



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“OPTIMIZACIÓN DEL PELADO DE MAÍZ CON CAL A UTILIZARSE COMO
ESTRATEGIA DE DESCONTAMINACIÓN DE FUMONISINAS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:

María Viviana Araujo Campoverde

C.I.:010599678-9

DIRECTORA:

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa., PhD

C.I.:030108289-7

ASESOR:

Fis. Christian Mejía G., PhD.

Dra. Silvana Donoso M., MSc.

CUENCA – ECUADOR

2016



Resumen

Objetivo: En este estudio, el proceso de pelado de maíz con cal (PPC) fue documentado y sus parámetros optimizados mediante un diseño experimental, con el fin de conseguir un pelado completo del maíz con el mínimo grado de contaminación con fumonisinas. La presencia de fumonisina B₁ (FB₁) en el maíz fue analizada mediante HPLC-RP-FLD.

Metodología: Los experimentos se realizaron a partir de un lote de maíz en grano seco conformado por submuestras provistas por agricultores seleccionados del cantón Nabón de la provincia del Azuay en base a un trabajo de investigación previo realizado por el proyecto VLIR-IUC, “Nutrición, Alimentación y Salud”. El diseño experimental fue dividido en tres etapas: la caracterización de proceso, el mismo que se realizó mediante encuestas y observaciones in situ; pruebas de agotamiento de cal para el PPC, las que se realizaron partiendo de los datos recogidos en la primera etapa, y las pruebas de evaluación del PPC en la reducción de fumonisinas B₁.

Resultados y conclusiones: Se observó que, independiente de la concentración de cal utilizada, la etapa de pelado produjo una reducción de 8.73 veces la concentración de FB₁ del maíz crudo ($P=0.030$), y que el maíz pelado y cocinado presentó una reducción de 9.14 veces ($P=0.019$).

Recomendaciones: Se recomienda continuar con la experimentación para elucidar si la reducción de FB₁ se debió al proceso mecánico de remoción de la cáscara, o a la transformación química en su forma hidrolizada, por lo que este trabajo podría considerarse como un estudio explorativo preliminar.

Palabras clave: fumonisina, FB₁, HFB1, PPC, cal, MC, MCC, MPSC, MPC.



Abstract

In this study, the maize peeling process with lime (PPC) was documented and its parameters were optimized using an experimental design in order to achieve complete removal of the peel and the minimum degree of contamination of fumonisins. Fumonisin B₁ (FB₁) in maize was analyzed by RP-HPLC-FLD. Experiments were performed from a batch of dry corn grain consisting of subsamples provided by selected farmers in the canton Nabón, Azuay province, based on a previous research conducted by the VLIR-IUC Project, "Food, Nutrition and Health". The experimental design was divided into three stages: the characterization process, the same as was done using surveys and in situ observations; lime exhaustion tests for PPC, which were made from the data collected in the first stage, and the PPC assessment tests in reducing fumonisin B₁. It was observed that, independently of the concentration of lime used, the peeling step produced a reduction of 8.73 times the concentration of FB₁ of raw corn ($P = 0.030$), and the peeling corn plus cooking promoted a reduction of 9.14 times ($P = 0.019$). It is recommended to continue the experiment to elucidate whether FB₁ reduction was due to the mechanical process of removing the peel, or it is due to the chemical transformation into its hydrolyzed form, so this work could be seen as a preliminary exploratory study.

Key words: fumonisin, FB₁, HFB₁, PPC, lime, MC, MCC, MPSC, MPC.



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| I. MARCO TEÓRICO | 11 |
| 1.1. Estructura química y propiedades de las fumonisinas | 11 |
| 1.2. Biosíntesis de las Fumonisinas | 13 |
| 1.2.1. Fumonisina B ₁ hidrolizada (HFB ₁ o AP ₁) | 13 |
| 1.3. Toxicidad e impacto en la salud pública de las fumonisinas | 16 |
| 1.4. Técnicas de análisis de las Fumonisinas | 17 |
| 1.5. Posibilidades para la reducción de fumonisinas en alimentos | 18 |
| 1.5.1. Nixtamalización..... | 19 |
| 1.6. Regulaciones de las fumonisinas en maíz y derivados..... | 21 |
| II. METODOLOGÍA | 22 |
| 2.1 Tipo de estudio | 22 |
| 2.1.1 Área de estudio | 22 |
| 2.2 Muestreo y tamaño de la muestra..... | 23 |
| 2.3 Recolección de la información del proceso de pelado de maíz con cal (PPC)..... | 24 |
| 2.4 Análisis de fumonisina B ₁ | 24 |
| 2.4.1 Equipos, materiales y reactivos | 24 |
| 2.4.2 Método de análisis..... | 26 |
| 2.4.3 Curvas de calibración | 29 |
| 2.4.4 Análisis de datos cromatográficos | 30 |



| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.5 | Diseño experimental | 31 |
| 2.5.1 | Caracterización del proceso PPC..... | 31 |
| 2.5.2 | Pruebas de agotamiento de cal para el PPC..... | 32 |
| 2.5.3 | Pruebas de evaluación del PPC..... | 32 |
| 2.6 | Manejo estadístico de datos | 32 |
| 2.7 | Aspectos éticos..... | 33 |
| III. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |
| 3.1. | Caracterización del proceso de pelado de maíz con cal (PPC) | 34 |
| 3.1.2 | Caracterización del PPC mediante encuestas | 34 |
| 3.1.3 | Caracterización mediante observación del PPC in situ | 37 |
| 3.1.4 | Caracterización final del PPC..... | 38 |
| 3.2. | Pruebas de agotamiento de cal | 40 |
| 3.3. | Pruebas de evaluación del PPC en la reducción de fumonisina B ₁ | 44 |
| 3.1.1 | Análisis de fumonisina B ₁ en las muestras de maíz seco sin procesar | 44 |
| 3.1.2 | Análisis de fumonisina B ₁ durante el proceso PPC | 45 |
| IV. | Conclusiones y recomendaciones..... | 52 |
| 4.1. | Conclusiones | 52 |
| 4.2. | Recomendaciones | 53 |
| | REFERENCIAS..... | 54 |
| | ANEXOS | 56 |



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

María Viviana Araujo Campoverde, autora de la tesis "OPTIMIZACIÓN DEL PELADO DE MAÍZ CON CAL A UTILIZARSE COMO ESTRATEGIA DE DESCONTAMINACIÓN DE FUMONISINAS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 25 de Julio de 2016

María Viviana Araujo Campoverde.

C.I: 010599678-9



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

María Viviana Araujo Campoverde, autora de la tesis "OPTIMIZACIÓN DEL PELADO DE MAÍZ CON CAL A UTILIZARSE COMO ESTRATEGIA DE DESCONTAMINACIÓN DE FUMONISINAS", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de bioquímica farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 25 de Julio de 2016

María Viviana Araujo Campoverde

C.I: 010599678-9

UNIVERSIDAD DE CUENCA
desde 1867



Dedicatoria

A Dios

Por darme el regalo de la vida y la oportunidad de levantarme cada día y estar conmigo de la mano en cada instante de mi vida y mi carrera.

A mis padres y mis abuelos

Que con su esfuerzo y cariño estuvieron siempre ahí para motivarme y darme siempre su apoyo incondicional, ustedes han sido parte fundamental de mi vida y de este logro, para ustedes siempre mi amor y agradecimiento.

A mi futuro esposo, Francisco

Gracias por ser mi pilar y mi motor, por las horas de charlas interminables, por los consejos, las recomendaciones, por tu tiempo, tu amor y tu confianza y por siempre ver en mí más de lo que yo veía.

Este logro también es para ustedes.

Vivi



Agradecimientos

En primer lugar a Dios por haberme permitido llegar a este punto de mi carrera y mi vida, por ser mi luz, mi guía y mi fortaleza.

A la Doctora Johana Ortiz Ulloa por haber sido mi guía durante la elaboración de esta tesis, por todas sus valiosas enseñanzas y consejos. Gracias por haber sido mi profesora, directora y amiga.

Al Laboratorio de Alimentos y Nutrición del proyecto VLIR-IUC por haberme abierto sus puertas y permitido realizar mis análisis y experimentos dentro de sus instalaciones, por facilitarme siempre los medios necesarios para llevar a cabo con éxito todas las actividades propuestas. De manera especial a la BQF. Gabriela Astudillo por su apoyo y ayuda durante estos meses de trabajo.

Muchas gracias.



INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo de investigación fue optimizar el proceso del pelado de maíz con cal (PPC) con el fin de utilizar dicho proceso como método para reducir la contaminación por fumonisinas.

A nivel mundial, se estima que más de la mitad del maíz y productos a base de maíz consumidos están contaminados con fumonisinas. Los niveles de contaminación varían dependiendo de las condiciones climáticas, prácticas agrícolas y el genotipo del maíz cultivado. Sin embargo, se ha observado una tendencia creciente de contaminación en los países con clima caliente y húmedo, cuando el almacenamiento del maíz cosechado no es el adecuado. Las poblaciones de países como Argentina, Brasil, India y África media se encuentran altamente expuestas a estas micotoxinas ya que el maíz forma parte de los alimentos base dentro de sus dietas. En el año 2011, la OMS reportó que el 63% de un total de 10 354 muestras de maíz y productos a base de maíz analizadas a nivel mundial se encontraban contaminadas con fumonisina B₁, revelando un verdadero problema de Salud Pública y económico (Bryła et al., 2013).

El PPC es un tipo de cocción en una solución alcalina de hidróxido de calcio utilizada comúnmente para eliminar el pericarpio del maíz sin llegar a la cocción total. Existen estudios que demuestran que similares procesos térmicos alcalinos inducen a la hidrólisis de las fumonisinas, disminuyendo su toxicidad (De la Campa, Miller, & Hendricks, 2004; Humpf & Voss, 2004a; Palencia et al., 2003).



I. MARCO TEÓRICO

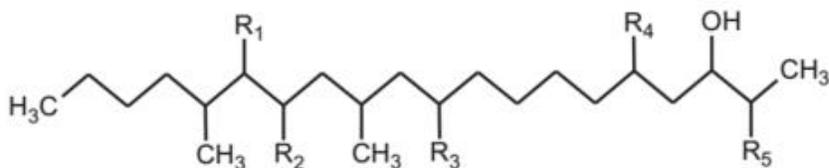
CONTAMINACIÓN DE MAÍZ CON FUMONISINAS

1.1. Estructura química y propiedades de las fumonisinas

Las fumonisinas son un grupo heterogéneo de compuestos químicos de bajo peso molecular producidos como parte del metabolismo secundario de algunos tipos de hongos, principalmente del género *Fusarium*, entre ellos *F. verticillioides*, *F. moniliforme* y *F. proliferatum* (Pagliuca et al., 2005). Su estructura química está formada por una cadena hidrocarbonada de di-ésteres de propano 1, 2, 3 ácido tricarbóxico y una cadena larga de polihidroxiaminas semejantes a las bases de esfingolípidos, esfingosina y esfingomielina (Bryła et al., 2013; Dombink-Kurtzman, Dvorak, Barron, & Rooney, 2000).

Se han descubierto al menos 18 análogos de las fumonisinas, los cuales han sido clasificados basados en su estructura química en series A, B, C y P (Bryła et al., 2013). De este grupo, los isómeros FB₁, FB₂ y FB₃ son los más abundantes y relevantes ya que juegan un papel importante en la contaminación de alimentos. De ellos, el isómero FB₁ es el más peligroso por sus propiedades cancerígenas, entre otras (Pagliuca et al., 2005).

