

Unidad Iztapalapa  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**TRATAMIENTO CON  $\text{CaCO}_3$  Y ADICIÓN DE FRACCIÓN DE HARINA  
GELATINIZADA EN MASA DE MAÍZ: EFECTO EN PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS Y REOLOGÍA.**

**TESIS**

Para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

**PRESENTA:**

M.C. Samuel García Díaz

**DIRECTORES DE TESIS**

Dr. E. Jaime Vernon Carter

Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

**ASESORA:**

Dra. Angélica Román Guerrero

**Enero 2019**

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Edificio W-107 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez, Dr. E. Jaime Vernon Carter.

El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto número 236500 de Ciencia Básica.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Samuel García Díaz con número de apoyo 213474 para la realización de esta investigación.

Ciudad de México a 31 de enero de 2019

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**TRATAMIENTO CON  $\text{CaCO}_3$  Y ADICIÓN DE FRACCIÓN DE HARINA  
GELATINIZADA EN MASA DE MAÍZ: EFECTO EN PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS Y REOLOGÍA.**

que presentó

**M.C. Samuel García Díaz**

Comité Tutorial:

Director: Dr. E. Jaime Vernon Carter

Co-Director: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretaria: Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Vocal: Dra. Edith Agama Acevedo

Vocal: Dr. Cesar Ramírez Santiago

***“Porque de Él, y por Él,  
y para Él, son todas las cosas.  
A Él sea la gloria por los siglos.”***

*Romanos 11:36*

## AGRADECIMIENTOS

*Sin duda, los logros obtenidos a lo largo de la vida, nunca se logran por nosotros mismos de manera absoluta, siempre hay gente cerca de nosotros que nos ayudan, inspiran, e impelen a crecer y realizarnos, desde nuestro primer respiro hasta que dejamos esta tierra.*

*A Dios gracias por darme de su bendición rodeándome de gente valiosa cerca de mí.*

*Gracias a todos quienes siendo mi familia no dejaron de creer que llevaríamos un logro más a casa. A mi esposa e hijas (Aída, Ittay y Jareseth). A nuestros padres Elizabeth D. y Cruz G., Raquel M. y Moisés H. Su apoyo, amor y ejemplo de resiliencia fueron el impulso que brindan la inercia en mi para seguir creyendo en la familia. Los amo y le pido a Dios tenerles toda la vida. A mi familia entera, mi hermano, cuñados, sobrinos, tíos y primos, a todos. Los sigo extrañando siempre.*

*A mis amigos que sin ser de mi familia tuve el privilegio de conocer en esta travesía por la Cd. de México. Todos quienes son mi compañía y apoyo siempre. Ustedes mismos se saben aludidos. Mi agradecimiento por todo.*

*Un especial agradecimiento a mi comité tutorial de tesis.*

*Dr. José Álvarez Ramírez y Dr. Jaime Vernon Carter. Por su confianza brindada desde el principio. Hoy fuera de la UAM, sigo reconociendo que el proceso de formación, y todo lo que involucró es y seguirá siendo de provecho para mí.*

*Gracias por su apoyo cuando lo necesité y perdón por mis desaciertos. Por los regaños, pero también por la convivencia. Por los días de estrés, pero también por su incansable labor en la producción científica en la que tuvieron a bien tomarme en cuenta. Muchas gracias.*

*Al comité revisor, Dra. Angélica Román, Dra. Eva Rodríguez, Dra. Edith Agama y Dr. Cesar Ramírez. Gracias por su atención y tiempo dedicado para la revisión. Todos su comentarios y aportaciones fueron pertinentes y necesarios.*

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Edificio W-107 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez y el Dr. E. Jaime Vernon Carter.

El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto número 236500 de Ciencia Básica.

## RESUMEN

El proceso de nixtamalización tradicional (NT) involucra el cocimiento alcalino de los granos de maíz para la obtención de una masa con las características adecuadas para la elaboración de distintos productos. Los derivados del maíz nixtamalizado constituyen un alimento básico en gran parte de la población de México y América Central, siendo la tortilla el producto más relevante de la nixtamalización con el mayor consumo, donde tan sólo para el caso de México se estima que se consume por más de 115 millones de personas (FAO, 2014). Si bien, la mecanización de la industria de la tortilla ha hecho posible producir un amplio despliegue de productos de alta calidad, hoy en día, los consumidores demandan nuevos alimentos con mejores atributos nutricionales que promuevan la salud, así como productos con mejores atributos sensoriales en donde se prolongue las características de una tortilla recién hecha. Todo esto obtenido por procesos seguros y ambientalmente limpios (Rooney & Serna-Saldivar, 2015). Lo anterior, ha hecho que los procesadores tengan interés en procesos innovadores que atiendan estos nichos de oportunidad para conservar o expandir sus mercados. Con relación a la huella ecológica provocada por la nixtamalización tradicional y la alta alcalinidad de los residuos generados en el proceso, se han explorado nuevos métodos alternativos conocidos como nixtamalización ecológica (NE) con el uso de sales de calcio como el  $\text{CaCO}_3$  buscando obtener menor cantidad de sólidos dispersos en el nejayote con un pH cercano a la neutralidad, así como, menor degradación de compuestos bioactivos y fibra (Bello-Perez, *et al.* 2014). Sin embargo, los estudios en torno a estos nuevos métodos propuestos se han enfocado poco en las interacciones del  $\text{CaCO}_3$  a nivel del almidón. Este trabajo se presenta en dos bloques principales enfocados en abordar dos problemáticas relacionadas a NE y al principal producto de la nixtamalización (tortilla): (1) Evaluar de los cambios producidos por el  $\text{CaCO}_3$  (0.0-2.0 % p/p  $\text{CaCO}_3$ ) en la morfología, cristalinidad, reología e hidrólisis de dispersiones de almidón de maíz gelatinizado, un tema que ha sido poco estudiado; (2) Proponer un método simple y efectivo para retardar el endurecimiento de las tortillas de maíz con el almacenamiento, mediante el uso de diferentes fracciones de harina de maíz nixtamalizada pregelatinizada (5.0-15 % p/p). Del primer bloque relacionado al  $\text{CaCO}_3$  se obtuvo que la sal modificó la morfología de los remanentes insolubles de la gelatinización de una manera menos severa a la provocada por el  $\text{Ca(OH)}_2$  en la NT evaluada por microscopía, estos cambios se vieron reflejados en los patrones de rayos-X con una disminución paulatina de la cristalinidad hasta un mínimo a partir de 1 % p/p de  $\text{CaCO}_3$ , así también, el  $\text{CaCO}_3$  promovió un aumento en la tixotropía hasta un máximo con la mayor concentración de  $\text{CaCO}_3$  evaluada (2 % p/p) de las dispersiones. Finalmente, se encontró evidencia de posibles

entrecruzamientos provocados por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el seno de las dispersiones de almidón gelatinizadas mediante análisis de sinéresis, FTIR y DSC. Referente al segundo bloque del trabajo el método propuesto mostró que la harina gelatinizada principalmente disminuyó la cantidad de agua congelable en un 22 % y mejoró la capacidad de retención de agua cerca del 11 % de las masas para tortillas. Mientras que en las tortillas con adición de harina de maíz gelatinizada (HMG) logró menor dureza de las tortillas respecto a aquellas sin adicionar HMG, de la misma forma en que logró una disminución de las áreas bajo la curva de los picos entálpicos asociados a la retrogradación del almidón de 3.2 J g<sup>-1</sup> para T<sub>0</sub> a 2.7 J g<sup>-1</sup> para T<sub>15</sub> con 4 días de almacenamiento. Todo esto mostró que las fracciones de harina gelatinizada juegan un papel similar al de un hidrocoloide como agente preservador de las características de las tortillas recién hechas, retardando la retrogradación del almidón de maíz previniendo la pérdida de agua y el incremento de las características sensoriales indeseables de las tortillas con el almacenamiento como el incremento de la firmeza.

# ÍNDICE

## *Contenido*

RESUMEN .....	1
<b>ÍNDICE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
2.1. NIXTAMALIZACIÓN .....	9
2.2. NIXTAMALIZACIÓN ECOLÓGICA .....	9
2.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ALMIDÓN .....	10
2.4. GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN .....	12
2.5. RETROGRADACIÓN DEL ALMIDÓN .....	12
2.6. HIDROCOLOIDES USADOS EN TORTILLAS .....	14
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>4.- OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>5.- HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>6.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
6.1. MATERIALES .....	17
6.2. TRATAMIENTO CON CARBONATO DE CALCIO .....	18
6.3 CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN DE TAMAÑO (SEC) .....	18
6.4. MICROSCOPÍA ÓPTICA .....	19
6.5. MICROSCOPÍA SEM .....	19
6.6 TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	19
6.7. SINÉRESIS .....	19
6.8. ÁNGULO DE CONTACTO .....	20
6.9. VOLUMEN DE HINCHAMIENTO (SWELLING VOLUME) .....	20
6.10. SOLUBILIDAD .....	20
6.11. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR) .....	20
6.12. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX) .....	21

6.13. PROPIEDADES REOLÓGICAS.....	21
6.14. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) .....	22
6.15. HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	22
6.16. PREPARACIÓN DE LA MASA.....	23
6.17. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA .....	23
6.18. PREPARACIÓN DE TORTILLAS.....	23
6.19. CONTENIDO DE HUMEDAD .....	23
6.20. DUREZA DE TORTILLAS.....	24
6.21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
<b>7.- RESULTADOS PARTE I.....</b>	<b>25</b>
7.1.- RESUMEN.....	25
7.2. INTRODUCCIÓN.....	25
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.3.1. <i>pH de las DAMG</i> .....	27
7.3.2. <i>Cromatografía de exclusión por tamaño</i> .....	29
7.3.2. <i>Imágenes ópticas y tamaño de partícula</i> .....	29
7.3.3. <i>Morfología-imágenes SEM</i> .....	30
7.3.4. <i>Sinéresis</i> .....	32
7.3.5. <i>Ángulo de contacto</i> .....	32
7.3.6. <i>Espectroscopía ATR-FTIR</i> .....	33
7.3.7. <i>Difracción de rayos-X (XRD)</i> .....	34
7.3.8 <i>Propiedades reológicas</i> .....	35
7.3.9 <i>Propiedades térmicas</i> .....	37
7.3.10 <i>Hidrólisis ácida</i> .....	39
7.3.11 <i>Nuevas perspectivas de discusión</i> .....	40
<b>8.- RESULTADOS PARTE II.....</b>	<b>42</b>
8.1- RESUMEN.....	42
8.2.- INTRODUCCIÓN.....	42
8.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8.3.1. <i>Contenido de agua de las tortillas</i> .....	44
8.3.2. <i>Capacidad de retención de agua de las diferentes masas</i> .....	45
8.3.3 <i>Agua congelable de las diferentes masas</i> .....	45
8.3.3. <i>Viscosidad de las diferentes masas</i> .....	46
8.3.4. <i>Viscoelasticidad de las diferentes masas</i> .....	47

8.3.5. Contenido de humedad de las diferentes tortillas .....	48
8.3.6. Contenido de agua congelable de las diferentes tortillas .....	49
8.3.7. Ángulo de contacto .....	50
3.3.8. Análisis de FTIR de las diferentes tortillas.....	51
8.3.9. Análisis DSC.....	53
8.3.10. Dureza de las diferentes tortillas .....	54
<b>9.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>
<b>11.- APÉNDICES.....</b>	<b>67</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• GARCIA-DIAZ, S., HERNANDEZ-JAIMES, C., ESCALONA-BUENDIA, H. B., BELLO-PEREZ, L. A., VERNON-CARTER, E. J., &amp; ALVAREZ-RAMIREZ, J. (2016). EFFECTS OF CaCO<sub>3</sub> TREATMENT ON THE MORPHOLOGY, CRYSTALLINITY, RHEOLOGY AND HYDROLYSIS OF GELATINIZED MAIZE STARCH DISPERSIONS. FOOD CHEMISTRY, 207, 139-147.....</li> <li>• ALVAREZ-RAMIREZ, J., GARCIA-DIAZ, S., VERNON-CARTER, E. J., &amp; BELLO-PEREZ, L. A. (2018). A NOVEL, SIMPLE, ECONOMIC AND EFFECTIVE METHOD FOR RETARDING MAIZE TORTILLA STALING. JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE.....</li> </ul>	67

## Índice figuras

<b>Figura 1.</b> LA FILA SUPERIOR MUESTRA IMÁGENES ÓPTICAS Y LA FILA INFERIOR IMÁGENES SEM DE LAS DAMG TRATADAS CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $\text{CaCO}_3$ : (a), (f) 0.0, (b), (g) 0.25 %, (c), (h) 0.5 %, (d), (i) 1.0 %, y (e), (j) 2.0 %. ..	31
<b>Figura 3.</b> (A) ESPECTRO XRD DE LAS DAMG. (B) CONTENIDO DE CRISTALINIDAD COMO UNA FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{CaCO}_3$ .....	34
<b>Figura 4.</b> PRUEBAS DE BARRIDOS EN FRECUENCIA DE LAS DAMG.....	36
<b>Figura 5.</b> CURVAS DE FLUJO DE LAS DAMG: (A) ILUSTRACIÓN DE LOS CICLOS DE HISTÉRESIS REPRESENTATIVOS POR TIXOTROPÍA. (B) ÍNDICE DE TIXOTROPÍA COMO FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{CaCO}_3$ .....	37
<b>Figura 6.</b> Avance de hidrólisis de las DAMG a diferentes concentraciones de $\text{CaCO}_3$ . LA LÍNEA CONTINUA INDICA UNA CINÉTICA DE PRIMER ORDEN DEL ALMIDÓN DE MAÍZ SIN TRATAMIENTO CON LA SAL DE CALCIO.....	39
<b>Figura 7.</b> EL PARÁMETRO N ES EL ÍNDICE DE COMPORTAMIENTO DE FLUJO Y ES ESTIMADO COMO LA PENDIENTE DEL PATRÓN DE VISCOSIDAD APARENTE EN UNA GRÁFICA LOG-LOG (B) MÓDULO VISCOSO Y (C) FACTOR DE PÉRDIDA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE MASAS. PARA TODAS LAS GRÁFICAS, SE UTILIZAN LOS SIGUIENTES SÍMBOLOS: LOS SÍMBOLOS ABIERTOS CORRESPONDEN AL MÓDULO DE PÉRDIDA $G''$ MIENTRAS QUE LOS SÍMBOLOS CERRADOS CORRESPONDEN AL MÓDULO DE ALMACENAMIENTO: ■, M0; ●, M5; ▲, M10; ★, M15.....	47
<b>Figura 8.</b> (A) CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE TORTILLAS. LETRAS DIFERENTES DENOTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ). (B) PESO DE LA TORTILLA COMO FUNCIÓN DEL ENDURECIMIENTO. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15). (C) TASA DE DESHIDRATACIÓN PARA LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE TORTILLAS. ....	49
<b>Figura 9.</b> AGUA CONGELABLE COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15).....	50
<b>Figura 10.</b> ÁNGULO DE CONTACTO DE ACEITE DE CANOLA SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS TORTILLAS COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15).....	51

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> ALGUNAS PROPIEDADES DE LA DAMG.....	28
<b>Tabla 2.</b> ALGUNAS PROPIEDADES DE LA DAMG. (CONTINUACIÓN).....	28
<b>Tabla 3.</b> PROPIEDADES TÉRMICAS DE LAS DAMG BAJO CONDICIONES DE FUSIÓN Y EBULLICIÓN. ....	38
<b>Tabla 4.</b> PROPIEDADES DE MASA DE MAÍZ CON HARINA DE MAÍZ GELATINIZADO. ....	45
<b>Tabla 5.</b> EVOLUCIÓN DE LA DUREZA DE LAS TORTILLAS EN BASE A LAS DIFERENTES FORMULACIONES .....	55

## 1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

La nixtamalización tradicional (NT) es un proceso ampliamente usado para la obtención de masa para elaborar numerosos alimentos. Algunos de los problemas que conlleva la producción de la masa son la utilización de grandes volúmenes de agua, alta alcalinidad del nejayote y su alto nivel de sólidos solubles (3-15 %), desechados durante la cocción y el lavado del nixtamal. Por esta razón en los últimos años ha crecido el interés por procesos de nixtamalización que sean amigables con el ambiente. La nixtamalización con el uso de sales de calcio genera un nivel mínimo de residuos, además de lograr un mayor contenido de fibra, en la masa y tortillas, por lo cual su consumo produce efectos positivos en la salud (Bello-Perez, *et al.* 2014). De las sales propuestas para la NE como el  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y el  $\text{CaCO}_3$ , el carbonato de calcio es el principal componente de las cenizas de madera antiguamente usadas en la nixtamalización clásica (NC). Este compuesto promueve características viscoelásticas de la masa más aproximadas a las obtenidas con el hidróxido de calcio (Santiago-Ramos, Figueroa-Cárdenas & Véles-Medina, 2018), además de ser la sal de calcio que alcanza valores de pH más cercanos a la neutralidad, lo cual promueve un impacto ambiental más bajo (Bello-Perez, *et al.* 2014). No obstante, la información disponible sobre las interacciones de las sales con el almidón es limitada, ya que los estudios han sido enfocados en las características térmicas del almidón principalmente. Oosten (1982) investigó las interacciones de algunas sales como el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con almidón de maíz, encontrando que los aniones presentan un mayor efecto en el proceso de gelatinización respecto a los cationes que conjugan las sales. En este contexto recientemente se ha probado que el  $\text{CaCO}_3$  en particular, influye en las propiedades térmicas del almidón disminuyendo la entalpía de gelatinización respecto al almidón nativo. Mientras que al compararse con el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  el efecto es mayor comparado al  $\text{CaCO}_3$ , incluso el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  produce una disrupción de los remanentes insolubles del almidón en la gelatinización (“ghost”) causando menor capacidad de retención de agua, mayor sinéresis de los geles formados, mayor solubilidad y pérdida de la cristalinidad del almidón de maíz (Bryant & Hamaker, 1997; Lobato-Calleros *et al.* 2015). La primera parte de esta investigación se enfocará en estudiar los efectos del  $\text{CaCO}_3$  sobre la morfología, cristalinidad, reología e hidrólisis de dispersiones de almidón de maíz gelatinizado. La gelatinización del almidón de maíz es un fenómeno importante ocurrido en diferentes procesos como la nixtamalización y procesos de panificación (Santiago-Ramos, Figueroa-Cárdenas & Véles-Medina, 2018; Alvarez-Ramirez, 2018). Los efectos de la incorporación de almidón gelatinizado para la preparación de masas y mejorar sus propiedades en la elaboración de pan han sido tema explorado en años recientes. Se ha encontrado que el almidón gelatinizado brinda mayor suavidad en el producto final, así como, atenuación de los efectos adversos debidos a la caducidad del pan, debido a que mejora la retención de agua durante el proceso del horneado, se ha propuesto que el uso de fracciones

de harina gelatinizada es comparable a los efectos que producen los hidrocoloides, como la modificación de la reología de la masa y retardar el endurecimiento del pan durante el almacenamiento (Hesso *et al.* 2014; Seyhum *et al.* 2005; Miyazaki *et al.* 2006; Carrillo-Navas *et al.* 2014). La segunda parte de esta investigación trata sobre el estudio de fracciones de harina de maíz gelatinizada agregadas en formulaciones para la elaboración de tortillas evaluando las propiedades reológicas y térmicas de masas, así como, las propiedades fisicoquímicas de las tortillas elaboradas. Los resultados proveen información valiosa en el uso de las fracciones de harina gelatinizada en el rol de hidrocoloide para mejorar las propiedades fisicoquímicas y texturales de masa y tortillas. Es sabido que el uso de hidrocoloides en tortillas comerciales aumenta la vida de anaquel hasta 25-60 días bajo refrigeración, dos de las gomas principalmente usadas son la carboximetil-celulosa (CMC) y la goma guar, (Serna-Saldivar *et al.* 1990), estas gomas en proporciones adecuadas la CMC ayuda a preservar la flexibilidad y funciona como inhibidor de hongos en las tortillas, sin embargo, la extensión de la vida de anaquel viene acompañado con algunas desventajas como el aumento en el precio de la tortilla (~25 %), cambios en las propiedades sensoriales (insipidez y amargor), aromas indeseables y textura gomosa (Bueso-Ucles, 2003).

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1. *Nixtamalización*

La nixtamalización es el proceso mediante el cual se realiza un cocimiento alcalino del grano de maíz con agua y cal en el que ocurre el desprendimiento del pericarpio. El nombre existe desde antes de la conquista y proviene del náhuatl: “*Nextli*” que significa cenizas y “*Tamali*” que quiere decir masa de maíz cocido. El proceso de nixtamalización logra promover cambios en la estructura del grano, en las propiedades funcionales y en el valor nutricional del grano de maíz. El proceso de NT hoy se realiza como desde épocas prehispánicas sin cambios sustanciales. Desde tiempos antiquísimos el grano de maíz se sometía a una cocción con cenizas de madera, actualmente la nixtamalización se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1 % a una porción de maíz. Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua, sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. Se obtiene así el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45 % de humedad (Paredes-López, Guevara-Lara & Bello-Pérez, 2009). Entre los beneficios nutrimentales aportados por la nixtamalización se destacan el mejoramiento en la disponibilidad de minerales como el hierro, fósforo y calcio, los cuales ayudan a prevenir enfermedades como el raquitismo promoviendo la biodisponibilidad de niacina (vitamina B3) y de aminoácidos como la isoleucina, los cuales son importantes para el metabolismo en la conversión de los carbohidratos en energía (Bressani *et al.* 1958). Algunas de las vitaminas afectadas por la alcalinidad del medio durante la NT son la tiamina y riboflavina, además de la pérdida de fibra dietética, lípidos y algunos compuestos nutraceuticos como el ácido ferúlico y antocianinas encontrados en el pericarpio y la aleurona respectivamente (Méndez, *et al.* 2013). Otros beneficios del tratamiento alcalino de la NT son la reducción de las aflatoxinas provenientes del grano de maíz (De Arriola *et al.* 1988; Guzmán *et al.* 1995), la modificación de las hemicelulosas (Gonzalez, 2005) y el mejoramiento de la maquinabilidad de la masa resultante al moler nixtamal (Rooney & Serna-Saldivar, 2015). Entre los factores que afectan las características físicas, fisicoquímicas y nutrimentales de la masa al final de su elaboración son: la variedad del maíz, los contenidos de agua y cal para la nixtamalización, las temperaturas y tiempos de cocción, periodos de remojo, y finalmente la molienda.

### 2.2. *Nixtamalización Ecológica*

El proceso de NE surge ante la necesidad de dar solución a los problemas que subsisten por el uso de cal (hidróxido de calcio) en la NT. Principalmente en relación con la huella ecológica dejada por los

residuos del nixtamal. Así como la pérdida de fibra, lípidos, proteínas y algunos nutrientes como las vitaminas B1 y B3 principalmente encontrados en el pericarpio del grano de maíz (Mariscal-Moreno *et al.* 2015). El método patentado por Figueroa *et al.* (2011) propone el remplazo del uso de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  por sales de calcio disponibles comercialmente como el carbonato de calcio, sulfato de calcio, y cloruro de calcio, entre otras, ampliamente usadas en la industria alimenticia, que permiten abatir la contaminación de sólidos solubles del nejayote sin alterar los rendimientos de harinas, masa y tortillas. Por el contrario, este método sugiere dar valor agregado al pericarpio desechado en el nejayote por la NT, utilizándole para producir tortillas integrales con el pericarpio retenido en el grano cocido. El proceso de NE similar a la NT consiste en una fase de cocimiento del grano, seguido una etapa de reposo para permitir la hidratación del grano, una etapa de lavado del grano, y finalmente una etapa de molienda. La masa obtenida puede ser deshidratada para la preparación de harina integral instantánea o bien para la elaboración de tortillas integrales. En comparación al proceso de NT, este método ecológico promueve la mayor formación de almidón resistente presente en tortillas por la formación de complejos amilosa-lípido (almidón resistente tipo V), logrado probablemente por la disminución en la pérdida de lípidos que promovieron las sales de calcio para la formación de complejos. De la misma forma en que se otorga mayor protección a la fibra dietética y proteínas del grano respecto a la NT (Santiago-Ramos, 2014).

### 2.3. Caracterización estructural del almidón

El análisis estructural del almidón se basa en estudiar los componentes del gránulo de almidón y sus interacciones fisicoquímicas mediante métodos instrumentales disponibles. La mayor parte de los estudios se centra en la caracterización de la estructura molecular del almidón, compuesto primariamente por moléculas de amilosa y amilopectina, las cuales se conforman por cadenas lineales y ramificadas de unidades de glucosa respectivamente, así como, otros componentes encontrados en los gránulos como lípidos y proteínas. La disposición y proporción de estos componentes varía principalmente de acuerdo con su origen botánico. La estabilidad, las transformaciones y propiedades físicas de los materiales del almidón son muy dependientes de la naturaleza de los dominios amorfos y cristalinos presentes en el gránulo. Varias técnicas físicas han sido aprovechadas para tener un acercamiento a la conformación estructural, entre éstas se encuentran la microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), la cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC, por sus siglas en inglés), la difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR, por sus siglas en inglés), la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), pruebas reológicas, entre otras. Cada una de estas técnicas son sensibles a un nivel diferente de la estructura. Por ejemplo, con microscopía se pueden apreciar características externas de los gránulos como su tamaño y morfología que contribuye

a la identificación botánica del almidón. Mientras que mediante otras técnicas como HPSEC se permite describir la longitud de las ramificaciones y el perfil de amilosa y amilopectina. A otro nivel es posible identificar los patrones y el orden tridimensional de las cadenas del almidón con la ayuda de técnicas como la difracción de rayos-X en donde se pueden identificar polimorfismos de las cadenas del almidón como en el tipo-A que consiste en dobles hélices arregladas paralelamente produciendo un cristal monoclinico, o bien, el modelo cristalino tipo-B, el cual, es producido por un arreglo hexagonal de dobles hélices. Generalmente la mayoría de los cereales son tipo-A y algunos tubérculos como la papa son tipo-B, mientras que algunas leguminosas tienen patrones tipo-C las cual es una mezcla de los polimorfismos A y B. Durante la gelatinización del almidón las interacciones con el agua propician la pérdida de cristalinidad la cual puede ser detectada como un evento endotérmico por calorimetría diferencial de barrido. El pico endotérmico, identificado como el pico de gelatinización alrededor de 60 °C, este valor es dependiente de la cantidad de agua. Adicionalmente, los almidones ricos en amilosa por ejemplo producen bandas endotérmicas amplias a temperaturas de fusión altas mediante DSC (~80-130 °C). La caracterización reológica nos da una aproximación de la estructura de la red polimérica del almidón cuando es gelatinizado, para lo cual es común obtener curvas de flujo (esfuerzo cortante o viscosidad Vs. velocidad de corte), permitiendo una descripción completa del comportamiento reológico de la muestra sobre un rango de velocidades de corte. La viscoelasticidad, es una propiedad reológica que nos brinda información sobre las dispersiones de almidón gelatinizadas (DAG), donde  $G'$ , es llamado el módulo de almacenamiento de corte dinámico (módulo elástico), es medido de la energía recuperada por ciclo de deformación y puede ser tomado como un indicador del carácter elástico o sólido del gel. El módulo de pérdida  $G''$  (módulo viscoso) es un estimado de la energía disipada como calor por ciclo de deformación y es indicativo de propiedad viscosa del gel. La tangente de pérdida  $\tan \delta = G''/G'$  nos da un valor numérico que se relaciona con el carácter viscoelástico de la estructura de la red polimérica del almidón gelatinizado valores menores a la unidad indican que el material se comporta más bien como un sólido o un gel que como un líquido. La descripción de la estructura del almidón mediante estas técnicas y algunas otras, permite la elucidación de los mecanismos y la identificación de propiedades funcionales específicas. Los alcances de estas técnicas han sido de ayuda para la comprensión de algunas propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón. Lo cual, nos da posibilidades para aprovechar mejor sus características en beneficio de productos en base al almidón, que es ampliamente consumido en todo el mundo (BeMiller & Whistler, 2009; Eliasson, 2004; Bertolini, 2009).

#### *2.4. Gelatinización del almidón*

El almidón es usado en un amplio rango de aplicaciones industriales además de ser el polisacárido de mayor consumo en la dieta humana. En muchos de los alimentos que consumimos (pastas, arroz, atole, tamales, tortillas, pan, etc) el almidón está presente no solo como almidón nativo sino como almidón gelatinizado. Es bien conocido que cuando el gránulo de almidón es calentado en exceso de agua, el almidón sufre una transición al desorden irreversible denominada gelatinización. Los gránulos se hinchan y pierden su birrefringencia debido a que el agua es absorbida lenta e irreversiblemente durante la fase de gelatinización (Ratnayake & Jackson, 2008). Durante la gelatinización el almidón inicialmente pasa por un proceso de incremento de volumen. La captación de agua por la lamela amorfa se acompaña del hinchamiento dentro de esta región. Como consecuencia de este incremento de volumen impone un estrés sobre los cristales de amilopectina causando la disociación de las dobles hélices llevando a rompimiento de la integridad del gránulo (Eliasson, 2004). En este contexto la gelatinización es también definida como un colapso del orden molecular (rompimiento de puentes -H) dentro del gránulo. Además de los cambios en las propiedades mencionados anteriormente. El aumento de volumen va acompañado de la lixiviación de cadenas del almidón hacia afuera del gránulo. La amilosa es el principal material que se lixivía, sin embargo, también llega a suceder con la amilopectina dependiendo de la severidad de las condiciones de calentamiento y velocidades de corte aplicadas. La salida de material lixiviado al exterior de los gránulos durante la gelatinización produce un aumento en la viscosidad del medio y es un fenómeno característico usado en el espesamiento de alimentos. Durante la gelatinización, ocurren cambios simultáneos a nivel microscópico, así como a escala nanométrica. La pérdida de cristalinidad puede ser detectada como un evento endotérmico por calorimetría diferencial de barrido. Este hecho también puede corroborarse mediante microscopía con luz polarizada, donde se contrasta un almidón nativo a uno que ha gelatinizado notándose en la pérdida de birrefringencia durante la gelatinización que refleja la desaparición de la organización radial de las cadenas de amilopectina y amilosa dentro del gránulo (Bertolini, 2009). Finalmente, a un nivel macroscópico la gelatinización del almidón puede ser vista como el proceso por el cual las moléculas del almidón dispersas en un medio acuoso se asocian y forma una estructura de red tridimensional (BeMiller & Whistler, 2009). El estado gelatinizado del almidón modifica y afecta los atributos sensoriales (textura, viscosidad, aspecto y sabor) así como sus propiedades nutricionales.

#### *2.5. Retrogradación del almidón*

Los cambios posteriores a la gelatinización del almidón están acompañados de una restauración del orden molecular en el almidón, estos cambios son descritos colectivamente por el termino retrogradación. Así, durante la fase de enfriamiento posterior a la gelatinización, las cadenas de

almidón tienden a asociarse en una estructura ordenada. Las propiedades fisicoquímicas de la amilosa y la amilopectina no son iguales y por ende esto contribuye a que se retrograden de manera diferente. Mediante análisis de electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se ha podido observar que en el inicio de la retrogradación la amilosa presenta los primeros cambios hacia la formación de estructuras parcialmente ordenadas. Las hélices interactúan formando agregados semi-cristalinos separados por regiones amorfas. Sin embargo, la amilopectina forma estructuras complejas en forma de una red fractal que se forma de manera paulatina. De esta manera se ha podido identificar que la cristalización de la amilosa es rápida y toma lugar en el orden de horas, mientras que la velocidad de cristalización de amilopectina es más lenta y toma lugar a lo largo de días y hasta algunas semanas. Por lo cual se dice que la retrogradación de la amilosa y la amilopectina ocurre de acuerdo con diferentes procesos cinéticos. (Bertolini, 2009). Aun así, algunas etapas de la retrogradación, tales como interacciones entre cadenas del almidón, formación de doble hélice, cristalización, y formación de redes interconectadas, son similares en ambos polímeros (Bertolini, 2009). Por todo lo anterior, la retrogradación es un fenómeno complejo que depende de varios factores, tales como la fuente del almidón, la concentración de almidón, la cocción, la tasa de enfriamiento, pH, y la presencia de solutos tales como lípidos, electrolitos y azúcares. La retrogradación involucra la formación de cadenas entrelazadas, ordenamiento a corto alcance molecular y la cristalización de agregados de dobles hélices, al momento se han explorado varias técnicas físicas para dar seguimiento a este fenómeno y otros cambios asociados. En este contexto, algunos métodos disponibles son: la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), la dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAX, por sus siglas en inglés), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), espectroscopía Raman y resonancia magnética nuclear de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR, por sus siglas en inglés), los cuales han mostrado ser sensibles a los cambios de algunos elementos estructurales del almidón con el tiempo. Por ejemplo, el análisis térmico (DSC) es sensible al ordenamiento de las cadenas de la fracción de amilopectina, un proceso manifestado por el desarrollo de un pico endotérmico ( $T_m = 45\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ ). Directamente en productos como pan y tortillas pueden ser evaluadas otras técnicas mecánicas como los análisis de textura sensibles a la dureza provocada por los reordenamientos de las cadenas en la matriz de estos alimentos (BeMiller & Whistler, 2009). La pérdida de frescura en tortillas y el pan es causado principalmente por una serie de cambios físicos, químicos que ocurren en el almidón después del cocimiento. Todo esto tomando en cuenta que el almidón es el principal componente (63-72 % bs) de productos donde ocurre este fenómeno. Clubbs, Vittadini, Shellhammer & Vodovotz, (2008) hicieron uso de un hidrocoloide para disminuir la pérdida de agua y la recristalización de la amilopectina durante el almacenamiento de tortillas, que implicó un menor efecto de la retrogradación. Sin embargo, este tipo de soluciones aún

poseen áreas de oportunidad para mejorar como los sabores indeseables provocados, los costos, entre otras desventajas.

