



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TORTILLA NUTRACÉUTICA OBTENIDA DE MAÍZ DE GRANO AZUL:

FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

PRESENTA:

MAGALI ANABEL CAÑAREJO ANTAMBA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, agosto de 2014

**TORTILLA NUTRACÉUTICA OBTENIDA DE MAÍZ DE GRANO AZUL:
FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL**

Tesis realizada por **Magali Anabel Cañarejo Antamba** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

AGROALIMENTARIA



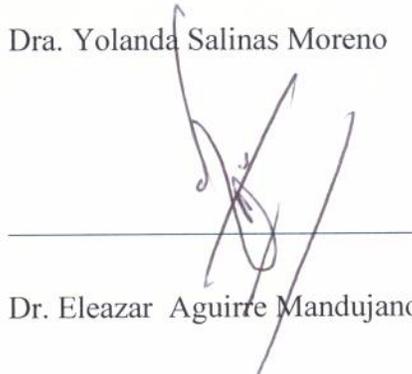
Director

Dr. Salvador Valle Guadarrama



Co-Directora

Dra. Yolanda Salinas Moreno



Asesor

Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

Chapingo, Estado de México, agosto de 2014

DEDICATORIAS

A Dios por poner en mí, la fortaleza necesaria cada día de mi vida.

A mis Padres; Ángel Cañarejo y Elvia Antamba que con su amor infinito y apoyo incondicional supieron guiarme a culminar con éxitos mis estudios.

A mis Hermanos; Glenda, Javier y Johana quienes son cómplices de mis objetivos y ejemplo de perseverancia en mis metas.

A mis adorados sobrinos; Gabriel, Leandro, Ma. Emilia, Francisco y Camila.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haber financiado mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por darme la oportunidad de cumplir una meta más en vida profesional.

Al Posgrado representado por la Dra. Carmen Ybarra Moncada y al personal administrativo por su apoyo incondicional durante la maestría.

A la Dra. Yolanda Salinas Moreno por ser guía y brindarme su confianza y paciencia durante la realización del trabajo de investigación.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por su apoyo, tiempo y disposición para dirigir éste trabajo de investigación.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano por sus aportaciones a éste trabajo de investigación.

A la Dra. Sonia Sáyago Ayerdi y al Ing. M. C. Victor Guzmán, por su colaboración durante mi estancia en el Laboratorio Integral de Investigación de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit.

A la Dra. Mónica Jaime Fonseca por su colaboración en el Centro de Investigaciones en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del Instituto Politécnico Nacional.

A la Ing. Carolina García Salinas del Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Centro de Biotecnología-FEMSA del Tecnológico de Monterrey por su colaboración en la realización de análisis químicos.

Al personal del Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal del CIMMYT por su apoyo en la realización de análisis químicos.

A Viridiana, Alberto, Elvia, Aurora, Laura y demás quienes conformaron el quipos de trabajo del Laboratorio de Calidad de Maíz del INIFAP, Estado de México. México.

A mis queridos compañeros de la onceava generación de la MCyTA por hacer que mi estancia en el posgrado y en México sea agradable e inolvidable.

A todos aquellos que de una u otra manera forma supieron colaborar con la finalización de este trabajo de investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

Ingeniera Agrónoma en la Universidad Central del Ecuador. Durante 2010 hasta 2012 fue Técnica de Campo en el área de producción agrícola y realizó actividades de apoyo como capacitadora en el área de Desarrollo Rural, en el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) de Ecuador.

TORTILLA NUTRACÉUTICA OBTENIDA DE MAÍZ DE GRANO AZUL: FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL

NUTRACEUTICAL TORTILLA OBTAINED FROM CORN OF BLUE GRAIN: FORMULATION AND SHELF LIFE

Cañarejo-Antamba, M., Y. Salinas-Moreno., S. Valle-Guadarrama., E. Aguirre-Mandujano

RESUMEN

El maíz de grano azul, contiene elevado contenido de antocianinas, que se pierden en proporción importante, al ser transformado en tortillas, por el pH alcalino del proceso. El objetivo del trabajo fue desarrollar una tortilla nutraceutica con alto contenido de antocianinas, a través de la optimización del método de nixtamalización y la adición de pericarpio de grano. Se usó maíz azul raza Chalqueño. Se encontró que la modificación del pH a 5.1 en la etapa de reposo con ácido fumárico al 1.2 %, y luego a 7.1 en la etapa de molienda con la adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 2 % produjo tortillas con mayor contenido de antocianinas (AT; 350 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG) kg^{-1} de materia seca (MS) y fenoles solubles totales (FST; 1054.4 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) kg^{-1} MS), mayor actividad antioxidante (AA; 17 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} MS), en comparación con el proceso tradicional (218 mg ECG kg^{-1} , 674 mg EAG kg^{-1} y 10.5 μmol ET g^{-1} , respectivamente), con similares atributos de color. Asimismo, la adición (3 %) de pericarpio de maíz Elotes Cónico a una mezcla 70:30 de maíces de las razas Chalqueño y Bolita, causó aumento de AT (58%), FST (68 %) y AA (97 %), índice de hidrólisis (92 %) y predicción de índice glucémico (87 %), con características de color, textura y vida de anaquel similares a tortillas obtenidas sin la adición de pericarpio y también con niveles bajos de cuenta microbiológica.

Palabras clave: nixtamalización, nutraceutico, antioxidante, antocianinas, índice glucémico.

ABSTRACT

Blue-grained corn, after nixtamalization, can produce tortillas with high content of anthocyanins, which are, however, degraded during alkaline cooking. The objective of this study was to develop a nutraceutical tortilla with high content of anthocyanins, by optimizing nixtamalization and adding grain pericarp. Chalqueño landrace corn was used. It was found that changing the pH to 5.1 in the steeping stage with 1.2 % fumaric acid, and then to 7.1 at the milling step with the addition of 2 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$ produced tortillas with higher anthocyanin content (AC; 350 mg equivalent of cyanidin-3-glucoside (CGE) kg^{-1} dry matter (DM), and total soluble phenols (TSP; 1054.4 mg gallic acid equivalents (GAE) kg^{-1} DM), higher antioxidant activity (AA, 17 μmol Trolox equivalent (TE) g^{-1} DM), compared with the traditional process (218 mg CGE kg^{-1} , 674 mg GAE kg^{-1} , and 10.5 μmol TE g^{-1} , respectively), with similar color attributes. Also, the addition (3 %) of pericarp from Elotes Cónico corn to a 70:30 mixture of Chalqueño and Bolita corn races increased AC (58 %), TSP (68 %) and AA (97 %), hydrolysis index (92 %) and prediction of glycemic index (87 %), with features of color, texture and shelf life similar to tortillas obtained without the addition of pericarp, and also with low levels of microbiological development.

Keywords: nixtamalization, nutraceutical, antioxidant, anthocyanins, glycemic index.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DATOS BIOGRÁFICOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Importancia del maíz	5
2.1.1 Producción	5
2.1.2 Variabilidad genética del maíz en México	6
2.1.3 Formas de consumo del maíz pigmentado en México.....	7
2.2 Características de los maíces pigmentados	8
2.2.1. Características físicas.....	8
2.2.3 Composición química del grano de maíz blanco y azul	10
2.3 Tortillas de maíz azul	11
2.4 Antocianinas en maíces pigmentados.....	12
2.4.1 Factores que alteran la estabilidad en las antocianinas.....	13
2.4.2 Actividades biológicas de las antocianinas.....	15
2.5 La nixtamalización y su efecto sobre las antocianinas del grano de maíz pigmentado	16
2.6 Alimentos funcionales.....	17

2.7 Vida de anaquel de productos.....	19
IV. MEJORAMIENTO DEL MÉTODO DE NIXTAMALIZACIÓN PARA ELABORAR TORTILLAS A PARTIR DE MAÍZ DE GRANO AZUL	21
RESUMEN.....	22
ABSTRACT.....	22
1 Introducción	23
2 Materiales y métodos	25
2.1 Material de estudio	25
2.2 Sitio de experimentación	25
2.3 Organización experimental.....	25
2.3.1 Nixtamalización de muestras.....	25
2.3.2 Elaboración de tortillas	26
2.4 Variables respuesta.....	27
2.4.1 Medición de pH en nejayote y masa.....	27
2.4.2 Humedad en nixtamal, masa y tortilla	27
2.4.3 Color en masa y tortilla.....	28
2.4.4 Variables de composición fenólica en las tortillas.....	28
2.4.5 Actividad antioxidante.....	30
2.5 Análisis estadístico de los datos	31
3 Resultados y discusión	31
3.1 Condiciones de pH en nixtamalización, reposo, molienda y amasado.....	31
3.2 Humedad de nixtamal, masa y tortilla.....	32
3.3 Color de masa y tortilla	34
3.4 Composición fenólica en tortilla	37
3.5 Actividad antioxidante de tortillas.....	39
V. FORMULACIÓN DE TORTILLA NUTRACÉUTICA A PARTIR DE MAÍZ DE GRANO AZUL NUTRACÉUTICA Y VIDA DE ANAQUEL.....	41
RESUMEN.....	42
ABSTRACT.....	42
1 Introducción	43

2 Materiales y métodos	44
2.1 Material de estudio	44
2.2 Organización experimental.....	44
2.2.1 Nixtamalización de muestras	44
2.2.2 Elaboración de tratamientos para la formulación de una tortilla azul nutracéutica.....	45
2.2.3 Perlado mecánico del grano rojo Elotes Cónico para obtener ingrediente rico en antioxidantes	45
2.2.4 Elaboración de tortilla azul nutracéutica	47
2.3 Variables respuesta.....	48
2.3.1 Evaluación de las características físicas de la tortilla azul nutracéutica.....	48
2.3.2 Determinación de la composición química y mineral en la tortilla azul nutracéutica.....	49
2.3.3 Análisis de la tasa de hidrólisis y predicción del índice glucémico en la tortilla azul nutracéutica.	49
2.3.4 Variables de composición fenólica en la tortilla azul nutracéutica	50
2.3.5 Actividad antioxidante.....	51
2.4 Determinación de vida de anaquel	53
2.5 Análisis de datos.....	53
3 Resultados y discusión	54
3.1 Características físicas de humedad y color en tortilla	54
3.2 Textura en tortillas.....	58
3.3 Composición química y mineral en tortillas.....	60
3.4 Digestibilidad del almidón	65
3.4.1 Tasa de hidrólisis	65
3.4.2 Predicción del índice glucémico (pIG)	66
3.5 Composición fenólica y actividad antioxidante en las tortillas	67
3.5.1 Actividad antioxidante en tortillas.....	70
3.6 Vida de anaquel de tortilla azul nutracéutica	71
3.6.1 Composición fenólica y actividad antioxidante en las tortillas evaluadas en vida de anaquel.	73
3.6.2 Análisis Microbiológico de tortillas almacenadas en refrigeración.....	76
4 Conclusiones	79

VI. CONCLUSIONES GENERALES.....	81
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características físicas del grano de maíz pigmentado y blanco.....	9
Cuadro 2. Composición proximal en maíces y tortillas blancas y azules (% base seca).	10
Cuadro 3. Descripción de tratamientos de nixtamalización y acondicionamiento de masa aplicados en el maíz azul/morado.....	26
Cuadro 4. Análisis de varianza de parámetros de pH en masa, y color, humedad y composición fenólica en masa y tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño	33
Cuadro 5. Color en masa y tortilla de maíz Chalqueño con grano azul/morado.	34
Cuadro 6. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas de maíz azul/morado preparadas con distintos manejos de pH.	38
Cuadro 7. Descripción de tratamientos para formular una tortilla azul nutracéutica y un testigo de grano blanco.....	46
Cuadro 8. Análisis de varianza de parámetros de color, humedad y textura, composición química y mineral en tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño.....	55
Cuadro 9. Humedad y características colorimétricas en tortilla azul con diferente formulación y tortilla blanca como contraste.....	56
Cuadro 10. Características de textura en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.....	59
Cuadro 11. Composición química promedio (%) en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.	61

Cuadro 12. Contenido de fibra ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste	63
Cuadro 13. Contenido de minerales ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste	64
Cuadro 14. Contenido de almidón (%) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.*	66
Cuadro 15. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos de la composición fenólica y contenido microbiológico en tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño, durante el almacenamiento.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la semilla de maíz. Fuente: Rodríguez-Mendez (2013).	9
Figura 2. Estructura general de las antocianinas (Harborne, 1963; Kong <i>et al.</i> , 2003). .12	
Figura 3. Estructura de las antocianinas en función del pH (Castañeda <i>et al.</i> , 2009).....	14
Figura 4. Estructura de la antocianina en función de la temperatura.	15
Figura 5. Variación del pH en los tratamientos TT, TA, TAM y TAA para la nixtamalización de maíz azul y elaboración de tortilla.....	31
Figura 6. Fotografías digitales de las tortillas de maíz azul/morado raza Chalqueño obtenidas con diferentes tratamientos de nixtamalización y acondicionado de masa.	35
Figura 7. Representación gráfica de los parámetros Hue y Croma de las tortillas obtenidas con diferentes tratamientos de nixtamalización y acondicionado de masa.	36
Figura 8. Actividad antioxidante por ABTS en las tortillas obtenidas de los distintos tratamientos de nixtamalización.....	39
Figura 9. Proceso de perlado del grano de maíz, (a): escarificado del grano; (b): clasificación y molienda del pericarpio; (c): pericarpio molido	47
Figura 10. Antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste'	69
Figura 11. Actividad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.	71
Figura 12. Tortillas azules empacadas al vacío y con atmósfera modificada.	72

Figura 13. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas almacenadas en refrigeración a 5 °C.....	74
Figura 14. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas de los diferentes tratamientos evaluados en vida de anaquel.	76
Figura 15. Cuenta de bacterias mesofílicas, hongos y levaduras en tortillas azules evaluadas en vida de anaquel.	77
Figura 16. Cuenta de bacterias mesófilas, hongos y levaduras en tortillas azules obtenidas de los distintos tratamientos evaluados en vida de anaquel.....	78

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas) y al género *Zea*. (Paredes-López *et al.*, 2008). La producción mundial anual de este cereal es de 800 millones de toneladas y los principales productores son Estados Unidos, China, Brasil, Argentina, India, Francia e Indonesia (FAO, 2012). México se ubica en la octava posición entre los principales países productores.

En México la producción de maíz en el año 2012 fue de 22.07 millones de toneladas, de las cuales 86 % fueron de maíz blanco, 9 % de maíz amarillo y 5 % de otros (SIAP, 2012). Sin embargo actualmente no se cuenta con estadísticas oficiales acerca de la producción nacional de los maíces de color. Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante del país, con un consumo *per cápita* como alimento de 128 kg/año (SAGARPA, 2013). Las variedades criollas de maíz presentan granos pigmentados de múltiples colores y forman parte de las 59 razas descritas en el país (CONABIO, 2011). Dentro de esta variabilidad, se localizan las razas de maíz pigmentado (azul/morado) denominadas Chalqueño y Bolita, que tradicionalmente son preferidos por los productores por su adaptación a las condiciones ambientales, facilidad para su procesamiento por las características de los alimentos que con ellos se preparan y por su uso forrajero (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2010).

A los granos de colores negros, azules, morados y rojos encontrados en maíces pigmentados, se ha conferido propiedades nutraceuticas por su alto contenido de antocianinas, las cuales poseen actividad biológica benéfica (Serna *et al.*, 2013). Estos compuestos tienen una acción positiva en la salud humana al atacar radicales libres, los cuales se involucran en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Kong *et al.*, 2003).

El interés acentuado de los consumidores en la optimización de los beneficios de la salud a través de la ingesta de alimentos, ha generado una demanda creciente de los alimentos funcionales y alimentos nutraceuticos en el mercado (Mazza, 2002). Diversos materiales conteniendo antocianinas han sido incorporados a este tipo de productos alimenticios, como el maíz pigmentado para la elaboración de tortillas azules. Las tortillas azules, por su contenido de antocianinas y fenoles, resultan ser productos funcionales con alto potencial para el mercado (Serna-Saldivar *et al.*, 2013).

En México, las tortillas son el alimento básico de la dieta diaria, el consumo diario *per cápita* es de 155.4 g en las zonas urbanas y hasta 217.9 g en las zonas rurales (Fernández-Suárez *et al.*, 2013). La tortilla azul, además de su color y sabor diferente, posee un contenido de antioxidantes ligeramente mayor que la tortilla blanca, con valores entre 12-18 μmoles equivalentes de trolox (ET)/g de materia seca (MS) para tortilla azul común y valores entre 8-10 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ MS para tortilla blanca (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; De la Parra *et al.*, 2007; Mora-Rochin *et al.*, 2010; Lopez-Martínez *et al.*, 2011), algunos reportes señalan que el índice glucémico en la tortilla azul es inferior a la tortilla blanca (Hernández-Uribe *et al.*, 2007). Sin embargo, los procesos de transformación al que es sometido el grano de maíz para transformarse en tortilla, provocan la pérdida de gran cantidad de fenoles, los que se han cuantificado

entre 50-100 % (Salinas-Moreno *et al.*, 2003; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; De la Parra *et al.*, 2007).

La nixtamalización, que es el principal proceso de transformación del maíz a tortilla, involucra cambios químicos, estructurales y nutricionales en los diversos componentes del grano. Según lo informado por Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) y De la Parra *et al.* (2007), cuando los maíces azules son nixtamalizados y transformados en tortilla, existen pérdidas entre 70 y 80 % del contenido de antocianinas. Estas pérdidas son atribuidas al efecto combinado de la cal y el procesamiento térmico durante la nixtamalización, así como pérdidas físicas del pericarpio y la lixiviación de compuestos fenólicos en el residuo de cocción.

Aunque varios estudios han informado procesos alternativos a la nixtamalización tradicional, como la nixtamalización por extrusión y la nixtamalización fraccionada (Cortéz-Gómez *et al.*, 2006; Mora-Rochin *et al.*, 2010), las pérdidas de antocianinas reportadas con estos métodos no difieren mayormente. Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) propusieron realizar el reposo del grano nixtamalizado en medio ácido (pH=5.2) como una manera para reducir las pérdidas de antocianinas. Esta modificación al proceso tradicional condujo a una pérdida de antocianinas de sólo 17 % en maíces azules. Sin embargo, los estudios no han reportado cómo obtener una tortilla azul con características de calidad en color y textura similares a la tortilla azul tradicional, pero con mayor contenido de antocianinas. Con base a estas consideraciones, surge el interés de desarrollar una tortilla azul con alto contenido de antocianinas, a través de la optimización del método de nixtamalización y la adición de fracciones de grano rojo y evaluar el efecto de la tortilla formulada sobre la composición fenólica durante el almacenamiento.

II. OBJETIVOS

General: Evaluar el potencial nutracéutico en tortillas formuladas a partir de maíz blanco, maíz azul y mezclas de maíz azul con fracciones de grano rojo.

Particulares:

- Desarrollar la formulación de la tortilla azul nutracéutica a partir de maíces azul/morado y fracciones de grano rojo.
- Evaluar el índice glucémico y la actividad antioxidante de las formulaciones desarrolladas.
- Determinar la estabilidad de los bioactivos (antocianinas y fenoles solubles totales) durante la vida de anaquel de la tortilla formulada.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del maíz

2.1.1 Producción

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas) y al género *Zea*. Es la única especie cultivada de este género y tiene el más alto potencial (70-75 % de almidón en el grano) para producción de carbohidratos por unidad de superficie por día (Paredes-López *et al.*, 2008). La producción mundial anual de este cereal es de 800 millones de toneladas, y los principales productores son Estados Unidos, China, Brasil, Argentina, India, Francia e Indonesia (FAO, 2012). México se ubica en la octava posición entre los países productores.

En México el maíz es el cultivo más importante, tanto por superficie cultivada y cosechada, como por la relevancia de este cereal en la dieta. Durante 2012 se produjeron 22.07 millones de toneladas, de las cuales 86 % fueron de maíz blanco, 9 % de maíz amarillo y 5 % de otros (SIAP, 2012). No existen registros oficiales de la producción de maíces de colores (pigmentados) debido a que se cultivan en pequeños volúmenes. Esta gramínea está presente en la elaboración de más de 4 mil productos (almidón, aceites, cartón, chocolates, biocombustibles, alimento animal, entre otros) y aporta cantidades

significativas de nutrientes, sobre todo calorías y proteínas. El consumo *per cápita* como alimento es de 128 kg/año (SAGARPA, 2013).

2.1.2 Variabilidad genética del maíz en México

México posee la mayor variabilidad genética de este cereal en el mundo, donde se han registrado 64 razas, de las cuales 59 son consideradas nativas. Esta diversidad se ha clasificado de acuerdo a criterios de morfología, ecología, genética y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (CONABIO, 2011). Sin embargo, la valoración de las estructuras reproductivas femeninas, mazorcas, grano y olote, parecen ser el criterio morfológico más importante para la clasificación racial de maíz entre razas y dentro de razas (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000).

Uno de los componentes de la diversidad fenotípica es el color del grano, y en muchas de las razas nativas registradas en el país se presentan variantes de grano pigmentado con coloraciones que van desde el negro hasta el rosa, siendo los más comunes los azules, rojos y morados. Estas tonalidades de colores se deben a las antocianinas (Salinas-Moreno *et al.*, 2013b), uno de los principales grupos de pigmentos vegetales visible al ojo humano (Kong *et al.*, 2003). Dentro de las razas de maíz pigmentado (azul/morado) descritas en el país, se encuentra las denominadas Chalqueño y Bolita, que tradicionalmente son de preferencia por los productores por su adaptación a las condiciones ambientales, facilidad para su procesamiento por las características de los alimentos que con ellos se preparan y por su uso forrajero (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2010).

