

Efecto del pH en la concentración de las aflatoxinas presentes en el maíz sometido a
nixtamalización

Karen Melisa Estévez Angarita y Juliana Peña Quiroga

Trabajo de Grado para Optar el título de Químico

Director

Luis Javier López Giraldo

Doctor en Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Codirector

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, Msc

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A mi madre por su entrega, amor y presencia, este logro es compartido contigo, te admiro y agradezco que nunca dejaras de apostar por mí, luchar conmigo y para mí.

También a mi padre, mi Keith y tía Fabiola, por su amistad, amor y apoyo.

Finalmente, a mi compañera de proyecto por su paciencia, calma y dedicación para el desarrollo de este trabajo.

Karen Melisa Estévez Angarita

Dedicatoria

Principalmente doy gracias a Dios por darme la vida, oportunidad y capacidad de realizar mis estudios universitarios.

A mi papá y mi mamá, ya que sin su apoyo y paciencia este logro hubiese sido muy difícil de conseguir, ellos junto con su bendición y ejemplo de superación me animaron a lograr este objetivo, también a mis hermanos Camila y Santiago, por su tiempo y disposición de ayudarme, por ser mi apoyo cuando necesitaba un descanso y un ejemplo de que cuando algo se quiere se puede lograr.

A mi compañera de proyecto, por su paciencia en momentos de estrés, su compromiso y dedicación para el correcto desarrollo de este trabajo.

Juliana Peña Quiroga

Agradecimientos

A nuestros padres, familiares y amigos por su apoyo constante, la paciencia, los consejos y el amor hacía nosotras. En especial a Angie Katherine Romero, por su apoyo, guía y tiempo para este trabajo.

Al grupo de investigación CICTA, en especial al profesor Luis Javier López, Arley Villamizar y Sergio Pico, por la oportunidad de trabajar en este proyecto y por la confianza y guía en la realización de este.

A la Universidad Industrial de Santander por la enseñanzas y formación profesional y personal brindada.

Finalmente, a las profesoras Janet Aide Perea y Marianny Yajaira Combariza, por su tiempo y valoración para este proyecto.

Contenido

	Pág.
Introducción.....	11
1. Objetivos.....	14
1.1 Objetivo General	14
1.2 Objetivos Específicos	14
2. Marco teórico	15
2.1 El maíz	15
2.2 Las micotoxinas	18
2.3 Las aflatoxinas.	18
2.4 Detección de aflatoxinas.....	22
2.4.1 Verificación del método.	25
2.5 Nixtamalización.	27
2.6 Digestión gastro intestinal.	30
3. Metodología	32
3.1 Muestras.....	32
3.2 Verificación del método analítico	32
3.3 Análisis de aflatoxinas.....	34
3.3.1 Extracción y purificación.....	35
3.3.2 Derivatización.	35

3.3.3 Análisis por HPLC.	35
3.4 Nixtamalización	36
3.5 Digestión gastro-intestinal in vitro.....	37
3.5.1 Preparación de las soluciones estándar.....	38
3.5.2 Digestión gástrica in vitro (DG).....	38
3.5.3 Digestión intestinal in vitro (DGI).	39
3.5.4 Recuperación de la forma detectable de las aflatoxinas.	39
3.5.5 Bioaccesibilidad.	40
3.6 Tratamiento de datos.	41
4. Resultados y discusión	41
4.1 Verificación del método analítico	41
4.2 Nixtamalización.	46
4.3 Análisis del contenido de aflatoxinas post-nixtamalización en las etapas del nejayote y las simulaciones digestivas.	49
4.4 Bioaccesibilidad	52
5. Conclusión	53
6. Recomendaciones.....	54
Referencias Bibliográficas.....	55

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición química proximal del maíz.	15
Tabla 2. Condiciones del proceso de nixtamalización del maíz típicamente empleadas.	28
Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas para las digestiones.	38
Tabla 4. Resultados de verificación del método.	43
Tabla 5. Resultados de precisión y exactitud.	45
Tabla 6. Concentraciones de aflatoxinas en maíz sin nixtamalizar, muestras control (MF-2C y MF-3C).	46
Tabla 7. Concentraciones de AFs en la muestra control inicial (MF-2C) y final después del proceso de nixtamalización (MF-2) a 1,0% Ca(OH) ₂	49
Tabla 8. Porcentaje de aflatoxinas presentes en cada etapa del proceso de 1,0% de Ca(OH) ₂ respecto a la muestra control (MF-2C).	50
Tabla 9. Porcentaje de recuperación (%r) de la forma detectable de las aflatoxinas en muestras nixtamalizadas sometidas a una simulación DG y DGI.	51
Tabla 10. Porcentajes de bioaccesibilidad de las aflatoxinas detectadas en las muestras tratadas a 1,0 % de Ca(OH) ₂	52

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Maíz amarillo y estructura de un grano de maíz.	16
Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2.	21
Figura 3. Reacción de AFB1 con TFA en solución acuosa.	24
Figura 4. AFB2a y AFG2a productos de la derivatización.	24
Figura 5. Reacción de la hipótesis de la apertura del anillo de lactona.	30
Figura 6. Resumen de la metodología utilizada para el análisis de la influencia del pH en la concentración de aflatoxinas.	40
Figura 7. Cromatogramas del material de referencia certificado (MRC), muestra natural (MF-1) y blanco (Bk). Tiempos de retención (min), G1 (5,99), B1(7,36), G2(11,91) y B2(15,89).	42
Figura 8. Curvas de calibración de las aflatoxinas G1 y B1.	44
Figura 9. Curvas de calibración de las aflatoxinas G2 y B2.	44
Figura 10. Porcentajes de reducción (%R) de las aflatoxinas B1 y G1 calculados para la nixtamalización a diferentes concentraciones de cal. (50 min de ebullición y 17 horas de remojo). (A) Muestra MF-2 (B) Muestra MF-3.	47

Resumen

Título: Efecto del pH sobre la concentración de las aflatoxinas presentes en el maíz sometido a nixtamalización*

Autor: Karen Melisa Estévez Angarita, Juliana Peña Quiroga**

Palabras Clave: Micotoxinas, aflatoxinas, nixtamalización, bioaccesibilidad.

Descripción:

Las aflatoxinas son micotoxinas presentes en el maíz (*Zea mays* L), son producidas por diferentes especies fúngicas del género *Aspergillus*, comunes y dispersos en la naturaleza, sobre todo en zonas de clima cálido y húmedo. Estudios previos muestran que la exposición a estas representa un riesgo para la salud humana y animal, por lo que es importante llevar un control de sus concentraciones y realizar procesos que propendan la mitigación de éstas. La nixtamalización es el tratamiento tradicional que se hace al maíz usado en la producción de arepas, tortillas o tamales. En el presente trabajo se verificó un método analítico para la detección y cuantificación de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en el maíz mediante el uso de HPLC-FD, evaluando diferentes parámetros como selectividad, linealidad ($>0,995$), límites de detección ($<0,5\text{ng/mL}$) y cuantificación ($<1,5\text{ng/mL}$), precisión ($\text{RSD} \leq 22\%$) y exactitud representada con porcentajes de recuperación entre 75-110%. Además, se realizó la nixtamalización a escala de laboratorio a los granos de maíz, obteniendo una reducción en la concentración de las aflatoxinas B1, G1 y totales de 70 a 97% en las diferentes muestras. Adicionalmente, a las muestras nixtamalizadas se le aplicó una simulación del proceso de digestión gastro-intestinal *in vitro*, donde se obtuvieron valores de bioaccesibilidad entre 7-41% y un porcentaje de recuperación $<23,22\%$ de la concentración de aflatoxinas totales. El cambio en el pH presente en la nixtamalización y digestión gastro-intestinal influyó significativamente en la concentración de aflatoxinas en el maíz.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo. Codirector: Arley René Villamizar Jaimes.

Abstract

Title: Effect of pH on the concentration of aflatoxins present in corn subjected to nixtamalization*

Author: Karen Melisa Estévez Angarita, Juliana Peña Quiroga**

Key words: Mycotoxins, aflatoxins, nixtamalization, bioaccessibility.

Description:

Aflatoxins are mycotoxins which are presented in corn (*Zea mays* L). They are produced by different fungal species of the genus *Aspergillus*, highly common and dispersed in nature, especially in hot and humid climate zones. Previous studies have shown that the exposure to these represent a risk to human and animal health, therefore is important to monitor their concentrations and carry out processes that promote their mitigation. Nixtamalization is the traditional treatment of corn that will be used to make arepas, tortillas or tamales. This study shows an analytical method for the detection and quantification of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) in corn. It was verified by HPLC-FD, evaluating different parameters such as selectivity, linearity ($> 0,995$), detection limits ($<0,5\text{ng/mL}$) and quantification ($<1,5\text{ng/mL}$), precision ($\text{RSD} \leq 22\%$) and accuracy represented with recovery percentages between 75-110%. In addition, the corn grains were nixtamalized on a laboratory scale, obtaining a reduction in the concentration of B1, G1 and total aflatoxins from 70 to 97% in the different samples. Additionally, a simulation of the in vitro gastro-intestinal digestion process was applied to the nixtamalized samples, where bioaccessibility values between 7-41% and a recovery percentage $<23,22\%$ of the total aflatoxin concentration were obtained. The change in pH present in the nixtamalization and gastro-intestinal digestion significantly influenced the aflatoxin concentration in corn.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo. Co-director: Arley René Villamizar Jaimes.

Introducción

Las aflatoxinas (AFs) son toxinas naturales producidas por diferentes especies fúngicas del género *Aspergillus*, pertenecen al grupo de las micotoxinas y se encuentran presentes en alimentos como cereales, frutos secos y especias (A. Méndez & Moreno, 2011) (OMS, 2018). Existen alrededor de 20 tipos de aflatoxinas, entre ellas la B1, B2, G1, G2 (Londoño & Martínez, 2017), las cuales tienen mayor relevancia por su efecto en la salud, ya que, se encuentran asociadas con el cáncer de hígado, y son catalogadas como agente carcinógeno del grupo I, por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC, por sus siglas en inglés (Teresa et al., 2006).

Las zonas cálidas y húmedas proporcionan un ambiente favorable para la proliferación de las especies de hongos productores de aflatoxinas. Considerando que el maíz se produce en zonas cálidas es uno de los cultivos más susceptible a contaminación aflatoxigénica (Martínez et al., 2014).

En Colombia, el maíz es uno de los alimentos con mayor participación en el sector agropecuario y en los últimos años su producción ha ido en aumento; sin embargo, la demanda supera su oferta, lo que genera la necesidad de importación de aproximadamente 85% del consumo total; en el periodo de 2017 a 2019 se importaron entre 4.600.000 y 5.300.000 toneladas anuales, provenientes principalmente de Estados Unidos, Argentina y Brasil (INS & MINSALUD, 2015)(Centro Virtual de Negocios, 2019; Ventura Group, 2020). Del maíz importado el 77% se destina a la industria de piensos para animales, mientras que, el 63% de la producción nacional, es destinada para consumo humano (Hoyos & Ocampo, 2015).

Según la Norma Técnica Colombiana NTC 3581 de 2006, la concentración de aflatoxinas no debe exceder el límite de 20 µg/kg, restricción equivalente a las establecidas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y la organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés) (FAO - ONU, 2004; Venegas et al., 2014). En Medellín, se ha confirmado la presencia de aflatoxinas en muestras de maíz, con niveles superiores al máximo establecido por las entidades mencionadas anteriormente. Además, estudios realizados por Díaz, Perilla & Rojas (2001) demostraron que el 12,8% de las muestras de maíz estaban contaminadas por aflatoxinas; además, 12 de las 22 muestras positivas excedían el límite permitido (Díaz et al., 2001)

En la región del oriente colombiano, uno de los alimentos tradicionales es la arepa santandereana o de maíz pelado, la cual es consumida más de dos veces por semana por el 84% de la población (Bermúdez et al., 2006). La arepa de maíz pelado, junto con otros alimentos como las tortillas y los tamales, son fabricados a base de maíz nixtamalizado.

La nixtamalización, es un proceso termo-alcalino que se practica con el fin de ablandar el grano y retirarle la cáscara antes de molerlo (Robinson, n.d.). Además, diversas investigaciones evidencian que este tratamiento influye en la reducción de la concentración de las aflatoxinas (J. A. Méndez et al., 2004) (J. Méndez et al., 2004). Sin embargo, los resultados de investigadores como Méndez *et al.* (2004) y Moctezuma et al (2015) han mostrado que las aflatoxinas se pueden regenerar en medio ácido y neutro, a pH similares al del estómago e intestino delgado, respectivamente (J. A. Méndez et al., 2004)(Moctezuma et al., 2015), lo que implica una mayor bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos, aumentando el riesgo para la salud (Anguiano et al., 2005).