Desde el punto de vista químico, la fumonisina B₁ es un amino-pentahidroieicoseno en el que los grupos hidroxilo que se encuentran ubicados en los C14 y C15 son sustituidos por propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico (diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico). Las estructuras químicas de los isómeros FB₂ y FB₃ son casi idénticas pero se diferencian en que el isómero FB₂ no posee el grupo hidroxilo en el C10 (Bryła et al., 2013; Grenier et al., 2012).



| Compound | Acronym | Functional group | | | | | Molecular weight |
|---|--------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|--|------------------|
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | |
| Fumonisin B ₁ | FB ₁ | TCA | TCA | OH | OH | NH ₂ | 721 |
| Fumonisin B ₂ | FB ₂ | TCA | TCA | H | OH | NH ₂ | 705 |
| Fumonisin B ₃ | FB ₃ | TCA | TCA | OH | H | NH ₂ | 705 |
| Hydrolysed FB ₁ | HFB ₁ | OH | OH | OH | OH | NH ₂ | 405 |
| N-Carboxymethyl FB ₁ | NCMFB ₁ | TCA | TCA | OH | OH | NH(C ₂ O ₂ H ₃) | 779 |
| N-1-Deoxy-D-fructose-1-yl FB ₁ | NDFB ₁ | TCA | TCA | OH | OH | NH(C ₆ H ₁₁ O ₅) | 883 |

TCA denotes propane-1,2,3-tricarboxylic acid (i.e. tricarballylic acid):

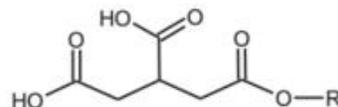


Figura 1. Estructura química de las Fumonisinias (Bryła et al., 2013)

En general, las fumonisinas son compuestos polares altamente higroscópicos que se solubilizan bien en agua y soluciones acuosas de metanol o acetonitrilo, siendo altamente estable en soluciones de acetonitrilo-agua en proporción 1:1 (Bryła et al., 2013). Además, las fumonisinas son muy estables al calor incluso al calentamiento a 100°C, temperatura a la cual no se observa una pérdida considerable a menos que el alimento o la muestra sean sometidas a una temperatura mayor a 150°C (Bryła et al., 2013). Particularmente, se ha observado una degradación del 90% después del calentamiento a 175°C por 60 min (Bryła et al., 2013). A pesar de que la pérdida de las fumonisinas tras su calentamiento a 100° C no es significativa, el procesamiento puede conllevar a una pérdida importante de la cantidad detectable de fumonisinas debido, por ejemplo, a una degradación química por la reacción de Maillard o por la hidrólisis mediante la pérdida de dos grupos tricarbóxicos en medio alcalino (Dall'Asta, Falavigna, Galaverna, Dossena, & Marchelli, 2010).



1.2. Biosíntesis de las Fumonisin

El hongo del genero *Fusarium*, especialmente la especie *F. verticillioides* es el contaminante de maíz más frecuente alrededor del mundo. El proceso de contaminación puede empezar incluso en las primeras etapas de formación del grano; sin embargo, la cantidad de micotoxina que se produce en las distintas etapas de maduración del maíz puede variar significativamente. Ensayos *in vitro* han permitido establecer los requerimientos básicos para el desarrollo de fumonisin, estableciéndose que su síntesis depende primordialmente de la presencia de azúcares (especialmente de amilopectina), del pH, actividad acuosa (a_w) y de la presencia de nitrógeno en el medio. El hongo puede empezar a contaminar el maíz antes de su cosecha o en las etapas tempranas de secado si la a_w es alta. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20-30°C, alcanzando su pico máximo de producción entre los 20-25°C con un a_w de 0.95-0.99; mientras que en temperaturas menores a 10°C y a_w menor a 0.93 la producción de micotoxinas puede detenerse (Bryła et al., 2013).

1.2.1. Fumonisina B₁ hidrolizada (HFB₁ o AP₁)

La forma hidrolizada de la fumonisina B₁ (HFB₁), también conocida como AP₁ (1-aminopentol), se forma por la hidrólisis de las cadenas laterales del ácido tricarbónico en los C₁₄ y C₁₅ los cuales son reemplazados por grupos hidroxilos. Se ha demostrado que las HFB₁ se forman durante el proceso de nixtamalización por acción del hidróxido de calcio en caliente y existen investigaciones que sugieren su formación *in vivo* en el tracto gastrointestinal de los humanos por acción de la flora presente (Bryła et al., 2013; Pagliuca et al., 2005). La forma



hidrolizada es menos tóxica que la forma original FB_1 aunque se estima que puede producir daño a nivel del hígado y riñón (Pagliuca et al., 2005). La disminución en la toxicidad de esta forma hidrolizada, radica en que la cadena de la AP_1 compite por el sitio activo de la enzima ceramida sintetasa mientras los grupos aniónicos 1, 2,3- ácido tricarboxílico de la FB_1 se une al acetyl CoA y compite por la unión con los ácidos grasos. La eliminación del propano 1, 2,3- TCA de la cadena reduce la posibilidad de la inhibición de la síntesis de ceramida. La AP_1 no solo activa como inhibidor sino también como sustrato para la reacción de acetilación a través de la ceramida sintetasa, al inhibir esta enzima no se produce la dihidroceramida y por lo tanto se interrumpe la producción de esfingolípidos. (Bryła et al., 2013).

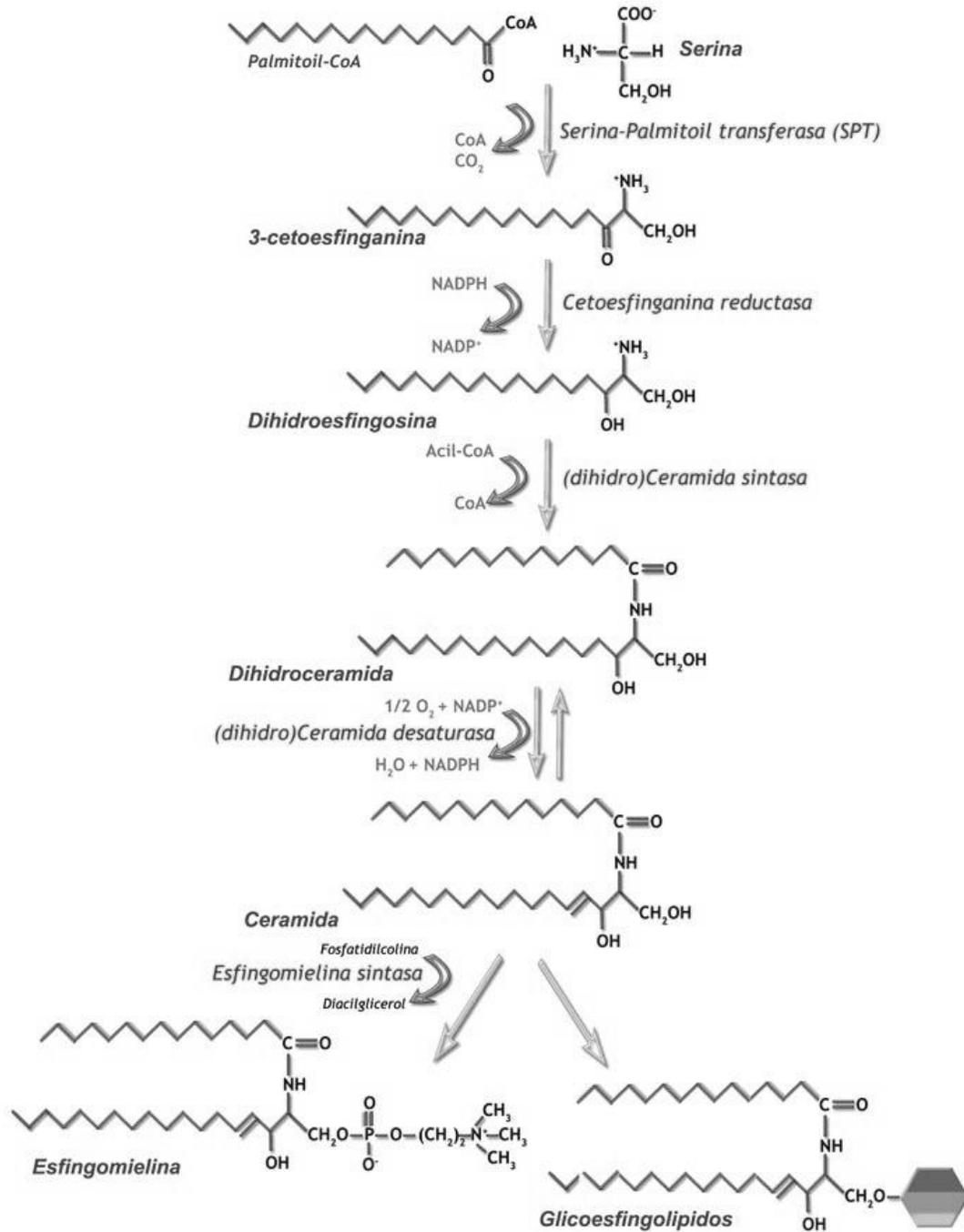


Figura 2. Síntesis de esfingolípidos (Sterin-Speziale & Leocata Nieto, 2007)



1.3. Toxicidad e impacto en la salud pública de las fumonisinas

La toxicidad de las fumonisinas radica en la similitud estructural que existe entre las fumonisinas y los esfingolípidos y esfingomielinas. Fumonisina B₁ y otros análogos que poseen un grupo amino libre en la posición C₂ de su molécula son capaces de inhibir la síntesis de ceramida ya sea por interrupción en la conversión de esfingosina a dihidroceramida o en la interrupción de la reacilación de la esfingosina durante la síntesis de ceramidas, lo que se produce mediante un mecanismo de inhibición competitiva de la enzima ceramida sintetasa (Bryła et al., 2013). Estudios recientes han confirmado que la FB₁ es capaz de producir defectos en la formación del tubo neural. Se le ha asociado también con la aparición de edema pulmonar en cisnes, edema pulmonar en porcinos, arteroesclerosis en monos y hemorragia cerebral en conejos. Además puede actuar como un agente inmunomodular produciendo daño al tracto gastrointestinal. Se ha observado que las fumonisinas presentan también actividad nefrotóxica y hepatotóxica (Hartinger & Moll, 2011; Humpf & Voss, 2004b).

La relación de las fumonisinas y su capacidad para producir enfermedad en el ser humano todavía no se ha esclarecido, por lo que la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) ha decidido clasificarla dentro del grupo B2 “posible agente cancerígenos en humanos” . En varios estudios realizados en los últimos años se ha observado una fuerte correlación entre el consumo de maíz contaminado con FB₁ y un aumento en el riesgo de la aparición de cáncer de esófago entre la población de granjeros en el centro y sur de África , además de la aparición de enfermedades relacionadas con la formación del tubo neural e interrupción del crecimiento normal de células y la permeabilidad de las mismas, disminución de peso en infantes y aparición de diarrea y dolor estomacal (Humpf & Voss, 2004b; IARC, 2003; Pagliuca et al., 2005).



Por otro lado, las fumonisinas también son fitotóxicas produciendo una reducción marcada en la síntesis de clorofila (Bryła et al., 2013).