La raza de maíz Chalqueño perteneciente a las razas del grupo Cónico, se distribuye en áreas sobre los 1800 msnm, donde se encuentran los Valles Altos del centro de México, donde se siembra en condiciones de humedad residual, con mazorcas de forma piramidal y de grano dentado de color cremoso. Existen variantes dentro de este tipo de maíz, así como variantes de otros colores de grano como azul, rojo, amarillo, y blanco (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004)

La raza Bolita se distribuye ampliamente desde los 1200 hasta los 2000 msnm; se caracteriza por sus plantas de porte bajo, resistencia a sequía y excelente calidad de grano; tiene mazorcas cortas provistas de buena cobertura, de tamaño mediano, granos de apariencia redonda y una amplia variedad de colores. Predomina en los Valles Centrales del Estado de Oaxaca, de donde se considera originaria y donde expresa su mayor diversidad (Aragón-Cuevas *et al.*, 2006).

2.1.3 Formas de consumo del maíz pigmentado en México

La dieta forma parte de la memoria colectiva de un pueblo, y no sólo comprende la ingesta de alimentos, sino también expresa relaciones socioeconómicas y hace patente actos de simbolismo cultural. En la época prehispánica, el maíz fue uno de los alimentos en la dieta de algunos antiguos pobladores y sus usos probables eran la producción de harinas, pinole y granos reventados con calor. La tortilla no era conocida al principio de esta época, sin embargo en la actualidad, la tortilla es considerada como el alimento base de la supervivencia del pueblo mexicano desde hace más de 3500 años (Fernández-Suárez *et al.*, 2013).

La preparación culinaria del alimento está correlaciona estrictamente con la raza del maíz. Por ejemplo, dentro de los maíces pigmentados, la raza Chalqueño se consume principalmente en forma de tortilla y la raza Bolita es idónea para elaborar la tortilla “tlayuda” y el “tejate” (Fernández-Suárez *et al.*, 2013). En general, los maíces pigmentados también se consumen como atole de masa cocida, atole de grano seco molido o harina de maíz tostado con azúcar, canela y miel. A este producto se le conoce como pinole, el cual se puede consumir sólo como dulce o mezclado con agua. Los productos obtenidos a base de maíz pigmentado, además de tener un color atractivo y un sabor diferente, poseen componentes bioactivos (Antonio *et al.*, 2004).

La base de al menos la mitad de las preparaciones culinarias es la nixtamalización del maíz, donde la cocción de grano en agua con cal es por mucho la operación culinaria y tecnológica más sofisticada de todas, que ha sido modernizada y adoptada por la industria de la masa y la tortilla (Fernández-Suárez *et al.*, 2013).

2.2 Características de los maíces pigmentados

2.2.1. Características físicas

Existe una gran diversidad de variedades de maíz pigmentado, las cuales corresponden a varias razas, cada una de las cuales puede comprender numerosas variantes diferenciadas en formas de mazorca, color y textura de grano. Los maíces pigmentados son harinosos, de textura suave, con un tamaño medio en comparación con los granos de tamaño grande de las razas Ancho y Cacahuacintle (60 a 70 g/100 semillas), o pequeño en las razas Palomero Toluqueño y Arrocillo (18 a 22 g/100 semillas; Cuadro 1). Algunos tipos de maíces pigmentados con endospermo harinoso tienen mayor contenido de antocianinas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012a).

Cuadro 1. Características físicas del grano de maíz pigmentado y blanco.

Tipo de Maíz	Peso de granos (g)	100 Peso hectolítrico (kg hL ⁻¹)	Índice de flotación (%)	de Textura
Azul	37	66.2	85-100	Suave
Blanco	43	68-3	50-60	Intermedia

Fuente: Vázquez-Carrillo *et al.* (2010) y Salinas-Moreno *et al.* (2012a).

El color del grano pigmentado se debe a que las antocianinas se localizan en las capas periféricas, ya sea en la aleurona, en el pericarpio o en las dos estructuras. En los granos azules el pigmento se localiza en la capa de aleurona, en tanto que en los granos rojos se localizan en el pericarpio o en ambas estructuras (Figura 1; Salinas-Moreno *et al.*, 2013).

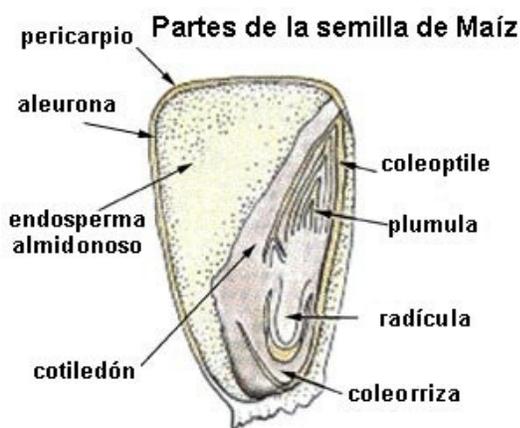


Figura 1. Partes de la semilla de maíz. Fuente: Rodríguez-Mendez (2013).

El tono de color depende del tipo de antocianinas que dominen en el grano; en los maíces azules y morados prevalecen los derivados de cianidina y en los rojos

predominan los de pelargonidina, así como también la cianidina. Las antocianinas son colorantes naturales para el consumo humano y poseen importantes actividades biológicas para la salud (Agama-Acevedo *et al.*, 2011).

2.2.3 Composición química del grano de maíz blanco y azul

Los tipos de maíces que se producen en México reportan una composición promedio del 8 % de proteínas y 80 % de hidratos de carbono (Castañeda-Sánchez, 2011). Los maíces pigmentados (azul/morado) presentan menor contenido de almidón y un índice glucémico inferior al maíz normal, estas características no afectan en la elaboración de la tortilla y su textura (Hernández-Uribe *et al.*, 2007). Es decir que, las tortillas elaboradas con maíces de pigmento azul representan un alimento propicio en la dieta. En el Cuadro 2 se muestra la composición proximal de maíces blancos y azules, así como sus respectivas tortillas.

Cuadro 2. Composición proximal en maíces y tortillas blancas y azules (% base seca).

Componente (%)	Maíz		Tortilla	
	Blanco	Azul	Blanca	Azul
Humedad	8.58 ± 0.31	8.29 ± 0.17	38.30 ± 0.34	34.74 ± 0.10
Cenizas	1.63 ± 0.01	1.52 ± 0.03	1.36 ± 0.03	1.60 ± 0.02
Lípidos	5.36 ± 0.04	4.91 ± 0.02	2.60 ± 0.05	4.47 ± 0.07
Proteínas	9.04 ± 0.23	9.04 ± 0.12	8.03 ± 0.10	9.56 ± 0.13
Almidón	78.50 ± 0.95	82.9 ± 0.86	74.90 ± 0.32	68.47 ± 0.10

Fuente: Hernández-Uribe *et al.* (2007) y Castañeda-Sánchez (2011).

El grano de maíz azul con endospermo harinoso posee mayor valor alimenticio, el contenido de minerales y proteína es superior que el de otras variedades y es fuente importante de carbohidratos (Antonio *et al.*, 2004).

2.3 Tortillas de maíz azul

El maíz (*Zea mays* L.) en forma de tortilla es uno de los principales componentes de la dieta del pueblo mexicano, seguido de otros productos derivados del maíz como atoles, pinoles, tostadas, tamales, sopes, botanas etc. Sólo en México se han identificado al menos 600 formas de preparar el maíz en la alimentación. La tortilla de maíz es uno de los alimentos más consumidos en México, por su bajo precio relativo y alto valor nutritivo, ya que por sí sola provee el 38% de las proteínas, el 45.2% de las calorías y el 49.1% del calcio en la dieta diaria (FAO, 1992). El consumo de tortillas elaboradas con maíz blanco y amarillos es muy usual. Sin embargo, existen regiones en donde se utiliza el maíz azul para la producción de tortillas. Las tortillas azules, a diferencia de las blancas, poseen una textura suave y un sabor más agradable, motivos por el cual, el gusto por estas tortillas se ha ido incrementado (Salinas *et al.*, 2003). El consumo diario *per cápita* de 155.4 g en las zonas urbanas y hasta 217.9 g en las zonas rurales (Fernández-Suárez *et al.*, 2013).

Las tortillas azules elaboradas a partir de maíces pigmentados se caracteriza por el contenido de fenoles solubles totales, antocianinas, y capacidad antioxidante presentes en el grano de maíz (Serna *et al.*, 2013), sin embargo, la transformación del maíz a tortilla afecta significativamente la cantidad y biodisponibilidad de estos compuestos, así como el tono de color natural de la tortilla (De la Parra *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2003).

Hernández-Uribe *et al.* (2007) menciona que las tortillas de maíces azules presentan menor contenido de almidón y un bajo índice glucémico que las tortillas de maíces blancos, haciendo de este producto un alimento de importancia nutrimental (Cuadro 2).

2.4 Antocianinas en maíces pigmentados

Las antocianinas en el grano de maíces de grano azul/morado, se localizan únicamente en la capa de aleurona. Estos compuestos pertenecen al grupo de los flavonoides, y su estructura básica es el ion flavilio, que consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una unidad de tres carbonos (Salinas-Moreno *et al.*, 2013).

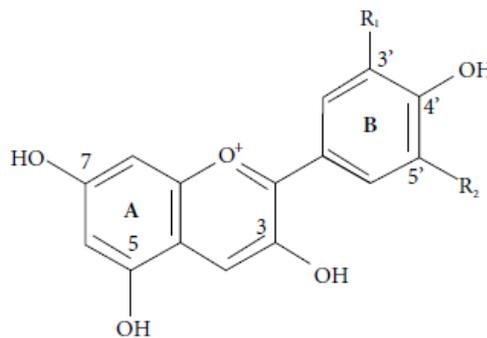


Figura 2. Estructura general de las antocianinas (Harborne, 1963; Kong *et al.*, 2003).

Las antocianinas encontradas en el maíz derivan principalmente de cianidina y pelargonidina; la primera es más frecuente en maíces de color azul/morado, en tanto que la segunda en maíces rojos (Salinas-Moreno *et al.*, 1999; Salinas-Moreno *et al.*, 2010).

La acumulación de antocianinas del grano de maíz pigmentado es afectada por las condiciones climáticas y de cultivo. Salinas-Moreno *et al.* (2012b), analizaron el contenido de antocianinas en tres razas de maíz azul/morado (Chalqueño, Elotes cónico y Bolita) provenientes de tres condiciones de cultivo diferentes. Los maíces de la raza

Chalqueño analizados, que se cultivan en el Distrito Federal, a altitudes de 2500 msnm, registraron un contenido de antocianinas promedio de 829 mg EC3G kg⁻¹ MS; en la raza Elotes cónicos del Estado de México, que se cultivan a altitudes similares se encontró un contenido promedio de 1204 mg EC3G kg⁻¹ MS, mientras que en los maíces de la raza Bolita, colectados en el estado de Oaxaca a altitudes de 1500 msnm, se encontró un contenido de antocianinas de 423 mg EC3G kg⁻¹ MS. Este último valor se encuentra dentro de lo informado por Del Pozo-Insfran *et al.* (2006); De la Parra *et al.* (2007); y Mora-Rochin *et al.* (2010), cuyos valores son 321, 369, 306 mg EC3G kg⁻¹ MS, respectivamente, sin embargo los autores no aclaran las condiciones bajo las cuales se cultivaron los maíces analizados.

La presencia de antocianinas en las variedades de maíz pigmentado las hacen un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por ello, el estudio de los pigmentos del maíz azul y morado, así como los productos derivados de éste, ha despertado un creciente interés (Cuevas-Montilla *et al.*, 2008).

2.4.1 Factores que alteran la estabilidad en las antocianinas

La incorporación de las antocianinas en los alimentos es limitada debido a que son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación durante el procesamiento y almacenamiento (Fossen *et al.*, 1998). Las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación. Su estabilidad es afectada por factores tales como el pH, temperatura de almacenamiento, estructura química, concentración, luz, oxígeno, solventes, presencia de algunas enzimas, flavonoides, proteínas y algunos iones metálicos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.4.1.1 Influencia del pH. Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes estructuras químicas dependiendo del pH de solución. El catión flavilio de las antocianinas es estable a pH muy ácido (0-1.5); es decir a un pH de 1, la estructura predominante es el catión flavilio (morado a rojo), a valores de pH (1.5-4), el catión flavilio pierde un protón hasta formar una base quinoidal (azul), la cual es una estructura inestable. Cuando el pH se encuentra entre 5 y 6 las especies predominantes son estructuras incoloras: pseudobase carbinol y chalcona, y a pH mayor a 7 las antocianinas se degradan, dependiendo de los grupos sustituyentes (Figura 3) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

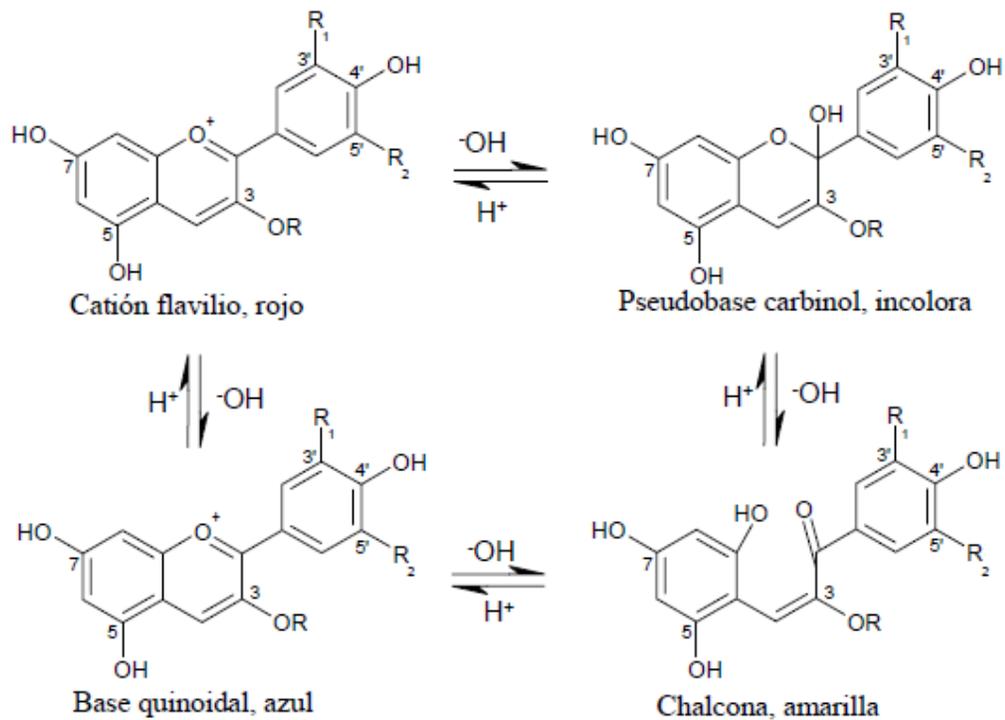


Figura 3. Estructura de las antocianinas en función del pH (Castañeda *et al.*, 2009).

En general, las antocianinas presentan mayor estabilidad con pH menor a 8, pues después de este valor se presentan cambios muy drásticos que se manifiestan en su color. A pH de 10.5, estos compuestos en solución adquieren tonalidades azulados y verdosos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.4.1.2 Efecto de la temperatura. Las antocianinas son destruidas por el calor durante el procesamiento y almacenamiento. Un incremento en la temperatura provoca un incremento logarítmico de su destrucción (Cuevas-Montilla *et al.*, 2008). Timberlake (1986) observó que el equilibrio entre las estructuras es endotérmico, en dirección de izquierda a derecha.

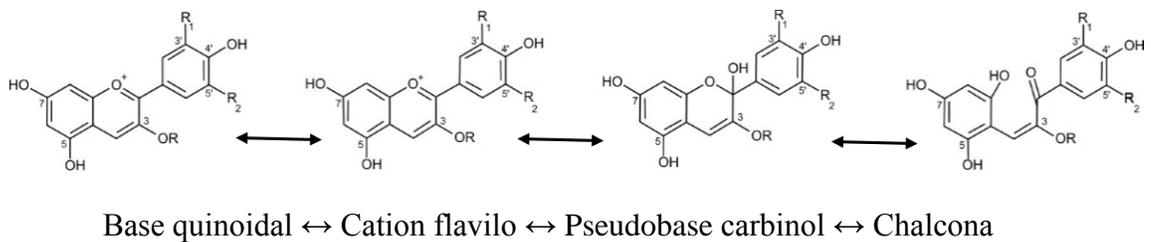


Figura 4. Estructura de la antocianina en función de la temperatura

(Cuevas-Montilla *et al.*, 2008).

2.4.2 Actividades biológicas de las antocianinas

El interés en los pigmentos antocianos se ha intensificado por su implicación en la salud humana, debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas, las cuales están relacionadas con sus propiedades antioxidantes (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011).

Las antocianinas son capaces de prevenir el daño oxidativo al ADN, proteínas, lípidos u otras moléculas causadas por especies de oxígeno reactivas (EROS). Estas especies reactivas son agentes oxidantes y/o fácilmente convertidas a radicales. Cuando un aumento del contenido intracelular de EROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la

célula se produce el estrés oxidativo, el cual induce daños a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Diversos estudios han demostrado que los extractos ricos en antocianinas pueden ayudar a combatir las especies reactivas del oxígeno (EROS) y la inhibición de la oxidación de lipoproteínas, las cuales están relacionadas con enfermedades cardiovasculares, así como también la supresión de células cancerígenas derivadas del cáncer de colon o cáncer gástrico (Kong *et al.*, 2003).

Las propiedades de estos compuestos como antioxidantes se deben a que son fácilmente oxidables (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Se caracterizan por ser donadores de electrones que evitan reacciones en cadena provocadas por los radicales libres. La actividad antioxidante de las antocianinas juega un papel importante en la prevención de padecimientos neuronales y cardiovasculares, cáncer y diabetes, entre muchas otras (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011). Investigaciones realizadas con extractos de *Vitis vinífera* ricos en antocianinas, han mostrado que disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar; también poseen efectos antiinflamatorios y actividad antiedema (Kong *et al.*, 2003). Además, tienen la propiedad de neutralizar las enzimas que destruyen el tejido conectivo y por su alto poder antioxidante previenen la oxidación del tejido conectivo dañado. Estas características biológicas catalogan a las antocianinas como agentes nutraceuticos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.5 La nixtamalización y su efecto sobre las antocianinas del grano de maíz pigmentado

Del náhuatl *nixtli* = cenizas, y *tamalli* = masa, la nixtamalización es un proceso antiguo desarrollado por las culturas Mesoamericanas y aún es utilizado para la elaboración de tortillas. Consiste en agregar una parte de maíz entero y dos partes de agua con 1 % de

cal. La mezcla se calienta a una temperatura entre 80-90 °C durante 20 a 45 minutos con alguna agitación, y finalmente se deja reposar durante 12 a 14 h (Paredes-López *et al.*, 2008). El proceso de nixtamalización tradicional involucra cambios químicos, estructurales y nutricionales en los diversos constituyentes del grano (Escalante-Aburto *et al.*, 2013).

Según Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) y De la Parra *et al.* (2007), cuando los maíces azules son nixtamalizados y transformados en tortilla, existen pérdidas entre 70 y 80 % del contenido de antocianinas. Estas pérdidas son atribuidas al efecto combinado de la cal y el procesamiento térmico durante la nixtamalización, así como pérdidas físicas del pericarpio y la lixiviación de compuestos fenólicos en el residuo de cocción. La pérdida de las antocianinas durante el proceso de nixtamalización, está relacionada con el tipo de maíz y variedad de color (López-Martínez *et al.*, 2011), así como también la localización del pigmento en el grano del maíz (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).

2.6 Alimentos funcionales

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Este patrón de comportamiento por los consumidores, ha generado una rápida expansión de los alimentos funcionales en el mercado (Mazza, 2002).

Los alimentos funcionales se definen como los productos alimenticios de origen vegetal o animal, consumidos en la dieta, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos. En ciertos casos, dichos componentes bioactivos han sido distribuidos comercialmente como productos nutraceuticos. Un producto nutraceutico es aquél que

pueda tener la consideración de alimento, o parte de él, capaz de proporcionar beneficios saludables, incluidos la prevención y el tratamiento de enfermedades. Entre los beneficios derivados de una alimentación nutracéutica están: reducción de colesterol, reducción de enfermedades como cardiovasculares, osteoporosis y cánceres (Alvírez-Morales *et al.*, 2002).