## 2.6. *Hidrocoloides usados en tortillas*

A la duración de tiempo en la que se retienen las características de calidad que se relacionan con la frescura de un producto se le conoce como estabilidad de anaquel o de almacenamiento. En el caso de las tortillas de maíz la frescura se ve deteriorada debido al envejecimiento. Cuando las tortillas han perdido la frescura son más duras y se rompen o truenan con mayor facilidad cuando son enrolladas (Rooney & Serna-Saldivar, 2015). Estos efectos se han relacionado a la tasa de deshidratación y recristalización de la amilopeptina los cuales son los principales factores responsables del endurecimiento y envejecimiento de las tortillas identificándose por un incremento en la dureza y la fragilidad que son características indeseables. Han sido varios los métodos usados para mejorar la estabilidad en el almacenamiento o la rolabilidad de tortillas, incluyendo el uso de proteínas, enzimas e hidrocoloides entre los que se destacan la goma guar, carragenina, goma xantana, goma arábiga y carboximetilcelulosa (CMC) (Vázquez-Carrillo *et al.* 2011; Rooney & Serna-Saldivar, 2015). De estos componentes, la CMC ha sido utilizada industrialmente como un medio para retardar los efectos indeseables del envejecimiento de las tortillas durante el almacenamiento (Clubbs, Vittadini, Shellhammer & Vodovotz, 2008). La ventaja encontrada en el uso de hidrocoloides en tortillas es que estos componentes incrementan la habilidad para reducir la cantidad de agua capaz de alcanzar la superficie del producto que promueve su deshidratación, lo cual conlleva un incremento en la habilidad de mantener la pliability (flexibilidad) del producto. Algunos otros autores sugieren que la CMC muestra buena afinidad con el agua en matrices de harina de maíz nixtamalizada formando una estructura amorfa enredada alrededor de las partículas de la harina que ayuda a conservar en buena parte la hidratación y así las características texturales con el tiempo (Gutierrez de Velasco, 2004; Bueso, Rooney, Waniska, & Silva, 2004). Además de los beneficios aportados a la tortilla, los hidrocoloides mejoran la maquinabilidad de la masa disminuyendo la pegajosidad y teniendo ahorros en energía para el amasado en la producción en gran escala.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

La necesidad de nuevos métodos de nixtamalización con menor impacto ambiental ha llevado al surgimiento la nixtamalización ecológica. En este contexto existen reportes recientes sobre el efecto de algunas sales de calcio (carbonato de calcio) como sustitutos de la cal en la nixtamalización ecológica del grano de maíz y subproductos para el mejoramiento de la calidad y la funcionalidad de tortillas. Sin embargo, los mecanismos de interacción de estas sales sobre la estructura supramolecular del almidón de maíz son poco claros. El presente trabajo aborda los efectos del carbonato de calcio (0.0–2.0 % p/p  $\text{CaCO}_3$ ) sobre la morfología, cristalinidad, reología e hidrólisis de dispersiones de almidón gelatinizado. La gelatinización del almidón es considerada por algunos como el fenómeno fisicoquímico de mayor importancia durante el proceso de nixtamalización. El uso de fracciones de harina gelatinizada ha mostrado mejorar las características de la masa para elaboración de pan con efectos similares al de los hidrocoloides ampliamente usados en la industria, no obstante, su uso conlleva un incremento en el costo del producto siendo un ingrediente mucho más caro comparado a los demás ingredientes usados en la manufactura de tortillas, por lo que la industria está ampliamente interesada en sustitutos más baratos con una funcionalidad similar. Derivado de esto y a que no existen reportes del uso de fracciones harina gelatinizada en tortillas, este trabajo abordará también el efecto en las propiedades fisicoquímicas y reología del uso de fracciones de harina (nixtamalizada) gelatinizada en la elaboración de masas para tortillas.

## 4.- OBJETIVOS

Estudiar el efecto de la concentración  $\text{CaCO}_3$  sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas de dispersiones de almidón, así como, evaluar los efectos de adicionar dispersiones de harina de maíz nixtamalizado gelatinizado (HMNG) a la masa hecha de harina de maíz nixtamalizado (HMN) comercial sobre parámetros fisicoquímicos e indicadores asociados con el endurecimiento de tortillas de maíz y propiedades físicas de la masa.

### 4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### *Parte uno*

1. Analizar la morfología de las dispersiones de almidón de maíz gelatinizado (DAMG) tratado a diferentes concentraciones de  $\text{CaCO}_3$  mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.
2. Determinar las características reológicas de las DAMG mediante pruebas oscilatorias (barridos en amplitud y frecuencia).
3. Determinar las interacciones en el sistema almidón- $\text{CaCO}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$  mediante análisis térmico, sinéresis y ángulo de contacto de las DAMG.
4. Determinar el efecto del  $\text{CaCO}_3$  sobre la cristalinidad y el ordenamiento de las doble hélices de las cadenas de almidón mediante difracción de rayos-X (XRD) y espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR).
5. Estudiar la degradabilidad de las DAMG tratadas con  $\text{CaCO}_3$  en condiciones de digestión mediante hidrólisis ácida.

#### *Parte dos*

1. Determinar las interacciones en el sistema almidón- $\text{H}_2\text{O}$  mediante análisis térmico, capacidad de retención de agua de las masas.
2. Determinar las interacciones en el sistema almidón- $\text{H}_2\text{O}$  mediante análisis térmico, contenido de humedad y ángulo de contacto de tortillas.
3. Determinar el efecto de la fracción gelatinizada sobre la formación de la doble hélice de las cadenas de almidón mediante espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR) en tortillas.
4. Caracterizar la reología las masas mediante curvas de flujo, así como determinar el perfil de textura de las tortillas a diferentes días de almacenamiento.

## 5.- HIPÓTESIS

- El  $\text{CaCO}_3$  provocará la formación de entrecruzamientos con las cadenas de almidón de las dispersiones gelatinizadas modificando las propiedades a nivel estructural del almidón.
- El uso de fracciones de harina maíz gelatinizada, compuesta de una matriz continua rica en amilosa conferirá propiedades viscosas y una fracción rica en amilopectina de remanentes insolubles (ghost) con alta elasticidad, entrecruzada a su vez a las moléculas de almidón de la harina de maíz nixtamalizada en la masa por iones calcio, mejorará la capacidad de retención de agua de la masa y consecuentemente el retardo del endurecimiento de las tortillas.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. *Materiales*

El almidón de maíz nativo (Nr. S-4126) se adquirió de Sigma-Aldrich (San Luis, USA). El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) grado reactivo fue obtenido de J.T. Baker (Xalostoc, México). Para la elaboración

de masa y tortillas se usó harina de maíz nixtamalizada (cocimiento alcalino) (HMN) sin aditivos Maseca S.A. de C.V. (Monterrey, México). El agua utilizada en todas las formulaciones fue destilada previamente.

### *6.2. Tratamiento con carbonato de calcio*

El almidón de maíz (5g) fue dispersado en 95g de solución de carbonato de calcio a diferentes concentraciones (0.0 %, 0.25 %, 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % p/p). Las dispersiones se calentaron a ~92 °C (temperatura de ebullición en la Ciudad de México) con agitación moderada durante 25 min para permitir la cocción de los gránulos de almidón con el calcio, así como, para completar la gelatinización de los gránulos de almidón. En todos los casos, el pH de las dispersiones de almidón fue monitoreado (Mettler delta340, Columbus, USA). Las dispersiones de almidón de maíz gelatinizado (DAMG) se enfriaron a temperatura ambiente y se codificaron como DAMG<sub>x</sub>, donde el subíndice indica la concentración de CaCO<sub>3</sub> usada. Una fracción de las DAMG fue usada para distintos análisis (microscopía óptica, tamaño de partícula y reología) a partir de 15 min de su preparación para minimizar los efectos adversos causados por la retrogradación del almidón, una segunda fracción de las DAMG fue secada con aire seco a 30 °C durante 24 h para los análisis que requerían las muestras secas (SEM (por sus siglas en inglés, microscopía electrónica de barrido), HPSEC (por sus siglas en inglés, cromatografía por exclusión de tamaño de alta resolución), incremento de volumen, solubilidad, XRD (por sus siglas en inglés, difracción de rayos X) y propiedades térmicas).

### *6.3 Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)*

El efecto del CaCO<sub>3</sub> sobre la distribución de tamaño molecular del almidón de maíz fue determinado mediante cromatógrafo por exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC) (Shimadzu, Tokyo, Japón). Las dispersiones secas (1g) se hidrataron en 10 mL de agua, posteriormente se suspendieron en 90 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y puestos en ebullición por 2 h con agitación. La solución de almidón obtenida se mantuvo a temperatura ambiente en agitación por 24 h. A continuación, la solución se precipitó con etanol y se centrifugó a 2500 rpm por 20 min, el precipitado obtenido se lavó tres veces con etanol, y fue secado al vacío por 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, 5 mg de las muestras se humedecieron con etanol (200 µL) y se disolvieron con NaOH 2M (1 mL) con agitación y calentamiento (70 °C) durante 1 h. Consecutivamente, se agregaron 17 mL de una solución de NaNO<sub>3</sub> 0.15 M y se neutralizó con HCl 2M diluyendo nuevamente con NaNO<sub>3</sub> 0.15 M hasta obtener una concentración de 0.24 mg mL<sup>-1</sup>. Antes de la inyección en el cromatógrafo, la muestra se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.8 µm. El filtrado se inyectó dentro del sistema HPSEC, el cual consistió en una bomba LC-10AT, un detector de índice de refracción RID-10A, un

inyector automático SIL-10A y tres columnas ultrahidrogel conectadas en serie. Se uso  $\text{NaNO}_3$  0.1 M como fase móvil a una razón de flujo de  $0.3 \text{ mL min}^{-1}$ . La temperatura de las columnas y el detector IR (índice de refracción) se fijó en  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente.

#### 6.4. Microscopía óptica

Las DAMG (1.0 mL) se mezclaron con 1.0 mL de solución de yodo y yoduro de potasio (0.3 g de yodo y 7.5 g de yoduro de potasio en 500 mL de glicerol al 50 % p/p). Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokio, Japón) acoplado a un sistema analizador de imágenes (cámara digital Olympus C3030; software: Image Pro-Plus versión 4.5, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Las micrografías seleccionadas se presentan a  $100\times$ .

#### 6.5. Microscopía SEM

La microscopía electrónica de barrido (SEM) fue realizada en las muestras de las DAMG para revelar las características de la microestructura superficial. Las muestras de DAMG fueron cubiertas con una capa delgada de oro en un Aspersor de Iones de Cubierta Fina JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japan). Un microscopio electrónico de barrido de alto vacío JEOL JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japan), a 20kV, fue usado para observar cada muestra a magnificación de  $2000\times$ . Micrografías SEM representativas serán presentadas.

#### 6.6 Tamaño de partícula

El diámetro medio ( $d_{\phi L}$ ) de las DAMG fue estimado por el método de difracción láser mediante un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Las muestras de las DAMG (0.25 mL) fueron mezcladas con 0.5 mL de agua destilada, y la mezcla obtenida se homogenizó con suficiente agitación. Se consideró utilizar una oscuración de 5-10 % para todas las lecturas. En todas las mediciones fue necesario el índice de refracción de las DAMG 1.335, y la del dispersante que en este caso se utilizó agua (1.33).

#### 6.7. Sinéresis

La sinéresis fue determinada después de 24 h de la preparación de las DAMG. Muestras (14 g) fueron colocados en tubos de centrifuga calibrados y centrifugados a  $222 \times g$  por 3 min a temperatura ambiente ( $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), el sobrenadante claro fue vertido y pesado. Los resultados fueron expresados como: sinéresis %, el cual se obtuvo como se expresa a continuación: (peso del agua extraída de la DAMG después de 24 h / peso del agua inicial contenido en la DAMG)  $\times 100$ .

### 6.8. *Ángulo de contacto*

El método a la gota inmóvil es una aproximación del ángulo óptico que es frecuentemente usado para estimar propiedades de humectación de una superficie sólida. Para este propósito, se formaron películas de cada DAMG depositando una muestra de 1.5 mL sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio y secadas a temperatura ambiente durante 24 h. El ángulo de contacto producido por gotas de agua sobre la superficie de las películas formadas fue determinado sobre una muestra de la película de 4 cm<sup>2</sup> usando un analizador de ángulo de contacto (OCA 20, Dataphysics Instrument GmbH, Filderstadt, Alemania). Para el caso del ángulo de contacto de tortillas se determinó usando 10 µL gotas de aceite de canola sobre diferentes localizaciones de la superficie de la tortilla a 25 °C. El método se basa en el procesamiento de imagen y en la curva ajustada numéricamente al tomar un perfil de gota meridiano como referencia. Cinco mediciones fueron realizadas tomando el promedio resultante.

### 6.9. *Volumen de hinchamiento (Swelling volume)*

El hinchamiento de las muestras de almidón tratadas fue estimado por el método de Huang *et al.* (2007). Las muestras deshidratadas de las DAMG (0.2 g) fueron pesadas en un tubo de centrifuga de 20 mL y se le agregaron 10 mL de agua. Las muestras se atemperaron a 25 °C por 30 minutos y posteriormente calentadas a 70 °C por 40 min. Posteriormente las muestras se enfriaron a 20 °C se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. El sobrenadante se desechó y el volumen incrementado se registró y se obtuvo el volumen por unidad de peso de muestra seca. Los análisis se realizaron por duplicado.

### 6.10. *Solubilidad*

La solubilidad de las DAMG se estimó mediante el método de Schoch (1964). Las muestras secas (0.5 g) se mezclaron con agua (40 mL) y calentadas a la temperatura deseada especificada por 240 min. Después de centrifugarse a 3000 × g por 15 min, el sobrenadante se secó (120 °C) por 2 h y el remanente se pesó. La solubilidad (%) se registró como la tasa del peso de sobrenadante seco respecto al almidón seco.

### 6.11. *Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR)*

Las muestras de las DAMG, masa y tortillas se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de acuerdo con la metodología reportada por van Soest *et al.* (1995). Para este fin, los espectros FTIR fueron obtenidos usando un espectrofotómetro Perkin Elmer (Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio universal ATR con cristal de diamante para las muestras. Por cada muestra, el espectro representado representa el promedio de 32

barridos usando una resolución de  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Además, los espectros fueron corregidos a partir de la línea base en el rango de  $1200\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$  trazando una línea recta por debajo del rango mencionado. Los espectros fueron deconvolucionados usando funciones Gaussianas y Lorenzianas con un anchura a media altura de  $15 \text{ cm}^{-1}$ .

### 6.12. Difracción de rayos-X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos-X de las DAMG secas fueron determinados a temperatura ambiente en un difractómetro Siemens D-5000 (Karlsruhe, Alemania) usando radiación de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.543 \text{ \AA}$ ) y un monocromador de grafito de haz secundario operado a 40 kV y 30 mA. Las intensidades fueron medidas en el rango de  $10\text{-}60^\circ 2\theta$  con un tamaño de escalón de 0.03 y tiempo de medición de 1.0 s por punto. La cristalinidad se midió de acuerdo con el método Hermans–Weidinger. Los difractogramas se suavizaron y corrigieron en la línea base trazando una línea recta a partir de  $\sim 4^\circ 2\theta$  a fin de normalizar y realizar apropiadamente el cálculo de cristalinidad (Rindlava, *et al.* 1997).

### 6.13. Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de las DAMG y las masas de HMG se determinaron con un reómetro oscilatorio dinámico Physica MCR300 (Physica Messtechnik GmbH, Stuttgart, Alemania), utilizando una geometría cono-plato para las DAMG, en la cual el cono de rotación fue 50 mm de diámetro, y el ángulo del cono de  $2^\circ$  con un gap de 0.05 mm. Para evaluar las propiedades reológicas de las masas se utilizó una geometría de plato paralelo (5 cm de diámetro). En el que el plato serrado (estriado) superior fue bajado sobre la muestra hasta alcanzar un gap de 0.05 mm. Para las DAMG se colocó alrededor de 1.25 mL de muestra en el sistema de medición. Mientras que la cantidad de masa utilizada para las pruebas fue de  $\sim 5.0 \text{ g}$ . Las muestras se dejaron reposar por 5 min a  $25^\circ \text{C}$  con el fin de lograr la recuperación estructural. Las curvas de flujo obtenidas se realizaron variando la tasa de corte de  $0.1$  a  $100 \text{ s}^{-1}$  en la dirección hacia adelante, y de  $100$  a  $0.1 \text{ s}^{-1}$  en la dirección hacia atrás (solo para el caso de las DAMG). Los resultados experimentales de viscosidad aparente ( $\eta_{eff}$ ) fueron descritos mediante un modelo de ley de potencia dado por la siguiente ecuación:

$$\eta_{eff} = K_n \gamma^{n-1} \quad (1)$$

Donde  $\gamma$  es la velocidad de corte ( $\text{s}^{-1}$ ),  $n$  es el índice de comportamiento del flujo y  $K_n$  es el índice de consistencia ( $\text{Pa s}^n$ ). Nótese que  $n < 1$  corresponde a un comportamiento de reoadelgazamiento,  $n = 1$  a un fluido Newtoniano y  $n > 1$  a un comportamiento de reoespesamiento. Para determinar los posibles cambios en los módulos elástico y viscoso por efecto del carbonato de calcio sobre las DAMG y por el uso de fracciones de harina de maíz gelatinizada sobre las masas de maíz, se realizaron barridos de

amplitud en el rango de 0.1–1000 % a 25 °C. Para todos los casos los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') fueron obtenidos del software del equipo (US200/32 V2.50).

#### 6.14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las muestras de las DAMG, masa y tortillas (7 mg) (sin haber sido sujetas a ningún tipo de acondicionamiento) se colocaron en celdas de aluminio selladas y analizadas en un calorímetro diferencial de barrido (TA Instruments, Q1000, New Castle, USA). Las muestras fueron calentadas a 5 °C min<sup>-1</sup> de -30 a 200 °C. Todas las corridas se realizaron por duplicado. El contenido de agua congelable (FW, por sus siglas en inglés “Freezable water”) se obtuvo del pico endotérmico de fusión alrededor de 0 °C correspondiente a la fusión del agua. La entalpía de la transición endotérmica ( $\Delta H$ , J g<sup>-1</sup>) se calculó usando el software Universal Analysis 2000 (New Castle, USA). La entalpía de esta transición se utilizó para el cálculo del FW usando la siguiente ecuación:

$$\%FW = \left( \Delta H \times \frac{1}{\text{Calor latente de fusión del agua}} \times \frac{1}{\text{g del agua total/g de muestra}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Por otro parte, se mostrará que las cinéticas de la entalpía de retrogradación presentan un comportamiento exponencial. Respecto a esto, se estimó una aproximación de la tasa de envejecimiento de las tortillas mediante un ajuste de los datos experimentales a una cinética de primer orden de la forma

$$\frac{d\Delta H_f}{dt} = k_r (\Delta H_{r,\infty} - \Delta H_r) \quad (3)$$

Donde  $\Delta H_{r,\infty}$  es la entalpía de retrogradación limitante,  $\Delta H_r$  la entalpía de retrogradación al tiempo  $t$  y  $k_r$  es la constante de velocidad de retrogradación.

#### 6.15. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de las DAMG se realizó de acuerdo con el método reportado por Kim *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Muestras de DAMG (1 g, base seca) se dispersaron en una solución acuosa de ácido clorhídrico (100 mL, 1 M), mediante agitación y manteniéndolas a 35 °C durante 2 h. Posteriormente, la DAMG se centrifugó (6000 × g por 15 min) y los precipitados se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Los precipitados sólidos fueron secados con aire a 35 °C durante 24 h, y así se prosiguió a medir el peso sólido del gel de almidón hidrolizado. El grado de hidrólisis (%) se calculó como la razón porcentual de los sólidos disueltos y los sólidos de almidón iniciales.

#### *6.16. Preparación de la masa*

La masa fue preparada con HMN (40 %) y agua (60 %) (Clubbs, Vittadini, Shellhammer & Vodovotz, 2008). HMN y el agua fue puesta en un tazón y mezclada con las manos durante un minuto. Las formulaciones que contienen harina gelatinizada (GF) fueron realizadas de la siguiente forma. HMN (7 % p/p) fue dispersada en agua y se calentó a 92 °C (temperatura de ebullición en la Ciudad de México) con agitación moderada durante 20 min para permitir la completa gelatinización de los gránulos de almidón contenidos en la HMN. Posteriormente, la dispersión gelatinizada se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (~25 °C). Se mezcló una fracción de la harina de maíz gelatinizada (5, 10 y 15 % p/p) con la cantidad total de agua y harina a utilizar en la receta descrita inicialmente para la preparación de la masa. La masa fue dejada reposar durante 1 minuto y dividida en piezas de 30 g para la preparación de las tortillas.

#### *6.17. Capacidad de retención de agua*

La determinación de la capacidad de retención de agua de las masas (WHC) se determinó de acuerdo con el método aprobado 56-11.02 (AACC International 2000) y a lo reportado por Quinn & Paton (1979). Una muestra de 5 g se mezcló con exceso de agua (25 mL) y se centrifugó a 1000 × g durante 15 min. El sobrenadante se decantó, el tubo se pesó y el agua absorbida se calculó por diferencia (el peso del sedimento menos el peso de la muestra). Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### *6.18. Preparación de tortillas*

Las tortillas de maíz se prepararon con esferas de masa de 30 g y comprimidas con una prensa de tortillas manual. Para evitar que la masa se pegara a la prensa se colocaron dos cubiertas plásticas en cada una de las placas de la prensa. Las tortillas resultantes tuvieron una dimensión aproximada de 140 ± 5 mm de diámetro y 1.5–2.0 mm de espesor. La cocción de las tortillas se llevó a cabo mediante una parrilla eléctrica (IKA, modelo C-MAG HS), calentando a 350 °C durante 60 s posteriormente volteada y dejada cocer por 60 s, se dio vuelta nuevamente y cocida hasta que comenzará a inflar (aproximadamente 5 s) las tortillas fueron dejadas enfriar a condiciones ambientales (~25 °C) durante 10 min previo a ser empacadas individualmente en bolsas plásticas (las tortillas usadas para las pruebas de almacenamiento se mantuvieron a 4±1 °C).

#### *6.19. Contenido de humedad*

El contenido de humedad de las muestras de masa y tortillas de maíz fue determinado mediante una estufa de secado al vacío por el método AOAC (2002), las muestras previamente pesadas fueron

mantenidas a 60 °C por 24h. Se determinó el peso final y se estimó el contenido de humedad por pérdida de peso. Los experimentos fueron hechos por triplicado.

#### *6.20. Dureza de tortillas*

La dureza es considerada como la característica textural más relevante respecto al envejecimiento de las tortillas y se determinó usando un texturómetro Brookfield CT3-4500 (Massachusetts, USA) equipado con una sonda esférica TA18 (1.27 cm). Para cada muestra de tortilla evaluada se utilizó la pieza entera sujeta a la base del texturómetro por una placa horadada por el centro con una abertura de 2.54 cm de diámetro. Las tortillas fueron comprimidas a una razón de 2.0 mm s<sup>-1</sup> hasta alcanzar 4 cm como valor meta ensayando las pruebas a un ciclo. Realizando tres mediciones de cada formulación. Los valores de dureza fueron provistos por el software TexturePro CT (Brookfield, Massachusetts, USA).

#### *6.21. Análisis estadístico*

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar y sometidas a un análisis de varianza usando Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., Cambridge, MA, USA). Cuando fue pertinente, las diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los promedios fueron detectadas usando la prueba de Tukey.

## 7.- RESULTADOS PARTE I

### 7.1.- Resumen

El uso de sales de calcio en lugar de cal permite una nixtamalización ecológica (NE) del grano de maíz, donde el impacto negativo de contaminación de la nixtamalización tradicional (NT) con cal se reduce. En esta primera parte del trabajo se evaluaron los efectos del carbonato de calcio (0.0-2.0 % p/p  $\text{CaCO}_3$ ) sobre la morfología, cristalinidad, reología e hidrólisis de dispersiones de almidón de maíz gelatinizado (DAMG). Los análisis de microscopía mostraron que el  $\text{CaCO}_3$  cambió la morfología de los remanentes insolubles de amilopectina (“ghosts” en inglés) y decreció el grado de sinéresis de las DAMG. Los análisis de distribución de tamaño de partícula mostraron una ligera disminución de tamaño conforme se incrementó el contenido de  $\text{CaCO}_3$ . Respecto a los patrones de rayos-X indicaron que la cristalinidad alcanzó un valor mínimo a concentraciones alrededor de 1 % p/p. Las DAMG con las concentraciones más altas de  $\text{CaCO}_3$  exhibieron una mayor área de tixotropía y un comportamiento viscoelástico dependiente de la frecuencia. Un posible mecanismo involucrado en la modificación de las cadenas de almidón por el carbonato de calcio es que el almidón puede actuar como un intercambiador de iones del tipo ácido débil capaz de intercambiar los protones de los grupos hidroxilo por cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ).

### 7.2. Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es una fuente importante de energía mundial para consumo humano. Los granos de maíz raramente son usados directamente para producir alimentos ya que la masa obtenida de la harina de los granos molidos tiene una manejabilidad pobre (Rooney & Serna-Saldivar, 2015). Para aliviar esta situación, los granos de maíz son tratados tradicionalmente con cenizas de cal ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) en un proceso conocido como nixtamalización, el cual se remonta a tiempos pre-colombinos en las Américas (Moreno-Castro *et al.* 2015). En un primer paso, los granos de maíz son cocidos con agua y cal suficiente bajo condiciones atmosféricas por 30-60 min. Subsecuentemente, la mezcla cocida es reposada por 12-14 h. Los granos de maíz resultantes (nixtamal) son lavados varias veces para remover el exceso de cal y finalmente se muele en molino de piedra resultando en una masa maleable que es usada para la elaboración de varios productos alimenticios (harina, tortilla, frituras, etc.). También, la masa puede ser deshidratada para su comercialización como un polvo seco a la cual el agua puede ser incorporada para obtener una masa maleable. En décadas recientes, muchos investigadores han estudiado los efectos de la cal sobre la microestructura, funcionalidad, digestibilidad y viscoelasticidad de los granos y la masa de maíz (Robles, Murray & Paredes-López, 1988; Fernandez-Muñoz *et al.*, 2004; Mondragón, Bello-Pérez, Agama, Melo, Betancur-Ancona, & Peña, 2004; Méndez-Montealvo, García-Suárez, Paredes-López, & Bello-Pérez, 2008; Yahuaca-

Juárez *et al.*, 2013; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2015). Estos autores encontraron que además de la incorporación funcional del calcio, la nixtamalización tradicional causa la degradación del pericarpio, la saponificación lipídica y la gelatinización parcial del almidón. El procesamiento de la nixtamalización tradicional tiene algunas desventajas, tales como: (1) alto consumo de agua; (2) produce contaminación de efluentes con alta carga (~ 5-15 %) de residuos sólidos (Rosentrater, 2006); y (3) pérdida de nutrientes (Salazar, Arámbula-Villa, Luna-Bárceñas, Figueroa-Cárdenas, Azuara, & Vázquez-Landaverde, 2014). En particular, la fracción espesa de los residuos, obtenidos bajo condiciones muy alcalinas, es compuesta de partículas coloidales complejas floculadas, que son muy difíciles de remover mediante la mayoría de los métodos de tratamiento de aguas residuales (Suarez-Meraz, Ponce-Vargas, Lopez-Maldonado, Cornejo-Bravo, Oropeza-Guzman & Lopez-Maldonado, 2016). Se ha propuesto que la sustitución parcial o total de la cal por sales de calcio puede contribuir a aliviar estos problemas tecnológicos (Campechano-Carrera *et al.*, 2012). Este proceso nominado como nixtamalización ecológica es llevado a cabo bajo condiciones alcalinas moderadas (~ pH 8), reduciendo en esta manera los efectos adversos sobre los nutrientes y la producción de residuos floculados. Estudios posteriores mostraron que el proceso de nixtamalización ecológica lleva a productos alimentarios (masa y tortillas) con características sensoriales y nutrimentales aceptables, y con un color limpio. Se encontró también que la nixtamalización ecológica con carbonato de calcio incrementó los contenidos de fibra (Bello-Pérez, Flores-Silva, Agama-Acevedo, Figueroa-Cardenas, Lopez-Valenzuela, & Campanella, 2014) y el almidón resistente de tortillas en comparación a aquellas obtenidas por el proceso de nixtamalización tradicional con cal (Santiago-Ramos *et al.*, 2015a), mientras que ambos procesos inducen propiedades térmicas similares (Santiago-Ramos *et al.*, 2015b). En resumen, la nixtamalización del grano de maíz basado en sales de calcio es un proceso prometedor para fortalecer la calidad de la harina, masa, tortillas y otros productos alimentarios conteniendo maíz tradicional, así como para reducir la producción de residuos contaminantes. La vasta mayoría de estudios de la nixtamalización tradicional están basadas en el tratamiento del grano entero de maíz. Solo un número limitado de reportes se han enfocado en los efectos específicos de la concentración de cal sobre el almidón de maíz. Bryant & Hamaker (1997) mostraron que la gelatinización de almidón de maíz se afecta por la cocción con cal como la capacidad de retención de agua, la solubilidad del almidón y la temperatura de gelatinización se incrementaron por la adición de hidróxido de calcio a niveles de 0.0 y 0.40-0.50 %, con valores máximos en 0.20 %. Los datos termo-gravimétricos han sido usados para estudiar la degradación térmica del almidón de maíz con y sin tratamiento alcalino, hallando que el almidón de maíz tratado con hidróxido de calcio exhibió los valores de energía de activación más altos durante todo el proceso de degradación térmica lo cual podría ser relacionado al proceso físico de entrecruzamiento entre los constituyentes del almidón y

los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Pineda-Gómez, Coral, Ramos-Rivera, Rosales-Rivera, & Rodríguez-García, 2011; Pineda-Gómez, Rosales-Rivera, & Rodríguez-García, 2012). Contreras-Jiménez, Gaytán-Martínez, Figueroa-Cárdenas, Avalos-Zúñiga, & Morales-Sánchez (2014) mostraron que el tiempo de remojo y el contenido de hidróxido de calcio tuvo efectos significantes sobre la absorción de agua y pH de las partículas de maíz. Lobato-Calleros *et al.* (2015) estudiaron las concentraciones de cal entre 0.0 y 2.0 %, encontrando que el hinchamiento del almidón, la capacidad de retención de agua, y la gelatinización exhibió valores máximos a concentraciones alrededor de 0.2 % (w/v) de cal. Los reportes antes mencionados proveen percepciones interesantes con relación a los mecanismos involucrados en la transformación del almidón de maíz por tratamientos en medios alcalinos. Aparentemente el hidróxido de calcio afecta la estructura supramolecular del almidón de maíz en dos formas: (1) los iones calcio están ligados a las cadenas de almidón para formar estructuras entrecruzadas que refuerzan la retención de agua y la viscoelasticidad (Lobato-Calleros *et al.*, 2015), y (2) los iones hidróxido rompen las moléculas de amilopectina ramificadas, mejorando ambas la difusión de iones calcio y la viscoelasticidad de geles de almidón de maíz tratados (Bryant & Hamaker, 1997). Además, reportes recientes han obtenido información sobre los efectos de sales de calcio sobre la estructura supramolecular del almidón de maíz, el tema requiere una aclaración más específica. En relación con esto, el objetivo de la primera parte de este trabajo fue estudiar algunos efectos del carbonato de calcio sobre la morfología, cristalinidad, reología e hidrólisis de dispersiones de almidón de maíz.

### 7.3. Resultados y discusión

#### 7.3.1. pH de las DAMG

El pH de las DAMG juega un papel importante en los efectos inducidos por la nixtamalización ecológica. Típicamente, la nixtamalización tradicional basada en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es realizada bajo condiciones fuertemente alcalinas (~ pH de 12.0, 1.0 % p/p  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Tales niveles de pH no pueden ser alcanzados con sales de calcio debido a la deficiencia de iones OH. El pH de las DAMG se muestra en la primera columna de la Tabla 1. Considerando que el pH de las DAMG obtenidas por la cocción en agua pura fue alrededor de 5.42, el pH alcanzado por las concentraciones más altas de  $\text{CaCO}_3$  de 2.0 % p/p fue de solo 7.93. Esto indica que, en contraste a la nixtamalización tradicional, el proceso basado en sales de calcio se lleva a cabo en condiciones cercanas a un pH neutro.

**Tabla 1.** Propiedades de las DAMG tratadas con diferentes contenidos de CaCO<sub>3</sub>.

Código del gel	pH	S (%)	Ángulo de Contacto (grados)	Grado de hidrólisis (%)
<b>DAMG<sub>0.0</sub></b>	5.42±0.15 <sup>a</sup>	9.5±0.19 <sup>a</sup>	20.66±0.28 <sup>a</sup>	57.12±1.14 <sup>a</sup>
<b>DAMG<sub>0.25</sub></b>	6.67±0.20 <sup>b</sup>	8.7±0.18 <sup>b</sup>	22.34±0.21 <sup>b</sup>	66.61±1.33 <sup>b</sup>
<b>DAMG<sub>0.5</sub></b>	7.54±0.23 <sup>c</sup>	8.1±0.16 <sup>c</sup>	21.82±0.23 <sup>a</sup>	73.47±1.24 <sup>c</sup>
<b>DAMG<sub>1.0</sub></b>	7.82±0.41 <sup>d</sup>	7.6±0.15 <sup>d</sup>	18.73±0.24 <sup>c</sup>	76.76±1.53 <sup>d</sup>
<b>DAMG<sub>2.0</sub></b>	7.93±0.39 <sup>d</sup>	7.3±0.16 <sup>d</sup>	16.13±0.19 <sup>d</sup>	79.19±1.42 <sup>d</sup>

Los valores son el promedio ± DesvEst de tres replicados. Las diferencias significativas en cada columna están expresadas con letras diferentes ( $p < 0.05$ ). DAMG = dispersión de almidón de maíz gelatinizado; S = sinéresis %

**Tabla 2.** Propiedades de las DAMG tratadas con diferentes contenidos de CaCO<sub>3</sub>. (continuación)

Código del gel	Respuesta RI (A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> )	SV a 70 °C (mL g <sup>-1</sup> )	Solubilidad a 70 °C (%)
<b>DAMG<sub>0.0</sub></b>	1.62±0.17 <sup>a</sup>	18.12±1.14 <sup>a</sup>	32.5±1.23 <sup>a</sup>
<b>DAMG<sub>0.25</sub></b>	1.51±0.13 <sup>b</sup>	17.61±1.13 <sup>b</sup>	33.2±1.17 <sup>b</sup>
<b>DAMG<sub>0.5</sub></b>	1.42±0.12 <sup>c</sup>	16.07±1.14 <sup>c</sup>	34.3±1.62 <sup>c</sup>
<b>DAMG<sub>1.0</sub></b>	1.25±0.15 <sup>d</sup>	14.76±1.03 <sup>d</sup>	35.1±1.42 <sup>d</sup>
<b>DAMG<sub>2.0</sub></b>	1.12±0.21 <sup>d</sup>	13.19±1.02 <sup>d</sup>	36.1±1.58 <sup>d</sup>

Los valores son el promedio ± DesvEst de tres replicados. Las diferencias significativas en cada columna están expresadas con letras diferentes ( $p < 0.05$ ). DAMG = dispersión de almidón de maíz gelatinizado; SV = Volumen de hinchamiento por su abreviación en inglés “swelling volume”; RI (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>)= Relación de áreas bajo la curva (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) provenientes de la respuesta del detector de índice de refracción vs el tiempo de retención del cromatograma.

