pico máximo de viscosidad respecto a las HMCr. Cozzolino et al. (2013) analizaron los perfiles de viscosidad para harinas de cebada con diferentes contenidos de ácidos grasos y reportaron que la amilosa (componente del almidón) forma un complejo de inclusión amilosa-ácido graso que al hidratarse forma un gel debido al incremento en los sitios de unión amilosa-lípido dando lugar a la formación de agregados menos compactos y que son los responsables del incremento en la viscosidad del sistema. En la HMCr los cuerpos grasos permanecen recubiertos por una matriz proteica, los cuales se observaron en la Figura 30d. Esto da a entender que no se forma el complejo amilosa-lípidos y el perfil de viscosidad está gobernado solo por los cambios en el almidón.

El pico de viscosidad aparente en las harinas de maíz crudo con germen (6627 cP) fue mayor con respecto al pico de viscosidad promedio en las harinas de maíz cocido y nixtamalizado con germen cuyo valor promedio se detectó entre 5615 y 5698 cP, respectivamente. Oosten (1982) reportó que los cationes bivalentes como el calcio puede estar involucrados en la formación de enlaces más fuertes entre las moléculas de almidón con respecto a otros iones causando una disminución en la capacidad de absorción de agua por parte de los gránulos de almidón.

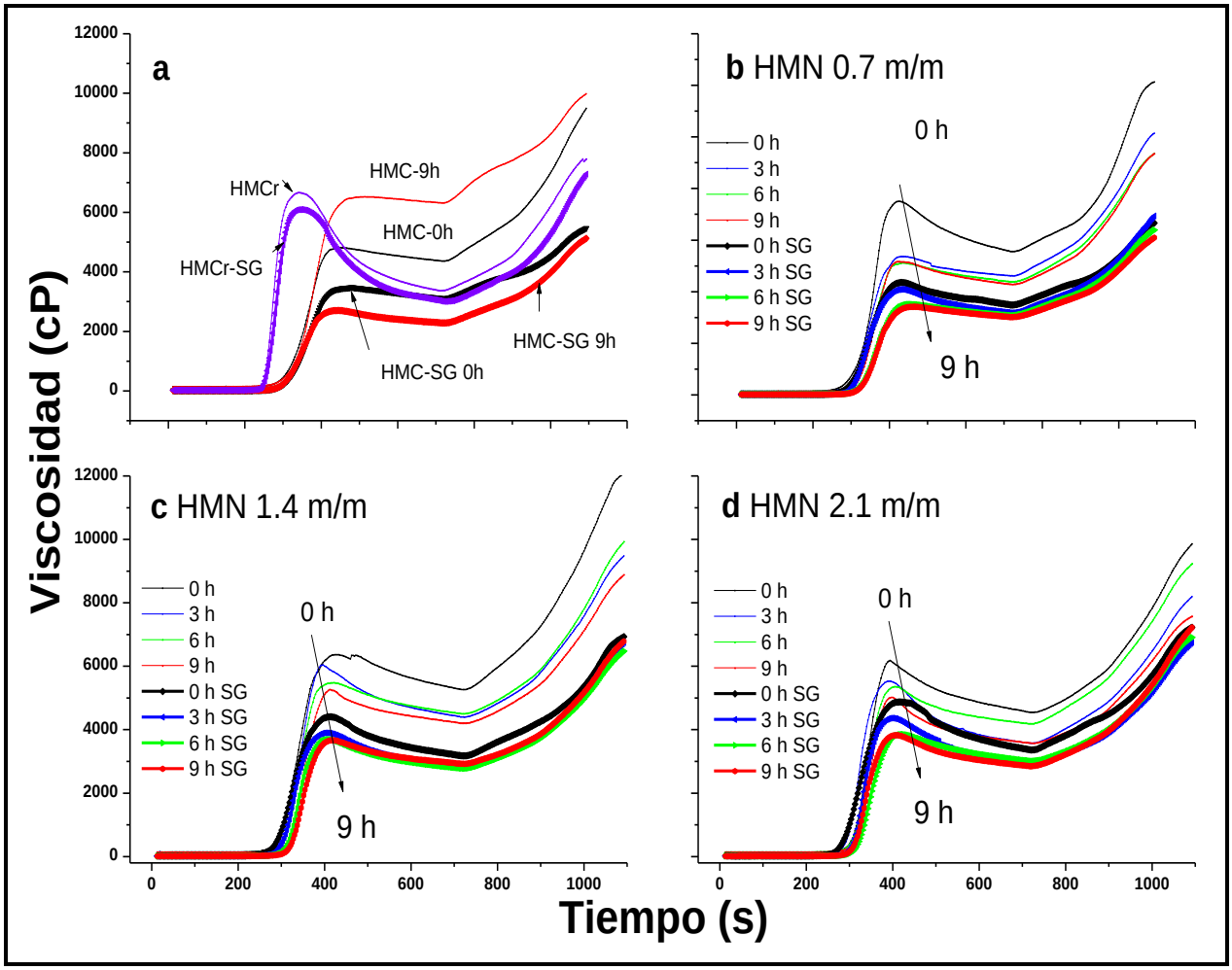


Figura 34. Perfiles de viscosidad para harinas de maíz. La figura muestra harinas de maíz crudas con germen (HMCr) y sin germen (HMCr-SG), harinas de maíz cocidas con germen (HMC), y sin germen (HMC-SG), harinas de maíz nixtamalizado con germen (HMN) y sin germen (HMN-SG) a diferentes condiciones de proceso.

En los perfiles de viscosidad de HMC y HMC-SG (Figura 34a) se observó una diferencia de aproximadamente el 40% en el pico de viscosidad para harinas cocidas sin germen con respecto a las harinas con germen. Este mismo comportamiento se observó en las harinas de maíz nixtamalizado con diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ (Figura 34b, c y d) Estos resultados están acorde con lo reportado por Martínez-Bustos et al. (2001), donde evaluaron la viscosidad aparente en masas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen y observaron que el pico de viscosidad aparente en las masas con germen fue significativamente mayor con respecto a la masa de maíz nixtamalizado sin

germen. Los autores mencionan que la presencia de fibras solubles y de lípidos saponificados mejoran las propiedades reológicas de la masa; así mismo señalan que otros factores como el tamaño de las partículas que constituyen la masa, el contenido de sólidos disueltos, la proporción de gránulos de almidón libres y los lípidos dispersos son factores que afectan la textura de la masa.

En la Figuras 34b, c y d se observó un ligero incremento en el pico de viscosidad aparente al aumentar la concentración de $Ca(OH)_2$ utilizado durante la nixtamalización, ya que en las harinas procesada a una concentración de 0.7 % m/m de $Ca(OH)_2$ el promedio del pico máximo de viscosidad fue menor a 5500 cP, , en tanto que en las harinas procesadas a 1.4 y 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ el promedio del pico máximo de viscosidad se observó entre 5500 y 6000 cP, excepto para las muestras con 0 h de reposo Estos resultados están acorde con Santiago-Ramos et al. (2015), quienes detectaron un incremento en el pico de viscosidad en harinas de maíz nixtamalizado a través de un método ecológico al incrementar la concentración de $Ca(OH)_2$ empleada durante el proceso. Al respecto, Pineda-Gómez et al. (2011, 2012b) sugieren que durante la nixtamalización los iones de calcio en la solución alcalina se difunden en las regiones amorfas de la amilosa de los gránulos de almidón para romper sus enlaces intermoleculares lo que provoca un mayor hinchamiento de dichos gránulos.

Finalmente, se destaca que en las harinas nixtamalizadas con 9 h de reposo el pico de viscosidad aparente fue menor con respecto a las harinas nixtamalizadas con tiempos de reposo más reducidos, esto puede atribuirse al fenómeno de anillado del almidón (annealing), el cual se presenta durante la etapa de reposo del maíz cocido con $Ca(OH)_2$ (nixtamal), donde el almidón experimenta un reacomodo molecular que involucra interacciones entre las cadenas de amilosa-amilopectina incrementándose la cristalinidad de la molécula de almidón. El annealing además de disminuir el pico de viscosidad en el nixtamal aumenta la temperatura en la que se incrementa la viscosidad de las muestras (Santiago-Ramos et al., 2015).

7.5 Distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz nixtamalizado y cocidas con germen y sin germen a diferentes condiciones de proceso

En la Figura 35 se presenta la distribución del tamaño de partícula de las harinas de maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ y harinas de maíz nixtamalizado con germen a diferentes condiciones de proceso. Como ya se señaló anteriormente, la distribución del tamaño de partícula se representa a través de una gráfica diferencial que presenta la forma característica de una campana de Gauss.

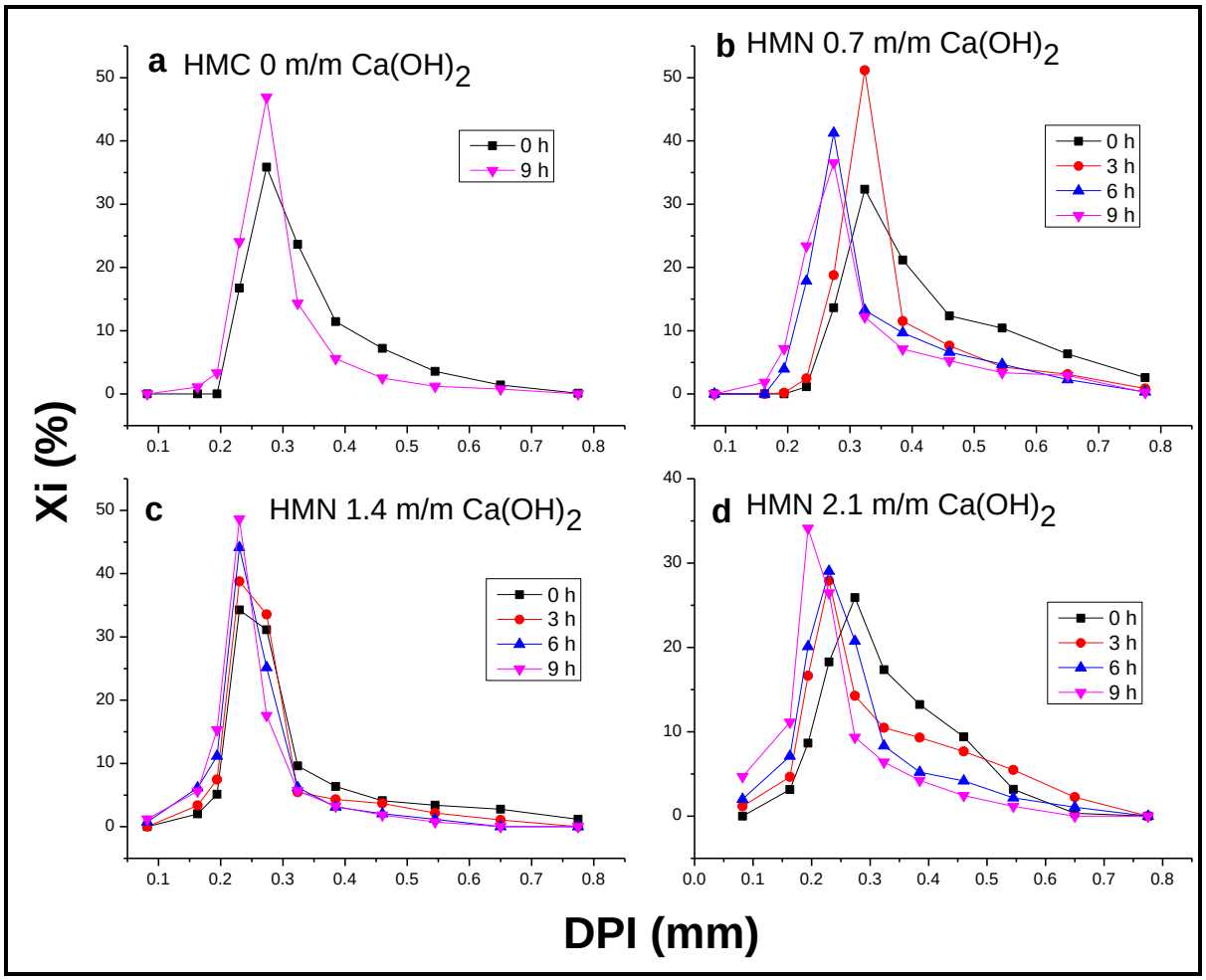


Figura 35. Gráfica diferencial de distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz cocido (HMC) y harinas de maíz nixtamalizado (HMN)