Ciertos alimentos funcionales son desarrollados a partir cereales como la avena y cebada por los altos niveles de beta-glucano, que contribuye a la reducción de la glucosa postprandial (posterior a la ingesta de alimentos) y el riesgo de cardiopatía coronaria (Steele *et al.*, 2013). Existen diversas investigaciones sobre extractos alimenticios ricos en antocianinas que han sido incorporados y desarrollados dentro de suplementos alimenticios dietéticos. Por ejemplo, extractos de antocianinas de maíz morado han sido incorporados como un suplemento dietético antioxidante; el arroz rojo también está siendo fermentado y comercializado como Cholestin para ayudar a reducir los niveles de colesterol, y el pan de trigo azul puede ser procesado para producir un polvo rico en antocianinas como suplemento dietético (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado que la glucosa en la sangre y las respuestas de insulina se ven afectadas por la composición del alimento. Los alimentos que contienen carbohidratos pueden ser catalogados con índice glucémico alto si su valor es superior a 70, medio con valores entre 56 y 59, y bajo para valores inferiores a 55 (Jenkins *et al.*, 1981; Nayak *et al.*, 2014). El índice glucémico (IG) es un indicador numérico que determina cómo la ingesta de alimentos específicos eleva la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo y cuál es su respuesta en la producción de insulina. Uno de los factores que determinan la elevación del índice glucémico, es el tipo característico de

carbohidratos que cada alimento tiene y que puede ser de rápida o lenta digestión. Uno de los componentes alimenticios en los carbohidratos, es la fibra dietética, que está relacionada con la reducción de la glucosa en la sangre y el contenido de insulina en el cuerpo humano (Charalampopoulos *et al.*, 2002).

Una reducción de la tasa de digestión y la absorción de carbohidratos por medio de una dieta con alimentos bajos en índice glucémico, puede prevenir varias enfermedades crónico degenerativas, tales como la obesidad, la diabetes tipo 2, enfermedad cardíaca coronaria y varias formas de cáncer (Nayak *et al.*, 2014).

2.7 Vida de anaquel de productos

Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, varios cambios químicos ocurren que involucran los componentes internos de los alimentos y los factores ambientales externos. Estos cambios pueden causar deterioro y reducir la vida útil del alimento. La vida útil de un alimento puede ser definido como el período que mantendrá un nivel aceptable de calidad de consumo, a partir de una seguridad y el punto de vista sensorial. El estudio de la conservación de los alimentos no es probable que produzca resultados claros, sobre todo porque los alimentos son diversos, complejos e involucran reacciones simultáneas, enzimáticas y físico químicas que se llevan a cabo al mismo tiempo en un determinado alimento. Sin embargo, la aplicación de un modelo científico podría estimar el periodo que mantendrá un nivel aceptable de calidad de consumo, y factores como: formulación, procesamiento, empaque y condiciones de almacenamiento podrían ser críticos en este proceso (Singh y Cadwallader, 2002).

Tratamientos como bajas temperaturas, altas concentraciones de CO₂, atmósferas controlada (AC) y modificadas (AM) implican desaceleración de la velocidad de

muchos procesos metabólicos que conduce a un deterioro natural y pérdida de calidad. Sin embargo, algunos de estos tratamientos afectan negativamente al contenido de antocianinas, con consecuencia en el color y el valor nutritivo (De Pascual-Teresa *et al.*, 2008).

En trabajos anteriores se ha investigado el efecto del almacenamiento en refrigeración de productos con colorante tipo antociano, en los que mencionan la posible estabilidad de las antocianinas totales, debido a la estructura de la aglicona y tipo de azúcar conjugado, así como también, la exposición del producto a bajas tasas de oxígeno y atmósferas de nitrógeno durante el almacenamiento conlleva a una menor degradación de estos compuestos (Howard *et al.*, 2012). Según lo reportado por Fossen *et al.* (1998), las cianidina 3-glucósido muestra una alta estabilidad en pH bajo (3.1) a una temperatura de 10 °C después de 15 días de almacenamiento e indica que en alimentos con pH alcalino como productos de panaderías, el tiempo de almacenamiento debe ser limitado.

Alimentos como las tortillas de maíz, debido a su alto contenido de humedad de 42 a 50 % y su actividad acuosa (0.94 a 0,98) hacen que el producto sea susceptible a daños por microbios (Martínez-Flores *et al.*, 2004; Adolphson *et al.*, 2013), por lo que la refrigeración es un método alternativo de conservar las tortillas por varios días, a fin de prevenir daños bacteriológicos. Existe poca información con respecto al uso de atmosferas modificadas para extender la vida útil de las tortillas de maíz, por lo que la aplicación de este tipo de tecnología podría ser una alternativa para conservar del producto.

**IV. MEJORAMIENTO DEL MÉTODO DE NIXTAMALIZACIÓN PARA
ELABORAR TORTILLAS A PARTIR DE MAÍZ DE GRANO AZUL**

MEJORAMIENTO DEL MÉTODO DE NIXTAMALIZACIÓN PARA ELABORAR TORTILLAS A PARTIR DE MAÍZ DE GRANO AZUL

IMPROVEMENT OF THE NIXTAMALIZATION METHOD TO ELABORATE TORTILLAS FROM CORN OF BLUE GRAIN

Cañarejo-Antamba, M., Y. Salinas-Moreno., S. Valle-Guadarrama., E. Aguirre-Mandujano

RESUMEN

El maíz de grano azul contiene elevada cantidad de antocianinas, que se pierden en proporción importante, al ser transformado en tortillas, por el pH alcalino del proceso. El objetivo del trabajo fue desarrollar una tortilla nutracéutica con alto contenido de antocianinas, a través de la optimización del método de nixtamalización. Se usó maíz azul raza Chalqueño y se comparó la nixtamalización tradicional (TT) con un manejo con reposo en medio ácido (pH 5.1) (TA), un tratamiento con reposo ácido (pH 5.1) y molienda alcalina (pH 7.1) (TAM) y un manejo con reposo ácido (pH 5.1), molienda ácida (pH 5.1) y amasado alcalino (pH 7.1) (TAA). La condición ácida se logró agregando ácido fumárico al 1.2 % y el posterior incremento del pH con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 2 %. Con TA se incrementó el contenido de antocianinas (AT) y de fenoles solubles totales (FST), pero las tortillas tuvieron tonalidad rojiza no característica. Con TAM y TAA se incrementó AT a valores entre 343 y 350 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG) kg^{-1} de materia seca (MS), FST al rango entre 1054 y 1083 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) kg^{-1} MS) y AA fue también mayor (17 a 18 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} MS), en comparación con el proceso tradicional (218 mg ECG kg^{-1} , 674 mg EAG kg^{-1} y 10.5 μmol ET g^{-1} , respectivamente), con similares atributos de color.

Palabras clave: nixtamalización, antocianinas, fenoles, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The corn of blue grain has an elevated content of anthocyanins, which are lost in a great amount, during its processing into tortillas, due to the alkaline pH used. The objective was to develop a nutraceutical tortilla with high content of anthocyanins, through the optimization of the nixtamalization method. Corn of the race Chalqueño was used, and traditional nixtamalization (TT) was compared with a treatment with resting in acidic medium (pH 5.1) (TA), a treatment with acid resting (pH 5.1) and alkaline milling (pH 7.1) (TAM) and a management with acid resting (pH 5.1), acid milling (pH 5.1) and alkaline mashing (pH 7.1) (TAA). The acid condition was achieved through adding 1.2 % fumaric acid, and the subsequent increase in pH with 2 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$. With TA the content of anthocyanins (AC) and that of total soluble phenols (TSP) resulted increased, but tortillas had a reddish non characteristic hue. In contrast, with TAM and TAA the AC increased to values between 343 and 350 mg equivalent of cyanidin-3-glucoside (CGE) kg^{-1} dry matter (DM), TSP to the range between 1054 and 1083 mg gallic acid equivalents (GAE) kg^{-1} DM), and AA was also higher (17 to 18 μmol Trolox equivalent (TE) g^{-1} DM), compared with the traditional process (218 mg CGE kg^{-1} , 674 mg GAE kg^{-1} , and 10.5 μmol TE g^{-1} , respectively), with similar color attributes.

Key words: nixtamalization, anthocyanins, phenols, antioxidant activity.

1 Introducción

Los cereales, además de ser la principal fuente de calorías en la dieta, concentran en sus capas periféricas compuestos fenólicos (Dykes y Rooney, 2007) con actividades biológicas distintas. Los procesos de transformación a los que son sometidos para obtener productos finales de consumo, provocan la pérdida de gran cantidad de sus fenoles, lo que se ha cuantificado entre 50-100 % (Salinas-Moreno *et al.*, 2003; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; De la Parra *et al.*, 2007). Actualmente hay una búsqueda de alimentos que no sólo realicen un aporte nutrimental, sino que contribuyan a la prevención de enfermedades como aquéllas de tipo cardiovascular, diabetes y cáncer (Mazza, 2002; Alvidrez-Morales *et al.*, 2002). El interés de la industria de alimentos sobre las antocianinas además de ser utilizados como colorantes naturales, puede ser considerado como ingrediente funcional por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías (De Pascual-Teresa *et al.*, 2008). El papel de las antocianinas como agentes colorantes de alimentos viene a ser relevante, ya que imparten color a muchas frutas y hortalizas y a varios productos alimenticios que lo poseen (Kong *et al.*, 2003). El uso de estos pigmentos solubles en agua es también aumentado por su potencial beneficio a la salud (Bridle y Timberlake, 1996). Sin embargo, varios factores limitan sus posibilidades, debido a que su color es fácilmente afectado por un número de reacciones que se producen durante el procesamiento de los alimentos. Las antocianinas son muy estables en pH ácido (pH=1) y moderadamente estables en pH de entre 2 y 5. Incrementos en los valores del pH a valores entre 5-12 reducen esta estabilidad, ya que modifican su estructura química y con ello su color (Brouillard, 1982).

Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas dependiendo el pH de solución. A pH menor a 2 su forma principal es el catión flavilio (color rojo), a

valores de pH entre 2 y 4 su forma es la base quinoidal (color azul) y a valores de pH entre 5 y 6 se presentan dos formas incoloras: pseudo carbinol y chalcona (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009), en tanto que con pH alcalino el color que prevalece es azul/morado (Brouillard, 1982). En el grano de maíz azul/morado, las antocianinas se localizan en la aleurona, que se ubica por debajo del pericarpio del grano (Salinas-Moreno *et al.*, 1999). El pH alcalino del agua de cocimiento durante el proceso de nixtamalización solubiliza parcial o completamente esta estructura (De la Parra *et al.*, 2007), de tal manera que el pH alcalino del agua ingresa hasta la capa de aleurona y degrada gran parte de las antocianinas presentes en esta estructura (Salinas-Moreno *et al.*, 2003), pues estos compuestos son inestables a tales condiciones (Brouillard, 1982).

Aunque varios estudios han informado procesos alternativos a la nixtamalización tradicional, como la nixtamalización por extrusión y la nixtamalización fraccionada (Cortéz-Gómez *et al.*, 2006 y Mora-Rochin *et al.*, 2010) las pérdidas de antocianinas reportadas con estos métodos no difieren mayormente. Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) propusieron realizar el reposo del grano nixtamalizado en medio ácido (pH=5.2) como una manera para reducir las pérdidas de antocianinas. Esta modificación al proceso tradicional condujo a una pérdida de antocianinas de sólo 17 % en maíces azules. Sin embargo, los estudios no han reportado cómo obtener una tortilla azul con características de calidad en color y textura similares a la tortilla azul tradicional, pero con mayor contenido de antocianinas. En base a estas consideraciones, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicación de un método de nixtamalización con reposo en medio ácido y restitución del pH alcalino de la masa para obtener una tortilla azul de alto contenido de antocianinas con atributos de color y textura característicos.

2 Materiales y métodos

2.1 Material de estudio

Se utilizó una población de maíz de grano azul/morado de la raza Chalqueño, proveniente de la Delegación Xochimilco del Distrito Federal, México (19° 15' N, 99° 05' O).

2.2 Sitio de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Calidad de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Km. 13.5 de la Carretera los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México.

2.3 Organización experimental

2.3.1 Nixtamalización de muestras

Se utilizaron lotes de 1 kg de maíz limpio de la raza Chalqueño, que se nixtamalizaron con óxido de calcio en concentración de 0.7 % y tiempo de cocción de 25 min. El tiempo de cocción se determinó con base en el índice de flotación, según el criterio descrito por Salinas y Vázquez (2006). El grano nixtamalizado se reposó durante 12 h a temperatura ambiente. Al final de esta fase el nixtamal se enjuagó con agua corriente para eliminar el exceso de cal y residuos del pericarpio solubilizado para proceder a su molienda en equipo de piedras (Weg MSL1J, México). Este procedimiento se realizó con particularidades asignadas a los tratamientos descritos en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Descripción de tratamientos de nixtamalización y acondicionamiento de masa aplicados en el maíz azul/morado.

Tratamientos de nixtamalización	Descripción
TT	Tratamiento testigo. Proceso de nixtamalización, reposo, molienda y acondicionamiento de la masa realizado en forma tradicional.
TA	Tratamiento con reposo en medio ácido. La fase de reposo fue en medio ácido (pH=5.1), agregando ácido fumárico al 1.2 % con relación al peso del grano (3 g/250 g de grano nixtamalizado). La molienda y acondicionamiento de masa fueron de manera tradicional.
TAM	Tratamiento con reposo ácido y molienda alcalina. La fase de reposo fue en medio ácido (pH=5.1), agregando ácido fumárico al 1.2 % con relación al peso del grano (3 g/250 g de grano nixtamalizado). Durante la molienda, se agregaron 10 mL de una solución de óxido de calcio al 2 % (p/v). Finalmente se aplicó amasado tradicional.
TAA	Tratamiento con reposo ácido, molienda ácida y amasado alcalino. La fase de reposo fue en medio ácido, agregando ácido fumárico al 1.2 % con relación al peso del grano (3 g/250 g de grano nixtamalizado). El grano se molió sin aditivos y después, durante al amasado, se agregaron 7 mL de una solución de óxido de calcio al 2 % (p/v).

2.3.2 Elaboración de tortillas

Se elaboraron 10 tortillas de cada tratamiento (TT, TA, TAM y TAA) a partir de porciones de 20 g de masa. El laminado de las tortillas se realizó con una prensa manual,

para obtener discos de 11 cm de diámetro con espesor de 2 mm, que se cocieron en una placa metálica a una temperatura entre 250 y 270 °C. El cocimiento se realizó durante 10 s por una de las caras, se volteó para cocer la otra cara durante 15 s, nuevamente un volteo a la primera cara para lograr la formación de la ampolla. De cada tratamiento se tomaron cinco tortillas para determinar color y humedad. Las tortillas restantes de cada tratamiento se deshidrataron a 45 °C durante 24 h, posteriormente se molieron en un molino tipo ciclónico IKA (MF 10 Basic, IKA Laboratory equipment, USA) con malla de 0.5 mm. La harina se almacenó en sobres de papel manila que se colocaron en un desecador para su análisis inmediato de compuestos fenólicos (antocianinas totales, fenoles solubles totales y actividad antioxidante).

2.4 Variables respuesta

2.4.1 Medición de pH en nejayote y masa

Se ajustó la humedad de la masa (H^m) a 14 % mediante la Ecuación (1):

$$\frac{860}{100 - \% H^m} \quad (1)$$

Después, se utilizaron muestras de 1 g de masa disuelta en 10 mL de agua destilada, se aplicó agitación durante 15 min y posterior reposo por 10 min. Al final se tomó la lectura del pH con un potenciómetro Denver Instrument UB10 (USA), calibrado con buffer de pH 4 y 7. Para nejayote se tomó la lectura directamente con el potenciómetro.

2.4.2 Humedad en nixtamal, masa y tortilla

Se determinó la humedad en nixtamal, masa y tortilla según el método AACC (2000) con adaptaciones. Se pesaron muestras de 2 g de grano nixtamalizado, de masa y de

tortilla en una caja de aluminio a peso constante y se colocó en una estufa durante 1 h a 130 °C. Transcurrido ese tiempo se sacó la caja y se dejó enfriar en desecador. Por último, se procedió a determinar el peso de la caja con la muestra seca. El contenido de humedad se realizaron de acuerdo a la Ecuación (2), donde H es humedad (%), $PCMH$ es peso de la caja más muestra húmeda (g), $PCMS$ es peso de la caja más muestra seca (g) y PM es peso de la muestra (g) (Salinas y Vázquez, 2006).

$$\% H = \left(\frac{PCMH - PCMS}{PM} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.4.3 Color en masa y tortilla

Para la medición de color, se utilizó un colorímetro Hunter Lab (Mini Scan XE Plus 45/0-L) en escala CieLab (L^* , a^* , b^*). Con los valores de a^* y b^* se calcularon los parámetros de ángulo de tono (*Hue*; h^*) y saturación del color (*Croma*; C^*) con base en las Ecuaciones (3) y (4), en tanto que el valor de L^* se tomó como luminosidad (McGuire, 1992).

$$h^* = \text{Tan}^{-1}(b^* / a^*) \quad (3)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

2.4.4 Variables de composición fenólica en las tortillas

2.4.4.1 Obtención de los extractos fenólicos. Se pesó 1.0 g de muestra de harina de tortilla en un matraz Erlenmeyer a la cual se agregaron 20 mL de disolvente (metanol acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich Chemicals). Se aplicó agitación y se cubrió la boquilla del matraz con Parafilm. La muestra fue

sometida a otra agitación en un baño sonicador (Brason 2510) durante 15 min. Posteriormente, se aplicó refrigeración durante 1 h con 45 min, para completar 2 h de extracción. Una vez concluido el tiempo de extracción se decantó el sobrenadante del matraz, se centrifugó durante 15 min a 2862 x g, se filtró con papel Whatman No 4 y se aforó a 20 mL con el disolvente de extracción. Finalmente, los extractos se guardaron en congelación para la cuantificación de antocianinas y fenoles solubles totales (Abdel-Aal *et al.*, 1999, con adaptación de Salinas *et al.*, 2005).

2.4.4.2 Cuantificación de antocianinas. Al extracto de antocianinas obtenido en el punto anterior se le determinó absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis), a dos longitudes de onda, 530 y 700 nm. Ésta última se utilizó para corregir la lectura de la muestra por presencia de turbidez. La calibración del equipo se realizó con el mismo disolvente de extracción. Para los cálculos de la concentración de antocianinas se elaboró una curva patrón con cianidina-3-glucósido (Polyphenols, NW). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido /kilogramos de materia seca (mg ECG kg⁻¹ de MS).

2.4.4.3 Cuantificación de fenoles solubles totales (FST). La cuantificación de FST se realizó mediante el método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton y Rossi (1965) Se tomaron 100 µL del extracto obtenido para cuantificar antocianinas, se añadieron 125 µL del reactivo Folin Ciocalteu 1 N, se aplicó agitación y se dejó reaccionar durante 6 min. Posteriormente se agregaron 1250 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 19 % (p/v) y se aforó a 3 mL con agua destilada. En seguida se agitó en un equipo vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 90 min. Después se aplicó centrifugación a 34622 x g durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis)

a una longitud de onda de 760 nm. Se elaboró una curva patrón a partir de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60 y 100 ppm. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por kg de muestra seca (mg EAG 100 g⁻¹ de MS).

2.4.5 Actividad antioxidante

2.4.5.1 Método ABTS. Se realizó de acuerdo al criterio descrito por Re *et al.* (1999). Se preparó una solución de 7 mM de ABTS en agua destilada a la que se llamó solución A, y otra de persulfato de potasio 2.45 mM a la que se llamó solución B. Posteriormente, se mezclaron en proporción 1:0.5 (solución A: solución B). La mezcla se dejó reposar durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente para permitir la generación de radical libre, a la cual se llamó solución stock, que fue diluida en una solución buffer de fosfatos 75 mM (PBS; pH=7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm, a la que se denominó solución de trabajo.

Para obtener la capacidad antioxidante de los extractos se tomaron 200 µL y se colocaron en la celda de cuarzo. Después se agregaron 2800 µL de la solución de trabajo, agitándose vigorosamente. Se midió la absorbancia cada minuto durante el desarrollo de la reacción hasta los 6 min, y posteriormente cada 5 min hasta completar 30 min. El porcentaje de reducción se calculó con la Ecuación (5), donde $ABTS_{blanco}$ = Absorbancia del blanco (200 µL de BPS y 2800 µL de la solución de trabajo a 734 nm).y $Abs_{muestra\ t}$ = valor de la absorbancia de la muestra al tiempo t . Se elaboró una curva patrón con Trolox. Los resultados se expresaron en micromoles Equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca (µmoles ET g⁻¹ de MS).

$$\% ABTS_{reducido} = \left(\frac{ABTS_{blanco} - ABTS_{muestra,t}}{ABTS_{blanco}} \right) \times 100 \quad (5)$$

2.5 Análisis estadístico de los datos

El experimento se condujo de acuerdo a un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (TT, TA, TAM, TAA). Se aplicó un análisis de varianza y rutinas de comparación de medias de tratamientos (Tukey, 0.05), lo cual se realizó con apoyo del programa SAS (SAS Institute Inc., 2005).

3 Resultados y discusión

3.1 Condiciones de pH en nixtamalización, reposo, molienda y amasado

El pH se modificó entre las distintas etapas, de forma que los tratamientos TT, TA, TAM y TAA se basaron en el manejo mostrado en la Figura 5.

