

4  
0056729.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

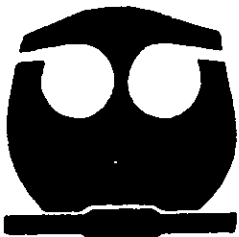
**EVALUACION DEL EFECTO DE ALMACENAMIENTO  
SOBRE LAS MACROMOLECULAS DEL MAIZ POR  
MEDIO DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL  
DE BARRIDO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS  
(QUIMICA DE ALIMENTOS)**

**P R E S E N T A :  
LUZ SANDRA SANCHEZ DEL ANGEL**

**ASESORA: M. EN C. MA. DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ.**



**MEXICO, D. F.**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

263328



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DEDICATORIA**  
A mis padres  
a mi esposo

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora M en C. M<sup>a</sup> de los Angeles Valdivia L. por sus valiosos consejos y esmero en el diseño y realización de este proyecto.

En especial al Dr. Alvaro Barragán Hernández por el gran apoyo que representó en este trabajo.

A la maestra Fanny Iturbe Chiñas y a todos mis maestros y compañeros que me impulsaron a lograr esta meta.

Por el valioso apoyo tanto técnico como entusiasta de Julieta Sandoval G., Sandra Pérez M. En especial para Hugo Sousa.

Por la gran experiencia profesional que siempre han compartido conmigo mis fabulosos amigos: Gilberto González C., Mercedes Lagunas, Priscila Balarezo, Julieta Sandoval, Amalia Macedo, Sandra Pérez, María Castro, Silvana Donoso, Saúl Domínguez, Lucía Mancilla, Gerardo Ramírez M., Alejandra Farias, Olga De León, Juan Porras y todos aquellos que en este momento escapan a mi memoria.

A la Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario de la Secretaría de Salud, institución que me brindó la oportunidad de superación académica.

A toda mi familia, en especial a Graciela Reyes S.

<b>ÍNDICE.</b>	<b>página</b>
<b>RESUMEN.</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	3
<b>1. GENERALIDADES DEL MAÍZ.</b>	4
1.1. Características estructurales.	7
1.2. Composición química	9
1.3. Macromoléculas del maíz	10
1.3.1 Hidratos de carbono.	
1.3.2 Proteínas.	11
1.3.2.1 Zeínas.	13
1.3.2.2 Glutelinas.	15
1.3.2.3 Albúminas.	16
1.3.2.4 Globulinas.	
1.3.3 Lípidos.	
1.4 Almacenamiento del maíz.	18
1.4.1 Sistemas de almacenamiento.	
1.4.2 Periodo de almacenamiento.	19
1.4.3 Factores de control durante el almacenamiento.	
1.4.3.1 Humedad.	20
1.4.3.2 Temperatura.	21
1.4.3.3 Aireación.	
1.4.3.4 Factores biológicos.	22
1.4.4 Cambios nutritivos en el almacenamiento.	
1.4.4.1 Deterioro por efectos químicos.	24
1.4.4.2 Deterioro por efectos biológicos.	
1.5 ANÁLISIS TÉRMICO.	25
1.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	
1.5.2 Características térmicas medidas por DSC.	26
1.5.3 Aplicaciones de DSC en alimentos.	29
1.5.3.1 Aplicaciones en proteínas.	

1.5.3.1.1	Desnaturalización térmica.	30
1.5.3.1.2	Interacciones proteínicas	
1.5.3.1.3	Efecto del ambiente en la conducta térmica de las proteínas.	33
1.5.3.2	Aplicaciones en almidón.	35
1.5.3.2.1	Efectos térmicos sobre la estructura del almidón.	
1.5.3.2.2	Interacciones del almidón.	37
1.5.3.2.3	Efecto del ambiente en la conducta térmica del almidón.	38
1.5.3.3	Aplicaciones en grasas.	39
	<b>HIPÓTESIS.</b>	40
	<b>OBJETIVOS.</b>	
<b>2.</b>	<b>TRABAJO EXPERIMENTAL.</b>	41
2.1	Primera etapa: Validación de DSC para macromoléculas del maíz.	
2.1.1	Análisis químico proximal.	
2.1.2	Separación de macrocomponentes.	
2.1.3	Condiciones térmicas de barrido.	42
2.1.4	Establecimiento de los parámetros de humedad en los macrocomponentes para la obtención de curvas térmicas.	43
2.2	Segunda etapa: Almacenamiento del maíz.	44
2.2.1	Establecimiento de las condiciones de almacenamiento.	
2.2.1.1	Ajuste de los 3 contenidos de humedad en el grano.	
2.2.1.2	Ajuste de las temperaturas de almacenamiento.	45
2.2.2	Calendario de almacenamiento y monitoreo.	
2.2.3	Esquema analítico.	47
2.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	48
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	49
3.1	Primera etapa: Trabajo preliminar al almacenamiento.	
3.2	Segunda etapa: Almacenamiento del maíz.	55
3.2.1	Determinación de las características térmicas de las proteínas.	56
3.2.1.1	Resultados calorimétricos de las fracciones proteínicas del maíz control.	57

3.2.1.2 Resultados calorimétricos de las fracciones proteínicas del maíz almacenado a 40 y 20 °C, con 18, 15 y 10% de humedad.	59
3.2.2 Determinación de las características térmicas del almidón.	83
3.2.2.1 Resultados calorimétricos de la fracción de almidón del maíz control.	
3.2.2.2 Resultados calorimétricos de la fracción de almidón del maíz almacenado a 40 y 20 °C, con 18, 15 y 10% de humedad.	84
<b>4. CONCLUSIONES.</b>	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	
<b>APÉNDICE.</b>	

## RESUMEN

Se ha demostrado que el manejo deficiente post-cosecha y los sistemas actualmente en práctica para almacenar, no protegen a los granos de las variaciones climatológicas, ocasionando cambios en el contenido de humedad de los mismos y fomentando la eventual infestación. Del mismo modo, se conoce que durante el almacenamiento se llevan a cabo cambios físicos y químicos, sin embargo hay poca evidencia de lo que ocurre a nivel molecular.

En este estudio se presentan resultados que ayudan a comprender la naturaleza de las modificaciones moleculares que toman lugar por efecto de la temperatura y humedad durante el almacenamiento. Para evaluar estos efectos se considero esencialmente la diversidad climatológica del país en la cual se pueden encontrar tanto condiciones favorables como adversas. Se utilizó la Calorimetría Diferencial de Barrido como herramienta analítica para la evaluación y seguimiento de las propiedades térmicas de los macrocomponentes de un híbrido clasificado de maíz. Se monitorearon las transiciones debido a la desnaturalización de las fracciones proteínicas, así como los cambios en la transiciones debido a la gelatinización para el caso de la fracción de almidón. Los resultados entálpicos de proteínas demuestran una disminución de 84% aproximadamente (con respecto a un control) cuando el grano se almacenó a 40°C y 18% de humedad. El tiempo en el que se presentó este decremento fue de solo 30 días de almacenamiento para las proteínas con predominios polares (albúminas y globulinas) y 60 días para las de predominios hidrofóbicos (prolaminas y glutelinas). El almidón, disminuyó un 26% (el valor entálpico bajó de 3.98 a 2.92 J/g) en 60 días, esta tendencia indica menor necesidad de energía para su transición calorimétrica probablemente debido a una hidratación primaria que motivó la desestabilización de las zonas amorfas del grano.

Para las proteínas la temperatura de desnaturalización aumentó de 80.2 a 106 °C, es decir un 32% para las hidrofóbicas y un 15% para las polares. Asimismo, la solubilidad de las últimas disminuyó en un 80% y un 50% para las de predominios hidrofóbicos ocasionando su baja recuperación durante la extracción. Se estableció la presencia de segundas transiciones, tanto en las fracciones proteínicas como en la de almidón, a temperaturas mayores de las



registradas para la desnaturalización y gelatinización\*.

Del mismo modo, a 40°C y humedad del 18% consideradas como condiciones extremas, el grano sufrió modificaciones en sus atributos físicos y aceleración de la velocidad de reacciones químicas, dando lugar a la presencia de ácidos grasos libres y peróxidos, como productos de la oxidación de los lípidos, así como melanoidinas provenientes de las reacciones de Maillard. En todas las condiciones a las que se almacenó el grano se estableció daño químico grave de las proteínas, sobre todo en las polares, este efecto incide directamente sobre la lisina que puede perderse por alguna de las vías de deterioro disminuyendo así la calidad nutricional.

La temperatura y humedad de almacenamiento son factores cuyo control requiere de infraestructura costosa. Debido a esto, el tiempo de almacenamiento podría ser un factor de control fácil y económico sobre todo en las zonas rurales, ya que en este trabajo se muestra que el grano con un contenido de humedad de 10% al 15% y con temperatura ambiental de 20°C muestra respuestas térmicas que revelan pocos cambios en las proteínas a los 180 y 30 días respectivamente. Condiciones de 18% de humedad y 20°C implican movimiento del grano en un tiempo no mayor de 20 días para asegurar la calidad integral del maíz. El estudio demuestra que a condiciones de 40°C a cualquier intervalo de humedad experimentado, el maíz sufre un severo daño en menos de 10 días, por lo que bajo estas condiciones el consumo o industrialización deberá ser inmediato. Adicionalmente se recomienda realizar estudios térmicos para conocer las zonas de estabilidad macromolecular en otros intervalos de temperatura y humedad de almacenamiento, para que con esto aporte mas opciones en las que se asegure un grano de mayor beneficio nutritivo. Para el tecnólogo, estos datos le pueden indicar un ajuste de temperaturas en los procesos en los que se involucre calor.

El estudio demostró que a través de la calorimetría diferencial de barrido es factible establecer la historia de almacenamiento a la que fue sometido el maíz y que eventualmente la metodología puede ser aplicada a otros cereales o granos.

---

\* según se definen en el punto 1.5.3.1.1 y 1.5.3.2.1

## INTRODUCCIÓN.

En los países Europeos se consume una variedad de cereales entre los cuales, el maíz ocupa un cuarto o quinto lugar. En el Oriente, el arroz es el de mayor consumo. Sin embargo, la producción de maíz en China es de 40 millones de toneladas por año. En Estados Unidos, la producción es de 230 millones y México tiene una producción de solo 14 millones de toneladas por año la cual es insuficiente y obliga a la importación.

El maíz, se adapta a diferentes suelos y condiciones climáticas; puede ser cultivado en pequeña o gran escala. Debido a esto, tiene un magnífico rendimiento, pues en algunas zonas de nuestro país se pueden obtener dos cosechas al año y cada mazorca puede producir, según la variedad, un promedio de 300 granos. La superficie cosechada de aproximadamente 8 millones de hectáreas ha aumentado a 14 millones desde 1981 a la fecha y el consumo *per capita* se ubica en 172 Kg./año. Las importaciones de maíz que para el año de 1996 fueron de 1,062 millones de dólares han permitido mantener la disponibilidad en niveles adecuados y apoyar el consumo alimentario<sup>1</sup>. Por otro lado, México carece de programas de control eficientes para evaluar la calidad de los cereales importados, por lo que no es extraño que lotes deteriorados y contaminados con micotoxinas sean introducidos al país.

La producción agrícola en México, en especial la de granos básicos, se ve limitada por factores diversos como la escasez de tierras y agua, mala organización de las pequeñas unidades de producción, deficiente capacitación de campesinos y técnicos, carencia de asistencia técnica efectiva a las unidades de producción, insuficiencia de insumos agrícolas, entre ellos de semillas mejoradas, y daños provocados por plagas y enfermedades<sup>2,3</sup>. Todos estos efectos inciden de manera decisiva en la economía y en el estado de la alimentación de la población. Por ejemplo, en 1990 la pérdida post-cosecha para el maíz fue de 732 mil toneladas lo que representó un costo de 128.8 millones de dólares<sup>1</sup>. Tan grandes pérdidas se explican si se considera que un alto porcentaje de los almacenes se encuentran a la intemperie. Estas pérdidas cuantitativas sólo son una parte de la reducción de la disponibilidad de alimentos; la otra, son las pérdidas cualitativas, que se producen por deterioro en la calidad nutritiva y sanitaria del grano por acción de factores físicos y bióticos,

aspecto completamente relegado en la comercialización.

Para una adecuada conservación de granos se requiere de cierta capacidad tecnológica y grandes inversiones en infraestructura, recursos de los cuales México carece en gran medida; sin embargo, este aspecto se contrapone pues al parecer se prefiere gastar en la importación de maíz. Las infestaciones por hongos y plagas son las causas principales de deterioro del grano, pero puede ocurrir un declive lento de la calidad aun en ausencia de estas causas<sup>2</sup>. Este deterioro ocasiona variaciones en la acidez, pH, proteína cruda, azúcares solubles totales, etc.<sup>4,5</sup>. Estos cambios físicos y químicos repercuten de manera significativa en las cualidades tecnológicas. Algo similar ocurre para el trigo, que a la fecha ha sido el cereal más estudiado, y del cual se tiene mas información. De esta forma se sabe por ejemplo, que las proteínas se modifican en cuanto a sus características de solubilidad y agregación repercutiendo en forma importante en las propiedades panaderas; así mismo, la pérdida de características apropiadas se agudiza en la medida en que las condiciones de almacenamiento no resultan eficientes<sup>6,7</sup>

En contraste con el trigo, la información sobre maíz resulta escasa, probablemente debido a que en los países desarrollados su uso está encaminado

a la alimentación animal y al aprovechamiento industrial de algunos componentes. Dada la diversidad del uso del maíz en el país, el cual se industrializa en un 90 % (tortillas, aceite, pan, frituras, harina nixtamalizada, anticorrosivos, adhesivos, y decenas de productos más<sup>8,9</sup>), resulta evidente la importancia de contar con mas información sobre los cambios que se presentan en los macrocomponentes durante el almacenamiento y evaluar el efecto de las condiciones que prevalecen, para poder inferir las posibles consecuencias tecnológicas.

## 1. GENERALIDADES DEL MAÍZ

El maíz es un cereal de origen mesoamericano que pertenece a la familia Gramineae, al género y especie *Zea mays*. En EUA, donde la producción de este cereal es mayor, existen dos subespecies de importancia comercial el *Zea indurata* y *Zea indentata*. Dentro de la clasificación estructural, el maíz puede dividirse en varias subespecies, en función de calidad, cantidad y patrón de composición del endospermo en maíz dentado, cristalino,

aspecto completamente relegado en la comercialización.

Para una adecuada conservación de granos se requiere de cierta capacidad tecnológica y grandes inversiones en infraestructura, recursos de los cuales México carece en gran medida; sin embargo, este aspecto se contrapone pues al parecer se prefiere gastar en la importación de maíz. Las infestaciones por hongos y plagas son las causas principales de deterioro del grano, pero puede ocurrir un declive lento de la calidad aun en ausencia de estas causas<sup>2</sup>. Este deterioro ocasiona variaciones en la acidez, pH, proteína cruda, azúcares solubles totales, etc.<sup>4,5</sup>. Estos cambios físicos y químicos repercuten de manera significativa en las cualidades tecnológicas. Algo similar ocurre para el trigo, que a la fecha ha sido el cereal más estudiado, y del cual se tiene mas información. De esta forma se sabe por ejemplo, que las proteínas se modifican en cuanto a sus características de solubilidad y agregación repercutiendo en forma importante en las propiedades panaderas; así mismo, la pérdida de características apropiadas se agudiza en la medida en que las condiciones de almacenamiento no resultan eficientes<sup>6,7</sup>.

En contraste con el trigo, la información sobre maíz resulta escasa, probablemente debido a que en los países desarrollados su uso está encaminado a la alimentación animal y al aprovechamiento industrial de algunos componentes. Dada la diversidad del uso del maíz en el país, el cual se industrializa en un 90 % (tortillas, aceite, pan, frituras, harina nixtamalizada, anticorrosivos, adhesivos, y decenas de productos más<sup>8,9</sup>), resulta evidente la importancia de contar con mas información sobre los cambios que se presentan en los macrocomponentes durante el almacenamiento y evaluar el efecto de las condiciones que prevalecen, para poder inferir las posibles consecuencias tecnológicas.

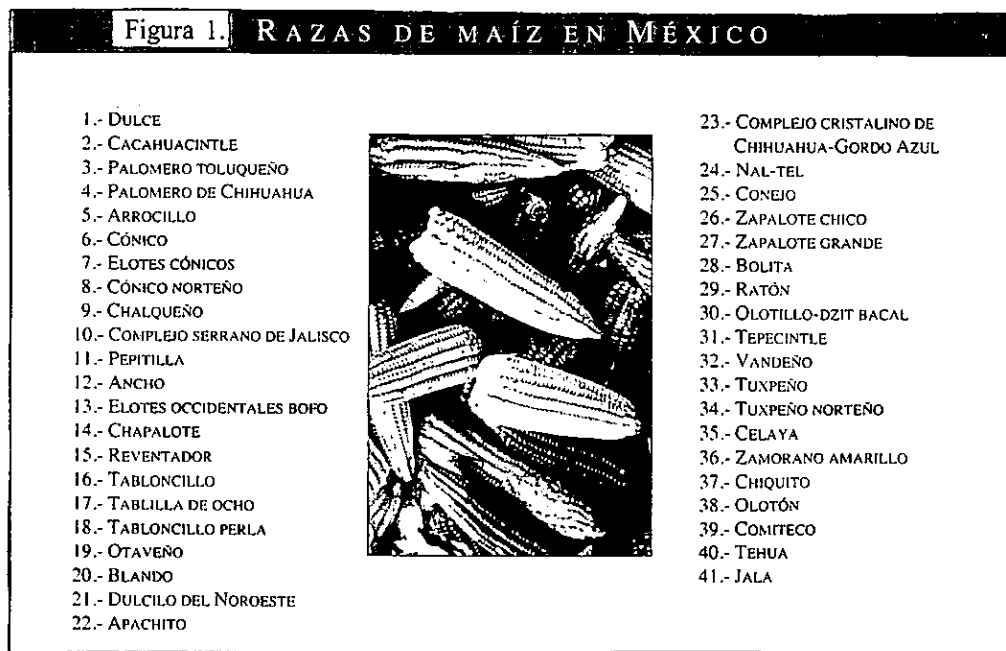
## 1. GENERALIDADES DEL MAÍZ

El maíz es un cereal de origen mesoamericano que pertenece a la familia Gramineae, al género y especie *Zea mays*. En EUA, donde la producción de este cereal es mayor, existen dos subespecies de importancia comercial el *Zea indurata* y *Zea indentata*. Dentro de la clasificación estructural, el maíz puede dividirse en varias subespecies, en función de calidad, cantidad y patrón de composición del endospermo en maíz dentado, cristalino,

harinoso, dulce, palomero y tunicado<sup>10</sup>.

La clasificación del maíz mexicano se hace a partir de razas, las cuales son poblaciones de maíz cuyas semejanzas entre sí son mayores que con las de otras poblaciones, lo cual indica contenido genético común alto y por ende un parentesco. Esta clasificación se hace con el propósito de aclarar la historia

evolutiva del maíz en México y como base para efectuar el mejoramiento genético del cultivo. De las razas de maíz se cultivan hoy no menos de 40 (figura 1) y de ellas se derivan decenas de variedades y clases<sup>7</sup>.



Modificado de: R. Ortega Packsa, J.J. Sánchez et al., "Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México", en R. Ortega Packsa et al., avances en los recursos fitogenéticos de México, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C., México, 1991.

Desde el punto de vista compra-venta, el maíz se clasifica de la siguiente manera: maíz

blanco, la NOM (Norma Oficial Mexicana) lo define como el que presenta un valor menor o igual a 5% de maíces amarillos y que contenga como máximo 5% de oscuros (rojo, azul y morado). Las industrias harineras y almidoneras lo prefieren.

El maíz amarillo, la NOM lo indica como aquel maíz de granos amarillos o amarillos con un tono rojizo, con un valor menor o igual a 6% de maíces de otro color. Debido a su elevado contenido en carotenos, este maíz es muypreciado para ser empleado como forraje y para la extracción de aceite.

El maíz mezclado, la NOM estipula como aquel maíz blanco que contenga entre 5.1 y el 10 % de maíces amarillos o viceversa. Ambos sin sobrepasar el 5% de maíces oscuros.

El maíz pinto, la NOM lo define como todo aquel maíz blanco, amarillo y mezclado que contenga más del 5% de maíces oscuros (rojo, azul y morado)<sup>11</sup>.

Otra clasificación del maíz es la que se obtiene por medios genéticos para producir modificaciones en el contenido de almidón, proteína, aceite y otras propiedades. Por ejemplo, el maíz céreo (*Zea mays cerea*), fue introducido en Estados Unidos en 1908. Es un mutante del endospermo y es poseedor del gene wx. Su almidón esta compuesto de 100 % de amilopectina y se tiñe de color café rojizo con una solución al 2% de yoduro de potasio, mientras que el almidón del maíz común, se tiñe de color azul. Los tipos de almidón céreo (nativo y modificado) son comercializados a nivel mundial debido a su estabilidad y a otras propiedades de sus soluciones.

El maíz de alta amilosa es otro mutante del endospermo y tiene el gene ae (amylose-extender). En éste, se aumenta la fracción de amilosa del almidón a 50 % o más. Existen dos tipos desarrollados comercialmente, el que tiene un contenido de amilosa entre 50 y 60% y otro que contiene entre 70 y 80%. El grano es de apariencia deslustrado, translúcido, es utilizado en la industria textil y como adhesivo en la manufactura de cartón. Los híbridos ceroso y alto en amilosa se siembran bajo contrato con la industria de molienda húmeda de maíz. Ambos genes son recesivos y el campo en que son producidos debe ser aislado.

El maíz de alta lisina, es el nombre genérico para el que tiene un mejor balance de aminoácidos y por consiguiente, una mejor calidad de proteína. En 1964, se descubrió que el nivel de lisina es controlado por un gene recesivo (opaco-2 o harinoso-2), que reduce el

contenido de zeína en el endospermo e incrementa el porcentaje de lisina y triptofano<sup>12</sup>. Aunque recientemente se ha encontrado que esto no corresponde a un solo gene.

El maíz con elevado contenido de aceite, es aquel donde el porcentaje de aceite del material que ha estado bajo selección continua se ha incrementado hasta en un 17.5%. Aunque las variedades con altos contenidos de aceite tienen un bajo rendimiento, investigaciones recientes que incorporan nuevos genes, indican que los tipos que contienen entre 7 y 8 % de aceite, pueden ser productivos en cuanto a rendimiento<sup>13</sup>.

En África, los programas de alimentación han hecho que se desarrollen variedades de elevada producción mas que de alta calidad en términos de propiedades tecnológicas, organolépticas y nutricionales. Sin embargo, las mutaciones de mayor calidad como el opaco-2, aunque es dos veces mas nutritivo que el grano convencional, no es muy aceptado porque tiene una estructura blanda y endospermo calcáreo que resulta en baja producción por disminución de la densidad del grano. La mutación del opaco-2 también causa una alta susceptibilidad a enfermedades y daño por insectos. Las excepciones a lo antes expuesto, son las variedades de maíz de calidad proteica (QPM, Quality Protein Maize) desarrolladas por el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) en México, que convierte al opaco-2 en variedades que tienen calidad nutricional, alta producción, apariencia tradicional y dureza convencional. El contenido de lisina es intermedio entre el normal y el opaco-2<sup>14,15</sup>.

### 1.1. Características estructurales.

Un diente de maíz consiste de 3 partes principales: el pericarpio o cáscara externa cuya proporción (dependiendo de la variedad) es de aproximadamente el 6%, el germen con 11%, y el endospermo con 83% del grano.

El pericarpio está formado por aproximadamente 40 % de celulosa y 40 % de peptidoglucano, es una cubierta compuesta por una capa externa de células elongadas y empaquetadas dentro de un tejido muy denso. Se adhiere fuertemente a la superficie exterior de la aleurona y se cree que imparte propiedades semipermeables al grano de maíz. Debajo de esta capa se encuentra un tejido esponjoso de células cruzadas y tubulares, unidas con la punta y cuya función es de absorber agua. El agua contenida en el pericarpio y en la raíz

dentro del germen tiene alta movilidad, mientras que en el endospermo tiene la más baja movilidad<sup>16</sup>.

El germen se origina por la unión de los núcleos del grano de polen y del saco embrionario. Está compuesto por las siguientes partes: el eje embrionario, que comprende el 10 % del germen y es una estructura que desarrollará la planta durante la germinación; y el escutelo, que integra el 90 % restante y almacena los nutrientes que se movilizarán rápidamente durante la germinación. La superficie del escutelo, en contacto con el endospermo, está cubierta de un epitelio secretor. Este epitelio es una capa profunda con células elongadas cuya función es generar enzimas amilolíticas que se difunden dentro del endospermo, donde digieren al almidón y otros constituyentes para proveer de nutrientes al embrión.

El escutelo está formado por células parenquimales que contienen esferosomas, los cuales están constituidos de aceite líquido, estos organelos son también conocidos como cuerpos oleosos y se encuentran en todas las oleaginosas. Los esferosomas contienen enzimas hidrolíticas, así como las enzimas necesarias para la síntesis de lípidos. La pared celular del escutelo, compuesta básicamente por hemicelulosa, es gruesa, porosa y con espacios interestructurales para facilitar el movimiento de materiales. Su capa exterior, está formada por células secretoras que forman el contacto principal entre el embrión y el endospermo.

Dependiendo de la raza y variedad, el endospermo está compuesto en un 86-89 % (peso de almidón/peso del endospermo) por almidón en el diente harinoso. Se divide en dos regiones bien definidas: el endospermo harinoso y el endospermo corneo. El primero representa el 34 % del peso total del endospermo, es de consistencia suave y de apariencia opaca, se caracteriza por tener células longitudinales y gránulos de almidón grandes y redondos. Estos gránulos, están arreglados holgadamente con una delgada matriz proteica, que se rompe durante el secado y forma espacios vacíos. El endospermo corneo, es de consistencia dura y apariencia translúcida, se caracteriza porque sus gránulos de almidón están incrustados de forma compacta en una gruesa matriz proteica, lo que origina que estos, formen superficies angulares características de este arreglo (son poligonales); la matriz, no sufre ruptura



durante el secado. Este endospermo, representa generalmente el 66 % del peso total en maíz de tipo harinoso y su contenido de proteínas es de 1.5 a 2 % más que el endospermo harinoso.

La capa más externa del endospermo es la aleurona, la cual está formada por una lámina sencilla de células de diferente forma; esta capa cubre el endospermo y el germen<sup>13</sup>.

## 1.2 Composición química

La composición química de las tres porciones principales del grano de maíz (harinoso) se presenta en la tabla 1.1 y en la tabla 1.2 se muestra su análisis proximal. Cabe hacer la aclaración que ésta depende de la raza de maíz de que se trate.

Tabla 1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MAÍZ  
(g/ 100 g en base seca)

	Almidón	Grasa	Proteína	Cenizas	Azúcar	Fibra cruda
Germen	5.1 - 10	31.1-38.9	17.3 - 20	9.38- 11.3	10.1-12.5	1.8-2.9
Endospermo	83.9- 88.9	0.7 -1.1	6.7 - 11.1	0.22 -0.46	0.47-0.82	0.3-0.5
Pericarpio	3.5 - 10.4	0.7 - 1.2	2.9 - 3.9	0.29 -1.0	0.19-0.52	16.0-17.0
Grano entero	67.8-74	3.9 - 5.8	8.1 - 11.5	1.27 -1.52	1.61-2.22	1.8-2.0

Tabla 1.2 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO DE MAÍZ  
(g/100 g de harina, base seca)

Característica	Rango	Promedio
Humedad	7 - 12	10.0
Almidón	61 - 72	71.7
Proteína	6 - 11	9.5
Grasa	3.1 - 5.7	4.3
Cenizas	1.1 - 1.9	1.4
Pentosanas (xilosa)	5.8 - 6.0	6.2
Fibra	1.3 - 2.9	2.5
Celulosa + Lignina	3.3 - 4.3	3.3
Azúcares totales	1.0 - 3.0	2.0
Carotenoides totales mg/Kg.	4 - 40	30.0

fuentes: Stanley A.W. 1987.

La tabla 1.1 muestra que el 85% del aceite de maíz está presente en el germen. Debido a esto, para prevenir la rancidez durante el almacenamiento, el germen es generalmente removido por decorticación, proceso que hacen solo las fábricas que se dedican a la producción de aceite. Además, esta estructura es más rica en minerales que las otras

porciones (tabla 1.1), probablemente porque son esenciales para el crecimiento del embrión. El componente inorgánico más abundante es el fósforo y está presente en el germen principalmente en forma de complejo con ácido fítico para formar la fitina (hexafosfato de inositol), los cuales durante la germinación son transportados a cuerpos proteicos de la aleurona y el escutelo<sup>17</sup>.

### **1.3. Macromoléculas del maíz.**

#### **1.3.1 Hidratos de carbono.**

Son los constituyentes químicos principales del grano de maíz. Los polímeros estructurales y de almacenamiento, además de una amplia variedad de hidratos de carbono simples, son sintetizados en el grano en desarrollo. En la madurez, cuando la síntesis se ha completado, los azúcares representan únicamente el 2 % del grano (base seca) y aunque están en niveles muy bajos, son muy importantes para la síntesis y transferencia de energía. Los azúcares simples presentes en el grano son: sacarosa, glucosa, fructosa y la mayor proporción está en el embrión (tabla 1.1)<sup>18</sup>.

Los principales monosacáridos del endospermo son la D-fructosa y D-glucosa presentes en cantidades iguales. La sacarosa es el disacárido más abundante, los trisacáridos y los oligosacáridos son componentes menores y pueden estar presentes la rafinosa, maltotriosa y los malto-oligosacáridos.

Dentro de los hidratos de carbono estructurales, están las sustancias pépticas, hemicelulosa y celulosa formando parte de la pared celular.

El almidón es el hidrato de carbono de almacenamiento del maíz, se almacena dentro de gránulos en el endospermo que se genera dentro de un organelo celular llamado amiloplasto; mide 25  $\mu\text{m}$  de diámetro y difiere en dimensión y forma, propiedades que son relativamente características para los distintos cereales. Las moléculas de polisacáridos en los gránulos están organizadas radialmente; debido a la presencia alternante de capas deficientes y ricas en agua se pueden observar al microscopio diferencias en los índices de refracción. Los gránulos de almidón pueden ser gelatinizados y el intervalo de temperatura en el que se

producen estos cambios así como la magnitud de hinchamiento a una temperatura dada, son característicos y pueden utilizarse para identificar la procedencia del almidón.

Los almidones altos en amilosa gelatinizan a mas alta temperatura y pueden ser usados para formar geles y películas, además, reducen el hinchado, la solubilidad y no dan pastas viscosas. Entre los constituyentes heterogéneos de los gránulos de almidón se encuentran los lípidos (60g de lípidos no polares y 40g de fosfolípidos y glicolípidos por cada 100 g de lípidos amiláceos totales) y las proteínas (0.5g /100g de lípidos) que proceden de los amiloplastos precursores<sup>10</sup>.

### 1.3.2 Proteínas.

Las proteínas en el grano se clasifican en: las de almacenamiento y las metabólicas (citoplásmicas). Las proteínas de almacenamiento, como las zeínas y glutelinas, son aquellas que 1) no tienen función metabólica a excepción de proveer nitrógeno para la germinación, 2) se forman relativamente tarde en el desarrollo de la semilla, 3) pueden ser almacenadas en un paquete separado, generalmente conocido como cuerpo proteico, y 4) pueden estar compuestas de un número limitado de polipéptidos similares. Las proteínas metabólicas, tales como las albúminas, globulinas y algunas glutelinas, éstas se hidrolizan durante la germinación para liberar aminoácidos necesarios en el desarrollo del germen.

Osborne y Mendel (1914) desarrollaron un proceso de extracción secuencial para separar las clases de proteínas de una muestra simple de maíz basadas en diferencias en solubilidad. Dentro de la clase original de Osborne están las albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal), zeínas (solubles en alcohol acuoso) y glutelinas (solubles en álcali diluido). El agente reductor 2-mercaptoetanol ha sido utilizado para mejorar la extractabilidad de las glutelinas<sup>13</sup>.

La separación clásica de proteínas (medida como nitrógeno) dentro de fracciones clasificadas por su solubilidad, se presenta en la tabla 1.3. Cabe aclarar que esta distribución varía dependiendo de la raza y variedad del maíz estudiado.