En Colombia, especialmente en Santander, no se ha realizado ninguna investigación en la que se evalúe simultáneamente el efecto que tiene el porcentaje cal hidratada sobre el contenido de AFs en la masa de maíz antes y después de consumo, usando una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de cal en la etapa de nixtamalización sobre el contenido de aflatoxinas y la bioaccesibilidad de éstas usando una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Esta investigación se realizó en el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los cambios de pH sobre la concentración de las aflatoxinas presentes en el maíz sometido a nixtamalización.

1.2 Objetivos Específicos

Verificar la técnica de cuantificación de aflatoxinas en cromatografía líquida con detector de fluorescencia.

Evaluar el cambio en la concentración de las aflatoxinas en el maíz al variar las cantidades de cal hidratada en el proceso de nixtamalización.

Analizar la concentración de las aflatoxinas bioaccesibles en el maíz nixtamalizado sometido a una digestión gastro-intestinal *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 El maíz

El maíz (*Zea mays L*) es un cereal perteneciente a la familia de las poáceas, gramíneas (David et al., 2013) y es una de las materias primas más requeridas a nivel mundial, debido a sus diferentes usos en la industria alimenticia; entre ellos la fabricación de dextrinas, aceites y otros productos derivados de su proceso de fermentación (Hoyos & Ocampo, 2015). Es una planta monoica anual, de origen americano y junto con los cultivos de arroz y trigo es adaptable a casi cualquier tipo de suelo, por lo que su producción es una de las más importantes en el mundo (Molina et al., 2015).

La composición química del maíz varía en función del tipo, la zona de cultivo y las condiciones de cosecha, pero en general se encuentra distribuida como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1.

Composición química proximal del maíz.

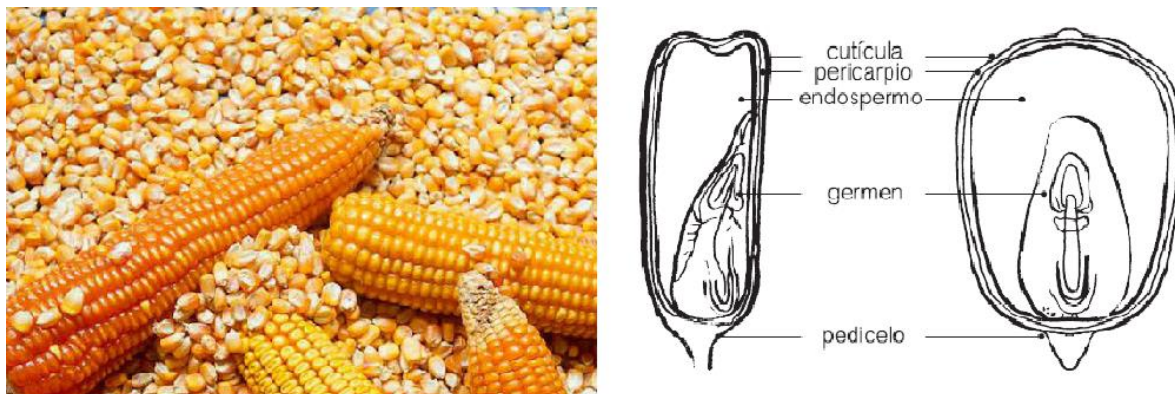
Componente	Cantidad (g/100g)
Proteína	2,67
Grasa	0,67
Ceniza	2,7
Agua	70
Carbohidratos	23,96

Nota. Adaptado de FoodData Central (2019) (Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), 2019).

En la **Figura 1** se observa las principales zonas en que está dividido el grano de maíz: el pericarpio o cubierta, el endospermo o amiláceo y el embrión o germen. El pericarpio contiene 87% de fibra, la cual está formada por los polisacáridos de celulosa, hemicelulosa y lignina (Yúfera & Dorrién, 1987). El endospermo aporta el 87% del peso en base seca del grano, éste se caracteriza por su elevado contenido de gluten y almidón, este último es una macromolécula compuesta de amilosa y amilopectina, es el principal compuesto presente en el maíz, alcanzando un 70% del peso seco del grano de maíz (Baltes, 2006). Finalmente se encuentra el germen, el cual posee una gran cantidad de grasa vegetal, proteínas y minerales, y contribuye con el 11,5% del peso del grano (Santiago et al., 2018).

Figura 1.

Maíz amarillo y estructura de un grano de maíz.



Nota. Adaptado de La nixtamalización y el valor nutricional del maíz, Pág. 62 (Paredes et al., 2009)

El mayor uso del maíz se encuentra en el consumo animal y humano, con un porcentaje del 61,2% y 14,2% respectivamente (Hoyos & Ocampo, 2015). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO por sus siglas en inglés, el maíz es

el segundo cultivo de mayor producción mundial, después del trigo, con una producción de hasta 872,8 millones de toneladas (Londoño & Martínez, 2017). Los principales productores de maíz a nivel mundial en 2016 fueron la Unión Europea, México, Argentina, USA, China y Brasil, siendo estos tres últimos los productores de las tres cuartas partes de la producción mundial (Hoyos & Ocampo, 2015).

Colombia se encuentra en el puesto 37 a nivel mundial de los productores agrícolas de maíz. Según las estadísticas de la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, Colombia produjo, en 2017, un aproximado de 1,2 millones de toneladas (Agroinsumos S.A.S, 2018). Los principales productores de este cereal son los departamentos de Córdoba y Valle del Cauca, aportando aproximadamente el 50% de la producción total nacional. El 37% de cultivo se destina a uso industrial y el 63% restante al consumo humano. A pesar del indiscutible crecimiento de las hectáreas de este cultivo agrario, la demanda comercial del maíz supera considerablemente su oferta, lo que genera la necesidad de importación (Hoyos & Ocampo, 2015). Así las cosas, Colombia importa un 85% del maíz que consume, el cual es destinado principalmente para la industria de alimentos balanceados para consumo animal (INS & MINSALUD, 2015).

El cultivo de maíz es susceptible a la contaminación por aflatoxinas, un tipo de micotoxina altamente tóxica para los humanos y animales, ocasionando así una constante preocupación que difunde un estudio perseverante, por parte de académicos y entes de control, de nuevas estrategias que permitan su medición, control o mitigación.

2.2 Las micotoxinas

Las micotoxinas son productos químicos sintetizados por hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Furasium*. Son sustancias tóxicas para los animales vertebrados y poseen una resistencia variable a la degradación por medio de procesos térmicos y de fermentación (Baltes, 2006). Las especies fúngicas, que producen las micotoxinas, crecen durante la pre-cosecha por malas prácticas agrícolas, así como en la pos-cosecha debido a un mal almacenamiento (Pleadin et al., 2019).

Se ha estimado que las micotoxinas afectan una cuarta parte de los cultivos a nivel mundial (Arroyo et al., 2014), generando una gran preocupación en diferentes asociaciones como la Organización Mundial de la Salud OMS y la FAO, y su comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios, quienes mediante el comité del Codex Alimentarius (2018), establecieron el nivel de ingesta diaria tolerable para diferentes micotoxinas en el rango de 0,5 µg/kg a 15µg/kg para la mayoría de alimentos (OMS, 2018).

Existen diferentes tipos de micotoxinas, como la ocratoxina A, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona, el nivalenol, desoxinivalenol, entre otras. (Gil et al., 2014).

2.3 Las aflatoxinas.

Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios tóxicos, que pertenecen al grupo de las micotoxinas, son conocidas desde 1960, cuando en Inglaterra se presentó una epidemia que mató alrededor de 100.000 pavos, alimentados con maní contaminado por el hongo *A. flavus* (Martínez et al., 2014). Son producidas por las especies fúngicas del género *Aspergillus* tales como *flavus*,

parasiticus y *nomius* (Golge et al., 2016), el crecimiento de estos hongos frecuentemente se presenta en los cultivos agrícolas de maíz, maní, nuez, arroz, trigo, algodón y frutos secos (Martínez et al., 2015), esto sucede gracias a las condiciones favorecedoras donde se cultivan estos piensos, es decir, en zonas geográficas de clima tropical, con porcentajes de humedad relativa de 80 a 90% y temperaturas entre los 30 y 35°C (Martínez et al., 2014). El estrés de la planta o los daños de los insectos, permiten la entrada de esporas de estos hongos, por ende la producción de las aflatoxinas puede ocurrir durante la pre y post cosecha (Acuña et al., 2005).

Existen aproximadamente 20 tipos de aflatoxinas, pero las más comunes y de mayor interés son las B1, B2, G1 y G2, denominadas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Siendo la AFB1 considerada la más toxica de todas. Existen también derivados metabólicos de las AFB1 y AFB2, conocidos como AFM1 y AFM2, respectivamente, que se producen en la excreción de orina y leche de quienes se han alimentado de piensos contaminados (Londoño & Martínez, 2017). La denominación B y G de la AFs, se toma con base en la fluorescencia que presentan en capa fina de gel (Blue= azul o Green= verde, respectivamente en inglés), por otra parte los índices 1 y 2 se refiere al orden de aparición en cromatografía de capa delgada (TLC) (González, 2010).

Según la OMS (2018) 600 millones de personas por año son afectadas por una enfermedad transmitida por alimentos, y según la FAO (2018) aproximadamente el 25% de los cultivos se encuentran contaminados por micotoxinas, lo que genera una alta preocupación de salud pública (Klingelhöfer et al., 2018). Las AFs representan una amenaza tanto para la salud humana como animal, ya que producen complicaciones hepatotóxicas, teratogénicas e inmunotóxicas (Kumar et al., 2017).

La AFB1 y la mezcla de las AFB, AFG y las AFM, están clasificadas por la IARC como carcinógeno del grupo 1, debido a que se encuentran estrechamente relacionadas con el carcinoma

hepatocelular (CHC), el tipo más común de cáncer de hígado, y el noveno y séptimo tipo de cáncer más frecuente en mujeres y hombres, respectivamente (Ismail et al., 2018). Esta patología se ve particularmente relacionada no solo con las aflatoxinas cancerígenas, si no con la combinación de éstas con una infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB). Según la OMS se estima que existen 788.000 muertes por el CHC (World Health Organization Department of Food Safety and Zoonoses, 2018), donde la mayor incidencia de esta enfermedad terminal, se encuentra en los países en vías de desarrollo debido a la prevalencia de los dos factores anteriormente mencionados (VHB y AFs) (Klingelhöfer et al., 2018).

Adicionalmente las aflatoxinas están vinculadas con el deterioro del crecimiento, algunos tipos de desnutrición y afecciones al sistema inmunológico (Martínez et al., 2014), lo que impacta negativamente en los animales de granja y por ende en la producción de carne, la economía y el suministro mundial de alimento.

Por otro lado, pero no menos importante, existe la intoxicación por consumo de aflatoxinas, conocida como aflatoxicosis, la cual puede ser aguda con afectaciones de digestión, edemas, hemorragia y daño hepático agudo, o la aflatoxicosis crónica que produce digestiones disfuncionales, retraso de crecimiento y malformaciones congénitas fetales en las mujeres embarazadas (Klingelhöfer et al., 2018).

Los límites de AFs en el maíz y productos derivados varía según el país o región, para la mayoría de los países de la Unión Europea, (UE) el contenido máximo permitido de AFs totales es de 5µg/kg y para la AFB1 se encuentra en un intervalo 2 a 8 µg/kg. Para la Administración de Medicamentos y Alimentos, FDA por sus siglas en inglés, la concentración límite permitida para AFs totales es de 20µg/kg, en cuanto a la AFB1, no discrimina un valor permitido único (FAO -

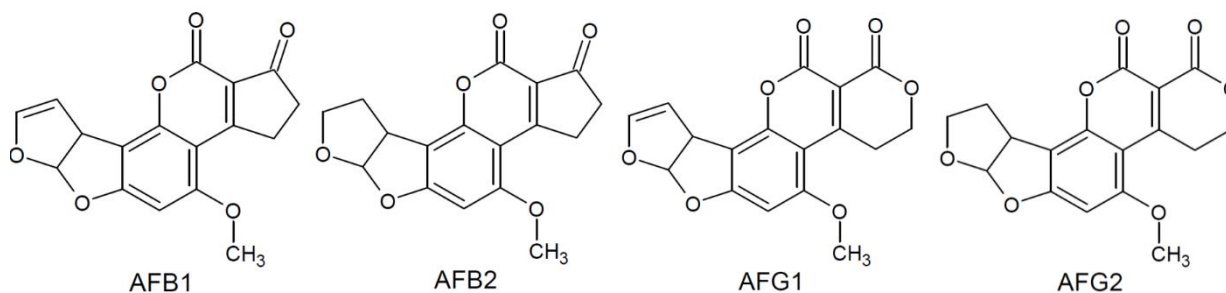
ONU, 2004). La normativa colombiana, NTC 3581 (2006), indica que el límite permisibles de aflatoxinas totales para el maíz es de 20µg/kg (Normas, 2019).