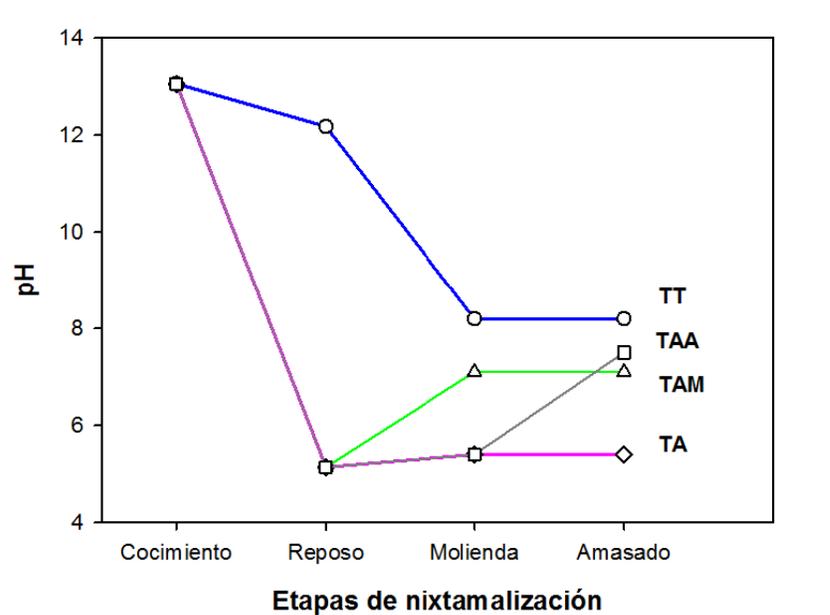


Figura 5. Variación del pH en los tratamientos TT, TA, TAM y TAA para la nixtamalización de maíz azul y elaboración de tortilla

Derivado de este manejo, la masa obtenida en los tratamientos TT, TA, TAM y TAA fue de 8.19, 5.96, 7.06 y 7.46, respectivamente, con diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre ellos (diferencia significativa honesta, DSH, igual a 0.025; Cuadro 4). El valor de pH del tratamiento TT fue resultado de las condiciones de pH alcalino que prevalecen en la nixtamalización tradicional (pH=13.1), en tanto que los valores de pH en los tratamientos TAM, TAA fueron consecuencia de la adición de solución de óxido de calcio al 2 % durante la molienda o acondicionado de la masa. Trabajos de Bello-Pérez *et al.* (2002) y Flores-Farías *et al.* (2002) reportan valores de pH en harinas nixtamalizadas entre 6.5 y 7.3, en tanto que en el presente trabajo fue de 7.2. Por otro lado, se aceptó que el pH de las tortillas elaboradas para cada tratamiento tuvo valores similares a los mencionados.

3.2 Humedad de nixtamal, masa y tortilla

La humedad del nixtamal varió entre 34.8 y 38.1 %, con mayor valor en el tratamiento testigo. Estos valores estuvieron dentro del rango de variación establecido por la norma NMX-034 (2002b), aunque fueron menores a los reportados por Bedolla y Rooney (1982), quienes concluyeron que la masa resultante de un nixtamal con humedad entre 48 y 50 % tiene una textura óptima para su procesamiento mecánico.

La humedad en masa fue de 56.99, 57.13, 58.36 y 56.88 % para los tratamientos TT, TA, TAM y TAA, respectivamente, siendo el valor de TAM significativamente distinto ($P \leq 0.05$) al de los otros tres (Cuadro 4; DSH = 0.252 %), lo que puede sugerir que la variación del pH antes de la molienda hacia una condición menos ácida puede ayudar a retener mayor humedad en la masa. De acuerdo por Arámbula-Villa *et al.* (2000), en una masa de maíz de buena calidad para elaboración de tortillas, la humedad debe oscilar

entre 50 y 58 %, rango en el cual están comprendidos los valores de los tratamientos evaluados. Sin embargo, la estructura de variación de la humedad de masa no se reflejó en la humedad de la tortilla, ya que los valores en este caso fueron de 40.36, 36.92, 35.12 y 39.92 %, para el mismo orden de tratamientos, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos (Cuadro 4, DSH = 7.58 %). No obstante, los resultados obtenidos estuvieron dentro de la variación entre 37.7 y 46.0 % reportada por varios autores (Antuna-Grijalva *et al.*, 2008; Salinas-Moreno *et al.*, 2010b). Una menor humedad en la tortilla podría afectar la textura, es decir, que tendrían mayor dureza.

Cuadro 4. Análisis de varianza de parámetros de pH en masa, y color, humedad y composición fenólica en masa y tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño

Variable	Objeto	gl	F _{calc}	R ²	C.V.
pH	Masa	3	46579.9*	0.999	0.085
Humedad	Masa	3	248.4*	0.995	0.108
	Tortilla	3	2.1 ns	0.436	7.636
Luminosidad (L*)	Masa	3	235.44 *	0.972	1.058
	Tortilla	3	78.78 *	0.922	1.790
Ángulo de tono (H*)	Masa	3	69.26 *	0.912	7.671
	Tortilla	3	13215 *	0.999	0.701
Cromaticidad (C*)	Masa	3	193.06 *	0.967	2.294
	Tortilla	3	361.55 *	0.982	5.244
FST	Tortilla	3	126.50 *	0.990	2.530
AT	Tortilla	3	400.30 *	0.997	1.549
AA	Tortilla	3	26.67 *	0.970	5.631

gl: grados de libertad; F_{calc}: valor de F calculado; R²: coeficiente de determinación del ajuste con el modelo lineal estadístico; C.V.: coeficiente de variación (%); FST: contenido de fenoles solubles totales; AT: contenido de antocianinas totales; AA: actividad antioxidante; *: efecto significativo de tratamientos a ($P \leq 0.05$); ns: efecto no significativo de tratamientos a ($P \leq 0.05$).

3.3 Color de masa y tortilla

El análisis estadístico mostró que hubo significancia entre el efecto causado por los distintos tratamientos (TT, TA, TAM y TAA) sobre los tres atributos de color, luminosidad, ángulo de tono o hue y cromaticidad o croma (Cuadro 5). En cuanto a la luminosidad (L*), que indica brillantez de color, presentó un mayor valor en el tratamiento ácido (TA), mientras que los tratamientos TAM y TAA causaron valores iguales ($P>0.05$) y mayores a los obtenidos con el tratamiento TT.

Cuadro 5. Color en masa y tortilla de maíz Chalqueño con grano azul/morado.

Tratam.	Masa			Tortilla		
	L*	H*	C*	L*	h*	C*
TT	50.10 c ² (± 0.4)	201.97 b (± 1.2)	5.30 a (± 0.1)	42.88 c (±0.7)	192.95 c (± 1.4)	2.77 b (± 0.1)
TA	58.87 a (± 0.6)	326.77 a (± 2.1)	5.47 a (± 0.1)	50.23 a (± 0.2)	352.63 a (± 0.8)	4.42 a (± 0.3)
TAM	53.80 b (± 0.9)	208.60 b (± 35.9)	4.88 b (± 0.2)	46.53 b (± 0.5)	212.88 b (± 2.4)	2.30 c (± 0.1)
TAA	54.22 b (± 0.2)	202.97 b (± 1.7)	4.03 c (± 0.1)	46.05 b (± 0.9)	189.00 d (± 1.6)	1.77 d (± 0.1)
DSH ¹	0.927	29.13	0.183	1.343	2.682	0.238

*: L= luminosidad (%); h=hue o ángulo de tono (°); C=croma o índice de saturación de color¹DSH: Diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). ²Letras diferentes indican diferencia significativa entre valores de una misma columna. Los valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar.

El ángulo de tono (Hue), mostró el valor más alto en el tratamiento TA y fue estadísticamente diferente ($P\leq 0.05$) al resto de tratamientos (Cuadro 5). De acuerdo con

el valor de esta variable en el TA ($326.8 \pm 1.2^\circ$), el tono de color fue rojizo, en tanto que en el resto de tratamientos los valores mostrados correspondieron a un tono verde azulado. La cromaticidad o croma, que es un parámetro que mide el nivel de saturación de un color, en donde valores elevados son colores puros y valores bajos son colores mate o de menor pureza, mostró valores más altos en los tratamientos TT y TA y éstos fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$), en tanto que los tratamientos TAM y TAA causaron valores bajos y fueron diferentes entre sí (Cuadro 5). La incorporación de la solución alcalina durante la molienda o acondicionamiento de la masa (TAM, TAA), permitió que su color fuera similar al de la masa del TT.

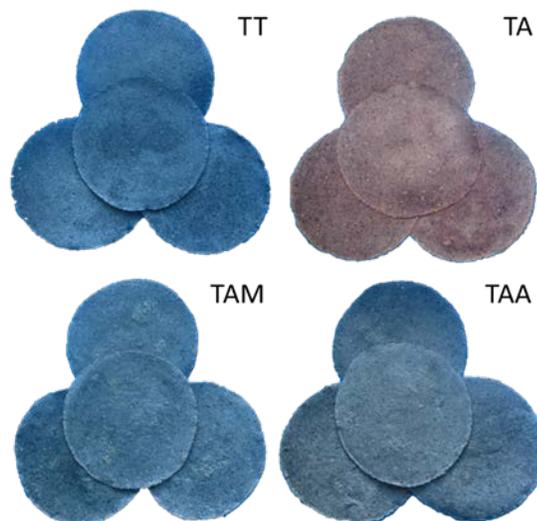


Figura 6. Fotografías digitales de las tortillas de maíz azul/morado raza Chalqueño obtenidas con diferentes tratamientos de nixtamalización y acondicionamiento de masa.

En tortillas, la mayor luminosidad (L^*) se presentó en las del tratamiento TA y éstas fueron estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) a las de las tortillas de los demás tratamientos

(Cuadro 5). Lo mismo ocurrió con los valores de ángulo de tono o Hue y croma de las tortillas del tratamiento TA, que fueron diferentes a los de los tratamientos TT, TAM y TAA ($P \leq 0.05$). En la Figura 6 se puede observar a las tortillas de los cuatro tratamientos; en la cual se aprecia el color rojizo-morado en aquéllas obtenidas con el tratamiento TA. El parámetro Hue, que corresponde al tono de color y a través del cual se puede distinguir entre rojo (0 y 360°), amarillo (90°), verde (180°) y azul (270°), es de las variables de color que mayor asociación tiene con la apreciación visual (Jha, 2010). En las tortillas del tratamiento TA se pudo apreciar un tono rojizo, acorde con su valor de Hue ($352.6 \pm 0.8^\circ$), en tanto que las tortillas de los tratamientos TT, TAM y TAA fueron de un tono verde azulado correspondientes a valores cercanos a 200° . La Figura 7 muestra el plano de Hue, en el que se han colocado los tratamientos en reposo medio ácido (TA, TAM, TAA) y alcalino (TT).

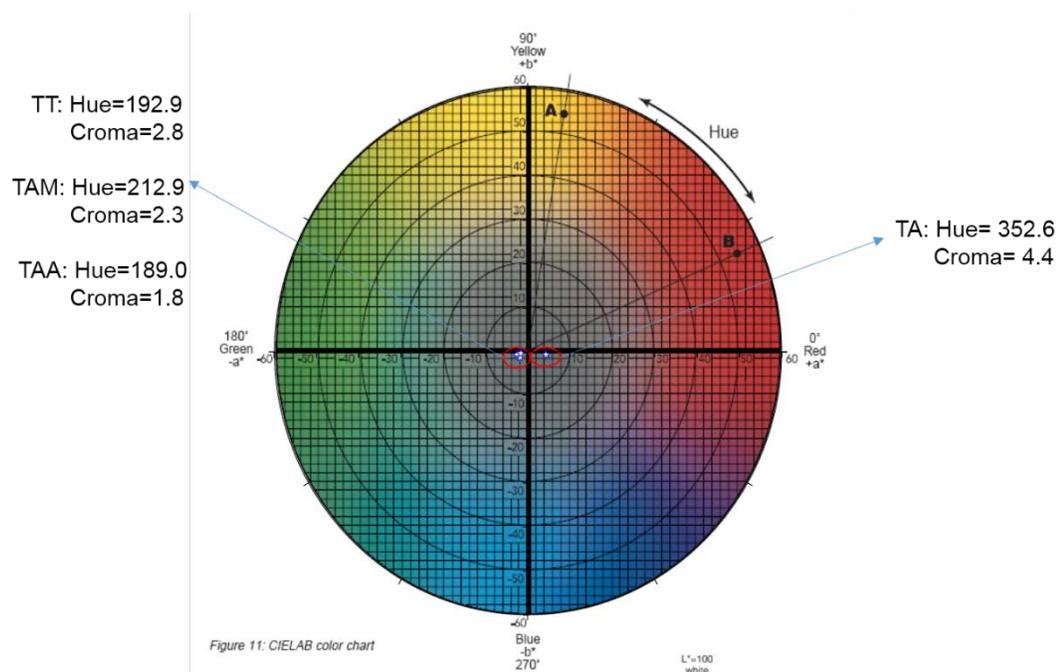


Figura 7. Representación gráfica de los parámetros Hue y Croma de las tortillas obtenidas con diferentes tratamientos de nixtamalización y acondicionado de masa.

Los valores obtenidos en las tortillas del tratamiento ácido (TA) fueron similares a lo informado por Del Pozo-Insfran *et al.* (2007), quienes reportan en tortillas de maíz azul, cuyo nixtamal se reposó en medio ácido, valores de Hue entre 338.9° y 345.5°, mientras que para croma los valores oscilan entre 7.6 y 8.8.

Las antocianinas son compuestos cuya estructura química se modifica por efecto del pH y con ello su color. A pH ácido el color característico es rojo, en tanto que a pH alcalino el color que prevalece es azul/morado (Brouillard, 1982). Este comportamiento característico de las antocianinas es el que se observó en los tratamientos de nixtamalización con reposo alcalino y ácido.

3.4 Composición fenólica en tortilla

La aplicación de tratamientos con distinto manejo del pH causó significancia en el efecto diferencial de los tratamientos aplicados (Cuadro 4). El mayor contenido de antocianinas totales (AT) correspondió a las tortillas del tratamiento TA y fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al resto. Las tortillas de los tratamientos TAM y TAA no presentaron diferencias; sin embargo, sus valores de AT fueron superiores a las del tratamiento TT, que presentaron los valores más bajos. En cuanto a los fenoles solubles totales (FST), las tortillas de los tratamientos TA, TAM, y TAA, cuyo nixtamal se reposó en pH ácido, presentaron valores mayores ($P \leq 0.05$) que las del tratamiento TT (Cuadro 6).

El reposo del nixtamal en medio ácido redujo la pérdida de antocianinas, pues el contenido de estos compuestos en las tortillas de los distintos tratamientos (TA, TAM y TAA) fue entre 57.4 y 72.2 % mayor en relación a las del tratamiento testigo TT. Los FST, dentro de los cuales se hallan las antocianinas, mostraron un patrón similar. En este caso, el contenido fue entre 54.7 y 60.7 % superior en las tortillas obtenidas de nixtamal

con reposo en medio ácido. El mayor contenido de antocianinas en los tratamientos TA, TAM y TAA se debió al pH ácido durante el reposo, condición que favorece la estabilidad de las antocianinas (Fossen *et al.*, 1998).

El alto contenido de FST en las tortillas de los tratamientos ácidos, se presume debido a la aplicación del tratamiento alcalino-ácido, al cual fue sometido el grano de maíz. La hidrólisis alcalina que sufren las diferentes estructuras del grano durante el cocimiento en medio alcalino, induce la liberación de la mayoría de los compuestos fenólicos esterificados a la hemicelulosa del pericarpio (González *et al.*, 2004). El tratamiento ácido podría aumentar esta hidrólisis (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006) y favorecer una mayor liberación de ácidos fenólicos, especialmente el ácido ferúlico (Saha, 2003).

Cuadro 6. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas de maíz azul/morado preparadas con distintos manejos de pH.

Tratamientos	Antocianinas (mg ECG kg⁻¹ de MS)	Fenoles Solubles Totales (mg EAG kg⁻¹ de MS)
TT	217.9 ± 3.4c ²	674.0 ± 11.7 b
TA	375.3 ± 5.3 a	1042.9 ± 17.9 a
TAM	343.0 ± 5.5 b	1054.4 ± 43.6 a
TAA	350.0 ± 5.5 b	1083.4 ± 4.1 a
DHS ¹	20.28	99.25

¹DSH: Diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). ²Letras diferentes indican diferencia significativa entre valores de una misma columna. Los valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar.

El contenido de antocianinas totales (AT) en las tortillas de maíz de grano azul/morado del tratamiento testigo TT, fue considerablemente mayor a lo informado por De la Parra *et al.* (2007), quienes reportaron 38.1 mg ECG kg⁻¹ de MS y también moderadamente

mayor a lo reportado por Mora-Rochin *et al.* (2010), que fue de 138.0 mg ECG kg⁻¹ de MS. El contenido de FST en las tortillas de todos los tratamientos también fue superior a valores entre 135 y 280 mg EAG kg⁻¹ MS, informados por autores como Mora-Rochin *et al.* (2011) para tortillas de maíz azul.

3.5 Actividad antioxidante de tortillas

La AA de las tortillas de los tratamientos de nixtamalización, en los que el reposo del nixtamal se realizó en medio ácido fue entre 64.7 y 74.3 % superior a las del tratamientos testigo TT, cuyo reposo fue en medio alcalino (Figura 8). La mayor AA en las tortillas de los tratamientos TA, TAM y TAA se atribuye al mayor contenido de antocianinas y fenoles solubles totales logrado con el reposo del nixtamal en medio ácido.

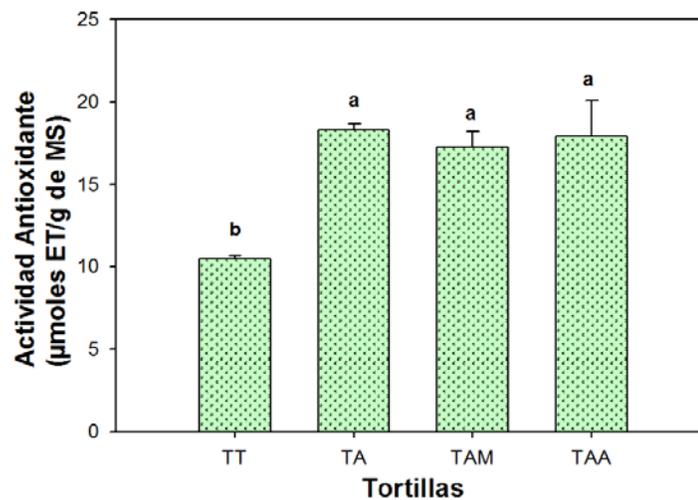


Figura 8. Actividad antioxidante por ABTS en las tortillas obtenidas de los distintos tratamientos de nixtamalización.

La actividad antioxidante (AA) de las tortillas se atribuye principalmente a los compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz, que en los granos azul/morados son

principalmente antocianinas y ácidos fenólicos (Salinas *et al.*, 1999; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006). De estos fenólicos, las antocianinas son antioxidantes más potentes que los ácidos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1997), pero se hallan en menor proporción que los ácidos fenólicos en la fracción de FST.

En las tortillas bajo estudio, la proporción de antocianinas en la fracción de FST fue 32.3, 36.0, 32.5 y 32.3 %, para los tratamientos TT, TA, TAM y TAA, en ese orden, de manera que la mayor AA de las tortillas de los tratamientos TA, TAM y TAA con relación a las del TT se debe a los ácidos fenólicos.

4. Conclusiones

El reposo en medio ácido condujo a tener una menor humedad en el nixtamal. Sin embargo, la humedad de la masa en los distintos tratamientos no se vio afectada, aunque sí la de las tortillas. El pH de la masa obtenida del tratamiento TA se logró ajustar a un valor cercano al TT agregando una solución de óxido de calcio al 2 % durante el proceso de la molienda o bien acondicionando la masa. De acuerdo con los resultados de color en masa y tortillas, los tratamientos TAM y TAA permiten reducir la pérdida de antocianinas, y obtener masa y tortillas con un color similar a las del tratamiento testigo. Sin embargo el TAM mostró una mejor homogeneidad de la masa en color. Aplicando el método de nixtamalización desarrollado, con reposo ácido se redujo la pérdida de antocianinas entre un 57.4 y 72.2 % en relación a las del TT. Los fenoles solubles totales mostraron un comportamiento similar. Una mayor retención de antocianinas se traduce en una mayor actividad antioxidante de la tortilla.

**V. FORMULACIÓN DE TORTILLA NUTRACÉUTICA A PARTIR DE MAÍZ
DE GRANO AZUL Y VIDA DE ANAQUEL**

FORMULACIÓN DE TORTILLA NUTRACÉUTICA A PARTIR DE MAÍZ DE GRANO AZUL Y VIDA DE ANAQUEL

FORMULATION OF NUTRACEUTICAL TORTILLA OBTAINED FROM CORN OF BLUE GRAIN AND SHELF LIFE

Cañarejo-Antamba, M., Y. Salinas-Moreno., S. Valle-Guadarrama., E. Aguirre-Mandujano

RESUMEN

El maíz de grano azul tiene elevado contenido de antocianinas, que se pierden en proporción importante, al ser transformado en tortillas, por el pH alcalino del proceso. El objetivo del trabajo fue desarrollar una tortilla nutraceutica con alto contenido de antocianinas, a través de la optimización del método de nixtamalización y la adición de pericarpio de grano. Se utilizó maíz de la raza Chalqueño y una mezcla 70:30 de éste con maíz de la raza Bolita. En ambos se evaluó la producción de tortillas usando nixtamalización tradicional y en condición modificada con reposo ácido (pH 5.1), molienda alcalina (pH 7.5) y la adición de 3 % de pericarpio de maíz de la raza Elotes Cónico, lo que causó incremento de contenido de antocianinas en un 58%, de fenoles solubles totales en un 68 %, actividad antioxidante en un 97 %, índice de hidrólisis en un 92 % y predicción de índice glicémico en 87 %, con similares atributos de color y textura que el tratamiento testigo, y también con bajos niveles de desarrollo microbiano.

