



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**  
**Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

**Compuestos Bioactivos y Propiedades  
Pro-Apoptóticas de Maíz (*Zea mays* L)  
Criollo Azul Procesado en Células de  
Cáncer de Colon Humano**

# **T E S I S**

Que presenta

**MC Nallely Gaxiola Cuevas**

Como requisito para  
obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en  
Biotecnología de Alimentos**

Director de Tesis

**Dr Jorge Milán Carrillo**

**Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno**

**Culiacán Rosales, Sinaloa, México**

**Julio 2017**

## Presentación

La presente investigación, titulada “Compuestos Bioactivos y Propiedades Pro-Apoptóticas de Maíz (*Zea mays* L) Criollo Azul Procesado en Células de Cáncer de Colon Humano, se llevó a cabo en los Laboratorios del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología (Laboratorio de Nutraceuticos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas / Unidad de Investigación, Facultad de Medicina), Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C Dr Vicente Adrián Canizalez Román, Dra Claudia del Rosario León Sicarios, Dra Saraid Mora Rochín, Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez, Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno, Dr Jorge Milán Carrillo participaron como Asesores Académicos. Los dos últimos Investigadores fungieron como Director de Tesis. Este investigación forma parte de los proyectos “Perfiles y Niveles de Fitoquímicos en Maíces (*Zea mays* L.) Mexicanos Criollos Pigmentados. Capacidad Antioxidante e Inhibición de la Proliferación Celular” [Proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) – Secretaría de Educación Pública (SEP), Ciencia Básica 168,279] y “Evaluación de la Actividad Antioxidante en Células HEP-G2 de Fitoquímicos de Tortillas Elaboradas con Maíces Criollos del Estado de Sinaloa” [Proyecto del Programa de Fomento y Apoyo a la Investigación – Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAPI-UAS) 2014/137]. La C MC Nallely Gaxiola Cuevas recibió Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Doctorado) del CONACyT en el periodo 2013-2017.

## Agradecimientos

A las personas e instituciones que directa e indirectamente hicieron posible esta investigación:

A los **Dres Cuauhtémoc Reyes Moreno y Jorge Milán Carrillo** por permitirme ser parte de su gran equipo de investigadores desde hace 10 años, por creer y confiar en mí para desarrollar investigación científica. Gracias por la formación profesional que he adquirido en este tiempo.

A la **Dra Saraíd Mora Rochín** por ser mi guía en este trayecto de formación, por su ayuda en todos los sentidos pero sobre todo por su amistad sincera.

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

Al **Dr Vicente Adrián Canizalez Román** y a su equipo de trabajo, en especial a la **MC Erika Acosta Smith** por la disposición, ayuda y asesoría para la realización de este trabajo en la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina, UAS.

A los (as) **Dres Roberto Gutiérrez, Evelia Milán, Perla Reyes, Liliana León, Álvaro Montoya y Luis Sánchez**, por su ayuda y observaciones en este trabajo de investigación.

A mi compañera y gran amiga la **MC Dulce María Domínguez Arispuro** por que empezamos juntas este trayecto de formación, dándonos apoyo, ayuda y ánimos para siempre salir adelante de la mejor manera. Gracias amiguita.

A mis compañeros de laboratorio: **Gaby, Eslim, Evelyn, Yuriana, Astrid, Jocelyn, Briseida, Carolina, Mariela, Carlos, Radamés, Oscar y Eduardo**, por su compañerismo, su apoyo, sus observaciones y comentarios. En verdad gracias.

A las siguientes instituciones por los apoyos proporcionados que hicieron posible esta investigación: **Universidad Autónoma de Sinaloa** (Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y Facultad de Medicina) y **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**.

A mi madre **María del Refugio Cuevas Sánchez** por ser mi brazo derecho pero también el izquierdo, por ser mi apoyo total en cualquier proyecto de vida que deseo emprender.

A mi esposo **Dr Sergio Arturo Galaviz Hernández** por apoyarme incondicionalmente en mi formación profesional y estar ahí cuando más lo necesito.

A mis hermanos **Lic Karla Gaxiola, LCP César Gaxiola y Yossi Gaxiola**, por su ayuda y apoyo durante mis estudios y por que son mis ejemplos a seguir.

## Dedicatoria

*A mi amigo, mi complice, mi ángel, mi padre... Que dios te tenga en su santa gloria*

*(Ing Eladio Gaxiola Camacho)*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
I RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
A CÁNCER DE COLON	6
1 Generalidades	6
2 Epidemiología	8
3 Causas	9
a Estrés oxidativo	9
b Inflamación crónica	11
4 Apoptosis	15
5 Quimioprevención	19
a Nutracéuticos	22
1) Compuestos fitoquímicos	25
B MAÍZ AZUL	26
1 Generalidades	26
2 Compuestos nutracéuticos asociados al maíz azul	31
a Polifenoles	35
1) Ácidos fenólicos	35
2) Antocianinas	37
b Actividad antioxidante	39
1) Métodos químicos de capacidad antioxidante	40
2) Ensayo de actividad antioxidante celular (AAC)	41
c Actividad anticancerígena	42
1) Estudios <i>in vitro</i>	43
2) Ensayos <i>In vivo</i>	43
C PROCESAMIENTO DEL MAÍZ AZUL	44
1 Proceso de Nixtamalización	45
a Efecto de la nixtamalización sobre los compuestos fitoquímicos	45
2 Proceso de cocción alcalina por extrusión	46
a Efecto de la extrusión sobre los compuestos fitoquímicos	46
IV JUSTIFICACIÓN	48
V OBJETIVOS	49
A GENERAL	49
B ESPECÍFICOS	49
VI MATERIALES Y MÉTODOS	50
A MATERIALES	50
B MÉTODOS	50
1 Producción de harinas instantáneas de maíces	50
a Harinas de maíz nixtamalizado	50
b Harinas de maíz extrudido	50

2	Elaboración de tortillas de harinas de maíz nixtamalizado y extrudido	50
3	Determinación del contenido de compuestos fenólicos	51
a	Extracción de fenólicos libres	51
b	Extracción de fenólicos ligados	51
c	Fenólicos totales	51
4	Determinación del contenido de antocianinas totales	52
5	Determinación de niveles y perfiles de ácidos fenólicos	52
6	Determinación de la capacidad antioxidante por métodos químicos	53
a	Método ORAC	53
b	Método ABTS	53
c	Método DPPH	54
7	Determinación de la actividad antioxidante celular (AAC)	54
a	Cultivo de células HepG2	54
b	Ensayo de citotoxicidad	54
c	Ensayo de actividad antioxidante celular (AAC)	55
d	Cuantificación de AAC	55
8	Evaluación del potencial inhibitorio de proliferación en células de cáncer de colon humano (HT-29) y células antitumorales (NIH-3T3)	56
a	Cultivo de células	56
b	Ensayo de proliferación celular	56
c	Determinación de la $CI_{50}$	57
d	Evaluación de la muerte celular. Apoptosis y Necrosis	57
9	Análisis estadístico	57
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	58
A	TORTILLAS DE MAÍCES NIXTAMALIZADOS Y EXTRUDIDOS	58
B	NIVELES Y PERFILES DE FITOQUÍMICOS (CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES, ANTOCIANINAS Y ÁCIDOS FENÓLICOS) DE TORTILLAS DE MAÍZ CRIOLLO AZUL Y BLANCO COMERCIAL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL Y COCCIÓN ALCALINA POR EXTRUSIÓN	58
1	Contenido de fenólicos totales	58
2	Contenido de antocianinas totales	61
3	Contenido de ácidos fenólicos	63
C	BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES EN TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL Y BLANCO COMERCIAL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL Y COCCIÓN ALCALINA POR EXTRUSIÓN	67
1	Determinación de capacidad antioxidante química (ORAC, ABTS y DPPH)	67
2	Actividad antioxidante celular (AAC)	69
3	Valores de $EC_{50}$ por AAC	71
4	Calidad antioxidante celular	73
D	POTENCIAL INHIBITORIO DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO (HT-29) Y CÉLULAS ANTITUMORALES (NIH-3T3) DE EXTRACTOS LIGADOS DE TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN Y COCCIÓN ALCALINA POR	74

	EXTRUSIÓN	
	1 Viabilidad celular	74
	2 Efecto de extractos ligados de tortillas de maíz criollo azul sobre la inducción de apoptosis y necrosis en células HT-29 y NIH-3T3	81
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	84
<b>IX</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	86
	Abreviaturas	104
	Anexos	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Esquema de los principales genes y vías de señalización que dirigen la progresión del cáncer colorrectal	7
2	Importancia de la homeostasis redox para la función celular	10
3	Reacciones bioquímicas asociadas con la oxidación-dependiente que contribuyen a la biología del cáncer	12
4	La producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) causa progresión de múltiples tipos de cáncer	13
5	El defecto de la barrera mucosa con respuesta inflamatoria alterada induce células epiteliales intestinales a señales proliferativas y de supervivencia no controladas	16
6	Principales vías del mecanismo de apoptosis	18
7	Estructuras químicas de algunas drogas derivadas del platino	20
8	Mecanismo de acción del Cisplatino en una célula tumoral	21
9	Resumen de los factores que influyen la aparición de cáncer de colon	23
10	Ilustración esquemática de varios tipos de nutracéuticos utilizados en la prevención y el tratamiento del cáncer	24
11	La visión clásica de los efectos oxidantes-antioxidantes sobre la señalización celular y su respuesta	27
12	Razas nativas de maíz identificadas en el estado de Sinaloa	29
13	Estructura del grano de maíz azul	30
14	Estructuras de ácidos fenólicos comunes	36
15	Estructura genérica de los principales flavonoides y formas básicas de antocianinas	38
16	Tortillas	59
17	Perfil de ácidos fenólicos por HPLC de extractos libres de maíz azul	64
18	Perfil de ácidos fenólicos por HPLC de extractos ligados de maíz azul	65
19	Curvas de respuestas de los cultivos de las líneas celulares	77
20	Histogramas de los cultivos de las líneas celulares	78
21	Medida de la apoptosis temprana y apoptosis total (temprana + tardía) + necrosis en HT-29 y NIH-3T3	82



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Principales categorías de nutraceuticos asociados con maíces criollos	32
2	Compuestos fitoquímicos en genotipos de maíz blanco y azul	34
3	Contenido de fenólicos totales y porcentaje de contribución en maíz criollo azul y blanco comercial y en sus tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión	60
4	Contenido de antocianinas totales y porcentaje de contribución de maíz criollo azul y sus tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión	62
5	Composición de ácidos fenólicos en maíz criollo azul y blanco comercial y en sus tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión	66
6	Capacidad antioxidante química de maíz criollo azul y blanco comercial y en tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión	68
7	Actividad antioxidante celular (AAC) de las fracciones libres, ligadas y totales de maíz azul y blanco comercial y sus tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión	70
8	Valores de EC <sub>50</sub> de extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial y de tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión	72
9	Calidad antioxidante celular de extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial y de tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión	75
10	Porcentaje de viabilidad e inhibición celular en células HT-29 y NIH-3T3 de extractos ligados de maíz azul crudo y sus tortillas elaboradas por nixtamalización y extrusión	79
11	Valores CI <sub>50</sub> de extractos ligados de maíz azul crudo, tortillas de maíz nixtamalizado y extrudido	80

## I RESUMEN

Se ha investigado que maíces (*Zea mays* L.) criollos pigmentados mexicanos contienen diversos tipos de compuestos bioactivos incluyendo ácidos fenólicos, antocianinas, carotenoides entre otros. Estas sustancias fitoquímicas que poseen actividad biológica relacionada con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenas han recibido mayor atención desde una perspectiva nutraceutica. En la presente investigación se discute la actividad quimiopreventiva de sustancias fitoquímicas contenidas en tortillas procesadas a través de nixtamalización y extrusión por cocción alcalina a partir de granos de maíz criollo azul (A-512) y blanco comercial (B-111), originarios del estado de Sinaloa. La hipótesis planteada consistió que compuestos bioactivos presentes en tortillas nixtamalizadas (TN) y extrudidas (TE) logran aportaciones beneficiosas para la salud en prevención de cáncer de colon. Para la primera parte de este estudio, se evaluó el perfil fitoquímico (compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos, antocianinas) y propiedades nutraceuticas (actividad antioxidante química y celular). Ambos procesos empleados para la producción de tortillas promovieron decrementos en fenólicos totales, ácidos fenólicos, antocianinas, actividad antioxidante química (AOX) y celular (AAC). TE alcanzaron porcentajes de retención entre 79,6-83,5%, 74,1-77,6% y 79,8-80,5% de valores de fenólicos totales, ABTS y ORAC respectivamente, en comparación con 47,8-49,8%, 41,3-42,3% y 43,7-44,4% observados en TN. Aproximadamente 72,5-88,2% de ácido ferúlico en granos sin procesar y sus correspondientes tortillas se encuentran presente en forma ligada. Sin embargo, porcentajes retenidos en TN y TE de AAC varió entre 47.4-48.7% y 72.8-77.5%, respectivamente, con respecto a los granos sin procesar. Para la segunda parte del estudio se examinó la actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon humano HT-29 y NIH-3T3. Tratamientos en células HT-29 con dosis 20, 35 y 50 mg/mL de extractos de fitoquímicos ligados de maíz azul criollo, TN y TE exhibieron efecto citotóxico mayor. Los valores de  $CI_{50}$  de 29.3, 34.6 y 33.1 mg/mL se observaron para maíz crudo, TN y TE, respectivamente. Sin embargo, dichos extractos en células NIH-3T3 exhibieron efecto citotóxico menor. Además, incremento en la dosis de los mismos extractos de maíz azul (A-512) y TN y TE percibimos inducción de apoptosis. Estos resultados revelan que tortillas elaboradas por la tecnología de cocción alcalina por extrusión permite una mayor retención de niveles de fitoquímicos, particularmente ácido ferúlico y antioxidantes. Asimismo, fitoquímicos ligados de maíz criollo azul y TE exhibieron mejor efecto citotóxico en células HT-29, razón para ser un alimento quimiopreventivo cuando sea consumido.