### 7.3.2. Cromatografía de exclusión por tamaño

Para determinar los efectos de la concentración de carbonato de calcio sobre las cadenas de almidón (amilosa y amilopectina), la distribución de tiempos de retención de la cromatografía de exclusión por tamaño se estimó con DAMG con y sin tratamiento con  $\text{CaCO}_3$ . Siguiendo la metodología propuesta por Amelia & BeMiller (2009), la primera fracción de cadenas del almidón de maíz nativo presentó un tiempo de retención más corto, relacionado a carbohidratos de alto peso molecular (principalmente amilopectina). La segunda fracción de cadenas se presentó como un hombro del primer pico de retención, tal fracción constituida por carbohidratos de bajo peso molecular (principalmente amilosa). La relación entre el área del primer pico (moléculas grandes) es comúnmente referida como Área 1, mientras el área bajo la banda del segundo pico (moléculas más pequeñas, principalmente amilosa y fragmentos de amilopectina) es referida como Área 2. Después del tratamiento con carbonato de calcio, el área de la primera fracción disminuyó mientras que el área con el mayor tiempo de retención aumentó. La variación de la razón  $A_1/A_2$  como función de la concentración de  $\text{CaCO}_3$  se presenta en la Tabla 2. La razón de áreas obtenida de la respuesta RI (por sus siglas en inglés, índice de refracción) del cromatograma se observa que el valor de la muestra DAMG 0.0 disminuyó de 1.62 a 1.51 con la adición mínima evaluada de la sal de carbonato de calcio (DAMG 0.25), alcanzándose una disminución hasta del 30 % a la concentración mayor evaluada (DAMG 2.0). Los resultados de la Tabla 2 indican que el carbonato de calcio alteró la estructura de las cadenas del almidón, tal alteración debe tener efectos importantes en la viscoelasticidad y en la degradabilidad de las DAMG. Considerando lo reportado por Lobato-Calleros *et al.* (2015) sobre el efecto producido en el almidón de maíz por el tratamiento con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (comúnmente usado en la nixtamalización tradicional) evaluado por HPSEC; el  $\text{CaCO}_3$  despolimeriza las cadenas del almidón de manera similar, a reserva de que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  tiene un efecto mucho más severo en la despolimerización las cadenas de almidón comparado al  $\text{CaCO}_3$ .

### 7.3.2. Imágenes ópticas y tamaño de partícula

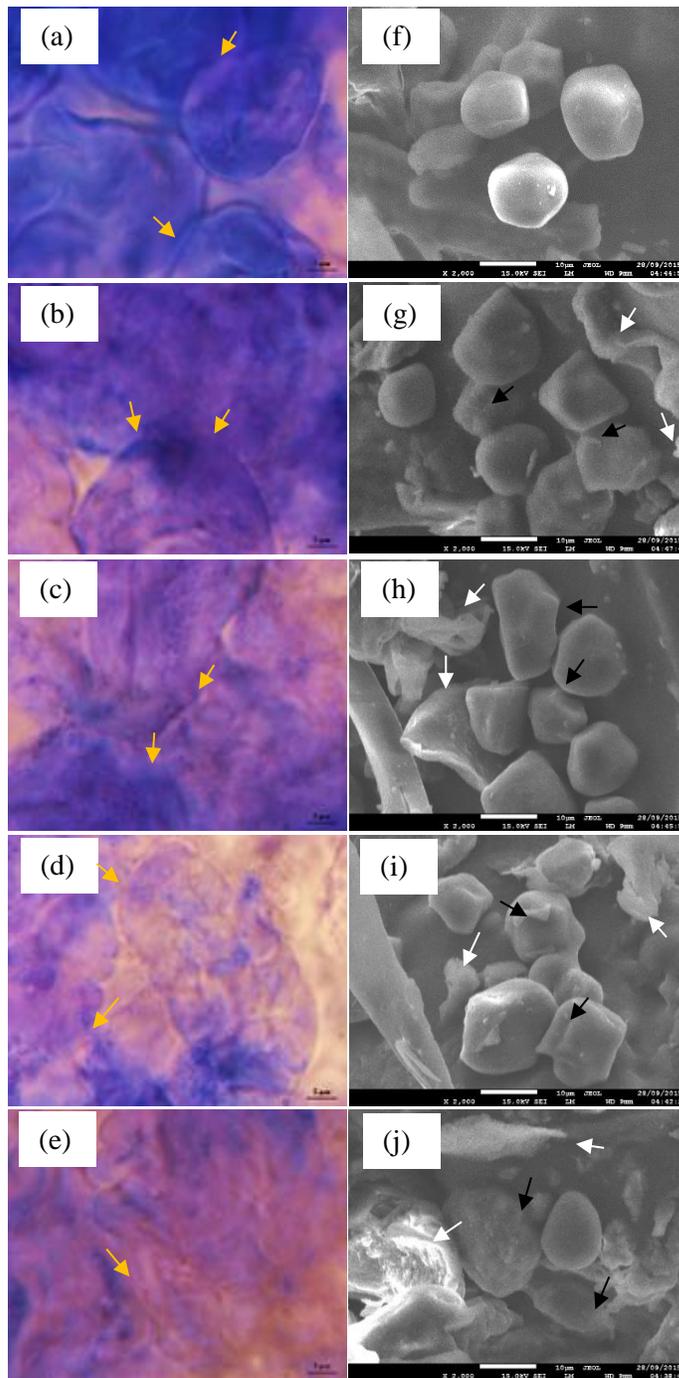
Generalmente, las dispersiones acuosas de almidón cocidas a temperaturas no mayores a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  presentan hinchamiento de los gránulos y una expulsión de amilosa junto con pequeñas cantidades de cadenas amilopectina dentro de una fase continua (McClements, 1999). Los remanentes insolubles pueden persistir aún después de la gelatinización como formas hidratadas hinchadas conocidas como “ghost” (Ratnayaque & Jackson, 2007). Se ha mostrado que estos remanentes del gránulo se forman cuando los gránulos hidratados estallan y colapsan (Zhang, Dhital, Flanagan, & Gidley, 2014), estando compuestos de cadenas de amilopectina principalmente (Debet & Gidley, 2007). La Fig. 1(a) ilustra la microestructura de las DAMG<sub>0,0</sub>, donde se puede apreciar dominios locales de paquetes compactados claramente, mostrando que los remanentes de los gránulos formaron geometrías

espaciales irregulares. Se ha sugerido que este tipo de microestructura se presenta debido a la combinación de matrices viscosas continuas ricas en amilosa y remanentes “ghost” dispersos ricos en amilopectina (Ratnayake & Jackson, 2007). Las Fig. 1(b)-1(e) presentan las imágenes de las DAMG<sub>0.25</sub>, DAMG<sub>0.5</sub>, DAMG<sub>1.0</sub> y DAMG<sub>2.0</sub>, respectivamente. En la Fig. 1.b se puede apreciar que el dominio continuo fue rico en contenido de amilosa y relativamente más alto que el observado en la Fig. 1(a) por la DAMG<sub>0.0</sub>, indicando que aún a concentraciones relativamente bajas de CaCO<sub>3</sub> se indujo la expulsión de la mayoría de la amilosa de los gránulos de almidón, dejando atrás la presencia de los “ghost” asociados a la amilopectina insoluble. Estas observaciones confirman que la amilosa es afectada mayormente por los iones calcio que los remanentes de amilopectina no solubilizados. Conforme la concentración de CaCO<sub>3</sub> fue incrementada, los iones adicionales de calcio destruyeron la estructura de los “ghost” progresivamente, sugiriendo que las interacciones con el carbonato de calcio incrementaron la solubilidad de la fracción de amilopectina. De hecho, los “ghost” casi fueron destruidos en las DAMG<sub>0.5</sub> (Fig. 1(c)), aunque las DAMG<sub>1.0</sub> y DAMG<sub>2.0</sub> exhibieron una disrupción mayor del material insoluble (Fig. 1(d) y 1(e)).

El  $d_{\phi L}$  decreció de alrededor de 43.2  $\mu\text{m}$  para las DAMG<sub>0.0</sub> a 35.2  $\mu\text{m}$  para las DAMG<sub>2.0</sub>. Estos resultados están de acuerdo con los cambios morfológicos observados de las imágenes de microscopía óptica, principalmente en que el encogimiento puede estar reflejando la expulsión de las cadenas de almidón promovidas por la migración de los iones calcio dentro de la matriz.

### 7.3.3. Morfología-imágenes SEM

Las DAMG fueron secadas para evaluar sus características morfológicas a través de imágenes SEM. Las imágenes se presentan en la Fig. 1(f)-1(j). De acuerdo con reportes previos, los gránulos de almidón de maíz de la muestra DAMG<sub>0.0</sub> estuvieron formados por poliedros con bordes agudos (Jane, Kasemuwan, Leas, Zobel, & Robyt, 1994). El tratamiento con el carbonato de calcio llevó a desviaciones importantes de la geometría poliédrica, produciendo progresivamente gránulos con formas más irregulares (Fig. 1(g)-1(j)). Los gránulos de almidón de las DAMG<sub>1.0</sub> y DAMG<sub>2.0</sub> (Fig. 1(i) y 1(j)) exhibieron abrasión y fracturas en la superficie. Es aparente que, con la cocción, el calcio ligado produjo disrupción de los gránulos de almidón de maíz, produciendo exasperación de cadenas de almidón, y cambios en la morfología superficial de los gránulos.



**Figura 1.** La columna izquierda muestra imágenes ópticas (100×) y la fila derecha presenta la imágenes SEM (2000×) de las DAMG tratadas con las diferentes concentraciones de  $\text{CaCO}_3$ : (a), (f) 0.0 %, (b), (g) 0.25 %, (c), (h) 0.5 %, (d), (i) 1.0 %, y (e), (j) 2.0 %.

#### 7.3.4. Sinéresis

Se ha reportado que el incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  produce la destrucción gradual de la microestructura de los “ghost” en las dispersiones de almidón gelatinizado, por lo que puede esperarse una disminución en la capacidad de retención de agua (Mondragón *et al.*, 2004; Lobato-Calleros *et al.*, 2015). Bryant y Hamaker (1997) reportaron que la capacidad de retención de agua de harina de maíz sin grasa disminuyó pronunciadamente a concentraciones por arriba de 0.60 %, y posteriormente se niveló. Referente a este estudio, el tratamiento con  $\text{CaCO}_3$  produjo que las DAMG mostrarán una disminución en la sinéresis (Tabla 1). La sinéresis disminuyó significativamente de 9.5 % para DAMG<sub>0,0</sub> a 7.3 % para DAMG<sub>2,0</sub>. El comportamiento opuesto entre el tratamiento tradicional y el ecológico puede explicarse por el hecho que, por un lado, se da el entrecruzamiento de las cadenas de almidón mediado por el calcio, así como, los iones hidroxilo  $\text{OH}^-$  del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  llevan a cabo una hidrólisis alcalina de las cadenas de almidón. Como una consecuencia, el gel de almidón de maíz es debilitado en cadenas de almidón más cortas, principalmente amilopectina des-ramificada (Bryant & Hamaker, 1997), llevando a una microestructura enredada pobremente. En contraste, en el tratamiento con  $\text{CaCO}_3$ , el entrecruzamiento de las cadenas de almidón llevó a la formación de geles más consolidados con mejor capacidad de retención de agua.

#### 7.3.5. Ángulo de contacto

El enlace del calcio a las cadenas de almidón modifica la afinidad del gel de almidón al agua. En cambio, este efecto debe estar reflejado en la afinidad del agua a las cadenas de almidón nixtamalizado. La tercera columna de la Tabla 1 se presenta el ángulo de contacto del agua con películas secas de las DAMG. La película de la DAMG<sub>0,0</sub> fue muy hidrofílica con un ángulo de contacto de 20.66°, el cual disminuyó cerca de los 16.10° para la película de la DAMG<sub>2,0</sub>. Estos resultados indican que la adición del calcio permite una humectabilidad más extensiva de las moléculas de almidón, lo cual puede atribuirse al rompimiento de las cadenas de almidón (detectado por HPSEC) y como efecto del entrecruzamiento en los grupos carboxílicos.

#### 7.3.6. Volumen de hinchamiento (*Swelling Volume*)

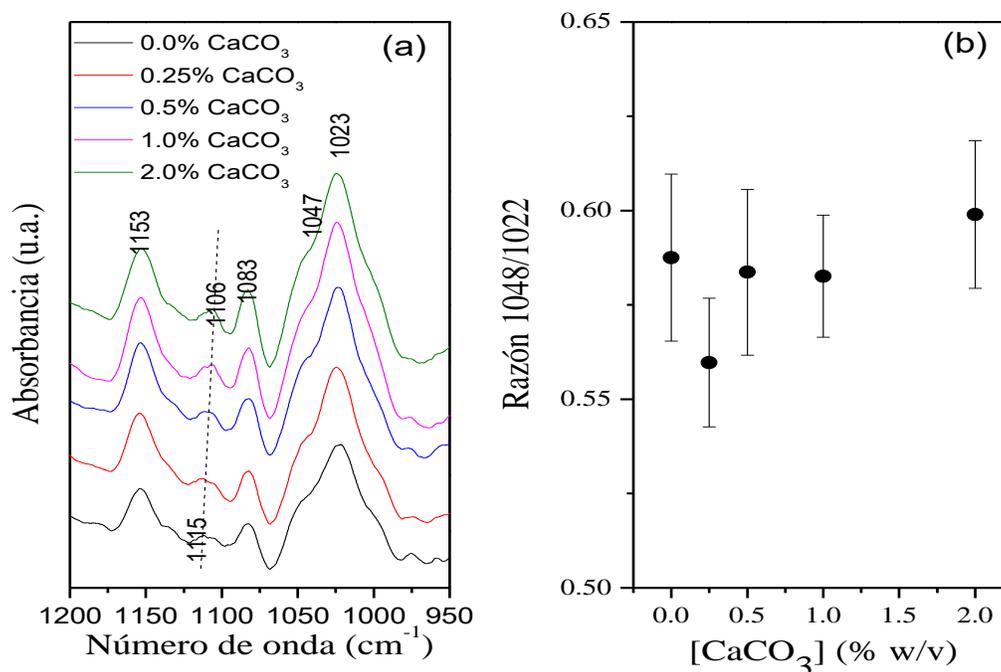
Los resultados de las pruebas de hinchamiento se registran en la Tabla 2. La adición de carbonato de calcio produjo una disminución importante del volumen de hinchamiento, el cual se causó por la fuerza iónica y efectos de entrecruzamiento presentados por los iones de calcio (Zhu, Gayin, Chatel, Dewettinck & Van Der Meeren, 2009). Así como, el rompimiento de las cadenas redujo la habilidad de retención de agua dentro de la microestructura del almidón amorfo

### 7.3.7. Solubilidad

En la Tabla 2 se presenta la solubilidad a 70 °C de las distintas DAMG tratadas con CaCO<sub>3</sub>. La acción del carbonato de calcio sobre las cadenas de almidón incrementó la solubilidad, un efecto que podría ser atribuido al rompimiento de las cadenas. De hecho, el fraccionamiento de las ramificaciones de las moléculas de amilopectina son fragmentos lineales que se dispersan fácilmente en la matriz continua. En contraste, la amilopectina remanente se muestra como material insoluble y puede observarse en las imágenes de los ghost colapsados en las imágenes ópticas (Fig. 1).

### 7.3.6. Espectroscopía ATR-FTIR

Los espectros de FTIR de las DAMG se ilustran en la Fig. 2(a). La presencia de las bandas en el rango de 900-1200 cm<sup>-1</sup> se han atribuido con interacciones C-O-C (Wu, Ran, & Zhang, 2009). Esta región espectral ha mostrado ser sensible a cambios en la estructura a nivel molecular, dentro del orden a corto rango de geles de almidón (Sevenou, Hill, Farhat, & Mitchell, 2002).



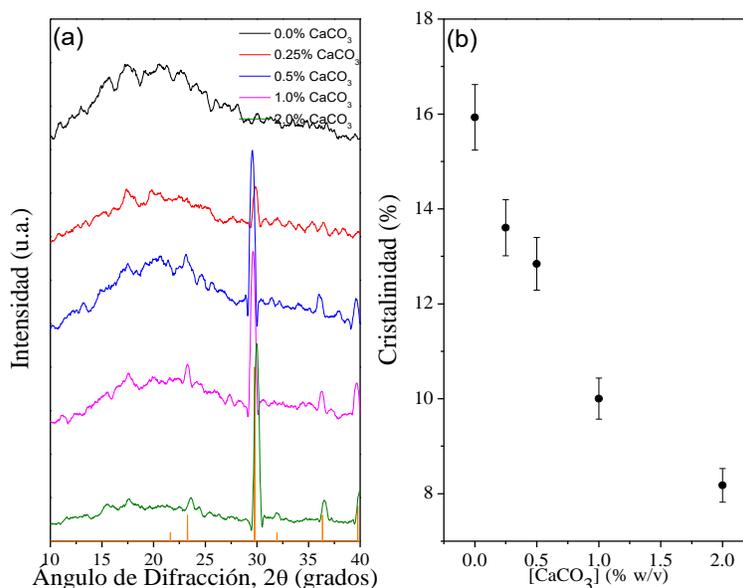
**Figura 2.** (a) Espectro FTIR de las DAMG. (b) Razón 1048/1022 como una función de la concentración de CaCO<sub>3</sub>.

El orden de corto rango refleja un orden de doble hélice como opuesto al orden de rango amplio relacionado al empaquetamiento de las dobles hélices, los cuales se detectan por difracción de rayos-X. El nivel de organización investigado mediante ATR-FTIR se encuentra limitado a pequeñas

estructuras cristalizadas dispersas dentro la matriz del gel. La absorbancia en la banda de  $1048\text{ cm}^{-1}$  aumenta con la cristalinidad, mientras que la banda en  $1022\text{ cm}^{-1}$  está relacionada a los modos vibracionales de los componentes amorfos (van Soest, Turnois, de Wit, & Vliegthart, 1995). De aquí que, la razón de las absorbancias 1048/1022 es considerada como un indicador que cuantifica comúnmente la cantidad de las estructuras cristalinas ordenadas relativo al material amorfo en el gel de almidón (van Soest *et al.* 1995). La Fig. 2(b) presenta la variación la razón de intensidades 1048/1022 con respecto a la concentración de  $\text{CaCO}_3$ . La razón de absorbancia quedó prácticamente constante alrededor de 0.58, sugiriendo que la cristalinidad de corto rango detectada por FTIR no fue alterada por la acción de las sales de calcio. Esto significa que el orden la doble hélice de las DAMG tratadas con  $\text{CaCO}_3$  no fue afectada. Estos resultados están en contraste con el tratamiento tradicional con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  donde se tomó lugar una disminución significativa de la razón de absorbancias 1048/1022 (Lobato-Calleros *et al.*, 2015). Esto podría sugerir que tales diferencias pueden ser imputadas a la hidrólisis de las cadenas de almidón producida por los iones OH, los cuales se encuentran ausentes en el tratamiento con  $\text{CaCO}_3$ .

### 7.3.7. Difracción de rayos-X (XRD)

Los patrones XRD de las DAMG se presentan en la Fig. 3(a). Los patrones XRD de las DAMG<sub>0,0</sub> se caracterizaron por presentar señales alrededor de  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $20^\circ$  y  $23^\circ$ , indicativo de un patrón tipo A propio del almidón de maíz.

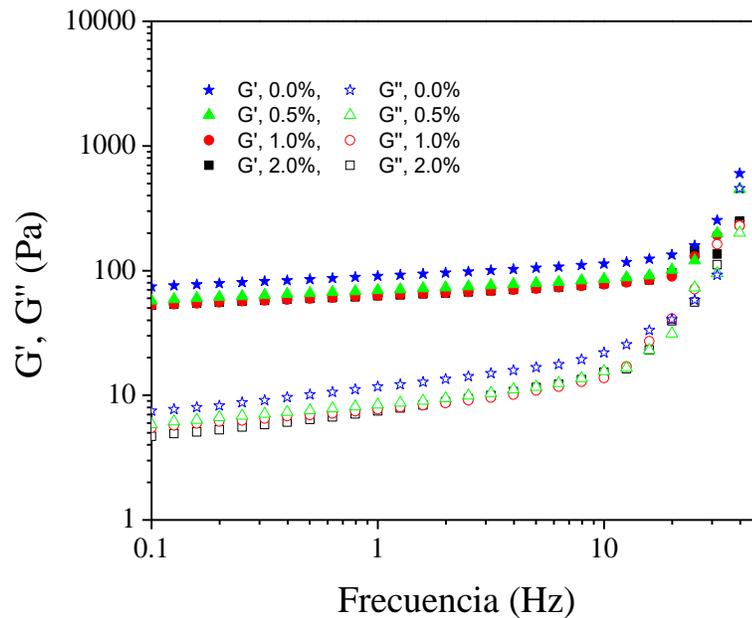


**Figura 3.** (a) Espectro XRD de las DAMG. (b) Contenido de cristalinidad como una función de la concentración de  $\text{CaCO}_3$ .

Es notorio que la intensidad de estas señales fue atenuada por la acción del carbonato de calcio. Para la DAMG<sub>2,0</sub> los picos característicos no fueron tan observables. Sin embargo, se presentaron señales de mayor intensidad, los cuales están relacionados a cristales de calcita clase escalenoédrico hexagonal (card 05-0586 ICDD International Diffraction Data). El contenido de cristalinidad de las DAMG se estimó removiendo los picos de intensidad de la calcita y los resultados se presentan en la Fig. 3(b). Las DAMG<sub>0,0</sub> exhibieron un contenido de cristalinidad alrededor de 16.0 %, lo cual puede atribuirse a la reorganización de los remanentes insolubles (“ghost”) después del secado. La cristalinidad de los remanentes fue determinada por la velocidad relativa de hinchamiento y entrecruzamiento modulado por los componentes superficiales de naturaleza diferente a los polisacáridos (Debet & Gidley, 2007). La presencia de los cristales de calcita en las DAMG tratados con carbonato de calcio se puede explicar como producto de un exceso de CaCO<sub>3</sub> que no puede ser acomodado dentro de las cadenas de almidón. Gutiérrez-Cortez *et al.* (2010) también detectaron cristales de calcita en el tratamiento tradicional de Ca(OH)<sub>2</sub>, lo cual fue atribuido al proceso de carbonación que involucra una reacción química entre el CO<sub>2</sub> atmosférico y el Ca(OH)<sub>2</sub> de la cal. Por otro lado, el incremento de la concentración del carbonato de calcio disminuyó los picos característicos del patrón tipo A, indicando que la región cristalina del almidón tratado se dañó significativamente. La cristalinidad exhibió una disminución monótona (Fig. 3(b)), la cual está relacionado al daño de los “ghost” ricos en amilopectina (Fig. 1).

### 7.3.8 Propiedades reológicas

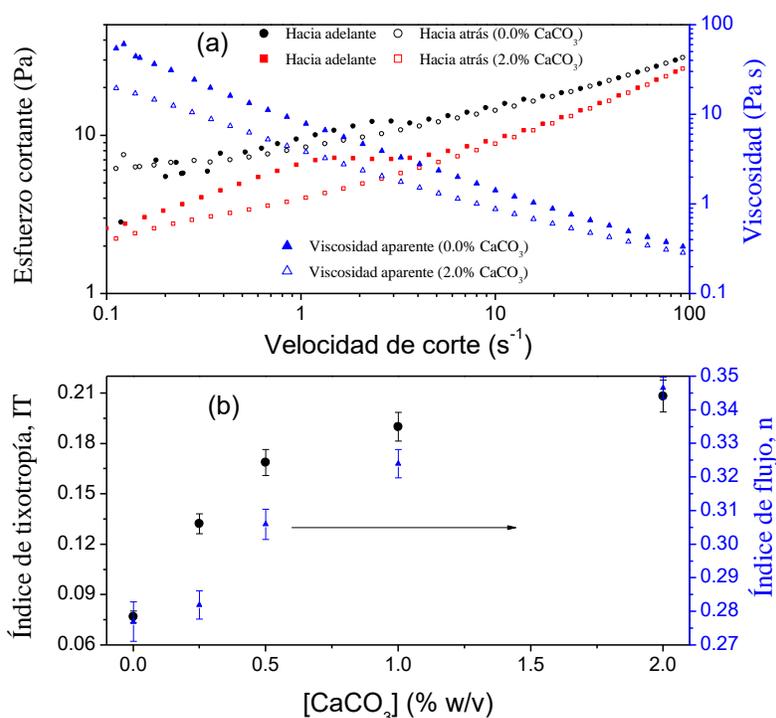
La viscoelasticidad de las DAMG es determinada ampliamente por la interacción entre los “ghost” altamente elásticos y la matriz continua viscosa (Ratnayake & Jackson, 2007). La Fig. 1 mostró que el tratamiento con el CaCO<sub>3</sub> tuvo un impacto importante sobre la integridad de los “ghost”. Como consecuencia, las propiedades viscoelásticas deben modificarse también. La Fig. 4 muestra los módulos de almacenamiento y pérdida de las DAMG como una función de la frecuencia. Se aprecia que los módulos disminuyeron conforme se incrementó la concentración de CaCO<sub>3</sub>, probablemente debido a la fragmentación detectada también por HPSEC (Tabla 2). La calcita dispersada dentro de la matriz continua puede también afectar la viscoelasticidad de las dispersiones de almidón de maíz gelatinizado. No se aprecia un cruce en la frecuencia, lo que indica que las DAMG están dominadas en gran parte por mecanismos elásticos para el rango de frecuencias evaluado. La interacción compleja de los sólidos elásticos dispersos en la matriz viscosa continua de amilosa podría llevar efectos de memoria en el comportamiento del flujo de las DAMG.



**Figura 4.** Pruebas de barridos en frecuencia de las DAMG.

En la Fig. 5(a) se ilustra el comportamiento de las curvas de flujo aplicadas en dirección hacia adelante y hacia atrás de las DAMG0.0 y DAMG2.0, las siguientes características pueden comentarse: a) el tratamiento con  $\text{CaCO}_3$  disminuyó el esfuerzo cortante, indicando que la acción de calcio debilitó la microestructura de los geles de almidón. b) las curvas de flujo en dirección hacia adelante y hacia atrás fueron diferentes, alcanzando valores mayores en la dirección hacia adelante. De aquí que, la aplicación de un incremento en la velocidad de corte introdujo un rompimiento gradual de la microestructura del gel, resultando en valores reducidos de la viscosidad aparente. Cuando la velocidad de corte fue en reversa, no se recuperó completamente la microestructura del gel. c) el ciclo de histéresis reflejó el nivel en el comportamiento tixotrópico de las DAMG. El grado de tixotropía puede ser cuantificado por la diferencia entre las curvas hacia adelante y hacia atrás. El área del ciclo de histéresis es comúnmente considerada como una medida de la tixotropía también (Ibarz & Barbosa-Canovas, 2003), por simplicidad el índice de tixotropía fue tomado como la distancia máxima logarítmica entre las curvas hacia adelante y hacia atrás; llamada  $IT = \max(\log(\sigma_F) - \log(\sigma_B))$ , de manera sencilla se calculó el logaritmo de cada dato de las curvas hacia adelante (subíndice F) y hacia atrás (subíndice B), posteriormente se obtuvo la diferencia entre cada dato de acuerdo a su velocidad de corte correspondiente, la diferencia máxima obtenida para cada muestra representó el índice de tixotropía respectivo a esa muestra. El comportamiento de IT como función de la concentración de  $\text{CaCO}_3$  indicó que existió un incremento en el gap entre los

valores más altos de viscosidad aparente hacia adelante y los valores más bajos en la viscosidad aparente en reversa (Fig. 5(b)). La tixotropía es debida a la dependencia del tiempo, similar a la dependencia del esfuerzo, y sus resultados de la reorganización estructural en una disminución de la resistencia al flujo (Ibarz & Barbosa-Canovas, 2003).



**Figura 5.** Curvas de flujo de las DAMG: (a) Ilustra los ciclos de histéresis representativos por tixotropía. (b) Índice de tixotropía como función de la concentración de CaCO<sub>3</sub>.

### 7.3.9 Propiedades térmicas

La gelatinización del almidón produce hinchazón y una expulsión masiva de las cadenas del almidón en el gránulo para formar una microestructura de material insoluble (“ghost”) inmersa en una matriz viscosa de moléculas entrelazadas. Aquí, el agua es atrapada dentro de la complejidad y ligada a las moléculas de almidón. La microestructura de los geles y la naturaleza de las cadenas del almidón (p.e. entrecruzamientos mediados por el calcio) podrían afectar las propiedades térmicas del gel en las

condiciones de fusión y ebullición. Las temperaturas pico y las entalpías respectivas se resumen en la Tabla 3. Se ha postulado que las cadenas de almidón (amilosa y amilopectina) juegan un papel dominante en el centro de las cavidades tetraédricas ocupadas por las moléculas de agua (Tako, Tamaki, Teruya, & Takeda, 2014). Por otro lado, este arreglo seguramente lleva a un efecto cooperativo que estabiliza las regiones extendidas de agua en forma de hielo con enlaces hidrógeno sobre la superficie de las moléculas poliméricas. Aquí, el oxígeno hemiacetal y los grupos hidroxilo podrían participar en formar puentes hidrógeno con las moléculas de agua (Tako, Tamaki, Konishi, Shibamura, Hanashiro, & Takeda, 2008). El agua en exceso debe llevar a la saturación de puentes hidrógeno intermolecular entre las moléculas de amilosa y amilopectina, así como la asociación intermolecular entre las moléculas de amilopectina debido a los puentes de hidrógeno. La entalpía de fusión presentada en la Tabla 3 puede ser considerada como un indicador del agua disponible por congelación. Recordando que las DAMG contenían 5 % p/p de almidón y que la entalpía de fusión del agua es  $\Delta H_{f,agua} = 334 \text{ J g}^{-1}$ , el valor  $w_f = 0.95\Delta H_f / \Delta H_{f,agua}$  es un índice de la fracción disponible para el congelamiento. De esta manera, el valor más pequeño de entalpía de fusión de los geles viene a ser la fracción más pequeña de agua congelable.

**Tabla 3.** Propiedades térmicas de las DAMG bajo condiciones de fusión y ebullición.

Código del gel	$T_{p,f}$ (°C)	$\Delta H_f$ (J g <sup>-1</sup> )	$T_{p,e}$ (°C)	$\Delta H_e$ (J g <sup>-1</sup> )
<i>DAMG</i> <sub>0,0</sub>	3.34±0.23 <sup>a</sup>	241.2±3.1 <sup>a</sup>	102.73±0.17 <sup>a</sup>	1366.4±4.5 <sup>a</sup>
<i>DAMG</i> <sub>0,25</sub>	3.87±0.22 <sup>a</sup>	250.1±2.9 <sup>b</sup>	103.84±0.19 <sup>b</sup>	1628.2±5.3 <sup>b</sup>
<i>DAMG</i> <sub>0,5</sub>	3.21±0.35 <sup>a</sup>	252.1±3.3 <sup>bc</sup>	105.17±0.24 <sup>c</sup>	1688.7±6.1 <sup>c</sup>
<i>DAMG</i> <sub>1,0</sub>	3.22±0.30 <sup>a</sup>	253.3±2.8 <sup>c</sup>	105.08±0.23 <sup>c</sup>	1709.4±5.8 <sup>d</sup>
<i>DAMG</i> <sub>2,0</sub>	3.07±0.29 <sup>a</sup>	258.4±3.3 <sup>d</sup>	104.87±0.43 <sup>c</sup>	1758.2±5.7 <sup>e</sup>

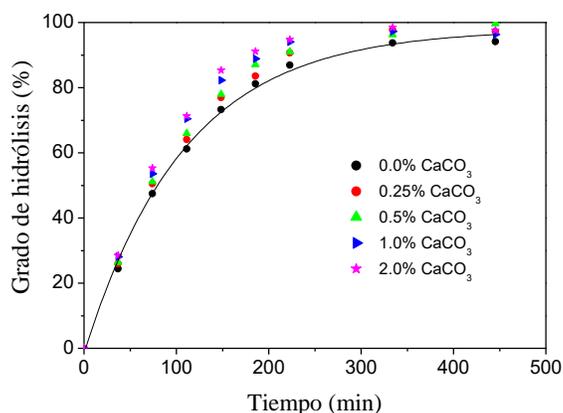
Los valores son promedios ± DE de tres replicados. Las diferencias significativas en cada columna se expresan con letras diferentes (p < 0.05).  $T_{p,f}$  y  $T_{p,e}$  corresponden a las temperaturas pico en los puntos de fusión y ebullición respectivamente;  $\Delta H_f$  y  $\Delta H_e$  son el cambio de la entalpía en los puntos de fusión y ebullición respectivamente. Como referencia, los valores de entalpía del agua respectivos son  $\Delta H_{f,agua}=334 \text{ J g}^{-1}$  y  $\Delta H_{e,agua}=2257 \text{ J g}^{-1}$ .

La Tabla 3 muestra que esta fracción incrementó con tan solo un ligero aumento en la concentración de CaCO<sub>3</sub>, significando que la modificación del almidón por el calcio no alteró las regiones del agua en forma de hielo con puentes hidrógeno sobre la superficie de las moléculas poliméricas. Un razonamiento similar puede ser hecho para la entalpía de ebullición, lo cual refleja la cantidad de las moléculas de agua no ligada. Aquí, un índice de la fracción evaporable es  $w_e = 0.95\Delta H_e / \Delta H_{e,agua}$ . En la Tabla 3 se puede observar un notorio incremento de la entalpía de ebullición, de 1366.4 J g<sup>-1</sup>

para las DAMG<sub>0.0</sub> a 1758.2 Jg<sup>-1</sup>, el entrecruzamiento con el calcio y la presencia de los cristales de calcita debilitaron la capacidad de retención de agua de las DAMG tratadas con el CaCO<sub>3</sub> a las condiciones de ebullición.

