



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIA QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Extractos Purificados de Tortilla de Maíz (*Zea mays* L.)
Criollo Azul y su Potencial Efecto Antioxidante y Citotóxico**

TESIS

Que presenta

YAZMÍN BRISCEIDA JIMÉNEZ NEVÁREZ

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DRA. SARAID MORA ROCHÍN

DR. JORGE MILÁN CARRILLO

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2018

Presentación

La presente investigación, titulada “Compuestos Bioactivos en Fracciones de Maíz (*Zea mays* L.) Criollo Azul de la raza Elotero de Sinaloa. Efecto del Proceso sobre su Actividad Antioxidante y Antiproliferativa”, se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutracéuticos (Laboratorio 18), Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas en la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C. Dr. Jorge Milán Carrillo y Dra. Saraid Mora Rochín, participaron como Directores de Tesis. El proyecto recibió financiamiento de la Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAPI-2014-137), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. 168279) y beca de terminación de tesis por CONACyT (No. de becario 709169), cuyo responsable técnico fue la Dra. Saraid Mora Rochín.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa el día 22 del mes Junio del año 2020, el (la) que suscribe C. Yazmín Brisceida Jiménez Nevárez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0615697-5, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Jorge Milán Carrillo y Dra Saraid Mora Rochín y cede los derechos del trabajo titulado “Extractos Purificados de Tortilla de Maíz (*Zea mays L*) Criollo Azul y su Potencial Efecto Antioxidante y Citotóxico”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Yazmín Brisceida Jiménez Nevárez", is written over a horizontal line.

M.C. Yazmín Brisceida Jiménez Nevárez

DEDICATORIA

A mí *Madre* adorada por todo el amor, sacrificio y esfuerzo que desde siempre ha dado por mí. A a mi tío por toda su fe, confianza, y apoyo incondicional que he recibido de su parte, otorgándome la mejor herencia "*La Educación*".

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, por permitirme realizar mi formación profesional.

A la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas-UAS** por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis en sus instalaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento del proyecto.

Un agradecimiento muy especial a la **Dra Saraid Mora Rochín**, que más que mi asesora de tesis ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, gracias por sus consejos, por su tiempo, asesoría, apoyo incondicional, paciencia, confianza, y su forma de trabajar, inculcaron en mí un sentido de responsabilidad y rigor académico. Por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, y por realizar este proyecto de investigación. De verdad, creo que tuve la mejor asesora que pude haber encontrado. Muchas gracias de todo corazón. Siempre contará con todo mi respeto y amistad.

Al **Dr Jorge Milán Carrillo** por haberme permitido tener el honor de formar parte de su excelente grupo de trabajo, por su paciencia, por haber dedicado tiempo a escuchar mis dudas e inquietudes y haber confiado en mis capacidades, y por sus aportes a mi proyecto de tesis. Fue un verdadero honor haber trabajado bajo su dirección.

A la **Dra Edith O. Cuevas Rodríguez** por sus buenos consejos y observaciones y por su gran ayuda para facilitar la realización de esta investigación.

Al **Dr Álvaro Montoya Rodríguez** por su disposición, ayuda y asesoría para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Liliana León** por brindarme su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto, por su tiempo, muchísimas gracias.

A los (as) **Dres Nallely Gaxiola, Dulce María Domínguez, Julio Montes, Gabriela López, Rosalio Ramos** por su ayuda, observaciones y por haberme ayudado a desarrollar parte de mi trabajo y permitido trabajar en sus laboratorios, muchas gracias.

A todos mis compañeros de laboratorio que alguna vez me ayudaron: **Evelyn, Perla, Radames, Carlos, Jocelyn, Astrid, Carolina, Yuri, Abel, Eslim, Gaby, Gemán** por su apoyo, explicaciones, observaciones, pero principalmente por su amistad brindada. Gracias chicos.

A mi madre **Guadalupe Nevárez Millán**, que ha sido madre y padre desde siempre, tengo que agradecerle tantas cosas, por tus consejos, por apoyarme en mis estudios y sobre todo por tantas desveladas y madrugadas que pasaste a mi lado siempre dándome ánimos, no me alcanzaría toda la vida para agradecerle todo lo que me has dado. Te amo mucho mami.

A mi tío **Tereso Nevárez Millán**, que lo considero como mi padre porque es una persona intachable para mí, siempre me ha dado su apoyo incondicional.

A mis tías y tíos Sandra, **Magui, Monchi, Bertha, Manuel, Chuy, Lupe, Mele**, porque de alguna manera u otra siempre me apoyaron en los momentos más difíciles, siempre estaban ahí dándome ánimos, los quiero mucho a todos.

A mis abuelos hermosos **María Millán y Ángel Nevárez** porque son los mejores abuelos que pude tener, le doy gracias a Dios por permitirles estar aquí disfrutando de la vida, gracias por todo su apoyo y amor. Los amo mucho.

A mis prima(o)s **Abigail, Missael** que los considero como mis hermanos, **Mitzi, Alexis, Yami, Greysi, Beto, Yessi, Cinthya, Luis Ángel**, que de alguna manera me apoyaron en todo y aunque han surgido momentos difíciles los hemos podido llevar, muchas gracias primos los quiero.

A mis sobrinos preciosos **Vicente, Citlaly, Joselinne, Dylan, Missael Jr, Alexia, Juan Manuel** que los quiero tanto, porque siempre están ahí sacándome una sonrisa. Los amo mis niños.

Alan Valdez por todo su apoyo y amor incondicional que me ha brindado, gracias por siempre tener un consejo y una sonrisa para mí. Te amo por siempre mi amor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
I. RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN.....	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A. SALUD EN MÉXICO	8
1. Principales causas de muerte en México.....	8
B. ESTRÉS OXIDATIVO	12
1. Especies Reactivas.....	13
C. INFLAMACIÓN.....	15
1. Inflamación aguda.....	16
2. Inflamación crónica	17
D. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HUMANO.....	18
1. Antioxidantes enzimáticos.....	19
2. Antioxidantes no enzimáticos.....	21
E. MAÍZ.....	25
1. Origen y diversidad	25
2. Razas criollas de maíz	27
1. Diversidad genética en Sinaloa.....	30
2. Maíz azul raza Elotero de Sinaloa	31
F. Compuestos bioactivos asociados al maíz azul	33
1. Polifenoles.....	39
2. Clasificación de compuestos fenólicos	42
G. Biodisponibilidad de Polifenoles	57
H. Propiedades de los polifenoles	59
I. Medición de la Actividad Antioxidante	62
1. Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).....	65

2. Métodos basados en la transferencia de electrones (TE).....	69
3. Métodos que combinan mecanismos TAH y TE	69
J. USOS DEL MAÍZ	70
K. PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DEL MAÍZ.....	70
1. PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN.....	70
IV. JUSTIFICACIÓN	73
V. HIPÓTESIS	74
VI. OBJETIVOS	75
A. OBJETIVO GENERAL	75
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	76
A. MATERIALES.....	76
B. MÉTODOS	76
1. Características físicas del grano de maíz criollo azul	76
2. Propiedades fisicoquímicas del grano de maíz azul	78
3. Composición química.....	78
4. Nixtamalización tradicional.....	78
5. Elaboración de tortillas de maíz criollo azul obtenidas por el proceso de nixtamalización tradicional.....	79
6. Obtención de harina de grano de maíz azul y tortillas nixtamalizadas	79
7. Compuestos bioactivos	80
8. Determinación de la capacidad antioxidante	86
9. Análisis Estadístico	¡Error! Marcador no definido.
10. CITOTOXICIDAD	90
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	96
A. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL GRANO CRUDO DE MAÍZ AZUL	96
B. ELABORACIÓN DE TORTILLAS DE MAÍZ CRIOLLO AZUL NIXTAMALIZADO.	101
C. NIVELES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL (FENÓLICOS TOTALES Y ANTOCIANINAS).	101
D. BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES EN TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL.....	105

1. Determinación de capacidad antioxidante química ORAC	105
E. NIVELES DE COMPUESTOS BIACTIVOS EN FRACCIONES RICAS DE POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL	109
F. BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES DE FRACCIONES RICAS EN POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL	112
1. Determinación de capacidad antioxidante química (ORAC, DPPH, ABTS)	112
G. HPLC	115
H. Curva de Proliferación.....	120
I. Citotoxicidad de Extractos ricos en polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul “Elotero de Sinaloa” sobre Macrófagos RAW 264.7 inducidos con LPS	123
J. Viabilidad Celular con Azul de Tripano	127
IX. CONCLUSIONES.....	131
X. BIBLIOGRAFÍA.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Clasificación de antioxidantes.....	20
2	Efectividad de diversos antioxidantes en el cuerpo humano en la neutralización de radicales libres.....	22
3	Mazorcas de la Raza Elotero de Sinaloa.....	32
4	Estructura del grano de maíz azul.....	34
5	Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas.....	43
6	Clasificación de polifenoles.....	45
7	Estructuras de ácidos fenólicos comunes	47
8	Estructura básica de antocianinas.....	49
9	Ruta general de biosíntesis de las antocianinas.....	51
10	Estructura genérica de los principales flavonoides y formas básicas de antocianinas.....	56
11	(A) Formación del radical flavínico por la captura de radicales libres por polifenoles. (B) Reacción de Fenton.....	61
12	Estándar de cianidina-3-glucósido de zarzamoras (Rubus spp.)	
13	Curva de la Fluoroceína.....	68
14	Diagrama para obtener los extractos concentrados de polifenoles, antocianinas y proantocianidinas a partir de maíz azul liofilizado.....	82
15	Antocianinas presentes en las diferentes fracciones de maíz azul y sus tortillas.....	115
16	Reacción enzimática que permite la cuantificación de daño y muerte celular.	119
17	Actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) como indicador de citotoxicidad.....	121

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales causas de muerte en México.....	10
2	Clasificación de las razas mexicanas de maíz.....	29
3	Principales categorías de nutrarcéuticos asociados con maíces criollos.....	36
4	Compuestos fitoquímicos en genotipos de maíz blanco y azul	40
5	Antocianinas reportadas en maíz.....	52
6	Comparación de métodos para medir actividad antioxidante...	64
7	Características físicas del grano de maíz criollo azul.....	94
8	Contenido de fenólicos totales y porcentaje de contribución en maíz criollo azul y sus tortillas obtenidas por el proceso de nixtamalización.....	99
9	Capacidad antioxidante química de maíz criollo azul y tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización.....	103
10	Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante de las fracciones ricas en antocianinas y ricas en polifenoles.....	108
11	Actividad antioxidante de las fracciones ricas en antocianinas y ricas en polifenoles.....	110

I. RESUMEN

En México, el maíz (*Zea mays* L.) de grano azul se destina a la elaboración de diversos alimentos, dentro de los cuales la tortilla es el más común. La variabilidad en el contenido de antocianinas, pigmentos responsables de la coloración azul en el grano de maíz, lo hace un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales, así mismo, se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan actividad antioxidante y antiproliferativa a nivel celular, por lo que el consumo de estos se consideran como promotores de salud. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la extracción de fracciones ricas en polifenoles y antocianinas de tortillas nixtamalizadas elaboradas con maíz criollo azul, y su efecto en los perfiles y niveles de compuestos bioactivos, y su actividad antioxidante y antiproliferativa. Tortillas de maíz azul elaboradas a partir de harinas instantáneas obtenidas por el proceso de nixtamalización, presentaron un alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante determinada por los métodos de ORAC, DPPH y ABTS. El proceso de nixtamalización mostró decrementos en el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas. Tortillas azules retuvieron el 59 y 57 % del contenido total de fenólicos (suma de la fracción libre + ligada) y antocianinas, además retuvieron su actividad antioxidante en un 64% (ORAC), 69 % (DPPH) y 82.95 % (ABTS), con respecto al grano crudo. Fracción Rica en Polifenoles Nixtamalizada (FRPN), Fracción Rica en Antocianinas Nixtamalizada (FRAN) retuvieron 63.92 % y 65.53 % en el contenido de fenólicos totales y 48.30 % y 52.30 % de antocianinas, sin embargo, para la FRAN y FRPN mostró un incremento de

518.59 % para fenólicos totales, y 465.2 % en antocianinas, además, la FRPN y FRAN en capacidad antioxidante, retuvieron 49.11 % y 94.10 % (DPPH) y 72.98 % y 85.66 % (ABTS), sin embargo para la FRAN mostró incremento de 426.36 % (DPPH) y 209 % (ABTS).

Esto podría indicar que el tratamiento térmico de nixtamalización genera cambios en la matriz del grano de maíz, con la consecuente liberación de estos compuestos, los cuales podrían estar ligados a pared celular y convertirlos a su forma libre. Para el perfil de antocianinas, se lograron identificar en grano y tortilla seis tipos diferentes: la cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-(6''-malonilglucósido), pelargonidina-3-(6''-malonilglucósido) y la cianidina-3-(6''-succinilglucósido). Debido al alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, y un perfil cromatográfico dominado por la cianidina, estos maíces son materia prima atractiva para elaborar productos alimenticios con potencial nutracéutico. Además, se pudo observar que ambas fracciones (FRAN y FRPN) no mostraron un efecto citotóxico en células RAW-264. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que tortillas elaboradas con maíz criollo azul representa una fuente con potencial para la salud.

Palabras clave: Maíz, fracciones, compuestos bioactivos, antioxidantes.

ABSTRACT

In México, blue maize (*Zea mays* L.) is used for the preparation various foods, among which the tortilla is the most common. The variability in the content of anthocyanins, pigments responsible for blue coloration in the corn grain, makes it a potential product for the supply of natural colorants and antioxidants, in the same way, it has been described some phenolic compounds of vegetable origin that have antioxidant and antiproliferative activity at cellular level, so the consumption of these are considered as health promoters. The objective of this work was to carry out the extraction of fractions rich in polyphenols and anthocyanins from nixtamalized tortillas made with blue creole corn, and its effect on the profiles and levels of bioactive compounds also its antioxidant and antiproliferative activity. Blue corn tortillas made of instant flours obtained by nixtamalization process, presented a high content of phenolic compounds and antioxidant activity determined by ORAC, DPPH and ABTS methods. The nixtamalization process showed decreases in the content of phenolic compounds and anthocyanins. Blue tortillas retained 59 and 57% of the total content of phenolics (sum of free + bound fraction) and anthocyanins, in addition they retained their antioxidant activity by 64% (ORAC), 69% (DPPH) and 82.95% (ABTS), with respect to the raw grain. Fraction Rich in Polyphenols Nixtamalized (FRPN), Fraction Rich in Anthocyanins Nixtamalized (FRAN) retained 63.92% and 65.53% in the content of total phenolic and 48.30% and 52.30% of anthocyanins, however FRAN and FRPN there was an increment of 518.59% for total phenolics and 465.2% in anthocyanins, in addition the FRPN and FRAN in antioxidant capacity retained

49.11% and 94.10% (DPPH) and 72.98% and 85.66% (ABTS), however FRAN showed an increase of 426.36% (DPPH) and 209% (ABTS).

This could indicate that the thermal treatment of nixtamalization generates changes in the corn grain matrix, with the consequent release of these compounds, which could be bound to the cell wall and convert them to their free form. For the anthocyanin profile, six different types were identified in grain and tortilla: cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3- (6"-malonylglucoside), pelargonidin- 3- (6"-malonylglucoside) and cyanidin-3- (6"-succinylglucoside). Due the high content of phenolic compounds and antioxidant activity, and a chromatographic profile dominated by cyanidin, these maizes are attractive raw material to produce food products with nutraceutical potential. In addition, it was observed that both fractions (FRAN and FRPN) no showed an citotoxic effect in RAW-264 cells. The results obtained in this investigation show that tortillas made with blue creole corn represent a source with potential for health.

Keywords: Corn, fractions, bioactive compounds, antioxidants.

II INTRODUCCIÓN

El maíz es el cereal de los pueblos y culturas del continente Americano, surgió aproximadamente entre los años 8 000 y 600 AC en Mesoamérica (México y Guatemala), probablemente a lo largo del acantilado occidental de México Central o del Sur, a 500 km de la Ciudad de México (Acosta 2009). Las más antiguas civilizaciones de América, desde los olmecas y teotihuacanos en Mesoamérica, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica, estuvieron acompañadas en su desarrollo por esta planta (Serratos-Hernández 2012).

México como el principal centro de origen del maíz, tiene la diversidad más grande de recursos genéticos; a través de una selección, la planta se ha diversificado en una multitud de poblaciones con distintas adaptaciones al clima, latitud y tamaño, y se han especificado para una amplia gama de actividades humanas con alrededor de 59 razas identificadas (Sánchez y col 2000; Hernández 1985). Recientemente, el maíz azul ha sido utilizado para elaborar tortillas y botanas pigmentadas debido a que estos productos se aprecian como promotores de salud (El-Sayed y col 2006; Serna-Saldívar 2010).

A estos maíces se les ha otorgado un valor agregado debido a su alto contenido de compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, entre los que destacan las antocianinas y los ácidos fenólicos (Masuoka y col 2012; Mora-Rochín y col 2016). Además, en varios estudios se ha destacado el perfil de compuestos fenólicos, antocianinas, y capacidad antioxidante de distintas variedades (López-Martínez y col 2009; Serna-Saldívar y col 2011; Reynoso-Camacho y col 2015).

También se le han atribuido propiedades nutraceuticas a los maíces pigmentados por su alto contenido de antocianinas, las cuales poseen actividad biológica benéfica (antioxidante) (Mora-Rochín y col 2010; Gaxiola-Cuevas y col 2017). Estos compuestos tienen una acción positiva en la salud al atacar radicales libres, los cuales se involucran en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Liu 2003; Arroyo y col 2007; Reynoso-Camacho y col 2015). Adicionalmente, el valor nutrimental del maíz azul se basa en su endospermo harinoso y contenido de proteína que es considerado como el más alto, comparado con maíz blanco y amarillo (Betran y col 2001). La tortilla es la principal forma de consumo del maíz, y constituye el alimento básico diario en México y Centroamérica. Las tortillas se elaboran primordialmente por el proceso de cocción alcalina, llamado nixtamalización. El término nixtamalización se refiere al proceso de cocción alcalina del maíz para la elaboración de alimentos, como las tortillas y aperitivos (patatas fritas de maíz, tortillas chips, y tacos) (Serna-Saldívar y col 1990). Aunque este proceso mejora en gran medida las propiedades fisicoquímicas y estructurales, así como el valor nutricional de la tortilla, también afecta la concentración de compuestos bioactivos y actividad antioxidante (Gutiérrez-Urbe y col 2014; Bello-Pérez y col 2015).

Existen varios estudios que han reportado el efecto del proceso de nixtamalización sobre el contenido de polifenoles y antioxidantes de los productos de maíz, pero no existe suficiente información científica sobre el efecto que tiene dicho

proceso sobre los niveles y perfiles de compuestos bioactivos y su actividad antioxidante en tortillas de maíz azul elaboradas por el proceso de nixtamalización.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del proceso de nixtamalización de compuestos bioactivos en fracciones ricas en polifenoles y antocianinas de tortillas elaboradas con maíz criollo azul, y su efecto en la actividad antioxidante y antiproliferativa.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A. SALUD EN MÉXICO

1. Principales causas de muerte en México

Actualmente México ha generado y recibido beneficios de una mejoría notable en las condiciones de salud. El mejor reflejo de ello se observa entre 1990 y 2013 donde la esperanza de vida de mujeres incrementó de 74 a 78 años, mientras que en hombres de 67 a 72 años. (SSA, 2015).

En México el perfil demográfico es causa y consecuencia del perfil epidemiológico, tanto como el descenso de la mortalidad. Sin embargo, la disminución en la fecundidad desaceleró el crecimiento de la población dando origen al proceso de envejecimiento. La evolución de la transición demográfica conlleva a un paulatino envejecimiento de la población mexicana, dejando en el pasado un considerable volumen de niños que en la actualidad se han convertido en jóvenes de edades altamente productivas y reproductivas. En nuestro país, el fenómeno demográfico migratorio tiene gran relevancia, pues produce movimientos y desplazamientos tanto al interior del país como al exterior. Asimismo, influye en el volumen, estructura y distribución de una población. La distribución territorial en el país revela no solo el proceso de urbanización que ha experimentado México, sino también, la gran disparidad en la distribución de los mexicanos a lo largo del territorio nacional (SSA 2015).

Gran cantidad de personas viven o se desplazan para trabajar en áreas urbanas, mientras que pocos habitan en localidades rurales. Las infecciones comunes y los

padecimientos ligados a desnutrición y reproducción, que ocupaban los primeros sitios entre las causas de muerte, fueron desplazados por las enfermedades crónicas degenerativas (diabetes, enfermedades cardio y cerebrovasculares, cáncer, enfermedades mentales y adicciones) y lesiones accidentales e imprudenciales (SSA 2015).

En el año 2016 se observó que las principales causas de muerte entre hombres y mujeres eran similares; enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y tumores malignos (**Cuadro 1**). Las enfermedades del corazón son las primeras causas de muerte en la población del país, el 10.38% de las defunciones masculinas y el 9.25% de las femeninas se deben a padecimientos de este tipo. La diabetes mellitus representa la segunda causa de muerte en los hombres con un 7.29%, mientras que para las mujeres es 7.73%. La tercera causa de muerte entre la población corresponde a tumores malignos, en hombres 5.93% y 6.16% en las mujeres. En conjunto, las tres principales causas de muerte agrupan 23.6% de las defunciones masculinas y 23.14% de las femeninas (INEGI 2015).

La transición epidemiológica hacia enfermedades crónicas degenerativas afecta a la sociedad e impacta significativamente al Sistema de Salud. México tiene una de las mayores prevalencias de obesidad y sobrepeso infantil en el mundo y más de 70% de sus adultos tiene sobrepeso. (OMS 2017). La modificación de los hábitos alimentarios, el menor gasto de energía calórica de las personas, los estilos de vida sedentarios y el envejecimiento de la población, sumado al consumo de alcohol y de tabaco, representan los principales factores de riesgo para las enfermedades no

Cuadro 1. Principales causas de muerte en México

Sexo y causas	Total	Porcentaje
Hombres	363,732	55.50%
Enfermedades del corazón	68,052	10.38
Diabetes mellitus	47,816	7.29
Tumores malignos	38,902	5.93
Accidentes	28,299	4.31
Enfermedades del hígado	25,753	3.92
Agresiones	18,293	2.79
Enfermedades cerebrovasculares	16,511	2.51
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	11,093	1.69
Influenza y neumonía	10,454	1.59
Las demás causas	98,559	15.03
Mujeres	291,637	44.5%
Enfermedades del corazón	60,670	9.25
Diabetes mellitus	50,705	7.73
Tumores malignos	40,612	6.19
Enfermedades cerebrovasculares	17,595	2.68
Enfermedades obstructivas crónicas	9,964	1.52
Enfermedades del hígado	9,958	1.51
Accidentes	8,856	1.35
Influenza y neumonía	8,430	1.28
Insuficiencia renal	5,961	0.90
Otros	78,886	12.03
Total (hombres y mujeres)	655,369	100%

INEGI 2015

transmisibles, las cuales constituyen un reto cada vez mayor para la salud pública en México (SSA 2015).

La causa principal de las enfermedades crónicas es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, ya que hoy en día hay un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares, pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes. Por otro lado, un descenso en la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento, y de una creciente urbanización, además a menudo los cambios en los hábitos de alimentación y actividad física son consecuencia de cambios ambientales y sociales asociados al desarrollo y de la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud; agricultura; transporte; planeamiento urbano; medio ambiente; procesamiento, distribución y comercialización de alimentos, y educación (SSA 2015).

Las enfermedades crónicas del siglo XXI constituyen un fenómeno reciente en la historia de la humanidad (Murray y col 2012; OMS 2011). Comenzaron a reconocerse a partir de la Segunda Guerra Mundial, al mismo tiempo que se produjo la transición nutricional, primero en los países industrializados y después en el resto del mundo. La transición nutricional engloba las tecnologías que permiten la síntesis de moléculas “desconocidas de la naturaleza” (Bland 2007), un rápido aumento de la exposición a toxinas ambientales y una disminución de la actividad física. Nuevos patrones de comportamientos han dado lugar a que se cocine menos en las casas y aumente el consumo de platos precocinados y las comidas fuera de casa. Todos

estos cambios han venido acompañados por un mayor uso de alimentos procesados, menos densos en nutrientes, una menor ingesta de frutas y verduras completas, y un aumento del consumo de azúcar. Estos componentes de la transición nutricional no parecen haber sido beneficiosos para los seres humanos, ya que sus efectos están incrementando con rapidez en todo el mundo, dando lugar al sobrepeso y obesidad, además de dar lugar a enfermedades crónicas a edades más precoces (Hruby y Hu 2014). La creciente incidencia de las enfermedades crónicas ha impulsado a la población civil y a los sistemas sanitarios gubernamentales a buscar nuevas estrategias frente a este reto casi universal (Noland y col 2017).

Actualmente se relaciona el papel del estrés oxidativo en las enfermedades crónico degenerativas, como lo son las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I y II y cáncer, por lo tanto es objeto de investigaciones extensivas.

B. ESTRÉS OXIDATIVO

Se reconoce como un mecanismo fundamental en la toxicidad de muchos xenobióticos y que también está implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades, y el culpable de que el oxígeno, indiscutido como indispensable para la vida, haya sido denominado elemento paradójico a causa de sus efectos nocivos. El estrés oxidativo se puede definir como una situación de desequilibrio entre la población de moléculas oxidantes frente a la presencia de antioxidantes, a favor de los primeros; actúa no solo en procesos de oxidación-reducción, sino también en señales de regulación y transducción en la expresión de genes a través de mecanismos redox (Boelsterli 2007; Dasgupta y Klein 2014).

1. Especies Reactivas

Las formas moleculares oxidadas y las que venimos denominando de oxígeno activo integran las llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), de la misma manera que hay especies reactivas de nitrógeno (ERN), de azufre (ERS), etc., expresiones que abarcan no sólo a los radicales libres, sino también a otras moléculas oxidantes o que pueden convertirse fácilmente en radicales libres. (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se producen habitualmente en todos los organismos aerobios, en los que los agentes tóxicos, incluidos los contaminantes ambientales, perturban el equilibrio redox celular y conducen a una alteración de las funciones biológicas normales. Este desequilibrio contribuye al envejecimiento, a la producción de enfermedades (patogénesis), al cáncer y a cambios en la expresión de diferentes genes (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009)

En el metabolismo de alimentos, medicamentos, productos industriales y contaminantes se producen numerosos compuestos fenólicos, algunos de los cuales son extremadamente tóxicos, mientras que otros parecen actuar como protectores celulares, e incluso otros son importantes constituyentes intracelulares. Los compuestos fenólicos juegan un papel crítico en las reacciones redox intracelulares y también reaccionan con los receptores de estrógenos (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009)

En las reacciones redox, tanto enzimáticas como no-enzimáticas, se producen radicales fenoxilo ($C_6H_5O^*$), de gran reactividad, y que adicionan compuestos

electrófilos en las posiciones orto y para. De esta reactividad, que dificulta su detección y determinación, depende que el compuesto sea citotóxico, protector antioxidante o catalizador selectivo; así se dice que los radicales fenoxilo pueden actuar como antioxidantes o como pro oxidantes (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009).

La formación de radicales tirosilo por la mieloperoxidasa constituye una vía de peroxidación de lípidos y de proteínas en los procesos que conducen a la aterogénesis; el radical tirosilo también interactúa con el óxido nítrico (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009)

La oxidación de estrógenos y antiestrógenos da lugar a radicales quinoides que participan en la cancerogénesis (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009)

Para contrarrestar los efectos oxidantes y restaurar la homeostasis redox, las células pueden adaptar sus parámetros críticos y establecer un nuevo estado estacionario. El desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la defensa antioxidante, a favor de los primeros, ha sido definido como estrés oxidativo, y supone una potencialidad de daño que puede ir desde un intento de adaptación por parte de la célula, una alteración de su fisiología (liberación de iones Ca^{++} , activación de proteasas, etc.), a lesiones o muerte celular (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009).

Los cambios producidos por el daño oxidativo y la restauración de la homeostasis dan lugar, a menudo, a la activación o represión de genes que codifican factores

reguladores de transcripción, enzimas antioxidantes defensivas y proteínas estructurales. Actualmente interesa grandemente conocer los mecanismos seguidos por las ERO para modular las cascadas de señales de transducción y la expresión de genes (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn 2009)

El proceso fisiopatológico se puede desarrollar por los siguientes mecanismos:

1. El radical libre del producto primitivo puede alquilar diferentes componentes tisulares (membranas celulares, retículo endoplásmico, enzimas, etc.), produciendo necrosis o déficit metabólico o de defensa, o trastornos en la reproducción celular (cáncer) por alteración de los ácidos nucleicos.
2. Las formas de “oxígeno activado” actúan preferentemente oxidando fuertemente los lípidos celulares (especialmente los lípidos insaturados) y también los compuestos con grupos SH (glutación, etc.), iniciando lo que se conoce como estrés oxidativo, que da lugar a procesos inflamatorios y citotóxicos.