Tabla 1.3. DISTRIBUCIÓN DE NITRÓGENO EN LAS FRACCIONES PROTEÍNICAS  
(g de nitrógeno/ 100 g de proteína total)

Fracción proteica	Grano entero	Endospermo	Germen
Albúminas	7	3	35
Globulinas	5	3	18
Zeína	52	60	5
Glutelina	25	26	18
N <sub>2</sub> no proteico	6	3	20
Proteína total	100	78	18

\* 0.5M NaCl

fuelle: Landry J. and Moureaux T. 1980.

La fracción mas grande en el germen, son las albúminas que contienen cerca de la tercera parte del nitrógeno total<sup>19</sup>.

Los factores que pueden influir en la extractabilidad de proteínas son: genotipo, dureza del grano, edad y condiciones de almacenamiento de la muestra, procedimiento de molienda, remoción de lípidos, tipo de alcohol y su concentración, tiempo y temperatura de extracción, entre otros. Específicamente dos compuestos no proteínicos del germen afectan la extractabilidad y solubilidad de proteínas; el fitato y el aceite que pueden formar complejos con las albúminas y globulinas<sup>17</sup>.

El contenido de aminoácidos en las diferentes fracciones del maíz se muestra en la tabla 1.4. La zeína, aporta cerca de la mitad del nitrógeno del grano pero nada de lisina y triptofano en su hidrólisis digestiva por lo que su valor biológico no es bueno. Como el valor nutricional puede ser relacionado directamente con el contenido de lisina del grano, se ha demostrado que el remplazo de zeína mejora este valor. Las otras proteínas contienen niveles satisfactorios de lisina.

Tabla 1.4 CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES (% mol) COMPARADOS CON LOS  
REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA FAO.

Aminoácido	Patrón FAO*	Proteínas(Endospermo)**	Zeína	Proteínas (germen)
Lisina	4.3	4.7	0.1	4.6
Treonina	3.9	4.9	3.0	4.4
Valina	4.2	7.1	3.6	6.6
Cisteína+ Metionina	3.0	4.5	1.9	3.2
Isoleucina	3.5	4.0	3.8	3.2
Leucina	6.2	9.0	18.7	7.7
Fenilalanina+tirosina	4.0	6.2	8.7	5.6
Triptofano	0.5	0.6	0	1.0
TOTAL	29.6	41.0	39.8	36.3

\* 1973, \*\* no zeínas: albúminas, globulinas y glutelinas.

fuelle: Stanley A.W. and Ramstad P.E. 1987.

El total de aminoácidos esenciales en zeína no significa alta calidad, ya que el exceso de leucina puede antagonizar la utilización de isoleucina. Las proteínas del embrión tienen un alto valor nutricional que las proteínas del endospermo, debido al mejor balance de aminoácidos esenciales. En cuanto a su clasificación, la heterogeneidad y tendencia a asociarse han limitado la determinación del peso molecular de las proteínas<sup>20</sup>.

### 1.3.2.1 Zeína.

Es la principal proteína del maíz clasificada como una prolamina y constituye cerca de la mitad de la proteína total. Las proteínas del endospermo son en su mayoría zeínas y los sitios de deposición de esta proteína son los cuerpos proteicos. El volumen promedio de estos cuerpos aumenta durante el desarrollo y su dimensión varía en diferentes regiones del endospermo, miden de 1.5-1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se encuentran dentro de membranas intactas que protegen a la proteína de digestión por proteinasas y parece que cambian en estructura cuando las proteínas solubles que cubren la superficie del cuerpo proteico son removidas.

La zeína es sintetizada por los ribosomas del retículo endoplásmico y es depositada en la membrana produciendo así un cuerpo proteico. La matriz proteica envuelve los gránulos de almidón y rodea a los cuerpos, que son más grandes y numerosos en el endospermo corneo que en el harinoso<sup>15,21</sup>.

La zeína pertenece a una familia de polipéptidos individuales que difieren en dimensiones, en proporción de aminoácidos cargados, en hidrofobicidad y en cantidad relativa. Es soluble en soluciones acuosas de alcohol (60-70%), los primeros 33 aminoácidos (60.6%) son hidrofóbicos (alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina y metionina), en contraste con las albúminas y globulinas, lo que la hace primariamente soluble en alcohol. Su pobre solubilidad en agua, es un obstáculo en la utilización de la proteína como un ingrediente alimentario<sup>22</sup>. La zeína presenta polimorfismo debido a la presencia de cantidades variables de fracciones de glutelina. Esto hace que haya diferencias en solubilidad de las zeínas en soluciones alcohólicas causando partición en varias fracciones, lo que ha hecho la nomenclatura compleja. Sin embargo, se sugirió un sistema de clasificación basada

en la estructura proteica mas que en su movilidad en electroforesis o solubilidad. Con este sistema de clasificación, las proteínas 19 y 22 Kd son las mas abundantes y se llaman zeínas alfa, las de 14 Kd son las zeínas beta, las de 16 y 27 Kd son zeínas gamma y las de 10 Kd son las delta.

En los estados iniciales del desarrollo del grano, las zeínas beta y gamma están distribuidas en cuerpos proteicos pequeños con poca o nada zeína alfa. En las etapas finales de maduración del cuerpo proteico, las zeínas alfa y delta llenan el núcleo del cuerpo, rodeado por una capa de zeínas beta y gamma. Esto sugiere que estas últimas son importantes en la organización de zeínas dentro de los cuerpos proteicos<sup>23</sup>.

La zeína alfa, tiene una cadena de 210 a 245 aminoácidos y un alto contenido en glutamina, valina, metionina, leucina y alanina. Tiene segmentos repetidos de aproximadamente 20 aminoácidos en la región central de la proteína, en conformación de alfa hélices, que interactúan por puentes de hidrógeno al doblar de la proteína en moléculas con forma de bastón. Comprenden el 35 % de la zeína total, son las más hidrofóbicas y contienen cantidades pequeñas de prolina y fenilalanina.

La zeína beta tiene 160 aminoácidos de largo, contiene menos glutamina (16%), leucina (10%), y prolina (9%) que la alfa, pero tiene mas aminoácidos sulfurados: metionina (7%) y cisteína (4%). Tiende a formar enlaces sulfhidrilo intermoleculares, pero aparentemente no forma agregados en los cuerpos proteicos. Cuentan con una alta concentración de glicina, histidina, arginina, metionina y tirosina al comparar con la zeína alfa. Es menos hidrofóbica que otras prolaminas, es extraída solo si un agente reductor esta presente.

La zeína gamma, es una proteína de 180 aminoácidos con alto contenido de cisteína (7%) y prolina (25%). El aumento en prolina hace que cambie la estructura y trae como consecuencia una serie de hexapéptidos repetidos en el amino terminal. Cuando hay 8 copias repetidas el peso es de 27 Kd, pero cuando solo hay tres copias, entonces el peso es de 16 Kd. Tiene una alta cantidad de metionina y glicina. Comprende el 5-10% de la zeína total y requiere un agente reductor para su extracción. Probablemente la zeína gamma está

involucrada en las interacciones disulfuro que influyen en la dureza del grano.

La zeína delta es una proteína pequeña de 130 aminoácidos, es rica en aminoácidos sulfurados, metionina (23%) y cisteína (4%). Constituye una fuente importante de almacenamiento de azufre para la semilla. También posee un alto contenido de histidina<sup>24</sup>.

En cuanto a su conformación, la zeína posee el 46 % de alfa hélice, 9% de beta-plegada y 45% de forma desordenada. Como la prolina no está distribuida uniformemente, se presentan segmentos largos de alfa hélice en las regiones libres de prolina y cortos en donde la prolina es mas abundante. Cuando los enlaces disulfuro de zeína se rompen por la adición de 2- mercaptoetanol, el contenido alfa hélice permanece constante. Por lo tanto, estos enlaces no son importantes para mantener la estructura alfa-hélice<sup>25</sup>.

### 13.2.2 Glutelinas.

En maíz, los precursores de glutelinas pueden estar en cuerpos proteicos tipo vacuolar o en el citoplasma donde interactúan en el desarrollo. Se cree proceden de ciertas globulinas y albúminas que fueron desnaturalizadas durante los estados finales de la maduración y forman enlaces disulfuro siendo así incorporadas dentro de las glutelinas. Durante la germinación, ocurre el fenómeno opuesto llamado disgregación de glutelinas en proteínas solubles en sal, que se lleva a cabo en el endospermo antes de la hidrólisis de todo el grupo proteico.

Las glutelinas representan del 30-35 % del total de proteínas; pueden ser disueltas en solución de detergentes conteniendo un agente reductor, de esta manera, las glutelinas son desdobladas y asociadas por interacciones hidrofóbicas así como a través de puentes disulfuro. Estas proteínas son parecidas a las zeínas, por su patrón electroforético similar y facilidad en extracción con alcohol y mercaptoetanol. Debido a esto, sus extractos contienen cantidades de zeína que no fueron extraídas con las prolaminas. De tal forma que presenta varias fracciones: G1 solubles en alcohol acuoso, G2 insolubles en alcohol y soluble en agua y G3 solubles en solución salina. Los enlaces disulfuro interpolipéptido hacen a la glutelina pobremente soluble, por lo que la extracción requiere reducción. La solubilidad de la fracción en solución de alcohol puede derivar de su alto contenido de prolina y aminoácidos hidrofóbicos, mientras que su concentración mayor de aminoácidos básicos combinado con

el bajo contenido de no polares puede explicar la solubilidad en agua de la otra fracción<sup>26,27</sup>. Las glutelinas son intermedias en composición de aminoácidos entre las zeínas, albúminas y globulinas, tienen 3 veces más cisteína que la zeína y contienen un alto contenido de histidina, metionina, arginina, prolina, glicina, valina y baja concentración de aspártico, alanina, tirosina, fenilalanina. En cuanto a su configuración, las glutelinas tienen el 22% de alfa hélice, 18% de beta-plegada y 60% de cadenas desordenadas. El contenido alto de prolina es consistente con la cantidad baja de alfa hélice comparado con zeína<sup>28</sup>.

### **1.3.2.3 Albúminas.**

Las albúminas son definidas como proteínas solubles en agua, y también como extraíbles en agua. Contienen alta lisina y arginina, tienen un peso molecular de 66 Kd y es una proteína monomérica. Una molécula de albúmina contiene 17 enlaces disulfuro y un tiol libre de un residuo cisteína. Puede ser extraída junto con proteínas solubles en sal.

### **1.3.2.4 Globulinas.**

Las globulinas están compuestas de menos fracciones que las albúminas y tienen un alto contenido de lisina, histidina, fenilalanina y arginina. Además, tienen otros componentes muchos de los cuales son enzimas. La globulina tiene un modelo universal con 6 pares de enlaces disulfuro combinados en una configuración bi-anular hexagonal que consta de dos fracciones de 127 Kd y mayor a 200. Las globulinas son las principales proteínas de almacenamiento del embrión. Durante los estados iniciales de germinación, esas proteínas pueden proveer los aminoácidos requeridos para la síntesis de nuevas enzimas. Participan en la hidrólisis de material de almacenamiento del endospermo y en la interconversión de compuestos que vienen del endospermo a la semilla en desarrollo<sup>13</sup>.

### **1.3.3 Lípidos.**

Los triglicéridos son los lípidos de almacenamiento predominantes en el grano.

Los fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, ácidos grasos libres, carotenoides (precursores de vitamina A), tocoferoles (vitamina E) y ceras son todos lípidos encontrados en el grano de maíz en menor cantidad.



La función de la fracción lipídica no es bien conocida pero es constituyente importante de membranas. Por ejemplo, los fosfolípidos, carotenoides y tocoferoles tienen propiedades antioxidantes. Estructuralmente, los lípidos se encuentran dentro de los esferosomas (gotas microscópicas de aceite), están rodeados de una capa membranosa de proteína-lípido-proteína con el lado lipofílico hacia dentro de la matriz lipídica, miden 1.09  $\mu\text{m}$  de diámetro y son más pequeños en el endospermo que en el germen<sup>34</sup>. Su distribución en el grano se presenta en la tabla 1.1.

En el germen, los triglicéridos constituyen el 85% de los lípidos totales, los fosfolípidos 3 %, los glicolípidos 2% y los lípidos insaponificables 4 %. Los triglicéridos más abundantes, en orden decreciente son: trilinoleína, oleoilidilinoína y palmitoilidilinoína.

En el endospermo, los lípidos están formando complejo con almidón y proteínas, sus ácidos grasos son más saturados que los del germen y contienen niveles altos de ácidos palmítico, esteárico y linoléico así como bajos niveles de oleico y linoleico. Los lípidos en esta estructura son divididos en lípidos de almidón (46g /100g de lípido total) y no amiláceos (54g/100g de lípido total).

Los lípidos no amiláceos están constituidos por cada 100g de: 48-55g de triglicéridos, 19g de ácidos grasos libres, 4g de fosfolípidos, 6g de glicolípidos y 10g de insaponificables.

Los lípidos amiláceos, son los que se encuentran dentro del gránulo y tienen alta proporción de ácidos grasos libres (51-62 g/100g de lípidos amiláceos) y bajos niveles de fosfolípidos (24-46 g/100g de lípidos amiláceos), que correlacionan positivamente con la cantidad de amilosa en el almidón. Los lípidos que forman complejo con amilosa se tratan, casi exclusivamente, de ácidos grasos libres, y su cadena queda dentro de la sección helicoidal. De esta forma son resistentes a la extracción por disolventes y autooxidación. La formación de complejos entre la amilosa y lípidos se favorece por la humedad que causa que los gránulos de almidón se hinchen. En un gránulo seco, se forman espacios intermoleculares que disminuyen este contacto. Los lípidos de almidón también modifican la gelatinización.

Dentro de los lípidos no saponificables tenemos a los carotenoides (siempre y cuando no estén esterificados) que representan un grupo de isoprenoides. Son hidrocarburos y se cree que son los precursores biosintéticos de derivados oxigenados como las xantófilas. La distribución en el grano es de 74-86% (g de carotenoide/100g de lípidos no saponificables)

en el endospermo corneo, 9-23% en el harinoso, 2-4% en el germen y 1% en salvado. Debido a su estructura isoprenoide (sistema alternante de dobles ligaduras), los carotenos son muy sensibles al oxígeno, luz, calor y ácidos, por esto durante el almacenamiento pierden parte de su actividad, lo mismo sucede con los pigmentos xantófilos (luteína y zeaxantina).

El gamma tocoferol es el tocol predominante en granos. Los tocotrienoles se encuentran solo en el endospermo, mientras que el germen contiene la mayor proporción de los tocoferoles.

Las enzimas que degradan lípidos, están presentes en cereales pero parecen ser menos activas que en los estados de germinación de la semilla. Por ejemplo, la lipasa del escutelo está presente en los cuerpos lipídicos de semillas germinadas, pero no en las no germinadas. La enzima es activa solo sobre triglicéridos que contienen ácidos linoleico u oleico, los ácidos grasos dominantes en el aceite de maíz. La lipoxigenasa cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados produciendo hidroperóxidos de ácidos grasos, que son muy reactivos y potencialmente dañinos para los componentes celulares<sup>13</sup>. Como se puede ver la humedad puede activar el metabolismo de la semilla por esto se tiene cuidado en su control junto con otros factores para la conservación del grano durante su almacenamiento.

#### **1.4 Almacenamiento del maíz.**

El almacenamiento y conservación de granos y semillas lo realizan en el país cuatro sectores: a) el sector oficial, a través de Bodegas Rurales CONASUPO y Almacenes Nacionales de Depósito (ANDSA), que manejan los granos para el consumo humano y animal, b) la Productora Nacional de Semillas, c) los comerciantes y por último, d) el sector rural, formado por los campesinos<sup>2</sup>.

##### **1.4.1 Sistemas de almacenamiento.**

El almacenamiento de los granos es muy variado y depende de los recursos disponibles en la región. El mas sencillo es apilar el grano sobre el suelo. Esta forma de almacenamiento no deteriora la calidad del grano a corto plazo. Sin embargo, el grano absorbe humedad del terreno y la lluvia, y está sujeto al ataque de roedores, pájaros y al viento.

El sistema de almacenamiento más antiguo consiste en guardar el grano bajo tierra. Las ventajas que ofrece este sistema es la protección del grano de las fluctuaciones de temperatura durante el día y la estación, disminuye la proliferación de insectos y hongos por la poca disponibilidad de oxígeno y elevado contenido de bióxido de carbono. Pero ciertos microorganismos aerobios, como las levaduras, pueden producir fermentaciones.

El almacenamiento en sacos es menos rudimentario y muy recurrido. El grano ensacado se puede conservar en casi cualquier albergue que lo proteja de las inclemencias del tiempo y de los predadores.

El almacenamiento a granel en depósitos o almacenes es el sistema más generalizado. Los almacenes comprenden una variedad de bodegas y silos. En general son de capacidad variable, de distintas formas y algunas son completamente mecanizadas. Su capacidad fluctúa entre 1000 a 5000 ton. Sin embargo, existe un déficit a nivel nacional que obliga al almacenamiento a la intemperie<sup>3</sup>.

#### **1.4.2 Período de almacenamiento.**

Es un factor muy importante que tiene que considerarse en la conservación de productos agrícolas. Al inicio y durante el periodo de almacenamiento debe conocerse la condición de los granos y semillas, por lo que hay que determinar en forma precisa sus características físicas y biológicas, tales como el contenido de humedad, la temperatura, las impurezas, los porcentajes de germinación y de semillas invadidas por hongos de almacén. La información que se deriva de las pruebas de laboratorio de control de calidad permitirá tomar medidas para evitar el deterioro del grano, tales como el rechazo del grano o semilla al momento de su arribo al almacén, el secado, aireación y beneficio de la materia prima, su traslado a otra región más favorable, el uso inmediato del grano, el uso de fumigantes para el combate de insectos, etc<sup>2</sup>.

#### **1.4.3 Factores de control durante el almacenamiento.**

Se pueden citar dos factores: físicos y biológicos. Dentro de los factores físicos se encuentran la humedad, temperatura y aireación del grano. Los factores biológicos se refieren a insectos, aves, roedores y microorganismos.

### 1.4.3.1 Humedad.

La humedad es el factor más importante que influye en la proporción o velocidad de deterioro. La práctica común es que el grano sea recibido con niveles de humedad cerca o muy por encima de los niveles críticos. Sin embargo, el deterioro se puede presentar en el grano que se encuentra dentro de los límites de humedad considerados como seguros, debido a marcadas diferencias de humedad en el espacio de almacenamiento.

Siendo un material higroscópico, el grano de maíz pierde o gana humedad dependiendo de la presión de vapor en el ambiente que lo rodea. La humedad relativa del aire intersticial en el grano almacenado tiende a permanecer en equilibrio con la humedad del grano. A cualquier nivel de humedad relativa la cantidad de vapor de agua por unidad de volumen de aire aumenta con el incremento de temperatura y como el aire se encuentra en movimiento constante como resultado de difusión ó convección, la humedad es transportada de las regiones más calientes a las más frías del grano para mantener el equilibrio.

Se conoce que para almacenamiento por largo tiempo una humedad relativa de 65% se considera segura. Además, el crecimiento bacteriano es inhibido debido a que la humedad relativa requerida por los microorganismos excede del 90%. Generalmente se acepta que el nivel máximo de contenido de humedad en el grano para un almacenamiento fiable sea del 13%. En la fig. 2 se muestran las isotermas de equilibrio de humedad del maíz, que está basada en la ecuación de Chung<sup>13</sup>.

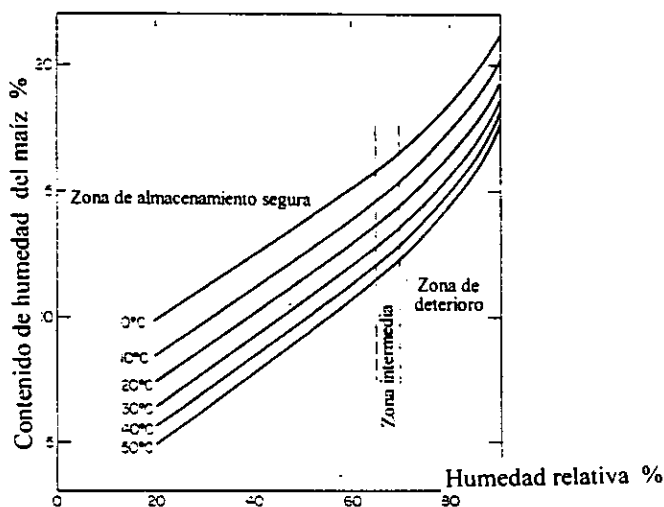


Figura 2. Isoterma de humedad para maíz, mostrando zonas de estabilidad durante el almacenamiento.

En áreas secas, donde la humedad relativa es baja, el secado de granos y semillas después de la cosecha asegura en gran medida la preservación de su calidad. En cambio, en áreas húmedas secar los granos y semillas no es suficiente, ya que éstos adquieren del ambiente suficiente humedad para activar los procesos metabólicos de las semillas con un consiguiente deterioro fisiológico que se traduce en bajo vigor ó pérdida del poder germinativo<sup>30</sup>.

#### *1.4.3.2 Temperatura.*

Existen dos temperaturas a considerar, la del grano y la del aire. El aire caliente retiene más humedad que el aire frío en la saturación. Si se incrementa la temperatura, la respiración del grano se acelera hasta niveles en que ésta se ve afectada por factores como inactivación térmica de las enzimas, agotamiento del sustrato (incluido el oxígeno) y acumulación de inhibidores como el bióxido de carbono.

El efecto de la temperatura en la velocidad de respiración depende del contenido de humedad de las semillas, así como de la presencia de hongos e insectos. La temperatura de almacenamiento puede manejarse para combatir plagas de almacén; ya que los insectos producen humedad y calor al consumir el grano, a medida que los contenidos de humedad sean más altos, es necesario bajar la temperatura. Los insectos no invernán y mueren a temperaturas menores a los 5°C. Sin embargo, el uso de temperaturas bajas representa altos costos de energía e instalaciones, lo cual en la mayoría de los casos hace incosteable su empleo.

#### *1.4.3.3 Aireación.*

La aireación es el único método práctico de controlar la migración de humedad durante almacenamientos prolongados; equilibra la temperatura lentamente entre el centro y el exterior del silo. La acumulación de humedad puede ser eliminada por un sistema de vacío que saca el aire caliente sin pasar a través de capas de grano frío. Deben de ser operados intermitentemente ya que solo puede eliminarse de 0.25 -0.5 % de humedad del silo. Debido a que la respiración aeróbica del grano y de los microorganismos asociados con el grano involucran consumo de oxígeno y liberación de bióxido de carbono, el proceso tiende a limitar el aporte de oxígeno.

#### 1.4.3.4 Factores biológicos.

Entre las causas de las pérdidas cuantitativas y cualitativas que sufren los granos y las semillas en los almacenes, se encuentran los insectos, roedores, pájaros y hongos. En el caso de los insectos y de los hongos, el principal factor que favorece su desarrollo es la humedad y en segundo término la temperatura.

En algunas zonas agrícolas, los granos se cosechan con alto contenido de humedad y quedan expuestos al ataque de insectos y hongos del almacén. Por ejemplo, el grano quebrado es más susceptible a la acción destructiva de estas plagas<sup>1</sup>. Los hongos de almacén pertenecen principalmente a especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, cuya característica principal es su capacidad para crecer en granos con bajo contenido de humedad en equilibrio con humedades relativas de alrededor del 70%. Aun más, algunas especies son capaces de producir aflatoxinas.

Los roedores son las plagas más dañinas destruyendo miles de toneladas de granos al año mundialmente. Su acción se evita con dispositivos anti-roedores y buenas medidas sanitarias<sup>2</sup>.

#### 1.4.4. Cambios nutritivos en el almacenamiento.

Un buen grano para alimento es caracterizado por su alta digestibilidad y valor biológico de la proteína, por la ausencia de sustancias tóxicas (micotoxinas, pesticidas, etc.), por la presencia de lípidos que no han sido hidrolizados u oxidados apreciablemente y por cambios menores en vitaminas hidrosolubles y liposolubles (especialmente tocoferol).

Los cambios nutritivos han sido pobremente definidos porque es difícil demostrar los efectos en la alimentación, de productos almacenados y deteriorados. Sin embargo, en pruebas de alimentación de cuyos con estos granos, se ha presentado malestar digestivo, dermatitis y distrofia muscular. En cereales con hongos, se ha visto que se puede retardar el crecimiento de pollos, tal vez por efecto de la presencia de compuestos tóxicos en el alimento.

En cuanto a cambios minerales, se sabe que la disponibilidad de fósforo es nutricionalmente importante para humanos y animales. Como se mencionó anteriormente, mucho del fósforo

en el grano esta en forma de fitina (hormona vegetal), de tal manera, que no es bien utilizado en los animales y mucho de él es excretado sin cambio por los humanos. Durante el almacenamiento, la fitasa actúa sobre la fitina, resultando en la liberación de compuestos de fósforo fácilmente asimilables<sup>17</sup>.

Con temperaturas de almacenamiento de 50 a 60°C se puede reducir la capacidad de hinchado de almidones y aumentar la degradación a través de la formación de dextrinas de bajo peso molecular. Además, se puede presentar el fenómeno conocido como “grano enfermo” que se manifiesta porque los granos tienen apariencia dura y los gérmenes están muertos y exhiben varios grados de oscurecimiento. Estos granos son muy susceptibles al crecimiento de hongos y sus proteínas disminuyen en solubilidad y en digestibilidad. En estudios, con ratas alimentadas con este grano, el maíz decreció en palatabilidad y en valor nutritivo, características que se agravaron conforme aumentó el periodo de almacenamiento.

La pérdida de vitaminas puede ocurrir durante el almacenamiento. Los cereales son buena fuente de tiamina, niacina, piridoxina, inositol, biotina, vitamina E y pequeñas cantidades de ácido pantoténico. Se cree que las vitaminas, con excepción de este último, son muy estables y no son fácilmente destruidas en el grano bajo condiciones normales de almacenamiento. Sin embargo, se ha demostrado que la tiamina puede disminuir con contenidos de humedad por encima del 10 % y que la riboflavina así como piridoxina son sensibles a la luz y pueden ser inestables en productos molidos. La vitamina A es de importancia en alimentos para animales y en la nutrición humana. En maíz amarillo, su actividad es debida a los beta carotenos, criptoxantina y neocriptoxantina y en menor grado al alfa y kapa caroteno. Esas sustancias son “provitaminas” y son convertidas, en grado variable, en vitamina A en el cuerpo. Una disminución considerable de esta vitamina puede ocurrir en maíz amarillo durante el almacenamiento, ya que se ha demostrado que este grano puede sufrir un decremento en carotenoides.

La pérdida de tocoferoles es acelerada en grano almacenado bajo condiciones adversas. Su ausencia se correlaciona con disminución en ácidos grasos insaturados (linoleico y linolénico), y por la presencia de peróxidos, cambios que se agravan por infestación con insectos<sup>4,32,33</sup>.

#### 1.4.4.1 Deterioro por efectos químicos.

Los granos contienen antioxidantes y las grasas del grano sin romper están parcialmente protegidas contra efectos del oxígeno en el aire. Debido a esto, el desarrollo de rancidez oxidativa intensa es raro en almacenamiento. Por otra parte, las grasas, son rápidamente hidrolizadas por lipasas produciendo ácidos grasos y glicerol durante almacenamiento, particularmente cuando la temperatura y humedad son altas, favoreciendo el deterioro general. Este tipo de cambios es acelerado por la actividad lipolítica de los hongos. Por esta razón, la prueba de acidez ha sido propuesta como un índice de deterioro del grano<sup>34,35</sup>.

En productos dañados, el orden biológico es destruido y los cambios que ocurren durante almacenamiento dependen de factores externos. Un aumento en la capacidad de absorción de agua y reactividad facilita e intensifica el daño por las otras fuentes, como oxígeno, luz, y alta humedad relativa. Es por esto que la retención de propiedades deseables es más difícil que en el grano sano. El aumento en humedad provoca la activación de enzimas en los granos, característica de las etapas iniciales de germinación; por ejemplo, la descarboxilasa y la transaminasa del ácido glutámico-alanina son activadas en las etapas iniciales de imbibición de agua. Los niveles de humedad de 15 a 18% en el grano activan ambos sistemas enzimáticos<sup>30</sup>.

#### 1.4.4.2 Deterioro por efectos biológicos.

Los cambios que originan estos factores en los granos afectan al sabor y olor. Poco se ha publicado acerca de los efectos sobre infestación de insectos, entre los que se citan, pérdida de peso y de germinación en el grano. También el aumento del ácido úrico se utiliza como índice confiable de infestación. Algunos cambios que acompañan a la infestación son una disminución en el contenido proteico, solubilidad proteica, así como de tiamina y riboflavina<sup>18</sup>.

Los microorganismos generan un olor característico del grano almacenado deteriorado debido a la producción de ácidos grasos volátiles (isobutírico y valérico). Algunos producen micotoxinas provocando que los granos no sean aptos para consumo y en algunos casos para su industrialización<sup>36</sup>.

En este estudio este deterioro por efectos biológicos fue prevenido al utilizar un fungicida,



de forma que los únicos cambios que se vieran fueran de origen químico. La manera de evaluar estos cambios es a través de pruebas fisicoquímicas, pero la información que brindan se ve limitada a reacciones químicas sin aportar información acerca de cambios moleculares. Además, ellas requieren de ciertas condiciones de las especies a probar como cantidad, solubilidad, aislamiento e integridad estructural entre otras. Dentro de estas pruebas podemos citar acidez, índice de peróxidos, determinación de nitrógeno soluble, electroforesis, las diferentes cromatografías, difracción óptica etc.

Por otra parte, la solubilidad ha sido tomada como indicador de integridad conformacional proteica ya que refleja versatilidad y buen potencial de uso en alimentos, pero puede haber cambios en la conformación que no pueden ser detectados midiendo la solubilidad. Para evaluar estas características, el análisis térmico por conducto de la técnica de DSC es útil para alimentos en donde las proteínas pueden ser analizadas sin solubilizarlas previamente. Esto permite el análisis directo de macromoléculas en el estado sólido, semisólido o mezclas sin purificar<sup>43,45</sup>. En el caso del almidón, la temperatura de gelatinización puede ser investigada por pérdida de birrefringencia, pero la DSC tiene la ventaja que en adición a la temperatura puede ser obtenida la entalpia de gelatinización. Esta prueba también se ejecuta con poca muestra.

### 1.5 Análisis térmico

El análisis térmico es una valiosa herramienta para probar la extensión, rango y secuencia de eventos térmicos en sistemas puros y complejos. Estos han permitido establecer los mecanismos fisicoquímicos de transiciones de fase, conducta conformacional, interacciones con otros constituyentes, degradación pirolítica y alteraciones composicionales. La información analítica puede ser cualitativa (por ejemplo, identificación y caracterización de una sustancia en su huella térmica y cooperatividad de una transición) o de naturaleza cuantitativa (como transición de calor, parámetros termocinéticos etc.)<sup>37</sup>.

En 1969, el comité de nomenclatura de la Confederación Internacional de Análisis Térmico (CIAT) definió como análisis térmico a un grupo de técnicas instrumentales en el que una propiedad física de una sustancia es medida como una función de la temperatura después de

que la sustancia es sujeta a un programa de temperatura controlada. Existen varias técnicas disponibles y entre las más utilizadas podemos citar el análisis térmico diferencial (DTA), análisis termogravimétrico (TGA), análisis termomecánico (TMA), análisis térmico tensiométrico (TTA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y reducción a temperatura programada. Debe resaltarse que en la mayor parte de los casos la utilización de una técnica de análisis térmico puede no proporcionar la información suficiente sobre un sistema dado. Al igual que otros métodos analíticos puede ser necesaria información complementaria proporcionada por otras técnicas, termoanalíticas o no.

### **1.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido.**

El fundamento de esta técnica está en registrar el flujo calórico de una sustancia, cuando ésta es sometida a un régimen de calentamiento determinado. Dicho flujo puede ser hacia o desde la muestra, o sea endotérmico o exotérmico. Con este instrumental obtenemos los llamados "termogramas" los cuales son el registro de calentamiento de una muestra en un intervalo de temperatura a una velocidad constante, de tal manera que el incremento de la temperatura resulte lineal con el tiempo. Las llamadas curvas de DSC pueden presentarse en formas variadas en función de los factores que la afecten o de los cambios que se involucren en el proceso de calentamiento. En estas curvas, el área de los picos será proporcional a la masa de la muestra y las transiciones indican la presencia de uno o más componentes sensibles al calentamiento.

El análisis por DSC puede verse afectado por varios factores como son: los instrumentales (geometría del portamuestras, atmósfera del horno, material del crisol) y los relacionados con las características de la muestra (tamaño de partícula, grado de empaquetamiento, masa de la muestra, conductividad térmica, capacidad calorífica etc.)<sup>38</sup>.