Palabras clave: bioactivos, nixtamalización, formulación, índice glucémico.

ABSTRACT

The corn of blue grain has an elevated content of anthocyanins, which are lost in a great amount, during its processing into tortillas, due to the alkaline pH used. The objective was to develop a nutraceutical tortilla with high content of anthocyanins, through the optimization of the nixtamalization method and the addition of pericarp of grain. Corn of the race Chalqueño was used and also a 70:30 mixture of Chalqueño and Bolita corn races. In both cases the tortilla production was evaluated using traditional nixtamalization and a process at modified conditions with acid resting (pH 5.1), alkaline milling (pH 7.5), and the addition of 3 % of pericarp from Elotes Cónico corn, which caused increased of contents of anthocyanins (58 %), total soluble phenols (68 %), antioxidant activity (97 %), hydrolysis index (92 %), and prediction of glycemic index (87 %), with similar features of color, texture and shelf life to tortillas obtained without the addition of pericarp, and also with low levels of microbiological development.

Key words: bioactive, nixtamalization formulation, glycemic index.

1 Introducción

La demanda creciente y el interés acentuado de los consumidores en la optimización de los beneficios de la salud a través de la ingesta de alimentos, han generado una rápida expansión de los alimentos funcionales en el mercado (Mazza, 2002). Los alimentos funcionales son productos de origen vegetal o animal, que proporcionan un beneficio para la salud, más allá de la nutrición básica, e incluyen a los productos nutraceuticos. Un producto nutraceutico es aquél que pueda tener la consideración de alimento, o parte de él, que proporciona una forma concentrada de un agente bioactivo y un efecto positivo a la salud (Alvídrez-Morales *et al.*, 2002). Estados Unidos es el más importante productor y consumidor de alimentos funcionales, seguido de Japón, Alemania, Francia y el Reino Unido (Cortés *et al.*, 2005).

Las antocianinas son de interés particular para la industria de alimentos, no sólo por su capacidad de impartir colores a productos alimenticios, sino también por su implicación en la salud humana a través de las propiedades funcionales, de su potencial como ingrediente alimenticio y de su impacto sobre la salud (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011). La ingesta de antocianinas en los seres humanos se estima en el rango de 180-215 mg/día en los Estados Unidos (De Pascual-Teresa *et al.*, 2008) y se está incrementando de manera significativa debido a que los alimentos con alto contenido de antocianinas están más disponibles comercialmente hoy en día (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2011).

Diversos materiales conteniendo antocianinas están siendo incorporados a productos alimenticios, como el maíz pigmentado para la elaboración de tortillas azules. Las tortillas azules, por su contenido de antocianinas y fenoles, resultan ser productos funcionales con un buen potencial para el mercado (Serna-Saldivar *et al.*, 2013). En

México, las tortillas son el alimento básico de la dieta diaria, su consumo diario *per cápita* es de 155.4 g en las zonas urbanas y hasta 217.9 g en las zonas rurales (Fernández-Suárez *et al.*, 2013). La tortilla azul, además de su color y sabor diferente, posee un contenido de antioxidantes ligeramente mayor que la tortilla blanca, con valores entre 12-18 μmoles equivalente de Trolox (ET)/g de materia seca (MS) para tortilla azul común y valores entre 8-10 μmoles ET g^{-1} MS para tortilla blanca (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; De al Parra *et al.*, 2007; Mora-Rochin *et al.*, 2010; Lopez-Martínez *et al.*, 2011), y algunos reportes señalan que el índice glucémico en la tortilla azul es inferior a la tortilla blanca (Hernández-Uribe *et al.*, 2007). Esta investigación tuvo como objetivo formular una tortilla azul nutracéutica a partir de maíz azul/morado y fracciones de grano rojo y determinar la estabilidad de los bioactivos (antocianinas y fenoles) durante la vida de anaquel de la tortilla formulada.

2 Materiales y métodos

2.1 Material de estudio

Se utilizó una población de maíz de la raza Chalqueño con grano azul/morado, la variedad VC-42 de la raza Bolita, también de grano azul/morado y pericarpio de maíz rojo magenta de la raza Elotes Cónico como ingrediente enriquecedor de antioxidantes. Las muestras provinieron del Distrito Federal, Oaxaca y Tlaxcala, respectivamente. Como testigo para contenido de antioxidantes se utilizó maíz blanco (Híbrido H-40).

2.2 Organización experimental

2.2.1 Nixtamalización de muestras

Se utilizaron lotes de 1 kg de maíz limpio de las razas Chalqueño y Bolita y 250 g del Híbrido H-40, que se nixtamalizaron con óxido de calcio en concentración de 0.7 %. Se

aplicaron tiempos de cocción de 25 min para Chalqueño, 40 min para Bolita y 35 min para H-40. El tiempo de cocción se determinó con base en el índice de flotación, según el criterio descrito por Salinas y Vázquez (2006). El grano nixtamalizado se reposó durante 12 h a temperatura ambiente. Al final de esta fase el nixtamal se enjuagó con agua corriente para eliminar el exceso de cal y residuos del pericarpio solubilizado para proceder a su molienda en un molino de piedras (Weg MSL1J, México). Este procedimiento se realizó con las particularidades asignadas a los tratamientos descritas en el Cuadro 7.

2.2.2 Elaboración de tratamientos para la formulación de una tortilla azul nutracéutica

Se realizó previamente una mezcla de grano nixtamalizado en proporción 70:30 (Chalqueño: Bolita), para mejorar las características de textura y manejo de la masa (Cruz-Moreno, 2013). Debido a que los maíces poseen diferente dureza, se nixtamalizaron por separado y se realizó la mezcla de los maíces en nixtamal. Los tratamientos para elaboración de la tortilla nutracéutica se describen en el Cuadro 7.

2.2.3 Perlado mecánico del grano rojo Elotes Cónico para obtener ingrediente rico en antioxidantes

Se utilizaron muestras de 250 g de grano de maíz rojo con 20 % de humedad, que fueron colocadas en la máquina perladora (Modelo 6K48GA, EXCELL, MX) durante 30 segundos. Al finalizar el tiempo se retiró el grano perlado de la máquina, y se seleccionó el pericarpio del resto de fracciones del grano con ayuda de cribas N° 5 y 6. Posteriormente se molió el pericarpio en un molino (Modelo 2775255, Louis Allis Company, USA) y se almacenó en bolsas de plástico (Figura 9).

Cuadro 7. Descripción de tratamientos para formular una tortilla azul nutracéutica y un testigo de grano blanco.

Tratamientos	Descripción
T1	Maíz blanco H-40. Proceso de nixtamalización, reposo, molienda y acondicionamiento de la masa realizado en forma tradicional.
T2	Maíz azul/morado raza Chalqueño. Proceso de nixtamalización, reposo, molienda y acondicionamiento de la masa realizado en forma tradicional.
T3	Mezcla de maíces en proporción 70:30 (Chalqueño: Bolita). Proceso de nixtamalización, reposo, molienda y acondicionamiento de la masa realizado en forma tradicional.
T4	Mezcla de maíces en proporción 70:30 (Chalqueño: Bolita) con reposo del nixtamal en medio ácido. La fase de reposo fue en medio ácido (pH=5.1) agregando ácido fumárico al 1.2 % con relación al peso del grano (6 g/500 g de grano nixtamalizado). Durante la molienda, se agregaron 10 mL de una solución de óxido de calcio al 2 % (p/v). Finalmente se aplicó amasado tradicional.
T5	Mezcla de maíces en proporción 70:30 (Chalqueño: Bolita) proceso de nixtamalización, reposo y molienda tradicional. Durante la molienda se agregó 3 % de pericarpio de maíz rojo raza Elotes Cónicos (9 g/300 g de mezcla de grano nixtamalizado). El acondicionamiento de la masa fue en forma tradicional.
T6	Mezcla de maíces en proporción 70:30 (Chalqueño: Bolita) con reposo del nixtamal en medio ácido. La fase de reposo fue en medio ácido (pH=5.1) agregando ácido fumárico al 1.2 % con relación al peso del grano (6 g/500 g de grano nixtamalizado). Durante la molienda, se agregaron 10 mL de una solución de óxido de calcio al 2 % (p/v) y 3 % de pericarpio de maíz rojo raza Elotes Cónicos (9 g/300 g de mezcla de grano nixtamalizado). El acondicionamiento de la masa fue en forma tradicional.

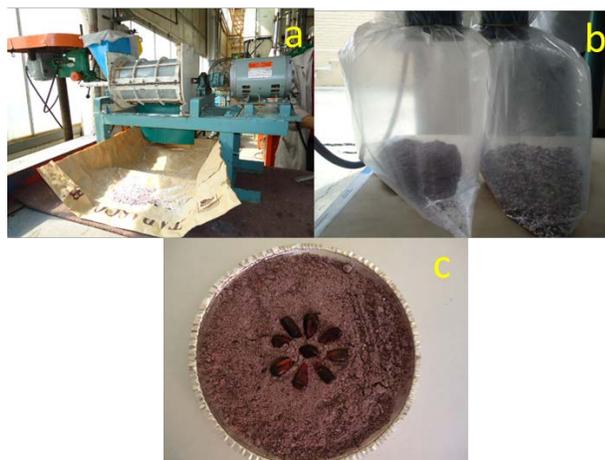


Figura 9. Proceso de perlado del grano de maíz, (a): escarificado del grano; (b): clasificación y molienda del pericarpio; (c): pericarpio molido

2.2.4 Elaboración de tortilla azul nutracéutica

Se elaboraron 10 tortillas de cada tratamiento a partir de 20 g de masa. El laminado de las tortillas se realizó con una prensa manual, para obtener discos de 11 cm de diámetro con espesor de 2 mm, que se cocieron en una plancha metálica a una temperatura entre 250 y 270 °C. El cocimiento se realizó durante 10 s por una de las caras, se volteó para cocer la otra cara durante 15 s, nuevamente un volteo a la primera cara para lograr la formación de la ampolla. De cada tratamiento se tomaron cinco tortillas para determinar color, humedad y textura. Las tortillas restantes de cada tratamiento se cortaron en pequeños trozos y fueron empacados en papel aluminio para ser liofilizadas en un equipo Labconco (Modelo 7670520, USA), posteriormente se molieron en un molino tipo ciclónico IKA (MF 10 Basic, IKA Laboratory equipment, USA) con malla de 0.5 mm. La harina se almacenó en sobres de papel manila que se colocaron en un desecador

para su análisis inmediato de compuestos fenólicos (antocianinas totales, fenoles solubles totales) y actividad antioxidante.

2.3 Variables respuesta

2.3.1 Evaluación de las características físicas de la tortilla azul nutracéutica

2.3.1.1 Humedad. Se pesaron 2 g de muestra de masa en una caja de aluminio a peso constante y se colocó en una estufa durante 1 h a 130 °C. Transcurrido ese tiempo se sacó la caja y se dejó enfriar en desecador. Por último, se procedió a determinar el peso de la caja con la muestra seca. El contenido de humedad se calculó de acuerdo a la Ecuación (6), donde H es humedad %, $PCMH$ es peso de la caja más muestra húmeda (g), $PCMS$ es peso de la caja más muestra seca (g) y PM es peso de la muestra (g) (Salinas y Vázquez, 2006).

$$\% H = \left(\frac{PCMH - PCMS}{PM} \right) \times 100 \quad (6)$$

2.3.1.2 Color. Para la medición de color se utilizó un colorímetro Hunter Lab (Mini Scan XE Plus 45/ 0-L) en escala CieLab (L^* , a^* , b^*). Con los valores de a^* y b^* se calcularon los parámetros de ángulo de tono (Hue ; h^*) y saturación del color ($Croma$; C^*) con base en las Ecuaciones (7) y (8), en tanto que el valor de L^* se tomó como luminosidad (McGuire, 1992).

$$h^* = \text{Tan}^{-1}(b^* / a^*) \quad (7)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (8)$$

2.3.1.3 Textura. La textura se obtuvo con un Texturómetro Brookfield® CT3 (Middleboro, MA, USA), equipado con una celda de carga de 25 kg. Se colocó la tortilla entre dos placas metálicas y fue perforada por una sonda con terminación en esfera metálica de diámetro de ½ pulgada que se desplazó a una velocidad de 1 mm/s. La dureza se registró como la fuerza necesaria para perforar la tortilla, expresada en unidades de gramos fuerza (gf), en tanto que la deformación se consideró como la distancia desde el punto de contacto de la esfera con la superficie de la tortilla hasta su perforación, y se consignó en mm.

2.3.2 Determinación de la composición química y mineral en la tortilla azul nutracéutica

El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a lo establecido por los métodos 08-01; 30-25 de la AACC (1995) adaptado por Galicia *et al.* (2012) para cenizas totales y extracto etéreo respectivamente. El contenido de proteína se basó en un procedimiento colorimétrico y se usó como referencia el método industrial N° 334-74 desarrollado para el Autoanalizador Technicon II (1977). El contenido de fibra dietética soluble e insoluble se determinó según los métodos de la AOAC (1999) y Englyst *et al.* (1988). El contenido de minerales fue determinado por digestión con una mezcla diácida (HClO₄-HNO₃) (Jones y Case, 1990). El contenido de almidón total se estableció por el método propuesto por Holm *et al.* (1986).

2.3.3 Análisis de la tasa de hidrólisis y predicción del índice glucémico en la tortilla azul nutracéutica

El contenido de almidón disponible se determinó según el método descrito por Holm *et al.* (1986). La tasa de digestión de almidón *in vitro* para la obtención del índice de

hidrólisis se realizó según lo descrito por Granfeldt *et al.* (1992). La predicción del índice glucémico fue en base al método de Granfeldt (1994).

2.3.4 Variables de composición fenólica en la tortilla azul nutracéutica

2.3.4.1 Obtención de los extractos fenólicos. Se pesó 1.0 g de muestra de harina de tortilla en un matraz Erlenmeyer, a la cual se agregaron 20 mL de disolvente (metanol acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich Chemicals). Se aplicó agitación y se cubrió la boquilla del matraz con Parafilm. La muestra fue sometida a otra agitación en un baño sonicador (Brason 2510) durante 15 min. Posteriormente, se aplicó refrigeración durante 1 h con 45 min, para completar 2 h de extracción. Una vez concluido el tiempo de extracción se decantó el sobrenadante del matraz, se centrifugó durante 15 min a 2862 x g, se filtró con papel Whatman No 4 y se aforó a 20 mL con el disolvente de extracción. Finalmente se guardó en congelación para la cuantificación de antocianinas y fenoles solubles totales (Abdel-Aal *et al.*, 1999, con adaptación de Salinas *et al.*, 2005).

2.3.4.2 Cuantificación de antocianinas. Al extracto de antocianinas obtenido en el punto anterior se le determinó absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis), a dos longitudes de onda, 530 y 700 nm. Ésta última se utilizó para corregir la lectura de la muestra por presencia de turbidez. La calibración del equipo se realizó con el mismo disolvente de extracción. Para los cálculos de la concentración de antocianinas se elaboró una curva patrón con cianidina-3-glucósido (Polyphenols, NW). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/100 gramos materia seca (mg ECG 100 g⁻¹ de MS).

2.3.4.3 Cuantificación de fenoles solubles totales (FST). La cuantificación de FST se realizó mediante el método de Folin Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Se tomaron 100 μL del extracto obtenido para cuantificar antocianinas, se añadieron 125 μL del reactivo Folin Ciocalteu 1 N, se aplicó agitación y se dejó reaccionar durante 6 min. Posteriormente se agregaron 1250 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 19 % (p/v) y se aforó a 3 mL con agua destilada. En seguida se agitó en un vórtex (Vortex-2 Gene, scientific Industries, USA) y se dejó reposar a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 90 min. Después se aplicó centrifugación a 34622 x g durante 15 min. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis) a una longitud de onda de 760 nm. Se elaboró una curva patrón a partir de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60 y 100 ppm. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca ($\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1}$ de MS).

2.3.5 Actividad antioxidante

2.3.5.1 Método ABTS. Se realizó de acuerdo al criterio descrito por Re *et al.* (1999). Se preparó una solución 7 mM de ABTS en agua destilada a la que se llamó solución A, y otra de persulfato de potasio 2.45 mM, a la que se llamó solución B. Posteriormente, se mezclaron en proporción 1:0.5 (solución A: solución B). La mezcla se dejó reposar durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente para permitir la generación de radical libre, a la cual se llamó solución stock, que fue diluida en una solución buffer de fosfatos 75 mM (PBS; pH=7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm, a la que se denominó solución de trabajo.

Para obtener la capacidad antioxidante de los extractos se tomaron 200 μL y se colocaron en la celda de cuarzo; después se agregaron 2800 μL de la solución de trabajo, agitándose vigorosamente. Se midió la absorbancia cada minuto durante el desarrollo de la reacción hasta los 6 min, y posteriormente cada 5 min hasta completar 30 min. El porcentaje de reducción se calculó con la Ecuación (9), donde $ABTS_{blanco}$ es la Absorbancia del blanco (200 μL de BPS y 2800 μL de la solución de trabajo a 734 nm), y $ABTS_{muestra\ t}$ es el valor de la absorbancia de la muestra al tiempo t . Se elaboró una curva patrón con Trolox. Los resultados se expresaron en micromoles Equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca ($\mu\text{moles ET g}^{-1}$ de MS).

$$\% ABTS_{reducido} = \left(\frac{ABTS_{blanco} - ABTS_{muestra, t}}{ABTS_{blanco}} \right) \times 100 \quad (9)$$

2.3.5.2 Método ORAC. La determinación de la capacidad antioxidante por el método de Capacidad de Absorbancia de Radicales Oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), comúnmente se emplea para compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Cao *et al.*; 1993; Ou *et al.*, 2001). Se transfirió una alícuota de 20 μL de extracto a una placa oscura de 96 pozos de fondo plano junto con 5 μL de buffer y 360 μL de fluoresceína 48 nM (Sigma, St. Louis, MO). Las muestras se incubaron 30 segundos y la fluorescencia inicial se registró. La placa se leyó en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek instrument) y por medio de un autodispensador del equipo se inició la reacción al agregar AAPH (2-2'-Azobis amidinopropano, generador de radicales libres) por medio del autodispensador. La fluorescencia se monitoreó durante 3 horas en intervalos de 1 minuto a 37 °C. La longitud de onda de excitación y emisión fueron de

485 nm de excitación y 530 nm, respectivamente. Los datos fueron expresados en micromoles Equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca ($\mu\text{moles ET g}^{-1}$ de MS).

2.4 Determinación de vida de anaquel

De los tratamientos presentados en el Cuadro 7, se seleccionaron el T2, T5 y T6, en base a criterios de comparación (formulación y método de nixtamalización). Se elaboraron tortillas suficientes para realizar su empacado al vacío en bolsas de plástico de alta barrera y atmósferas modificadas (30 % CO_2 y 70 % N). Se almacenó por 15 días a una temperatura de 5 °C, y cada 5 días, se tomó una muestra para monitorear las variables de contenido de fenólicos y actividad antioxidante. También se realizaron análisis microbiológicos, los cuales consistieron en cuenta mesofílica viable, coliformes totales y cuenta de levaduras y hongos

La cuantificación de coliformes totales, bacterias coliformes, hongos y levaduras, se determinó con base en los métodos descritos en la NOM-111-SSA1; NOM-112-SSA1 y NOM-113-SSA1, respectivamente, de la Norma Mexicana de Alimentos (1994).

2.5 Análisis de datos

El experimento se condujo de acuerdo a un diseño completamente al azar con seis tratamientos. Se aplicaron rutinas de comparación de medias de tratamientos (Tukey, 0.05) lo cual se hizo con apoyo del programa SAS (SAS Intitute incorporation Inc., 2005).

Para la fase de evaluación de vida de anaquel, se consideraron sólo los tratamientos T2, T5 y T6, y se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con tres tratamientos, donde las evaluaciones en el tiempo constituyeron la fuente de bloqueo. Se realizaron análisis de varianza y rutinas de comparación de medias de tratamientos (Tukey, 0.05)

con apoyo del programa SAS (SAS Intitute incoporation Inc., 2005). El efecto tanto de tratamientos (T) como del tiempo (Φ), se determinó con base en el error del efecto de interacción $T \times \Phi$.