### 7.3.10 Hidrólisis ácida

La hidrólisis bajo condiciones fuertemente ácidas provee valiosas apreciaciones sobre la degradabilidad de las cadenas de almidón. Los datos presentados en las cinéticas de hidrólisis ácida muestran que los datos ajustan a una cinética de primer orden, dando una constante de tiempo a 108 min para el almidón control, mientras que para el almidón tratado con la sal de calcio fue alrededor de 90 min. Estos valores justificaron el uso de 2 h en la Tabla 1 como un valor representativo de la hidrólisis completa. El grado de hidrólisis de las DAMG a 2 h en un medio de HCl 1.0 M (pH 2) a 50 °C se presenta en la Tabla 1. La hidrólisis completa se muestra en la Fig. 6. La DAMG<sub>0.0</sub> fue hidrolizada por arriba del 57.12 % después de 2 h. El tratamiento con el CaCO<sub>3</sub> llevó a las cadenas de almidón a degradarse altamente, para las DAMG<sub>2.0</sub> tuvo un avance de hidrólisis de alrededor 79.19 %, esto sugiere que el entrecruzamiento mediado por el calcio promueve la acción de los iones H<sup>+</sup>, los cuales eventualmente llevan a la fragmentación de las cadenas de almidón (Lobato-Calleros *et al.*, 2015), en línea con lo obtenido en la Tabla 2 en la sección 7.3.2. Interesantemente, los resultados de hidrólisis están de acuerdo también con reportado por Bello-Pérez *et al.* (2014), mostrando que el tratamiento con CaCO<sub>3</sub> incrementó la disponibilidad de almidón rápidamente digerible.



**Figura 6.** Avance de hidrólisis de las DAMG a diferentes concentraciones de CaCO<sub>3</sub>. La línea continua indica una cinética de primer orden del almidón de maíz sin tratamiento con la sal de calcio.

### 7.3.11 Nuevas perspectivas de discusión

La nixtamalización es un proceso encaminado a disponer el almidón de maíz para consumo humano. Tradicionalmente, el proceso requiere la cocción del grano de maíz con hidróxido de calcio. Por otro lado, el proceso propuesto de nixtamalización ecológica se basa en el uso de sales (p.e.  $\text{CaCO}_3$ ). Las diferencias entre los dos métodos se han documentado (Campechano-Carrera *et al.*, 2012; Bello-Pérez *et al.*, 2014), encontrando que la nixtamalización basada en el  $\text{CaCO}_3$  es incapaz de degradar completamente el pericarpio del grano, aunque puede ser destinado como fibra. Considerando al almidón de maíz, las diferencias son más sutiles tomando en cuenta que el propósito medular del tratamiento es la funcionalización de las cadenas de almidón por la incorporación del calcio. Una base para explicar las diferencias entre las modificaciones del almidón basadas en la cal y en las sales puede ser encontrada en la teoría de Oosten (1982). En esta teoría, el almidón puede actuar, como un intercambiador de iones del tipo ácido débil que es capaz de intercambiar algunos protones de los grupos alcohólicos del almidón por cationes. Después de alcanzar las condiciones de equilibrio durante el proceso de gelatinización, las cadenas de almidón son capaces de exponer carga negativa, mientras el agua es inducida a exhibir carga positiva (BeMiller and Whistler, 2009). Eventualmente, el potencial es resultado del equilibrio entre las cadenas de almidón y el agua, conocido como el potencial negativo de Donnan, que estabiliza la microestructura del gel, el cual previene la incorporación posterior de aniones. Como consecuencia, el gradiente de concentraciones tiende a empujar a los cationes (p.e.  $\text{Ca}^{+2}$ ) dentro del dominio de las cadenas de almidón, resultando en un remplazo efectivo de los iones hidrógeno (Oosten, 1982; French, Whistler, BeMiller, & Paschall, 2009; Beck, Jekle, & Becker, 2011). El exceso de iones hidrógeno dentro del dominio de agua libre baja el pH efectivo. Además, los aniones pueden coadyuvar al proceso de gelatinización por el rompimiento de puentes hidrógeno dentro de las regiones de las cadenas de almidón (Ahmad & Williams, 1999). Al aceptar esta teoría, es posible formar las siguientes percepciones sobre las diferencias entre el proceso basado en  $\text{Ca(OH)}_2$  y  $\text{CaCO}_3$ :

- El principio fundamental en el proceso de modificación del almidón es que en la fase de gelatinización la concentración de los iones hidrógeno dentro del dominio de las cadenas de almidón es más alta que en la fase agua. Este gradiente de fuerzas lleva a los iones hidrógeno a migrar de las cadenas de almidón (p.e. los grupos alcohólicos) a las regiones de agua libre hasta alcanzar condiciones de equilibrio dinámico. Las condiciones de equilibrio pueden alcanzarse cuando los cationes con una alta densidad de carga son empujados del agua dentro de las cadenas de almidón a ser unidas a otros grupos alcohólicos. En general, los cationes tienen un radio iónico más grande que los iones hidrógeno y de aquí probablemente

modifiquen los atributos de las cadenas de almidón. En este enfoque, el gradiente de los iones hidrógeno entre el agua y el dominio de las cadenas de almidón juega un papel importante en la efectividad de los mecanismos de equilibrio dinámico. Mientras la nixtamalización basada en el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es operada típicamente en pH alrededor de 10.0-12.0, el proceso basado en el  $\text{CaCO}_3$  opera a valores de pH en el rango de 6.0-8.0. esto significa que la nixtamalización tradicional impone un gradiente más grande de hidrógenos, lo cual seguramente hace que la sustitución del calcio en los grupos alcohólicos sea más eficiente. En otras palabras, el proceso de nixtamalización ecológica requeriría una concentración más alta de calcio para lograr efectos similares que el proceso tradicional.

- El anión del agente de modificación infringe efectos importantes en las cadenas de almidón de maíz también. Los iones hidroxilo del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  puede romper enlaces hidrógeno dentro de las cadenas de almidón, llevando a una reducción del peso molecular efectivo (Whistler & BeMiller, 1957; French *et al.*, 2009). Bryant y Hamaker (1998) han puntualizado que la acción de los iones hidroxilo son responsables de la fragmentación de cadenas secundarias de amilopectina ramificada, lo cual eventualmente mejora la viscoelasticidad de la pasta (p.e. masa) del maíz nixtamalizado. En el proceso considerado ecológico, el anión resultante es el  $\text{CO}_3^{2-}$  cuya acción en las cadenas de almidón es un poco marginal. En lugar de esto los iones carbonato se quedan en la fase agua y pueden formar ácido carbónico con los iones hidrogeno extraídos de las cadenas de almidón. De esta forma, las diferencias en las propiedades viscoelásticas y en la capacidad de retención de agua puede ser atribuida a diferencias en los efectos de los aniones en las cadenas de almidón.

En resumen, los mecanismos químicos que fundamentan el proceso de nixtamalización pueden ser delineados del enfoque en el que el almidón actúa como un ácido débil que puede intercambiar iones con el dominio del agua libre. Las diferencias en las propiedades funcionales, reológicas y morfológicas pueden atribuirse a diferencias en las acciones efectivas de los aniones involucrados en el proceso (Oosten, 1982; French, Whistler, BeMiller, & Paschall, 2009; Beck, Jekle, & Becker, 2011).

## 8.- RESULTADOS PARTE II

### 8.1- Resumen

El endurecimiento de las tortillas de maíz es el principal inconveniente que afecta su manufactura, comercialización y consumo. El desarrollo de los métodos que pueden ayudar a retardar el endurecimiento de tortillas de maíz es un tema de investigación en desarrollo. En esta segunda parte del trabajo, se propone un método novedoso, simple, económico y efectivo, basado en adicionar una dispersión de harina de maíz nixtamalizada gelatinizada completamente (HMG) a la formulación de la receta básica de la masa (agua-harina de maíz nixtamalizada 60:40) en sustitución de un 5, 10 y 15 % p/p de agua. La masa adicionada con HMG mostró incrementar la capacidad de retención de agua, redujo el contenido de agua congelable y mejoró las propiedades de flujo y la dinámica reológica y produjo tortillas con menos dureza. La razón  $1047/1022\text{ cm}^{-1}$  del espectro infrarrojo indicó que se formó un arreglo más desordenado del gránulo de almidón, mientras que los picos entálpicos asociados con la retrogradación del almidón disminuyeron. Todos los indicadores anteriores fueron más pronunciados conforme se aumentó el contenido de HMG. Este trabajo muestra que la HMG puede jugar un papel importante como hidrocoloide, un agente para evitar el endurecimiento por sí mismo, al retardar la retrogradación del almidón de maíz e impidiendo la pérdida de agua, propiedades reológicas de la masa y el incremento de características sensoriales indeseables de la tortilla tal como la firmeza.

### 8.2.- Introducción

El endurecimiento es el principal problema para la comercialización y consumo de las tortillas de maíz. La disminución en la maleabilidad, rolabilidad y el incremento de la dureza son aspectos texturales negativos acompañados del proceso de endurecimiento y caducidad de la tortilla de maíz. (Suhendro, Almeida-Dominguez, Rooney, & Waniska, 1998; Campas-Baypoli, Rosas-Burgos, Torres-Chávez, Ramírez-Wong, & Serna-Saldívar, 2002; Román-Brito, Agama-Acevedo, Méndez-Montecalvo, & Bello-Pérez 2007). Al igual que el pan, el endurecimiento de la tortilla de maíz es un proceso complejo que requiere precisión al entenderlo para mejorar el producto y reducir el efecto económico. Estudios sistemáticos han sido emprendidos para clarificar el principal mecanismo involucrado en el envejecimiento de las tortillas de maíz. El incremento en la dureza durante el envejecimiento (vida de anaquel) es atribuido comúnmente a la recristalización de las cadenas de almidón y su redistribución, así como, a la pérdida de humedad. El endurecimiento ha sido relacionado a una asociación rápida de las cadenas de amilosa y amilopectina, promoviendo estructuras insolubles en las tortillas (Fernandez, Waniska, & Rooney, 1999). El valor de la rigidez de pruebas de esfuerzo relajación refleja puntualmente el proceso de endurecimiento de las tortillas

de maíz, (Limanond, Castell-Perez, & Moreira, 2002) y ha sido reportado que la tasa de nucleación máxima de las cadenas de almidón ocurre a una temperatura de 12.3 °C (Limanond, Castell-Perez, & Moreira, 2002). El incremento en el contenido de almidón resistente debido a la retrogradación puede contribuir también al incremento en la dureza de la tortilla. (Campas-Baypoli, Rosas-Burgos, Torres-Chávez, Ramírez-Wong, & Serna-Saldívar, 2002; Rendón-Villalobos, Agama-Acevedo, Islas-Hernández, Sánchez-Muñoz, & Bello-Perez, 2006) Durante el almacenamiento en refrigeración (3-10 °C), las tortillas llegan a endurecerse rápidamente (Paredes-López, 1994; Bueso, Waniska, Moreira, Seetharaman, & Rooney, 2006) la pérdida de las propiedades texturales deseadas ha motivado el diseño de métodos para reducir el endurecimiento en tortillas de maíz. La mayoría de los intentos recurrentes consisten en la incorporación de hidrocoloides. El razonamiento detrás del uso de hidrocoloides como agentes anti-endurecimiento es que estos componentes tienen la habilidad de formar redes tridimensionales robustas con una buena capacidad de retención de agua. De esta manera, se retarda la agregación y recristalización de las cadenas de almidón, extendiendo la estabilidad durante el almacenamiento de productos alimentarios en base a cereales. Friend *et al.* (1993) exploró la incorporación de harina de trigo con hidrocoloides comerciales, encontrando que la carboximetil celulosa (CMC) prolonga la estabilidad textural durante periodos largos. Yeggy (2000) exploró los efectos de agregar hidrocoloides comerciales y proteínas sobre el endurecimiento de tortillas, encontrando que sólo la CMC produjo una mejora en la textura durante el almacenamiento. Bueso *et al.* (2004) encontró que la combinación de amilasa maltogénica con CMC retrasó el proceso de endurecimiento. Román-Brito *et al.* (2007) reportaron que la adición de goma xantana disminuyó la dureza, aumentó la flexibilidad y las características gomosas de tortillas. Aunque los hidrocoloides comerciales han probado ser una buena alternativa para retardar el endurecimiento de tortillas de maíz, sus usos presentan algunas desventajas. Los hidrocoloides comerciales (CMC, goma xantana, etc.) pueden alterar las propiedades sensoriales de las tortillas de maíz, reduciendo la aceptabilidad del consumidor (Mier R, <http://gourmetdemexico.com.mx/>). Por otra parte, el incremento en el costo de los hidrocoloides comerciales limita su uso en una economía regional difícil. La tortilla de maíz es el principal alimento de la canasta básica en México y en muchos países de América central. Su consumo en estos países está relacionado estrechamente a poblaciones empobrecidas y de bajos recursos económicos, donde variaciones marginales en el costo podría tener grandes efectos en la comercialización y consumo (González & Martínez, 2015) El mercado de la tortilla ha florecido en los Estados Unidos en los últimos años, llegando a ser el segmento de más rápido crecimiento desde la industria del horneado. Esta situación, junto con el incremento en la demanda de productos libres de aditivos, impone limitaciones en el uso de hidrocoloides en matrices alimentarias (Day B, <http://www.foodbusinessnews.net>). De esta manera existe la motivación para la

búsqueda de alternativas para reducir los efectos adversos del endurecimiento en productos alimentarios basados en harina de maíz (tortillas y tamales). En el proceso de nixtamalización industrial, los granos de maíz son sometidos a un proceso de cocción con cal y agua a 80-90 °C durante un periodo comprendido entre 30-45 min dependiendo del tipo de endospermo del maíz. Los granos cocidos son entonces reposados durante 12-16 h para permitir un recocido de los gránulos de almidón, posteriormente son enjuagados para remover el exceso de cal y otras impurezas y molidos para obtener la masa. La masa es entonces deshidratada usando secadores tipo flash, molida en un molino de martillo, tamizado, clasificado y empacado como harina de maíz nixtamalizada (HMN) (Figuroa-Cárdenas *et al.* 2016). Durante este proceso, solo cantidades relativamente pequeñas de los gránulos de almidón están gelatinizados, (Bello-Pérez, *et al.* 2003) y la mayoría de la gelatinización es debida a la fricción durante la molienda, en la cual además los gránulos hinchados parcialmente son dispersados en la matriz que actúa como un pegamento, sosteniendo las partículas en la masa. El cocimiento excesivo produce una masa pegajosa y difícil de manipular, mientras una falta de cocción genera una masa sin cohesión que produce tortillas con una textura deficiente. (Bello-Pérez, Osorio-Díaz, Agama-Acevedo, Núñez-Santiago, & Paredes-López, 2002) El objetivo de la segunda parte del trabajo fue evaluar los efectos de adicionar diferentes niveles de una dispersión de harina de maíz nixtamalizado gelatinizado (HMG) a la masa hecha de HMN comercial sobre parámetros fisicoquímicos e indicadores asociados con el endurecimiento de tortillas de maíz. Hipotéticamente se espera que la HMG, compuesta de una matriz continua rica en amilosa confiera propiedades viscosas y una fracción rica en amilopectina de remanentes insolubles (ghost) con alta elasticidad, esta entrecruzada a las moléculas de almidón de la HMN en la masa por iones calcio, mejorando la capacidad de retención de agua de la masa y consecuentemente retardando el endurecimiento de las tortillas.

### 8.3.- *Resultados y discusión*

#### 8.3.1. *Contenido de agua de las tortillas*

Las distintas formulaciones fueron hechas con la misma cantidad de agua ( $59.29 \pm 0.43$  %) y masa ( $40.71 \pm 0.43$  %) relativamente. Durante el proceso de mezclado de la masa, puede perderse por evaporación (Tabla 4). El contenido de humedad de  $M_0$  fue de 60.93 %, mientras que  $M_{15}$  fue de 59.65 %. Estas diferencias en humedad permanecieron sin cambio a través del periodo de almacenamiento precedente a la cocción de las tortillas.

**Tabla 4.** Propiedades de masa de maíz con harina de maíz gelatinizado.

Muestra	Contenido de Humedad (%)	CRA (mL·g)	Agua congelable (%)	Agua no congelable (%)
M <sub>0</sub>	60.93±0.82 <sup>a</sup>	1.78±0.08 <sup>c</sup>	46.29±0.75 <sup>a</sup>	14.64±0.41 <sup>c</sup>
M <sub>5</sub>	60.56±0.77 <sup>a</sup>	1.90±0.07 <sup>b</sup>	40.35±0.86 <sup>b</sup>	19.79±0.37 <sup>b</sup>
M <sub>10</sub>	60.12±0.79 <sup>a</sup>	1.92±0.08 <sup>b</sup>	39.18±0.78 <sup>b</sup>	20.51±0.43 <sup>b</sup>
M <sub>15</sub>	59.65±0.85 <sup>a</sup>	1.98±0.08 <sup>a</sup>	35.93±0.73 <sup>c</sup>	23.22±0.47 <sup>a</sup>

Los valores son promedios ± error estándar, de tres replicas. Los super índices con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

### 8.3.2. Capacidad de retención de agua de las diferentes masas

En la segunda columna de la Tabla 4 se presenta la capacidad de retención de agua (CRA) de las diferentes masas como una función del contenido de HMG. El valor estimado para M<sub>0</sub> está en línea con lo que se reportó previamente para harina de maíz nixtamalizado Maseca® #0 libre de aditivos. (Lucius, Gao, & Vodovotz, 2009). La adición de HMG afectó la CRA de las masas incrementando su valor alrededor de un 12 % para M<sub>15</sub>. Este incrementó en la CRA refleja la habilidad de la HMG para retener agua, probablemente debido a que los grupos OH<sup>-</sup> de las unidades de glucosa presentes en las cadenas de almidón están más expuestas y disponibles para unirse a moléculas de agua mediante puentes hidrógeno. De manera general, los geles de almidón exhiben una pequeña CRA comparado con hidrogeles basados en alginato. Sin embargo, en este caso, el proceso de nixtamalización incorporó iones calcio en la HMN, llevando al entrecruzamiento de las cadenas de almidón (Lobato-Calleros *et al.* 2015). Un efecto benéfico del entrecruzamiento es la formación de hidrocoloides más estables con una mejor capacidad para retener el agua. En relación con esto, los resultados mostrados en la Tabla 4 están en línea con lo reportado por Sukhija *et al.* (Sukhija, Singh, & Riar, 1977) mostrando que el entrecruzamiento de las cadenas de almidón mejora la capacidad de retención de agua de hidrocoloides en base al almidón.

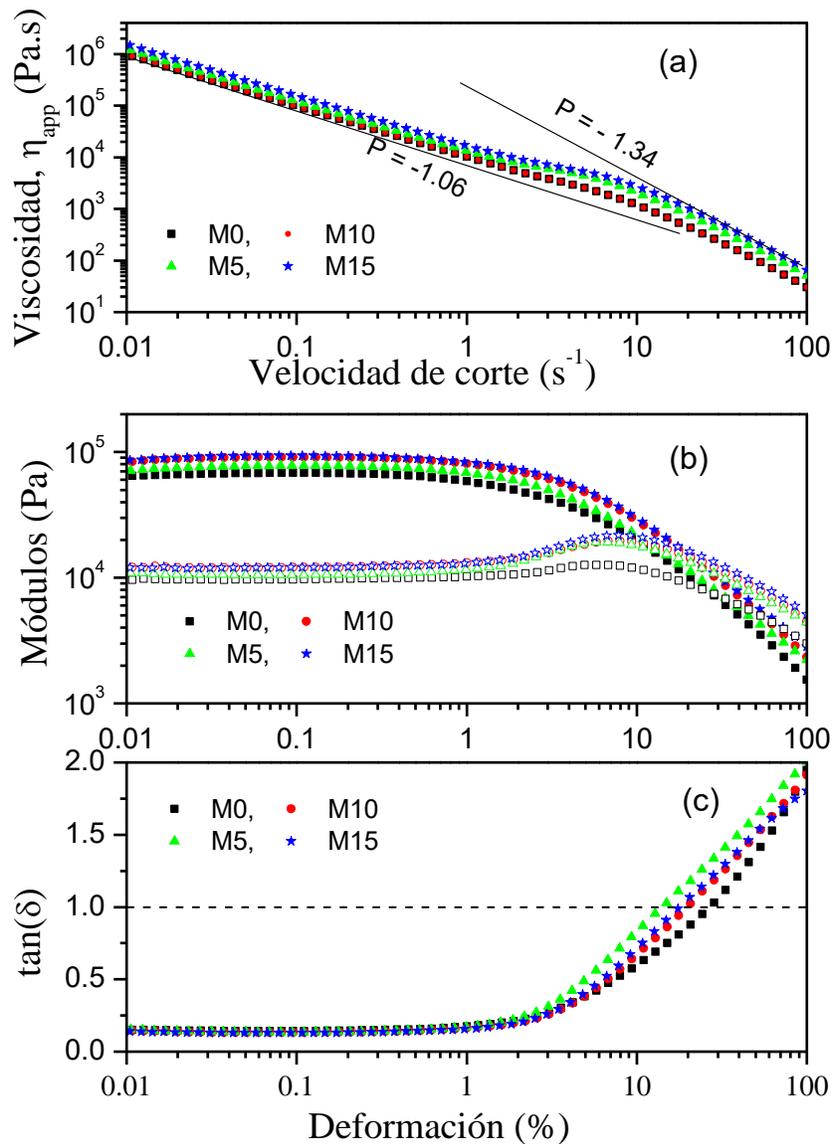
### 8.3.3 Agua congelable de las diferentes masas

El agua congelable es la cantidad de agua que se comporta como agua libre (Vittadini, & Vodovotz, 2003). El agua congelable en la matriz de un alimento está disponible para reacciones químicas y bioquímicas, así como para el crecimiento y propagación microbiana (Leloup, Colonna, Ring, Roberts, & Wells, 1992). De esta manera, el agua congelable incrementa el riesgo de deteriorar la masa y tortillas durante su almacenamiento y condiciones de anaquel. En contraste, el agua no congelable corresponde a moléculas de agua ligada. En la Tabla 4 se describe el contenido de agua congelable y no congelable de las masas en sus diferentes formulaciones. El contenido de agua

congelable disminuyó con la incorporación de HMG, de 46.29 % para  $M_0$  a 35.93 % para  $M_{15}$ . Esto significa que la incorporación de HMG promovió el enlace de las moléculas de agua, de acuerdo con los resultados obtenidos en la CRA. La gelatinización de almidón llevó a la formación de cadenas de amilosa lixiviadas durante el calentamiento, donde las moléculas de agua son atrapadas en una red tridimensional compleja (Leloup, Colonna, Ring, Roberts, & Wells, 1992). En cambio, estas microestructuras resultan en moléculas de agua que no están disponibles para el congelamiento a la temperatura de 0 °C.

### 8.3.3. Viscosidad de las diferentes masas

La maleabilidad de la masa es una característica importante para la producción de tortillas. Referente a esto, la viscosidad y las propiedades viscoelásticas juegan un papel importante en la manipulación de la masa. La viscosidad aparente aumentó con el contenido de HMG (Fig. 7(a)). Por ejemplo, para un valor de  $0.1 \text{ s}^{-1}$  de velocidad de corte, la viscosidad aparente fue 95.01 kPa s para  $M_0$  y 153.48 kPa s para  $M_{15}$ . Un patrón reológico similar se obtuvo para masa de trigo conteniendo fracciones de almidón pregelatinizado sometido a pruebas de corte. (Onyango, Mutungi, Unbehend, & Lindhauer, 2010; Hesso, Loisel, Chevallier, & Le-Bail, 2014). De manera general, se puede observar un comportamiento de reoadelgazamiento en todo el rango velocidad de corte analizado, diferenciándose dos regiones, donde el reoadelgazamiento se describe por la ley de potencia (ver Ec. (1)). En la primera región a valores bajos de velocidad de corte (arriba de  $1 \text{ s}^{-1}$ ), el decaimiento logarítmico de la viscosidad aparente mostró una pendiente de -1.06, correspondiente a un índice de comportamiento de flujo de  $n = 0.06$ . Por otro lado, la región a valores de velocidad de corte más altos mostró una pendiente de -1.34, correspondiente a índice de comportamiento de flujo de  $n=0.34$ . Esto es, el adelgazamiento fue más fuerte a valores de velocidades de corte altos. ( $>10 \text{ s}^{-1}$ ). Es notorio que las curvas de viscosidad aparente para la masa conteniendo HMG parecen desplazarse verticalmente respecto a  $M_0$ , sugiriendo que la HMG actúa como un hidrocoloide fortaleciendo la microestructura de la masa. Los hidrocoloides agregados a la masa tienen la habilidad para dispersarse y absorber más agua al igual que el almidón nativo (Ortolan *et al.* 2015). Se ha demostrado que la viscosidad de dispersiones coloidales incorporando almidón gelatinizado se atribuye a la absorción de líquido y el aumento de volumen del coloide agregado (Li, & Nie, 2016). El almidón pregelatinizado en harinas libre de gluten se ha incorporado en formulaciones para mejorar la textura del pan (Sugiura, Ito, & Arai, 2017); sin embargo, hasta donde se sabe, el uso de harinas de almidón gelatinizado en tortillas no se ha reportado.



**Figura 7.** El parámetro  $n$  es el índice de comportamiento de flujo y es estimado como la pendiente del patrón de viscosidad aparente en una gráfica log-log (b) Módulo viscoso y (c) factor de pérdida de las diferentes formulaciones de masas. Para todas las gráficas, se utilizan los siguientes símbolos: Los símbolos abiertos corresponden al módulo de pérdida  $G''$  mientras que los símbolos cerrados corresponden al módulo de almacenamiento: ■, M0; ●, M5; ▲, M10; ★, M15. P= "Pendiente".

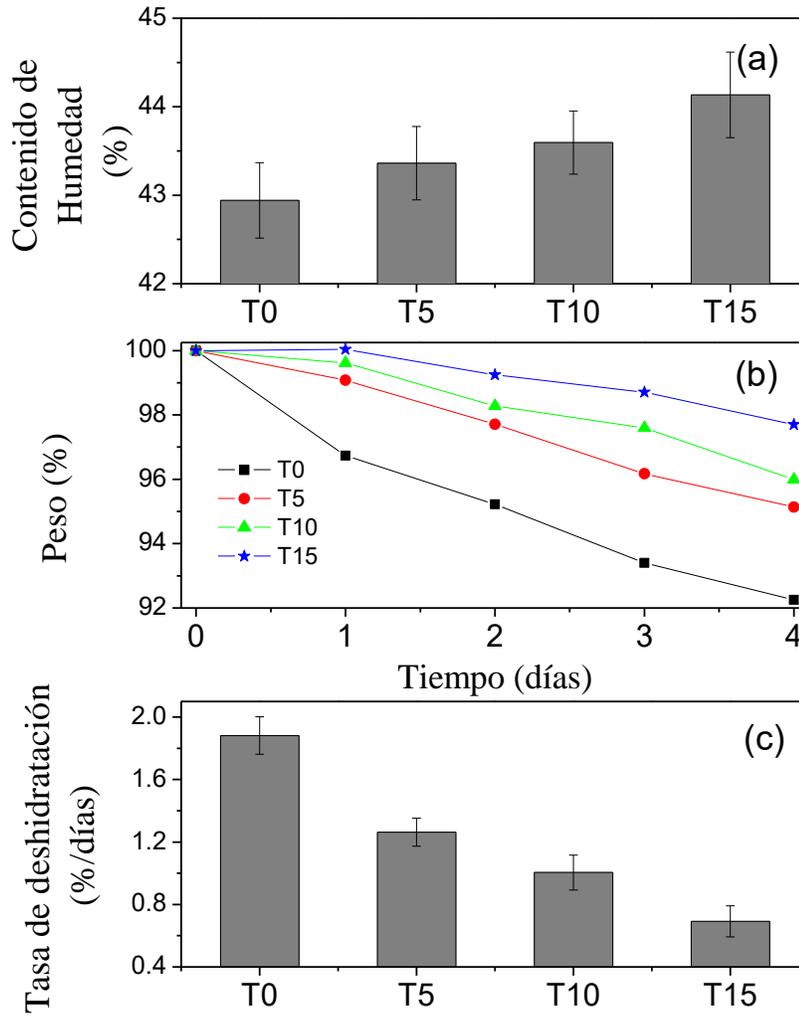
#### 8.3.4. Viscoelasticidad de las diferentes masas

La Fig. 7(b) presenta los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) como función de la deformación a 1 rad s<sup>-1</sup>. El comportamiento del módulo viscoelástico nos da información valiosa

respecto a los cambios en la microestructura conforme la masa es deformada. Para pequeñas deformaciones, por abajo del 2 % ambos módulos son casi constantes, indicando que la microestructura no se afectó por deformaciones pequeñas. El módulo elástico  $G'$  comenzó a disminuir para deformaciones más altas al 2 % lo cual se atribuyó al rompimiento de la estructura de la masa. La disminución en el esfuerzo de corte para deformaciones altas puede atribuirse al alineamiento de la microestructura a lo largo de la dirección de la deformación. Al mismo tiempo, el decaimiento rápido de este módulo a valores por arriba del 10 % de deformación puede ser causado por el rompimiento de agregados de partículas dispersos en el *bulk* de la masa, llevando a la fragmentación de la microestructura de la masa (Hyun, Kim, Ahn, & Lee, 2002; Ewoldt, Hosoi, & McKinley, 2008). El patrón descrito anteriormente fue el mismo en todos los casos, incluyendo aquellos con un alto contenido de HMG. La HMG forma una red tridimensional donde diferentes fracciones de la masa son dispersos, resultando en una microestructura de la masa altamente consolidada con mejores propiedades elásticas (Lobato-Calleros *et al.* 2015). La Fig. 7(c) exhibe el factor de pérdida  $\tan(\delta)=G''/G'$ . Se observó un comportamiento similar al de un sólido ( $\tan(\delta)<1$ ) para valores tan altos como el 10 %, lo cual es un comportamiento típico a la masa de maíz (Núñez-Santiago, Santoyo, Bello-Perez, & Santoyo-Gutiérrez, 2003). La transición ( $\tan(\delta)=1$ ) a comportamiento como un líquido fue afectado negativamente conforme el contenido de la fracción de HMG aumentó.

#### 8.3.5. Contenido de humedad de las diferentes tortillas

El contenido de humedad de las tortillas frescas (Fig. 8(a)) incrementó conforme la fracción de HMG aumentó. Un incremento significativo con respecto a  $M_0$  se observó solo para  $M_{15}$ . Sin embargo, ocurrieron diferencias más importantes con el tiempo. El peso disminuyó debido a la pérdida de agua a condiciones ambientales y se presenta en la Fig. 8(b). La cinética de pérdida de peso siguió un patrón lineal, significando que la evaporación de agua durante los primeros 4 días siguió un patrón de orden cero. Después de 4 días, las tortillas sin HMG ( $T_0$ ) perdió ~8 % del peso inicial, mientras  $T_{15}$  perdió solo ~2 %. La tasa de deshidratación (p. ej. la pendiente de la cinética de deshidratación) presentada en la Fig. 8(c) muestra que  $T_0$  se deshidrató a una razón 4 veces más rápido que  $T_{15}$ .

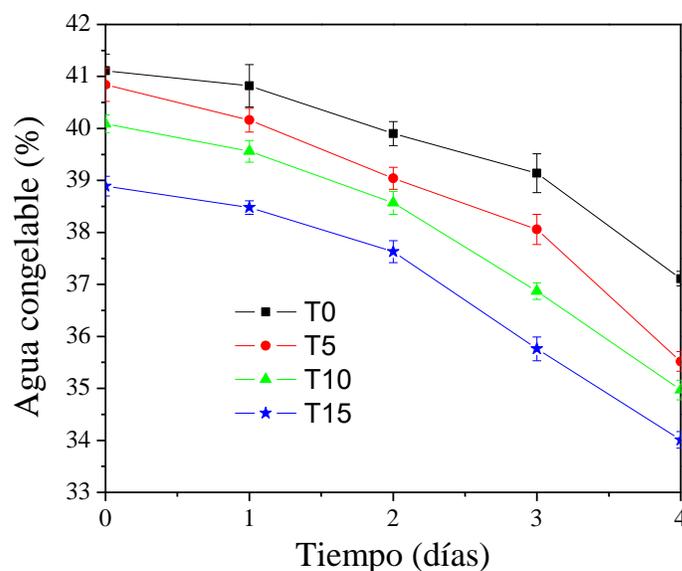


**Figura 8.** (a) Contenido de humedad de las diferentes formulaciones de tortillas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). (b) Peso de la tortilla como función del tiempo de almacenamiento. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15). (c) Tasa de deshidratación para las diferentes formulaciones de tortillas.

### 8.3.6. Contenido de agua congelable de las diferentes tortillas

La Fig. 9 presenta el comportamiento del contenido de agua congelable con el tiempo de almacenamiento. Para tortillas frescas, el contenido de agua congelable fue más alto para  $T_0$  y disminuyó conforme el contenido de HMG aumentó. Estos resultados muestran que la incorporación de la HMG promovió el ligamiento de moléculas de agua con el tiempo de almacenamiento. En

cambio, esto llevó a la reducción de las moléculas de agua disponibles para efectos de evaporación y sinéresis. Sin embargo, el decaimiento del agua congelable fue más alto para tortillas conteniendo fracciones más altas de HMG. La naturaleza de estos efectos no es tan clara aún, pero podrían ser atribuidos a la formación de una red tridimensional más fuerte inducida por la fracción gelatinizada de la harina de maíz.