C. INFLAMACIÓN

La inflamación es la respuesta biológica compleja del tejido vascular ante estímulos nocivos como patógenos, células dañadas o irritantes, y consta de una respuesta vascular y otra celular. La inflamación es el intento protector de eliminar los estímulos nocivos e iniciar el proceso de curación y restablecer la estructura y el funcionamiento normal. La inflamación puede ser local o sistémica. También puede ser aguda o crónica (Undurti 2011).

1. Inflamación aguda

La respuesta del sistema inmunitario frente al estrés fisiológico y metabólico es producir moléculas pro inflamatorias como adipocinas y citosinas, moléculas de señalización celular que facilitan la comunicación intercelular y estimulan el movimiento de las células hacia áreas de inflamación en situaciones de infección o herida. Estas respuestas del sistema inmunitario y la inflamación resultante están íntimamente relacionadas (Abbas y col 2012).

En condiciones óptimas, la función del sistema inmunitario es mantener el organismo sano, poniendo en marcha la respuesta inflamatoria adecuada frente a influencias ambientales, como una infección pasajera o una herida leve, y volviendo después al organismo al estado de alerta defensiva. Esta función exige que el organismo sea capaz de reconocer lo propio y lo extraño. Cuando la respuesta inmunitaria tiene éxito, el tejido vuelve a un estado de bienestar o estabilidad metabólica descrito como homeostasis. El compromiso de muchas áreas del sistema de defensa del organismo como la barrera digestiva, la acidez gástrica, la piel hace que el reconocimiento de lo propio y lo extraño disminuya hasta que el organismo se haya reparado. Cuanto más tiempo dure la agresión fisiológica, mayor deterioro de la capacidad de distinguir entre propio y extraño (Wu y col 2014). Si no se resuelve la causa subyacente, la respuesta inmunitaria puede quedarse “atascada” en un estado de inflamación prolongada. Cuando se mantiene en este estado durante un tiempo, el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer lo propio y lo extraño, que

es una capacidad fundamental para la supervivencia y constituye el núcleo central de la inmunología (Abbas y col 2012).

2. Inflamación crónica

Es la inflamación mantenida o no resuelta, da lugar a una transformación progresiva del tipo de células presentes en el lugar de la inflamación que se caracteriza por la destrucción, y la reparación progresiva del tejido afectado por el proceso inflamatorio. Diversos estudios indican que la inflamación prolongada tiene un papel importante en la patogenia de las enfermedades crónicas, en el cual la respuesta inmunitaria incrementa la proporción de citosinas pro inflamatorias respecto a las anti inflamatorias (Bauer y col 2014).

Una de las características más importantes de todas las enfermedades crónicas es el inicio y el mantenimiento de una inflamación prolongada a lo largo de toda la vida o parte de ella, dando lugar a una enfermedad crónica (Bauer y col 20014). En la cronología de la progresión de las enfermedades crónicas, la inflamación primero es subclínica, lo que a menudo se conoce como “inflamación asintomática”. Esta inflamación gradual sigue por debajo del umbral para el diagnóstico clínico. Se produce en el organismo daño celular y tisular durante años antes de ser percibido (Bauer y col 2014)

La inflamación de las enfermedades crónicas se describe como la elevación de dos a tres mediadores inflamatorios circulantes, generalmente asociada a la subdivisión innata del sistema inmunitario. Se trata de un estado que se desarrolla con lentitud (sepsis por ejemplo) y su origen suele ser difícil de identificar (artritis por

ejemplo). Esto hace difícil desarrollar estrategias terapéuticas adecuadas que aborden al mismo tiempo la causa y el síntoma (inflamación) de forma coordinada (Calcada y col 2014).

Estos procesos inflamatorios comparten otros mecanismos fisiológicos, como cambios de las reservas tisulares de nutrientes, del plasma y de la composición de ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes en la membrana de los glóbulos rojos. Este síndrome multifactorial (a menudo denominado síndrome metabólico) está relacionado con la obesidad y, lo que es más importante, con la resistencia a la insulina y la adiposidad central, puesta de manifiesto por la presencia de tejidos adiposo visceral. Sin embargo, la expresión de la inflamación prolongada es individual, y no todos los individuos presentan necesariamente todas las características antes descritas (Kathleen-Mahan y Ryamond 2017).

D. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE HUMANO

La producción de radicales libres (RL) es esencial para el metabolismo normal de la célula, pero puede ser perjudicial si no se controla por mecanismos de defensa, los organismos evolutivamente desarrollan sistemas de defensa antioxidante, para poder neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento (Halliwell 2000).

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser; lípido, proteína, ADN, o cualquier otro tipo de molécula (Halliwell 1997).

El sistema de defensa antioxidante se encuentra formado por elementos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan conjuntamente para así proteger a la célula (**Fig. 1**). El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de EROS como; el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL (Ferrari 1999; Yu 1994).

1. Antioxidantes enzimáticos

Varios sistemas de defensa antioxidante enzimáticos limitan el potencial tóxico de los intermediarios formados durante la reducción de O_2^* a H_2O (Arias y col 1999).

En cuanto a la defensa enzimática celular, esta se divide en enzimática primaria y secundaria. Con respecto a la defensa primaria, se compone de tres enzimas importantes que impiden la formación o neutralizan los RL: la glutatión peroxidasa, que dona dos electrones para reducir los peróxidos, la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua, y finalmente, la superóxido dismutasa que convierte aniones superóxido en peróxido de hidrógeno como sustrato para la enzima catalasa (Babbar y col 2015).

En particular, la enzima SOD cataliza la dismutación de O_2 a H_2O_2 , manteniendo los niveles intracelulares de O_2^* a 10^{-11} M durante el metabolismo normal. La reducción divalente de O_2 produce H_2O_2 y la célula se protege de su toxicidad potencial mediante la acción de catalasas y peroxidasas. Sin embargo, el más tóxico de todos los radicales es OH^* cuya formación está limitada por la compartimentalización del hierro catalítico. Este sistema protector se fundamenta en

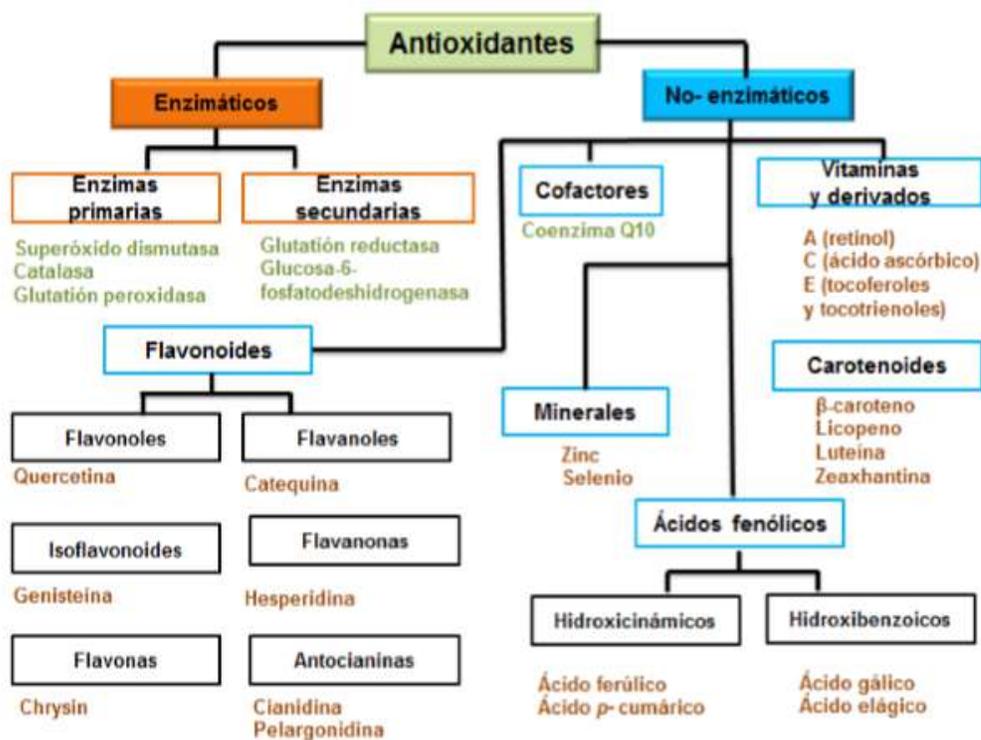


Fig. 1. Clasificación de los antioxidantes. Antioxidantes naturales separados en clases. Palabras en color verde representan los antioxidantes endógenos, mientras que las cafés representan los antioxidantes exógenos.

Carocho y Ferrerira (2013)

las proteínas que se unen al hierro: Apoferritina: intracelular, Transferrina y Lactoferrina: extracelulares y Hemoglobina: intravascular.

Estas proteínas protegen contra la toxicidad del hierro y además permiten el aporte de oxígeno a los tejidos y controlan la liberación de hierro por múltiples procesos enzimáticos críticos (Arias y col 1999). El hierro ha sido un compañero primordial del oxígeno en la evolución. Entre las funciones más importantes del hierro destacan el transporte de O_2 , la transferencia de electrones, la síntesis de ADN y la oxidación por O_2 y H_2O_2 (Arias y col 1999)

La defensa enzimática secundaria incluye a la glutatión reductasa y glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. La glutatión reductasa reduce al glutatión (antioxidante) de su forma oxidada a su forma reducida. La glucosa-6-fosfato regenera NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, coenzima utilizada en reacciones anabólicas) (Gamble y Burke 1984; Ratnam y col 2006). Por lo general, las enzimas antioxidantes proporcionan la defensa antioxidante más fuerte, a pesar de que todos los antioxidantes son importantes para la neutralización apropiada del estrés oxidativo (**Fig. 2**) (Miao y Clair 2009).

2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función capturar radicales libres y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al radical libre con el objetivo de estabilizarlo. (Bandyopadhyay y col 1999; Larkins 1999). El sistema de defensa antioxidante no enzimático se refiere a los alimentos

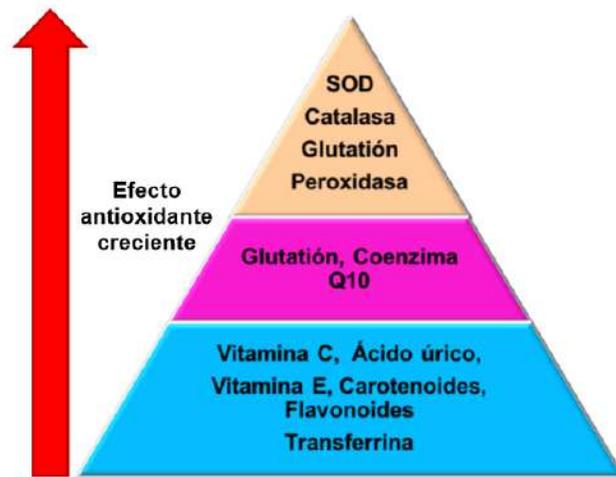


Fig. 2. Efectividad de diversos antioxidantes en el cuerpo humano en la neutralización de los radicales libres.

Dasgupta y Klein (2014)

ingeridos por la dieta, dentro de este grupo se incluyen vitaminas, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, etc. (Corrales y Muñoz-Ariza 2012; Laguerre y col 2015). La vitamina C se encuentra a nivel intra y extracelular en forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tocoferoxilo, transformándolo a vitamina E. Sin embargo, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante cuando se encuentran presentes excesivas concentraciones de iones hierro y cobre (Corrales y Muñoz-Ariza 2012).

Los carotenoides son solubles en lípidos, la forma más común es β caroteno. Estos antioxidantes pueden neutralizar los radicales peroxil, así como oxígeno singlete (Milán-Carrillo y col 2017). Además, β -caroteno es un precursor de la vitamina A, la cual también tiene actividad antioxidante (Milán-Carrillo y col 2017).

Flavonoides polifenólicos. Dentro de los flavonoides polifenólicos se encuentran un amplio grupo de compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como quelantes de metales y que además, capturan de forma *in vitro* ERO y ERN. Pueden ser de tipo lipo e hidrosolubles y se ubican tanto intra como extracelularmente (Larkins 1999.).

Los flavonoides o bioflavonoides son fitonutrientes asociados a los diversos colores presentes en las frutas y verduras. Estos fitonutrientes ejercen acciones antioxidantes y antiinflamatorias actuando como mensajeros beneficiosos para el sistema inmunitario (Jeena y col 2013), confieren protección frente a la actividad de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan

inflamación, y modulan los efectos epigenéticos al mejorar los niveles de ácidos grasos y prostaglandinas del individuo. Cuando el nivel de antioxidantes y flavonoides es insuficiente para proteger a células y tejidos, se produce un deterioro acelerado que favorece la degeneración y altera la salud del individuo. La quercetina es un flavonoide con acción antiinflamatoria en los mastocitos. Los alimentos ricos en quercetina son útiles para combatir reacciones alérgicas o de hipersensibilidad (Kim y col 2014). Varios sistemas de antioxidantes participan en la protección frente a las ERO, especialmente dentro del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias. Los ácidos fenólicos actúan como quelantes y captadores de RL con especial incidencia en los radicales hidroxilo, peroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos (Krimmel y col 2010; Terpinc y col 2011).

Frutas y vegetales, son fuentes ricas de compuestos fenólicos, el consumo de dichos compuestos se asocian con un incremento en la protección antioxidante en el cuerpo, combatiendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer, según lo demostrado por estudios epidemiológicos (Liu 2007).

Investigaciones, han mostrado que el contenido de fenólicos y actividad antioxidante en cereales fue subestimado en la literatura, debido a que compuestos fenólicos presentes en granos de cereales no eran cuantificados, por lo que la concentración de estos compuestos en cereales resultan ser más altos de lo reportado previamente (Adom y Liu 2002).

En este sentido, trigo, arroz y maíz, son considerados los cereales más importantes en la dieta humana. De los cuales, el maíz contiene una mayor

concentración de compuestos fenólicos, seguido por trigo y arroz (Adom y Liu 2002). Así, los cereales contienen fitoquímicos únicos, que al ser consumidos junto con fitoquímicos provenientes de frutas y vegetales, son complementados debido a efectos sinérgicos (Liu 2007).

E. MAÍZ

1. Origen y diversidad

El maíz en México forma parte de nuestra alimentación diaria, es el cultivo de mayor presencia en el país, constituye un insumo para la ganadería y para la obtención de numerosos productos industriales, por lo que, desde el punto de vista alimentario, económico, político y social, es el cultivo agrícola más importante (Hernández 1970; SIAP 2008).

El maíz pertenece a la especie *Zea* de la familia de las gramíneas, y es una planta anual dotada de un amplio sistema radicular fibroso (FAO 1993).

En ningún otro país de América ha llegado el maíz a convertirse en un elemento tan preponderante en la vida social y económica del pueblo como México. Que el maíz se haya originado en México, es un problema aún debatido, pero si es cierto que el maíz es una planta cultivada de gran antigüedad en este país. Quizá en ningún país sea tan grande la gama de variación total del maíz como en México. Pero considerando el país en conjunto, podemos decir con cierta seguridad, que México supera a cualquier otro en la riqueza de biodiversidad de sus razas y variedades de maíz (Wellhausen y col 1951).

Se han postulado tres teorías acerca del desarrollo del maíz en mazorca que conocemos hoy en día. La primera es que el maíz moderno resultó de la cruce del Teocintle y *Tripsacum*. La segunda es que el maíz moderno proviene del maíz Tunicado y que el Teocintle es el resultado de la cruce del género *Zea* y *Tripsacum*. La tercera y reconocida como la más válida es que el maíz evolucionó simple y sencillamente del Teocintle (Galinat 1988).

El maíz es el cereal de los pueblos y culturas del continente Americano. Las más antiguas civilizaciones de América, desde los olmecas y teotihuacanos en Mesoamérica, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica, estuvieron acompañadas en su desarrollo por esta planta (Serratos-Hernández 2012).

Se pueden reconocer cuando menos cuatro factores involucrados en la tremenda diversidad de los maíces de México: (1) razas primitivas, que en países como el Perú se encuentran principalmente como reliquias arqueológicas, existen en México como variedades actualmente vivas; (2) durante ciertas épocas de la historia del cultivo del maíz en México, se ha registrado la influencia de variedades exóticas de países del sur; (3) el teocintle se ha cruzado en forma natural con el maíz en México y en regiones adyacentes de Guatemala, y ha introducido nuevas características y nuevas variaciones a los maíces de ambos países; y (4) la geografía de México favorece la rápida diferenciación, pues posee varias clases de factores aislantes (Wellhausen y col 1951).

México posee la mayor diversidad genética de maíz, la cual se manifiesta en la variación de caracteres morfológicos, vegetativos, de espiga, mazorca, grano y composición química del grano y polen (Vázquez-Carrillo y col 2003). Desde la época de los aztecas se reconocen muchos tipos de maíz con diferentes aplicaciones. Estos genotipos varían en tamaño de grano, textura, pigmentación o color, y aplicación culinaria (Preciado y Montes 2011). Esta diversidad, está definida por el factor genético, y depende de las prácticas de cultivo, condiciones climáticas y tipo de suelo (Agama- Acevedo y col 2011; Figueroa-Cárdenas y col 2013).

2. Razas criollas de maíz

El término “maíz criollo o raza” se utiliza para denotar variedades de maíz (*Zea mays* L.) nativas a una comunidad, región o estado, tales variedades están conformadas por poblaciones heterogéneas de plantas, las cuales son diferenciadas por los agricultores de acuerdo a su color, textura, forma del grano, forma de la mazorca, ciclo de cultivo y uso (Gaytán-Martínez y col 2013). Estos materiales genéticos han sido desarrollados por los agricultores, producto de milenarias prácticas agrícolas vinculadas al conocimiento tradicional de los pueblos indígenas de México, principales herederos, custodios y mejoradores del germoplasma nativo (Fernández-Suarez y col 2013).

El concepto y la categoría de raza es de gran utilidad como sistema de referencia rápido para comprender la variación de maíz, y para su uso en el mejoramiento (Perales y Golicher 2011). Cada raza puede comprender numerosas

variantes diferenciadas en formas de mazorca, color y textura de grano, adaptaciones y diversidad genética.

Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas (Cónico, por la forma de la mazorca), tipo de grano (Reventador, por la capacidad del grano para explotar y producir palomitas), por el lugar o región donde inicialmente fueron colectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpan, Elotero de Sinaloa, Chalqueño, típico del Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (Zapalote Chico en el Istmo de Oaxaca o Apachito en la Sierra Tarahumara) (Wellhausen y col 1951).

En América Latina, se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y McK Bird 1977), de las cuales 64 se han identificado y descrito en su mayoría para México, de estas, 59 se pueden considerar nativas del país (**Cuadro 2**) (Wellhausen y col 1951; Hernández y Alanís 1970; Sánchez 1989; Sánchez y col 2000).

Los maíces de México presentan interés especial debido a la función que han desempeñado en el desarrollo de las variedades modernas y altamente productivas de América, especialmente en la zona maicera de EUA. Por consiguiente, la clasificación de los maíces de México es de interés no sólo para el mejoramiento del cultivo, sino también para los genetistas, y actualmente para la ingeniería genética y la industria agro biotecnológica (Pineda-Hidalgo y col 2013).

En el estado de Sinaloa México, pequeños agricultores siembran maíces criollos pigmentados, los cuales presentan una gran diversidad en sus características

Cuadro 2. Clasificación de las razas mexicanas de maíz.

Grupo Racial	Nombre de la Raza
Razas Indígenas Antiguas	Palomero Toluqueño; Arrocillo Amarillo; Chapalote; Nal-Tel.
Exóticas Precolombinas	Cacahuacintle; Harinoso de Ocho: Sub-Raza Elotes Occidentales; Olotón; Maíz Dulce.
Razas Mestizas-Prehistóricas	Cónico; Reventador; Tabloncillo; Tehua; Tepecintle; Comiteco; Jala; Zapalote Chico; Zapalote Grande; Pepitilla; Olotillo: Subraza: Dzit-Bacal; Tuxpeño; Vandeño.
Modernas Incipientes	Chalqueño; Celaya; Cónico Norteño; Bolita.
Razas No bien Definidas	Conejo; Mushito; Complejo Serrano de Jalisco; Zamorano Amarillo; Maíz Blando de Sonora; Onaveño; Dulcillo del Noroeste.
Razas no clasificadas en alguno de los grupos propuestos	Azul; Apachito; Tablilla de Ocho; Gordo; Tuxpeño Norteño; Bofo; Onaveño; Coscomatepec; San Juan; Carmen; Cónico Mushito; Tablón-Cónico Norteño; Conejo Vandeño; Blandito; Blandito Gordo; Cristalino de Chihuahua; Cristalino de Chihuahua-Tablón; Azul-Bofo; Chalqueño-Elotes Cónicos; Cónico-Norteño-Bofo; Ancho-Olotillo; Olotón-Bolita; Cónico-Bolita; Cónico-Cacahuacintle; Tunicado; Maizón; Xmehenal; Tablón-Perla; Lady Finger; Clavillo; Fasciado; Ratón; Palomero de Chihuahua; Chatino Maizón; Mixeño; Choapaneco; Mixteco; Serrano Mixe. Motozinteco; Elotero de Sinaloa.

Figuroa-Cárdenas y col (2013).

morfológicas, sin embargo, no han sido estudiados lo suficiente. Además, los cambios y usos de las tierras para la siembra de híbridos, podría afectar la gran biodiversidad genética que presentan estos maíces (Pineda-Hidalgo y col 2013).

1. Diversidad genética en Sinaloa

En el estado de Sinaloa, se cultivan en su mayoría maíces híbridos blancos y en algunas áreas maíz amarillo para la producción de etanol y generación de subproductos como pasta con alto contenido proteico para el sector pecuario. Esta política ha dejado de lado la enorme diversidad de maíces criollos que posee nuestro estado y que se cultivan de forma tradicional por campesinos en las zonas altas o de temporal, contribuyendo con ello a la pérdida de diversidad genética.

El entorno de condiciones climáticas desfavorables presentes en Sinaloa, en cuanto a lluvia, disminución de superficies sembradas con maíz de temporal, sustitución por cultivos forrajeros menos exigentes de humedad, así como un entorno social de productores de edad avanzada, y la salida de población joven de las zonas rurales, resulta desfavorable para salvaguardar la diversidad del maíz heredada. Sin embargo, una selección adecuada de híbridos, el manejo eficiente de la fertilización y el uso de paquetes tecnológicos, aunado a la experiencia alcanzada por los productores en el manejo del cultivo, han sido determinantes para elevar los niveles productivos que se han venido mejorando año con año (Miguel y col 2004).

De acuerdo a la base de datos de maíces de México conjuntada por CONABIO, un análisis de la distribución de las distintas razas propone regiones que son centros de diversidad y distribución para el maíz en México, mencionando a Sinaloa como

centro de distribución de 13 razas. Entre estas, las razas Chapalote, Dulcillo de Noroeste, Tabloncillo, Tabloncillo Perla, Reventador, Onaveño, y Elotero de Sinaloa pertenecen al estado (Perales y Golicher 2011; Pineda-Hidalgo y col 2013).

2. Maíz azul raza Elotero de Sinaloa

Se considera asociada con la raza Chapalote, a la cual se asemeja en características de mazorca y planta con diferencias en el color y textura de grano, de la cual probablemente se derivó con cierta influencia de Blando de Sonora o Harinoso de Ocho; y también está asociada con Onaveño (Sánchez 1989). Se caracteriza por sus mazorcas alargadas, semielípticas, de grano de color azul y textura harinosa a semicristalina (**Fig. 3**) (Sánchez 1989; CONABIO 2010).

El maíz azul proviene de la raza cultivada en el occidente de México, desde Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima y se extiende hasta Michoacán y Guerrero (Sánchez 1989; Ron y col, 2006; Carrera y col 2008; Gómez y col 2010; CONABIO 2011).

Se localiza con mayor frecuencia en la parte sur de Sinaloa, como Concordia y El Rosario, y en la parte sur-centro, en los municipios de San Ignacio y Cósala. Cubre una gama amplia de altitud, ya que se localiza desde casi el nivel del mar hasta altitudes mayores a 1,500 metros sobre el nivel del mar. Se utiliza principalmente para la elaboración de tortillas de color azul, que destacan por su sabor y olor (CONABIO 2008). El maíz está compuesto de cuatro partes principales: germen (12%), endospermo (82%), pericarpio (5.2 %) y pedicelo (0.8%) (Eckhoff y col 2003). El endospermo es rico en almidón y proteínas, mientras que el germen lo es en



Fig. 3. Mazorcas de la Raza Elotero de Sinaloa.
Vidal-Martínez (2010).

lípidos, minerales y proteínas. En el caso del pericarpio la mayor parte del mismo es fibra (FAO 1993).

El maíz azul presenta alto contenido de antocianinas, las cuales son las responsables de la pigmentación característica de este grano, y que se encuentran en la capa de aleurona, la cual está compuesta por una capa simple de células de pared celular fina que se encuentra rodeando al endospermo y al germen (**Fig. 4**) (Betran y col 2001). En cuanto a la composición química del grano, ésta varía de acuerdo a las condiciones climatológicas, variedad (genotipo) y condiciones de crecimiento; a su vez, dentro de las distintas zonas del mismo grano, su composición varía de un lugar a otro. Los granos enteros son fuente de fibra, vitaminas, minerales y fitoquímicos, incluyendo compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitamina E, ligninas, β -glucanos, inulina, almidón resistente, esteroides y fitatos (Liu 2007; Urías-Peraldí 2013). Las propiedades nutraceuticas del maíz azul representan actualmente una fuerte línea de investigación, la cual está en pleno desarrollo. Éste interés se debe a la gran cantidad de compuestos fitoquímicos que contiene, ya que cuentan con relevantes propiedades antioxidantes.

F. Compuestos bioactivos asociados al maíz azul

El maíz es una fuente importante de compuestos bioactivos o fitoquímicos, como carotenoides (Kopsell y col 2009; Milán-Carrillo y col 2017), fenólicos (López-Martínez y col 2009) y fitoesteroides (Jr Ostlund y col 2002), los cuales son sintetizados en la planta por el metabolismo secundario. Estos compuestos no se

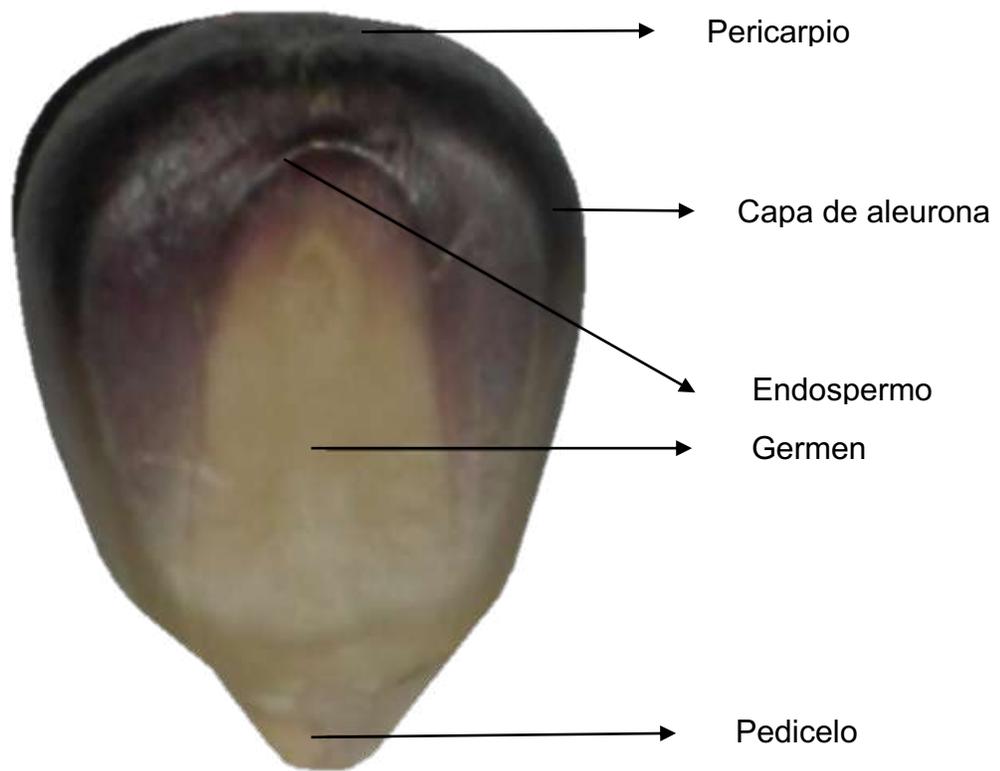


Fig. 4. Estructura del grano de maíz azul.

consideran como nutrientes, sin embargo, poseen actividad biológica, se acumulan en los tejidos dérmicos del cuerpo de la planta debido a su función protectora contra los rayos UV, y como productos químicos de defensa contra patógenos (Sarkar y Shetty 2014; Babbar y col 2015). Cuando son ingeridos, proveen beneficios a la salud ayudando en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (López-Martínez y col 2009; Serna-Saldívar y col 2011; Reynoso-Camacho y col 2015) (**Cuadro 3**). Conviene destacar que la biodiversidad genética presente entre y dentro de las razas de maíces criollos, presentan una función fundamental que incluye la presencia de compuestos nutraceuticos (Serna-Saldívar y col 2013).