La estructura básica de las aflatoxinas son el anillo de difurano y la cumarina, lo que explica su toxicidad (Peng et al., 2018). La **Figura 2**, muestra la diferencia entre las dos clases principales de toxinas, la AFB y AFG, donde las primeras presentan un anillo de ciclopentanona unido a la cumarina, mientras que, las AFG están compuestas por un anillo de lactona (Martínez et al., 2014). Por otra parte, entre las mismas clases, B y G, existe la diferencia del doble enlace en el anillo de difurano.

Físicamente son sustancias inodoras, insípidas e incoloras, químicamente son compuestos estables en los alimentos y resistentes a la degeneración en los procesos de cocción cotidianos, puesto que su temperatura de degradación oscila entre los 237 – 306°C (Kumar et al., 2017). Estos metabolitos tóxicos son compuestos orgánicos no proteicos y de bajo peso molecular (Martínez et al., 2014) que fluorescen en presencia de radiación UV, con una longitud de onda de excitación de 365 nm y una de emisión de 455 nm (Molina et al., 2015). El grado de toxicidad de las aflatoxinas sigue el orden de B1>G1>B2>G2 (Coppock et al., 2018).

Figura 2.

Estructura química de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2.



2.4 Detección de aflatoxinas

Shephard (2008) resume una serie de técnicas analíticas para la determinación de las micotoxinas en alimentos para consumo humano, entre las cuales se encuentran la cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alta resolución con detector de UV y fluorescencia (HPLC-UV HPLC-FD), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida acoplada a un detector masas/masas (LC-MS/MS), y la técnica de inmunoensayo (ELISA), entre otros (Shephard, 2017).

Algunas técnicas analíticas son más precisas y exactas en la cuantificación de los analitos, como lo muestra Stefanovic et al. (2015) al comparar la cuantificación de las AFB1 y AFM1 en muestras de maíz y leche, respectivamente, mediante las técnicas de ELISA y LC- MS/MS, mostrando que esta última es más precisa debido a un rango dinámico más amplio del equipo y la limitación del rango de linealidad de la técnica ELISA, ya que, la mayoría de muestras analizadas superan el límite de dicho parámetro (0,25 µg/kg) (Stefanovic et al., 2015). Además, Fu Z *et al.*(2008), reportan un método rápido de UPLC-UV para muestras de maíz y maní, el cual ilustra límites de detección y cuantificación entre 0,19-0,32 y 0,63-1,07 µg/kg respectivamente, similares a los reportados en los métodos de HPLC-FD, por otro lado, este método logra la separación cromatográfica en 3,5 minutos, lo que supera a la técnica de HPLC-FD, la cual demora aproximadamente 20 minutos para la separación total de los analitos, dándole una ventaja sobre la misma en cuanto al tiempo de análisis de una muestra (Fu et al., 2008). Así mismo, los reportes de Martínez *et al.* (2015), Acuña *et al.*(2005), muestran la cuantificación de la concentración de AFs en la matriz de maíz usando la técnica de HPLC con un detector de fluorescencia (Acuña et al.,

2005) (Martínez et al., 2015), técnica comúnmente usada para este tipo de analitos y respaldada por normas como la NTC 1232 y AOAC 994.08, por su reproducibilidad (AOAC, 1994).

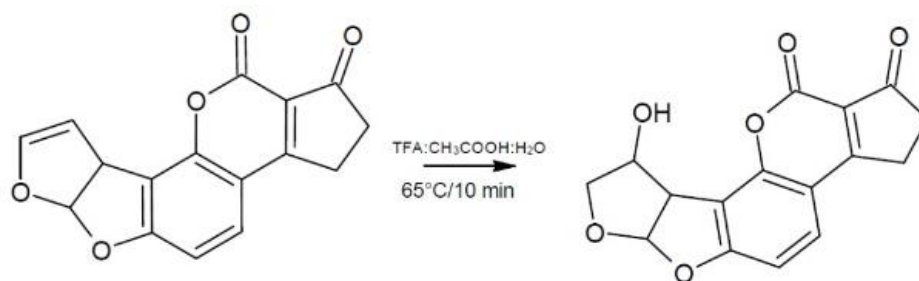
Según la norma NTC 1232 y la AOAC 994.08, la determinación de las aflatoxinas se hace en cuatro pasos, la extracción, la purificación, la derivatización y el análisis por HPLC. Así como lo reportan los autores González Mora (2010), Rojas & Wilches (2009) y Martínez et al. (2015) para muestras de nueces, comida a base de cereal para infantes, maíz y arepa, respectivamente.

La extracción del analito es realizada mediante una separación líquido-líquido, con solventes como acetonitrilo, agua, metanol o en algunas ocasiones heptano, este paso es realmente sencillo ya que se precisa la homogeneización de la muestra mediante molienda, su posterior pesado, licuación con los solventes y una filtración por gravedad (Martínez et al., 2014). La purificación es uno de los pasos más importantes en el análisis de las AFs, puesto que garantiza que no exista ningún tipo de trazas contaminantes que interfiera con la experimentación; recientemente, se ha comenzado a emplear las columnas diseñadas para la purificación de aflatoxinas en matrices de maíz, maní, arroz, entre otros (Shephard, 2017).

La derivatización es importante para aumentar la intensidad de fluorescencia de las AFB1 y AFG1, esta etapa se realiza mediante la reacción del analito con ácido trifluoroacético (TFA) en solución acuosa (AOAC, 1994), para formar el producto de hidroxilación de estas moléculas en el doble enlace del anillo de difurano, la reacción se observa en la **Figura 3**.

Figura 3.

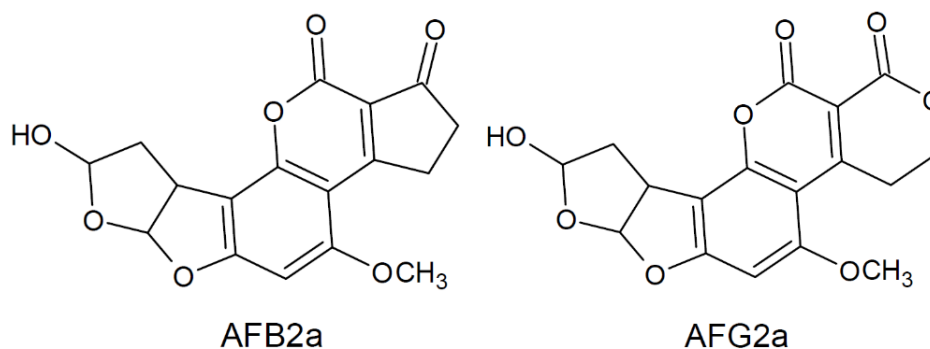
Reacción de AFB1 con TFA en solución acuosa.



Los productos de la derivatización se observan en la **Figura 4**, además, cabe resaltar que las AFB₂ y AFG₂ no reaccionan ante esta sustancia (NotiJenck, 2008).

Figura 4.

AFB_{2a} y AFG_{2a} productos de la derivatización.



El siguiente paso después de la derivatización, es el análisis de las muestras por medio del HPLC-FD, ajustado previamente con las condiciones cromatográficas que pueden estar basadas en una norma, un método previamente validado, o un método no normalizado, independientemente

de la fuente de estas condiciones, es necesario la validación o verificación del método analítico según corresponda, para ello una serie de factores de desempeño son evaluados.

2.4.1 Verificación del método.

Se entiende por verificación de un método, como el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método (Eurachem, 2016). Los parámetros que permiten al analista tener a futuro la certeza o confianza de obtener resultados confiables en cromatografía líquida, son: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

La selectividad, se refiere a la capacidad del método de producir una respuesta representada por una señal de manera cuantificable, que puede ser atribuida exclusivamente al analito de interés. Esta señal debe ser preferiblemente libre de interferencias y de un orden de magnitud de acuerdo con las unidades (ng/mL, µg/kg) que se esperan en el análisis (Valls, 2004).

La linealidad es la capacidad de un método para obtener resultados directamente proporcionales de la concentración de analito respecto a la señal dada por el equipo en un rango definido, se representa con el coeficiente de correlación (R^2), para su determinación se realiza un tratamiento matemático de los resultados obtenidos del analito a diferentes concentraciones, teniendo como resultado la curva de calibración (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996).

La sensibilidad se define como la capacidad de un método de diferenciar mínimos cambios en la concentración de un analito. Los parámetros relacionados con la sensibilidad son: el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). El LOD es la cantidad mínima de analito

que puede detectarse en una muestra a partir de la medida de un blanco (Boqué, 2004). El LOQ se define como la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con exactitud aceptable, este es un parámetro de análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en muestras (Rodríguez, 2012). El LOD y LOQ del método se determinan con los valores de la desviación estándar del intercepto (S_b) y la pendiente (a) de la curva de calibración ($3 \frac{S_b}{a}$ y $6 \frac{S_b}{a}$) (Acosta, 2009).

La precisión es la dispersión de las medidas alrededor de su valor promedio cuando es valorado a partir de una muestra homogénea; típicamente es expresada mediante la desviación estándar (S) y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV), estos valores permiten evaluar la incertidumbre debido a errores sistemáticos o aleatorios que produce la dispersión alrededor del promedio. Existe la precisión del sistema y del método, la primera se obtiene mediante las mediciones del material de referencia certificado y la segunda evalúa la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea, teniendo en cuenta todos los procedimientos tanto de tratamiento de muestra como de cuantificación (Valls, 2004).

La precisión se expresa de tres formas diferentes: la repetibilidad, repetibilidad intermedia y la reproducibilidad. La repetibilidad muestra la variabilidad en un método cuando es realizado bajo los mismos factores en un intervalo de tiempo corto; la repetibilidad intermedia se obtiene cuando se cambian algunos factores (analista, día de operación, columna, etc.) en un mismo laboratorio; por otro lado, la reproducibilidad muestra la variabilidad de una misma muestra, pero en diferentes laboratorios (U.S Food & DRUG, 1996).

La exactitud expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia, según la Guía de EURACHEM (2016), la exactitud se deriva en dos componentes, la precisión, mencionado anteriormente y la veracidad, donde la define como la expresión de la proximidad de

la medida de un número infinito de resultados a un valor de referencia, definición que concuerda con las guías de la FDA del ICH, para la exactitud. La evaluación de este parámetro puede hacerse por dos métodos, el absoluto y el relativo. El método absoluto requiere una muestra que contenga una cantidad conocida de compuesto, y en el relativo se utiliza un porcentaje de recuperación (%R) que consiste en la adición de concentraciones conocidas de analito a la muestra dentro de un rango de interés, y proceder a su cuantificación; esta última es la metodología más usada debido a que contar con una muestra de concentración conocida no es tan factible. (U.S Food & Drug, 2019; U.S Food & DRUG, 1996)

Los valores deseados en los ensayos de exactitud son del 100%, ya que indicarían que la presencia de errores es mínima o que su sumatoria tiende a cero, aunque los valores frecuentes están entre el 80 - 110%. En general este parámetro mide las pérdidas en la extracción o el efecto de diferencias de solubilidad (Valls, 2004).

2.5 Nixtamalización.

El origen de este proceso se remonta aproximadamente a la América precolombina, específicamente a México, antes de la llegada de los españoles. Se compone de cuatro pasos: la cocción del maíz en agua alcalinizada con cal apagada, el remojo, el lavado y por último la molienda para obtener la masa nixtamalizada usada para la elaboración de diferentes productos como tamales, tortillas, arepas de maíz pelado, entre otros (Paredes et al., 2009). La nixtamalización puede variar entre el fabricante o el investigador, pero, la mayoría de los autores coinciden en las condiciones de tiempo, intervalos de temperatura y concentraciones, como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2.

Condiciones del proceso de nixtamalización del maíz típicamente empleadas.