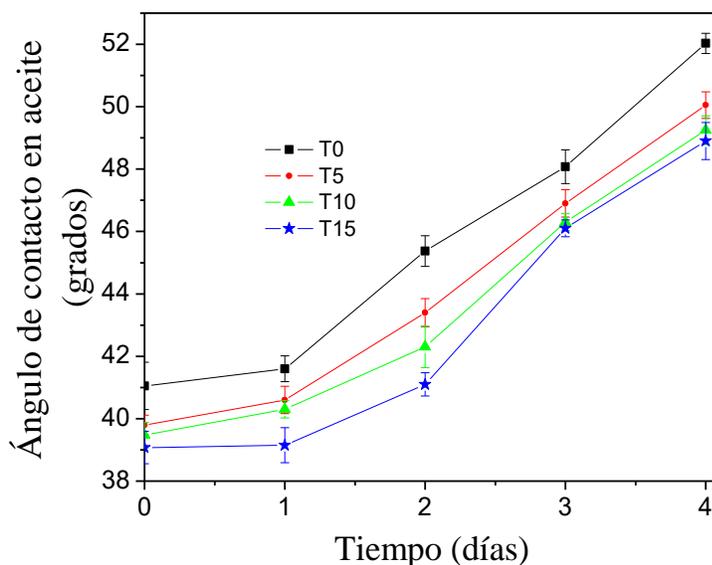


**Figura 9.** Agua congelable como función del tiempo. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15)

### 8.3.7. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto del agua líquida con la superficie de la tortilla no puede ser medida, debido a que la tortilla es altamente hidrofílica y la gota depositada es completamente absorbida. En su lugar, se usó aceite de canola para estimar la naturaleza hidrofílica de la superficie de las tortillas. El incremento en el ángulo de contacto indicó que la superficie llega a ser menos hidrofílica, (Feng *et al.* 2004) causado por la pérdida de agua libre. De esta manera, el ángulo de contacto del aceite puede ser tomado también como una aproximación del envejecimiento de las tortillas, toda vez que el tiempo de almacenamiento y la cantidad de harina gelatinizada promovieron una mayor afinidad al aceite favoreciendo la hidrofobicidad superficial de las tortillas debido a su capacidad de retención de agua resultando en los valores mínimos de ángulo de contacto. Kawas & Moreira (2001) evaluaron el efecto del contenido de humedad y de almidón gelatinizado sobre la absorción de aceite soya en tortillas durante 60 s de freído a 190 °C encontrando que la absorción de aceite en las tortillas fue dependiente de la cantidad de almidón gelatinizado reduciendo su absorción conforme aumento el

contenido de almidón gelatinizado, de la misma manera en que las tortillas con menos contenido de humedad disminuyeron la absorción de aceite. Cabe mencionar que los experimentos desarrollados en nuestra investigación se realizaron a temperatura ambiente, sin embargo similar a lo encontrado por Kawas & Moreira (2001) la afinidad de las tortillas al aceite, seguido por el ángulo de contacto en nuestro caso, presenta el efecto combinado: por la pérdida de humedad con el almacenamiento y por la cantidad de almidón gelatinizado. La Fig. 10 presenta el cambio en el ángulo de contacto del aceite respecto al tiempo de almacenamiento. Para todos los tiempos de almacenamiento, el ángulo de contacto de las tortillas conteniendo HMG fue más pequeño que el ángulo de contacto de T<sub>0</sub>. Al mismo tiempo que conforme el contenido de HMG fue más grande, el ángulo de contacto del aceite fue más pequeño, un resultado que indica que la adición de HMG promueve la capacidad de retención de agua de las tortillas de maíz.

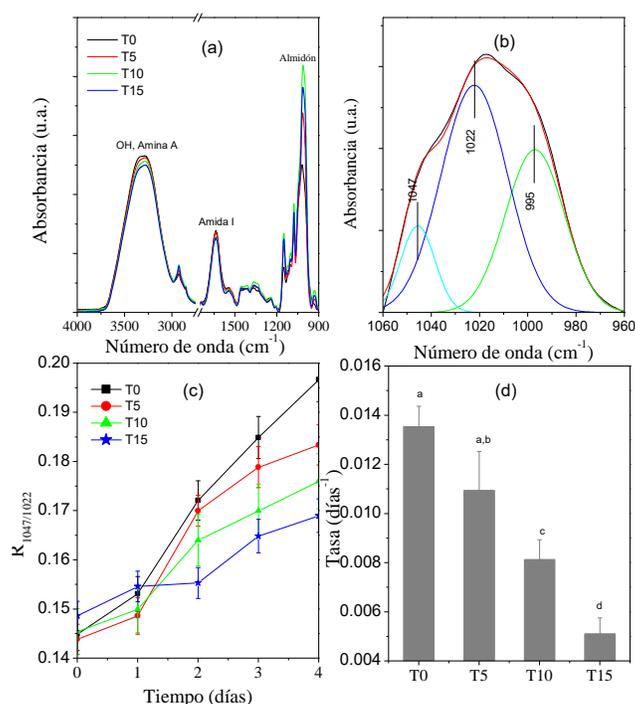


**Figura 10.** Ángulo de contacto de aceite de canola sobre la superficie de las tortillas como función del tiempo. (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15)

### 3.3.8. Análisis de FTIR de las diferentes tortillas

La Fig. 11(a) presenta el espectro FTIR para tortillas con diferentes contenidos de HMG. Todas las muestras mostraron un pico de banda ancha pronunciada entre 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual resultó del traslape combinado de estiramientos de grupos  $\text{OH}^-$  ( $3500 \text{ cm}^{-1}$ ) junto con los efectos de hidratación de grupos  $\text{NH}$  ( $3300 \text{ cm}^{-1}$ ) atribuidos a los grupos de la amida A de proteínas. Estos picos son ligeramente atenuados para las tortillas conteniendo HMG, probablemente debido a que el agua es

entrapada en una red formada por las cadenas del almidón. Flores *et al.* (2012) y Chen *et al.* (2018) han sugerido que el pico a  $\sim 2915\text{ cm}^{-1}$  está relacionado a elongaciones de enlaces CH y puede ser atribuido a ácidos grasos libres y a complejos de inclusión amilosa-lípido. La harina de maíz nixtamalizado contiene  $\sim 4\%$  de lípidos, los cuales pueden formar complejos de inclusión durante la etapa de remojado. La banda ancha centrada entre  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  con un pico en  $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$  corresponde a elongaciones de los enlaces C=O y asociado a los presentes en la amida I de las proteínas del maíz (Flores-Morales *et al.* 2012). Finalmente, la banda centrada entre  $1080\text{--}950\text{ cm}^{-1}$  surge de elongaciones vibracionales de enlaces C-O, C-C, C-H y C-O-H relacionados a los carbohidratos, principalmente al almidón en el caso de las tortillas. De hecho, esta banda es la huella digital de la estructura del almidón (van Soest, Tournois, de Wit, & Vliegthart, 1995).



**Figura 11.** (a) Espectros FTIR para formulaciones de tortillas. (b) Ejemplo de la deconvolución de un espectro FTIR en las bandas asociadas a carbohidratos. (c) Razón 1047/1022 como una función del tiempo de almacenamiento (■, T0; ●, T5; ▲, T10; ★, T15). (d) Tasa de cambio de la cristalinidad de corto rango.

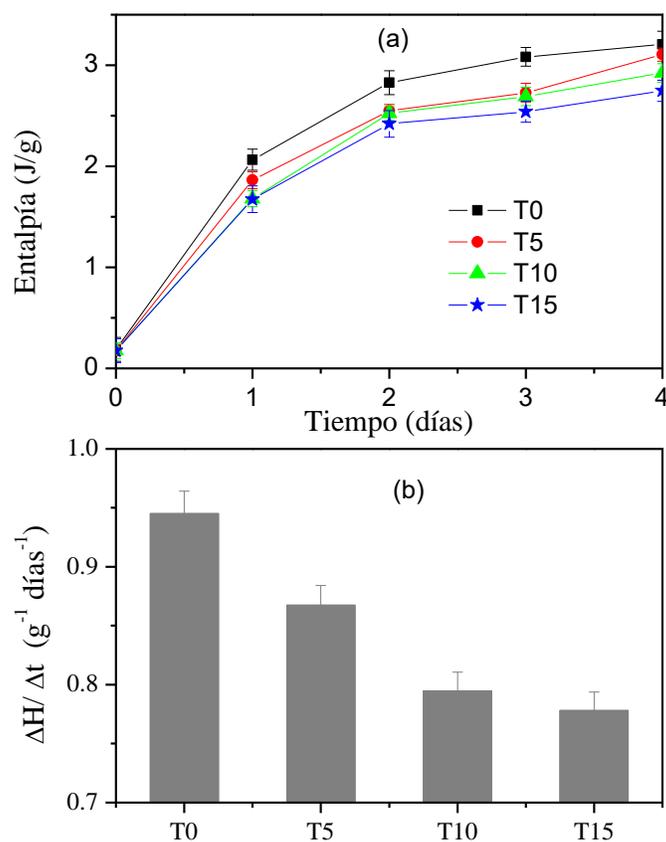
Algunos autores han indicado que la razón 1047/1022 es un indicador útil de las estructuras ordenadas en el almidón (Capron, Robert, Colonna, Brogly, & Planchot, 2007; van Soest, Tournois, de Wit, & Vliegthart, 1995; Sevenou, Hill, Farhat, & Mitchell, 2002). Para estimar la razón 1047/1022, se

deconvolucionaron los espectros FTIR con funciones gaussianas (Fig. 11(b)) y se calculó la razón de áreas correspondiente a los picos más cercanos a 1022 y 1047  $\text{cm}^{-1}$ . La Fig. 11(c) muestra la variación en la razón 1047/1022  $\text{cm}^{-1}$  con respecto al tiempo de almacenamiento como función del contenido de HMG. El incremento en la razón 1047/1022  $\text{cm}^{-1}$  refleja la recristalización de las cadenas de almidón, principalmente la amilosa, promovida por la pérdida de agua (Imberty, Buléon, Tran, & Pérez, 1991). Al primer día se aprecia claramente un orden de la razón FTIR respecto al contenido de HMG. Sin embargo, en días subsecuentes, la razón fue más pequeña para contenidos de HMG más altos, reflejando la desorganización de los gránulos de almidón inducidos por la incorporación de la fracción gelatinizada. En la gelatinización, se forman nuevos enlaces hidrógeno con las moléculas de agua y estructuras de doble hélice, llevando a una reducción en el agua libre (Imberty, Buléon, Tran, & Pérez, 1991). De esta forma, los resultados presentados en el Fig. 11(c) sugieren que la incorporación de la HMG mejora la retención de agua en la microestructura de la masa. También es notorio que el aumento en la razón 1047/1022 con respecto al tiempo puede ser descrita por una cinética de orden cero. Los datos experimentales en la Fig. 10(c) se ajustaron a una función lineal donde la pendiente corresponde a la tasa de incremento de la razón 1047/1022. La Fig. 11(d) presenta el comportamiento de esta razón respecto al contenido de HMG. El resultado mostró que la razón 1047/1022 la cual refleja la velocidad de retrogradación del almidón, disminuyó con el aumento del contenido de HMG. En cambio, esta disminución indica en la retrogradación la efectividad de la adición de una fracción de HMG para reducir los efectos adversos del endurecimiento de las tortillas.

### 8.3.9. Análisis DSC

Los patrones DSC (Datos no mostrados) de las tortillas a diferentes tiempos de almacenamiento mostraron un pico endotérmico  $\sim 60$  °C, lo cual es característico de la fusión de amilopectina retrogradada (Clubbs, Vittadini, Shellhammer, & Vodovotz, 2002). El endurecimiento de las tortillas está ligado a la retrogradación de los componentes del almidón, a través de la cual se produce una estructura cristalina durante el almacenamiento que aumenta con el tiempo con cristales pequeños e imperfectos que se desordenan a temperaturas más bajas que su contraparte el almidón nativo (Paredes-Lopez, Bello-Perez, & Lopez, 1994; García-Rosas *et al.* 2009). De esta manera la cantidad de almidón retrogradado provee un índice del endurecimiento de las tortillas. A su vez, la entalpía del pico en  $\sim 60$  °C también puede ser considerado como indicativo del endurecimiento de las tortillas. La Fig. 12 presenta las cinéticas de la entalpía estimada en el pico en  $\sim 60$  °C. El valor de la entalpía presenta un incremento monótono donde  $T_0$  presenta un incremento mayor. La incorporación de la HMG disminuyó el incremento de la entalpía, sugiriendo que la HMG retardó la reorganización de los componentes del almidón. De hecho, conforme mayor contenido de HMG, menor fue el incremento de la entalpía y con esto el endurecimiento de las tortillas también. El modelo cinético de primer

ordenado en la Eqn. (3) fue usado para ajustar los datos experimentales de la entalpía. La Fig. 12(b) presenta la constante de velocidad (estimada por el ajuste con mínimos cuadrados) para las diferentes formulaciones evaluadas en tortillas. Como se esperaba de los datos en la Fig. 12(a), conforme mayor fue el contenido de HMG fueron mayores, menor fue la constante de velocidad de retrogradación.



**Figura 12.** (a) Entalpía estimada por DSC (b) Tasa de cambio de la entalpía de fusión de la amilopectina

### 8.3.10. Dureza de las diferentes tortillas

La evolución de la dureza de las tortillas está descrita en la Tabla 5. La firmeza es la característica sensorial más palpable que indica el endurecimiento de la tortilla, para esta investigación se realizó un análisis instrumental de dureza. La adición de HMG causó una disminución de la dureza de las tortillas frescas. De hecho, la dureza fue ~2.12 N para T<sub>0</sub> y disminuyó a ~1.56 N para T<sub>15</sub>. La disminución de la dureza fue inducida por la HMG, la cual lleva a una microestructura más compacta,

probablemente debido a que la HMG actuó como un plastificante que estabilizó la microestructura de las tortillas. Por otro lado, la retrogradación de los componentes del almidón y la pérdida del agua llevó a un incremento en la dureza de las tortillas, una clara característica del envejecimiento de las tortillas. La dureza de T<sub>0</sub> aumentó de ~2.12 a ~4.13N en 4 días. La incorporación de la HMG disminuyó el incremento de la dureza. Por ejemplo, la dureza de T<sub>15</sub> aumentó de ~1.56 a ~2.91 N en el mismo periodo de tiempo, un efecto que podría ser atribuido a la formación de red tridimensional más compacta.

**Tabla 5.** Evolución de la dureza de las tortillas en base a las diferentes formulaciones

Tiempo (días)	Dureza (N)			
	T <sub>0</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>15</sub>
0	2.12±0.07 <sup>d</sup>	1.73±0.11 <sup>d</sup>	1.73±0.11 <sup>d</sup>	1.56±0.13 <sup>c</sup>
1	3.51±0.27 <sup>bc</sup>	3.29±0.25 <sup>c</sup>	3.29±0.25 <sup>c</sup>	2.31±0.24 <sup>b</sup>
2	3.88±0.27 <sup>ab</sup>	3.79±0.24 <sup>b</sup>	3.79±0.24 <sup>b</sup>	2.78±0.31 <sup>a</sup>
3	4.17±0.19 <sup>a</sup>	3.81±0.18 <sup>ab</sup>	3.81±0.18 <sup>ab</sup>	2.78±0.35 <sup>a</sup>
4	4.13±0.23 <sup>a</sup>	3.93±0.30 <sup>a</sup>	3.93±0.29 <sup>a</sup>	2.91±0.24 <sup>a</sup>

Los valores son promedios ± error estándar, de tres replicas. Los super índices con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

## 9.- CONCLUSIONES

### Parte I

Los resultados de este trabajo proveen una visión detallada de los efectos del tratamiento con  $\text{CaCO}_3$  sobre la morfología, viscoelasticidad, cristalinidad y degradabilidad de geles de almidón de maíz.

- Los análisis de microscopía de las DAMG evidenciaron que se modificó la morfología de los remanentes insolubles de amilopectina (“ghosts”, por su nombre en inglés) alterando la estructura y evidenciando una mayor salida de amilosa fuera de los “ghost” por efecto del  $\text{CaCO}_3$ .
- El contenido de  $\text{CaCO}_3$  aumentó la tixotropía y un comportamiento viscoelástico dependiente de la frecuencia en las DAMG.
- Los análisis térmicos, de sinéresis y ángulo de contacto permitieron observar las interacciones en el sistema almidón- $\text{CaCO}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$ , mostrando que:
  - Se origina una mayor humectabilidad determinada por los análisis de ángulo de contacto.
  - El  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la formación de entrecruzamientos con las cadenas del almidón dispersadas durante la gelatinización.
    - Se forma una red más fuerte al agregar el  $\text{CaCO}_3$  decreciendo de esta manera la sinéresis de las DAMG.
    - El  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a los espacios que el agua ocuparía durante el proceso de gelatinización evidenciado por el aumento en el contenido de agua congelable determinado por la calorimetría diferencial de barrido.
- El reordenamiento de las cadenas de almidón al someterse a un proceso previo de secado indica que el  $\text{CaCO}_3$  modificó los patrones de rayos-X disminuyendo el índice de cristalinidad, el cual alcanzó un valor mínimo a partir de la concentración de 1 % p/p de la sal. Por otro lado, el grado de ordenamiento de las doble hélices (determinado por FTIR) de las DAMG tratadas con la sal de calcio no mostró cambios evidentes.
- El entrecruzamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  con el almidón promovió el transporte de  $\text{H}^+$  provenientes de las cadenas de almidón hacia el medio. Esto provocó la probable formación de ácido carbónico que a su vez causó una mayor degradabilidad de las cadenas reflejada en un mayor grado de hidrólisis conforme se aumentó el contenido de  $\text{CaCO}_3$ .

## Parte II

Respecto a la adición de harina de maíz gelatinizado, en esta investigación se hace una propuesta novedosa al no usar aditivos extra, los cuales además son caros; obteniendo efectos comparables a los de los hidrocoloides industrialmente usados para evitar el endurecimiento de la tortilla.

- El contenido de HMG provoca un aumento en la cantidad de agua ligada determinado mediante análisis térmicos, lo cual favorece a su vez un incremento en la capacidad de retención de agua de las masas.
- Las tortillas elaboradas usando HMG causaron una disminución en el valor de la entalpía de fusión de amilopectina asociada a la retrogradación de las cadenas de almidón y el endurecimiento de las tortillas.
- Se determinó que un mayor contenido de HMG favoreció la retención de agua de las tortillas de maíz disminuyendo el valor del ángulo de contacto formado con aceite de canola y la velocidad de pérdida de humedad. Todo esto, comparado al efecto de los hidrocoloides también se promueve la retención de agua y con ello se mantienen las características de una tortilla fresca.
- Los análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR) en tortillas revelaron que la adición de HMG colaboró en la formación de un arreglo más desordenado del gránulo de almidón.
- La adición de HMG mejoró las propiedades de flujo y la dinámica reológica en las masas y a su vez produjo tortillas con menos dureza.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- AACC International. (2001). *Approved Methods of Analysis*, 9th Ed., The Association, St Paul, MN.
- Ahmad, F. B., & Williams, P. A. (1999). Effect of salts on the gelatinization and rheological properties of sago starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3359–3366.
- Amelia, I., & BeMiller, J. N. (2009). Preparation of nonfragmented, completely amorphous, pregelatinized maize starches and determination of the effects of fragmentation on the adhesiveness of their pastes. *Starch/Stärke*, 61, 677–734.
- AOAC, (2002). *Official methods of analysis*, 20th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Barbosa-Canovas, G. V., & Ibarz, A. (2002). *Unit operations in food engineering*. CRC press.
- Beck, M., Jekle, M., & Becker, T. (2011). Starch re-crystallization kinetics as a function of various cations. *Starch-Stärke*, 63, 792-800.
- Bello-Pérez, L. A., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Núñez-Santiago, C., & Paredes-López, O. (2002). Chemical, physicochemical and rheological properties of masas and nixtamalized corn flour. *Agrociencia*, 36, 319-328.
- Bello-Pérez, L. A., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Toro-Vázquez, J. F., & Paredes-López, O. (2003). Chemical and physicochemical properties of dried wet masa and dry masa flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 408-412.
- Bello-Pérez, L. A., Flores-Silva, P. C., Agama-Acevedo, E., Figueroa-Cardenas, J.D.D., Lopez-Valenzuela, J. A., & Campanella, O. H. (2014). Effect of the nixtamalization with calcium carbonate on the indigestible carbohydrate content and starch digestibility of maize tortilla. *Journal of Cereal Science*, 60, 421-425.
- BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (Eds.). (2009). *Starch: Chemistry and technology*. New York: Academic Press.
- Bertolini, A. (Ed.). (2009). *Starches: characterization, properties, and applications*. CRC Press.
- Bressani, R., Paz y Paz, R., & Scrimshaw, N. S. (1958). Corn nutrient losses, chemical changes in corn during preparation of tortillas. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 6(10), 770-774.
- Bryant, C. M., & Hamaker, B. R. (1997). Effect of lime on gelatinization of maize flour and starch. *Cereal Chemistry*, 74, 171-175.

- Bueso, F. J., Rooney, L. W., Waniska, R. D., & Silva, L. (2004). Combining maltogenic amylase with CMC or wheat gluten to prevent amylopectin recrystallization and delay corn tortilla staling. *Cereal chemistry*, 81(5), 654-659.
- Bueso, F. J., Waniska, R. D., Moreira, R., Seetharaman, K., & Rooney, L. W. (2006). Effect of temperature on texture of corn tortilla with and without antistaling agents. *Cereal chemistry*, 83(4), 348-353.
- Campas-Baypoli, O. N., Rosas-Burgos, E. C., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., & Serna-Saldívar, S. O. (2002). Physicochemical changes of starch in maize tortillas during storage at room and refrigeration temperatures. *Starch-Stärke*, 54(8), 358-363.
- Campechano-Carrera, E. M., Figueroa-Cárdenas, J.D.D., Arámbula-Villa, G., Martínez-Flores, H. E., Jiménez-Sandoval, S. J., Bárcenas, L., & Gabriel, J. (2012). New ecological nixtamalisation process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole maize flour and wastewater effluents. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 564-571.
- Capron, I., Robert, P., Colonna, P., Brogly, M., & Planchot, V. (2007). Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate polymers*, 68(2), 249-259.
- Carrillo, G. V., Uribe, G. Á., Montes, A. H., Merino-Castillo, J., & Guerrero, O. A. (2011). Evaluación sensorial de tortillas de maíz recién elaboradas y empacadas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(1), 161-167.
- Chen, L., Tian, Y., Sun, B., Cai, C., Ma, R., & Jin, Z. (2018). Measurement and characterization of external oil in the fried waxy maize starch granules using ATR-FTIR and XRD. *Food chemistry*, 242, 131-138.
- Clubbs, E. A., Vittadini, E., Shellhammer, T. H., & Vodovotz, Y. (2008). Effects of storage on the physico-chemical properties of corn tortillas prepared with glycerol and salt. *Journal of cereal science*, 47(2), 162-171.
- Contreras-Jiménez, B., Gaytán-Martínez, M., Figueroa-Cárdenas, J.D.D., Avalos-Zúñiga, R., & Morales-Sánchez, E. (2014). Effect of steeping time and calcium hydroxide concentration on the water absorption and pasting profile of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 122, 72-77.
- De Arriola, M. D. C., De Porres, E., De Cabrera, S., De Zepeda, M., & Rolz, C. (1988). Aflatoxin fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36(3), 530-533.

- Debet, M.R., & Gidley, M.J. (2007). Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4752-4760.
- Eliasson, A. C. (Ed.). (2004). *Starch in food: Structure, function and applications*. CRC Press.
- Ewoldt, R. H., Hosoi, A. E., & McKinley, G. H. (2008). New measures for characterizing nonlinear viscoelasticity in large amplitude oscillatory shear. *Journal of Rheology*, 52(6), 1427-1458.
- FAO. 2014. FAOSTAT, base de datos en línea. <http://www.fao.org/faostat>
- Feng, L., Zhang, Z., Mai, Z., Ma, Y., Liu, B., Jiang, L., & Zhu, D. (2004). A super-hydrophobic and super-oleophilic coating mesh film for the separation of oil and water. *Angewandte Chemie*, 116(15), 2046-2048.
- Fernandez, D. A., Waniska, R. D., & Rooney, L. W. (1999). Changes in starch properties of corn tortillas during storage. *Starch-Stärke*, 51(4), 136-140.
- Fernández-Muñoz, J. L., Rojas-Molina, I., González-Dávalos, M. L., Leal, M., Valtierra, M. E., Martín-Martínez, E. S., & Rodríguez, M. E. (2004). Study of calcium ion diffusion in components of maize kernels during traditional nixtamalization process. *Cereal chemistry*, 81, 65-69.
- Figuroa, J.D.C., Rodríguez-Chong, A., Veles-Medina, J.J., 2011. Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas, masa y tortillas integrales. 15 de agosto de 2011. Patente mexicana número 289339.
- Figuroa-Cárdenas, J., Véles-Medina, J. J., Esquivel-Martínez, A. M., Mariscal-Moreno, R. M., Santiago-Ramos, D., & Hernández-Estrada, Z. J. (2016). Effect of processing procedure on the formation of resistant starch in tamales. *Starch-Stärke*, 68(11-12), 1121-1128
- Flores-Morales, A., Jiménez-Estrada, M., & Mora-Escobedo, R. (2012). Determination of the structural changes by FT-IR, Raman, and CP/MAS 13C NMR spectroscopy on retrograded starch of maize tortillas. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 61-68.
- French, D., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Paschall, E. F. (1984). *Starch: Chemistry and Technology* (3rd ed.). New York: Academic Press.
- Friend, C. P., Waniska, R. D., & Rooney, L. W. (1993). Effects of hydrocolloids on processing and qualities of wheat tortillas. *Cereal Chemistry*, 70, 252-252.

- García-Rosas, M., Bello-Pérez, A., Yee-Madeira, H., Ramos, G., Flores-Morales, A., & Mora-Escobedo, R. (2009). Resistant starch content and structural changes in maize (*Zea mays*) tortillas during storage. *Starch-Stärke*, 61(7), 414-421.
- González, H., Damián, M., & Ángel, M. (2015). Efecto de transmisión de precio del mercado del maíz al mercado de la tortilla en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(6), 1149-1162.
- González, R., Reguera, E., Figueroa, J. M., & Sánchez-Sinencio, F. (2005). On the nature of the Ca binding to the hull of nixtamalized corn grains. *LWT-Food Science and Technology*, 38(2), 119-124.
- Guzmán, D., Trudel, L., & Wogan, G. N. (1995). Corn “nixtamalización” and the fate of radio labelled aflatoxin B1 in the tortilla making process. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 55(6), 858-864.
- Hesso, N., Loisel, C., Chevallier, S., & Le-Bail, A. (2014). Impact of pregelatinized starches on the texture and staling of conventional and degassed pound cake. *Food and bioprocess technology*, 7(10), 2923-2930.
- Huang, J., Schols, H. A., van Soest, J. J., Jin, Z., Sulmann, E., & Voragen, A. G. (2007). Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. *Food Chemistry*, 101, 1338-1345.
- Hyun, K., Kim, S. H., Ahn, K. H., & Lee, S. J. (2002). Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 107(1-3), 51-65.
- Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., & Pérez, S. (1991). Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch-Stärke*, 43(10), 375-384.
- Jane, J. L., Kasemuwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch- Stärke*, 46, 121-128.
- Kawas, M. L., & Moreira, R. G. (2001). Effect of degree of starch gelatinization on quality attributes of fried tortilla chips. *Journal of Food Science*, 66(2), 300-306.
- Kim, H.Y., Lee, J.H., Kim, J.Y., Lim, W.J., & Lim, S.T. (2012). Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches, *Starch/Stärke*, 64, 367-373.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.

- Labuza, t. P. (1977). The properties of water in relationship to water binding in foods: a review 1, 2. *Journal of food processing and preservation*, 1(2), 167-190.
- Leloup, V. M., Colonna, P., Ring, S. G., Roberts, K., & Wells, B. (1992). Microstructure of amylose gels. *Carbohydrate polymers*, 18(3), 189-197.
- Li, J. M., & Nie, S. P. (2016). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*, 53, 46-61.
- Limanond, B., Castell-Perez, M. E., & Moreira, R. G. (2002). Modeling the kinetics of corn tortilla staling using stress relaxation data. *Journal of Food Engineering*, 53(3), 237-247.
- Limanond, B., Castell-Perez, M. E., & Moreira, R. G. (2002). Quantifying texture changes in corn tortillas due to staling. *Journal of texture studies*, 33(1), 35-44.
- Lobato-Calleros, C., Hernandez-Jaimes, C., Chavez-Esquivel, G., Meraz, M., Sosa, E., Lara, V. H., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of lime concentration on gelatinized maize starch dispersions properties. *Food Chemistry*, 172, 353-360.
- McClements, D.J. (1999). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton: CRC Press (Chapter 8).
- Méndez-Montealvo, G., García-Suárez, F. J., Paredes-López, O., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. *Journal of Cereal Science*, 48, 420-425.
- Méndez, L. I. R., Cárdenas, J. D. D. F., Gómez, M. R., & Lagunas, L. L. M. (2013). Nutraceutical properties of flour and tortillas made with an ecological nixtamalization process. *Journal of food science*, 78(10), C1529-C1534.
- Mondragón, M., Bello-Pérez, L. A., Agama, E., Melo, A., Betancur-Ancona, D., & Peña, J. L. (2004). Effect of nixtamalization on the modification of the crystalline structure of maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 55, 411-418.
- Moreno-Castro, L.E., Quintero-Ramos, A., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Sánchez-Madrigal, M.A., Meléndez-Pizarro, M.A., Pérez-Reyes, I., & Lardizábal-Gutiérrez, A. (2015). Nixtamalization assisted with ultrasound: Effect on mass transfer and physicochemical properties of nixtamal, masa and tortilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14, 265-279.

- Nunez-Santiago, M. C., Santoyo, E., Bello-Perez, L. A., & Santoyo-Gutiérrez, S. (2003). Rheological evaluation of non-Newtonian Mexican nixtamalised maize and dry processed masa flours. *Journal of food engineering*, 60(1), 55-66.
- Oosten, B. J. (1982). Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. *Starch-Stärke*, 34, 233-239.
- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., & Lindhauer, M. G. (2010). Rheological and baking characteristics of batter and bread prepared from pregelatinised cassava starch and sorghum and modified using microbial transglutaminase. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 465-470.
- Ortolan, F., Brites, L. T. G., Montenegro, F. M., Schmiele, M., Steel, C. J., Clerici, M. T. P., ... & Chang, Y. K. (2015). Effect of extruded wheat flour and pre-gelatinized cassava starch on process and quality parameters of French-type bread elaborated from frozen dough. *Food Research International*, 76, 402-409.
- Paredes-López, O., Bello-Perez, L. A., & López, M. G. (1994). Amylopectin: structural, gelatinisation and retrogradation studies. *Food chemistry*, 50(4), 411-417.
- Pineda-Gómez, P., Coral, D. F., Ramos-Rivera, D., Rosales-Rivera, A., & Rodríguez-García, M. E. (2011). Thermo-alkaline treatment. A process that changes the thermal properties of maize starch. *Procedia Food Science*, 1, 370-378.
- Pineda-Gómez, P., Rosales-Rivera, A., & Rodríguez-García, M. E. (2012). Effect of the thermo-alkaline treatment over the thermal degradation of maize starch. *Starch-Stärke*, 64, 776-785.
- Ratnayake, W.S., & Jackson, D.S. (2007). A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*, 67, 511-529.
- Rendón-Villalobos, R., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J. J., Sánchez-Muñoz, J., & Bello-Perez, L. A. (2006). In vitro starch bioavailability of corn tortillas with hydrocolloids. *Food chemistry*, 97(4), 631-636.
- Rindlava, Å., Hulleman, S. H., & Gatenholma, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, 34(1-2), 25-30.
- Robles, R. R., Murray, E. D., & Paredes-López, O. (1988). Physicochemical changes of maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *International Journal of Food Science & Technology*, 23, 91-98.

Rodríguez-Martínez, N. A., Salazar-García, M. G., Ramírez-Wong, B., Islas-Rubio, A. R., Platt-Lucero, L. C., Morales-Rosas, I., Marquez-Melendez, R., & Martínez-Bustos, F. (2015). Effect of malting and nixtamalization processes on the physicochemical properties of instant extruded maize flour and tortilla quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 275-280.

Román-Brito, J. A., Agama-Acevedo, E., Méndez-Montevalvo, G., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Textural studies of stored corn tortillas with added xanthan gum. *Cereal chemistry*, 84(5), 502-505.

Rooney, L.W., & Serna-Saldivar, S.O. (2015). *Tortillas: Wheat Flour and Corn Products (2015)*, AACC International Press, ISBN 9781891127885, pp 288. <https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-88-5.50014-1>.

Rosentrater, K. A. (2006). A review of maize masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management*, 26, 284-292.

Salazar, R., Arámbula-Villa, G., Luna-Bárceñas, G., Figueroa-Cárdenas, J. D., Azuara, E., & Vázquez-Landaverde, P. A. (2014). Effect of added calcium hydroxide during maize nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. *LWT-Food Science and Technology*, 56, 87-92.

Santiago Ramos, D. (2014). Efecto de la concentración de sales de calcio en la gelatinización del almidón durante el proceso de nixtamalización ecológico y tradicional (Disertación doctoral).

Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Véles-Medina, J. J., Mariscal-Moreno, R. M., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M., & Morales-Sánchez, E. (2015a). Resistant starch formation in tortillas from an ecological nixtamalization process. *Cereal Chemistry*, 92, 185-192.

Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Véles-Medina, J. J., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M., & Morales-Sánchez, E. (2015b). Effects of annealing and concentration of calcium salts on thermal and rheological properties of maize starch during an ecological nixtamalization process. *Cereal Chemistry*, 92, 475-480.

Schoch, T. J. (1964). Swelling power and solubility of granular starches. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 4, 106-108.

Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2002). Organization of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 79-85.

- Suarez-Meraz, K.A., Ponce-Vargas, S.A., Lopez-Maldonado, J.T., Cornejo-Bravo, J.M., Oropeza-Guzman, M.T., & Lopez-Maldonado, E.A. (2016). Eco-friendly innovation for nejayote coagulation–flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*, 284, 536-542.
- Sugiura, F., Ito, S., & Arai, E. (2017). Effect of pregelatinized starch paste on the ease of swallowing high-moisture content bread. *Journal of Food Engineering*, 214, 209-217
- Suhendro, E. L., Almeida-Dominguez, H. D., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (1998). Objective rollability method for corn tortilla texture measurement. *Cereal chemistry*, 75(3), 320-324.
- Sukhija, S., Singh, S., & Riar, C. S. (2016). Effect of oxidation, cross-linking and dual modification on physicochemical, crystallinity, morphological, pasting and thermal characteristics of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) starch. *Food Hydrocolloids*, 55, 56-64.
- Tako, M., Tamaki, Y., Teruya, T., & Takeda, Y. (2014). The principles of starch gelatinization and retrogradation. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 280-291.
- Tako, M., Tamaki, Y., Konishi, T., Shibamura, K., Hanashiro, I., & Takeda, Y. (2008). Gelatinization and retrogradation characteristics of wheat (Rosella) starch. *Food Research International*, 41, 797-802.
- van Soest, J. J., Tournois, H., de Wit, D., & Vliegthart, J. F. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 279, 201-214.
- Vittadini, E., & Vodovotz, Y. (2003). Changes in the physicochemical properties of wheat-and soy-containing breads during storage as studied by thermal analyses. *Journal of food science*, 68(6), 2022-2027
- Warren, F. J., Gidley, M. J., & Flanagan, B. M. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate polymers*, 139, 35-42.
- Whistler, R. L., BeMiller, J. N. (1957). Alkaline degradation of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 13, 289-329.
- Wu, H., Ran, X.H., Zhang, K.Y. (2006). FTIR study on retrogradation behaviour of crosslinked starch. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 27, 775-778.