En esta Figura se puede observar que tanto en las harinas nixtamalizadas como en las cocidas en ausencia de álcali, al incrementarse el tiempo de reposo la dispersión de la curva es menor y por lo tanto, la homogeneidad del tamaño de las

partículas se incrementa. Otro aspecto importante a considerar es el hecho de que al aumentar la concentración de $Ca(OH)_2$ empleado en el proceso de nixtamalización, el diámetro promedio de las partículas es menor, es decir, se obtiene un mayor porcentaje de partículas finas. Estos resultados son similares a lo reportado por Cornejo-Villegas et al. (2013) quienes determinaron la distribución de tamaño de partículas en harinas de maíz QPM nixtamalizado por el método tradicional y demostraron que a tiempos de reposo prolongados se obtienen harinas con un mayor contenido de partículas finas. Por el contrario, las harinas de maíz nixtamalizado sin $Ca(OH)_2$ resultaron muy heterogéneas, debido a que presentaron una distribución de tamaño de partícula muy amplia, en donde el porcentaje de partículas granulares gruesas es mayor con respecto a las harinas de maíz nixtamalizadas. La Figura 36 corresponde a la distribución del tamaño de partícula de las harinas de maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ y harinas de maíz nixtamalizado desgerminadas, donde se observa que la distribución de partículas en las harinas presenta la misma tendencia de las harinas nixtamalizadas con germen. Esto indica que a tiempos de reposo prologados la uniformidad de las harinas es mayor; así mismo, al incrementarse la concentración de $Ca(OH)_2$ utilizado durante el proceso se obtienen harinas con una granulometría más fina. De la misma manera, en las harinas elaboradas con maíz cocido sin $Ca(OH)_2$ y desgerminadas el porcentaje de partículas gruesas es mayor comparada con las harinas de maíz procesadas con $Ca(OH)_2$. Estos resultados están acorde con Gutiérrez et al. (2013) quienes detectaron que el tamaño de partícula predominante en las harinas de maíz cocido sin $Ca(OH)_2$ es mayor con respecto al tamaño de partícula en las harinas de maíz nixtamalizado por el método tradicional. En este sentido resulta relevante mencionar que las partículas gruesas confieren ciertas características de textura en las frituras (los productos son más crujientes), debido a que éstas partículas destruyen la retícula (constituida por almidón, agua y otros componentes) que se forma en la masa, reduce el inflado de la tortilla durante su cocción y disminuye la absorción de aceite durante el freído; en tanto que las partículas más pequeñas (finas) son responsables de una mayor absorción de agua, viscosidad, cohesividad, plasticidad y suavidad en la masa. Esto significa que las harinas que se utilizan

para preparar tostadas y tamales requieren una granulometría más gruesa que la harinas destinadas a la elaboración de tortillas (Gómez et al.1987).

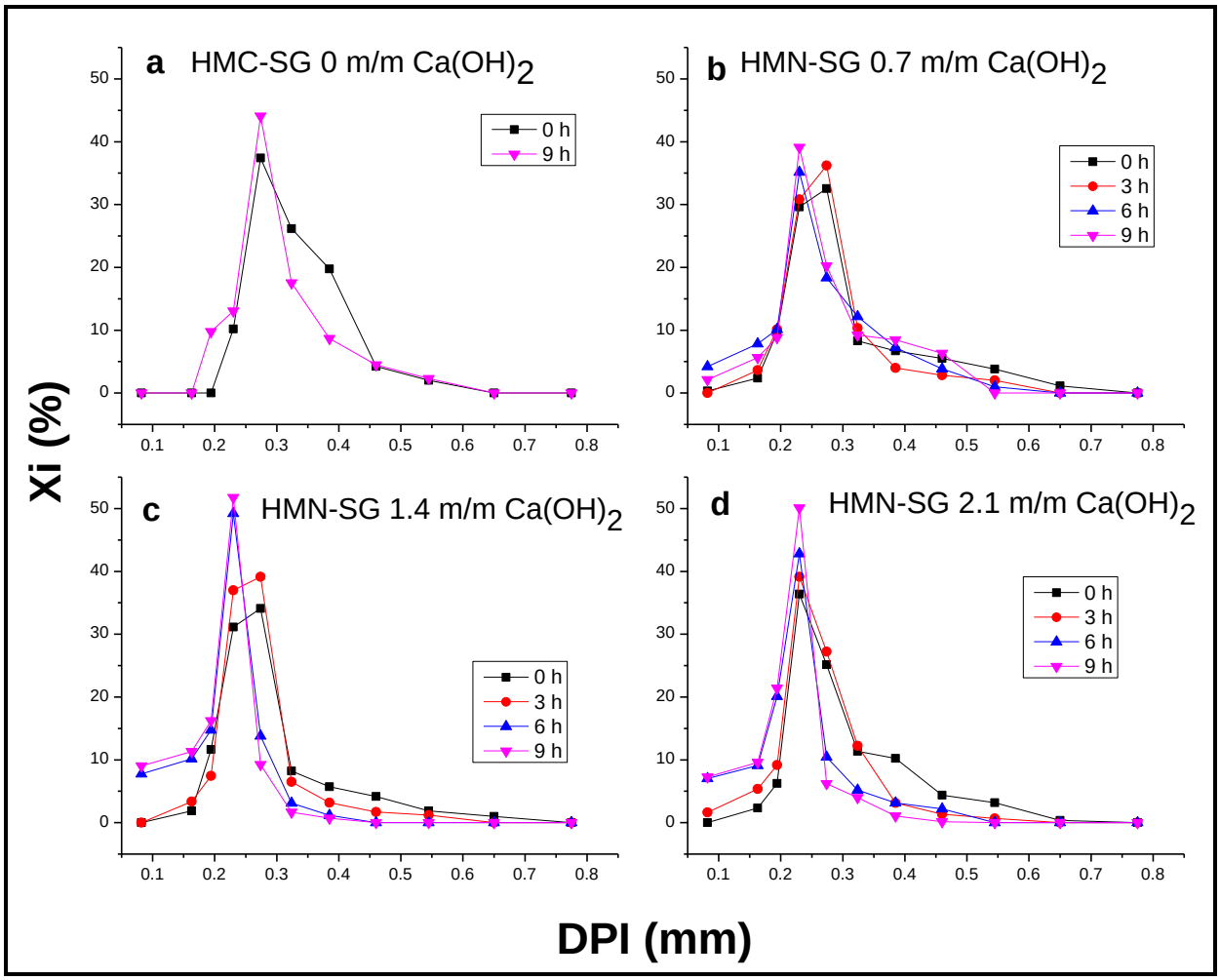


Figura 36. Gráfica diferencial de distribución de tamaño de partícula de harinas de maíz cocido sin germen (HMC-SG) y harinas de maíz nixtamalizado sin germen (HMN-SG).

En el Cuadro 16 se muestra el rendimiento obtenido para las harinas de maíz cocido sin $Ca(OH)_2$ y las harinas nixtamalizadas con y sin germen. En este cuadro se muestra evidencia de las harinas sin germen presenten una granulometría más adecuada comparada con la que presentan las harinas nixtamalizadas con germen, ya que las primeras cumplen con el requisito solicitado por la norma NMX-046-S-1980, donde se indica que el 75 % del producto deberá pasar el tamiz o malla 60 USA.

Cuadro 16. Rendimiento de harinas de maíz nixtamalizado y cocidas (HMN, HMN-SG y HMC, HMC-SG).

NMX 046-S-1980					
HMN/ HMC			**HMN-SG/HMC-SG**		
TR (h)	**$Ca(OH)_2$ (g)/ 100 g maíz**	**Rendimiento (g)**	**TR (h)**	**$Ca(OH)_2$ (g)/ 100 g maíz**	**Rendimiento (g)**
0	0	16.73	0	0	10.18
9	0	42.01	9	0	22.82
0	0.7	1.15	0	0.7	41.97
3	0.7	2.65	3	0.7	44.57
6	0.7	21.82	6	0.7	57.34
9	0.7	32.41	9	0.7	55.7
0	1.4	41.4	0	1.4	44.63
3	1.4	49.55	3	1.4	47.79
6	1.4	62.18	6	1.4	**81.88**
9	1.4	70.78	9	1.4	**88.32**
0	2.1	30.07	0	2.1	44.95
3	2.1	50.37	3	2.1	55.27
6	2.1	58.26	6	2.1	**79.01**
9	2.1	**76.38**	9	2.1	**88.41**

Las harinas que cumplen con este rendimiento harinero son las harinas sin germen elaboradas con 1.4 y 2.1 % m/m $Ca(OH)_2$ y en ambos casos con 6 y 9 horas de reposo, incluso las harinas preparadas con 2.1 % de álcali presentaron un mayor porcentaje de finos. En el caso de las harinas con germen únicamente aquellas procesadas con 2.1 % m/m $Ca(OH)_2$ y 9 horas de reposo cumplieron con la NMX-046-S-1980. Estos resultados corroboran lo reportado por Flores-Farías et al. (2002) quienes mencionan que los factores que inciden en el tamaño medio de las partículas en las harinas son la dureza del grano, el tiempo de nixtamalización, la cantidad de álcali empleada, el tiempo de reposo la velocidad de la molienda y el cribado de la harina. Por otro lado, se ha señalado que la funcionalidad de las harinas de maíz nixtamalizado está más relacionado con las características intrínsecas del almidón que se encuentra retenido en los tamices que con respecto a la distribución del tamaño de la partícula (Sahai et al. 2001).

Los resultados que se reportan en el Cuadro 16 se contraponen con lo señalado por Cornejo-Villegas et al. (2013), ya que estos autores sugieren que las partículas finas están constituidas mayoritariamente por el endospermo externo del grano, o

bien, por fracciones del pericarpio y del germen, en tanto que las partículas gruesas están conformadas por las capas más internas del endospermo. En este contexto es importante destacar que en este trabajo se obtuvo un mayor porcentaje de partículas finas en las harinas de maíz nixtamalizado sin germen debido a que esta estructura contiene un alto porcentaje de lípidos, los cuales aglomeran las partículas y forma grumos indeseables en el producto. No obstante, se presume que las masas preparadas con harinas de maíz nixtamalizado sin germen, pueden tener menor fuerza mecánica que las masas correspondientes a las harinas con germen.

Según el análisis de interacciones entre el rendimiento de las harinas y las variables de proceso; se pudo observar que las harinas con germen preparadas a 1.4 m/m y 2.1 m/m $Ca(OH)_2$ tienen el mismo rendimiento para un tiempo de reposo de 3 h. De igual manera, se observó una interacción entre harinas de maíz sin germen a 1.4 m/m y 2.1 m/m $Ca(OH)_2$ para 6 horas de reposo (Anexo).

7.6 Contenido de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico en aceite de germen de maíz

En el Cuadro 17 se muestra el contenido de ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO) y ácido linoleico (AL) en el aceite extraído del germen crudo y germen de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso de nixtamalización, concentraciones de $Ca(OH)_2$ de 0, 0.7, 1.4 y 2.1 m/m y tiempo de reposo de 0, 3, 6 y 9 h. No se presentó el contenido de ácido mirístico, debido a que es uno de los ácidos grasos que se encuentra en menor proporción (1-3 %) en el aceite de maíz.

El contenido de AP, AE, AO y AL en el aceite del germen de maíz crudo es similar al que presentan otras variedades de maíz cultivadas en Centroamérica (Bressani et al. 1990). Las variaciones en el contenido de ácidos grasos se atribuyen en parte, a las variaciones genéticas del maíz, así como a las prácticas de cultivo de cada región (Weber, 1987; Bressani et al., 1990).

Cuadro 17. Contenido de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico en el germen de maíz nativo y nixtamalizado a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo.

Muestras		Ácido Palmítico (g/100g)	Ácido Esteárico (g/100g)	Ácido Oleico (g/100g)	Ácido Linoleico (g/100g)
TR (h)	$Ca(OH)_2$ (%)				
0	0	14.14	2.67	33.26	49.91
9	0	14.08	2.75	34.26	48.89
0	0.7	13.86	2.63	34.47	49.02
3	0.7	13.97	2.60	34.16	49.25
6	0.7	14.20	2.74	33.82	49.20
9	0.7	13.79	2.62	34.50	49.06
0	1.4	14.07	2.70	34.92	48.29
3	1.4	13.76	2.55	34.09	49.58
6	1.4	13.70	2.79	33.89	49.61
9	1.4	14.24	2.71	33.92	49.11
0	2.1	14.05	2.63	33.96	49.35
3	2.1	13.91	2.71	34.41	48.94
6	2.1	13.79	2.64	34.32	49.22
9	2.1	14.07	2.67	33.51	49.73
Control	Control	14.04	2.59	33.66	49.64

En lo que respecta al contenido de AP, AE, AO y AL en el aceite del germen de maíz nixtamalizado se pudo observar que el proceso de nixtamalización no promueve cambios significativos en el contenido de éstos ácidos grasos en comparación con el aceite del germen crudo. Estos resultados están acorde con Bressani et al. (1990) quienes analizaron productos nixtamalizados (tortillas) de cuatro variedades de maíz.

No obstante, es importante señalar que aun cuando estos autores no observaron modificaciones en el perfil de ácidos grasos, el contenido de grasa total en el producto disminuyó por efecto de la nixtamalización. En este contexto Martínez-Flores et al. (2006) señalan que la cantidad de aceite extraído a partir del grano de maíz nixtamalizado se reduce a medida que la cantidad de $Ca(OH)_2$ empleado durante el proceso de nixtamalización (0 a 3 % m/m) se incrementa. Esta reducción en el contenido de aceite extraído en el grano nixtamalizado a mayores concentraciones de $Ca(OH)_2$ empleado puede atribuirse en parte a que

los lípidos del maíz se liberan durante las etapas de cocción y de reposo a través de reacciones de saponificación, en donde los ácidos grasos están involucrados.