Autores	Condiciones
Santiago et al. (2018)	Cocción: temperatura (T) 70°C, con tiempo (t) 5 a 180 minutos. Remojo: 24 horas (h). Concentración de cal [Ca(OH) ₂]: 0,05 – 6,25%, más usada 1%. Relación Agua: grano (1:4)
Ramirez, Gaytan y Reyes (2019)	Cocción: T ebullición/ t=20 a 45 min. Remojo: 12 a 20h. [Ca(OH) ₂]: 0,5 – 2 % (g cal/kg maíz).
Villada et al. (2017)	Cocción: T a 92°C/ t=40 min. Remojo: 24h. [Ca(OH) ₂]: 0,2 – 2 % (g cal/kg maíz). Relación de agua:maíz (1:2) (w/v)
Amador et al. (2019)	Cocción: T a ebullición/ t=30 min. Remojo: 12 a 24h. [Ca(OH) ₂]: 1 – 2 % (g cal/kg maíz). Relación de agua:maíz (1:2) (w/v)

Este proceso de cocción alcalina causa cambios físicos y químicos en el grano de maíz, mejorando el valor nutricional del grano, la bioaccesibilidad del calcio y niacina, la digestibilidad de las proteínas, el aumento en el contenido de almidón resistente, que es acompañado con un índice glucémico bajo y la reducción de micotoxinas, en especial de las aflatoxinas y las fuminosinas (Schaarschmidt & Fauhl, 2019).

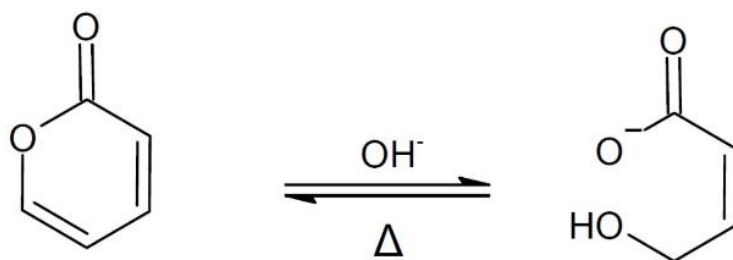
El contenido de aflatoxinas se reduce mediante el proceso de nixtamalización, así como lo exponen los autores Pérez-Flores *et al.* (2011) y Anguiano *et al.* (2005), presentando reducciones de 58 y 85%, con concentración final de aflatoxinas de 29,44 y 26 µg/kg respectivamente (Anguiano et al., 2005; Pérez-Flores et al., 2011), superando el límite máximo permitido de aflatoxinas; estos datos porcentuales son semejantes con los autores Zavala-Franco *et al.* (2020) y Méndez *et al.* (2004), quienes reportan disminuciones de 98 y 92%, y concentraciones finales de AFs de 2,15 y 2 µg/kg respectivamente (J. A. Méndez et al., 2004; Zavala-Franco et al., 2020).

Los cambios en el maíz nixtamalizado ocurren principalmente en el pericarpio y el endospermo. El pericarpio es la capa más externa del grano, por ende, es el primero en sufrir alteraciones, uno de estos es la hidrólisis y solubilización de sus componentes, donde se da lugar a dos etapas, una rápida donde ocurre la solubilización del almidón, la pectina y los lípidos y una lenta donde se hidrolizan y solubilizan los componentes del pericarpio estructural, es decir, la hidrólisis de los enlaces éster de la estructura celulosa-hemicelulosa-lignina, en otras palabras, ocurre la degradación, disolución o eliminación parcial de los componentes del pericarpio, lo que facilita su remoción en las fases de lavado. Por otro lado, sucede la captación de calcio en forma de CaCO_3 , generando una concentración de Ca de hasta 4mg/g en el pericarpio. De la misma manera en el endospermo ocurre la hidratación, la gelatinización y recocado del almidón almacenado en él. Además, da lugar a la absorción e interacción calcio-almidón y mejora de los complejos de amilosa-lípidos (Santiago et al., 2018).

El destino de las aflatoxinas post-nixtamalización aún es incierto y dispuesto a investigación, los autores Scharaarschmidt y Fauhl (2019) resumen en su artículo diferentes hipótesis sobre la finalidad de las micotoxinas, donde mencionan que las aflatoxinas se encuentran en su mayoría en el pericarpio, por ende, mediante el tratamiento termo-alcálico, esta parte del maíz y las aflatoxinas se desprenden del grano, un porcentaje de estos residuos queda en el nejayote o agua del nixtamal (Schaarschmidt & Fauhl, 2019); otra hipótesis señala que las aflatoxinas sufren la apertura del anillo de lactona, debido al pH básico, lo que genera la no detección de las mismas, esta reacción se observa en la **Figura 5** (Temba et al., 2016). Esta última hipótesis sería de alto cuidado, ya que puede incurrir en una posible unión del anillo, con un tratamiento ácido o neutro, como aquellos que están presentes en la digestión gastrointestinal (Temba et al., 2016) (J. Méndez et al., 2004), siendo así, representaría un riesgo al consumidor.

Figura 5.

Reacción de la hipótesis de la apertura del anillo de lactona.



2.6 Digestión gastro intestinal.

El proceso de digestión gastro intestinal *in vitro*, se realiza con el fin de obtener información importante sobre la digestibilidad de alimentos, liberación de nutrientes, bioaccesibilidad de micotoxinas, entre otros. El diseño de la simulación de este proceso se hace de acuerdo con las necesidades del estudio, realizando una revisión previa de los distintos modelos existentes, seleccionando los fluidos necesarios para cada etapa. Respecto a bioaccesibilidad, se entiende como la fracción del compuesto que se libera de los alimentos durante el proceso de digestión y que potencialmente se transporta a través del epitelio intestinal (Lin et al., 2019)

Diversos investigadores sugieren que el proceso de nixtamalización, no es tan efectivo como se piensa, puesto que los anillos de lactona de las aflatoxinas que se abren durante el tratamiento termo-alkalino, podrían cerrarse cuando la tortilla se acidifica en el estómago (Schaarschmidt & Fauhl, 2019), recuperando su forma fluorescente y su correspondiente riesgo a la salud humana y animal (Martínez et al., 2014).

El primer paso en la degradación durante la nixtamalización probablemente sea la apertura del anillo de lactona de la aflatoxina, produciendo una sal soluble en agua que incluye la

descarboxilación. La fluorescencia de la aflatoxina, atribuible a la porción cumarina, desaparece en los tratamientos alcalinos. Si este tratamiento no es lo suficientemente efectivo, posiblemente las aflatoxinas no se modifican de manera permanente, y en condiciones ácidas este mismo anillo de lactona puede cerrarse y volver a convertirse a su forma original (J. Méndez et al., 2004).

Anguiano et al. (2005) reporta que la concentración de aflatoxina B1, no aumenta con el tratamiento ácido de la muestra nixtamalizada, realizando el tratamiento de acidificación con ácido clorhídrico concentrado, con el fin de ajustar el pH a 3, el cual es el correspondiente al pH gástrico, realizando el proceso de extracción con ayuda de una mezcla de cloroformo con tierra diatomea (Anguiano et al., 2005), mientras que, para Méndez et al. (2004) la recuperación de las aflatoxinas B1 y B2 fue de un 57,2 y 33,9% respectivamente, el ajuste del pH a 3 se realizó con una mezcla comercial de ácido clorhídrico-ftalato de ácido potásico y el proceso de extracción se llevó a cabo con una mezcla de metanol-agua (J. A. Méndez et al., 2004). Es necesario aclarar que los autores anteriores presentan resultados a partir de muestras nixtamalizadas, seguidas de pruebas de simulación ácida de la digestión gástrica.

Por otro lado, Moctezuma et al., (2015) informa que la regeneración de aflatoxinas no necesariamente sucede en medio ácido, si no que estas recuperan su actividad a pH neutro, estos resultados son reportados a partir de muestras previamente nixtamalizadas. Adicionalmente reporta que la mayor recuperación de AFB1, en una simulación de digestión gastrointestinal a escala de laboratorio, se obtuvo en líquido pancreático a pH 7,5, mientras que a pH alcalino y ácido no son detectables los cambios en la concentración de éstas (Moctezuma et al., 2015).

Finalmente, Nogueira, Massarolo, Kupski y Badiale, (2019) determinaron que las aflatoxinas B1, B2, G1 Y G2 son bioaccesibles en un 58% en muestras de arroz (Nogueira, Massarolo, Kupski, & Badiale, 2019). Además, Massarolo, et al (2020) reportó una

bioaccesibilidad del 63% para AFB1 en muestras de harina de maíz. Massarolo et al., (2020) y Lin, et al (2019) obtuvieron resultados de 41,5-63,3% de bioaccesibilidad de aflatoxinas totales en muestras de maíz. (Lin et al., 2019).

3. Metodología

3.1 Muestras

Las muestras estudiadas en el presente trabajo fueron suministradas por una fábrica dedicada a la elaboración de arepa santandereana. El estudio se realizó a partir de tres lotes diferentes de muestra. Para la verificación se usó el primer lote nombrado MF-1, mientras que el análisis de la nixtamalización a diferentes concentraciones de Ca(OH)_2 se estudió con muestras del segundo y tercer lote llamados MF-2 y MF-3, de las estas se tomaron sub muestras utilizadas como blanco (control o muestras control), es decir, sin nixtamalizar, con el propósito de tener referencia de la concentración inicial de AFs y hacer los cálculos correspondientes en cada etapa experimental.

3.2 Verificación del método analítico

En primera instancia se determinaron los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad, LOD y LOQ para el método analítico de cuantificación de aflatoxinas en

maíz, mediante la técnica HPLC-FD, con el fin de tener criterios de confianza del método empleado, para las condiciones y equipamiento del laboratorio, las diferentes mediciones se realizaron por triplicado.

La selectividad se determinó comparando los tiempos de retención de las señales de la muestra (MF-1) con los de la solución estándar de aflatoxinas (HPLC- AF de MICOTOX LTDA), para corroborar la identidad de cada analito. Además, se determinó la señal del blanco con el objetivo de medir la respuesta del procedimiento analítico a las interferencias existentes en los reactivos.

La linealidad se evaluó mediante la relación de la función de respuesta del equipo con la concentración de los estándares certificados de aflatoxinas. Para ello, se adquirió una solución estándar que contenía las cuatro aflatoxinas de interés (HPLC-AF de MICOTOX LTDA), con la cual se preparó un set de 7 soluciones de concentraciones conocidas de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 y 80,0 ng/mL para AFB1-AFG1, y concentraciones de 0,75; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 y 24,0 ng/mL para AFB2-AFG2. Con los resultados obtenidos se calculó la ecuación de la recta (**Ecuación 1**) y el coeficiente de correlación (R^2) para cada una de las aflatoxinas; solo se aceptaron valores de coeficientes de correlación mayores a 0,995 (AGQ, 2017).

La sensibilidad se estableció mediante los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de la curva (Martínez et al., 2015). Se calcularon en base de la regresión lineal de las curvas de calibración, utilizando los valores de la **Ecuación 1** de las pendientes (a) y la desviación estándar de los interceptos (S_b) de cada una de las aflatoxinas y empleando las siguientes relaciones: $LOD = 3 \frac{S_b}{a}$ y $LOQ = 6 \frac{S_b}{a}$ (IDEAM, 2006).

$$y = ax + b \text{ (1)}$$

Para el caso de la precisión se estudió la repetibilidad y la repetibilidad intermedia del método, esto se realizó con muestras de maíz natural (MF-1) el mismo día para la repetibilidad y en días diferentes para la repetibilidad intermedia, la intención fue observar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos. Los datos se evaluaron mediante un análisis de variancia, determinando la desviación estándar de la repetibilidad (RSD_r) y la desviación estándar de la repetibilidad intermedia (RSD_{ri}) en porcentaje. Sólo se aceptaron valores de $RSD \leq 22\%$ (U.S Food & Drug, 2019).

Finalmente, la exactitud del método fue estimada mediante el porcentaje de recuperación (**ecuación 2**) de cada aflatoxina, este se realizó dopando las muestras naturales con una solución de concentración de 20 ng/mL para la B1-G1 y 6 ng/mL para la B2-G2.

$$\% R = \frac{X' - X}{X_{spiked}} \times 100 \quad (2)$$

Donde X' : es la cantidad de muestra enriquecida; X : es la cantidad de la muestra no enriquecida; X_{spiked} : es la cantidad de aflatoxinas añadida.

Los valores aceptados de recuperación se encuentran en el intervalo 70-110%, según el reglamento CE N°401/2006 (Comisión Europea, 2006).