## ABSTRACT

It has been investigated that Mexican pigmented maize (*Zea mays* L.) contain various types of bioactive compounds including phenolic acids, anthocyanins, carotenoids and others. These phytochemicals that have biological activity related to antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects have received greater attention from a nutraceutical perspective. The present investigation discusses the chemopreventive activity of phytochemical substances contained in tortillas processed through nixtamalization and extrusion cooking from blue (A-512) and commercial white (B-111), originating in the state of Sinaloa. The proposed hypothesis consented that bioactive compounds present in nixtamalized (TN) and extruded (ET) tortillas achieve beneficial contributions to health in the prevention of colon cancer. For the first part of this study, the phytochemical profile (total phenolic compounds, phenolic acids, anthocyanins) and nutraceutical properties (chemical and cellular antioxidant activity) were evaluated. Both processes used for the production of tortillas promoted decreases in total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, chemical antioxidant activity (AOX) and cellular (CAA). TE reached retention rates between 79.6-83.5%, 74.1-77.6% and 79.8-80.5% of total phenolic compounds, ABTS and ORAC respectively, as compared to 47.8- 49.8%, 41.3-42.3% and 43.7-44.4% observed in TN. Approximately 72.5-88.2% of ferulic acid in raw kernels and their corresponding tortillas are present in bound form. However, percentages retained in TN and TE of CAA varied between 47.4-48.7% and 72.8-77.5%, respectively, with respect to raw kernels. For the second part of the study antiproliferative activity was examined in human colon cancer cells HT-29 and NIH-3T3. Treatments in HT-29 cells at doses 20, 35 and 50 mg / mL of bound phytochemical extracts from criole blue maize, TN and TE showed greater cytotoxic effect. The  $IC_{50}$  values of 29.3, 34.6 and 33.1 mg / mL were observed for raw corn, TN and TE, respectively. However, such extracts in NIH-3T3 cells exhibited minor cytotoxic effect. In addition, increase in the doses of the same extracts of blue maize (A-512) and TN and TE we perceive induction of apoptosis. These results reveal that tortillas made by the extrusion alkaline cooking technology allow a greater retention of phytochemical levels, particularly ferulic acid and antioxidants. Also, phytochemicals of blue maize and TE exhibited better cytotoxic effect in HT-29 cells, reason to be a chemopreventive food when consumed.

## II INTRODUCCIÓN

México es considerado como centro de origen y domesticación de maíz (*Zea mays* L.), conserva la mayor diversidad de recursos genéticos de maíz a nivel mundial, con alrededor de 59 razas de maíz identificadas (Sánchez y col 2000). Hay varios genotipos pigmentados (amarillos, rojos, azules, morados, entre otros). En el estado de Sinaloa, más de 300 accesiones de maíz han sido identificadas y clasificadas en 13 razas de maíz, siendo Tabloncillo y Elotero de Sinaloa razas nativas distintivas de esta región del noroeste, las cuales se definen como material que ha sido cultivado durante cientos de años bajo las mismas condiciones de cultivo agrícola (Pineda-Hidalgo y col 2013).

El maíz nativo pigmentado ha ganado prominencia debido a sus diversos beneficios para la salud en la reducción del riesgo de diversas enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes tipo 2 y cáncer, las cuales están íntimamente relacionados con su amplia gama de fitoquímicos (Tsuda y col 2003, Tsuda 2012, Urias-Lugo y col 2015; Reynoso-Camacho y col 2015); Estos compuestos bioactivos son principalmente ácidos fenólicos, antocianinas y carotenoides, entre otros (López-Martínez y col 2009; Acosta-Estrada y col 2014) los cuales podrían desempeñar un papel de antioxidante natural y ser capaces de funcionar para evitar o retrasar la oxidación a neutralizar radicales libres, así como otros mecanismos tales como propiedades antiinflamatorias, inhibición de enzimas oxidativas e inducción de enzimas de desintoxicación (Fardet y col 2008; López-Martínez y col 2011; Mendoza-Díaz y col 2012).

La tortilla es la principal forma de consumo del maíz, y constituye el alimento básico diario en México y Centroamérica. Recientes estudios relacionados con los maíces criollos pigmentados han confirmado que presentan características adecuadas para la industria de la masa y la tortilla (Jiménez-Pérez y col 2015). Aunado a esto, la tortilla elaborada a partir de maíz pigmentado cuenta con actividades biológicas relacionadas con la prevención del estrés oxidativo, actividad antimutagénica y reducción de la carcinogénesis de colon, debido al contenido alto de fitoquímicos bioactivos (Mendoza-Díaz y col 2012; Gutiérrez-Urbe y col 2014; Reynoso-Camacho y col 2015; Bello-Pérez y col 2015; Mora-Rochín y col 2016).

Las tortillas se elaboran primordialmente por el proceso de cocción alcalina, llamado *nixtamalización*. El término *nixtamalización* se refiere al proceso de cocción alcalina del maíz para la elaboración de alimentos, como las tortillas y aperitivos (patatas fritas de maíz, tortillas chips, y tacos) (Serna-Saldívar y col 1990). Aunque este proceso mejora en gran medida las

propiedades fisicoquímicas y estructurales, así como el valor nutricional de la tortilla, también afecta la concentración de fitoquímicos y actividad antioxidante (Mendoza-Díaz y col 2012; Gutiérrez-Urbe y col 2014; Bello-Pérez y col 2015). La cocción alcalina por *extrusión* es un proceso alternativo para la elaboración de masa apta para tortillas, con características similares a las contrapartes producidas utilizando procesos tradicionales (Milán-Carrillo y col 2006). Los productos de maíz obtenidos por cocción alcalina por extrusión, son considerados alimentos integrales, debido a que retienen todas las partes anatómicas del grano, preservando de esta forma los nutrimentos y fitoquímicos asociados a ellas (Aguayo-Rojas y col 2012; Serna-Saldívar y col 2013). Ciertos estudios han mostrado que la cocción alcalina por extrusión coadyuva a preservar valores de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de tortillas elaboradas de maíces criollos pigmentados en mayor medida que la nixtamalización tradicional (Mora-Rochín y col 2010; Aguayo-Rojas y col 2012; Alam y col 2014; Sánchez-Madriral y col 2014).

Varios estudios sobre actividad antioxidante en el maíz pigmentado y sus productos derivados se han centrado principalmente en los ensayos de actividad antioxidante química (De la Parra y col 2007, Mora-Rochín y col 2010; Aguayo-Rojas y col 2012). Sin embargo, estos métodos químicos son excelentes para medir la actividad antioxidante en sistemas simples. No son capaces de predecir la actividad antioxidante en sistemas biológicos más complejos. Para este propósito, el ensayo de AAC es un método más adecuado que el químico, porque proporciona una evaluación biológica de la actividad antioxidante. De hecho, la AAC determina la complejidad en los sistemas biológicos y algunos aspectos como, la captación, el metabolismo y la localización de los compuestos antioxidantes dentro de las células (Wolfe y Liu 2007; López-Alarcon y Denicola 2013).

Por otro lado, la gran diversidad de sustancias fitoquímicas en granos integrales tienen la capacidad de neutralizar a los radicales libres, previniendo de esta forma el daño celular y por consecuencia el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Liu y Finley 2005; Reynoso-Camacho y col 2015). A diferencia de las frutas y vegetales, los fitoquímicos bioactivos en granos enteros están presentes tanto en forma libre, soluble conjugada, así como ligados a componentes de la pared celular del grano (Adom y Liu 2002). Diversas investigaciones han demostrado que los fitoquímicos ligados contenidos en la capa externa del grano, logran sobrevivir al tracto gastrointestinal llegando al colon, y gracias a que contienen los más altos niveles de compuestos fenólicos y actividad antioxidante logran tener un efecto quimiopreventivo sobre todo contra el cáncer de colon (Aguayo-Rojas y col 2012; Jiménez-Nevárez 2015).

Recientemente, estudios han reportado en granos de trigo pigmentado, cebada, arroz y semillas de lino diversos contenidos de AAC (Liu y col 2015; Zhu y col 2015). Asimismo, algunos trabajos han demostrado el efecto antiproliferativo en células de cáncer de colon humano de compuestos fitoquímicos provenientes de granos de cereales enteros (Ferguson y col 2005; Janicke y col 2011; Whent y col 2012). Sin embargo, no existe evidencia científica sobre AAC y actividad anticancerígena en células de cáncer de colon humano de maíces pigmentados y sus productos derivados. Además, los estudios sobre efecto del procesamiento de cocción-alkalina (nixtamalización) y extrusión por cocción alcalina sobre los fitoquímicos y antioxidantes de los productos de maíz son escasos.

### III REVISIÓN DE LA LITERATURA

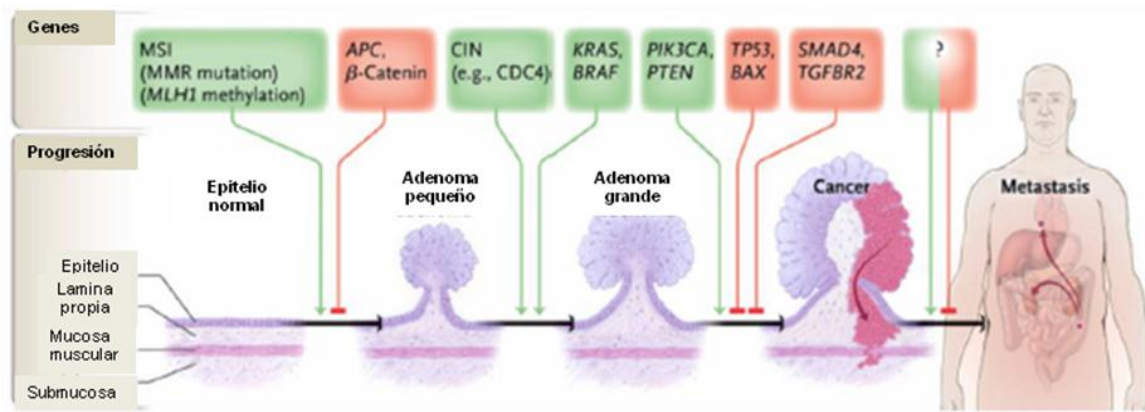
#### A CÁNCER DE COLON

##### 1 Generalidades

El cáncer, es considerado como una de las enfermedades más mortales y es caracterizado por el crecimiento incontrolado de células anormales (Pérez-Herrero y Fernández-Medarde 2015). Es una enfermedad genética causada por factores internos como mutaciones hereditarias, hormonas y condiciones inmunes; y factores ambientales / adquiridos (tales como tabaco, dieta, radiación y organismos infecciosos). Estos factores modulan genes como proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN a través de intermediarios celulares (Sadikovic y col 2008). Los intermediarios celulares son relativamente inestables pero influyen en las vías de señalización celular, que son mediadas principalmente a través de los siguientes factores de transcripción: factor-K B (NF- $\kappa$  B), transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) -3, factor inducible por hipoxia (HIF) -1 \ alpha, quinasas, diversos factores de crecimiento, citoquinas y otras proteínas (**Fig 1**).

El cáncer colorrectal (CCR) ó cáncer de colon es un proceso multifactorial influenciado por factores genéticos, epigenéticos y ambientales. El CCR puede ser hereditario, causado por enfermedades inflamatorias del intestino o esporádico. En CCR hereditario, las mutaciones genéticas heredadas se manifiestan en genes, tales como genes supresores de tumores, genes asociados con la reparación del ADN u otros genes. Estas producen un crítico desajuste con padecimientos como la poliposis adenomatosa polipoidea (FAP) y cáncer de colon hereditario no polipoideo (HNPCC). La segunda causa es la enfermedad intestinal inflamatoria crónica, debida a la alta carga de estrés oxidativo presente en la mucosa intestinal. La tercera, la causa esporádica, y la más frecuente en este padecimiento, se debe a mutaciones genéticas somáticas (normalmente en los mismos genes que los citados para el CCR hereditario) que se producen como parte de la vida celular normal o debido a la exposición a factores ambientales tales como carcinógenos de la dieta (Young y col 2005).

Evidentemente la vía de carcinogénesis colorrectal no es una sola y probablemente existan varios caminos para el inicio, desarrollo y progresión de un tumor colorrectal. Los avances de la biología molecular y en concreto, el estudio de las neoplasias hereditarias ha permitido establecer actualmente, dos vías moleculares bastante bien establecidas por las que se produce la oncogénesis colorrectal (Grife 1998):



**Fig 1.** Esquema de los principales genes y vías de señalización que dirigen la progresión del cáncer colorrectal. Las flechas rojas señalan genes supresores de tumores que han de inactivarse para que el tumor continúe su desarrollo y las verdes indican vías, situaciones y oncogenes activados durante dicho proceso.