### **1.5.2 Características térmicas medidas por DSC.**

Uno de los parámetros más obvio es la temperatura a la que la transición ocurre. En el caso de proteínas, es llamada temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) y en el de almidones se conoce como temperatura de gelatinización ( $T_g$ ). Según la figura 3 corresponde al pico

máximo de temperatura y representa una medida relacionada con la estabilidad térmica\* de las sustancias.

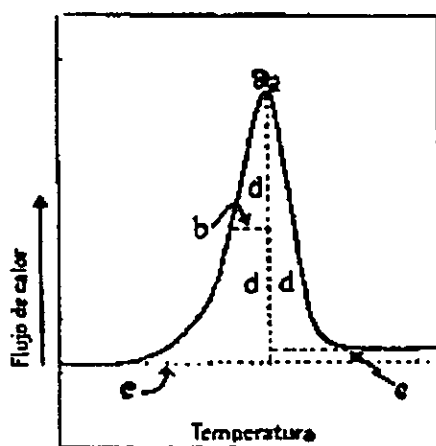


Fig. 3 Termograma de DSC típico que muestra: (a) temperatura máxima del pico, (b) temperatura media, (c) cambio en la capacidad de calor, (d) cambio entálpico (abarca toda el área bajo la curva), (e) línea base.

El análisis de la  $T_d$  en proteínas puede proporcionar evidencia de los cambios en la estructura intrínseca, carácter predominante de enlace o interacción. Por ejemplo, el pH extremo tiene un efecto desnaturalizante responsable de cambios conformacionales por un predominio de cargas iónicas que provocan un descenso en la  $T_d$ , o simplemente refleja un cambio en la estabilidad térmica por solutos añadidos sobre interacciones proteína-agua

\* según se define en el punto 3.2.1

(como azúcares y algunas sales) o el efecto de enlaces directos soluto-proteína (por ejemplo con detergentes aniónicos, metales y otras proteínas).

El valor de  $T_d$  en esas situaciones es la clave para optimizar las condiciones del proceso térmico y potencialmente para utilizar efectivamente las proteínas constituyentes. Este parámetro es influenciado por la velocidad de calentamiento y concentración de la molécula, pero en el caso de sobreposición de transiciones, es la única temperatura accesible.

El cambio entálpico denotado por  $\Delta H$  (figura 3), es el resultado de reacciones endotérmicas y exotérmicas, fundamentalmente gobernadas por el rompimiento de puentes de hidrógeno intramolecular, y en menor medida, formación de estos puentes que implican agregación y la ruptura de interacciones hidrofóbicas. El  $\Delta H$  representa un parámetro que evalúa el grado de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) o gelatinización ( $\Delta H_g$ ) como se definen más adelante, en estos procesos se involucran mayormente el rompimiento de puentes de hidrógeno dando lugar a la absorción de calor y por lo tanto son regidos por eventos endotérmicos. De esta forma, el valor de entalpia calculada a partir del área bajo el pico de transición, brinda un estimado de la energía térmica requerida para desnaturalizar la molécula. Por ejemplo, las proteínas que contienen enlaces disulfuro tienen más alto  $T_d$  y  $\Delta H_d$  que las proteínas sin enlaces de este tipo.

En los alimentos donde está presente una mezcla de proteínas, es posible obtener datos semicuantitativos de la cantidad de cada proteína por comparación de las áreas de transición cuando estas no coinciden. Sin embargo, los valores de entalpia en éstos sistemas representa un valor compuesto que refleja contribuciones de la proteína nativa, el medio que la rodea, asociación de las proteínas y compuestos no proteicos en el sistema. Por lo tanto, la entalpia es un valor compuesto que involucra entre otros, la conformación y el grado de asociación de la proteína como resultado del proceso u otro evento. Debido a la naturaleza composicional del  $\Delta H$ , los cambios pueden no necesariamente reflejar modificación en la conformación de la molécula<sup>39,40</sup>.

La entalpia de gelatinización también debe ser interpretada con precaución, debido a que representa cantidades termodinámicas netas de diferentes eventos como hinchamiento del gránulo y fusión cristalina (endotérmico), e hidratación y recristalización (exotérmico). La  $T_g$  y  $\Delta H_g$ , son influidas por el rango de calentamiento, contenido de humedad y lípidos

granulares<sup>41</sup>.

Cuando se establece un número específico de condiciones, los parámetros térmicos (cambio entálpico y temperatura máxima) pueden utilizarse como índice de homología<sup>42</sup>.

Otro parámetro es la  $T^{1/2}$  (figura 3), la cual es medida como la anchura a la mitad de la altura del pico de transición y está relacionada con su agudeza (debido a que adquiere un valor pequeño cuando el pico de transición es alto y delgado). También se conoce como un índice de la naturaleza cooperativa de la transición del estado nativo al desnaturalizado. Este parámetro puede ser usado como una medida para valorar la complejidad del proceso bajo investigación.

La presencia de otros picos, evidenciados en el perfil de la transición, hacen la interpretación de la temperatura máxima y  $\Delta H$  difícil. En estas circunstancias puede ser de mayor importancia el valor de  $T^{1/2}$  aunque su significado no es todavía claro su valor puede indicar disociación o rompimiento de la estructura cooperativa<sup>43</sup>.

### **1.5.3 Aplicaciones de DSC en alimentos.**

De las técnicas disponibles de análisis térmico, la DSC es muy utilizada en el estudio de transformaciones térmicas de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Puede ser utilizada para detectar transiciones de primer orden (fusión) y de segundo orden (transición cristalina). En alimentos, las transiciones de primer orden están principalmente relacionadas a desnaturalización proteica, gelatinización de almidón y fusión cristalina de grasas. La transición cristalina es una característica de las sustancias amorfas, y en alimentos, los gránulos de almidón y los productos congelados exhiben transiciones cristalinas. Cuando los compuestos son calentados en el estado sólido y/o un medio ambiente acuoso, experimentan una serie de transiciones físicas y químicas interrelacionadas que se manifiestan por cambios en sus propiedades como: capacidad de calor, entalpia, peso, volumen y cristalinidad. Los métodos de análisis térmico pueden monitorear esas propiedades<sup>44</sup>.

#### **1.5.3.1 Aplicación en proteínas.**

Las técnicas de DSC en el estudio de desnaturalización térmica relacionado a las proteínas, han empleado ribonucleasa, quimotripsinógeno, B-caseína bovina, lisosima y proteínas

globulares en general. Los cambios en la estabilidad al calor de proteínas de la carne han sido probados utilizando DSC. Muchos de los estudios de DSC han sido aplicados a proteínas vegetales como las de soya, chícharo y girasol entre otras<sup>41</sup>.

En general, la aplicación se divide en dos categorías: 1) estudios básicos donde principalmente se trabaja con proteínas aisladas o sistemas modelo y 2) aplicaciones prácticas para obtener más información sobre un número de diferentes aspectos de conducta de proteínas directamente relacionados a la calidad de alimentos o procesos. Por ejemplo, control de calidad de ingredientes, estudios de interacciones entre ingredientes, comprender los principales fundamentos de la operación del proceso.

Los estudios son ejecutados bajo parámetros que se aproximan a las condiciones o medio ambiente del producto o proceso. La DSC puede monitorear indirectamente los efectos de otras operaciones como congelado, secado y mezclado, siguiendo los cambios resultantes en la conducta térmica de la proteína.

#### **1.5.3.1.1 Desnaturalización térmica.**

Para fines de este estudio, se entiende por desnaturalización proteica cualquier modificación de la conformación (secundaria, terciaria o cuaternaria) que no vaya acompañada de la ruptura de enlaces peptídicos, implicados en la estructura primaria. Los cambios inducidos en proteínas de alimentos por tratamientos térmicos a menudo producen desnaturalización, el cual es un fenómeno complejo en el que aparece una nueva configuración o cambio parcial, a veces efímera. Un aumento en el grado de estructuración con respecto a la estructura nativa debe considerarse también como una forma de desnaturalización<sup>46</sup>.

La desnaturalización térmica es un fenómeno cooperativo, es decir, la estructura de la proteína se disocia en forma secuencial hasta llegar a un total desdoblamiento, esto puede ser detectado como un pico endotérmico en DSC. En sistemas de alimentos, la desnaturalización es normalmente irreversible debido a la agregación posterior de las moléculas desdobladas.

Las proteínas globulares, por ejemplo, esencialmente toman una conformación simple en su estado nativo; cuando se aumenta la temperatura hay un rompimiento de interacciones, las cadenas se abren y una vez abiertas se asocian entre sí debido generalmente a las

interacciones hidrofóbicas dependientes de la temperatura<sup>47</sup>. Puede estar presente el estado "molten globule" que se conoce como conformación intermedia parcialmente doblada entre las formas nativa y totalmente desnaturalizada. Es caracterizada por una reunión no específica de segmentos de estructura secundaria lograda por interacciones hidrofóbicas que dan lugar a racimos que son expuestos al medio ambiente acuoso. Por otra parte, los aminoácidos residuales hidrofílicos también son expuestos. Esto le confiere una naturaleza anfifílica a este estado<sup>48,49</sup>.

Los efectos de la desnaturalización proteica son múltiples; merecen especial atención los siguientes: el descenso de la solubilidad, modificación de la capacidad de fijación de agua, pérdida de la actividad biológica, incremento de la susceptibilidad al ataque por las proteasas, incremento de la viscosidad intrínseca e incapacidad de cristalizar.

Por otra parte, la susceptibilidad de las proteínas a la desnaturalización por el calor depende de numerosos factores como la naturaleza de la proteína, concentración de la misma,  $A_w$ , pH, fuerza iónica y la naturaleza de los iones presentes<sup>50</sup>.

#### 1.5.3.1.2 Interacciones proteicas.

La estructura de una proteína es dependiente de un balance entre interacciones proteína-proteína y proteína-solvente; cualquier factor que influya en ellos, puede alterar la estabilidad inherente de la molécula. De importancia particular son la composición del solvente (pH y fuerza iónica) y los perturbantes de estructura (estabilizadores y desnaturalizantes)<sup>50</sup>.

##### *Interacciones proteína-proteína.*

Las interacciones intramoleculares proteína-proteína de tipo específico, responsables de la integridad estructural de una molécula y la forma intermolecular no específica, están involucradas en la conformación y/o agregación de las proteínas. El efecto de interacciones proteicas puede manifestarse en una variedad de caminos, como cambios en la  $T_d$ , dimensión o forma de la transición o la velocidad o proporción de desnaturalización<sup>40</sup>.

La DSC puede ser utilizada para estudiar interacciones entre dos diferentes proteínas. De tal manera que se puede tener un incremento en la  $T_d$  por la formación del complejo y se

produce una gran estabilización al calor debido a que la entalpia de desnaturalización del complejo formado es igual a la suma de las entalpias de sus componentes. Sin embargo, hay excepciones a esto como asociaciones específicas proteína-proteína que pueden alterar la conducta térmica de una o ambas de las proteínas en cuestión. Por ejemplo, el aumento en la estabilidad del complejo avidina-biotina incluye un cambio entalpico asociado con las dos moléculas así como una modificación en la amplitud de desnaturalización de avidina. Es importante mencionar que las interacciones proteína-proteína no siempre pueden promover estabilidad térmica, ya que todo depende de la naturaleza de las proteínas y de la proporción entre ambas.

#### *Interacciones proteína-agua.*

El papel del agua es central en la desnaturalización de proteínas. El balance entre fuerzas proteína-proteína y proteína-solvente determina la estabilidad. La proteína en sí misma influye en la estructura y propiedades del agua que la rodea .

A bajo contenido de agua, donde está presente únicamente agua de hidratación primaria enlazada directamente a la proteína, la  $T_d$  y  $\Delta H_d$  son dependientes de la concentración. Además, se corre el riesgo de que el agua no se distribuya uniformemente en la muestra, y por lo tanto, restringe la cantidad de proteína que experimenta desnaturalización térmica.

A medida que el contenido de agua aumenta, la  $\Delta H_d$  se incrementa, mientras que ambos  $T_d$  y  $T^{1/2}$  bajan casi exponencialmente. Este aumento refleja mayor número de puentes de hidrógeno entre solvente y soluto y ocasiona una disminución en la cooperatividad global del proceso de desnaturalización. Cuando los cambios conformacionales ocurren, el agua de hidratación secundaria (estructurada por la proteína) es la que se afecta en primer término<sup>14</sup>.

#### *Interacciones de proteínas con polisacáridos e hidratos de carbono.*

La interacción proteína-polisacárido es importante en las propiedades de textura de alimentos. Entre proteína-polisacárido aniónico puede haber una interacción electrostática débil causando una mínima desestabilización de la proteína y por lo tanto el  $\Delta H_d$  disminuye. En contraste al efecto polisacárido, la presencia de azúcares estabiliza los constituyentes proteicos, debido a la influencia sobre la estructura del agua en la vecindad de la proteína, y



consecuentemente modifican las interacciones hidrofóbicas. Hay poca información al respecto, sin embargo, más adelante se hacen algunos comentarios.

#### *Interacciones proteína- lípidos*

El enlace de ácidos grasos a albúmina aumenta la estabilidad térmica de la proteína, limitando su uso como proteína coagulable con calor. Los fosfolípidos se podrían asociar a las globulinas pues tienen fuerte afinidad para lípidos polares. Pueden ocurrir cambios en la solubilidad de las proteínas causados por desengrasado de la harina<sup>51,52</sup>.

#### **1.5.3.1.3 Efecto del ambiente en la conducta térmica de las proteínas.**

##### *pH.*

Las características térmicas de las proteínas están grandemente influidas por el pH. Las condiciones extremas ácidas o alcalinas causan alteración de la conformación proteica. En general,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  son menores a pH extremos por debilitamiento de la estructura, debido a un cambio dramático en el equilibrio de cargas. El  $\Delta H$  es bajo posiblemente debido a un incremento en la estabilidad de las interacciones hidrofóbicas que tienen una contribución exotérmica al  $\Delta H$ , lo que resalta la importancia de su control.

##### *Sales.*

La adición de cloruro de sodio a proteínas incrementa la  $T_d$  indicando estabilización. Esto se atribuye al aumento en la contribución de interacciones hidrofóbicas a la estabilización de la conformación nativa, probablemente, por modificación de la estructura del agua. Sin embargo, el grado en que la estructura del agua es afectada, depende de la naturaleza de los cationes o aniones. Por ejemplo, los iones  $Ca^{2+}$  y  $SCN^-$  organizan mejor a las moléculas de agua de tal forma que tienen mayor influencia en la disminución del agua de hidratación de la proteína y pueden debilitar las interacciones hidrofóbicas intramoleculares. Este efecto aumenta la tendencia de desdoblaje bajando así la  $T_d$  y  $\Delta H_d$ .

Aunque esos componentes pueden representar un bajo porcentaje del peso del producto total, su impacto sobre las proteínas y funcionalidad puede ser considerable<sup>38,53</sup>.

### *Azúcares y polioles (glicerol, sorbitol).*

Estos compuestos estabilizan las proteínas contra desnaturalización por calor. La magnitud del efecto depende de la proteína y el poliol o azúcar y su influencia es muy probablemente la estructura del agua vecinal de la proteína.

### *Alcoholes monohídricos.*

Los alcoholes perturban la estructura del agua y promueven la desestabilización de proteínas por debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares.

El 2-mercaptoetanol actúa como un alcohol monohídrico que desestabiliza las proteínas ya que rompe la capa de hidratación asociada a la proteína y actúa sobre la región hidrofóbica principalmente por reducción de los grupos -S-S- de la proteína.

El tratamiento con solventes como el hexano, no afecta la  $T_d$  o  $\Delta H$ .

Los alcoholes con cadena alquilo corta no afectan la  $T_d$  pero disminuyen la  $\Delta H_d$  probablemente por su facilidad de penetración en la molécula de proteína<sup>39,54</sup>.

### *Agentes modificantes de estructura proteica.*

Algunos agentes químicos modifican la conformación proteica ya que influyen sobre la conducta térmica de las proteínas. Entre ellos tenemos: el etilenglicol que disminuye la constante dieléctrica del medio e interacciona con los sitios no polares de la cadena debilitando las interacciones hidrofóbicas con disminución de la estabilidad proteica y de la  $T_d$ .

La urea, destruye la estructura de enlace con hidrógenos del agua y facilita el desdoblamiento proteico por debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas, esto provoca incremento del contacto del agua con los residuos no polares, causando pérdida de la estructura proteica y estabilidad al calor.

Los detergentes aniónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS) disminuyen la entalpia o la  $T_d$  ya que a concentraciones altas puede causar repulsión de cargas entre cadenas polipeptídicas conduciendo al desdoblamiento molecular. Mientras que a bajas concentraciones estabiliza a las proteínas aumentando la  $T_d$ .

Existen algunos compuestos para modificar la carga, entre los que se encuentran el anhídrido

succínico o málico que reaccionan con residuos de lisina o carboximida. Debido a limitaciones en el uso de proteínas químicamente modificadas en alimentos, el uso de análisis térmico en valorar la modificación proteica es restringido<sup>44</sup>.

### **1.5.3.2 Aplicación en el almidón.**

La DSC ha sido ampliamente utilizada en estudios térmicos de almidón. Esta técnica detecta transiciones de materiales poliméricos y proporciona datos valiosos sobre fenómenos de orden-desorden de almidones granulares.

Los primeros estudios fueron sobre cambios macromoleculares de amilosa y amilopectina en cereal modificado y nativo, así como almidones de tubérculos. Por otra parte, se han hecho estudios para definir la interacción con otros componentes como SDS-almidón, sacarosa-almidón en trigo. Se ha investigado el efecto de humedad y contenido de NaCl sobre transiciones de fase de diferentes almidones granulares, estudios de gelatinización, retrogradación y conducta de genotipos del almidón entre otros<sup>55,56,57</sup>.

Dentro de las propiedades físicas importantes del almidón se incluyen; los requerimientos térmicos para gelatinización, la viscosidad generada, estabilidad de gránulos gelatinizados y susceptibilidad del almidón gelatinizado a retrogradación. Entre éstos se encuentra que la gelatinización es un fenómeno importante que ocurre en varias operaciones de proceso de alimentos. Por ejemplo, en cocción de pan, pasteles, extrusión de productos en base a cereales, espesado etc<sup>58</sup>. El uso de DSC ha permitido probar térmicamente la estructura del gránulo de almidón revelando su naturaleza biopolimérica. Además, se ha mostrado que el almidón céreo presenta conducta térmica similar al almidón normal de maíz y que el almidón alto en amilosa no exhibe un pico claro y su endoterma se extiende por arriba de 100 °C<sup>59</sup>.

#### **1.5.3.2.1 Efectos térmicos sobre la estructura del almidón.**

Los gránulos de almidón son heterogéneos química y físicamente porque están compuestos de moléculas de amilosa y amilopectina así como de estructuras cristalina y amorfa. La cristalinidad de los gránulos de almidón esta generalmente en el orden de 15-35%; por lo tanto, el modelo que puede describir morfológicamente la estructura semicristalina podría ser un sistema de dos fases, independientes una de otra, en donde los cristales son dispersos

en una matriz homogénea amorfa. La cristalinidad del almidón se debe a la presencia de racimos paralelos de cadenas cortas ( 50-60 Å ) empaquetadas lado por lado. Esas cadenas pueden ser las externas de amilopectina o partes de la molécula de amilosa. Las regiones amorfas son las que se presentan en racimos múltiples y previenen la formación de estructuras poliméricas ordenadas.

Dentro del gránulo, la amilosa se puede localizar entre moléculas de amilopectina y puede asociarse con las regiones lineales de ésta, el arreglo implica alto grado de orden originando regiones cristalinas, que por medio de la birrefringencia, indica una naturaleza perfectamente organizada.

El almidón en su estado nativo existe en la forma de gránulos insolubles en agua. Cuando se dispersan en agua fría, experimentan un hinchamiento reversible limitado debido a la difusión y absorción de pequeñas cantidades de agua dentro de las regiones amorfas; este proceso es exotérmico.

En el calentamiento, las propiedades ópticas del almidón (birrefringencia) y su patrón de difracción de rayos X se retienen, hasta que la temperatura de gelatinización se alcanza. En este momento, la organización cristalina se pierde y los gránulos se hinchan irreversiblemente para formar una pasta viscosa. Este proceso desordenado se llama gelatinización y es un fenómeno endotérmico. Las etapas transicionales se muestran a continuación (figura 4).

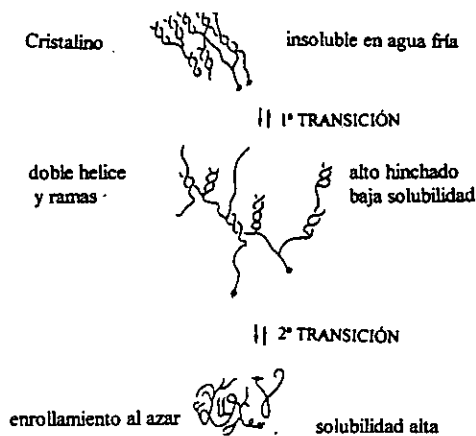


Figura 4. Modelo de transiciones moleculares durante la gelatinización del almidón. De Colonna P. and Mercier Ch.1985.

El modelo ejemplifica a la amilosa y su asociación cristalina se ve influenciada por la longitud de la cadena, presencia de la amilopectina y/o de lípidos complejantes.

Las diferencias sobre las características de gelatinización entre varios genotipos de maíz se deben a su diferente dimensión, organización y composición del gránulo, provocando variaciones en los perfiles y parámetros térmicos. Por otra parte, se dice que el hinchado y la fusión cristalina parecen ser procesos cooperativos<sup>60</sup>.

#### **1.5.3.2.2 Interacciones del almidón.**

##### *Interacción almidón-agua.*

La gelatinización depende de la infiltración de agua dentro del granulo. Si está presente una alta cantidad de agua, hay hidratación extensiva e hinchado de las regiones amorfas, facilitando la fusión de los cristales de almidón en el calentamiento. Esto ocurre en un intervalo de temperatura muy estrecho y produce una transición endotérmica simple. Adicionalmente a estas condiciones, al aumentar la temperatura se incrementa la difusión translacional y rotacional de las cadenas dentro de las partes amorfas de los gránulos. En este momento se hincha en forma reversible (limitado por los entrecruzamientos de las cadenas). Al aumentar más la temperatura, hay mayor movimiento de las cadenas, principalmente en la parte amorfa, la cual ejerce una acción desestabilizante en el resto del gránulo.

Con niveles de agua intermedios, se tienen dos transiciones endotérmicas, una debido a la desorganización del almidón, mientras que otra, a más alta temperatura, se atribuye a complejos amilosa-lípidos.

Bajo condiciones extremas, donde la humedad no esta presente en el sistema, y el único desnaturalizante es el calor, podría ocurrir la fusión de cristales. Es obvio que el agua juega un papel importante en el proceso global ya que ayuda a la fusión de cristales de almidón.

En un disolvente como el agua, los requerimientos para un estado energético mínimo podría favorecer la conformación compacta. Esto se apoya si consideramos que la ramificación extensiva facilita una conformación ordenada, por restricción de la rotación de enlaces glucosídicos individuales. Únicamente cambios de orden físico ocurren dentro del gránulo

como resultado del tratamiento humedad-calor sin haber degradación química. Sin embargo, estos cambios son de gran importancia ya que están relacionados con la funcionalidad<sup>37</sup>.

#### *Interacciones almidón-lípidos.*

Los lípidos actúan como modificadores de textura cuando interaccionan con el almidón, principalmente a través de los complejos con amilosa. El orden conformacional (rollo-hélice) de amilosa, inducido por agentes complejantes, promueven nucleación y subsecuente organización de hélices dentro de agregados parcialmente cristalinos. El mecanismo exacto no se sabe, pero la presencia de éstos complejos se denota por una transición a temperaturas entre 95-130 °C. La estabilidad térmica de los complejos aumenta con incremento de la longitud de la cadena del ácido graso, la entalpía varía dependiendo del agente complejante y de las condiciones empleadas para la formación del complejo. El contenido de agua también es importante, ya que a un contenido alto, la fusión del complejo es altamente cooperativo, produciendo una sola transición, a bajo contenido de agua, resulta en un pico que se desplaza a una segunda transición a más alta temperatura.

La entalpía aparente de gelatinización del almidón desengrasado es más alta que las de las muestras nativas, ya que la formación del complejo amilosa-lípido seguida por cristalización ocurre exotérmicamente durante la gelatinización. Además, la extracción de lípidos disminuye la Tg del gránulo<sup>61</sup>.

#### **1.5.3.2.3 Efecto del ambiente en la conducta del almidón.**

##### *Azúcares.*

Los azúcares compiten con el almidón por el agua, donde los disacáridos retardan más el hinchado que los monosacáridos. Por ejemplo, la adición de 50% de sacarosa, glucosa y fructosa al almidón, aumenta la Tg y baja la  $\Delta H$  requerida para gelatinización<sup>62,63</sup>.

##### *Surfactantes.*

Al igual que para las proteínas su efecto depende de la concentración. Generalmente desestabiliza la estructura granular, baja la Tg y  $\Delta H$ <sup>57</sup>.

### *Sales.*

Los iones de sales ejercen efectos distintos sobre la gelatinización; algunos incrementan y otros decrecen el hinchado del gránulo a una temperatura dada. Los electrolitos afectan la  $T_g$  del almidón, es decir, aniones y cationes pueden causar cambios en esta temperatura por modificación de la estructura del agua. Los iones hidratados fuertemente (como sulfato y Litio) tienden a incrementar el orden de la estructura del agua y disminuyen la concentración de agua “libre” resultando en el aumento en  $T_g$ .

No solo la interacción sal-agua sino también la de sal-almidón puede afectar la gelatinización. Cuando la concentración de sal aumenta a un cierto nivel, se rompen los puentes de hidrógeno entre el agua y el almidón y esto acelera la gelatinización, lo cual puede contribuir a disminuir la  $T_g$  del almidón<sup>64</sup>.

#### **1.5.3.2 Aplicación en grasas.**

Cuando el DSC se equipa con un accesorio de enfriamiento, se puede investigar la fusión cristalina y el templado usado en el proceso de materiales grasos (chocolate). Las grasas típicamente existen en varias formas cristalinas por lo que su textura y estabilidad en el almacenamiento dependen de la proporción relativa de esas formas. La temperatura de templado puede ser usada para fortalecer la nucleación y el crecimiento de los cristales de la forma deseada. El templado impropio causa pérdida de la textura y apariencia. El DSC es estable para estudiar el polimorfismo de las grasas por la temperatura. Puede también determinar cualitativamente la composición de triglicéridos de un aceite o de una grasa o mezclas de ellos<sup>38</sup>.

## HIPÓTESIS.

Las condiciones de almacenamiento en las que se encuentra el grano de maíz van a alterar las características intrínsecas de sus macromoléculas.

## OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de las principales macromoléculas del grano de maíz, a través de la determinación de los perfiles calorimétricos y sus parámetros.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

Estudiar los posibles cambios, modificaciones, interacciones y/o degradación de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, causados por el almacenamiento del grano de maíz.

Definir el efecto de la temperatura y la humedad de almacenamiento sobre los parámetros estudiados.

Establecer metodologías que permitan obtener información acerca de los posibles cambios e interacciones que toman lugar a nivel macromolecular y que puedan ser aplicables a otros granos.



## **2. TRABAJO EXPERIMENTAL**

El estudio se realizó en 2 etapas: en la primera se seleccionaron y validaron los procedimientos de extracción, hidratación y requisitos térmicos de barrido para el almidón y 4 fracciones proteínicas aisladas del grano; en la segunda etapa, estos métodos de separación de macromoléculas y especificaciones de barrido fueron aplicados al grano para la evaluación calorimétrica del efecto de temperatura y humedad de almacenamiento.

En este estudio se utilizó maíz híbrido H-447 cultivado en el ciclo 1994, procedente de la Unidad de Investigación de Granos y Semillas del Instituto de Biología ubicado en Pabellón de Artega, Aguascalientes, México. Con el objeto de prevenir el efecto causado por microorganismos, el maíz se trató previamente con el fungicida Tilletión 500 (Clorotalonil) con una concentración de 15% (v/v) y en una proporción de 10 ml/Kg.

Como control se utilizó maíz H-447 almacenado en condiciones herméticas a 4°C y a un contenido de humedad del 10 %.

### **2.1 Primera etapa. Validación de DSC para macromoléculas del maíz.**

#### **2.1.1 Análisis químico proximal.**

Con el propósito de establecer el perfil fisicoquímico del maíz bajo estudio y que se sometería al almacenamiento, se inició con un examen bromatológico general<sup>64</sup> (apéndice A.2).

#### **2.1.2 Separación de macrocomponentes.**

Para poder emprender el estudio sobre el comportamiento térmico de las macromoléculas fue necesario separarlas del grano de maíz. Para lograr esto se molió 150 g de maíz en un molino Super Lines Type SCES Mitsubishi Electric Co. y se utilizó el método de desengrasado en frío de la harina (apéndice A2.1). A partir de la harina desengrasada se continuó con el aislamiento, purificación y evaluación de las macromoléculas, esto con el propósito de conocer sus concentraciones y empezar a ajustar las variables y condiciones de corrida térmica que influyen en este estudio. En el caso del almidón, se utilizó la separación

húmeda (apéndice A2.2) y para proteínas, se utilizó el método de Osborne y Mendell<sup>66</sup> que se basa en diferencias de solubilidad (apéndice A2.3). De esta forma se obtuvieron 4 fracciones de proteínas: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas con diferentes concentraciones, donde la fracción predominante fue la de prolaminas. La tabla 2.1 muestra sus porcentajes.

Tabla 2.1. FRACCIONES PROTEÍNICAS EXTRAÍDAS A PARTIR DE HARINA DESENGRASADA (g de fracción/100g de proteína total)

<i>Fracción proteica</i>	%
Albúminas	1.3±0.2
Globulinas	0.8±0.06
Prolaminas	4.0±0.8
Glutelinas	3.8±0.3
Rendimiento total	9.9

Proteína total (microKj. 9.96%), n=3

La evaluación del almidón separado se hizo por el método de fenol-sulfúrico y las fracciones proteínicas por el método de microkjeldhal<sup>67</sup>.

El paso 2.1.2 de este procedimiento se repitió para el maíz sujeto a almacenamiento de donde se desprendieron los resultados sobre solubilidad con base en los rendimientos obtenidos para el grano control y cada una de las condiciones de almacenamiento.

### 2.1.3 Condiciones térmicas de barrido.

Para llevar a cabo el estudio de termoanálisis se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin-Elmer modelo DSC-7. El procedimiento de la preparación de las muestras para el análisis térmico se describe en el apéndice A2.4. Debido a que no hay antecedentes específicos para tomarlos como base en este estudio, la tabla 2.2 presenta los ajustes y materiales a los que se debe someter la muestra una vez preparada<sup>68</sup>.

Tabla 2.2 CONDICIONES TÉRMICAS PARA LA OBTENCIÓN DE TERMOGRAMAS.

Gas de acarreo	Nitrógeno
Velocidad de flujo (ml/min)	20-30
Velocidad de calentamiento (°C/min)	10
Crisoles para proteínas	de acero inoxidable con contratapa de oro (P-E B018-2905)
Crisoles para almidón	de aluminio (Perkin-Elmer 0219-0014)
Rango de calentamiento (°C)	25-200

McNaughton J.L. y Mortimer C.T. Perkin-Elmer 1975.

El equipo DSC se calibró con Indio que es un material muy estable en el intervalo de temperatura en la que se dan los procesos térmicos en estudio. El DSC tiene una sensibilidad de 0.5 mcal/min, o sea 0.002 J/min<sup>69</sup>.

Los parámetros que fueron obtenidos directamente del software del DSC para la transición son: cambio entálpico ( $\Delta H$ ) en J/g, temperatura máxima ( $T_d$ ), temperatura inicial ( $T_o$ ) y temperatura final ( $T_f$ ) en °C. Adicionalmente, en la etapa de almacenamiento, se determinó la temperatura media ( $T^{1/2}$ ) para desnaturalización de proteínas midiendo la altura del pico a la mitad (y a lo ancho) de la transición con ayuda de una regla.

#### 2.1.4. Establecimiento de los parámetros de humedad en los macrocomponentes para la obtención de curvas térmicas.

En esta etapa, se procedió a confirmar la interrelación materia seca-agua, para seleccionar y validar las condiciones de corrida calorimétrica en función del contenido de agua y de la temperatura necesaria para que se verifiquen los procesos de gelatinización del almidón y desnaturalización proteínica.