3.3 Análisis de aflatoxinas

Para la determinación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en las muestras de grano de maíz, maíz nixtamalizado y masa acidificada, se siguió el protocolo descrito por la norma internacional AOAC 994.08 (AOAC, 1994)

3.3.1 Extracción y purificación.

Se realizó el muestreo mediante cuarteo para tener una muestra de 20 g de maíz, se trituraron y posteriormente se agregó 50mL de una solución de acetonitrilo-agua (tipo I) ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$) 84:16 v/v, se mezcló en una licuadora Oster durante tres minutos, 1 minuto a velocidad baja y dos minutos a velocidad alta y se filtró por gravedad hasta conseguir 5mL. Con la ayuda de una pipeta pasteur se recolectaron aproximadamente 3mL del extracto en un tubo de ensayo, y se empujaron lentamente por una columna de limpieza Micotox M2004 hasta que se obtuvo cerca de 0,5mL de extracto purificado.

3.3.2 Derivatización.

Para aumentar la intensidad de la fluorescencia de las AFB1 y AFG1, se realizó una derivatización con ácido trifluoroacético (TFA) de la siguiente manera: se tomaron 200 μL del extracto purificado en un vial ámbar, seguidamente se adicionaron 700 μL de una solución de TFA:ácido acético glacial: H_2O en proporciones de 2:1:7 v/v/v, se agitó en un vortex por 30 segundos y se llevó a una temperatura de 65°C por 10 minutos.

3.3.3 Análisis por HPLC.

Para el análisis se utilizó un equipo ultimate 3000 de Thermoscientific HPLC con detector de fluorescencia Dionex Ultimate 3000 RS Fluorescence Detector y la columna C-18 Teknokroma mediterránea sea18 5 μm TR-010006. Las condiciones cromatográficas utilizadas correspondieron

a un flujo de 1mL/min, una fase móvil isocrática de H₂O:CH₃CN:MeOH en relaciones de 66:25:9 respectivamente, inyección de 50µL de muestra y una temperatura de columna de 50 °C. Las longitudes de onda de excitación y emisión para el detector fueron de 365 y 455 nm respectivamente.

3.4 Nixtamalización

Se realizaron cuatro nixtamalizaciones a diferentes concentraciones de Ca(OH)₂ que variaron de 0,5% hasta 2% (w/w), con aumentos progresivos de 0,5. Este incremento se fijó después de una revisión bibliográfica, donde se muestra que las concentraciones más empleadas para este procedimiento varían de 0,5 hasta 2%, siendo el 1% la concentración más usada (Santiago et al., 2018) (Villada et al., 2017) (Amador et al., 2019). Cada una de las nixtamalizaciones se realizó por duplicado.

El proceso de nixtamalización se llevó a cabo mediante la modificación del método presentado por Anguiano et al. (2005), donde se tomaron 50 g de grano de maíz y se depositaron en un recipiente de aproximadamente de 500mL, posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente de Ca(OH)₂ y se agregaron 200mL de agua. Esta mezcla se llevó a punto de ebullición durante 50 minutos y luego se dejó en reposo durante 17 horas. Finalmente, el maíz se lavó tres veces con agua limpia y una vez completado el lavado, las muestras se molieron con 5mL de agua, con el fin de conseguir una masa suave a la que se le realizó la cuantificación de la concentración de aflatoxinas.

Los lotes de muestra para el análisis de las diferentes variaciones de Ca(OH)₂ fueron MF-2 y MF-3, de cada uno de los lotes se tomó una submuestra control (MF-2C y MF-3C) y se

determinó la concentración de aflatoxinas presentes en el maíz sin nixtamalizar, con el fin de observar las diferencias entre el maíz sometido a nixtamalización y el usado como muestra control. Esta diferencia se representó mediante el cálculo del porcentaje de reducción de las aflatoxinas detectadas (**Ecuación 3**).

$$\% \text{ Reducción de AFs} = \frac{[AFs \text{ control}] - [AFs \text{ nixtamalizada}]}{[AFs \text{ control}]} * 100 \quad (3)$$

Se recolectó 20mL del agua de descarte (nejayote) del proceso de nixtamalizado a 1,0% de cal de MF-2, dado que este fue el proceso más efectivo, posteriormente se filtró, purificó y se analizó la concentración de las aflatoxinas presentes en este, para determinar la cantidad de AFs que podría contener esta matriz, expresada en porcentaje de AFs respecto a la muestra control (MF-2C) (**Ecuación 4**).

$$\% \text{ AFs en nejayote} = \frac{[AFs \text{ nejayote}]}{[AFs \text{ control}]} * 100 \quad (4)$$

3.5 Digestión gastro-intestinal in vitro.

Esta simulación se le practicó a las muestras provenientes de la nixtamalización de 1% de Ca(OH)_2 de MF-2.

Minekus *et al.* (2014), describe un método estandarizado de digestión *in-vitro* estática adecuado para alimentos como un consenso internacional, donde el proceso gastro-intestinal es simulado en tres partes importantes: boca, estómago e intestino (Minekus *et al.*, 2014), además los autores Moctezuma *et al.* (2015), Saladino (2017) y Nogueira *et al.* (2019) muestran la simulación de una digestión gastro-intestinal para observar la bioaccesibilidad de las aflatoxinas en diferentes matrices (Saladino *et al.*, 2018) (Moctezuma *et al.*, 2015) (Nogueira *et al.*, 2019).

3.5.1 Preparación de las soluciones estándar.

Para la digestión gastro-intestinal *in vitro*, se prepararon soluciones estándar electrolíticas simuladas de fluidos gástricos y pancreáticos. Estas se prepararon de la siguiente manera:

Tabla 3.

Composición de las soluciones utilizadas para las digestiones.

Compuestos	Concentración en solución de fluido gástrico (SFG), mM	Concentración en solución de fluido intestinal (SFI), mM
	pH 3	pH 7
KCl	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,9	0,8
NaHCO ₃	25	85
NaCl	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	-

Para ajustar y mantener el pH de las soluciones como fluidos de las digestiones se utilizó NaOH 1 M y HCl 6 M.

3.5.2 Digestión gástrica *in vitro* (DG).

Se pesaron aproximadamente 5 g de masa de maíz nixtamalizado, y se mezcló con 7,5mL de SFG, seguidamente se adicionó 1,6mL de solución de pepsina porcina de 25000 U/mL (disolver la pepsina con SFG), 5μL de CaCl₂ 0,3 M, 0,2mL de HCl 1 M para llegar a pH 3 y 695μL de agua; se realizó la digestión durante 2 horas. Todo este procedimiento se ejecutó a 37°C.

Se tomaron 4 g de muestra y se centrifugaron a velocidad 2500 rpm por 5 minutos, se aplicó el proceso de análisis de aflatoxinas desde la etapa de purificación, descrito sección 3.3.1

Este análisis se realizó dos veces con el fin de obtener una muestra para observar los resultados de la fase de digestión gástrica individual y otra para la simulación de la digestión gastro-intestinal completa.

3.5.3 Digestión intestinal in vitro (DGI).

Se mezcló el bolo gástrico proveniente del paso anterior con 11mL de SFI, y se adicionó 5mL de solución de pancreatina de 800 U/mL (disolver la pancreatina con SFI), 2,5mL de bilis, 40μL de CaCl₂ 0,3 M, 0,15mL de NaOH 1 M, para llegar a pH 7 y 1,31mL de agua; seguidamente se realizó la digestión durante 2 horas. Este procedimiento se ejecutó a 37 °C y manteniendo el valor de pH 7.

Se tomaron 4 g de muestra y se efectuó la determinación de aflatoxinas, como se describió en la digestión gástrica individual.

3.5.4 Recuperación de la forma detectable de las aflatoxinas.

Con los datos que aportaron las simulaciones de las digestiones, se analizó si la concentración de AFs aumentó respecto a lo previamente reducido en el tratamiento termo-alkalino (nixtamalización) y se representó en porcentaje de recuperación de concentración de AFs usando la ecuación 5.

$$\% \text{ recuperación} = \frac{[AFs \text{ Digestión}] - [AFs \text{ Nixtamalizado}]}{[AFs \text{ Control}]} * 100 \quad (5)$$

3.5.5 Bioaccesibilidad.

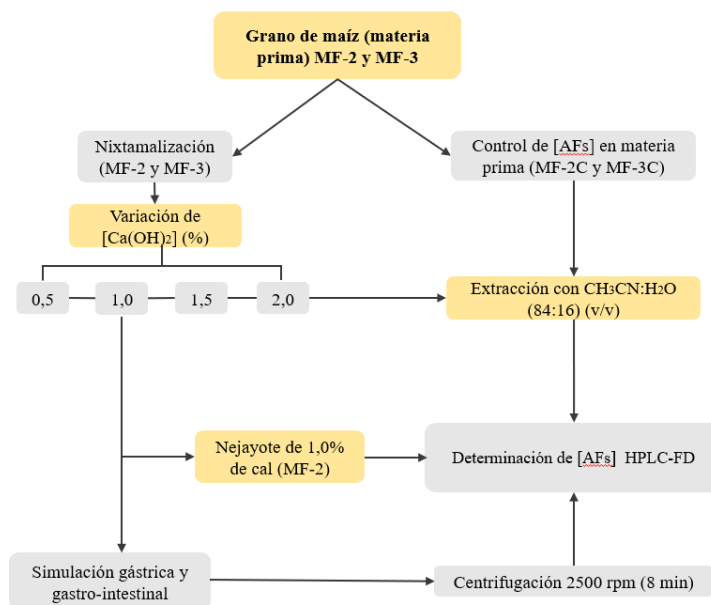
Se determinó la concentración de aflatoxinas bioaccesibles utilizando las ecuaciones obtenidas de las curvas de la calibración. Con el fin de mejorar el análisis y la comparación de los resultados, se calcularon los porcentajes de bioaccesibilidad respecto la materia prima (control) (Ecuación 6).

$$\% \text{ bioaccesibilidad} = \frac{[AFs \text{ Digestión}]}{[AFs \text{ Control}]} * 100 \quad (6)$$

A continuación, se muestra un diagrama que resume la metodología usada para el análisis de la influencia del pH sobre la concentración de aflatoxinas y la bioaccesibilidad de las mismas (Figura 6).

Figura 6.

Resumen de la metodología utilizada para el análisis de la influencia del pH en la concentración de aflatoxinas.



Hay que señalar, que el porcentaje de concentración de AFs respecto al control calculado para el nejayote (**Ecuación 4**) de la muestra de 1,0% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se evaluó asimismo para la masa nixtamalizada y la acidifica en las simulaciones de las digestiones gástricas y gastro-intestinales, para el posterior análisis del posible destino de las aflatoxinas durante estos tratamiento de cambios de pH.

3.6 Tratamiento de datos.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA de un factor para el triplicado de las curvas de calibración de cada aflatoxina, con el fin de garantizar que no había diferencias significativas entre ellas y poder usar el promedio de estas. Además, se calculó un t student entre las muestras del grano de maíz (control) con maíz nixtamalizado con el fin de observar si existían diferencias significativas en la concentración de aflatoxinas antes y después de este proceso.

4. Resultados y discusión

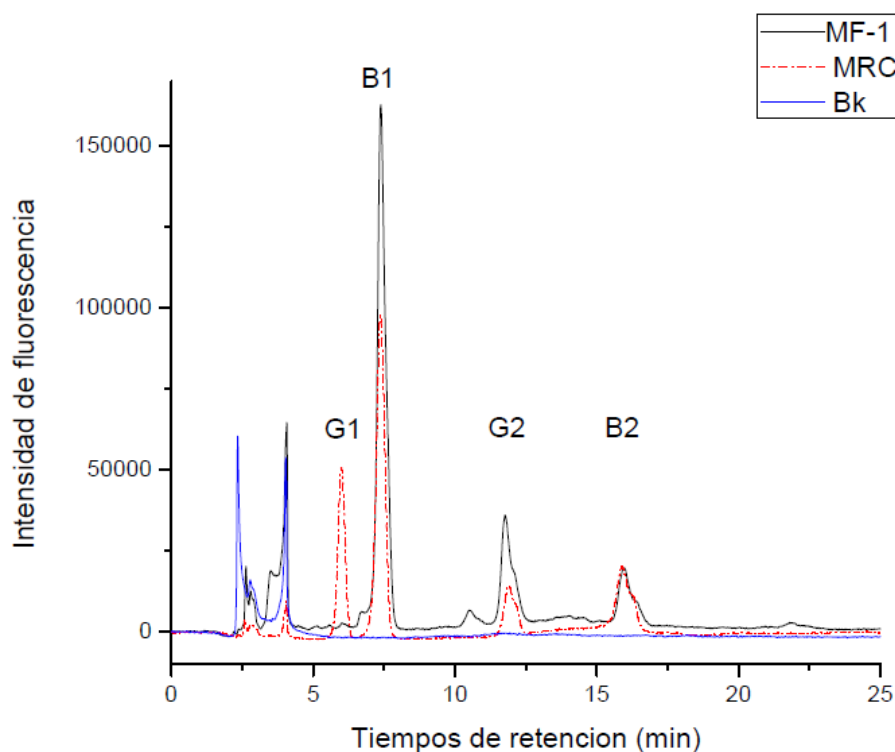
4.1 Verificación del método analítico

El método seguido en este trabajo (AOAC 994.08) se verificó mediante los parámetros de selectividad, linealidad, LOD, LOQ, precisión y exactitud, con los que se confirmó la capacidad del laboratorio para aplicar el método (Eurachem, 2016).