Los compuestos bioactivos, se clasifican de acuerdo a sus propiedades químicas y a su actividad biológica, el común denominador de la mayoría de los fitoquímicos o compuestos bioactivos es su propiedad antioxidante. Estos compuestos contrarrestan a los radicales libres responsables de causar la oxidación de membranas y daño al ADN, desencadenando enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares, fibrosis y envejecimiento (Serna-Saldívar y col 2011).

Los fitoquímicos se definen como compuestos bioactivos de origen vegetal, que cuando se ingieren proveen ciertos beneficios funcionales más allá de la nutrición básica. Estos beneficios podrían incluir la prevención y/o disminución de la iniciación y/o progresión de enfermedades crónicas en humanos (Okarter y Liu 2010). Fuente de alimentos comunes son frutas, vegetales y granos integrales.

Cuadro 3. Principales categorías de nutraceuticos asociados con maíces criollos.

Compuesto Familia	Nutraceutico Clase	Parte Anatómica	Efecto Preventivo o Terapéutico
Fenólicos	Simplees como el ferúlico	Principalmente asociados al pericarpio	Previenen el estrés oxidativo, cáncer, alto colesterol, arterioesclerosis y envejecimiento
Antocianinas Flavonoides	Antocianinas, flavonoles, flavan-3-ols	Principalmente asociados a la aleurona	Previenen el estrés oxidativo, cáncer, alto colesterol, arterioesclerosis y envejecimiento
Carotenoides	Carotenos Xantofilas: Luteína, Zeaxantina y Criptoxantina	Principalmente asociados al endospermo de maíces amarillos. Principalmente asociados al endospermo de maíces amarillos	Los B-carotenos son convertidos en vitamina A o retinol. Previenen el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y refuerzan al sistema inmunológico. Previenen a la degradación macular y formación de cataratas (opacidad del cristalino ocular). Retarda aparición de síntomas relacionados con la retinitis pigmentosa. Previenen a las enfermedades cardiovasculares.
Fitoesteroles	Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol	Principalmente asociados al germen, pericarpio y capa de aleurona.	Compiten con los sitios de absorción del colesterol y por consiguiente son considerados como hipocolesterolemicos y previsores de enfermedades cardiovasculares.
Fibra	Soluble como arabinoxilanos	Principalmente asociada al pericarpio.	Mejora función gastrointestinal, incrementa la viscosidad del bolo alimenticio y reduce el índice glicémico. Por lo tanto, reduce el riesgo de diabetes e hipercolesterolemia. La mayoría de las fibras solubles son prebióticas debido a que se fermentan rápidamente en el tracto gastrointestinal posterior

	Insoluble como celulosa y lignina	Principalmente asociadas al endospermo de maíces amarillos	generando ácidos grasos volátiles que a su vez inhiben a la enzima hepática HMG Co-A reductasa. Mejora función gastrointestinal, incrementa el ligado de ácidos biliares y el volumen y peso de las heces reduciendo la constipación, hemorroides, diverticulosis y cáncer.
Ácidos fítico Inositol	Inositol	Principalmente asociado al pericarpio y aleurona	Considerado como antioxidante y con propiedades anticancerígenas de mama, colon, hígado, leucemia, próstata y sarcomas.
Ácidos grasos poliinsaturados	Ácidos Linoleico (18:2 ω 6) y Linolénico (18:3 ω 3)	Principalmente asociada al germen.	Ayudan a reducir triglicéridos y colesterol sanguíneo. Estos ácidos grasos son convertidos en prostaglandinas y otros ácidos grasos como el EPA y DHA.
Fosfolípidos	Fosfatidil colina, etanolamina, inositol, serina	Principalmente asociados al germen.	La fosfatidil colina o lecitina, etanolamina, inositol y serina son esenciales para el apropiado funcionamiento de las membranas celulares y de las neuronas cerebrales. Por consiguiente, previenen el envejecimiento celular y el alto colesterol. La colina es esencial para producir acetil colina considerada como el principal neurotransmisor.
Vitaminas	Tocoferoles	Principalmente asociados al germen.	Los tocoferoles son antioxidantes. El α -tocoferol o vitamina E es considerado como la segunda línea de defensa contra el estrés oxidativo previniendo enfermedades cardiovasculares, alto colesterol y todo

	Ácido fólico	Principalmente asociados a la capa de aleurona.	tipo de cáncer. Además ayudan a mejorar la capacidad mental y función cerebral. Previene abortos y los defectos de tubo neural y malformaciones en bebés. Ayuda a disminuir los niveles de homocisteína y prevenir enfermedades cardiovascular
Policosanoles o ceras	Octacosanol, Tricontanol, Hexacosanol y Dotacontranol	Principalmente asociados al germen y pericarpio.	Reducen lípidos séricos, colesterol y la agregación de plaquetas (Arruzazabala y col 1996).

Serna-Saldívar (2010).

En el grano de maíz se han identificado diversos compuestos fitoquímicos distribuidos en sus diferentes partes anatómicas del grano (**Cuadro 4**).

1. Polifenoles

Los polifenoles son una amplia variedad de metabolitos secundarios sintetizados por plantas vasculares y abarcan más de 8000 compuestos fenólicos relacionados con una variedad de funciones fisiológica, tales como: absorción de nutrientes, fotosíntesis, actividad sensorial, entre otros (Han y col 2007b; Wu-Yang y Zhong 2010). Además, poseen distintos tipos de actividad biológica, tales como antioxidante, laxante, antihipertensiva, antimicrobiana, previenen e inhiben el crecimiento de células cancerígenas, obesidad, arterioesclerosis, embolias, inflamaciones, ataques cardíacos, entre otras (Adom y Liu 2002; Matsumoto y col 2004; Ghanbari 2012). Los compuestos fenólicos poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxil. La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de electrones (Martínez-Valverde 2000).

Los efectos cardiovasculares positivos atribuidos a los polifenoles son también consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antidislipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Los polifenoles contenidos en maíz pueden mejorar el perfil lipídico

Cuadro 4. Compuestos fitoquímicos en genotipos de maíz blanco y azul.

Compuestos Bioactivo (mg 100g ⁻¹)	Maíz Blanco	Maíz Azul	Referencia
Fenólicos Fenoles libres	30-40	27-45.5	Aguayo-Rojas y col 2012; Mora-Rochín y col 2010; De la Parra y col 2007; Del Pozo-Insfran y col 2006.
Fenoles ligados	110-226	115-221	
Fenoles totales	170-450	40-343	
Ácidos fenólicos Ácido ferúlico	120-474	130-336	Mora-Rochín y col 2010; De la Parra y col 2007; Del Pozo-Insfran y col 2006.
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.66	0.13	
Ácido gálico	0.39	Nd	
Antocianinas totales	0.27-1.60	27-63	López-Martínez y col 2012; Mora-Rochín y col 2010; De la Parra y col 2007; Del Pozo-Insfran y col 2006
Cianidina-3-glucósido; pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido	-----	0.23-11.20	Mora-Rochín y col 2016; Jing y col 2008; Abdel-Aal y col 2006
Cianidina-3-(6"-malonil-glucósido); cianidina-3-(6"-succinil-glucósido); pelargonidina-3-(6"-malonil-glucósido)	-----	2.3-5.92	Mora-Rochín y col 2016

Gaxiola-Cuevas (2017).

en sangre y proteger frente al daño oxidativo (Expósito-Gázquez y López- Fernández 2016).

Los efectos antioxidantes de los polifenoles de la dieta previenen la oxidación de las vitaminas y otros nutrientes (lípidos, proteínas, colesterol, etc.), preservando así una mayor calidad de la ingesta de nutrientes (Selma 2009).

En cereales, los fenoles se encuentran en forma libre, soluble conjugada y en su forma ligada (a materiales de la pared celular) en complejas estructuras como celulosa, lignina, y esterificada a proteínas (Adom y Liu 2002). A pesar de esto, estas formas ligadas pueden ser liberadas y absorbidas al ser consumidas en los alimentos. Existen diferentes vías de absorción descritas para compuestos fenólicos ligados en el tracto gastrointestinal, donde los microorganismos, enzimas e incluso los transportadores de glucosa están involucrados (Acosta-Estrada y col 2014). Estos sobreviven al estómago y a la digestión intestinal, y llegan al colon ya que los materiales fibrosos de la pared celular son difíciles de digerir (Adom y Liu 2002). Este fenómeno puede explicar en parte el mecanismo de consumo de granos en la prevención de cáncer de colon y otros cánceres digestivos, apoyado por estudios epidemiológicos. En el caso del maíz, Liu (2007) reporta que el 85% de los compuestos fenólicos se encuentran en forma ligada. En un estudio realizado por Aguayo-Rojas y col (2012) con maíces criollos mexicanos, observaron que el maíz azul presentó alto contenido de fenoles totales comparado con otros genotipos.

Los compuestos fenólicos se subdividen en 3 principales categorías: simples, flavonoides/antocianinas y taninos condensados. Todos los maíces contienen fenólicos simples y ningunos taninos condensados, mientras que solamente los

maíces pigmentados como el azul o morado contienen cantidades significativas de antocianinas (Serna-Saldívar y col 2011).

Podemos indicar que el consumo de maíz azul está relacionado con la disminución de ciertas enfermedades hoy en día, como lo son las enfermedades crónico degenerativas, cardiovasculares, cancerígenas, entre otras. Esta acción beneficiosa está relacionada con su composición de nutrientes y compuestos bioactivos (Reynoso-Camacho y col 2015).

2. Clasificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados en plantas por un par de rutas biosintéticas, las vías predominantes son la ruta de aromáticos, iniciando con la producción de aminoácidos aromáticos a través de la vía del ácido shikímico (Sarkar y Shetty 2014). Algunos aminoácidos aromáticos continúan la vía de fenilpropanoides, produciendo derivados del ácido cinámico, los cuales podrían unirse en la ruta de los flavonoides para dar lugar a una gran diversidad de compuestos flavonoides (Pascual-Teresa y col 2010). Estructuralmente, los compuestos fenólicos son derivados del benceno, con uno o más grupos hidroxilo sustituyentes, frecuentemente acompañados de sustituciones funcionales, tales como: ésteres, ésteres metílicos, glicósidos y otros (**Fig. 5**) (Han y col 2007b; Wang y col 2008). Los polifenoles varían desde compuestos simples a complejos, peso molecular alto y bajo, de anillos aromáticos, sencillos y complejos, posición de glicósidos, taninos y derivados fenólicos grandes (Han y col 2007b; Fernández-Panchon y col 2008; Wu-Yang y Yi-Zhong 2010).

CoA=Coenzima A

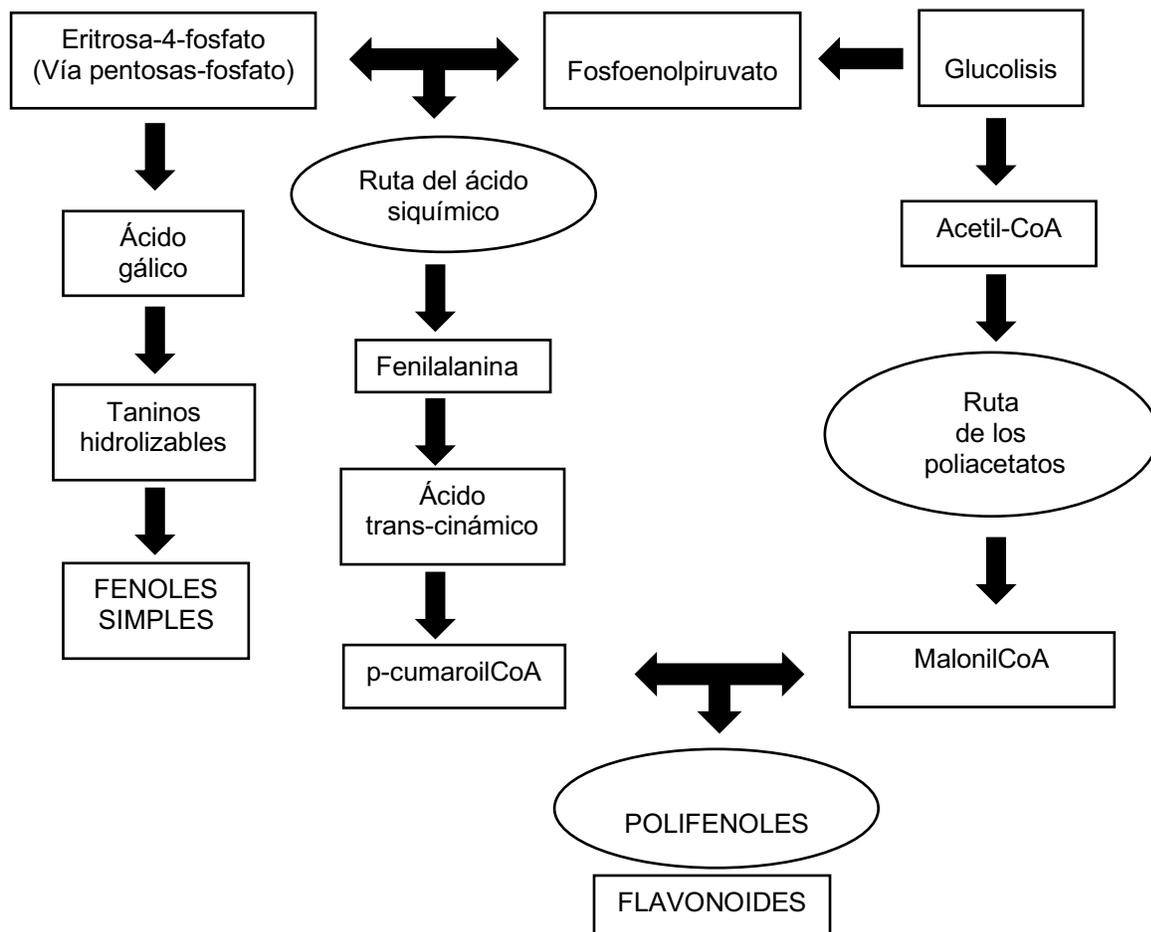


Fig. 5. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas

Wang y col (2008).

Los compuestos fenólicos, sobre sus propiedades estructurales se pueden clasificar en varios grupos (**Fig. 6**) (1) ácidos fenólicos, (2) flavonoides, (3) estilbenos, (4) ligninas y taninos (Han y col 2007b; Paredes-López y col 2010).

Todos los maíces contienen fenólicos simples, mientras que solamente los maíces pigmentados como el azul o morado contienen cantidades significativas de antocianinas. El ácido ferúlico es el compuesto fenólico presente en mayor concentración en maíz, donde se le puede encontrar en forma libre, soluble conjugada y ligada a compuestos de la pared celular (Liu 2007; Mora-Rochin y col 2013; Serna-Saldívar y col 2013).

a. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos están universalmente distribuidos en las plantas, su biodisponibilidad en la dieta es un factor importante en posibles beneficios a la salud de humanos y animales. Compuestos fenólicos simples se han encontrado con mucha frecuencia como resultado de la descarboxilación de ácidos fenólicos, degradación de ligninas o actividad microbiana (Sailendra y col 2006). Del total de polifenoles que se encuentran en las plantas, el 30% son ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico son ácido gálico, vanílico, protocatecuico y siríngico. Los ácidos fenólicos derivados de ácido hidroxicinámico incluyen *p*-cumárico, cafeico y ferúlico (Nichenametla y col 2006), los cuales poseen propiedades como la de inhibir la actividad de agentes mutagénicos, estimulan la actividad de la enzima fenosulfotransferasa, enzima implicada en la detoxificación

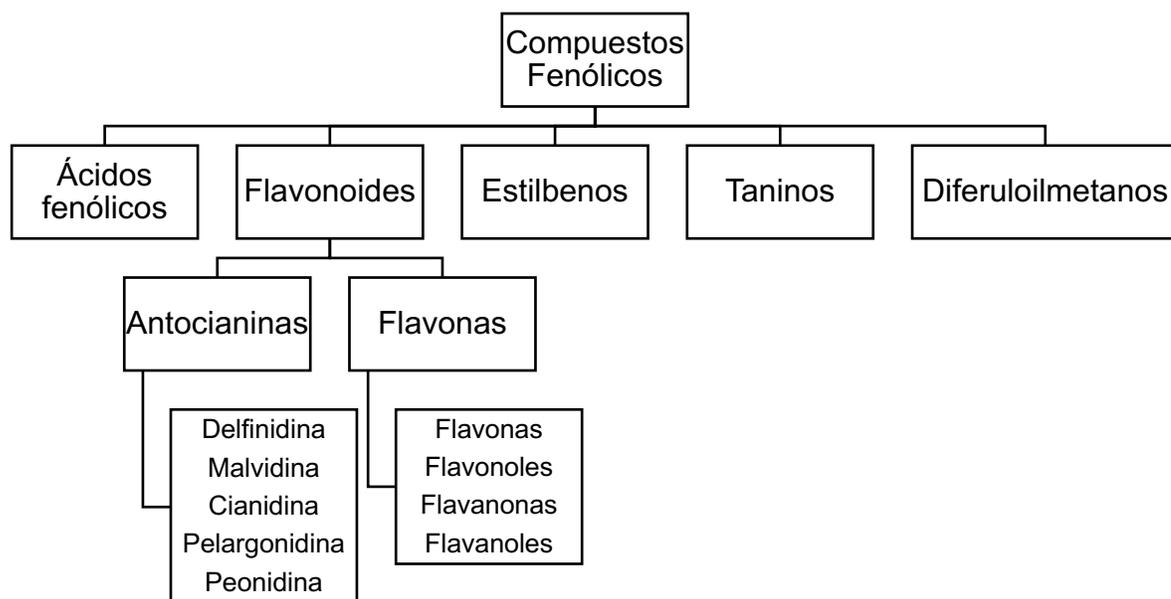


Fig. 5. Clasificación de polifenoles

Han y col 2007b; Paredes-López y col 2010.

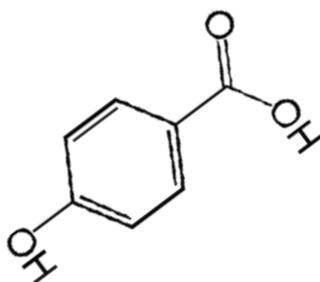
de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos. Además de estas propiedades, los ácidos fenólicos poseen actividad bactericida (Liu 2007).

Los hidroxicinámicos se encuentran más frecuentemente como ésteres simples con ácidos carboxílicos o glucosa y los hidroxibenzoicos están mayormente presentes en forma de glucósidos, tienen la capacidad de eliminar los radicales libres y metales pro-oxidantes (antioxidantes), además existe evidencia científica que estos compuestos tienen otros mecanismos, como la modulación de la actividad de algunas enzimas específicas e inhibir la proliferación descontrolada de células malignas (Manach 2004) (**Fig. 7**).

El ácido ferúlico es el ácido hidroxinámico más abundante en la familia de las Gramíneas (Adom y Liu 2002; De la Parra y col 2007). Se encuentra principalmente en la pared celular de la capa de aleurona ligado a los arabinoxilanos y otros polisacáridos y proteínas (Bunzel y col 2001; Klepacka y Fornal 2006). Estudios previos han determinado la presencia y contenido de ácido *p*-cumárico y ferúlico y sus derivados, variedades de maíz azul comparado con genotipos amarillo y blanco. Los ácidos fenólicos reportados en maíz se presentan en forma libre y ligada (Mora-Rochín y col 2012).

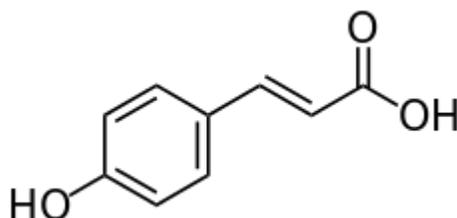
b. Flavonoides

Los flavonoides son encontrados frecuentemente en la naturaleza en su forma glicosilada o esterificada, pero también se pueden encontrar como agliconas. Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en la dieta humana, y son divididos en antocianinas glicosiladas, derivadas de la antocianidina. Este tipo de compuestos



Derivados del ácido hidroxibenzoico

	R1	R2	R3
Ácido p-hidroxibenzoico	H	OH	H
Ácido gálico	OH	OH	OH
Ácido siríngico	OCH3	OCH3	OCH3



Derivados del ácido hidroxicinámico

	R1	R2	R3
Ácido p-cumárico	H	OH	H
Ácido ferúlico	OCH3	OH	H
Ácido sinápico	OCH3	OH	OCH3

Fig. 6. Estructuras de ácidos fenólicos comunes: (a) Derivados de ácido benzoico y (b) derivados de ácido cinámico.

Liu (2007)

proporcionan colores fuertes y se encuentran principalmente en flores y frutas; antoxantinas, son colores más suaves, y se encuentran divididos en diferentes categorías, flavonas, flavanas, flavonoles, flavanales, isoflavonas y sus glicosilados (Han y col 2007b).

La estructura básica de flavonoides es el núcleo flavan, son de bajo peso molecular y consta de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6), conocido como A, B y C (Peluso y col 2015). El nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C permite distinguir las clases de flavonoides, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase se diferencian por sustituciones de los anillos A y B, que pueden incluir hidrogenación, hidroxilación, metilación, sulfatación y glicosilación (**Fig. 8**). Además, el anillo C pirano también se puede abrir en forma de chalcona y reciclarse en un anillo furano (Cook y Samman 1996). Actualmente, el número exacto de flavonoides es difícil de saber, sin embargo, se han identificado más de 5000 diferentes flavonoides y se clasifican por los menos en 10 grupos (Whiting y col 2001), entre ellos los flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, catequinas, antocianidinas y las isoflavonas son particularmente comunes (Pérez-Jiménez y col 2010). Estos compuestos, ayudan a proteger a la planta contra la luz UV, hongos parásitos, herbívoros, patógenos y daño celular oxidativo (Sarkar y Shetty 2014).

c. Antocianinas

Dentro del grupo de los flavonoides, se encuentran las antocianinas, pigmentos hidrosolubles ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Este tipo de compuestos

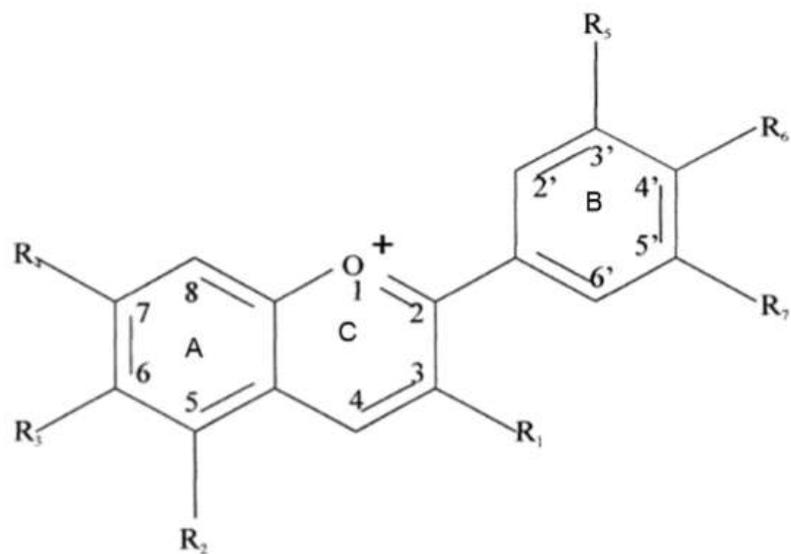


Fig. 8. Estructura básica de antocianinas. Los grupos R_n pueden ser H, OH u OCH_3 , dependiendo de la antocianina considerada. La nomenclatura más común aceptada para numerar los carbonos está indicada dentro de la estructura.

Delgado-Vargas y col (2000).

proporcionan colores fuertes y se encuentran principalmente en flores y frutas (Hann y col 2007). Son solubles en agua y dependiendo del pH y la presencia de metales imparten un color intenso azul o morado (Jing y col 2007).

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos (Springob y col 2003). Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las antocianinas, se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta del ácido siquímico. El ácido siquímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL, por sus siglas en inglés), y después de una pérdida de NH_3 se convierte en ácido *p*-coumárico. El *p*-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil- CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción catalizada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (**Fig. 9**). La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Garzón 2008).

Las antocianidinas más estudiadas, son cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, petunidina y peonidina (Moreno y col 2005), estas se encuentran en frutas, verduras y granos en forma de glicosidos, teniendo glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa o arabinosa adherida a la aglicona (Wang y Stoner 2008). La unidad o

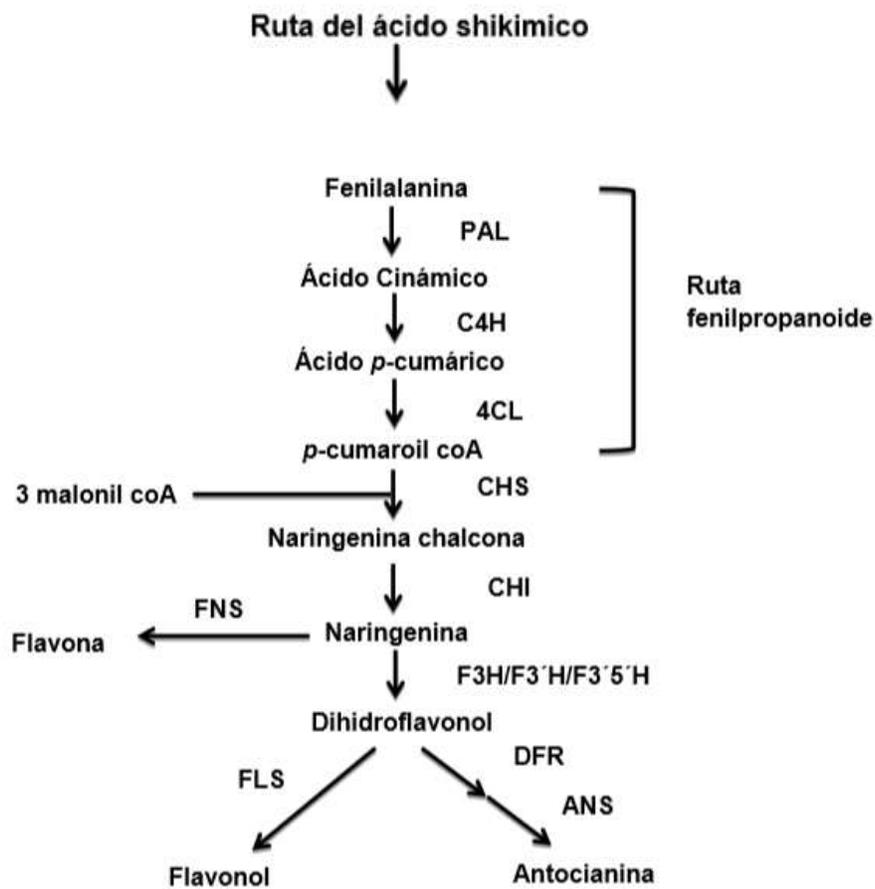


Fig. 7. Ruta general de biosíntesis de las antocianinas.

Las enzimas participantes en la ruta del ácido shikímico son: fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumaroil coA ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3H), flavanona 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H), flavanona 3'-hidroxilasa (F3'H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), antocianidin sintasa (ANS), flavonol sintasa (FLS), flavona sinthasa (FNS).

Zhang y col (2014)

unidades de azúcar le confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7 (Strack y Wray 1989).

En algunos casos, los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (*p*-cumárico, caféico, ferúlico o sinápico). Se ha observado, que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura.