Yahuaca-Juárez, B., de Dios Ortiz-Alvarado, J., Martínez-Flores, H. E., Pless, R. C., Vázquez-Landaverde, P. A., Bello-Pérez, L. A., Huerta-Ruelas, J. A. (2013). Laser light scattering system used to evaluate the effect of calcium hydroxide on the properties of amylopectin. *Food Analytical Methods*, 6, 1188-1195.

Yanagioka, M., & Frank, C. W. (2008). Effect of particle distribution on morphological and mechanical properties of filled hydrogel composites. *Macromolecules*, 41(14), 5441-5450.

Yeggy, H. A. (2000). Effect of hydrocolloids and protein on corn tortilla staling (Doctoral dissertation, Texas A&M University).

Zhang, B., Dhital, S., Flanagan, B. M., & Gidley, M. J. (2014). Mechanism for starch granule ghost formation deduced from structural and enzyme digestion properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62, 760-771

Zhu, W. X., Gayin, J., Chatel, F., Dewettinck, K., & Van Der Meeren, P. (2009). Influence of electrolytes on the heat-induced swelling of aqueous dispersions of native wheat starch granules. *Food Hydrocolloids*, 23, 2204-2211.

# 11.- Apéndices

- *Garcia-Diaz, S., Hernandez-Jaimes, C., Escalona-Buendia, H. B., Bello-Perez, L. A., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2016). Effects of CaCO<sub>3</sub> treatment on the morphology, crystallinity, rheology and hydrolysis of gelatinized maize starch dispersions. Food chemistry, 207, 139-147.*
- *Alvarez-Ramirez, J., Garcia-Diaz, S., Vernon-Carter, E. J., & Bello-Perez, L. A. (2018). A novel, simple, economic and effective method for retarding maize tortilla staling. Journal of the Science of Food and Agriculture.*



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Effects of CaCO<sub>3</sub> treatment on the morphology, crystallinity, rheology and hydrolysis of gelatinized maize starch dispersions



S. Garcia-Diaz<sup>a</sup>, C. Hernandez-Jaimes<sup>b,\*</sup>, H.B. Escalona-Buendia<sup>a</sup>, L.A. Bello-Perez<sup>c</sup>, E.J. Vernon-Carter<sup>d</sup>, J. Alvarez-Ramirez<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa 09340, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Toluca 50200, Mexico

<sup>c</sup> Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec 62731, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa 09340, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 November 2015

Received in revised form 22 February 2016

Accepted 28 March 2016

Available online 30 March 2016

#### Keywords:

Nixtamalization

Calcium carbonate

Rheology

Crystallinity

Chemical mechanisms

### ABSTRACT

Using calcium salts instead of lime allows for an ecological nixtamalization of maize grains, where the negative contamination impact of the traditional lime nixtamalization is reduced. This work assessed the effects of calcium carbonate (0.0–2.0% w/w CaCO<sub>3</sub>) on the morphology, crystallinity, rheology and hydrolysis of gelatinized maize starch dispersions (GMSD). Microscopy analysis showed that CaCO<sub>3</sub> changed the morphology of insoluble remnants (ghosts) and decreased the degree of syneresis. Analysis of particle size distribution showed a slight shift to smaller sizes as the CaCO<sub>3</sub> was increased. Also, X-ray patterns indicated that crystallinity achieved a minimum value at CaCO<sub>3</sub> concentration in the range of 1% w/w. GMSD with higher CaCO<sub>3</sub> concentrations exhibited higher thixotropy area and complex viscoelastic behavior that was frequency dependent. A possible mechanism involved in the starch chain modification by CaCO<sub>3</sub> is that starch may act as a weak acid ion exchanger capable of exchanging alcoholic group protons for cations (Ca<sup>2+</sup>).

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is an important worldwide energy source for human consumption. Maize granules are traditionally treated with ash lime (Ca(OH)<sub>2</sub>) in a process known as nixtamalization. Maize grains are cooked with enough water and lime at atmospheric conditions for 30–60 min. Subsequently, the cooked mixture is steeped down for 12–14 h. Next, maize grains are washed out to remove the excess of lime and finally ground in stone mills resulting in malleable dough that is used for the elaboration of various food products (e.g., flour, tortilla, chips, etc.). Various researchers have investigated the effects of lime on the microstructure, functionality, digestibility and viscoelasticity of maize grains and dough (Fernández-Muñoz et al., 2004; Méndez-Montealvo, García-Suárez, Paredes-López, & Bello-Pérez, 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2015; Yahuaca-Juárez et al., 2013). These authors found that besides the functional incorporation of calcium, the traditional nixtamalization caused pericarp degradation, lipid saponification and partial starch gelatinization.

Traditional nixtamalization processing has serious drawbacks: (1) It is inefficient because of the high water consumption; (2) It produces contaminating effluents with a high load (~5–15%) of solid residues (Rosentrater, 2006); and (3) The loss of nutrients (Salazar et al., 2014). It has been proposed that the total or partial substitution of lime by calcium salts may contribute to alleviate these technological problems (Campechano-Carrera et al., 2012). This process termed as ecological nixtamalization is carried out under moderate alkaline conditions (~pH 8), reducing the adverse effects on nutrients and the production of flocculated residues. Further studies showed that the ecological nixtamalization process led to food products (e.g., dough and tortillas) with acceptable sensory and nutritional characteristics, and with cleaner color. It was also found that the ecological nixtamalization with calcium carbonate increased the fiber (Bello-Pérez et al., 2014) and resistant starch (Santiago-Ramos et al., 2015a) contents of tortillas as compared to those obtained by the traditional lime nixtamalization, while both processes induced similar thermal properties (Santiago-Ramos et al., 2015b).

The vast majority of studies of traditional nixtamalization are based on the treatment of the whole maize grain. Only a limited number of reports have focused on the specific effects of lime concentration on maize starch. Bryant and Hamaker (1997) showed

\* Corresponding author.

E-mail address: [carmenherandezjaimes@gmail.com](mailto:carmenherandezjaimes@gmail.com) (C. Hernandez-Jaimes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.095>

0308-8146/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the amount of non-linked water molecules. Here, an index of the evaporable fraction is  $w_b = 0.95\Delta H_b/\Delta H_{b,water}$ . Table 2 shows an increase in the boiling enthalpy, from 1366.4 J/g for GMSD<sub>0.0</sub> to 1758.2 J/g for GMSD<sub>2.0</sub>. By recalling that the water boiling temperature is  $\Delta H_{b,water} = 2257$  J/g, the calcium cross-linking and the presence of calcite crystals weakened the water retention capacity of the CaCO<sub>3</sub> treated GMSD at boiling conditions.

### 3.13. Acid hydrolysis

Hydrolysis of under stringent acidic conditions provides valuable insights on the degradability of starch chains. The data exhibiting the kinetics of acid hydrolysis was presented in Fig. S.3 of the Supplementary Material. The data was adjusted with first-order kinetics, giving a time-constant from 108 min for untreated starch and about 90 min for treated samples. These values justified the use of 2 h in Table 1 as representative of the whole hydrolysis profile. The hydrolysis advance of the native GMSD after 2 h under HCl 1.0 M (pH 2) at 50.0 °C is presented in Table 1. The complete hydrolysis kinetics was shown in Fig. S.2 of the Supplementary Material section. GMSD<sub>0.0</sub> was hydrolysable up to 57.12% after two hours. Interestingly, the treatment with CaCO<sub>3</sub> led to highly degradable starch chains, with a hydrolysis advance of about 79.19% for GMSD<sub>2.0</sub>. This suggested that calcium-mediated cross-linking promotes the action of H<sup>+</sup> ions, which eventually led to the fragmentation of starch chains (Lobato-Calleros et al., 2015), as already shown by the size-exclusion chromatography results in Table 1. Interestingly, the hydrolysis results are in line with recent reports showing that CaCO<sub>3</sub> treatment increased the availability of rapidly digestible starch (Bello-Pérez et al., 2014).

### 3.14. Further discussion insights

Nixtamalization is a process aimed to accommodate maize starch for human consumption. Traditionally, the process is based on the cooking of maize grains with calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>). On the other hand, the proposed ecological nixtamalization process relies on the use of salts (e.g., CaCO<sub>3</sub>). Differences between the two approaches have been documented (Bello-Pérez et al., 2014; Campechano-Carrera et al., 2012), finding that CaCO<sub>3</sub>-based nixtamalization is unable to fully disrupt the grain pericarp, although it can be intended as fiber. From the standpoint of the maize starch, the differences are subtler as one important aim of the treatment is the functionalization of starch chains by the calcium incorporation. A basis for explaining the differences between lime- and salt-based starch modifications may be found in the theory by Oosten (1982). In this theory, starch can act as a weak acid ion exchanger that is capable of exchanging some starch alcoholic group protons for cations. After achieving equilibrium conditions during the gelatinization process, starch chains are able of displaying negative charge, while water is prompted for exhibiting positive charge (BeMiller & Whistler, 2009). Eventually, the potential resulting from equilibration between starch chains and water, called as negative Donnan-potential, stabilizes the gel microstructure, which prevents the further incorporation of anions. As a consequence, the concentration gradient tends to push the cations (e.g., Ca<sup>2+</sup>) into the starch chain domains, resulting in an effective replacement of hydrogen ions (Beck, Jekle, & Becker, 2011; French, Whistler, BeMiller, & Paschall, 1984; Oosten, 1982). The excess of the hydrogen ions into the free water domains lowers the effective pH. Anions may support the gelatinization process by breaking hydrogen bonds within the starch chain regions (Ahmad & Williams, 1999). By accepting this theory, the following

comments on the differences between the process based on Ca(OH)<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub> are in order:

- The principle underlying the starch modification process is that in the gelatinization phase the hydrogen ion concentration inside the starch chain domains is higher than in the water phase. This driving gradient forces the hydrogen ions to migrate from starch chains (i.e., the alcoholic groups) to the free water regions until achieving dynamic equilibrium conditions. The equilibrium conditions can be achieved when cations with a higher charge density are pushed from the water into the starch chains to be attached at the otherwise alcoholic groups. In general, cations have a greater ion radius than hydrogen ions and hence probably modify the starch chain attributes. In this view, the gradient in the hydrogen ions between the water and starch chain domains plays an important role in the effectiveness of the dynamic equilibration mechanisms. While the Ca(OH)<sub>2</sub>-based nixtamalization is typically operated at pH of about 10.0–12.0, the CaCO<sub>3</sub>-based process operates at pH values in the range 6–8. This means that the traditional nixtamalization imposes a greater hydrogen gradient, which surely makes the calcium substitution at the alcoholic groups more efficient. In other words, the ecological nixtamalization process should require a higher calcium concentration for attaining similar effects as the traditional process.
- The anion from the modification agent also infringes important effects on maize starch chains. Hydroxyl ions from Ca(OH)<sub>2</sub> can break hydrogen bonds within the starch chains, leading to a reduction of the effective molecular weight (French et al., 1984; Whistler & BeMiller, 1957). Bryant and Hamaker (1997) have pointed out that the action of hydroxyl ions is responsible of the fragmentation of secondary chains in ramified amylopectin, which eventually improves the viscoelasticity of paste (e.g., masa) of nixtamalized maize. In the traditional process considered in this work, the resulting anion is CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> whose action in the starch chains is quite marginal. Instead carbonate ions remains in the water phase and may form carbonic acid with the hydrogen ions extracted from the starch chains. In this way, the differences in the viscoelasticity properties and the water retention capacities can be attributed to differences in the effects of anions in the starch chains.

Summing up, the chemical mechanisms underlying the nixtamalization process can be delineated from the view that starch acts as a weak acid that can exchange ions with the free water domains. Difference in functional, rheological and morphological properties can be attributed to differences in the effective actions of anions involved in the process. Indeed, the action of the CaCO<sub>3</sub> is weaker than the action of the Ca(OH)<sub>2</sub>, which is reflected in the different analysis results described in this work and our already published work on lime treatment (Lobato-Calleros et al., 2015). For instance, relatively small amounts of Ca(OH)<sub>2</sub> led to extensive destruction of starch granules and ghosts, indicating a profound fragmentation (i.e., depolymerization) of starch chains. In contrast, the results shown in Fig. 1 of this work indicated that CaCO<sub>3</sub> disrupted ghosts without complete destruction. Also, the viscoelasticity of gelatinized starch dispersions exhibited important differences. In fact, the results in this work showed that treatment with CaCO<sub>3</sub> had minor effect in the storage and loss moduli. The treatment with Ca(OH)<sub>2</sub> produced an extensive modification of the gel viscoelasticity, leading to enhanced elastic properties. In general, the results showed that CaCO<sub>3</sub> is unable to achieve the starch modifications generated by Ca(OH)<sub>2</sub>. In turn, this suggests that ecological nixtamalization based solely on calcium salts is not a viable process, and that the process should be inevitably complemented by the addition of Ca(OH)<sub>2</sub>. Interestingly, this idea was already explored

indicative of an A-pattern. However, gelatinization disrupts the internal organization of starch granules, so that the XRD pattern reflected only amorphous microstructures. In fact, the intensity peaks of native maize starch granules are not longer observable. Instead, large intensity peaks were present, which are related to hexagonal-scalenohedral class calcite crystals (card 05-0586 ICDD).

### 3.11. Rheological properties

The viscoelasticity of GMSD is determined by the interplay between the highly elastic ghosts and the continuous viscous matrix (Ratnayake & Jackson, 2007). Fig. 1 showed that the treatment with  $\text{CaCO}_3$  had important impact on ghost integrity. As a consequence, the viscoelastic properties should be also modified. Fig. 3 shows the storage and loss moduli of the GMSD as a function of frequency. The storage and loss moduli decreased as  $\text{CaCO}_3$  concentration increased, probably due to starch chain fragmentation as detected by size-exclusion chromatography (see Table 1). Calcites dispersed into the continuous matrix can also affect the viscoelasticity of the gelatinized starch dispersion. The lack of a crossover frequency is noted, indicating that the gelatinized dispersion is largely dominated by elasticity mechanisms for the scrutinized frequency range.

The complex interplay between the elastic solids dispersed in the continuous amylose viscous matrix, might lead to memory effects in the flow behavior of the GMSD. Fig. 4a illustrates the behavior of the forward and backward flow curves of GMSD<sub>0.0</sub> and GMSD<sub>2.0</sub>. The following features can be commented: (a)  $\text{CaCO}_3$  treatment decreased the shear stress, indicating that the action of calcium salt weakened the starch gel microstructure. (b) Forward and backward flow curves exhibited a different pattern, with the former exhibiting higher shear stress values. This means that the application of an increasing shear rate induced gradual breakdown of the gel microstructure, which resulted in decreased (i.e., shear thinning) apparent viscosity values. For reversed shear rate direction, the pristine gel microstructure was not fully recovered. (c) The hysteresis loop can be seen as an indication of the extent of thixotropy behavior of the GMSD. It has been suggested that thixotropy can be quantified by the distance between the forward and the backward curves. However, although the hysteresis loop area can be taken as an index of thixotropy (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003), for simplicity in presentation the thixotropy index (TI) was considered as the maximum logarithmic distance between forward and backward curves. That is,  $TI = \max(\log(\sigma_F) - \log(\sigma_B))$ . The behavior of TI as function of the  $\text{CaCO}_3$  concentration indicated that an increasing gap existed between the higher forward apparent viscosity values and the lower reverse apparent viscosity values

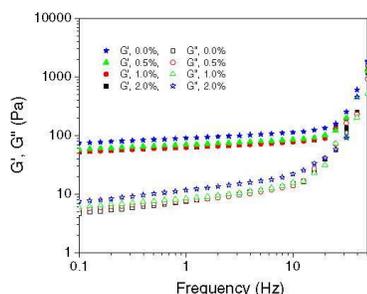


Fig. 3. Frequency sweep test of the gelatinized maize starch dispersions (GMSD).

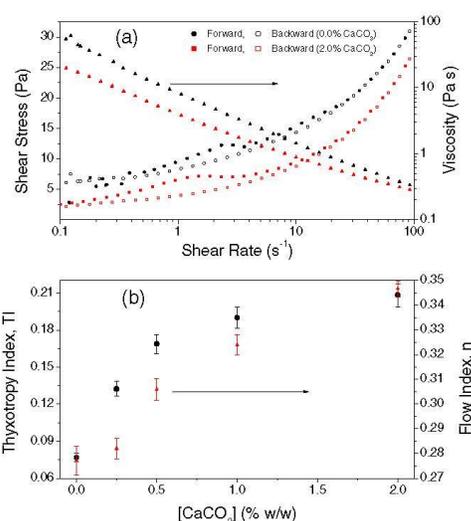


Fig. 4. Flow curves of the GMSD: (a) Illustrative thixotropy hysteresis loop. (b) Thixotropy index as function of the  $\text{CaCO}_3$  concentration.

(Fig. 4b). Thixotropy is due to the dependence on time, and it results from the structural reorganization in a decrease of the resistance to flow (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2003).

### 3.12. Thermal properties

Starch gelatinization produced granule swelling and massive chains leaching to form a complex microstructure of insoluble material (ghosts) crowded in a viscous matrix of entangled molecules. Here, water is trapped into the gel intricacy and linked to starch molecules. The gel microstructure and starch chain nature (e.g., calcium-mediated cross-linked) might affect the gel thermal properties at melting and boiling conditions. The respective peak temperatures and enthalpies are summarized in Table 2. It has been postulated that starch molecules (amylose and amylopectin) play a dominant role in the center of tetrahedral cavities occupied by water molecules (Tako, Tamaki, Teruya, & Takeda, 2014). Besides, this arrangement surely leads to cooperative effects that stabilize extended regions of ice-like water with hydrogen bonding on the surface of the polymer molecules. Here, hemiacetal oxygen and hydroxyl groups might participate in hydrogen bonding with water molecules (Tako et al., 2014). Water excess should lead to saturation of intermolecular hydrogen bonding between amylose and amylopectin molecules, and intermolecular association between amylopectin molecules due to hydrogen bonding. The melting enthalpy presented in Table 2 can be considered as an indicator of the water available for freezing. By recalling that the GMSD contained 5% w/w of starch and that the melting enthalpy of water is  $\Delta H_{m,water} = 334 \text{ J/g}$ , the value  $w_m = 0.95\Delta H_m / \Delta H_{m,water}$  is an index of the water fraction available for freezing. The smaller the gel melting enthalpy is, the smaller the fraction of freezable water becomes. Table 2 shows that this fraction increased only slightly with the  $\text{CaCO}_3$  concentration, meaning that the calcium starch modification did not alter the regions of ice-like water with hydrogen bonding on the surface of the polymer molecules. A similar reasoning can be made for the boiling enthalpy, which reflects

### 3.5. Syneresis

It has been found that increasing  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  concentrations leads to gradual destruction of the ghost microstructure of gelatinized starch dispersions. In this way, it can be expected that increased lime concentration induces a decrement of the water retention capacity (Lobato-Calleros et al., 2015). Bryant and Hamaker (1997) indicated that the water retention capacity of defatted maize flour showed a dramatic decrement up to a lime concentration of 0.60%, and then leveled off. In our study, the  $\text{CaCO}_3$  treatment produced GMSG that exhibited decreased syneresis (Table 1). Syneresis significantly decreased from about 9.5% for  $\text{GMSD}_{0.0}$  to 7.3% for  $\text{GMSD}_{2.0}$ . The opposite behavior between traditional and ecological treatments can be explained from the fact that, besides the calcium-mediated cross-linking of starch chains, the hydroxyl ion  $\text{OH}^-$  from  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  performs an alkaline hydrolysis of the starch chains. As a consequence, the maize starch gel is weakened as shorter starch chains, mainly debranched amylopectin (Bryant & Hamaker, 1997), led to a poorly entangled microstructure. In contrast, the extent of the starch chain disruption by  $\text{CaCO}_3$  treatment was not so severe, producing only moderate breakage of starch chains. It is apparent that this effect resulted in enhanced packing of the continuous matrix and hence to improved water retention capacity.

### 3.6. Contact angle

The binding of calcium to starch chains and the ionic strength by the remnant calcium and carbonate ions modify the affinity of the starch gel to water. In turn, this effect should be reflected in the water affinity of the nixtamalized starch chains. Table 1 presents the contact angle of water with the GMSD dried films. The  $\text{GMSD}_{0.0}$  film was strongly hydrophilic with contact angle of 20.66 degrees, which decreased to about 16.10 degrees for the  $\text{GMSD}_{2.0}$  film. These results indicate that calcium addition allowed a more extensive wettability of the starch molecules, which might be attributed to breakage of starch chains (as detected by size exclusion chromatography) and to cross-linking effects at the carboxyl groups.

### 3.7. Swelling volume

Results of swelling tests are summarized in Table 1. Addition of calcium carbonate produced an important decrease of the swelling volume, which was caused by ionic strength and cross-linking effects introduced by calcium ions (Zhu, Gayin, Chatel, Dewettinck, & Van Der Meeren, 2009). Also, starch chain breakage reduces the ability of retaining water within the amorphous starch microstructure.

### 3.8. Solubility

The solubility of dried of maize starch at 70 °C is exhibited in Table 1. The solubility as function of temperature was reported in Fig. S.1 of the Supplementary Material. The action of calcium carbonate salt on the starch chains increased the starch solubility, an effect that can be attributed to starch chain breakage. In fact, fractionated branches from amylopectin molecules are linear fragments that are easily dispersed in the continuous matrix. In contrast, branched amylopectin remained as insoluble material that can be observed as disrupted ghosts in optical images (Fig. 1).

### 3.9. ATR-FTIR spectroscopy

The FTIR spectra of the GMSD are exhibited in Fig. 2a. The intensity bands in the range 900–1020  $\text{cm}^{-1}$  have been linked to

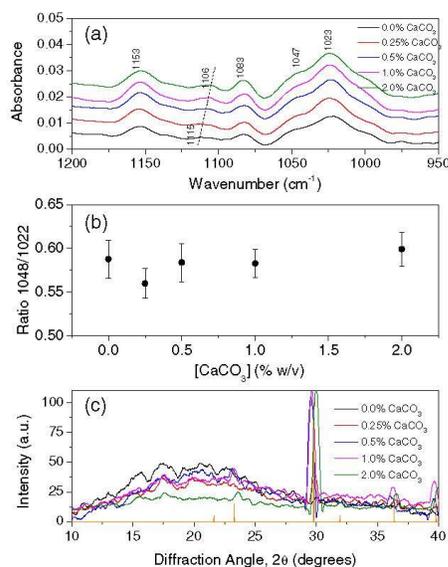
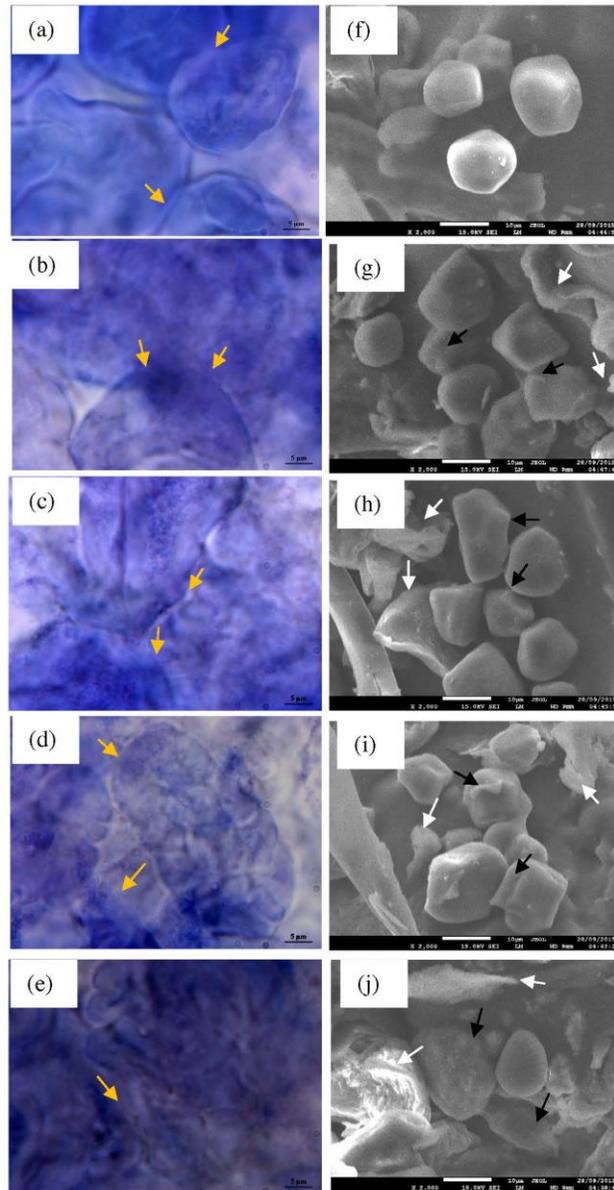


Fig. 2. (a) FTIR spectra of the gelatinized maize starch dispersions (GMSD). (b) 1048/1022 ratio as function of the  $\text{CaCO}_3$  concentration. (c) XRD spectra of the gelatinized maize starch dispersions (GMSD).

C—O—C interactions (Wu, Ran, & Zhang, 2006). It is well-known that the ATR-FTIR spectra of gelatinized starch dispersions are sensitive to changes in structure on a molecular level, which are expressed in the short-range order (Sevenou, Hill, Farhat, & Mitchell, 2002). Short-range order is the indication of double helical order. On the other hand, long-range order is related to packing of double helices, which can be detected by X-ray diffraction tests. The level of organization explored by ATR-FTIR is limited to relatively small crystallized structures that are dispersed within the gel matrix. The absorbance at 1048  $\text{cm}^{-1}$  increased with crystallinity, while 1022  $\text{cm}^{-1}$  is related to vibrational modes of amorphous components (van Soest et al., 1995). Hence, the absorbance ratio 1048/1022 are commonly considered an indicator quantifying the amount of ordered crystalline structures relative to amorphous material in starch gels (van Soest et al., 1995). The absorbance value at 995  $\text{cm}^{-1}$  also provides valuable information about changes in starches. Fig. 2b presents the variation of the intensity ratio 1048/1022 with respect to the  $\text{CaCO}_3$  concentration. The absorbance ratio remained practically constant at about 0.58, suggesting that the low-range crystallinity detected by FTIR was not disrupted by the action of the calcium salt. That is, the double helical order of the  $\text{CaCO}_3$  treated GMSD was unaffected. This result is in contrast with the traditional  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatment where a significant decrease of the absorbance ratio 1048/1022 took place (Lobato-Calleros et al., 2015). It might be suggested that such difference can be inputted to the starch chain hydrolysis performed by  $\text{OH}^-$  ions, which are absent in the  $\text{CaCO}_3$  treatment.

### 3.10. X-ray diffraction (XRD)

XRD patterns for the GMSD are illustrated in Fig. 2c. The XRD pattern of native maize starch granules are characterized by displaying main peaks at about 15°, 17°, 20°, and 23° degrees,



**Fig. 1.** Left column exhibits optical images and right column displays SEM images of the gelatinized maize starch dispersions (GMSD) treated with  $\text{CaCO}_3$  concentrations of: (a), (f) 0.0, (b), (g) 0.25%, (c), (h) 0.5%, (d), (i) 1.0%, and (e), (j) 2.0%. Yellow arrows indicate granular microstructures caused by starch granule disruption. White arrows indicate calcium carbonate aggregates, and black arrows partially reconstituted ghosts. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**  
pH, RI (SEC) response, syneresis, contact angle, swelling, solubility and hydrolysis advance (HCl 1.0 N, 50 °C) of GMSD.

Gel code	pH	RI response ( $A_1/A_2$ )	SR (%)	Contact angle (degrees)	SV at 70 °C (mL/g)	Solubility at 70 °C (%)	Hydrolysis advance (%)
GMSD <sub>0.0</sub>	5.42 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.17 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.19 <sup>a</sup>	20.66 ± 0.28 <sup>a</sup>	18.12 ± 1.14 <sup>a</sup>	32.5 ± 1.23 <sup>a</sup>	57.12 ± 1.14 <sup>a</sup>
GMSD <sub>0.25</sub>	6.67 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.18 <sup>b</sup>	22.34 ± 0.21 <sup>b</sup>	17.61 ± 1.13 <sup>b</sup>	33.2 ± 1.17 <sup>a</sup>	66.61 ± 1.33 <sup>b</sup>
GMSD <sub>0.5</sub>	7.54 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.42 ± 0.12 <sup>ab</sup>	8.1 ± 0.16 <sup>c</sup>	21.82 ± 0.23 <sup>a</sup>	16.07 ± 1.14 <sup>c</sup>	34.3 ± 1.62 <sup>ab</sup>	73.47 ± 1.24 <sup>c</sup>
GMSD <sub>1.0</sub>	7.82 ± 0.41 <sup>d</sup>	1.25 ± 0.15 <sup>bc</sup>	7.6 ± 0.15 <sup>d</sup>	18.73 ± 0.24 <sup>c</sup>	14.76 ± 1.03 <sup>c</sup>	35.1 ± 1.42 <sup>b</sup>	76.76 ± 1.53 <sup>d</sup>
GMSD <sub>2.0</sub>	7.93 ± 0.39 <sup>d</sup>	1.12 ± 0.21 <sup>c</sup>	7.3 ± 0.16 <sup>d</sup>	16.13 ± 0.19 <sup>d</sup>	13.19 ± 1.02 <sup>c</sup>	36.1 ± 1.58 <sup>b</sup>	79.19 ± 1.42 <sup>e</sup>

Values are means ± SD of three replicates.

GMSD = gelatinized maize starch dispersions; SR = syneresis ratio; SV = swelling volume.

### 3.2. Size-exclusion chromatography

To assess the effects of calcium carbonate concentration on the starch chains, the SEC retention time distribution was estimated for native and modified starch samples. Following Amelia and BeMiller (2009), the first chain fraction of native maize starch exhibited a shorter retention time, related to high molecular weight carbohydrates (mainly amylopectin). The second chain fraction was exhibited as a shoulder of the first retention peak, which was composed of low molecular weight carbohydrates (mainly amylose). The ratio between area of the first peak (larger molecules) is commonly referred as Area 1, while area under the broad second peak (smaller molecules, mainly amylose and amylopectin fragments) is referred as Area 2. After the CaCO<sub>3</sub> treatment, the area of the first fraction decreased while the area with the longer retention time increased. The variation of the  $A_1/A_2$  ratio as function of CaCO<sub>3</sub> concentration is presented in Table 1. The RI response decreased with addition of calcium carbonate salt, with 30% decrease at the highest concentration. Results in Table 2 indicated that calcium carbonate treatment disrupted (e.g., depolymerisation) the structure of starch chains. In turn, this disruption should have important effects on the viscoelasticity and degradability of the GMSD.

### 3.3. Optical images and particle size

Aqueous starch dispersions cooked at temperatures that are non-higher than about 110 °C exhibit swelling of granules and subsequent leaching of amylose and small amounts of amylopectin chains dispersed in a continuous aqueous phase (McClements, 1999). Interestingly, it is easily observed that insoluble material can persist after gelatinization as swollen hydrated forms, which are known as ghosts (Ratnayake & Jackson, 2007). Some studies have been reported that granule remnants are formed when the hydrated granules burst and collapse at temperatures of about 80–110 °C (Zhang, Dhital, Flanagan, & Gidley, 2014). It has been suggested that ghosts are composed mainly of cross-linked amylopectin chains (Debet & Gidley, 2007). Fig. 1a illustrates the microstructure of GMSD<sub>0.0</sub>. Compactly packed local domains can

be clearly distinguished, showing that granule remnants formed irregular spatial geometries. It has been suggested that this type microstructure arises due to a combination of viscous continuous amylose-rich matrices and disperse amylopectin-rich ghost remnants (Ratnayake & Jackson, 2007).

Fig. 1b–e present images of GMSD<sub>0.25</sub>, GMSD<sub>0.5</sub>, GMSD<sub>1.0</sub> and GMSD<sub>2.0</sub>, respectively. It can be appreciated in Fig. 1b that the continuous domain exhibits a granular structure (tagged as yellow arrows), which can be attributed to amylose leaching higher than that observed in Fig. 1a for GMSD<sub>0.0</sub>. This suggests that even relatively low concentrations of CaCO<sub>3</sub> induced leaching out of most of the amylose from the starch granules, leaving behind the presence of ghosts associated to insoluble amylopectin. An additional effect was caused by starch chain fractionation, which led to GMSD with a granular-like structure. These observations confirm that amylose is more affected by calcium ions than non-solubilized amylopectin remnants. As the CaCO<sub>3</sub> concentration was increased, the calcium ions in excess led to a progressive destruction of the ghost structure, suggesting that chemical links involving calcium increased the solubility of the amylopectin chains. In fact, ghosts were almost destroyed in GMSD<sub>0.5</sub> (Fig. 1c), while GMSD<sub>1.0</sub> and GMSD<sub>2.0</sub> exhibited a highly disrupted insoluble material (Fig. 1d and e).

Interestingly,  $d_{4L}$  decreased from about 43.2 μm for GMSD<sub>0.0</sub> to 35.2 μm for GMSD<sub>2.0</sub>. These results are in line with the morphological changes observed from the optical microscope images, mainly that shrinking might be reflecting the leaching of starch chains as promoted by the calcium ions migrating into the granule matrix. This is an interesting issue that merits to be studied to a greater depth on its own, but that at the moment is beyond the scope of this investigation.

### 3.4. Morphology-SEM images

The GMSD were dried in order to evaluate their morphological features through SEM images. Illustrative SEM images are exhibited in Fig. 1f–j. In line with previous reports, native maize starch granules of sample GMSD<sub>0.0</sub> were polyhedral shaped with relatively sharp edges (Jane, Kasemuwan, Leas, Zobel, & Robyt, 1994). During drying of the GMSD, ghosts exhibited partial shape recovery, although not necessarily the native crystalline configuration. Calcium carbonate treatment led to important deviations from the polyhedral geometry, progressively producing more irregularly shaped granules (Fig. 1g–j). Starch granules from GMSD<sub>1.0</sub> and GMSD<sub>2.0</sub> (Fig. 1i and j) exhibited abrasions and fractures (indicated by black arrows) on the surface. Aggregates (indicated by white arrows) of calcium salt, possibly calcites, can be also observed. It is apparent that upon cooking, calcium binding disrupted the maize starch granules, producing leaching out of starch chains, and changes in the surface morphology of the dried granules. Left panel of Fig. 1 showed that CaCO<sub>3</sub> disrupted, although not destroyed, the ghost structure, with the disruption being more severe with the increase of the CaCO<sub>3</sub> concentration.