La selectividad del método se determinó comparando los tiempos de retención de elución de cada una de las aflatoxinas entre la solución estándar y las muestras (Martínez et al., 2015; Valls, 2004). En la **Figura 7** se aprecia que los picos de las muestras coinciden con los de la solución estándar en cuanto a tiempos de retención y resolución de éstos, lo que permite atribuir las señales a los analitos de interés. Además, la señal del blanco se caracteriza por la ausencia de interferencias.

Figura 7.

Cromatogramas del material de referencia certificado (MRC), muestra natural (MF-1) y blanco (Bk). Tiempos de retención (min), G1 (5,99), B1(7,36), G2(11,91) y B2(15,89).



Los resultados de los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud para cada aflatoxina analizada (B1, B2, G1 y G2) se resumen en la **Tabla 4**, estos parámetros se calcularon

usando el patrón preparado con el estándar de micotoxinas HPLC-AF de MICOTOX LTDA (Figura 7).

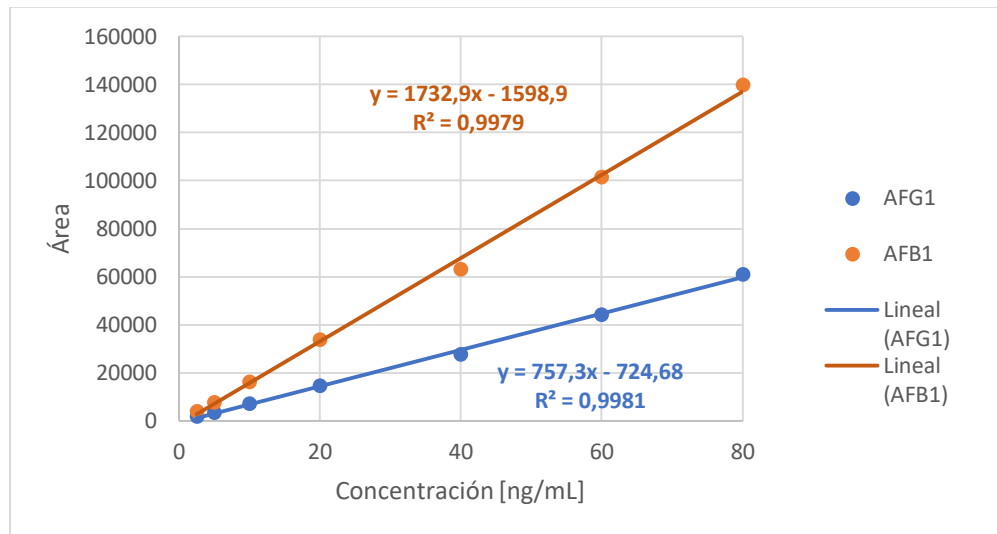
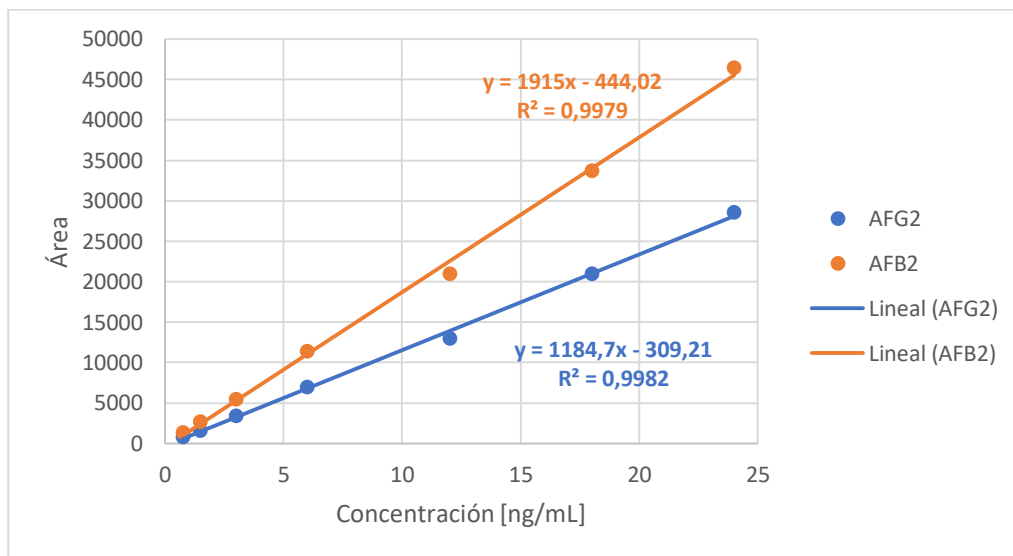
Tabla 4.

Resultados de verificación del método.

Aflatoxina	Linealidad	Curva		F experimental
	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	
AFB1	0,9979	0,51	1,56	0,002815
AFB2	0,9979	0,058	0,17	0,001273
AFG1	0,9981	0,22	0,67	0,002223
AFG2	0,9982	0,080	0,24	0,0007150

Con el fin de confirmar la concordancia de los datos de cada curva y así poder asegurar el uso de una curva promedio, se realizó un ANOVA de un factor a las áreas de cada curva, para observar si el F experimental era menor al valor de F de criterio (3,5545), parámetro que se cumplió para todas las aflatoxinas tal y como puede observarse en la **Tabla 4**; confirmándose así que los valores promedio, para las pendientes e interceptos de cada una de las aflatoxinas no son diferentes significativamente de los valores individuales obtenidos durante las repeticiones efectuadas.

A partir de las curvas de calibración de cada una de las aflatoxinas analizadas (**Figura 8 y 9**) se calcularon las ecuaciones lineales correspondientes y su respectivo coeficiente de correlación (R²), los valores de este coeficiente fueron superiores a 0,995, demostrando la linealidad del método (AGQ, 2017)

Figura 8.*Curvas de calibración de las aflatoxinas G1 y B1.***Figura 9.***Curvas de calibración de las aflatoxinas G2 y B2.*

La sensibilidad se estableció mediante los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de las curvas (Martínez et al., 2015).

Los LOD y LOQ se hallaron usando el valor de la desviación estándar de los interceptos y los promedios de las pendientes de cada una de las curvas; los valores de LOD y LOQ obtenidos para todas las aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) fueron inferiores a 0,51 y 1,56 ng/mL (**Tabla 4**) respectivamente; por lo tanto, el método verificado es capaz de determinar este tipo de analitos en dicha matriz. Estos datos son similares a los reportados por Martínez-Miranda (2013) quienes encontraron que el límite de detección para la AFB1 es 0,1 ng/mL.

Tabla 5.

Resultados de precisión y exactitud.

Aflatoxina	Precisión		Exactitud
	Repetibilidad %RSD	Repetibilidad intermedia %RSD	% Recuperación
AFB1	1,64	11,26	110,90±4,17
AFB2	0,79	11,44	91,30±3,02
AFG1	n.d*	n.d*	n.d*
AFG2	8,36	5,93	77,22±3,27

Nota. * Aflatoxina no detectada en las muestras de grano de maíz natural.

La precisión del método (**Tabla 5**) se estimó con la repetibilidad y repetibilidad intermedia de cada aflatoxina, los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos fueron menores a 22%, como lo estipula la guía de pautas para la validación de métodos químicos en alimentos, piensos, cosméticos y productos veterinarios, para la concentración de 10-100µg/kg, esto demuestra una alta precisión del método (U.S Food & Drug, 2019).

De acuerdo con el reglamento CE 401/2006, se establece que los porcentajes de recuperación oscilan entre los rangos de 70-110% para enriquecimientos entre 1-10 ng/mL y 80-110% para aquellos superiores a 10 ng/mL (Comisión Europea, 2006). Los resultados calculados

en este trabajo (**Tabla 5**) están en el mismo orden de magnitud de los valores anteriormente mencionados, lo que muestra una exactitud aceptable.

4.2 Nixtamalización.

En la **Tabla 6** se muestran las concentraciones de AFs presentes en las muestras control MF-2C y MF-3C. Además, se muestra la concentración de aflatoxinas totales que corresponde a la suma de las aflatoxinas (B1+B2+G1+G2). En las muestras usadas en el presente trabajo solo fueron detectadas las AFB1 y AFG1; lo cual no debe de sorprender puesto que no necesariamente se encuentran todas las AFs en cada una de las muestras (Martínez et al., 2015; Venegas et al., 2014).

Tabla 6.

Concentraciones de aflatoxinas en maíz sin nixtamalizar, muestras control (MF-2C y MF-3C).

Aflatoxina	MF-2C [$\mu\text{g/kg}$]	MF-3C [$\mu\text{g/kg}$]
AFB1	50,02 $\pm$ 0,12	5,24 $\pm$ 0,28
AFB2	n.d*	n.d*
AFG1	54,75 $\pm$ 0,26	15,37 $\pm$ 0,16
AFG2	n.d*	n.d*
AF total	104,77 $\pm$ 0,38	20,61 $\pm$ 0,44

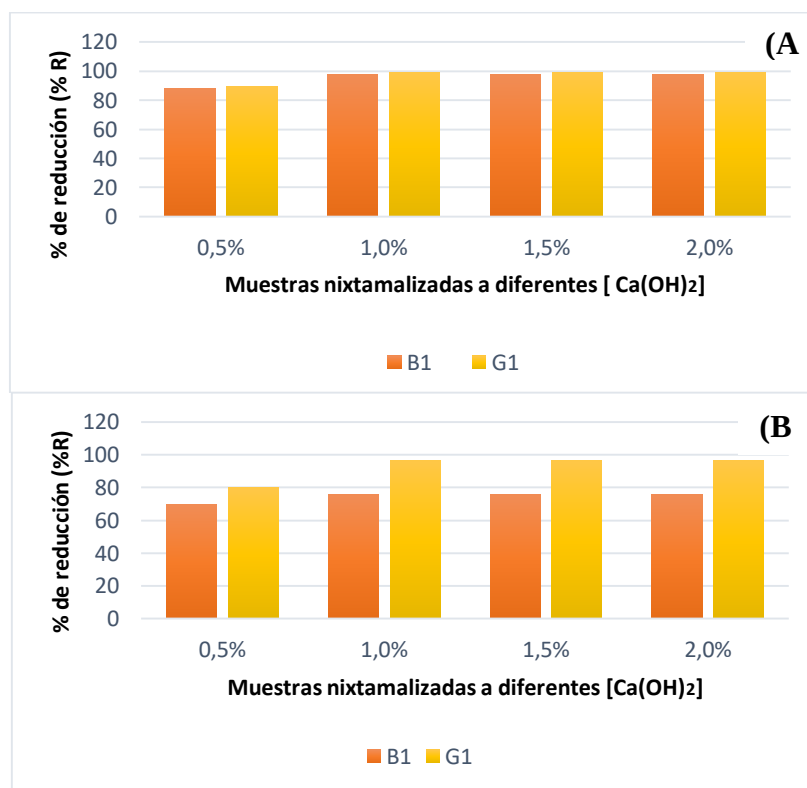
Nota. *Aflatoxinas no detectadas en la MF-2C y MF-3C.

En la **Figura 10** se muestran los porcentajes de reducción (%R) de las aflatoxinas detectadas en las muestras analizadas (MF-2 y MF-3) sometidas a cada uno de los tratamientos de nixtamalización a las cuatro diferentes concentraciones de Ca(OH)_2 (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 %) respecto a las muestras control (MF-2C y MF-3C). Los datos presentados para todas las muestras

nixtamalizadas a 1,0, 1,5 y 2,0% se representan por medio de desigualdades ($>$), ya que, la concentración de éstas se encontraba por debajo del límite de detección del método analítico y se usaron estos valores para hacer un cálculo aproximado.

Figura 10.