En lo que se refiere a la toxicidad de la forma hidrolizada (HFB₁) no existe evidencia contundente de su inocuidad para el ser humano. Se sabe que sus efectos son menores a los observados con las FB₁ y que su órgano diana es el aparato digestivo, por lo que se han realizado estudios *in vivo* en cerdos jóvenes. Los resultados de pruebas histopatológicas del tracto gastrointestinal tras un periodo de alimentación contaminada con FB₁ y HFB₁ demostraron que las lesiones a nivel hepático iban de leves a moderadas en todos los animales expuestos a la alimentación contaminada con FB₁ a diferencia del grupo alimentado con HFB₁ que no presentaba mayores lesiones, lo que llevo a la conclusión de que la forma hidrolizada HFB₁ no induce a daños severos a nivel hepático. En las muestras de sangre extraídas se realizaron pruebas químicas de marcadores hepáticos y los resultados demostraron nuevamente que el grupo alimentado con FB₁ presentaban valores aumentados de albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, fibrinógeno y γ -GT mientras en el grupo HFB₁ no se presentó ningún cambio a nivel de estos marcadores. Las mismas pruebas fueron realizadas en otros segmentos del tracto digestivo como el intestino grueso y delgado encontrando siempre los mismos resultados antes expuestos (Grenier et al., 2012).

1.4. Técnicas de análisis de las Fumonisin

En general, las fumonisinas son moléculas polares, solubles en agua y solventes orgánicos polares y por lo tanto candidatas para su determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con una previa derivatización de la muestra, la misma que se emplea para transformar a la



muestra en un compuesto fluorescente (Bryła et al., 2013). Los reactivos empleados para tal fin pueden incluir naftaleno-2,3- dicarboxílico aldehído (NDA), cianobenzoindol (CBI), ophtaldialdehido (OPA) o el 7-fluoro-4-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) (Bryła et al., 2013).

La separación y extracción de la muestra es el paso más importante dentro del análisis para lo cual se puede utilizar una extracción líquido-líquido con una mezcla de solventes orgánicos polares como la de acetonitrilo-agua en proporción 1:1 v/v o una mezcla de alcoholes como metanol y etanol en proporción 70-80%, sin embargo se ha observado que las mezclas alcohólicas no son muy eficientes (Bryła et al., 2013; Shephard, 1998). En lo que se refiere a la limpieza de la muestra se pueden utilizar técnicas de intercambio de iones por cromatografía (SAX) o columnas selectivas de inmunoafinidad (IAC) (Bryła et al., 2013).

El mayor problema que se presenta durante el análisis de fumonisinas proviene de la unión de éstas a otros macro componentes (carbohidratos, proteínas, grasas y sus derivados) presentes de forma natural en las muestras, lo que dificulta la identificación de las fumonisinas por los métodos convencionales. Una opción para resolver la unión de fumonisinas a proteínas puede ser realizar la extracción empleando un detergente de proteínas como el dodecil sulfato de sodio, para luego realizar normalmente una extracción líquido-líquido a partir del extracto recogido (Bryła et al., 2013).

1.5. Posibilidades para la reducción de fumonisinas en alimentos

Dado el gran impacto a nivel mundial que tiene la contaminación con micotoxinas de los alimentos, tanto a nivel de salud e inocuidad como a nivel económico, varias estrategias pre- y post-cosecha para la disminución de micotoxinas en



piensos y alimentos han sido propuestas. Particularmente, para el caso del maíz, la estrategia post cosecha de separación física de las partes visiblemente contaminadas ha sido la más eficaz para reducir el grado de contaminación de micotoxinas, y por ende su consumo y su propagación a los granos que se encuentran en buen estado. Métodos de adsorción han demostrado ser eficaces para ligar aflatoxinas a ciertos agentes por lo que se intentado utilizar el mismo método para fumonisinas para su posible aplicación a nivel agropecuario. Los agentes de adsorción estudiados incluyen carbón activado, bentonita y diatomita, pero los resultados obtenidos han sido muy pobres (Hartinger & Moll, 2011). Por otro lado, se han observado mejores resultados utilizando otros agentes como colestiramina y bacterias del ácido láctico (Hartinger & Moll, 2011).

Otro ejemplo de las estrategias post-cosecha en el maíz se relaciona con el proceso de cocción alcalina conocido como nixtamalización (Hartinger & Moll, 2011), el cual será descrito a detalle a continuación.

1.5.1. Nixtamalización

La nixtamalización es un proceso prehispánico originado en Mesoamérica mediante el cual se realiza la cocción del maíz con agua y cal para obtener el nixtamal. La palabra nixtamal proviene de los vocablos náhuatl “*nextli*” que significa “cenizas de cal” y “*tamalli*” que significa “masa de maíz cocido”. Al moler el nixtamal se obtiene una masa, que puede secarse para uso posterior (harina) o utilizarse fresca para la elaboración de tortillas, tamales, arepas, etc. El proceso de nixtamalización inicia con la cocción del maíz en una solución alcalina (hidróxido de calcio o cal apagada) a una temperatura cercana al punto de ebullición por cierto tiempo (desde unos minutos hasta una hora) después del cual se deja reposar al maíz en el caldo (generalmente por una noche, sin embargo puede



variar entre unos minutos hasta alrededor de un día). La duración del tiempo de cocción y remojo varía según el tipo de maíz, las tradiciones locales, la altitud sobre el nivel del mar y el tipo de alimentos a preparar. Durante la cocción y el remojo, la solución alcalina provoca la degradación y solubilización de los componentes de la pared celular (hemicelulosa y pectina) de los granos de maíz, permitiendo la remoción del pericarpio (cáscara) y que el endospermo se suavice. Además, los almidones se disuelven, se gelatinizan y parte de estos migran al caldo de cocción; el grano se hidrata y absorbe calcio, y se inactivan ciertas enzimas del germen que evitan la oxidación de las grasas de éste, alargando la vida media del producto final. Luego del remojo, la solución alcalina se descarta y los granos de maíz se lavan, se enjuagan y se vuelven a lavar. En este punto los granos de maíz se pueden pelar fácilmente con los dedos al frotarlos. Después el grano se usa solo o se muele para obtener la harina de maíz (De la Campa et al., 2004; Días Roig & Miaja, 2016)

En los últimos años se han realizado estudios que demuestran que el proceso de nixtamalización también puede ser usado como método efectivo para la reducción de la contaminación con micotoxinas del maíz (De la Campa et al., 2004). En particular, se ha observado que este proceso puede reducir alrededor del 73-95% de Fumonisinás (Dombrink-Kurtzman et al., 2000) (De la Campa et al., 2004). Esta reducción se debe a que, bajo las condiciones de cocción en medio alcalino (pH 8-9), la fumonisiná B₁ pasa mayoritariamente a su forma hidrolizada HFB₁ por reemplazo de los ácidos tricarbóxicos por hidrógenos en los carbonos 14 y 15, lo que dificulta su detección por las técnicas comunes. La forma hidrolizada (HFB₁), es menos peligrosa para la salud humana, pero no existe información que indique que esta forma hidrolizada no se revierta a su forma original una vez que se encuentra en el tracto gastrointestinal. Los factores físicos más importantes del proceso es la proporción empleada de maíz/cal, que a su vez afecta el pH de la



cocción, y el tiempo de remojo que ayuda a eliminar los residuos remanentes del pelado. Cabe considerar que la temperatura no juega un rol importante en el proceso (De la Campa et al., 2004).

1.6. Regulaciones de las fumonisinas en maíz y derivados

Varias organizaciones a nivel mundial han establecido límites máximos permisibles de fumonisinas en alimentos, basándose no únicamente en la parte toxicológica, sino también por ser límites alcanzables cuando se emplean buenas prácticas en la agricultura y de manufactura (Hartinger & Moll, 2011). Por ejemplo, en la Comisión Europea el límite máximo permitido es de 4000 µg/kg para las fumonisinas B₁+B₂ en maíz sin procesar, y de 1000 µg/kg en el maíz en proceso de pelado y en maíz destinado a alimentos para consumo humano directo (European-Commission, 2006). De manera similar, el límite establecido por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA) es de 4000 µg/kg para productos de maíz entero o con remoción parcial del germen, y de 4000 µg/kg para maíz limpio destinado para producción de masa (National-Grain-and-Feed-Association, 2011). Por su parte, el Comité de expertos de FAO/OMS en aditivos alimentarios (JECFA) ha establecido un límite provisional para la ingesta diaria permitida (PMTDI) de 2 µg/kg de peso corporal por día para las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ solas o en combinación.



II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de estudio

El presente estudio fue cuantitativo, analítico, experimental, cuyo objetivo fue la evaluación del pelado de maíz con hidróxido de sodio (cal apagada) como potencial estrategia de descontaminación de fumonisinas en el maíz seco utilizado para la elaboración de mote pelado.

2.1.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en los cantones de Cuenca y Nabón, Azuay-Ecuador. Cuenca es la tercera ciudad más grande del Ecuador y la capital de la provincia del Azuay. Se encuentra a 2538 m.s.n.m., posee una superficie de 15730 hectáreas y tiene una población aproximada de 580000 habitantes (Cuenca, 2016). Nabón se encuentra ubicado al sureste de la provincia del Azuay, a una altitud de 3300 m.s.n.m. y a 71 Km de Cuenca. Nabón tiene una población de 15121 habitantes, distribuida en 6,9% en la zona urbana y el 93,1% en la zona rural. Según el censo del año 2010, la principal fuente de ingreso económico en Nabón provino de la agricultura, silvicultura y pesca. Nabón está considerado como el noveno cantón más pobre del país, con un 87.9% de pobreza y un 55.7% de indigencia. Nabón está dividido políticamente en cuatro comunas indígenas (Shiña, Chunazana, Morasloma y Puca), tres parroquias de población mestiza (Cochapata, Las Nieves y El Progreso) y un centro cantonal (Nabón centro) (Nabón, 2015).



En el cantón Cuenca se llevó a cabo la recolección de la información sobre el proceso de pelado de maíz con cal (PPC) mediante encuestas realizadas de manera aleatoria. En el cantón Nabón se llevó a cabo la recolección de las muestras de maíz seco para los experimentos, las cuales fueron adquiridas a pequeños productores de maíz.

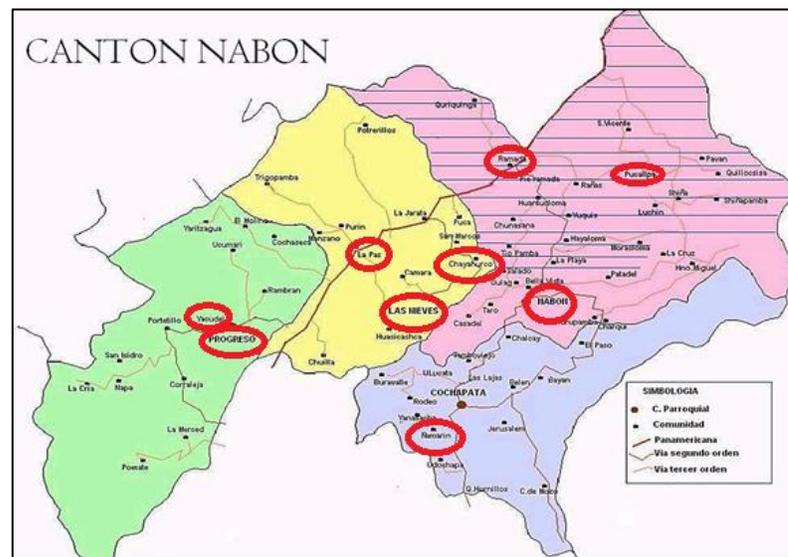


Figura 3. Mapa político de Nabón (Nabón, 2015). Las zonas de muestreo están marcadas con círculos en rojo.