**Markowitz y Bertagnolli (2009)**



1) *La vía supresora de tumores o vía clásica*, está caracterizada por las alteraciones en el balance cromosómico (inestabilidad cromosómica), que se manifiesta en el desarrollo de tumores con alto grado de aneuploidía. Estos tumores presentan pérdidas de heterocigosidad frecuentes en múltiples loci, así como mutaciones que activan a oncogenes e inactivan o bloquean a genes supresores tumorales, encontrándose mutados con mayor frecuencia los oncogenes K-ras, así como los genes supresores tumorales APC (gen de la poliposis adenomatosa coli) y p53, genes guardianes de la proliferación celular en el epitelio del colon. El 85% de los tumores colorrectales esporádicos, al igual que la poliposis adenomatosa familiar, surgen como consecuencia de la acumulación de alteraciones en las células de la mucosa cólica, afectando principalmente genes clave del ciclo celular (por ejemplo: APC, K-RAS y TP53).

2) *La vía mutadora*, caracterizada por la alteración de uno o más genes reparadores del DNA (MMR), y otras mutaciones secundarias que afectan a genes involucrados en las vías de señalización del crecimiento (por ejemplo: TGFβRII y IGFRII), y de la apoptosis (por ejemplo: BAX). Las células con deficiencias en los genes MMR pierden la capacidad de reparar debidamente los errores que ocurren espontáneamente durante el proceso de replicación del ADN, y por ello acumulan mutaciones que afectan sobretodo a las secuencias microsatélites.

Debido a su importancia en la prevención de este tipo de cáncer, numerosos equipos de investigación se han centrado en identificar los factores ambientales implicados en su iniciación, promoción y progresión (Derry y col 2013a).

## **2 Epidemiología**

Es alarmante el número de casos y muertes por cáncer a nivel mundial. La Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer GLOBOCAN, estimó que alrededor de 14 millones de nuevos casos de cáncer fueron diagnosticados en todo el mundo en 2012 y aproximadamente 8 millones de muertes ocurrieron por cáncer.

El cáncer es un importante problema de salud pública en los Estados Unidos y en muchas otras partes del mundo. Informes recientes indican que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 2 hombres en los Estados Unidos desarrollarán cáncer durante su vida. Es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, y se espera que supere las enfermedades del corazón en pocos años. La American Cancer Society (ACS) estimó que 1, 685,210 nuevos casos de cáncer serán diagnosticados y 595,690 individuos murieron de cáncer en 2016 en los Estados Unidos (Siegel y col 2016). De acuerdo al Reporte Mundial de Cáncer (2014; [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/Fs297 / es /](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/Fs297/es/)), más del 60% de los nuevos casos de

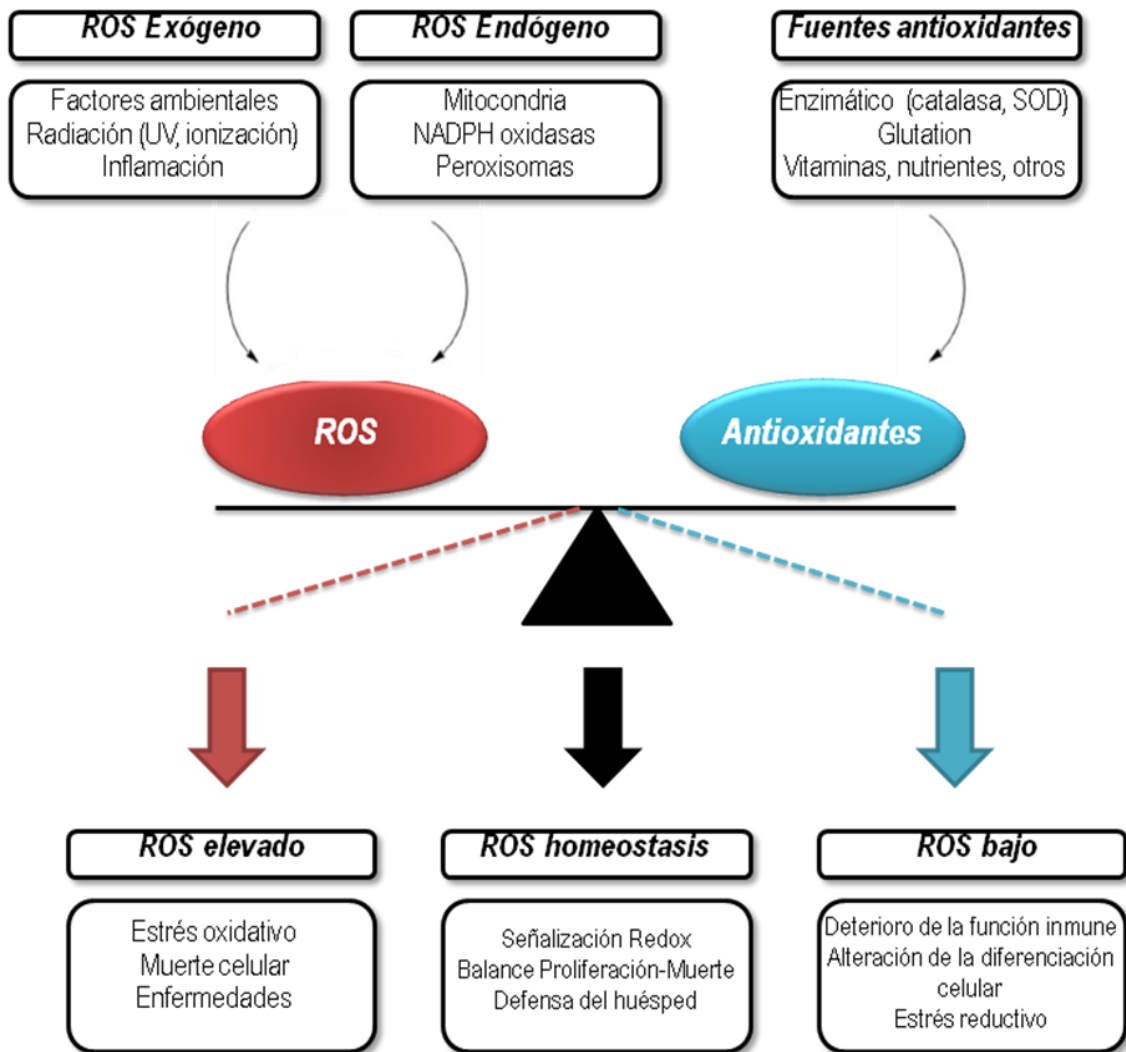
cáncer del mundo ocurren en África, Asia y América Central y del Sur; el 70% de las muertes por cáncer también ocurren en estas regiones. En 2010, los gastos en los Estados Unidos para el cuidado del cáncer fueron alrededor de \$125 mil millones de dólares, y este costo podría alcanzar los \$156 mil millones de dólares en 2020.

En los hombres los cánceres más frecuentes son: pulmón, hígado, estómago, colon y próstata; mientras que en las mujeres los más comunes son: mama, pulmón, colon, cervicouterino y estómago. El cáncer de colon, con 1.4 millones de nuevos casos registrados en todo el mundo, es el tercer tipo más frecuente de cáncer (19.4% del total), solo superado por el cáncer de pulmón (1.8 millones de casos) y de mama (1.7 millones de casos). En México, es el cuarto cáncer más frecuente, y de acuerdo con el INEGI en el 2010 se reportaron 74 685 muertes por cáncer, de los cuales 4 033 muertes fueron a causa de cáncer de colon.

### **3 Causas**

#### **a Estrés oxidativo**

En las últimas décadas, ha aumentado el interés por las especies reactivas de oxígeno-nitrógeno (RONS) debido a su importancia en la fisiología celular y tisular normal (Valko y col 2007). Asimismo, estas sustancias están relacionadas con el desarrollo de un amplio número de patologías degenerativas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, inflamación crónica y varios tipos de cáncer (Koutsilieri y col 2002; Closa y Folch-Puy 2004; Valko y col 2006). El estrés oxidativo se define típicamente como un desequilibrio entre la producción de ROS y la (s) respuesta (s) celular (es) para contrarrestar sus acciones (**Fig 2**). Originalmente son consideradas un simple subproducto de la respiración mitocondrial y otras vías metabólicas, es ahora bien entendido que ROS pueden ser generadas por varias fuentes endógenas celulares de una manera regulada. Entre estas las NADPH oxidasas (NOXes), una familia de complejos enzimáticos (NOX1-5 y DUOX1 / 2) que generan ROS ( $O_2^-$  y / o  $H_2O_2$ ) como su principal producto de la actividad enzimática (Lambeth 2004; Lambeth y Neish 2014), lo que implica la importancia biológica de ROS. Durante la última década, se ha reportado una extensa investigación sobre ROS en una variedad de vías de señalización implicados en la proliferación, migración y diferenciación celular (Janssen-Heininger y col 2008; Holmstrom y Finkel 2014; Reczek y Chandel 2015) y la alteración de la producción de ROS o el metabolismo se han demostrado en una variedad de patologías humanas, tales como el envejecimiento (Chandrasekaran y col 2016), la diabetes (Fakhrudin y col 2017), la aterosclerosis (Forstermann y col 2017), y el cáncer (Landry y Cotter 2014; Prasad y col 2017).



**Fig 2.** Importancia de la homeostasis redox para la función celular. La producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS) de varias fuentes está controlada por varias redes antioxidantes. La producción de ROS desregulada o los sistemas antioxidantes pueden alterar la homeostasis redox celular y contribuir a la patología.

Little y col (2017)

De hecho, las células cancerosas se caracterizan típicamente por elevadas cantidades de ROS, y varias líneas de evidencia indican su capacidad para contribuir a la progresión del cáncer (Landry y Cotter 2014; DeBerardinis y Chandel 2016).

La contribución de ROS en el cáncer es claramente muy compleja, y probablemente ocurre en varios niveles. Por ejemplo, ROS puede contribuir a la inestabilidad genómica induciendo daño oxidativo directo al ADN (Landry y Cotter 2014) o mediante la promoción de la peroxidación de lípidos para generar subproductos mutagénicos como malondialdehído o 4-hidroxinonenal, que puede formar aductos en el ADN (Block y Gorin 2012; Landry y Cotter 2014) (**Fig 3A, B**). Además, ROS tienen la capacidad de activar o inactivar vías de señalización celular que controlan la proliferación, migración, diferenciación o la supervivencia, mediante la inducción específica de reacciones de oxido-reducción (redox) mediada por modificaciones post-translacionales en objetivos sensibles a redox tales como proteínas quinasas o fosfatasa (Block y Gorin 2012; Roy y col 2015) (**Fig 3C**).

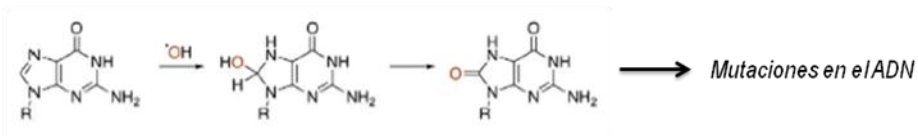
ROS se producen en todos los organismos aerobios. Como ya se mencionó, en niveles bajos, ROS muestran efectos beneficiosos, mientras que una acumulación excesiva de ROS pueden causar diversos trastornos, incluyendo diferentes tipos de carcinogénesis en diversos órganos humanos (Acharya y col 2010) (**Fig 4**).

## **b Inflamación crónica**

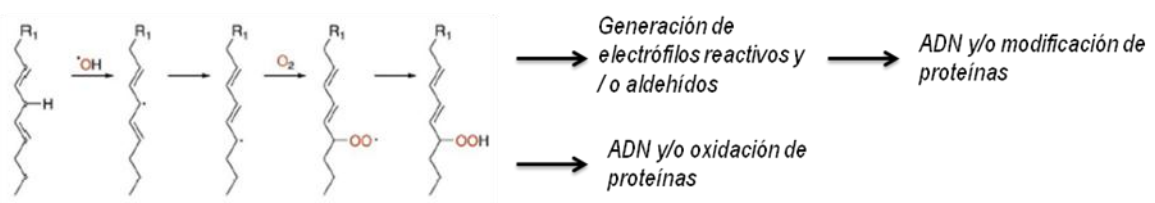
Datos experimentales consistentes sugieren la importancia del estrés oxidativo asociado a la inflamación en la patogénesis del cáncer colorrectal (CCR). La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), con inflamación intestinal crónica, se considera ahora una condición pre cancerosa. El estrés oxidativo es una característica esencial de la inflamación. La activación de los sensores redox, las señales de células pro-inflamatorias y los mediadores inflamatorios coinciden en establecer un entorno pro-tumoral (Rossin y col 2017).