Porcentajes de reducción (%R) de las aflatoxinas B1 y G1 calculados para la nixtamalización a diferentes concentraciones de cal. (50 min de ebullición y 17 horas de remojo). (A) Muestra MF-2 (B) Muestra MF-3.



Nota. Los porcentajes de la muestras nixtamalizadas a 1,0, 1,5 y 2,0% de Ca(OH)_2 corresponden a desigualdades ($>$).

Al aplicar el proceso de nixtamalización, las muestras MF-2 presentaron reducciones (**Figura 10A**) de 88 – 89% para 0,5% y para los otros procesos valores de %R > 97% para la AFB1 y AFG1, en cuanto a las muestras MF-3 estos porcentajes (**Figura 10B**) oscilaron de 70 – 80 % para 0,5% y %R > 75% hasta %R > 96% para los tratamientos a 1,0, 1,5 y 2,0 %, para las aflatoxinas presentes (B1 y G1). Las reducciones para la AFB1 y AFG1 indican una efectividad del tratamiento termo-alkalino. Los resultados de este trabajo son similares a los reportados por los autores Ulloa-Sosa et al (1969), con valores de reducción del 65%, Arriola et al (1988) con reducciones del 93% para AFB1 y 98% para AFG1 a 1,87% de cal, resultados que son resumidos en *“Mycotoxins during the processes of nixtamalization and tortilla production”* (Schaarschmidt & Faulh, 2019). Así mismo, Méndez-Alborez, et al (2004) presentaron una reducción de aflatoxinas de 93% utilizando una concentración de Ca(OH)_2 de 3% (J. Méndez et al., 2004); mientras que Anguiano et al (2005) presentaron una reducción de 93 a 96% para AFB1 a 1,0% de Ca(OH)_2 (Anguiano et al., 2005).

Con base en los resultados obtenidos del porcentaje de reducción para AFB1 y AFG1 se concluyó que el proceso a 1,0 % de Ca(OH)_2 era suficiente para obtener reducciones mayores al 90%; además, valores superiores al 1,0 % de Ca(OH)_2 no representan mayores aumentos en el porcentaje de reducción. Igualmente, se constató que el valor seleccionado coincide o es el más común en la cocina tradicional e industrial tal como lo expresa Santiago et al., 2018. Por lo anterior, el análisis del posible destino de las aflatoxinas, hacia el nejayote y la simulación de la digestión gastro-intestinal se les realizó a las muestras nixtamalizadas a concentración de Ca(OH)_2 de 1,0%. Estos análisis se hicieron a las muestras nixtamalizadas MF-2, puesto que, la concentración inicial (MF-2C) de AFs totales en estas, mostradas en la **Tabla 6**, superaba el límite permitido (20µg/kg) por la NTC 3581 (2006).

Con los datos de la **Tabla 7** de las muestras MF-2C y MF-2 a 1,0% de cal, respectivamente, se realizó una prueba t-student con el fin de demostrar que el contenido de AFs totales antes y después del proceso de nixtamalización fueran significativamente diferentes. El valor P obtenido fue de 0,001675, el cual es menor al valor crítico 0,05; por lo tanto, se demostró que los valores obtenidos fueron estadísticamente diferentes y, consecuentemente, el proceso de nixtamalización redujo el contenido de AFs totales. Es importante resaltar que la concentración de aflatoxinas totales post-nixtamalización no superó el límite permitido (20µg/kg) de la NTC 3581 (2006), lo que indicaría que este proceso podría conducir a reducir los riesgos para la salud asociados con el consumo de masas de maíz contaminadas con aflatoxinas.

Tabla 7.

Concentraciones de AFs en la muestra control inicial (MF-2C) y final después del proceso de nixtamalización (MF-2) a 1,0% Ca(OH)₂.

Aflatoxina	MF-2C [µg/kg]	MF-2 [µg/kg]
AFB1	50,02	<1,27*
AFG1	54,75	<0,55*
AF total	104,77	<1,82*

Nota. *AFs con concentraciones inferiores al LOD.

4.3 Análisis del contenido de aflatoxinas post-nixtamalización en las etapas del nejayote y las simulaciones digestivas.

La **Tabla 8** muestra los porcentajes de aflatoxinas presentes en la nixtamalización y los posibles destinos de las aflatoxinas reducidas por el proceso anterior, como el nejayote y la masa acidificada mediante simulación de la digestión gástrica (DG) y gastro intestinal (DGI). Hay tener

en cuenta que los resultados de DG y DGI no son aditivos, ya que, la DG es solo una parte del proceso, mientras que los resultados de la DGI corresponden al proceso global.

Tabla 8.

Porcentaje de aflatoxinas presentes en cada etapa del proceso de 1,0% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ respecto a la muestra control (MF-2C).

Aflatoxina	Nixtamalización (%)	Nejayote (%)	DG (%)	DGI (%)
AFB1	<2,54 *	19,42	<7,71**	<7,71**
AFG1	<1,01*	28,30	33,24	40,71

Nota. *AFs con concentraciones inferiores al LOD. ** AFs con concentraciones inferiores al LOQ.

Uno de los destinos de las aflatoxinas post-nixtamalización es el nejayote (agua del nixtamal); las concentraciones de AFB1 y AFG1 presentes en el nejayote fueron de $9,92 \pm 0,16$ y $15,82 \pm 0,42$ $\mu\text{g/kg}$ respectivamente, lo que corresponde a 19,42 y 28,30% del valor inicial presente en la masa de maíz antes del proceso; esto ocurre debido a que el pH alcalino y la cocción a la que se somete el maíz remueve parcial o totalmente el germen y pericarpio de éste, partes donde se encuentra una importante porción de las aflatoxinas (Schaarschmidt & Fauhl, 2019) (Torres et al., 2001). Sin embargo, el porcentaje de AFs en el nejayote y en la masa de maíz post-nixtamalización no superan el 21,96 y el 29,31% para la AFB1 y AFG1, respectivamente, lo que sugiere que el 78,04% de AFB1 y 70,96% de AFG1 restante se podría encontrar en una forma no fluorescente tal y como lo sugiere Schaarschmidt et. al. (2019). Con base en esta suposición es posible que durante los procesos de digestión exista una recuperación de la forma detectable (fluorescencia) de las AFs que se encuentran presentes en la masa de maíz nixtamalizada. Por lo tanto, se procedió a determinar las concentraciones de AFs después de los procesos de digestión gástrica (DG) y gastrointestinal (DGI) evidenciándose que durante estos procesos la concentración de las AFs

aumentó significativamente con respecto a la muestra nixtamalizada (**Tabla 7**), alcanzando concentraciones de 3,85 y 18,20 $\mu\text{g/kg}$ para AFB1 y AFG1 respectivamente para la DG, y concentraciones de 3,85 $\mu\text{g/kg}$ de AFB1 y 22,29 $\mu\text{g/kg}$ de AFG1 para la DGI, estas concentraciones fueron usadas para el cálculo de los porcentajes de AFs respecto a la muestra control visualizados en la **Tabla 8**. Este incremento se debe a los cambios de pH e interacciones enzimáticas a las que fueron sometidas las muestras de maíz nixtamalizadas, dado que uno de los posibles mecanismos de reducción de concentración de AFs en la nixtamalización en maíz, es la apertura del anillo de lactona de la cumarina, lo que ocasiona la pérdida de su fluorescencia y por ende la capacidad de ser detectadas (Temba et al., 2016).

Con el fin de conocer la cantidad de aflatoxinas recuperadas en los procesos de DG y DGI aplicados a las muestras nixtamalizadas, se determinó el porcentaje de recuperación de la forma detectable de cada una de las aflatoxinas presentes y se resumen en la **Tabla 9**.

Tabla 9.

Porcentaje de recuperación (%r) de la forma detectable de las aflatoxinas en muestras nixtamalizadas sometidas a una simulación DG y DGI.

Aflatoxina	DG (%r)	DGI (%r)
AFB1	<5,16*	<5,16*
AFG1	32,24	39,71

Nota. * AFs con concentraciones inferiores al LOQ y LOD en la digestión y nixtamalización, respectivamente.

Los resultados de la recuperación de la forma detectable de aflatoxinas en la DG (**Tabla 9**) se compararon a los reportados por Schaarschmidt et al, (2019), quien resume los resultados de Price & Jorgensen (1985), estos autores encontraron que a pH estomacal, similar al utilizado en la

DG de este trabajo, los valores oscilan en una recuperación de 10-28%, datos que estarían cercanos a los obtenidos en esta investigación (Schaarschmidt & Fauhl, 2019). Por otro lado los resultados de DGI (**Tabla 9**) se cotejaron a los presentados por los autores Moctezuma, et al (2015) reportan recuperaciones durante el proceso de DGI de 60-76% para AFB1 en un producto más elaborado como las tortillas de maíz, discrepan con los resultados de este trabajo posiblemente porque utilizaron una concentración del 0,04% de Ca(OH)_2 en la nixtamalización (Moctezuma et al., 2015). A pesar de la disparidad de los resultados en diferentes investigaciones, existe un punto en común y es que la recuperación de la forma detectable de las aflatoxinas de muestras nixtamalizadas en medio ácido está presente, y podría representar un riesgo a la salud si consigue superar la concentración del máximo permitido ($20\mu\text{g/kg}$) por la NTC 3581 (2006).

4.4 Bioaccesibilidad

La simulación de la DGI permitió determinar el contenido de aflatoxinas, que podría liberarse, de la matriz de la masa de maíz en el intestino delgado y disponible para su posible absorción, estos resultados son presentados en la **tabla 10** en forma de porcentaje de bioaccesibilidad de las AFs.

Tabla 10.

Porcentajes de bioaccesibilidad de las aflatoxinas detectadas en las muestras tratadas a 1,0 % de Ca(OH)_2 .

Aflatoxina	% de bioaccesibilidad
AFB1	<7,71*
AFG1	40,71

Nota. * AFs con concentraciones inferiores al LOQ.

Como se observa en la **tabla 10** estos porcentajes oscilan en un rango de 7 – 41 % lo que indica una alta bioaccesibilidad de estas moléculas en el cuerpo, especialmente para la AFG1. Para autores como Kabak y Ozbey (2012) la bioaccesibilidad de las aflatoxinas es >80%; sin embargo, hay que considerar que estos pueden variar debido al tratamiento previo de las muestras, en este caso la nixtamalización, tal como lo muestran los autores Massarolo et al (2020) con una bioaccesibilidad promedio del 63% con respecto a la materia prima después de realizar un tratamiento hidrotermal, caso similar para Lin, et al (2019) quienes resuelven un rango de 41,5-63,3% de bioaccesibilidad de las aflatoxinas en maíz tras un tratamiento de cocción (Kabak & Ozbey, 2012)(Massarolo et al., 2020)(Lin et al., 2019). Esta bioaccesibilidad podría representar un riesgo si las concentraciones de AFs que se encuentran en la matriz superan los límites permitidos, por lo que se precisa más investigación.

5. Conclusión

El método verificado para la detección y cuantificación de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en matriz de maíz, presentó valores satisfactorios de selectividad, linealidad, sensibilidad, LOD y LOQ; así como valores dentro de los criterios de aceptación de los %RSD de repetibilidad y repetibilidad intermedia para la precisión y recuperaciones mayores al 70% para la exactitud. Por lo anterior, el método es aplicable para la determinación de las aflatoxinas en muestras de maíz natural, nixtamalizado y sometido a la simulación gastro-intestinal.

En cuanto a la nixtamalización, se evidenció una alta reducción en la concentración de aflatoxinas totales a diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, lo que demostró la efectividad del proceso y la influencia del aumento del pH en el mensurando de interés, obteniendo concentraciones menores al límite detectable; sin embargo, la acidificación de las muestras mediante la simulación digestiva recuperó entre 32-39% de la concentración previamente reducida, excediendo la concentración límite legal vigente de aflatoxinas totales en maíz.

Finalmente, se alcanzó un porcentaje de 40,71% de bioaccesibilidad de las aflatoxinas presentes en las muestras de masa de maíz acidificada, lo que podría representar un riesgo a la salud de los consumidores de esta materia prima y sus derivados, como la tradicional arepa de maíz pelado de Santander.