3 Resultados y discusión

3.1 Características físicas de humedad y color en tortilla

El análisis estadístico mostró que hubo significancia entre el efecto causado por los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6) sobre el contenido de humedad y los tres atributos de color, luminosidad, ángulo de tono y cromaticidad (Cuadro 8). El contenido de humedad fue mayor en las tortillas del T2 y diferente ($P \leq 0.05$) a las tortillas del T1. En tanto que, en las tortillas del T3 el contenido fue menor que las del T2, lo cual probablemente se debe a que la mezcla de maíces con textura diferente afectó al contenido de humedad. Los tratamientos T3 y T4 no presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre ellos, por lo que el método de nixtamalización no tuvo efecto en esta variable. Sin embargo, se apreció diferencias significativas ($P \leq 0.05$) de humedad entre los tratamientos T5 y T6 (Cuadro 9). La mayor humedad en las tortillas testigos (T2) se podría relacionar con el alto contenido de almidón total determinado en este tratamiento. Se han reportado contenidos de humedad entre 37 y 42 % para tortillas recién elaboradas (Antuna-Grijalva *et al.*, 2008; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2010), rango en el cual los resultados obtenidos están dentro. El contenido de humedad depende de las condiciones de cocción (temperatura y tiempo de cocción), de la humedad de la masa, que a su vez depende directamente de la humedad del nixtamal y la cantidad de agua que absorbe el maíz durante la nixtamalización (Bello-Pérez *et al.*, 2002).

Cuadro 8. Análisis de varianza de parámetros de color, humedad y textura, composición química y mineral en tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño.

Variable	gl	F _{calc}	R ²	C.V.
Humedad	5	18.58*	0.904	1.965
Luminosidad (L*)	5	932.27*	0.997	1.634
Ángulo de tono (H*)	5	9.26*	0.822	17.32
Cromaticidad (C*)	5	2249.61*	0.999	6.102
Textura				
Deformación (mm)	5	3.51 ns	0.545	5.489
Fuerza de ruptura (g _f)	5	2.86 ns	0.52	26.109
Composición química y mineral				
Proteínas	5	38.09*	0.974	1.693
Lípidos	5	1.53 ns	0.749	13.364
Cenizas	5	2.83E+14*	1	4.68E-07
Fibra Dietaria Insoluble	5	6.61 ns	0.771	17.426
Fibra Dietaria Soluble	5	91.8*	0.978	16.532
Lignina Klason	5	39.73*	0.952	13.769
Fibra Dietaria Total	5	27.06*	0.931	10.213
Ca	5	278.01*	0.996	2.287
Fe	5	3.61 ns	0.785	0.092
Mn	5	4.69 ns	0.846	12.42
Zn	5	2.37 ns	0.745	4.775
Almidón Total	5	2.69 ns	0.736	2.073
Almidón Disponible	5	121.63*	0.99	1.055
Índice de Hidrólisis	5	23.61*	0.846	8.271
pIG	5	24.09*	0.849	6.984
Fenoles Solubles Totales	5	358.8*	0.997	2.106
Antocianinas Totales	5	6719.47*	0.999	0.951
ABTS	5	300.62*	0.996	2.43
ORAC	5	34.36*	0.971	8.02

gl: grados de libertad; F_{calc}: valor de F calculado; R²: coeficiente de determinación del ajuste con el modelo lineal estadístico; C.V.: coeficiente de variación (%); pIG: predicción del índice glucémico; *: efecto significativo de tratamientos a (P ≤ 0.05); ns: efecto no significativo de tratamientos a (P ≤ 0.05).

Cuadro 9. Humedad y características colorimétricas en tortilla azul con diferente formulación y tortilla blanca como contraste.

Tratamientos	Humedad en Tortilla (%)	Color en Tortilla		
		L*	h*	C*
T1	37.8 ± 0.40 c ²	74.8 ± 0.51 a	91.2 ± 0.35 b	19.8 ± 0.40 a
T2	42.6 ± 0.76 a	45.5 ± 0.95 b	148.4 ± 6.56 a b	1.8 ± 0.17 b
T3	39.4 ± 0.61 b c	45.5 ± 0.49 b	154.2 ± 3.30 a b	2.2 ± 0.06 b
T4	38.9 ± 0.82 b c	45.0 ± 0.60 b	179.1 ± 42.69 a	0.4 ± 0.10 c
T5	40.9 ± 0.61 a b	39.3 ± 0.97 c	223.1 ± 50.31 a	0.9 ± 0.47 c
T6	37.5 ± 1.20 c	36.5 ± 0.58 d	231.4 ± 2.30 a	1.9 ± 0.06 b
DHS ¹	2.2	2.21	84.12	0.78

*: L= luminosidad (%); h=hue o ángulo de tono (°); C=croma o índice de saturación de color¹; DHS: diferencia honesta significativa; ² Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (P≤0.05).

En cuanto a los parámetros de color, los mayores valores de luminosidad (L^*) y cromaticidad (C) se presentaron en el T1, que fue diferente ($P \leq 0.05$) en estas variables al resto de los tratamientos. El valor de hue indica un tono amarillo, que al combinarse con valores de L^* y C, revelan el color amarillo cremoso de una tortilla de maíz blanco. Dentro de las tortillas azules, el color en los tratamientos T2 y T3 fue igual, al no presentar diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en las variables que lo definen, lo que significa que la mezcla de nixtamal Chalqueño con VC-42 no tuvo efecto sobre esta variable. Las tortillas de T3 y T4 fueron iguales ($P > 0.05$) en luminosidad y ángulo de tono, pero diferentes en croma ($P \leq 0.05$), variable cuyo valor fue menor en T4. La diferencia entre estos dos tratamientos fue el medio ácido al que estuvo sometido el nixtamal del T4. El tratamiento T4 obtuvo un valor de L^* superior y diferente ($P \leq 0.05$)

al T6. Los tratamientos T5 y T6 presentaron valores más bajos y significancia estadística ($P \leq 0.05$) entre ellos, por lo que la adición del ingrediente enriquecedor posiblemente influyó negativamente en este parámetro.

El valor de Hue fue menor en las tortillas obtenidas del T1, en tanto que en las del resto de tratamientos fue igual. El parámetro croma, que mide el nivel de saturación de un color, mostró un valor más alto en el T1 y fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al resto de tratamientos. Las tortillas del T3 presentaron un color más claro que las del T4, lo cual puede deberse a que el reposo en medio ácido influye en la pureza del color. El valor de croma del T3 fue mayor que T5, mientras que el T4 presentó un valor más bajo que el T6. Además, el tratamiento T6 fue superior al T5, aunque fue estadísticamente igual ($P > 0.05$) al testigo (T2). Esto indica que la incorporación del pericarpio en nixtamal reposado en medio ácido, tiene un efecto positivo sobre la pureza color.

Las tortillas con mayor brillo y más claras fueron las obtenidas del T1, donde se tuvieron los mayores valores de L^* y Croma y concuerdan con los valores reportados por Del Pozo-Insfran *et al.* (2007) para tortillas blancas. De acuerdo con los valores de Hue observados en las tortillas obtenidas de los T5 y T6, en las cuales se agregó 3 % de pericarpio de grano rojo, en comparación con las del tratamiento testigo (T2), y donde se vio que el color no afectó por la adición del ingrediente enriquecedor en dichos tratamientos, las tortillas del T5 presentaron un color de tonalidad (verde azulado) similar a las del T6 correspondiente a sus valores de Hue, pero fueron ligeramente más brillantes y más oscuras que las del T6, en tanto que las tortillas del T4 mostraron una tonalidad verde amarillenta y fueron ligeramente más brillantes y más oscuras que las de los T5 y T6.

Las tortillas testigo (T2) adquirieron un color de tonalidad amarillento y fueron más claras que el resto de tratamientos. Los resultados de color obtenidos en tortillas azules son bajos a lo informado por Del Pozo-Insfran *et al.* (2007), quienes reportan valores para Hue de 357.6° y 5.9°, mientras que para croma los valores oscilan entre 6.2 y 8.7.

3.2 Textura en tortillas

No obstante la formulación de tortilla de cada tratamiento, no se observó diferencia significativa entre el efecto sobre las características de textura, expresadas en deformación y fuerza de ruptura (Cuadro 8).

La textura expresada en valores de deformación y fuerza de ruptura no presentó diferencias ($P>0.05$) entre la tortilla blanca (T1) y la tortilla azul (T2) (Cuadro 10). Para las tortillas azules, únicamente se presentó diferencia estadística en la variable deformación, entre los tratamientos T2 y T4. Las tortillas se deformaron menos que las de T2, lo que se atribuyó a que el reposo en medio ácido al que se sometió el nixtamal favoreció la pérdida del pericarpio solubilizado. El pericarpio del grano de maíz al ser solubilizado por el álcali, durante el cocimiento del grano, se transforman en gomas naturales que favorecen las características de textura de la masa y tortilla (Martínez-Bustos *et al.*, 2001). En cuanto a la fuerza de ruptura, no se observó diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos, sin embargo se observó menor valor numérico en el T4 (Cuadro 10).

Las características de textura en las tortillas se ven afectadas por la humedad de la masa, la cual está a su vez determinada por la humedad del nixtamal y las condiciones de molienda, lo que podría explicar los valores bajos del T4 y ligeramente bajos del T6 obtenidos en esta variable. Una mayor fuerza de ruptura se relaciona con una mayor

resistencia, que se traduce en que la tortilla no se rompa al colocarle encima algún guisado. Según los resultados obtenidos de textura, las tortillas del nixtamal reposado en medio ácido podrían ser menos resistentes que las obtenidas de un nixtamal reposado en medio alcalino. Sin embargo, al agregar el pericarpio del grano rojo durante la molienda (tratamiento T6) se mejora la textura de la masa, y se obtienen tortillas con mayor resistencia.

Cuadro 10. Características de textura en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.

Tratamientos	Textura	
	Deformación (mm)	Fuerza (gf)
T1	12.4 ± 0.46 ab ²	323.7 ± 86.39 a
T2	12.7 ± 0.33 a	284.5 ± 64.09 a
T3	12.5 ± 1.23 ab	249.0 ± 66.30 a
T4	11.0 ± 0.41 b	180.0 ± 52.53 a
T5	12.1 ± 0.34 ab	202.5 ± 43.37 a
T6	11.6 ± 0.34 ab	220.0 ± 50.46 a
DHS ¹	1.52	145.93

DHS¹ = diferencia honesta significativa; ²Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (P≤0.05).

Según estudios reportados por Vázquez-Carrillo *et al.* (2010) en tortillas de maíces criollos, valores cercanos de 183.3 gf corresponden a tortillas con dureza media y valores

superiores a 256.8 g_f a tortillas duras. Sin embargo, no existen trabajos donde se respalde estas relaciones con una evaluación sensorial y que verdaderamente justifiquen estas características de textura.

3.3 Composición química y mineral en tortillas

El análisis estadístico mostró que no hubo efecto significativo de tratamientos sobre lípidos, fibra insoluble y composición mineral, con excepción del calcio (Cuadro 8).

El mayor ($P \leq 0.05$) contenido de proteína lo presentó la tortilla de maíz de grano blanco (T1), el menor se observó en la tortilla del tratamiento T2, que es la tortilla azul. Las tortillas de los tratamientos T3-T6 fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) y mayores que en las tortillas de T2. Las diferencias en contenido de proteína entre las tortillas de T1 y T2 se deben a la dureza del grano empleado en su elaboración. Las del T1 provienen de un grano duro, las de T2 de uno suave, y los maíces de grano duro contienen mayor proteína que los de grano suave (Fox y Manley, 2009). El porcentaje de lípidos en las tortillas de T1 y T2 fue diferente, en tanto que en las tortillas de T1 y T3, así como en las de los tratamientos (T4-T6) el porcentaje fue estadísticamente igual ($P > 0.05$). El contenido de cenizas fue de mayor valor en el T6 y fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al resto de tratamientos (Cuadro 11). La adición de la solución de óxido de calcio durante la molienda del nixtamal con reposo en medio ácido en combinación con la adición de la fracción de pericarpio del grano rojo pudo ser la causa del mayor contenido de cenizas en las tortillas del T6, ya que por sí solos, ni la adición de la solución alcalina, ni la fracción de pericarpio causaron un incremento significativo del contenido de cenizas en las tortillas (T4 y T5).

Cuadro 11. Composición química promedio (%) en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.

Tratamientos	Proteína	Lípidos	Cenizas
T1	7.68± 0.14 a ²	2.32 ± 0.16 b	1.42± 0.01 c
T2	6.14± 0.00 c	3.54 ± 0.30 a	1.48± 0.01 c
T3	6.54± 0.14 c b	2.58 ± 0.16 b	1.43± 0.02 c
T4	6.70± 0.07 b	3.39 ± 0.34 a	1.53± 0.00 b
T5	6.70± 0.14 b	3.62 ± 0.28 a	1.50± 0.02 b
T6	6.60± 0.00 b	3.57 ± 0.31 a	1.60± 0.02 a
DHS ¹	0.48	0.52	2.90E+10

* Los resultados se informan en base seca; ¹DHS = diferencia honesta significativa; ²Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (P≤0.05).

Los resultados obtenidos de composición química en los tratamientos son menores en proteína y ligeramente menores en lípidos y cenizas a los valores indicados por Hernández-Uribe *et al.* (2007), quienes reportan valores de 9.56 ± 0.10 para proteína; 4.47 ± 0.07 para lípidos y 1.60 ± 0.02 para cenizas en tortilla azul. Para tortilla de grano blanco, las diferencias en la composición proximal de las tortillas pueden deberse al tipo de maíz utilizado y a factores agronómicos y ambientales en el que se cultiva el maíz (Agama-Acevedo *et al.*, 2011).

El contenido de fibra dietaria insoluble (FDI) del T1 no presentó diferencias significativas con el T2, en tanto que el T3 presentó un menor contenido y fue diferente que el T2. Los tratamientos T3, T4, T5 y T6 no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, aunque se observó un mayor contenido en los T5 y T6 frente a los T3 y T4, respectivamente, debido a la adición del pericarpio durante la molienda del nixtamal. El

contenido de fibra dietaria soluble (FDS) en los tratamientos T1 y T2 no mostró significancia estadística. Mientras que el T3 y T4 sí tuvieron un efecto significativo sobre esta variable. La FDS en el T3 fue mayor y estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al T5 y éste a su vez fue ligeramente mayor que el T6, aunque no presentó diferencias. En cuanto al contenido de lignina Klason (LK), los tratamientos T1 y T2 fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$), en tanto que el T3 obtuvo el contenido más bajo y fue diferente al T4. Los tratamientos T5 y T6 obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), y sus contenidos fueron superiores al tratamiento testigo (T2). El contenido de fibra dietaria total (FDT) en el T1 fue mayor que el resto de tratamientos, sin embargo, no tuvo diferencias significativas ($P > 0.05$) con el T2. El tratamiento T2 presentó un contenido de FDT superior al T3, por lo que la mezcla con distinto tipo de maíz posiblemente influyó en la disminución de la FDT. El tratamiento T4 obtuvo menor contenido de FDT que el T3, en tanto que los tratamientos T5 y T6 no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$). El elevado nivel de fibra total fundamentalmente es por tener más fibra dietaria insoluble (FDI) (Cuadro 12). Las tortillas obtenidas de un nixtamal reposado en medio ácido mostraron un menor contenido de fibras soluble, insoluble y por ende menor fibra total. Este comportamiento se atribuye a que existió mayor remoción de pericarpio en este tipo de tratamiento. Durante el proceso de nixtamalización se producen cambios estructurales, químicos, y nutricionales en el maíz y uno de los efectos, es que el proceso reduce la fibra dietaria insoluble y aumenta ligeramente la fibra dietaria soluble del grano a tortilla (Bressani *et al.*, 1990).

La composición mineral en las tortillas se muestra en el Cuadro 13. El contenido de calcio (Ca) fue diferente entre el T1 y T2, mientras que el T3 fue numéricamente mayor

que el T2; sin embargo, no presentaron significancia estadística ($P \leq 0.05$) entre ellos. El calcio en las tortillas del T4 fue mayor que en las del T3, lo que muestra que el método de nixtamalización tuvo un efecto significativo sobre este mineral.

Cuadro 12. Contenido de fibra ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste

Tratamientos	Fibra Dietaria	Fibra Dietaria	Lignina Klason	Fibra Dietaria
	Insoluble	Soluble		Total
T1	$5.07 \pm 0.50 \text{ a}^2$	$3.74 \pm 0.15\text{a}$	$0.84 \pm 0.13\text{bc}$	$9.65 \pm 0.46\text{a}$
T2	$4.65 \pm 0.21 \text{ ab}$	$3.47 \pm 0.00\text{a}$	$0.44 \pm 0.03\text{de}$	$8.56 \pm 0.0.23\text{a}$
T3	$2.33 \pm 0.51 \text{ c}$	$3.94 \pm 0.25\text{a}$	$0.26 \pm 0.04\text{e}$	$6.53 \pm 0.0.46\text{b}$
T4	$3.19 \pm 0.13 \text{ bc}$	$0.38 \pm 0.27\text{b}$	$1.17 \pm 0.0.01\text{a}$	$4.73 \pm 0.24\text{c}$
T5	$4.23 \pm 0.35 \text{ abc}$	$0.52 \pm 0.10\text{b}$	$1.02 \pm 0.0.01\text{ab}$	$5.77 \pm 0.35\text{bc}$
T6	$4.00 \pm 0.28 \text{ bc}$	$0.14 \pm 0.10\text{b}$	$0.58 \pm 0.03\text{cd}$	$4.72 \pm 0.40\text{c}$
DHS ¹	1.93	0.95	0.82	1.93

*Los resultados se informan en base seca; ¹DHS = diferencia honesta significativa; ²Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

El valor del Ca en las tortillas obtenidas del T6 fue mayor y estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) que las del T5. Además, fue superior en un 76.7 % más que la tortilla testigo (T2). Este incremento del calcio en los tratamientos T4 y T6 se atribuye a la adición de la solución alcalina durante la molienda para restituir el pH alcalino de la masa. El contenido de este mineral depende de la cantidad de cal (óxido de calcio) utilizada durante la nixtamalización, tiempo de cocción y de reposo, entre otros factores (Castillo

et al., 2009). Los resultados obtenidos de este mineral son cercanos al valor de 209 ± 57.3 reportado por (Bressani *et al.*, 1990) para tortillas de maíz. En cuanto a los minerales Fe, Mn y Zn no se encontró diferencia significativa entre tratamientos.

Cuadro 13. Contenido de minerales (mg 100 g⁻¹) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste

Tratamientos	Ca	Fe	Mn	Zn
T1	144.5 ± 1.56 b ²	4.20 ± 0.09 a	0.37 ± 0.28 a	2.20 ± 0.07 a
T2	117.6 ± 2.75 c	3.45 ± 0.76 a	0.29 ± 0.06 a	2.36 ± 0.06 a
T3	127.7 ± 4.43 c	2.92 ± 0.60 a	0.39 ± 0.06 a	2.50 ± 0.09 a
T4	209.5 ± 0.76 a	4.85 ± 0.67 a	0.51 ± 0.12 a	2.36 ± 0.14 a
T5	126.9 ± 2.70 c	3.07 ± 0.30 a	0.47 ± 0.03 a	2.26 ± 0.23 a
T6	207.8 ± 7.19 a	3.47 ± 0.23 a	0.45 ± 0.00 a	2.17 ± 0.02 a
DHS ¹	15.19	2.32	0.22	0.47

*Los resultados se informan en base seca; ¹DHS = diferencia honesta significativa; ²Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (P≤0.05).

En el grano de maíz azul se ha reportado un mayor contenido de minerales, comparado con el grano blanco (Antonio, 2004). Sin embargo, entre las tortillas blancas y azules no hubo diferencia estadística en el contenido de Fe, Mn y Zn, aunque numéricamente las tortillas a las que se agregó la fracción de pericarpio (T5 y T6) fueron superiores a las tortillas testigos en el mineral Mn. Los niveles de hierro observados en las tortillas de los diferentes tratamientos son mayores a los informados por Ortiz-Monasterio *et al.* (2007) quienes reportan valores de 2.0 mg 100 g⁻¹, en tanto que los niveles de Zn obtenidos son similares a los valores de 2.5 mg 100 g⁻¹ también reportados para maíz.

3.4 Digestibilidad del almidón

El efecto causado por los tratamientos con distinta formulación fue significativo sobre los tipos de almidón total y disponible, así como sobre la tasa de hidrólisis y la predicción del índice glucémico (Cuadro 8). El almidón forma parte importante de la dieta humana y uno de sus papeles es impartir textura y consistencia en alimentos. El contenido de almidón total (AT) no presentó diferencia estadística ($P>0.05$) entre tratamientos, aunque se observó un menor valor en el T4. Mientras que en la variable almidón disponible (AD), los tratamientos T1 y T2 presentaron diferencias, en tanto que el T3 fue ligeramente superior y diferente al T2, lo que indica que la mezcla de maíces tuvo efecto en esta variable. Los tratamientos T3 y T4 mostraron significancia ($P\leq 0.05$) en el efecto diferencial sobre el contenido de AD, así como también el T6 fue diferente al T5 y superior al testigo (T2) (Cuadro 14). Un alto contenido de AD está relacionado con una mayor proporción de almidón total, parámetro que puede influir directamente la textura de la tortilla de maíz pigmentado. El valor encontrado de AD en la tortilla azul (72.6 %) fue ligeramente superior al valor de 67.49 % reportado por Hernández-Uribe *et al.* (2007).

3.4.1 Tasa de hidrólisis

Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no tuvieron efecto significativo en esta variable, sin embargo, durante la hidrólisis del almidón las tortillas obtenidas del T6 presentaron un mayor porcentaje de hidrólisis y fueron estadísticamente diferentes ($P\leq 0.05$) al resto de tratamientos (Cuadro 14). Todos los componentes de un alimento, como lípidos, proteínas y antinutrientes, así como los procesamientos del alimento, pueden interferir

en la digestión del almidón (Goñi *et al.*, 1997), aunque es la fibra el componente que más afecta la respuesta glucémica (Snow y Dea, 1981).