**Table 2**  
Thermal properties of GMSD samples under melting and boiling conditions.

Gel Code	$T_{p,m}$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_{p,b}$ (°C)	$\Delta H_b$ (J/g)
GMSD <sub>0.0</sub>	3.34 ± 0.23 <sup>a</sup>	241.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	102.73 ± 0.17 <sup>a</sup>	1366.4 ± 4.5 <sup>a</sup>
GMSD <sub>0.25</sub>	3.87 ± 0.22 <sup>a</sup>	250.1 ± 2.9 <sup>b</sup>	103.84 ± 0.19 <sup>b</sup>	1628.2 ± 5.3 <sup>b</sup>
GMSD <sub>0.5</sub>	3.21 ± 0.35 <sup>a</sup>	252.1 ± 3.3 <sup>bc</sup>	105.17 ± 0.24 <sup>c</sup>	1688.7 ± 6.1 <sup>c</sup>
GMSD <sub>1.0</sub>	3.22 ± 0.30 <sup>a</sup>	253.3 ± 2.8 <sup>c</sup>	105.08 ± 0.23 <sup>c</sup>	1709.4 ± 5.8 <sup>d</sup>
GMSD <sub>2.0</sub>	3.07 ± 0.29 <sup>a</sup>	258.4 ± 3.3 <sup>d</sup>	104.87 ± 0.43 <sup>c</sup>	1758.2 ± 5.7 <sup>e</sup>

Values are means ± SD of three replicates. Significant differences in each column are expressed as different letter ( $p < 0.05$ ).  $T_{p,m}$  and  $T_{p,b}$  correspond to peak temperatures at melting and boiling point respectively;  $\Delta H_m$  and  $\Delta H_b$  is the enthalpy change at melting and boiling point respectively. For reference, the respective enthalpy values of water are  $\Delta H_{m,water} = 334$  J/g and  $\Delta H_{b,water} = 2257$  J/g. GMSD = gelatinized maize starch dispersions.

1.5 mL of each GMSD sample over a microscope slide surface and then air-dried at room temperature for 24 h. The contact angle made by drops of deionized water was determined on a 4 cm<sup>2</sup> film sample using a contact angle analyzer (OCA 20 from Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). The measurements are based on image processing coupled with numerical curve fitting by considering a meridian drop profile as reference. Five measurements were carried out.

### 2.9. Swelling volume

Swelling volume of treated starch samples was estimated by the method by Huang et al. (2007). Dried GMSD samples (0.2 g) were weighed in 20 mL glass centrifuge tubes and added with 10 mL of deionized water. Samples were equilibrated at 25 °C for 30 min and heated at 70 °C for 40 min. Samples were cooled down at 20 °C and centrifuged at 1000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the swelling volume was computed as the gel volume per unit dry weight of sample. Analysis was done in duplicate.

### 2.10. Solubility

Estimates of starch solubility were carried out following the method of Schoch (1964). Dried GMSD samples (0.5 g) were mixed with water (40 mL) and heated at desired temperature specified for 240 min. After centrifugation (3000g) for 15 min, the supernatant was dried (120 °C) for 2 h and the remnant was weighed. The solubility (%) was computed as the weight ratio of dried supernatant to dry starch.

### 2.11. ATR-FTIR spectroscopy

Dried GMSD samples were characterized by ATR-FTIR spectroscopy according to the methodology reported by van Soest, Tournois, de Wit, and Vliegthart (1995). FTIR spectra were recorded on a Perkin Elmer spectrophotometer (Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a crystal diamond universal ATR sampling accessory. Each spectrum represented an average of four scans. All spectra were deconvoluted using techniques described by using Gaussian and Lorentzian functions. In this case, the assumed line shape was Lorentzian with a half-width of 15 cm<sup>-1</sup>. The resolution enhancement factor was chosen as 1.5.

### 2.12. X-ray diffraction (XRD)

XRD patterns were conducted at room temperature conditions for dried samples. To this end, a Siemens D-5000 diffractometer (Karlsruhe, Germany) equipped with Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.543$ ) and secondary beam graphite monochromator was operated at 40 kV and 30 mA. Radiation intensities were measured in the range 10–60° of 2 $\theta$  diffraction angle by using a 0.03 step size and sampling time of 1.0 s per point. The crystallinity content was estimated according to the Hermans-Weidinger method. The diffractograms were smoothed (Savitsky-Golay with polynomial = 2 and points = 15) and baseline-corrected by deflating a straight line with an angle of 7°.

### 2.13. Rheological properties

The viscoelastic properties of the GMSD were estimated with oscillatory tests using a Physica MCR300 rheometer (Physica Messtechnik, GmbH, Stuttgart, Germany). The measurement geometry was a cone-plate in which the rotating cone was 50 mm in diameter, cone angle of 2° and a gap of 0.05 mm.

Measurements were conducted by using about 1.25 mL of the samples, which were placed in the measuring system, and left for resting for 5 min at 25 °C for structure recovery. Flow curves were determined by varying the shear rate in the range from 0.1 to 100 s<sup>-1</sup> in the forward direction, and from 100 to 0.1 s<sup>-1</sup> in the opposite or backward direction. Also, frequency sweeps were conducted for strain values in the range of 0.1–100 Hz at 25 °C. Temperature regulation was achieved with Physica TEK 150P temperature control system. The storage modulus ( $G'$ ) and the loss modulus ( $G''$ ) were computed with the software (US200/32 V2.50) of the equipment. All measurements were made by triplicate.

### 2.14. Thermal analysis

Thermal properties of the GMSD were analyzed by using differential scanning calorimetry (DSC) (TA Instruments, Q2000, New Castle, DE, USA) in order to determine the water-calcium-starch interactions in the boiling point. To this end, dried GMSD samples were weighed (7.0 mg dry basis) in aluminum pans, heated in the DSC cell from 25 to 150 °C by applying a heating rate of 5 °C min<sup>-1</sup>. On other hand, the GMSD were heated in the DSC cell from -25 to 25 °C applying a heating rate of 5 °C min<sup>-1</sup>. An empty pan was used as the reference and all measurements were conducted in triplicate. The DSC analysis provides a profile of injected/extracted heat flow from the analyzed sample as a function of temperature. Enthalpy changes correspond to the integral of the heat flow profile within the onset-endset temperature range.

### 2.15. Acid hydrolysis

Acid hydrolysis tests were adapted from the method reported by Kim, Lee, Kim, Lim, and Lim (2012) with slight modifications. Briefly, dried GMSD samples (1.0 g) were dispersed in an aqueous hydrochloric acid solution (100 mL, 1 M) by stirring and keeping at 50 °C for 5 h. Afterwards, the GMSD were centrifuged (6000g for 15 min) and the precipitates were washed in distilled water until neutral pH was achieved. The precipitated solids were air-dried at about 35 °C for 24 h, and the solid weight of the starch gel hydrolyzates was determined. The degree of hydrolysis (%) was expressed as the percent ratio of the dissolved starch solids based on initial starch solids.

### 2.16. Statistical analyses

The experimental data were analyzed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) with the SPSS Statistics 19.0 package.

## 3. Results and discussion

### 3.1. pH of the GMSD

The pH of the GMSD plays an important role on the effects induced by ecological nixtamalization. Typically, traditional Ca(OH)<sub>2</sub>-based nixtamalization is operated under strong alkaline conditions (~pH of 12.0, 1.0% w/w Ca(OH)<sub>2</sub>). Such levels of pH cannot be achieved with calcium salts because the lack of OH<sup>-1</sup> ions. The pH of GMSD is shown in the first column of Table 1. By considering that the pH of the GMSD obtained by cooking in pure water was about 5.42, the pH achieved by the highest CaCO<sub>3</sub> concentration of 2.0% w/w was only 7.93. This indicates that, in contrast to traditional nixtamalization, the process based on calcium salts is carried out at acidic or nearly neutral conditions.

that maize starch gelatinization is affected by lime cooking as starch solubility, water retention capacity and gelatinization temperature were increased by addition of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in the range from 0 to 0.40–0.50%, with a peak at 0.20%. Thermogravimetric data has been used to study the thermal degradation of maize starch with and without thermo-alkaline treatment, finding that maize starch treated with lime exhibited the highest activation energy values during the whole thermal degradation process which could be related to the physical cross-linking process between starch constituents and Ca-ions (Pineda-Gómez, Rosales-Rivera, & Rodríguez-García, 2012). Contreras-Jiménez, Gaytán-Martínez, Figueroa-Cárdenas, Avalos-Zúñiga, and Morales-Sánchez (2014) showed that steeping time and calcium hydroxide content had significant effects on water absorption and pH of maize grits. Lobato-Calleros et al. (2015) studied lime concentrations between 0.0 and 2.0%, finding that starch swelling, water retention capacity, and gelatinization exhibited a maximum value at or near 0.2% (w/v) lime concentration.

It is apparent that calcium hydroxide affects the maize starch supra-molecular structure along two ways: (1) calcium ions are linked to starch chains to form cross-linked structures that enhance water retention and viscoelasticity (Lobato-Calleros et al., 2015), and (2) hydroxyl ions brake down ramified amylopectin molecules, improving both calcium-ion diffusion and viscoelasticity of the treated maize starch gels (Bryant & Hamaker, 1997). An interesting question is whether starch treatment with calcium salts can produce similar results as those obtained with calcium hydroxide. Findings in this line should provide valuable insights regarding the potential of ecological nixtamalization for obtaining corn flour with the malleability and functionality obtained via the traditional nixtamalization process. Although knowledge has been gained about the effects of calcium salts on the supra-molecular structure of maize starch, the issue requires more specific clarifications. In this regard, the aim of this work was to study the effects of calcium carbonate on the morphology, crystallinity, rheology and hydrolysis of gelatinized maize starch dispersions, and to contrast these results with those reported for  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatment of maize starch granules.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Native maize starch (Nr. S-4126, moisture content <15%, pH 4.8–5.8, amylose content 26.7%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) reagent grade was obtained from J.T. Baker (Xalostoc, Mexico). Deionized water was used for all solutions and experimental runs.

### 2.2. Calcium carbonate treatment

Maize starch (5% w/w) was dispersed in calcium carbonate solutions at different concentrations (0.0%, 0.25%, 0.5%, 1.0% and 2.0% w/w). The dispersions were heated at 92 °C under gently stirring for 25 min for allowing a close interaction between starch chains and calcium ions, and for achieving complete gelatinization of starch granules. In all cases, the pH of the starch dispersion was monitored (Mettler delta340, Columbus, USA). The gelatinized maize starch dispersions (GMSD) were then cooled down to achieve room temperature. The dispersions were coded as GMSD<sub>x</sub>, where the subindex indicates the  $\text{CaCO}_3$  concentration used. A fraction of the GMSD samples was used for analysis (optical microscopy, particle size and rheology) within 15 min of their preparation in order to minimize possible adverse effects caused by starch retrogradation. A second fraction of the GMSD samples

was air-dried at 30 °C for 24 h for analysis requiring dry samples (SEM, swelling volume, solubility, XRD and thermal properties).

### 2.3. Size-exclusion chromatography (SEC)

The effect of the  $\text{CaCO}_3$  treatment on the molecular size distributions of corn starch was assessed with High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) (Shimadzu, Tokyo, Japan). For 10 mL of samples at room temperature, 1 mL of 1.0 M  $\text{NaNO}_3$  was added and subsequently the sample was passed through an 8.0 µm filter. The filtrate was injected into the HPSEC system, which consisted of a LC-10AT pump, RID-10A refractive index detector SIL-10A automatic injector and three Ultrahydrogel columns (linear, two 120) in series connection. 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  was used as mobile phase at flow-rate of 0.3 mL/min. The temperature of the columns and the RI detector was set respectively at 55 °C and 80 °C.

### 2.4. Optical microscopy

The GMSD (1 mL) were mixed with 1.0 mL of iodine and potassium iodide solution (0.3 g of iodine and 7.5 g of potassium iodide in 500 mL of 50% glycerol). The microstructure of the GMSD was assessed with an optical microscope (Olympus BX45, Tokyo, Japan) that was coupled to an image analyzer system (digital Olympus camera C3030 and Image Pro-Plus 4.5 software, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Selected micrographs at 100 × were used for illustration purposes.

### 2.5. SEM microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was performed on the GMSD samples to explore the surface microstructure features. To this end, dried GMSD samples were coated with a thin layer of gold in a Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japan). A high vacuum JEOL Scanning Electron Microscope JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japan), at 20 kV, was used to record each sample at magnification of 2000 ×. Representative SEM micrographs were presented to illustrate the surface features.

### 2.6. Particle size

The volume fraction-length mean diameter ( $d_{v,L}$ ) of the GMSD was estimated by means of laser diffraction method by using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). A Hydro wet was used as disperser unit. In all cases, samples of GMSD (0.25 mL) were mixed with 0.5 mL of distilled water, and the obtained mixture was homogenized under gently stirring conditions. An obscuration of 5–10% was considered for all measurements.

### 2.7. Syneresis

Syneresis was determined after 24 h of the GMSD preparation. To this end, GMSD samples (14 g) were placed in calibrated test-tubes and subsequently centrifuged at 222g for 3 min at room temperature (~20 °C). The clear supernatant was poured off and weighed. The results were expressed as a syneresis %, obtained as follows: (leached out water weight from the GMSD aged 24 h/ initial water weight content in GMSD) × 100.

### 2.8. Contact angle

The sessile drop method is an optical angle approach that is commonly considered to estimate wetting properties of solid surfaces. To this end, the testing surfaces were obtained by pouring

by the authors that proposed the use of calcium salts for maize nixtamalization (Santiago-Ramos et al., 2015b).

#### 4. Conclusions

The results in this work provided a detailed view of the effects of  $\text{CaCO}_3$  treatment on the morphology, viscoelasticity, crystallinity and degradability of maize starch gels. Differences with the traditional nixtamalization process based on  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , the differences are noticeable mainly on the morphology of insoluble remnants (i.e., ghosts), viscoelasticity and acidic degradability. While the effectiveness of calcium ions can be equated by fixing the concentration of calcium carrier, the differences can be delineated from the effects of the accompanying anion. In the traditional  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -based treatment, the hydroxyl groups can undergo breaking of starch chains at hydrogen bonds, leading to important changes in viscoelasticity properties. In contrast, the  $\text{CaCO}_3$ -mediated treatment involves carbonate anions, which are more likely to form carbonate acid in the free water domains. Surely, as already proposed by Santiago-Ramos et al. (2015b), suitable combinations of alkaline and salt carriers of calcium should provide a trade-off between negative ecological impacts and desirable effects on viscoelasticity and digestibility.

#### Conflict of interest

No conflict of interest is declared by the authors.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.095>.

#### References

- Ahmad, F. B., & Williams, P. A. (1999). Effect of salts on the gelatinization and rheological properties of sago starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3359–3366.
- Amelia, L., & BeMiller, J. N. (2009). Preparation of nonfragmented, completely amorphous, pregelatinized maize starches and determination of the effects of fragmentation on the adhesiveness of their pastes. *Starch/Stärke*, 61, 677–734.
- Beck, M., Jekle, M., & Becker, T. (2011). Starch re-crystallization kinetics as a function of various cations. *Starch/Stärke*, 63, 792–800.
- Bello-Pérez, L. A., Flores-Silva, P. C., Agama-Acevedo, E., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., López-Valenzuela, J. A., & Campanella, O. H. (2014). Effect of the nixtamalization with calcium carbonate on the indigestible carbohydrate content and starch digestibility of maize tortilla. *Journal of Cereal Science*, 60, 421–425.
- BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (Eds.). (2009). *Starch: Chemistry and technology*. New York: Academic Press.
- Bryant, C. M., & Hamaker, B. R. (1997). Effect of lime on gelatinization of maize flour and starch. *Cereal Chemistry*, 74, 171–175.
- Campechano-Carrera, E. M., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Arámbula-Villa, G., Martínez-Flores, H. E., Jiménez-Sandoval, S. J., Bárcenas, L., & Gabriel, J. (2012). New ecological nixtamalization process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole maize flour and wastewater effluents. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 564–571.
- Contreras-Jiménez, B., Gaytán-Martínez, M., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Avalos-Zúñiga, R., & Morales-Sánchez, E. (2014). Effect of steeping time and calcium hydroxide concentration on the water absorption and pasting profile of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 122, 72–77.
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2007). Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4752–4760.
- Fernández-Muñoz, J. L., Rojas-Molina, I., González-Dávalos, M. L., Leal, M., Valtierra, M. E., Martín-Martínez, E. S., & Rodríguez, M. E. (2004). Study of calcium ion diffusion in components of maize kernels during traditional nixtamalization process. *Cereal Chemistry*, 81, 65–69.
- French, D., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Paschall, E. F. (1984). *Starch: Chemistry and technology* (3rd ed.). New York: Academic Press.
- Huang, J., Schols, H. A., van Soest, J. J., Jin, Z., Sulmann, E., & Voragen, A. G. (2007). Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. *Food Chemistry*, 101, 1338–1345.
- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). *Unit operations in food engineering*. Boca Raton: CRC Press (Chapter 6).
- Jane, J. L., Kasemwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, 46, 121–128.
- Kim, H. Y., Lee, J. H., Kim, J. Y., Lim, W. J., & Lim, S. T. (2012). Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch/Stärke*, 64, 367–373.
- Lobato-Calleros, C., Hernandez-Jaimes, C., Chavez-Esquivel, G., Meraz, M., Sosa, E., Lara, V. H., ... Alvarez-Ramirez, J. (2015). Effect of lime concentration on gelatinized maize starch dispersions properties. *Food Chemistry*, 172, 353–360.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. Boca Raton: CRC Press (Chapter 8).
- Méndez-Montealvo, G., García-Suárez, F. J., Paredes-López, O., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. *Journal of Cereal Science*, 48, 420–425.
- Oosten, B. J. (1982). Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. *Starch/Stärke*, 34, 233–239.
- Pineda-Gómez, P., Rosales-Rivera, A., & Rodríguez-García, M. E. (2012). Effect of the thermo-alkaline treatment over the thermal degradation of maize starch. *Starch/Stärke*, 64, 776–785.
- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2007). A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*, 67, 511–529.
- Rodríguez-Martínez, N. A., Salazar-García, M. G., Ramírez-Wong, B., Islas-Rubio, A. R., Platt-Lucero, L. C., Morales-Rosas, L., ... Marquez-Melendez, R. (2015). Effect of malting and nixtamalization processes on the physicochemical properties of instant extruded maize flour and tortilla quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 275–280.
- Rosentrater, K. A. (2006). A review of maize masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management*, 26, 284–292.
- Salazar, R., Arámbula-Villa, G., Luna-Bárcenas, G., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Azuara, E., & Vázquez-Landaverde, P. A. (2014). Effect of added calcium hydroxide during maize nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. *LWT – Food Science and Technology*, 56, 87–92.
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Vélez-Medina, J. J., Mariscal-Moreno, R. M., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., ... Gaytán-Martínez, M. (2015a). Resistant starch formation in tortillas from an ecological nixtamalization process. *Cereal Chemistry*, 92, 185–192.
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Vélez-Medina, J. J., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Gaytán-Martínez, M., & Morales-Sánchez, E. (2015b). Effects of annealing and concentration of calcium salts on thermal and rheological properties of maize starch during an ecological nixtamalization process. *Cereal Chemistry*, 92, 475–480.
- Schoch, T. J. (1964). Swelling power and solubility of granular starches. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 4, 106–108.
- Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2002). Organization of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 79–85.
- Tako, M., Tamaki, Y., Teruya, T., & Takeda, Y. (2014). The principles of starch gelatinization and retrogradation. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 280–291.
- van Soest, J. J., Tournois, H., de Wit, D., & Vliegthart, J. F. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 279, 201–214.
- Whistler, R. L., & BeMiller, J. N. (1957). Alkaline degradation of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 13, 289–329.
- Wu, H., Ran, X. H., & Zhang, K. Y. (2006). FTIR study on retrogradation behaviour of crosslinked starch. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 27, 775–778.
- Yahuaca-Juárez, B., de Dios Ortiz-Alvarado, J., Martínez-Flores, H. E., Pless, R. C., Vázquez-Landaverde, P. A., Bello-Pérez, L. A., & Huerta-Ruelas, J. A. (2013). Laser light scattering system used to evaluate the effect of calcium hydroxide on the properties of amylopectin. *Food Analytical Methods*, 6, 1188–1195.
- Zhang, B., Dhital, S., Flanagan, B. M., & Gidley, M. J. (2014). Mechanism for starch granule ghost formation deduced from structural and enzyme digestion properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62, 760–771.
- Zhu, W. X., Gayin, J., Chatel, F., Dewettinck, K., & Van Der Meeren, P. (2009). Influence of electrolytes on the heat-induced swelling of aqueous dispersions of native wheat starch granules. *Food Hydrocolloids*, 23, 2204–2211.

# A novel, simple, economic and effective method for retarding maize tortilla staling

Jose Alvarez-Ramirez,<sup>a\*</sup> Samuel Garcia-Diaz,<sup>b</sup> Eduardo Jaime Vernon-Carter<sup>a</sup> and Luis Arturo Bello-Perez<sup>c</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** Staling of maize tortillas is a major drawback affecting their manufacture, commercialization and consumption. The development of methods that may help retard staling of maize tortillas is an ongoing research topic. In this work, a novel, simple, economic and effective method is proposed, based on adding completely gelatinized nixtamalized maize flour (GMF) dispersion to the basic masa formulation recipe (water, 600 g kg<sup>-1</sup>; nixtamalized maize flour, 400 g kg<sup>-1</sup>) in substitution of 50, 100 and 150 g kg<sup>-1</sup> of water.

**RESULTS:** Masa added with GMF showed increased water retention capacity, reduced freezable water content and improved flow and dynamic rheological properties and produced tortillas with decreased firmness. The infrared 1047/1022 cm<sup>-1</sup> spectral ratio indicated that a more disordered starch granule arrangement was formed, while enthalpy peaks associated with starch retrogradation decreased. All the above indicators were more pronounced the higher was the GMF content.

**CONCLUSION:** This work showed that GMF can play the role of a self-hydrocolloid anti-staling agent by retarding the retrogradation of maize starch and deterring the loss of water and rheological properties of masa and the increase in undesirable sensory characteristics of tortilla such as increased firmness.

© 2018 Society of Chemical Industry

**Keywords:** nixtamalized maize flour; gelatinized maize dispersion; masa; tortillas; staling

## INTRODUCTION

Staling is a major problem for commercialization and consumption of corn tortillas. Decrease in pliability and rollability and increase in firmness are negative textural aspects accompanying the staling process of corn tortilla.<sup>1–3</sup> Like bread, staling of corn tortilla is a complex process that requires accurate understanding to improve the product and to reduce the economic effect. Systematic studies have been undertaken to clarify the main mechanisms involved in staling of corn tortillas. Increase in firmness during staling is commonly attributed to recrystallization of starch chains and their redistribution, as well as loss of moisture. Staling has been linked to rapid associations of amylose and amylopectin chains, yielding insoluble structures in corn tortillas.<sup>4</sup> The stiffness value from stress relaxation tests reflects closely the staling process of corn tortilla,<sup>5</sup> and maximum nucleation rate of starch chains at a temperature of 12.3 °C has been reported.<sup>6</sup> The increased content of resistant starch due to retrogradation can also contribute to the increase in firmness of tortilla.<sup>2,7</sup> During refrigerated (3–10 °C) storage, tortillas become stiff faster.<sup>8</sup>

The loss of desired textural properties has motivated the design of methods to reduce staling in corn tortilla. The most recurrent approach consists in the incorporation of hydrocolloids. The rationale behind the use of hydrocolloids as anti-staling agents is that these components have the ability to form robust 3D networks with good water-holding capacity. In this way, aggregation and recrystallization of starch chains are retarded, extending the shelf stability of cereal-based food products. Friend *et al.*<sup>9</sup> explored

blends of wheat flour with commercial hydrocolloids, finding that carboxymethyl cellulose (CMC) extended the textural stability for longer times. Yeggy<sup>10</sup> explored the effects of adding commercial hydrocolloids and proteins on tortilla staling, finding that only CMC yielded improved texture during storage. Bueso *et al.*<sup>11</sup> found that combinations of maltogenic amylase with CMC slowed the staling process. Román-Brito *et al.*<sup>3</sup> reported that the addition of xanthan gum decreased the hardness and increased the flexibility and rubbery characteristics of tortillas.

Although commercial hydrocolloids have proved to be a good alternative for retarding corn tortilla staling, their use presents some drawbacks. Commercial hydrocolloids (e.g. CMC, xanthan gum, etc.) can alter the sensory properties of corn tortilla, reducing consumer acceptability (Mier R, <http://gourmetdemexico.com.mx/>). On the other hand, the increasing costs of commercial hydrocolloids limit their use in struggling regional economies.

\* Correspondence to: J Alvarez-Ramirez, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico. E-mail: jjar@xanum.uam.mx

a Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

b Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

c CEPROBI, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, Mexico

Corn tortilla is the main staple food in Mexico and in many countries of Central America. Its consumption in these countries is closely related to impoverished and low-profile populations, so marginal cost variations might have a large effect on commercialization and consumption.<sup>12</sup> Tortilla markets have flourished in the USA in the last few years, becoming the fastest-growing segment within the baking industry. This situation, coupled to the increasing demand for additive-free food products and specialties, imposes limitations on the use of hydrocolloids in food matrices (Day B, <http://www.foodbusinessnews.net>). Thus there is motivation for the search for alternatives to reduce the adverse effects of staling in food products based on corn flour (e.g. tortillas and tamales).

In the industrial nixtamalization process, corn grains are cooked in water containing lime at 80–90 °C for 30–45 min depending on maize endosperm type. The cooked grains are then steeped for 12–16 h to permit annealing of the starch granules, rinsed to remove excess lime and other impurities and milled to obtain masa (dough). The masa is then dehydrated using a flash-type dryer, re-milled with a hammer mill, sifted, classified and packaged as nixtamalized maize flour (NMF).<sup>13</sup> During this process, only relatively small amounts of starch granules are gelatinized,<sup>14</sup> and most gelatinization is due to friction at grinding, which also disperses partially swollen granules into the matrix that acts as a glue, holding the dough particles. Overcooking produces sticky dough difficult to handle, while undercooking generates non-cohesive dough that produces tortillas of poor texture.<sup>15</sup>

The aim of this work was to evaluate the effects of adding different levels of gelatinized nixtamalized maize flour (GMF) dispersion to masa made from commercial NMF on several physicochemical parameters and indicators associated with the staling of maize tortillas. It is hypothesized that the GMF, composed of an amylose-rich continuous matrix conferring viscous properties and an amylopectin-rich fraction of insoluble remnants (ghosts) having high elasticity, is cross-linked to the NMF starch molecules in the masa by calcium ions, enhancing the water retention capability of the masa<sup>16</sup> and consequently retarding tortilla staling.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Commercial NMF (product #0, free from additives, mean particle size 0.150–0.355 mm, pH 6.0–7.0) purchased from Maseca, SAB de CV (Monterrey, Mexico) was used for all masa and tortilla formulations. According to the manufacturer, the average composition of the NMF is as follows: 750 g starch, 10 g sugars, 80 g proteins, 40 g lipids and 100 g moisture kg<sup>-1</sup>, with an amylose/amylopectin ratio of 3.76. Deionized water was used in all experiments.

### Preparation of masa and tortilla variations

The components of the basic recipe for masa were water (600 g kg<sup>-1</sup>) and NMF (400 g kg<sup>-1</sup>).<sup>17</sup> The mixture (0.2 kg) was mixed and kneaded for 5 min with the help of a Costway Tilt-head Stand Mixer (Ontario, CA, USA) equipped with a dough hook at speed level 3. Masa variations were prepared by adding a 50, 100 or 150 g kg<sup>-1</sup> GMF dispersion made from NMF in substitution of water in the basic masa recipe. GMF (70 g kg<sup>-1</sup>) was prepared by dispersing the appropriate amount of NMF in water and heating at 92 °C for 40 min to achieve complete gelatinization of the starch fraction. Subsequently, the gelatinized dispersion was allowed to cool to room temperature (~20 °C) for 1 h. Then the GMF was

incorporated into the NMF and water blend, mixed and kneaded as described above. To avoid dehydration, the masa variations were left to rest for no more than 2 min in the bowl before the experiments. Masa formulations were coded as M<sub>0</sub> for the basic recipe (without GMF added) and M<sub>5</sub>, M<sub>10</sub> and M<sub>15</sub> for masa containing 50, 100 and 150 g kg<sup>-1</sup> of GMF respectively. Addition of higher amounts of GMF was unfeasible because a sticky masa was obtained, making its handling difficult.

The preparation of tortillas was done by forming 0.030 ± 0.001 kg spheres and pressing with a traditional wood-made hand tortilla press. The masa was protected by two sheets of plastic wrap to avoid it sticking to the press. The resulting tortillas were 0.140 ± 0.005 m in diameter and 0.0015–0.0020 m thick. The tortillas were cooked on a cast iron skillet (Model C-MAG HS, IKA, Mexico City, Mexico) heated to 350 °C for 45 s, flipped and cooked until the tortilla began to puff (~10 s). Tortillas were allowed to cool under lab conditions (~20 °C, 45% relative humidity) for 10 min prior to being individually packaged in plastic wraps. Finally, tortillas were stored for 4 days at 4 °C. Tortillas were coded as T<sub>0</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub> or T<sub>15</sub> depending on the masa variation used for their preparation. Their physicochemical properties were monitored daily during the storage period.

### Moisture content

The moisture content of masa and tortilla samples was determined by vacuum oven drying (AOAC method 930.15).<sup>18</sup> Pre-weighed samples were placed over silica gel overnight and then vacuum oven dried at 60 °C for 24 h. The final weight was determined and the moisture content estimated from the weight loss. Experiments were done in triplicate.

### Water retention capacity

AACC method 56-11.02<sup>19</sup> was implemented to determine the water retention capacity (WRC) of flour under a centrifugal force of 1000 × g. The sample (5 g) was mixed with an excess of water (0.025 L) and then centrifuged at 1000 × g for 15 min. The supernatant was decanted, the tube was weighed and the absorbed water was calculated by difference (sediment weight minus sample weight). Experiments were done in triplicate.

### Oil contact angle

The contact angle of 10 μL canola oil droplets at different locations on the tortilla surface at 25 °C was estimated using a contact angle analyzer (OCA 20, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). The measurements were based on image processing coupled with numerical curve fitting by considering a meridian drop profile as reference.<sup>20</sup> Experiments were done in quintuplicate.

### Differential scanning calorimetry (DSC) analysis

Samples (7 × 10<sup>-6</sup> kg) of the masa variations (without being subjected to any kind of conditioning) were placed in a hermetically sealed aluminum pan and analyzed with a DSC Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples were heated at 5 °C min<sup>-1</sup> from -30 to 200 °C. All runs were made in duplicate. The freezable water (FW) content was estimated from the endothermic melting peak around 0 °C corresponding to ice melting. To this end, the following equation was used:

$$FW = \left[ \frac{H_p}{H_f} (H_f \times MC_s) \right] \times 100 \quad (1)$$

where  $H_p$  is the peak enthalpy,  $H_f$  is the latent heat of fusion of ice and  $MC_s$  is the moisture content of the sample. On the other hand, it will be shown that the kinetics of the retrogradation enthalpy presents an exponential-like behavior. In this regard, a proxy of the staling rate was estimated by fitting the experimental data to first-order kinetics of the form

$$d\Delta H_r/dt = k_r (\Delta H_{r,\infty} - \Delta H_r) \quad (2)$$

where  $\Delta H_{r,\infty}$  is the limiting (i.e. for long storage times) retrogradation enthalpy and  $k_r$  is the retrogradation rate constant.

#### Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

The FTIR spectra of tortilla samples were obtained using a Spectrum 100 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a crystal diamond universal attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory and mirror velocity of  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$ . Samples of the tortilla variations were stored in plastic bags at  $4^\circ\text{C}$  (without additional manipulation or preparation) until required for analysis. During measurements, the sample was in contact with the universal diamond ATR top-plate. A spectrum of the empty cell was used to correct for background effects. For each sample, the spectrum represented an average of three scans with a resolution of  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Also, spectra were baseline corrected at  $1200\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$  by drawing a straight line below the recorded signal. In this case, the assumed line shape was Lorentzian with a half-width of  $15 \text{ cm}^{-1}$ .

#### Rheological properties

Flow and oscillatory measurements were carried out using a Physica MCR 300 rheometer (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany) with a parallel-plate geometry ( $0.05 \text{ m}$  plate diameter). The upper serrated plate was lowered until the thickness of the sample was adjusted to a gap of  $0.005 \text{ m}$ . The masa sample ( $\sim 0.005 \text{ kg}$ ) was carefully placed in the measuring system and left to rest for  $5 \text{ min}$  at  $25^\circ\text{C}$  for structure recovery. The edges of the cone plate measuring system were surrounded with mineral oil in order to hinder sample dehydration. Temperature maintenance was achieved with a Physica TEK 150P temperature control and measurement system. Flow curves were obtained by varying the shear rate from  $0.01$  to  $100 \text{ s}^{-1}$  and measuring the corresponding shear stress and apparent viscosity values. Three measurement runs were conducted for each sample. Experimental results of apparent viscosity ( $\eta_{\text{eff}}$ ) were described by a power-law model given by

$$\eta_{\text{eff}} = K_n \dot{\gamma}^{n-1} \quad (3)$$

where  $\dot{\gamma}$  is the shear rate ( $\text{s}^{-1}$ ),  $n$  is the flow behavior index and  $K_n$  is the flow viscosity index ( $\text{Pa s}^n$ ). It is noted that  $n < 1$  corresponds to shear-thinning behavior,  $n = 1$  to a Newtonian fluid and  $n > 1$  to shear-thickening behavior. Amplitude sweeps were carried out in the range  $0.01\text{--}100\%$  at  $1 \text{ rad s}^{-1}$ . The storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) were obtained from the equipment software (US200/32 V2.50) in all cases for the shear rate range from  $0.1$  to  $10 \text{ s}^{-1}$ .