Para el almidón aislado; se hicieron barridos a diferentes concentraciones de agua-almidón (10,20,30,40,50,60,70,80 y 90g de agua/100g de almidón), utilizando como punto de comparación barridos de almidones comerciales (Arancia) alto en amilosa (60% de amilosa) y alto en amilopectina (90% de amilopectina). De esta manera, se conoció la conducta térmica de estos 2 componentes principales del almidón y se identificó la huella térmica del almidón aislado del maíz H447. Con estos datos se fijó la cantidad de agua necesaria para manifestar efectos más claros del proceso de gelatinización por DSC.

Para las fracciones proteínicas; se hicieron barridos a diferentes concentraciones de agua-proteína (10,20,30,40,50,60,70,80 y 90g de agua/100g de proteína), utilizando como punto de comparación barridos de zeína comercial (donada por Arancia de concentración 60%), de esta forma se identificó la huella térmica de las prolaminas, componente proteínico mayoritario en el grano y de las otras fracciones. Con estos datos se fijó la cantidad de agua necesaria para manifestar, en su forma más clara, el proceso de desnaturalización por DSC<sup>39</sup>.

## 2.2 Segunda etapa. Almacenamiento del maíz.

### 2.2.1 Establecimiento de las condiciones de almacenamiento.

Se seleccionaron de acuerdo a las variaciones climáticas esencialmente de temperatura y humedad relativa, a las que se expone el grano durante su almacenamiento, en los diferentes lugares de acopio<sup>2</sup>. Tratando de abarcar las condiciones de conservación del grano desde favorables hasta de alto riesgo se propusieron 2 temperaturas y 3 contenidos de humedad en el grano que dieron lugar a 6 diferentes tratamientos que se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DEL MAÍZ H-447

Contenido de humedad en el grano %	Temperatura (°C)	
	40	20
18	T1	T2
15	T3	T4
10	T5	T6
<b>grano control almacenado herméticamente a 4°C y 10% de contenido de humedad</b>		

T= tratamientos.

#### 2.2.1.1 Ajuste de los 3 contenidos de humedad en el grano.

Para lograr estas condiciones en el grano, se hicieron pruebas con microambientes simulados en las que el maíz se colocó en contenedores de plástico cerrados. Estos mantenían humedades relativas en equilibrio con la humedad del grano a la temperatura definida, a través del empleo de soluciones saturadas de diferentes sales. Se probaron KCl, KBr, NaCl y KNO<sub>3</sub>; el procedimiento se desglosa en el apéndice B2. De las curvas de humedad del grano

(apéndice B2.1), se escogieron las sales adecuadas y se estableció el tiempo necesario para alcanzar la humedad en el grano a la temperatura deseada. La siguiente tabla 2.4 muestra estos datos.

Tabla 2.4 SALES ADECUADAS PARA LOGRAR LAS CONDICIONES DE HUMEDAD EN EL GRANO DE MAÍZ H-447 DURANTE SU ALMACENAMIENTO.

humedad del grano (%)	solución saturada	humedad relativa (%)			
		40 °C días		20 °C días	
18	Nitrato de potasio	89	3	93	5
15	Cloruro de sodio	75	6	75	8

En el caso del contenido de humedad del 10% en el grano, no fue necesario utilizar ninguna sal. Sin embargo, para asegurar el mantenimiento de este contenido, las muestras de maíz se mantuvieron cerradas y llenas para evitar fluctuaciones en la humedad dentro del mismo contenedor al ser sometidos a 40 y 20 °C<sup>70</sup>.

#### 2.2.1.2 Ajuste de las temperaturas de almacenamiento

Las temperaturas de 20 y 40°C fueron controladas manteniendo los contenedores en incubadoras Ambi-Hi-Chamber que tienen una precisión de  $\pm 0.1$  °C.

#### 2.2.2 Calendario de almacenamiento y monitoreo.

Una vez adecuadas las condiciones de almacenamiento, se establecieron los intervalos de tiempo y periodicidad de los monitoreos del maíz para las diferentes condiciones. La frecuencia del monitoreo se fijó considerando que en las condiciones más severas, los cambios moleculares se presentan a mayor velocidad. El calendario y la frecuencia de muestreo se esquematizan en la figura 1.21.

Figura 1.21

## CALENDARIO DE MUESTREO DEL MAÍZ (SEMILLA) 447 EN ALMACENAMIENTO

		TIEMPO (DÍAS)																	
t	10	15	20	30	40	45	50	60	75	80	90	100	120	140	150	160	180	210	
40°C	1	3	1 5	1 3	1 5	3	1	1 3 5	3	5	3	5							
20°C								4 6		2	4	2	2 4 6	2	4	2	2	4	
C						C					C			C				C	

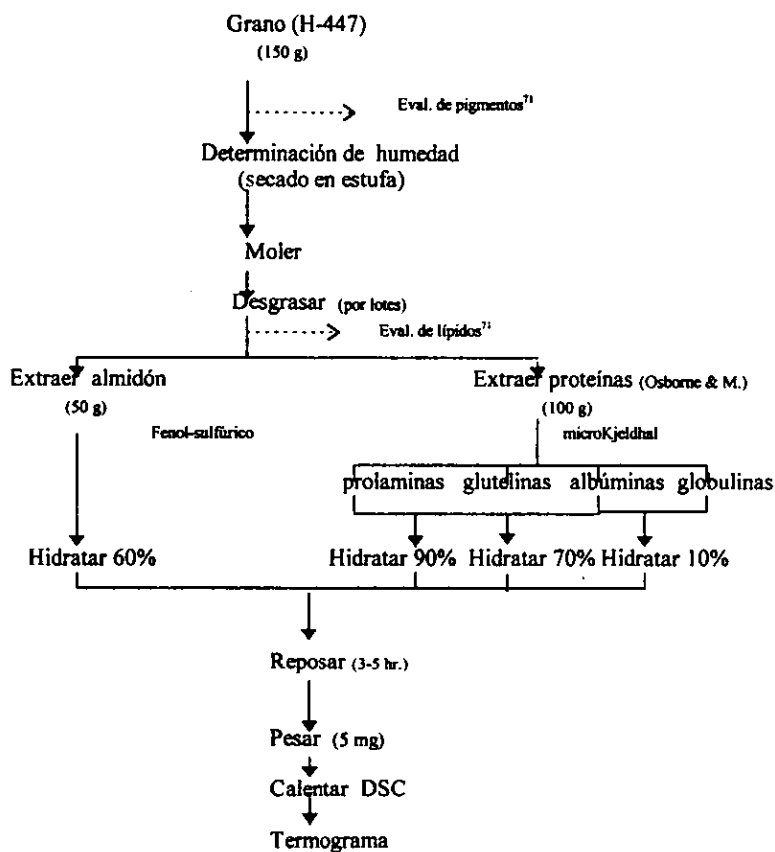
MUESTRA		INTERVALO	TIEMPO MÁXIMO	No. MUESTREOS
1	18% Humedad, 40°C	c/10días	60 días	6
2	18% Humedad 20°C	c/20días	120 días	6
3	15% Humedad 40°C	c/15días	90 días	6
4	15% Humedad 20°C	c/30días	180 días	6
5	10% Humedad 40°C	c/20días	120 días	6
6	10% Humedad 20°C	c/60días	180 días	6

C= maíz control a 10% humedad, 4°C c/45 días 210 días

Se determinó la humedad del grano<sup>3</sup> en cuanto es retirado de la cámara de almacenamiento.

### 2.2.3 Esquema analítico.

Enseguida se desglosa la secuencia de análisis para los monitoreos.



Las flechas punteadas corresponden a las pruebas fisicoquímicas que se hicieron en forma paralela<sup>71</sup> y cuando se requieran serán comentadas en la discusión de resultados.

### **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se aplicó con el objetivo de que los resultados encuentren un elemento de apoyo en el análisis y discusión. Para ello se utilizó el ANOVA (Análisis de varianza) de una vía, para evaluar los efectos de la humedad y la temperatura sobre los parámetros térmicos durante el tiempo de almacenamiento. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el paquete SPSS (Statistics Package for Social Sciences). Dado que el modelo del experimento es desequilibrado no pudo aplicarse alguno ya establecido. El análisis se encuentra en el apéndice.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Primera etapa: Trabajo preliminar al almacenamiento.

En la primera etapa, se realizó un estudio para determinar la cantidad de agua necesaria para la obtención de registros térmicos de gelatinización y desnaturalización del almidón aislado y de las 4 fracciones proteínicas.

Los termogramas de la figura 3.11 muestran los registros calorimétricos de los almidones de referencia y del almidón aislado. Los resultados que fueron obtenidos para la transición, correspondientes a la gelatinización se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 RESULTADOS DE DSC OBTENIDOS PARA GELATINIZACION DE ALMIDONES

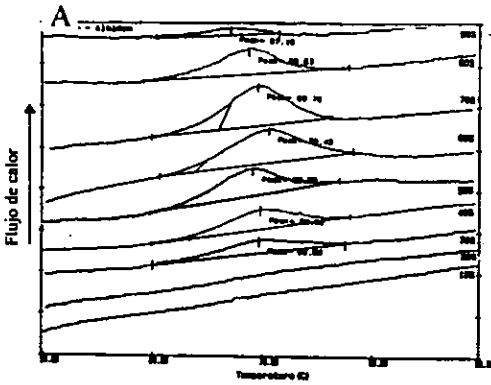
HIDRATACION %	30	40	50	60	70	80	90
<b>ALMIDÓN AISLADO</b>							
$\Delta H$ (J/g)	0.99±0.1	1.5±0.5	1.9±0.9	3.9±0.6	3.6±0.3	2.7±0.1	1.7±0.4
Tg	68.5±0.2	67.9±0.3	68.0±1.0	67.6±0.9	67.7±0.6	68.6±0.4	67.1±1.1
To	54.2±0.2	54.9±1.0	56.7±0.5	53.5±0.9	53.3±0.5	55.0±0.2	55.4±0.2
Tf	85.4±0.1	85.6±1.0	86.0±0.7	84.9±0.5	85.5±0.2	83.6±0.7	81.5±0.5
<b>ALMIDÓN CEROSO</b>							
$\Delta H$ (J/g)	0.53±0.1	1.09±0.1	1.3±0.3	2.58±1.0	2.51±0.3	1.77±0.2	0.94±0.4
Tg	67.9±0.3	67.4±0.4	67.8±0.4	67.4±0.5	67.8±0.5	68.0±0.2	68.3±0.6
To	56.5±0.3	55.3±0.7	53.4±0.9	55.4±0.5	54.6±0.5	53.1±0.8	55.5±0.3
Tf	83.3±0.1	83.9±0.6	84.7±0.3	84.1±0.2	83.2±0.9	84.7±0.1	84.8±0.2
<b>AMILOALMIDON</b>							
$\Delta H$ (J/g)	3.87±0.07	5.45±0.3	5.6±0.1	5.86±0.7	4.57±0.2	3.97±0.2	2.42±0.1
Tg	83.8±0.2	81.8±0.7	81.3±0.9	81.6±0.4	82.4±0.5	81.0±0.8	82.2±0.1
To	68.2±0.5	68.3±0.3	67.0±0.6	66.2±0.9	65.0±0.8	64.5±0.8	61.3±0.5
Tf	111.3±0.5	112.±0.4	111±0.8	111.6±.3	110.5±.9	105.5±.2	101.4±.3

n=3, %= g. de agua/100g de almidón

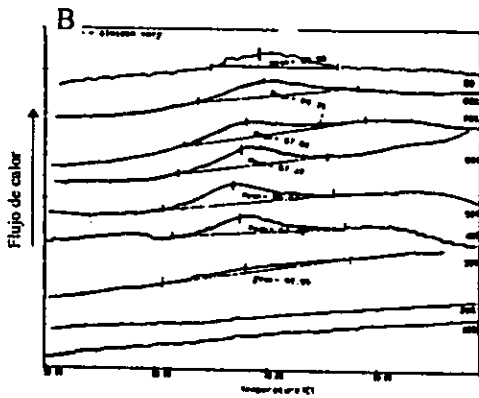
To=temperatura inicial, Tf=temperatura final, T=temperatura máxima de gelatinización en °C.

Con esta información se pudo constatar la conducta similar entre el almidón aislado y del alto en amilopectina (ceroso). Los perfiles térmicos (figura 3.11A y B) de estos dos almidones son muy parecidos, el intervalo de temperatura en que se produce la gelatinización fue de 53-85°C y 55-84°C respectivamente, con 60% de hidratación. Esto concuerda con el intervalo de 58.3-83°C que se ha encontrado para la gelatinización del almidón normal<sup>55</sup> y la semejanza en sus perfiles ha sido denotado por otros autores<sup>41,72</sup>.

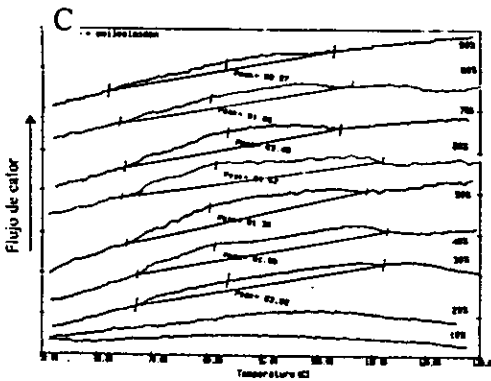
Figura 3.11. TERMOGRAMAS DE GELATINIZACIÓN DE ALMIDÓN AISLADO, 50  
 ALMIDON CEROSO Y ALMIDÓN ALTO EN AMILOSA OBTENIDOS POR DSC\*



ALMIDON AISLADO DE MAIZ: Barrido a diferentes contenidos de agua, del 10 al 90%, peso de 5mg y velocidad de calentamiento de 10°C/min.



ALMIDON CEROSO\*: Barrido a diferentes contenidos de agua, del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.



ALMIDON ALTO EN AMILOSA\*: Barrido a diferentes contenidos de agua, del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.

\* Fuente comercial  
 \*DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

El amiloalmidón gelatinizó en un intervalo de 66-111°C y la forma del perfil difirió apreciablemente, cuando se compara con los almidones anteriores (figura 3.11C). Esto lo han puesto de manifiesto diversos estudios<sup>21,60</sup>. Probablemente esta conducta se deba a que en el acomodo molecular de este tipo de almidón, predominan las zonas cristalinas, que pueden presentarse entre cadenas de diferente longitud, lo que origina una respuesta energética más alta, esto se muestra en la tabla 3.1 ya que se requiere de una Tg y  $\Delta H_g$  mayor que para los almidones anteriores con un intervalo amplio de temperatura y un perfil térmico aplanado. Adicionalmente se puede observar que a contenidos de agua extremos (menores o mayores) la gelatinización no se lleva a cabo adecuadamente por falta de agua o por efecto de dilución respectivamente.

En la tabla 3.2 se registran las condiciones con las que se obtienen los resultados térmicos mas claros para la gelatinización. Estas incluyen nivel de hidratación del 60% para los tres almidones, peso adecuado del almidón hidratado para las corridas térmicas, además se fijó el tamaño de partícula así como el tiempo de hidratación. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 3.2 CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN

Hidratación (%)	60±0.5
Peso de la muestra hidratada (mg)	5±0.1
Tamaño de la partícula (in.)	0.007
Tiempo de hidratación (hr.)	3-5

n= 3, %= g/100g de almidón.

En relación a proteínas, los termogramas de la figura 3.12 muestran los registros calorimétricos del estándar de zeína y de los componentes proteínicos aislados (prolaminas, glutelinas, albúminas y globulinas). En forma adicional, también se obtuvieron los resultados de entalpias y temperaturas de desnaturalización que se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 RESULTADOS DE DSC OBTENIDOS PARA DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

HIDRATACION %	90	80	70	60	50	40	30
<i>zeínas</i>							
$\Delta H$ (J/g)	15.0±1.5	12.3±0.8	8.19±0.7	7.09±0.5	7.3±0.2	4.23±0.8	3.23±0.4
Td	93.1±1	94.4±0.4	94.5±0.6	96.1±0.2	105.4±1	112.8±1	93.1±1
To	73.5±2.5	83.5±1	83.4±0.9	94.5±0.5	90.7±1	98.9±0.1	81.5±1.5
<i>Prolaminas</i>							
$\Delta H$ (J/g)	12.2±0.2	8.2±0.2	6.13±0.1	4.18±0.8	3.92±0.2	3.0±0.4	2.11±0.5
Td	89.0±0.6	84.4±0.1	93.1±0.5	94.3±0.1	94.9±0.2	81.3±1	97.4±0.2
To	80.8±0.1	75.4±0.3	78.6±1.5	85.3±0.1	89.4±0.5	80.3±1	91.9±0.1
<i>glutelinas</i>							
$\Delta H$ (J/g)	4.52±0.1	8.32±0.1	15.3±0.2	9.24±0.1	3.3±0.2	2.82±1.5	3.23±0.5
Td	87.7±0.2	86.5±0.1	80.5±0.3	84.1±0.4	81.4±0.3	85±0.7	101±1.3
To	74.3±0.8	79.3±1.3	74.7±1.3	67.7±1	70.3±0.1	77.3±0.8	77.4±0.3

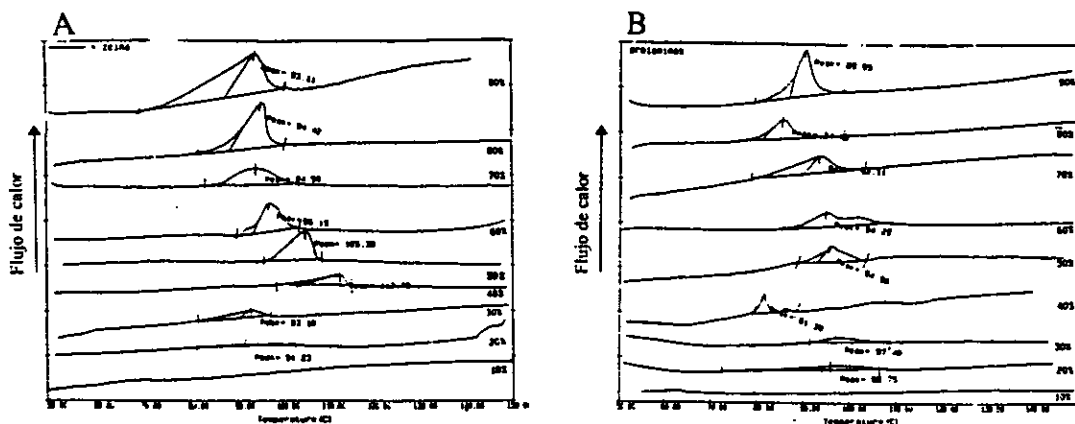
HIDRATACION %	50	40	30	20	10
<i>albúminas</i>					
$\Delta H$ (J/g)	2.4±0.2	1.28±2	7.14±0.2	7.78±0.5	16.25±0.2
Td	50.8±1	58.8±0.5	54.9±0.7	68.0±0.2	68.4±0.1
To	48±0.5	55.8±0.9	44.2±1	57±0.2	47.6±1.1
<i>globulinas</i>					
$\Delta H$ (J/g)	4.0±0.2	3.83±0.9	4.62±0.6	6.35±0.2	8.35±0.2
Td	65.8±1	62.6±1.5	52.3±0.4	63.5±0.5	52.3±0.2
To	62.3±0.03	54.2±1.3	47.6±2	62.3±0.4	40.1±0.1

n=3, %= g. de agua/100g de almidón

To=temperatura inicial, Td=temperatura máxima de desnaturalización en °C.

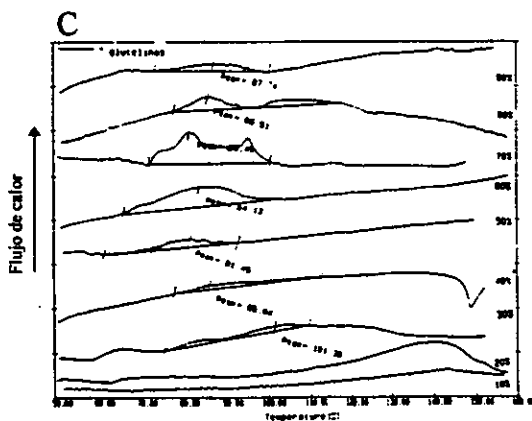
En la figura 3.12A, B, C, D y E, se observa que los perfiles térmicos de las 5 fracciones son asimétricos revelando procesos térmicos sobrepuestos posiblemente por la presencia de subfracciones o cambios de conducta de la misma proteína originados por su diferente ambiente acuoso. En lo que se refiere a prolaminas aisladas y zeínas de referencia (figura 3.12A y B), es notoria la conducta similar. Sin embargo, la diferencia de tamaño de la transición podría ser consecuencia de algún daño durante la extracción de las primeras. Los parámetros que cuantifican estos cambios (tabla 3.3) muestran, además, que el intervalo de temperatura en que se produce la desnaturalización en forma más acentuada fue de 73-98°C para las zeínas y de 80-98°C para las prolaminas con Td del pico de transición de 93°C y 90°C respectivamente. Esto según otros estudios, indica un grado considerable de homología entre las proteínas<sup>73</sup>.

**Figura 3.12 TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE ZEÍNA COMERCIAL Y LAS FRACCIONES PROTEICAS AISLADAS, OBTENIDOS POR DSC\***

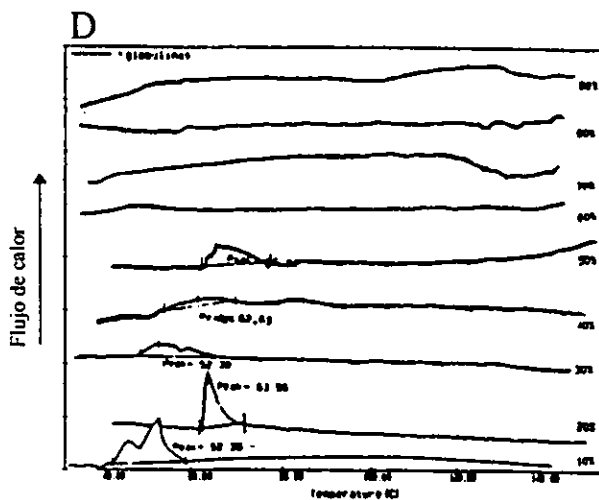


**ZEINAS\*** : Barrido a diferentes contenidos de agua, del 10 al 90%, peso de 5mg y velocidad de calentamiento de 10°C/min.

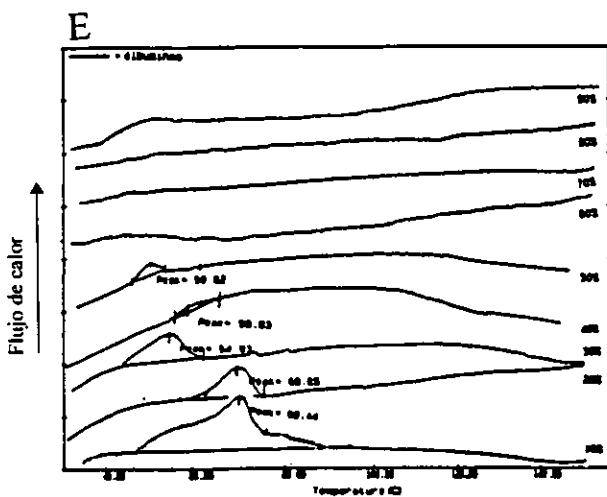
**PROLAMINAS**: Barrido a diferentes contenidos de agua del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**GLUTELINAS**: Barrido a diferentes contenidos de agua del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**GLOBULINAS:** Barrido a diferentes contenidos de agua del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**ALBÚMINAS:** Barrido a diferentes contenidos de agua del 10 al 90%, peso de 5mg, y velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Las glutelinas (figura 3.12C), presentaron un intervalo de desnaturalización de 74-103°C con Td de 80°C. La hidratación requerida para la desnaturalización de esta proteína fue menor que para zeínas, probablemente por tener un carácter menos hidrofóbico. Para las albúminas y globulinas (figura 3.12D y E) este intervalo fue de 47-88°C y 40-58°C respectivamente con Td de 68°C y 53°C.

En la tabla 3.4 se registran las hidrataciones requeridas para obtener los resultados mas marcados para la transición por desnaturalización. Las proteínas polares; más solubles y sensibles a el calor, requirieron menos agua y temperatura para su desnaturalización. Adicionalmente se estableció el peso de la muestra hidratada (5.0mg  $\pm$ 0.5) y el tiempo de hidratación.

Tabla 3.4 CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS.

PROTEÍNAS	HIDRATACIÓN g /100g de proteína
prolaminas	90 $\pm$ 1.4
glutelinas	70 $\pm$ 1.8
albúminas	10 $\pm$ 2.1
globulinas	10 $\pm$ 2.0

n= 3, tiempo de hidratación de 3-5 horas.

Los termogramas de la fig. 3.12 muestran que se requiere proporcionalmente alta energía para movilizar el agua asociada a centros polares (puentes de hidrógeno) y lograr la desnaturalización en las fracciones proteínicas.

### 3.2 Segunda etapa: Almacenamiento del maíz.

Antes de entrar a esta sección, es necesario mencionar que paralelamente a este estudio y dentro del mismo marco de investigación, se evaluaron la recuperación de lípidos extraídos y su integridad a través del índice de peróxido y la acidez titulable; el oscurecimiento no enzimático del embrión y la extracción de albúminas, globulinas y prolaminas<sup>71</sup>. Los resultados encontrados coinciden con los presentados a lo largo de este trabajo y, cuando se requiera, serán comentados para contar con más elementos de discusión.

En esta etapa, se procedió a evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento en las macromoléculas del maíz a través del seguimiento calorimétrico del almidón y de las fracciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Es importante recordar que las condiciones de almacenamiento se centraron en variar la humedad y la temperatura. Se evaluó el efecto a 40 y 20 °C y el de humedad en el grano de maíz a 3 contenidos (18%, 15% y 10%).

Para poder conocer la magnitud de los cambios provocados por estas condiciones se comparó con el maíz control, el cual estuvo almacenado a 4 °C con una humedad del 10 % por un período de 210 días. Se obtuvieron las fracciones de almidón y proteínas de este maíz que fueron utilizadas como controles para comparar los resultados calorimétricos con los obtenidos de las fracciones correspondientes a las diferentes condiciones de almacenamiento. Adicionalmente, se discuten los resultados obtenidos de los rendimientos de extracción de las fracciones proteínicas, así como del almidón de harina desengrasada de maíz, los cuales se anexan (apéndice, tabla 6.1 y 6.2).

Además de los parámetros obtenidos directamente del software del DSC para la transición, se calculó el valor ancho medio del pico ( $T^{1/2}$ ) en °C. Este dato ayuda a explicar las formas transicionales. Por otra parte, debido a que los puntos de inicio y fin de la transición son variables y difíciles de puntualizar por los perfiles obtenidos, la discusión se centrará en los valores obtenidos de entalpia,  $T_{\text{máxima}}$  ( $T_d$  o  $T_g$ ) y  $T^{1/2}$ .

### **3.2.1 Determinación de las características térmicas de las proteínas.**

Es necesario mencionar que en el presente estudio, se consideró que la desnaturalización depende de la intensidad de acción de la humedad y temperatura así como del tiempo de exposición del grano provocando cambios de diferente magnitud en la conformación o asociación de la molécula, los cuales se van a poder evidenciar por los resultados calorimétricos.

El calorímetro al inducir térmicamente la desnaturalización de esas moléculas expuestas a las condiciones de almacenamiento previas, muestra por medio de los termogramas un comportamiento y resultados diferentes entre esas moléculas y el control. Esto, junto con



información adicional brindada por las pruebas en lípidos<sup>71</sup> nos dan un panorama general de lo que probablemente ocurre.

La transición proteica de una conformación nativa a desnaturalizada es acompañada por la ruptura de enlaces o interacciones inter e intra moleculares dando lugar a procesos endotérmicos. En estos procesos, la desnaturalización de proteínas representa una transición en la que la estructura nativa compuesta de bloques o dominios cooperativos independientes e importantes en la organización conformacional se pierden<sup>47</sup>, dando lugar a estructuras sin conformación definida. Lo cual repercute en la forma y valores de la transición.

En este trabajo, resulta importante definir la estabilidad térmica de la proteína, como su capacidad a resistir daño estructural o conformacional cuando es sometida al calor. Así mismo, la entalpía de desnaturalización se entiende como la cantidad de calor necesaria para que se lleve a cabo el proceso.

### 3.2.1.1 Resultados calorimétricos de las fracciones proteínicas del maíz control H447.

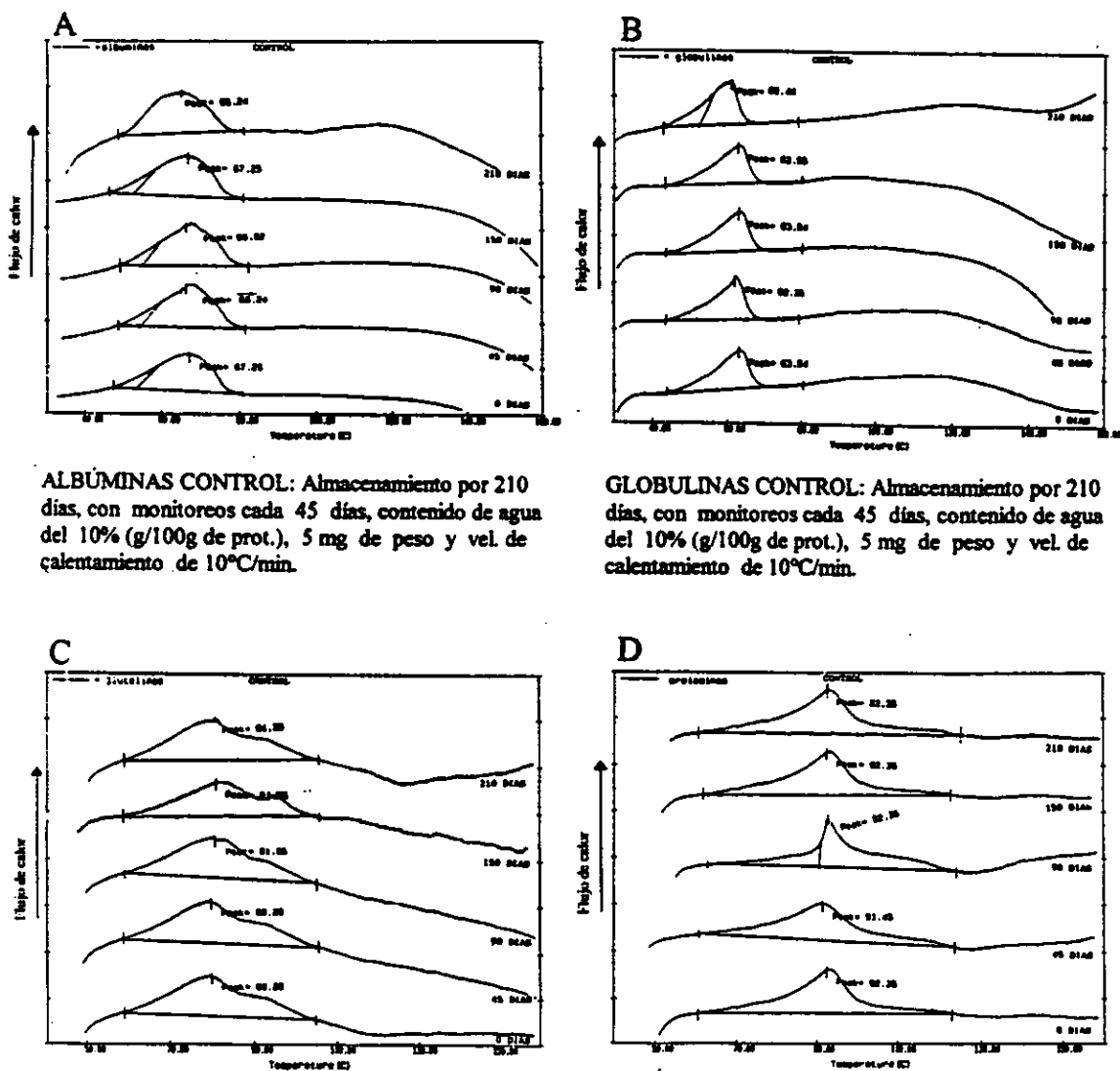
En la figura 3.13 A,B,C y D se muestran los perfiles térmicos de desnaturalización, obtenidos de las fracciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas del maíz control.