Cuadro 14. Contenido de almidón (%) en la tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.*

Tratamientos	Almidón Total	Almidón Disponible	Índice de Hidrólisis	pIG
pan blanco			100 a	94.4 a
T1	69.1± 1.4 a ²	66.1 ± 1.27 d	59.87 ± 5.45 c	59.80 ± 4.70 c
T2	71.5± 1.1 a	72.6 ± 0.56 c	67.87 ± 11.32 c	66.70 ± 9.76 c
T3	71.4± 0.7 a	82.2 ± 0.42 a	62.36 ± 6.28 c	61.96 ± 5.41c
T4	67.4± 2.2 a	67.9 ± 0.57 d	67.16 ± 3.51 c	66.09 ± 3.02 c
T5	69.9± 0.3 a	74.1 ± 1.77 c	66.82 ± 4.99 c	66.80 ± 4.30 c
T6	71.6± 1.8 a	77.9 ± 0.49 b	91.58 ± 7.51 b	87.14 ± 6.47 b
DHS ¹	6.2	3.31	10.19	8.49

*Los resultados se informan en base seca; ¹DHS = diferencia honesta significativa; ²Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (P≤0.05).

La fibra soluble probablemente actúa aumentando la viscosidad del contenido intestinal y retrasando así la absorción de hidratos de carbono de los alimentos (Snow y Dea, 1981), lo cual se podría relacionar con el alto porcentaje de hidrólisis en las tortillas obtenidas del T6, que presentó los valores más bajos en fibra soluble y fibra total.

3.4.2 Predicción del índice glucémico (pIG)

La tasa de digestión del almidón parece ser un factor determinante a la respuesta metabólica de las comidas. Una baja tasa de hidrólisis está relacionada con una lenta liberación de glucosas y ésta a su vez con una baja respuesta glucémica (Goñi *et al.*, 1997). El IG describe numéricamente la rapidez de absorción de los carbohidratos de un

determinado alimento. Los valores de pIG del almidón de tortillas obtenidas de los diferentes tratamientos se muestran en el Cuadro 14. Se observó que las tortillas de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no presentaron diferencias significativas, sin embargo, se observó que las tortillas del T6 presentaron los valores más altos de pIG y fueron estadísticamente diferentes al resto de tratamientos, lo que indica que la formulación de éste tratamiento no tiene un efecto positivo sobre esta variable.

De acuerdo con los resultados obtenidos del T6, se puede decir que las tortillas tienen un IG alto, ya que se ha establecido que un alimento con IG alto, da un valor de 70 o más, moderado cuando tiene un valor comprendido entre 56 y 69, y pequeño cuando tiene menos de 55 (Jenkins *et al.*, 1981; Nayak *et al.*, 2014). Conocer el IG de los alimentos puede resultar útil para controlar la glucemia sanguínea.

3.5 Composición fenólica y actividad antioxidante en las tortillas

La aplicación de tratamientos con distinta formulación causó significancia en el efecto diferencial de los tratamientos aplicados (Cuadro 8). Los resultados del contenido de antocianinas totales (AT) y fenoles solubles totales (FST) en las tortillas azules (T2) y sus tratamientos (T3, T4, T5, y T6), así como la tortilla de contraste (T1) se presentan en la Figura 10. Dentro de los FST se encuentran las antocianinas, que en el caso de las tortillas azules (T2) representaron el 38 %. El contenido de antocianinas en los tratamientos T1 y T2 presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ellos, y se observó claramente la no presencia de este compuesto en las tortillas de maíz blanco (T1). El tratamiento T3 mostró un menor contenido de AT en comparación al T2, y sus contenidos fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) entre ellos. Esto se puede atribuir a la menor concentración de antocianinas del maíz Bolita (439.4 mg ECG 100

g^{-1} MS) frente al Chalqueño (737.8 mg ECG 100 g^{-1} MS) utilizados para la mezcla. El contenido de AT de los tratamientos T3 y T4 fue diferente, siendo superior en este último, lo que indica que el método de nixtamalización con reposo ácido influyó positivamente en esta variable. Los tratamientos T5 y T6 no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos. Sin embargo, la formulación del T5 incrementó un 55.5 % más de antocianinas que el T2, mientras que la formulación del T6 presentó un 58.5 % más que el T2, y sus contenidos fueron superiores al tratamiento testigo (T2), que presentó el valor más bajo (37.1 ± 0.49 mg ECG 100 g^{-1} MS).

Estos incrementos de antocianinas en porcentaje, se atribuyen al método de nixtamalización y al ingrediente enriquecedor agregado durante la molienda del nixtamal. En cuanto a FST, el tratamiento T2 fue superior y diferente ($P \leq 0.05$) al T1, aunque sin diferencias significativas frente al T3. En los tratamientos T3 y T4 se observó una marcada diferencia en el contenido de FST, pues el método de nixtamalización con reposo en medio ácido tuvo efecto positivo sobre el contenido de estos compuestos. El tratamiento T6 fue moderadamente superior ante el T5, por lo que la formulación de este tratamiento favorece a un contenido mayor de fenoles. Los tratamientos T4 y T6 cuyo nixtamal se reposó en pH ácido, presentaron contenidos superiores ($P \leq 0.05$) que el tratamiento testigo (T2). Sin embargo, el contenido de fenoles del T6 fue diferente ($P \leq 0.05$) al T4, y eso se debe a que las tortillas obtenidas del tratamiento T6 fueron enriquecidas con pericarpio de grano rojo, que representó un 7 % más de fenoles.

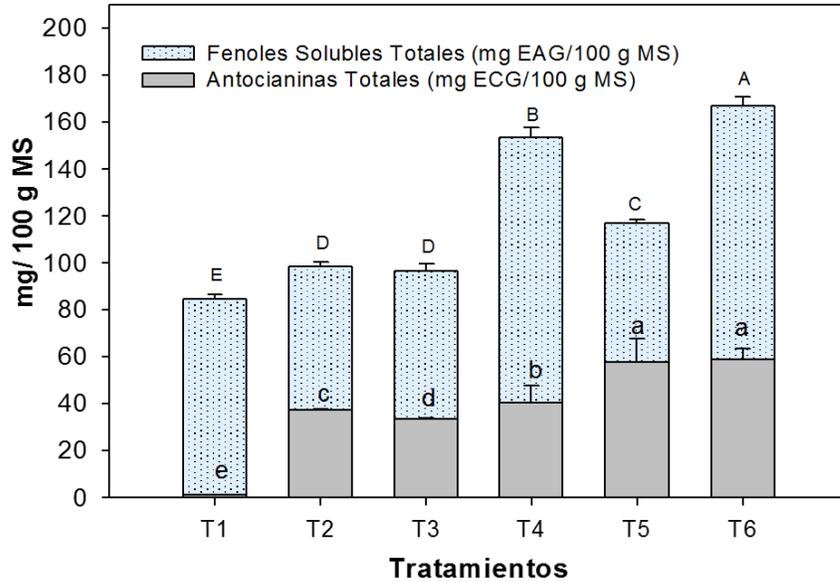


Figura 10. Antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste

Según los resultados obtenidos en FST, el reposo del nixtamal en pH ácido tuvo efecto en el incremento de fenoles, pues así lo demuestran las tortillas obtenidas de los tratamientos T4 y T6 que presentaron contenidos de 55 % y 68 % más que las del tratamiento testigo (T2). El incremento de fenoles en estas tortillas no se explica por la presencia de antocianinas, que sólo contribuyen en un 35 % del total de fenoles obtenidos, ya que dentro de estos compuestos fenólicos, además de las antocianinas, se encuentran los ácidos fenólicos, principalmente el ácido ferúlico, que está en mayor proporción en el grano de maíz, y que también posee actividad antioxidante (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Mora-Rochin *et al.*, 2010).

El contenido de antocianinas totales (AT) en las tortillas de maíz de grano azul/morado del tratamiento T2 fue considerablemente mayor a lo informado por De la Parra *et al.* (2007) y Mora-Rochin *et al.* (2010), quienes reportaron para tortilla azul valores de 3.81 y 13.80 mg ECG 100 g⁻¹ de MS, respectivamente. El contenido de FST en las tortillas

de todos los tratamientos también fue superior a valores entre 13.5 y 28.0 mg EAG 100 g⁻¹ de MS, informados por autores como Mora-Rochin *et al.* (2010) para tortillas de maíz azul.

3.5.1 Actividad antioxidante en tortillas

En los maíces de grano azul/morado los compuestos fenólicos predominantes son los ácidos fenólicos y las antocianinas (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006). Ambos grupos de compuestos poseen actividad antioxidante (AA). Cuando se realiza la extracción de los fenoles solubles en la tortilla de maíz se extraen conjuntamente estos dos grupos de fenoles, de manera que al evaluar la actividad antioxidante del extracto se cuantifica la total.

La AA de las tortillas obtenidas de los distintos tratamientos de formulación se determinó por dos métodos: ABTS y ORAC. Con el método ABTS, se observó diferencias entre el T1 y T2, mientras que la AA de los tratamientos T2 y T3 no presentó significancia estadística ($P > 0.05$). No obstante, se observó una clara diferencia entre el T3 y T4, la cual se atribuye a la aplicación del método de nixtamalización con reposo ácido. El tratamiento T6 fue superior y estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al T5, sin embargo, la AA del T4 fue similar a la del T6. La capacidad antioxidante de la tortilla obtenida con la nixtamalización tradicional, con menor contenido tanto de FST y AT fue menor en un 70 % que las tortillas de los tratamientos en reposo en medio ácido T4 y T6 (Figura 11).

Con el método del ORAC, los resultados de AA en las tortillas de los distintos tratamientos fueron más acordes con los contenidos de FST y AT que presentaron cada una. En general, se observó el mismo patrón que el obtenido con ABTS, aunque en este

caso no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre las tortillas del tratamiento testigo (T2) y las del T1. Por otro lado, el tratamiento T6 presentó un mayor valor de AA ($44.73 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ de MS) y fue estadísticamente diferente ($P\leq 0.05$) al T4, con lo que se podría asumir que la formulación del T6 tiene un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante. Además, el tratamiento T6 presentó un 97 % más de actividad antioxidante que el tratamiento testigo (T2), el cual obtuvo un valor de $22.58 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ de MS.

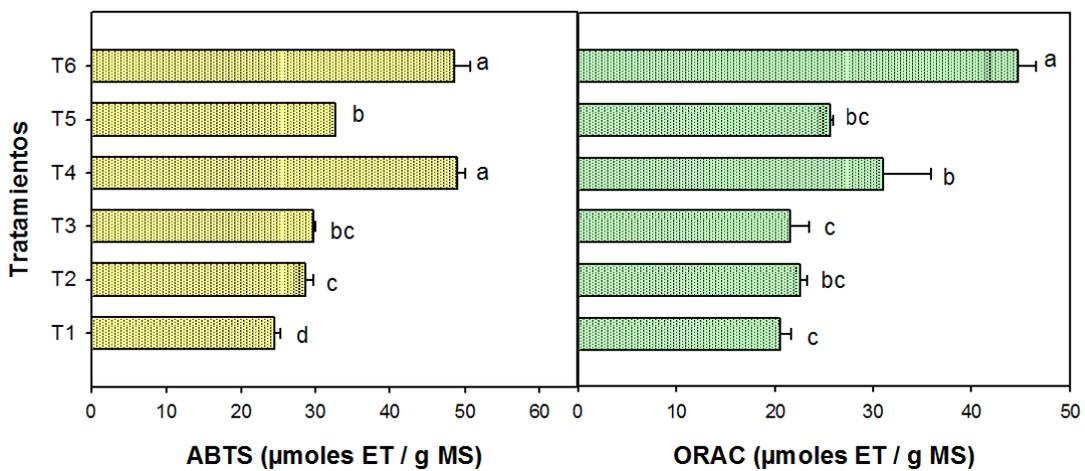


Figura 11. Actividad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC en tortilla azul con diferentes tratamientos de formulación y tortilla blanca como contraste.

En general, las tortillas azules (T2) muestran claramente mayor poder antioxidante en comparación con las tortillas blancas (T1).

3.6 Vida de anaquel de tortilla azul nutracéutica

En esta etapa del trabajo se utilizaron únicamente las tortillas de los tratamientos T2, T5 y T6. La tortilla del tratamiento T2 es la tortilla azul tradicional; T5 fueron las tortillas elaboradas con la mezcla de nixtamales, bajo proceso de nixtamalización tradicional, y

con la adición de fracción de pericarpio de maíz rojo en proporción de 3 % con relación al peso fresco del nixtamal; y T6 que fueron las tortillas obtenidas de la mezcla de nixtamales con reposo en medio ácido, adición de fracción de pericarpio en 3 % durante molienda y solución al 2 % de óxido de calcio. Para su almacenamiento, las tortillas fueron empacadas al vacío en bolsas de plástico de alta barrera y atmósfera modificada con una concentración de 30 % CO₂ y 70 % N₂ (Figura 12) y colocadas en refrigeración a una temperatura de 5 °C.



Figura 12. Tortillas azules empacadas al vacío y con atmósfera modificada.

Las muestras de tortillas tomadas en los diferentes días (0, 5 y 10) para el monitoreo de bioactivos, fueron almacenadas en congelación (-10 °C) hasta ser liofilizadas, debido al acceso limitado del liofilizador en el momento.

3.6.1 Composición fenólica y actividad antioxidante en las tortillas evaluadas en vida de anaquel.

El análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas del efecto causado por el almacenamiento de los distintos tratamientos (T2, T5 y T6) sobre la composición fenólica (antocianinas totales y fenoles totales) y actividad antioxidante. En cuanto al contenido microbiológico, bacterias, hongos y levaduras no se encontró diferencias (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos de la composición fenólica y contenido microbiológico en tortilla de maíz azul/morado raza Chalqueño, durante el almacenamiento.

Variable	gl	F _{calc}	R ²	C.V.
Bioactivos				
FST	2	113.97 *	0.971	3.130
AT	2	405.20 *	0.993	3.877
AA	2	228.00 *	0.972	4.740
Microorganismos				
Bacterias	2	1.73 ns	0.812	65.075
Hongos	2	0.93 ns	0.732	142.926
Levaduras	2	0.80 ns	0.954	67.895

gl: grados de libertad; F_{calc}: valor de F calculado; R²: coeficiente de determinación del ajuste con el modelo lineal estadístico; C.V.: coeficiente de variación (%); FST: fenoles solubles totales; AT: antocianinas totales; AA: antocianinas totales; *: efecto significativo de tratamientos a ($P \leq 0.05$); ns: efecto no significativo de tratamientos a ($P \leq 0.05$).

Durante la vida de anaquel de las tortillas, se observó que el contenido de antocianinas totales (AT) en el tiempo 0 fue de 36.7 mg ECG 100 g⁻¹ de MS, a los 5 días pasó a 44.9 mg y a los 15 días estuvo en 40.3 mg ECG 100 g⁻¹ de MS, lo que representa un incremento de 22.3 % y de 9.8 %, respectivamente. En fenoles solubles totales (FST),

dentro de los cuales se encuentra las antocianinas, se observó que al tiempo 0 fueron de 116.3 mg EAG 100 g⁻¹ de MS, a los 5 días pasó a 135.3 mg EAG 100 g⁻¹ de MS y a los 15 días de almacenamiento, el contenido de fenoles fue de 129.4 mg EAG 100 g⁻¹ de MS, estos resultados muestran un ligero incremento de 16 % y 11.3 %, respectivamente. En cuanto a la actividad antioxidante (AA), los resultados obtenidos por el método de ABTS indican que la AA de las tortillas evaluadas de los distintos tratamientos (T2, T5 y T6) fue acorde al contenido de AT y FST (Figura 13).

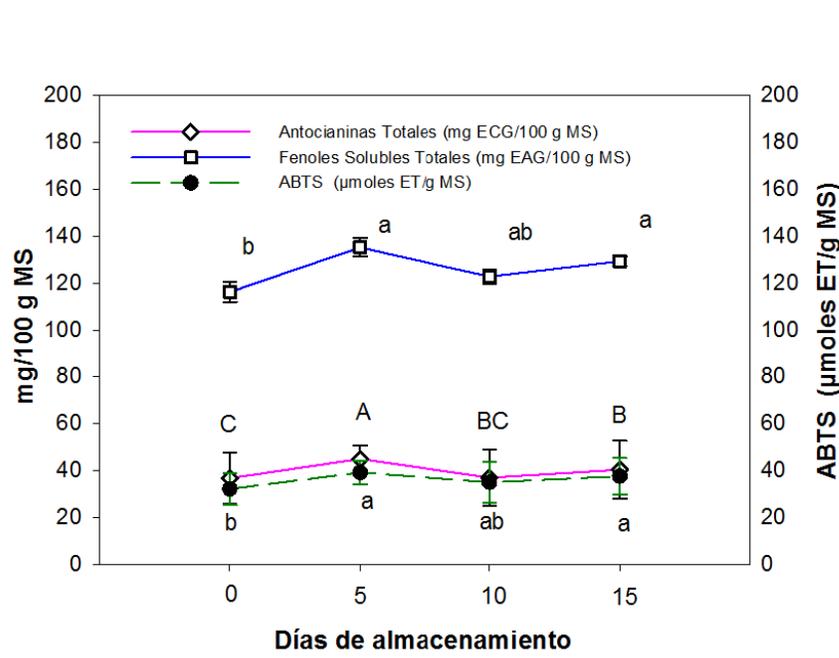


Figura 13. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas almacenadas en refrigeración a 5 °C.

Las antocianinas son inestables y especialmente sensibles a los cambios en el pH, la temperatura o la composición de la atmósfera, y durante la vida de anaquel la estabilidad de estos compuestos es influenciada por factores como características de empaque, condiciones del almacenamiento y las características físicas y químicas del producto (De Pascual-Teresa *et al.*, 2008). Varios estudios realizados sobre el efecto del

almacenamiento en refrigeración de productos con colorantes tipo antociano mencionan la posible reducción de la tasa de degradación de las antocianinas totales, debido a la estructura de la aglicona y tipo de azúcar conjugado, ya que la glucosa, sacarosa y maltosa presentan mayor estabilidad que los azúcares arabinosa, fructosa y lactosa, la exposición del producto a bajas tasas de oxígeno y atmósferas de nitrógeno durante el almacenamiento conlleva a una menor degradación de estos compuestos (Howard *et al.*, 2012).

El mayor contenido de antocianinas se presentó en el T5 con 49.2 mg ECG 100 g⁻¹ MS y fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al T2 y T6, en tanto que el menor contenido lo obtuvo el T2 con 17.6 mg ECG 100 g⁻¹ de MS. En el contenido de fenoles, el tratamiento T6 mostró el mayor valor con 145.9 mg EAC 100 g⁻¹ de MS y fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) a los tratamientos T2 y T5, los cuales presentaron valores de 97.1 mg y 125.3 mg EAC 100 g⁻¹ de MS en ese orden (Figura 14). La AA entre tratamientos mostró un patrón similar al contenido de AT y FST, en donde el menor valor fue en el T2 con 26.1 $\mu\text{m ET g}^{-1}$ de MS, y el mayor valor lo presentó el T6 con 43.1 $\mu\text{m ET g}^{-1}$ de MS (datos no mostrados).

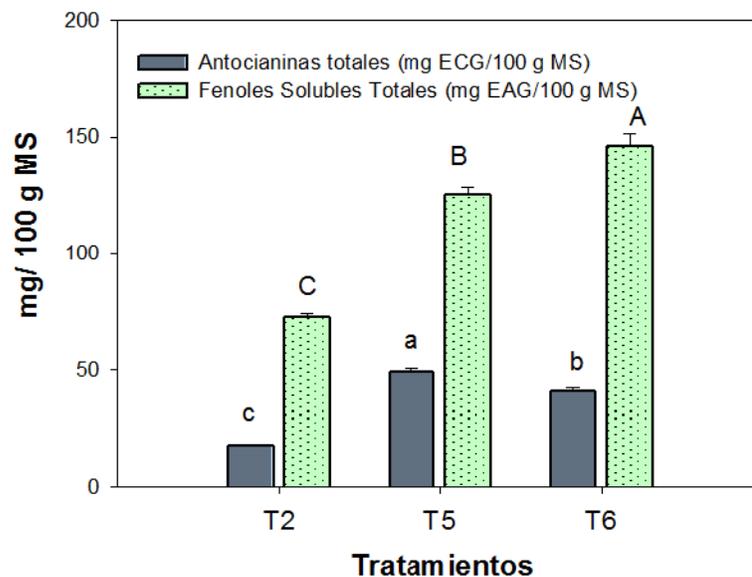


Figura 14. Contenido de antocianinas totales y fenoles solubles totales en tortillas de los diferentes tratamientos evaluados en vida de anaquel.

3.6.2 Análisis microbiológico de tortillas almacenadas en refrigeración

En este estudio, bacterias, levaduras y hongos se sembraron en placas petrifilm 3M. El uso de petrifilm para el recuento en los alimentos es aprobado por métodos de la AOAC Internacional.

El comportamiento de los microorganismos evaluados en los tratamientos T2, T5 y T6 durante los tiempos de almacenamiento se muestra en la Figura 15. En la cuantificación de bacterias coliformes, se observó que los tratamientos presentaron durante el almacenamiento una tendencia de incremento de unidades formadoras de colonia (UFC). Mientras que para hongos y levaduras, únicamente se observó presencia de UFC al final de este periodo (15 días). En la cuantificación de coliformes totales no se observó la presencia de UFC en ningún tiempo de almacenamiento.