Cuando en la molécula de antocianina se encuentran únicamente azúcares, se denominan glucosiladas; si además de los azúcares están presentes uno o varios radicales acilo, se catalogan como aciladas (Salinas y col 2010). En las estructuras vegetativas de esta gramínea las antocianinas de tipo glucosiladas o no aciladas identificadas son cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido; entre las antocianinas aciladas, cianidina-3-malonilglucosido, cianidina-3-dimalonilglucosido, peonidina-3-(6"- malonilglucosido), peonidina-3-dimalonilglucosido, pelargonidina-3-(5"-malonilglucosido) han sido reportadas (**Cuadro 5**). La estructura completa de las antocianinas aciladas, con la ubicación precisa de los puntos donde el radical acilo y azúcar se unen, se obtiene utilizando técnicas tales como resonancia magnética nuclear. Por otro lado, en maíz azul, las antocianinas presentes son derivadas principalmente de la cianidina y malvidina, siendo la primera dominante (Salinas-Moreno y col 2005). Las antocianinas son muy estables, pero esta estabilidad se reduce cuando el pH se aproxima a la neutralidad, llegando a destruirse completamente a un pH superior a 7 (Gaxiola-Cuevas 2017).

Cuadro 5. Antocianinas reportadas en maíz

Antocianinas	Referencia
<u>Glucosiladas</u>	
Cianidina-3-glucósido	Sánchez-Madrigal y col 2015; Ovando
Pelargonidina-3-glucósido	y col 2010; Yang y Zhai 2010;
Peonidina-3-glucósido	González-manzano y col
	2008; Pedreschi y Zevallos 2007;
	Salinas-Moreno y col 2005.
<u>Aciladas</u>	
Cianidina-3-(6"-malonilglucósido)	Collison y col 2015; Harakotr y col
Pelargonidina-3-(6"-malonilglucósido)	2014; Žilić y col 2012; Cuevas
Peonidina-3-(6"-malonilglucósido)	Montilla y col 2011; Abdel-Aal 2006.
Cianidina-3-(3",6"-dimalonilglucósido)	
Pelargonidina-3- dimalonilglucósido	

Mariela y col (2016).

Las antocianinas encontradas en maíz derivan de cianidina y pelargonidina (Salinas-Moreno y col., 2013; Mora-Rochín y col 2016), aunque otros autores mencionan también la presencia de peonidina y malvidina (Moreno y col 2005). Las antocianinas, además de ser colorantes inocuos para el consumo humano, poseen importantes actividades biológicas entre las que destacan sus capacidades antioxidantes y antimutagénicas (Zhao y col 2009; Gaxiola-Cuevas y col 2017), antiproliferativas del crecimiento de células cancerosas (Jing y col 2007; Mora-Rochín y col 2013).

Mora-Rochín y col (2010) determinaron el contenido de antocianinas de (30.69 mg equiv. cianidina-3-glucósido/100g muestra, bs) en maíz azul, observándose que los genotipos rojo, amarillo y blanco figuraron con tan solo 3.2%, 1.2% y 0.89%, respectivamente, con respecto al contenido en maíz azul. Diversos estudios han determinado varios tipos de antocianinas en diversos tipos de maíces azules, sin embargo, la cianidina-3-glucósido es la de mayor abundancia en este tipo de granos (15.4 a 110.2 mg kg⁻¹) (Abdel-Aal y col 2006; Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2007; Jing y col 2007). Otras antocianinas en maíz azul son la pelargonidina y peonidina presentes en sus formas glucosiladas, aciladas y agliconas (Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2007). Recientemente, se identificaron tipos acilados como cianidina-3-(6ll-malonil-glucósido), cianidina-3-(6ll-succinil-glucósido) y pelargonidina-3-(6llmalonil-glucósido) en maíces criollos azules originarios del estado de Sinaloa (Mora-Rochín y col 2016). Dichos tipos de antocianinas se presume que logran sobrevivir a

tratamientos drásticos como condiciones alcalinas y temperaturas altas, gracias a los grupos acilados que contienen (**Fig. 10**).

d. Flavonas y flavonoles

Las flavonas contienen un enlace doble entre las posiciones C2 y C3 en la estructura de flavonoides (anillo C) y una cetona en la posición C4. La mayoría de las flavonas de frutas y hortalizas tienen un grupo hidroxilo en la posición C5 del anillo A, mientras que la hidroxilación en otras posiciones, más a menudo en la posición C7 del anillo A o posiciones C3' y C4' del anillo B, puede variar en función de la clasificación taxonómica de una fruta o verdura en particular. La aglicona más generalizada son apigenina y luteolina, sin embargo los diversos patrones de sustitución hacen a este grupo más grande, con 309 agliconas en la última compilación de flavonoides (Valant-Vetschera y Wallenweber y col 2006). La glicosilación se produce sobre todo en las posiciones C5 y C7, mientras que la metilación y acilación de grupos hidroxilo en el anillo B. Algunas flavonas son polimetoxiladas, como tangeretina y nobiletina, flavonas típicas que se encuentran en la cáscara de cítricos (William 2006). Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas (Quiñones y col 2012).

Los flavonoles tienen como única diferencia con las flavonas el grupo hidroxilo, un grupo en la posición C3 de éste último, el grupo hidroxilo en el carbono 3 también puede ser glicosilado y es quizás el más común en las frutas y hortalizas. Valant-Vetschera y Wallenweber (2006) reportaron 393 agliconas de flavonoles. De la

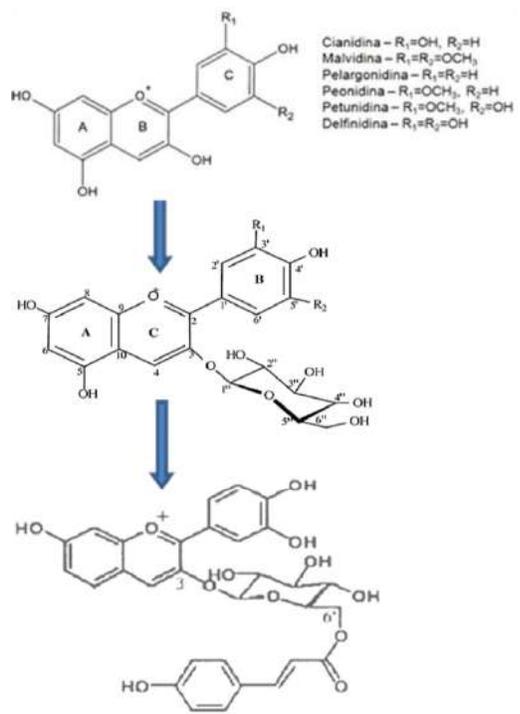
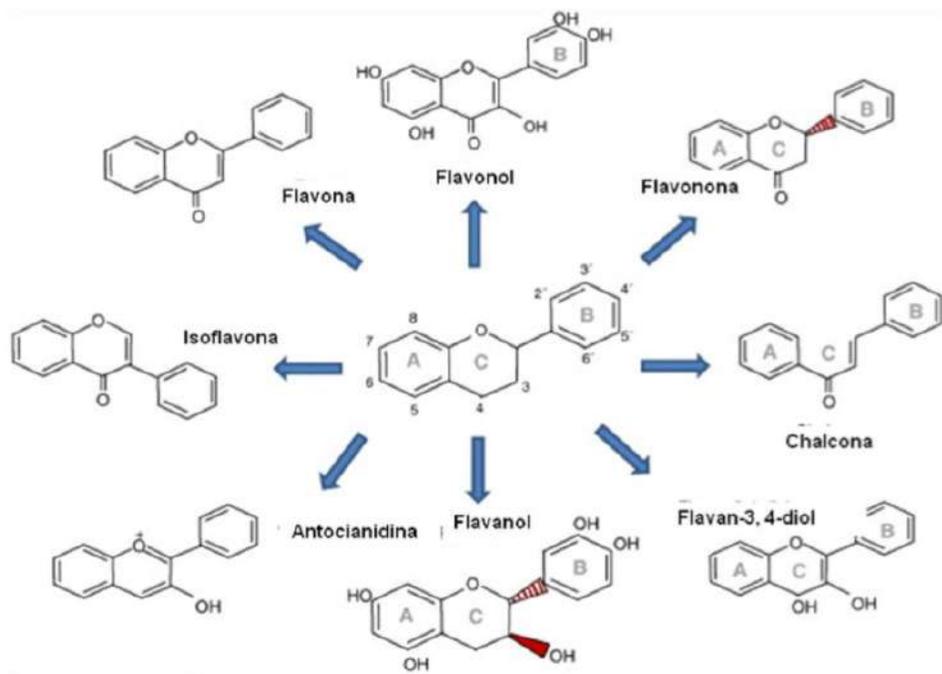


Fig. 10. Estructura genérica de los principales flavonoides y formas básicas de antocianinas.

He y Guistei (2010)

misma manera que las flavonas, estas agliconas son muy diversas en los patrones de hidroxilación y metilación; por lo tanto, cuando los patrones de glicosilación son considerados, los flavonoles son quizás el subgrupo más numeroso. Las agliconas flavonoles más comunes son: quercetina y kaempferol, tienen 279 y 347 combinaciones diferentes de glucósidos, respectivamente (William 2006).

La biosíntesis de flavonoles es un proceso fotosintético. Por ello, estos compuestos se localizan principalmente en el tejido externo y aéreo de la planta. La distribución y la concentración de los flavonoles puede ser distinta incluso en frutas procedentes de la misma planta; esto se debe a que la localización de los frutos condiciona la exposición al sol (Quiñones y col 2012).

G. Biodisponibilidad de Polifenoles

Biodisponibilidad hace referencia a "la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación". Es importante conocer la cantidad total de polifenoles que está presente en un alimento o ingrediente alimentario, pero, es más importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento (Srinivasan 2001).

El concepto de biodisponibilidad cobra gran importancia, dado que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente. En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos

ellos, que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico, incrementar su hidrofobicidad, y facilitar su eliminación urinaria o biliar (Manach y col 2004).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como esteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. En realidad, en los alimentos, prácticamente todos los flavonoides, excepto los flavanoles, presentan formas glucosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría de los glucósidos resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales como la β -glucosidasa y la lactasa-florizin hidrolasa, o deben ser degradadas por la microflora del colon antes de poder asimilarse (Németh y col 2003; D'Archivio y col 2010).

Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren, diversas modificaciones; estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, y esto dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica (Day y Williamson 2001; Natsume y col 2003). Los principales objetivos de los estudios de biodisponibilidad son determinar cuáles son los polifenoles que mejor se absorben, valorar que polifenoles dan lugar a metabolitos activos, y caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos (Quiñones 2012).

La estructura química de los polifenoles, más que su concentración, determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma. La glucosilación afecta al grado de absorción de estos compuestos, y los polifenoles más comunes de nuestra dieta, no son necesariamente los que producen una mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana (D'Archivio y col 2010).

H. Propiedades de los polifenoles

Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles (Bravo 1998; Schroeter y col 2006; Potenza y col 2007; Perez-Vizcaino y col 2009; Middleton y col 2000). Estos efectos son consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (Quiñones 2012).

Los polifenoles son los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides (Rice-Evans y Miller 1996). El maíz azul es uno de los alimentos que destaca por su alto contenido en polifenoles; altamente efectivos como defensa antioxidante (Pannala y col 1997). Flavonoides como la catequina o la quercetina pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno (EROS), como el O_2^- , el H_2O_2 (Binsack y col 2001) o el $HClO$ (Cotelle y col 1996). La quercetina y la miricetina, seguidas por el kenferol, son los flavonoides que poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres. El grupo fenólico que poseen puede actuar directamente capturando electrones desapareados de las EROS, y generar así

especies menos reactivas (Korkina y Afanas'ev 1997). Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados (**Fig. 11**). Además, flavonoles como la quercetina pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las EROS producidas por la reacción de Fenton (Krinsky 1992) (**Fig. 11**).

Los polifenoles también pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Nijveldt y col 2001). Además, estos compuestos pueden inhibir enzimas generadoras de EROS, como la xantina oxidasa y la nicotinamida- adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Orallo y col 2002; Dreosti 1996).

Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos (Schroeter y col 2006; William y col 2004; Ruf 1999). Además de las propiedades vasodilatadoras que favorecen el control del tono arterial, se han descrito otras propiedades de los flavonoides que favorecen también su efecto cardioprotector. Los polifenoles poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos (Pal y col 2003; Actis-Goretta y col 2006). Habría además que señalar, que algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Ojeda y col 2010).

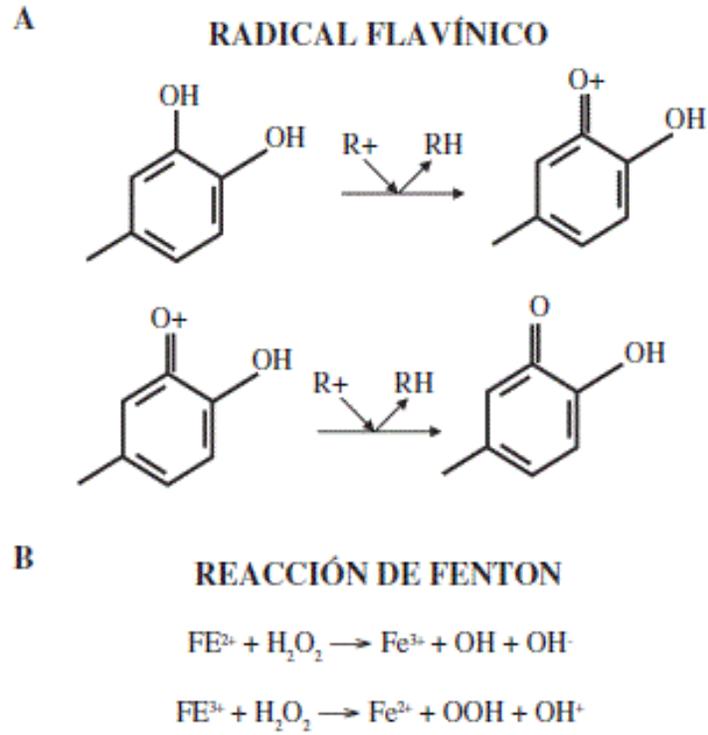


Fig.11. (A) Formación del radical flavínico por la captura de radicales libres por polifenoles. (B) Reacción de Fenton.

Krinsky 1992

El estrés oxidativo produce un aumento de enzimas tales como la COX y la LPO, implicadas en la liberación de factores tales como interleuquinas y quimocinas. Se ha demostrado que los polifenoles, y especialmente la quercetina, inhiben la COX y la LPO (Fan y col 2008).

I. Medición de la Actividad Antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica). En las fuentes dietarias, la presencia de antioxidantes depende, entre otros factores, de la parte del alimento en cuestión. A pesar de que los polifenoles están asociados con varios mecanismos, se cree que su principal modo de acción está relacionado con la alta reactividad hacia radicales libres. Sin embargo, debe distinguirse entre capacidad antioxidante y reactividad. Mientras que la capacidad antioxidante da información acerca de la duración del efecto antioxidante, la reactividad caracteriza solo la dinámica de inicio del efecto antioxidante a una concentración fija de compuesto (Roginsky 2005).

La actividad antioxidante está determinada por: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (Londoño-Londoño 2012).

La necesidad de establecer métodos unificados para medir capacidad antioxidante quedó manifestada por el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes llevado a cabo en Orlando, Florida, EUA en junio del año 2004. El

propósito fue discutir la forma en la cual se determina la capacidad antioxidante de alimentos, fitoterapéuticos, nutraceuticos y suplementos dietarios, y proponer métodos analíticos que pudieran ser estandarizados como procedimientos de rutina, debido a que los métodos existentes presentan resultados inconsistentes, no existe equivalencias entre unos y otros y la interpretación de las conclusiones, en algunos casos, va más allá del alcance de los resultados (Londoño-Londoño 2012).

Un método unificado para determinar capacidad antioxidante debería estar estandarizado y cumplir con los siguientes requisitos: 1) utilizar un radical biológicamente relevante, 2) ser un método simple, 3) utilizar un punto final definido y un mecanismo conocido, 4) emplear instrumentación fácilmente disponible, 5) tener buena reproducibilidad, 6) ser adaptable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y a diferentes radicales, 7) ser adaptable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras (Londoño-Londoño 2012). Queda de manifiesto que ningún método reflejará por sí solo la “capacidad antioxidante total” de una muestra, puesto que este parámetro deberá expresar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas (Londoño-Londoño 2012).

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* (**Cuadro 6**) para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin

Cuadro 6. Comparación de métodos para medir capacidad antioxidantes basada en la instrumentación requerida, la relevancia biológica, el mecanismo antioxidante, el punto final, el método de cuantificación y la adaptabilidad para medir antioxidantes lipofílicos e hidrófilicos.

Ensayo	Instrumentación	Relevancia biológica	Mecanismo	Punto final	Cuantificación	Lipofílicos-Hidrófilicos
ORAC	-	+++	TAH	Tiempo	ABC	+++
ABTS	-	-	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia	+++
DPPH	-	-	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia CE ₅₀	-
PATAR	++	+++	TAH	Fase de Inducción	CE ₅₀ Fase de Inducción	--
CRHF	---	--	TE	Tiempo	Absorbancia	---
Peroxidación lipídica LDL	--	+++	TAH	Fase de Inducción	Tiempo de Inducción, dienos conjugados, SRAT	---

^a De la más (+++) a la menos (---) especializada, ^b relevante, ^e adaptable

^c TAH: Transferencia de Átomos de Hidrógeno, TE: Transferencia de Electrones

^d ABC: Área bajo la curva, CE₅₀: Concentración efectiva 50, SRAT: Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico.

Londoño-Londoño (2012).

embargo, es necesario considerar que los modelos presentan variaciones que pueden dificultar la comparación de los resultados entre un método y otro. En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre; uso de algunos radicales libres metaestables, coloreados, con fuerte absorción en el espectro visible, como herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres (Ej. DPPH, ABTS). Sin embargo, varios estudios han controvertido esta aproximación considerando que con estos métodos pueden medir solo la capacidad para donar hidrógenos, pero que, en muchos casos, no se correlacionan con la capacidad antioxidante (Londoño-Londoño 2012).

1. Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

Los métodos TAH miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. Como se muestra en la ecuación 1, un sustrato oxidable (LH) es atacado por un radical libre ($X\cdot$) generando una especie no radicalaria (XH) y un nuevo radical libre ($L\cdot$). Por su parte, en la ecuación 2 se muestra cómo el antioxidante (AH) transfiere un átomo de hidrógeno para estabilizar el radical libre $X\cdot$ y generar la especie $A\cdot$.



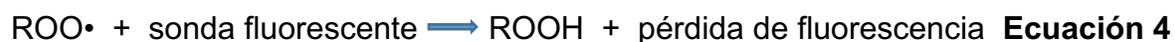
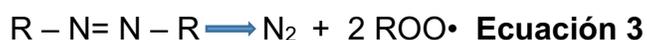
De esta forma, la reactividad de un antioxidante siguiendo un mecanismo de Transferencia de Átomos de Hidrógeno (TAH) estará determinada por la Energía de Disociación de Enlace (EDE) del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. En el caso de los compuestos fenólicos se trata de un enlace ArO-H en donde una

muy baja EDE implica que la reacción descrita por la ecuación 2 es termodinámicamente más favorable que aquella descrita por la ecuación 1. En otras palabras, significa que un radical libre reaccionará más rápidamente con el antioxidante que con el sustrato oxidable. Adicionalmente, la especie A^\bullet , generada en el proceso de estabilización del radical libre, debe ser tan estable como para no reaccionar con el sustrato e iniciar nuevamente una reacción de oxidación, pero lo suficientemente reactiva como para estabilizar radicales libres en un proceso de terminación de cadena. Se acepta que sustancias con valores de EDE alrededor de -10Kcal/mol y $PI < -36\text{ Kcal/mol}$ siguen mecanismos TAH. Las reacciones TAH son rápidas, independientes del pH y el solvente, pero sensibles a la presencia de metales y agentes reductores los cuales pueden generar una aparente mayor reactividad del antioxidante (Londoño-Londoño 2012).

a. ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno)

Estos métodos están basados en los trabajos de Wayner y Glazer (Wayner y col 1985; Glazer 1988) y perfeccionados por Cao (Cao 1997). En general, miden la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo y reflejan un mecanismo clásico de actividad mediada por antioxidantes terminadores de cadena mediante TAH (Ou 2001). Como se muestra en la ecuación 3, el radical peroxilo es generado de una fuente como AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), el cual sufre una descomposición térmica para producir nitrógeno molecular y radicales alquilo, que en presencia de oxígeno generarán radicales peroxilo, los cuales reaccionan con una sonda coloreada o fluorescente para

formar un producto incoloro o no fluorescente, como se muestra en la ecuación 4. La capacidad antioxidante es determinada por la disminución en la velocidad de degradación de la sonda debido a la reacción de los radicales peroxilo con el antioxidante para generar un producto no radicalario, como se muestra en la ecuación 5. En ORAC, generalmente se utiliza fluoresceína como sonda y la reacción suele llevarse por extensos períodos de tiempo (>30 minutos) para garantizar la estabilización de la reacción. Como se muestra en la **Fig. 12**, los cálculos para expresar los resultados se obtienen de la integración del Área Bajo la Curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia calculando el valor de $ABC_{\text{neto}} = ABC_{\text{con antioxidante}} - ABC_{\text{sin antioxidante}}$; se obtiene así información con respecto a parámetros cinéticos como tiempo de inducción y velocidad inicial en un solo parámetro. Generalmente, el resultado se expresa en términos de equivalencia de Trolox (análogo de vitamina E), para lo cual se construye una curva con diferentes concentraciones y las respectivas ABC de Trolox, que genera una curva de calibración que permite interpolar el ABC de la muestra y expresar su capacidad antioxidante en términos de cantidad equivalente a Trolox (Londoño-Londoño 2012).



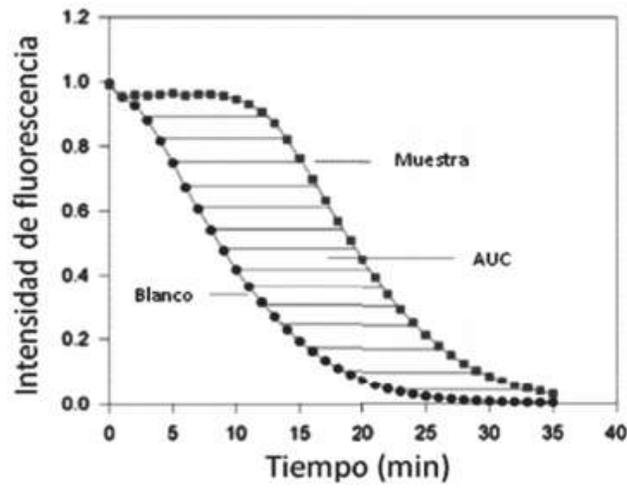


Fig. 12. Curva de decaimiento de la fluoresceína por oxidación con radicales peroxil en un típico ensayo ORAC donde se observa el efecto de un antioxidante (muestra) visto como el aumento en el Área Bajo la Curva (ABC) de decaimiento de fluoresceína.

2. Métodos basados en la transferencia de electrones (TE)

Estos métodos determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Describen reacciones más lentas que las TAH y por esto los cálculos de actividad antioxidante se basan en porcentajes de disminución en los productos más que en cinéticas de reacción. La reactividad relativa de un antioxidante en un método TE está basada, fundamentalmente, en la desprotonación y por lo tanto es gobernada por el Potencial de Ionización (PI), de tal manera que los valores de PI disminuyen con el aumento del pH, reflejando el incremento en la capacidad electrodonante con la desprotonación y por lo tanto, compuestos con $PI > -45$ Kcal/mol siguen un mecanismo predominantemente tipo TE. En general, se ha correlacionado el potencial redox con un mecanismo tipo TE. Los métodos TE son bastante sensibles al ácido ascórbico y ácido úrico, dos sustancias reconocidas por mantener el estado redox en plasma, además pueden detectar el poder reductor de polifenoles. Como en los métodos TAH, los metales pueden generar interferencia causando variabilidad e inconsistencias en los resultados (Londoño-Londoño 2012).

3. Métodos que combinan mecanismos TAH y TE

Algunos métodos ampliamente usados como el ABTS y el DPPH se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos TAH como TE y, por lo tanto, los patrones de

reactividad y el mecanismo son difíciles de interpretar cuando no se conoce la estructura química del antioxidante evaluado (Londoño-Londoño 2012).

J. USOS DEL MAÍZ

En México, los maíces pigmentados (azules y rojos), se destinan principalmente al autoconsumo y elaboración de productos tradicionales (tortillas, tamales, atoles, etc), frituras de tortillas, productos expandidos y otros alimentos tipo botana (Guillen y col 2002; Turiján y col 2012). De este tipo de maíz se pueden obtener productos alimenticios pigmentados de forma natural, esto tiene gran importancia en el mundo, debido a problemas de salud asociados con el consumo indiscriminado de alimentos con aditivos, dentro de los cuales se encuentran los colorantes artificiales. En la actualidad, el maíz pigmentado ha recibido mayor atención desde un punto de vista nutracéutico (Serna-Saldívar y col 2013; Gaxiola-Cuevas y col 2017).

K. PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DEL MAÍZ

1. PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN

El proceso de nixtamalización tiene una función crítica en el aumento del valor nutricional del maíz a través de la preparación de productos alimenticios para el consumo humano como tortillas, botanas de tortilla, botanas de maíz y totopos. Este proceso también se conoce con el término de cocción alcalina (Bressani 1990; Serna-Saldívar y col 1990). La tecnología para la producción de tortilla es ancestral y se ha transmitido de generación en generación. Esta tecnología involucra el cocimiento térmico-alcalino del grano de maíz, proceso denominado nixtamalización (del Náhuatl *nixtli* = cenizas y *tamalli* = masa cocida de maíz)

(Paredes-López y col 2009). En México todavía se utilizan estas técnicas, como en los tiempos de los aztecas; el maíz nixtamalizado era molido en un metate para producir la masa que era utilizada para formar a mano discos de aproximadamente 20 cm de diámetro, los cuales eran cocidos en un comal de barro. El producto resultante era llamado tlaxcalli por los aztecas y posteriormente tortillas por los españoles (Clavijero 1979). Durante el proceso por nixtamalización tradicional, el maíz es sometido a condiciones de alto contenido de humedad, calor (80 a 105 °C) y pH elevado (11 a 12) (De la Parra y col 2007). El proceso de nixtamalización requiere la cocción de los granos de maíz en una solución de agua con cal, dejándolo reposar durante la noche. Generalmente, la relación de maíz y solución alcalina oscila entre una parte de los granos de maíz enteros a 3-10 partes de la solución alcalina. La solución consiste en una solución de agua y cal [2% p/p de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)]. El maíz se cocina a temperatura de ebullición seguido de un período de reposo del orden de 12 horas. El proceso de cocción ablanda el pericarpio y permite al endospermo absorber agua, lo que facilita su posterior molienda (Serna-Saldívar y col 1990).

Después del periodo de reposo, la solución alcalina es drenada. En este punto al maíz se le llama nixtamal, y el líquido rico en sólidos de maíz, se llama nejayote. El nejayote es un producto altamente contaminante, es un desecho alcalino que tiene una gran demanda de oxígeno, el cual debe ser eliminado adecuadamente en el proceso, lo que aumenta el costo del proceso de nixtamalización tradicional. El nixtamal es lavado varias veces con agua para eliminar el exceso de cal. Los granos cocidos y nixtamalizados son molidos, posteriormente a la harina se le

adicionan pequeñas porciones de agua, y como resultado se obtiene la masa de maíz. A partir de esta masa se pueden elaborar diversos productos (Serna-Saldívar y col 1990).

La nixtamalización induce cambios que desde el punto de vista nutricional, son positivos en lo referente a la biodisponibilidad de nutrimentos. Se ha reportado un aumento significativo en el contenido de calcio (del orden de 13 veces), el cual es biodisponible prácticamente en su totalidad (Bressani 2008). También es mayor la cantidad de fibra dietaria soluble e incrementa la biodisponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales, lo que aumenta sensiblemente el valor biológico de la proteína (Paredes-López y col 2009). Aunque se reportan pérdidas de niacina de hasta 22 % después del tratamiento alcalino (Bressani 2008), las moléculas que quedan intactas son liberadas como ácido nicotínico para su aprovechamiento, lo que destruye el efecto pelagrogénico que tienen las dietas ricas en maíz crudo o tostado. La nixtamalización también puede favorecer la formación de almidón resistente (Paredes-López y col 2009), el cual al no ser digerido en el intestino delgado se comporta de forma similar a la fibra soluble. Adicionalmente, se ha reportado la degradación de aflatoxinas durante la nixtamalización y elaboración de tortillas (Méndez-Albores y col 2004). Varios estudios han informado de los efectos de la nixtamalización en la producción de tortilla ocasionan una disminución en el contenido polifenólico y actividad antioxidante, sin embargo, también se reporta el incremento de algunos compuestos bioactivos (De la parra y col 2007; Mora-Rochín y col 2010; Bello-Pérez y col 2015; Corrales-Bañuelos y col 2016; Mora-Rochín y col 2016).