Por otro lado, López-Duarte et al. (2009) mostraron que la concentración de ácido linoleico en harina de maíz nixtamalizado por el método industrial disminuye de manera significativa después de 180 días de almacenamiento. Estos datos sugieren que los ácidos grasos del aceite de maíz podrían ser más susceptibles al almacenamiento que al proceso de nixtamalización *per se*.

7.7 Índice de peróxido y saponificación

En el Cuadro 18 se presentan los resultados obtenidos para los análisis de índice de saponificación (IS) e índice de peróxido (IP) del aceite de maíz extraído de las muestras experimentales. Es importante señalar que ambos índices son algunos de los parámetros más importantes que se emplean para determinar la inocuidad y la vida útil de un producto (López-Duarte et al., 2009).

La peroxidación de los lípidos o auto-oxidación produce una modificación en la estructura de los triglicéridos que son parte de los componentes mayoritarios del aceite de maíz. La formación de radicales libres y su reacción con ácidos grasos poliinsaturados como por ejemplo, el ácido linoleico y linolénico promueven una reacción en cadena que da lugar a la formación de peróxidos e hidroperóxidos. Estos productos se cuantifican a través del índice de peróxido (IP).

Como se puede observar en el Cuadro 18 el IP para el aceite extraído del maíz crudo fue de 0.54 meq O_2/kg el cual se encuentra por abajo del valor máximo permitido por la NMX-F-223-SCFI-2011 que es de 2.0 meg O_2/kg.

Cuadro 18. Índice de saponificación e Índice de peróxido.

NMX F-174-SCFI-2006			NMX F-154-SCFI-2005		
TR (h)	**$Ca(OH)_2$ (w/w)**	**IS (mg KOH/g aceite)**	**TR (h)**	**$Ca(OH)_2$ (w/w)**	**IP (mEq de peróxido/ Kg aceite)**
0	0	183.10 ± 5.38a	0	0	150.88 ± 1.35a
9	0	185.12 ± 2.76a	9	0	102.64 ± 2.26b
0	0.7	183.80 ± 8.77a	0	0.7	128.09 ± 7.99c
3	0.7	185.79 ± 6.07a	3	0.7	82.93 ± 3.05d
6	0.7	180.88 ± 1.81ab	6	0.7	78.15 ± 6.12d
9	0.7	178.25 ± 6.05b	9	0.7	98.91 ± 5.20b
0	1.4	184.97 ± 1.02a	0	1.4	150.01 ± 7.84a
3	1.4	181.42 ± 4.17ab	3	1.4	46.60 ± 6.04e
6	1.4	182.92 ± 0.32ab	6	1.4	94.28 ± 8.03b
9	1.4	186.00 ± 2.29a	9	1.4	101.70 ± 7.94b
0	2.1	183.50 ± 9.20a	0	2.1	104.41 ± 3.36b
3	2.1	187.03 ± 1.53a	3	2.1	64.55 ± 4.14f
6	2.1	188.70 ± 0.99a	6	2.1	88.42 ± 6.59d
9	2.1	207.19 ± 1.79c	9	2.1	118.39 ± 6.45c
Crudo	Crudo	198.91 ± 0.96d	Crudo	Crudo	0.54 ± 0.08g

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$)

Es importante destacar que los aceites extraídos del maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ presentaron un IP significativamente mayor ($p \leq 0.05$) al aceite del maíz crudo, lo que confirma que las temperaturas elevadas a la que es sometido un alimento durante su procesamiento o almacenamiento constituyen uno de los factores que predisponen a la formación de especies reactivas de oxígeno como son el radical hidroxilo y el anión superóxido, los cuales reaccionan con los ácidos grasos insaturados iniciando la reacción de oxidación en cadena (López-Duarte y Vidal-Quintanar, 2009).

El IP de los aceites extraídos del maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso se encontró en un rango de 64.55 hasta 150.88 (meq O_2/kg), estos resultados son similares a los reportados por Yahuaca-Juárez et al. (2013a). Los valores más altos para el IP se observaron a un tiempo de reposo de 0 h y a una concentración de $Ca(OH)_2$ de 0.7 y 1.4 % (m/m). Estos datos están acorde con Yahuaca-Juárez et al. (2013a, 2013b) quienes observaron un mayor IP

en masas de maíz nixtamalizado elaboradas a tiempos de reposo y concentraciones de $Ca(OH)_2$ reducidos, atribuyéndolo al hecho de que a estas condiciones de proceso la reacción de oxidación de los lípidos se encuentra en la primera etapa, en donde la formación de peróxidos es mayor. Por otra parte, resulta importante señalar que el IP disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en el aceite del maíz nixtamalizado a 3 h de reposo y en las tres concentraciones de $Ca(OH)_2$ empleadas. La reducción en el IP se puede asociar a la inestabilidad y degradación de los hidroperóxidos y peróxidos resultantes de la etapa de propagación de la reacción de oxidación que conlleva a la formación de productos secundarios como aldehídos, cetonas y lactonas correspondientes a la etapa final de la reacción de oxidación. Estos productos son los responsables de los aromas y sabores desagradables de los alimentos que contienen lípidos oxidados (rancidez) (Vidal-Quintanar et al., 2003, López-Duarte y Vidal-Quintanar, 2009; Winkler-Moser y Breyer, 2011). El incremento del IP en las muestras analizadas después de las 3 h de reposo puede estar asociado a que la reacción de oxidación de los lípidos (reacción en cadena) se prolonga dando lugar a la formación de otros productos oxidantes primarios, como por ejemplo los radicales de ácidos grasos que pueden reacción con los ácidos grasos insaturados originando nuevos radicales de ácidos grasos Yahuaca-Juárez et al. (2013a). Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la concentración de $Ca(OH)_2$ y el tiempo de reposo tienen un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) en el IP del aceite extraído de las muestras experimentales, lo cual está acorde con Yahuaca-Juárez et al. (2013b) quienes señalaron que en un modelo de predicción estos dos factores explican el 73.16 % de la variación observada en el IP del aceite de maíz nixtamalizado a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ (0.75, 1.5 y 2.25 % m/m) y tiempos de reposo (8, 12 y 16 h).

Los lípidos se pueden clasificar, en saponificables (susceptibles a hidrólisis en un medio alcalino) y no saponificables. Los lípidos saponificables contienen en su estructura ésteres de ácidos grasos libres. Los segundos son esteroles, carotenoides, tocoferoles cuya estructura química difiere notablemente de los primeros. Los lípidos saponificables son mayoritarios en el germen y

representan el 93 % de los lípidos presentes en esta estructura. A su vez los triglicéridos son los componentes mayoritarios en este grupo de lípidos, con una abundancia relativa de un 85 % (Weber et al., 1987).

El índice de saponificación es inversamente proporcional al peso molecular de los ácidos grasos libres presentes en una muestra de aceite o grasa. El índice de saponificación para el aceite obtenido del maíz nativo (crudo) fue de 198.91 mg KOH/ g aceite, el cual resultó similar al valor máximo permitido por la NMX-F-030-SCFI 1985 (197 mg KOH/ g aceite). Por el contrario, el IS del aceite de maíz cocido en ausencia de $Ca(OH)_2$ a 0 y 9 h de reposo, así como en los aceites extraídos a diferentes concentraciones de $Ca(OH)_2$ excepto el aceite extraído del maíz nixtamalizado con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo fue menor al observado en el aceite de maíz nativo y al valor máximo permitido por la NMX-F-030-SCFI 1985 (Cuadro 18). El IS de los aceites extraídos del germen de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso fue en promedio de 185.61 g/KOH g aceite, lo que representa una disminución del 6.68 % del valor observado en el aceite obtenido del grano crudo. Se ha reportado que este decremento es debido a que durante el proceso de nixtamalización los triglicéridos son hidrolizados dando lugar a la formación de ácidos grasos libres, de tal forma que los iones de calcio procedentes del $Ca(OH)_2$ utilizado durante el proceso de nixtamalización reaccionan con el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres reduciendo en consecuencia los sitios de unión con los iones potasio cuando se lleva a cabo el análisis de IS (Rendón-Villalobos et al., 2009; Yahuaca-Juárez et al. 2013a). Es importante destacar que en este estudio el valor máximo para el IS se observó en el aceite extraído del maíz nixtamalizado con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo, en tanto que el valor mínimo se detectó en el aceite extraído del maíz nixtamalizado con 0.7 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo. Estos resultados indican que el efecto de la concentración de $Ca(OH)_2$ en el IS es significativamente mayor ($p \leq 0.05$) respecto al tiempo de reposo. La presencia de $CaCO_3$ (calcita) detectada mediante difracción de rayos X en el germen de maíz nixtamalizado con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo sugieren que este compuesto puede actuar como un interferente en el análisis reaccionando con el

ácido clorhídrico empleado en la determinación del IS de acuerdo a la reacción que se indica en la Ec. 11 elevándose de esta forma el IS en la muestra obtenida bajo estas condiciones de proceso. Por el contrario, en las muestras de aceite en donde no se detectó la presencia de $CaCO_3$ el IS fue menor con respecto al aceite extraído del grano nativo (crudo).

$$CaCO_3 + 2\ HCl \qquad CaCl_2 + CO_2 + H_2O \qquad \textbf{Ec. 11}$$

7.8 Cuantificación de aflatoxinas

La cuantificación de aflatoxinas se realizó a través de los cromatogramas obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se inició por la identificación de los picos característicos de cada aflatoxina (AFB_1, AFB_2, AFG_1 y AFG_2) mediante el empleo de estándares a una concentración de 64 ng mL^{-1} como se muestra en la Figura 37.

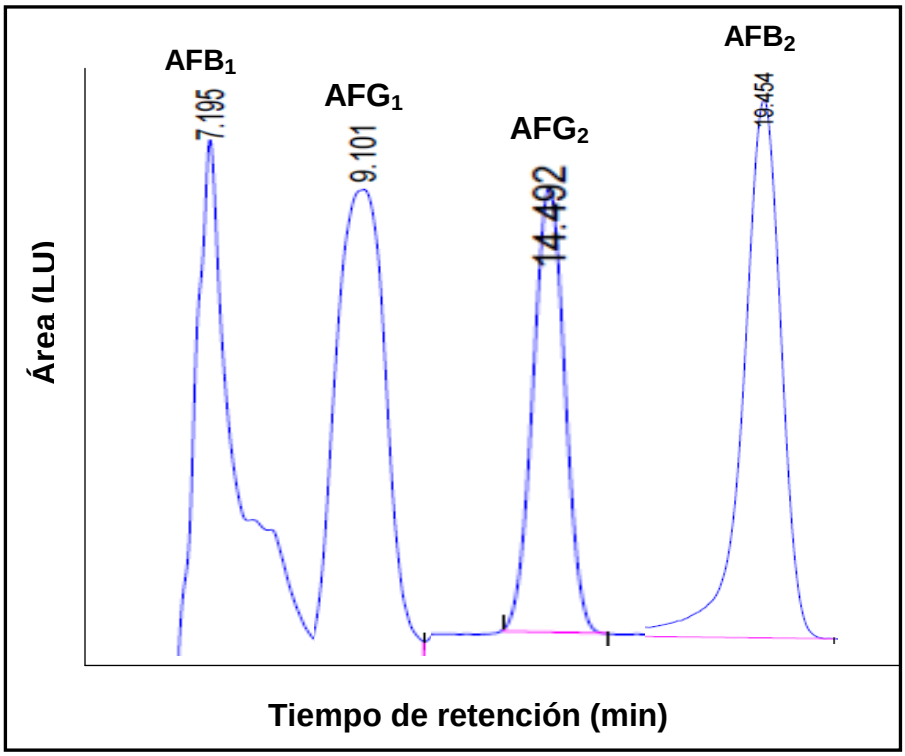


Figura 37. Picos cromatográficos correspondientes a las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 obtenidos en el HPLC a una concentración de 64 ng mL^{-1}.

7.8.1 Curvas de calibración de las aflatoxinas

Las curvas de calibración son necesarias para la cuantificación de aflatoxinas y se realizan a partir de concentraciones de 1 µg mL^{-1} para cada una de las 4 soluciones estándar correspondientes a cada aflatoxina (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2). Se prepararon las diluciones en acetonitrilo para obtener las curvas de calibración de cada aflatoxina. Las curvas de calibración se realizaron de acuerdo al área bajo la curva de cada pico cromatográfico en su tiempo de retención (Tr) característico para cada aflatoxina para sus diferentes concentraciones (diluciones).

En el Cuadro 19 se presenta la regresión lineal correspondiente a las curvas de calibración de las aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2), los tiempos de retención promedio detectada para cada aflatoxina y el coeficiente de correlación obtenido en cada una de las regresiones.