La inflamación crónica contribuye a la patogénesis de la mayoría de las principales enfermedades de países occidentales. Su influencia en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer ha sido ampliamente aceptada, especialmente en aquellos tejidos que son fácilmente expuestos a lesiones por agentes ambientales tales como la mucosa intestinal (Gunter y Leitzmann 2006). La opinión de que el cáncer de colon es una consecuencia de secuencias de genes mutados (APC / vía  $\beta$ -catenina, ras / raf, p53), y modificaciones epigenéticas ha sido ampliamente aceptada (Pancione y col 2012). De todos los CCR, el 5-6% es de tipo hereditario, del 20-25% tiene una historia familiar positiva o predisposición genética,

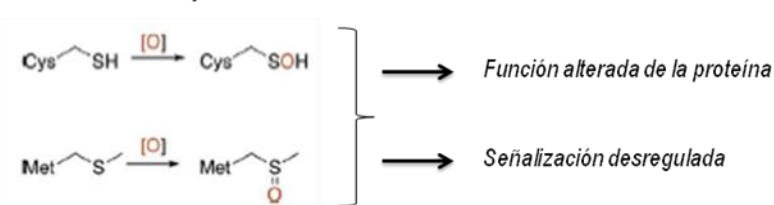
### A. Oxidación del ADN



### B. Peroxidación lipídica

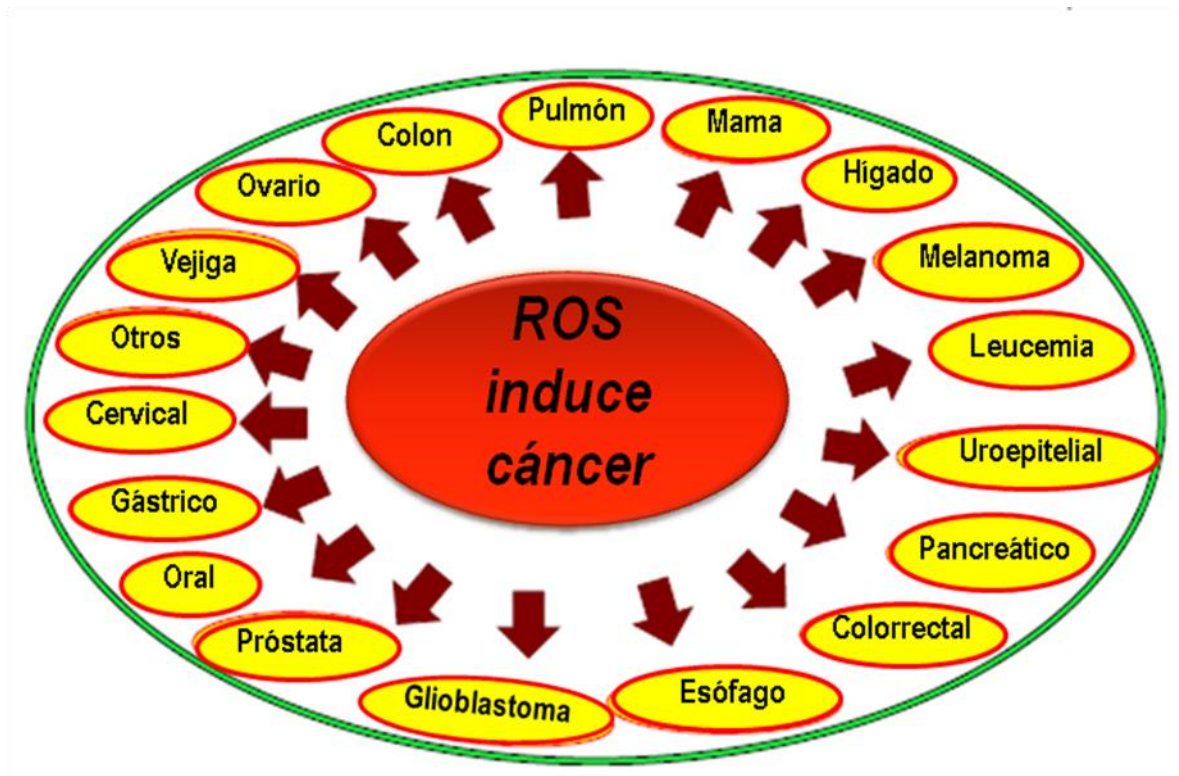


### C. Oxidación de proteínas



**Fig 3.** Reacciones bioquímicas asociadas con la oxidación-dependiente que contribuyen a la biología del cáncer. Niveles de especies reactivas de oxígeno ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que promueven eventos de oxidación tales como; (A) oxidación directa del ADN (8-oxo-guanina); (B) peroxidación lipídica, que puede conducir a la inestabilidad genómica y dar lugar a la iniciación del tumor motriz y/o progresión. El desequilibrio de ROS también puede perturbar procesos celulares dependientes de redox mediante oxidación de residuos de aminoácidos sensibles tales como metionina o cisteína (C), dando lugar a alternativas potenciales de proteína y/o señalización celular desregulada.

**Little y col (2017)**



**Fig 4.** La producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) causa progresión de múltiples tipos de cáncer.

Prasad y col (2017)

mientras que la mayoría de los casos ocurren esporádicamente como resultado de mutaciones somáticas en respuesta a factores ambientales (Migliore y col 2011).

Un gran número de factores ambientales están estrictamente involucrados en la inducción de la inflamación, que a su vez, es reconocida como una fuerza motriz en la iniciación, promoción y progresión del CCR. Es, de hecho, un evento clave en la inducción de la inestabilidad genética del cáncer (Terzić y col 2010). La colitis asociada al cáncer (CAC) es un subtipo de cáncer colorrectal, que es asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Se ha comprobado que esta asociación es responsable de las muertes en hasta un 15% de los pacientes con EII (Averboukh y col 2011). Los pacientes con EII muestran una hiperreactividad de la mucosa frente a un huésped en la flora con respuestas inmunes e inflamatorias. Esto puede ser causado por funciones alteradas de los receptores de reconocimiento de patógenos que conducen al defecto de la barrera de la mucosa con la correspondiente inducción no controlada de las señales proliferativas y de la supervivencia de células a la transformación neoplásica (Fukata y Arditi 2013; Jurjus y col 2016). El aumento del riesgo en el desarrollo de CAC en la EII depende de la persistencia de la inflamación, vinculada a una colitis de larga duración y a la extensión de la inflamación de la mucosa colónica (Fornaro y col 2016). El sello distintivo de la EII es la infiltración masiva en la lámina de células inmunes, que generan muchas citoquinas inflamatorias incluidas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , que desempeñan un papel crucial en la carcinogénesis colorrectal (Guina y col 2015).

Las señales celulares involucradas en la inflamación y en el cáncer de colon se unen por la inducción del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que se activa con frecuencia en el proceso de carcinogénesis (Mohd-Suzairi y col 2013; Sakamoto y col 2009). La activación de NF- $\kappa$ B representa el evento de limitación de velocidad que coincide con la inducción, la supervivencia y la inhibición de la apoptosis en células displásicas convirtiéndose un fenotipo tumoral. La activación crónica de NF- $\kappa$ B en el tejido intestinal se ha asociado con el estrés oxidativo. Aumentado los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se contrarresta la actividad de la tiorredoxina1, una pequeña proteína antioxidante que puede inhibir la activación de NF- $\kappa$ B interactuando con el inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y de este modo se puede prevenir su fosforilación por I $\kappa$ B quinasa (IKK); O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La producción, y consecuentemente la activación de NF- $\kappa$ B, ha sido también atribuido a la inducción mediada por TNF $\alpha$  de la enzima NADPH oxidasa, que participa activamente en la función fagocítica (Jeong y col 2009).

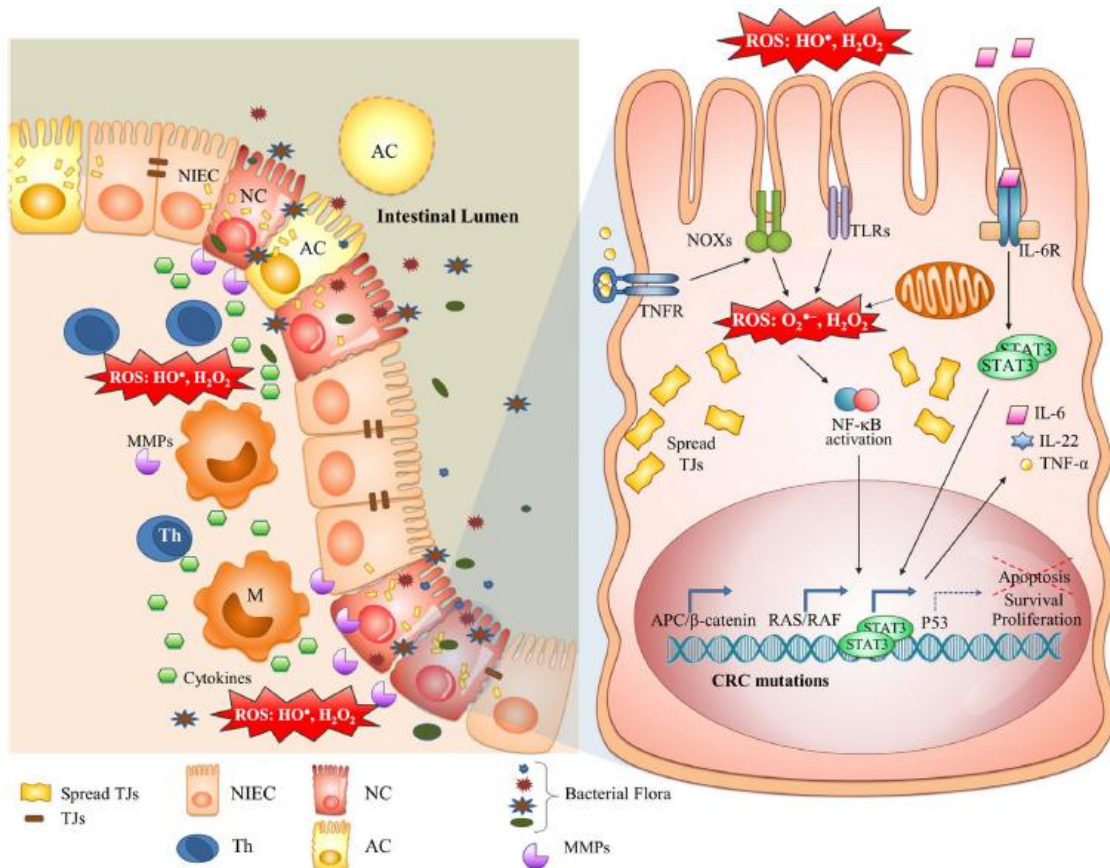
La actividad de NF- $\kappa$ B está regulada por factores de transcripción, en particular el transductor de señal y el activador de la transcripción (STAT) 3, cuya actividad se ha asociado fuertemente a la oncogénesis (Dmitrieva y col 2016). NF- $\kappa$ B, IL-6 y STAT3 se ha demostrado que representan el eje de señalización que puede regular la proliferación y la supervivencia del tumor intestinal que inicia en las células epiteliales (Grivennikov y col 2009). La activación persistente de STAT3 en el tejido colónico implica la producción de citoquinas tales como IL-22, IL-6 y TNF $\alpha$  que permiten la progresión hacia CCR (Yu y col 2013). NF- $\kappa$ B y STAT3 han demostrado mejorar la transcripción de  $\beta$ -catenina, cuya hiperactivación está presente en la mayoría de los CCR esporádicos y familiares (Grivennikov y Cominelli 2016). La orientación de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B utilizada por antioxidantes como los polifenoles, ha sido considerada como un enfoque emergente para prevenir el desarrollo de CCR (Derry y col 2013b; Raina y col 2013).

El descubrimiento de reactivo-redox Factor nuclear-Erythroid 2 (NRF2) ha sido muy interesante. Este factor de transcripción juega un papel clave en el mantenimiento del equilibrio redox en la mucosa, siendo activado por el aumento de las condiciones de las células oxidativas a transcribir varios genes que codifican las enzimas antioxidantes (Geismann y col 2014). Se ha sugerido que NRF2 causa la protección contra la inflamación asociada al CCR en la colitis en un modelo animal (Khor y col 2008). Sin embargo, NRF2 juega un papel contradictorio en el proceso de carcinogénesis dependiendo de las diferentes fases del cáncer. Suprime el desarrollo del tumor en las etapas más tempranas, pero su exceso de expresión se ha encontrado en etapas posteriores de malignidad, durante el cual las células cancerosas ya transformadas necesitan mantener antioxidante intracelular induciendo resistencia celular contra las terapias contra el cáncer (Geismann y col 2014). En la **Fig 5** se ilustran los principales eventos implicados en la inducción del daño de la barrera de la mucosa intestinal durante las reacciones inflamatorias que pueden conducir al crecimiento tumoral.

#### **4 Apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso fisiológico de muerte celular por el cual las células mueren de una forma controlada en respuesta a diversos estímulos. Se trata de un proceso fisiológico esencial en el desarrollo de un organismo, en el control de la homeostasis de la célula y en la respuesta a diferentes agentes externos como radiaciones ionizantes o agentes quimioterápicos. Los 2 principales vías que inician la apoptosis son la *vía extrínseca*, mediada por receptores de muerte CD95/Fas/Apo1, de la familia de receptores de





**Fig 5.** El defecto de la barrera mucosa con respuesta inflamatoria alterada induce células epiteliales intestinales a señales proliferativas y de supervivencia no controladas. El exceso de reacciones inflamatorias y la alteración de la función de la capa mucosa, a menudo presentes en la EII, pueden conducir a aumentar la producción de  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HO\cdot$ ,  $HOCl$  y mediadores inflamatorios por células inflamatorias, favoreciendo así la carcinogénesis del colon. Todos estos eventos dan como resultado la inducción de la supervivencia y la inhibición de la apoptosis en células displásicas que se convierten en un fenotipo tumoral. M: Macrófago; Th: linfocitos T auxiliares; MMPs: metaloproteinasas de matriz; NIEC: Célula Epitelial Intestinal Normal; NC: Célula necrótica; AC: Célula Apoptótica; TJs: Juntas estrechas.