Estas curvas muestran intervalos de desnaturalización mas cortos, asimetría y forma aguda en las albúminas y globulinas (figura 3.13A y B) y más achatada y prolongada en las prolaminas y glutelinas (figura 3.13C y D). La anchura o achatamiento de la endoterma sugiere una transición térmica secuencial relacionada a una mezcla de conglomerados proteínicos que son mas pequeños y sensibles a el calor en las proteínas de tipo polar<sup>43</sup>.

Como se puede observar, estas formas se mantuvieron durante todo el período al que fue almacenado el maíz. De esta manera no se distinguió ningún cambio apreciable en los resultados calorimétricos que se muestran en la tabla 6.3 y que se colocan en el apéndice debido a que no muestran grandes modificaciones.

De acuerdo con los perfiles de albúminas y globulinas (figura 3.13A y B), se establece que se desnaturalizan de una manera altamente cooperativa como lo muestra la magnitud de la  $T^{1/2}$ ,

**Figura 3.13. TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS AISLADAS A PARTIR DEL MAÍZ CONTROL ALMACENADO EN CONDICIONES HERMÉTICAS A 4°C**



**ALBÚMINAS CONTROL:** Almacenamiento por 210 días, con monitoreos cada 45 días, contenido de agua del 10% (g/100g de prot.), 5 mg de peso y vel. de calentamiento de 10°C/min.

**GLOBULINAS CONTROL:** Almacenamiento por 210 días, con monitoreos cada 45 días, contenido de agua del 10% (g/100g de prot.), 5 mg de peso y vel. de calentamiento de 10°C/min.

**GLUTELINAS CONTROL:** Almacenamiento por 210 días, con monitoreos cada 45 días, contenido de agua del 70% (g/100g de prot.), 5 mg de peso y vel. de calentamiento de 10°C/min.

**PROLAMINAS CONTROL:** Almacenamiento por 210 días, con monitoreos cada 45 días, contenido de agua del 90% (g/100g de prot.), 5 mg de peso y vel. de calentamiento de 10°C/min.

es decir, se partió de una estructura con dominios cooperativos bien organizados y estables ya que el intervalo de temperatura del evento fué corto. Resulta importante destacar que el valor constante de estas temperaturas durante todo el estudio demostró que los procesos de extracción de estas proteínas así como las condiciones de humedad y temperatura en las que se mantuvo almacenado el maíz control, no afectaron su conformación. Sin embargo, hay que mencionar que a nivel estructural, el efecto del disolvente de extracción también es desnaturalizante. Por lo tanto, se puede decir que hay cambios conformacionales durante la extracción que pueden afectar principalmente la entalpía, y el perfil térmico. Estas cualidades también se presentaron para los perfiles de glutelinas (figura 3.13C) las que además muestran asimetría, indicando con esto, la posible presencia de 2 fracciones proteínicas con diferente  $T_d$  o interacciones intramoleculares de la misma fracción. Esas transiciones parciales, no coinciden con la  $T_d$  de la fracción que está en mayor proporción, pero contribuyen a la transición global dando lugar a una forma alargada y achatada. La  $T_d$  de la fracción que esta en menor proporción coincide con la  $T_d$  de las prolaminas, por lo que pudiese ser pertenezca a zeínas gamma y delta que fueron sustraídas con las glutelinas al disolverlas con el 2-mercaptoetanol. Así mismo, se sabe que el disolvente tiene efecto sobre la solubilidad en la proteína como resultado de su exposición, lo que probablemente afecte el perfil y sus valores calorimétricos. Este efecto del disolvente también se presenta sobre la conformación de las prolaminas (figura 3.13D) que muestran una amplitud en el rango de temperatura de desnaturalización obteniéndose una forma alargada y aumento de su  $T_{1/2}$ . Debido a que estos cambios son constantes durante el período de estudio, estos resultados aseguran que los comparativos, con las demás condiciones, resultan válidos ya que solo se verá el efecto debido a la condición correspondiente (los grupos entre controles son estadísticamente iguales según la prueba de Duncan 1A del apéndice).

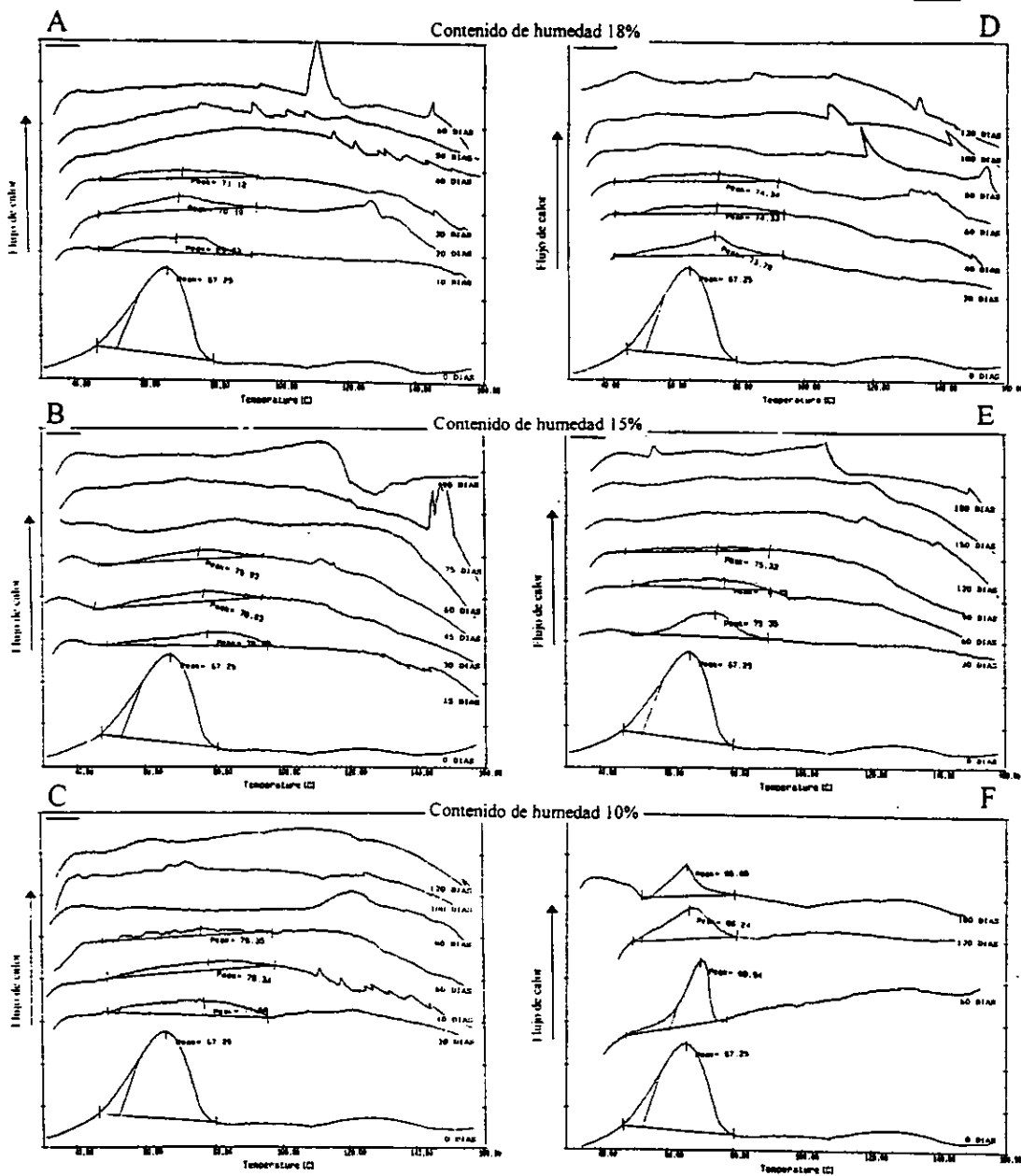
### **3.2.1.2. Resultados calorimétricos de las fracciones proteínicas del maíz almacenado a 40 y 20 °C, con 18, 15 y 10% de humedad.**

Los cambios en la fracción de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas por exposición a la temperatura y humedad de almacenamiento se evaluaron mediante sus perfiles y parámetros calorimétricos. Las figuras 3.14, 3.15, 3.16 y 3.17 muestran los cambios

Figura 3.14. TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE ALBÚMINAS, <sup>60</sup> OBTENIDOS POR DSC, EN LA FASE DE ALMACENAMIENTO DEL MAÍZ.

I) ALMACENAMIENTO A 40°C

II) ALMACENAMIENTO A 20°C

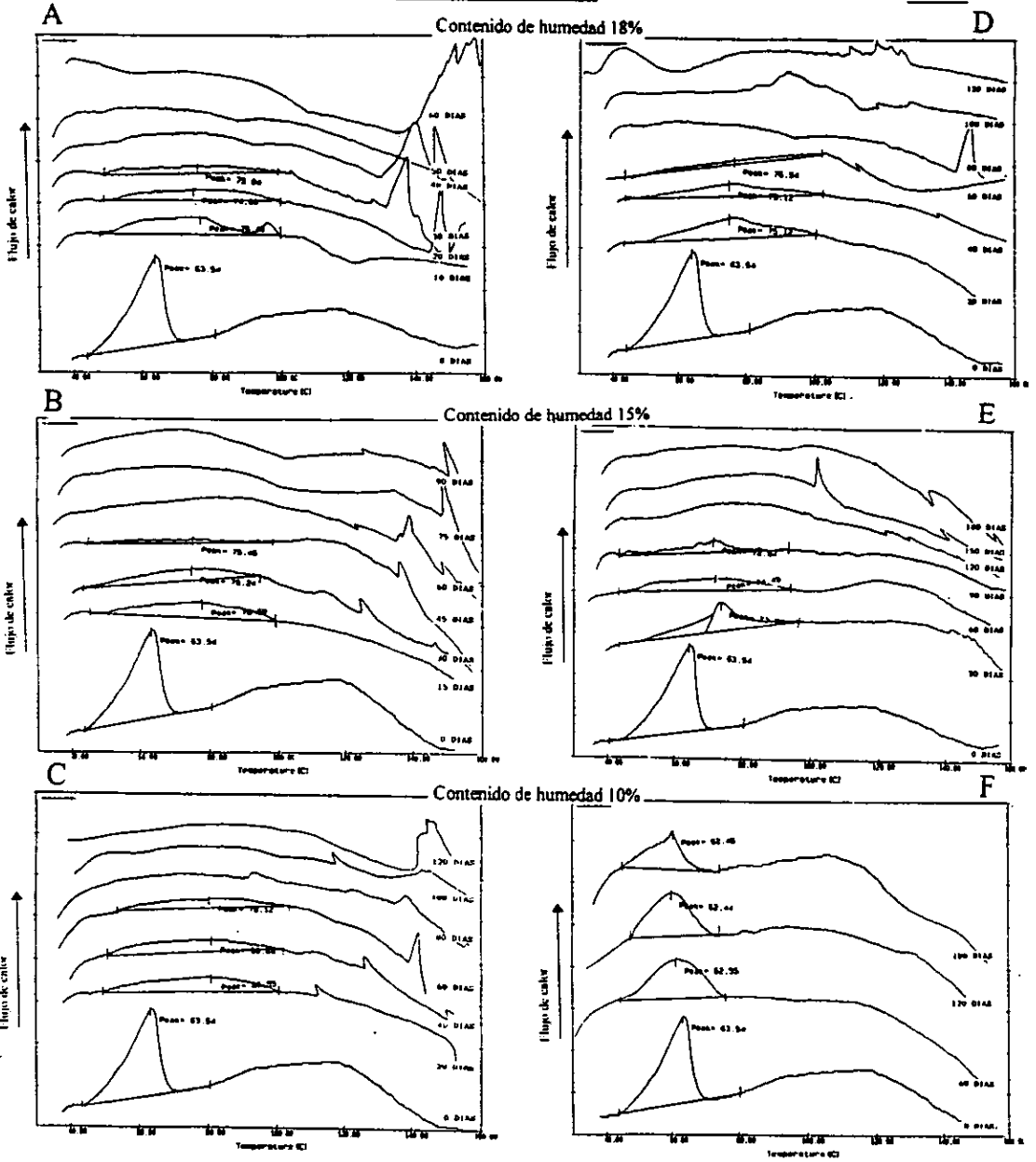


Condiciones de corrida: Velocidad de calentamiento de 10°C y 5 mg de peso.

**Figura 3.15. TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE GLOBULINAS, OBTENIDOS POR DSC, EN LA FASE DE ALMACENAMIENTO DEL MAÍZ**

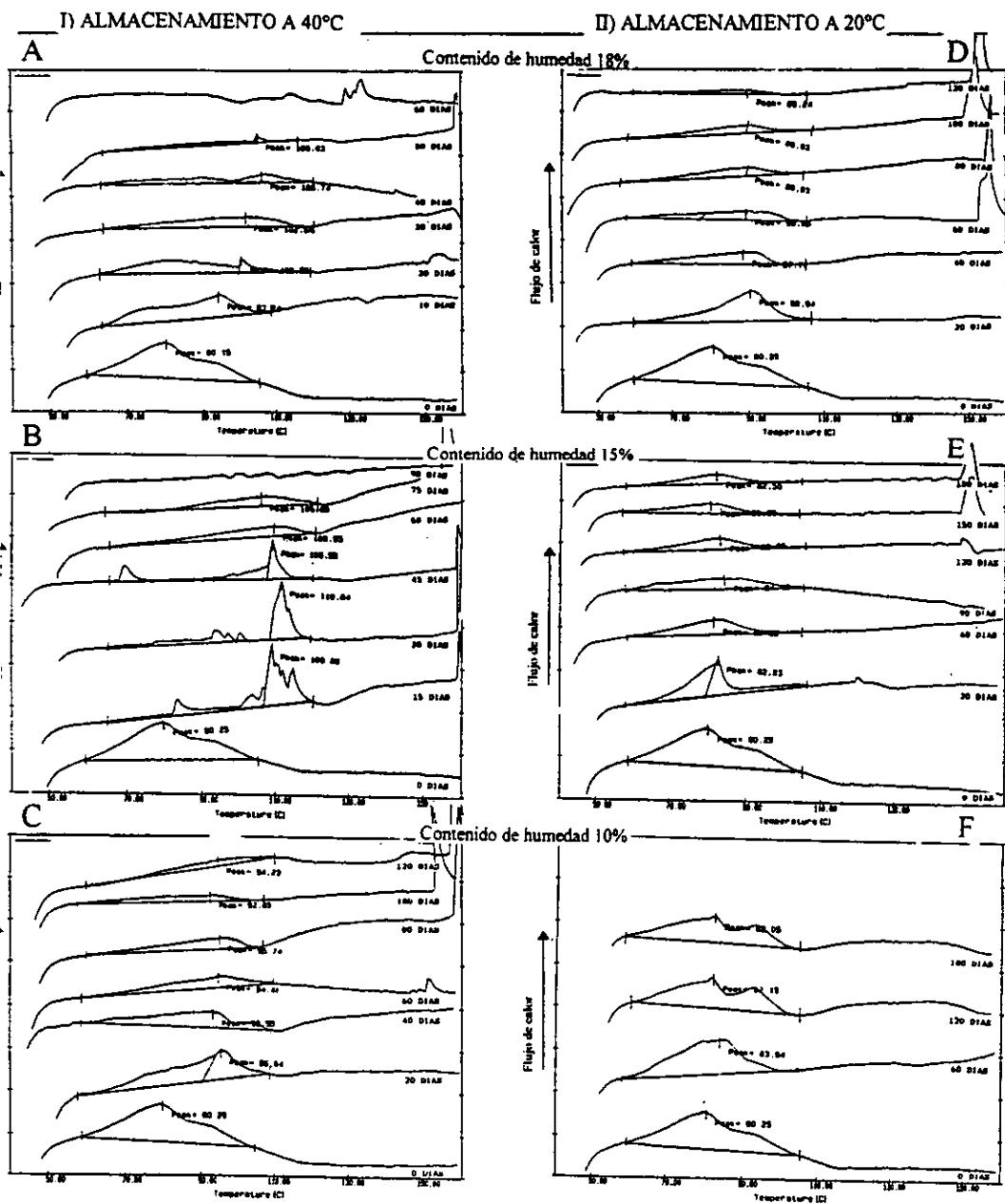
I) ALMACENAMIENTO A 40°C

II) ALMACENAMIENTO A 20°C



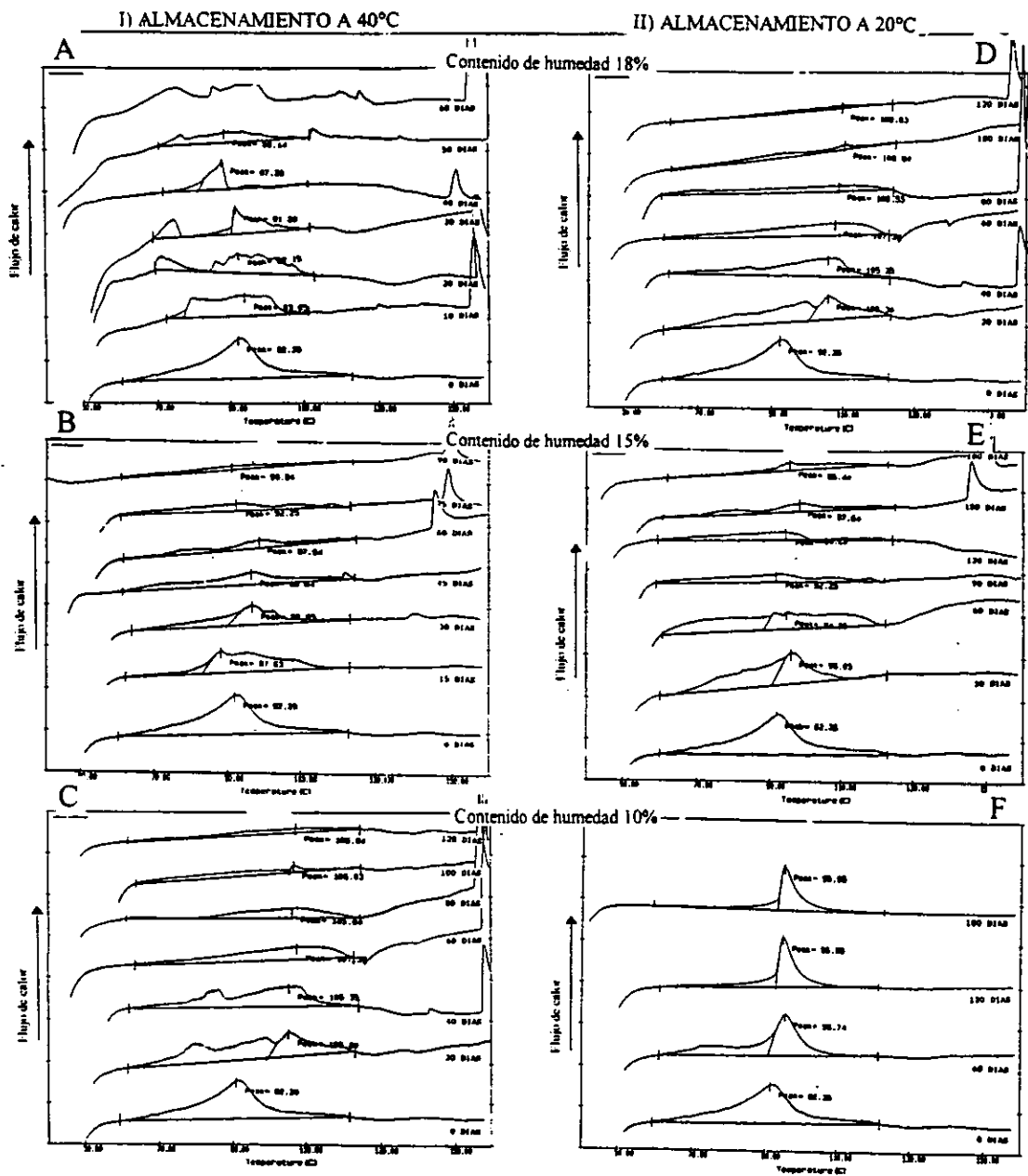
Condiciones de corrida: Velocidad de calentamiento de 10°C y 5 mg de peso.

**Figura 3.16. TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE GLUTELINAS, OBTENIDOS POR DSC, EN LA FASE DE ALMACENAMIENTO DEL MAÍZ.**



Condiciones de corrida: Velocidad de calentamiento de 10°C y 5 mg de peso.

Figura 3.17. TERMOGRAMAS DE DESNATURALIZACIÓN DE PROLAMINAS, OBTENIDOS POR DSC, EN LA FASE DE ALMACENAMIENTO DEL MAÍZ.<sup>63</sup>



Condiciones de corrida: Velocidad de calentamiento de 10°C y 5 mg de peso.

obtenidos para cada una de las condiciones de almacenamiento. En ellos se puede observar un cambio apreciable en el perfil conforme el tiempo de almacenamiento se incrementa. Las proteínas con carácter polar (figura 3.14 y 3.15) muestran un cambio mas dramático ya que el intervalo de desnaturalización se prolonga a temperaturas mas altas que la del control y la curva se achata casi inmediatamente a temperatura y humedad alta.

Los resultados de  $\Delta H_d$  y  $T^{1/2}$  que cuantifican los cambios de los perfiles térmicos, se esquematizan en las tablas 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 y enseguida se muestran gráficamente para su mejor apreciación:

**Tabla 3.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ENTALPIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 18 % DE CONTENIDO DE HUMEDAD**

Días*	$\Delta H$ (J/g)							
	40°C				20°C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelina	albúmina	globulina	prolamina	glutelina
0	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4
10	3.41±0.25	3.6± 0.05	7.96±0.5	8.54±0.4				
20	3.0±0.02	2.98±0.1	6.33±0.02	7.38±0.3	3.36±0.9	3.6±0.15	7.84±0.78	9.91±0.3
30	2.4±0.06	2.53±0.02	5.78±0.05	6.12±0.04				
40			3.72±0.03	4.61±0.1	2.49±0.1	2.93±0.04	4.51±0.2	8.10±0.2
50			2.14±0.2	2.82±0.05				
60					1.31±0.05	1.14±0.08	4.08±0.06	7.6±0.1
80							3.06±0.04	4.37±0.3
100							2.75±0.01	2.27±0.3
120							1.35±0.06	1.66±0.1

\*días de almacenamiento

**Tabla 3.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ENTALPIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 15% DE CONTENIDO DE HUMEDAD**

Días*	$\Delta H$ (J/g)							
	40°C				20°C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelina	albúmina	globulina	prolamina	glutelina
0	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4
15	3.75±0.25	3.8± 0.06	8.71±0.17	8.7±0.21				
30	2.85±0.02	2.96±0.01	6.34±0.2	7.32±0.09	5.86±0.2	3.96±0.42	6.74±0.5	10.91±0.3
45	1.75±0.03	1.05±0.03	5.22±0.02	6.56±0.03				
60			4.69±0.01	4.84±0.05	2.45±0.07	2.99±0.01	4.85±0.07	8.22±0.4
75			3.53±0.05	3.36±0.18				
90				1.91±0.04	1.11±0.1	1.95±0.05	4.77±0.03	4.67±0.2
120							3.93±0.04	3.69±0.03
150							3.12±0.01	3.5±0.01
180							3.08±0.02	2.97±0.01

\*días de almacenamiento



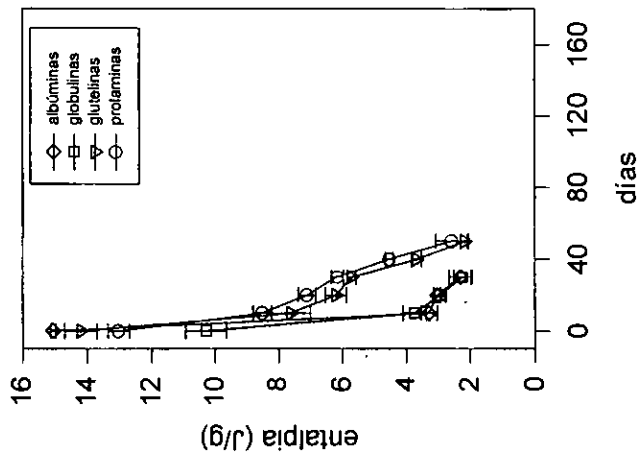
**Tabla 3.7 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ENTALPIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 10% DE CONTENIDO DE HUMEDAD**

Días*	$\Delta H$ (J/g)							
	40°C				20°C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas
0	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4	15.0±0.08	10.83±0.7	14.21±0.3	13.13±0.4
20	3.9±0.3	4.12±0.07	10.53±0.3	10.97±0.3				
40	2.9±0.2	3.01±0.1	6.98±0.2	9.5±0.05				
60	2.41±0.03	2.7±0.03	4.61±0.1	6.97±0.05	6.42±0.17	7.15±0.15	12.6±0.6	11.48±0.1
80			4.15±0.04	5.07±0.02				
100			3.05±0.02	3.5±0.03				
120			2.6±0.02	2.6±0.01	5.88±0.08	6.42±0.03	10.3±0.2	10.8±0.03
180					4.82±0.02	5.83±0.05	9.17±0.01	10.7±0.01

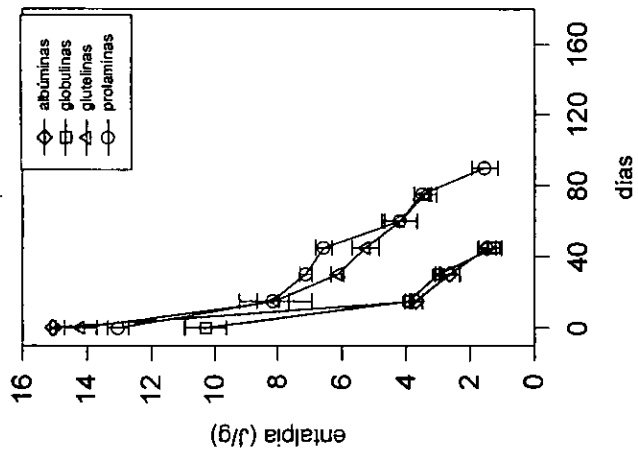
\*días de almacenamiento

### 3.5 Efecto de la temperatura de almacenamiento de 40°C sobre la entalpia de desnaturalización de las proteínas extraídas del maíz.

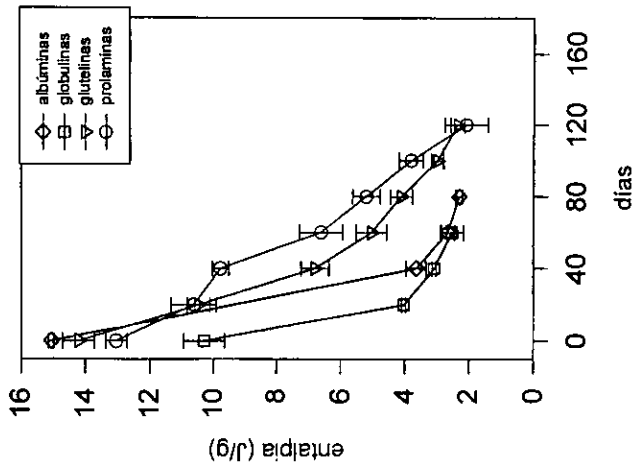
a) Humedad en el grano 18%



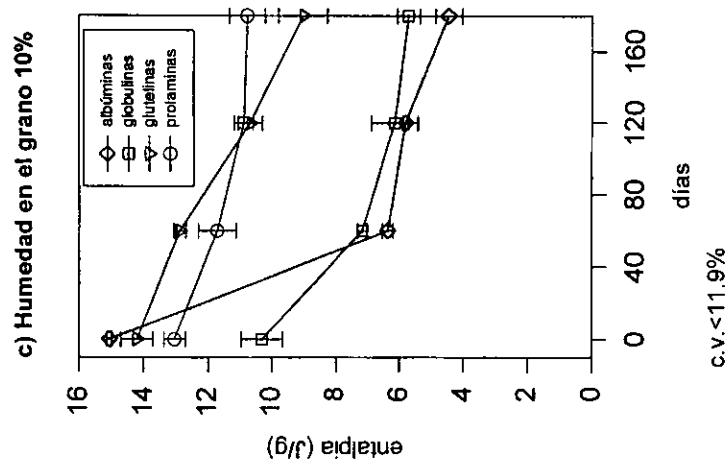
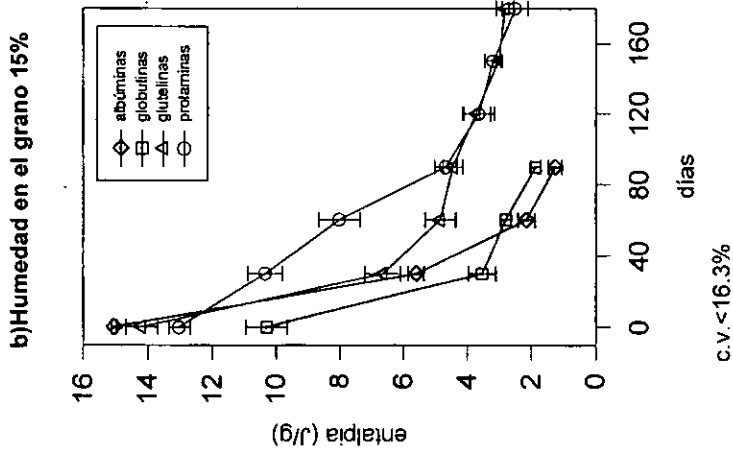
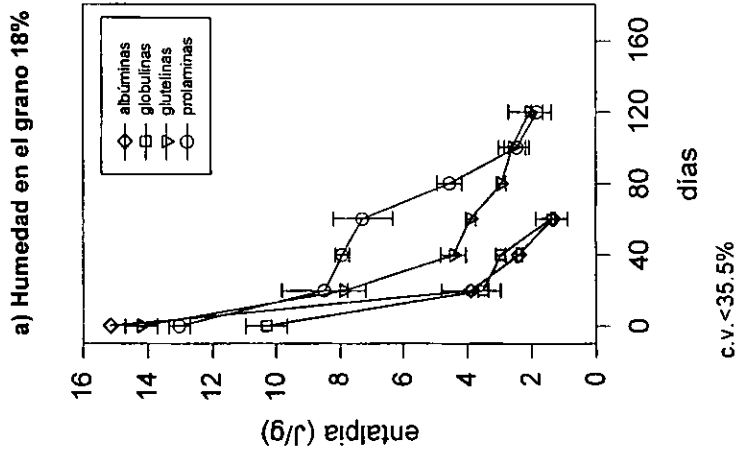
b) humedad en el grano 15%



c) humedad en el grano 10%



### 3.6 Efecto de la temperatura de almacenamiento de 20°C sobre la entalpia de desnaturalización de las proteínas extraídas del maíz.



El valor de la  $T^{1/2}$  es de importancia ya que aumenta su valor conforme la proteína parece desdoblarse. Enseguida se muestra este efecto.

Tabla 3.8 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA TEMPERATURA MEDIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 18 % DE CONTENIDO DE HUMEDAD

T <sup>1/2</sup> de desnaturalización								
Días*	40°C				20°C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas
0	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1
10	4.9±0.04	5.0±0.07	4.7±0.03	4.5±0.04				
20	4.6±0.07	6.5±0.05	5.2±0.06	3.5±0.4	3.0±0.5	5.3±0.07	2.6±0.8	4.3±0.01
30	6.0±0.03	6.8±0.02	5.0±0.1	1.0±0.5				
40			6.0±0.06	0.9±0.1	6.1±0.08	6.0±0.02	5.0±0.04	3.6±0.6
50			7.2±0.01	5.0±0.05				
60					5.5±0.7	7.9±0.08	5.7±0.02	5.5±0.1
80							5.8±0.01	6.5±0.07
100							5.5±0.6	7.0±0.4
120							5.8±0.1	5.0±0.8

\*días de almacenamiento

Tabla 3.9 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA TEMPERATURA MEDIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 15% DE CONTENIDO DE HUMEDAD.