IV. JUSTIFICACIÓN

El estado de Sinaloa cuenta con una gran biodiversidad de maíces pigmentados. Estos maíces contienen altas concentraciones de compuestos bioactivos y una alta capacidad antioxidante. Es necesario identificar los compuestos que les confieren calidad nutricional, nutraceutica e industrial, sobre las variedades comerciales, otorgándoles valor agregado, además forman parte de nuestra riqueza nacional y biodiversidad.

La información generada será de importancia para los fitomejoradores y conservadores del maíz nativo de México. Existe poca información científica sobre extractos purificados de tortilla de maíz criollo azul y su efecto potencial en la actividad antioxidante y citotóxica en células Raw-264.7.

V. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante y citotóxica en células Raw-264,7 de extractos purificados de tortillas de maíz criollo azul está relacionada con las transformaciones estructurales de los fitoquímicos retenidos en el proceso de nixtamalización.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto potencial antioxidante y citotóxico de extractos purificados de tortillas de maíz criollo azul.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización física del grano de maíz criollo azul, Elotero de Sinaloa.
2. Obtener harinas instantáneas por el proceso de nixtamalización y elaborar tortillas.
3. Obtener las fracciones purificadas en antocianinas y polifenoles de grano y tortilla nixtamalizada.
4. Determinar los niveles de compuestos bioactivos (fenólicos y antocianinas) al grano maíz azul, tortillas y fracciones ricas en polifenoles y antocianinas.
5. Determinar la actividad antioxidante (ORAC, ABTS y DPPH) al grano de maíz azul, tortilla y extractos purificados ricos en polifenoles y antocininas.
6. Evaluar el efecto citotóxico de los extractos ricos en polifenoles y antocianinas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Se utilizó maíz (*Zea mays* L.) criollo Azul Raza Elotero de Sinaloa (A-512), cultivado en condiciones de riego en el municipio de Concordia. El grano criollo azul fue colectado durante el año 2016 por campesinos tradicionales del municipio. Después de la cosecha los granos se limpiaron y almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su utilización. El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutraceuticos del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

B. MÉTODOS

1. Características físicas del grano de maíz criollo azul

a. Dimensiones físicas

Para la determinación de las dimensiones físicas de las semillas de maíz se registró longitud, ancho y grosor utilizando un vernier digital Lcd (Truper) (Milán-Carrillo y col 2000). Las determinaciones se realizaron en 50 semillas seleccionadas al azar por triplicado.

b. Peso de 1000 granos

Para el peso de 1000 granos, se seleccionaron al azar 1000 granos de un lote de semillas limpias, y se pesaron en una balanza analítica. La prueba se realizó por triplicado (AACC 1995).

c. Peso hectolítrico

Para el peso hectolítrico se empleó el procedimiento 55-10 de la AAC (1995). Un recipiente de volumen conocido (1 L) se llenó de granos y se pesaron en una balanza analítica. El peso hectolítrico se obtuvo al dividir el peso de los granos entre el volumen del recipiente y relacionándolo a un volumen de 100 L (kg/hL). Las mediciones se realizaron por triplicado.

d. Índice de dureza

1) Índice de flotación

Se determinó de acuerdo a la norma mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002 (NOM 2010). Se utilizó una solución de nitrato de sodio (NaNO_3), a una densidad de 1.25 g/mL. Se tomaron 25 granos al azar y se colocaron en un vaso de 50 mL que contenía la solución de nitrato de sodio, separando los granos por medio de un agitador de vidrio, se agitó y se esperó un minuto para tomar la lectura. El número de granos que ascendieron a la superficie se usó como el índice de flotación. El número de granos que flotaron fue multiplicado por cuatro. Se relacionó granos flotantes, respecto a dureza y tiempo de cocción. La prueba se realizó por triplicado.

2) Pericarpio remanente

La determinación consistió en colocar en baño María a 50 °C, 5 granos de maíz en un vaso de precipitado de 100 mL, con un volumen de 25 mL de hidróxido de sodio 2N (NaOH). Los vasos son conservados en el baño María durante 10 y 15 min, tomando lectura del comportamiento del pericarpio del grano respecto a las características presentadas referentes a la hinchazón, formación de burbujas,

separación parcial del pericarpio, endospermo de cada grano de maíz, así como también, separación total del pericarpio, por medio de una valoración visual a los 10 y 15 min. Se asignó un valor en una escala del 1 al 5 según lo reportado en la NMX-FF-034/1-SCFI-2002 (NOM 2010). La prueba se realizó por triplicado.

2. Propiedades fisicoquímicas del grano de maíz azul

a. Densidad aparente

Se determinó de acuerdo a NMX-FF-034/1-SCFI-2002 (NOM 2007). En una probeta graduada se midió 100 mL de harina. Se registró el volumen de la harina, y su peso correspondiente, la harina se vació en otro recipiente, para el cálculo de la densidad aparente, la cual se expresó en g/cm^3 . La prueba se realizó por triplicado.

3. Composición química

a. Humedad

Se determinó de acuerdo al método 925.10 de AOAC (1999); se registró la pérdida de peso de la muestra después de someterse a calentamiento para remover la humedad por temperatura. Se empleó una muestra de 3 g y una temperatura de 70°C por 12 h y a 130°C por 3 h, en una estufa sin circulación de aire. La prueba se realizó por triplicado.

4. Nixtamalización tradicional

Se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Milán-Carrillo y col (2004). Porciones de 500 g de maíz se cocieron en una disolución de cal (5.4 g cal/L) a 85°C; se usó una relación grano/medio de cocción de 1:3 y tiempos de nixtamalización y de reposo de 31 min y 8.1h, respectivamente. El licor de cocción

(nejayote) se decantó y el nixtamal se enjuagó tres veces con agua destilada. El nixtamal se secó (55°C, 12 h), se enfrió a temperatura ambiente y se molió hasta obtener un tamaño de partícula de 0.180 mm de diámetro. Las harinas obtenidas, se guardaron en bolsas de polietileno selladas y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

5. Elaboración de tortillas de maíz criollo azul obtenidas por el proceso de nixtamalización tradicional

Las tortillas se prepararon siguiendo la metodología reportada por Milán-Carrillo y col. (2004). 200 g de harina se mezclaron con suficiente agua para alcanzar una consistencia adecuada para la producción de tortillas, con ayuda de una prensa manual. Las tortillas se enfriaron a temperatura ambiente, se molieron para obtener harinas y se guardaron en bolsas de polietileno selladas y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Las tortillas fueron enfriadas, liofilizadas, y almacenadas hasta su uso posterior.

6. Obtención de harina de grano de maíz azul y tortillas nixtamalizadas

Para realizar todos los ensayos es necesario obtener harinas para su estudio. Las tortillas liofilizadas fueron sometidas a un proceso de molienda (molino, UD CycloneSampleMill, UD Corp, Boulder, CO, EUA) hasta pasar a través de malla 80 (0.180 mm). Las harinas de tortillas obtenidas se guardaron en bolsas de polietileno selladas y fueron almacenadas (-20°C) hasta su utilización.

7. Compuestos bioactivos

a. Determinación del contenido de compuestos fenólicos

1) Extracción de fenólicos libres

La extracción de fenólicos libres se realizó según el método descrito por Adom y Liu (2002). Se procedió con una extracción de los fenólicos libres de las diferentes muestras, de 0.5 g de harina con 10 mL de etanol al 80% (v/v); esta suspensión se agitó en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) velocidad 25 rpm por 10 min. Después se centrifugó a 3000 x g a 10°C por 10 min. El sobrenadante se concentró a 35°C a presiones bajas (Speed Vac Concentrator, Thermo Electron Corporation) hasta alcanzar un volumen final de 2 mL. El concentrado se almacenó a -20°C hasta su posterior uso en la determinación de actividad antioxidante atribuida a compuestos fenólicos libres. Las extracciones se realizaron por cuadruplicado.

2) Extracción de fenólicos ligados

La extracción de fenólicos ligados se realizó de acuerdo al método descrito por Adom y Liu (2002) con algunas modificaciones. El residuo del extracto libre fue digerido con 10 mL de NaOH 2M, se eliminó el O₂ en presencia de N₂ gas y la muestra se sometió a un tratamiento térmico por 30 min en baño María a 95°C y, posteriormente, se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con 2 mL de HCl concentrado y se le agregaron 10 mL de hexano para remover lípidos. La mezcla resultante se extrajo con 10 mL de acetato de etilo cinco veces. La fracción de acetato de etilo fue recolectada y se evaporó a sequedad (Speed Vac Concentrator, Thermo Electron Concentrator). Los

compuestos extraídos se reconstituyeron con 2 mL de metanol al 50% y se almacenaron a -20°C para su posterior utilización en la determinación de capacidad antioxidante atribuida a compuestos fenólicos ligados. Las extracciones se realizaron por cuadruplicado.

b. Preparación de los extractos de polifenoles de maíz criollo azul

El proceso utilizado para preparar fracciones enriquecidas de polifenoles y antocianinas en harinas de maíz criollo azul, Elotero de Sinaloa se ilustra en la **Fig. 13.**

1) Extracto crudo (EC)

Para la extracción de los compuestos fenólicos en harinas de maíz criollo azul se utilizó el método descrito previamente por Cuevas-Rodríguez y col (2011) con ligeras modificaciones. Se tomaron 30 g de cada muestra y se mezclaron con disolución de 100 mL de metanol al 80% al 0.3 % ATA (Ácido Tricloroacético) (v/v) en agitación durante 24 h a 15°C, el sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman's de 125 y 40 mm para posteriormente almacenar a 4°C en botellas color ámbar. El proceso de extracción se repitió 3 veces como se describió anteriormente. Todos los sólidos se deshecharon y los solventes se evaporaron en un rotavapor Büchi R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a controlador de vacío V-850 (Büchi Corp, New Castle, DE, EUA). Los extractos crudos de maíz azul obtenidos se liofilizaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2) Extracto concentrado de polifenoles (EP)

Para la obtención de extractos concentrados de polifenoles (EP) se utilizó la metodología propuesta por Cuevas-Rodríguez y col (2011), con algunas

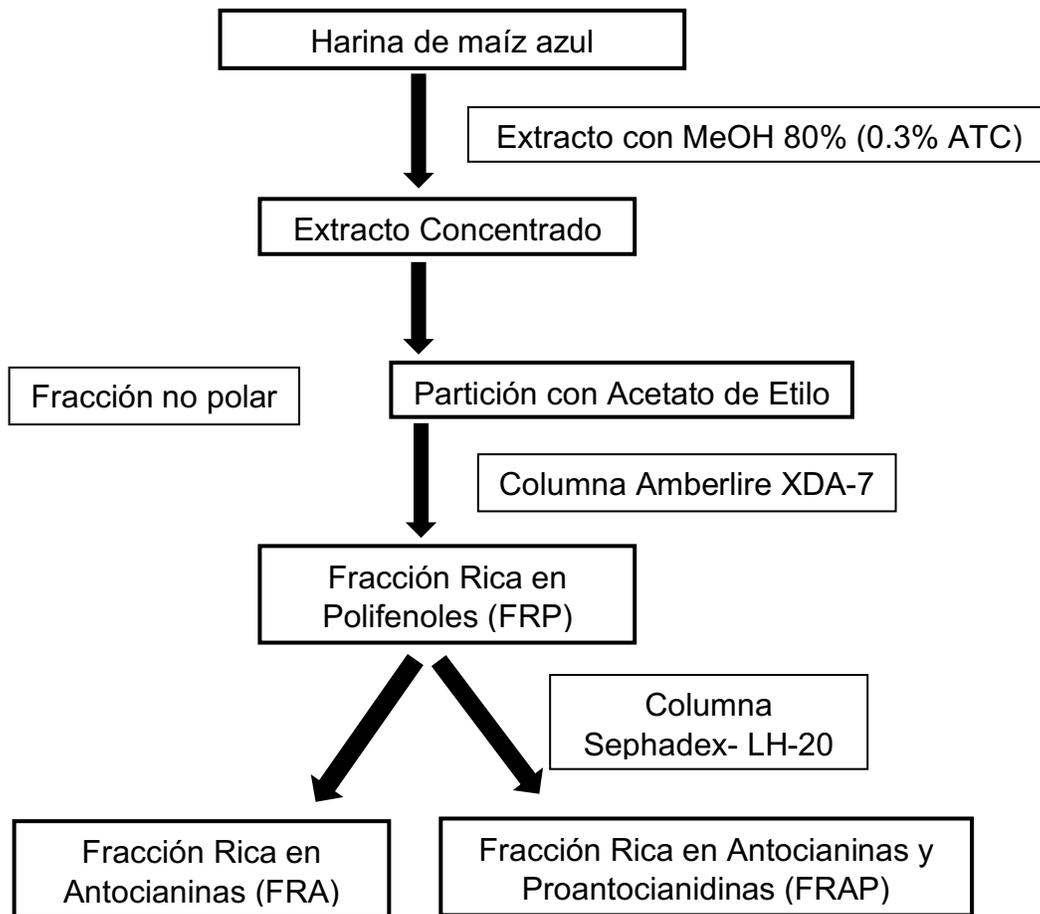


Fig. 13. Diagrama para obtener los extractos concentrados de polifenoles, antocianinas y proantocianidinas a partir de maíz azul liofilizado

Dónde: FRA incluye las fracciones 1-3, las cuales contenían principalmente antocianinas eluidas con MeOH 80%, FRAP fracción que contiene principalmente antocianinas y proantocianidinas eluidas con acetona 70%.

modificaciones. 10 g de maíz liofilizado se mezclaron en un frasco con 50 mL de metanol al 80% acidificado [0.3% de ATA (1:5, p/v)] y se filtró tres veces a través de capas múltiples de algodón para separar el pigmento púrpura. La mezcla resultante se filtró primero en papel Whatman's de 125 y 40 mm. (Florham Park, NJ, EUA en condiciones de oscuridad. El extracto hidroalcohólico colectado se concentró por evaporación rotatoria (40°C para remover el metanol. El concentrado acuoso restante se diluyó con acetato de etilo (4:120 mL) para remover los compuestos liposolubles y el extracto fue de nuevo concentrado para remover el acetato de etilo. La fracción acuosa (~120 mL) se aplicó en la parte superior de una columna cromatográfica (30 x 10 cm, Vineland, NJ, EUA) empacada con resina Amberlite XDA-7 (tamaño del grano, 20-60 mesh, Sigma Life Science, CO, EUA), previamente acondicionada con agua acidificada (0.3% ATA), donde la mezcla de polifenoles se adsorbió y se lavó en agua acidificada (0.3% ATA) para remover los azúcares libres, pectinas y otras impurezas. El extracto de mezcla de polifenoles (EP) se eluyó de la columna con metanol acidificado (1000 mL) como fase móvil. El metanol se evaporó en un rotavapor Büchi modelo R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a un controlador de vacío V-850 (Büchi Corp) y posteriormente se liofilizó utilizando una liofilizadora modelo VL-61010 (Labconco Inc., Kansas City, MO, EUA) para asegurar que los restos de humedad fueran removidos, y finalmente los extractos ricos en polifenoles (EP) se almacenaron en botellas de vidrio color ámbar en congelador (-20°C) hasta su uso. Las extracciones de muestras de maíz azul se realizaron las veces necesarias.

3) Extracto rico de antocianinas

La extracción de antocianinas se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Cuevas-Rodríguez y col (2011) con algunas modificaciones. Extractos ricos en polifenoles (2.0 g) se disolvieron en 5 mL de metanol al 80% (v/v) con ligera sonicación para facilitar la disolución y después se aplicaron a la parte superior de una columna cromatográfica empacada con resina Sephadex-LH-20 (3 x 30 cm), previamente preconditionada con una disolución de metanol [80% (v/v), 0.3% ATA]. Se utilizaron dos sistemas de disolventes para eluir los compuestos polifenólicos de la columna Sephadex: metanol [80% (v/v), 0.3% ATA] y acetona [70% (v/v)]. Un total de 4 fracciones (50 mL cada una) se colectaron, iniciando cuando el material púrpura comenzó a eluir de la columna. Las primeras tres fracciones fueron ricas en antocianinas (FRA) y se utilizó metanol [80% (v/v), 0.3% ATA] como fase móvil para eluir el extracto rico en antocianinas. Para eluir las fracciones ricas en proantocianidinas (FRAP) de la columna Sephadex-LH-20 se utilizó como fase móvil acetona [70% (v/v)]. Los solventes orgánicos de todas las fracciones se evaporaron con un rotavapor Büchi modelo R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a un controlador de vacío V-850 (Büchi Corp.) y posteriormente se liofilizaron utilizando una liofilizadora modelo VL-61010 (Labconco Inc., Kansa City) y finalmente, ambos extractos ricos en antocianinas (FRA) y en proantocianidinas (FRAP) se almacenaron en frascos color ámbar en un congelador (-20°C) hasta su uso.

c. Determinación de compuestos fenólicos totales

Para determinar la concentración de fenólicos totales de los extractos y de las harinas se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col (1999). En una placa de 96 celdas, se agregaron 20 μ L de una solución estándar de ácido gálico, en las siguientes celdas se agregaron 20 μ L del extracto de fenólicos libres, ligados, extractos de polifenoles y ricos en antocianinas. El estándar y los extractos se mezclaron con 180 μ L del reactivo de Folin, la reacción se neutralizó con 50 μ L Na_2CO_3 al 7% y posteriormente se incubó en el espectro, después de 90 min, se registró la absorbancia a 750 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). Se construyó una curva de calibración con ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico (EAG) /100 g de muestra. El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó al sumar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de fenólicos libres y ligados. La determinación se realizó por cuadruplicado.

d. Determinación de Antocianinas Totales

Las antocianinas totales se determinaron por el método descrito por Abdel-Aal y Huel (1999) para los extractos de harina de grano de maíz azul y tortillas nixtamalizadas. Se pesaron 0.1 g de muestra en un vial de 2 mL, se agregó 1 mL de etanol frío acidificado (95% metanol y 1 N HCl, 85:15, v/v). Posteriormente se centrifugó a 3000 x g por 10 min, el sobrenadante se recolectó y para los extractos ricos en polifenoles y antocianinas se utilizó el mismo método descrito por Abdel-Aal y Huel (1999), pero con ligeras modificaciones. La absorbancia de las muestras fue registrada a 535 nm y 700 nm en un lector de microplatos (Synergy

HT, Biotek Instrument). El contenido de antocianinas se calculó de la siguiente manera: $C = ((A_{535nm} - A_{700nm}) / \epsilon) \times (\text{vol. total de extracto}) \times PM \times (1/\text{peso de muestra})$, Donde, C es la concentración total de antocianina (mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra), ϵ es la absorción molar (cianidina-3-glucósido = 25965 cm⁻¹ M⁻¹) y PM es el peso molecular de cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol.

8. Determinación de la capacidad antioxidante

a. Método ORAC

Se preparó una solución stock de fluoresceína (FL) (1.2 mM) pesando 39.87 mg del reactivo y disolviéndola en 100 mL de una solución reguladora de fosfatos (PBS) (75 mM, pH 7.4). De la solución stock anterior se preparó una segunda solución de FL por dilución (10 μ M). La solución de trabajo de FL (0.1 μ M) se preparó diariamente por dilución tomando 0.25 mL (250 μ L) de la segunda dilución de FL en 25 mL de la solución reguladora de fosfatos (PBS). El generador de radicales libres (AAPH) (200 mM) se preparó diariamente pesando 207 mg del reactivo y aforando en un matraz volumétrico de 5 mL con solución reguladora de fosfatos (PBS). Se utilizó como estándar de referencia una solución de Trolox 1 mM (1000 μ M) que se preparó a partir de una solución stock de trolox 5 mM (almacenada a -20 °C) con PBS. Para el ensayo se transfirieron alícuotas de 25 μ L de los extractos de fenólicos libres y ligados (diluídas previamente con PBS) a una placa de 96 pozos, que se colocó en un lector de microplatos (SynergyTM HY Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA), donde fueron dispensados 150 μ L de FL (0.1 μ M). La placa se agitó e incubó a 37 °C por 30 min antes de agregar

25 μ L de la solución de AAPH. La reacción se llevó a 37 °C y la fluorescencia fue registrada (485 nm de excitación y 538 de emisión) cada 2 min durante 60 min para determinar el área neta bajo la curva que genera la pérdida de fluorescencia (AUC [AUCAOX AUCno AOX] con respecto a un blanco. Una curva de trolox fue utilizada como estándar (concentración de 25 a 100 μ M). Los datos se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de muestra en base seca (μ mol ET / 100 g bs) (Ou y col 2001; Prior y col 2003).

b. Método ABTS

Las capacidades antioxidantes de extractos libres y ligados de tortillas nixtamalizadas y extractos ricos en polifenoles y antocianinas para la eliminación de radicales libres se estimó en términos de la actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS propuesto por Re y col (1999), el cual se basa en la reducción del radical ABTS^{•+} por los antioxidantes presentes en los extractos evaluados. El ABTS se disolvió en agua desionizada a una concentración 7 mM. Una solución stock del catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se generó mediante la reacción de la solución de ABTS con persulfato potásico 2.45 mM (concentración final) y permitiendo que la mezcla reposara en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. Una alícuota de la solución con el radical ABTS^{•+} se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 765 nm. Se tomó una lectura del blanco y los extractos (20 μ L) se transfirieron a una cubeta de plástico y el ensayo se inició al adicionar 1980 μ L de la solución ABTS^{•+}. Se registró la absorbancia a 735 nm 15 min después de la mezcla inicial y se calculó la pérdida de absorbancia del

ABTS•+ respecto a un blanco. Se preparó una curva de calibración con Trolox y los datos se expresaron como micromoles equivalentes de trolox (ET) por 100 g de muestra en base seca (μmol de ET/100 g, bs).

c. Método DPPH

La determinación se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Brand-Williams y col (1995), con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pozos se añadieron 5 puntos de curva de trolox (25, 50, 60, 75, 100 μM), 22 μL de extractos libres y ligados y 200 μL del radical DPPH (150 μM) en metanol. La mezcla fue agitada y mantenida en oscuridad a temperatura ambiente 30 min. Las medidas de absorbancia se realizaron a 517 nm (λ de máxima absorción). La concentración de DPPH en el medio de reacción se calculó a partir de una curva de calibración obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresaron como actividad antioxidante micromoles equivalente de Trolox/100 g de muestra en base seca [μmol ET/100 gr (bs)]. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

e. Caracterización de Antocianinas

1) Análisis por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)

La cuantificación e identificación de antocianinas se realizó por HPLC. Se utilizó un equipo HPLC (Perkin Elmer, Alemania), equipado con una columna de 250 mm x 4.6 mm, una columna 18 YMC y un detector UV-visible. El método consistió en inyectar 10 μL de muestra a temperatura ambiente (25 °C), se midió la absorbancia a 520 nm. Para el análisis se utilizaron dos fases móviles, la fase (A) consistió en 5% de ácido fórmico en agua grado HPLC y la fase (B) 100% de metanol, el gradiente de elución utilizado fue: 10, 15, 25, 30, 60, 10 y 10% del

solvente B, y 0, 5, 15, 20, 25, 45, 47, y 60 min del solvente A. La velocidad de flujo utilizada fue 1 mL/min, como estándar se utilizó cianidina-3-glucósido. La identificación en el extracto de cianidina 3-glucósido se realizó por comparación del tiempo de retención, orden de elución, datos del espectro UV-visible que presentó la muestra y el estándar, el cual consistió en una mezcla de antocianinas, que fueron extraídas y purificadas de una fuente de origen vegetal de zarzamoras (*Rubus* spp.) cultivadas en México, en un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación por Cuevas-Rodríguez y col (2011). La curva de calibración consistió en preparar 4 concentraciones de cianidina-3-o-glucosido (0.005, 0.5, 1 y 5 mg/ml). Todos los extractos ricos en antocianinas se analizaron por duplicado.

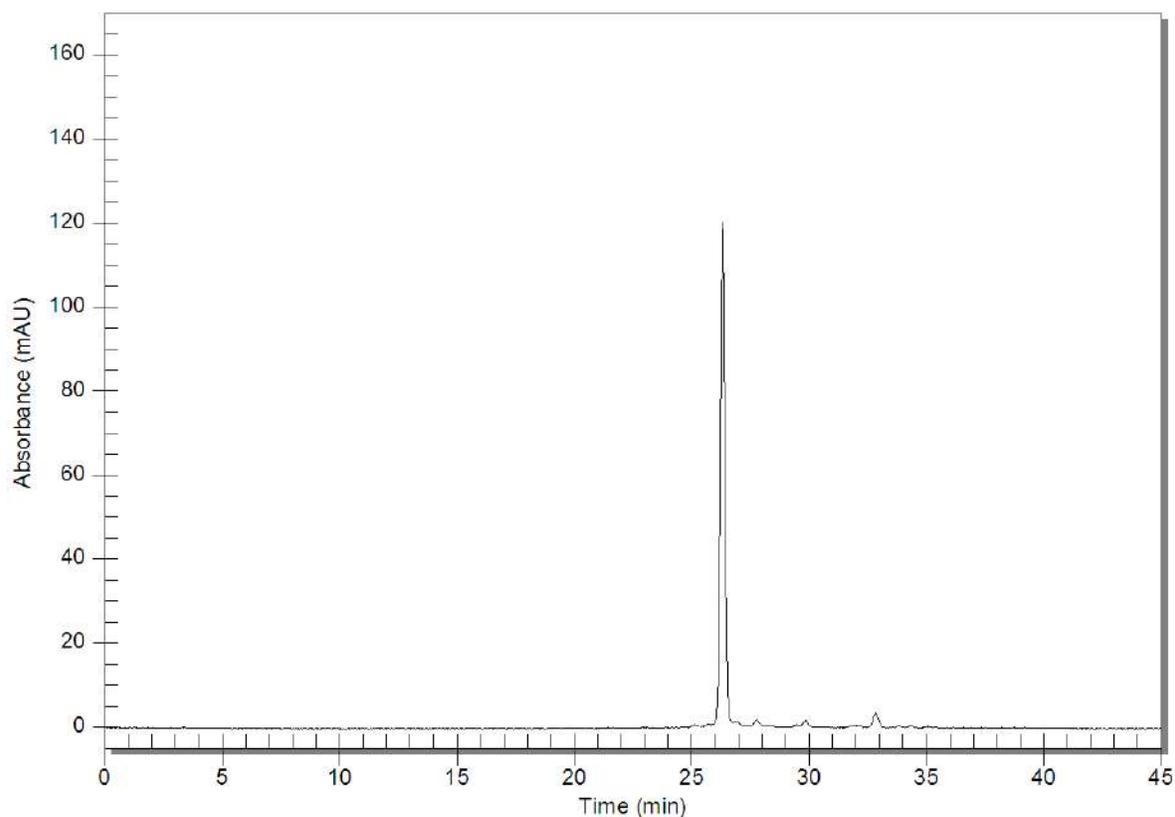


Fig. 14. Estándar de cianidina 3 glucósido de zarzamora (*Rubus* spp.)

9. CITOTOXICIDAD

a. Cultivo celular

Se cultivaron células RAW 264.7 en botellas cuello inclinado de 75 cm² con filtro en la tapa. Como medio de cultivo se utilizó medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) adicionado con 5% de Suero Bovino Fetal (FBS) y 1% de solución antibiótica (10,000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina B/mL, Sigma). Las células se crecieron en incubación a 37 °C y atmósfera humidificada a 5% de CO₂ hasta obtener el número de células necesario para los ensayos.

b. Conteo Celular

Cuando las células llegaron a confluencia del 95%, se retiró el medio DMEM y se agregaron 3 mL de tripsina (Sigma), se incubó por 5 minutos en atmósfera humidificada a 5% de CO₂ y 37 °C. Con ayuda de un rastrillo de cultivo se despegaron las células y la suspensión celular se colocó en un tubo Falcón en proporción 1:1 con medio de cultivo; se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla de células obtenida se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo. Para el conteo celular se colocaron en un vial de 200 µL, 10 µL de azul de Tripano (0.4%) y 10 µL de células en medio de cultivo nuevo y se mezcló con succión delicada de la pipeta. Se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocaron entre la Cámara de Neubauer y un cubreobjetos, lo que permitió cubrir la superficie cuadrículada de la cámara por medio de capilaridad. Con un microscopio trilocular de contraste de fases

(innotek/XDS2 modelo SI-PH) se contaron las células que se encuentran en cada cuadrante de la cámara y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ. \text{ de células/mL} = (C1+C2+C3+C4/4 * 10,000 * 2)^1$$

¹ (C1+C2+C3+C4)/4 = Promedio de N° de células por cuadrante; 10,000 mm³ = Área de la cámara de Neubauer; 2 µl = Factor de dilución del azul de Tripano.

c. Curva de Proliferación

La curva de proliferación es una herramienta ideal para determinar la correcta densidad de siembra de las células, esta técnica determina la velocidad de crecimiento y el tiempo más adecuado para realizar un nuevo cultivo (Freshuney 2010).

Cuando las células llegaron a confluencia del 95%, se retiró el medio DMEM y se agregaron 3 mL de tripsina (Sigma), se incubó por 5 minutos en atmósfera humidificada a 5% de CO₂ y 37 °C. Con ayuda de un rastrillo de cultivo se despegaron las células y la suspensión celular se colocó en un tubo Falcón en proporción 1:1 con medio de cultivo; se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla de células obtenida se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo. Para el conteo celular se colocaron en un vial de 200 µL, 10 µL de azul de Tripano (0.4%) y 10 µL de células en medio de cultivo nuevo y se mezcló con succión delicada de la pipeta. Se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocaron entre la Cámara de Neubauer y un cubreobjetos, lo que permitió cubrir la superficie cuadrículada de la cámara por medio de capilaridad. Con un microscopio trilocular de contraste de fases

(innotek/XDS2 modelo SI-PH) se contaron las células que se encuentran en cada cuadrante de la cámara y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ. \text{ de células/mL} = (C1+C2+C3+C4/4 * 10,000 * 2)^1$$

¹ (C1+C2+C3+C4)/4 =Promedio de N° de células por cuadrante; 10,000 mm³ = Área de la cámara de Neubauer; 2 µl = Factor de dilución del azul de Tripano.

Para determinar la cantidad de células y tiempo más apropiados para este análisis, se utilizó diferentes densidades celulares: 0, 1 000, 5 000, 10 000, 25 000, 50 000, 75 000, 100 000 y 150 000 células por pocillo por cuadruplicado y tiempos de 24 y 48 hrs de incubación.

d. Ensayo de citotoxicidad

Para conocer la citotoxicidad de los extractos de 50, 100, 150 y 200 µg/mL de extractos ricos en polifenoles y antocianinas; Fracción rica en polifenoles crudo (FRPC), FRPN, Fracción rica en Antocianinas Crudo (FRAC) y FRAN, se sembraron en placas de 96 pozos 5 x 10⁴ células por pozo con un pretratamiento de 5 h a 37°C y 5% de CO₂ con los extractos diluidos en Dimetilsulfoxido (DMSO) de tal modo que la concentración final en el pozo fuera de 0.5% de DMSO. Transcurridas las 5 h, se agregó el estímulo de inflamación utilizando 1 µL de LPS de E. coli con una concentración de 200 µg/mL para obtener una concentración final en el pozo de 1 µg/mL de LPS. Se dejó en incubación por un periodo de 19 h a 37°C y 5% de CO₂ para completar un ciclo de 24 h de pretratamiento y proceder a utilizar el kit para ensayos

toxicológicos in vitro basado en la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Sigma TOX7). Como controles se utilizaron células, medio, células y LPS, células y DMSO y células lisadas; para estas últimas se utilizó la solución de lisis celular 1 h antes de cumplirse las 24 h. Posteriormente, del cultivo celular se tomaron 50 μ L del sobrenadante de cada pozo y se colocaron en una placa nueva. Se añadieron 100 μ L de mezcla de reacción (1/3 de solución de sustrato de LDH, 1/3 de solución de tinción de LDH y 1/3 de cofactor de LDH); se cubrió la placa con aluminio resguardando de la luz y se dejó incubar por 30 min. Para detener la reacción se agregaron 15 μ L de HCl 1 N a cada pozo y se leyó en un lector de placas ELISA marca RAYTO modelo RT-2100C a una absorbancia de 490 nm. Los datos se obtuvieron a partir de la absorbancia de Muerte Máxima como el 100% (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; Legrand, 1992).

e. Ensayo de Viabilidad Celular con Azul de Tripano.

Este ensayo permite determinar la cantidad de células no viables (células muertas con daño a la membrana) en un cultivo mediante un conteo directo de las células teñidas con el colorante. Esto se realiza con la finalidad de completar el ensayo de LDH y determinar de esta manera el tipo de daño que ocasiona la exposición a los tratamientos empleados en los ensayos. Se establecieron dos tiempos de tratamiento (24 y 48 hrs) y tratamientos de las Fracciones Ricas en Polifenoles y Antocianinas tanto de grano crudo como de tortillas nixtamalizadas de maíz criollo azul “Elotero de Sinaloa” con

concentraciones de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en macrófagos RAW 264.7 bajo la inducción de un estímulo con LPS de *E. coli*.

Los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron en se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad aproximada de 25 000 células/ cm^2 con un pretratamiento de 8 h a 37°C y 5% de CO_2 con los extractos diluidos en Dimetilsulfoxido (DMSO) de tal modo que la concentración final en el pozo fuera de 0.5% de DMSO. Transcurridas las 8 h, se agregó el estímulo de inflamación utilizando 1 μL de LPS de *E. coli* con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener una concentración final en el pozo de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Se dejó en incubación por un periodo de 16 h a 37°C y 5% de CO_2 para completar un ciclo de 24 y 48 h de pre tratamiento.

Después de 24-48 h de incubación con tratamiento, el medio se retiró por aspiración y se colectó en un tubo eppendorf, las células se lavaron con 250 μl de PBS. Se agregaron 100 μl de tripsina a las células y fueron incubadas a 37 °C por un lapso de 2-4 minutos. Finalizado el periodo de incubación, se agregaron 200 μl de medio DMEN suplementado, para inactivar el efecto digestivo de la tripsina, y se realizó la dispersión mecánica con una pipeta, se aspiró el contenido y se depositó en el tubo eppendorf correspondiente y resuspendió. Cabe mencionar que las soluciones y reactivos agregados a las células al retirarse fueron colectados en un tubo eppendorf por separado con la finalidad de que el número total de células no se vea disminuido por el proceso de manipulación. De la mezcla final de células se tomaron 20 μl y se mezclaron

con 20 μ l de azul de tripano para realizar el conteo diferencial celular (células viables y no viables), respecto al número total de células en cada tratamiento.

f. Análisis estadístico

Para los polifenoles y actividad antioxidante los datos se analizaron aplicando una ANOVA bifactorial, mediante el paquete estadístico Minitab 16, y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05$).

Para el ensayo de citotoxicidad las variables de respuesta se les determinó si cumplían normalidad y homogeneidad de varianzas para todos los experimentos. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SigmaStat versión 3.5 ajustando un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) para grupos independientes con distribución de error tipo Normal y para un $\alpha = 0.05$, se realizó las pruebas post hoc mediante la prueba de Tukey. Los resultados se expresaron como la media (\pm EE) del porcentaje de absorbancia (ensayo de LDH) y porcentaje de viabilidad (prueba con azul de tripano) de cada tratamiento.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL GRANO CRUDO DE MAÍZ AZUL

En México se tienen pocos estudios referente a la caracterización del grano de maíz criollo azul cultivados en las diferentes regiones del país. Por ello, es de suma importancia la evaluación de estos tipos de maíces cultivados en el estado de Sinaloa. La información sobre sus características físicas permitirá aprovechar mejor estos recursos naturales.

Las dimensiones físicas de los granos son indicadores de calidad comercial, manejo y almacenamiento de los mismos, asimismo son un factor importante que impacta en el proceso de nixtamalización tradicional y sus correspondientes productos (Rooney y Suhendro, 1999). El **Cuadro 7** muestra las características físicas del grano de maíz criollo azul “Elotero de Sinaloa”.

El maíz criollo azul presentó un valor promedio en longitud, ancho y grosor de 1.056, 1.116 y 0.477 cm, respectivamente. Estos valores son similares a lo reportado por Mora-Rochín y col. (2011) en maíz criollo azul del estado de Sinaloa quien reportó dimensiones de 0.9, 0.92 y 0.5 cm respectivamente. Asimismo, son similares a lo reportado por Figueroa-Cárdenas y col. (2013), quienes reportan una revisión de los resultados que se han publicado con las características físicas de los maíces nativos de México, con el objetivo de comparar los diferentes grupos raciales.

Cuadro 7. Características físicas del grano de maíz criollo azul.

Características	MCA-512
Dimensiones físicas (cm)	
Longitud	1.056
Ancho	1.116
Grosor	0.477
Peso de 1000 granos (g)	341.966
Peso hectolítrico (kg/hL)	78.188
Índice de flotación (%)	54.66
Dureza	Intermedio
Pericarpio remanente	5
Pericarpio (g/100 g, bs)	4.493
Endospermo (g/100 g bs)	85.616
Germen (g/100 g, bs)	8.2
Pedicelo (g/100 g, bs)	1.69

¹Las medias se separaron por renglones, aplicando la prueba de rango múltiple de Tukey. Valores con la misma letra no son diferentes ($p < 0.05$). MCA= Maíz criollo azul

Las diferencias entre las propiedades físicas de los maíces pigmentados podría atribuirse a la diversidad genética que presentan estos granos, además, otros factores como condiciones climatológicas de la región, condiciones de cultivo, entre otros, pueden influir en este tipo de propiedades.

El peso de 1000 semillas indica el tamaño del grano de dicha variedad y el peso hectolítrico es una medida indirecta de la densidad del grano. El maíz criollo Azul utilizado en esta investigación presentó un valor promedio de peso de 1000 granos y peso hectolítrico de 341.96 g y 781.8 kg/L, respectivamente. De acuerdo a la norma de productos nixtamalizados, NMX-FF-034/1- SCFI2002, los valores de peso de 1000 granos deben ser mayores a 300 g y superiores a 77 kg /hL, en el caso del peso hectolítrico. El maíz empleado en nuestra investigación cumple con dichas especificaciones, pudiendo ser utilizados en la industria de la masa y la tortilla. El peso hectolítrico es considerado también un indicador de la calidad del grano y es una evaluación rápida que depende principalmente, del reacomodo de las semillas en el espacio ocupado por estas (Gutiérrez-Dorado y col., 2008).

El índice de flotación es un parámetro que permite diferenciar claramente entre un grano muy suave (88 a 100%), suave (63 a 87%), intermedio (38 a 62%), duro (13 a 37%) y muy duro (0 a 12%) (NOM, 2010). El maíz criollo Azul presentó en su índice de flotación un valor promedio de 54.6%, de acuerdo a este valor el maíz en estudio es considerado como un grano intermedio. De acuerdo con Gaxiola-Cuevas (2013), en un estudio con 15 genotipos de maíz azul nativos de Sinaloa, el índice de flotación mostró valores de 34.7 a 94.7%. El conocimiento de esta propiedad tecnológica es de suma importancia para la industria de la tortilla, ya

que de esto dependen los tiempos de proceso, así como las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la masa y del producto final. La dureza del grano de maíz se debe a varios factores, como la relación entre el endospermo córneo y harinoso, la compactación de los componentes celulares, el grosor de la matriz proteínica que rodea a los gránulos de almidón y grosor del pericarpio (Gaytán-Martínez y col., 2004). El maíz apropiado para la industria de la tortilla es un grano suave, ya que precisa de un menor tiempo de cocción térmico alcalino para el proceso de nixtamalización en comparación con un grano duro, el cual es más apropiado para la elaboración de botanas (Fernández-Morales y col., 2013). De acuerdo a la NOM (2010), los granos aptos para ser utilizados en la industria de la masa y la tortilla, son granos suaves, ya que precisan de menores tiempos de cocción térmico-alcalino para el proceso de nixtamalización, en comparación con un grano duro, el cual es más apropiado para la elaboración de botanas (Aragón-Cuevas y col., 2012).

El pericarpio remanente de los maíces registró valores de 5 (**Cuadro 1**). Este parámetro fue evaluado de acuerdo a una escala hedónica del 1 al 5, donde 1 significa que el pericarpio se removió totalmente de todos los granos de maíz después de 10 minutos de permanecer en una solución alcalina, y 5 indica que existió poco cambio en los granos de maíz después de 15 minutos. La presencia de pericarpio residual es importante pues afecta tanto el color de la masa, como su textura.

Los porcentajes de pericarpio, endospermo, germen y pedicelo del grano de maíz azul mostraron valores en base seca de 4.49, 85.61, 8.2, 1.69 g/100 g, bs

respectivamente. Resultados similares fueron reportados por López-Gastelum y col (2012), quienes reportaron valores de pericarpio, endospermo, germen y pedicelo de 4.5, 87.1, 7.4 y 1.5 g/100 g, bs respectivamente, en maíz azul nativo de Sinaloa. Gaytán (2004) menciona que el porcentaje de pericarpio máximo tolerado por la industria de las harinas nixtamalizadas es del 4.5 %, por lo que el maíz azul aquí estudiado, es apto para la industria mencionada, con un porcentaje de pericarpio de 4.49. De Sinibaldi y Bressani (2001) mencionan que la industria prefiere bajos porcentajes de pericarpio debido a que éste se elimina con el lavado después de la nixtamalización, por lo que aumenta la pérdida de sólidos si el porcentaje de pericarpio es elevado, pero no afecta negativamente a la industria de la masa y la tortilla, ya que las gomas presentes en este componente del grano confieren calidad a la tortilla (Vázquez y col 2003). El porcentaje de endospermo es una variable importante para la industria molinera, ya que el producto de la misma es el endospermo pulverizado para la molienda en seco, o refinado para la molienda en húmedo (Gómez y col 2004). Espinosa y col (2006) mencionan que los maíces pigmentados poseen mayores contenidos de endospermo y mayor tamaño de grano comparado con los maíces blancos. En el germen se encuentran la mayoría de los lípidos del grano, por esto, mientras mayor sea el porcentaje de germen mayor será su contenido de aceites, por lo que no son aptos para la industria de productos nixtamalizados debido a que reducen la vida de anaquel de los mismos (Acuña 2001; Salinas 2004). Diversos Investigadores (Gaytán 2004; Salinas y Vázquez 2006) mencionan que el porcentaje de germen máximo aceptado por la industria de harinas de maíz nixtamalizado es del 12 %, por lo que el maíz azul evaluado en el presente trabajo es apto para esta industria. En cuanto

al contenido de pedicelo, Figueroa y col (2012) mencionan que el porcentaje de pedicelo máximo tolerado por la industria de las harinas nixtamalizadas es de 0.5 %, por lo que el maíz azul en este estudio no sería adecuado para dicha industria, ya que sobrepasa el porcentaje, sin embargo, también mencionan que el porcentaje de pedicelo no es un factor limitante para la industria de la masa y la tortilla.

B. ELABORACIÓN DE TORTILLAS DE MAÍZ CRIOLLO AZUL NIXTAMALIZADO.

Se obtuvieron harinas de maíz criollo azul (A-512) nixtamalizadas aptas para la elaboración de tortillas. Las tortillas presentaron propiedades funcionales (hinchabilidad/rolabilidad) y sensoriales (aceptabilidad) aceptables.

C. NIVELES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL (FENÓLICOS TOTALES Y ANTOCIANINAS).

Se estima que los alimentos integrales contienen entre 5,000 y 25,000 fitoquímicos. Entre estos, los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiados debido a sus diversos beneficios para la salud. Se ha reportado que estos compuestos poseen propiedades como, antioxidantes, prevención de procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y anticarcinogénicos (Sakar y Shetty, 2014). El contenido de fenólicos totales se determinó como la suma del contenido de fenólicos solubles e insolubles en harina de maíz criollo azul crudo y tortilla nixtamalizada (**Cuadro 8**). El contenido de fenólicos totales del grano de maíz sin procesar mostró un valor promedio en base seca de 244.77 mg

Cuadro 8. Contenido de fenólicos totales y porcentaje de contribución en maíz criollo azul y sus tortillas obtenidas por el proceso de nixtamalización.

Maíz	Producto	Contenido Fenólicos (mg EAG/100 g, base seca)			Contenido de antocianinas (mg cianidina 3 glucósido ECG/100 g, bs)
		Libre	Ligados	Totales	Totales
A-512	Crudo	58.56 ^a	186.21 ^a	244.77 ^a	28.39 ^a
	TN	29.12 ^b	115.42 ^b	144.54 ^b (59%)	16.06 ^b (57%)

Valores dentro de columnas sin letras en común son diferentes ($p < 0.05$); TN = tortillas elaboradas con maíz nixtamalizado.

equivalentes de ácido gálico (EAG/100 g), sin embargo, se mostró un decremento ($p < 0.05$) cuando el grano fue transformado en tortilla. Este resultado puede ser atribuido a las características del proceso de nixtamalización. Durante la etapa de cocción y remojo existe lixiviación de compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos en el contenido de fenólicos totales son similares a lo reportado por Gaxiola-Cuevas y col (2017) quién reporta en grano de maíz azul y tortilla nixtamalizada valores promedio en base seca de 244 y 121 mg EAG/100 g, respectivamente.

El consumo de cereales integrales conlleva a muchos beneficios en la salud, las diferentes partes anatómicas que conforman al grano de maíz, contienen fitoquímicos únicos con propiedades muy específicas en la salud. Como se pudo observar en los resultados del presente estudio, la fracción ligada representa más del 80% del total de los fenólicos presentes en el grano de maíz. Diversos estudios mencionan que el fenol que se encuentra en mayor proporción en maíz, es el ácido ferúlico. El ácido ferúlico, es el fenol más abundante, forma conexiones entre los fragmentos de lignina a través de enlaces éter, y con las arabinoxilanas por medio de enlaces éster. Este ácido también forma puentes diferúlico entre las heteroxilanas que constituyen la hemicelulosa de la pared celular que al no ser digeridos por el estómago, pueden ser separados de la matriz de la fibra en el colon debido a la actividad enzimática del conjunto bacteriano, y junto con los metabolitos originados de la interacción entre substratos y microbiota, pueden quedar solubilizados en el medio y ejercer su

efecto localmente en el intestino grueso, con un efecto quimiopreventivo en cáncer de colon o por vía sistémica al absorberse (González-Aguilar y col 2014).

Las antocianinas se encuentran principalmente en el pericarpio y/o capa de aleurona, siendo la cianidina, pelargonidina y peonidina las de mayor contenido en maíz azul (Salinas-Moreno y col 2003; Mora-Rochín y col 2016). Además son las responsables del color final de la tortilla de color azul.

La mayor ($p < 0.05$) concentración de antocianinas totales se observó en maíz azul sin procesar (28.39 mg cianidina 3 glucósido ECG/100 g bs) (**Cuadro 8**). En un estudio reciente, Mora-Rochín y col (2016) reportó un rango de antocianinas totales de 14.1 a 34.1 mg cianidina 3 glucósido ECG/100 g bs en quince genotipos de maíz azul criollo originarios del estado de Sinaloa. La variabilidad en el contenido de antocianinas en diferentes genotipos de maíz, podría ser atribuida principalmente a la genética de los granos. Sin embargo, diversos factores ambientales como luz visible, radiación ultravioleta, bajas temperaturas, sequías, estrés hídrico, entre otros, han manifestado inducir la acumulación de antocianinas en las plantas (Chalker-Scott 1999). El contenido de antocianinas totales varía de acuerdo con las técnicas de extracción y del germoplasma utilizado, de acuerdo a lo reportado por Salinas y col. (2005, 2013).

La transformación del grano de maíz en tortilla nixtamalizada, mostró un decremento ($p < 0.05$), en el contenido de antocianinas. La tortilla de maíz criollo azul presentó un contenido de antocianinas totales de 16.06 mg Cianidina- 3 glucósido ECG)/100 g, bs y una retención del 57% respecto al grano sin procesar (**Cuadro 8**). Las disminuciones encontradas en este estudio son similares a lo

reportado por Mora-Rochín y col (2016), quienes en un estudio con tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas utilizando quince genotipos de maíz azul nativos de Sinaloa, reportaron valores de antocianinas totales en un rango de 2.1 a 15.5 mg ECG/100 g bs. Sánchez-Madrugal y col (2015) reportaron que las pérdidas en el contenido de antocianinas se incrementan con el pH alcalino y elevadas temperaturas, afectando la estabilidad de las antocianinas, el color y apariencia de la tortilla.

Sin embargo, en un estudio reciente por Hernández-Martínez y col. (2016) encontraron un mayor contenido de antocianinas en tortillas de maíz azul elaboradas por el proceso de nixtamalización con un promedio de 30.72 mg de EGC/100 g, bs.

D. BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES EN TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL.

1. Determinación de capacidad antioxidante química ORAC

La capacidad antioxidante de los granos enteros y sus tortillas producidas por ambos procesos se evaluaron utilizando ensayos químicos ORAC, DPPH y ABTS (**Cuadro 9**). Los tres ensayos de capacidad antioxidante se basan en diferentes mecanismos: transferencia de un solo electrón para los métodos DPPH y ABTS y transferencia de átomos de hidrógeno para el método de ORAC (Huang y col 2005). El primero mide la capacidad reductora de los antioxidantes y el segundo mide la capacidad donante de átomos de hidrógeno de antioxidantes que rompen la reacción radical en cadena. Por lo tanto, los resultados de estos tres ensayos pueden proporcionar información útil sobre las propiedades de los antioxidantes

Cuadro 9. Capacidad antioxidante química de maíz criollo azul y tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización.

Maíz	Producto	ORAC ¹			DPPH ²			ABTS ³		
		Libre	Ligado	Total	Libre	Ligado	Total	Libre	Ligado	Total
A-512	Crudo	1,640.0 ^a	7,076.6 ^a	8,716.6 ^a	530.3 ^a	2,383.3 ^a	2,913.7 ^a	889.3 ^a	6,438.9 ^a	7,328.2 ^a
	TN	1,327.5 ^b	4,263.6 ^b	5591.0 ^b (64%)	386.9 ^b	1,623.6 ^b	2,010.5 ^b (69%)	717.74 ^b	5,361.5 ^b	6,079.17 ^b (82.9%)

contenidos en maíz y tortillas. En general, la actividad antioxidante de las tortillas azules se encuentra en el siguiente orden: ORAC > ABTS > DPPH. Las metodologías utilizadas en este estudio se han utilizado ampliamente para medir la actividad antioxidante en la ciencia de los alimentos. Sin embargo, es importante mencionar que no pueden compararse porque cada uno mide la inhibición de diferentes radicales. En el **Cuadro 9** se muestra la capacidad antioxidante total del maíz azul crudo y tortillas utilizando las pruebas ORAC, DPPH y ABTS. Los valores promedio oscilaron entre 8,716.6-5,591.0, 2,913.7-2,010.5, y 7,328.2-6,079.2 $\mu\text{mol ET} / 100\text{g bs}$, respectivamente. Estos resultados son similares a lo reportado por Gaxiola-Cuevas y (2017) (7,481-7,661 y 10,230-10,878 y $\mu\text{mol TE}/100\text{ g, bs}$), para maíz azul procedente del estado de Sinaloa.

Independientemente del método utilizado, para evaluar la actividad antioxidante de fenólicos en tortillas de maíz criollo azul, se observó que el proceso de elaboración de tortilla causó decrementos ($p < 0.05$) del 36, 31 y 17.05 % en su actividad antioxidante por los métodos ya mencionados.

En esta investigación se obtuvieron valores de 8,716.63 $\mu\text{mol ET} / 100\text{ g, bs}$, en maíz azul crudo y 5591.05 $\text{ET} / 100\text{ g, bs}$, en tortilla, mediante la técnica de ORAC, estos resultados son similares a lo reportado por Gaxiola-Cuevas (2017) donde reportó valores de actividad antioxidante por el método de ORAC en grano crudo y tortilla rangos de 10,058 y 5,941.3 $\mu\text{mol ET} / 100\text{ g, bs}$.

Por otro lado, los resultados encontrados por el método de DPPH y ABTS en tortilla fueron de 2,010.51 y 6,079.174 $\mu\text{mol ET} / 100\text{ g, bs}$, valores similares a lo

reportado por Gaxiola-Cuevas (2017) (1903.7 y 6281.6 $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g, bs}$), en tortillas elaboradas por harinas nixtamalizadas por los mismos métodos.

Los métodos de ABTS y DPPH se basan en diferentes mecanismos. La reactividad de los compuestos fenólicos es dependiente de las estructuras químicas que lo conforman (Zhao y col., 2008). Por lo tanto, los resultados obtenidos por diferentes métodos pueden ser sesgados.

En general la técnica de DPPH proporciona valores más bajos relacionados con Trolox que ABTS, debido a una mayor estabilidad, de igual forma indica menor reactividad del radical de DPPH.

En mecanismos descritos se conoce que el radical DPPH reacciona con polifenoles (catequinas, proantocianidinas), pero no con los ácidos fenólicos y azúcares (Kaneda y col 1995). Por lo tanto, la absorbancia cuantificada en las actividades antioxidantes determinada por DPPH y ABTS, son parcialmente diferentes. La principal ventaja del radical ABTS es su alta reactividad, de tal manera que la capacidad de reacción química es con una gama más amplia de antioxidantes en comparación con el método DPPH. Esto podría conducir a resultados imparciales (Floegel y col 2011).

La elevada capacidad antioxidante presente tanto en grano crudo como en tortilla, podría estar directamente relacionada con la concentración de compuestos bioactivos, tales como, antocianinas y fenólicos, ya que estos son considerados potentes antioxidantes.

E. NIVELES DE COMPUESTOS BIATIVOS EN FRACCIONES RICAS DE POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL

El contenido de fenólicos totales del grano de maíz para las diferentes fracciones (FRP, FRA y FRAP) fueron de 26.5, 22.3 y 15.6 mg equivalentes de ácido gálico (EAG/g EL) respectivamente, sin embargo, se mostró un decremento ($p < 0.05$) cuando el grano fue transformado en tortilla para la fracción rica en polifenoles (FRP) y fracción rica en antocianinas (FRA) de 16.9 y 14.6 mg equivalentes de ácido gálico (EAG/g EL). Por otro lado para la fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP) mostró un incremento de 5 veces (80.8 mg EAG/g EL) con respecto a la fracción del grano crudo azul. Este incremento pudiera indicar que el tratamiento térmico causa cambios en la matriz del grano de maíz con la consecuente liberación a su forma libre de los compuestos ligados a pared celular (Xu y Chang 2009; Hiemori y col 2009). Los cambios en el contenido de fenólicos en tortilla dependen del tipo de proceso aplicado. Algunos reportes mencionan incrementos, así como degradación de estos compuestos, los diferentes resultados dependen de diversos factores, así como tipo de material utilizado, tratamiento térmico, y la presión y energía empleadas en dicho tratamiento (Ioannou y col 2012). De acuerdo a nuestros resultados, se observa que es posible la preservación e incremento de estos compuestos en tortillas obtenidas por el proceso de nixtamalización.

La mayor ($p < 0.05$) concentración de antocianinas totales se observó en la fracción rica en polifenoles (FRP) en maíz azul sin procesar (8.86 mg cianidina 3

glucósido/g EL) (**Cuadro 10**). Por otro lado, en la fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP) de tortilla nixtamalizada se observó la mayor cantidad de antocianinas totales (11.63 mg Cianidina-3-glucósido/g EL). Sin embargo, se observó un decremento cuando el grano fue transformado en tortilla para la fracción rica en polifenoles (FRP) y fracción rica en antocianinas (FRA) de 4.28 y 3.85 mg Cianidina- 3-glucósido/g EL, respectivamente.

La variabilidad en el contenido de antocianinas en maíz azul, podría ser atribuida principalmente a la genética del grano. Sin embargo, diversos factores ambientales como luz visible, radiación ultravioleta, bajas temperaturas, sequías, estrés hídrico, entre otros, han manifestado inducir la acumulación de antocianinas en las plantas (Chalker-Scott 1999). Asimismo, Salinas y col. (2005, 2013), mencionan que el contenido de antocianinas totales varía de acuerdo con las técnicas de extracción y del germoplasma utilizado.

Sánchez-Madrigal y col (2015) reportaron que las pérdidas en el contenido de antocianinas se incrementan con el pH alcalino y elevadas temperaturas, afectando la estabilidad de las antocianinas, el color y apariencia de la tortilla.

Los cambios en el contenido de antocianinas en tortilla dependen del tipo de proceso aplicado. Algunos reportes mencionan incrementos, así como degradación de estos compuestos, los diferentes resultados dependen de diversos factores, como tipo de material utilizado, tratamiento térmico, y la presión y energía empleadas en dicho tratamiento (Ioannou y col 2012). De acuerdo a nuestros resultados, se observa que es posible la preservación e incremento de estos compuestos en tortillas obtenidas por el proceso de nixtamalización.

Cuadro 10. Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante de las fracciones ricas en antocianinas y ricas en polifenoles.