**Rossin y col (2017)**

muerte de factor de necrosis tumoral (TNF) (Young y col 2005). Cuando el Fas-L (ligando) se une al receptor de muerte Fas, atraviesan la membrana de la célula y se unen a una proteína adaptadora (FADD) que a continuación activa la caspasa 8. La segunda, es la *vía intrínseca*, mediada por la mitocondria. En las mitocondrias, la propagación de la señal de apoptosis está regulada por proteínas tales como Bcl-2 miembros de la familia (Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w) que ejercen efectos anti-apoptóticos, y Bid, Bad, Bak, Bax y Bim, que ejercen efectos pro-apoptóticos (Reuter y col 2008). Estas regulan la liberación del citocromo C, una vez en el citosol el citocromo C se une a una proteína de unión Apaf-1, juntos activan la caspasa 9 en un complejo llamado apoptosoma. Tanto la caspasa 8 como la 9 activan la cascada de caspasas relacionadas con el proceso apoptótico para finalmente activar la caspasa-efectora-3 responsable de la fragmentación del ADN y por consiguiente, la muerte celular. Una tercera vía, es la del "estrés del retículo endoplásmico", que se ha descrito recientemente (Reuter y col 2008) (**Fig 6**). La activación de las caspasas es fundamental para el proceso de muerte celular por apoptosis. Existen tres tipos de caspasas: caspasas inflamatorias, participan en procesos de activación de citoquinas (caspasas-1, -4, -5 y -14), caspasas iniciadoras, son activadas en respuesta a señales de estrés o daño celular o cuando la célula recibe una señal de que debe morir (caspasas-8, -9,-10 y -12) y las caspasas efectoras o ejecutoras, son proteolizadas y activadas por las caspasas iniciadoras. Son responsables de la proteólisis directa de otros sustratos que producirán el cambio morfológico de la célula. La principal caspasa efectora es la caspasa-3, aunque también ejercen funciones ejecutoras las caspasas-6 y -7. La caspasa-3 es responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de los cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos.

Durante el proceso de apoptosis la morfología de la célula sufre una serie de cambios: la cromatina se condensa en la periferia nuclear, los nucléolos se desintegran y se reduce el tamaño del núcleo. El volumen celular total se reduce, la célula se encoge y se hace más densa, los orgánulos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata, pero las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales. A continuación se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que reciben el nombre de cuerpos apoptóticos y que serán fagocitados por macrófagos o células vecinas.

La desregulación de la apoptosis bien sea por exceso o por defecto puede ser causa de diversas patologías. Este proceso es un mecanismo protector contra el cáncer, mediante la

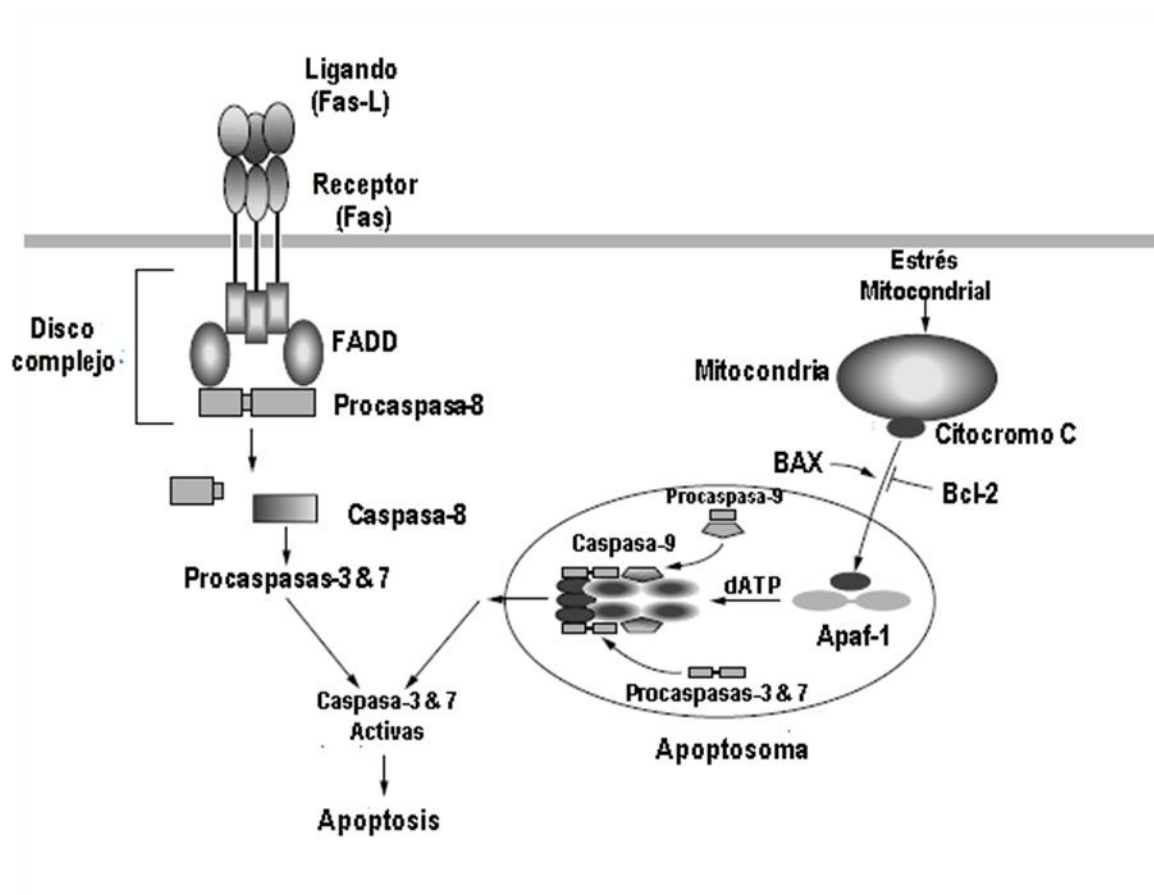


Fig 6. Principales vías del mecanismo de apoptosis.

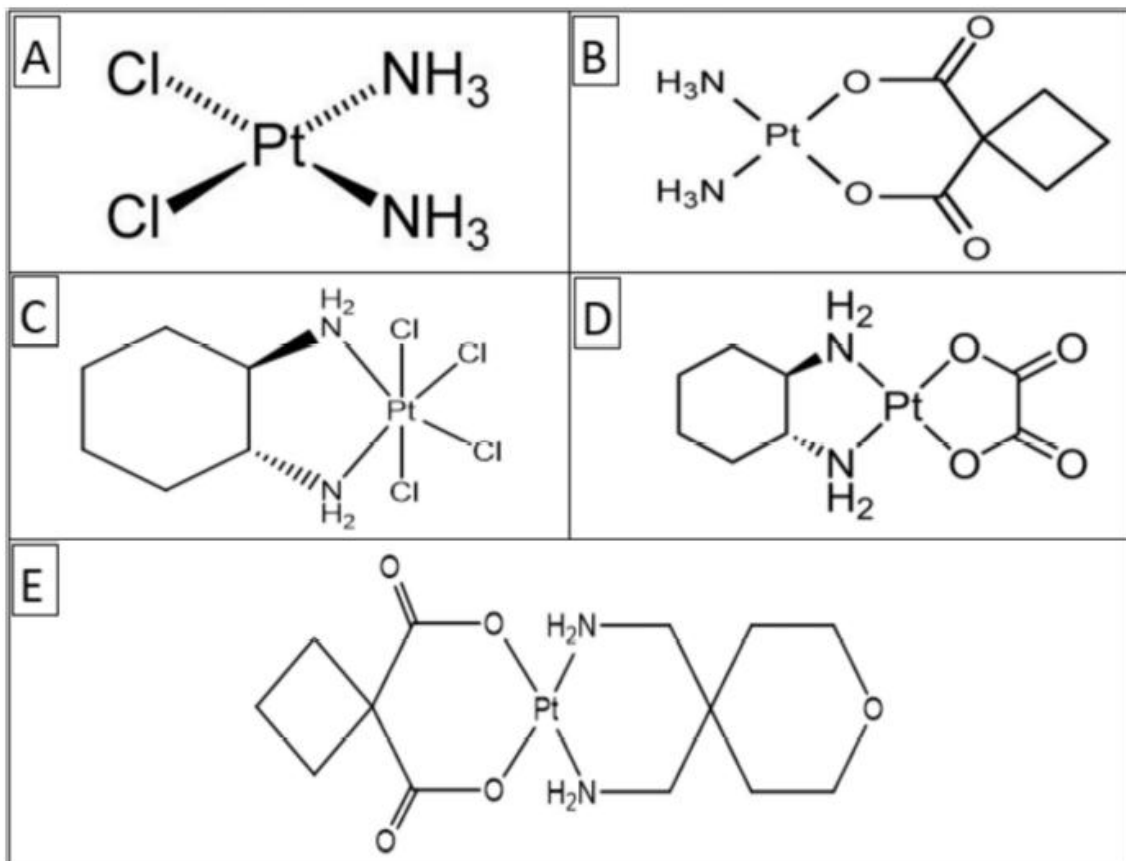
Martínez y col (2003)

eliminación de células con daño genético en células del epitelio antes de que se sometan a una expansión clonal. Por lo tanto, la resistencia a la apoptosis es un sello distintivo del cáncer (Johnson 2002). Se han descrito dos mecanismos para evadir la apoptosis principalmente. En el primero de éstos, Bcl-2, que suprime la apoptosis, se sobreexpresa. El segundo mecanismo que proporciona el cáncer es, células con resistencia a la apoptosis es la supresión del receptor Fas. Como con otros receptores, las mutaciones pueden ocurrir ya sea en el la unión del ligando de dominio o en el dominio intracelular, interfiriendo con la activación de la vía de señalización de la muerte.

## 5 Quimioprevención

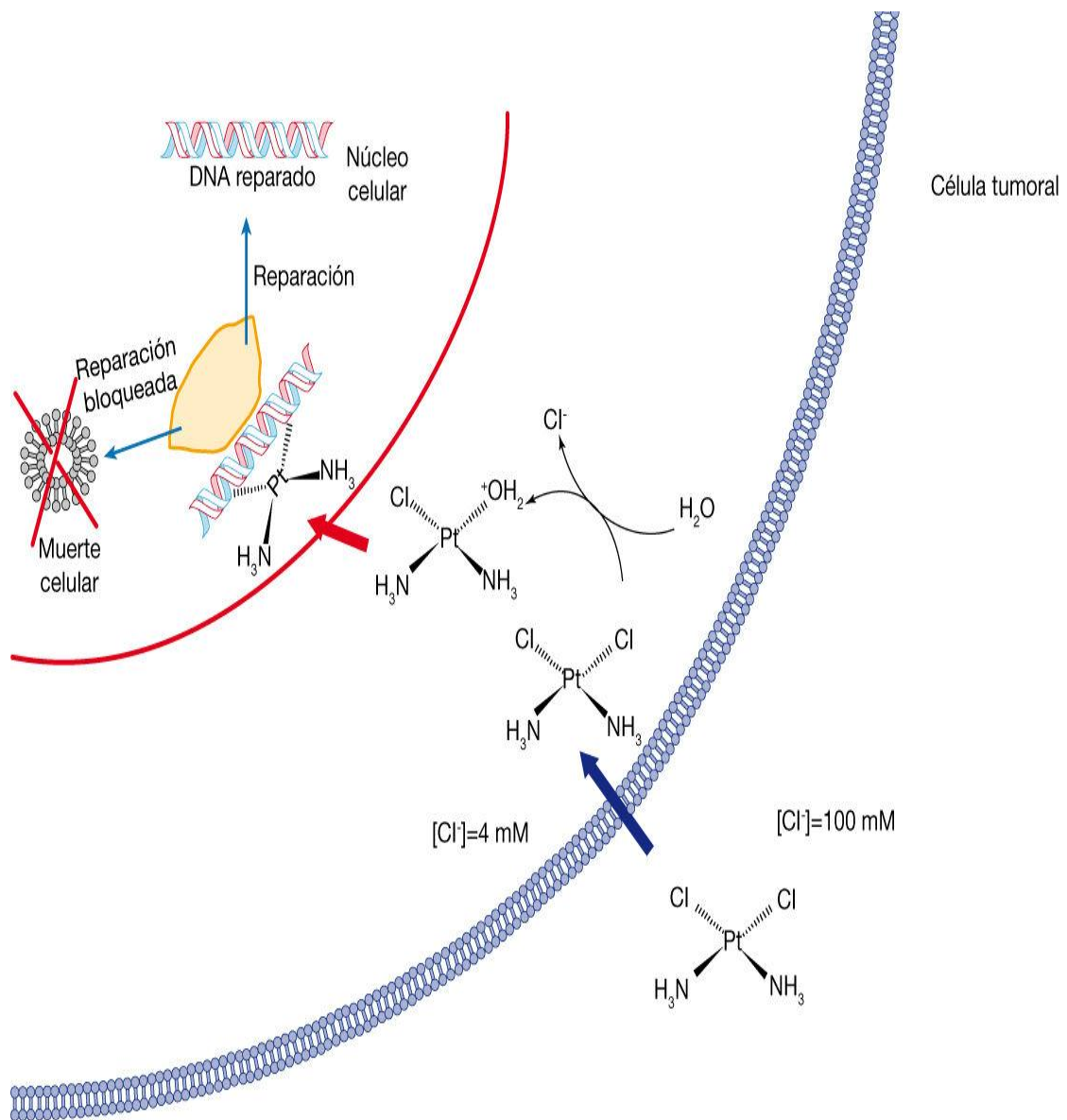
La cirugía es el principal procedimiento en los pacientes con CCR potencialmente curable. Sin embargo, existen fármacos de primera línea utilizadas para el tratamiento adyuvante en quimioterapia como el 5-fluorouracilo y los derivados del platino como cisplatino, carboplatino, oxiloplatino, ormaplatino y enloplatino (Goldberg y col 2004). Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) es un fármaco quimioterapéutico muy utilizado. Es un compuesto metálico (platino) con una geometría planar cuadrada (CISPLAT) ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) (**Fig 7**). Es un polvo cristalino blanco o amarillo intenso a amarillo-naranja a temperatura ambiente. Es ligeramente soluble en agua y soluble en dimetilprimanida y N,N-dimetilformamida. El cisplatino es estable a temperaturas y presiones normales, pero puede transformarse lentamente con el transcurso del tiempo hasta el isómero trans (Akron 2009). El cisplatino tiene un peso molecular de 301.1 gr/mol, una densidad de 3.74 gr/cm<sup>3</sup>, un punto de fusión de 270°C y una solubilidad en agua de 2.53 gr/l a 25°C.