2.2 Muestreo y tamaño de la muestra

En este estudio no se realizó un proceso de muestreo per-se. Se seleccionaron a los pequeños productores de maíz en Nabón a partir de un estudio precedente a éste, con el criterio de que el maíz estuviese contaminado con fumonisina B₁. En total, se recolectaron 12 muestras de maíz seco con cáscara, variedad cuzco ecuatoriano (Zhima), de 6 libras de peso cada una. Las muestras se recolectaron en los sectores de La Paz (n=1), El Progreso (n=1), Yacudel (n=2), Chayahurco



(n=3), Romerillo (n=1), Nabón centro (n=1), Tamboloma (n= 1), La Ramada (n=1) y Pucallpa (n=1). Las muestras de maíz fueron conservadas en condiciones frescas y secas hasta su procesamiento.

2.3 Recolección de la información del proceso de pelado de maíz con cal (PPC)

Se diseñó una encuesta para recolectar información sobre los parámetros básicos del proceso del pelado de maíz con cal (**Anexo 1**). La encuesta se aplicó a 30 personas en el cantón Cuenca. Adicionalmente se realizaron pruebas de pelado in situ con tres personas en distintas partes de la ciudad de Cuenca: Miraflores, Tutupali y Punta Corral.

2.4 Análisis de fumonisina B₁

2.4.1 Equipos, materiales y reactivos

Los equipos, materiales, reactivos, estándares, así como las instalaciones y la mayoría de insumos para preparación de las muestras fueron provistos por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud”, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, como parte del proyecto de investigación “Assessment of the traditional wood ash nixtamalization as detoxification strategy to reduce Fumonisin and Aflatoxin contamination of boiled maize ("mote pelado"), Nabon-Ecuador” financiado por la Fundación Internacional de Ciencia (IFS) (Research Grant E/5398-1).



Equipos

- HPLC con detector de fluorescencia (Agilent 1 200, USA)
- Generador de nitrógeno (Domnick Hunter, USA)
- Sistema de extracción al vacío (Heidolph, Alemania)
- Potenciómetro (Mettler Toledo, Suiza)
- Centrífuga (Hettich, Alemania)
- Homogeneizador horizontal (VWR, USA)
- Purificador y destilador de agua (Barnstead, USA)
- Micropipeta (Brand, Alemania)
- Micropipeta (Boeco, Alemania)
- Baño ultrasónico (Branson, USA)
- Sistema de extracción al vacío para fase sólida SPE (Waters, USA).
- Mezclador vortex (Velp Scientifica, Italia)
- Balanza portátil (Ohaus, USA)
- Balanza electrónica de precisión (Boeco, USA)
- Cocineta eléctrica de 2 quemadores (Oster, USA)
- Moledor de café (Kitchen aid, USA)

Materiales e insumos

- Papel filtro Whatman No. 4
- Filtros de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (0.45 μm x 13 mm)
- Cartuchos para extracción SPE de intercambio aniónico fuerte (SAX)
- Material de vidrio
- Microtubos
- Jeringuillas de 3 mL



- Viales para HPLC (2 mL) con inserto de vidrio
- Fundas con cierre ziploc
- Fundas de papel
- Etiquetas
- Ollas de acero inoxidable

Reactivos y estándares

- Metanol (MeOH), grado gradiente
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido acético glacial (HAc)
- Fosfato de sodio dihidrogenado
- Acetonitrilo (MeCN)
- Ácido ortofosfórico
- Tetraborato de sodio
- B-mercaptoetanol
- Orto-phtaldehido (OPA)
- Estándares de extracto sólido puro de fumonisina B₁

2.4.2 Método de análisis

La determinación de FB₁ se realizó mediante la técnica cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP) con detección de fluorescencia (FLD). El método modificado a partir del descrito por Kimanya et al., 2008. La FB₁ se extrajo a partir de 20 g de una muestra de maíz finamente molida usando 50 ml de la mezcla de solvente metanol/agua (75:25 v/v) en una botella de vidrio de 100



mL. La extracción se realizó agitando manual y vigorosamente la mezcla por dos minutos y luego se colocó en un agitador horizontal por 10 minutos a 300 rpm. La suspensión fue filtrada a través de papel de filtro Whatman No.4 y se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm. El pH del filtrado debía estar entre 5.8 y 6.5 (ajuste con NaOH 0.1M o HCl 0.1N). Para la purificación del extracto se utilizaron cartuchos de intercambio de aniones fuertes (SAX) que fueron pre-lavados con 5 mL de metanol y 5 mL de metanol/agua (75:25, v/v). Una alícuota de 10 mL del extracto se pasó a través de los cartuchos SAX a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. Los cartuchos se lavaron con 8 mL de metanol/agua (75:25, v/v) seguido de 3 mL de metanol a una velocidad de flujo de 5 mL min⁻¹. Luego se aplicó una ligera corriente de vacío en el cartucho (10 segundos) y finalmente la FB₁ fue eluída muy lentamente (<1 mL min⁻¹) con 10 mL de metanol/ácido acético (99:1, v/v). El eluído se recogió en un matraz esmerilado con capacidad de 25 mL y el borde del matraz se lavó con 0.5 mL adicionales de metanol. El eluído se secó usando un rotavapor a 40°C por aproximadamente 3 minutos hasta dejar el volumen de 1 mL. Transcurrido este tiempo, el eluído se trasvasó a un tubo de 10 mL, y el matraz fue lavado 3 veces con 0.5 mL de metanol, añadiendo esto también al tubo. El extracto fue llevado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente.

La derivatización de la FB₁ se realizó disolviendo el extracto seco con 200 µl de metanol y luego se añadió 200 µl del reactivo derivatizante OPA (solución de 40 mg de orto-phtaldehido en 1 mL de metanol con 5 mL de tetraborato de sodio 0.1M y 50 µl de B-mercaptoetanol). La solución se homogeneizó por 30 segundos con un homogeneizador vortex, se filtró (filtro de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro) y se transfirió inmediatamente en un vial para el análisis por HPLC. La solución derivatizada debe ser inyectada al sistema (20 µL) en un lapso total de 2.5 min. La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 (150 x 4.6



mm, 5 μm) a 30°C siguiendo una elución isocrática a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La fase móvil fue una mezcla de metanol con una solución de fosfato de sodio di hidrogenado 0.1 M (75:25 v/v) con un pH ajustado a 3.35 utilizando ácido ortofosfórico. La detección por fluorescencia se realizó a 335 nm de excitación y 400 nm emisión. El análisis tuvo una duración total de 18 minutos.

A continuación se presenta las características analíticas del método optimizado:

Tabla 1. Características del método analítico para el análisis de fumonisina B₁

| Parámetros analíticos | Valores | Unidades |
|------------------------------|----------------|-------------------------|
| Límite de detección | 0.55 | $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| Límite de cuantificación | 1.10 | $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| Rango lineal bajo | 5.0 – 25.0 | ng/mL |
| Linealidad (R^2) | 0.9939 | |
| Rango lineal medio | 10.0 – 100.0 | ng/mL |
| Linealidad (R^2) | 0.9942 | |
| Rango lineal alto | 100.0 – 400.0 | ng/mL |
| Linealidad (R^2) | 0.9646 | |
| Recuperación (recovery) | 86 \pm 11.9 | % |
| Tiempo de retención | 6.9 \pm 0.6 | min |
| Precisión inter-día | 15.15 | % |
| Precisión intra-día | 8.9 | % |



2.4.3 Curvas de calibración

Se realizaron tres curvas de calibración con distintos rangos de concentraciones que abarcaban los posibles valores presentes en las muestras. Los rangos de concentración fueron 5-25 ng/mL, 10-100 ng/mL y 100-400 ng/mL. Se partió de un extracto seco de un patrón de fumonisina B₁ de 0.1 mg/mL (100 µL) la misma que fue reconstituida con 1 000 µL de MeCN: H₂O (dilución 1/10) obteniendo una solución stock de 10ppm.

El volumen final de las soluciones patrón fue de 200 µL, que fue alcanzado diluyendo la solución stock con metanol. Finalmente, la concentración de las soluciones disminuyó a la mitad por la dilución 1/2 con el reactivo derivatizante OPA antes de la inyección en el HPLC.

Tabla 2. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración.

| Concentración (ng/mL) | Dilución + OPA | Stock + MeOH (200 µL) |
|-------------------------|----------------|-----------------------|
| Stock 1 000ng/mL | | |
| 800(400)* | 1 / 1.25 x ½ | 160 + 40 |
| 600(300) | 1 / 1.66 x ½ | 120 + 80 |
| 400(200) | 1 / 2.5 x ½ | 80 + 120 |
| 200(100) | 1 / 5 x ½ | 40 + 160 |
| 150(75) | 1 / 6.66 x ½ | 30 + 170 |
| 100(50) | 1 / 10 x ½ | 20 + 180 |
| 50(25) | 1 / 20 x ½ | 10 + 190 |
| Stock 100 ng/mL | | |
| 40(20) | 1 / 2.5 x ½ | 80 + 120 |
| 30(15) | 1 / 3.33 x ½ | 60 + 140 |



| | | |
|--------|-----------------------------|----------|
| 20(10) | $1 / 5 \times \frac{1}{2}$ | 40 + 160 |
| 10(5) | $1 / 10 \times \frac{1}{2}$ | 20 + 180 |

(*) Concentración final después de la dilución con el reactivo derivatizante OPA.

2.4.4 Análisis de datos cromatográficos

El cálculo del nivel de contaminación de fumonisina B₁ (C) se hizo siguiendo la siguiente ecuación:

$$C \text{ (ng/g)} = \frac{C_1 \text{ (ng/mL)}}{g \text{ (g/mL)}}$$

Donde C_1 = concentración de micotoxina presente en la alícuota inyectada; g = gramos de muestra por mililitro en la inyección.

Los gramos por mililitro al momento de la inyección fueron 10 g, lo que deduce de los siguientes esquemas de extracción y preparación de las muestras:

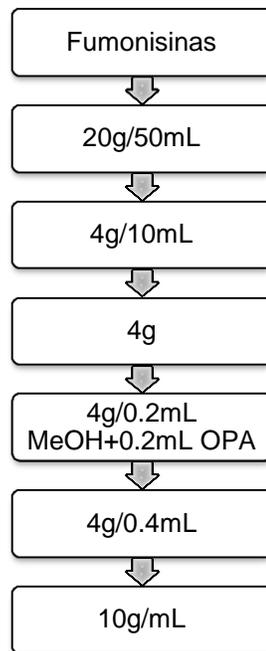


Figura 4. Esquema de cálculo de gramos de muestra por mililitro al momento de la inyección

2.5 Diseño experimental

El diseño experimental para la evaluación de los fumonisina en PPC del maíz incluyó 3 etapas, las cuales se describen a continuación.

2.5.1 Caracterización del proceso PPC

La caracterización del proceso PPC se realizó con el fin de determinar las condiciones del análisis a mantenerse constantes durante todo el experimento y para seleccionar en cuanto al grano de maíz el lugar, fecha y variedad.