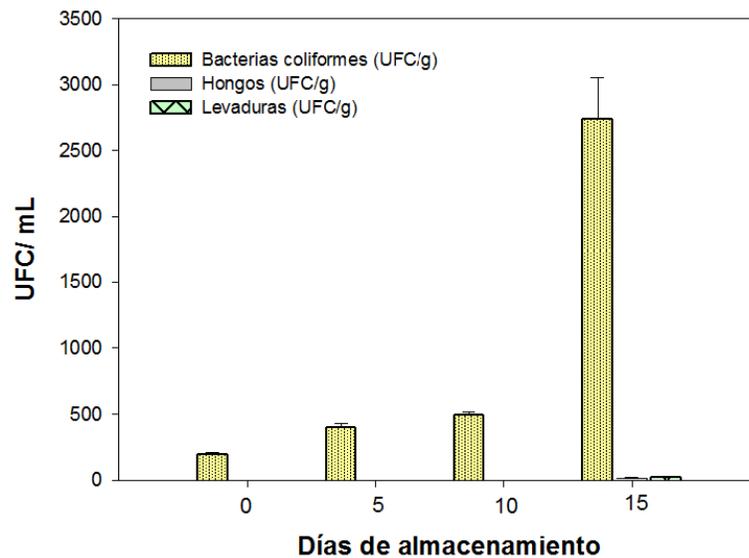


Figura 15. Cuenta de bacterias mesófilas, hongos y levaduras en tortillas azules evaluadas en vida de anaquel.

La mayores niveles de microorganismos presentes al final del periodo de almacenamiento pudo deberse a la temperatura de congelación (-10 °C) a la que se sometieron las muestras de los tiempos 0, 5 y 10 una vez concluido su periodo de almacenamiento, mientras que las muestras a los 15 días no se congelaron. Los microorganismos presentan una temperatura óptima para su crecimiento, por lo que con temperaturas superiores al máximo o inferiores al mínimo de crecimiento, su reproducción decrece o inclusive llega a detenerse (Barreiro-Méndez *et al.*, 2006). De acuerdo a los valores obtenidos entre tratamientos, las tortillas del T6 mostraron un mayor nivel de bacterias mesófilas (1263 UFC mL⁻¹) que el resto de tratamientos; sin embargo, no se encontraron diferencias (P>0.05) entre ellos. Los niveles de hongos y levaduras fueron superiores en el T5 con 3.9 y 15 .4 UFC mL⁻¹ en este orden (Figura 16).

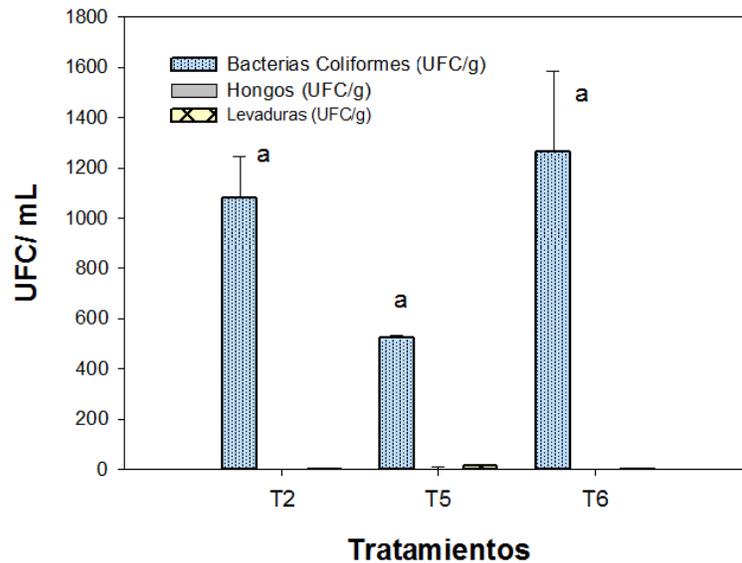


Figura 16. Cuenta de bacterias mesófilas, hongos y levaduras en tortillas azules obtenidas de los distintos tratamientos evaluados en vida de anaquel.

Los resultados obtenidos en los tratamientos en estudio, están dentro de lo permitido por la norma NXM-147 (1996) para alimentos a base de cereales, la cual indica un límite máximo de 10000 UFC g⁻¹ para mesofílicos aerobios, menor a 30 UFC g⁻¹ para coliformes totales y 300 UFC g⁻¹ para mohos. Sin embargo, la norma NXM-187 (2002) para productos de grano nixtamalizado, reporta únicamente el límite máximo para coliformes totales (< 30 UFC g⁻¹).

Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, ocurren varios cambios químicos que involucran los componentes internos de los alimentos y los factores ambientales externos. Estos cambios pueden causar deterioro y reducir la vida de anaquel del alimento. Según Adolphson *et al.* (2013), la vida útil de las tortillas en fresco es corta, debido al crecimiento microbiano significativo durante su elaboración, por ciertas condiciones como el alto contenido de humedad, la disponibilidad de

nutrientes y temperatura de almacenamiento. Además, factores como la concentración de cal, el tiempo de remojo en la solución alcalina y otros parámetros del proceso, pueden desempeñar un papel importante en la microflora de la masa (Adolphson *et al.*, 2013).

La remoción del oxígeno, ya sea al vacío o mediante su desplazamiento con gases no reactivos como el nitrógeno, en combinación con un empaque adecuado es una técnica para prevenir procesos de deterioro en el alimento (Barreiro-Méndez *et al.*, 2006). Sin embargo, el empaque de plástico no es permeable al oxígeno, por lo que puede transcurrir un tiempo para modificarse los niveles de O₂ y CO₂ en el interior del empaque (Thompson, 1998), creando un posible ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos.

4 Conclusiones

El tratamiento T6 presentó el mayor contenido de FST y AT con valores de 164.9 mg EAG 100 g⁻¹ MS y 58.8 mg ECG 100 g⁻¹ MS en ese orden, equivalente a una actividad antioxidante de 44.73 y 48.6 µmoles ET g⁻¹ de MS por el método ABTS y ORAC respectivamente.

La formulación del T6 mostró un 58 % más de antocianinas y las tortillas obtenidas de este tratamiento presentaron características favorables de color y textura similares a la tortilla azul tradicional. Sin embargo, estas tortillas obtuvieron una mayor tasa de hidrólisis y como consecuencia un mayor IG que la tortilla blanca (T1) y la tortilla azul tradicional (T2).

Durante el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración, las tortillas de los distintos tratamientos (T2, T5 y T6) tuvo efecto sobre el contenido de fenoles. La presencia de microorganismos (Bacterias, Hongos y Levaduras) en las tortillas de los tratamientos evaluados, se observó a los 15 días de almacenamiento, obteniendo un mayor nivel de UFC el tratamiento T6 seguido del T2 y finalmente el T5.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Se logró desarrollar una formulación de la tortilla azul con características de color y textura similares a la tortilla azul tradicional, y con alto contenido de antocianinas equivalente a una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, esta tortilla obtuvo una mayor tasa de hidrólisis y como consecuencia un mayor IG que la tortilla blanca y la tortilla azul tradicional.

Durante la vida de anaquel de las tortillas formuladas, se observó que el contenido de antocianinas y fenoles solubles totales fueron estables a partir del día 5 de almacenamiento y con niveles bajos de cuenta microbiológica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AACC (1995). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. American.. (1995). American Association of Cereal Chemists, 9 th edition. St. Paul, MN.
- AACC (2000). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. American. American Association of Cereal Chemists, 10 th edition. St. Paul, MN.
- Abdel-Aal, E.S.M, & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Journal Cereal Chemistry*. 76 (3): 350-354.
- Adolphson, S., Dunn, M., Jefferies, L., & Steele, F. (2013). Isolation and characterization of the microflora of nixtamalized corn masa. *International Journal of Food Microbiology*. 167: 209-213.
- Agama-Acevedo, E., Salinas-Moreno, Y., Pacheco-Vargas, G., & Bellos-Pérez, L. (2011). Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2: 317-329.
- Aguilera-Ortíz, M., Reza-Vargas, C., Chew-Madinaveitia, R., & Meza-Velázquez, J. (2011). Propiedades Funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 12 (2): 16-22.

- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3): 6
- Antonio, M., Arellano, J., García de los Santos, G., Miranda, S., Mejía, A., & Gonzáles, F. (2004). Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Fitotecnia Mexicana*. 27: 9-15.
- Antuna-Grijalva, O., Rodríguez-Herrera, S., Arámbula-Villa, G., Palomo-Gil, A., Gutierrez-Arías, E., Espinosa-Banda, A., Andrio-Enríquez, E. (2008). Calidad nixtamalera y tortilla en maíces criollos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31(3): 23-27.
- Aragón-Cuevas, F., Taba, S., Hernández-Casillas, J., Figueroa-Cárdenas, J., Serrano-Altamirano, V., & Castro-García, F. (2006). Catálogo de maíces criollos de Oaxaca. N°6: INIFAP-SAGARPA (Ed), Oaxaca, México. Pp 5-8.
- Arámbula-Villa, G., Yáñez-Limón, J., Vorobiev-Vasilievich, Y., & González-Hernández, J. (2000). Coeficiente efectivo de difusión de agua en masa de maíz nixtamalizado por extrusión. *Agrociencia*. 34: 717-727.
- Association of Official Analytical Chemists AOAC. (1999). Official Method 991.43 Total dietary fiber. *Official Methods of Analysis*. Washington, D.C.
- Barreiro-Méndez, J., & Sandoval-Briceño, A. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Carlos Pacheco (ed) Venezuela. Equinoccio (Ed). Pp 47-50
- Bedolla, S., & Rooney, W. (1982). Cooking maize for masa production. *Cereal Food World*. 27 (5): 219-221.

- Bello-Pérez, L., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Nuñez-Santiago, C., & Paredes-López, O. (2002). Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*. 36: 319-328.
- Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E., & Ortiz, M. (1990). Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during rural tortilla preparation. *Cereal Chemistry*. 6: 515-518.
- Bridle, P., & Timberlake, C. (1996). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*. 58(1): 103-109.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins: color stabilization effects. In: *Anthocyanins as food colors*. Academic Press (Ed), New York, 261p.
- Cao, G., Alessio, H., & Culter, R. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med* 14: 303-311.
- Castañeda-Ovando, A., Pachecho-Hernández, P., Páez-Hernández, E., Rodríguez, J., & Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113: 859-871.
- Castillo, V., Ochoa, M., Figueroa, C., Delgado, L., Gallegos, I., & Morales, C. (2009). Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 4: 425- 432.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 79 (1): 131-141.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO, (2011). Obtenido de Biodiversidad Mexicana:

<http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maíces/razas2011.html> (12 de Mayo de 2011)

Cortés, M., Chiralt, A., & Puente, L. (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Revista Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia, 12(1): 5-14.

Cortéz-Gómez, A., Salinas-Moreno, Y., Martín-Martínez, E., & Martínez-Bustos, F. (2006). Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of cereal science*. 43 (1): 57-62.

Cruz-Moreno, A. (2013). Mezcla de maíces azules para lograr una formulación de tortilla azul nutraceutica. Tesis profesional, UACH. Chapingo, México, 56 p.

Cuevas-Montilla, E., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2008). Análisis y caracterización de anocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) Boliviano. *In: Memorias*. Red-Alfa Langrotech, Comunidad Europea. Cartagena. Pp 79-95.

De la Parra, C., Serna-Saldivar, S., & Hai-Liu, R. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortilla and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4177-4183.

De Pascual-Teresa, S., & Sanchez-Bellesta, M. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry*. 7: 281-299.

Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C., Serna-Saldivar, S., & Talcott, S. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) productos. *Food Research International*. 36: 696-703.

- Del Pozo-Insfran, D., Serna-Saldivar, S., Brenes, C., & Talcott, S. (2007). Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chemistry*. 84 (2): 162-168.
- Dykes, L., & Rooney, L. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Food World*. 52 (3): 105-111.
- Englyst, H., & Cummings, J. (1988). Improved method for the measurement of dietary fibre as nonstarch polysaccharide in plant foods. *Assoc. Off. Anal. Chem*, 71: 808-814.
- Escalante-Aburto, A., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P., Borrón-Hoyos, M., Figueroa-Cárdenas, J., & López-Cervantes, J. (2013). La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Revista Mexicana*. 36 (4): 429-437.
- Fernández-Suárez, R., Morales-Chávez, L., & Gálvez-Mariscal, A. (2013). Importancia de los Maíces Nativos de México en las dieta Nacional. Una revisión indispensable. *Fitotecnia Mexicana*. 36: 275-283.
- Flores-Farías, R., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., & Ríos, E. (2002). Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*. 36: 557-567.
- Food and Agricultural production. Obtenido de Organización de las Naciones, FAO. (1993). *El maíz y la nutrición*. Roma. Disponible en <http://www.fao.org>. Fecha de consulta: 5 de Diciembre de 2012).
- Food and Agricultural production. Obtenido de Organización de las Naciones, FAO. (2012). *Food and Agricultural production*. Disponible en <http://www.fao.org>. Fecha de consulta: 5 de Julio de 2013).

- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*. 63 (4): 435-440.
- Fox, G., & Manley, M. (2009). Hardness methods for testing maize kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(13): 5647-5657.
- Galicia, L., Miranda, A., Gutiérrez, M., Custodio, O., Rosales, A., Ruíz, N., & Palacios, N. (2012). Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México. Pp 54.
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J., & Sánchez, F. (2004). Physicochemical changes in the hull of corn grain during their alkaline cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 3831-3837.
- Goñi, I., García-Alonso, A., & Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17: 427-437.
- Granfeldt, Y. (1994). Food factors affecting metabolic responses to cereal products. Doctoral dissertation, Dept. of Applied Nutrition and Food Chemistry, Lund University. Pp 649-660.
- Granfeldt, Y., Björck, I., Drews, A & Tovar, J. (1992). An in vitro method based on chewing to predict metabolic responses to starch in cereal and legumes products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 649-660.
- Harborne, J. (1963). Plant Polyphenols-XI. The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry*. 3(4) 131-140.

- Hernández-Uirbe, J., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. (2007). Chemical composition and in vitro starch digestibility of pigmented corn tortilla. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 2482-2487.
- Herrera-Cabrera, B., Castillo-González, F., Sánchez-Gonzalez, J., Ortega-Paczka, R., & Goodman, M. (2000). Caracteres morfológicos para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Fitotecnia Mexicana*. 23: 335-354.
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.-G., Sjöberg, L.-B., & Lundquist, I. (1986). A Rapid Method for the Analysis of Starch. *Starch- Stärke*. 38 (7): 224-226.
- Howard, L., Prior, R., Rohana, L., & Lay, J. (2012). Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 6678- 6603.
- Jenkins, D., Wolever, T., Taylor, R., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J., & Goff, D. (1981). Glycemic index of food: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 34: 364-366.
- Jha, S. (2010). Colour measurements and Modeling In: *Nondestructive evaluation of food quality. Colour Measurements and Modeling*, En Jha (ed). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. Pp 17-40.
- Jones, J., & Case, V. (1990). Sampling handling and analyzing plant tissue samples. *In. Soil testing and plant analysis*. Westerman R.L, (Ed.). Pp 389- 427.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923-033.
- López-Martínez, L., Parkin, K., & García, H. (2011). Phase II-Inducing Polyphenols content and antioxidant capacity of corn (*Zea mays* L.) from phenotypes of

- white, blue, red and purple colors processed into masa and tortilla. *Plant Food Human Nutrition*. 66:41-47.
- Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H., SanMartín-Martínez, E., Sánchez-Silencio, F., Chang, W., Barrera-Arellano, D., & Ríos, E. (2001). Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalization process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:1455-1462
- Martínez-Flores, H., Gaytán-Martínez, M., Figueroa-Cárdenas, J., Martínez-Bustos, F., Reyes-Vega, M., & Rodríguez-Vidal, A. (2004). Efecto de algunos conservadores sobre la vida útil de tortillas de maíz obtenidas a partir de masa extruida. *Agrociencia*. 38: 285- 292.
- Mazza, G. (2002). *Functional food: biochemical and processing aspects*. W. Elliot, & D. Elliot (ed), Pennsylvania, USA. CRC Press (Ed). Pp 95-96.
- Mazza, G. (2002). *Functional food: biochemical and processing aspects*. *Carbohydrate Polymers*. 50: 95-96.
- McGuire, R. (1992). Reporting objective color measurements. *Horticultural Science*. 27: 1254-1255.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J., Serna-Saldívar, S., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Scienc*. 52: 502-508.
- Navarrete, A. (2012). *Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Latinoamericana de Química, México*. Pp7-10.
- Nayak, B., Berrios, J., & Tang, J. (2014). Impact of food processing on the glycemic index (GI) of potato products. *Food Research International*. 56: 35-46.

- NXM-034 (2002b). Norma Oficial Mexicana. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-cereales-maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado-especificaciones y métodos de prueba. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Dirección General de Normas. México, D.F. 18 p.
- NXM-147 (1996). Norma Oficial Mexicana. Cereales y sus productos. Alimentos a base de cereales y Productos de panificación. Secretaría de Salud, México, D.F. Disponible en www.salud.gob.mx. Fecha de consulta: 20 de Abril de 2014).
- NXM-187 (2002). Norma Oficial Mexicana. Masa, tortilla, tostadas y harinas prepradas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Secretaría de Salud. México, D.F. Disponible en <http://www.salud.gob.mx>. Fecha de consulta: 20 de Abril de 2014).
- Ortiz-Monasterio, J., Palacios-Rojas, N., Meng, E., Pixley, K., Trethowan, R., & Peña, R. (2007). Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science*. 46: 293-307.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Pior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619- 4626.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. (2008). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*. Pp 60-70.
- Re, R., Pellergrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 96: 1231-1237.

- Rice-Evans, C.A., & N.J. Miller. G. Paganga. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicine*. 20: 933-956.
- Rodríguez-Mendez, L. (2013). Evaluación de propiedades fisicoquímicas y nutraceuticas de harina y tortilla elaboradas con un proceso de nixtamalización ecológica. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Querétaro, 110p.
- Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30:279-291.
- Salinas, M., Salas, S., Rubio, H., & Ramos, L. (2005). Characterization of Anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*. 43:485-487.
- Salinas, M.Y., & Vázquez, G. (2006). Metodología de análisis de la calidad nixtamalera-tortillera en maíz. Folleto Técnico No 23. Centro de Investigación Regional del Centro, Campo Experimental Valle de México. Laboratorio de Maíz. Pp 74-76.
- Salinas-Moreno, Y., Cruz-Chávez, F., Días-Ortíz, S., & Castillo-González, F. (2012a). Granos de maíces pigmentados de chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutraceutico. *Fitotecnia Mexicana*. 35(1): 33-41.
- Salinas-Moreno, Y., García-Salinas, C., Coutiño-Estrada, B., V, & Vidal-Martínez, V. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Fitotecnia Mexicana*. 36: 285-294.
- Salinas-Moreno, Y., Gómez-Montiel, N., Cervantes-Martínez, J., Sierra-Macías, M., Palafox-Caballero, A., Betanzos-Mendoza, E., & Coutiño-Estrada, B. (2010). Calidad nixtamalera y tortillera en maíces del trópico húmedo y subhúmedo de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1 (4): 509-523.

- Salinas-Moreno, Y., Martínez-Bustos, F., Soto-Hernández, M., Ortega-Paczka, R., & Arellano-Vázquez, J. (2003). Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia*. 37:617-628.
- Salinas-Moreno, Y., Pérez-Alonso, J., Vázquez-Carrillo, G., Aragón-Cuevas, F., & Velázquez-Cardelas, G. (2012b). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia*. 46: 693-706.
- Salinas-Moreno, Y., Soto-Hernández, M., Martínez-Bustos, F., González-Hernández, V., & Ortega-Paczka, R. (1999). Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Fitotecnia Mexicana*. 22: 161-174.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. (2013). Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta: 19 de Marzo de 2013).
- Serna-Saldivar, S., Gutiérrez-Urbe, J., Mora-Rochin, S., & García-Lara, S. (2013). Potencial nutracéutico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Fitotecnia Mexicana*. 36: 295-304.
- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. (2012). Situación actual y perspectivas "1996-2010". México. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: 20 de Abril de 2012.
- Singh, T., & Cadwallader, K. (2002). *The Shelf Life of Food: An Overview*. Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana. American Chemical Society: Washington, DC. 21p.

- Singlenton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetric of total phenols with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Snow, P., & Dea, K. (1981). Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in food. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 34: 2721-2727.
- Steele, K., Dickin, E., Keerio, M., Samad, S., Kambona, C., Brook, R., & Frost, G. (2013). Breeding low-glycemic index barley for functional food. *Field Crops Research*. 154: 31-39.
- Thompson, K. A. (1998). *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*, Second Edition. London, UK: MPG Books Group (Ed). 250 p.
- Vázquez-Carrillo, G., Pérez-Camarillo, J., Hernández-Casillas, J., Marrufo-Díaz, M., & Martínez-Ruiz, E. (2010). Calidad de grano y de tortilla de maíces criollos del Altiplano y Valle del Mezquital, México. *Fitotecnia Mexicana*. 3: 49-56.