#### Tortilla firmness

Firmness is considered the most relevant textural characteristic associated with tortilla staling<sup>27</sup> and was determined using a Brookfield CT3-4500 texturometer (AMETEK Brookfield, Middleborough, MA, USA) equipped with a TA18 spherical probe (diameter  $0.0127 \text{ m}$ ). A tortilla variation sample (a whole tortilla) was

placed on the texturometer bottom plate having a square pierced hole ( $0.0254 \text{ m}$  diameter). The tortilla sample was compressed at rate of  $0.002 \text{ m s}^{-1}$  until  $0.004 \text{ m}$  penetration was achieved using one compression cycle. Firmness values were provided by the equipment software. Three measurements were carried out for each tortilla variation.

#### Data analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and subjected to analysis of variance using Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., Cambridge, MA, USA). When pertinent, significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among means were detected by Tukey's test.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Moisture content of masa variations

All masa variations were made with the same relative amount of water ( $592.9 \pm 4.3 \text{ g kg}^{-1}$ ) and flour ( $407.1 \pm 4.3 \text{ g kg}^{-1}$ ). During the process of masa mixing, some water can be lost through evaporation (Table 1). The moisture content (MC) of  $M_0$  was  $609.3 \text{ g kg}^{-1}$ , while that of  $M_{15}$  was  $596.5 \text{ g kg}^{-1}$ . These moisture differences remained unchanged throughout the storage period preceding the tortilla cooking.

### Water retention capacity of masa variations

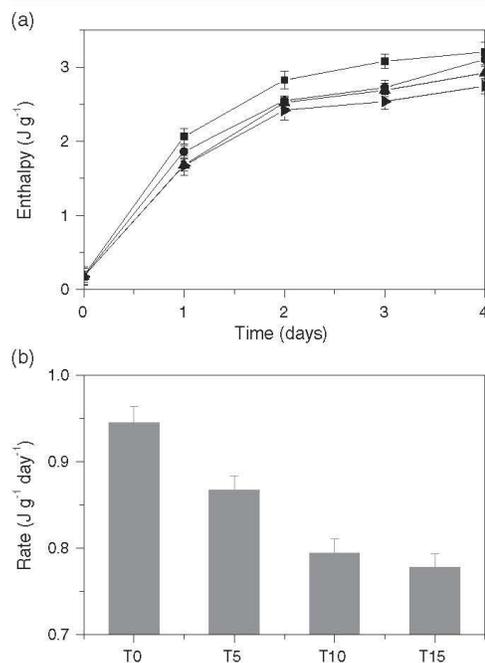
The second column of Table 1 presents the WRC of masa variations as a function of GMF content. The estimated value for  $M_0$  is in line with that previously reported for nixtamalized corn flour #0 Maseca flour free of additives.<sup>21</sup> The addition of GMF increased the WRC, with an increase of about 12% for  $M_{15}$ . This increase reflects the ability of GMF to retain water, probably because the OH groups of glucose units present in starch chains are more exposed and available to join water molecules by hydrogen bridges. In general, starch gels exhibit mild WRC as compared with e.g. alginate-based hydrogels. However, in this case, the nixtamalization process incorporated calcium ions into the NMF, leading to cross-linking of starch chains.<sup>16</sup> A beneficial effect of cross-linking is the formation of more stable hydrocolloids with enhanced capacity to retain water. In this regard, the results shown in Table 1 are in line with the report by Sukhija *et al.*<sup>22</sup> showing that cross-linking of starch chains improves the water retention capacity of starch-based hydrocolloids.

**Table 1.** Properties of maize masa with gelatinized nixtamalized maize flour

Sample <sup>a</sup>	Moisture content ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Water retention capacity ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Freezable water ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Un-freezable water ( $\text{g kg}^{-1}$ )
$M_0$	$609.3 \pm 8.2a$	$1.78 \pm 0.08c$	$462.9 \pm 7.5a$	$146.4 \pm 4.1c$
$M_5$	$605.6 \pm 7.7a$	$1.90 \pm 0.07b$	$403.5 \pm 8.6b$	$197.9 \pm 3.7b$
$M_{10}$	$601.2 \pm 7.9a$	$1.92 \pm 0.08b$	$391.8 \pm 7.8b$	$205.1 \pm 4.3b$
$M_{15}$	$596.5 \pm 8.5a$	$1.98 \pm 0.08a$	$359.3 \pm 7.3c$	$232.2 \pm 4.7a$

Values are mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. Means with different letters in the same column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>a</sup> The subscript number denotes the amount (% w/w) of gelatinized maize flour added to the masa formulation.



**Figure 6.** (a) Enthalpy as estimated from DSC analysis (■, T<sub>0</sub>; ●, T<sub>5</sub>; ▲, T<sub>10</sub>; ▴, T<sub>15</sub>). (b) Rate of change of staling enthalpy.

#### DSC analysis

The DSC patterns (data not shown) of tortillas at different storage times showed an endothermic peak at ~60 °C, which is characteristic of the fusion of retrograded amylopectin.<sup>17</sup> Staling of tortillas is linked to retrogradation of starch components, whereby a crystalline structure is produced upon storage that increases with time, but with imperfect and small crystallites that are disorganized at lower temperature than their native starch counterpart.<sup>43,44</sup> In this way, the amount of retrograded starch provides an index of tortilla staling. In turn, the enthalpy of the peak at ~60 °C can be considered as an indication of tortilla staling. Figure 6(a) presents the kinetics of the enthalpy estimated at the ~60 °C peak. The enthalpy shows a monotonic increasing behavior, with T<sub>0</sub> presenting the higher increase. The incorporation of GMF reduced the increase in enthalpy, suggesting that the GMF retarded the reorganization of starch components. In fact, the higher the GMF content, the smaller was the enthalpy increase and hence the tortilla staling extent. The first-order kinetics model given by Eqn (2) was used for fitting experimental data of enthalpy. Figure 6(b) presents the rate constant (estimated by least-squares fitting) for the different tortilla variations. As expected from the data in Fig. 6(a), the higher the GMF content, the smaller was the retrogradation rate constant.

#### Firmness of tortilla variations

The evolution of firmness of the tortilla variations is described in Table 2. Firmness is the most palpable sensory feature indicating tortilla staling. The addition of GMF decreased firmness of fresh

**Table 2.** Evolution of firmness of different tortilla variations

Time (days)	Firmness (N)			
	T <sub>0</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>15</sub>
0	2.12 ± 0.07d	1.73 ± 0.11d	1.73 ± 0.11d	1.56 ± 0.13c
1	3.51 ± 0.27bc	3.29 ± 0.25c	3.29 ± 0.25c	2.31 ± 0.24b
2	3.88 ± 0.27ab	3.79 ± 0.24b	3.79 ± 0.24b	2.78 ± 0.31a
3	4.17 ± 0.19a	3.81 ± 0.18ab	3.81 ± 0.18ab	2.78 ± 0.35a
4	4.13 ± 0.23a	3.93 ± 0.29a	3.93 ± 0.29a	2.91 ± 0.24a

Values are mean ± standard deviation of three replicates. Means with different letters in the same column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

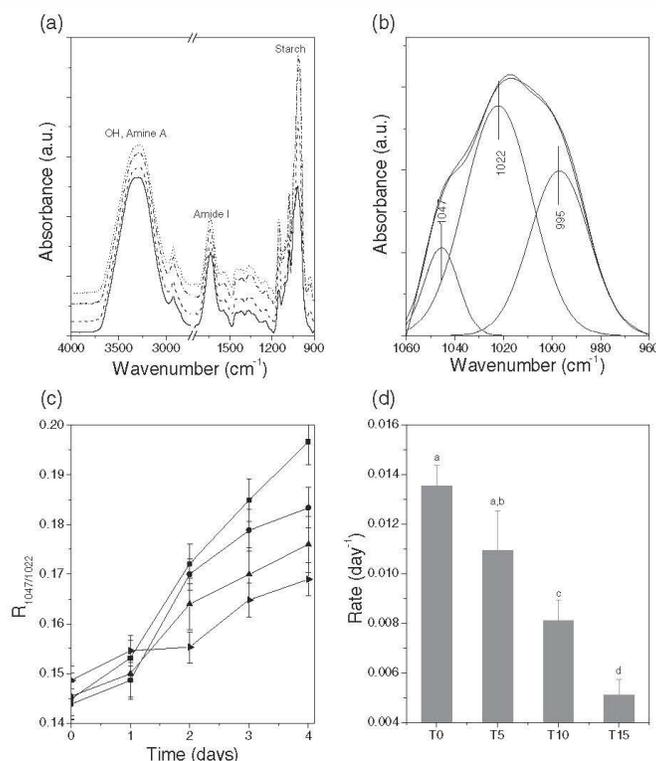
tortillas. In fact, firmness was ~2.12 N for fresh T<sub>0</sub> and decreased to ~1.56 N for T<sub>15</sub>. Firmness reduction was induced by GMF, which led to a more compact microstructure, probably because the GMF acted as a plasticizer that stabilized the tortilla microstructure. On the other hand, retrogradation of starch components and water loss lead to an increase in tortilla firmness, a salient feature of staling. Firmness of T<sub>0</sub> increased from ~2.12 to ~4.13 N in 4 days. The incorporation of GMF reduced the increase in firmness. For instance, firmness of T<sub>15</sub> increased from ~1.56 to ~2.91 N in the same period, an effect that can be ascribed to the formation of a more compact 3D network.

#### CONCLUSIONS

Staling of maize tortillas is a major drawback that affects their commercialization and consumption. Firmness of tortillas increases as a consequence of retrogradation of starch chains, giving them a hard unpleasant texture. Although anti-staling agents have proven to be effective, their use is limited by economics, adverse sensory attributes and consumer preference for additive-free products. This work showed that GMF can play the role of an anti-staling agent by retarding the increase in firmness (the most palpable adverse sensory characteristic) and the loss of rheological properties, through the increased WRC of the masa due to GMF addition. The proposed methodology is novel in that it uses GMF as a self-hydrocolloid, instead of foreign anti-staling agents (e.g. gums) which are more expensive. The optimal fraction of GMF to obtain acceptable anti-staling effects while maintaining the cost increase at a minimum is an issue that should be evaluated.

#### REFERENCES

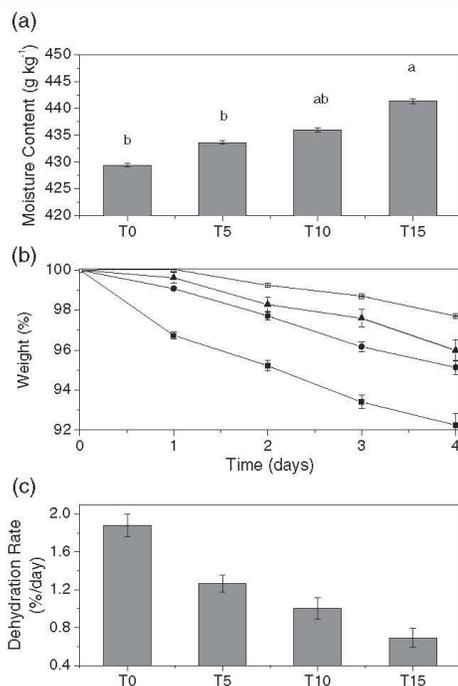
- Suhendro EL, Almeida-Dominguez HD, Rooney LW and Waniska RD. Objective rollability method for corn tortilla texture measurement. *Cereal Chem* **75**:320–324 (1998).
- Campos-Baypoli ON, Rosas-Burgos EC, Torres-Chávez PI, Ramirez-Wong B and Serna-Saldívar SO. Physicochemical changes of starch in maize tortillas during storage at room and refrigeration temperatures. *Starch/Stärke* **54**:358–363 (2002).
- Román-Brito JA, Agama-Acevedo E, Méndez-Montealvo G and Bello-Pérez LA. Textural studies of stored corn tortillas with added xanthan gum. *Cereal Chem* **84**:502–505 (2007).
- Fernandez DA, Waniska RD and Rooney LW. Changes in starch properties of corn tortillas during storage. *Starch/Stärke* **51**:136–140 (1999).
- Limanond B, Castell-Perez ME and Moreira RG. Modeling the kinetics of corn tortilla staling using stress relaxation data. *J Food Eng* **53**:237–247 (2002).
- Limanond B, Castell-Perez ME and Moreira RG. Quantifying texture changes in corn tortillas due to staling. *J Texture Stud* **33**:35–44 (2002).



**Figure 5.** FTIR spectra for tortilla formulations (—, T<sub>0</sub>; - - -, T<sub>5</sub>; ·····, T<sub>10</sub>; ·······, T<sub>15</sub>). (b) Example of carbohydrate fingerprint deconvolution. (c) FTIR ratio 1047/1022 as function of staling time (■, T<sub>0</sub>; ●, T<sub>5</sub>; ▲, T<sub>10</sub>; ▴, T<sub>15</sub>). (d) Rate of change of short-range crystallinity.

proteins.<sup>35</sup> These peaks are slightly attenuated for tortillas containing GMF, as the water is entrapped in the entangled network formed by the gelatinized starch chains. Flores-Morales *et al.*<sup>36</sup> and Chen *et al.*<sup>37</sup> have suggested that the peak at ~2915 cm<sup>-1</sup> is related to CH stretching and can be attributed to free fatty acids and amylose–fatty acid inclusion complexes. NMF contains ~4% of lipids, which can form amylose–lipid inclusion complexes during the cooking step. The broad band at 1700–1600 cm<sup>-1</sup> with a large peak at ~1640 cm<sup>-1</sup> corresponds to C=O stretching and is linked to the amide I group of maize proteins.<sup>36</sup> Finally, the broad band at ~1080–950 cm<sup>-1</sup> arises from C–O, C–C and C–H stretching and C–O–H bending vibrations<sup>38,39</sup> and is related to carbohydrates, mainly starch in the case of tortillas. In fact, this band is a fingerprint of starch structure.<sup>40</sup> Some authors have indicated that the ratio 1047/1022 is a useful indicator of ordered structures in starch.<sup>38,40,41</sup> It was found that the band close to 1022 cm<sup>-1</sup> increased in more amorphous samples, while the bands close to 1000 and 1047 cm<sup>-1</sup> become more prominent in more crystalline samples. Motivated by these findings, the band ratio at 1047/1022 cm<sup>-1</sup> is commonly adopted as a measure of short-range ordered molecular structures in starch. To estimate this ratio, the FTIR spectrum was deconvoluted with three Gaussian functions (Fig. 5(b)) and the ratio of areas corresponding to the

peaks nearest to 1022 and 1047 cm<sup>-1</sup> was computed. Figure 5(c) shows the variation in the ratio 1047/1022 cm<sup>-1</sup> with respect to storage time as function of the content of GMF. The increase in the ratio 1047/1022 cm<sup>-1</sup> reflects the recrystallization of starch chains, mainly amylose, promoted by the loss of water.<sup>42</sup> On the first day, a clear order of the FTIR ratio with respect to the content of GMF was observed. However, in subsequent days, the ratio was smaller for higher GMF contents, reflecting the disorganization of the starch granules induced by the incorporation of a gelatinized fraction. Upon gelatinization, new hydrogen bonds are formed with water molecules with double-helix structures, leading to a reduction in free water.<sup>42</sup> In this way, the results in Fig. 5(c) suggest that the incorporation of GMF improves the retention of water in the masa microstructure. It is noted that the increase in the ratio 1047/1022 with respect to time can be described by zero-order kinetics. Experimental data in Fig. 5(c) were fitted with a linear function with the slope corresponding to the rate of increase in the ratio 1047/1022. Figure 5(d) presents the behavior of this rate of ratio increase with respect to the content of GMF. The results showed that the rate, which reflects the speed of starch retrogradation, decreased with increasing content of GMF. In turn, this decrease in the retrogradation rate indicates the effectiveness of adding a GMF fraction to reduce the adverse effects of staling in tortillas.



**Figure 2.** (a) Moisture content of tortilla formulations. Different letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ). (b) Tortilla weight as function of staling time (■, T<sub>0</sub>; ●, T<sub>5</sub>; ▲, T<sub>10</sub>; □, T<sub>15</sub>). (c) Dehydration rate for different tortilla formulations.

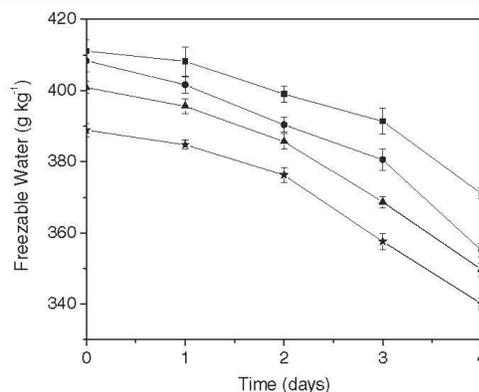
time. The weight decrease due to water loss under room conditions is presented in Fig. 2(b). The weight loss kinetics followed a linear pattern, meaning that water evaporation during the first 4 days followed zero-order kinetics. After 4 days, tortilla without GMF (T<sub>0</sub>) lost ~8% of the initial weight, while T<sub>15</sub> lost only ~2%. The dehydration rate (i.e. the slope of the dehydration kinetics) displayed in Fig. 2(c) shows that T<sub>0</sub> was dehydrated at a rate four times faster than T<sub>15</sub>.

#### Freezable water of tortilla variations

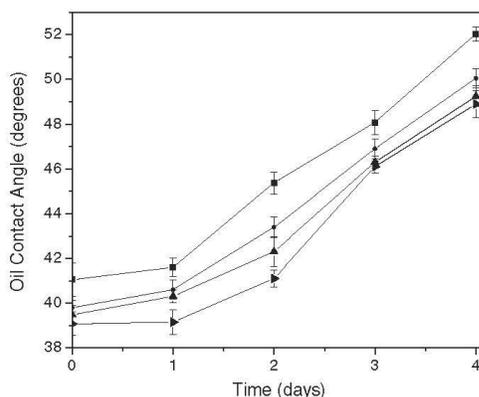
Figure 3 presents the behavior of the freezable water content with storage time. For fresh tortillas, the freezable water content was higher for T<sub>0</sub> and decreased as the content of GMF increased. This result pinpoints that the incorporation of GMF promoted the binding of water molecules with storage time. In turn, this led to a reduction in free water molecules available for evaporation and syneresis effects. However, the decaying of freezable water was higher for tortillas containing higher GMF fraction. The nature of this effect is not clear to us, but it can be attributed to the formation of stronger 3D networks induced by the gelatinized fraction of the maize flour.

#### Oil contact angle

The contact angle of liquid water with the tortilla surface cannot be measured, because tortilla is highly hydrophilic and the deposited



**Figure 3.** Freezable water as function of staling time (■, T<sub>0</sub>; ●, T<sub>5</sub>; ▲, T<sub>10</sub>; ★, T<sub>15</sub>).



**Figure 4.** Oil contact angle of tortilla surface as function of staling time (■, T<sub>0</sub>; ●, T<sub>5</sub>; ▲, T<sub>10</sub>; ►, T<sub>15</sub>).

droplet is completely absorbed. Instead, the contact angle of canola oil was used to estimate the hydrophilic nature of the tortilla surface. An increasing oil contact angle indicates that the surface is becoming less hydrophilic,<sup>20</sup> caused by the loss of free water. In this way, the oil contact angle can be also taken as a proxy of the staling of tortillas. Figure 4 presents the change in the oil contact angle with storage time. For all storage times, the contact angle of tortillas containing GMF was smaller than the contact angle of T<sub>0</sub>. Besides, the higher the GMF content, the smaller was the oil contact angle, a result indicating that the addition of GMF promotes the water retention capacity of maize tortillas.

#### FTIR analysis of tortilla variations

Figure 5(a) presents the FTIR spectra for tortillas with different GMF contents. All samples showed a pronounced broad peak at 3000–3700 cm<sup>-1</sup>, which resulted from the overlapping combination of OH stretching (~3500 cm<sup>-1</sup>) linked to hydration effects and NH stretching (3300 cm<sup>-1</sup>) attributed to amide A groups of

**Freezable water of masa variations**

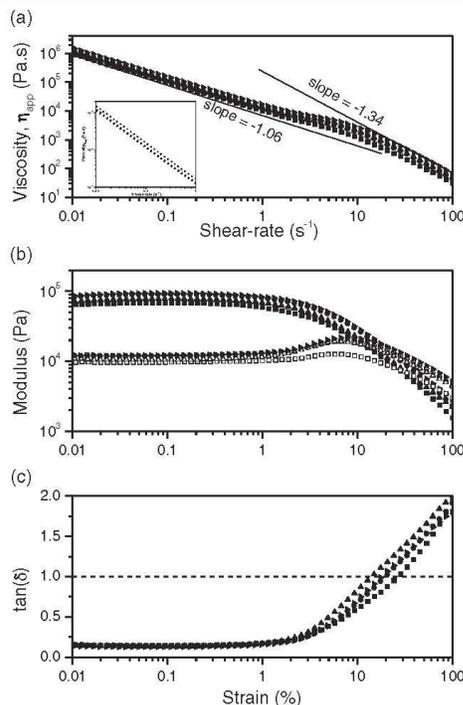
Freezable water is the amount of water behaving like free water.<sup>23</sup> Freezable water in a food matrix is available for chemical and biochemical reactions as well as for microbial growth and propagation.<sup>24</sup> In this way, freezable water increases the risk of masa and tortilla deterioration under storage and shelf conditions. In contrast, un-freezable water corresponds to bound water molecules. The last two columns in Table 1 describe the content of freezable and un-freezable water for the different masa variations. The freezable water content decreased with the incorporation of GMF, from ~462.9 g kg<sup>-1</sup> for M<sub>0</sub> to ~359.3 g kg<sup>-1</sup> for M<sub>15</sub>. This means that the incorporation of GMF promoted the binding of water molecules, in agreement with the results for WRC. Gelatinization of starch leads to the formation of semi-crystalline and amorphous entanglements of amylose chains lixiviated during heating, where water molecules are trapped in a complex 3D network.<sup>25</sup> In turn, these microstructures result in water molecules that are not available for freezing at temperatures around 0 °C.

**Viscosity of masa variations**

Malleability of masa is an important feature for manual or machine-based production of tortillas. In this regard, the viscosity and viscoelasticity properties play an important role in the handling of masa. The apparent viscosity increased with the content of GMF (Fig. 1(a)). For instance, for the shear rate value of 0.1 s<sup>-1</sup>, the apparent viscosity was 87 657 Pa s for M<sub>0</sub> and 167 326 Pa s for M<sub>15</sub>. A similar rheological pattern was obtained for wheat dough containing pre-gelatinized starch fractions subjected to creep tests.<sup>26,27</sup> Shear-thinning behavior was observed for the scrutinized range of shear rate values. Two regions can be observed, where the shear-thinning behavior can be described by a power-law model (see Eqn (3)). In the first region of low shear rate values (up to 1 s<sup>-1</sup>), the logarithmic decay of the apparent viscosity showed a slope of -1.06, corresponding to a flow behavior index of *n*=0.06. On the other hand, the region of higher shear rate values showed a slope of -1.34, corresponding to a flow behavior index of *n*=0.34. That is, the shear-thinning behavior was stronger for high shear rate values (>10 s<sup>-1</sup>). It is noted that the apparent viscosity curves for masa incorporating GMF appear as a vertical shift of the curve for M<sub>0</sub>, suggesting that the GMF acted as a hydrocolloid strengthening the masa microstructure. Hydrocolloids added to masa have the ability to disperse and absorb more water as compared with native starch.<sup>28</sup> It has been pointed out that the viscosity of colloidal dispersions incorporating gelatinized starch is ascribable to liquid absorption and resultant swelling of the dispersed colloid.<sup>29</sup> Pre-gelatinized starch in gluten-free flours has been incorporated in formulations to improve the texture of bread<sup>30</sup>; however, to the best of our knowledge, the use of gelatinized starch flours in tortilla has not been reported.

**Viscoelasticity of masa variations**

Figure 1(b) presents the storage (*G'*) and loss (*G''*) moduli as a function of strain at 1 rad s<sup>-1</sup>. The behavior of the viscoelastic moduli gives valuable information regarding changes in the microstructure as masa is deformed. For small deformations, up to 2% strain, both moduli are nearly constant, indicating that the microstructure was not affected by small deformations. The storage modulus *G'* started to decrease for strains higher than about 2%, which can be attributed to the breakdown of the masa structure. The reduction in the shear stress for high deformations can be attributed



**Figure 1.** (a) Apparent viscosity of masa formulations. The parameter *n* is the flow behavior index and is estimated as the slope of the apparent viscosity pattern in a log–log plot. (b) Viscoelastic moduli and (c) loss factor for different masa formulations. For all plots, the following symbols were used: ■, M<sub>0</sub>; ●, M<sub>5</sub>; ▲, M<sub>10</sub>; ▴, M<sub>15</sub>. Open symbols correspond to the loss modulus *G''*.

to the alignment of the masa microstructure along the deformation direction. Besides, the fast decay of the moduli for strain values higher than 10% might be caused by the breakage of particle aggregates dispersed in the masa bulk, leading to the fragmentation of the dough microstructure.<sup>31,32</sup> The pattern described above was the same for all cases, including those with high GMF content. Similarly to particle-filled hydrogel composites,<sup>33</sup> the GMF acted as a hydrocolloid entrapping the particles (e.g. insoluble remnants a.k.a. ghosts) dispersed in the masa bulk. The GMF forms a 3D network where the different dough fractions are dispersed, resulting in a highly consolidated masa microstructure with improved elastic properties.<sup>16</sup> Figure 1(c) exhibits the loss factor  $\tan(\delta) = G''/G'$ . A solid-like behavior ( $\tan(\delta) < 1$ ) was observed for strain values as high as 10%, which is a typical behavior of maize masa.<sup>24</sup> The transition ( $\tan(\delta) = 1$ ) to a liquid-like behavior was affected negatively by the GMF content, as reflected by a smaller loss factor value as the GMF fraction increased.

**Moisture content of tortilla variations**

The MC of fresh tortilla (Fig. 2(a)) increased as the fraction of GMF increased. A significant increase with respect to M<sub>0</sub> was observed only for M<sub>15</sub>. However, more important differences occurred over

- 7 Rendón-Villalobos R, Agama-Acevedo E, Islas-Hernández JJ, Sánchez-Muñoz J and Bello-Pérez LA, *In vitro* starch bioavailability of corn tortillas with hydrocolloids. *Food Chem* **97**:631–636 (2006).
- 8 Bueso FJ, Waniska RD, Moreira R, Seetharaman K and Rooney LW, Effect of temperature on texture of corn tortilla with and without antistaling agents. *Cereal Chem* **83**:348–353 (2006).
- 9 Friend CP, Waniska RD and Rooney LW, Effects of hydrocolloids on processing and qualities of wheat tortillas. *Cereal Chem* **70**:252–256 (1993).
- 10 Yeggy HA, Effect of hydrocolloids and protein on corn tortilla staling. Doctoral dissertation, Texas A&M University (2000).
- 11 Bueso FJ, Rooney LW, Waniska RD and Silva L, Combining maltogenic amylase with CMC or wheat gluten to prevent amylopectin recrystallization and delay corn tortilla staling. *Cereal Chem* **81**:654–659 (2004).
- 12 González Pérez H and Martínez Damián MA, Efecto de transmisión de precio del mercado del maíz al mercado de la tortilla en México. *Rev Mex Ciencias Agríc* **6**:1149–1162 (2015).
- 13 Figueroa-Cárdenas JD, Vélez-Medina JJ, Esquivel-Martínez AM, Mariscal-Moreno RM, Santiago-Ramos D and Hernández-Estrada ZI, Effect of processing procedure on the formation of resistant starch in tamales. *Starch/Stärke* **68**:1121–1128 (2016).
- 14 Bello-Pérez LA, Osorio-Díaz P, Agama-Acevedo E, Solorza-Ferri J, Toro-Vázquez JF and Paredes-López O, Chemical and physicochemical properties of dried wet masa and dry masa flour. *J Sci Food Agric* **83**:408–412 (2003).
- 15 Bello-Pérez LA, Osorio-Díaz P, Agama-Acevedo E, Núñez-Santiago C and Paredes-López O, Chemical, physicochemical and rheological properties of masas and nixtamalized corn flour. *Agrociencia* **36**:319–328 (2002).
- 16 Lobato-Calleros C, Hernandez-Jaimes C, Chavez-Esquivel G, Meraz M, Sosa E, Lara VH et al, Effect of lime concentration on gelatinized maize starch dispersions properties. *Food Chem* **172**:353–360 (2015).
- 17 Clubbs EA, Vittadini E, Shellhammer TH and Vodovotz Y, Effects of storage on the physico-chemical properties of corn tortillas prepared with glycerol and salt. *J Cereal Sci* **47**:162–171 (2008).
- 18 AOAC, Official Methods of Analysis (20th edn). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (2002).
- 19 AOAC International, Approved Methods of Analysis (9th edn). AOAC International, St Paul, MN (2001).
- 20 Feng L, Zhang Z, Mai Z, Ma Y, Liu B, Jiang L et al, A super-hydrophobic and super-oleophilic coating mesh film for the separation of oil and water. *Angew Chem Int Ed* **43**:2012–2014 (2004).
- 21 Lucius R, Gao Y and Vodovotz Y, Characterization of water state in masa with different additives. *Cereal Chem* **86**:350–354 (2009).
- 22 Sukhija S, Singh S and Riar CS, Effect of oxidation, cross-linking and dual modification on physicochemical, crystallinity, morphological, pasting and thermal characteristics of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) starch. *Food Hydrocolloids* **55**:56–64 (2016).
- 23 Labuza TP, The properties of water in relationship to water binding in foods: a review. *J Food Process Preserv* **1**:167–190 (1977).
- 24 Vittadini E and Vodovotz Y, Changes in the physicochemical properties of wheat- and soy-containing breads during storage as studied by thermal analyses. *J Food Sci* **68**:2022–2027 (2003).
- 25 Leloup VM, Colonna P, Ring SG, Roberts K and Wells B, Microstructure of amylose gels. *Carbohydr Polym* **18**:189–197 (1992).
- 26 Onyang C, Mutungi C, Unbehend G and Lindhauer MG, Rheological and baking characteristics of batter and bread prepared from pregelatinised cassava starch and sorghum and modified using microbial transglutaminase. *J Food Eng* **97**:465–470 (2010).
- 27 Hesso N, Loisel C, Chevallier S and Le-Bail A, Impact of pregelatinized starches on the texture and staling of conventional and degassed pound cake. *Food Bioprocess Technol* **7**:2923–2930 (2014).
- 28 Ortolan F, Brites LTG, Montenegro FM, Schmiele M, Steel CJ, Clerici MTPS et al, Effect of extruded wheat flour and pre-gelatinized cassava starch on process and quality parameters of French-type bread elaborated from frozen dough. *Food Res Int* **76**:402–409 (2015).
- 29 Li J-M and Nie S-P, The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids* **53**:46–61 (2016).
- 30 Sugiyura F, Ito S and Arai E, Effect of pregelatinized starch paste on the ease of swallowing high-moisture content bread. *J Food Eng* **214**:209–217 (2017).
- 31 Hyun K, Kim SH, Ahn KH and Lee, SJ, Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. *J Non-Newtonian Fluid Mech* **107**:51–65 (2002).
- 32 Ewoldt RH, Hosoi AE and McKinley GH, New measures for characterizing nonlinear viscoelasticity in large amplitude oscillatory shear. *J Rheol* **52**:1427–1458 (2008).
- 33 Yanagioka M and Frank CW, Effect of particle distribution on morphological and mechanical properties of filled hydrogel composites. *Macromolecules* **41**:5441–5450 (2008).
- 34 Núñez-Santiago MC, Santoyo E, Bello-Pérez LA and Santoyo-Gutiérrez S, Rheological evaluation of non-Newtonian Mexican nixtamalised maize and dry processed masa flours. *J Food Eng* **60**:55–66 (2003).
- 35 Kong J and Yu S, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* **39**:549–559 (2007).
- 36 Flores-Morales A, Jiménez-Estrada M and Mora-Escobedo R, Determination of the structural changes by FT-IR, Raman, and CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy on retrograded starch of maize tortillas. *Carbohydr Polym* **87**:61–68 (2012).
- 37 Chen L, Tian Y, Sun B, Cai C, Ma R and Jin Z, Measurement and characterization of external oil in the fried waxy maize starch granules using ATR-FTIR and XRD. *Food Chem* **242**:131–138 (2018).
- 38 Capron I, Robert P, Colonna P, Brogly M and Planchot V, Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym* **68**:249–259 (2007).
- 39 Warren FJ, Gidley MJ and Flanagan BM, Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure – a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydr Polym* **139**:35–42 (2016).
- 40 Van Soest JGG, Tournois H, de Wit D and Vliegenthart JFG, Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr Res* **279**:201–214 (1995).
- 41 Sevenou O, Hill SE, Farhat IA and Mitchell JR, Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *Int J Biol Macromol* **31**:79–85 (2002).
- 42 Imberty A, Buléon A, Tran V and Pérez S, Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke* **43**:375–384 (1991).
- 43 Paredes-López O, Bello-Pérez LA and López MG, Amylopectin: structural, gelatinisation and retrogradation studies. *Food Chem* **50**:411–417 (1994).
- 44 García-Rosas M, Bello-Pérez A, Yee-Madeira H, Ramos G, Flores-Morales A and Mora-Escobedo R, Resistant starch content and structural changes in maize (*Zea mays*) tortillas during storage. *Starch/Stärke* **61**:414–421 (2009).



Tratamiento con  $\text{CaCO}_3$  y adición de fracción de harina gelatinizada en masa de maíz: Efecto en propiedades fisicoquímicas y reología.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 31 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
- DR. CESAR RAMIREZ SANTIAGO
- DRA. EDITH AGAMA ACEVEDO
- DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO

2019



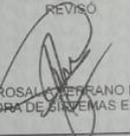

SAMUEL GARCÍA DÍAZ  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

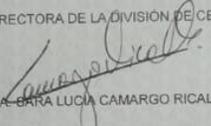
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
DE: SAMUEL GARCIA DIAZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

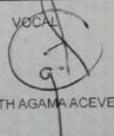
REVISÓ  
  
MTRA. ROSAL CEBRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

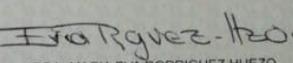
Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS  
  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA  
  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL  
  
DR. CESAR RAMIREZ SANTIAGO

VOCAL  
  
DRA. EDITH AGAMA ACEVEDO

SECRETARIA  
  
DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO