



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca.**

**“Compuestos nutracéuticos de la tortilla tlayuda:
cambios durante el proceso de elaboración y
bioaccesibilidad.”**

TESIS

que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

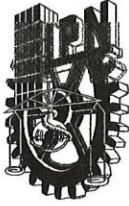
I.Q. Daniel Alberto García Rojas

Director de tesis:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Sta. Cruz Xoxocotlán Oaxaca

Junio 2016



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de junio del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada :"Compuestos nutracéuticos de la tortilla tlayuda: cambios durante el proceso de elaboración y bioaccesibilidad"

Presentado por el alumno:

García Apellido paterno	Rojas materno	Daniel Alberto nombre(s)
-----------------------------------	-------------------------	------------------------------------

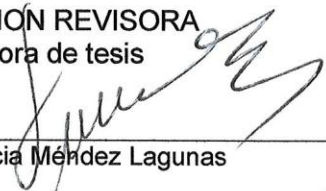
Con registro:

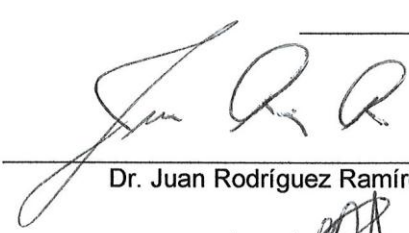
A	1	4	0	4	6	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

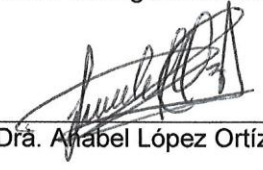
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

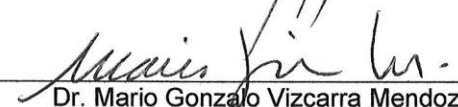
LA COMISION REVISORA
Directora de tesis


Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas


Dr. Juan Rodríguez Ramírez.


Dr. Sadoth Sandoval Torres


Dra. Anabel López Ortíz


Dr. Mario Gonzalo Vizcarra Mendoza

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez
Director



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 22 del mes de junio del año 2016, el (la) que suscribe García Rojas Daniel Alberto, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A140466, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas. y cede los derechos del trabajo titulado: “:Compuestos nutracéuticos de la tortilla tlayuda: cambios durante el proceso de elaboración y bioaccesibilidad”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó daniel.alberto.garo@hotmail.com, Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

García Rojas Daniel Alberto



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

Compuestos nutraceuticos de la tortilla tlayuda: cambios durante el proceso de elaboraci3n y bioaccesibilidad.

I.Q. Daniel Alberto Garc3a Rojas

RESUMEN

El efecto de los procesos para la obtenci3n de tortillas tlayudas en los compuestos nutraceuticos y su comparaci3n con tortillas tradicionales, as3 como la bioaccesibilidad de los mismos, se estudian en este trabajo. Tradicionalmente para elaborar productos de ma3z nixtamalizado, el ma3z es sometido a un proceso de nixtamalizaci3n (NT) de pH b3sico, el cual influye fuertemente sobre los compuestos nutraceuticos (CN) encontrados en el ma3z. En contraste la nixtamalizaci3n ecol3gica (NE) conserva el pericarpio y mantiene el pH del licor de cocci3n, en un rango 3cido neutral, pudi3ndo retener CN.

El objetivo de esta investigaci3n fue evaluar el efecto de nixtamalizaci3n ecol3gica, nixtamalizaci3n tradicional y el m3todo de cocci3n de tortillas en compuestos nutraceuticos, incluyendo la biodisponibilidad de CN en tortillas tlayudas y tradicionales elaboradas con ma3z azul VC-42. Antocianinas totales (ANT), fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante (CA) fueron medidos con m3todos espectrofotom3tricos en ma3z fresco, ma3z nixtamalizado y tortilla, antes y durante la digesti3n gastrointestinal *in vitro* (DGiV). La biodisponibilidad de CN tambi3n fue calculada 12 horas despu3s de la DGiV. Se us3 un dise1o totalmente aleatorizado con dos factores (el m3todo de cocci3n y tipo de nixtamalizaci3n), para el an3lisis de datos se utiliz3 un ANOVA y la prueba de Tukey para la comparaci3n de los tratamientos en cada fase. En la nixtamalizaci3n NE se encontr3 una mayor retenci3n de CN en comparaci3n de NT. El m3todo de cocci3n de tortillas en combinaci3n con el agente qu3mico usado en la nixtamalizaci3n tuvo un efecto significativo en la matriz alimentaria, dicho efecto fue notable durante la digesti3n gastrointestinal *in vitro* de tortillas. Con respecto al grano, la bioaccesibilidad de ANT para NT fue

entre el 10 y 11%, para NE entre el 14 y 27%. La bioaccesibilidad de FT fue entre 122-126% para NT y de 100-148% para NE. Por otra parte la bioaccesibilidad de CA fue de 113 -115% para NT, y entre 96-150% para NE. Los resultados sugieren que, los fenoles contribuyen en mayor proporción a la CA; al final de la DGiV la cantidad de fenoles libres fue mayor que los fenoles bioaccesibles, lo que sugiere la liberación incompleta o la degradación de fenoles.

Palabras clave: Compuestos nutraceuticos, maíz azul, bioaccesibilidad, nixtamalización ecológica.

Dirigido por:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas.

Nutraceutical compounds of “tortilla tlayuda”: changes during the development process and bioavailability.

I. Q. Daniel Alberto García Rojas

ABSTRACT

The effect of the processes used to obtain “tortillas tlayudas” on the nutraceutical compounds and its comparison with traditional tortillas, and the bioavailability of them, are studied on this work. Traditionally, to produce nixtamalized corn products, corn is subjected to a process of nixtamalización (NT) of basic pH, which strongly influences the nutraceutical compounds (CN) found in corn. In contrast ecological nixtamalización (NE) retains the pericarp and maintains the pH of the cooking liquor, in a neutral acidic range, retaining CN.

The objective of this research was to evaluate the effect of NE, NT on nixtamalized corn also the cooking method and bioavailability in tortillas on nutraceuticals. Total anthocyanins (ANT), total phenols (FT) and antioxidant capacity (CA) were measured with spectrophotometric methods in fresh corn, nixtamalized corn and tortillas before and during gastrointestinal digestion in vitro (DGiV). The bioavailability of nutraceuticals also was calculated 12 hours after in vitro gastrointestinal digestion. A completely randomized design with two factors was used (the cooking method and type of nixtamalization). For data analysis ANOVA was used, and Tukey's tests were used for the comparison of treatments in each phase. In the nixtamalization NE a greater retention of nutraceuticals was found compared to traditional nixtamalization. The cooking method of tortillas in combination with the type of salt used in the nixtamalization had a significant effect on the food matrix, this effect was remarkable during gastrointestinal digestion in vitro of tortillas, with respect to the grain, the bioavailability of anthocyanins for the traditional nixtamalization was between 10 and 11%, and for ecological nixtamalization between 14 and

27%. The bioavailability of total phenolics was between 122-126% for traditional nixtamalización and 100-148% for ecological nixtamalización. Moreover the bioavailability of antioxidant capacity was 113 -115% for traditional nixtamalization and between 96-150% for ecological nixtamalization. The results suggest that phenols contribute most to the CA; at the end of the DGIV the amount of free phenol was greater than the bioaccessible phenols, suggesting incomplete release or degradation of phenols.

Keywords: nutraceutical compounds, blue corn, bioavailability, ecological nixtamalization

Directed by

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilia Méndez por las sugerencias para poder realizar esta tesis, su apoyo en la financiación de materiales durante la fase experimental, y las facilidades para la producción del maíz VC-42.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por proporcionar los granos para el cultivo del maíz VC-42

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca por las facilidades prestadas para la realización de los estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de la maestría.

A la Universidad Politécnica de Valencia, en especial a la Dra. Ana Andrés Grau, y a la Dra. Ana Heredia Gutiérrez, por su confianza, comprensión, apoyo y sugerencias para llevar a buen fin la etapa de digestión gastrointestinal in vitro de tortillas en esta tesis.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado, y al fondo europeo H2020 por las facilidades prestadas para la realización de la estancia en la Universidad Politécnica de Valencia.

Índice

Índice	ix
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Lista de ecuaciones	xiv
Prefacio	1
CAPITULO I. Introducción	4
1.1 Justificación	4
1.2 Hipótesis	6
1.3 Objetivos	6
CAPITULO II. Marco Teórico y referencial	8
2.1 Maíz	8
Botánica	8
La semilla; composición física y fisicoquímica.	9
2.2 Maíces pigmentados	11
2.2.1 Maíz azul VC-42	11
2.3 Compuestos fenólicos en maíces pigmentados	12
2.3.1 Contenido de antocianinas en maíz	13
2.4 Procesos de nixtamalización y la tortilla	17
2.4.1 Procesos de nixtamalización	17
2.4.1.1 Cambios en el contenido de antocianinas de productos de maíz nixtamalizado	18
2.4.2 La tortilla	20
	ix

2.5 Digestión gastrointestinal in vitro	21
CAPITULO III. Metodología	23
3.1 Ubicación del sitio experimental	23
3.2 Materia prima vegetal	23
3.3 Determinación de propiedades físicas	23
3.3.1 Determinación de humedad	23
3.3.2 Determinación de peso hectolítrico	23
3.3.4 Determinación de color	24
3.3.5 Determinación de pH	25
3.3.6 Tiempo de nixtamalización	25
3.4 Etapas de experimentación y condiciones de almacenamiento	26
3.4.1 Etapa uno: Nixtamalización y molienda	26
3.4.2 Etapa dos: cocción de tortillas	27
3.4.3 Etapa tres: digestión gastrointestinal in vitro	27
3.5 cuantificación de propiedades nutraceuticas.	29
3.5.1 Elaboración de extractos	29
3.5.2 Cuantificación de antocianinas	30
3.5.3 Medición de capacidad antioxidante	31
3.5.4 Cuantificación de fenoles totales	32
3.5.4.1 Cuantificación de fenoles libres	32
3.5.4.2 Cuantificación de fenoles ligados	32
3.6 Diseño de experimentos y análisis de datos	34
Capitulo IV. Resultados	35
4.1 caracterización del grano	35

4.2 Calidad de nixtamalización	35
4.3 Contenido de humedad	36
4.4 Determinación de pH y pérdida de materia seca	37
4.4 Color en maíz, masa y tortilla	38
4.5 Contenido de compuestos nutraceuticos en el primer ensayo.	41
4.5.1 Contenido de antocianinas	41
4.5.2 Contenido de fenoles	44
4.5.3 Capacidad antioxidante	47
4.5.4 Bioaccesibilidad	49
4.6 Contenido de compuestos nutraceuticos en el segundo ensayo	50
4.6.1 Compuestos nutraceuticos en el grano	51
4.6.2 Compuestos nutraceuticos en masa	55
4.6.3 Compuestos nutraceuticos en tortillas	58
4.6.4 Compuestos nutraceuticos en digestión gastrointestinal in vitro de tortillas y bioaccesibilidad	62
CAPITULO V. Conclusiones y recomendaciones.	70
5.1 Conclusiones	70
5.2 Recomendaciones	72
CAPITULO VI. Bibliografía	
ANEXO A. Distribución de fenoles en digestión in vitro de tortillas tradicionales	81
ANEXO B. Distribución de fenoles en digestión in vitro de tortillas tlayudas	82
ANEXO C. Capacidad antioxidante en digestión in vitro de tortillas	83
ANEXO D. Antocianinas durante digestión in vitro de tortillas	84

Lista de tablas

Tabla 1 Perfil taxonómico del maíz	9
Tabla 2 Contenido de antocianinas en variedades de maíz con granos pigmentados	15
Tabla 3 Índice de dureza para granos de maíz y tiempos de nixtamalización	26
Tabla 4 Concentraciones para la curva estándar de compuestos fenólicos	33
Tabla 5 Concentraciones para la curva estándar de capacidad antioxidante	31
Tabla 6 Distribución porcentual de fracciones anatómicas del grano	35
Tabla 7 Parámetros de nixtamalización	36
Tabla 8 Contenido de humedad	36
Tabla 9 pH y pérdida de materia seca en nejayote	37
Tabla 10 Color en maíz, maíz nixtamalizado y tortillas	39
Tabla 11 Distribución de antocianinas en porciones anatómicas de maíz	41
Tabla 12 Distribución de antocianinas por etapa	42
Tabla 13 Distribución de fenoles totales por etapa de proceso	44
Tabla 14 Distribución de fenoles libres por etapa	45
Tabla 15 Distribución de fenoles ligados por etapa	46
Tabla 16 Distribución de capacidad antioxidante por etapa	47
Tabla 17 Biodisponibilidad de compuestos nutraceuticos en tortilla tlayuda	49
Tabla 18 Antocianinas en fracciones anatómicas de maíz	51
Tabla 19 Contribución de antocianinas en fracciones anatómicas de maíz	52
Tabla 20 Fenoles en fracciones anatómicas de maíz	53
Tabla 21 Contribución de fenoles en fracciones anatómicas de maíz	53
Tabla 22 Capacidad antioxidante en fracciones anatómicas de maíz	54
Tabla 23 Contribución de actividad antioxidante en fracciones anatómicas de maíz	54

Lista de figuras

Figura 1 Principales partes estructurales del grano de maíz (Paredes et al., 2006)	10
Figura 2 Estructura de antocianidinas en frutas y vegetales (Adaptado de De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).	14
Figura 3 Procedimiento para obtener extractos	30
Figura 4 Compuestos nutraceuticos en masa	55
Figura 5 Contenido de antocianinas en masa y tortillas	58
Figura 6 Contenido de fenoles totales en masa y tortilla	59
Figura 7 Contenido de capacidad antioxidante en masa y tortillas	60
Figura 8 Contenido de antocianinas en digestión in vitro	62
Figura 9 Contenido de fenoles totales en digestión	63
Figura 10 Contenido de capacidad antioxidante en digestión	64
Figura 11 Bioaccesibilidad de antocianinas en tortillas	65
Figura 12 Bioaccesibilidad de fenoles en tortillas	66
Figura 13 Bioaccesibilidad de capacidad antioxidante en tortillas	67

Lista de abreviaturas

NT	Nixtamalización tradicional
NE	Nixtamalización ecológica
CN	Compuestos nutraceuticos
ANT	Antocianinas
CA	Capacidad antioxidante
FT	Fenoles totales
DGiV	Digestión gastrointestinal in <i>Vitro</i>
TTL	Tortilla tlayuda
TTR	Tortilla tradicional
F-C	Folin-Ciocalteu

Lista de ecuaciones

Ecuación 1	Cálculo de bioaccesibilidad.	32
Ecuación 2	Cálculo ángulo de Croma	33
Ecuación 3	Cálculo ángulo de tono	33
Ecuación 4	Cálculo de contenido de antocianinas totales.	37

Prefacio

Con un consumo anual per cápita de 90 kilogramos, la tortilla es la base de la alimentación en México. Producto elaborado de maíz, que puede adquirir diferentes coloraciones, debido a las distintas pigmentaciones en las variedades del maíz, entre las que destacan el amarillo, rojo, azul, morado y negro.

Estas pigmentaciones en los maíces son debidas al alto contenido de compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, principalmente antocianinas y ácidos fenólicos (Escalante-Aburto 2013). Estos compuestos tienen actividad biológica benéfica derivada de sus metabolitos secundarios, por lo que se les denomina compuestos nutracéuticos (CN) (Mora-Rochin et al., 2010; Mendoza-Díaz et al., 2012).

Para que el maíz pueda ser consumido, tiene que pasar por varios procesos, la nixtamalización es el principal de ellos.

La nixtamalización (del náhuatl, nextli, cal de cenizas y tamalli, masa cocida de maíz) involucra cambios químicos, estructurales y nutricionales en los diversos constituyentes del grano. La nixtamalización tradicional consiste en calentar hasta la ebullición una solución de Ca(OH)_2 con los granos de maíz, durante este proceso el almidón del maíz se pre-gelatiniza, la proteína se desnaturaliza y el pericarpio o salvado se hidroliza parcialmente.

Nutritionalmente, el maíz cocido o nixtamal contiene una alta cantidad de calcio biodisponible y alta disponibilidad de niacina, (Serna-Saldívar, 2009). Después de un remojo de 8 a 16 horas, el maíz cocido o nixtamal pasa a un lavado con el fin de quitar el remanente de Ca(OH)_2 , para que después de la molienda se obtenga la masa.

La estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la presencia de luz, oxígeno, pH, presencia de iones metálicos (Ca^{2+}) y la temperatura (Bordignon-Luiz et al., 2007), factores presentes en todo el proceso de elaboración de tortillas.

Durante la nixtamalización el maíz es sometido a condiciones de alto contenido de humedad, calor (80-105°C) y un pH elevado (11 a 12). La NT reduce significativamente el contenido de antocianinas en los maíces pigmentados, pérdida que se debe a que gran cantidad de estos compuestos se solubilizan en el licor de cocción con pH elevado y temperatura extrema, lo que degrada a los compuestos. Además otras estructuras químicas derivadas de los polifenoles son afectadas por el rompimiento de los enlaces éster, y como consecuencia se liberan los fenoles a la solución de cocimiento. La mayor parte de estos compuestos se encuentran en el pericarpio del grano, y son eliminados durante el lavado del nixtamal (De la Parra et al., 2007).

Para solucionar algunos problemas de efluentes contaminantes cuando se usa NT, otras alternativas como nixtamalización ecológica (NE), realizado y patentado por Figueroa et. al. (2011) han sido estudiadas que reemplaza de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por otras sales de calcio; el mismo autor reporta mejores propiedades en masa y tortillas elaboradas con este proceso.

Las tortillas pueden ser elaboradas de manera manual o mecánica, con significativas diferencias en diámetro, grosor, textura, propiedades organolépticas y color, las elaboradas mecánicamente son cocinadas sobre un dispositivo que cuenta con una banda continua a alta temperatura, y las elaboradas manualmente se cocinan sobre placas de hierro o cerámica arcillosa caliente. Las medidas comunes de tortillas varían entre 12 y 18 centímetros de diámetro

y de 1 a 2 mm de grosor, pesando cada tortilla entre 22 y 31 gramos. En el sureste de México se consume tortilla tlayuda (TTL), que son de mayor tamaño, entre 25 y 45 cm de diámetro, un peso entre 72 y 142 g, un espesor entre 1.5 y 2.5 mm, cambiando la forma de elaboración, haciendo uso de mallas metálicas, con este accesorio la tortilla no toca directamente la placa caliente donde se cocina, permitiendo que la tortilla tenga una cocción mas lenta, y obteniendo una mayor vida de anaquel.

Durante la cocción de tortillas los perfiles de CN son afectados por el uso de temperaturas altas, entre 100 y 250 °C, lo que supone que la cocción de TTL podría mejorar la retención de algunos CN por que disminuye la transferencia de calor, exponiendo la TTL a menor temperatura durante un mayor tiempo de exposición, por otro lado las variedades azules de maíz contienen el pigmento característico en la aleurona, que forma parte del endospermo (Betrán 2001); la NE deja completo el pericarpio, por lo que se podría suponer una retención mayor de CN durante el lavado después de la nixtamalización.

En esta tesis se estudia el efecto de los procesos para la obtención de tortillas tlayudas en los compuestos nutraceuticos y su comparación con tortillas tradicionales, así como la bioaccesibilidad de los mismos. En el capítulo I encontraremos información acerca de los objetivos, en el capítulo II el marco teórico y referencial, la metodología se encuentra en el capítulo III, los resultados en el IV, por último, en el capítulo V se encuentran las conclusiones, seguida de las recomendaciones.

CAPITULO I. Introducción

1.1 Justificación

El maíz es la base de la alimentación en México, y cuando son elaboradas con maíces pigmentados son una fuente de compuestos nutraceuticos al organismo y podrían mejorar el estado de salud; sin embargo, para que pueda ser consumido, el maíz debe pasar por varios procesos, la nixtamalización es el principal de ellos.

La combinación de pH altamente alcalino y altas temperaturas durante la nixtamalización tienen un efecto sobre la estabilidad de los compuestos nutraceuticos, degradando principalmente las antocianinas, mientras que los fenoles son liberados, siendo estas las principales razones del cambio de color en el nixtamal. En adicción a este problema, el efluente contaminante de las aguas residuales es alto. En contraste, se han realizado alternativas a la nixtamalización tradicional, como la nixtamalización ecológica, que sustituye el hidróxido de calcio, logrando con esto un pH en el rango ácido-neutral, con lo que se espera mayor retención de compuestos nutraceuticos y menores impactos por contaminación.

Después de la nixtamalización, la cocción de tortillas es el segundo proceso en orden de importancia, es en esta fase donde el producto final adquiere características diferentes, sobre todo por las diferencias en la cocción, tal es el caso de la tortilla tlayuda, que hace uso de mallas metálicas después del inflado, con lo que se obtiene una cocción más lenta, con ello un contenido de humedad inferior, y una vida de anaquel más larga a comparación de la tortilla tradicional.

Cuando los alimentos son consumidos, la digestión gástrica mejora la liberación de compuestos nutraceuticos de la matriz alimentaria, sin embargo, los principales factores que intervienen durante este proceso es el pH ácido y la actividad enzimática, los cuales afectan la estabilidad de compuestos de interés y su bioaccesibilidad.

El efecto de la nixtamalización tradicional y ecológica ya se encuentra reportada para diferentes tipos de maíz, pero no para las variedades azules, que contienen los compuestos de

interés en el endospermo y podrían retenerlos en mayor proporción a diferencia de las demás variedades, en adición, el efecto de la temperatura durante la cocción de tortillas tlayudas tampoco se encuentra reportado, además la bioaccesibilidad de compuestos nutraceuticos en tortillas tradicionales y tlayudas se desconoce.

1.2 Hipótesis

Por efecto del método de cocción, la tortillas tlayudas elaboradas con nixtamalización ecológica contiene un mayor cantidad de compuestos nutraceuticos que la tortilla tradicional, incluyendo mayor biodisponibilidad de los mismos después de la digestión gastrointestinal in vitro.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de nixtamalización ecológica, nixtamalización tradicional y el método de cocción de tortillas en los compuestos nutraceuticos, incluyendo la biodisponibilidad de CN en tortillas tlayudas y tradicionales elaboradas con maíz azul VC-42.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de pH en nixtamalización sobre los compuestos nutraceuticos en maíz VC-42.
- Evaluar el efecto del método de cocción de tortillas tlayudas y tradicionales sobre los compuestos nutraceuticos (antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante).

- Determinar la bioaccesibilidad de compuestos nutraceuticos (antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante) con ensayos de digestibilidad gastrointestinal in vitro en tortillas tlayudas y tradicionales.
- Evaluar el efecto del pH sobre el color del maíz nixtamalizado, tortillas tlayudas y tradicionales elaboradas con maíz azul VC-42
- Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el perfil de compuestos nutraceuticos (antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante) en tortillas tlayudas.

CAPITULO II. Marco Teórico y referencial

La producción de cereales ocupa cerca del 60% de la producción total de alimentos a nivel mundial, sus granos y productos tales como harinas obtenidas a partir de ellos contienen numerosos compuestos funcionales tales como ácidos grasos, fitoesteroles, almidón resistente y compuestos fenólicos, además, el consumo de granos enteros se ha asociado a las bajas incidencias de ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. (Salmeron et al., 2009).

2.1 Maíz

La planta de maíz es un sistema metabólico cuyo producto final es un órgano especializado (los granos) el cual contiene fibras, carbohidratos, proteínas, grasas que han servido de alimento para la población desde hace miles de años y en la actualidad es una de las materias primas principales en la industria alimentaria . Los granos se encuentran agrupados en órganos denominados elotes cuando aún son granos tiernos, posteriormente denominados mazorcas cuando son granos secos, en cada mazorca pueden haber de 200 a 400 granos aproximadamente los cuales pueden tener diversas tonalidades.

El maíz contiene casi todos los nutrimentos necesarios para la alimentación del ser humano, su concentración cambia según la variedad, y las condiciones ambientales de manejo presentes durante su desarrollo. En México se produce una gran variedad de tipos de maíz, los cuales tienen una composición promedio del 70% de hidratos de carbono, 8% de proteínas, 4% de minerales, 4% de lípidos, 3% de celulosa (Paredes, 2002).

Botánica

Botánicamente, el maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radical fibroso. El perfil taxonómico del maíz se presenta en la tabla 1

Tabla 1 Perfil taxonómico del maíz

Reino:	Vegetal
División:	Tracheophyta
Subdivisión:	Pterosidae
Clase:	Angiospermae
Subclase:	Monocotyledoneae
Grupo:	Glumiflora
Orden:	Graminales
Familia:	Gramineae
Tribu:	Maydeae
Género:	Zea
Especie:	mays

La semilla; composición física y fisicoquímica.

El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una cariósida y agrícolamente se le conoce como semilla. En la figura 1 se presentan las partes de la semilla de maíz. Las antocianinas están presentes en el pericarpio o la aureola, y su presencia, depende del genotipo de maíz.

Pericarpio. Cubierta del fruto, de origen materno, se conoce como testa, hollejo o cáscara.

Aleurona. Capa de células del endospermo, de naturaleza proteica.

Endospermo. Tejido de reserva de la semilla que alimenta el embrión durante la germinación. El endospermo es la parte de mayor volumen en la semilla. Hay dos regiones bien diferenciadas hay en el endospermo: suave o harinosos y el duro o endospermo vítreo, la proporción depende de la variedad.

Escutelo o cotiledón. Parte del embrión.

Embrión o germen. Es la estructura para originar una nueva planta, al germinar la semilla.

Capa terminal. Parte que se une al elote, con una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad. Entre esta capa y la base del germen se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar, la cual funciona como un mecanismo sellante durante la maduración del grano.

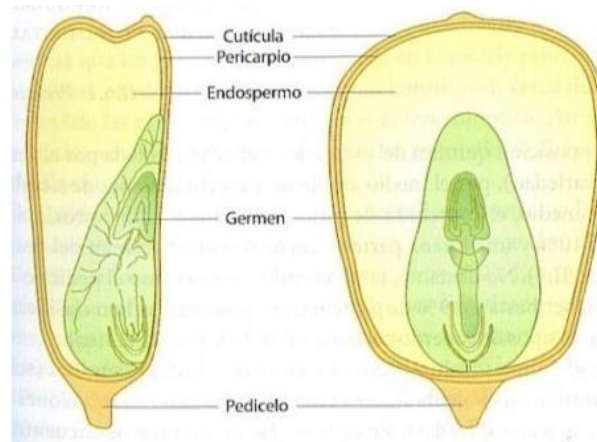


Figura 1 Principales partes estructurales del grano de maíz (Paredes et al., 2002)

La composición química es variable y está relacionada con el estado, raza, variedad, tecnología del cultivo, clima y la parte de la planta o del grano que se analice. Existe un número considerable de datos sobre la composición química del maíz, y múltiples estudios se han llevado a cabo para tratar de comprender y evaluar las repercusiones de la estructura genética del número relativamente elevado de variedades de maíz existentes en su composición química, así como la influencia de los factores ambientales y las prácticas agronómicas en los elementos constitutivos químicos y en el valor nutritivo del grano.

El endospermo comprende el 82% del grano, el pericarpio el 6% y el embrión el 12%, del grano total en la cual encontramos varios componentes importantes en éste.

La variación de cenizas y humedad entre diferentes autores no es significativa (Reyes 1990; Maya-Cortés et al., 2010; Figueroa et al. (2011) y Maya-Cortés et al. (2010) obtuvieron el porcentaje de fibra dietaría que va de 9.93% y 10.32% respectivamente en comparación con

Figuroa et al. (2001) que reportaron en el maíz con soya que fue de 2.23% y 3.85% de fibra cruda, respectivamente.

Almidón : El componente químico principal del grano de maíz es el almidón, al que corresponde hasta el 72-73 % del peso del grano. Otros hidratos de carbono son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades que varían de 1 al 3 % del grano. En el almidón, se encuentra presente el ácido fúmarico, el cuál es el principal antioxidante del grano.

2.2 Maíces pigmentados

Se le denominan maíces pigmentados a la variedad de maíces que presentan coloraciones que van desde tonalidades amarillas, rojas, moradas, negras, azules, entre otras y además son parte de un legado prehispánico y cultural. También reciben el nombre de maíces criollos.

Los maíces pigmentados, están presentes en la mayoría de las 41 razas de maíz descritas en México, los colores negros, morados y rojos que se observan, se deben a las antocianinas, compuestos presentes en el pericarpio, en la capa aleurona, o en ambos. En la región Central de México el consumo de tortillas de maíz azul ocurre en comunidades y pueblos, durante festejos especiales. (Salinas et al., 2003).

2.2.1 Maíz azul VC-42

Espinosa et al., (2009) menciona que los granos mejorados se han obtenido a lo largo de años de trabajo y son el fruto del cruzamiento y selección de razas los cuales dan mejores rendimientos en los campos, por ello muchas instituciones tales como la UNAM, UACH, CP, UDG y el INIFAP han vertido esfuerzos para el desarrollo de nuevas variedades de maíz, estas variedades mejoradas representan la obtención de mejores cosechas.

El INIFAP ha logrado mejoras en 10 de las 50 razas nativa de maíz, las cuales son empleadas en los 15 grandes macro ambientes que consideran grandes regiones agroclimáticas del país y las cuatro provincias agronómicas de la tierra de labor, algunos sembradíos en zonas con condiciones adversas como en la región Mixteca de Oaxaca, por citar un caso, se desarrolló un tipo de mejoramiento en el maíz (V-235 y V-236), para el estado de Oaxaca se desarrollaron de manera *in situ* 18 variedades de maíz contando con la participación activa de los agricultores, logrando así promover el uso diferenciado y los precios atractivos para quienes los cultivan (Espinosa et al., 2009).

Un ejemplo de mejoramiento es el maíz Azul VC-42 el cual fue generado en el Campo Experimental Valles de Oaxaca. Esta variedad se adapta en climas Semicálidos y semisecos en altitudes de 1200 a 1800 metros sobre el nivel de mar. La raza a la cual pertenece el maíz azul VC-42 es la Bolita, variedad VC-42, con una altura aproximada de 220 a 280 cm, días a floración de 60 a 72 días, con días de cosecha aproximado de 110 a 135.

2.3 Compuestos fenólicos en maíces pigmentados

Los compuestos fenólicos (CF) se incluyen dentro de un grupo de moléculas bioactivas no nutritivas (fitoquímicos) contenidas en frutas, vegetales y granos (Liu, 2004). El maíz contiene mayor cantidad de fenoles y capacidad antioxidante que otros cereales como trigo, arroz y avena (Ichikawa et al., 2001; Adom y Liu, 2002). Químicamente, un CF es una molécula que incluye en su estructura un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos son derivados de sales 2-fenil-benzopirilo que existen en las plantas generalmente como glucósidos, con excepción de unos pocos compuestos amino.

Los CF comprenden una amplia variedad de formas químicas: fenoles simples, fenil propanoides, derivados de ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas (Sahidi y Naczki, 2004). Los ácidos fenólicos se encuentran en los cereales en dos formas, libres y ligados (Dykes y Rooney, 2007).

Las formas libres son menos abundantes en comparación con sus ésteres, glucósidos y compuestos ligados. En granos de cereales, su parte externa (pericarpio y testa) y la capa de

células de aleurona en el endospermo contienen los fenoles libres en su forma glucosilada o esterificada (Yu et al., 2001). El contenido de ácidos fenólicos en el grano de maíz integral es de 601 mg kg⁻¹ (en base seca, bs), y el ácido ferúlico es el compuesto que constituye aproximadamente 63 % de los fenoles totales (Mattila et al., 2004).

Este compuesto se encuentra en el pericarpio en forma libre o esterificada a heteroxilanas, las cuales conforman la hemicelulosa de la pared celular del grano de maíz (Saulnier y Thibault, 1999). Cabrera-Soto et al. (2009) demostraron que los CF del maíz se encuentran en varias partes anatómicas del grano donde varían en contenido, y que éste correlaciona con la dureza del grano. Estos autores también reportaron que el contenido de fenoles solubles e insolubles difirió entre dos híbridos de maíz blanco, y que en el germen de ambos hubo el mayor contenido de fenoles solubles.

Uno de los procesos para concentrar los CF provenientes de cereales, es mediante la decorticación de los granos para producir salvado, el cual puede ser incorporado como ingrediente en la elaboración de alimentos con mayor aporte de fibra dietaria y con propiedades nutracéuticas.

2.3.1 Contenido de antocianinas en maíz

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides, un subgrupo importante de los CF, y son pigmentos ampliamente distribuidos en las plantas.

El término antocianina es derivado de los vocablos griegos *anthos* (flor) y *kyaneos* (azul) (Liu, 2003; De Pascual Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Estos compuestos son los responsables de los colores azul, púrpura y rojo en plantas comestibles, principalmente cereales y frutas (Escribano- Bailón et al., 2004). La forma aglicona de las antocianinas o antocianidina, posee una estructura basada en el ion flavilio o 2-fenilbenzopirilium, que presenta grupos hidroxilo y metoxilo en diferentes posiciones (Figura 2). Consta de un esqueleto carbonado en forma C-6 (anillo A)- C-3 (anillo B)- C-6 (anillo C), cuya estructura forma un anillo cromano unido a un segundo anillo aromático (B) en la posición dos (Horbowicz et al., 2008). El tipo de antocianidina formado depende del grado o nivel de hidroxilación o metoxilación del anillo (B) de

la molécula (Garzón, 2008).

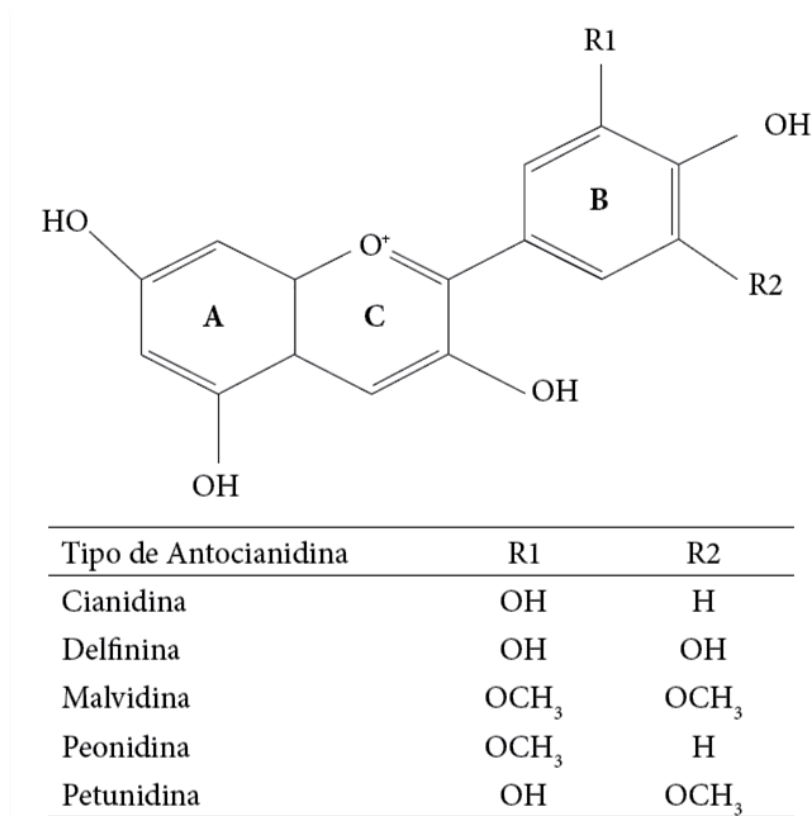


Figura 2 Estructura de antocianidinas en frutas y vegetales (Adaptado de De Pascual-Teresa et. al., 2008; Escalante-Aburto et. al., 2013).

El color de las antocianinas depende del número y posición de los grupos sustituyentes en la molécula. Un aumento en la cantidad de grupos hidroxilo produce pigmentos de tonos azules, y por el contrario, con predominancia de grupos metoxilo se presenta una tonalidad roja (Stintzing et al., 2002). Se han descrito de 12 a 17 antocianidinas diferentes, pero solo seis de ellas se encuentran comúnmente en frutas, vegetales y cereales como el maíz (Kong et al., 2003; De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Las antocianinas pueden encontrarse en forma acilada debido a la acilación de los residuos de azúcares con derivados de ácidos orgánicos alifáticos. Las formas no aciladas son menos estables que las antocianinas que presentan uno o más grupos acilo (De Pascual-Teresa et al., 2002)

Tabla 2 Contenido de antocianinas en variedades de maíz con granos pigmentados

Variedad de maíz	Contenido de antocianinas (mg eq. de cianidina 3 glucósido/100 g)	Referencia
BAJO		
Amarillo ceroso	0.063±0.05	Hu y Xu (2001)
Amarillo comercial	1.11±0.03	Hu y Xu (2001)
Rojo Carmesí	5.09±0.17	Abdel-Aal et al(2006)
Rosa jinheiyu	12.74±0.41	Abdel-Aal et al(2006)
Fiesta india(Multicolor)	13.17±0.56	Abdel-Aal et al(2006)
Rosa Cutie	16.39±0.47	Abdel-Aal et al(2006)
Azul Cutie	19.67±0.21	Abdel-Aal et al(2006)
Naranja	21.5±1.1	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Azul suave comercial	27.20±0.08	Cortés-Gómez et al (2006)
Azul shaman	32.27±0.15	Abdel-Aal et al(2006)
Amarillo tropical	33.1	Ruiz et al (2008)
MEDIO		
Rojo purpura dulce	60.71±2.17	Abdel-Aal et al(2006)
Azul criollo	62.09±0.84	Escalante-aburto et al (2003)
Azul comercial	63.1±1.4	López-Martinez (2011)
RO (Rojo)	127±0.49	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Morado	127.7±0.49	Abdel-Aal et al(2006)
Rojo morado	141±1.56	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Rojo carmesí	149.3±5.63	Zhao et al (2008)
Shijanzhuang		
MSI04 (Rojo)	159±1.22	López-Martinez y García- Galindo (2009)
ALTO		
Negro mexicano	324±3.45	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Rojo Mexicano	366±3.22	López-Martinez y García- Galindo (2009)
RaO04PV Rojo	385±4.22	López-Martinez y García- Galindo (2009)
NO04PV Negro	431±3.89	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Pinto mexicano Rojo	431±34.5	López-Martinez y García- Galindo (2009)
337 Morado	478±4.11	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Nn04cl Negro	529±7.12	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Morado Mexicano	1050±10.11	López-Martinez y García- Galindo (2009)
AREQTL (Morado)	2050±10.15	López-Martinez y García- Galindo (2009)
Morado oscuro Jingheinuo	2565±112.1	Zhao et al (2008)
Morado Zhuozhou	3045±163.2	Zhao et al (2008)

DE- Desviación estándar (Adaptado de De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008; Escalante-Aburto 2013).

En la tabla 2 se presentan los contenidos de antocianinas en diferentes variedades y tipos de maíz, clasificados en tres niveles: bajo, medio y alto. Como las antocianinas proporcionan el color característico a cada grano, los maíces blancos no aportan una cantidad significativa de estos compuestos, con contenidos de antocianinas entre 0.9 y 1.59 mg/100 g, en equivalentes de cianidina 3-glucósido (López-Martínez y García-Galindo, 2009; Hu y Xu, 2011).

El contenido de antocianinas varía ampliamente entre genotipos; así, los maíces de color rojo presentan valores altos, medios y bajos, lo cual pudiera depender de su variabilidad genética. En general, los maíces que contienen bajos valores de antocianinas son los maíces amarillos y rosas, mientras que en el grupo de los valores medios se encuentran los maíces azules, y los contenidos más elevados ocurren en los granos de colores morado y negro.

Según López-Martínez y García-Galindo (2009) y López-Martínez et al. (2008), las variedades 'Veracruz 42' y 'AREQTL', ambas de color morado, presentan un elevado contenido de antocianinas en comparación con las demás variedades estudiadas. Además de conocer el tipo de antocianinas que contienen y su comportamiento durante diferentes tipos de procesamiento, resulta importante realizar una caracterización más completa y específica de los diferentes granos pigmentados.

En el grano de maíz el pigmento se encuentra en el pericarpio y la capa de la aleurona. En el maíz azul la capa de la aleurona contiene los pigmentos de antocianina azul, que derivan principalmente de la cianidina y la pelargonidina, aunque también se ha sugerido la presencia de antocianinas en el germen de ciertas variedades de maíz (Betrán et al., 2001).

Los derivados de la cianidina constituyen aproximadamente el 70 % de las antocianinas del grano (Aoki et al. 2002, De Pascual-Tersa et al 2002). Se ha detectado la presencia de cianidina 3-O-glucósido- 2- malonilglucósido, peonidina 3-(malonilglucósido) y la peonidina 3- (dimalonilglucósido) en cinco híbridos de maíces morados en China, y se comprobó que estos compuestos son estables en un rango amplio de tiempo y

temperaturas, por lo que pudieran presentar mayor estabilidad durante su procesamiento (Zhao et al., 2008).

La mayor parte de las investigaciones se enfocan en el contenido de pigmentos en grano; sin embargo, no se han considerado los contenidos de antocianinas y de compuestos fenólicos en la matriz alimentaria en la digestión gastrointestinal.

2.4 Procesos de nixtamalización y la tortilla

2.4.1 Procesos de nixtamalización

El proceso de nixtamalización es un tratamiento térmico alcalino al cual se somete el maíz y que da como producto central la masa, la cual, luego se transforma en diversos productos.

Durante la nixtamalización, el almidón del maíz se pregelatiniza, la proteína se desnaturaliza y el pericarpio o salvado se hidroliza parcialmente. Nutritionalmente, el maíz cocido o nixtamal contiene una alta cantidad de calcio biodisponible y mejor disponibilidad de la niacina. En la mayoría de los casos el nixtamal es lavado y posteriormente molido para obtener una masa que es la columna vertebral para la que todavía es la base de la alimentación de los mexicanos. (Escalante-Aburto et. al., 2013)

Actualmente se dispone de procesos alternativos a la nixtamalización tradicional (NT), como la nixtamalización por extrusión (NEX) (Mora-Rochin et al., 2010), la nixtamalización fraccionada (NF) (Cortés-Gómez et al. 2006), que al igual que en la NT, los granos de maíz son sometidos a un tratamiento térmico-alcalino en presencia de exceso o limitada cantidad de agua, y la nixtamalización ecológica (NE) (Figuroa et al. 2011) que sustituye el hidróxido de calcio utilizado en la NT por otras sales de calcio (Sulfato de calcio, cloruro de calcio, bicarbonato de calcio, carbonato de calcio, propionato de calcio, u otras sales o ácidos débiles como el ácido acético o propiónico).

El desarrollo de estos procesos alternativos se debe a que la NT requiere de largos periodos de tiempo y el uso de gran cantidad de agua, que da como subproducto al líquido

denominado “nejayote” cuyo pH es elevado y contiene gran cantidad de material orgánico, al cual se le han encontrado pocos usos (González et al., 2004). Los procesos alternos se enfocan a la reducción de tiempo de procesamiento y de efluentes contaminantes; así, se han desarrollado tecnologías que optimizan el contenido de antocianinas en productos nixtamalizados para obtener un beneficio adicional a la salud de la población.

2.4.1.1 Cambios en el contenido de antocianinas de productos de maíz nixtamalizado

La estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la presencia de luz, oxígeno, pH, presencia de iones metálicos (Ca^{2+}) y de la temperatura (Bordignon-Luiz et al., 2007); durante el procesamiento por NT el maíz es sometido a condiciones de alto contenido de humedad, calor (80 a 105 °C) y un pH elevado (11 a 12). La NT reduce significativamente el contenido de antocianinas en los maíces pigmentados, pérdida que se debe a que gran cantidad de estos compuestos se solubilizan en el agua de cocción con pH elevado y temperatura extrema, lo que degrada a los compuestos. Además, otras estructuras químicas derivadas de los polifenoles son afectadas por el rompimiento de enlaces éster, y como consecuencia se liberan los fenoles a la solución de cocimiento. La mayor parte de estos compuestos se encuentran en el pericarpio del grano, y son eliminados durante el lavado del nixtamal (De la Parra et al., 2007). Salinas-Moreno et al. (2003) evaluaron el efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas en granos de variedades de maíz de colores rojo y azul producidos en ciertas regiones de México. Este estudio fue uno de los primeros que evaluó los cambios en el contenido y perfil de estos compuestos. Los autores reportaron que los maíces con pigmentos en el pericarpio presentaron mayores pérdidas (73 y 100 %), en contraste con los granos con pigmentos ubicados en la capa de aleurona que perdieron entre 19.5 y 50.2 %, posiblemente por el efecto de protección del pericarpio a la capa de aleurona la cual mostró escaso daño.

Salinas Moreno et al. (2003) reportaron un incremento en el contenido de cianidina 3-glucósido en harinas nixtamalizadas de maíz azul, y un cambio en el perfil de antocianinas de maíces de ambos colores, por una degradación de compuestos acilados que da lugar a la formación de nuevas estructuras químicas como antocianinas simples. Otros compuestos son prácticamente destruidos en su totalidad por efecto del pH alcalino.

Posteriormente, Salinas-Moreno et al. (2007) reportaron mayores contenidos de fenoles totales y libres en muestras de masas y tortillas nixtamalizadas mediante NT , comparados con los valores encontrados en el grano crudo, y también describieron algunos de los efectos de la NT en el oscurecimiento de masas y tortillas elaboradas con maíces comerciales.

Del Pozo-Insfran et al. (2007) compararon la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles (con énfasis en las antocianinas) de tortillas y “tortilla chips” elaboradas con maíz azul mexicano y un híbrido de maíz azul americano. Los contenidos de antocianinas para estos maíces fueron de 342 y 261 mg/kg respectivamente, y la pérdida de estos compuestos durante el procesamiento fue mayor en los productos derivados del maíz azul americano. Estos autores propusieron la adición de ácido fumárico (pH 5.2) a las masas de maíz nixtamalizado, para mejorar la retención de antocianinas, fenoles solubles y capacidad antioxidante. Con esta técnica se logró retener una mayor cantidad de los compuestos de interés, además de que se presentó mayor capacidad antioxidante y una mejor coloración en los productos obtenidos.

Por su parte, López-Martínez et al. (2011) evaluaron el efecto de la NT sobre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante en tortillas elaboradas con maíz blanco, azul, rojo y morado. Encontraron una disminución en el contenido de antocianinas y fenoles debida al tratamiento térmico alcalino. Sin embargo, la masa y tortilla del maíz morado ‘Veracruz 42’ presentaron una mayor capacidad antioxidante, lo que atribuyeron al elevado contenido de antocianinas y fenoles presentes en esta variedad de maíz, demostrando así que la pérdida de antocianinas está relacionada con la variedad de maíz utilizada. Estos autores también reportaron un incremento en la capacidad antioxidante al cocer la masa para obtención de tortillas, debido probablemente al aumento de fenoles solubles. Agama-Acevedo et al. (2004) reportaron que el almidón de maíz azul contiene más antocianinas totales que el maíz negro, ya que en el maíz azul los pigmentos se encuentran distribuidos en pericarpio, capa de aleurona y endospermo.

Pero el contenido de antocianinas en maíz negro nixtamalizado resultó mayor que el

azul sometido al mismo proceso, debido a que el pericarpio permaneció casi intacto y porque posiblemente este maíz tiene mayor contenido de antocianinas aciladas que derivan de la petunidina, como petanina que es más estable a la nixtamalización. En adición, las antocianinas del endospermo en el maíz azul presentaron mayor exposición a la solución alcalina, ya que las proteínas que forman parte de la subaleurona resultaron solubilizadas durante el procesamiento.

Mendoza-Díaz et al. (2012) evaluaron contenido de antocianinas, capacidad antioxidante y antimutagénica en tortillas elaboradas mediante la NT, en granos de maíces pigmentados criollos de varios colores (blanco, amarillo, rojo y azul). Estos autores encontraron resultados similares a los descritos anteriormente respecto a la pérdida de antocianinas durante el procesamiento del grano a masa (83 %) y tortilla (64 %); sin embargo, después de la nixtamalización los maíces azules y rojos superaron a las demás variedades en contenido de antocianinas.

Rodríguez-Méndez et al., (2013) evalúa actividad antioxidante, fenoles totales y antocianinas, de harinas y tortillas, nixtamalizadas con (hidróxido de calcio, carbonato de calcio, cloruro de calcio y sulfato de calcio), los tratamientos con sales en la nixtamalización ecológica superaron a la nixtamalización tradicional en cuanto a los niveles de compuestos nutraceuticos retenidos en harinas y tortillas.

Además que encontró un efecto del genotipo y las sales en la calidad y compuestos nutraceuticos. La nixtamalización ecológica presentó el mejor desempeño que la nixtamalización tradicional para retener compuestos que incrementan la capacidad antioxidante en las harinas y tortillas.

2.4.2 La tortilla

El icono de los alimentos nixtamalizados es la tortilla, que ha sido producida a partir de numerosos tipos de maíces (blanco, amarillo, azul y morado) (Serna- Saldívar, 2009).

En México, la tortilla forma parte de la dieta de todos los estratos sociales con un consumo per capita de 120 Kg/año, esto es, 328 g por día de tortilla; y provee 38.8% de las

proteínas, 45.2% de las calorías y 49.1% del calcio en la dieta diaria de la población, y en las zonas rurales proporciona aproximadamente 70% del total de calorías y 50% de las proteínas ingeridas diariamente por la población (Figueroa et al., 1994). Alrededor del territorio mexicano existe gran variedad de tortillas, que varían en color, diámetro, grosor y textura, que repercuten en la vida de anaquel, tal es el caso de la tortilla "Tlayuda" que llega a tener una vida de anaquel a condiciones ambientales de 7 días, mientras que las tortillas tradicionales apenas alcanzan dos días. La tortilla tlayuda mide entre 30 y 40 cm, con peso promedio de 76 gramos, espesor de 1.5 mm y una humedad promedio de el 20%.

Las diferencias más contrastantes entre la tortilla tlayuda (TTL) y la tortilla tradicional (TTR) son el diámetro y el método de cocción, mientras que TTR es cocida directamente sobre una placa caliente, después de la mitad de la cocción TTL es trasladada a una malla metálica, produciendo un cocido más lento por efecto de la disminución de transferencia de calor.

2.5 Digestión gastrointestinal in vitro

Los métodos in vitro que simulan procesos de digestión son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o productos farmacéuticos. Aunque los estudios nutricionales humanos siguen siendo considerados el "estándar de oro" para abordar las cuestiones relacionadas con la dieta, los métodos *in vitro* de digestión gastrointestinal tienen la ventaja de ser un blanco más rápido, menos costoso, menos mano de obra intensiva, y no-tiene restricciones éticas. Esto permite relativamente un amplio número de muestras a medir en el cribado paralelo para fines prácticos. Permite reproducibilidad, la elección de la condición controlada y muestreo fácil, los modelos in vitro son muy fiable para estudios mecanicistas y de construcción de hipótesis.

Los métodos de digestión simulada normalmente incluyen las fases intestinales orales, gástricas y en ocasiones fermentación intestinal. Estos métodos tratan de imitar las condiciones *in vivo* fisiológico, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, el pH, tiempo de digestión, y concentraciones de sal, entre otros factores. Algunos modelos sofisticados computarizados como el modelo del tracto gastrointestinal holandés TNO, el modelo del Instituto Inglés de Alimentos investigación y el INRA un

modelo Francés que permite la simulación de los aspectos dinámicos de la digestión, como el transporte de las comidas digeridas, enzima variables concentraciones y pH de divisas a través del tiempo.

Los modelos estáticos de la digestión humana se han utilizado para tratar temas tan diversos como la digestibilidad y bioaccesibilidad de farmacéuticos, micotoxinas y macronutrientes como las proteínas, carbohidratos y lípidos. Se han utilizado para estudiar la liberación a la matriz de micronutrientes y oligoelementos tales como elementos y sustancias vegetales secundarias y poli-carotenoides, Incluyendo algunos la digestión de algunos fenoles. Se utilizan para producir fracciones biodisponibles que se puede utilizar para hacer frente a otras cuestiones mecanicistas. (M. Minekus et. al. 2014)

Se debe considerar la diferencia entre bioaccesibilidad y biodisponibilidad; la **bioaccesibilidad** se define como la cantidad de un componente del alimento que está presente en el intestino humano, como consecuencia de su liberación de la matriz del alimento, y que puede ser capaz de atravesar la barrera intestinal (Shim et al., 2009). En cambio, la **biodisponibilidad** se define como la cantidad y velocidad a la que el principio activo se absorbe y llega al lugar de acción (Holsty Williamson,2008).

CAPITULO III. Metodología

3.1 Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo dentro de las instalaciones del CIIDIR unidad Oaxaca, y en la Universidad Politécnica de Valencia, España.

3.2 Materia prima vegetal

Se usó Maíz VC-42, semilla proporcionada por el INIFAP, que de acuerdo a dicha institución, es de la raza Bolita de la región de los Valles Centrales y es una de las 35 razas de maíz que posee el estado de Oaxaca.

De acuerdo al INIFAP, el maíz tiene alta tolerancia a sequía y bajo nitrógeno en la siembra, con excelentes propiedades para la producción tradicional de tortillas o para su uso en la industria harinera, cumple con todos los requisitos de la Norma Oficial Mexicana para las harinas nixtamalizadas (NMX-FF-034/1-SCFI- 2002).

La clasificación del maíz VC-42 es la siguiente.

- Especie: Mays
- Género: Zea
- Raza: bolita
- Genotipo: Azul

3.3 Determinación de propiedades físicas

3.3.1 Determinación de humedad

Para la determinación de humedad se usó el método 14003 de AOAC (1980)

3.3.2 Determinación de peso hectolítrico

Se determinó de acuerdo a Salinas et. al., (2006), en un recipiente de un litro, se dejó caer maíz hasta completar el volumen, se rasó y pesó, el peso se multiplicó por 100. Se registró también el peso de 100 granos.

3.3.3 Determinación de porcentaje de germen, pedicelo y pericarpio.

Se realizó de acuerdo a como lo reporta Rodríguez-Méndez et. al., (2013), diez granos de maíz fueron remojados en agua a 100 °C. Se secaron con una toalla de papel para eliminar humedad externa, con una cuchilla se separó manualmente el germen, pericarpio y endospermo, se secaron en una estufa durante tres horas a 100 grados centígrados, y luego se pesaron. Se realizaron tres repeticiones.

3.3.4 Determinación de color

El color se registró en la escala CIELab, esto con un colorímetro Mini Scan, donde se registrarán las tres escalas cromáticas L, a*, b*, C*, h*, los tres primeros parámetros se obtuvieron directamente del equipo, mientras que C* y h* se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (4)$$

Donde:

L: Luminosidad.

a*: Valores negativos verdes, positivos rojos.

b*: Valores negativos azul, positivos amarillo.

C*: croma.

h*: ángulo de tono

ΔE : Cambio total de color

Para la medición de color de maíz, se usó el procedimiento descrito por Salinas Moreno et. al., (2013), este procedimiento consiste en montar el grano sobre una superficie de plastilina gris para simular la forma que se encuentra en la mazorca, de la misma forma se realizó con el maíz nixtamalizado.

El color en masa y tortilla fue medido directamente sobre el material, para homogeneizar el color, las tortillas fueron trituradas.

3.3.5 Determinación de pH

Se calculó según el método 981.12 de la AOAC (1990). El pH se determinó por triplicado en cada muestra utilizando un potenciómetro digital (HANNA Instruments pH 211) por inmersión directa del electrodo previamente calibrado.

3.3.6 Tiempo de nixtamalización

El tiempo de nixtamalización se determinó tal como lo establece la norma mexicana NMX-FF-034 que utiliza el índice de flotación, este índice se basa en el principio de que los granos duros son de mayor densidad y por lo tanto tales granos flotan en menor cantidad que los granos de menor densidad.

Se empleó una disolución de nitrato de sodio, a una densidad de 1.250 g/ml (+/- 0.001 g/ml), medida con un picnómetro. Se controló la temperatura entre 22°C - 23°C, empleando un volumen de 300ml-350ml, contenidos en un vaso de 600 ml.

En la disolución se sumergieron 100 granos limpios, se agitó constantemente con un agitador de vidrio con el fin de separar los granos, después de un minuto se contabilizó el número de granos que ascendieron a la superficie se denotó como índice de flotación.

El tiempo de cocción en el proceso de nixtamalización está directamente correlacionado con los datos de la tabla tres establecida por la norma antes mencionada.

Tabla 3 Índice de dureza para granos de maíz y tiempos de nixtamalización

Granos flotantes	Dureza	Tiempo de cocción (minutos)
0-12	Muy duros	45
13-37	Duros	40
38-62	Intermedios	35
63-87	Suaves	30
88-100	Muy Suaves	25

3.4 Etapas de experimentación y condiciones de almacenamiento

La metodología para el presente estudio se dividió en tres etapas de experimentación: nixtamalización, cocción de tortillas y por último digestión gastrointestinal in vitro, que permitió determinar la bioaccesibilidad.

Dos ensayos de laboratorio se realizaron en momentos diferentes, que afectaron el contenido inicial de CN en el maíz; el primer ensayo fue realizado con maíz en madurez fisiológica y recién colectado (33% h.b.h.), con tortillas tlayudas (TTL) con una vida de anaquel de 28 días en congelación (-2°C) empaquetadas al vacío; El segundo ensayo fue realizado con maíz secado a temperatura ambiente en la sombra (hasta 13% h.b.h.) con una vida de anaquel de 8 meses a condiciones ambientales, resguardado en un frasco de plástico con tapa hermética, realizando este ultimo ensayo de laboratorio en TTL y TTR.

3.4.1 Etapa uno: Nixtamalización y molienda

Se realizó dos tipos de nixtamalización: nixtamalización ecológica (NE) y nixtamalización tradicional (NT). Tomando como base lo reportado por Rodríguez-Méndez et. al., (2013), con la variación que el tiempo de nixtamalización, que fue determinado con el índice de flotación.

Para NT a un kilogramo de maíz se añadió una solución de hidróxido de calcio al 1% en una proporción 1:2 (w/v). Para NE (Figuroa et. al., 2011) se sustituyó el hidróxido de calcio por carbonato de calcio, cloruro de calcio y sulfato de calcio (cada sal fue un tratamiento de NE). Se llevó a ebullición durante 30 min, y después se dejó en remojo durante 16 horas a temperatura ambiente. El maíz cocido, llamado ahora nixtamal se separó del licor de cocción (nejayote), el maíz se lavó con agua purificada en una proporción 1:1 con respecto al peso del nixtamal. La molienda se llevó a cabo en un molino de piedra (Modelo M100, Fumasa, Querétaro, México). La masa fue guardada en bolsas de plástico y en refrigeración hasta su uso, no más de cuatro horas después de la molienda.

3.4.2 Etapa dos: cocción de tortillas

Con la masa obtenida, se moldearon tortillas en una prensa manual, con un diámetro de 30 ± 2 cm y un grosor de 2 ± 0.5 mm. Se utilizó un comal de cerámica arcillosa a una temperatura de 250 ± 10 °C, y una malla metálica de 40 cm de diámetro, que puesta sobre la placa de cerámica permitió una separación de 1 cm entre la placa y la tortilla.

La tortilla tradicional se coció sobre la placa de cerámica arcillosa durante 17 s de un lado, 50 s para formar la capa gruesa en el lado opuesto, y se volvió al primer lado durante 17 segundos para permitir el inflado y la formación de dos capas. Para la elaboración de tortillas tlayudas se coció durante 17 s en un lado, 30 s para formar una capa gruesa en el lado opuesto, y se regresó al primer lado durante 10 s para permitir el inflado, sin cambiar de lado, la tortilla tlayuda fue depositada sobre la malla metálica depositada sobre la placa de cerámica arcillosa.

3.4.3 Etapa tres: digestión gastrointestinal in vitro

Para imitar las condiciones de digestión GI in vitro, y para determinar la cantidad de compuestos nutraceuticos potencialmente disponible para una mayor absorción, el protocolo original de Miller et. al., (1981) y posteriormente modificado por Luten et al., (1996) fue seguido con ligeras modificaciones.

Simulación de fluidos gástricos

Fluido salival simulado (FSS) se preparó mezclando 100 U α -amilasa (α -amilasa de saliva humana IX-A, 1000 a 3000 U mg⁻¹, Sigma) en por ml de solución de NaCl 0.9%. Fluido gástrico simulado (FGS) se preparó mezclando 40 mg de pepsina porcina (EC 3.4.23.1) por ml de solución de NaCl 0,9%. Fluido intestinal simulado (FIS) se preparó mezclado 2 g de pancreatina (de páncreas porcino, Sigma) y 12 g de sales biliares por litro de solución NaHCO₃ (0.1 M)

Fase oral

La masticación de tortillas se simuló con una picadora eléctrica. Se realizó una mezcla homogénea con 10 gramos de tortilla y 50 ml de una solución de NaCl al 0.9%, se añadió 0.006 ml de FSS, y se incubó a 37 °C durante un minuto, a 200 rpm. Antes y después de la fase oral, se verificó el pH (pH 5.6 a 6.9).

Fase gástrica

Después de la fase oral, el pH se ajustó inmediatamente a 2 por adición de 8 ml de HCl (0.1 M) y se homogeneizaron con una proporción 0.05: 1 (v/v) de FGS:Recopilación oral. La mezcla se incubó a 37 ° C en agitación de agua a 130 rpm durante 60 min. Durante la fase gástrica, el pH se verificó en 2.

Fase intestinal

Para simular la fase intestinal, el pH de la digestión gástrica se ajustó a por adición de NaHCO₃ (1 M) y una proporción 0.25:1 (v/v) de FIS: Digestado gástrico. La mezcla se incubó a 45 rpm durante 120 min.

3.4.3.1 Bioaccesibilidad de compuestos nutraceuticos

Terminada la digestión gastrointestinal *in vitro*, se resguardaron alícuotas a temperatura ambiente durante 24 horas (Granado-Lorencio et. al., 2008), por decantación se separó el sobrenadante y se realizaron extractos de bioaccesibilidad tal como lo presenta la Figura número tres. El cálculo de bioaccesibilidad se realizó con la ecuación número uno,

el contenido inicial de CN fue el determinado con respecto a cada tipo de tortilla y al maíz. El contenido final de CN fue el determinado con los extractos de bioaccesibilidad.

$$\% \text{Bioaccesibilidad} = \frac{Xf}{Xi} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

Xf: Contenido final de CN después 24 horas de reposo (mg/kg).

Xi: Contenido inicial de CN (mg/kg).

3.5 cuantificación de propiedades nutracéuticas.

La cuantificación de propiedades nutracéuticas se realizó en cada fase, antes y después de los tratamientos, es decir, en el maíz fresco, en el maíz seco, después de los procesos de nixtamalización y cocción de tortillas, así como durante y al final de digestión gastrointestinal *in vitro*

3.5.1 Elaboración de extractos

Para la elaboración de extractos, se tuvo en cuenta la naturaleza de la materia prima, cuando fue necesario se llevó molienda (100 granos de maíz, tres totillas enteras) y se homogeneizó realizando agitación.

Se tomó una muestra aleatoria de aproximadamente 1 g, tomando nota siempre del peso exacto. Se hicieron dos tipos de extractos uno con metanol al 80%, y otro más con metanol acidificado al 1% con ácido clorhídrico. El procedimiento para obtener los extractos se presenta en la figura 3:

Al término de las extracciones sucesivas se aforó en un matraz de 10 o 20 ml, según fue el caso. Los extractos, fueron resguardados en frascos color ámbar y refrigerados hasta las pruebas químicas, no más de 5 días.

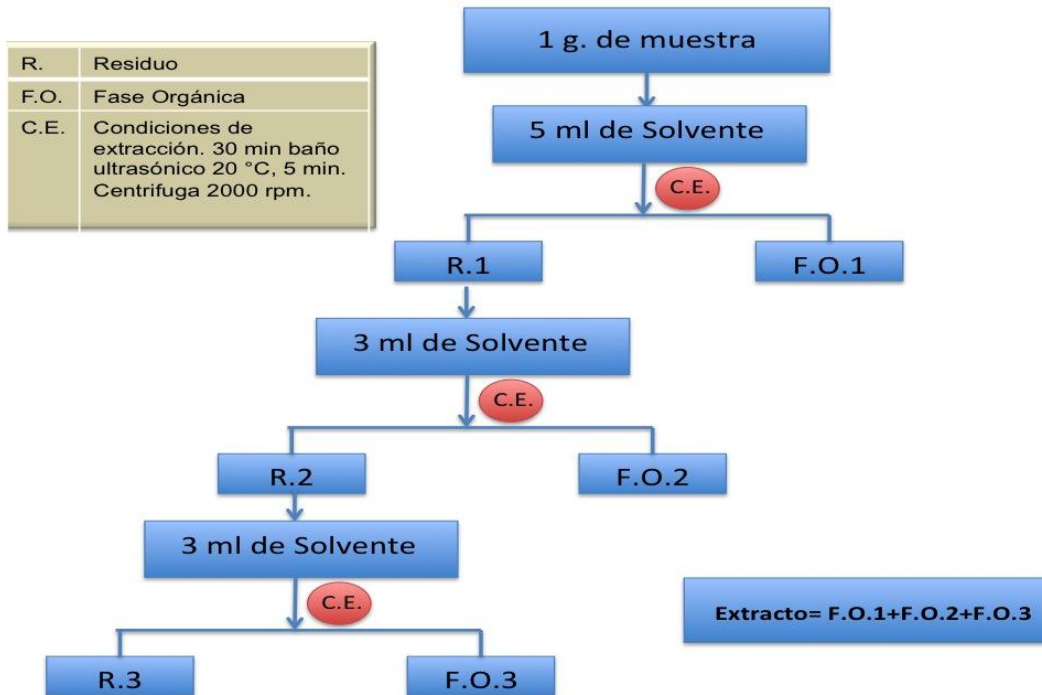


Figura 3 Procedimiento general para la obtención de extractos para la determinación de compuestos nutracéuticos.

3.5.2 Cuantificación de antocianinas

Para la cuantificación de antocianinas se utilizó el método descrito por Abdel-AAL y Hucl (1999). Para ello se utilizó el extracto elaborado con metanol acidificado (MeOH-HCl 1%)

Una alícuota de 1.5 ml del extracto se midió espectrofotométricamente a 540 nm, la longitud de onda a la que las antocianinas exponen su máximo de absorción, y a 700 nm.

El contenido total de antocianina se calcula con la ecuación 4 propuesta por Abdel-AAL y Hucl (1999):

$$A = \frac{(A_{535} - A_{700})}{\xi} * \frac{V_E}{1000} * \frac{M_W}{M_t} * 10^6 \quad (4)$$

Dónde

A: Concentración de antocianinas (mg eq. cianidina 3-glucósido/kg base seca)

A_{535} y A_{700} : Absorbancias del extracto (cm^{-1})

ξ : coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucósido (25.965 cm^2/mol)

V_E : Volumen total del extracto (ml)

Mw : Peso molecular de cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol)

Wt: Peso seco de la muestra (g)

3.5.3 Medición de capacidad antioxidante

Para la determinación de capacidad antioxidante se usó el método de DPPH desarrollado por Brand-William et al. (1995).

Para la preparación del reactivo se aforaron 3.9 mg de DPPH en 100 ml de metanol al 80%, se llevó a baño ultrasónico durante 10 minutos.

Se elaboró una curva patrón con ácido ascórbico como estándar, la solución madre tenía una concentración de 25mg/100ml, se usaron las concentraciones mostradas en la Tabla 5

Tabla 4. Concentraciones para la curva estándar de capacidad antioxidante

Concentración (mg/100 ml)	Solución madre (ml)	MeOH al 80% (ml)
25	2.000	0
21	1.680	0.320
17	1.360	0.640
12.5	1.000	1.000
9	0.720	1.280
5	0.400	1.600
0	0	2.000

En oscuridad total, se agregaron por triplicado en tubos o viales, 100 μ l de las soluciones preparadas, se añadieron 2.9 ml de reactivo DPPH preparado, y se dejaron reposar 30 min contando a partir de la primera muestra a la que se le agregó DPPH. Se midió en el espectrofotómetro a 517 nm la absorbancia del blanco (MeOH al 80%). Para la medición de CA en las muestras se siguió el mismo procedimiento al de la curva de calibración sustituyendo la alícuota tomada de la solución madre por una alícuota del extracto de las respectivas muestras.

El contenido de capacidad antioxidante se calculó con la curva estándar, sustituyendo el valor de "x" con el valor de la absorbancia por cada extracto, el resultado multiplicándolo por el volumen total del extracto en mililitros, y el peso seco de la muestra en gramos.

3.5.4 Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales se calcularon sumando la cantidad de fenoles libres y ligados.

3.5.4.1 Cuantificación de fenoles libres

Para la cuantificación de fenoles libres se usó el método propuesto por Bakan et. al. (2003). Para la elaboración del extracto 30 ml de solución de metanol/agua (80:20) se añadió a una muestra de 1.5 g triturada, se sumergió a un baño ultrasónico durante 60 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 1.325 g durante 10 min, el extracto se separó por decantación.

3.5.4.2 Cuantificación de fenoles ligados

La cuantificación de fenoles ligados se realizó de acuerdo al protocolo realizado por Sosulski et. al., (1982). Para lo cual a la se realizó al residuo de la extracción de fenoles libres 30 ml de una disolución metanol/agua (80:20). Se sumergió en un baño ultrasónico durante 60 min a temperatura ambiente, el extracto se separó por decantación después de ser centrifugado

a 1.325 g durante 10 min.

Método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos, se usó el método de Folin y Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965). El reactivo Folin-Ciocalteu se preparó con una dilución 1:1 con agua destilada, se realizó curva patrón con ácido gálico como estándar con las concentraciones de la Tabla 4

Tabla 5. Concentraciones para la curva estándar de compuestos fenólicos

Concentración (mg/100 mL)	Solución madre (ml)	Agua (ml)
12	2.000	0.000
10	1.667	0.333
8	1.333	0.667
6	1.000	1.000
4	0.667	1.333
2	0.333	1.667
0	0.000	2.000

De cada dilución se tomaron 0.2 ml y se añadieron 0.2 ml de Folin-Ciocalteu, se agitó. Se añadieron 2 ml de Na_2CO_3 al 7%, se agitó nuevamente y se agregaron 2.6 ml de agua agitando nuevamente ahora con vortex. Se incubaron por una hora y se midió la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro. Para la medición en las muestras, se siguió un procedimiento similar, sustituyendo los 0.2 ml de dilución por cada extracto realizado con metanol al 80%.

El contenido de fenoles se calculó con la curva estándar, sustituyendo el valor de “x” con el valor de la absorbancia por cada extracto, el resultado multiplicándolo por el volumen total del extracto en mililitros, y el peso seco de la muestra en gramos.

3.6 Diseño de experimentos y análisis de datos

Se usó un diseño factorial totalmente aleatorizado 2x4x2 con dos factores (El tipo de cocción con dos niveles, tortilla tradicional y tortilla tlayuda; el tipo de agente usado en la nixtamalización con cuatro niveles Ca(OH)_2 , CaCl_2 , CaCO_3 , CaSO_4). Cada tratamiento se llevó por triplicado. Un análisis de varianza se aplicó a los datos. Se usó la prueba de Tukey para la comparación de tratamientos por cada fase. Se usó un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$.

Capítulo IV. Resultados

4.1 caracterización del grano

La calidad del grano de maíz está asociada tanto con su constitución física, que determina la textura y dureza, como con su composición química, que define el valor nutricional y las propiedades tecnológicas; la distribución de fracciones anatómicas del maíz son un referente para la calidad del grano, La distribución de las fracciones anatómicas del grano de maíz vc-42, se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución porcentual de fracciones anatómicas del grano

Fracción anatómica	Porción de la fracción
Pericarpio	0.0538 ±0.00 ^d
Endospermo	0.8274 ±0.01 ^b
Germen	0.1186 ±0.01 ^c
Grano	1.0000 ±0.00 ^a

Los valores con diferentes superíndices en la misma columna (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P <0,05). ±DE- Desviación estándar.

Los valores con diferentes superíndices en la misma columna (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P <0,05). ±DE- Desviación estándar

El grano maduro de maíz está integrado por distintos tejidos que conforman: el germen (11.86%), responsable de formar una futura nueva planta; el endospermo (82.74%) estructura de almacenamiento del grano que constituye su principal reserva energética, y el pericarpio o cubierta del grano (5.38 %), que protege a la semilla de la entrada de hongos y bacterias antes y después de la siembra.

4.2 Calidad de nixtamalización

Con lo que respecta a la calidad de nixtamalización, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 7.

El peso hectolítrico calculado para el maíz vc-42 indica una buena calidad para nixtamalización, de acuerdo a la NMX-FF-034 este peso debe ser al menos de 75 kg y el maíz vc-42 supera en peso el parámetro. Por otra parte, de acuerdo a la misma norma, y comparando los granos flotantes del índice de flotación con la tabla 3, se encuentra que el maíz vc-42 es un grano suave y necesita un tiempo de nixtamalización de 30 minutos.

Tabla 7. Parámetros de nixtamalización

Parámetro	Valor obtenido
Peso hectolítrico (peso 100 L)	77.14 ±6.44 Kg.
Peso por 100 granos	45.269 ±2.00 g
Índice de flotación	75 ±2 flotantes

±DE- Desviación estándar

4.3 Contenido de humedad

El contenido de humedad en base seca de la masa de maíz y las tortillas se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Contenido de humedad

Tratamiento	Contenido de humedad (g agua/g sólido seco)		
	Maíz nixtamalizado	TTL	TTR
Ca(OH) ₂	1.51±0.002 ^a	0.24±0.046 ^c	0.35±0.003 ^c
CaCl ₂	1.49±0.025 ^a	0.30±0.006 ^a	0.47±0.082 ^a
CaCO ₃	1.39±0.025 ^b	0.26±0.001 ^b	0.39±0.045 ^b
CaSO ₄	1.48±0.004 ^a	0.24±0.003 ^c	0.33±0.000 ^c

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, etc) difieren significativamente (P< 0.05) ±DE

Al tener una cocción más larga, la tortilla tlayuda tiene un contenido de humedad menor al de la tortilla tradicional, lo que explica la mayor vida de anaquel de la tortilla tlayuda.

Aunque no existe diferencia significativa entre el contenido de humedad en maíz nixtamalizado en casi todos los tratamientos, el tratamiento de cloruro de calcio tiene un contenido de humedad superior tanto en tortillas tlayudas como en tradicionales.

4.4 Determinación de pH y pérdida de materia seca

Las aguas residuales de NT que incluyen el nejayote, tienen el pH altamente alcalino entre 10.5 y 11.2 tal como lo reporta Trejo et. al., (1982). Sin embargo en varios estudios han reportado rangos diferentes de pH entre 10.5 y 11.6 (Ibarra Mendivil 2008, González-Martínez 1984). El Valor del pH depende de la concentración de hidróxido de calcio utilizada, de la eliminación del exceso después de la nixtamalización y la etapa de enjuagado o lavado que puede reducir el pH a aproximadamente 8.5. En la Tabla 9 se muestra la pérdida de materia seca en el nejayote (licor de cocción) así como el pH, por efecto de las distintas sales de calcio.

Los procesos alternos a NT como la NE se enfocan en la reducción de tiempo de procesamiento y de efluentes contaminantes porque NT da como subproducto nejayote con pH elevado y gran cantidad de material orgánico al cuál se le han encontrado pocos usos (González et. al., 2004).

En la Tabla 9 se encuentran los datos obtenidos de la pérdida de materia seca, la prueba de Tukey no mostró diferencia significativa entre los tratamientos de la nixtamalización ecológica, mientras que si existe una diferencia significativa contra NT.

Tabla 9 pH y pérdida de materia seca en nejayote

pH y pérdida de materia seca		
Tratamiento	pH	Pérdida de materia seca* (%)
Ca(OH) ₂	12.79 ±1.03 ^a	4.02 ±0.08 ^a
CaCl ₂	4.7 ±0.65 ^d	1.21 ±0.00 ^b
CaCO ₃	7.96 ±0.53 ^b	1.19 ±0.03 ^b
CaSO ₄	5.98 ±0.47 ^c	1.11 ±0.12 ^b

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, etc) difieren

significativamente ($P < 0.05$) \pm DE. *Reportado en base seca.

Numerosos autores reportan valores amplios para la pérdida de materia seca entre 2.0-12.5% (Gómez et. al., 1987; Pflugfelder et. al., 1988) dichos valores pueden ser tan variados debido a la intensidad del tratamiento térmico, tiempos de reposo, número de lavados y dureza o suavidad del grano, que difieren en cada estudio. Campechano et. al., (2012) reportó una pérdida de materia seca de 3.2% para NT y de 1.2 a 1.4% para NE, mientras que Rodríguez Méndez et. al., (2013) reportó una pérdida entre 4.41 y 7.25% para NT y de 1.05 y 5.20% para NE; en este estudio se encontró la pérdida de materia seca de 4.02% para NT y entre 1.11 y 1.21% para NE, estas variaciones entre estudios podrían deberse a la composición de fracciones de cada tipo de grano. De los sólidos presentes en el nejayote, la mayor proporción corresponde al pericarpio desprendido del grano (Pflugfelder et al., 1988)

4.4 Color en maíz, masa y tortilla

El color obtenido del maíz fresco sin tratamiento (contenido de humedad del 33% b.h.), y después del secado en campo hasta un contenido de humedad del 13% b.h. así como en el proceso de elaboración se muestra en la Tabla 10.

Para observar el efecto de la nixtamalización en el color, se comparó el color de las aleuronas del maíz seco con las aleuronas del maíz nixtamalizado y para observar el efecto de la cocción sobre el color de TTL y TTR se comparó el color con la masa de maíz nixtamalizado (maíz nixtamalizado triturado).

De acuerdo con el parámetro L, después de la nixtamalización se observa un oscurecimiento en todos los tratamientos, mismo fenómeno después de la molienda del maíz nixtamalizado para la obtención de masa de maíz. Anteriormente Salinas-Moreno (2006) reportaron que algunos híbridos y variedades de maíz producen masa y tortilla que se oscurecen, sin embargo no se conoce la causa del oscurecimiento, pero los compuestos fenólicos del grano podrían estar relacionados.

Tabla 10 Color en maíz, maíz nixtamalizado y tortillas

Tratamiento	Color en la escala Ciel* ^a *b*					
	L*	a*	b*	c	h	ΔE
Maíz fresco	19.93±0.29 ^a	1.79±0.06 ^a	0.32±0.13 ^a	1.82±0.05	0.18±0.07	-
Maíz seco	19.05±0.59 ^a	1.41±0.16 ^b	0.04±0.01 ^b	1.41±0.16	0.03±0.01	1.00
Maíz Nixtamalizado						
Ca(OH) ₂	14.59 ±0.23 ^c	2.24 ±0.23 ^a	-0.36 ±0.02 ^c	2.27±0.22	-0.16±0.02	4.55
CaCl ₂	14.37 ±0.34 ^c	2.16 ±0.18 ^a	-0.32 ±0.02 ^c	2.18±0.18	-0.15±0.02	4.75
CaCO ₃	15.89 ±0.41 ^b	1.42 ±0.26 ^{*b}	1.67 ±0.12 ^b	2.20±0.14	0.87±0.11	3.56
CaSO ₄	18.26 ±0.36 ^a	1.10 ±0.09 ^b	2.27 ±0.10 ^a	2.53±0.13	1.12±0.02	2.39
Masa de maíz						
Ca(OH) ₂	0.22 ±0.01 ^d	-0.18 ±0.02 ^c	56.18 ±0.14 ^c	0.29±0.00	-0.69±0.06	41.64
CaCl ₂			58.04			44.24
	9.22 ±0.11 ^a	0.36 ±0.04 ^a	±0.22 ^a	9.22±0.11	0.04±0.00	
CaCO ₃			58.21			42.81
	7.78 ±0.04 ^c	0.32 ±0.01 ^a	±0.09 ^a	7.78±0.04	0.04±0.00	
CaSO ₄			57.37			39.95
	8.95 ±0.03 ^b	0.10 ±0.02 ^b	±0.05 ^b	8.95±0.03	0.01±0.00	
Tortilla tlayuda						
Ca(OH) ₂	34.73 ±0.38 ^c	-2.37 ±0.09 ^c	4.49 ±0.20 ^c	5.08±0.21	-1.08±0.01	22.10
CaCl ₂	41.23 ±0.18 ^b	4.54 ±0.02 ^b	4.03 ±0.02 ^d	6.07±0.03	0.73±0.00	17.83
CaCO ₃	43.28 ±0.15 ^a	4.63 ±0.07 ^b	6.01 ±0.17 ^a	7.59±0.17	0.91±0.01	16.28
CaSO ₄	42.90 ±0.15 ^a	6.83 ±0.04 ^a	5.11 ±0.04 ^b	8.53±0.03	0.64±0.00	15.46
Tortilla tradicional						
Ca(OH) ₂	33.70 ±0.24 ^d	-2.56 ±0.35 ^c	3.81 ±0.12 ^b	4.59±0.30	-0.98±0.05	23.00
CaCl ₂	39.97 ±0.21 ^a	4.24 ±0.04 ^b	4.25 ±0.10 ^b	6.01±0.10	0.79±0.01	19.14
CaCO ₃	39.18 ±0.21 ^b	4.58 ±0.03 ^b	5.03 ±0.24 ^a	6.80±0.16	0.83±0.03	19.86
CaSO ₄	37.75 ±0.08 ^c	6.52 ±0.16 ^a	5.27 ±0.44 ^a	8.38±0.40	0.68±0.03	20.44

Los valores con diferentes superíndices en la misma columna y sección (a, b, etc) difieren significativamente (P< 0.05) ±DE. Para ΔE maíz seco fue el control para maíz nixtamalizado, maíz nixtamalizado fue el control para masa de maíz, y masa de maíz fue el control para TTL y TTR.

Visualmente la masa y tortilla de los tratamientos de hidróxido de calcio y cloruro de calcio son más azules, que se confirma con lo registrado con el colorímetro, que dio valores mas bajos de b^* .(anexo 1)

Algunas de las reacciones que pueden ser causa del oscurecimiento de alimentos es la polifenoloxidasasa (PFO) que cataliza dos reacciones de gran cantidad de fenoles, del cual se obtienen compuestos como p-cresol y o-benzoquinona, que después de su oxidación y polimerización conduce a la formación de melaninas, responsables del oscurecimiento en frutas y verduras (Fenema, 2000).

El oscurecimiento observado en masa y tortillas podría no estar ligado a reacciones de este tipo en nixtamalización tradicional, pues el pH alcalino (11-13) y la alta temperatura durante la cocción del nixtamal inactivarían cualquier enzima, particularmente la PFO cuyo pH de actividad es de 3 a 6 (Núñez-Delicado et al., 2005), que se ubica en el pericarpio y la capa de la aleurona, en la nixtamalización ecológica, cabe la posibilidad de oscurecimiento por la PFO, por que utiliza un rango de pH dónde la PFO tiene actividad, sin embargo, el tratamiento térmico podría ser el suficiente para inactivarla, en general, el maíz utilizado, en todos los tratamientos de nixtamalización, tanto NT y NE, se observa un oscurecimiento.

La reacción de Maillard es otra reacción de oscurecimiento, es producida por calentamiento o almacenamiento, es debida a la reacción química entre azúcares reductores, principalmente entre la D-glucosa y un aminoácido libre. Dicha reacción no es responsable del oscurecimiento en masa y tortillas, porque los niveles de grupos reactivos de aminoácidos y azúcares no son suficientes.

La oxidación de fenoles como el ácido p-hidroxibenzoico, catecol, ácido caféico, gosalol y quercitina, hacia quinonas por acción de oxígeno atmosférico y pH alcalino, pueden sufrir reacciones de condensación y formar compuestos pardos como las melaninas y melanoidinas (Fenema, 2000).

Aunque Salinas-Moreno (2006) reporta que el contenido de fenoles en el pericarpio podría estar no asociado con el oscurecimiento en masa y tortillas, pero si el contenido de fenoles en el endospermo.

En este estudio se mide el color del pericarpio en el maíz nixtamalizado y existen

diferencias significativas con el maíz sin nixtamalizar, por lo que de estar relacionados los fenoles, los resultados sugieren que los fenoles del pericarpio sí podrían estar relacionados con el oscurecimiento de masa y tortillas.

Sin embargo, se comparó el color en maíz nixtamalizado y en masa de maíz nixtamalizado, aunque son el mismo material, el color es significativamente diferente, que se podría explicar por varios factores explicados anteriormente, como la presencia de oxígeno atmosférico, el contenido de humedad que interfiere en el índice de refracción, además que al tomar el color en el maíz nixtamalizado se toman medidas de este parámetro en el pericarpio, recordando que la NE no hidroliza esta fase anatómica del maíz, lo que podría retener los compuestos presentes en la aleurona, donde se encuentra el mayor contenido de flavonoides, entre los que destacan las antocianinas, que al momento de la reducción de tamaño o molienda se mezclan con el almidón del endospermo. Figueroa (2001b) reportó colores más claros para las tortillas elaboradas con NT, que fue precisamente lo encontrado en este estudio para los dos tipos de tortillas elaborados.

4.5 Contenido de compuestos nutracéuticos en el primer ensayo.

4.5.1 Contenido de antocianinas

Los alimentos funcionales, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un beneficio para la salud. En la Tabla 11 se muestra el contenido de antocianinas obtenido.

Tabla 11 Distribución de antocianinas en porciones anatómicas de maíz

Fracción anatómica	mg eq. Cianidin 3-glucósido/kg b.s.	Porción de la fracción
Pericarpio	181.3 ±0.00 ^d	0.0538 ±0.00 ^d
Endosperma	514.9 ±0.01 ^b	0.8274 ±0.01 ^b
Germen	194.1±0.01 ^c	0.1186 ±0.01 ^c
Grano	558.8 ±0.00 ^a	1.0000 ±0.00 ^a

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P<0,05). ±DE- Desviación estándar

Betrán en el 2001, reporta que en el endospermo del grano de maíz azul, la capa de aleurona contiene los pigmentos de antocianina azul que le confieren su color característico; en los resultados obtenidos, el contenido mayoritario del pigmento se encontró en el endospermo, fracción anatómica donde se encuentra la aleurona.

Respecto al contenido de antocianinas totales en el maíz azul se han reportado entre 196.5 y 620.9 mg eq. de cianidin 3-glucosido/kg b.s. (Abdel-Aal et. al., 2006; Cortés-Gómez et. al., 2006; Escalante-Aburto et. al., 2003); en el maíz trabajado, se encontró un contenido de 558.8 mg eq. de cianidin 3-glucosido/kg b.s., quedando dentro de los valores ya reportados.

En la tabla 12 se presenta el contenido de antocianinas por etapa.

Tabla 12. Distribución de antocianinas por etapa

Antocianinas totales mg cianidina 3-glucosido/kg b.s.				
	Tratamiento Ca(OH) ₂	Tratamiento CaCl ₂	Tratamiento CaSO ₄	Tratamiento CaCO ₃
Masa	478.42 ±7.55 ^c	550.12 ±1.98 ^a	505.75 ±1.91 ^b	453.95 ±2.91 ^d
Tlayuda Fresca	197.46 ±0.613 ^c	263.47 ±0.284 ^a	183.64 ±0.378 ^d	216.71 ±2.81 ^b
Tlayuda Almacenada	59.691 ±0.142 ^b	52.343 ±0.136 ^c	75.859 ±0.184 ^a	55.133 ±3.46 ^c
Digestión	29.757 ±1.56 ^c	39.219 ±0.129 ^a	33.560 ±0.157 ^b	40.330 ±0.545 ^a

Los valores con diferentes superíndices entre tratamientos (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P<0,05). ±DE- Desviación estándar

El contenido de antocianinas mostró diferencias significativas en los tratamientos de la nixtamalización, en la masa se encontró entre 453.95 y 550.12 mg eq. de cianidina 3-glucosido/Kg b.s., el tratamiento de hidróxido de calcio que es la nixtamalización tradicional, perdió el 14.48% del compuesto, mientras que para la nixtamalización ecológica con sales de Cloruro de Calcio, Sulfato de Calcio y Carbonato de Calcio, perdieron un promedio de 1.55, 9.4, 18.7 %, respectivamente; el Cloruro de calcio mostro una mayor retención, mientras que el carbonato de calcio mostró la mayor degradación de los compuestos antocianos.

En la nixtamalización Rodríguez et. al., (2013) reporta una pérdida entre el 8 y el 56% de antocianinas totales usando los mismos tratamientos, sin embargo trabaja con maíces blancos, amarillos, rojos y negros, Salinas Moreno (2003) evaluó nixtamalización tradicional sobre maíces azules con pigmentos ubicados en la aleurona, dichos maíces perdieron entre el 19.5 y el 50.2 %. En este trabajo se encontró que el maíz perdió en la nixtamalización tradicional un porcentaje del 14.48%, reteniendo casi un 5% más que lo mostrado por Salinas Moreno en el 2003, en contraste, la nixtamalización ecológica, no ha sido evaluada en maíz azul, el porcentaje de pérdida fue entre 1.55 y 18.7%.

En la elaboración de la tortilla, todos los tratamientos mostraron diferencia significativa sobre el contenido de antocianinas (Tabla 12), el tratamiento de cloruro de calcio presenta mayor contenido de compuestos antocianos con 267.47 mg eq. de cianidina 3-glucosido/kg b.s., en contraste, el tratamiento de sulfato de calcio fue el tratamiento con menor retención de los compuestos 183.64 mg eq. de cianidina 3-glucosido/kg b.s.; la tortilla tlayuda con respecto al nixtamal presentó una pérdida entre el 52 y el 63%, (58%- $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 52%- CaCl_2 , 63%- CaSO_4 52%- CaCO_3).

Mendoza-Díaz et. al., (2012) evaluaron el contenido de antocianinas en la nixtamalización y cocción de tortillas tradicionales, estos autores encontraron pérdidas similares de antocianinas durante el procesamiento del grano a masa (83 %) y de masa a tortilla (64 %); sin embargo, después de la nixtamalización los maíces azules y rojos superaron a las demás variedades en contenido de antocianinas. En el maíz vc-42 usado en este trabajo, se encontró una retención de antocianinas mayor.

Después de un almacenamiento de 30 días, en todos los tratamientos se obtuvo una pérdida significativa con respecto a la tlayuda fresca que varió entre el 58-74% (69%- $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 80%- CaCl_2 , 58%- CaSO_4 , 74%- CaCO_3).

En la digestión gastrointestinal in vitro, entre los tratamiento de cloruro de calcio y carbonato de calcio no hubo diferencia significativa sobre el contenido de antocianinas,

Por otra parte los tratamientos de cloruro de calcio y carbonato de calcio, mostraron diferencia significativa con todos los demás, quedando las medias de forma descendente de la siguiente manera CaCO_3 - CaCl_2 , CaSO_4 e Ca(OH)_2 , (40.3-39.2, 33.5, 29.75 mg eq. cianidina 3-glucósido respectivamente), en contraste, la pérdida con respecto a la tortilla tlayuda almacenada fue de la siguiente manera 50.14%- Ca(OH)_2 , 25.07%- CaCl_2 , 55.76% - CaSO_4 , 26.8%- CaCO_3 . Varios factores contribuyen a las diferencias de retención de antocianinas en el maíz y los productos de la nixtamalización; entre otros factores están las características físicas de los maíces, el tiempo de cocimiento, el pH y la temperatura (Cuevas et al., 2008).

4.5.2 Contenido de fenoles

En cereales, los fenoles se agrupan en solubles o libres e insolubles o ligados. En el primer grupo se incluyen los fenoles libres, glucosados y esterificados, que se ubican en mayor cantidad en las capas periféricas de los granos (pericarpio, testa y células de aleurona). Los fenoles totales es la suma de los fenoles libres y fenoles ligados; en la Tabla 13 se muestra el contenido de fenoles totales.

Tabla 13. Distribución de fenoles totales por etapa de proceso

	Fenoles totales mg eq. ácido gálico/100 g b.s.			
	Tratamiento Ca(OH)_2	Tratamiento CaCl_2	Tratamiento CaSO_4	Tratamiento CaCO_3
Masa	297.49 ±6.83 ^c	229.05 ±2.81 ^d	380.27 ±0.865 ^a	312.57 ±1.73 ^b
Tlayuda Fresca	127.59 ±3.63 ^c	138.46 ±0.474 ^b	125.23 ±3.57 ^c	175.70 ±0.92 ^a
Tlayuda Almacenada	103.69 ±0.562 ^c	183.94 ±9.13 ^a	118.70 ±3.33 ^{bc}	124.34 ±9.94 ^b
Digestión	165.16 ±10.9 ^b	225.55 ±6.39 ^a	199.67 ±16.4 ^a	209.40 ±3.29 ^a

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente ($P < 0,05$). ±DE- Desviación estándar

El contenido total de fenoles en el grano de maíz fue de 213.44 ± 1.90 , después de la nixtamalización todos los tratamientos mostraron un aumento significativo de fenoles totales con respecto al contenido inicial del grano, el tratamiento de hidróxido de calcio mostró un

aumento del 39%, el de cloruro de calcio de 7.31%, el de sulfato de calcio un aumento del 78%, mientras que para el carbonato de calcio el 46%.

En la tortilla fresca, el tratamiento de carbonato de calcio mostró la mayor cantidad de fenoles totales con 175 mg de mg eq ácido gálico/100 g b.s., en conjunto, el tratamiento de sulfato de calcio e hidróxido de calcio no presentaron diferencia significativa, a su vez fueron los tratamientos que menor cantidad de fenoles totales retuvieron, con respecto al maíz nixtamalizado.

Después del almacenamiento en los tratamientos de cloruro de calcio, carbonato de calcio e hidróxido de calcio, hubo diferencia significativa sobre los fenoles totales. Por otra parte el tratamiento de sulfato de calcio no tuvo diferencia significativa con CaCO_3 , CaCl_2 .

La pérdida de fenoles totales después del almacenamiento de tortillas con respecto a la tlayuda fresca fue de la siguiente manera 29.23%- CaCO_3 , 18.72%- Ca(OH)_2 , 5.21%- CaSO_4 , en contraste con el tratamiento de cloruro de calcio, que aumentó el contenido de FT en un 32.85%.

Después de la digestión, todos los tratamientos de la nixtamalización ecológica no mostraron diferencia significativa entre sí sobre el contenido de fenoles totales, mientras que NE vs NT mostraron diferencia significativa entre sí. En las Tablas 14 y 15 se muestra el contenido de fenoles libres y ligados por etapa.

Tabla 14 Distribución de fenoles libres por etapa

	Fenoles libres mg eq. ácido gálico/100 g b.s.			
	Tratamiento Ca(OH)_2	Tratamiento CaCl_2	Tratamiento CaSO_4	Tratamiento CaCO_3
Masa	120.81 \pm 2.05 ^d	123.82 \pm 0.558 ^c	139.51 \pm 0.152 ^b	188.87 \pm 0.399 ^a
Tlayuda Fresca	84.174 \pm 0.881 ^c	90.751 \pm 0.298 ^b	81.710 \pm 3.57 ^c	145.05 \pm 0.342 ^a
Tlayuda Almacenada	68.441 \pm 0.371 ^a	59.599 \pm 8.02 ^d	77.039 \pm 2.17 ^c	103.02 \pm 8.25 ^b
Digestión	83.772 \pm 5.36 ^c	103.86 \pm 2.87 ^b	117.18 \pm 2.67 ^a	109.11 \pm 3.31 ^{ab}

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente ($P < 0,05$). \pm DE- Desviación estándar

El método Folin-Ciocalteu (F-C) es simple y útil para evaluar el contenido fenólico total en los alimentos. Sin embargo, otras sustancias no fenólicas de los alimentos, tales como ácido ascórbico, azúcares, aminas aromáticas, ácidos orgánicos y proteínas, también se reducen por el reactivo F-C (Prior, Wu, y Schaich, 2005), lo que podría conducir a la sobre la estimación del contenido fenólico. Esto podría explicar los resultados observados en este estudio.

Tabla 15 Distribución de fenoles ligados por etapa

	Fenoles ligados mg eq. ácido gálico/100 g b.s.			
	Tratamiento Ca(OH) ₂	Tratamiento CaCl ₂	Tratamiento CaSO ₄	Tratamiento CaCO ₃
Masa	176.68 ±4.77 ^c	205.23 ±2.25 ^b	240.76 ±0.713 ^a	123.69 ±1.34 ^d
Tlayuda Fresca	43.421 ±4.51 ^a	47.707 ±0.17 ^a	43.522 ±0.0096 ^a	30.658 ±0.578 ^b
Tlayuda Almacenada	35.256 ±0.191 ^b	24.34 ±9.94 ^a	41.665 ±1.18 ^b	21.322 ±1.72 ^c
Digestión	81.387 ±5.53 ^b	121.68 ±3.52 ^a	82.496 ±19.1 ^b	100.29 ±6.17 ^{ab}

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P<0,05). ±DE- Desviación estándar

La digestión gástrica aumentó significativamente la concentración de todos los compuestos fenólicos. Estos resultados sugieren que la digestión gástrica mejora la liberación de compuestos fenólicos de la matriz de la tortilla. Este hecho podría atribuirse principalmente al pH ácido y la actividad enzimática durante esta fase digestiva, que puede inducir la hidrólisis de algunos compuestos fenólicos unidos a otros componentes de los alimentos.

Del mismo modo, Baublis, et. al, (2000) y Liyana-Pathirana et. al., (2005) sugirieron que las condiciones gástricas aumentan la capacidad de extracción de compuestos fenólicos a partir de la matriz del alimento. Saura-Calixto, Serrano, y Goñi (2007) informaron que los fenoles ligados a compuestos de alto peso molecular, tales como proteínas y carbohidratos, pueden ser liberados por la acción de enzimas digestivas, que conduce a un aumento significativo en sus concentraciones después de la digestión gástrica. Tagliazucchi et. al., (2010) reportó un aumento entre 22% y 77% en el contenido de fenoles totales; los mismos

autores observaron que los compuestos fenólicos puros, como el ácido gálico, ácido cafeico, catequina y la quercetina, se mantuvieron estables después de la digestión gástrica, destacando la importancia de la matriz alimentaria y la interacción con componentes de la dieta en la liberación de compuestos fenólicos.

4.5.3 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante calculada por el método de DPPH, se muestra en la Tabla 16

Tabla 16 Distribución de capacidad antioxidante por etapa

	Capacidad antioxidante mg eq. ácido ascórbico/kg b.s.			
	Tratamiento Ca(OH) ₂	Tratamiento CaCl ₂	Tratamiento CaSO ₄	Tratamiento CaCO ₃
Masa	1011.5 ±6.48 ^b	1257.1 ±11.4 ^{ab}	1343.4 ±16.2 ^{ab}	1521.8 ±26.7 ^a
Tlayuda Fresca	618.39 ±4.68 ^b	836.51 ±1.84 ^a	526.99 ±36.1 ^c	616.57 ±45.1 ^b
Tlayuda Almacenada	233.25 ±28.4 ^c	386.62 ±12.2 ^b	446.46 ±9.51 ^a	379.72 ±29.2 ^b
Digestión	147.39 ±11.6 ^b	183.10 ±19.7 ^a	192.97 ±10.2 ^a	195.98 ±7.28 ^a

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P<0,05). ±DE- Desviación estándar

El tratamiento de carbonato de calcio mostró un contenido de CA significativamente mayor a todos los demás, los tratamientos de sulfato de calcio y cloruro de calcio no mostraron diferencia significativa con el de CaCO₃, a su vez, estos tratamientos no mostraron diferencia significativa con el tratamiento de la NT. El intervalo de actividad antioxidante fue entre los 1011.5-1521.8 mg eq. ácido ascorbico /kg b.s. En la elaboración de tortilla tlayuda, todos los tratamientos mostraron diferencia significativa, con una reducción en un 58%- Ca(OH)₂, 52%- CaCl₂, 63%- CaSO₄, 52%- CaCO₃ con respecto al maíz nixtamalizado.

Posterior al almacenamiento de 30 días, los tratamientos de NE mostraron diferencia significativa con la NT, en la NE el cloruro y el carbonato de calcio no mostraron diferencia significativa entre sí, mientras que el tratamiento de sulfato de calcio mostró superioridad en la retención de CA.

En la digestión todos los tratamientos de NE no mostraron diferencia significativa entre sí, NE vs NT si mostró diferencia significativa, mostrando la NE niveles más altos de CA en la digestión.

El contenido de AA en el grano de maíz fue de 2221 mg eq. ácido ascórbico/Kg b.s., con respecto a este valor, hasta la digestión, en general la NT presentó una pérdida del 94%, y para la NE una pérdida del 93%

Tendencias similares fueron reportadas también por Dewanto et. al., (2002) quienes encontraron que el proceso térmico de maíz dulce incrementó significativamente contenido de fenólicos libres, contenido de ácido ferúlico y la capacidad antioxidante total, principalmente por el incremento de contenido de ácido ferúlico libre y conjugado debido a la liberación de ácidos ferúlico ligados en la forma de glucósidos conjugados. El incremento de la actividad antioxidante por procesos térmicos se puede explicar por el incremento en la cantidad de la solubilización de esteres de ácido ferúlico, la presencia de mayor cantidad de fenoles ligados en maíz y probablemente por efectos aditivos y sinergismo de otros fitoquímicos como fenoles y flavonoides (Eberthardt et al., 2000). En alimentos se ha reportado que el cocimiento incrementa o reduce la actividad antioxidante de los alimentos dependiendo de la naturaleza y la estructura molecular de los compuestos antioxidantes.

Dewanto et. al., (2002) reportaron de 8-10 veces más alta la cantidad de ácido ferúlico obtenido de los extractos de fitoquímicos solubles obtenidos por procesos térmicos después de ser sometidos a hidrólisis, por lo que el incremento de actividad antioxidante encontrado en las harinas de las variedades sometidas a tratamientos de NE y NT en este trabajo, se puede explicar por la liberación de fenoles ligados, efectos aditivos y sinergismo de otros fitoquímicos y la hidrólisis favorecida por la temperatura y las sales utilizadas en los tratamientos de NE y NT.

Por otra parte, Maya Cortés et al. (2010) y Campechano et al. (2012) encontraron que las harinas con el proceso de nixtamalización ecológica retienen casi intacto el pericarpio, por la inhibición de la hidrólisis del grupo éster del ácido ferúlico que está ligado

covalentemente con los arabinosilanos o gomas que forman el pericarpio del grano, permitiendo la retención de compuestos fenólicos en dicha estructura.

4.5.4 Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad se refiere a el porcentaje de compuestos que son disponibles para que el organismo pueda absorberlos, la bioaccesibilidad se calculó con respecto a la tortilla almacenada, fue este material que se trató en análisis de digestibilidad gastrointestinal *in vitro*. En la Tabla 17 se presentan los resultados obtenidos:

Tabla 17. Biodisponibilidad de compuestos nutraceuticos en tortilla tlayuda

	Biodisponibilidad (%) Compuestos nutraceuticos por tratamiento			
	Tratamiento Ca(OH) ₂	Tratamiento CaCl ₂	Tratamiento CaSO ₄	Tratamiento CaCO ₃
Antocianinas	51.543±4.09 ^b	67.249±2.95 ^a	39.251±2.64 ^c	70.563±2.21 ^a
Fenoles totales	80.795±5.39 ^b	59.217±3.15 ^c	98.744±2.51 ^a	93.846±11.3 ^{ab}
Actividad antioxidante	62.425±9.14 ^a	32.632±2.59 ^b	29.731±0.74 ^b	39.951±1.40 ^b

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, c, etc.) difieren significativamente (P<0,05). ±DE- Desviación estándar

En el contenido de antocianinas en los tratamientos de carbonato de calcio y cloruro de calcio no tuvieron diferencia significativa entre sí, siendo este par de tratamientos los que tuvieron una mayor biodisponibilidad de compuestos antocianos, seguidos del hidróxido de calcio con un 51%, mientras que el sulfato de calcio presentó la menor biodisponibilidad, con el 39%.

La biodisponibilidad de fenoles solo se realizó en fenoles totales, como ya se había explicado anteriormente en la metodología, las alícuotas tomadas después de 24 horas son del sobrenadante, y solo es posible medir fenoles totales, por la imposibilidad de obtener extractos.

El conjunto de sulfato de calcio y carbonato de calcio presentaron la mayor bioaccesibilidad de FT con un promedio del 95% no habiendo diferencia significativa entre dichos tratamientos, a su vez el carbonato de calcio no presentó diferencia significativa con el tratamiento de hidróxido de calcio que tiene una biodisponibilidad del 80%, el tratamiento de cloruro de calcio presentó la menor biodisponibilidad de estos compuestos con el 59%.

En actividad antioxidante, el tratamiento de hidróxido de calcio presentó la mayor bioaccesibilidad con el 62%, mientras que todos los tratamientos de la nixtamalización ecológica con una media menor, no presentó diferencia significativa entre sí.

4.6 Contenido de compuestos nutraceuticos en el segundo ensayo

En esta sección se discute acerca del contenido de antocianinas (ANT), capacidad antioxidante (CA), fenoles totales (FT), fenoles libres (FL) y fenoles ligados (FLG) desde el maíz hasta la digestión in vitro (DiV) en tortillas tlayudas (TTL) y tortillas tradicionales (TTR).

4.6.1 Compuestos nutracéuticos en el grano

El contenido de Antocianinas (ANT) por fracción anatómica se muestra en la Tabla 18,

Tabla 18. Antocianinas en fracciones anatómicas de maíz

Fracción anatómica	Antocianinas (mg eq. cianidyn 3-glucósido/ kg b.s.)		Porción de la fracción
	Maíz fresco	Maíz almacenado	
Pericarpio	181.3 ±0.00 ^d	212.7 ±1.03 ^c	0.0538 ±0.00 ^d
Endospermo	514.9 ±0.01 ^b	431.4 ±0.65 ^a	0.8274 ±0.01 ^b
Germen	194.1 ±0.01 ^c	142.7 ±0.53 ^d	0.1186 ±0.01 ^c
Grano	558.8 ±0.00 ^a	385.3 ±0.47 ^b	1.0000 ±0.00 ^a

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, etc) difieren significativamente (P< 0.05) ±DE

Si se toma como base de cálculo 1 kilogramo de maíz en base seca, realizando un balance de masa, la contribución de antocianinas por fracción anatómica es de la manera como la Tabla 19 muestra.

Betrán en el 2001, reporta que en el endospermo del grano de maíz azul, la capa de aleurona contiene los pigmentos de antocianina azul que le confieren su color característico; en los resultados obtenidos, el contenido mayoritario del pigmento se encontró en el endospermo, fracción anatómica donde se encuentra la aleurona.

Tabla 19. Contribución de antocianinas en fracciones anatómicas de maíz

Maíz vc-42 como base de cálculo 1 kg en base seca

Fracción anatómica	Antocianinas (mg eq. cianidyn 3-glucósido)	
	Maíz fresco	Maíz almacenado
Pericarpio	9.75	11.44
Endospermo	426.03	356.94
Germen	23.02	16.92
Grano	558.8	385.3

Respecto al contenido de antocianinas totales en el maíz azul se han reportado entre 196.5 y 620.9 mg eq. de cianidina 3-glucosido/kg b.s. (Abdel-Aal et. al., 2006; Cortés-Gómez et. al., 2006; Escalante-aburto et. al., 2003); en el maíz VC-42 se encontró un contenido de 558.8 y 385.3 mg eq. de cianidina 3-glucosido/kg b.s., quedando dentro de los valores reportados.

Después del almacenamiento el pericarpio aumentó significativamente el contenido de ANT, lo que podría explicarse a la reducción del contenido de humedad, el mayor contenido de ANT se encuentra en la aleurona, la capa externa del endospermo, que al secarse podría adherirse más al pericarpio, y en un proceso de adsorción alguna fracción de ANT pudo quedar adherida al pericarpio, mismo proceso que podría explicar la disminución de ANT en el endospermo, sin embargo, la mayor reducción de ANT es a la degradación de estructuras químicas en el almacenamiento en donde intervienen varios factores como la luz y el tiempo, degradándose a estructuras más sencillas.

En el grano de maíz los compuestos fenólicos están conformados por flavonoides y ácidos fenólicos; estos últimos contribuyen a la tolerancia del grano al ataque de insectos (Serratos et al., 1987; Arnason et al., 1992). Se concentran en el pericarpio del grano libre o esterificados a las heteroxilanas que constituyen las hemicelulosas de esta estructura (Duodu et al., 2003).

En los resultados obtenidos el pericarpio contiene la mayor cantidad de fenoles libres, seguido del endospermo, mientras que la mayor cantidad de fenoles ligados están en el pericarpio y el endospermo.

El contenido de fenoles por kilogramo en fracciones anatómicas de maíz se presenta en la Tabla 20.

Tabla 20. Fenoles en fracciones anatómicas de maíz

Fracción anatómica	Fenoles (mg eq. ácido gálico/ kg b.s.)		
	libres	Ligados	Totales
Pericarpio	639.8 ±23.7 ^a	240.9 ±5.12 ^a	880.7 ±18.6 ^a
Endospermo	171.1 ±9.74 ^d	127.8 ±0.65 ^b	298.9 ±11.1 ^d
Germen	337.0 ±5.81 ^b	79.91 ±0.36 ^c	416.9 ±5.69 ^b
Grano	216.0 ±9.47 ^c	128.2 ±0.46 ^b	344.2 ±9.50 ^c

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, etc) difieren significativamente (P< 0.05) ±DE

De forma similar como se hizo con el contenido de antocianinas, tomando como base de cálculo 1 kilogramo de maíz en base seca, realizando un balance de masa, la contribución de fenoles por fracción anatómica es como se presenta la Tabla 21.

Tabla 21 Contribución de fenoles en fracciones anatómicas de maíz

Maíz vc-42 como base de cálculo 1 kg en base seca

Fracción anatómica	Fenoles (mg eq. ácido gálico)		
	libres	Ligados	Totales
Pericarpio	34.42	12.96	47.38
Endospermo	141.57	105.74	247.31
Germen	39.97	9.48	49.44
Grano	216	128.2	344.2

El endospermo es la fracción anatómica que contribuye la mayor cantidad de fenoles libres y de fenoles ligados, lo que presupone una menor pérdida de fenoles durante la nixtamalización.

La capacidad antioxidante por kilogramo en base seca en las fracciones anatómicas de maíz se muestra en la Tabla 22

Tabla 22 Capacidad antioxidante en fracciones anatómicas de maíz

Fracción anatómica	Capacidad antioxidante (mg eq. ácido ascórbico/ kg b.s.)
Pericarpio	861.8 ±12.3 ^a
Endospermo	281.1 ±3.43 ^c
Germen	290.8 ±9.04 ^c
Grano	311.3 ±3.23 ^b

Los valores con diferentes superíndices en la misma fila (a, b, etc) difieren significativamente (P< 0.05) ±DE

De manera similar, tal como se hizo en el contenido de antocianinas y de fenoles, como base de cálculo 1 kilogramo de maíz en base seca, realizando un balance de masa, la contribución de capacidad antioxidante por fracción anatómica es de la manera como en la Tabla 23 se muestra.

Tabla 23 Contribución de actividad antioxidante en fracciones anatómicas de maíz

Maíz vc-42 como base de cálculo 1 kg b.s.

Fracción anatómica	Capacidad antioxidante (mg eq. ácido ascórbico)
Pericarpio	46.35
Endospermo	232.6
Germen	34.48
Grano	311.3

La mayor contribución de capacidad antioxidante es del endospermo, lo que se podría explicar que esta fracción anatómica contiene la mayor cantidad de fenoles libres y ligados, así como de antocianinas, las diferencias observadas pueden ser atribuidas a los antecedentes genéticos, las propiedades físicas del grano, y la relación relativa de pericarpio y el endospermo, que son las estructuras más ricas en compuestos fenólicos (Adom et. al., 2002; Salinas-Moreno et. al.,2013; Mora-Rochin et. al., 2010; Campechano et. al.,2012).

4.6.2 Compuestos nutracéuticos en masa

El contenido de compuestos nutracéuticos en masa se muestra en la figura 4

Figura 4. Compuestos nutracéuticos en masa

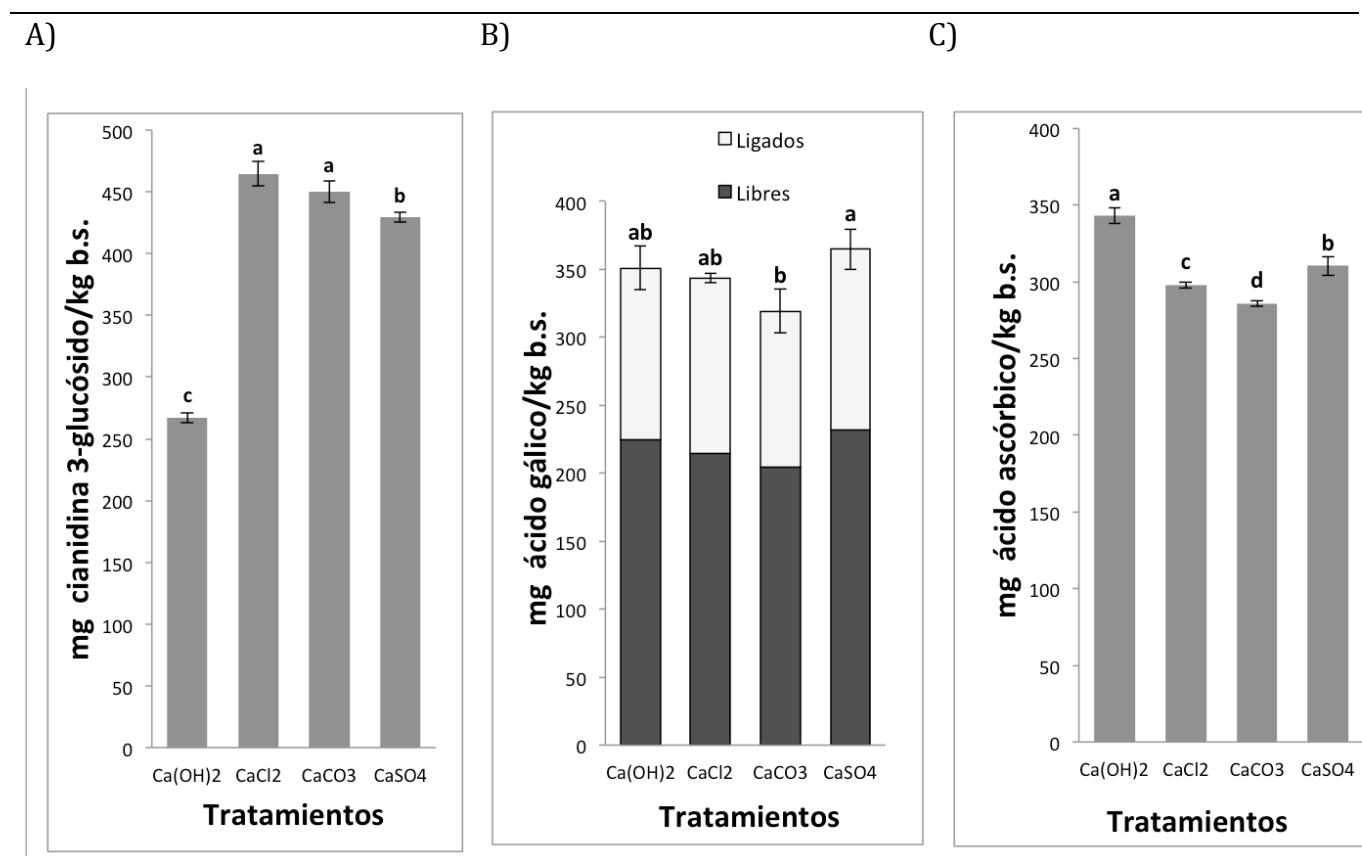


Figura 4 Contenido de antocianinas (A), contenido de fenoles totales (B), capacidad antioxidante (C) por tratamiento en masa de maíz. Letras diferentes (a,b,c) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

En el gráfico A de la figura 4 se puede observar el contenido total de antocianinas en el maíz nixtamalizado, expresado como mg eq. cianidina 3-glucósido/kg b.s., la nixtamalización tradicional, es decir el tratamiento de hidróxido de calcio muestra la menor cantidad de ANT, este tratamiento es significativamente diferente a NE, mostrando todos los tratamientos de NE medias mayores de ANT con respecto a NT, mientras que la NT presenta la pérdida del 30% de ANT, la nixtamalización ecológica mostró un aumento entre el 11 y el 20% con respecto al maíz.

Se ha sugerido que en la nixtamalización tradicional el efecto sinérgico del pH alcalino y la temperatura en la estructura de grano degrada las estructuras de ANT (Cortés et al., 2006; De la Parra et al., 2007). ANT son más estables en un medio ácido, donde la forma predominante es el ion de flavilio. En un ambiente alcalino el ion flavilio es susceptible al ataque nucleófilo del agua, produciendo una pseudo-base carbinol (Cuevas-Montilla et al., 2008). Sin embargo, las antocianinas de tipo acilado, como la petanina [petunidina 3-(6",4" p-coumarilramnosido)-5 glucósido] son más estables, y conservan su color característico con pH alcalino (Fossen et al., 1998).

El incremento de la proporción de la cianidina 3-glucósido en el nixtamal de NE podría estar relacionado con la degradación de las antocianinas que son de tipo acilado, y de acuerdo con los reportes de Fossen et al., (2001) y de Pascual-Teresa et al., (2002) corresponden a cianidina 3-(6"-malonilglucósido) y cianidina 3-(3",6" dimalonilglucósido). Ambas son derivados de la cianidina y posiblemente el enlace éster con el que está unido el radical malonil al azúcar, sea sumamente inestable a las condiciones de temperatura y pH que se dan durante el proceso de nixtamalización, y sean degradadas a cianidina 3-glucósido.

En el gráfico B de la figura 4, se presenta el contenido de fenoles totales, presentados como la suma de fenoles libres más fenoles ligados, expresados en mg eq. De ácido gálico por kilogramo en base seca con respecto al maíz, NT y el tratamiento sulfato de calcio en NE, con respecto al maíz mostraron un aumento en fenoles totales del 1.94 y 5.98% en el mismo orden, sin embargo, los tratamientos restantes de NE no muestran diferencia significativa entre ellos sí, sin embargo a excepción del tratamiento de sulfato de calcio,

ningún tratamiento muestra diferencia significativa con el contenido de fenoles totales con respecto al maíz. El mismo comportamiento existe en fenoles libres y ligados.

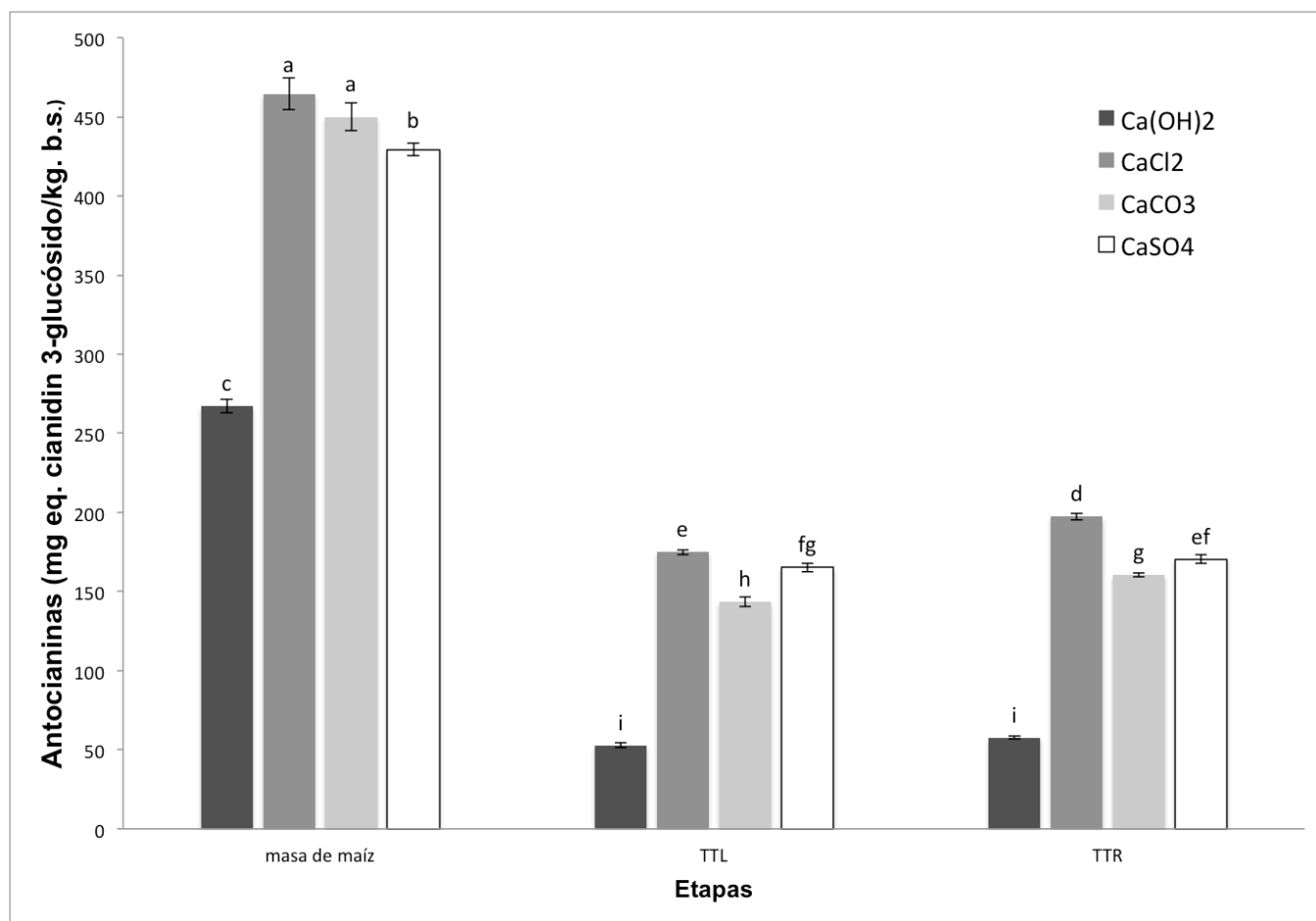
La hidrólisis alcalina que sufren las diferentes estructuras del grano durante el cocimiento con agua más Ca(OH)_2 en la nixtamalización, induce a la liberación de la mayoría de los compuestos fenólicos ligados a las hemicelulosas del pericarpio y la ruptura de enlaces con las heteroxilanas (Duodu et al., 2003). El efecto combinado del medio alcalino con los tratamientos térmicos durante nixtamalización y la lixiviación de los compuestos fenólicos en la solución de cocción influyen en gran medida la pérdida total de compuestos fenólicos, pasando al licor de cocción, puesto que de los sólidos presentes en el nejayote, la mayor proporción corresponde al pericarpio desprendido del grano (Pflugfelder et al., 1988)

En el gráfico C de la figura 4 se puede observar la Capacidad antioxidante, expresado como mg eq. ácido ascórbico /kg b. s., NT muestra un aumento del 10% de CA, mientras que el los tratamientos de NE presenta una disminución del 4 y 8% para Cloruro de Calcio y carbonato de calcio, el tratamiento de sulfato de calcio no muestra diferencia significativa entre el contenido inicial de CA en el grano, recordando que el contenido mayor de FT fue en NT que mostró un aumento de CA y en sulfato que no mostró diferencia significativa con respecto al grano, Del Pozo-Insfrán et. al., (2007) sugirieron que los niveles de ácidos ferúlico, libres y esterificados, son responsables de la CA en maíces pigmentados.

4.6.3 Compuestos nutracéuticos en tortillas

El contenido de ANT en tortillas se muestra en la figura 5

Figura 3. Contenido de antocianinas en masa y tortillas



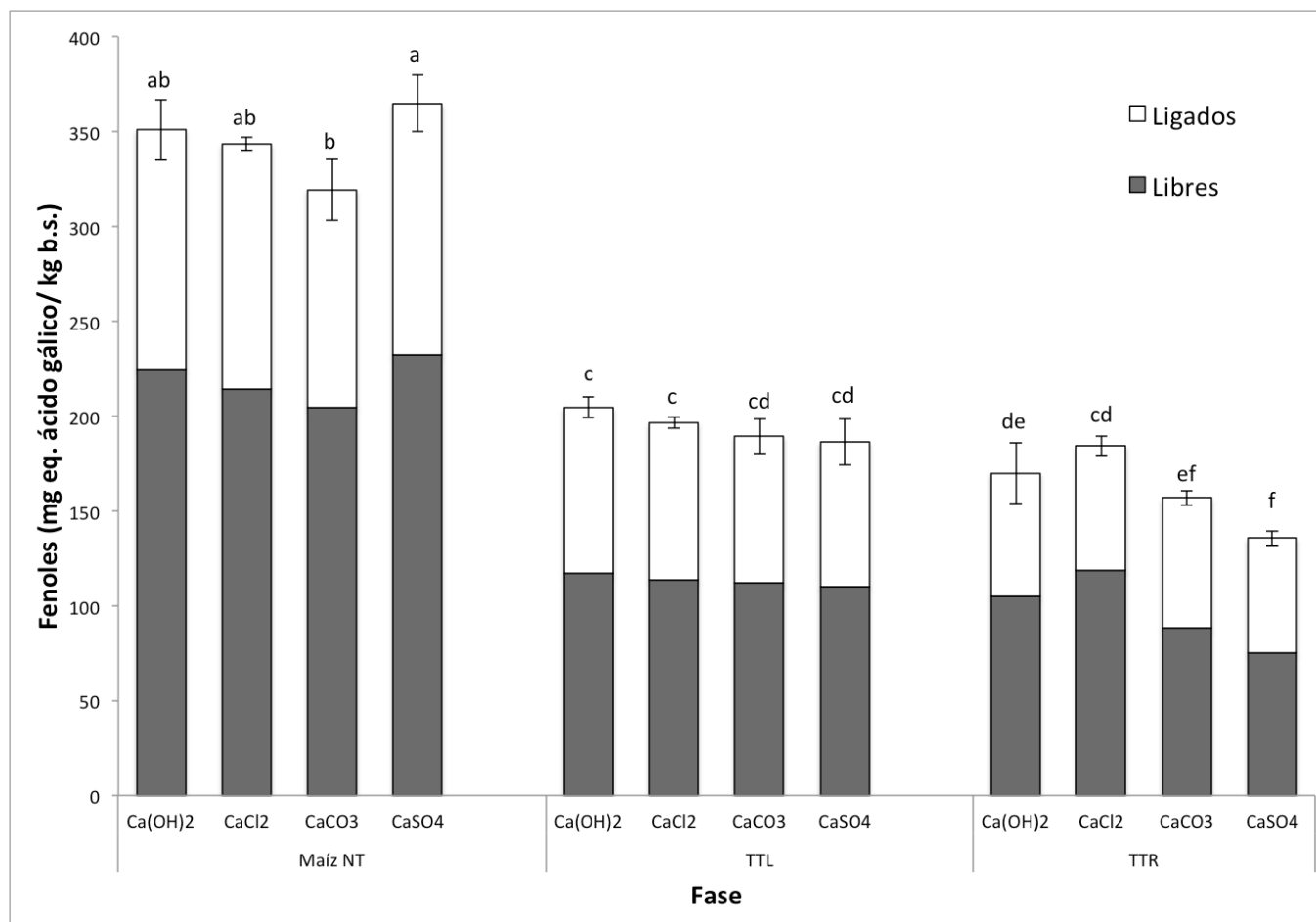
Los valores con diferentes superíndices (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

En la figura 5 se presenta el contenido de antocianinas expresadas en mg eq. de cianidin 3-glucósido/kg b.s. en tortillas tlayudas (TTL) y tortillas tradicionales (TTR). No hay diferencia significativa entre el contenido de ANT en TTL y TTR para el tratamiento de hidróxido de calcio con una pérdida promedio del 85% de contenido de ANT con respecto al maíz, con un porcentaje de pérdidas entre 48-58% TTR en todos los tratamientos de NE presenta medias mayores en el contenido de ANT contra TTL que presenta perdidas entre

54 y 62%. En general, NE retuvo en mayor proporción la cantidad de ANT con respecto a NT.

El contenido de fenoles totales en tortillas se muestra en la figura 6

Figura 6. Contenido de fenoles totales en masa y tortilla



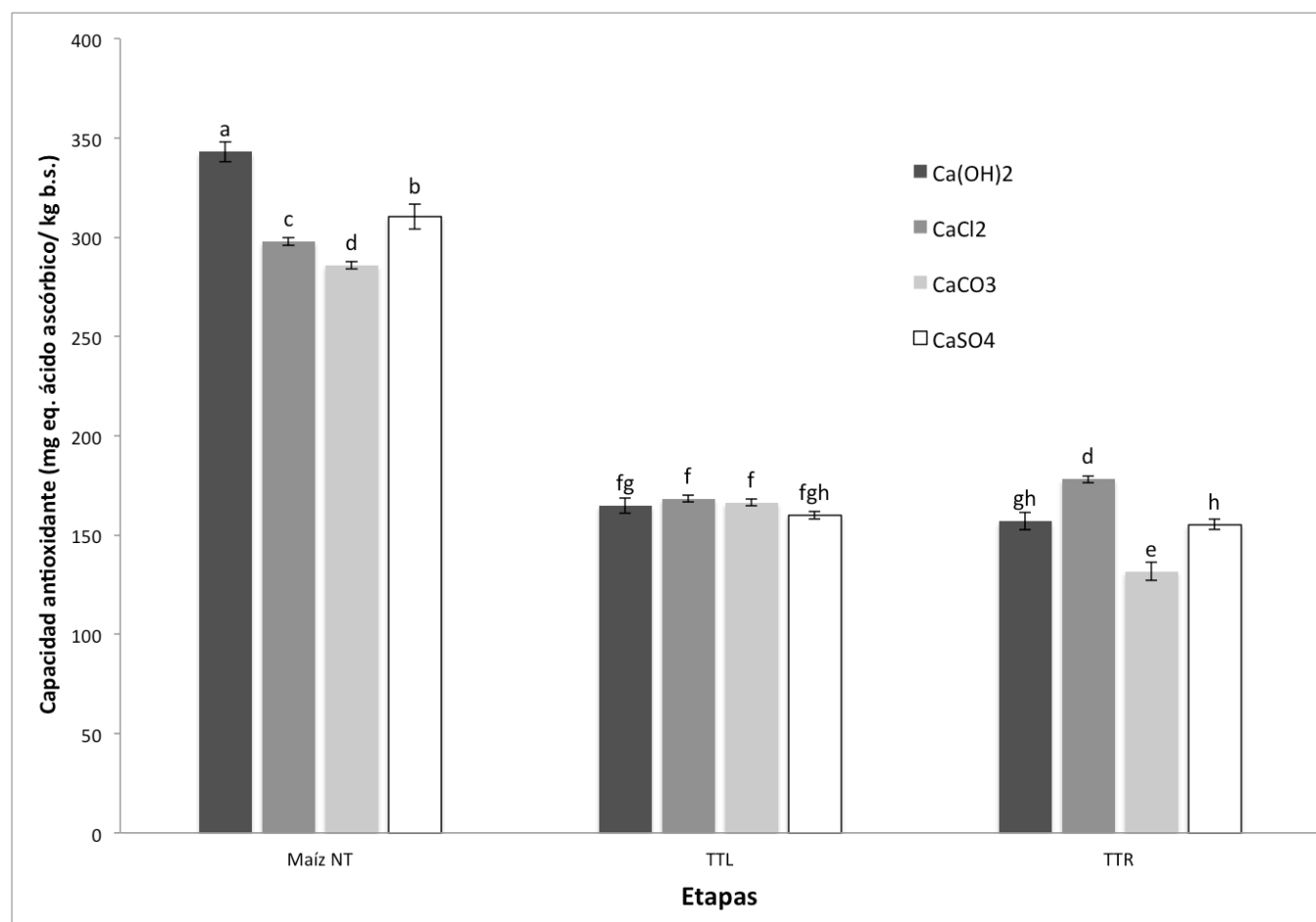
Los valores con diferentes superíndices (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

En la figura 6 se muestra el contenido de fenoles expresado en mg eq. De ácido gálico/ kg b.s. en TTL y TTR, con un promedio de pérdidas del 42% de fenoles totales con respecto al maíz, en todos los tratamientos de TTL no hay diferencias significativas en el contenido de FT, en TTR el tratamiento de cloruro de calcio e hidróxido de calcio no muestran diferencia significativa entre sí en el contenido de FT con un promedio de pérdidas del 48% de FT con respecto al maíz, carbonato de calcio y sulfato de calcio en TTR

muestran la menor cantidad de FT con una pérdida de casi el 60%. Comportamientos parecidos se encuentran si se analizan los resultados de fenoles libres.

La capacidad antioxidante en tortillas se muestra en la figura 7

Figura 7. Contenido de capacidad antioxidante en masa y tortillas



Los valores con diferentes superíndices (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

En el gráfico de la figura 7 se muestra la capacidad antioxidante expresada en mg eq. ácido ascórbico/kg b.s. en TTL y TTR. Con una pérdida promedio del 47% de CA con respecto al maíz, no hay diferencia significativa entre el contenido de CA en todos los tratamientos de TTL, en TTR el tratamiento de cloruro de calcio tiene el mayor contenido de CA; mientras que el tratamiento de carbonato de calcio tiene el menor contenido de CA con una pérdida del 58% con respecto al maíz.

La estabilidad de las antocianinas es muy variable y depende de su estructura, así como en la composición de la matriz en la que se encuentra (Giusti y Wrolstad 2001). Se ha sugerido que la rápida destrucción de ANT a altas temperaturas podría ser debido a la hidrólisis de la estructura 3-glucósido que tiene un efecto protector en una antocianina inestable. La otra sugerencia es que la hidrólisis de los anillos de pirilio que como resultado la producción de chalconas, que es responsable del color marrón que puede desarrollarse en un alimento que contiene antocianinas (Markakis 1982; Giusti et. al., 2001). Por lo que se sugiere que tiempos largos de cocción y la reducción de la transferencia de calor en la cocción de TTL tiene el mismo efecto que tiempos cortos de cocción y transferencia de calor por contacto directo de la placa caliente de cerámica sobre la estabilidad antocianinas en tortillas.

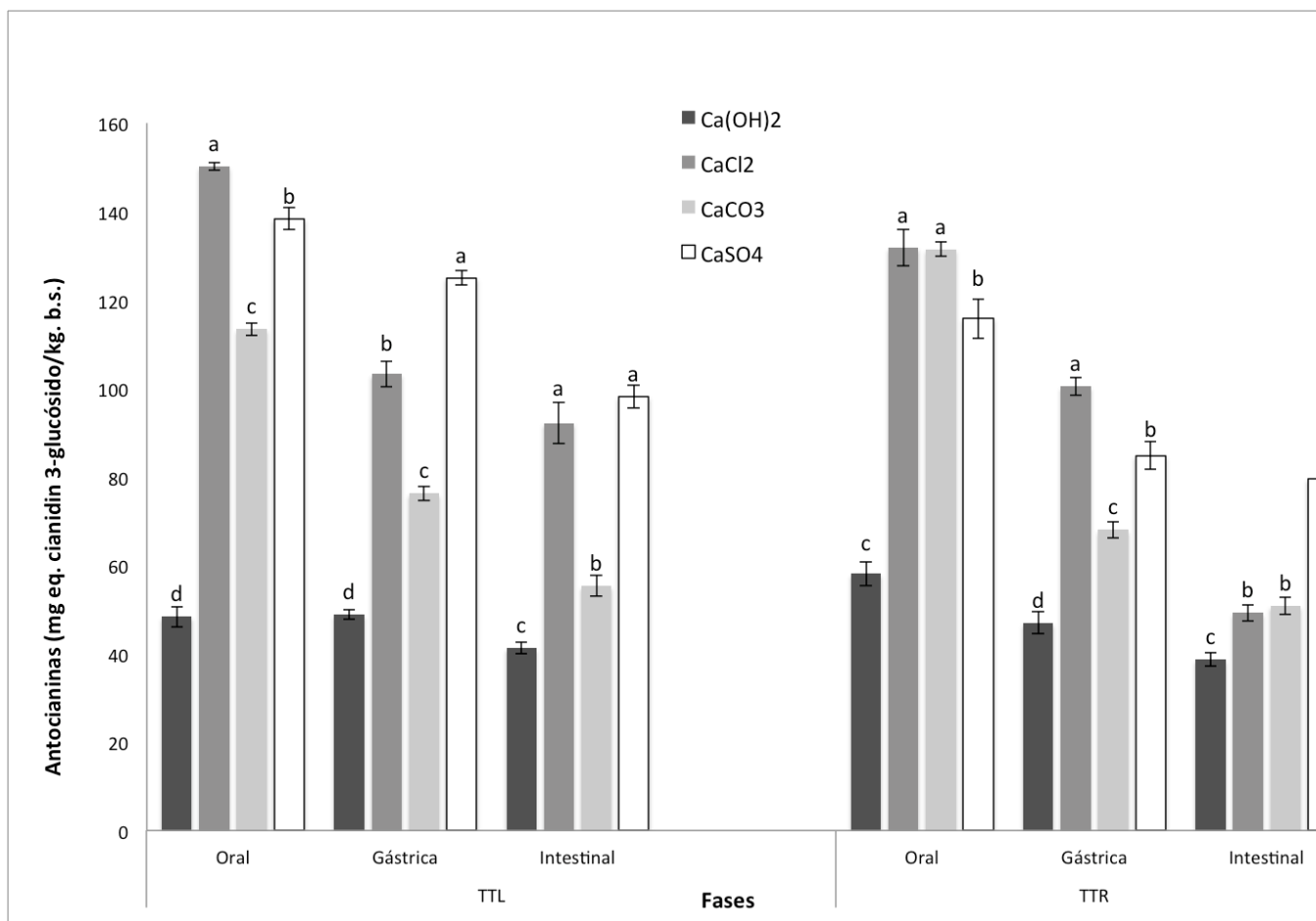
En contraste, investigaciones anteriores han determinado que la concentración y la presencia de polifenoles específicos en la matriz alimentaria tienen un profundo efecto sobre la estabilidad de ANT (Mazza et. al., 1993; Del Pozo-Insfrán et. al., 2007). La presencia de compuestos fenólicos ligados se puede atribuir al hecho de que son los más comúnmente unidos por enlaces éster a cadenas de hemicelulosa, en su mayoría con residuos de arabinosa, y que también se polimerizan con la lignina con enlaces éter (Klepacka y Fornal 2006). Además, el ácido ferúlico en las moléculas de pentosano forma compuestos específicos con proteínas de unión química con aminoácidos (Klepacka et. al., 2006). De acuerdo a Santiago Ramos (2015) las tortillas elaboradas con NE tiene valores más altos de proteína, grasa, fibra dietética total, la fibra insoluble y fibra soluble, en comparación con las tortillas elaboradas con NT

Los resultados de CA de esta investigación confirman lo sugerido por Del Pozo-Insfrán et. al., (2007), los niveles de CA están más relacionados con el contenido de fenoles libres y ligados que con ANT, sin embargo ambos tipos de compuestos contribuyen en CA. El aumento de las temperaturas promueven la formación de enlaces cruzados de proteínas con estos compuestos y todos estos cambios afectan a la retención de los CN

4.6.4 Compuestos nutracéuticos en digestión gastrointestinal in vitro de tortillas y bioaccesibilidad

El contenido de ANT en digestión in vitro se muestra en la figura 8

Figura 8. Contenido de antocianinas en digestión in vitro



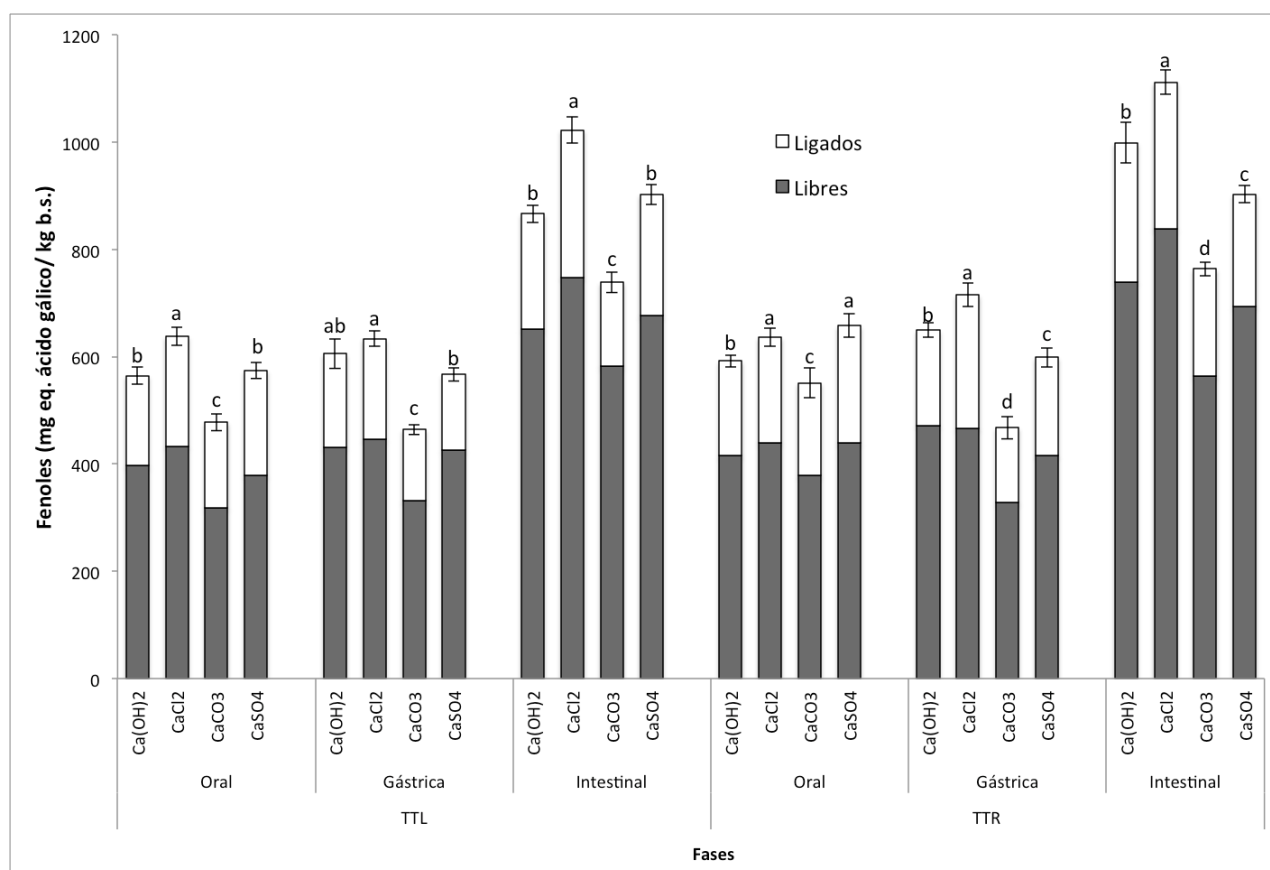
Los valores con diferentes superíndices en la misma etapa (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

El efecto de la digestión GI en antocianinas se muestra en la figura 8. Se presenta el contenido de antocianinas por cada etapa de la digestión gastrointestinal in vitro en todos los tratamientos. En general, la cantidad de antocianinas disminuyó al final de cada etapa de la digestión gastrointestinal, a excepción del tratamiento de hidróxido de calcio la disminución fue significativa. Las pérdidas en la fase oral fue hasta el 32% con respecto a la matriz alimentaria inicial y hasta el 87% con respecto al contenido inicial de maíz (maíz seco Tabla

18), La tortilla tradicional tiene un contenido mayor de ANT en comparación con TTL. Aunque NT tiene el menor contenido de ANT.

En tanto en TTL como en TTR, en el tratamiento de hidróxido de calcio, no hay diferencia significativa entre el contenido de ANT entre la fase oral y la fase gástrica, lo que sugiere mayor estabilidad de ANT en la matriz alimentaria de este tratamiento. Los contenidos de ANT al final de la digestión para TTL son $\text{CaSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{CaCO}_3 > \text{Ca(OH)}_2$ y para TTR $\text{CaSO}_4 > \text{CaCl}_2 - \text{CaCO}_3 > \text{Ca(OH)}_2$

Figura 9 Contenido de fenoles totales en digestión

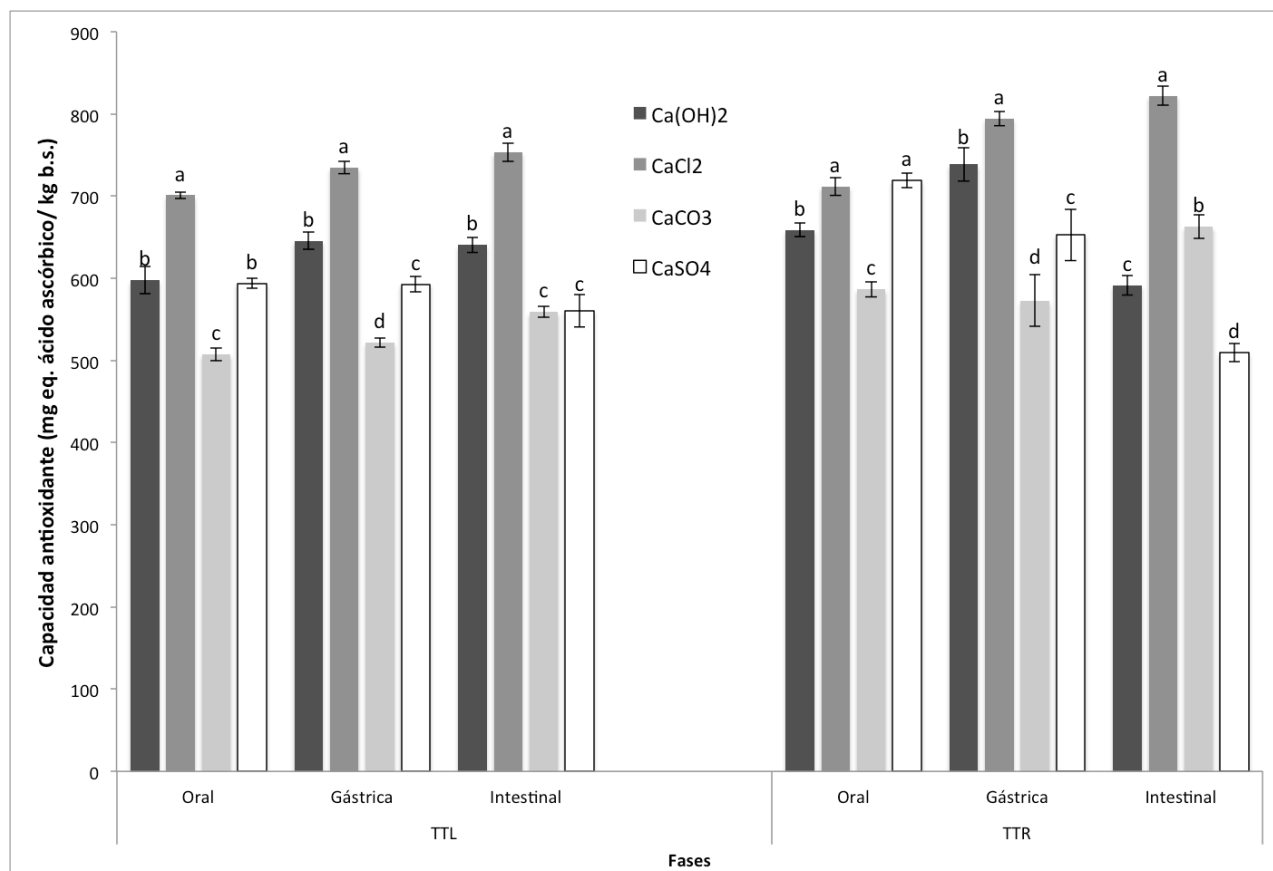


Los valores con diferentes superíndices en la misma etapa (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

El impacto de la digestión GI en fenoles totales se muestra en la figura 9. En general, la cantidad de compuestos fenólicos aumentó al final de cada etapa, El aumento de FT fue significativo del contenido de FT en la tortilla (figura 6) al contenido en la fase oral, y de la

fase gástrica a la fase intestinal. En comparación con los compuestos fenólicos cuantificados del grano de maíz (Tabla 20), muestra aumentos de FT de hasta cuatro veces más el contenido inicial, los contenidos de FT de mayor a menor son de la siguiente manera TTL $\text{CaCl}_2 > \text{CaSO}_4 > \text{Ca(OH)}_2 > \text{CaCO}_3$ y para TTR $\text{CaCl}_2 > \text{Ca(OH)}_2 > \text{CaSO}_4 > \text{CaCO}_3$.

Figura 10. Contenido de capacidad antioxidante en digestión



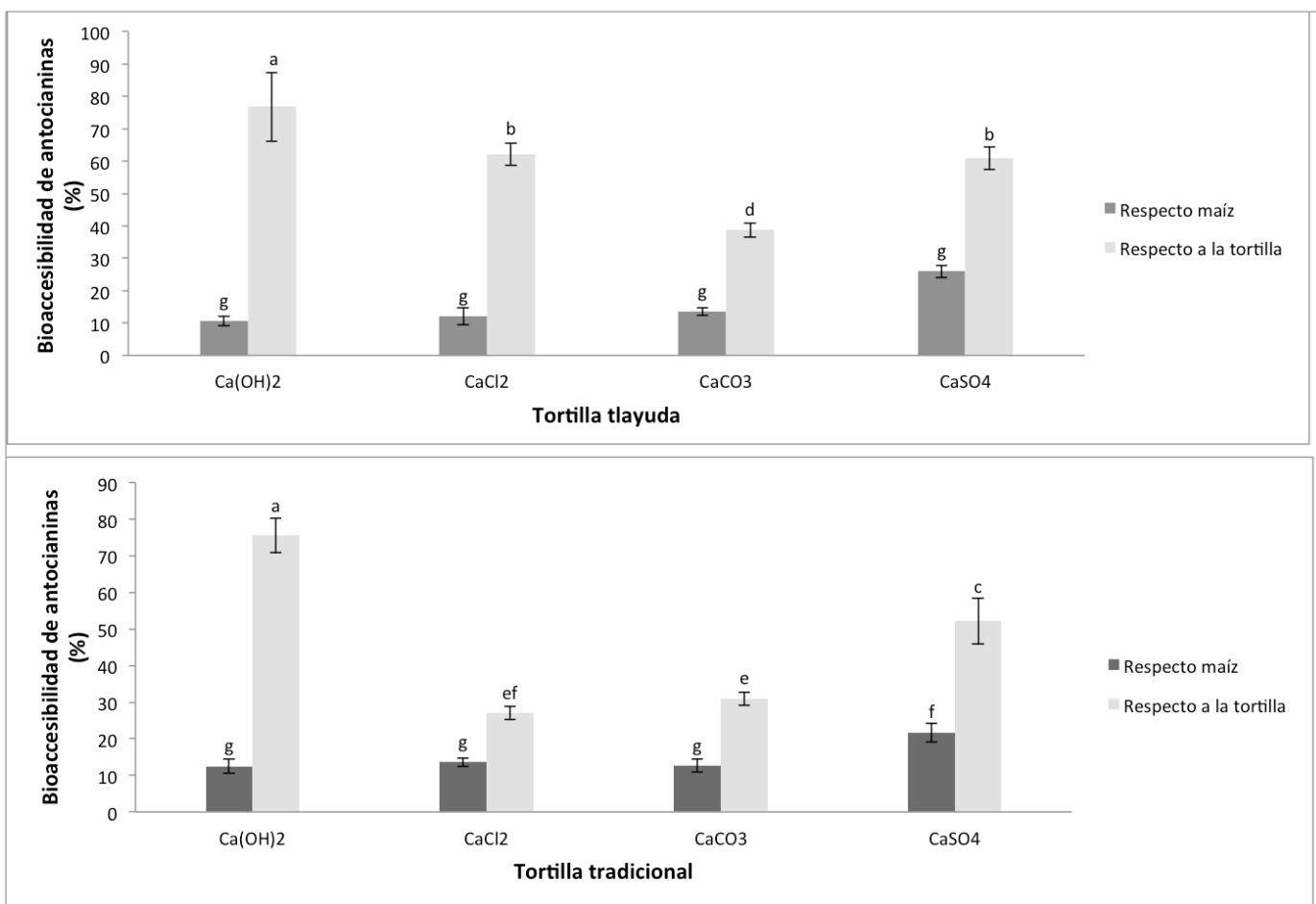
Los valores con diferentes superíndices en la misma etapa (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

El efecto de la digestión GI en capacidad antioxidante se muestra en la figura 10. En general, la cantidad de capacidad antioxidante aumentó al final de cada etapa, de la etapa oral a la gástrica, y de la gástrica a la intestinal fue significativo para todos los tratamientos a excepción de el de cloruro de calcio. Los resultados sugieren que la capacidad antioxidante es proporcionada en mayor proporción por los fenoles que por ANT. En comparación con la capacidad antioxidante cuantificado en el grano de maíz (Tabla 22), muestra recuperaciones de FT de hasta 4 veces más el contenido inicial, los contenido de CA de

mayor a menor son las siguientes TTL $\text{CaCl}_2 > \text{CaSO}_4 > \text{Ca(OH)}_2 > \text{CaCO}_3$ y para TTR $\text{CaCl}_2 > \text{Ca(OH)}_2 > \text{CaSO}_4 > \text{CaCO}_3$.

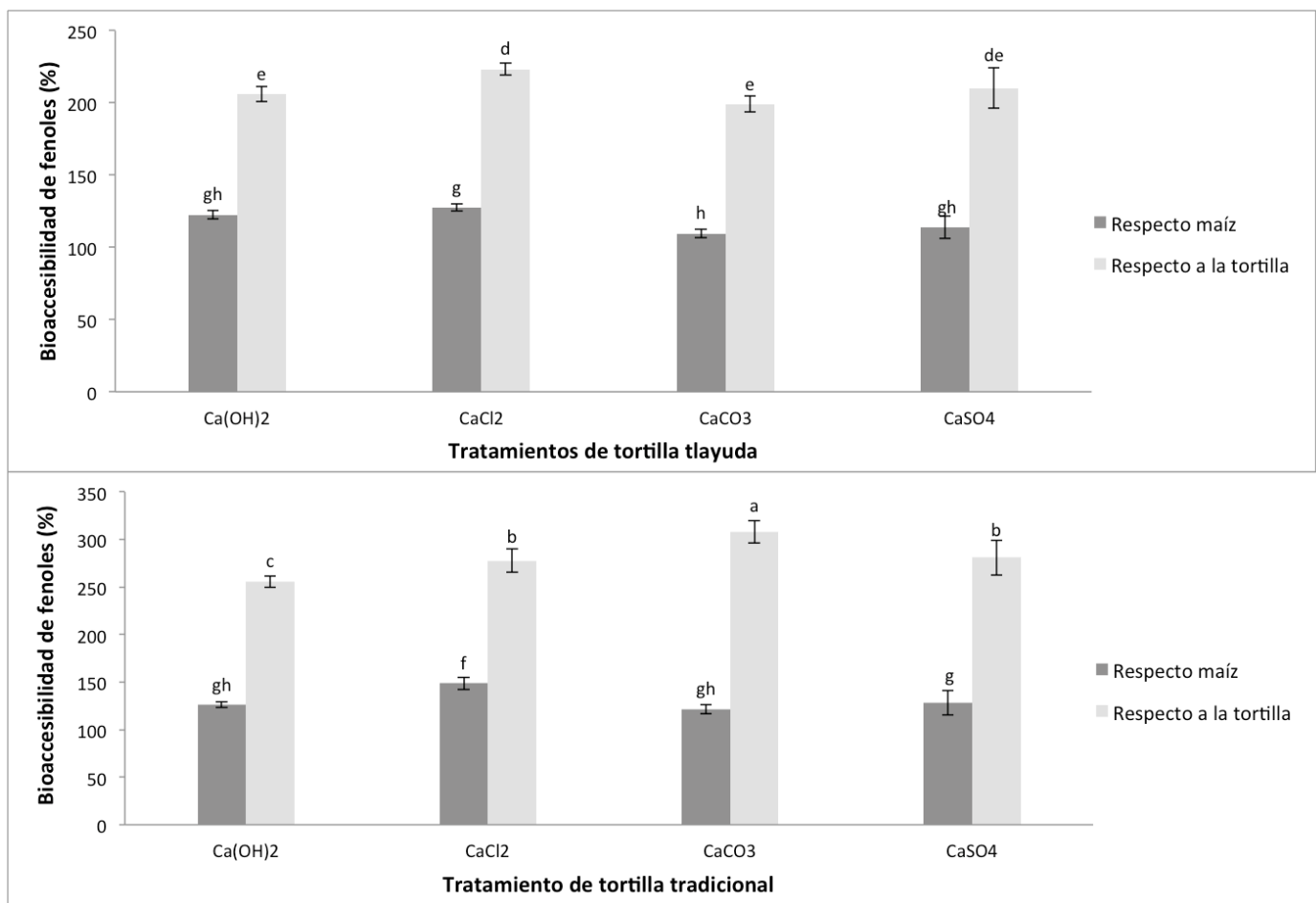
La proporción de compuestos nutracéuticos estudiados, tras superar el proceso digestivo, que se encuentra en forma soluble y por tanto es susceptible de atravesar la barrera intestinal se encuentra en las figuras 11, 12 y 13 que continúan.

Figura 11. Bioaccesibilidad de antocianinas en tortillas



Los valores con diferentes superíndices (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE.

Figura 12. Bioaccesibilidad de fenoles en tortillas



Los valores con diferentes superíndices en la misma etapa (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

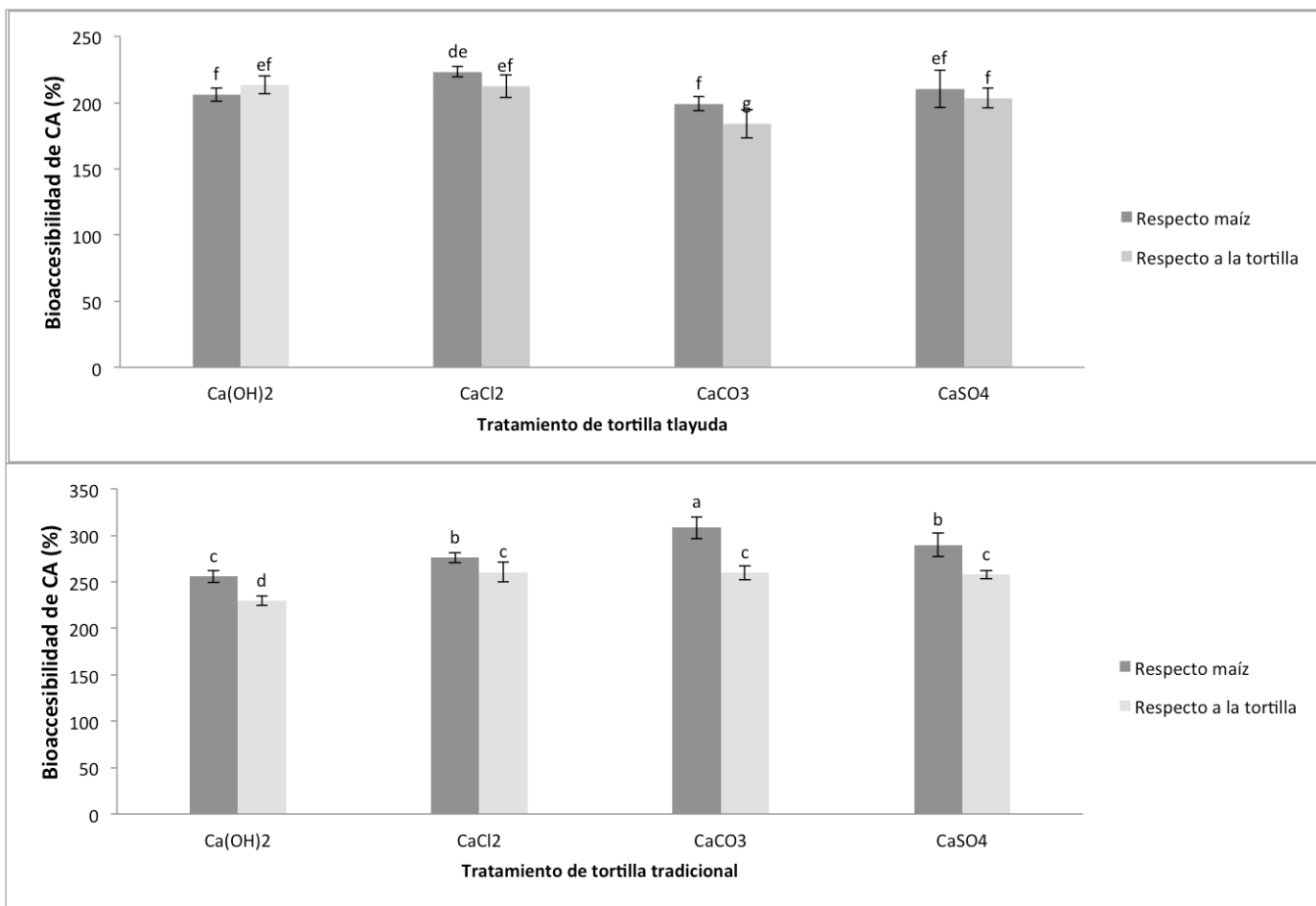
Existen diversos factores que interfieren en la bioaccesibilidad de estos compuestos, como la matriz alimentaria y las interacciones químicas con otros fitoquímicos y/o biomoléculas (Parada y Aguilera, 2007).

Los polifenoles no absorbibles asociados a la matriz alimentaria no son biodisponibles en el intestino delgado humano y llegan al colon, donde son sustratos fermentables para la microflora bacteriana (Saura-Calixto, 2010).

La naturaleza de fitoquímicos extraíbles, su estabilidad y su actividad antioxidante depende de muchos factores, tales como la matriz del alimento, el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, la presencia de enzimas, y otros

factores relacionados (McDougall et, al., 2005; Saura-Calixto et. al., 2007; Tagliacruz et. al., 2010).

Figura 13. Bioaccesibilidad de capacidad antioxidante en tortillas



Los valores con diferentes superíndices en la misma etapa (a, b, etc) difieren significativamente ($P < 0.05$) \pm DE

El tracto gastrointestinal humano puede considerarse como un extractor, en donde la masticación y la acción química durante la fase de digestión, contribuyen a la extracción de compuestos fenólicos de las matrices sólidas como las tortillas (Lafay et. al., 2008). En particular, la acción mecánica de la masticación influye en la degradación de las células y de la estructura de la matriz alimentaria que libera los compuestos fenólicos, que ocurre por solubilización directa (37° C, pH 1-7.5) y/o por acción de enzimas como alfa amilasa utilizada en esta fase, que hidrolizan los enlaces no covalentes entre los grupos hidroxilo de

los compuestos fenólicos y los grupos polares de las moléculas polisacáridas (Palafox-Carlos et. al., 2011).

La digestión gástrica mejora la liberación de compuestos fenólicos de la matriz de la tortilla. Este hecho se puede atribuir principalmente al pH ácido y la actividad enzimática durante esta fase, que puede inducir la hidrólisis de algunos compuestos fenólicos unidos a otros componentes de los alimentos. Del mismo modo, Baublis et. al., (2000) y Liyana-Pathirana et. al., (2005) sugirieron que las condiciones gástricas aumentan la capacidad de extracción de compuestos fenólicos a partir de la matriz del alimento. Saura-Calixto et. al., (2007) informaron que los fenoles con enlaces a compuestos de alto peso molecular, tales como proteínas y carbohidratos, pueden ser liberados por la acción de enzimas digestivas, que conduce a un aumento significativo en sus concentraciones después de la digestión gástrica. El aumento de fenoles totales después de la fase intestinal podría explicarse por el tiempo adicional de extracción (de 2 h) y/o el efecto de las enzimas digestivas intestinales (lipasa y pancreatina, con acciones acumuladas de amilasa y actividad de la proteasa que fue añadida en la fase oral) en la matriz del alimento complejo, lo que facilita la liberación de compuestos fenólicos unidos a la matriz.

Además de la dependencia de la actividad fenólica en condiciones circundantes, tales como el pH, la interacción de los compuestos fenólicos con otros componentes de la dieta liberados durante la digestión, tales como hierro y otros minerales, todos los cuales se sabe que son impacto de polifenoles solubilidad y disponibilidad (Argyri et. al., 2006; Mañach et. al., 2004; Saura-Calixto et. al., 2007). La estructura química de los compuestos fenólicos también juega un papel en la actividad de los radicales libres de captación, que depende principalmente del número y posición de los grupos hidroxilo que donan hidrógeno en los anillos aromáticos de las moléculas fenólicas (Rice-Evans et. al., 1996).

La disminución de antocianinas después de la digestión intestinal y gástrica, sugiere su degradación después de la transición de la fase gástrica-ácida a la fase intestinal-alcalina al medio ambiente intestinal alcalino suave, y el impacto de los ácidos biliares y pancreatina. Se cree que la transición de ácido a medio alcalino aumenta el poder antioxidante de los

compuestos fenólicos al causar la desprotonación de los restos hidroxilo presentes en sus anillos aromáticos.

La reducción del contenido de fenoles en la bioaccesibilidad, incluso menor que la cantidad de fenoles libres que se esperaba encontrar, sugiere la liberación incompleta o la degradación de compuestos fenólicos.

En la bioaccesibilidad se encontró una menor cantidad de fenoles a comparación de los fenoles libres al final de la digestión gastrointestinal *in vitro*, lo que sugiere la liberación incompleta o la degradación de compuestos fenólicos.

CAPITULO V. Conclusiones y recomendaciones.

5.1 Conclusiones

Se puede considerar al maíz azul VC-42 como un grano rico en CN, la distribución de CN en las fracciones anatómicas permite obtener productos de maíz nixtamalizado rico en este tipo de compuestos.

Las tortillas tlayudas son tortillas ricas en compuestos nutraceuticos, y que además es una fuente rica de compuestos bioactivos bioaccesibles.

El licor de cocción de la nixtamalización ecológica tienen un pH neutro o ligeramente ácido, que permite menores pérdidas de materia seca y de fenoles por lixiviación.

En nixtamalización, el proceso ecológico tiene aumento de hasta el 20% antocianinas mientras que el proceso tradicional tiene pérdidas del 30%. La nixtamalización tradicional tiene mayores niveles de capacidad antioxidante y de fenoles totales comparados con la nixtamalización ecológica.

El método de cocción de tortillas tiene un efecto significativo en la concentración de compuestos nutraceuticos, mientras que en el proceso de cocción de tortilla tlayuda los niveles de compuestos nutraceuticos no son afectados entre tratamientos, en la tortilla tradicional se encontraron diferencias entre los niveles de CN por diferencias de tratamiento térmico y de tipo de sal usado en la nixtamalización.

Al experimentar, la tortilla tradicional tiene una exposición térmica de forma directa, supeditada a una modificación de la matriz que contiene los compuestos nutraceuticos, ocasionando una degradación en cantidad y en variedad de los mismos. Por otra parte la cocción de tlayuda expone a la matriz alimentaria a un efecto térmico menos directo pero prolongado de tiempo, lo cual ocasiona una menor degradación de los compuestos nutraceuticos.

Las temperaturas en el método de cocción de tortillas tiene un efecto significativo en la concentración de los compuestos nutraceuticos, mientras que la tortilla tlayuda tiene niveles similares sin diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos en la concentración fenoles y capacidad antioxidante en los diferentes tratamientos, la tortilla tradicional si tiene diferencias significativas.

La bioaccesibilidad de compuestos nutraceuticos en combinación del método de cocción y el tipo de sal utilizado en la nixtamalización tienen un efecto sobre la matriz alimentaria reflejado en la liberación de compuestos nutraceuticos durante la digestión gastrointestinal in vitro de tortillas.

Aunque numéricamente la cantidad de compuestos biodisponibles con respecto al maíz en tortillas tradicionales es mayor que en tortillas tlayudas, las tortillas tlayudas presentan mayor biodisponibilidad de compuestos nutraceuticos, con lo que se sugiere que la matriz alimentaria de la tortilla tlayuda da estabilidad a los compuestos nutraceuticos.

De acuerdo a los resultados, a diferencia de las antocianinas totales, los fenoles contribuyen en mayor proporción a capacidad antioxidante; los fenoles libres son los fenoles bioaccesibles, aunque al final de la digestión gastrointestinal la cantidad de fenoles libres fue mayor, lo que sugiere la liberación incompleta o la degradación de fenoles.

El almacenamiento de tortillas tlayudas tiene un efecto negativo en el contenido de compuestos nutraceuticos, con pérdidas de hasta el 29% de fenoles, 15% de antocianinas y el 63% de la capacidad antioxidante después de 30 días.

Esta investigación sienta la base para la realización de futuras investigaciones acerca del comportamiento de compuestos antioxidantes en el tracto gastrointestinal provenientes de tortillas de maíz, en contraste con las investigaciones que atañen en la retención de compuestos nutraceuticos en la matriz alimentaria sin saber la bioaccesibilidad de los mismos.

5.2 Recomendaciones

Se necesita mayor investigación para indagar la biodisponibilidad y la identificación de polifenoles, que al estar ligados a compuestos macromoleculares posiblemente están siendo sobreestimados por la extracción química.