Cuadro 19. Regresiones lineales obtenidas en las curvas de calibración para las aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2, tiempos de retención promedio detectados para cada aflatoxina y coeficientes de correlación.

Aflatoxina	Tiempo de retención (min)	Regresión lineal	Coeficiente de correlacion (R^2)
AFB_1	7.195 - 8.983	0.5557x + 0.8245	0.9809
AFB_2	18.965 - 23.272	0.5683x + 1.4339	0.9954
AFG_1	7.681 - 9.541	0.0697x + 0.3942	0.9871
AFG_2	12.214 - 14.492	1.5848x – 5.4446	0.9933

7.8.2 Identificación y cuantificación de Aflatoxinas en HMN y HMN-SG

El contenido de aflatoxinas detectadas en las harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen se presentan en el Cuadro 20. El análisis de varianza de los tratamientos evidenció que los factores que tienen un efecto significativo en el contenido de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y aflatoxinas totales son la presencia del germen y la concentración de $Ca(OH)_2$ empleado en el proceso de nixtamalización ($p<0.05$); específicamente las concentraciones de 1.4 y 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ Únicamente el tiempo de reposo tuvo un efecto significativo en el contenido de las aflatoxinas B_2 ($p=0.0458$) y G_1 ($p=0.0445$). Con respecto a la

aflatoxina G_2 ninguno de los tres factores analizados (germen, concentración de $Ca(OH)_2$, y tiempo de reposo tuvo un efecto significativo en el contenido de esta aflatoxina.

En el Cuadro 20 se puede observar que el contenido de aflatoxinas totales en harinas de maíz nixtamalizado con germen y en harinas desgerminadas es mayor a 12 µg kg^{-1}, siendo este valor el límite de tolerancia establecido en la por la NOM-247-SSA1-2008. Es importante destacar que la aflatoxina B_2 es la que se encuentra en mayor concentración en las harinas de maíz nixtamalizado y crudo con germen cuyo valor promedio fue de 2.86 ng mL^{-1}. En este sentido es importante destacar que el consumo de maíz contaminado con aflatoxinas durante un tiempo prolongado pueden acumularse en el ADN y formar aductos que pueden desencadenar una mutación y posiblemente el desarrollo de un cáncer (Carvajal et al., 2004; Castillo-Urueta et al., 2011).

En general, se observó que las aflatoxinas B_2 y G_1 son las que se encontraron en mayor concentración en las harinas con germen siendo su concentración promedio de 2.86 y 1.69 ng mL^{-1}, respectivamente. Como se mencionó anteriormente el grado de toxicidad de las aflatoxinas de acuerdo a sus características teratogénicas, mutagénicas y cancerígenas es de acuerdo al siguiente orden: $AFB_1 > AFG_1 > AFG_2 > AFB_2$ (Castillo-Urueta et al., 2011). Sin embargo, las aflatoxinas se pueden acumular en el ADN, formar aductos y llegar a generar un cáncer (Hsieh, 1983).

Los grupos de aflatoxinas G y B se diferencian en las enzimas involucradas en su biosíntesis, no obstante de que tienen el mismo producto intermediario en la ruta biosintética. Las enzimas involucradas en la formación de las aflatoxinas del grupo G son menos estables con respecto a las aflatoxinas del grupo B (Yabe et al., 1999). Las diferentes especies de hongos producen diferentes tipos de aflatoxinas, concretamente *Aspergillus flavus* únicamente produce aflatoxina B_1 y B_2, en tanto que *Aspergillus parasiticus* produce aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2. Por lo anterior, se puede inferir que el maíz empleado en la elaboración de las muestras experimentales estuvo contaminado con ambos

hongos, aunque es probable que estuviera mayormente expuesto a *Aspergillus parasiticus.* Los factores biológicos como la exposición a diferentes especies de *Aspergillus*, los factores físicos entre los que se puede mencionar la humedad relativa de la atmósfera y, del sustrato, así como los factores bioquímicos y ambientales favorecen la producción de aflatoxinas. De la misma manera las condiciones de almacenamiento inadecuadas, como son una temperatura entre 20 a 40 °C, una humedad de 10 a 20 % y una humedad relativa en el aire de 70 a 90 %, potencializan la producción de aflatoxina (Cotty y García, 2007; Castillo-Urueta et al., 2011).

El proceso de nixtamalización bajo las condiciones en que se llevó a cabo en este trabajo no eliminó las aflatoxinas AFB_1, AFB_2 AFG_1 y AFG_2 en las harinas de maíz crudo, cocido y nixtamalizado con germen. Estos resultados coinciden con Abbas et al. (1988) quienes identificaron diversas micotoxinas en muestras de maíz, tortillas de maíz y de trigo e indicaron que las aflatoxinas, la zearalenona y el desoxinivalenol (DON) no se destruían con el tratamiento alcalino a una concentración de un 2 % m/m de $Ca(OH)_2$ y a temperaturas de cocción de 110 °C.

Cuadro 20. Concentraciones de aflatoxinas (ng mL^{-1}) en harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen, harinas de maíz cocido con germen y sin germen y harinas de maíz crudo.

		Concentración ng mL^{-1}					
Harinas de maíz crudo, cocido y nixtamalizado con germen		**AFB_1**	**AFB_2**	**AFG_1**	**AFG_2**	**Aflatoxinas totales**	**Aflatoxinas totales /Kg harina**
m/m $Ca(OH)_2$	**TR (h)**						
0	9	0.08 ± 0.01	2.01 ± 2.19	0.73 ± 0.39	0	2.82	1128
0.7	3	0.13 ± 0.07	1.26 ± 2.12	1.61 ± 1.22	0	2.99	1196
0.7	9	0.11 ± 0.05	2.27 ± 2.00	1.00 ± 1.09	0	3.38	1352
1.4	3	0.77 ± 1.07	4.59 ± 0.32	2.53 ± 1.01	0	7.89	3156
1.4	9	0.12 ± 0.10	4.35 ± 0.43	0.54 ± 0.49	0.33 ± 0.57	5.34	2136
2.1	3	0.10 ± 0.13	3.63 ± 1.46	0.43 ± 0.51	0.27 ± 0.46	4.43	1772
2.1	9	0.52 ± 0.79	3.91 ± 0.04	5.6 ± 9.69	0.39 ± 0.37	10.42	4168
Crudo	Crudo	0.14 ± 0.05	0.86 ± 1.38	1.11 ± 1.29	0	2.11	844
Promedio		**0.25**	**2.86**	**1.69**	**0.12**	**4.92**	
		Concentración ng mL^{-1}					
Harinas de maíz cocido y nixtamalizado con sin germen		**AFB_1**	**AFB_2**	**AFG_1**	**AFG_2**	**Aflatoxinas totales**	**Aflatoxinas totales /Kg harina**
m/m $Ca(OH)_2$	**TR (h)**						
0	9	0.99 ± 0.69	0.08 ± 0.01	9.65 ± 8.22	0	10.72	4288
0.7	3	1.68 ± 0.16	0.09 ± 0.04	19.74 ± 1.91	0.17 ± 0.30	21.68	8672
0.7	9	2.09 ± 0.06	0.017 ± 0.02	23.81 ± 2.09	0	25.92	10368
1.4	3	0.99 ± 0.81	0.09 ± 0.06	11.52 ± 9.80	0	12.60	5040
1.4	9	3.76 ± 0.49	0.037 ± 0.06	44.28 ± 5.77	0	48.08	19232
2.1	3	2.63 ± 0.10	0.05 ± 0.04	30.97 ± 1.16	0	33.65	13460
2.1	9	2.38 ± 0.06	0.017 ± 0.02	27.76 ± 0.40	0	30.16	12064
Promedio		**2.07**	**0.05**	**23.96**	**0.02**	**26.12**	

La concentración promedio de aflatoxina B_2 en harinas sin germen fue de 0.05 ng mL^{-1} (Cuadro 20), la cual disminuyó significativamente (p= 0.0) con respecto a la concentración de 2.86 ng mL^{-1} en harinas con germen. A este respecto es importante mencionar que las aflatoxinas se encuentran principalmente en el germen del maíz y se acumulan en las partes ricas en ácidos grasos (Payne, 1983). Estos resultados indican que la reducción en el contenido de aflatoxina B_2 en las harinas sin germen es debido a que para esta aflatoxina en particular, los componentes del germen no ejercen un efecto protector contra las aflatoxinas como el observado para las aflatoxinas B_1 y G_1 en donde el contenido de estas dos aflatoxinas fue mayor en las harinas de maíz desgerminado en comparación con las harinas de maíz nixtamalizado con germen. En cuanto al contenido de aflatoxinas totales, éste fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en las harinas nixtamalizadas con germen con respecto a las harinas de maíz nixtamalizadas sin germen, lo que indica que el germen al ser una estructura con alto contenido de ácidos grasos entre éstos el ácido linoléico y otros componentes como flavonoides, monoterpenos y carotenoides pueden tener la capacidad de suprimir la activación metabólica de las aflatoxinas específicamente la B_1 y la G_1. En lo que respecta a la aflatoxina G_2 no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de esta aflatoxina entre las harinas de maíz nixtamalizado con germen y sin germen.

8. CONCLUSIONES

- Las transformaciones morfológicas del germen de maíz nixtamalizado a diferentes condiciones de proceso son resultado de la difusión y fijación del calcio en esta estructura. Estos cambios involucran un engrosamiento del tejido vascular del escutelo y del embrión, así como la disgregación de gránulos de almidón y cuerpos grasos, los cuales son más evidentes a altas concentraciones de $Ca(OH)_2$ y tiempos de reposo prolongados.

- El germen de maíz nixtamalizado contribuye significativamente ($p \leq 0.05$) en el contenido de calcio de las harinas de maíz nixtamalizado, la cantidad de calcio fijado fue mayor en las harinas elaboradas con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo.

- El pico de viscosidad aparente en las harinas de maíz nixtamalizado sin germen fue menor con respecto a las harinas de maíz nixtamalizado con germen; esto indica que la presencia del germen es importante para el desarrollo de las propiedades reológicas en las harinas. Los valores más altos en el pico de viscosidad aparente se observaron a 1.4 y 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo.

- Las harinas elaboradas con altas concentraciones de $Ca(OH)_2$ (1.4 y 2.1 % m/m) y tiempos de reposo prolongados (6 y 9 h) presentaron un alto porcentaje de partículas finas, lo que permitió que dichas harinas cumplieran con el requerimiento establecido por la norma NMX-046-S-1980. Las harinas sin germen fueron las que presentaron una granulometría más adecuada acorde con la Norma Mexicana anteriormente señalada.

- El proceso de nixtamalización no promueve cambios significativos ($p \leq 0.05$) en el contenido de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico del aceite extraído del germen nixtamalizado en comparación con el aceite del germen crudo en las condiciones de proceso analizadas (0.7, 1.4 y 2.1 % m/m $Ca(OH)_2$ y 0, 3, 6, 9 h de reposo).

- La presencia de compuestos amorfos en el germen evitó identificar de manera inequívoca mediante análisis de difracción de rayos X la presencia de complejos amilosa-lípidos en las muestras analizadas. Sin embargo, se detectó por primera vez la presencia de $CaCO_3$ en el germen de maíz nixtamalizado, específicamente en las muestras procesadas con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y 9 h de reposo.

- La concentración de $Ca(OH)_2$ y el tiempo de reposo tienen un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en el índice de peróxido de los aceites extraídos del germen de maíz cocido en ausencia de álcali y maíz nixtamalizado. Los valores obtenidos para este índice en todas las muestras experimentales se encuentran por arriba del límite máximo permitido por la NMX-F-223-SCFI-2011 para el aceite puro de maíz (2 meq/Kg).

- El efecto de la concentración de $Ca(OH)_2$ en el índice de saponificación de los aceites de maíz extraídos de las muestras experimentales es significativamente mayor ($p \leq 0.05$) con respecto al tiempo de reposo. El valor máximo para el índice de saponificación se observó en el aceite extraído del maíz nixtamalizado con 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ y con 9 h de reposo (207.19 ± 1.79 mg KOH/g aceite), el cual es mayor al límite máximo permitido por la NMX-F-030-1985 para aceite puro de maíz (197 mg KOH/g aceite).

- Las concentraciones de 1.4 y 2.1 % m/m de $Ca(OH)_2$ empleadas en el proceso de nixtamalización del grano de maíz y la presencia del germen tienen un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la disminución del contenido de las aflatoxinas A_1 y G_1. No obstante, el contenido de aflatoxinas totales en todas las muestras experimentales fue mayor a 12 µg kg^{-1} que es el límite máximo permitido por la NOM-247-SSA1-2008.

9. REFERENCIAS

Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Rosiles, R. and Carvajal, M. 1988. Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn. Cereal Chem. **65 (1)**: 15-19.

Acosta-Osorio, A.A., Herrera-Ruiz, G., Pineda-Gómez, P., Cornejo-Villegas, M.A., Martínez-Bustos, F., Gaytán, M. and Rodríguez-García, M.E. 2001. Analysis of the apparent viscosity of starch in aqueous suspension within agitation and temperature by using rapid visco analyzer system. Mech Eng. **1**: 110-124.