2.5.2 Pruebas de agotamiento de cal para el PPC

Las pruebas de agotamiento de cal para el PPC tuvieron como objetivo:

Pelado de grano P como una función de la cantidad de cal, $P \rightarrow P(x)$

Cocinado del grano $\tau \rightarrow \tau(x)$

2.5.3 Pruebas de evaluación del PPC

La evaluación del PPC se realizó con el fin de determinar su potencial en la reducción del grado de contaminación con fumonisina B_1 . Esto se realizó mediante el análisis de FB_1 (Test F) considerando las variables independientes del pelado P , cocción τ y la concentración de cal x :

Test F $\rightarrow F(P, \tau) \rightarrow F(x)$:

1. Test F \rightarrow grano crudo sin PPC
2. Test F \rightarrow grano cocinado sin PPC
3. Test F \rightarrow grano pelado con PPC (con variación de la cantidad x de cal)
4. Test F \rightarrow grano PPC y cocinado

2.6 Manejo estadístico de datos

Los datos de las encuestas fueron ingresados por duplicado en el software EpiDATA versión 3.1. Esta información fue validada y exportada al software estadístico STATA 10.0 para realizar el análisis estadístico descriptivo respectivo.

El análisis de los datos cromatográficos se realizó con la ayuda del programa CHEMSTATION SW (Agilent Technologies) Los parámetros de validación de las



técnicas de análisis (linealidad, límites de detección y cuantificación, porcentaje de recuperación, precisión intra e inter-día) así como las curvas de calibración y cálculos fueron calculados utilizando Microsoft Excel 2010.

Los resultados experimentales se presentan como curvas de agotamiento de cal para el proceso PPC y curvas de reducción de fumonisinas en función de la concentración de cal y la etapa del proceso PPC. La diferencia de la concentración de fumonisina B₁ y la etapa del proceso de pelado (independientemente de la concentración de cal) fueron evaluadas mediante un Análisis de Varianzas (ANOVA) seguido de un Test de Scheffe para cuantificar dichas diferencias. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Stata 10.0 con un nivel de significancia del 5%.

2.7 Aspectos éticos

Este estudio constituye un trabajo adjunto al proyecto de investigación IFS E5398 “Assessment of the traditional wood ash nixtamalization as detoxification strategy to reduce Fumonisin and Aflatoxin contamination of boiled maize ("mote pelado"), Nabon-Ecuador” financiado por la Fundación Internacional de Ciencia (IFS), el cual cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad Central del Ecuador COBI/IRB (aprobación. 11/12/2014).



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del proceso de pelado de maíz con cal (PPC)

Para caracterizar el proceso de pelado de maíz con cal (PPC) se realizaron encuestas y posteriormente observaciones del proceso en situ.

3.1.2 Caracterización del PPC mediante encuestas

En total, se realizaron 30 encuestas sobre el proceso de PPC a personas que lo realizan de manera casera/artesanal en el cantón Cuenca. Los resultados de estas encuestas se presentan en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización del proceso de pelado de maíz con cal (PPC)

| Variable | Prevalencia n (%) |
|----------------------------------|-----------------------|
| Remojo del maíz antes del PPC | No 30 (100%) |
| Procedencia de la cal | Ferretería 30 (100%) |
| Tipo de olla | Cualquiera 26 (87.6%) |



| | | |
|---|--|------------|
| | Olla tamalera | 2 (6.7%) |
| | Olla de acero inoxidable | 1 (3.3%) |
| | Paila de bronce | 1 (3.3%) |
| Orden de los ingredientes para el proceso térmico del PPC | | |
| | Agua hirviendo + maíz + cal | 27 (90%) |
| | Agua + maíz + cal | 2 (6.7%) |
| | Agua tibia + maíz + cal | 1 (3.3%) |
| Tiempo de cocción hasta la remoción de la cáscara | | |
| | Hasta que empiece a desprenderse. | 21 (72.4%) |
| | 20 minutos | 4 (13.8%) |
| | 3-4horas | 2 (6.9%) |
| | 1 hora | 2 (6.9%) |
| Proceso de pelado PPC | | |
| | Pasar a un cesto holgado y frotar con las manos. | 26 (86.7%) |
| | Pasar a un cesto holgado y frotar con la ayuda de una cuchara. | 2 (6.7%) |
| | Reposar en el agua de pelado por una noche y pelar al día siguiente. | 2 (6.7%) |



Remojo posterior al PPC

Dejar en remojo toda la noche y lavar al día siguiente. 24 (80%)

Remojar un día cambiando el agua de 3-4 veces. 6 (20%)

Ecurrido posterior al PPC

Si 30 (100%)

Secado posterior al PPC

Secado extendido sobre cualquier superficie. 18 (60%)

Secar al sol sobre saquillos. 6 (20%)

Secar al sol sobre una estera. 6 (20%)

Tabla 4. Cantidad promedio de agua, cal y maíz del PPC

| Cantidad | n | Promedio \pm DE | Min-Max |
|--------------------------------|----|-------------------|------------|
| Cal (g) por cada 100 g de maíz | 30 | 7.6 \pm 3.6 | 2.0 - 18.2 |



| | | | |
|----------------------------------|----|-----------------|-------------|
| Agua (mL) por cada 100 g de maíz | 7 | 0.2 ± 0.7 | 0.08 - 0.02 |
| Relación maíz / cal | 30 | 17.6 ± 11.5 | 5.5 - 49.8 |

En general, los datos obtenidos de la encuesta fueron muy variables. Además, la mayoría de participantes (77%) no indicó la cantidad de agua utilizada, refiriéndose solamente a que debía ser una cantidad suficiente para cubrir la porción de maíz utilizada. Se realizó un experimento en el laboratorio en donde se intentó reproducir el proceso con las cantidades descritas en la encuesta, utilizando 400 g de maíz, 30.4 g de cal y se determinó la cantidad suficiente de agua que fue de 500 mL con 50 mL de pérdida durante el proceso de ebullición (550 mL en total). El experimento de réplica en el laboratorio no dio los resultados esperados posiblemente por omisión de lavado con agua corriente durante el pelado, lo cual no fue detallado en la encuesta. Por esta razón se decidió repetir la recolección de datos por observación del pelado in situ en el que se documentó paso a paso el proceso.

3.1.3 Caracterización mediante observación del PPC in situ

La observación in situ del PPC se llevó a cabo con la participación de tres personas conocedoras del proceso provenientes de tres diferentes sectores de la ciudad de Cuenca en tres días diferentes de la semana. Todas las observaciones coincidieron tanto en las cantidades utilizadas como en el procedimiento de PPC:

“Por cada 2 libras de maíz se empleaban 4 onzas de cal que se hacen hervir por alrededor de 10 minutos en 3 L de agua hasta



que la cascara se desprenda al frotar entre los dedos. Posteriormente se pasa el maíz a una canasta y se lava debajo de un chorro de agua continuo hasta que toda la cáscara se desprenda refregando con las manos y en contra de la canasta. Para proceder a la cocción es necesario desaguar el maíz por un periodo de 6 a 12 horas cambiando el agua cada 3 horas para finalmente cocinar el maíz cambiando el agua de los primeros 10 minutos de ebullición y dejando hervir hasta que el maíz este cocinado.”

3.1.4 Caracterización final del PPC

Para el proceso final se tomó en cuenta la información de la observación del PPC in situ. En el laboratorio se reprodujo el proceso trabajando con 100 g de maíz y las cantidades equivalentes de agua (330 mL) y cal (12.5 g). Luego del pelado, el maíz fue desaguado, cocinado y secado determinando el porcentaje de humedad ($59.4 \pm 2.4 \%$) (**Anexo 2**). El proceso completo fue documentado y se presenta en la Tabla 5 (**Anexo 3**).

Se realizaron ciertas modificaciones al proceso para reducir factores externos que puedan interferir en el desarrollo de los experimentos posteriores. Estas modificaciones incluyeron:

- Tapar la olla durante la cocción para el PPC, para evitar la contaminación ambiental y disminuir los tiempos de cocción
- Cambiar la canasta de esterilla para el pelado final por una canasta de plástico ya que dada la naturaleza de la canasta era propensa a enmohecer con el uso. Cabe mencionar que se trató de reemplazar la canasta por un colador de acero



inoxidable pero este no brindaba la superficie de rozamiento necesaria para la remoción de la cáscara.

Tabla 5. Proceso final PPC

| Etapa del proceso | Cantidad |
|---|----------|
| Cocción-PPC | |
| Cantidad de maíz (g) | 100 |
| Cantidad de cal (g) | 12.5 |
| Cantidad inicial de agua de cocción (mL) | 330 |
| Cantidad de agua después de la cocción (mL) | 105 |
| Tiempo de cocción (minutos) | 9 |
| Lavado, pelado y desaguado-PPC | |
| Cantidad de agua lavado/pelado manual (mL) | 9 925 |
| Cantidad de agua para remojo después del pelado (desaguado) | 500 |
| Cambios de agua de desaguado | 2 |
| Duración de cada desaguado (horas) | 3 |
| Cocción del grano pelado | |
| Tiempo de cocción (minutos) | 190 |
| Cantidad inicial de agua de cocción (mL) | 500 |
| Cantidad de agua añadida a los 10 minutos (mL) | 3 600 |
| Cantidad de agua al final de la cocción (mL) | 135 |



El maíz pelado por PPC y cocinado fue sometido a un proceso de secado en estufa a 110°C por 180 minutos, en el que se documentó también la cantidad de agua perdida. Las muestras de maíz secas fueron molidas con la ayuda de un molino de café y guardadas en bolsas de papel debidamente rotuladas para su posterior extracción mediante columnas SAX y su análisis por HPLC-FLD.

3.2. Pruebas de agotamiento de cal

Las pruebas de agotamiento de cal se realizaron para determinar la cantidad mínima de cal con la que se podía lograr un pelado eficiente. Para esto, se realizaron pruebas por duplicado con un lote de maíz seco con cáscara sin contaminación (blanco). Se pelaron 100 g de maíz en 330 mL de agua utilizando cantidades descendentes de cal a partir de la cantidad promedio de 12.5 g de cal: 0.5 g, 2.5 g, 5 g, 7.5g, 10g y 12.5 g.

Se documentaron los tiempos empleados en el proceso de PPC a diferentes concentraciones de cal, al igual que los volúmenes remanentes de agua en cada etapa del proceso (Tabla 6 y 7).



Tabla 6. Datos experimentales de las pruebas de agotamiento de cal en el PPC

| # Muestra | Réplica | Maíz (g) | Cal (g) | Pelado: tiempo (seg) | Pelado: agua final (ml) | Lavado: agua pelado (ml) | Secado: peso inicial (g) | Secado: peso final (g) |
|-----------|---------|----------|---------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | 1 | 100,4 | 12,5 | 540 | 110 | 9850 | 187,8 | 76,2 |
| 1 | 2 | 100,6 | 12,5 | 540 | 100 | 10000 | 179 | 83,5 |
| 2 | 1 | 100,6 | 10 | 732 | 90 | 6590 | 181,8 | 83,3 |
| 2 | 2 | 100 | 10 | 732 | 80 | 5800 | 182,8 | 82,9 |
| 3 | 1 | 100,1 | 7,5 | 762 | 70 | 6270 | 188,4 | 76,9 |
| 3 | 2 | 100 | 7,5 | 752 | 60 | 6510 | 191,2 | 80,1 |
| 4 | 1 | 100,3 | 5 | 770 | 60 | 6240 | 185,2 | 79,8 |
| 4 | 2 | 100,4 | 5 | 795 | 58 | 6230 | 174 | 74,2 |
| 5 | 1 | 100,2 | 2,5 | 798 | 58 | 7500 | 181,9 | 79,4 |
| 5 | 2 | 100,3 | 2,5 | 930 | 53 | 4460 | 178 | 71,3 |
| 6 | 1 | 100,1 | 0,5 | 1197 | 40 | 9480 | 184,5 | 82 |
| 6 | 2 | 100,2 | 0,5 | 1130 | 20 | 4240 | 163,4 | 74,1 |



Tabla 7. Constantes del proceso de las pruebas de agotamiento de cal en el PPC

| Constantes del proceso | Cantidad |
|--------------------------------------|-----------------|
| Pelado: agua inicial (ml) | 330 |
| Desaguado: tiempo total (h) | 6 |
| Desaguado: agua de cambio c/3 h (ml) | 500 |
| Desaguado: agua total a las 6 h (ml) | 1000 |
| Cocción: agua inicial (10 min) (ml) | 500 |
| Cocción: agua adición (190 min)(ml) | 3600 |
| Cocción: tiempo total (min) | 190 |
| Secado: tiempo total (min) | 180 |
| Secado: temperatura (°C) | 110 |

A partir de los datos de agotamiento de cal, se observó una relación inversa entre la concentración de cal y el tiempo de cocción de PPC (Figura 5). Sin embargo, esta relación no fue lineal sino que parece tornarse asintótica a partir de la concentración de 5 g.