El cisplatino se ha usado para el tratamiento de numerosos cánceres humanos incluyendo cáncer de vejiga, colon, cabeza, cuello, pulmón, ovario, mama y testicular. Es eficaz contra varios tipos de cánceres, incluyendo carcinomas, tumores de células germinales, linfomas y sarcomas. Su modo de acción se ha relacionado con su capacidad para entrecruzarse con las bases de purina en el ADN; interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN, causando daño al ADN y, posteriormente, induciendo la apoptosis en las células cancerosas (**Fig 8**) (Dasari y Tchounwou 2015). En un estudio realizado por Pruefer y col (2008) se demostró la muerte celular inducida por CDDP en células SW480 de cáncer de colon, promoviendo la vía intrínseca de la apoptosis. De acuerdo con ensayos de microscopia de fluorescencia y Western Blot este agente antineoplásico provocó la liberación del citocromo C mitocondrial y por consiguiente la



**Fig 7.** Estructuras químicas de algunas drogas derivadas del platino: A-cisplatino; B-carboplatino; C-oxaliplatino; D-ormaplatino; E-enloplatino.

**Weiss y Christian (1993)**



**Fig. 8.** Mecanismo de acción del Cisplatino en una célula tumoral.

**Dasari y Tchounwou (2015)**

activación de la caspasa 3, siendo estos eventos indicadores de la activación de la fase intrínseca de la apoptosis.

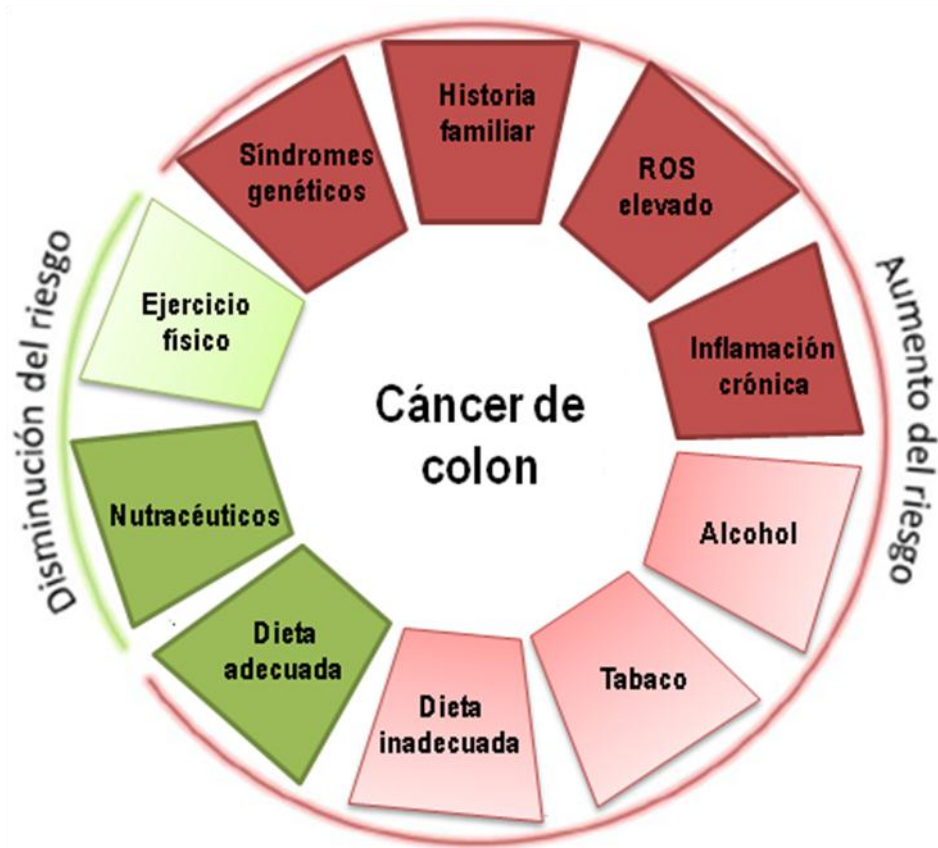
Sin embargo, estos fármacos presentan numerosos efectos secundarios tales como problemas renales graves, reacciones alérgicas, disminución de la inmunidad a infecciones, trastornos gastrointestinales, hemorragia y pérdida de audición especialmente en pacientes más jóvenes. Además, las terapias combinadas de cisplatino con otros fármacos han sido consideradas para superar la resistencia a fármacos y reducir la toxicidad (Dasari y Tchounwou 2015).

#### **a Nutracéuticos**

En los últimos años a la comunidad científica le ha llamado mucho la atención la frase "Deja que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu comida" dicha por Hipócrates. Los nutracéuticos son cualquier alimento que contiene aditivos que tienen algunos beneficios medicinales. Previenen la progresión del cáncer mediante la regulación de las vías de transducción de señales que son vitales para el desarrollo de ésta enfermedad. Además de modificar los factores del estilo de vida como método de prevención primaria del cáncer, otro enfoque es la disminución del progreso del cáncer a través de la administración de nutracéuticos (Fig 9).

Recientemente, los nutracéuticos han ganado mucha atención en el área de la investigación del cáncer, debido a sus diversos efectos y comportamiento relativamente no tóxico (Nair y col 2010). Estos son compuestos bioactivos estructural y funcionalmente diversos e incluyen numerosas sustancias tales como carotenoides, vitaminas, fibra dietética, probióticos, prebióticos, ácidos grasos y fenólicos (Fig 10) (Kalra 2003; Wang y col 2016a; Wang y col 2016b).

Los nutracéuticos varían considerablemente en sus estructuras químicas, propiedades y efectos biológicos (Bagchi y col 2015; Gupta 2016). Por ejemplo, los compuestos nutracéuticos difieren en su masa molar, estructura, polaridad, carga y grupos funcionales, lo que influye en su reactividad química, estado, característica de solubilidad, destino y funciones biológicas (McClements 2015). Algunos nutracéuticos están naturalmente presentes en alimentos enteros, tales como frutas, verduras y cereales, y por lo tanto, se consumen a menudo en esta forma. Por otro lado, otros nutracéuticos se aíslan de sus estados naturales y se convierten en aditivos que se pueden incorporar en alimentos, suplementos dietéticos o productos farmacéuticos.



**Fig 9.** Resumen de los factores que influyen la aparición de cáncer de colon. En color rojo, factores genéticos y del estilo de vida que aumentan el riesgo de aparición de la enfermedad. En verde, factores preventivos o que disminuyen dicho riesgo.

**Redondo-Blanco (2014)**



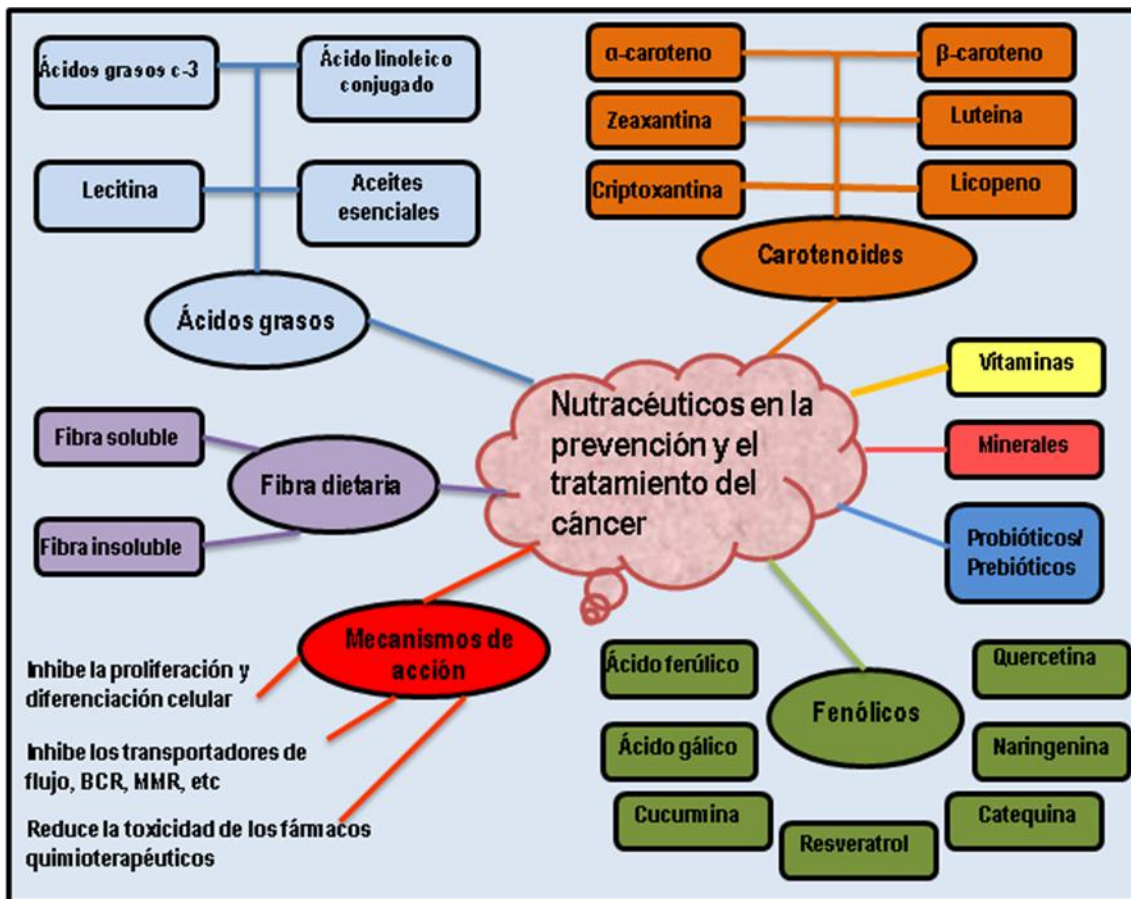


Fig 10. Ilustración esquemática de varios tipos de nutraceuticos utilizados en la prevencion y el tratamiento del cancer. Los compuestos nutraceuticos actúan inhibiendo la proliferación celular y la diferenciación de las células cancerosas.

Arora y Jaglan (2016)

Evidencias científicas demuestran que el consumo de alimentos ricos en nutraceuticos puede disminuir el riesgo de ciertos tipos de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer. Sin embargo, si los consumidores van a beneficiarse consumiendo estos alimentos con compuestos nutraceuticos es importante que tengan ciertas características:

- ✓ Los nutraceuticos deben estar inicialmente presentes en los alimentos para tener un efecto fisiológico beneficioso.
- ✓ Los nutraceuticos deben permanecer estables dentro de los alimentos funcionales durante su fabricación, almacenamiento y utilización, de lo contrario pueden perder sus efectos beneficiosos para la salud.
- ✓ No deben tener un efecto adverso sobre el color, sabor o vida útil de un producto alimenticio.
- ✓ Después de la ingestión, estos compuestos deben ser funcionales y entregados al sitio de acción apropiado dentro del cuerpo humano.

La acumulación de pruebas científicas sugiere que muchos nutraceuticos, como curcumina, resveratrol, polifenole, sulforafano, antocianinas, genisteína, quercetina y licopeno, presentan actividades contra diversos tipos de cáncer (Arvanitoyannis y Houwelingen-Koukaliaroglou 2005; Ullah y Khan 2008).

Una de las ventajas importantes de utilizar compuestos nutraceuticos para prevenir y tratar el cáncer es que generalmente presentan poco o ningún efecto adverso frecuentemente asociado con agentes farmacéuticos después de una administración a largo plazo. Se ha encontrado que los nutraceuticos ejercen una amplia gama de efectos celulares. Los posibles mecanismos de acción de los nutraceuticos incluyen la inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis en las células cancerosas, la desintoxicación de moléculas altamente reactivas, la activación del sistema inmune del huésped y la sensibilización de las células malignas a los agentes citotóxicos (Pan y Ho 2008; Kotecha y col 2016).

### **1) Compuestos fitoquímicos**

Los fitoquímicos son una clase de metabolitos secundarios de las plantas. Una dieta humana "recomendada" debe garantizar una alta proporción de energía y recientemente debe también de incluir la ingestión de fitoquímicos, para ser considerada en general "promotora de la salud" en virtud de su actividad antioxidante y modulación positiva, directa o indirectamente, del balance redox celular y tisular. La dieta actúa a través de múltiples vías, y la asociación entre el

consumo de alimentos específicos y el riesgo de las enfermedades degenerativas es extremadamente compleja.

Los compuestos fitoquímicos tienen propiedades antioxidantes in vivo, particularmente polifenoles como, flavonoides, isoprenoides y fenólicos, entre otros, por lo que se han considerado capaces de modular las respuestas celulares a varios estímulos interactuando con ROS de manera intracelular por: (i) captura de especies de oxígeno reactivo o supresión, ya sea por inhibición de las enzimas o por elementos quelantes que participan en la producción de radicales libres (Brown y col 1998), o (ii) protección de las defensas antioxidantes o regulación positiva de las proteínas intracelulares participantes en la respuesta celular antioxidante (**Fig 11**) (Surh 2003; Kweon y col 2006).

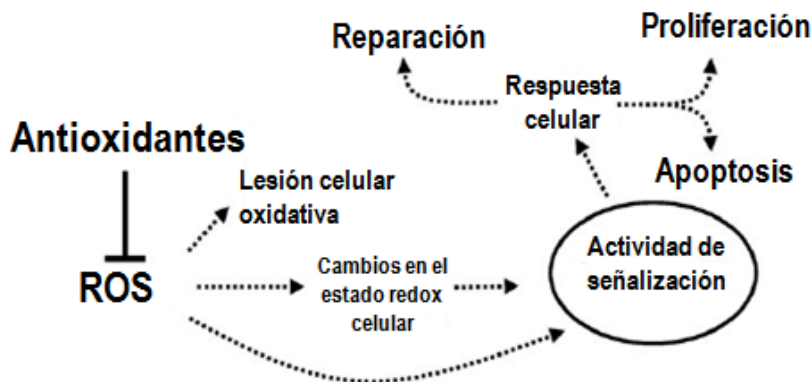
Las dos clases principales de polifenoles son flavonoides y ácidos fenólicos. Los flavonoides se clasifican además como flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, proantocianidinas y antocianinas. Los polifenoles se encuentran principalmente en frutas, hortalizas, cereales, legumbres secas, chocolate y bebidas derivadas de vegetales, tales como té, café y vino, representando, por lo tanto, los "componentes menores" más abundantes en la dieta (Manach y col 2004). Estos compuestos podrían proteger contra el cáncer a través de la inhibición del daño oxidativo (Borek 2004; Adlercreutz y col 2004). Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar la actividad biológica de los polifenoles, incluida la capacidad de afectar la actividad enzimática, regulación de la transducción de señales; modulación de los factores de transcripción en el sistema redox, incluyendo Nrf2, NF-κB y AP-1; biosíntesis de glutatión y la expresión génica en general (Krazeisen y col 2002; Chen y col 2005; Moskaug y col 2005; El Bedoui y col 2005; Lin y col 2005; Wung y col 2005; Andreadi y col 2006; Jakobs y col 2006).

## **B MAÍZ AZUL**

### **1 Generalidades**

El valor del maíz a nivel mundial y en México, se encuentra en una tendencia creciente por el alto consumo de los productos derivados de este cereal. Esta demanda en el país es transmitida hacia el sector primario o es satisfecha directamente con importaciones. En México, el área destinada a este cultivo es de aproximadamente 7.3 millones de hectáreas con una productividad promedio de solamente 3.19 Ton/ha. Sin embargo, los agricultores altamente mecanizados de regiones selectas del país (por ejemplo Sinaloa y el Bajío) obtienen un promedio alrededor de 10 Ton/ha, utilizando semilla híbrida en paquetes tecnológicos que

a)



b)

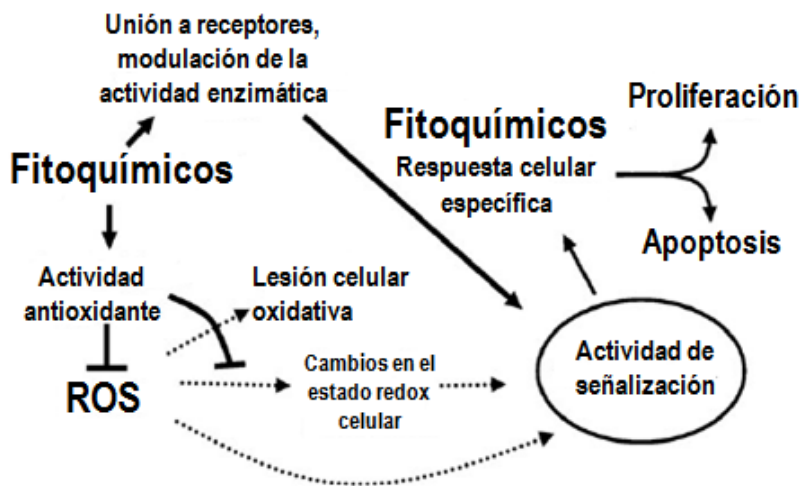


Fig 11. La visión clásica de los efectos oxidantes-antioxidantes sobre la señalización celular y su respuesta. (a) ROS puede actuar sobre la señalización celular, directa o indirectamente, a través de cambios en el equilibrio celular redox. Los antioxidantes modulan la respuesta celular mediada por ROS protegiendo su reactividad o reduciendo su disponibilidad, tanto a nivel extracelular como intracelular. (b) Varias moléculas nutricionales (fitoquímicos) interactúan con la señalización celular gracias a mecanismos independientes de sus propiedades antioxidantes, al afectar directamente las actividades celulares, incluyendo enzimas clave y receptores de membrana.

Virgili y Marino (2008)

incluyen irrigación y aplicación de fertilizantes, pesticidas y herbicidas. En ése sentido, Sinaloa es el mayor productor de maíz en México con una producción neta de 3.6 millones de Ton en el 2014 (SAGARPA 2017). Cifras bajas comparadas con años anteriores, debido a las condiciones climáticas de los últimos años.

México es el centro de origen del maíz (*Zea mays* L.) y la evidencia sugiere que este cultivo se originó en su medio silvestre, teniendo como progenitor al teosinte *Zea mays* ssp. *Parviglumis* (Doebley 2004), en un solo evento de domesticación que ocurrió hace unos 9000 años. Este evento de domesticación redujo la genética y diversidad del maíz, dando lugar a un pequeño grupo de variedades autóctonas que posteriormente se diversificaron con una amplia gama de condiciones climáticas y geográficas en el mundo. En México, el maíz se ha diversificado en poblaciones con adaptaciones a diferentes condiciones y características que permiten su uso en una gran diversidad de productos alimenticios (Ortega-Paczka 2003).

Diversos estudios se han centrado en la descripción y en establecer relaciones entre las razas autóctonas mexicanas de maíz. Una de las clasificaciones más completas del germoplasma de maíz mexicano fue propuesta por Sánchez y col (2000), en donde estudió accesiones de 50 variedades locales y las clasificó en 7 grupos de acuerdo con sus características bioquímicas y morfológicas. De estos grupos, en el noroeste de México, específicamente en el estado de Sinaloa, se encontró el grupo Chapalote, con 6 razas nativas de esta región, Onaveño, Tabloncillo Perla, Tuxpeño, Chapalote, Dulcillo del Noroeste, Reventador y Elotero de Sinaloa, esta última se caracteriza por tener granos de color azul (**Fig 12**) (Sánchez y col 2000; Pineda-Hidalgo y col 2013).

El maíz está compuesto de cuatro partes principales: germen (12%), endospermo (82%), pericarpio (5.2 %) y pedicelo (0.8%) (Eckhoff y col 2003). El endospermo es rico en almidón y proteínas, mientras que el germen lo es en lípidos, minerales y proteínas. En el caso del pericarpio la mayor parte del mismo es fibra (FAO 1993). El maíz azul presenta alto contenido de antocianinas las cuales son las responsables de la pigmentación característica de este grano y que se encuentran en la capa de aleurona, la cual está compuesta por una capa simple de células de pared celular fina que se encuentra rodeando al endospermo y al germen (**Fig 13**) (Betran y col 2001). En cuanto a la composición química del grano, ésta varía de acuerdo a las condiciones climatológicas, variedad (genotipo) y condiciones de crecimiento; a su vez, dentro de las distintas zonas del mismo grano, su composición varía de un lugar a otro. Los granos enteros son fuente de fibra, vitaminas, minerales y fitoquímicos, incluyendo compuestos



**Tabloncillo Perla**



**Tuxpeño**



**Chapalote**



**Dulcillo del Noroeste**

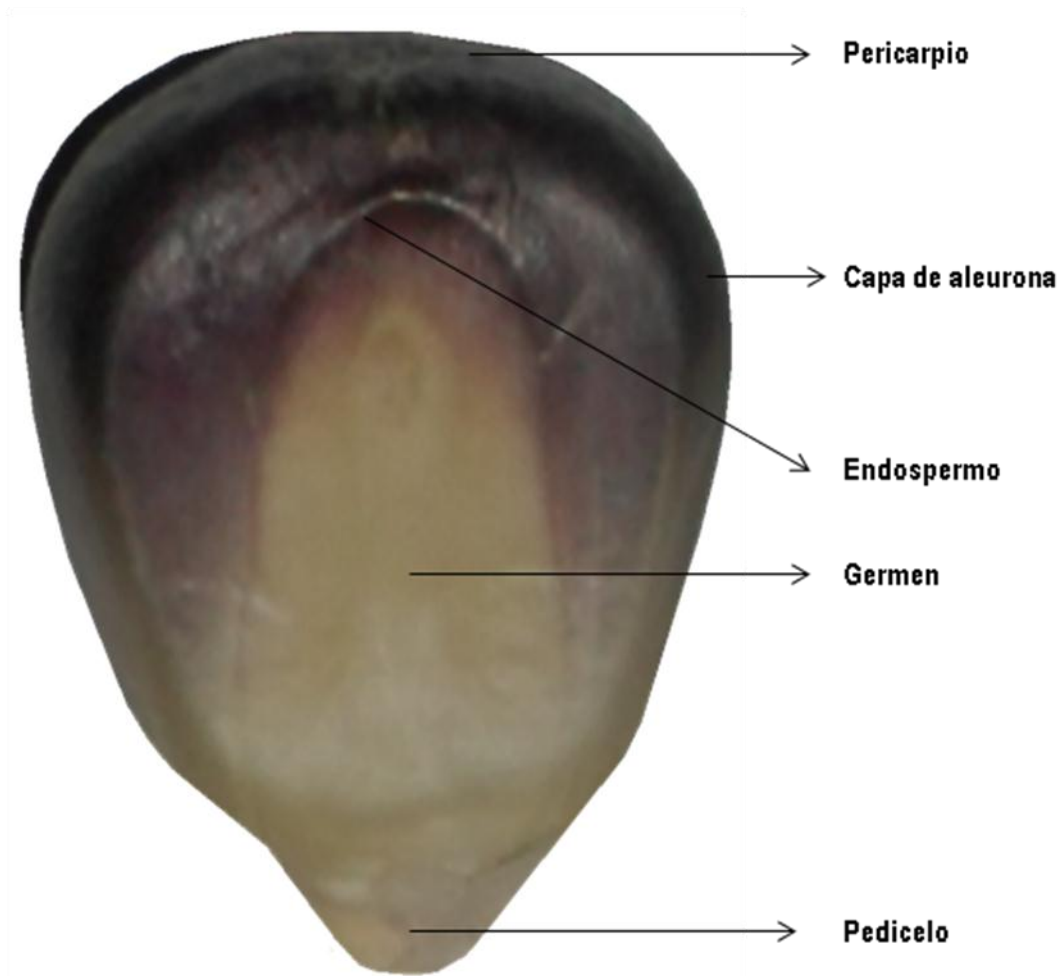


**Reventador**



**Elotero de Sinaloa**

**Fig 12.** Razas nativas de maíz identificadas en el estado de Sinaloa.  
**Sánchez y col (2000)**



**Fig 13.** Estructura del grano de maíz azul.  
Eckhoff y col (2003)

fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitamina E, ligninas,  $\beta$ -glucanos, inulina, almidón resistente, esteroides y fitatos (Liu, 2007).

Las propiedades nutraceuticas del maíz azul representan actualmente una fuerte línea de investigación, la cual está en pleno desarrollo. Éste interés se debe a la gran cantidad de compuestos fitoquímicos que contiene, ya que cuentan con relevantes propiedades antioxidantes y anticancerígenas.

## **2 Compuestos nutraceuticos asociados al maíz azul**

Los nutraceuticos son componentes de los alimentos o parte de los alimentos que proveen beneficios a la salud y que han sido asociados a la prevención y/o disminución de enfermedades (Kalra 2003). El maíz es una fuente importante de fitoquímicos como carotenoides (Kopsell y col 2009), compuestos fenólicos (Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2006; Nesci y Etcheverry 2009; López-Martínez y col 2009) y fitoesteroides (Jr Ostlund y col 2002). Todos estos compuestos contribuyen a efectos benéficos para la salud. Los compuestos nutraceuticos asociados al maíz no son necesariamente nutrientes que tradicionalmente han sido asociados con deficiencias en la dieta, sino compuestos cuyo consumo ayudan a prevenir e inclusive tratar enfermedades crónico-degenerativas. Los compuestos nutraceuticos, se clasifican de acuerdo a sus propiedades químicas y a su actividad biológica, común denominador de la mayoría de los nutraceuticos, los cuales se caracterizan principalmente por tener propiedades antioxidantes. Estos compuestos contrarrestan a los radicales libres responsables de causar la oxidación de membranas y daño al ADN, lo cual podría desarrollar enfermedades como el cáncer, problemas cardiovasculares, fibrosis y envejecimiento. En el **Cuadro 1** se muestran las principales categorías de nutraceuticos asociados al maíz. Dentro de los antioxidantes destacan el grupo de los compuestos fenólicos, una familia grande de nutraceuticos que poseen propiedades positivas a la salud (Serna-Saldívar y col 2011).