Aguilera, B.A., Rivera, M.J., Trujillo, A.H., Tamayo, O.J., Barreira, M.E. and Rodríguez, M.E. 2013. Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calciuria in adult Mexican women. Food and Nutr. Res. **57**:19106

Anderson, H. W., Nehring, E. W., and Wichser, W. R. 1975. Aflatoxin contamination of corn in the field. Food Chem. **23**: 75–782.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 17th edition. Método 970.44. Washington, D.C. USA.

Bello-Pérez, L. A., Osorio, D. P., Agama-Acevedo, E., Núñez-Santiago, C., Paredes-López, O. 2002. Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. Agrociencia. ***36* (3):** 319-328.

Bennett, J.W., and Klich, M. 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. **16 (3):** 497-516.

Bertonili, C.A. 2010. Starches “Characterization, Properties and Applications”. Cap.1. In: Trends in starch applications. Ed. CRC Press. p 3. USA.

Bierenbaum, M.L., Fleischman, A.I., and Raichelson, R.I. 1972. Ten-year experience of modified-fat diets on younger men with coronary heart-disease. Lipids. **7**: 202-206.

Bressani, R., Rooney, L.W., and Serna, S. O. 1997. Nutritional quality of nixtamalized corn masa flour. Achievement though fortification with micronutrients. In: Fortification of Corn Masa Flour with Iron and/or Other Nutrients. A Literature and Industry Experience Review. p 120. Washington, DC.

Bressani, R., Turcios, J. C., Reyes, L., Mérida, R. 2001. Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central. Arch. Latinoam. Nutr. **51(3)**:309-313.

Bressani, R., Turcios, J. C., de Ruiz, A. S., and Palacios de P. P. (2004). Effect of processing conditions on phytic acid, calcium, iron and zinc contents of lime-cooked maize. J. Agr. Food Chem. **52**: 1157-1162.

Boyer, C.D., and Shannon, J.C. 1987. Carbohydrates of the kernel. In: Corn: Chemistry and Technology. S A Watson, P E Ramstad. Ed. AACC. St. Paul, MN. USA. p 253-272.

Burgos-Hernández, A., López-García, R., Njapau, H., and Park, D.L. 2001a. Anti-mutagenic compounds from corn. Food Addit Contam. **9**: 797-809.

Burgos-Hernández-Hernández, A., López-García, R., Njapau, H., and Park, D.L. 2001b. Partial chemical/structural elucidation of anti-mutagenic compounds from corn. Toxicology. **166**:161–170.

Carvajal, M., Espinosa-Aguirre, J.J., Moctezuma, M.G., Gonsebatt, M.E., Rojo, F., and Pérez-López, I. 2004. Minimal amount of aflatoxin B_1 to produce a mutation in the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA 98. Revista Mexicana de Micología. **19**: 71-79.

Castillo-Urueta, P., Carvajal, M., Méndez, I., Meza, F., and Gálvez, A. 2011. Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. Food Addit. Contam:Part B. **4(1)**: 42-51.

CISAN. 2011. Ácidos grasos omega 6. Más que una moda, una cuestión de salud. Fundación del Consejo Internacional de Información Alimentaria. p 3. Argentina.

Cornejo-Villegas, M.A., Acosta-Osorio, A.A., Rojas-Molina, I., Gutiérrez-Cortéz, E., Quiroga, M.A., Gaytán, M., Herrera, G., and Rodríguez-García, M.E. 2010. Study of the physicochemical and pasting properties of instant corn flour added with calcium and fibers from nopal powder. J Food Eng. **96**: 401

Cornejo-Villegas, M.A., Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Del Real-López, A., Zambrano-Zaragoza, M., Martínez-Vega, V., and Rodríguez-García, M.E. 2013. Physicochemical, morphological, and pasting properties of nixtamalized flours from quality protein maize and its particle distribution. Food Sci Technol Int. **53(1)**: 81-87.

Cotty, P.J. and García, .R.J 2007. Influences of climate on aflatoxins producing fungi and aflatoxins contamination. Int J Food Microbiol. **119**: 109-115.

Cozzolino, D., Roumeliotis, S., and Eglinton, J. 2013.Relationships between starch pasting properties, free fatty acids and amylose content in barley. Food res int. **51**: 444-449.

Cuevas, R., Figuraueroa, E., and Racca, E. 1985. The technology for industrial production of precooked corn flour in Venezuela. Cereal Food World. **30**: 707–712.

De Arriola, M.C., De Porres, E., De Cabrera, S., De Zepeda, M., Rolz C. 1988. Aflatoxins fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. J Agric Food Chem. **36:** 530–533.

Denke, M.A., Fox, M.M., and Schulte, M.C. 1993. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. J Nutr. **123**: 1047-1053.

Dolezal, A.L., Obrian, G.R., Nielsen, D.M., Woloshuk, C.P., Boston, R.S., and Payne, G.A. 2013. Localization, morphology and transcriptional profile of *Aspergillus flavus* during seed colonization. Mol. Plant Pathol. **14**: 898–909.

Dolezal, L.A., Shu, X., Obrian, R.G., Nielsen, M.D., Woloshuk, P.C., Boston, S.R., and Payne, A.G. 2014. Aspergillus flavus infection induces trasncriptional and physical changes in developing maize kernels. Front Microbiology. **384**: 1-10.

Eaton, D.I., Ramsdell, H.S., and Neal, G.E. 1994. Biotransformación de Aflatoxinas. Cap. 3. En: Eaton, D.L. and Groopman, J.J Ed. The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, Inc. p 544. San Diego, USA.

Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W., and Cotty, P.J. 2002. Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1576**: 171-175.

Fanta, G.F., Shogren, R.L, Salch, J.H. 1999. Steam jet cooking of high-amylose starch-fatty acid mixtures. An investigation of complex formation. Carbohydrate polymers. **38**: 8091-8096.

FAO. 1993. Alimentación y nutrición. Cap.1. En: El maíz en la nutrición humana. EAAP Publ. No. 25. p 1. Roma, Italia.

FAO. 2009. La FAO en México. Más de 60 años de cooperación. Cap.3. En: Nutrición y seguridad alimentaria. AGROANALISIS AC. Ed. p 58. Roma, Italia.

Fernández-Muñoz J. L., Rodríguez, M. E., Pless, R. C., Martínez-Flores, H. E., Leal, M., Martínez, J. L., and Baños, L. 2002. Changes in nixtamalized corn flours dependent postcooking steeping time. Cereal Chem. ***79(*1)**: 162-166.

Fernández-Muñoz, J.L., Rojas, M.I., González, M.L., Leal, M., Valtierra, M.E., San Martin, M.E., and Rodríguez, M.E. 2004. Study of calcium ion diffusion in components of maize kernels during traditional nixtamalization process. Cereal Chem. **81(1)**: 65-69.

Fernández-Muñoz, J.L., Acosta-Osorio, A.A., Zelaya-Angel, O., and Rodríguez-García, M.E. 2011. Effect of calcium content in the corn flour on RVA profiles. J Food Eng. **102**: 100-103.

Firozi, P.F., Aboobaker, V.S., Bhattacharya, R.K., 1986. Modulation by certain factors of metabolic activation of aflatoxin B1 as detected in vitro in a simple fluorimetric assay. Chem. Biol. Interact. **58**: 173–184.

Fleischman, A.I., Yacowitz, H., Hayton, T., and Bierenbaum, M.L. 1967. J Nutr. **91**: 151-15.

Flores-Farias, R., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., Ríos, E. 2002. Caracterization of commercial nixtamalized maize flours. Agrociencia. **36**: 557-567.

Garcia-Uriguen, P. 2012. La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios, Cámara Nacional de la Industria de Transformación. p 17. México, D.F.

Giddey, C., Brandt, J., and Bunter, G. 1977. The detoxification of oil-seed cakes polluted by aflatoxins: research and development of an industrial process. Ann Technol Agric. **27**: 331-338.

Gross-Steinmeyer, K., and Eaton, L.D. 2012. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. Toxicology. **299**: 69– 79.

Gómez-Aldapa, C.A., Matínez-Bustos, F., Figuraueroa-Cárdenas, J.D., Ordorica-Falomir, C.A., and González-Hernández, J. 1996. Cambios en algunos componentes químicos y nutricionales durante la preparación de tortillas de maíz elaboradas con harinas instantáneas obtenidas por extrusión continua. Arch. Latinoam. Nutr. **46(4)**: 315-324.

Gómez, M.H., Rooney, L.W., Waniska, R.D., and Pflugfelder, R.L. 1987. Dry corn masa flours for tortilla and snack food production. Cereal Food World. **32**: 372.

Gómez, M.H., Waniska, R.D., and Rooney, L.W. 1991. Starch characterization of nixtamalized maize flour. Cereal Chem. **68(6)**: 578- 582.

González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figuraueroa, J.M., and Sánchez-Sinencio, F. 2004. Physicochemical changes in the hull of corn grains during their alkaline cooking. Food Chem. **52**: 3831–3837.

Gutiérrez, E., Rojas, M.I., Pons, H.J., Guzmán, H., Aguas, A.B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios, F.A., Herrera, G., and Rodríguez, M.E. 2007. Study of calcium ion diffusion in nixtamalized Quality protein maize as a function of cooking temperature. Cereal Chem. **84(2)**: 186-194.

Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Rojas, A., Arjona, J.L., Cornejo-Villegas, M.A., Zepeda-Benítez, Y., Velázquez-Hernández, R., Ibarra-Alvarado, C., Rodríguez-García, M.E. 2010. Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process. J of Cereal Sci. **51**: 81-88.

Herrera, C.M., Vega y León, S., Tolentino, G.R., Fernández, G.B., and González, D.G., 2006. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: Nutrición, bioquímica y salud. REB. ***25*(3)**: 72.

Hsieh, D.P.H. 1983. Metabolism and transmission of mycotoxins. In: Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins. National Research Center. p 151. Cairo, Egypt.

Hoseney, R.C. 1991. Principios de Ciencia y Tecnología de los cereales. Cap 2. Department of grain science and industry. Ed. Acribia, S.A. Kansas State University. p 148. España.

IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. **82**: 1-556.

ARC. 2012. Chemical agents and related ocupations: A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. **100**: 225-248.

IOF. 2006. Factores nutrimentales y salud ósea. En: Bone Appétit: El rol de los alimentos y la nutrición en el desarrollo y mantenimiento de huesos fuertes. Ed. Dra. Jo Cadogan. Universidad de Tufts. p 3 y 4 Boston, MA, USA.

Khan, M.N., Des Rosiers, M.C., Rooney, L.W., Morgan, R.G., and Sweat, V.E. 1982. Corn tortillas: Evaluation of corn cooking procedures. Cereal Chem. **59(4)**: 279.

Keller, N. P., Butchko, R., Sarr, B., and Phillips, T. D. 1994. A visual pattern of mycotoxin production in maize kernels by *Aspergillus* spp. Phytopathology. **84**: 483–488.

Klaus, J.L., and Karel, K. 1991. Handbook of cereal science and technology. **23(2)**: 321-325.

Knothe, G., and Dunn, R.O. 2003. Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. J Am Oil Chem Soc. **80**: 1021–1026.

Landry, J., and Moreaux, T. 1980. Distribution and amino acid composition of protein groups located in different histological parts of maize grain. J Agric. Food Sci. **28**: 1186-1191.

Lam, H.S., and Proctor, A. 2003. Lipid hydrolysis and oxidation on the surface of milled rice. J Am Oil Chem Soc. **80**: 563–567.

Logan, D.C., Millar, A. H., and Sweetlove, L.J. 2001. Drial biogenesis during germination of maize embryos. Plant Physiol. **125**: 662-672.

Liu, Z., Gao, J., Yu J. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. J Stor Prod Res. **42**: 468–479.

López-Duarte, A.L., and Vidal-Quintanar, R.L. 2009. Oxidation of linoleic acid as a marker for shelf life of corn flour. Food Chem. **114**: 478–483.

Malkin, Y.A. 1994. Rheology Fundamentals. Cap.1. In: Introduction Rheology: subject and language. Ed. ChemTec Publishing. p 1. Toronto, Canadá.

Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., and Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Ocurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem Toxicol. **60**: 218.

Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H.E., San Martín-Martínez, E., Sánchez-Sinencio, F., Chang, Y.K., Barrera-Arellano, D., and Rios, E. 2001. Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalization process. J of the Sci of Food and Agr. **81**: 1455–1462.

Martínez-Flores, H.M., Garnica-Romo, M.G., Romero, V.J.U., and Yahuaca J.B. 2006. Evaluating the quality of lipids during alkaline cooking of corn. J Food Lipids. 1**3**:178-180.

McKillop, I.H., Moran, D.M., Jin, X. and Koniaris, L.G. 2006. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. J Surg Res. **136(1)**: 125-135.

Méndez-Montealvo, G., García-Suárez, F.J., Paredes-López, O., and Bello-Pérez, L.A. 2007. Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. J Cereal Sc. **48(2)**: 420-425.