6. Recomendaciones

Es importante seguir con las investigaciones a nivel regional y nacional sobre el contenido de aflatoxinas presente en la matriz de maíz amarillo y sus derivados debido al posible riesgo a la salud de los consumidores. Además, se recomienda estudiar si el contenido de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ usado en la nixtamalización influye en el aumento de la concentración de aflatoxinas cuando se acidifica la masa de maíz, por último, se sugiere investigar el contenido de aflatoxinas y la influencia del pH sobre estas en otros tipos de maíz

Referencias Bibliográficas

- Acosta, I. L. Z. (2009). *Calidad al análisis de Aflatoxinas en Alimento Formulados llevada por Cromatografía Liquida de Alta*.
- Acuña, C., Díaz, G., & Espitia, M. (2005). Aflatoxina en maíz: Reporte de Caso en la Costa Atlántica Colombiana. *Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 52, 156–162.
- AGQ. (2017). *Artículo técnico: Análisis químico, medir es comparar. figura 1*, 1–6.
- Agroinsumos S.A.S. (2018). *Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas*. <http://www.agroinsumossa.com/cultivo-del-maiz-en-colombia/>
- Amador, K., Silos, H., Valera, L., Perales, C., Flores, S., & Martínez, F. (2019). Physico-chemical, thermal, and rheological properties of nixtamalized creole corn flours produced by high-energy milling. *Food Chemistry*, 283, 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.044>
- Anguiano, G., Verver, A., Vargas, A., & Guzmán, D. (2005). *Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa*.
- AOAC. (1994). *AOAC Official Method 994.08 Aflatoxins in Corn, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts Multifunctional Column (Mycosep) Method First Action*.
- Arroyo, N., Huertas, J., Gámiz, L., & García, A. (2014). *Control de micotoxinas en alimentos*. www.ugr.es/~fqm302/
- Baltes, W. (2006). *Química de los alimentos*. Acribia. <https://books.google.com.co/books?id=6Y86PAAACAAJ>

- Bermúdez, C., Insuasty, J., & Gamarra, G. (2006). Grupo sanguíneo A y riesgo de cáncer gástrico en el Hospital Universitario de Santander (Bucaramanga, Colombia). *Acta Médica Colombiana*, 31(4), 400–410.
- Boqué, R. (2004). El Límite de detección de un Método Analítico. *Técnicas de laboratorio. Universitat Rovira i Virgili*, 296, 878–881. <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf>
- Castillo Aguilar, B., & González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Centro Virtual de Negocios. (2019). *Maíz en Colombia*. 27 Junio. <https://www.cvn.com.co/maiz-en-colombia/>
- Comisión Europea. (2006). Reglamento (CE) No 401/2006 de la Comisión. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 12–34.
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition* (pp. 983–994). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>
- David, C., Tovar, G., Sthepani, B., Colonia, O., Grande, C. D., & Químico, T. (2013). Producción y procesamiento del maíz en Colombia * Corn Processing and Production in Colombia. In *Revista Científica Guillermo de Ockham* (Vol. 11, Issue 1).
- Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). (2019). *FoodData Central*. FoodData Central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171706/nutrients%0Ahttps://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html%23/?query=ndbNumber:11216%0Ahttps://fdc.nal.usda.gov/index.html>
- Díaz, G. J., Perilla, N., & Rojas, Y. (2001). Occurrence of Aflatoxins in selected Colombian Foods Abstract A survey of aflatoxin contamination in selected Colombian foods was conducted over a 12-month period on a total of products . The results of the present study indicate that major public health. *Mycotoxin Research*, 17, 15–20.

- Eurachem. (2016). *La adecuación al uso de los métodos analíticos, Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*.
- FAO - ONU. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. *Estudio FAO. Alimentación y Nutrición*, 45.
- Fu, Z., Huang, X., & Min, S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209(1–2), 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.054>
- Gil, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2014). Mycotoxins: Toxicology. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 887–892). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00234-2>
- Golge, O., Hepsag, F., & Kabak, B. (2016). Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method. *Food Control*, 59, 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.035>
- González, S. (2010). *Determinación de aflatoxinas en frutos de nuez mediante cromatografía líquida*. Universidad Austral de Chile.
- Hoyos, G., & Ocampo, J. (2015). *Producción y consumo de maíz en Colombia, descripción de la cadena y propuesta de estrategias para un mejor desempeño de la misma*.
- IDEAM. (2006). *Estandarización de métodos analíticos*.
- INS, & MINSALUD. (2015). *Documento de evaluación de riesgos en inocuidad de alimentos - Evaluación de riesgo de carcinoma hepatocelular en población colombiana por consumo de arepa de maíz contaminada con aflatoxina B1 (AFB1) REPÚBLICA*.
- Ismail, A., Gonçalves, B. L., de Neeff, D. V., Ponzilacqua, B., Coppa, C. F. S. C., Hintzsche, H., Sajid, M., Cruz, A. G., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. In *Food Research International* (Vol. 113, pp. 74–85). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.067>

- Kabak, B., & Ozbey, F. (2012). Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.04.006>
- Klingelhöfer, D., Zhu, Y., Braun, M., Bendels, M. H. K., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2018). Aflatoxin – Publication analysis of a global health threat. *Food Control*, 89, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.017>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Lin, X., Hu, X., Zhang, Y., Xia, Y., & Zhang, M. (2019). Bioaccessibility in daily diet and bioavailability *in vitro* of aflatoxins from maize after cooking. *World Mycotoxin Journal*, 12(2), 173–181. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2350>
- Londoño, E., & Martínez, M. (2017). *Aflatoxins in Food and Dietary Exposure as a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma*. 16(1), 53–66.
- Martínez, M., Taborda, G., & Rosero, M. (2015). Validation of a high performance liquid chromatography method for aflatoxins determination in corn arepas. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(4), 797–803. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150042>
- Martínez, M., Vargas, L., & Gómez, V. (2014). *Aflatoxinas: Incidencia, impactos en la salud, contro y prevención*. 12(2), 89–109. <https://doi.org/1657-9550>
- Massarolo, K. C., Ferreira, C. F. J., Collazzo, C. C., Bianchini, A., Kupski, L., & Badiale-Furlong, E. (2020). Resistant starch and hydrothermal treatment of cornmeal: Factors in aflatoxins and fumonisin B1 reduction and bioaccessibility. *Food Control*, 114, 107274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107274>
- Méndez, A., & Moreno, E. (2011). *Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos*. <http://eppursimuoveqfitos.blogspot.com/2011/12/las-micotoxinas-contaminantes-naturales.html>

- Méndez, J. A., Arámbula, G., Loarca, M. G., González, J., Castaño, E., & Moreno, E. (2004). Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*, 40(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00080-2)
- Méndez, J., Villa, G., Del Rio, J., & Martínez, E. (2004). Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1611–1614. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1853>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Moctezuma, M., Carvajal, M., Espinosa, J., Gonsébat, M., Rojo, F., Castillo, P., Pérez, I., & Ruiz, S. (2015). Role of pH in the Mutagenicity of Aflatoxin B1 in Maize Tortillas during In Vitro Human Digestion Model. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2324-9323.1000174>
- Molina, M. J., María, C., Ochoa, C., Página, A., Universidad, I., Cuenca, D. E., De, F., Químicas, C., De Bioquímica, E., Farmacia, Y., Aflatoxinas, Y. F., & Caso De, N.-E. ". (2015). *Caracterización del Proceso Tradicional del Pelado de Maíz con Ceniza a ser utilizado como Estrategia de Detoxificación de Aflatoxinas*. Universidad de Cuenca.
- Nogueira, M., Massarolo, K., Kupski, L., & Badiale, E. (2019). Hydrothermal treatment of rice: Reduction of aflatoxins and bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 85(October 2018), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.009>
- Normas, I. L. De. (2019). *ICONTEC e-Collection / Listado de Normas*. 2019.
- NotiJenck. (2008). *UFLC: Análisis de aflatoxinas con cromatografía líquida de alta velocidad y alta resolución - NotiJenck*. Noti Jenck. <https://www.notijenck.com.ar/aplicaciones/uflc-analisis-de-aflatoxinas-con-cromatografia-liquida-de-alta-velocidad-y-alta-resolucion>
- OMS. (2018). *Micotoxinas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

- Paredes, O., Guevara, F., & Bello, L. (2009). La nixtamalización y el valor nutricional del maíz. In *CIENCIAS* (pp. 92–93).
- Peng, Z., Chen, L., Zhu, Y., Huang, Y., Hu, X., Wu, Q., Nüssler, A. K., Liu, L., & Yang, W. (2018). Current major degradation methods for aflatoxins: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 80, pp. 155–166). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.009>
- Pérez-Flores, G. C., Moreno-Martínez, E., & Méndez-Albores, A. (2011). Effect of Microwave Heating during Alkaline-Cooking of Aflatoxin Contaminated Maize. *Journal of Food Science*, 76(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01980.x>
- Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. In *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>
- Robinson, V. (n.d.). ¿Para cuántas cosas nos sirve la nixtamalización? Retrieved June 8, 2020, from <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/82-numero-11/166-ipara-cuantas-cosas-nos-sirve-la-nixtamalizacion.html>
- Rodriguez, S. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Tumbaga*, 7(1), 5.
- Saladino, F., Posarelli, E., Luz, C., Luciano, F., Rodriguez, M., Mañes, J., & Meca, G. (2018). Influence of probiotic microorganisms on aflatoxins B1 and B2 bioaccessibility evaluated with a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.010>
- Santiago, D., Figueroa, J. de D., Mariscal, R., Escalante, A., Ponce, N., & Véles, J. (2018). Physical and chemical changes undergone by pericarp and endosperm during corn nixtamalization- A review. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 81, pp. 108–117). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.003>
- Schaarschmidt, S., & Fauhl, C. (2019). Mycotoxins during the processes of nixtamalization and tortilla production. In *Toxins* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins11040227>
- Shephard, G. (2017). Determination of Mycotoxins in Food. In *Analysis of Food Toxins and*

- Toxicants* (Vols. 1–2, pp. 139–168). Wiley Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781118992685.ch5>
- Stefanovic, S., Spiric, D., Petronijevic, R., Trailovic, J. N., Milicevic, D., Nikolic, D., & Jankovic, S. (2015). Comparison of two Analytical Methods (ELISA and LC-MS/MS) for Determination of Aflatoxin B1 in Corn and Aflatoxin M1 in Milk. *Procedia Food Science*, 5, 270–273. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.077>
- Temba, B. A., Sultanbawa, Y., Kriticos, D. J., Fox, G. P., Harvey, J. J. W., & Fletcher, M. T. (2016). Tools for Defusing a Major Global Food and Feed Safety Risk: Nonbiological Postharvest Procedures To Decontaminate Mycotoxins in Foods and Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(47), 8959–8972. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03777>
- Teresa, M., Restrepo, E., Patricia, M., Hurtado, R., Luz, M., Camacho, B., Araque, Á., Melba, G., Osorio, V., Manuel, J., Camargo, L., & Bogotá, D. C. (2006). *Manual de Agentes Carcinógenos*.
- Torres, P., Guzmán-Ortiz, M., & Ramírez-Wong, B. (2001). Revising the Role of pH and Thermal Treatments in Aflatoxin Content Reduction During the Tortilla and Deep Frying Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2825–2829. <https://doi.org/10.1021/jf0007030>
- U.S Food & Drug. (2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program, 3rd Edition*. 39.
- U.S Food & DRUG. (1996). *Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*.
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> or <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
- Valls, J. (2004). *Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos*. [Universidad Central de Venezuela].
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26411.85289>
- Venegas, A., Hurtado, J., & Navas, M. (2014). Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. In *IATREIA* (Vol. 27, Issue 1).

- Ventura Group. (2020). *Cuál es el panorama de la importación de maíz a Colombia*. 29 Enero. <https://www.venturagroup.com/panorama-de-importacion-de-maiz-a-colombia/#:~:text=El puerto de Buenaventura es,de toneladas por el puerto>
- Villada, J., Sánchez, F., Zelaya, O., Gutiérrez, E., & Rodríguez, M. E. (2017). Study of the morphological, structural, thermal, and pasting corn transformation during the traditional nixtamalization process: From corn to tortilla. *Journal of Food Engineering*, 212, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.034>
- World Health Organization Department of Food Safety and Zoonoses. (2018). Aflatoxins. In *Food Safety Digest*.
- Yúfera, E. P., & Dorrién, J. M. C. (1987). *Química agrícola* (Issue v. 3). Alhambra. <https://books.google.com.co/books?id=OVTeKAAACAAJ>
- Zavala-Franco, A., Arámbula-Villa, G., Ramírez-Noguera, P., Salazar, A. M., Sordo, M., Marroquín-Cardona, A., Figueroa-Cárdenas, J. de D., & Méndez-Albores, A. (2020). Aflatoxin detoxification in tortillas using an infrared radiation thermo-alkaline process: Cytotoxic and genotoxic evaluation. *Food Control*, 112, 107084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107084>