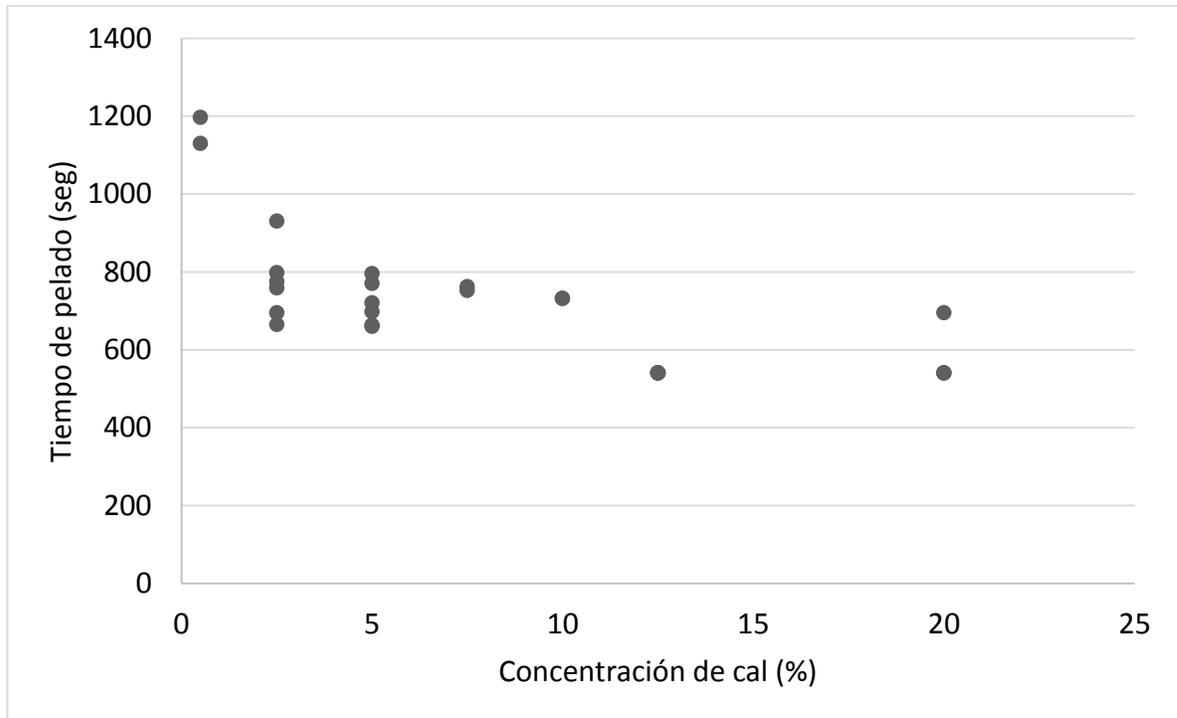


Figura 5. Curva de agotamiento de la cal en el proceso PPC: Tiempo de pelado (seg) vs. Concentración de cal (%). Pool de muestras.

Para la optimización del método se realizó un análisis tomando en cuenta el punto de vista económico, sensorial, nutritivo y toxicológico. A nivel sensorial, el rango óptimo de pelado PPC se encontraría dentro los 5-10g de cal ya que a estas concentraciones se logró un pelado eficiente del maíz y el sabor a cal se eliminó en las etapas de lavado, desaguado y cocción. Además, la cantidad de cal empleada sería menor a lo usual (12.5 %) lo que correspondería a una ligera ventaja económica pues la cal es un material barato y de fácil acceso. Desde el punto de vista nutricional y toxicológico de la utilización de cal en el proceso PPC, si bien la cal aporta una gran cantidad de calcio a la dieta su biodisponibilidad podría no ser la más óptima y por lo tanto no aportaría nutricionalmente a los



consumidores de maíz pelado con cal. Por otro lado, no existen estudios sobre posibles efectos adversos de emplear cal como un ingrediente dentro del proceso.

3.3. Pruebas de evaluación del PPC en la reducción de fumonisina B₁

3.1.1 Análisis de fumonisina B₁ en las muestras de maíz seco sin procesar

El grado de contaminación con fumonisina B₁ se evaluó en las muestras de maíz seco sin procesar. Para estos análisis se tomaron submuestras de 100 g de maíz de cada lote, la cual fue molida y procesada para el análisis por HPLC. Los resultados de los análisis se presentan en la Tabla 8 (**Anexo 4**).

En la mayoría de las muestras se observó cierto grado de contaminación con fumonisina B₁. Sin embargo, ningún valor estuvo por encima de los límites permitidos que ha establecido la Comisión Europea (4000 µg/kg) para la mezcla de FB₁+FB₂ en maíz sin procesar y la FDA (4000 µg/kg) para la mezcla de FB₁+FB₂+FB₃ en maíz entero, con remoción parcial del germen o para producción de masa (European-Commission, 2006; National-Grain-and-Feed-Association, 2011).

Tabla 8. Análisis de fumonisina B₁ en las muestras de maíz seco sin pelar (n=12).

| | |
|---|--------------|
| Muestras positivas (> LOD) | 12/12 (100%) |
| Muestras cuantificables (> LOQ) | 8/12 (67%) |
| X | 4.41 |
| DE | 7.44 |
| Min-Max | 1.13 - 22.79 |

LOD: Límite de detección = 0.55 µg/kg

LOQ: límite de cuantificación = 1.10 µg/kg



De las 12 muestras analizadas, las muestras con mayor grado de contaminación fueron escogidas para las pruebas de evaluación del proceso PPC.

3.1.2 Análisis de fumonisina B₁ durante el proceso PPC

Para evaluar la influencia del proceso PPC en la reducción de fumonisina B₁, se midió su concentración en dos muestras contaminadas naturalmente, en cada etapa del proceso:

- Test F → grano crudo sin PPC
- Test F → grano cocinado sin PPC
- Test F → grano pelado con PPC (con variación de la cantidad x de cal: 2.5%, 5%, 12.5% y 20%)
- Test F → grano PPC y cocinado

Los resultados se presentan en la Tabla 9 (**Anexo 5**). Se evaluó la reducción de FB₁ según la concentración de cal y la etapa del proceso PPC (Figura 6). Los resultados sugieren que la reducción ocurre independientemente de la cantidad de cal utilizada en el proceso, y que esta reducción fue mayor debido al pelado PPC ($92.1 \pm 4.9 \mu\text{g/kg}$) que debido a la cocción del maíz pelado ($83.4 \pm 15.3 \mu\text{g/kg}$).

MC= maíz crudo

MCC= maíz cocinado con cáscara.

MPSC= maíz pelado sin cocinar.

MPC= maíz pelado y cocinado.



Tabla 9. Reducción de FB₁ en las muestras de maíz mediante el proceso PPC

| Muestra | Etapa del proceso | Cal (%) | Test F (FB ₁) (µg/kg) | Reducción de FB ₁ (%) en el pelado | Reducción adicional de FB ₁ (%) en la cocción | Reducción total de FB ₁ (%) por PPC | |
|---------|-------------------|---------|-----------------------------------|---|--|--|--------------|
| a | MC | 0 | 5.90 | - | - | - | |
| a | MCC | 0 | 4.98 | - | - | - | |
| a | MPSC | 2.5 | 0.76 | 87.2% | | | |
| a | MPC | 2.5 | 0.29 | | 61.4% | 95.0% | |
| a | MPSC | 5 | 0.80 | 86.4% | | | |
| a | MPC | 5 | 0.10 | | 88.1% | 98.4% | |
| a | MPSC | 12.5 | 0.73 | 87.6% | | | |
| a | MPC | 12.5 | 0.05 | | 93.0% | 99.1% | |
| a | MPSC | 20 | 0.63 | 89.3% | | | |
| a | MPC | 20 | 0 | | 100.0% | 100.0% | |
| b | MC | 0 | 22.79 | - | - | - | |
| b | MCC | 0 | 0 | - | - | - | |
| b | MPSC | 2.5 | 0.70 | 96.9% | | | |
| b | MPC | 2.5 | 0 | | 100.0% | 100.0% | |
| b | MPSC | 5 | 0.66 | 97.1% | | | |
| b | MPC | 5 | 0.08 | | 87.3% | 99.6% | |
| b | MPSC | 12.5 | 1.00 | 95.6% | | | |
| b | MPC | 12.5 | 0.36 | | 64.0% | 98.4% | |
| b | MPSC | 20 | 0.78 | 96.6% | | | |
| b | MPC | 20 | 0.21 | | 73.3% | 99.1% | |
| | | | | X | 92.1% | 83.4% | 98.7% |
| | | | | DE | 4.9% | 15.3% | 1.6% |

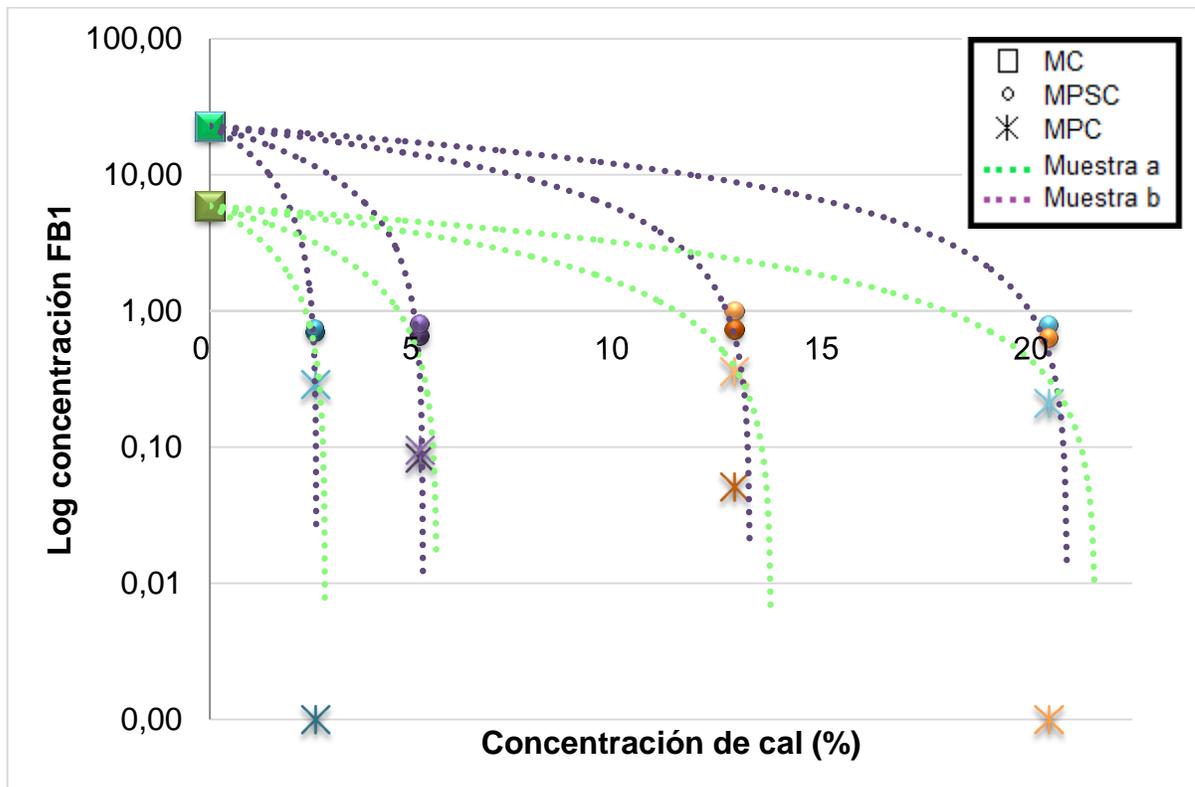


Figura 6. Curva de reducción de FB_1 según la concentración de cal y etapa del proceso PPC: Log concentración FB_1 vs. Concentración de cal (%)