T <sup>1/2</sup> de desnaturalización								
Días*	40 °C				20 °C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas
0	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1
15	5.1±0.01	6.5±0.02	0.8±0.05	4.9±0.02				
30	5.1±0.05	6.5±0.08	0.85±0.07	4.8±0.18	3.0±0.5	2.0±0.09	1.5±0.8	3.5±0.08
45	4.2±0.8	6.6±0.2	0.45±0.9	6.0±0.08				
60			5.9±0.01	7.0±0.05	5.5±0.04	6.5±0.01	4.0±0.01	9.4±0.01
75			6.0±0.05	6.0±0.04				
90				8.5±0.0.8	5.5±0.08	4.0±0.5	5.9±0.01	5.5±0.03
120							4.0±0.03	5.8±0.07
150							4.0±0.08	7.0±0.05
180							3.8±0.3	6.0±0.7

\*días de almacenamiento

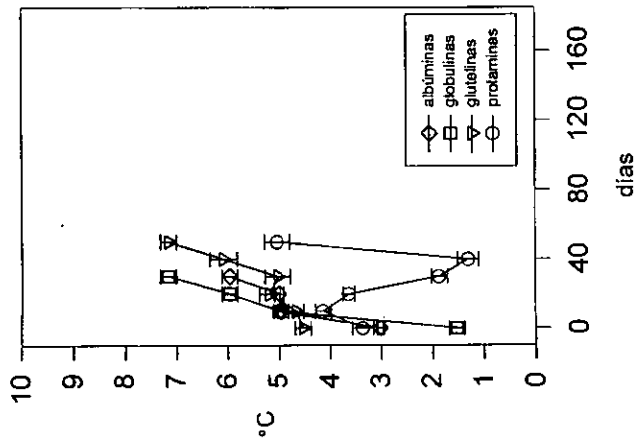
Tabla 3.10 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA TEMPERATURA MEDIA DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL MAÍZ CON 10% DE CONTENIDO DE HUMEDAD.

T ½ de desnaturalización								
Días*	40 °C				20°C			
	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas	albúmina	globulina	prolamina	glutelinas
0	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1	3.1±0.08	1.5±0.02	4.5±0.08	2.5±0.1
20	6.0±0.02	6.8±0.03	4.5±0.1	6.2±0.02				
40	5.7±0.05	6.6±0.1	5.7±0.02	6.0±0.2				
60	4.0±0.7	6.3±0.2	5.0±0.5	7.0±0.01	1.3±0.7	3.0±0.05	4.0±0.5	2.5±0.03
80			5.5±0.4	6.2±0.1				
100			6.8±0.01	6.5±0.1				
120			6.0±0.7	7.8±0.04	2.6±0.03	2.4±0.01	4.6±0.06	0.7±0.8
180					1.5±0.8	2.0±0.5	5.1±0.08	0.6±0.9

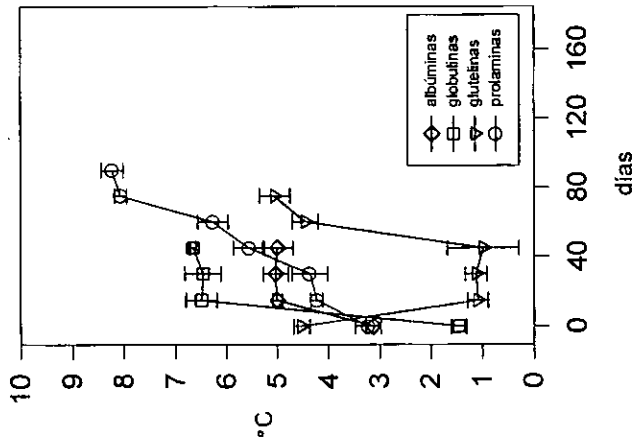
\*días de almacenamiento.

3.8 Efecto de la temperatura de almacenamiento de 40°C sobre la T<sup>1/2</sup> de desnaturalización de proteínas extraídas del maíz.

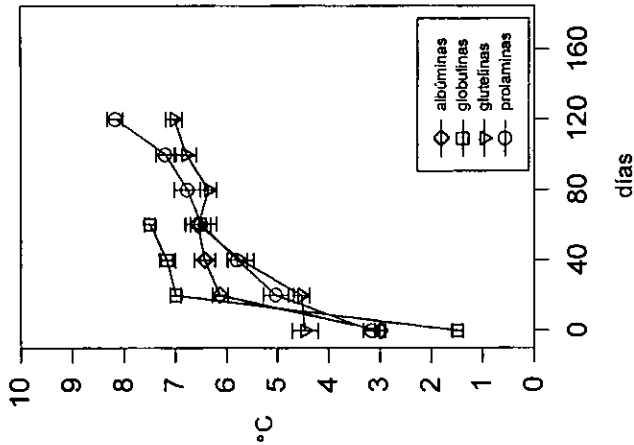
a) humedad en el grano 18%



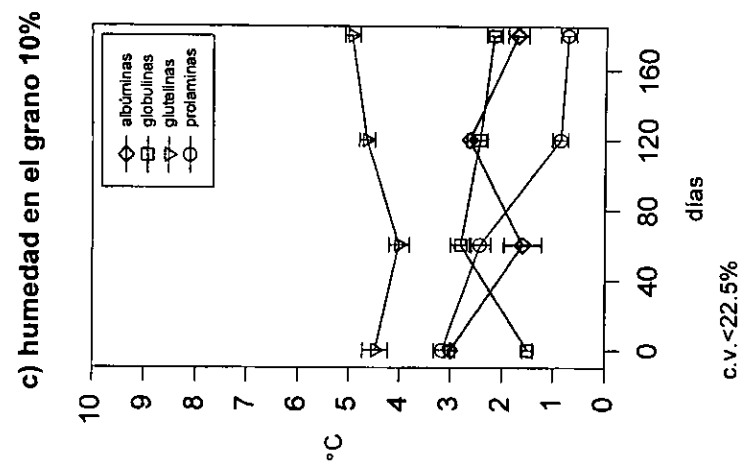
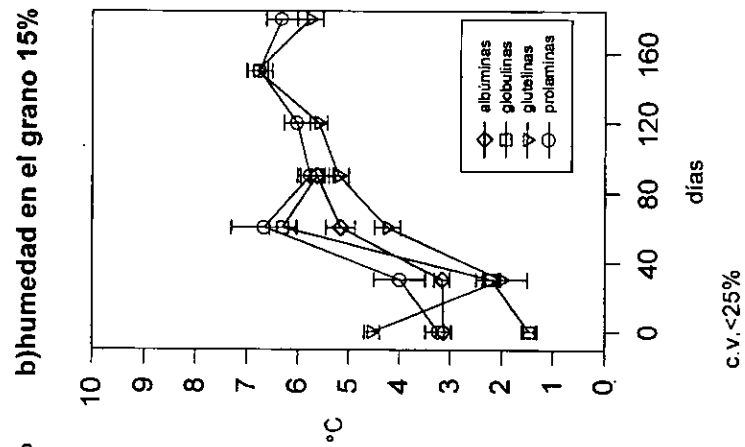
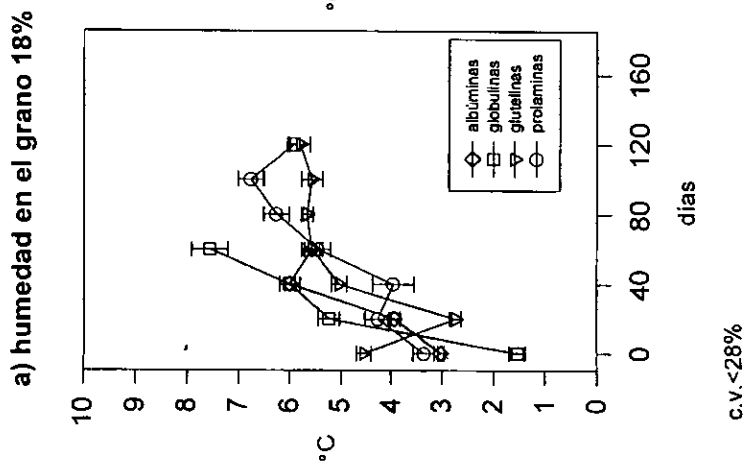
b) humedad en el grano 15%



c) humedad en el grano 10%



3.9 Efecto de la temperatura de almacenamiento de 20°C sobre la  $T^{1/2}$  de desnaturalización de proteínas extraídas del maíz.



Los resultados mostrados de  $\Delta H$  y  $T^{1/2}$  establecen modificaciones que se dan con mayor rapidez en las condiciones severas (40 °C y 18% de humedad en el grano), ya que a partir del día 10 de almacenamiento se pone de manifiesto una pérdida de la definición del registro debido a la transición de albúminas y globulinas. Así mismo, es importante señalar que a partir de este mismo día, se presentó una segunda transición y finalmente a los 40 días desapareció la respuesta térmica (figura 3.14A y 3.15A). Esto indica que el efecto de interacciones se ve favorecido en cortos tiempos.

Con el propósito de evaluar los efectos contra tiempo, se procedió a efectuar un análisis de rangos múltiples (apéndice tabla 1A). Que establecen que estos valores son significativamente diferentes a partir de los 10 días, cuando se compara con las fracciones control.

En la gráfica 3.5a, se observa como los valores entálpicos disminuyeron hasta en un 84 % a los 30 días con respecto a el control. Esta disminución se puede explicar por las interacciones hidrofóbicas que se ven favorecidas en estas condiciones. Estas pueden interaccionar con componentes no proteínicos contribuyendo a la porción exotérmica del valor de entalpia, bajando la entalpia observada. Es importante mencionar que el valor exotérmico se puede incrementar por reacciones de oxidación, por presencia de radicales oxidantes o interacciones hidrofóbicas (eventos comunes en estas condiciones, confirmadas por la presencia de los productos de deterioro de lípidos<sup>71</sup>).

En las gráficas 3.5a,b,c resalta la conducta por parejas de las 4 fracciones. En lo que respecta a albúminas y globulinas su respuesta fue muy similar tal vez por la semejanza en composición de aminoácidos polares.

Resulta interesante hacer notar que la  $T_d$  aumentó en un 15 % (tabla 6.4 del apéndice). Esto confirma las interacciones mencionadas ya que las proteínas mas estructuradas requieren de mayor temperatura para llevar a cabo la transición, es decir, al estar interaccionando con algún tipo de molécula, se afecta su estabilidad térmica. La prueba de



rangos múltiples (apéndice tabla 9A y 10A) establece diferencia significativa con el control a partir de 30 días de almacenamiento.

Las interacciones probables son principalmente con lípidos hidrolizados o incluso con los parcialmente oxidados, dando lugar a la presencia de segundas transiciones. Esto se infiere ya que en este ambiente de almacenamiento se comprobó, en el estudio fisicoquímico de lípidos, una acentuada disminución en la extracción de lípidos y un aumento significativo en el índice de peróxidos y de ácidos grasos libres a partir de los 20 días de almacenamiento.

Otro parámetro que apoya lo anterior es la solubilidad, la cual disminuyó en un 80% a los 60 días (tabla 6.2 del apéndice), lo que sugiere agregaciones de la molécula por interacciones entre ella misma o entre ésta y otros componentes, dificultando la extracción de estas fracciones proteínicas. En los estudios paralelos<sup>71</sup>, la prueba de Duncan para solubilidad, establece una diferencia con el testigo a partir de los 10 días de almacenamiento.

El efecto predominante, producto de estos cambios, es que se incrementa el valor de la  $T^{1/2}$  lo que demuestra una paulatina pérdida de la agudeza del pico de transición alcanzando formas achatadas o semiplanas; producto de la disgregación de las unidades que conforman la molécula (gráfica 3.8a,b,c).

De manera adicional, es importante comentar que al observar los atributos físicos en el grano almacenado en estas condiciones (figura 5), se hizo evidente el oscurecimiento que fue adquiriendo principalmente en el área del germen, donde se encuentra en mayor proporción el aceite, vitaminas y fracciones de albúminas y globulinas<sup>51</sup>. Este efecto se comprobó en los estudios mencionados<sup>71</sup>, midiendo los pigmentos generados, seguramente por reacciones de oscurecimiento no enzimático (Maillard), que se incrementaron a partir de los 50 días de almacenamiento.

Fig. 5. MAÍZ EN ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA DE 40°C Y DIFERENTES HUMEDADES

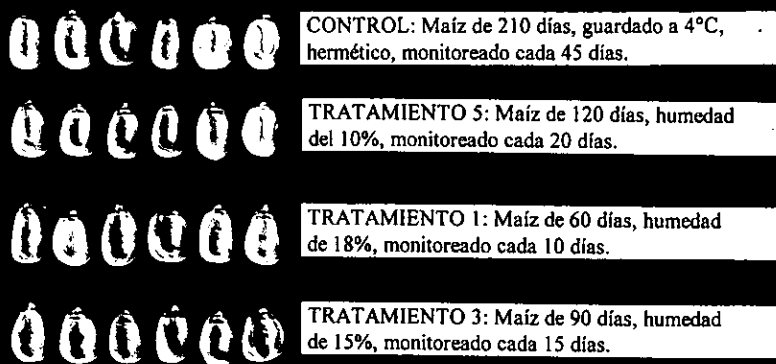


Figura 5

Por lo que respecta a las prolaminas y glutelinas, las curvas térmicas en las figuras 3.16A y 3.17A, revelan cambios en formas y áreas, dificultando la interpretación de éstos parámetros ya que reflejan la presencia de otras transiciones en el mismo rango de temperatura. De esta manera, se obtuvieron transiciones múltiples con valores alternantes de la  $T^k$  (gráficas 3.8b y 3.8b). Este efecto parece revelar división del área cooperativa de la entidad proteica originando transiciones independientes de diferentes partes de la molécula.

En estas proteínas, el efecto de interacción con lípidos es más acentuado debido a sus características predominantemente hidrofóbicas. De tal manera que hubo presencia de segundas transiciones a partir de los 10 días de almacenamiento en esta condición, posiblemente como respuesta de señales de componentes producto de estas interacciones. Esto se ve corroborado por la  $T_d$ , que aumentó en un 32% indicando mayor estructuración molecular.

En estas condiciones de tiempo, temperatura y humedad, las pruebas de deterioro de lípidos<sup>71</sup>, revelaron una mayor formación de peróxidos e hidroperóxidos, posiblemente por una participación indirecta de las enzimas lipolíticas que generaron ácidos grasos libres ahora más susceptibles a la oxidación. Debido a esto, entre otras causas ya mencionadas, la señal en los termogramas de las proteínas fue disminuyendo por cambios en la conformación, que pueden explicarse por la exposición de nuevos grupos reactivos, principalmente de naturaleza hidrofóbica, capaces de interactuar con los lípidos. Esto afectó a la extracción proteínica ya que la solubilidad disminuyó un 50 y 30 % respectivamente para estas fracciones, a los 60 días (tabla 6.2, apéndice). De esta manera la concentración proteica fue disminuyendo, limitando la cantidad de proteína que sufre desnaturalización y como consecuencia, la  $\Delta H$  sufrió un decremento del 85% a los 50 días de almacenamiento (gráfica 3.5a).

En la condición a **40°C con 15 % de humedad** en el grano, los efectos en los perfiles térmicos (figura 3.14B y 3.15B) y sus parámetros, fueron muy parecidos a la condición anterior, pero se dieron en mayor tiempo (estudio estadístico tabla 3Ay 4A). Por ejemplo, el  $\Delta H_d$  disminuyó 90% en 45 días y la  $T^{1/2}$  aumentó a partir de los 15 días (gráfica 3.5b y 3.8b).

Es decir, para las albúminas y globulinas, las segundas transiciones se presentaron a los 45 y 30 días respectivamente, como resultado de cambios conformacionales que exponen sus grupos hidrófobos y puede ser muy probable que tomen lugar interacciones con residuos de lípidos oxidados o intermediarios cambiando la polaridad de las macromoléculas, como consecuencia la solubilidad bajó en un 64% a los 90 días. Esto indica que las fracciones sufren el mismo daño ya que prácticamente es la misma respuesta que la condición anterior.

Las glutelinas y prolaminas presentaron perfiles térmicos muy complejos (fig. 3.16B y 3.17B), así como segundas transiciones a los 15 y 60 días, esto es indicativo de cambios conformacionales por establecimiento de nuevas interacciones, con incremento en la Td en la misma proporción que la condición anterior. Esto se ve apoyado por parámetros como la solubilidad la cual bajó 34 y 20 % respectivamente en 90 días, que puede indicar la potenciación de las interacciones proteína-proteína<sup>50</sup>. Como consecuencia de estos cambios en donde predominan las interacciones hidrofóbicas, la  $\Delta H_d$  disminuyó 85% en 90 días. En contraste, es interesante observar en las gráficas 3.5b,c que los valores de entalpia para prolaminas son mas altos que los de glutelinas. Esta conducta de las prolaminas probablemente se deba a que siendo moléculas muy hidrofóbicas, sean mas susceptibles de interaccionar con sus congéneres, los lípidos, principalmente en ambientes de mas baja humedad. Esto trae como consecuencia una mayor estructuración y un valor de entalpia mas alto que para las glutelinas, albúminas y globulinas. Algunos autores<sup>43</sup>, publican que de entre los eventos propiciados por interacciones, el incremento en Td puede indicar formación de complejos con amplitud (achataamiento) del perfil térmico de la proteína.

En la condición de **40°C y 10% de humedad** en el grano, se puede evidenciar el efecto de la temperatura. Los perfiles de las albúminas y globulinas en la figura 3.14C y 3.15C no muestran gran diferencia con las condiciones anteriores, desarrollaron segundas transiciones a los 80 y 60 días respectivamente y también sus parámetros se vieron afectados de forma similar.

La prueba de rangos múltiples demuestra la semejanza entre estos grupos Tabla 3A y 4A.

La temperatura es el factor promotor de la presencia de reacciones de autoxidación. Esta es una evidencia encontrada en el estudio paralelo<sup>71</sup>, que informa acerca de una diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) en el contenido de peróxidos debida a la temperatura de almacenamiento. En el estudio calorimétrico, estas reacciones pueden dar lugar a un aumento en la estabilidad térmica de la proteína y del almidón por su resistencia térmica y el intervalo mas amplio de desnaturalización así como por el aumento en el valor de Td.

Las albúminas y globulinas tienen fuerte afinidad para los lípidos polares y para los productos de su deterioro (peróxidos, ácidos grasos libres), por esto es muy probable que se

formen asociaciones ácidos grasos-proteína dando lugar a segundas transiciones, a un aumento de un 16% en la Td, y también cambian la polaridad de las moléculas provocando disminución de la solubilidad en un 53 % a los 120 días (tabla 6.2). En cuanto al  $\Delta H_d$ , este sufre una disminución en un 80% y 74% a los 60 días de almacenamiento (gráfica 3.5c), debido a esta serie de eventos, que ocasionan una disminución entre las fuerzas que mantienen la configuración en el grano. La consecuencia final es un aumento de la  $T^{1/2}$  de la transición (gráfica 3.8c).

Las prolaminas y glutelinas desarrollaron segundas transiciones a los 40 y 60 días respectivamente. De manera similar que para las fracciones anteriores, en esta condición se generan peróxidos que cambian el ambiente redox haciéndolo menos reductor. Las subunidades de las prolaminas (beta, gamma y delta), así como las glutelinas contienen aminoácidos sulfurados que pueden ser oxidados e incrementar los enlaces disulfuro (S-S) disminuyendo la facilidad a la extracción. Como consecuencia la solubilidad disminuyó en un 22 % a los 120 días (tabla 6.2 apéndice). Los grupos SH de los aminoácidos sulfurados, fácilmente donan el hidruro sufriendo rupturas homolíticas que dan origen a radicales que pueden participar con los originados por las reacciones de autooxidación de los lípidos. Esto puede dar origen a nuevos enlaces entrecruzados entre proteínas y lípidos. Además, puede explicar las segundas transiciones que se observan en la figura 3.16C y 3.17C. Al disminuir la solubilidad baja la concentración de la proteína extraída, por lo que se afectan los parámetros Td y  $\Delta H_d$  dependientes de la concentración (la gráfica 3.5c muestra como la  $\Delta H_d$  bajó en un 80% en 120 días). Sin embargo, la tabla 6.4 del apéndice muestra que la Td aumentó en un 15 y 20% respectivamente, posiblemente debido a la contribución estructural de los enlaces o interacciones entrecruzados. La gráfica 3.8c muestra el aumento en la  $T^{1/2}$ , indicando desdoblamiento y achatamiento de la molécula.

En la condición de 20°C y 18% de humedad, las albúminas y globulinas continúan presentando el mismo perfil achatado (figura 3.14D y 3.15D) y por consiguiente el valor de  $T^{1/2}$  es alto (gráfica 3.9a). Adicionalmente, se presentó una segunda transición a los 60 días, y

se estableció que a los 80 días hay una pérdida mayor de la conformación nativa de la proteína, como se demuestra por la ausencia de respuesta térmica.

En estados avanzados de almacenamiento, a los efectos antes mencionados se puede sumar las modificaciones en la estructura del agua, que en estas condiciones puede encontrarse más ordenada debido a la interacción con sitios hidrofóbicos. Como consecuencia se debilitan los contactos intramoleculares provocando que la tendencia al desdoblamiento de la proteína se incremente. A su vez, esto provoca la disminución de la  $\Delta H_d$  en un 90 % a los 60 días de almacenamiento al compar con el control (gráfica 3.6a). Esto probablemente se debe al aumento en intensidad de las interacciones mencionadas solo por efecto de la humedad. El análisis estadístico de los datos, en el estudio que se hizo en forma alterna<sup>71</sup>, mostró una influencia significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) debida a la humedad, que a la temperatura de almacenamiento. En este trabajo, sucede lo mismo, la humedad de almacenamiento propicia reacciones de hidrólisis por el acercamiento molecular dando lugar a modificaciones moleculares que se evidencian por los cambios en los perfiles, disminución del área de transición y ganancia en estabilidad térmica que indica la presencia de interacciones.

Sin embargo, no se puede disociar el efecto humedad-temperatura sobre los valores alcanzados durante este estudio.

El descenso evidente de la entalpia en condiciones de humedad alta, probablemente sea coadyuvado por efecto de hidrólisis de proteasas sobre fragmentos de proteínas principalmente en el embrión. La proteólisis durante el almacenamiento puede liberar dos o mas unidades cooperativas que pueden interaccionar con componentes no proteicos impactando a las formas transicionales así como a sus valores. Como se ha informado en otros estudios, las interacciones térmicas entre proteínas, carbohidratos y lípidos en alimentos son complicadas, ya que en condiciones favorecidas podemos encontrar grupos muy reactivos que pueden estar en alimentos como resultado de reacciones, por ejemplo, las de oxidación de lípidos no saturados, que en el embrión son los que están en mayor cantidad. El agua actúa como vehículo que facilita el contacto, propiciando las interacciones o la formación de entrecruzamientos dentro o entre las cadenas polipeptídicas<sup>50</sup>.

En esta condición, también aumentó la Td de albúminas y globulinas en un 20%. Esto se debe a que el agua asociada con la hidratación proteica, entre mas ordenada esté, mas energía se requiere para mobilizarla y esto puede influir en el proceso de desnaturalización originando que aumente la Td. Esto sugiere formación de agregados con una estructura ordenada compacta de peso molecular alto y elevada estabilidad térmica que influye en la solubilidad. Una de las vías de esta agregación puede ser por formación de puentes disulfuro que están relacionados con la ganancia de la estabilidad térmica<sup>74,75</sup>. Esto trae como consecuencia la disminución de la solubilidad en un 70% a los 120 días de almacenamiento (tabla 6.2 apéndice).

Las prolaminas y glutelinas en esta condición de almacenamiento, presentaron los perfiles que se ven en la figura 3.16D y 3.17D. En ambas hay desarrollo de una segunda transición a los 40 y 60 días respectivamente. En la gráfica 3.6a se muestra un decremento de la  $\Delta H_d$  de 90 % a los 120 días. Esto quiere decir que el efecto de la humedad sobre este tipo de proteínas tuvo menor intensidad que sobre las proteínas polares, ya que los valores de cambios entálpicos son mas altos para prolaminas que para glutelinas y proteínas polares. La explicación, como ya se mencionó anteriormente, es en base a la elevada hidrofobicidad de las prolaminas que en este ambiente de alta humedad, exponen sus residuos hidrofóbicos para interaccionar con los productos de degradación de lípidos principalmente con acidos grasos libres como producto de su hidrólisis. De ahí que también haya un ascenso más evidente de la  $T^{1/2}$  (gráfica 3.9a) para esta fracción.

Por otra parte, a medida que aumenta el agua en el cereal, se establece un efecto de dilución de los radicales generados, evitando así que las reacciones de autooxidación se intensifiquen; sin embargo como ya se mencionó, la lipólisis se puede ver favorecida por la presencia de agua y los ácidos grasos ahora libres, pueden presentar mayor susceptibilidad a la oxidación. Esto trae como consecuencia cambios en la solubilidad de estas fracciones ocasionando una disminución en la extracción de 50 y 30 % respectivamente con respecto a el control. En este ambiente de alta movilidad se inducen mas fácilmente las interacciones por el mayor acercamiento molecular, esto puede explicar el aumento de la Td en un 11 y 17% (tabla 6.4 apéndice), indicando aumento en la estabilidad térmica.

En la condición de 20°C y 15% de humedad, las albúminas y globulinas desarrollaron perfiles ligeramente más agudos que en las condiciones anteriores (figura 3.14E y 3.15E). Las segundas transiciones empezaron a manifestarse tardíamente a los 120 y 150 días. De igual manera, el agua manifestó su efecto sobre la conformación aumentando la tendencia al desdoblaje, ya que la entalpía bajó en un 92% a los 90 días (gráfica 3.6b) y la  $T^{1/2}$  muestra un incremento en la gráfica 3.9b. Estos cambios en los parámetros indican daño similar en estas fracciones, como en la condición anterior, por efecto de la humedad de almacenamiento. La mayor proporción de aminoácidos polares en estas fracciones las hace interactuar con mayor facilidad en los ambientes acuosos (que se demuestra pues la  $T_d$  aumentó en un 12 y 19% respectivamente por incremento de interacciones). Esto promueve las agregaciones entre ellas mismas con disminución de la solubilidad en un 47 % en 180 días (tabla 6.2 apéndice).

Las prolaminas y glutelinas desarrollaron perfiles que se muestran en la figura 3.16E y 3.17E, en ellos se observan segundas transiciones a los 120 y 150 días, lo cual indica un retraso en la aparición de efectos por interacciones ya que al parecer a menores contenidos de humedad, se presenta una mayor estabilidad frente a los cambios mencionados (tabla 1A y 2A del estudio estadístico  $p < 0.01$ ).

Esto se refleja en los parámetros como la entalpía la cual disminuyó en un 78% (gráfica 3.6b) y la  $T^{1/2}$  sigue presentando un incremento principalmente en la fracción de prolaminas. Como ya se mencionó, estas fracciones son ricas en aminoácidos sulfurados con grupos -SH que en este ambiente pueden transformarse en grupos -S-S-. Esto provoca disminución de la solubilidad que en esta condición fue de un 23% a los 180 días (tabla 6.2 apéndice), y aumento de la  $T_d$  en un 4%. En general, los efectos son los mismos pero se presentan a un tiempo más prolongado. Esto reitera el efecto deteriorante de la humedad que se mostró en la condición anterior.

Es importante mencionar que en todas las fracciones proteínicas en la condición de 20°C y 10 % de humedad se manifestaron transiciones con un área más grande y un perfil térmico parecido al que muestra el control (figura 3.14F, 3.15F). Hubo cambios conformacionales de



menor intensidad y la probabilidad de interactuar entre sí o con otros grupos reactivos resultantes del deterioro, fue menor. Estadísticamente esta condición es similar a el control y difiere hasta los 180 días de almacenamiento tablas 9Ay 10A.

Esto se refleja en los rendimientos de extracción más altos para albúminas y globulinas (la solubilidad bajó solo un 38%).

Los valores térmicos fueron similares a los del control. Sin embargo, la entalpia disminuyó en un 68% para albúminas y un 45 % para globulinas a los 180 días (gráfica 3.6c). Esto pone en evidencia que aún en estas condiciones menos severas, se producen cambios muy marcados en estas fracciones. Sin embargo, resalta el aspecto de mayor cooperatividad en la desnaturalización térmica en esta condición (gráfica 3.9c), lo que nos indica mayor agudeza en el perfil e intervalos de temperatura mas cortos.

Las prolaminas y glutelinas (figura 3.16F,3.17F) disminuyeron su solubilidad solo en un 13% a los 180 días, lo que indica mayor resistencia al daño que las proteínas polares. El cambio que sufrieron los parámetros calorimétricos fue menor al comparar con los valores del control (pruebas estadísticas tabla 8A y 9A apéndice).

El  $\Delta H_d$  bajó en un 35% y 18% respectivamente (gráfica 3.6c). Es evidente el valor mas alto que adquiere el cambio entálpico para estas fracciones que para las proteínas de tipo polar, lo cual puede indicar un cambio estructural menor durante el almacenamiento, argumento que se ve apoyado por el valor bajo que adquiere la  $T^{1/2}$ . En esta condición de almacenamiento, no hubo evidencia de segundas transiciones ni aumento de la  $T_d$  lo cual indica disminución de interacciones.

Es evidente que el daño sobre las proteínas del maíz debido a la temperatura y humedad alta (40°C y 18% de humedad) es sinérgico. Sin embargo, en este trabajo la humedad de almacenamiento, cuyo efecto se puede ver en la condición de 20°C y 18% de humedad, es factor principalmente responsable del rompimiento o establecimiento de nuevas interacciones.

El daño es más severo para las albúminas y globulinas que para las prolaminas y glutelinas (figura 6), debido a sus características predominantemente polares que las hace mas sensibles y reactivas a los efectos de humedad y temperatura estudiados. Esto se comprobó

por la mayor sensibilidad térmica mostrada por estas fracciones y evaluada por su Td menor (62 y 67°C) en comparación con la obtenida por las prolaminas y glutelinas (80 y 92°C).

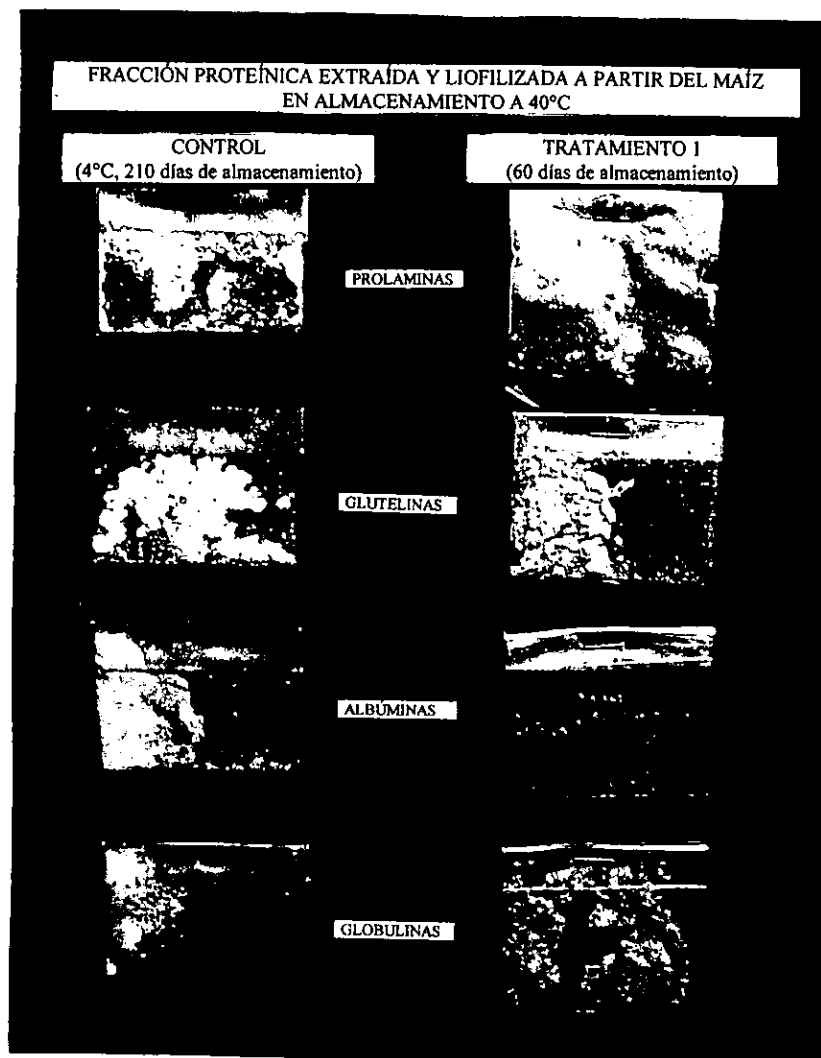


Figura 6.

### 3.2.2 Determinación de las características térmicas del almidón.

Una de las propiedades físicas que afectan esta molécula es la gelatinización, el cual es un proceso inducido térmicamente en el que se involucran la formación y/o ruptura de enlaces o interacciones inter e intramoleculares que son detectables por DSC y dan lugar a procesos endotérmicos. Los parámetros calorimétricos obtenidos de la gelatinización y manejados con el programa del software para conocer los cambios de la transición fueron: cambio entálpico ( $\Delta H_g$ ) en J/g y temperatura máxima (T<sub>g</sub>).