Aunque los resultados obtenidos con este modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* no pueden extrapolarse de manera directa al ser humano en condiciones *in vivo*, se sugiere que es útil para la investigación, y saber el comportamiento de la matriz alimentaria, factores relacionados con los componentes de interés, tales como efecto de las enzimas que afectan la bioaccesibilidad de CN.

CAPITULO VI. Bibliografía

- Abdel-Aal E.S., C.J. Young, I. Rabalski. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 54:4696-4704.
- Abdel-Aal E.S.M., P. Hulc. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem* 76:350–4.
- Adom K. K., R. H. Liu . 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50:6182-6187.
- Agama-Acevedo E., M.A. Ottenhof, M.I. Farhat, O. Paredes-López, J. Ortíz-Cereceres, L.A. Bello-Pérez. 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia* 29:643-649.
- Agama-Acevedo E., Y. Salinas-Moreno, G. Pacheco-Vargas, L.A. BelloPérez. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: Morfología del almidón. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2:317-329.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, Vol. II, 15th ed. Arlington, VA: The Association.
- Aoki H., Kuze N. , Kato Y. 2002. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods Food Ingredients J. Jpn.* 199: 41–45.
- Argyri K., Komaitis M., Kapsokefalou M. 2006. Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281–289.
- Bakan B., Bily A.C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogene B.J.R., Richard- Molard D. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J Agric Food Chem* 51:2826–1.
- Baublis A., Decker E.A., Clydesdale F.M. 2000. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68(1), 1–6.
- Betrán F.J., A.J. Bockholt, L.W. Rooney. 2001. Blue corn. In: *Specialty Corns*. A R Hallauer (ed). Iowa State University, Ames Iowa, USA. pp:293-337.
- Bordignon-Luiz M.T., C. Gauche, E.F. Gris, L.D. Falcao . 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Sci. Technol.* 40:549-599.
- Bouayed J. 2010 . Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 13–18.

- Bouayed J., Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 228–237.
- Cabrera-Soto M L, Salinas-Moreno Y., Velázquez-Cardelas G. A., E Espinosa-Trujillo. (2009) Content of soluble and insoluble phenols in the structures of corn grain and their relationship with physical properties. *Agrociencia* 43:827-839.
- Campechano C.E.M., Figueroa J.D.C., Arámbula V.G., Martínez F.H.E., Jiménez S.J.S., Luna B. J.G. 2012. New ecological nixtamalization process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole corn flour and wastewater effluents. *Intl J Food Sci Technol* 47:64–71.
- Choi S., Chung M.J., Lee S.J., Shin J.H., Shung N.J. 2007. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control*, 18, 485-491.
- Cortes-Gómez A., Salinas M.Y., San Martín-Martínez E., Martínez-Bustos F. 2006. Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *J Cereal Sci* 43:57–62.
- Cortés-Gómez A., E. San Martín-Martínez, F. Martínez-Bustos, G.M. Vázquez-Carrillo. 2005. Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by a fractionated process of nixtamalization: Analysis using response surface methodology. *J. Food Eng.* 66:273-281.
- Cuevas-Montilla E., Antezana A., Winterhalter P. 2008. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech*, Comunidad Europea, Cartagena, Spain.
- De la Parra C., Serna Saldívar S.O., Hai L.R. 2007. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *J Agric Food Chem* 55:4177–83.
- De Pascual-Teresa S., C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo .2002 . LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* 82:1003-1006.
- De Pascual-Teresa S., M.T. Sánchez-Ballesta. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem. Rev.* 7:281-299.
- Del Pozo-Insfran D., Serna-Saldivar S.O., Brenes C., Talcott S. 2007. Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chem* 84:162–8.
- Dewanto, V.; Wu, X.; Liu, R. H. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50:4959–4964.

- Duodu K.G.K., J.R.N. Taylor, P.S. Belton, and B.R. Hamaker. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38:117-131.
- Dykes L., L.W. Rooney . 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* 52:105-111.2
- Eberhardt M.V., Lee C.Y., Liu R.H. 2000. Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 405: 903-904
- Escalante-Aburto A., B. Ramírez-Wong, P.I. Torres-Chávez, J.D. Figueroa Cárdenas, J. López-Cervantes, J.M. Barrón-Hoyos, I. MoralesRosas. 2013. Effect of extrusion processing parameters on anthocyanin content, physicochemical properties of nixtamalized blue corn expanded extrudates. *CyTA-J. Food* 11:29-37.
- Escalante-Aburto A., Ramírez-Wong B., Torres-Chávez P., Barrón-Hoyos M., Figueroa-cárdenas J. D. D., López-Cervantes J. (2013). La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 429 – 437.
- Escribano-Bailón M.T., C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo (2004) Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr.* 1054:129-141.
- Espinosa A., Tadeo M., Turrent A., Gómez N. (2009). El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz. *Revista Ciencias de la UNAM*, 92-93, 118–125.
- FAO. (1993). El maíz en la alimentación humana. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Colección FAO: Alimentación y nutrición. 25.
- Figueroa J.D.C., González-Hernández J. 2001. La Tecnología de la Tortilla. Pasado, Presente y Futuro. *Ciencia y Desarrollo.* 27(156):22-31.
- Figueroa J.D.C., A Rodríguez C, J J Véles M .2006 . Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas masas y tortillas integrales. Mexican Patent PA / a / 2005 / 011797.
- Figueroa J.D.C., González H.J., Arámbula V. G., Morales S. E. 1997. Tecnologías Ecológicas para la Producción de Tortilla. *Avance y Perspectiva* 16:363-374.
- Figueroa J.D.C., Martínez B.F., González H.J., Sánchez S.F., Martínez M. J.L., y Ruiz T. Mb .1994. Modernización tecnológica del proceso de nixtamalización. *Avance y Perspectiva.* 13:323- 329.
- Figueroa J.D.C., Rodríguez-Chong A., Véles Medina J.J. 2011. Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas, masa y tortillas integrales. Patente mexicana número 289339.

- Fossen T., L. Cabrita, O.M. Andersen. 1998. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* 63(4): 435-440.
- Fossen T., R. Slimestad, O. M. Andersen. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarigrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 2318-2321.
- Garzón G.A. (2008) Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. A review. *Acta Biol. Colomb.* 13:27-36.
- Gião, M. S., Gomes, S., Madureira A. R., Faria A., Pestana D., Calhau C., Malcata F. X. (2012). Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*. 131: 761-767.
- Granado-Lorencio F., Herrero-Barbudo C., Olmedilla-Alonso B., Blanco-Navarro I., Pérez-Sacristán B. 2008. Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: in vivo and in vitro study. *J Nutr Biochem.* 21: 133-139
- Giusti M.M., Wrolstad R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, editor. *Current protocols in food analytical Chemistry*. New York, EUA: John Wiley & Sons.
- Gómez M.H., C.M. McDonough, L.W. Rooney, R.D. Wanishka. (1989) Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. *J. Food Sci.* 53:330-336.
- González R., E. Reguera, L. Mendoza, J.M. Figueroa, F. Sánchez-Sinécio (2004) Physicochemical changes in the hull of corn grains during their alkaline cooking. *J. Agric. Food Chem.* 52:3831-3837.
- Holst B., G. Williamson. 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology.* 19(2):73-82.
- Horbowicz M., R. Kosson, A. Grzysiuk, H. Debski (2008) Anthocyanins of fruits and vegetables, their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Res. Bull.* 68:5-22.
- Hu Q., Xu J. 2011. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 59:2026-2033.
- Ichikawa H., T. Ichiyangi, B. Xu, Y. Yoshii, M. Nakajima, T. Konishi. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J. Med. Food* 4:211-218.
- Klepacka J., Fornal L. 2006. Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(8):639-47.
- Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T F, Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933.

- Lafay S., A. Gil-Izquierdo. 2008. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*. 7(2):301-311.
- Lee C.H., H.S. García, K.L. Parkin. 2010. Bioactivities of kernel extracts of 18 strains of maize (*Zea mays* L.). *J. Food Sci.* 75:C667-C672.
- Liu R.H. 2003. Health benefits of fruits and vegetables from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:517S-520S.
- Liu R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Am. J. Clin. Nutr.* 134:3479S-3485S.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi F. 2005. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2433–2440.
- López-Martínez L.X., H.S. García-Galindo. 2009. Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia* 3,2:51-65.
- López-Martínez L.X, K.L. Parkin, H.S. García. 2011. Phase II-Inducing, Polyphenols content and antioxidant capacity of corn (*Zea mays* L.) from phenotypes of white, blue, red, and purple colors processed into masa and tortillas. *Plant Food Hum. Nutr.* 66:41-47.
- López-Martínez L.X., Oliat-Ros R.M., Valerio-Alfaro G., Lee C.H., Parkin K.L., García H.S. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Sci Technol* 42:1187–92.
- Luten J., Crews H., Flynn A., Van Dael, P., Kastenmayer P., Hurrell R. 1996 . Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron Dialysability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 415–424.
- Mañach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. . 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Maya-Cortés D. C Figueroa C. J., Garnica-Romo M. G., Cuevas-Villanueva R. A., Cortés Martínez R. A., Véles-Medina J. J., Martínez-Flores H. E. 2010. Wholegrain corn tortilla prepared using an ecological nixtamalisation process and its impact on the nutritional value. *International J. Food Sci. Tech*, 45: 23–28 23
- Markakis P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. Anthocyanins as food colors .In: Markakis P, editor. New York: Academic Press. p 163–80.
- Mattila P., J.M. Pihlava, J. Hellström. 2004. Contents of phenolic acids, alkyl and alkenylresorcinols, and avenanthramides in comercial grain products. *J. Agric. Food Chem.* 53:8290-8295.

- Mazza G., Miniati E. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, FL: CRC Press.
- McDougall G. J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. 2005 . Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896–5904.
- Mendoza-Díaz S., M.C. Ortíz-Valerio, E. Castaño-Tostado, J.D.F. Cárdenas, R. Reynoso-Camacho, M. Ramos-Gómez, R. Campos-Vega, G.F. Loarca-Piña . 2012 . Antioxidant capacity and antimutagenic activity of anthocyanin and carotenoid extracts from nixtamalized pigmented creole maize races (*Zea mays* L.). *Plant Food Hum. Nutr.* 67:442-449.
- Miller D., Schrickler B. R. , Rasmussen R.R., Van Campen, *Am. J. Clin. Nutr.* 1981. An in vitro method for estimation of iron availability from meals 34: 2248-2256
- Minekus M., Alminguer M., Alvito P., Ballance., Bohn S., Bourlieu., Carrère F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufort C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Recio I., C.N. Santos., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodkorb A. 2014. A standardized static in vitro digestion method suitable for food- an international consensus. *Food Funct.* 5(6):1113-24
- Mora-Rochin S., Gutierrez-Uribe J.A., Serna-Saldivar S.O., Sanchez-Peña P., Reyes-Moreno C., Milan-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J Cereal Sci* 52:410–6.
- NMX-FF_034/1-SCFI-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-Cereales-Parte I: Maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado. Especificaciones y métodos de prueba.
- Palafox-Carlos H., J.F. Ayala-Zavala y G.A. González-Aguilar. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science.* 76:6-15.
- Parada J., J. Aguilera. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science.* 72:21-32.
- Paredes L.O. 2002. Propiedades Químicas, Fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizadas. *Agrociencia* 36:319-328.
- Pflugfelder R. L., L. W. Rooney, R.D. Waniska. 1988. Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chem.* 65:127-132.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 53(10):4290-302

- Reyes C. P. 1990. El maíz y su cultivo. Primera edición. Ed. AGT editor, S.A.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga, G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Rodríguez Méndez L. I., Figueroa Cárdenas J. De D., Ramos Gómez M., Méndez Lagunas L. 2013. Nutraceutical properties of flour and tortillas made with an ecological Nixtamalization Process. *Journal of Food Science*, 78: 1519-1534.
- Sahidi F., M. Naczk. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 566 .
- Salinas-Moreno Y., G. Vázquez C. 2006. Metodologías de análisis de la calidad nixtamalera-tortillera en maíz. INIFAP. Folleto Técnico. No. 24. 98.
- Salinas-Moreno Y., Aragon Cuevas F., Ybarra Moncada C., Aguilar Villareal J., Altunar López B. Y Sosa Montes E. 2013. Physical characterization and chemical composition of maize races with blue/purple grain from tropical and subtropical regions of Oaxaca. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(1): 23-31.
- Salinas-Moreno Y., F. Martínez-Bustos, M. Soto-Hernández, R. OrtegaPaczka, J.L. Arellano Vázquez. 2003. Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas de granos pigmentados. *Agrociencia* 37:617-628.
- Salinas-Moreno Y., J.J. López-Reynoso, G. González-Flores, G. Vázquez Carrillo. 2007. Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia* 41:295-305.
- Salinas-Moreno Y., J.J. Pérez-Alonso, G. Vázquez-Carrillo, F. Aragón- Cuevas, G.A. Velázquez Cardelas. 2012. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia* 47:815-825.
- Salinas-Moreno Y., Martínez Bustos F., Soto Hernández M., Ortega Paczka R., Arellano-Vásquez J.L. 2003. Efecto de la nixtamalización sobre las anthocyanins del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37(6):617–28.
- Salmeron I., Ficuños P., Charalampopoulos D., Padilla S. (2009) Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereals-based substrates. *Food Chem* 117:265-271
- 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 R. 2015. 92(2):185-192.
- Saulnier L., Thibault J. 1999. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and corn bran heteroxylans. *J Agric Food Chem* 79:396–402.

- Saura-Calixto F. 2010. Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(1):43-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. 2007 . Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Serna-Saldívar S O (2009) Research developments in the science, technology and nutritional value of maize-based nixtamalized foods. In: *The ICC Book of Ethnic Cereal-Based Foods Across the Continents*. J Taylor, R Cracknell (eds). Published by the University of Pretoria, Pretoria, South Africa. pp:133-163.
- Shim S.M., M.G.Ferruzzi, Y.C.Kim,E.M. JanleyC.R. Santerre. 2009. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*. 112(1):46-50.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16:144–58.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L. 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolics acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J Agric Food Chem* 30:337–40.
- Tagliazucchi D., Verzelloni E., Bertolini D., Conte, A. 2010. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599–606.
- Trejo G. A., Feria-Morales A. and Wild-Altamirano C. 1982. The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation. *Adv. Chem Ser*: 198:245-263.
- Yu J., T. Vasanthan, F. Temelli. 2001. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance-liquid-chromatography. *J. Agric. Food Chem*. 49:4352-4358.
- Zhao X., M. Corrales, C. Zhang, X. Hu, Y. Ma, B. Tauscher. 2008. Composition and thermal stability of anthocyanins from Chinese purple corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem*. 56:10761-10766.
- Zilic S., Serpen A., Akillioglu G., Gökmen V, Vancetovic J. 2012. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem*. 60:1224-1231.

ANEXO A. Distribución de fenoles en digestión in vitro de tortillas tradicionales.

ANEXO A. Distribución de fenoles digestión in vitro de tortillas tradicionales									
Fenoles (mg eq. ácido gálico/ kg b.s.)									
Tratamiento	Oral			Gástrica			Intestinal		
	Libres	Ligados	Totales	Libres	Ligados	Totales	Libres	Ligados	Totales
Ca(OH) ₂	421.1267047	173.0874737	594.2141784	487.2773625	164.8930173	652.1703799	1106.248827	309.666872	1415.915699
Ca(OH) ₂	421.0011564	172.0641688	593.0653252	488.7177682	157.8306139	646.5483821	1111.742987	303.9123049	1415.655292
Ca(OH) ₂	411.2685808	178.8227967	590.0913776	456.3391319	193.9463142	650.2854462	1168.327112	311.7909899	1480.118102
Ca(OH) ₂	408.9381974	180.8477366	589.7859339	455.9501173	191.0377462	646.9878635	1171.860045	311.4020132	1483.262058
CaCl ₂	444.6789755	195.2575003	639.9364757	472.7779381	248.5572426	721.3351807	845.2450129	287.5352089	1132.780222
CaCl ₂	444.9298766	196.367692	641.2975686	471.4379971	249.6555482	721.0935453	844.7788594	284.4481997	1129.227059
CaCl ₂	434.5751683	195.6985002	630.2736685	461.2556616	247.271629	708.5272906	831.7785432	260.6019341	1092.380477
CaCl ₂	436.6153425	195.2036572	631.8189997	460.1001905	248.6934665	708.7936571	833.9080933	258.2051003	1092.113194
CaCO ₃	377.6918059	168.1145415	545.8063474	318.8763134	145.5549064	464.4312198	690.0377995	210.082892	900.1206915
CaCO ₃	377.4878038	169.4193897	546.9071936	319.58324	145.029192	464.612432	690.9873454	210.2220599	901.2094053
CaCO ₃	379.7994023	176.4220158	556.2214181	338.2293173	135.1083239	473.3376412	695.6697939	208.6143599	904.2841537
CaCO ₃	380.8818883	174.8726201	555.7545084	336.9932626	131.7290157	468.7222783	697.4679965	208.269556	905.7375525
CaSO ₄	441.353338	220.1676217	661.5209597	423.0411254	181.7855842	604.8267095	563.0681241	203.150237	766.2183611
CaSO ₄	441.3257405	223.635252	664.9609924	424.3991573	183.2337663	607.6329236	563.907817	203.9695737	767.8773907
CaSO ₄	436.5686154	212.0563611	648.6249765	408.9599715	183.2957927	592.2557643	562.6328766	196.5299216	759.1627982
CaSO ₄	439.6388411	215.1327964	654.7716375	408.1124055	181.36758	589.4799855	563.9640644	197.2198893	761.1839537

ANEXO B. Distribución de fenoles en digestión in vitro de tortillas tlayudas

Anexo B. Distribución de fenoles digestión in vitro de tortillas tlayudas									
Fenoles (mg eq. ácido gálico/ kg b.s.)									
Tratamiento	Oral			Gástrica			Intestinal		
	Libres	Ligados	Totales	Libres	Ligados	Totales	Libres	Ligados	Totales
Ca(OH) ₂	409.127757	172.4760184	581.6037754	428.7260876	178.0921257	606.8182133	635.0743628	214.7124852	849.7868479
Ca(OH) ₂	406.1802615	167.8983506	574.0786121	426.942469	177.1403752	604.0828442	638.2506245	216.8794555	855.13008
Ca(OH) ₂	385.5036473	166.2811277	551.784775	427.1325267	171.6064062	598.738933	664.8682528	214.0892573	878.9575101
Ca(OH) ₂	386.7382697	163.1064264	549.8446961	440.5287199	171.2763637	611.8050836	664.5318224	216.0681848	880.6000071
CaCl ₂	432.2948725	207.0670687	639.3619411	444.8091453	190.982074	635.7912193	745.3638699	276.6731383	1022.037008
CaCl ₂	435.399299	205.5192973	640.9185964	443.2823536	191.7349616	635.0173152	744.4063959	275.8684156	1020.274811
CaCl ₂	432.8624544	204.3423462	637.2048006	448.7198749	183.773392	632.4932668	745.9831316	272.3983268	1018.381458
CaCl ₂	431.4393866	201.8226113	633.2619979	446.9149227	182.590695	629.5056178	756.884339	272.7895732	1029.673912
CaCO ₃	335.186641	155.3332467	490.5198877	339.6389151	133.3784881	473.0174033	578.7375263	159.6833899	738.4209162
CaCO ₃	334.8135364	157.2809431	492.0944795	337.4419507	133.412772	470.8547227	576.1153917	157.068026	733.1834176
CaCO ₃	303.0951183	156.2975784	459.3926968	323.1809226	134.4167987	457.5977214	585.9237756	155.9628516	741.8866273
CaCO ₃	300.7326264	169.3631361	470.0957625	323.1616817	131.6128703	454.7745521	585.9837893	154.2781609	740.2619502
CaSO ₄	369.1010569	194.5427011	563.6437579	613.5414232	243.3193905	856.8608137	668.4274936	228.3346301	896.7621237
CaSO ₄	367.0970895	192.0461465	559.1432361	617.2630597	238.6467775	855.9098372	670.2759192	232.3932319	902.669151
CaSO ₄	389.9534262	197.2275203	587.1809466	635.18696	239.0589063	874.2458663	683.3353835	219.8985805	903.2339641
CaSO ₄	388.7782331	198.1074535	586.8856866	637.0838444	242.6807273	879.7645717	683.7335737	221.8898256	905.6233993

ANEXO C. Capacidad antioxidante en digestión in vitro de tortillas

ANEXO C. Capacidad antioxidante durante digestión in vitro de tortilla						
Tratamiento	Capacidad antioxidante (mg eq. ácido ascórbico/ kg b.s.)					
	TTL			TTR		
	Oral	Gástrica	Intestinal	Oral	Gástrica	Intestinal
Ca(OH) ₂	599.7918797	658.0033519	638.4581913	650.9033876	757.4288988	581.5101592
Ca(OH) ₂	597.8126444	650.8938401	637.7578337	652.4541479	754.7004303	581.1699745
Ca(OH) ₂	596.2302782	637.1507582	641.8622547	666.0048858	721.569374	602.6397765
Ca(OH) ₂	596.4312677	636.7086612	644.1972734	666.2019657	720.788073	602.0274441
CaCl ₂	699.4386318	735.6925199	761.9816581	709.4756887	799.3811221	823.656145
CaCl ₂	695.6453254	739.7326383	764.2900971	711.7269489	803.9378443	824.6343588
CaCl ₂	704.399256	732.0343345	743.6354497	713.2977434	786.8348844	820.8612485
CaCl ₂	704.842951	731.8506928	743.4130603	713.3761771	787.3651723	819.5356136
CaCO ₃	512.872351	520.328526	552.2686032	584.2820907	544.9655538	648.4882921
CaCO ₃	511.5715058	530.2003722	554.4095652	583.982499	545.9319943	652.1736938
CaCO ₃	504.1493445	518.7063669	563.1515301	590.0186071	599.1915922	675.2254866
CaCO ₃	502.3851606	518.2163988	566.6960514	588.8630392	601.0125175	675.7527085
CaSO ₄	595.4255172	602.1191983	577.2284848	714.681434	678.2246814	516.6553485
CaSO ₄	593.5525942	599.7836575	578.3254685	713.4855302	681.0385209	520.7973332
CaSO ₄	593.3952484	582.0177508	543.9407249	714.960944	627.1028805	499.9091433

ANEXO D. Antocianinas durante digestión in vitro de tortillas

Cuadro D . ANT durante digestión in vitro de tortilla						
Tratamiento	Antocianinas antioxidante (mg eq. ácido ascórbico/ kg b.s.)					
	TTL			TTR		
	Oral	Gástrica	Intestinal	Oral	Gástrica	Intestinal
Ca(OH) ₂	48.67789614	41.19748914	48.97959767	58.49498611	46.91992096	38.68808841
Ca(OH) ₂	48.33747336	41.37724634	48.76336213	57.9103923	47.30486853	38.5531454
Ca(OH) ₂	48.3478765	41.38596591	48.92359207	57.95346942	46.72444405	38.50479968
Ca(OH) ₂	48.114366	41.20285502	48.68938681	58.01944186	46.90490528	38.84746991
CaCl ₂	150.3633586	103.527868	93.04209955	132.0424779	100.4389242	49.15920363
CaCl ₂	150.1645784	103.4529787	92.86669313	132.0362448	100.6957931	49.4981835
CaCl ₂	150.1979288	102.9902609	91.45759489	131.9759392	100.2570536	49.10612674
CaCl ₂	150.2024833	102.9987124	91.23472556	131.1799675	100.295892	49.13970254
CaCO ₃	73.2756445	55.28977128	113.5450795	131.6876803	68.1824168	50.92875817
CaCO ₃	76.21854836	55.46160909	113.1397619	131.421376	68.10293541	50.82731664
CaCO ₃	76.12802619	55.1836137	113.6129258	131.449361	67.77929863	50.53845102
CaCO ₃	66.46068717	55.5425638	113.2128887	131.3121154	67.91922395	50.9632534
CaSO ₄	124.946837	98.322817	138.6379609	79.44325991	84.74641372	115.7880956
CaSO ₄	124.8088345	97.93124835	138.5225182	80.1132414	85.21725631	115.732701
CaSO ₄	124.8611012	98.13573155	138.1031517	79.55833836	84.64589396	115.9014098
CaSO ₄	125.3588578	98.21604721	138.1836068	79.03070289	84.50886701	115.6719405