La diferencia en la concentración final de FB_1 entre las etapas del proceso (maíz crudo, maíz pelado sin cocinar, maíz pelado y cocinado, maíz cocinado con cáscara) se evaluó también mediante un Análisis de Varianza seguido de un Test de Scheffe para cuantificar las diferencias (Tabla 10), obteniéndose que la etapa de pelado produce una reducción de 8.73 veces la concentración de FB_1 del maíz crudo ($P=0.030$), y que el maíz pelado y cocinado presentó una reducción de 9.14 veces la concentración de FB_1 del maíz crudo ($P=0.019$). Aunque no se observaron diferencias significativas entre las otras etapas del proceso, se



presume que estas diferencias pudiesen evidenciarse si se incrementa el número de experimentos.

Tabla 10. Evaluación de las diferencias de concentración de FB₁ entre las etapas del PCC por Anova - Scheffe

| | MC | MPSC | MPC |
|------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| MPSC | -8.72778 <i>P</i> = 0.030 * | | |
| MPC | -9.31444 <i>P</i> = 0.019 * | -0.586667 <i>P</i> =0.992 | |
| MCC | -7.0733 <i>P</i> = 0.305 | 1.65444 <i>P</i> =0.961 | 2.24111 <i>P</i> =0.911 |

MC= maíz crudo

MPSC=maíz pelado sin cocinar

MPC=maíz pelado y cocinado

MCC=maíz con cáscara cocinado

* Diferencia estadísticamente significativa

Desde el descubrimiento de las fumonisinas como contaminantes y posibles agentes carcinógenos varias han sido las técnicas y estrategias que se han planteado para lograr una disminución de las mismas en los alimentos contaminados. Se sabe que la separación física ayuda únicamente a eliminar el maíz claramente enmohecido pero esto no asegura una eliminación de las micotoxinas ya que estas pueden estar presente en el maíz de apariencia normal



o haberse contaminado en el proceso de secado o separación extraíble (Humpf & Voss, 2004a).

Los distintos procedimientos como la molienda en seco o en húmedo, la extrucción y la nixtamalización han sido reproducidos en varios laboratorios alrededor del mundo con el fin de identificar por cuál de estos procesos se logra una mayor disminución de la contaminación. Según estos estudios se ha determinado que la pérdida de fumonisinas se debe a cuatro factores: 1) la extracción o remoción de fumonisinas del grano, 2) a su destrucción, 3) transformación, 4) unión a otros componentes presentes en la matriz o su conversión a una forma menos extraíble (Humpf & Voss, 2004a).

En cuanto al proceso de nixtamalización como estrategia de descontaminación basada en un tratamiento térmico-alkalino se han estudiado los factores más significativos en la reducción de fumonisinas tales como la temperatura, pH, el tiempo de cocción y remojo, cantidad de azúcar añadida en algunos procesos culinarios y la relación cal / maíz empleada. Debido a gran estabilidad térmica de las fumonisinas, la temperatura no juega un rol determinante. La descomposición de fumonisinas debido a la acción térmica empieza a las 150°C, y a temperaturas igual o mayores a 175°C se ha observado una pérdida del 90% cuando la cocción se realiza por más de 60 min. También se ha determinado los tiempos de vida media de acuerdo a la temperatura, observándose que este factor seguía una cinética de primer orden con tiempos de vida media de 175 min a los 100°C, 30-38 min a los 125°C y de 10 min a 250°C, temperaturas extremadamente elevadas que se logran únicamente con el horneado o la fritura del alimento y no en los procesos de nixtamalización o PPC (Humpf & Voss, 2004a). El pH y su relación con la temperatura fue otro de los factores estudiados y de poca relevancia ya que las fumonisinas son muy estables a distintos pH que varían del ácido al alcalino, descendiendo su estabilidad cuando el pH varía de 4>7>10, lo que en teoría hace



más fácil la remoción de las fumonisinas cuando se aplica un tratamiento alcalino como la nixtamalización o el PPC. A pesar de esto se ha observado que no existe una pérdida significativa cuando el pH es neutro y la temperatura empleada es de 110-125°C pero si cuando el pH se eleva a 10 debido a la conversión de FB_1 a HFB_1 (De la Campa et al., 2004). El paso más importante para lograr una disminución casi completa de fumonisinas es la cocción y el remojo, pues el pH alcalino al igual que el remojo favorecen a la conversión de la fumonisina a su forma hidrolizada la que se supone es menos tóxica pero también más difícil de identificar debido a las cantidades pequeñas en las que se presenta. Se ha observado que durante el proceso de nixtamalización se produce una pérdida del 50% de fumonisina por su conversión a HFB_1 , de este 50%, el 50% se encuentra en el agua de cocción y el 11% en el agua de lavado (Palencia et al., 2003). Resultados similares han sido mencionados por otros autores que reportan una pérdida del 81.5% y 100% respectivamente, posterior al proceso de nixtamalización por la misma razón de conversión a la forma hidrolizada (De la Campa et al., 2004; Humpf & Voss, 2004a). Además se ha mencionado que existe una mayor pérdida de fumonisinas cuanto mayor sea la adición de cal al proceso de cocción, por lo que esta variable fue evaluada en el proceso PPC de este estudio sin encontrar una mayor influencia en la reducción de la fumonisina B_1 .

Estudios de caracterización por observación de procesos tradicionales, como el realizado en este estudio, han sido descritos para documentar el proceso de nixtamalización en las comunidades Mayas de Guatemala (Palencia et al., 2003). En particular permitía la conversión de 21 veces más HFB_1 que FB_1 posterior al tratamiento alcalino. Este reporte permite asumir que cuando el proceso de PPC es utilizado la conversión de la fumonisina a su forma hidrolizada debe ser relativamente menor debido a que en el PPC los tiempos de remojo no son tan extensos como los reportados en la nixtamalización (15 horas) y tampoco se llega



a la pérdida del germen pero si hay una pérdida del 95% de FB_1 por la remoción del pericarpio.

Distintos procesos culinarios menos agresivos que la nixtamalización reportan valores diferentes de pérdida de fumonisina tal es el caso de lugares como África e Italia, donde se han reportado pérdidas del 23 y el 8% cuando se cocina ugali o polenta con maíz contaminado (Palencia et al., 2003) que harían referencia solo a la influencia de la cocción.



IV. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Luego de caracterizar el proceso y evaluar la influencia de la utilización de diferentes cantidades de cal se concluye que, a los rangos de concentración de cal estudiados (2.5-20%), la concentración de cal no influyó en la reducción de fumonisina B₁ en el maíz seco. Sin embargo, la presencia de cal permite crear el medio alcalino necesario para la transformación de la fumonisina B₁ en su forma hidrolizada y por ende promueve su transferencia al medio líquido de cocción y lavado. Por otro lado, se observó que en general el proceso térmico- alcalino de pelado provoca una reducción de aproximadamente 10 veces la contaminación inicial de fumonisina B₁ y que el proceso de cocción (que incluye el lavado y la cocción en agua) contribuye con la reducción de la toxina en aproximadamente 10 veces más.

Para elucidar si la reducción de fumonisina B₁ se debió al proceso mecánico de remoción de la cáscara, o a la transformación química a su forma hidrolizada (como sucede en la nixtamalización que es un proceso alcalino-térmico mucho más agresivo) se requieren experimentos adicionales, por lo que este trabajo podría considerarse como un estudio explorativo preliminar.

Desde el punto de vista sensorial y económico, se podría reducir la cantidad habitual de 12.5% de cal hasta 5% para realizar el proceso PPC manteniendo la eficiencia del pelado en términos de la remoción de la cáscara y el tiempo utilizado en el proceso, y sin dejar un sabor remanente a cal proveniente del proceso.



4.2. Recomendaciones

La recomendación principal de este trabajo es continuar con el estudio considerando:

- Incrementar el número de muestras analíticas en cada etapa del proceso.
- Incluir muestras contaminadas artificialmente que permitan la experimentación a concentraciones más altas de la toxina y permita a su vez un mayor control de la variable dependiente.



REFERENCIAS

- Bryła, M., Roszko, M., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R., Obiedziński, M. W., & Sękul, J. (2013). Fumonisin in plant-origin food and fodder—a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(9), 1626-1640.
- Cuenca, F. m. t. p. (2016). Generalidades del destino. Retrieved from <http://www.cuenca.com.ec/>
- Dall'Asta, C., Falavigna, C., Galaverna, G., Dossena, A., & Marchelli, R. (2010). In vitro digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 12042-12047.
- De la Campa, R., Miller, J. D., & Hendricks, K. (2004). Fumonisin in Tortillas Produced in Small-Sale Facilities and Effect of Traditional Masa Production Methods on This Mycotoxin. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 52, 4432-4437.
- Dombrink-Kurtzman, M. A., Dvorak, T. J., Barron, M. E., & Rooney, L. W. (2000). Effect of Nixtamalization (Alkaline cooking) on Fumonisin-Contaminated Corn for Production of Masa and Tortillas. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 5781-5786.
- Días Roig, M., & Miaja, M. T. (2016, 22 enero 2016). Nixtamalización. Retrieved from <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Nixtamalizaci%C3%B3n&oldid=88615959>
- European-Commission. (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Commission regulations EC.*, 5-24. Retrieved from
- Grenier, B., Bracarense, A.-P. F., Schwartz, H. E., Trumel, C., Cossalter, A.-M., Schatzmayr, G., . . . Oswald, I. P. (2012). The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B 1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochemical pharmacology*, 83(10), 1465-1473.
- Hartinger, D., & Moll, W.-D. (2011). Fumonisin elimination and prospects for detoxification by enzymatic transformation. *World mycotoxin journal*, 4(22 January 2011), 271-283.
- Humpf, H.-U., & Voss, K. A. (2004a). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisins mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48, 255-269.
- Humpf, H.-U., & Voss, K. A. (2004b). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisins mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48, 255-269.
- IARC. (2003). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2002, Lyon (France), International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (Vol. 82, pp. 594): Elsevier.



- Nabón, G. a. d. m. d. (2015). Ubicación geográfica. Retrieved from <http://www.nabon.gob.ec/portal/index.php/municipio/ubicacion-geografica>
- National-Grain-and-Feed-Association. (2011). FDA Micotoxyn regulation guidance, 15. Retrieved from
- Pagliuca, G., Ziorini, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G. P., & Piva, A. (2005). Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 819(2005), 97-103.
- Palencia, E., Torres, O., Hagler, W., Meredith, F., Williams, L., & Ridley, R. (2003). Total Fumonisin Are Reduced in Tortillas Using the Traditional Nixtamalization Method of Mayan Communities. *Journal of Nutrition*, 3200-3203.
- Shephard, G. S. (1998). Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 31-39.



ANEXOS

Anexo 1: Encuesta sobre el pelado de maíz con cal

| ENCUESTA SOBRE PELADO DEL MAÍZ CON CAL | |
|--|--|
| Proyecto "Evaluación del pelado tradicional con ceniza como estrategia de descontaminación de micotoxinas (fumonisinas y aflatoxinas) en el mote pelado, Nabón-Ecuador" | |
| Número de registro | <input type="text"/> |
| Fecha de la encuesta (dd/mm/aa) | <input type="text"/> |
| DATOS GENERALES: | |
| Nombre del encuestado: | <input type="text"/> |
| Dirección: | <input type="text"/> |
| Teléfono: | <input type="text"/> |
| 1. ¿Remoja el maíz antes de pelarlo? | |
| 1. Si | <input type="text"/> |
| 2. No | |
| | → ¿Por cuánto tiempo? <input type="text"/> |
| 2. ¿De dónde obtiene la cal para pelar el maíz? | |
| <input type="text"/> | |
| ¿Qué cantidad de cal y agua utiliza para pelar una cantidad de | |
| 3. maíz? | |
| <i>Ejemplo: 1 onza de cal por galón de agua para pelar 1 galón de maíz</i> | |
| <input type="text"/> | |



4. ¿Cómo realiza el pelado del maíz?

Detallar el proceso completo, paso a paso hasta que el grano esté pelado

| |
|--|
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |

Nota: revisar que la siguiente información esté incluida en la descripción del proceso detallado anteriormente

| | |
|---|--|
| Cantidad de cal, agua y maíz | |
| Tiempo de cocción hasta remover la cáscara | |
| Remojo antes y después del pelado | |
| Escurreo (cómo lo hace, qué hace con el agua) | |
| Tipo de olla | |
| Secado posterior (sí/no; donde seca el maíz, por cuánto tiempo) | |

¡GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!



Anexo 2: Documentación del contenido de humedad del maíz pelado y cocinado

| #muestra | Réplica | Peso cápsula vacía (g) | Muestra | Peso 1 | Peso 2 | Peso 3 | Peso 4 | Peso 5 | Peso 6 | Peso 7 (cte) | %H | %MS |
|----------|---------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------|------|-------------|
| 1 | 1 | 54.0977 | 5.0001 | 56.1271 | 56.1078 | 56.096 | 56.0871 | 56.0816 | 56.078 | 56.074 | 39.5 | 60.5 |
| 1 | 2 | 53.3491 | 5.0493 | 55.5612 | 55.5413 | 55.5282 | 55.5201 | 55.5149 | 55.5089 | 55.5045 | 42.7 | 57.3 |
| 2 | 1 | 53.177 | 5.0651 | 55.3476 | 55.3363 | 55.3194 | 55.3113 | 55.3067 | 55.3016 | 55.2981 | 41.9 | 58.1 |
| 2 | 2 | 56.8295 | 5.2008 | 58.8548 | 58.8422 | 58.8331 | 58.8272 | 58.8234 | 58.8234 | 58.8234 | 38.3 | 61.7 |
| 3 | 1 | 56.959 | 5.0581 | 58.9788 | 58.9623 | 58.9511 | 58.9437 | 58.9401 | 58.9344 | 58.9319 | 39.0 | 61.0 |
| 3 | 2 | 54.7756 | 5.134 | 56.8701 | 56.8505 | 56.838 | 56.8301 | 56.8253 | 56.8191 | 56.8186 | 39.8 | 60.2 |
| 4 | 1 | 52.8464 | 5.368 | 54.8705 | 54.8586 | 54.8358 | 54.8294 | 54.8261 | 54.8212 | 54.8187 | 36.7 | 63.3 |
| 4 | 2 | 52.3041 | 5.0272 | 54.5961 | 54.5775 | 54.566 | 54.558 | 54.5528 | 54.5491 | 54.5429 | 44.5 | 55.5 |
| 5 | 1 | 57.2342 | 5.0766 | 59.3195 | 59.3016 | 59.2892 | 59.2819 | 59.2769 | 59.2716 | 59.2665 | 40.0 | 60.0 |
| 5 | 2 | 56.8956 | 5.1278 | 58.9165 | 58.8958 | 58.8874 | 58.8815 | 58.8776 | 58.8736 | 58.8686 | 38.5 | 61.5 |
| 6 | 1 | 53.0824 | 5.0239 | 55.2466 | 55.2309 | 55.2193 | 55.213 | 55.2087 | 55.2033 | 55.1984 | 42.1 | 57.9 |
| 6 | 2 | 53.2754 | 5.0611 | 55.568 | 55.5513 | 55.5414 | 55.5345 | 55.5304 | 55.5269 | 55.5206 | 44.4 | 55.6 |



Anexo 3: Documentación gráfica del proceso PPC



Ilustración 1. PPC: maíz con 20g cal



Ilustración 2. PPC: maíz cocido con cal a los 9 min



Ilustración 3. PPC: maíz pelado, 20g cal



Ilustración 4. PPC: maíz en remojo (6 horas)



Ilustración 5. PPC: maíz pelado en cocción



Ilustración 6. Maíz cocinado con cáscara



Ilustración 7. Maíz cocinado con cáscara posterior al secado



Ilustración 8. Proceso de extracción posterior al PPC.



Anexo 4: Documentación del análisis de fumonisina B₁ en las muestras de maíz seco sin procesar

| # Muestra | Área | Tiempo de retención (min) | ng de FB ₁ inyectados (curva de calibración) | g de muestra inyectados (proceso de extracción) | ug/kg (ng/g) | Detección / Cuantificación |
|-----------|---------|---------------------------|---|---|--------------|----------------------------|
| 1 | 0.18450 | 6.046 | 11.584 | 10 | 1.16 | > LOQ |
| *2 | 0.38614 | 6.011 | 24.719 | 10 | 2.47 | > LOQ |
| 3 | 0.30797 | 5.967 | 19.628 | 10 | 1.96 | > LOQ |
| 4 | 0.29288 | 5.929 | 18.644 | 10 | 1.86 | > LOQ |
| *5 | 4.30274 | 5.894 | 227.853 | 10 | 22.79 | > LOQ |
| 6 | 0.13210 | 5.89 | 8.172 | 10 | 0.82 | >LOD |
| 7 | 0.17965 | 5.905 | 11.269 | 10 | 1.13 | > LOQ |
| 8 | 0.13862 | 5.911 | 8.596 | 10 | 0.86 | >LOD |
| 9 | 0.12929 | 5.908 | 7.988 | 10 | 0.80 | >LOD |
| 10 | 0.27360 | 5.918 | 17.388 | 10 | 1.74 | > LOQ |
| 11 | 0.34605 | 5.91 | 22.108 | 10 | 2.21 | > LOQ |
| 12 | 0.17032 | 5.906 | 10.661 | 10 | 1.07 | >LOD |

* Muestras seleccionadas para el proceso de PPC.

LOD: límite de detección = 0.55 µg/kg

LOQ: límite de cuantificación = 1.10 µg/kg



Anexo 5: Documentación de las pruebas de evaluación del proceso PPC en la reducción de fumonisina B₁

| # | Muestra | Proceso | Maíz (g) | Cal (g) | Pelado: tiempo (seg) | Pelado: agua final (ml) | Lavado: agua pelado (ml) | Cocción: agua final - 500 (ml) | Cocción: agua final - 3600 (ml) | Secado: peso inicial (g) | Secado: peso final (g) | Secado: tiempo total (min) | Cocción- CC: agua final | Cocción- CC: agua inicial | Cocción- cc: tiempo total (min) | Test F (FB ₁) |
|----|---------|---------|----------|---------|----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | 5 | MPC | 100.3 | 2.5 | 775 | 150 | 4070 | 380 | 1560 | 226.1 | 100.9 | | | | | 0 |
| 2 | 5 | MPC | 100.1 | 5 | 720 | 90 | 2670 | 360 | 1700 | 236.6 | 87.4 | | | | | 0.08 |
| 3 | 5 | MPC | 100.5 | 12.5 | 540 | 110 | 2110 | 230 | 1880 | 237.8 | 99.4 | | | | | 0.36 |
| 4 | 5 | MPC | 100.3 | 20 | 540 | 180 | 5660 | 350 | 1590 | 202.6 | 84 | | | | | 0.21 |
| 5 | 5 | MPSC | 100.3 | 2.5 | 665 | 180 | 2500 | | | 136.9 | 92.7 | | | | | 0.70 |
| 6 | 5 | MPSC | 100.5 | 5 | 660 | 150 | 2670 | | | 149 | 87.9 | | | | | 0.66 |
| 7 | 5 | MPSC | 100.3 | 12.5 | 540 | 150 | 4590 | | | 131 | 87.9 | | | | | 1.00 |
| 8 | 5 | MPSC | 100.2 | 20 | 540 | 160 | 4400 | | | 135.3 | 87.3 | | | | | 0.78 |
| 9 | 2 | MPC | 100.4 | 2.5 | 759 | 140 | 4560 | 360 | 2000 | 205.1 | 85.4 | | | | | 0.29 |
| 10 | 2 | MPC | 100.4 | 5 | 697 | 140 | 3640 | 310 | 1100 | 217.2 | 86.9 | | | | | 0.10 |
| 11 | 2 | MPC | 100.4 | 12.5 | 540 | 160 | 4120 | 250 | 900 | 211 | 140.2 | | | | | 0.05 |
| 12 | 2 | MPC | 100.4 | 20 | 695 | 180 | 4000 | 370 | 1590 | 196.7 | 80.8 | | | | | 0 |
| 13 | 2 | MPSC | 100.3 | 2.5 | 695 | 200 | 2230 | | | 129.2 | 83.8 | | | | | 0.76 |
| 14 | 2 | MPSC | 100.2 | 5 | 663 | 130 | 2840 | | | 112.4 | 83.2 | | | | | 0.80 |
| 15 | 2 | MPSC | 100.2 | 12.5 | 540 | 110 | 2850 | | | 139.9 | 85.4 | | | | | 0.73 |
| 16 | 2 | MPSC | 100.2 | 20 | 540 | 150 | 2800 | | | 123.6 | 84.4 | | | | | 0.63 |
| 17 | 5 | MCC | 200.8 | | | | | | | 432 | 258.7 | 210 | 340 | 8600 | 300 | 0 |



| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|------|-------|---|--|--|--|--|--|-------|-------|-----|-----|------|-----|-------|
| 18 | 2 | MCC | 100.1 | | | | | | | 211.7 | 101.5 | 210 | 170 | 5200 | 272 | 4.98 |
| 19 | 5 | MC | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 20 | 2 | MC | | | | | | | | | | | | | | 5.90 |
| 21 | 5 | MC | | | | | | | | | | | | | | 22.79 |
| 22 | 5 | MPC | | 5 | | | | | | | | | | | | 1.15 |
| 23 | 5 | MPSC | | 5 | | | | | | | | | | | | 1.46 |

MC= maíz crudo

MPSC=maíz pelado sin cocinar

MPC=maíz pelado y cocinado

MCC=maíz con cáscara cocinado.