#### 3.2.2.1 Resultados calorimétricos de la fracción de almidón del maíz control H447.

Los perfiles térmicos obtenidos para el almidón se muestran en la figura 3.18. En ella se observan diferencias debidas a la gelatinización, con simetría y forma achatada que se mostró igual a lo largo del período de almacenamiento.

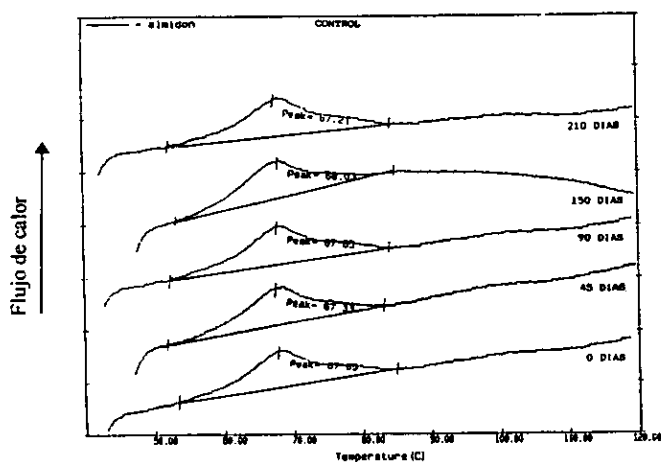


Figura 3.18

La anchura o achatamiento de la endoterma sugiere una mezcla heterogénea por la presencia de amilosa y amilpectina en los gránulos. Adicionalmente se encontró que la T<sub>g</sub> del maíz

control H 447 fue de 67°C, valor que fue similar con la Tg de 67.3°C que se ha publicado para maíz alto en amilopectina y rico en zonas amorfas y además con la Tg de 68°C para almidón extraído de maíz normal, en condiciones de laboratorio<sup>21,55</sup>. Los resultados calorimétricos de esta fracción control se muestran en la tabla 6.5 del apéndice, debido a que no se apreció ningún cambio en estos valores (estadísticamente no hay cambio 1A apéndice).

### **3.2.2.2 Resultados calorimétricos de la *fracción de almidón* del maíz almacenado a 40 y 20 °C, con 18, 15 y 10% de humedad.**

Los cambios en la fracción de almidón por exposición a la temperatura y humedad de almacenamiento se evaluaron mediante sus perfiles calorimétricos. La figura 3.19, muestra los cambios obtenidos para cada una de las condiciones de temperatura. El efecto general es una ligera disminución en el área de transición cuando se compara con el control.

De acuerdo con los resultados térmicos, se establece que la fracción de almidón sufre menos modificación en sus perfiles, que el componente proteínico.

Los parámetros de entalpia y Tg que cuantifican los cambios cualitativos de los perfiles térmicos, se muestran en las tablas 4.1 y 4.2 así como gráficamente para una mejor apreciación.



Tabla 4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ENTALPIA DE GELATINIZACION DE ALMIDÓN DEL MAÍZ CON DIFERENTES CONTENIDOS DE HUMEDAD

*Días	Entalpia de gelatinización (J/g)					
	40 °C			20 °C		
	Contenido de humedad			Contenido de humedad		
	18 %	15 %	10 %	18 %	15 %	10 %
0	3.98±0.03	3.98±0.03	3.98±0.03	3.98±0.03	3.98±0.03	3.98±0.03
10	3.35±0.01					
15		3.41±0.05				
20	3.03±0.05		3.35±0.01	3.35±0.07		
30	2.95±0.01	3.03±0.02			3.65±0.02	
40	2.84±0.02		3.25±0.07	3.16±0.05		
45		2.92±0.07				
50	3.03±0.02					
60	2.92±0.01	3.0±0.03	3.3±0.01	2.93±0.01	3.0±0.07	3.84±0.07
75		2.68±0.02				
80			3.09±0.02	2.66±0.05		
90		2.61±0.01			3.15±0.01	
100			2.84±0.06	2.53±0.02		
120			2.8±0.08	2.34±0.03	3.0±0.03	3.82± 0.04
150					2.63±0.02	
180					2.43±0.06	3.77±0.02

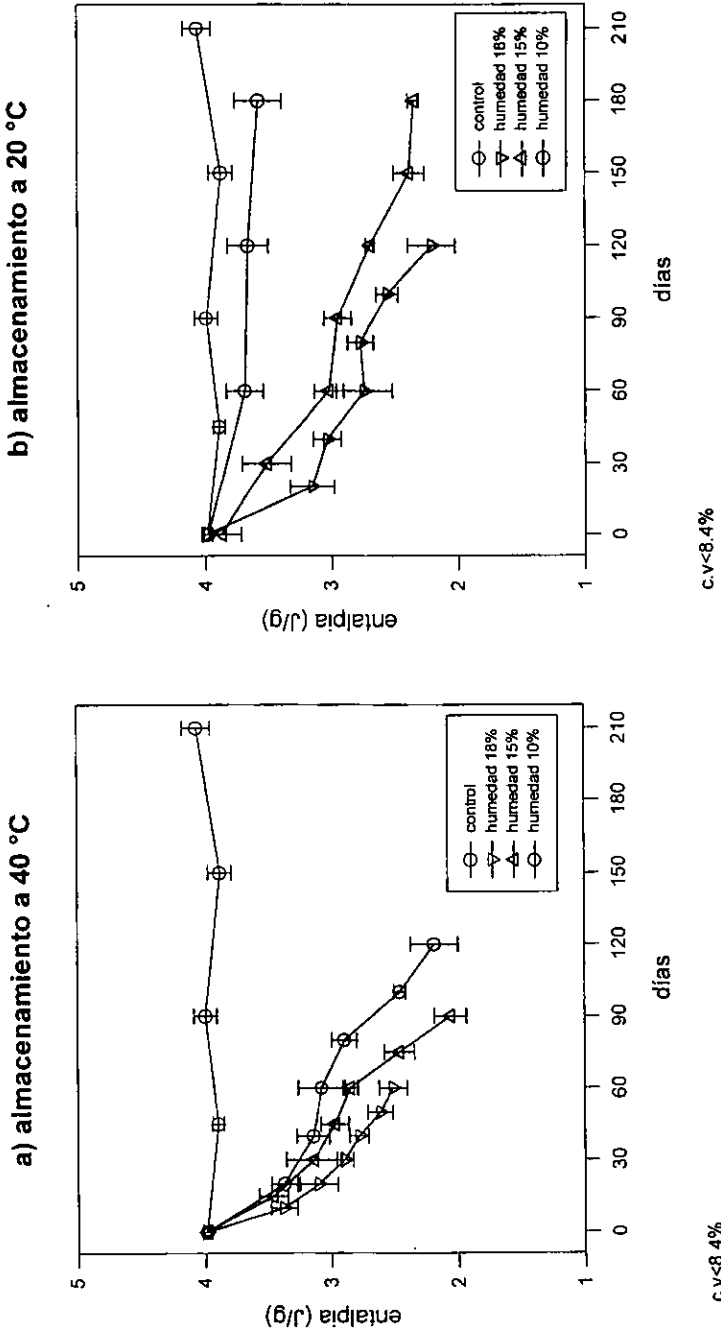
n=3, \*días de almacenamiento.

Tabla 4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA TEMPERATURA MÁXIMA DE GELATINIZACION DE ALMIDÓN DEL MAÍZ CON DIFERENTES CONTENIDOS DE HUMEDAD.

*Días	Tg (°C)					
	40 °C			20 °C		
	Contenido de humedad			Contenido de humedad		
	18 %	15 %	10 %	18 %	15%	10 %
0	67.6±0.05	67.6±0.05	67.6±0.05	67.6±0.05	67.6±0.05	67.6±0.05
10	70.2±0.03					
15		68.9±0.1				
20	69.2±0.08		70.2±0.03	68.1±0.09		
30	70.4±0.02	70.1±0.02			69.3±0.02	
40	69.2±0.04		70.3±0.02	68.8±0.04		
45		69.1±0.05				
50	70.1±0.03					
60	69.1±0.05	69.3±0.03	70.2±0.01	68.0±0.07	67.5±0.08	68.1±0.07
75		69.3±0.06				
80			69.7±0.03	67.0±0.8		
90		69.1±0.05			67.9±0.01	
100			68.7±0.04	68.3±0.06		
120			68.9±0.02	67.5±0.4	67.7±0.06	68.0±0.06
150					67.7±0.03	
180					66.0±0.08	68.3±0.03

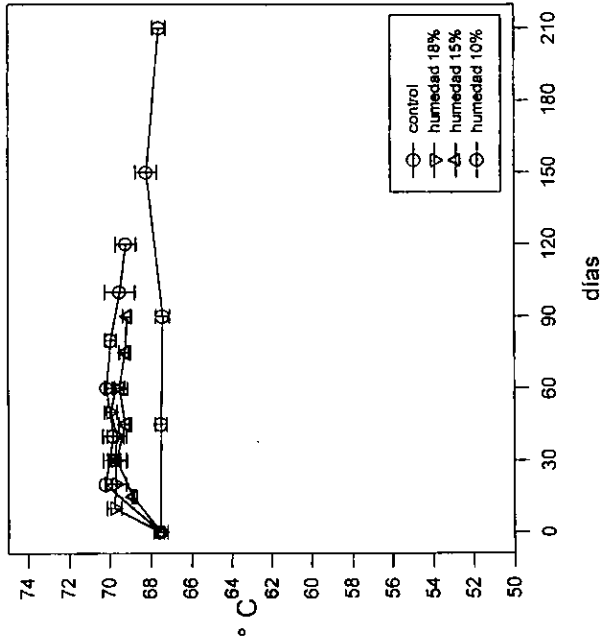
n=3, \*días de almacenamiento.

4.1 Efecto de la humedad y temperatura durante el almacenamiento del grano de maíz sobre la entalpia de gelatinización del almidón.



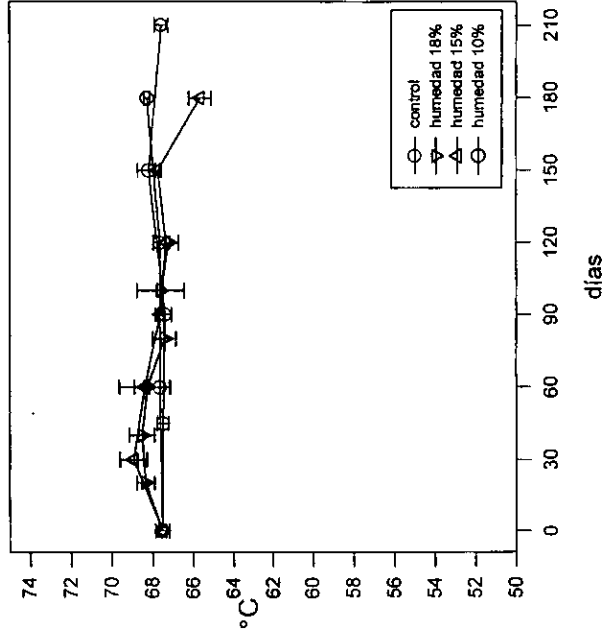
4.2 Efecto de la humedad y temperatura durante el almacenamiento del grano de maíz sobre la temperatura máxima de gelatinización del almidón.

a) almacenamiento a 40 °C



c.v.<1.07%

b) almacenamiento a 20 °C



c.v.<2.3%



En la condición a 40°C y 18% de humedad, se observa un achatamiento progresivo de la transición y la presencia de segundas transiciones que aparecen a los 30 días (figura 3.19A). La gráfica 4.1a presenta disminución del  $\Delta H_g$  en un 26 % a los 60 días. La causa que provoca estos cambios y por consiguiente las modificaciones de áreas de transición es probablemente un reordenamiento molecular motivado por el agua y la presencia de otros constituyentes que interaccionan con el almidón propiciando mayor estructuración. Esto puede ser muy probable ya que en las pruebas fisicoquímicas<sup>71</sup> efectuadas al maíz estudiado, en el mismo período de almacenamiento, se detectó un incremento considerable de peróxidos, ácidos grasos libres, grupos amino y carboxilo que pudiesen estar interaccionando con la amilosa. La formación de complejos con la amilosa puede ocasionar cambios en la organización de hélices dando lugar a agregaciones que denotan su presencia por la aparición de segundas transiciones en el perfil, esto se refleja en la  $T_g$  que aumenta hasta 70°C (un 2%, gráfica 4.2a). Otras moléculas presentes en cantidades considerables, como la glucosa y los iones fosfato, pueden interaccionar con la amilosa<sup>69</sup>.

Las amilasas pueden activarse en las condiciones de humedad alta, propiciando aumento de monosacáridos que pueden interaccionar con grupos amino<sup>69</sup>. La evidencia se ve confirmada por el grado de empardeamiento no enzimático detectado por las pruebas fisicoquímicas mencionadas y por la apariencia que el grano y el almidón aislado manifiestan en este estadio de almacenamiento (figuras 5 y 7).

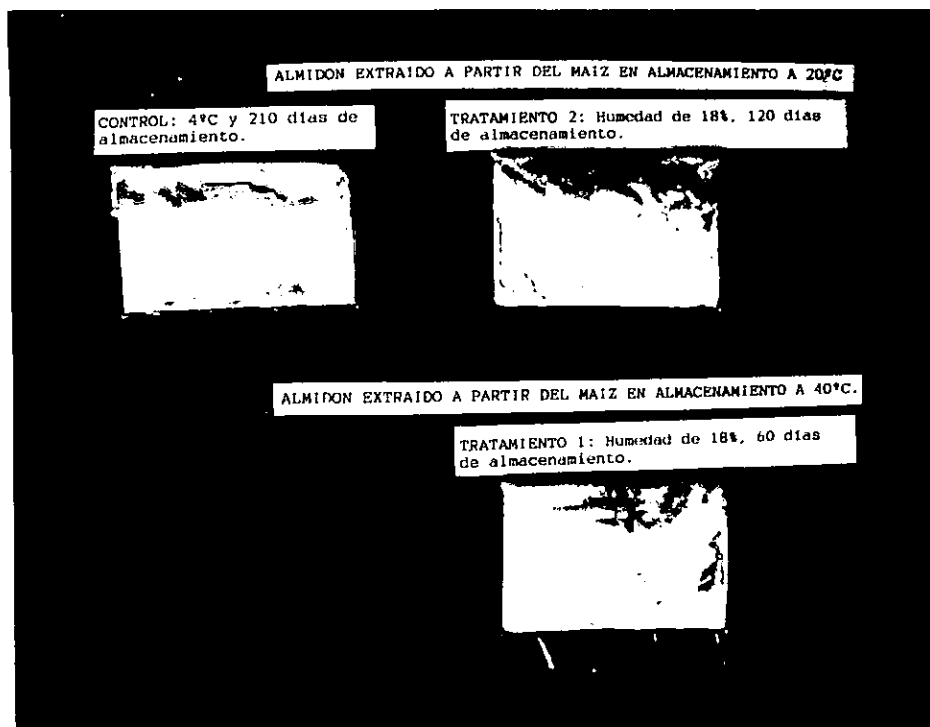


Figura 7.

En la condición de **40°C y 15% de humedad**, se presentó una segunda transición a los 90 días de almacenamiento (figura 3.19B), lo que sugiere que el efecto de interacción se manifiesta en forma tardía cuando se compara con la condición anterior (prueba de Duncan, tabla 5A apéndice). Sin embargo, la cantidad de agua presente en esta condición, es suficiente para hidratar parcialmente las zonas amorfas de los gránulos. La temperatura facilita la difusión dentro de las cadenas hinchando el gránulo; esto crea solo un cierto grado de desorden de tal manera que hay disminución del  $\Delta H_g$  en un 34% a los 90 días (gráfica 4.1a). La formación de este conglomerado por la participación de las interacciones antes

mencionadas, probablemente ocasiona que la  $T_g$  aumente en la misma cantidad que la condición anterior.

En la condición de **40°C y 10% de humedad** (figura 3.19C), ocurrió solo la manifestación de una desestabilización parcial por efecto de la temperatura sobre las cadenas (zonas amorfas y cristalinas), favoreciendo una estructura compacta, ya que la  $T_g$  aumentó al igual que en las condiciones anteriores. La cantidad de agua presente no es suficiente para permitir un acercamiento intramolecular por lo que la interacción con otros componentes no amiláceos no es muy probable, de tal forma que no se desarrollaron segundas transiciones. Así mismo, los efectos como la disminución del  $\Delta H_g$  en un 27% tardan en manifestarse (120 días, gráfica 4.1a) (prueba estadística tabla 5A).

En la condición a **20°C y 18% de humedad**, se obtuvieron áreas mas pequeñas que en las condiciones anteriores (figura 3.19D), de tal manera que el  $\Delta H_g$  bajó en un 40 % a los 120 días (gráfica 4.1a), con respecto al valor del control. Esto manifiesta un efecto severo de carácter físico mas que químico dado por la humedad, ya que en esta condición de almacenamiento, no se desarrollaron segundas transiciones y no aumentó la  $T_g$ . La explicación mas probable es el efecto de hidratación e hinchamiento del gránulo, principalmente en la parte amorfa donde el agua puede interaccionar con mayor facilidad a través de puentes de hidrógeno. Cabe recordar que la amilopectina es la molécula composicional mayoritaria en el gránulo de almidón y por lo tanto, la variación en la estructura puede modificar el endospermo y resultar en gránulos de almidón con diferentes propiedades térmicas. Los gránulos se hidratan con el consecuente aumento de volumen y la toma de agua por los polisacáridos reduce la adhesión intracelular lo que resulta en una disminución de la firmeza del grano<sup>76</sup>. La hidratación disminuye la estructuración de las macromoléculas favoreciendo su transición en el calentamiento, lo que se traduce en un valor entálpico menor.

Biliaderis<sup>55</sup>, recomienda utilizar el valor que adquiere la  $T_g$  para caracterizar almidones ya que un cambio refleja modificaciones marcadas en la organización granular y en la cristalinidad.

La condición a 20°C y 15% de humedad (figura 3.19E) presentó perfiles muy similares a los anteriores. Sin embargo, la entalpia (gráfica 4.1b) disminuyó ligeramente tal vez debido a que la desestabilización de las zonas amorfa y cristalina fue menor. Esta disminución se presentó de forma similar a la condición anterior pero a los 180 días y la Tg no pareció afectarse. Es decir, se presentan los mismos cambios pero en tiempos mas prolongados. La prueba de rangos múltiples de Duncan confirma este comportamiento en la tabla 5A (apéndice).

En la condición de 20°C y 10% de humedad, los perfiles térmicos fueron muy similares al control (figura 3.19F). La tabla 11A de rangos múltiples (apéndice) establece que se requieren 100 o más días para que se establezca una diferencia con el control. Al parecer, este tratamiento no desestabilizó a los componentes del gránulo ya que la  $\Delta H_g$  bajó ligeramente un 5% a los 180 días (gráfica 4.1b), y la Tg no se afectó, lo que indica un mínimo efecto sobre la estructura del almidón.

En las condiciones de 20°C y 10 -15 % de humedad, no hubo un daño apreciable debido a modificaciones químicas, lo cual en gran medida puede asegurar propiedades adecuadas en el grano, que permitan su industrialización. Sin embargo, los resultados hasta aquí discutidos muestran deterioro en todas las condiciones de almacenamiento. Este deterioro es más acentuado sobre las albúminas y globulinas, ya que por sus características de afinidad a compuestos polares y neutros son muy susceptibles a formar asociaciones impidiendo con esto, la disponibilidad nutricional de aminoácidos o ácidos grasos esenciales. Esta situación se torna más difícil al considerar que estos componentes esenciales están presentes en cantidades limitantes. Una vía de pérdida de ácidos grasos insaturados es debido a la autoxidación, que se presentó en las condiciones de almacenamiento que se trabajaron aun en presencia de antioxidantes naturales en el grano.

Por otra parte, al afectarse la globulina también se afecta su mecanismo de activación para la germinación de la semilla, dando lugar a pérdida de la viabilidad.

El análisis de resultados demuestra que el efecto de la humedad de almacenamiento sobre las macromoléculas aisladas fue mayor que el de la temperatura, tal vez por esto la práctica común en algunas regiones es el secado del grano al sol hasta tener del 10-12 % de humedad que miden de forma empírica y posterior almacenamiento sin control del tiempo ni de la temperatura. Alcanzar y mantener estas condiciones "benignas" es difícil sin una infraestructura, situación que se agrava debido a fenómenos climatológicos como el del "niño". Debido a esto, el tiempo de almacenamiento podría ser un factor de control fácil y económico sobre todo en las zonas rurales, ya que en este trabajo se muestra que el grano con un contenido de humedad de 10% al 15% y con temperatura ambiental de 20°C muestra respuestas térmicas que revelan pocos cambios en las proteínas a los 180 y 30 días respectivamente. Condiciones de 18% de humedad y 20°C implican movimiento del grano en un tiempo no mayor de 20 días para asegurar la calidad integral del maíz. El estudio demuestra que a condiciones de 40°C a cualquier intervalo de humedad experimentado, el maíz sufre un severo daño en menos de 10 días, por lo que bajo estas condiciones el consumo o industrialización deberá ser inmediato. Sin embargo, es necesario conocer los cambios térmicos en las humedades y temperaturas de almacenamiento intermedias (12 y 13% de humedad y temperaturas de 25 y 30°C) para tratar de construir zonas de seguridad y de deterioro por medio de datos calorimétricos que brinden mas información para el almacenamiento del grano como lo hizo Chung<sup>13</sup> con los isoterms.

Desde el punto de vista de tecnología, este estudio puede brindar información a cerca de las temperaturas que se deben manejar cuando se utilice este grano para algún proceso que involucre calor.

Todavía existe mucho por hacer ya que sería de interés conocer la disponibilidad de lisina en las proteínas con carácter polar, evaluar el grano en su poder germinativo tal vez enfocando el estudio sobre la funcionalidad de la globulina o realizar estudios más profundos sobre el almidón y lípidos para identificar completamente la historia térmica del maíz.

#### IV. CONCLUSIONES.

-Se considera que hay evidencia de cambios conformacionales de macromoléculas del maíz en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas.

-Los indicadores calorimétricos se vieron sensiblemente modificados principalmente en las fracciones proteínicas. Los valores de  $\Delta H_d$  de 14.2 y 13.1 J/g disminuyeron un 85 y 78% en 50 días para las proteínas hidrofóbicas (prolaminas y glutelinas) y en solo 30 días para las polares (albúminas y globulinas).

-La transición debida a gelatinización se vio ligeramente afectada posiblemente por una desestabilización del gránulo en las condiciones más extremas, de tal forma que el  $\Delta H_g$  de 3.98J/g disminuyó en un 37% en 60 días.

-La Td. aumentó de 80.2 a 106°C y la de gelatinización de 67 a 70°C lo que indica un cambio en sus propiedades térmicas y por consiguiente en la funcionalidad normal de éstas macromoléculas.

-La solubilidad de albúminas y globulinas disminuyó en un 80% en 60 días de almacenamiento; la de las prolaminas y glutelinas se redujeron en 50 y 30% respectivamente. Esto trae como consecuencia modificaciones en las proteínas que obedecen esencialmente a efectos de agregación y nuevas interacciones entre ellas o con otros componentes.

-Como consecuencia, estas modificaciones provocan la baja disponibilidad de ciertos aminoácidos como la lisina y ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico indispensables y limitantes en cereales, disminuyendo el valor nutritivo del maíz.

-En la semilla hay pérdida de viabilidad ya que los componentes en el embrión se ven directamente afectados por las reacciones de oscurecimiento.

-Se encontró que aún en las condiciones menos severas de almacenamiento, las proteínas pierden su conformación nativa, sobre todo las fracciones con predominios polares.

-En la condición de 20°C y 10 % de humedad en el grano se obtuvieron los mismos resultados que en las otras condiciones de almacenamiento, pero a más de 180 días de almacenamiento. Probablemente sea difícil el control de estas condiciones pero el grano puede durar mucho tiempo sin que se afecte en gran medida su calidad.

-Se estableció que a través de estudios calorimétricos es posible conocer la historia de almacenamiento en el maíz y que eventualmente, la metodología puede ser aplicada a otros granos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Centro de Estadística Agropecuaria. 1997. Importaciones agroalimentarias anuales. SAGAR. México.
2. Moreno Martínez E. 1984. "Los problemas de la conservación de granos y semillas en México". Ciencia y Desarrollo. 58: 9-17.
3. Moreno Martínez E. 1991. "Almacenamiento y conservación de granos y semillas". Programa Universitario de Alimentos. México-UNAM.
4. Onigbinde A.O., y Akinyele I.O. 1988. "Biochemical and Nutritional Changes in Corn (*Zea mays*) during Storage at Three Temperatures". J. Food Sci. 53:117-123
5. Onigbinde A.O. y Akinyele I.O. 1990. "Compositional and Protein Digestibility Changes in Maize (*Z. mays*) and Cowpea (*V. unguiculata*) after Storage at Ambient Conditions". Food Chem. 36:315-321.
6. Lorenz K and Kulp K. 1981. "Heat-Moisture Treatment of Starches. II. Functional Properties and Baking Potential". Cereal Chem. 58:49-52.
7. Lupano C. E. and Añón M. C. 1986. "Denaturation of Wheat Germ Proteins During Drying". Cereal Chem. 63:259-262.
8. Barros C. y Buenrostro M. 1997. "El maíz, nuestro sustento". Arqueología Mexicana. 25:4-73.
9. Zayas J.F. and Lin C.S. 1989. "Emulsifying Properties of Corn Germ Proteins". Cereal Chem. 66:263-267.
10. Kent -Jones D.W. and Amos A.J. 1967. Modern Cereal Chemistry. Sixth Ed. Food Trade Press LTD. London.
11. Norma Oficial Mexicana. NOM-FF-34-1982. Productos Alimenticios no Industrializados para Uso Humano-Cereales-Maíz (*Zea mays*).
12. Esen A. 1980. "Estimation of Protein Quality and Quantity in Corn (*Zea mays L.*) by Assaying Protein in Two Solubility Fractions" J. Agric. Food Chem. 28:529-532.
13. Stanley A. W. and Ramstad P. E. 1987. Corn Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul Minnesota, USA.
14. Mestres C., Louis-Alexandre A., Matencio F. and Lahlou A. 1991. "Dry-Milling Properties of Maize". Cereal Chem. 68:51-56.

15. Paiva E., Kriz A.L., Peixoto M.J.V.V., Wallace J.C. and Larkins B.A. 1991. "Quantitation and Distribution of Gamma-Zein in the Endosperm of Maize Kernels". *Cereal Chem.* 68:276-279.
16. Rongsheng R. and Litchfield J.B.1992. "Determination of Water Distribution and Mobility Inside Maize Kernels During Steeping Using Magnetic Resonance Imaging". *Cereal Chem.* 69:13-17.
17. O Dell B. L. and Boland A. 1976. "Complexation of Phytate With Proteins and Cations in Corn Germ and Oilseed Meals. *J. Agric. Food Chem.* 24:804-808.
18. Pomeranz Y. 1987. *Modern Cereal Science and Technology*. VCH Publishers. Nueva York Inc, USA.
19. Landry J. and Moureaux T. 1980. "Distribution and Amino Acid Composition of Protein Groups Located in Different Histological Parts of Maize Grain". *J. Agric. Food Chem.* 28:1186-1191.
20. Baudet J., Huet J-C. and Mossé J. 1986. "Variability and Relationships among Amino Acids and Nitrogen in Maize Grains". *J. Agric. Food Chem.* 34: 365-370.
21. Dombrink-Kurtzman M.A. and Bietz J. A. 1993. "Zein Composition in Hard and Soft Endosperm of Maize". *Cereal Chem.* 70:105-108.
22. Mannheim A. and Cheryan M. 1993. "Water-Soluble Zein by Enzymatic Modification in Organic Solvents". *Cereal Chem.* 70:115-121.
23. Belitz H. D., Kieffer R., Seilmeier W. and Wieser H. 1986. "Structure and Function of Gluten Proteins". *Cereal Chem.* 63:336-341.
24. Freeling M. and Walbot V. 1994. *The Maize Handbook*. Ed. Springer-Verlag. New York Inc. EUA.
25. Paulis W.J. 1981. "Disulfide Structures of Zein Proteins from Corn Endosperm". *Cereal Chem.* 58:542-546.
26. Esen A., Bietz J. A., Paulis J. W. and Wall J. S. 1981. Fractionation of Alcohol-Soluble Reduced Corn Glutelins on Phosphocellulose and Partial Characterization of Two Proline-Rich Fractions". *Cereal Chem.* 58:534-537.
27. Wall J. S., Cooker L. A. and Bietz J. A. 1988. "Structure and Origin of Maize Endosperm Alcohol-Insoluble Glutelin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 722-728.



28. Wu Y. V., Paulis J. W., Sexson K. R. and Wall J. S. 1983. "Conformation of Corn Zein and Glutelin Fractions with Unusual Amino Acid Sequence". *Cereal Chem.* 60:342-344.
29. Zawistowska U., Bekes F. and Bushuk W. 1985. "Involvement of Carbohydrates and Lipids in Aggregation of Glutenin Proteins". *Cereal Chem.* 62:340-345.
30. Warner D. A., Grove M. J. and Knutson C. A. 1991. "Isolation and Characterization of  $\alpha$ -Amylases from Endosperm of Germinating Maize. *Cereal Chem.* 68:383-389.
31. Dorsey-Redding C., Hurburgh Ch. R., Johnson L. A. and Fox S. R. 1991. "Relationships Among Maize Quality Factors". *Cereal Chem.* 68: 602-605.
32. Clayton T.A. and Morrison W.R. 1972. "Changes in Flour Lipids During the Storage of Wheat Flour". *J. Sci. Food Agric.* 23:721-736.
33. Tannenbaum S.R. 1979. "Nutritional and Safety Aspects of Food Processing". Dekker Marcel Inc. Nueva York.
34. Peplinski A. J., Paulis J. W., Bietz J. A. and Pratt R. C. 1994. "Drying of High-Moisture Corn: Changes in Properties and Physical Quality". *Cereal Chem.* 71:129-133.
35. Weller C. L., Paulsen M. R. and Mbuvi S. 1989. "Germ Weight, Germ Oil Content, and Estimated Oil Yield for Wet-Milled Yellow Dent Corn as Affected by Moisture Content at Harvest and Temperature of Drying Air". *Cereal Chem.* 66:273-275.
36. Pixton S.W., Warburton S. y Hill S.T. 1975. "Long-term Storage of Wheat-III: Some Changes in the Quality of Wheat Observed During 16 Years of Storage". *J. Stored Prod. Res.* 11:177-185.
37. Dollimore D. 1992. "Thermal Analysis". *Anal. Chem.* 64:147R- 153R.
38. Harwalkar M. A. and Ma C. Y. 1990. *Thermal Analysis of Foods*. Elsevier applied Food Sci. Series. USA.
39. Murray E.D., Arntfield S.D., and Ismond M.A.H. 1985. "The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality II. Factors Affecting Thermal Properties as Analyzed by Differential Scanning Calorimetry". *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18:158-162.
40. Arntfield S. D. and Murray E.D. 1981. "The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as a Indicator of Protein Denaturation". *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 14:289-294.
41. Wang Y. J., White P. and Pollak L. 1992. Thermal and Gelling Properties of Maize Mutants from the OH43 Inbred Line. *Cereal Chem.* 69:328-334

42. Sosulski F. W., Hoover R., Tyler R.T., Saskatoon T. and Murray E. D., Arntfield S. D. 1985. "Differential Scanning Calorimetry of Air-Classified Starch and Protein Fractions from Eight Legume Species. *Starch/Stärke* 37:257-262.
43. Wright D. J. 1982. Application of Scanning Calorimetry to the Study of Protein Behaviour in Foods. *Developments in Food Proteins*. Ed. B.J.F. Hudson. Applied Sci. Publishers Inc. Ingleterra.
44. Ma C. Y., and Harwalkar V. R. 1991. "Thermal Analysis of Food Proteins". *Advances in Food and Nutrition Research*. 35:317-367.
45. Wootton M., Nguyen T. H. and Hoang L. P. T. 1981. "A Study of the Denaturation of Egg White Proteins during Freezing Using Differential Scanning Calorimetry". *J. Food Sci.* 46:1336-1338.
46. Otamiri M., Adlercreutz P. and Mattiasson B. 1994. "A Differential Scanning Calorimetric Study of Chymotrypsin in the Presence of Added Polymers. *Biotech. & Bioengin.* 44:73-78.
47. Anfinsen C.B., Edsall J. T., and Richards F. M. 1996. *Advances Protein Chemistry*. Academic Press Inc. London LTD.
48. Privalov P.L. and Khechinashvili N. N. 1974. "A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein Structure: A Calorimetric Study". *J. Mol. Biol.* 86:665-684.
49. Hirose M. 1993. "Molten globule state of food proteins". *Trends in Food Sci. & Tech.* 4:48-51.
50. Fennema R. O. 1993. *Food Chemistry*. 2th. Ed. Marcel Dekker. New York.
51. Huang T. Ch., Bruechert L. J., Hartman T. G., Rosen R. T. and Ho Ch. T. 1987. "Effect of Lipids and Carbohydrates on Thermal Generation of Volatiles from Commercial Zein". *J. Agric. Food Chem.* 35:985-990.
52. Zawistowska U., Bekes F. and Bushuk W. 1985. "Gluten Proteins with High Affinity to Flour Lipids". *Cereal Chem.* 62:284-289.
53. Finch A. and Ledward D.A. 1973. "Differential Scanning Calorimetric Study of Collagen Fibres Swollen in Aqueous Neutral Salt Solutions". *Biochem. et Biophys. Acta.* 29:296-300.