Moctezuma-Zarate, M.G. 2002. Mutagénesis por aflatoxina B_1 presente en el maíz y tortillas y la nixtamalización como posible control. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. p 1-99. Distrito Federal, México.

Montemayor, E. and Rubio, M. 1983. Alkaline cooked corn flour: technology and uses in tortilla and snack products. Cereal F W. **28**: 571-577.

Nakai, V.K., Rocha, L.O., Gonzalez, E., Fonseca, H., Ortega, E.M. and Correa, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanuts variety. Food Chem. **106**: 285-290.

NMX-F-046-S-1980. Harina de maíz nixtamalizado. Norma Mexicana. Secretaria de fomento Industrial.

NMX-187-SSA1/SCFI-2002. Norma Mexicana de Maíz Nixtamalizado Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

NMX-154-SCFI-2005. Norma Mexicana de Maíz Nixtamalizado Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

NMX-F-174-SCFI-2006. Norma Mexicana de Maíz Nixtamalizado Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

Oosten, B.J. 1982. Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. Sarch/Stärke. **34**: 233-239.

Palacios-Fonseca, A.J., Vazquez-Ramos, C., and Rodríguez-García, M.E. 2009. Physicochemical characterizing of industrial and traditional nixtamalized corn flours J Food Eng. **93**: 45-51.

Payne, G.A. 1983. Epidemiology of aflatoxin formation by *A. flavus*. In: Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn. Southern. Diener, U.L., Asquith, R.L.,Dickens, J.W., Eds. Auburn University: Opelika, AL.

Payne, G., Thompson, D., Lillehoj, E., Zuber, M., and Adkins, C. 1988. Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. Phytopathology. **78**: 1376–1380.

Pineda-Gómez, P., Coral, D.F., Ramos-Rivera, D., Rosales-Rivera, A., and Rodríguez-García, M.E. 2011. Thermo-alkaline treatment: A process that changes the termal properties of corn starch. Procedia Food Sci. **1**:370-378.

Pineda-Gómez, P., Acosta-Osorio, A.A., Coral, D.F., Rosales-Rivera, A.,Sanchez-Echeverri, L.A., Rojas-Molina, I., and Rodríguez-García, M.E. 2012a. Physicochemical characterization of traditional and commercial instant corn flours prepared with threshed white corn. CyTA J. Food. doi:10.1080/19476337.2011.65369.

Pineda-Gómez, P., Rosales-Rivera, A., and Rodríguez-García, M.E. 2012b. Effect of the thermo-alkaline treatment over the thermal degradation of corn starch. Starch/Stäke. **64**: 776-785.

Price, R.L., and Jorgensen, K.V. 1985. Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. J Food Sci. **50**: 347–349.

Porter, N.A., Caldwell, S.E. and Mills, K.A. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids. **30**: 277–290.

Reed, A.R. 2001. Fijación del calcio en la nixtamalización: Estudio de las sales de calcio de ácidos carboxílicos alifáticos. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico nacional. CICATA. p. 10, 22, 11, 13, 23. México,D.F.

Reese, B. N., Payne, G. A., Nielsen, D.M., and Woloshuk, C. P. 2011. Gene expression profile and response to maize kernels by *Aspergillus flavus*. Phytopathology. **101**: 797–804.

Rendón-Villalobos, J.R., Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J.J., Osorio-Díaz, P., and Tovar, J. 2009. Composition and characteristics of oil extracted from flaxseed-added corn tortilla. Food Chem. **117**: 83-87.

Rodríguez, M.E., Yáñez-Limón, J.M., Alvarado, J.J., Vargas, H., Sáchez-Sinencio, F., Figuraueroa, F., Martínez, B. F., González-Hernández, J., Silva, M. D., and Miranda, L. C. M. 1996. Influence of the structural changes during alkaline cooking on the thermal, rheological, and dielectric properties of maize tortillas. Cereal Chem. **(73)**: 593–600.

Rodríguez, E.M., Serna O.S., Sinencio, S.F. 2008. Cambios nutrimentales en el maíz inducidos por el proceso de nxtamalización.Cap.1. En: Nixtamalización del maíz a la tortilla Aspectos nutrimentales y toxicológicos. Ed. Editores. p 21. Querétaro, México.

Rojas, M.I., Gutiérrez, E., Cortés, A.M., Campos, S.L., Hernández, U.M., Arjona, L.J., Cornejo, A. and Rodríguez, M.E. 2009. Effect of temperature and steeping time on calcium and phosphorus content in nixtamalized corn flours obtained by traditional nixtamalization process. Cereal Chem. **86(5)**: 516-520.

Rooney, L.W., de Suhendro, E.L., 1999. Perspectives on nixtamalization (alkaline cooking) of maize for tortillas and snacks. Cereal F W. **(7)**: 466-470.

Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chem. **59(1)**: 57-67.

Santiago-Ramos, D., Figuraueroa-Cárdena, J.D., Vélez-Medina, J., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M. and Morales-Sánchez, E. 2015. Effects of annealing and concentration of calcium salts on thermal and rheological properties of maize starch during and ecological nixtamalization process. Cereal Chem. (In press)
SE; Secretaría de Economía. 2012. Análisis de la cadena de valor maíz-tortilla: situación actual y factores de competencia local. Cap.1 En: Producción, consumo e inventarios mundiales de maíz. p.2, 5. México.

Sahai, D., Buendía, M. O. and Jackson, D. S. 2001. Analytical technique for understanding nixtamalized maize flour particles size distribution and functionality relationships in masa flour sample. Cereal Chem. **78(1)**: 14-18.

Saulnier, L., Mestres, C., Doublier, J.L., Roger, P., Thibault, J.F. 1993. Studies of polysaccharides solubilized during alkaline cooking of maize kernel. J of Cereal Sci **17**: 267-276.

Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., and Migheli, Q. 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD*, *aflO*, and *aflP* by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates *of Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J Food Microbiol. **98**: 201– 210.

Serna-Saldívar, S. O. 1996. Morfología y estructura química. En: Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. Published by AGT. p 37. México.

Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A., and Essigmann, J. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B_1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. Carcinogenesis. **22**: 535-545.

Smela, ME., Hamm, ML., Henderson, PT., Harris, CM., Harris, TM., Essigmann, JM. 2002. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. PNAS. **99(10)**: 6655-60.

Spencer, H., Kramer, L. and Osis, D. 1988. Do protein and phosphorus cause calcium loss. J. Nutr. **118**:657-660.

Steyn, P.S., Vleggaar, R., and Wessels, P.L. 1980. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. Chap. 4. In: The biosynthesis of mycotoxins. Steyn, P.S. Ed. Academic Press. p 105.New York, U.S.A.

Sweeney., M.J., and Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. FEMS Microbiology Letters*.* **175(2)**: 149-163.

Torres, P., Guzmán-Ortíz, M., and Ramírez-Wong, B. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. J Agric Food Chem. **49**: 2825–2829.

Valderrama-Bravo, C., Rojas-Molina, A., Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Oaxaca-Luna, O., De la Rosa-Rincón, E., M.E. Rodríguez-García. 2010. Mechanism of calcium uptake in corn kernels during the traditional nixtamalization process: Diffusion, accumulation and percolation. *J* Food Eng. **10**: 126-132.

Vázquez-Durán, A., Díaz-Torres, R., Ramírez-Noguera, P., Moreno-Martínez, E., and Méndez-Albores, A. 2014. Cytotoxic and genotoxic evaluation of tortillas produced by microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin-contaminated maize. Food Sci. **5**: 1024-1029.

Vidal-Quintanar, R., L, Love., M.H., Love, J.A., White, P.J., Johnson, L.A. 2003. Lipid-autoxidation-limited shelf-life of nixtamalized instant corn “masa”. J Food Lipids*.* **10**: 153-163.

Watson, S. A. 2003. Description, development, structure, and composition of the corn kernel. Chap. 3. In: Corn: Chemistry and Technology. Ed. White, P.J. and Johnson, L. A. American Association of Cereal Chemists, Inc. p 69. St. Paul, MN.USA.

Weber, E.J. 1987. Lipids of the kernel. In: Corn: Chemistry and Technology. S.A.Watson and P.E. Ramstad. Eds. American Association of Cereal Chemists. p 316. St. Paul, MN.

White, J.P and Johnson, L.A. 2003. Corn: Chemistry and technology. Ed. American Association of cereal chemistry In. p 3. St. Paul. MN, USA.

Williams, M.C. 2000. Dietary fatty acids and human health. Ann. Zootech. **49**: 165–180.

Williams, J. and Wilson, D. 1999. Informe sobre el problema de aflatoxinas de la castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia: Documento Técnico 71/1999. p 4.Universidad de Georgia, USAID/Bolivia.

Winkler-Moser, J.K., Breyer, I. 2011. Composition and oxidative stability of crude oil extacts of corn germ and distillers grains. Ind Crop Prod. **33**: 572-578.

Wolf, M.J., Buzan, C.L., MacMasters, M.M., and Rist, C.E. 1952. Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structural relationships. Cereal Chem **29**: 321-333.

Woo, L.L., Egner, A.P., Belanger, L.C., Wattanawaraporn, R., Trudel, J.L., Croy, G.R., Groopman, D.J., Essigmann, M.J., and Wogan, G.N. 2011. Aflatoxin B_1-DNA adduct formation and mutagenicity in livers of neonatal male and female B6C3F1 mice. Toxicol Sci. **122(1)**: 38-44.

Yahuaca-Juárez, B., Martínez-Flores, H.E., Huerta-Ruelas, J.A., Vázquez-Landaverde, P.A., Pless, R.C., and Tello-Santillán, R. 2013a. Effect of thermal-alkaline processing conditions on the quality level of corn oil. CyTA J. Food. **11**:(sp1) 1-7.

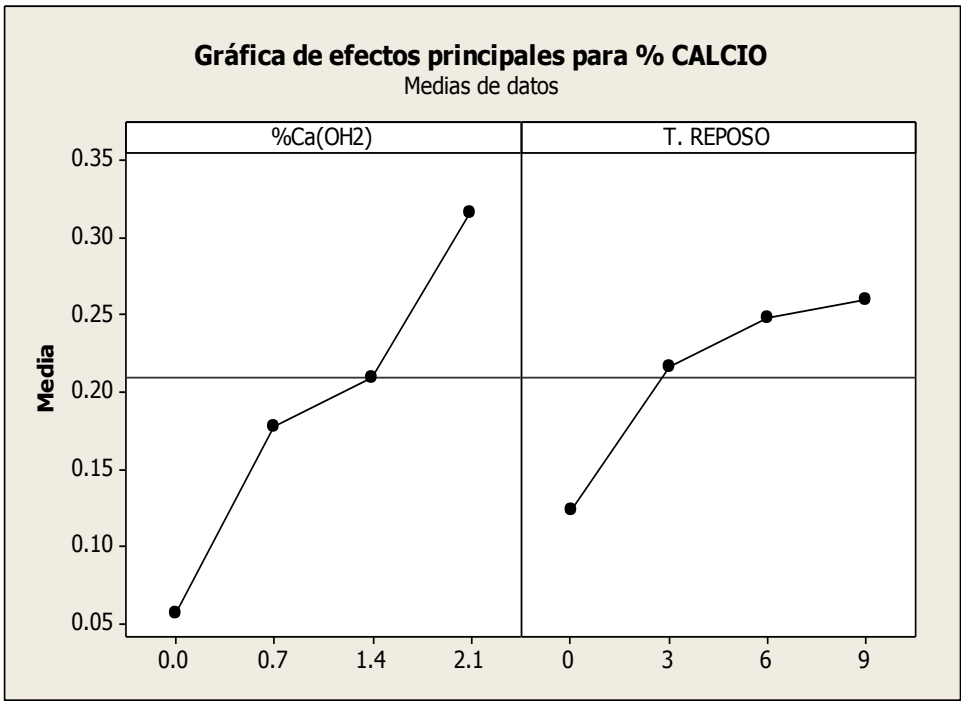
Yahuaca-Juarez, B., Martínez-Flores, H.E., Huerta-Ruelas, J.A., Pless, R.C., Vázquez-LAndaverde, A.A., Tello-Santillán, R. 2013b. Oil oxidation in corn flour from grains processed with alkaline cooking by use of peroxide value, UV and FTIR. Plant Foods Hum Nutr **68:** 65-71.