Maíz	Producto	Contenido Fenólicos	Antocianinas	DPPH	ABTS
		(mg EAG/g EL)	(mg cianidina 3 glucósido/g EL)	(μ mol ET/g EL)	(μ mol ET/g EL)
		Totales	Totales	Total	Total
A-512 Crudo	FRP	26.5 ^a	8.9 ^a	161.3 ^a	7,558.6 ^a
	FRA	22.3 ^a	7.4 ^a	79.6 ^b	6,573.4 ^b
	FRAP	15.6 ^b	2.5 ^b	163.2 ^a	3,946.2 ^c
A-512 Nixtamalizado	FRP	16.9 ^b	4.3 ^b	79.2 ^b	5,516.8 ^a
	FRA	14.6 ^b	3.8 ^b	74.9 ^b	5,631.0 ^a
	FRAP	80.9 ^a	11.6 ^a	695.9 ^a	8,258.2 ^b

F. BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES DE FRACCIONES RICAS EN POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS EN GRANO CRUDO Y TORTILLA DE MAÍZ AZUL.

1. Determinación de capacidad antioxidante química (ORAC, DPPH, ABTS)

En el **Cuadro 11** se muestra la capacidad antioxidante total de las fracciones ricas en polifenoles (FRP), fracciones ricas en antocianinas (FRA) y fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP). Se observaron valores promedio de 161.31, 79.61 y 163.23 $\mu\text{mol ET /EL}$, respectivamente para grano azul sin procesar. En el caso de la tortilla nixtamalizada, se observó un decremento para la fracción rica en polifenoles (FRP) y fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP) del 49.11% y 94.10%, sin embargo para la fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP) incrementó más de 4 veces (695.9 $\mu\text{mol ET /EL}$) en comparación con la fracción del grano sin procesar, mediante la técnica de DPPH.

Por otro lado, los resultados encontrados por el método de ABTS en el grano sin procesar para la fracción rica en polifenoles (FRP) fue de 7,558.6 $\mu\text{mol ET /EL}$, 6,573.4 para la fracción rica en antocianinas (FRA) y 3946.2 $\mu\text{mol ET /EL}$ para la fracción rica en antocianinas y proantocianidinas (FRAP). Sin embargo, en la tortilla nixtamalizada para la FRAP incrementó 2 veces más (8,258.2 $\mu\text{mol ET /EL}$) en comparación con la fracción del grano sin procesar. En el caso de la fracción rica en polifenoles y fracción rica en antocianinas se observaron 73% y 85.7% de retención, respectivamente.

Cuadro 11. Actividad antioxidante de las fracciones ricas en antocianinas y ricas en polifenoles.

Maíz	Producto	DPPH	ABTS
		($\mu\text{mol ET/g EL}$)	($\mu\text{mol ET/g EL}$)
		Total	Total
A-512 Crudo	FRP	161.3 ^a	7,558.6 ^a
	FRA	79.6 ^b	6,573.4 ^b
	FRAP	163.2 ^a	3,946.2 ^c
A-512 Nixtamalizado	FRP	79.2 ^b	5,516.8 ^b
	FRA	74.9 ^b	5,631.0 ^b
	FRAP	695.9 ^a	8,258.2 ^a

La elevada capacidad antioxidante presente tanto en grano crudo como en tortilla, podría estar directamente relacionada con la concentración de compuestos bioactivos, tales como, antocianinas y fenólicos, ya que estos son considerados potentes antioxidantes.

En nuestro estudio, consideramos que en la extracción y purificación de antocianinas de maíz y tortilla azul, no co-eluyeron otros compuestos interferentes como ácidos fenólicos y otro tipo de flavonoides. En este sentido, la contribución de otro tipo de compuestos que pudieran estar presentes en el extracto rico en antocianinas suponemos es mínima. Por lo que presumimos que la actividad antioxidante es debido al efecto sinérgico de la mezcla de antocianinas de ambos extractos.

Debido a que no encontramos en la literatura reportes que evaluaran la actividad antioxidante de extractos ricos de antocianinas provenientes de maíz azul y sus productos, comparamos los resultados aquí encontrados con valores reportados para frutas ricas en antocianinas, como es el caso de la zarzamora, así, el valor encontrado de actividad antioxidante medida por DPPH fue mayor a lo encontrado para maíz azul y tortilla, lo que es de esperarse debido principalmente a que estas frutas contienen una concentración superior de antocianinas, ya que ha sido reportado que la actividad antioxidante es directamente proporcional al contenido total de antocianinas presentes en la muestra, así como a la naturaleza química de estas (Heinonen y col 1998).

Diversos estudios han sugerido que el contenido de antocianinas y su actividad antioxidante contribuyen con un efecto protector contra las enfermedades crónicas

degenerativas, su ingesta diaria va de 180 a 215 mg por día (Abdel Aal y col 2006), estos valores nos dan una idea de la importancia biológica que estas representan.

G. HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica ampliamente utilizada en el análisis estructural de alimentos, especialmente en la separación e identificación de compuestos polares, solubles en agua, térmolábiles no volátiles. Esta metodología presenta ventajas tales como fácil manejo, excelente separación, alta sensibilidad y tiempos de análisis relativamente cortos (Kennedy y Waterhouse 2000). Por lo tanto, esta técnica, representa una opción ideal para la identificación de compuestos como las antocianinas (Castañeda Ovando y col 2010; Yang y Zhai 2010; Harakotr y col 2014). En este sentido, en la presente investigación, se realizó el análisis de antocianinas en grano de maíz azul y su producto (tortilla) con el fin de evaluar el efecto del proceso de nixtamalización en el perfil de las mismas.

En el cromatograma de HPLC (**Fig 15**) se puede observar diferencias en el número de picos y la intensidad de los mismos entre las fracciones analizadas. Las fracciones del grano crudo mostraron mayor número de compuestos que su correspondiente fracción nixtamalizada.

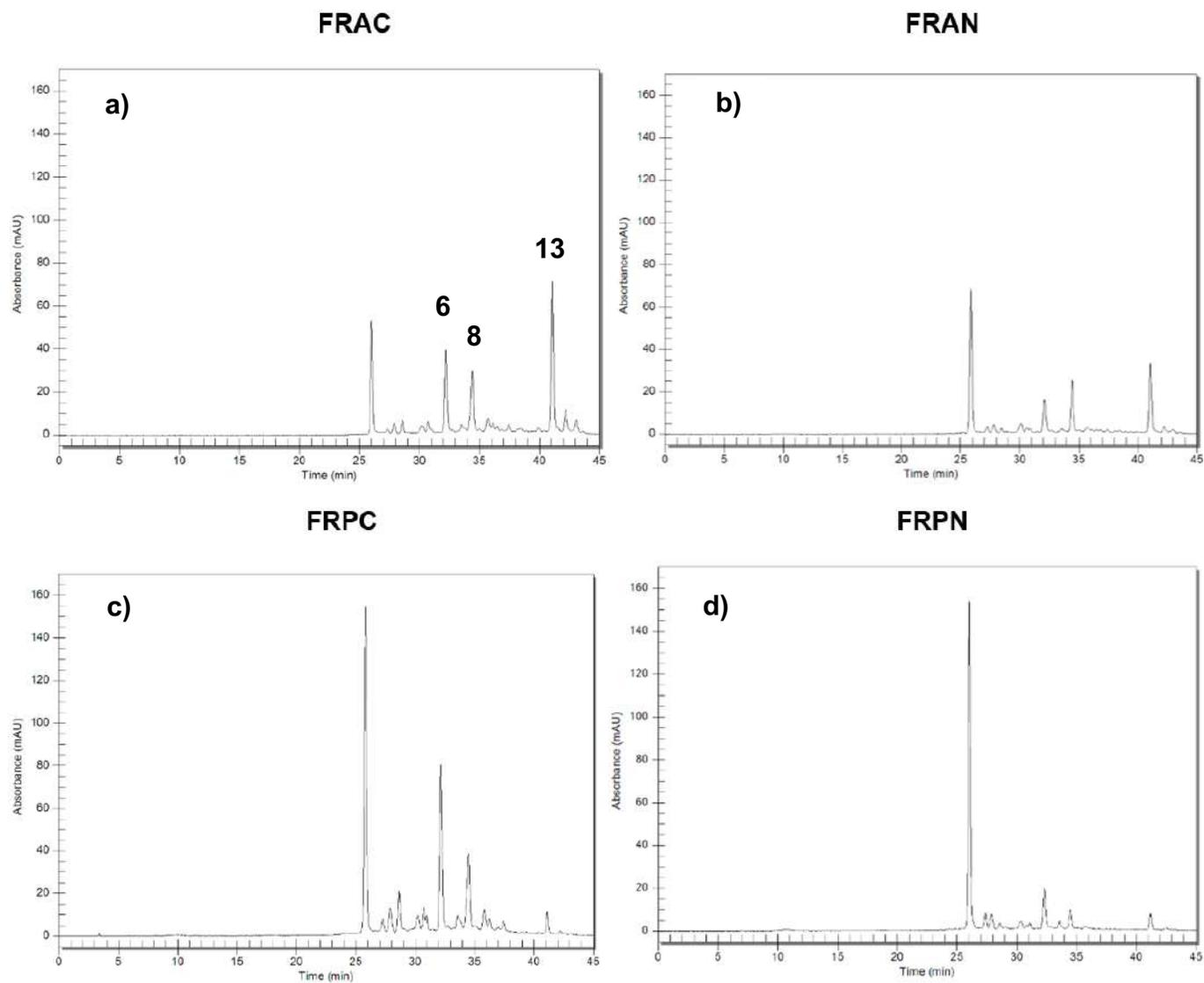


Fig. 15. Antocianinas presentes en las diferentes fracciones de maíz azul y sus tortillas.

Además, al comparar entre fracciones (polifenoles y antocianinas) se observó un incremento en el número de señales en las fracciones de antocianinas.

Los espectros de UV de cada uno de los picos, mostró espectros característicos de antocianinas con máximos de absorción a 520 nm. De manera general, todas las fracciones presentaron un perfil muy similar, destacando cuatro picos principales a los 26.35, 32.75, 34.95 y 45.71 min, estos tiempos de retención coinciden con lo reportado en estudios previos de nuestro grupo de trabajo (**Cuadro 12**). Menchaca-Armenta y col (2016), analizaron el perfil de antocianinas en maíz azul mediante ESI-MS, identificando como antocianinas principales a cianidina-3-glucósido (26.35 min), pelargonidina-3-glucósido (32.75 min), peonidina-3-glucósido (34.95 min) y pelargonidina-3-(6'-malonilglucósido) (45.71 min, confirmando la presencia de las mismas en nuestras fracciones. Adicionalmente, la antocianina mayoritaria (26.35 min) se confirmó por comparación con el estándar de cianidina-3-glucósido. Esta antocianina ya ha sido reportada como mayoritaria en maíces azules mexicanos y americanos (Collison y col 2015; Mora-Rochín y col 2016), lo que coincide con nuestros resultados.

Considerando a la antocianina mayoritaria, la cuantificación se reportó como equivalentes de cianidina-3-glucósido (**Cuadro 12**). Al comparar la concentración de las antocianinas de la fracción de polifenoles de grano crudo y tortilla nixtamalizada, se observó una retención de la antocianina mayoritaria entre 40 y 86%. La concentración de cianidina-3-glucósido se retuvo en un 86% en la fracción de polifenoles, mientras que en la fracción de antocianinas fue del 100%, incluso en esta última se reportó una concentración mayor (**Cuadro 12**), lo cual

Cuadro 12. Antocianinas detectadas en HPLC

Pico	TR (min)	mg Eq C3G/1 g Fracción			
		Fracción 1 Crudo	Fracción 1 Nixtamalizada	Fracción 2 Crudo	Fracción 2 Nixtamalizada
1	25.46	1.91	-	-	-
2	26.35	12.60	11.17	4.71	5.96
3	27.78	2.27	2.34	-	-
4	28.34	2.86	2.40	-	-
5	29.03	3.19	2.06	1.97	2.07
6	29.52	-	1.95	2.24	2.19
7	30.68	2.49	2.23	2.29	2.01
8	31.20	2.91	2.15	-	-
9	32.02	-	-	-	-
10	32.76	7.40	3.16	2.20	2.29
11	33.28	2.01	1.95	2.22	2.05
12	34.18	2.66	2.15	1.98	2.00
13	34.95	5.30	2.57	4.46	3.02
14	35.54	2.05	-	2.06	2.03
15	36.24	2.70	-	-	-
16	36.62	2.31	-	4.13	3.50
17	37.04	1.99	-	-	-
18	37.86	2.14	-	2.46	2.07
19	38.16	-	-	2.15	-
20	38.46	-	-	2.06	1.94
21	38.87	-	-	2.07	-
22	39.44	1.94	-	2.07	1.98
23	40.24	-	-	1.98	-
24	40.52	-	-	2.02	-
25	41.59	2.58	2.19	-	-
26	42.14	2.03	-	4.25	-
27	43.37	-	-	4.15	4.12
28	44.68	-	-	2.78	2.14
29	45.71	-	-	2.35	1.98
30	46.27	-	-	1.97	-
31	49.34	-	-	2.01	-

más que un incremento, podría deberse a una menor degradación de la antocianina durante el procedimiento de purificación cromatográfico. Es importante resaltar, el alto porcentaje de retención de las antocianinas después del proceso de nixtamalización. Sin embargo, un comportamiento diferente se observó al realizar la determinación de antocianinas totales por el método colorimétrico desarrollado por Abdel-Aal y Huel, en 1999, en donde la tortilla retuvo solamente un 25% del contenido total de antocianinas y en la fracción de polifenoles de la tortilla nixtamalizada (FRPN), mantuvo el contenido de la cianidina 3 glucósido, sin embargo lo que se presume como pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-(6''- succinilglucósido), cianidina-3-(6''-malonilglucósido) y pelargonidina-3-(6''malonilglucósido) disminuyeron mínimamente su cantidad en comparación con la Fracción Rica en Polifenoles (FRPC) del grano crudo. Adicionalmente, algunos picos de las fracciones de granos crudos no se observaron en las fracciones de tortillas nixtamalizadas. Esto puede ser atribuido a que las antocianinas son susceptibles a la degradación ante condiciones de luz, temperaturas y pH elevados, condiciones que involucra el proceso de nixtamalización, lo que afecta directamente la estabilidad de las estructuras de estos compuestos (Castañeda-Ovando y col 2010).

Por otra parte, la cianidina-3-glucósido en la Fracción 1 Crudo (12.60 mg Eq C3G/1 g Fracción) y Fracción 1 nixtamalizada (11.16 mg Eq C3G/1 g Fracción) disminuye 2.67 y 1.87 veces su concentración en comparación con la Fracción 2 cruda (4.71 mg Eq C3G/1 g Fracción) y Fracción 2 nixtamalizada (5.96 mg Eq C3G/1 g Fracción), esto podría ser atribuido que al momento de someter las

fracciones 1 del grano crudo y nixtamalizado (F1C y F1N) en la segunda resina de Sephadex, las antocianinas pudieron haberse degradado ya que son susceptibles ante condiciones de luz, temperatura y pH elevados, condiciones que involucra la extracción por la segunda resina (Sephadex), lo que afecta directamente la estabilidad de las estructuras de estos compuestos.

La determinación e identificación de antocianinas pudiera parecer una labor relativamente simple cuando se emplea HPLC, sin embargo, la falta de estándares es una gran desventaja, y en muchos casos dificulta el conocer la identidad de una señal en particular.

H. Curva de Proliferación

Se realizó una curva de proliferación para determinar las características de crecimiento de las células Raw 264.7 en cultivo y se ajustó con los datos del experimento una proyección semilogarítmica de la concentración de las células versus la absorbancia (**Fig. 16 y 17**). Se registró que la fase exponencial del cultivo no finaliza. Este efecto se debe al origen de las células, puesto que son células que continúan el proceso de proliferación de manera lenta, en lugar de verse inhibido su crecimiento debido a la confluencia, o morir por agotamiento de nutrientes como sucede con las células normales en el medio de cultivo. Con esta información se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de células que se emplearon tanto en el experimento de viabilidad con LDH (Lactato Deshidrogenasa), así como también en el ensayo de azul de tripano. En ambas técnicas se utilizó una densidad aproximada de 25 000 cel/cm² y se determinó un lapso de 24 h posteriores al sembrado para comenzar los experimentos, con la

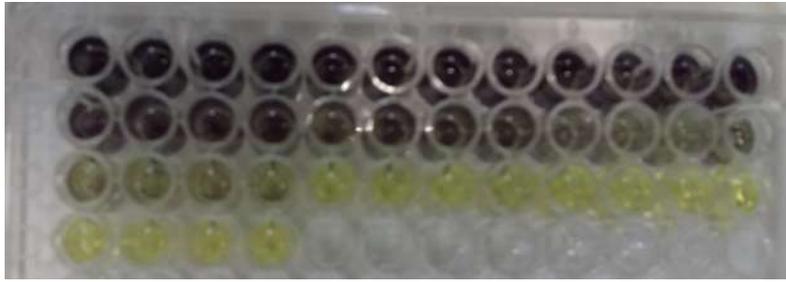
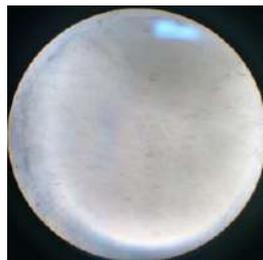


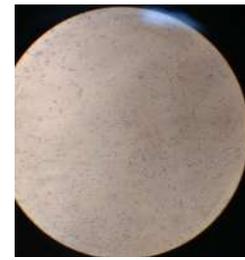
Fig. 16 a. Imagen de la curva de proliferación en placa.



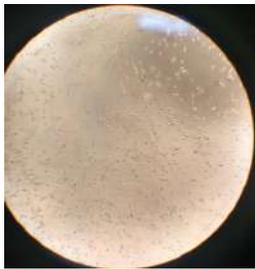
0 células



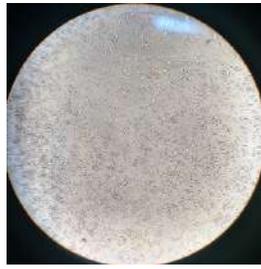
1 000 células



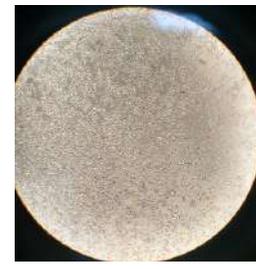
5 000 células



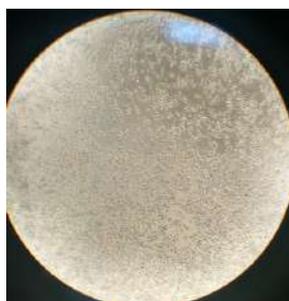
10 000 células



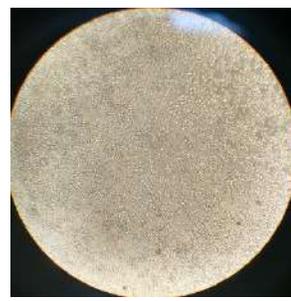
25 000 células



50 000 células



75 000 células



100 000 células



150 000 células

Fig. 16 b. Concentración celular de Raw 264.7 en 24 hrs de incubación.

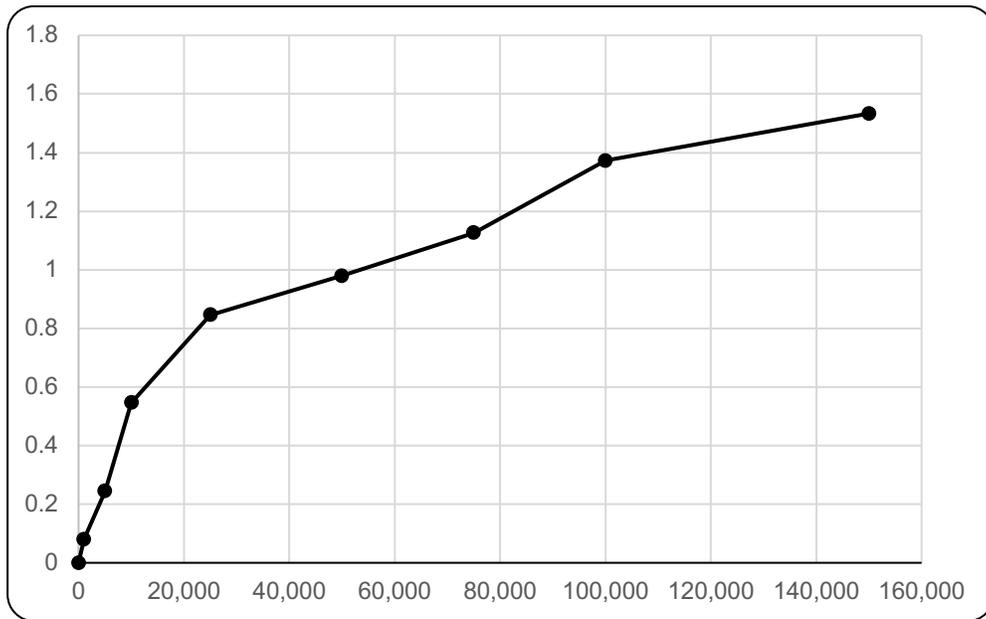


Fig 17. Curva de proliferación celular Raw 264.7 cultivadas en DMEN suplementado. Relación semilogarítmica del concentrado de células vs absorbancia en 24 hrs de incubación.

finalidad de que las células se adhieran y se encuentren con una confluencia del 80% aproximadamente, y que disminuya su tasa de proliferación, al estar cerca de alcanzar la meseta.

I. Citotoxicidad de Extractos ricos en polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul “Elotero de Sinaloa” sobre Macrófagos RAW 264.7 inducidos con LPS

Un indicador importante de toxicidad celular es la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Cuando una célula se encuentra dañada, liberan al medio extracelular la enzima LDH citoplasmática y al encontrarse de forma activa en el sobrenadante celular, es capaz de generar NADH (Holder y col 2012), lo que cataliza la reacción generada por la conversión de sales de tetrazolium a azul de formazán. Esta reacción genera un color rosado que puede medirse por absorbancia y es proporcional a la muerte celular. La muerte celular puede calcularse mediante porcentaje con respecto al control de muerte máxima (lisis) (Vijayakumar y Ganesan 2012) (**Fig. 18**).

Los extractos ricos en polifenoles Fracción Rica en Polifenoles Crudo (FRPC), Fracción Rica en Polifenoles Nixtamalizado (FRPN), Fracción Rica en Antocianinas Crudo (FRAC) y Fracción Rica en Antocianinas Nixtamalizado (FRAN) fueron evaluados a 50, 100, 150 y 200 µg/mL en macrófagos RAW 264.7 bajo la inducción de un estímulo con LPS de *E. coli*.

Las concentraciones de la diferentes fracciones ricas de polifenoles crudo y nixtamalizada (FRPC y FRPN) y fracciones ricas antocianinas crudo y nixtamalizado (FRAC y FRAN) no mostró diferencia significativa entre

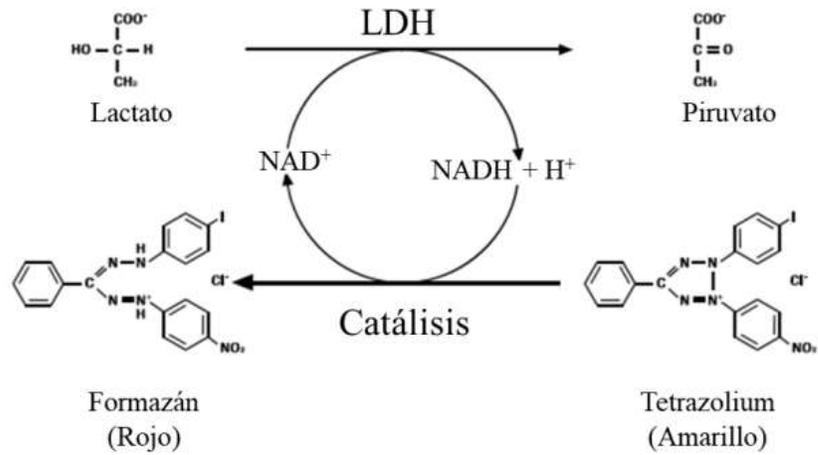


Fig. 18. Reacción enzimática que permite la cuantificación de daño y muerte celular.

Sigma-aldrich, 2016.

concentraciones con un 27% de actividad LDH, siendo menor a la actividad celular basal de 62%; la concentración en FRPC con menor lisis celular fue la de 150 µg/mL, al igual que en la Fracción Rica en Polifenoles Nixtamalizado (FRPN).

Sin embargo, para la Fracción Rica en Antocianinas Crudo (FRAC) la mejor concentración para una menor lisis celular fue la de 150 y 200 µg/mL y para la Fracción Rica en Antocianinas Nixtamalizado (FRAN) fue de 100 µg/mL (**Fig. 19**).

La citotoxicidad de extractos naturales está ligada al tipo de compuestos que contiene, es decir, a mayor cantidad de flavonoides glicosilados en un extracto, este tiende a presentar actividad citotóxica. Las cuatro concentraciones utilizadas de 50, 100, 150 y 200 µg/mL de cada fracción rica en polifenoles y antocianinas no se considera que tenga un efecto citotóxico (Walle 2007; Applová y col 2017).

En este sentido se reporta que cualquier incremento significativo en el nivel de actividad de la enzima LDH puede indicar daño celular o muerte durante el tratamiento (Vijayakumar y Ganesan 2012), por lo que es evidente que los extractos ricos en polifenoles y antocianinas de grano crudo y nixtamalizado de maíz criollo azul mantienen el porcentaje del control basal celular, y presentan diferencia significativa con respecto al control de lisis, estos extractos no presentan un efecto citotóxico a las concentraciones ya mencionadas, por lo que es posible considerar los extractos ricos en polifenoles y antocianinas para probar su efecto en estudios *in vitro* o *in vivo*.

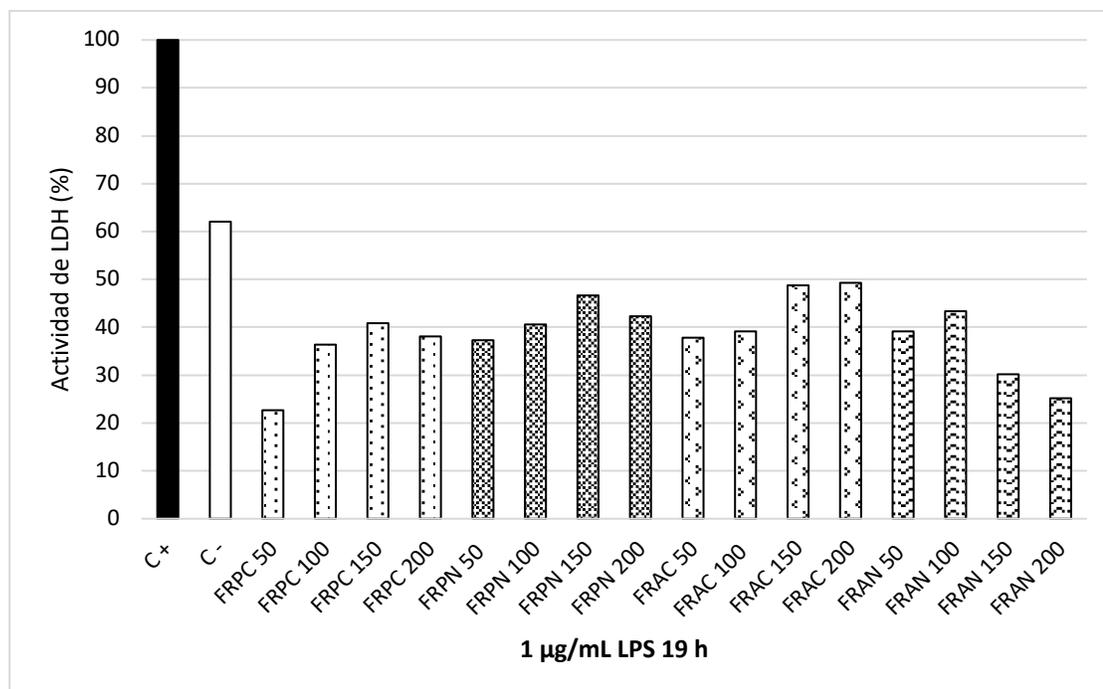


Figura 19. Actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) como indicador de citotoxicidad.

El gráfico muestra un control de muerte máxima (lisis), un control celular (C) con y sin estímulo inflamatorio LPS y los tratamientos con extractos ricos en polifenoles y antocianinas; Fracción Rica en Polifenoles Crudo (FRPC), Fracción Rica en Polifenoles Nixtamalizado (FRPN), Fracción Rica en Antocianinas (FRAC) y Fracción Rica en Antocianinas Nixtamalizado (FRAN) a 50, 100, 150 y 200 µg/mL. El porcentaje es la media \pm error estándar de la absorbancia a 490 nm de tres replicas biológicas y fueron calculados con respecto al control de lisis celular.