54. Zarins Z. M. and Marshall W. E. 1990. "Thermal Denaturation of Soy Glycinin in the Presence of 2-Mercaptoethanol Studied by Differential Scanning Calorimetry". *Cereal Chem.* 67: 35-38.
55. Biliaderis C. G., Maurice T. J. and Vose J. R. 1980. "Starch Gelatinization Phenomena Studied by Differential Scanning Calorimetry". *J. Food Sci.* 45:1669-1674.
56. Buck J. S. and Walker C. E. 1988. "Sugar and Sucrose Ester Effects on Maize and Wheat Starch Gelatinization Patterns by Differential Scanning Calorimeter". *Starch/Stärke.* 40:353-356.
57. Gough B. M., Greenwell P. and Russell P. L. 1985. "On the Interaction of Sodium Dodecyl Sulphate with Starch Granules. In new Approaches to Research on Cereal Carbohydrates". *Cereal Chem.* 14:99-108.
58. Kulp K. and Lorenz K. 1981. "Heat-Moisture Treatment of Starches. I. Physicochemical Properties" *Cereal Chem.* 58:46-48.
59. Sanders E. B., Thompson D. B. and Boyer C. D. 1990. "Thermal Behavior during Gelatinization and Amylopectin Fine Structure for Selected Maize Genotypes as Expressed in Four Inbred Lines". *Cereal Chem.* 67: 594-602.
60. Sievert D. and Würsch P. 1993. "Amylose Chain Association Based On Differential Scanning Calorimetry". *J. Food Sci.* 58:1332-1334.
61. Eliasson A. Ch. and Ljunger G. 1988. "Interactions between Amylopectin and Lipid Additives during Retrogradation in a Model System". *J. Sci. Food Agric.* 44:353-361.
62. Eliasson A. Ch. 1992. "A Calorimetric Investigation of the Influence of Sucrose on the Gelatinization of Starch". *Carbohydrate-Polymers.* 18:131-138.
63. Kim C.S. and Walker C. E. 1992. "Effects of Sugars and Emulsifiers on Starch Gelatinization Evaluated by Differential Scanning Calorimetry". *Cereal Chem.* 69:212-217.
64. Osman E.M. 1975. "Interaction of Starch With Other Components of Food Systems". *Food Tech.* 29:30-35.
65. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. 15th. edition. AOAC Inc. Washington D.C.
66. Paulis W.J. 1982. "Recent Developments in Corn Protein Research". *J. Agric. Food Chem.* 30:14-20.
67. Pearson, D. *Laboratory Techniques in Food Analysis.* John Wiley & Sons, Inc., New York.

68. Lii-CY. and Lee B.L. 1993. "Heating A-, B-, and C-Type Starches in Aqueous Sodium Chloride: Effects of Sodium Chloride Concentration and Moisture Content on Differential Scanning Calorimetry Thermograms". *Cereal Chem.* 70:188-192.
69. López G. J. 1994. Efecto del almacenamiento en las propiedades térmicas de las semillas de frijol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
70. Rockland L. B. 1960. "Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40 °C". *Analytical Chem.* 32:1375-1376.
71. Abascal D. M. 1997. "Deterioro químico de los lípidos y de las proteínas del maíz durante su almacenamiento". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
72. Yuan R. C., Thompson D. B. and Boyer C. D. 1993. "Fine Structure of Amylopectin in Relation to Gelatinization and Retrogradation Behavior of Maize Starches from Three wx-Containing Genotypes in Two Inbred Lines". *Cereal Chem.* 70:81-89.
73. Wright D.J. and Boulter D. 1980. "Differential Scanning Calorimetric Study of Meals and Constituents of Some Food Grain Legumes". *J. Sci. Food Agric.* 31: 1231-1241.
74. Liu W. R., Langer R. and Klibanov A. M. 1991. "Moisture-Induced Aggregation of Lyophilized Proteins in the Solid State. *Biotech. and Bioengineering.* 37:177-184.
75. Evans M.T.A., Phillips M.C. 1979. The Conformation and Aggregation of Bovine  $\beta$ -Casein A. II. Thermodynamics of Thermal Association and the Effects of Changes in Polar and Apolar Interactions on Micellization. *Biopolymers.* 18:1123-1140.
76. Mistry A.H., Wu X., Eckhoff S. R. and Litchfield J.B. 1993. "Wet-Milling Characteristics of High-Temperature, High-Humidity Maize". *Cereal Chem.* 70:360-361.

## APENDICE.

### A.2 CARACTERIZACIÓN DEL MAÍZ PRUEBAS FISICOQUIMICAS

(g/100g de harina de maíz)

DETERMINACIÓN	RESULTADO
humedad (pérdida al secado)	9.72±0.37
grasa (goldfish)	4.25±0.3
proteínas (kjeldahl)	8.70±0.4
cenizas (por calcinación)	1.81±0.05
fibra cruda	2.0±0.36
carbohidratos	73.2±0.27
plaguicidas organoclorados ppm	NEGATIVO
organofosforados	
aflatoxinas (aflatest) ppb	NEGATIVO
carbohidratos reductores (dns)	0.5±0.05
índice de peróxidos meq/kg	0.85±0.03

resultados de 3 repeticiones.

#### A.2.1 Desengrasado de la harina<sup>67</sup>.

Se pesa 150 g de la harina de maíz (perfectamente homogeneizada) en un vaso de precipitado de 500 ml. Previamente se determina el contenido de humedad<sup>3</sup>. Se añade éter etílico en una proporción 1:1 (peso harina: volumen de éter) y se mantiene en agitación media hora. Se filtra sobre papel Whatman No.1 y se recibe el filtrado en un vaso de precipitado de peso conocido. Se repite la extracción 4 veces más, cambiando de papel filtro cada vez, o hasta que al colocar una gota del disolvente en papel filtro limpio, no quede residuo al evaporarse el disolvente. Se obtiene así la harina desgrasada. Se utilizó éter etílico como solvente extractor (Merck grado analítico).

#### A.2.2 Extracción del almidón.

Se pesa 50 g de harina desengrasada y se tamiza para quitar la mayor parte de cáscara, después se lava con agua destilada fría en una proporción 1:1. Se centrifuga la mezcla a una velocidad de 3000 a 3500 r.p.m. en una centrifuga marca Damon modelo HT por 15 min. Se extrae la capa acuosa y el residuo se pone a secar en estufa de vacío (marca National Appliace modelo 5831) a 30°C por 24 horas. El almidón así obtenido se pesa y se macera

en un mortero y se hace pasar por malla 100 (0.007 in) para uniformar el tamaño de partícula.

### A.2.3 Extracción de proteínas<sup>12</sup>.

#### 1) Albúminas

Se Pesa 100 g de harina desgrasada, en un vaso de precipitado de 500 ml, se agita la harina con 250 ml de agua desionizada por 1 hora en refrigeración. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 15 min. en una centrifuga Janetzki K24 con refrigeración. Se colecta el sobrenadante y el residuo se vuelve a lavar con 200 ml de agua siguiendo el mismo procedimiento. Se unen los sobrenadantes y se dializa contra agua, por 24 horas cambiando por lo menos 3 veces el agua, finalmente las proteínas son liofilizadas. El residuo se utiliza para la extracción de globulinas.

#### 2) Globulinas.

Al residuo se le agregan 250 ml de solución salina ( NaCl 0.5 M) y se agita por 1 hora en refrigeración. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 15 min, separar el sobrenadante y el residuo se vuelve a lavar con 200 ml de agua desionizada siguiendo el mismo procedimiento. Se unen los sobrenadantes y se dializa contra agua, finalmente las proteínas son liofilizadas. El residuo se utiliza para la extracción de prolaminas.

#### 3) Prolaminas.

Al residuo anterior se le agregan 100 ml de solución alcohólica ( Etanol al 70%-acetato de sodio 0.5%) y se agita por 1 hora en refrigeración. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 15 min. Se separa el sobrenadante y el residuo se vuelve a lavar dos veces más siguiendo el mismo procedimiento. Se unen los sobrenadantes y se dializa contra agua. El precipitado obtenido se liofiliza. El residuo se utiliza para la extracción de glutelinas.

#### 4) Glutelinas.

Al residuo anterior se le agregan 100 ml de solución de etanol 70%-acetato de sodio 0.5%-B-mercaptoetanol 0.1M y se agita por 30 min. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 15 min. Se

separa el sobrenadante y el residuo se vuelve a lavar dos veces más con la solución de etanol-acetato de sodio, siguiendo el mismo procedimiento. Se unen los sobrenadantes y se dializa contra agua. El precipitado obtenido se liofiliza.

#### A.2.4 Procedimiento para la obtención de curvas térmicas y sus parámetros.

##### a) Almidón.

Se hidrata el almidón aislado con agua desionizada pesando en una relación 3:2 ó 60% (g de agua/100g de almidón) en un contenedor eppendorff con tapa hermética para evitar evaporación. Se homogeneiza manualmente y se deja reposar por 3-5 horas para permitir que los componentes se hidraten completamente.

Posteriormente con la ayuda de una microbalanza Mettler-Toledo Ag 245 se pesan 5 mg de la mezcla hidratada en un crisol de aluminio (P-E 0219-0041) y se sellan inmediatamente con un encapsulador hermético Dupont. El crisol cerrado se coloca en el portamuestras del DSC-7 (previamente calibrado y ajustada su línea base) y en la celda de referencia se pone un crisol vacío. Se inició el programa de temperatura haciendo circular nitrógeno para asegurar una atmósfera inerte. Finalmente se obtuvo el termograma y los parámetros termodinámicos de gelatinización, el software del DSC-7 realizó los calculos directamente.

##### b) Fracciones proteínicas.

De forma similar, se hidratan separadamente, las prolaminas y glutelinas aisladas con agua desionizada pesando en una relación 9:1 ó 90% y 70% (g de agua/100g de proteína) en un contenedor eppendorff con tapa hermética para evitar evaporación. Se homogeneiza manualmente y se deja reposar por 3-5 horas para permitir que los componentes se hidraten completamente.

Posteriormente con la ayuda de una microbalanza se pesan 5 mg de cada una de las mezclas hidratadas, en forma separada cada una en un crisol de acero inoxidable P. E. B018-2905 y se sellan inmediatamente con un encapsulador para alta presión P.E. B018-2864. El crisol cerrado se coloca en el portamuestras del DSC-7 (previamente calibrado y ajustada su línea base) y en la celda de referencia se pone un crisol vacío. Se inicia el programa de

temperatura haciendo circular nitrógeno para asegurar una atmósfera inerte. Finalmente se obtiene el termograma para cada fracción y los parámetros termodinámicos de desnaturalización de cada una de las proteínas los calcula directamente el software. La temperatura media ( $T^{1/2}$ ) se mide directamente de la curva térmica con ayuda de una regla. Lo mismo se hace para las albúminas y globulinas pero éstas se hidratan en una relación 1:9 ó 10% (peso del agua/peso de proteína).

## B.2 Preparación de sales saturadas<sup>70</sup>.

Se preparan soluciones al 31.2, 56.0, 33.4 y 31.7% de KCl, KBr, KNO<sub>3</sub> y NaCl, escogidas de acuerdo a las condiciones de almacenamiento planteadas. Las soluciones saturadas se agregan a desecadores con el fin de almacenar el maíz a 40 y 20 °C. Se monitorean los granos para determinación de humedad, por pérdida al secado, en un horno Blue M 890629, cada 12 ó 24 horas.

### B.2.1 CURVAS DE HUMEDAD DEL MAÍZ H-447 CON DIFERENTES SALES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

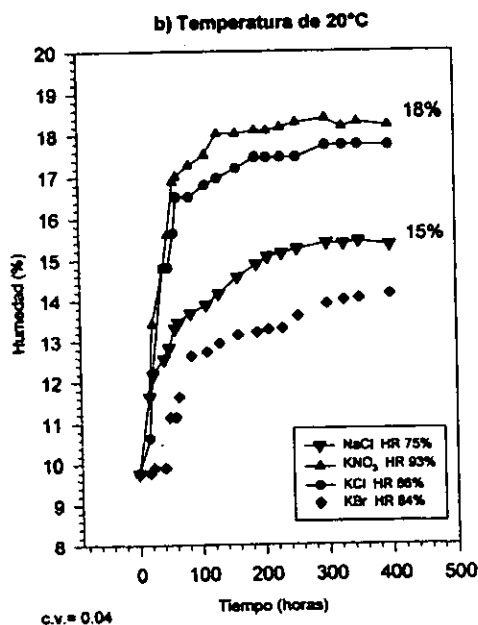
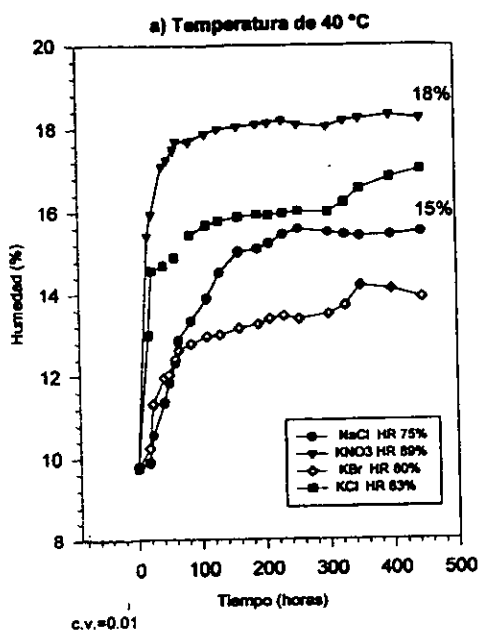




Tabla 6.1 RECUPERACIÓN EN PORCENTAJE DEL ALMIDÓN DE MAÍZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES CONDICIONES DE HUMEDAD Y TEMPERATURA. (g almidón /100g de harina)

Días*	40 °C			20 °C		
	humedad en el grano			humedad en el grano		
	18%	15%	10%	18%	15%	10%
0	92.3±1.2	92.3±1.2	92.3±1.2	92.3±1.2	92.3±1.2	92.3±1.2
20	92±0.66					
30		92±2.6				
40	90.8±3.0		91.2±0.76	93.1±3.2		
60	93.5±2.6	92.8±0.56			90.5±2.1	92.6±0.6
80			92±0.93	91±1.1		
90		90.2±1.7				
120			91±2.3	90±2.1	91.4±1.8	92.8±0.87
180					90.3±0.68	92.6±1.5

\*días de almacenamiento

Tabla 6.2 PÉRDIDA EN PORCIENTO DE LA SOLUBILIDAD DE FRACCIONES PROTEÍNICAS EXTRAÍDAS DEL MAÍZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD.

(g proteína perdida/100g de proteína)

ALBUMINAS						
días**	40°C			20°C		
	*humedad %			humedad %		
	18	15	10	18	15	10
60	80.5					
90		62.5				
120			49	69.7		
180					43.8	21
GLOBULINAS						
60	81.7					
90		64.7				
120			53	57.6		
180					47	38.8
PROLAMINAS						
60	51.5					
90		34.6				
120			22	32.2		
180					23.2	12.8
GLUTELINAS						
60	30					
90		20.2				
120			19	24		
180					17.4	13.4

\*en el grano

\*\* días de almacenamiento

Tabla 6.3 VALORES TÉRMICOS DE LAS *FRACCIONES PROTEICAS CONTROL* SEPARADAS DEL MAÍZ ALMACENADO A 4°C Y 10% DE HUMEDAD POR 210 DÍAS.

Día	Albúminas			Globulinas			Prolaminas		
	$\Delta H_g$	Td	$T^{1/2}$	$\Delta H_d$	Td	$T^{1/2}$	$\Delta H_d$	Td	$T^{1/2}$
0	15±0.08	67.2±.6	3.1± 0.5	10.8±.7	63.5±0.4	1.5±0.6	14.2±.5	80.2±0.5	4.5±0.6
45	15.2±0.6	66.2±1	2.8±0.4	10.9±.3	62.3±0.5	1.6±1.0	14.4±.9	80.2±0.4	4.5±0.8
90	15.2±0.4	66.8±.2	2.7±0.2	10.8±.9	63.5±0.5	1.5±0.1	14.9±.5	81.5±0.6	4.0±0.8
150	15.6±0.2	67.2±.1	3.1±0.4	10.8±.6	63.5±0.5	1.6±0.2	13.8±.3	81.5±0.4	4.8±0.06
210	15.5±0.1	66.2±.6	3.1±0.6	11.2±.9	62.4±0.2	1.6±0.2	14.2±.4	81.3±0.7	4.5±0.3

Día	Glutelinas		
	$\Delta H_d$	Td	$T^{1/2}$
0	13.1±0.8	92.3±0.3	2.5±0.2
45	12.5±1.2	91.4±0.5	3.3±1.8
90	12.1±0.9	92.3±0.2	2.0±0.2
150	12.6±0.8	92.3±0.6	2.5±0.3
210	13.1±0.5	92.3±0.2	2.5±0.5

Tabla 6.4 AUMENTO EN PORCIENTO DE LA *TEMPERATURA MÁXIMA DE DESNATURALIZACIÓN (Td)* DE FRACCIONES PROTEÍNICAS EXTRAÍDAS DEL MAÍZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD.

ALBÚMINAS						
días**	40°C			20°C		
	*humedad %			humedad %		
	18	15	10	18	15	10
60	15					
90		15				
120			16	20		
180					12	0
GLOBULINAS						
60	15					
90		15				
120			16	20		
180					19	0
PROLAMINAS						
60	32					
90		32				
120			15	11		
180					4	0
GLUTELINAS						
60	32					
90		32				
120			20	17		
180					4	0

\*en el grano, \*\* días de almacenamiento.

Tabla 6.5 VALORES TÉRMICOS DE LA FRACCIÓN DE ALMIDÓN CONTROL SEPARADA DEL MAÍZ ALMACENADO A 4°C Y 10 % DE HUMEDAD POR 210 DÍAS.

Días*	Almidón	
	$\Delta H_g$ (J/g)	Tg
0	3.98±0.08	67.2±0.6
45	3.94±0.6	66.2±0.7
90	4.08±0.4	66.8±0.9
150	3.96±0.2	67.2±0.5
210	3.94±0.1	66.2±0.6

\*días de almacenamiento

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada una de las mediciones se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para conocer el efecto de cada variable de tal forma que se evaluó los tratamientos, humedad, temperatura y días de almacenamiento considerando el número de repeticiones. Se realizó una comparación entre las muestras según el tiempo de almacenamiento. No fué posible conocer el efecto de interacciones debido a que el tiempo de almacenamiento entre las condiciones fué disparejo, sin embargo, se hizo el análisis entre las condiciones de almacenamiento cuya frecuencia de toma de muestra (días) coincidiera, para ello, se tomaron diferentes grupos. Se aplicó el análisis entre todos los tratamientos comparando las muestras que se habían mantenido en almacenamiento.

Una vez realizado, se les aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan (programa SPSS) para determinar hasta que día de almacenamiento los valores de entalpia, temperatura máxima y temperatura media permanecían igual, comparando con las diferentes condiciones de almacenamiento y el control.

### I. Condiciones de almacenamiento.

Tabla 1. Análisis de varianza para todas las condiciones de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
<b>glutelinas</b>	Entre condiciones	1372.6	17	80.74	416.619**
	Dentro de condiciones	6.976	36	0.193	
	Total	1379.59	53		
	Desv. st.	3.45			
	Error	1.021			

\*\*denota diferencia altamente significativa

Hay una diferencia altamente significativa entre la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  de glutelinas control y la de diferentes condiciones. Para conocer entre que grupos se presentaba esta diferencia se hizo la siguiente prueba.

Tabla 1A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Los valores dentro de los grupos control son iguales entre sí.

Las siguientes grupos de condiciones son iguales entre sí, pero tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición
A) 20	20° y 18%H
10	40° y 18%H
30	20° y 15%H, 40° y 15%H
60	20° y 10%H
B) 20	40° y 18%H, 40° y 10%H
120	20° y 10%H
180	20° y 10%H
C) 30	40° y 18%H
40	40° y 10%H
D) 40	20° y 18%H
60	20° y 18%H, 15%H, 40° y 15%H, 10%H
90	20° y 15%H
40	40° y 18%H
E) 80	20° y 18%H, 40° y 10%H
F) 100	20° y 18%H, 40° y 10%H
50	40° y 18%H
120	20° y 18%H, 20° y 15%H, 40° y 10%H
150	20° y 15%H
75	40° y 15%H
G) 180	40° y 15%H

Las letras indican el grupo en donde las condiciones se comportan de manera similar, pero a diferentes tiempos.

Tabla 2. Análisis de varianza para todas las condiciones de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
prolamina	Entre condiciones	910.22	17	53.542	143.36**
	Dentro de condiciones	13.44	36	0.3735	
	Total	923.67	53		
	Desv. st.	3.57			
	Error	1.023			

\*\*denota diferencia altamente significativa

Hay una diferencia altamente significativa entre la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  de prolamina control y la de las diferentes condiciones. Para conocer entre que grupos se presentaba esta diferencia se hizo la siguiente prueba.

Tabla 2A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras señalan las condiciones que son iguales entre sí, pero tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición
A) 20	20° y 18%H
40	20° y 18%H
20	40° y 18%H
30	40° y 18%H, 20° y 15%H
60	20° y 10%H
B) 80	20° y 18%H
40	40° y 18%H, 40° y 10%H
60	20° y 15%H
15	40° y 15%H
20	40° y 10%H
120	20° y 10%H
180	20° y 10%H
C) 30	40° y 15%H
45	40° y 15%H
80	40° y 10%H
D) 100	20° y 18%H, 40° y 10%H
50	40° y 18%H
120	40° y 10%H

Las letras indican el grupo en donde las condiciones se comportan de manera similar, pero a diferentes tiempos.

Tabla 3. Análisis de varianza para todas las condiciones de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
albúminas	Entre condiciones	1532.05	12	127.671	1757.81**
	Dentro de condiciones	1.888	26	0.072	
	Total	1533.94	38		
	Desv. st.	6.35			
	Error	1.07			

\*\*denota diferencia altamente significativa

Hay una diferencia altamente significativa entre la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  de albúminas control y la de las diferentes condiciones.

Para conocer entre que grupos se daba esta diferencia se hizo la siguiente prueba.

Tabla 3A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras señalan las condiciones que son iguales entre sí, pero tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición
A) 20	20° y 18%H
10	40° y 18%H
20	40° y 18%H, 10%H
30	20° y 15%H
60	20° y 10%H
B) 30	40° y 18%H
40	20° y 18%H, 10%H
15	40° y 15%H
120	20° y 10%H
C) 60	20° y 15%H, 10%H
30	40° y 15%H
180	20° y 10%H
D) 60	20° y 18%H
45	40° y 15%H
90	20° y 15%H

Las letras indican grupos diferentes.

Tabla 4. Análisis de varianza para todas las condiciones de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
globulinas	Entre condiciones	567.738	12	47.311	324.58**
	Dentro de condiciones	3.644	25	0.145	
	Total	571.382	37		
	Desv. st.	3.92			
	Error	0.637			

\*\*denota diferencia altamente significativa

Hay una diferencia altamente significativa entre la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  de globulinas control y la de las diferentes condiciones.

Tabla 4A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes condiciones son iguales entre sí, pero tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición
A) 10	40° y 18%H
20	20° y 18%H, 40° y 10%H
60	20° y 10%H
B) 20	40° y 18%H
15	40° y 15%H
40	20° y 18%H, 40° y 10%H
30	40° y 18%H, 20° y 15%H, 40° y 15%H
60	20° y 15%H
120	20° y 10%H
C) 60	20° y 18%H, 40° y 10%H
180	20° y 10%H

Tabla 5. Análisis de varianza para todas las condiciones de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
almidón	Entre condiciones	9.4838	12	0.7903	41.184**
	Dentro de condiciones	0.4989	26	0.0192	
	Total	9.9827	38		
	Desv. st.				
	Error				

\*\*denota diferencia altamente significativa

Hay una diferencia altamente significativa entre la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  de almidón control y la de las diferentes condiciones.

Tabla 5A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras indican las condiciones que son iguales entre sí, pero tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición	
A)	20	20° y 18%H, 40° y 10%H
	10	40° y 18%H
	20	40° y 18%H
	150	40° y 15%H
	60	40° y 10%H
B)	30	40° y 18%H, 40° y 15%H
	45	40° y 15%H
	40	40° y 18%H, 40° y 10%H
	60	20° y 18%H, 20° y 15%H, 40° y 15%H
	90	20° y 15%H
C)	120	20° y 18%H
	75	40° y 15%H
	80	40° y 10%H
	180	20° y 15%H
D)	80	20° y 18%H
	90	40° y 15%H
	40	20° y 18%H
	100	20° y 18%H, 40° y 10%H
	120	40° y 10%H

Las letras indican grupos diferentes.



## II) Temperatura de almacenamiento.

Tabla 6. Análisis de varianza para las temperaturas de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
glutelinas	Entre temperaturas	767.13	2	383.56	31.94*
	Dentro de temperatura	612.46	51	12.009	
	Total	923.67	53		
	Desv. st.	5.10			
	Error	0.694			
prolamina	Entre temperaturas	417.70	2	208.85	21.05*
	Dentro de temperatura	505.96	51	9.920	
	Total	923.67	53		
	Desv. st.	4.17			
	Error	0.568			
albúminas	Entre temperaturas	829.24	2	414.62	21.181*
	Dentro de temperatura	704.70	36	19.57	
	Total	1533.94	38		
	Desv. st.	6.35			
	Error	1.017			
globulinas	Entre temperaturas	343.47	2	171.73	26.373*
	Dentro de temperatura	227.90	35	6.511	
	Total	571.382	37		
	Desv. st.	3.92			
	Error	0.637			
almidón	Entre condiciones	10.929	2	5.464	27.466*
	Dentro de condiciones	10.744	54	0.199	
	Total	21.674	56		
	Desv. st.	0.622			
	Error	0.0824			

\*denota diferencia significativa

Hay una diferencia significativa entre la temperatura de almacenamiento de glutelinas, prolaminas, albúminas, globulinas y almidón control y la de las diferentes condiciones.

### 6A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Dice que la entalpia,  $T_d$  y  $T^{1/2}$  entre las temperaturas a 40 y 20 °C, es la misma en cada una de ellas, pero es significativamente diferente a 4°C, que es la temperatura del control.

### III) Días de almacenamiento y repeticiones.

Tabla 7. Análisis de varianza para los días de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
glutelinas	Entre días	1368.62	13	105.278	383.74**
	Dentro de los días	10.973	40	0.274	
	Total	1379.59	53		
	Repeticiones	0.160	2	0.080	0.03 N.S.
	Desv. st.				
	Error	9.07			

\*\*denota diferencia altamente significativa

N.S.no significativo

La entalpia, Td y  $T^{1/2}$  es diferente significativamente entre los días de almacenamiento, pero las repeticiones tienen diferencia no significativa.

Tabla 7A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras señalan los grupos de días que tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición
A) 150	40° y 18%H
100	20° y 18%H
20	40°y18%H,15%,
180	10%H 20°y15%
B) 60	20° y 18%H
C) 20	20° y 18%H
40	20°y18%H,15%,40°y15%,10H
D) 80	20° y 18%H,15%,10%H
150	40°y15%
E) 10	40° y 18%H
120	20° y 18%H
40	40° y 18%H

Las letras indican grupos diferentes.

Tabla 8. Análisis de varianza para los días de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
prolaminas	Entre días	886.53	13	68.195	73.453**
	Dentro de los días	37.136	40	0.928	
	Total	923.67	53		
	Repeticiones	2.698	2	1.349	0.074N.S.
	Desv. st.				
	Error	11.22			

\*\*denota diferencia altamente significativa, N.S.=no significativo.

La entalpia, Td y  $T^{1/2}$  es diferente significativamente entre los días de almacenamiento, pero no las repeticiones.

Tabla 8A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras señalan los grupos de días que tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y T<sup>1/2</sup> del control:

días de almacenamiento	condición
A) 150	40° y 18%, 20°y15%
180	20°y15%, 10%H
100	20° y 18%H,40°y10%H
75	40°y15%
20	40° y 18%H, 15%H
30	20°y15%
15	40°y15%
B) 20	20° y 18%H
40	20° y 18%H, 40°y10%H
C) 60	20° y 18%H,40°y15%H,10%H
80	20° y 18%H, 40°y10%H
E) 10, 120	40°y18%H,20° y 18%H, 40°y10%H
F) 30, 40	40° y 18%H,40° y 18%H

Tabla 9. Análisis de varianza para los días de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
albúminas	Entre días	1257.77	8	157.221	17.078*
	Dentro de los días	276.16	30	9.205	
	Total	1533.94	38		
	Repeticiones	0.4352	2	0.217	0.0051N.S
	Desv. st.	6.35			
	Error	1.01			

\*denota diferencia significativa, N.S.=no significativo

La entalpia, Td y T<sup>1/2</sup> es diferente significativamente entre los días de almacenamiento, pero no en las repeticiones.

Tabla 9A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras indican los grupos de días que tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y T<sup>1/2</sup> del control:

días de almacenamiento	condición
A) 30	40° y 18%H
60	20°y15%, 10%H
B) 10	40° y 18%H
120	20°y10%H
C) 20	20°y 18%H, 40°y15%, 10%H
40	20° y 18%H, 10%H
60	20° y 18%H,10%H
30	40°y15%
180	20°y10%H

Tabla 10. Análisis de varianza para los días de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
globulinas	Entre días	429.911	8	53.738	11.015*
	Dentro de los días	141.470	29	4.878	
	Total	571.38	37		
	Repeticiones	0.210	2	0.105	0.006N.S.
	Desv. st.	3.92			
	Error	0.637			

\*denota diferencia significativa

N.S.no significativo

La entalpia, Td y  $T^{1/2}$  es diferente significativamente entre los días de almacenamiento; las repeticiones presentan una diferencia no significativa..

Tabla 10A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05% de significancia).

Las siguientes letras señalan los grupos de días que tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control:

días de almacenamiento	condición	
A)	30	40° y 18%H, 15%H
	40	20°y15%,40°y10%H
	20	20°y15%,40°y10%H
	60	40°y10%H
B)	10	40° y 18%H, 15%H
	20	20° y 18%H
	40	20° y 18%H
	60	20°y18%H, 15%H, 10%H
	120	20°y10%H
	180	20°y10%H

Las letras indican grupos diferentes.

Tabla 11. Análisis de varianza para los días de almacenamiento.

Clase	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.de L.	Media de cuadrados	F
almidón	Entre días	12.862	9	1.429	64.701**
	Dentro de los días	0.7731	35	0.22	
	Total	13.635	44		
	Repeticiones	0.085	2	0.0427	0.106N.S.
	Desv. st.	0.55			
	Error	0.083			

\*\*denota diferencia altamente significativa

N.S.=no significativo

La entalpia, Td y  $T^{1/2}$  es diferente significativamente entre los días de almacenamiento, las repeticiones presentan una diferencia no significativa.

Tabla 11A. Prueba de Rangos múltiples de Duncan (0.05%de significancia).

Las siguientes letras indican los grupos de días que tienen una diferencia altamente significativa con la entalpia, Td y  $T^{1/2}$  del control.

días de almacenamiento	condición
A) 100	20° y 18%H,15%H, 10%H
20	40° y 18%H
50	40°y15%
60	40°y10%H
80	40°y10%H
B) 20	20° y 18%H
60	20° y 18%H, 40°y15%
80	20° y 18%H
10	40° y 18%H
120	20° y 18%H,15%H, 10%H

Las letras indican grupos diferentes.