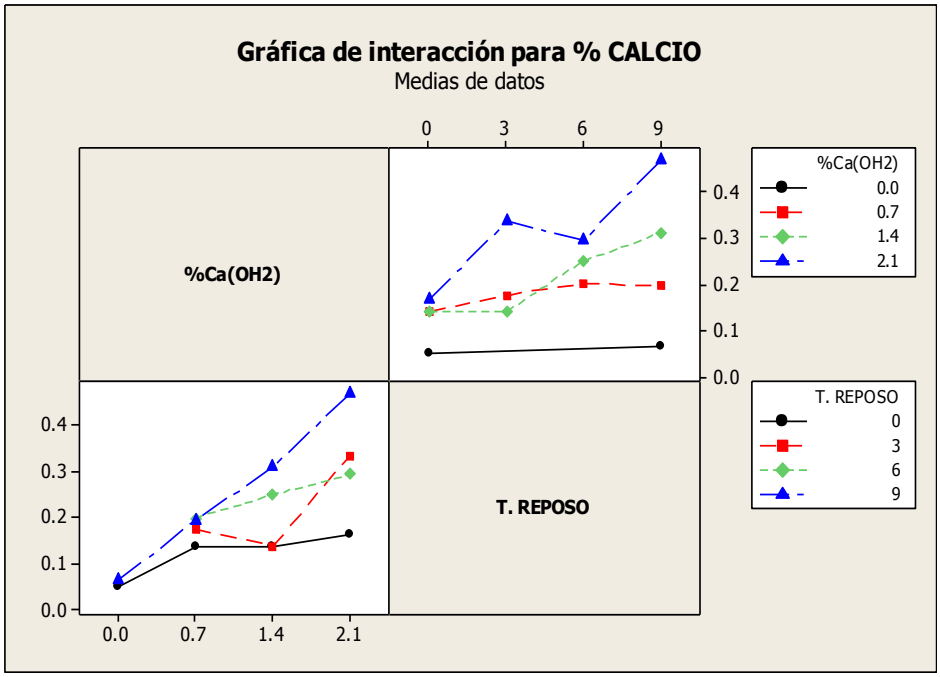
Yabe, K., Nakamura, M., Hamasaki, T. 1999. Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationships between G and B group aflatoxins. Appl Environ Microbiol. **65(9)**: 3867–3872.

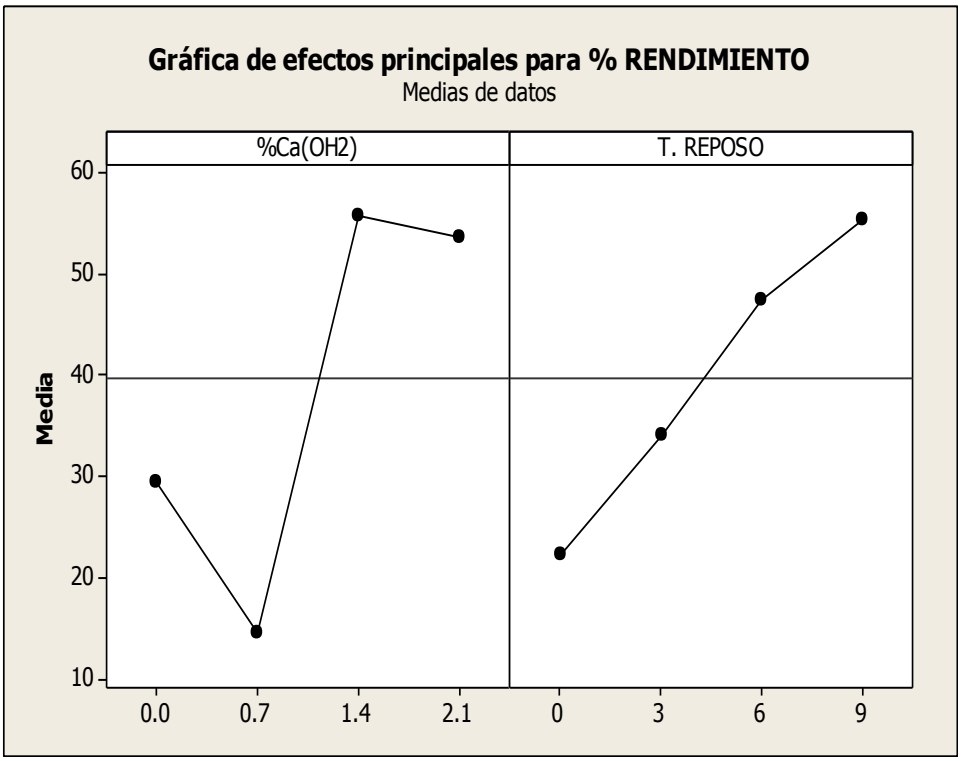
Zabar, S., Lesmes, U., Katz, I., Shimoni, E., Blanco-Peled, H.A. 2009. Studying different dimensions of amylose-long chain fatty acid complexes: Molecular, nano and micro level characteristics. Food Hydrocolloid. **23**: 1918-1925.

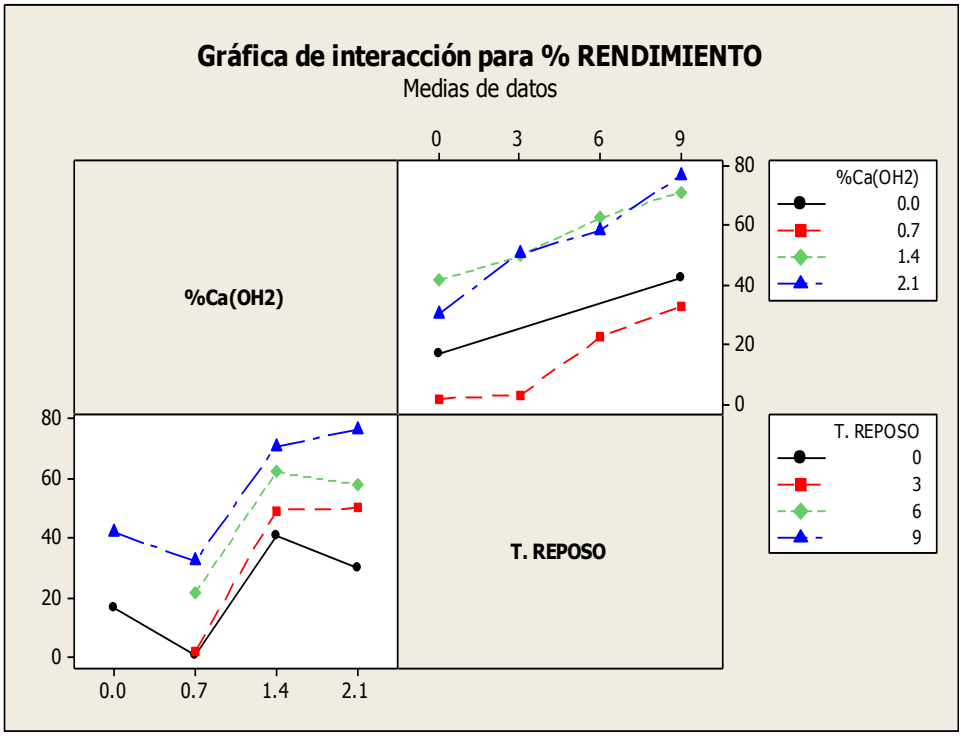
ANEXOS

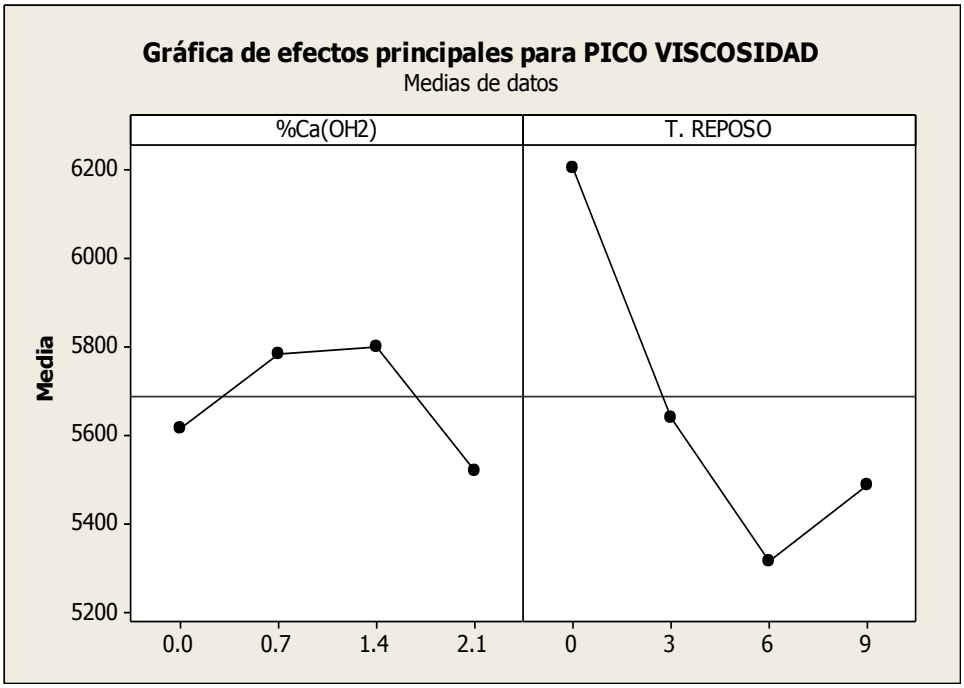
Harinas de maíz con germen

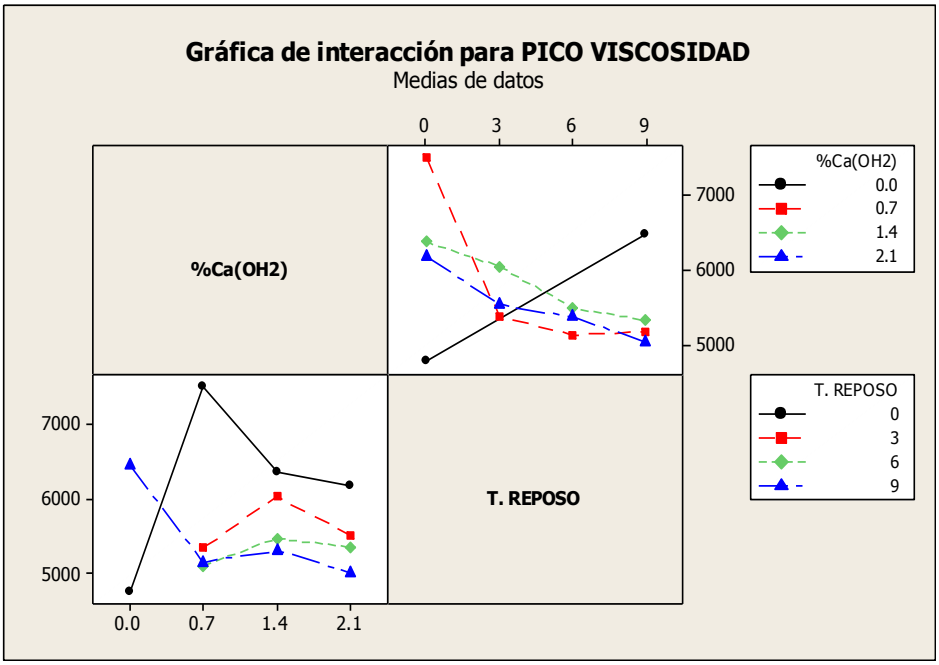




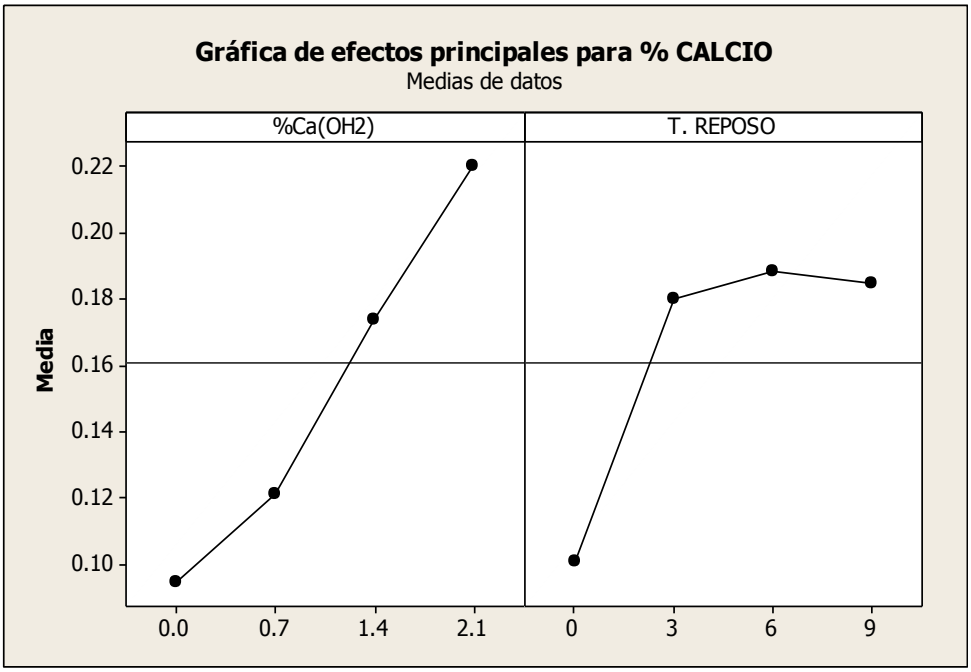

Gráfica de efectos principales para % RENDIMIENTO
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
Media
60
50
40
30
20
10
0.0
0.7
1.4
2.1
0
3
6
9