J. Viabilidad Celular con Azul de Tripano

El ensayo de exclusión con azul de tripano mostró a las 24 h de tratamiento, una disminución en el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en la concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tanto de extractos crudos y nixtamalizados de maíz criollo azul, mientras que el control – (negativo) no registró viabilidad (**Fig. 20**).

Después de 48 h de tratamiento, se observó disminución en el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en extractos crudos y nixtamalizados. Pero en el resto de los grupos fueron homogéneos, sin embargo, es notorio que hay decremento de la viabilidad celular en todos los tratamientos. Esto puede ser por el agotamiento de nutrientes en el cultivo. Esto indica que los extractos crudos y nixtamalizados en las diferentes concentraciones empleadas no aumentó la muerte celular.

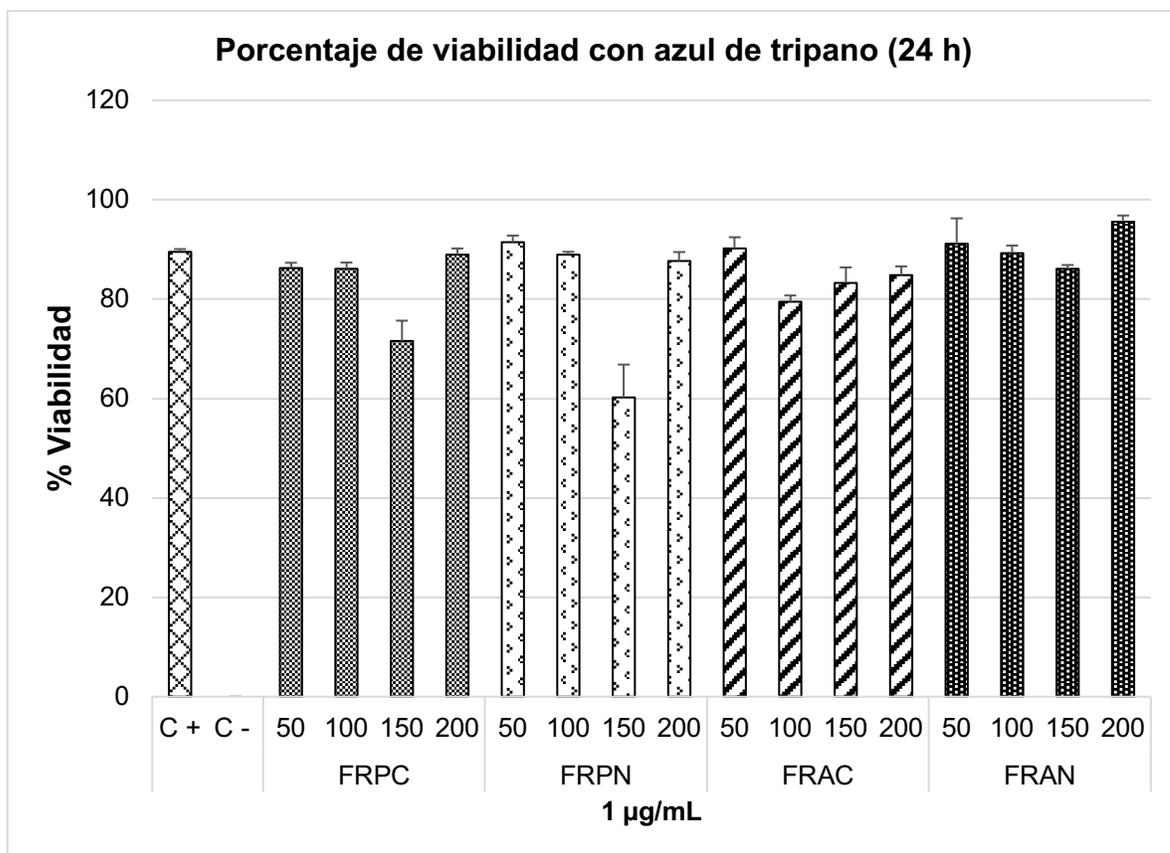
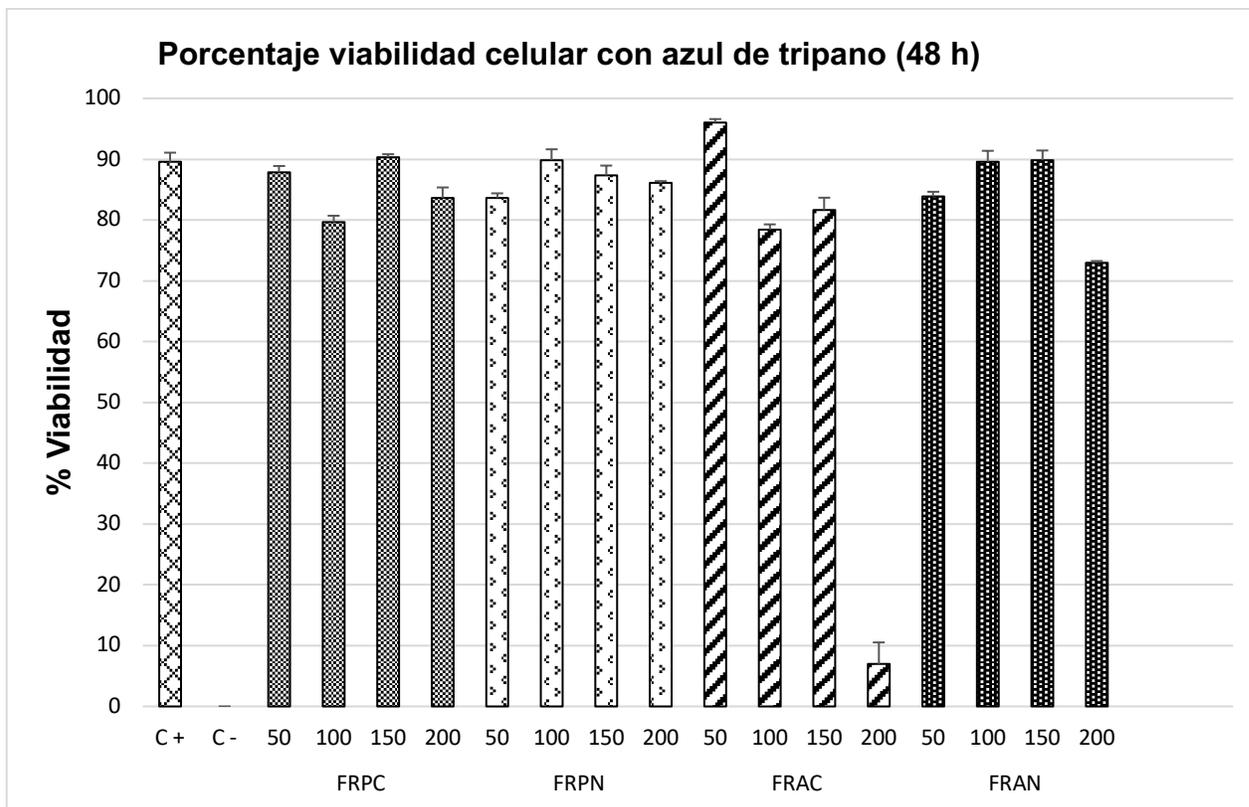


Fig. 20. Valores promedio (\pm DE) del contraste entre tratamientos del efecto de los extractos crudos y nixtamalizados, en células Raw 264.7 tras 24 h de tratamiento.



Valores promedio (\pm DE) del contraste entre tratamientos del efecto de los extractos crudos y nixtamalizados, en células macrófagos Raw 264.7 tras 48 h de tratamiento.

IX. CONCLUSIONES

1. Las características físicas del grano de maíz azul se encuentran dentro del rango establecido por la industria para ser utilizado en la industria de la masa y la tortilla.

2. Los compuestos fenólicos totales presentes en maíz azul y tortilla estuvieron en el rango de 244 y 144 mg EAG/ 100 g bs, respectivamente. Las tortillas azules retuvieron el 59 % del contenido total de fenólicos con respecto al grano crudo.

3. La mayor parte de los compuestos fenólicos (>80%) en grano crudo y tortilla se encuentran en forma ligada.

5. El contenido total de antocianinas fue de 28.39 y 16.06 mg (ECG)/100 g bs, para maíz azul y tortilla respectivamente. Las tortillas azules retuvieron el 57 % del contenido total de antocianinas con respecto al grano crudo.

6. Las antocianinas identificadas en maíz azul y tortilla nixtamalizada empleando la técnica de HPLC-DAD fueron la cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3 glucósido y pelargonidina-3-(6''-malonilglucósido), siendo cianidina-3-glucósido la antocianina mayoritaria. El proceso de nixtamalización y de elaboración de tortilla afectó de manera moderada presentando porcentaje de retención 40 y 80%. La disminución de antocianinas en la fracción sometida a un segundo procedimiento de purificación podría estar asociada a una degradación de las mismas debido al mayor tiempo de exposición a la luz, temperatura y cambios de pH durante el proceso.

7. Las tortillas azules incrementaron su actividad antioxidante, con respecto al grano crudo. Esto demuestra que el proceso incrementa la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos.

8. La rica composición en polifenoles y antocianinas en los extractos evaluados, no influyó sobre citotoxicidad y viabilidad de macrófagos. Las concentraciones 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de las diferentes fracciones de polifenoles y antocianinas tanto para grano crudo y tortilla nixtamalizada de maíz criollo azul no mostraron efecto citotóxico sobre las células.

X. BIBLIOGRAFÍA

AACC.1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 9º edn. Saint. Paul, MN,EUA.

Abbas A, Litchman A, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. Capítulo 1 Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias. Séptima edición. Elsevier. Pp. 1-14.

Abdel-Aal ESM, Young JC y Rabalaski I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple and red cereal grains. Journal of Agriculture of Food Chemistry, 54: 4696-4704.

Acosta R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Reseña. Cultivos Tropicales, 2009, vol. 30, no. 2, p. 113-120.

Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. Food Chemistry,152: 46–55

[Actis-Goretta L](#), [Ottaviani JI](#), [Fraga CG](#). 2006. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. [J Agric Food Chem](#). 2006 Jan 11;54(1):229-34.

Adom KK y Liu RH. 2002. Antioxidant activity of grains. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50:6182-6187.

Agama-Acevedo E, Salinas-Moreno Y, Pacheco-Vargas G y Bello-Pérez LA 2011. Physical and chemical characteristics of blue corn from two races: starch morphology. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.2 Núm.3, pp. 317-329

Aguayo-Rojas J, Mora-Rochín S, Cuevas-Rodríguez EO, Serna-Saldívar SO, Gutierrez-Urbe JA, Reyes-Moreno C y Milán-Carrillo J. 2012. Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after limecooking extrusion process of whole pigmented mexican maize. Plant Foods for Human Nutrition,67:178-18

AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 16 Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington,DC, EUA.

Arias J, Aller MA, Arias JI, Lorente L. 1999. Fisiopatología quirúrgica. Capítulo 14 Respuesta inflamatoria aguda. Respuesta Inflamatoria Crónica. Editorial Tebar. Pág 287-300.

Arroyo P, Fernández V, Loría A, Pardío J, Laviada H, Vargas-Ancona L. 2007. Ryk Ward Obesidad, morfología corporal y presión arterial en grupos urbanos y rurales de Yucatán Salud Pública de México, vol. 49, núm. 4, julio-agosto, 2007, pp. 274-285, Instituto Nacional de Salud Pública México.

Babbar N, Oberoi H S y Sandhu S K.2015. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55:3, 319-337

Bandyopadhyay U. Das D, Banerjee R. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Curr Sci. 77: 658 – 666.

Bauer A, Parsonage M, Knapp M, Lemmi V Adelaja B. 2014. The costs of perinatal mental health problems. Personal social Services Unit.

Bello-Pérez LA, Flores-Silva PC, Camelo-Méndez GA, Paredes-López O, FigueroaCárdenas JDD. 2015. Effect of the nixtamalization process on the dietary fiber dietary fiber content starch digestibility and antioxidant capacity of blue maize tortilla. Cereal Chemistry 92: 265-270.

Betran FJ, Bockholt AJ, Rooney LW. 2001. Blue corn. En: Hallauer AR. Specialty Corns. 2a ed. Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press. Pp 293-302.

Binsack F, Boersma B, R. Patel, White R, Darley-Usmar V, Barnes S, Zhou F. 2001. Enhanced Antioxidant Activity After Chlorination of Quercetin by Hypochlorous Acid. *Clinical & experimental research*.

Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional

Brand-Williams W; Cuvelier ME; Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 28, no. 1. p. 25-30.

Bunzel M, Ralph J, Marita MJ, Hatfield RD, Steinhart H. 2001. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 653-660.

Cao G. 1997. SOFIC, Emin and PRIOR, Ronald. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. En: *Free Radical Biology and Medicine*. 1997. Vol. 22, no. 5. p. 749-760

Carrera V J A. 2008. Proyecto FZ001 "Estudio de la diversidad genética y su distribución de los maíces criollos sus parientes silvestres en Michoacán". Informe Final. Centro Regional Universitario Centro Oriente-Universidad Autónoma Chapingo. Morelia, Michoacán. 64 p

Chaudoére J, Ferrari R. 1999 Intracellular antioxidants from chemical biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 37: 949 – 962.

Clifford MN. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric*. 79, 362-372.

Cook MN, Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem*. 7, 66-76.

CONABIO.2011. Proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html>. (Mayo 2013)

CONABIO 2010. Argumentación para conservar las razas de maíces nativos de México. Taller con especialistas en maíces nativos, realizado los días 17 y 18 de marzo de 2010 en las instalaciones de la CONABIO. México,http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo6_Reunion esTalleres/Tabla%20razas_marzo%202010.pdf

CONABIO. 2008. Información biológica–agronómica básica sobre los maíces nativos y sus parientes silvestres. Documento de trabajo para el Taller Agrobiodiversidad en México: el caso del maíz. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 64 p.

Corrales LC y Muñoz-Ariza MM. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18 Julio - Diciembre de 2012: 135 – 250. Docente investigador Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Estudiantes Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá, D.C., Colombia.

De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structures and biological activities. *Biochem. Sys. Ecol.* 27, 445-459.

De la Parra C, Serna SO, Liu EH. 2007. Effect of Processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 4177-4183.

Eckhoff SR, Paulsen MR, Yang SC. 2003. Maize. En: Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. Enciclopedia of Food Sciences and Nutrition. Volumen 6. Reino Unido: Elsevier Science Ltd. Pp 3647-3653.

Expósito-Gázquez A y López-Fernández FJ. 2016. Sostenibilidad y calidad de vida. Editorial: ACCI ediciones- Asociación cultural y científica iberoamericana. Madrid, España. Pp 12-16.

FAO, Food and Agriculture Organization (1993) El Maíz en la Nutrición Humana. Organización de las Naciones Unidas, Roma. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm> (Diciembre, 2013).

Ferguson L, Zhu S y Harris P. 2005. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 585–593.

Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parilla MC. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 649-671.

Fernández Suárez R, Morales Chávez L A y Gálvez Mariscal A. 2013. Importance of mexican maize landraces in the national diet. An essential Review. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36: 275 - 283

Figueroa Cárdenas JD, Narváez DG, Mauricio AS, Taba S, Gaytán-Martínez M, Véles MJ, Rincón FS y Aragón FC. 2013. Propiedades físicas del grano y calidad de los grupos raciales de maíces nativos (criollos) de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36:305-314

Galinat W C. 1988. The origin of Corn. In: *Corn and Corn Improvement* G F Sprague, and J W Dudley, (eds). American Soc. of Agronomy, Inc. Crop Sci. Soc. of America, Inc. Madison. pp. 1-3

Gamble PE, Burke JJ. 1984. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*,76: 615–621

Gaxiola-Cuevas N. 2013. Caracterización de antocianinas de maíces (*Zea mays* L.) criollos azules de Sinaloa. Efecto del Proceso de Nixtamalización. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa.

Glazer A. 1988. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. En: *The FASEB journal: official publication of Julian Londoño Londoño / 161 / the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1988. Vol. 2. p. 2487-2491.

Gómez M, N O, B Coutiño E y A Trujillo C. 2010. Proyecto FZ016 “Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México, segunda etapa 2008- 2009”. Informe final de la región Pacífico Sur. INIFAP, Campo Experimental Iguala. Iguala, Guerrero, México. 21 p

Halliwell B, Gutteridge J. 2000 *Free radicals in Biology and Medicine*. Tercera edición. Oxford, New York.

Han X, Shen T, Lou H. 2007b. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8, 950-988.

HUANG, Op. cit., p. 1841-56.

Gaytán-Martínez M, Figueroa-Cárdenas J D, Reyes-Vega M L, MoralesSánchez E y Rincón-Sánchez F.2013. Maize landraces selection for industrial and use based on their added value. *Revista Fitotecnica Mexicana*,36:339 – 346.

Goodman, M. M. y R. McK. Bird. 1977. The races of maize IV: Tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany* 31:204-221.

Halliwel B. Antioxidants, 1997: The Basis – What they are and how to evaluate them. En: Antioxidants in deeseases: Mecanismos and therapy. SIES. Academic Press. California.

Han Xiuzhen, Shen Tao y Lou Hong xiang. 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International Journal of Molecular Sciences, 8:950-988

Hannum MS. 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. Crit. Review Food Sci. Nutr. 44, 1-17.

Hernández X., E. y G. Alanís F. 1970. Estudio morfológico de cinco razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: Implicaciones filogenéticos y fitogeográficas. Agrociencia 5 (1): 3–30.

Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis H y Oredsson S. 2011. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. Nutrition and Cancer, 63,611–622.

Jing P, y M M Giutsi. 2007. Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn(Zea mays L.) color extract. Journal of Food Science,72:363-368

Jr Ostlund RE, Racette SB, Okeke A y Stenson WF. 2002. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. American Journal of Clinical Nutrition, 75: 1000 – 1004.

Kathleen-Mahan L y Ryamond J. 2017. Krause. Dietoterapia. 14ª Edición. Elsevier. Barcelona, España

<https://books.google.com.mx/books?id=9wVODgAAQBAJ&pg=PA28&dq=especies+reactivas+en+enfermedades+cronicas&hl=es->

[419&sa=X&ved=0ahUKEwizjIX6zIzYAhXD54MKHeQmDuwQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false](https://doi.org/10.1080/00137170310001631419&sa=X&ved=0ahUKEwizjIX6zIzYAhXD54MKHeQmDuwQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false)

Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J (1993): Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Technol* 47: 85–89.

Klepcka J y Fornal L. 2006. Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 639-647.

Konczak I y Zhang W. 2004. Anthocyanins-more than nature' s colors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 239–240.

Krimmel B, Swoboda F, Solar S, Reznicek G. 2010. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry*, 79: 1247– 1254

Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements D J, Lecomte J, Decker E A, Villeneuve P. 2015. What Makes Good Antioxidants in LipidBased Systems? The Next TheoriesBeyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:2, 183-201

Larkins N. 1999. Free radical biology and pathology. *J Equine Vet Sci*. 19: 84- 89.

Liu RH. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46:207-219.

Londoño-Londoño. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad.

<http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>

López-Martínez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee CH, Parkin KL y Garcia HS. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1187–1192.

Manach C, Scarbet A, Monard C, Rémesy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.

Matsumoto, D., LeRoux, J. A., Bernhard, R., & Gray, H. (2004). Personality and behavioral correlates of intercultural adjustment potential. *International Journal of Intercultural Relations*, 28, 281–309.

Mattila, P, Pihlava J M, y Hellstrom J. 2005. Contents of phenolic acids. Alkyl-and alkenylresorcinols, and avertinamides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:8290

Noland D., MPH, RD, CCN Y LD. 2017. Kathleen-Mahan L. y Raymond J. 2017. Capítulo 1 Inflamación y fisiopatología de las enfermedades crónicas. Págs 28-35. Krause. *Dietoterapia*. 14ª edición. ELSEVIER España, S. L. U.

<https://books.google.com.mx/books?id=9wVODgAAQBAJ&pg=PA28&dq=especies+reactivas+en+enfermedades+cronicas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwizjIX6zIzYAhXD54MKHeQmDuwQ6AEIJzAA#v=onepage&q=estres%20oxidativo&f=false>

Miao L St Clair DK.2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*,47:344-56

Miguel MA, Arellano-Vazquez JL, García de los Santos G, Miranda-Colin S, Majia-Contreras J, Gonzalez-Cossio F V. 2004. Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (1):9-15

Miller N. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. En: *Clinical science (London, England)*. 1993. vol. 84. p. 407-412.

Mora-Rochín S, Gaxiola-Cuevas N, Gutiérrez-Urbe JA, Milán-Carrillo J, Milán-Noris EM, Reyes-Moreno C, Serna-Saldivar SO y Cuevas-Rodríguez EO. 2016. Effect of traditional nixtamalization on anthocyanin content and profile in Mexican blue maize (*Zea mays* L.) landraces. *Food Science and Technology*, 68: 563-569.

Mora-Rochín S, Milán J, Reyes C. 2013. Fitoquímicos y potencial nutracéutico de maíces pigmentados mexicanos. Ed. PUBLICIA, primera edición, Alemania, p 158.

Mora-Rochin S, Gutierrez- Uribe JA, Serna-Saldivar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C y Milan-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented corns processed by conventional nixtamalization of extrusion cooking. *Journal Cereal Science*, 52: 502-508.

Moreno YS, Sánchez GS, Hernández DR y Lobato NR. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43:483–487

Nichenametla SS. Taruscio GT. 2006. A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cáncer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 161-183

Okarter N y Liu RH. 2010. Health benefits of whole grain phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50: 193–208.

http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=780&Itemid=310

OU B y col. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. En: Journal of agricultural and food chemistry. 2001. Vol. 49. p. 4619-26.

Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. 2010. T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life-review. Plant Foods Hum. Nutr. 65, 299-308.

Pedreschi R y Cisneros-Zevallos L. 2007. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L). Journal of Agriculture Food Chemistry, 54: 4557-4567.

Peluso I, Miglio C, Morabito G, Ioannone F, Serafini M. 2015. Flavonoids and Immune Function in Human: A Systematic Review. Food Science and Nutrition, 55:3, 383-395.

Perales R, H y D Golicher. 2011. Modelos de distribución para las razas de maíz en México y propuesta de centros de diversidad. Informe técnico preparado para la CONABIO. ECOSUR. Chiapas. México. 108 p. Manuscrito.

Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the Phenol-Explorer database. Journal of Agricultural. Food Chemistry, 58(8):4959–4969.

Pérez Uriarte J H. 2014. Optimización del Proceso de Extrusión sobre la Capacidad Antioxidante de Tortillas de Maíz Criollo Azul del Estado de Sinaloa. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa

Pietta P y col. 2000. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. Vol. 23. p. 223-226.

Pineda-Hidalgo K V, Mendez-Marroquin K P, Vega-Alvarez M, Cháve Ontiveros J, Sánchez-Peña P, Garzon-Tiznado J A, Vega-García M O, López-Valenzuela J A. 2013. Microsatellite-based genetic diversity among accessions of native landraces from Sinaloa in Mexico. Hereditas 150:53-59

Preciado-Ortiz RE, Montes-Hernández S. 2011. Amplitud, aprovechamiento y riesgos de la diversidad genética de maíz en México. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Chapingo, Edo. de México. 274 p

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. Recuperado en 08 de enero de 2018, de

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar NMVR. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal Control Release*, 113: 189–207

Repetto-Jiménez M y Repetto-Kuhn G, 2009. Toxicología fundamental. Capítulo 6 Mecanismos de toxicidad. 4ta edición. Ediciones Días de Santos. 620 páginas. Pag 182-182

<https://books.google.com.mx/books?id=WheuVgivN6wC&pg=PA181&dq=especies+reactivas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjNo4ffwYzYAhVn1oMKHb8gAswQ6AEIPjAF#v=onepage&q&f=false>

Reynoso-Camacho R, Guerrero-Villanueva G, Figueroa J D, Gallegos-Corona M A, Mendoza S .2015. Anticarcinogenic Effect of Corn Tortilla Against 1,2 Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Carcinogenesis in Sprague– Dawley Rats. Plant Foods for Human Nutrition, 69:4

Roginsky E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. En: Food Chemistry. September. Vol. 92, no. 2. p. 235-254

Ron J P, J J G Sánchez, A A C Jiménez, J AV Carrera, J G L Martín, M M R Morales, L L de la Cruz, S A de la P Hurtado, S M Mena, J G F Rodríguez .2006. Maíces nativos del Occidente de México I. Colectas 2004. ScientiaCUCBA, 8:1-139.

Salinas M Y, J Soria R, E Espinosa T .2010. Aprovechamiento y distribución de maíz azul en el Estado de México. INIFAP. Campo Experimental Valle de México, Chapingo, México. Folleto Técnico No. 42. 50 p.

Salinas Moreno Y, Salas Sánchez G, Rubio Hernández D, Ramos Lobato N. 2005. Characterization of Anthocyanin Extracts from Maize Kernels. Journal of Chromatographic Science, Vol. 43

Sailendra NN, Todd GT. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cáncer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 161-183

Sánchez G J J. 1989. Relationships among the Mexican Races o maize. Ph. D. Thesis. North Caroline State University, Department of Crop Science. Raleigh, N. C. 187 p.

Sánchez JJ, Goodman MM y Sruber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Economic Botany*,54:43 – 59

Sarkar D, y Shetty K.2014. Metabolic Stimulation of Plant Phenolics for Food Preservation and Health. *Annual review food science technology*, 5:395–413

Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA, Mora-Rochin S y García-Lara S. 2013. Potencial nutraceútico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3-A), 295-304

Serna-Saldivar SO, Garcia Lara S, Gutierrez-Urbe JA.2011.Perfil fitoquímico y propiedades nutraceúticas de maíces pigmentados y sus tortillas.Cap. 5 en "Amplitud,Mejoramiento,Usos y Riesgos de la Diversidad Genética de Maíz en México".Sociedad Mexicana de Filogenética A.C Chapingo, Edo. De México, pp, 75-9

Serna-Saldívar SO. 2010. Chemical Composition of Cereal Grains. En: *Cereal Grains: Properties, Processing and Nutritional Atributes*. Serna-Saldívar, SO, editor. 2a Ed. Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press. Pp 81-108.

Serratos-Hernández JA. 2012. El Origen y la Diversidad del Maíz en el Continente Americano. Segunda Edición. 40 p.

Srinivasan VS. 2001. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J Nutr*; 131: 1349S-1350S.

Sousa E, Pessanha M, Alves R, Colleen C, Clevidence Y y Novotny J. 2005. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53: 2589–2599.

Springob K, Nakajima Ji, Yamazaki M, Saito K. 2003. Recent advances in the Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins. *Natural Product Reports*, 20:288-303

Strack D y Wray V. 1989. Anthocyanins. En *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I. Plant Phenolics. H. B. Harbone (ed.), pp 325-356. Academic Press.

Tawaha K. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. En: *Food Chemistry*. Vol. 104. p. 1372-1378.

Terpinc P, Polak T, Šegatin N, Hanzlowsky A, Ulrich NP, Abramovic̃ H. 2011. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, 128:62–6

Urias-Peraldí M, Gutiérrez-Urbe JA, Preciado-Ortiz RE, Cruz-Morales AS, Serna-Saldívar SO, García-Lara S. 2013. Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. *Field Crops Research*, 141, 69-76.

Valant-Vetschera KM y Wallenweber E. 2006. Flavones and flavonols. En: Anderson, O. M; Markham K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. Pp 618-748.

Vázquez-Carrillo M G, Guzmán-Báez L, Andrés-García J L, Márquez Sánchez F y Castillo-Merino J. 2003. Calidad de granos y tortillas de maíces criollos y sus retrocruzas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26: 231-235

Wang LS, Stoner DG. 2008. Anthocyanins and their role in cáncer prevention. Mini-review. *Cancer Letter*. 6, 119-128.

Wayner DD y col. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. En: *FEBS letters*. July 1985. Vol. 187, no. 1. p. 33-37

Wellhausen, E. J., L. M. Roberts, E. Hernández X. en colaboración de P. C. Mangelsdorf. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales Secretaría de Agricultura y Ganadería. Folleto técnico Núm. 55. México D. F.

Whiting D. 2001. Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of century's chemistry. *Natural Prod. Report*. 18, 583-606.

Williams CA. 2006. Flavone and flavonol O-glycosides. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. (edi). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. pp. 749-856.

WRIGHT. Op. cit. p. 1173-1183.

Wu-Yang H, Yi-Zhong C. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cáncer prevention. *Nutr. Cancer*. 62, 1-10.

Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal Clinical Pathology*, 54:176-86

Yu P. 1994 Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.*; 74 (1): 139 – 162.

Zhao X, Zhang C, Guigas C, y Corrales MM, Tauscher B, Hu X. 2009. Composition, antimicrobial activity and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *European Food Research and Technology*, 228:759-765.