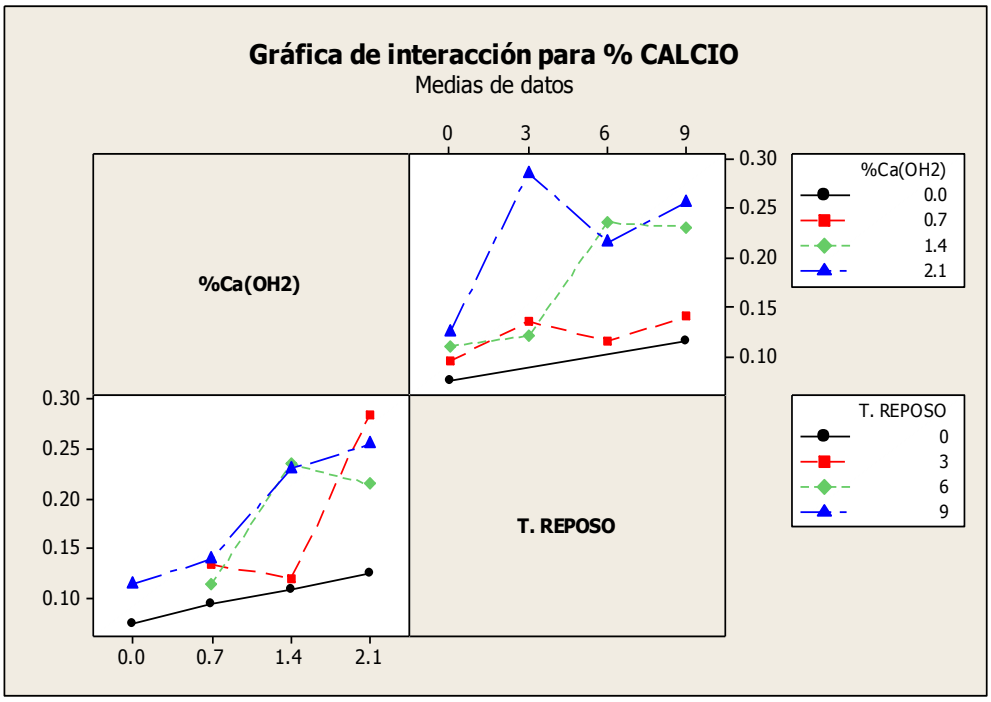

Gráfica de interacción para % RENDIMIENTO
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
0
3
6
9
80
60
40
20
0
0.0
0.7
1.4
2.1
%Ca(OH2)
0.0
0.7
1.4
2.1
T. REPOSO
0
3
6
9

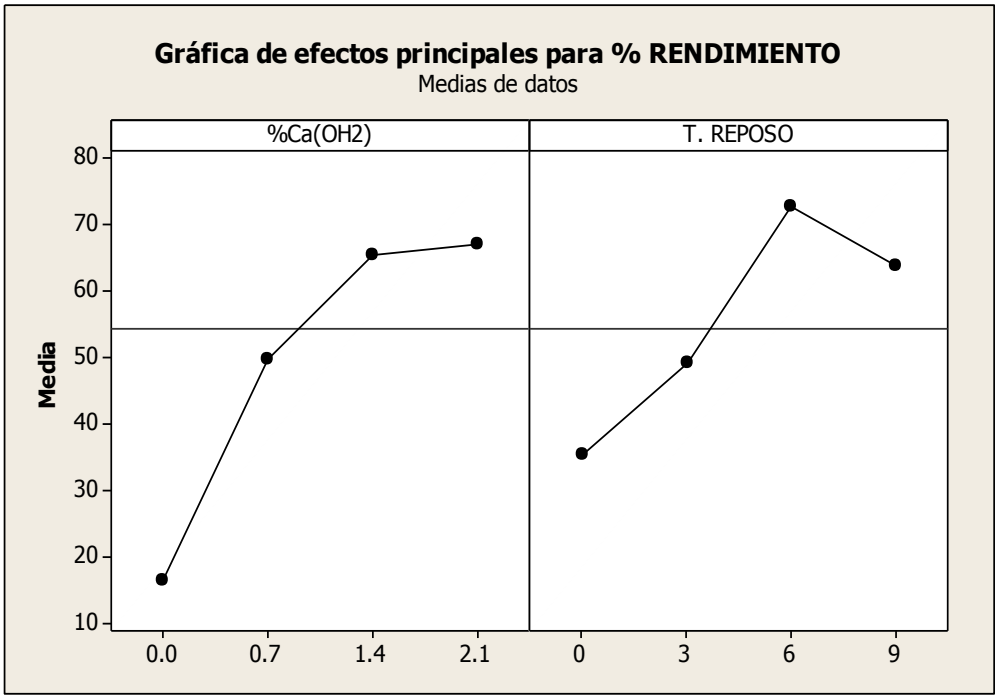

Gráfica de efectos principales para PICO VISCOSIDAD
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
Media
6200
6000
5800
5600
5400
5200
0.0
0.7
1.4
2.1
0
3
6
9

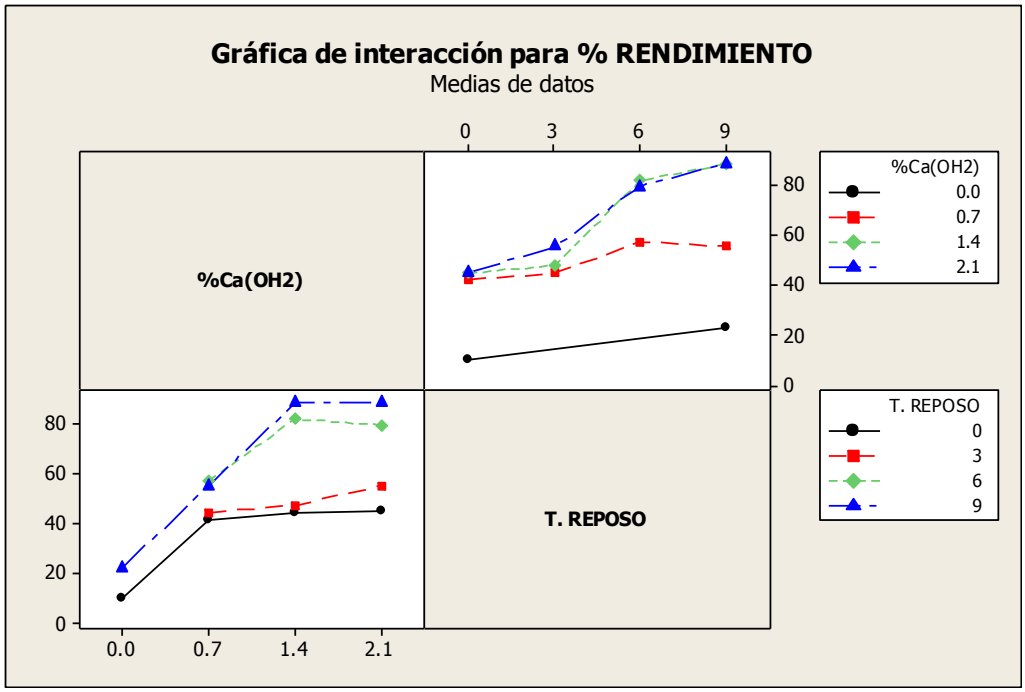

Gráfica de interacción para PICO VISCOSIDAD
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
0
3
6
9
7000
6000
5000
0.0
0.7
1.4
2.1
%Ca(OH2)
0.0
0.7
1.4
2.1
T. REPOSO
0
3
6
9

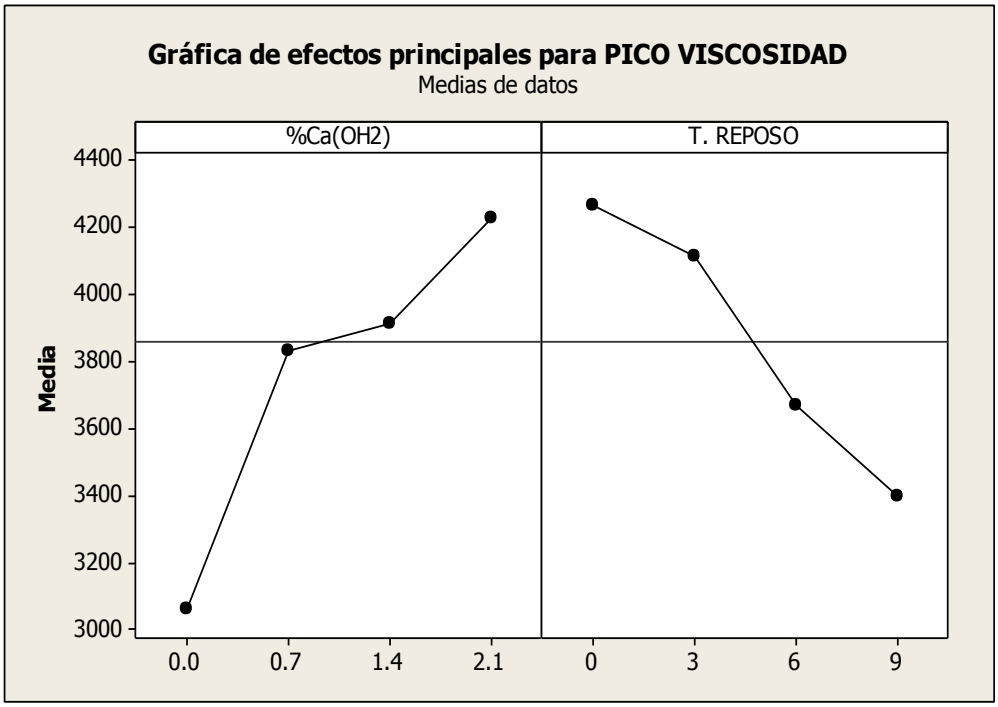
Harinas de maíz sin germen

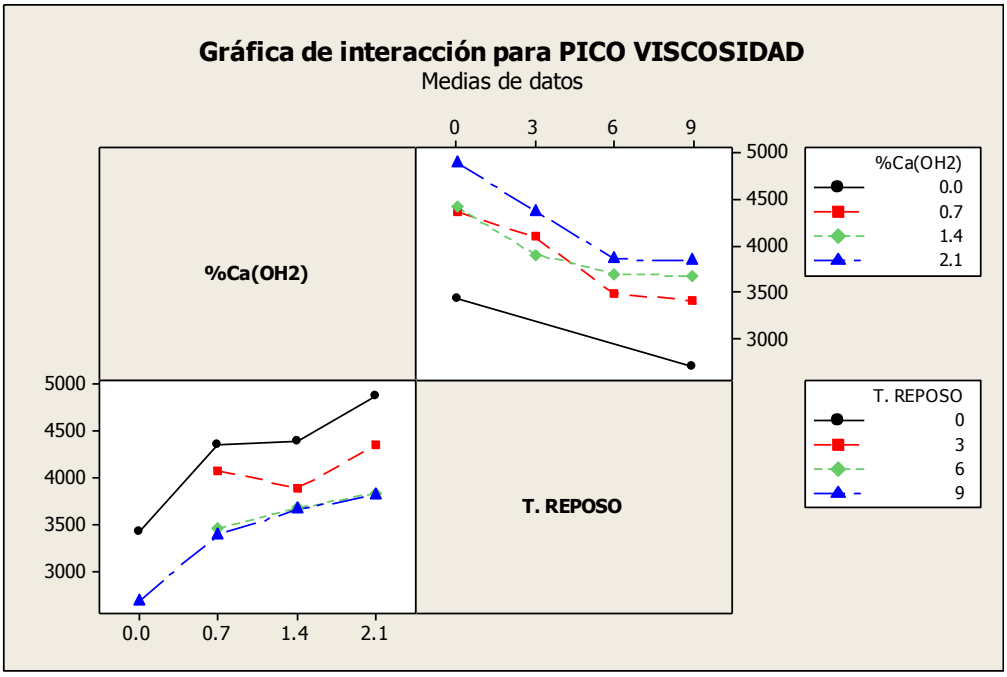





Gráfica de efectos principales para % RENDIMIENTO
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
Media
80
70
60
50
40
30
20
10
0.0
0.7
1.4
2.1
0
3
6
9


Gráfica de interacción para % RENDIMIENTO
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
0
3
6
9
80
60
40
20
0
0.0
0.7
1.4
2.1
%Ca(OH2)
0.0
0.7
1.4
2.1
T. REPOSO
0
3
6
9


Gráfica de efectos principales para PICO VISCOSIDAD
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
Media
4400
4200
4000
3800
3600
3400
3200
3000
0.0
0.7
1.4
2.1
0
3
6
9


Gráfica de interacción para PICO VISCOSIDAD
Medias de datos
%Ca(OH2)
T. REPOSO
0
3
6
9
5000
4500
4000
3500
3000
0.0
0.7
1.4
2.1
%Ca(OH2)
0.0
0.7
1.4
2.1
T. REPOSO
0
3
6
9