Los fitoquímicos se definen como compuestos bioactivos de origen vegetal que cuando se ingieren proveen ciertos beneficios funcionales más allá de la nutrición básica. Estos beneficios podrían incluir la prevención y/o disminución de la iniciación y/o progresión de enfermedades crónicas en humanos (Okarter y Liu 2010). Fuente de alimentos comunes son frutas, vegetales y granos integrales. En el maíz se han identificado diversos compuestos fitoquímicos distribuidos en sus diferentes partes anatómicas del grano (**Cuadro 2**). El enfoque de los fitoquímicos para la prevención de enfermedades crónicas, continúa incrementándose el



**Cuadro 1.** Principales categorías de nutraceuticos asociados con maíces criollos.

<b>Compuesto</b>	<b>Nutraceutico</b>	<b>Parte Anatómica</b>	<b>Efecto Preventivo o Terapéutico</b>
<b>Familia</b>	<b>Clase</b>		
Fenólicos	Simplees como el ferúlico	Principalmente asociados al pericarpio.	Previenen el estrés oxidativo, cáncer, alto colesterol, arterioesclerosis y envejecimiento.
Antocianinas Flavonoides	Antocianinas, flavonoles, flavan-3-ols	Principalmente asociados a la aleurona.	Previenen el estrés oxidativo, cáncer, alto colesterol, arterioesclerosis y envejecimiento
Carotenoides	Carotenos	Principalmente asociados al endospermo de maíces amarillos.	Los $\beta$ -carotenos son convertidos en vitamina A o retinol. Previenen el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y refuerzan al sistema inmunológico.
	Xantofilas: Luteína, Zeaxantina y Criptoxantina	Principalmente asociados al endospermo de maíces amarillos.	Previenen a la degradación macular y formación de cataratas (opacidad del cristalino ocular). Retarda aparición de síntomas relacionados con la <i>retinitis pigmentosa</i> . Previenen a las enfermedades cardiovasculares.
Fitoesteroles	Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol	Principalmente asociados al germen, pericarpio y capa de aleurona.	Compiten con los sitios de absorción del colesterol y por consiguiente son considerados como hipocolesterolemicos y previsores de enfermedades cardiovasculares.
Fibra	Soluble como arabinoxilanos y hemicelulosas solubles	Principalmente asociada al pericarpio.	Mejora función gastrointestinal, incrementa la viscosidad del bolo alimenticio y reduce el índice glicémico. Por lo tanto, reduce el riesgo de diabetes e hipercolesterolemia. La mayoría de las fibras solubles son prebióticas debido a que se fermentan rápidamente en el tracto gastrointestinal posterior generando ácidos grasos volátiles que a su vez inhiben a la enzima hepática HMG Co-A redustasa.
	Insoluble como celulosa y lignina	Principalmente asociadas al endospermo de maíces amarillos	Mejora función gastrointestinal, incrementa el ligado de ácidos biliares y el volumen y peso de las heces reduciendo la constipación, hemorroides, diverticulosis y cáncer.
Ácidos fítico Inositol	Inositol	Principalmente asociado al	Considerado como antioxidante y con propiedades anticancerígenas

		pericarpio y aleurona	de mama, colon, hígado, leucemia próstata y sarcomas.
Ácidos grasos poliinsaturados	Ácidos Linoleico (18:2 $\omega$ 6) y Linolénico (18:3 $\omega$ 3)	Principalmente asociada al germen.	Ayudan a reducir triglicéridos y colesterol sanguíneo. Estos ácidos grasos son convertidos en prostaglandinas y otros ácidos grasos como el EPA y DHA.
Fosfolípidos	Fosfatidil colina, etanolamina, inositol, serina	Principalmente asociados al germen.	La fosfatidil colina o lecitina, etanolamina, inositol y serina son esenciales para el apropiado funcionamiento de las membranas celulares y de las neuronas cerebrales. Por consiguiente, previenen el envejecimiento celular y el alto colesterol. La colina es esencial para producir acetil colina considerada como el principal neurotransmisor.
Vitaminas	Tocoferoles	Principalmente asociados al germen.	Los tocoferoles son antioxidantes. El $\alpha$ -tocoferol o vitamina E es considerado como la segunda línea de defensa contra el estrés oxidativo previniendo enfermedades cardiovasculares, alto colesterol y todo tipo de cáncer. Además ayudan a mejorar la capacidad mental y función cerebral.
	Ácido fólico	Principalmente asociados a la capa de aleurona.	Previene abortos y los defectos de tubo neural y malformaciones en bebés. Ayuda a disminuir los niveles de homocisteína y prevenir enfermedades cardiovasculares.
Policosanoles o ceras	Octacosanol, Tricontanol, Hexacosanol y Dotacontrianol	Principalmente asociados al germen y pericarpio.	Reducen lípidos séricos, colesterol y la agregación de plaquetas (Arruzazabala y col 1996).

**Serna-Saldívar (2010)**

**Cuadro 2.** Compuestos fitoquímicos en genotipos de maíz blanco y azul.

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

conocimiento y sensibilización de los consumidores de los beneficios para la salud derivados de su consumo.

#### **a Polifenoles**

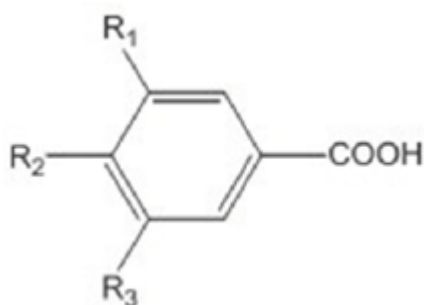
Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que los compuestos fenólicos previenen e inhiben el crecimiento de células cancerígenas y previenen la obesidad, arterioesclerosis, embolias, inflamaciones, ataques cardíacos, entre otras (Adom y Liu 2002; Tsuda y col 2002, 2003; Matsumoto y col 2004). Los compuestos fenólicos poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxil. La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de electrones (Kinsella y col 1993).

En los cereales, los fenoles se encuentran en forma libre, soluble conjugada y en su forma ligada (a materiales de la pared celular) en complejas estructuras como la celulosa, lignina y esterificada a proteínas (Adom y Liu 2002). A pesar de esto, estas formas ligadas pueden ser liberadas y absorbidas al ser consumidas en los alimentos. Existen diferentes vías de absorción descritas para compuestos fenólicos ligados en el tracto gastrointestinal, donde los microorganismos, enzimas e incluso los transportadores de glucosa están involucrados (Acosta-Estrada y col 2014). Estos sobreviven al estómago y a la digestión intestinal, y llegan al colon ya que los materiales fibrosos de la pared celular son difíciles de digerir (Adom y Liu 2002). Este fenómeno puede explicar en parte el mecanismo de consumo de granos en la prevención de cáncer de colon y otros cánceres digestivos, apoyado por estudios epidemiológicos. En el caso del maíz, Liu (2007) reporta que el 85% de los compuestos fenólicos se encuentran en forma ligada. En un estudio realizado por Aguayo-Rojas y col (2012) con maíces criollos mexicanos, observaron que el maíz azul presentó alto contenido de fenoles totales comparado con otros genotipos. Los compuestos fenólicos se subdividen en 3 principales categorías: simples, flavonoides/antocianinas y taninos condensados. Todos los maíces contienen fenólicos simples y ningunos taninos condensados, mientras que solamente los maíces pigmentados como el azul o morado contienen cantidades significativas de antocianinas (Serna-Saldívar y col 2011).

##### **1) Ácidos fenólicos**

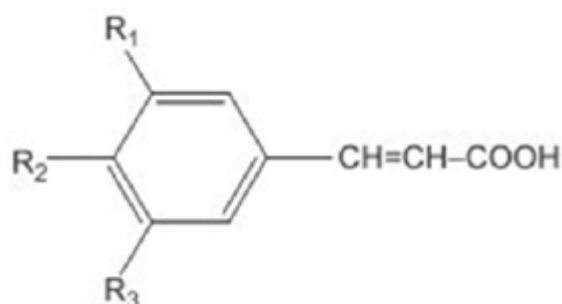
Otro subgrupo importante dentro de los fenoles, son los ácidos fenólicos, los cuales a su vez se subdividen en dos grupos principales, ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico (Liu 2004) (**Fig 14**). Entre los fenoles derivados del ácido hidroxicinámico se encuentran el ácido

### Derivados del ácido hidroxibenzoico



	R1	R2	R3
Ácido p-hidroxibenzoico	H	OH	H
Ácido gálico	OH	OH	OH
Ácido siríngico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### Derivados del ácido hidroxicinámico



	R1	R2	R3
Ácido p-cumárico	H	OH	H
Ácido ferúlico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ácido sinápico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Fig 14. Estructuras de ácidos fenólicos comunes: (a) Derivados de ácido benzoico y (b) derivados de ácido cinámico.

Liu (2007)

cumarico, cafeico y ferúlico, los cuales poseen propiedades como la de inhibir la actividad de agentes mutagénicos, estimulan la actividad de la enzima fenosulfotransferasa, enzima implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos. Además de estas propiedades, los ácidos fenólicos poseen actividad bactericida (Puupponen-Pimiä y col 2001; Liu 2007). Los ácidos hidroxicinámicos tienen la capacidad de eliminar los radicales libres y metales pro-oxidantes (antioxidantes). Existe evidencia científica de que además de tener capacidad antioxidante, estos compuestos tienen otros mecanismos, como la modulación de la actividad de algunas enzimas específicas e inhibir la proliferación descontrolada de células malignas (Manach 2004).

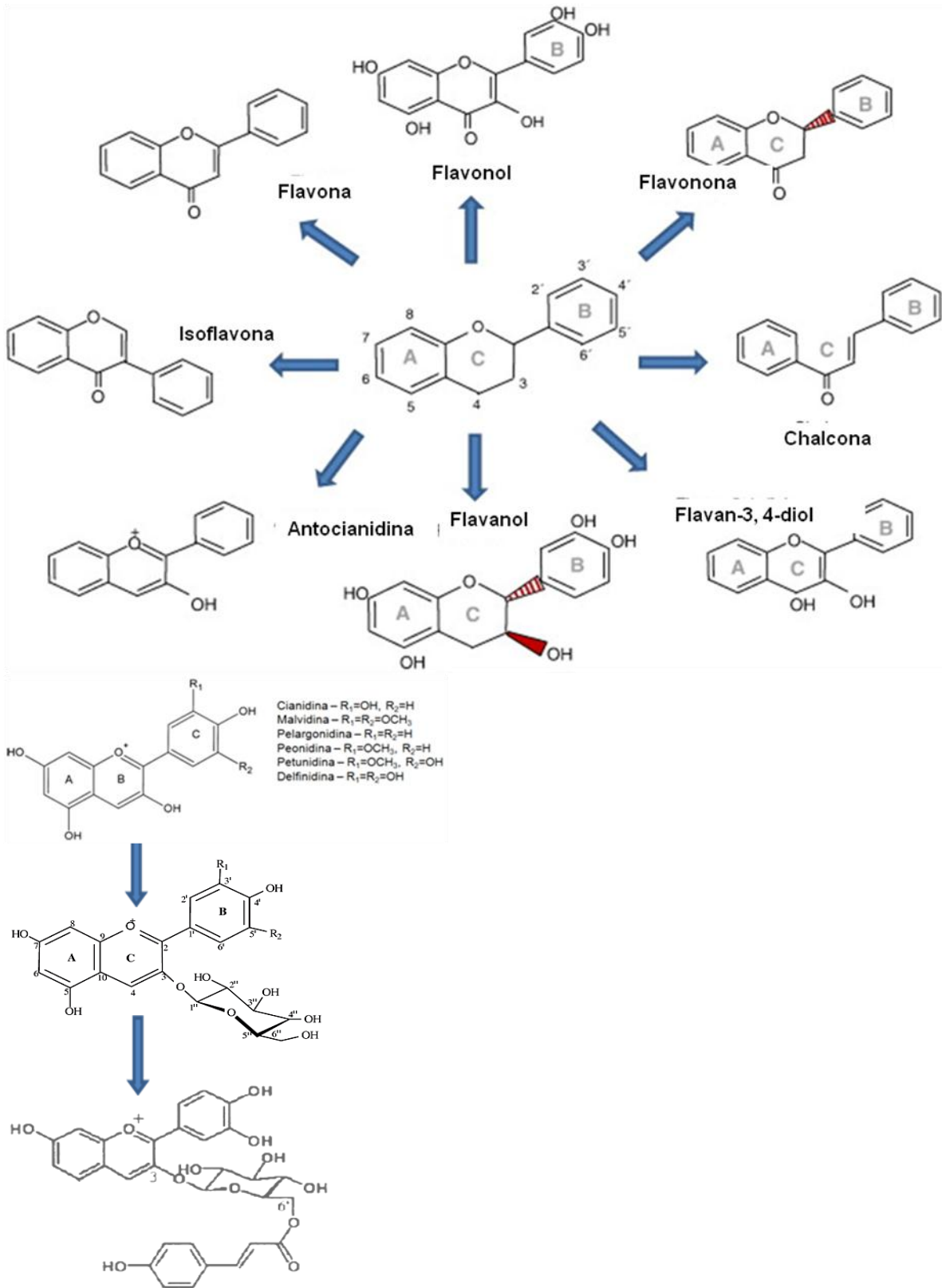
La evidencia científica que existe sobre los ácidos hidroxicinámicos es que estos compuestos tienen un efecto inhibitorio sobre la invasión y la metástasis del cáncer. Durante los últimos años se han hecho muchos esfuerzos con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en el cual los ácidos hidroxicinámicos previenen el cáncer. En estas evidencias se demuestran la actividad anti-cancerígena en diferentes líneas celulares, colon, gástrico, hígado, próstata, mama y pulmón (Ferguson y col 2005; Janicke y col 2011).

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

## 2) Antocianinas

Los flavonoides son la clase más grande de fenilpropanoides en las plantas. La estructura básica de flavonoides es de dos anillos aromáticos (uno de fenilalanina y otro de la condensación de tres ácidos malónicos) unidos por tres átomos de carbono. Actualmente, el número exacto de flavonoides es difícil de saber; sin embargo, se han reportado más de 9,000 flavonoides que han sido identificados en la naturaleza. Dentro de los cuatro principales grupos de flavonoides, se encuentran las antocianinas, flavonas, flavonoles y/o isoflavonas (**Fig 15**). La diferencia estriba principalmente en el grado de oxidación de la relación de tres carbonos.

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, constan de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterocíclico (C) que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático (B) (**Fig 15**) (Sousa y col 2005).



**Fig 15.** Estructura genérica de los principales flavonoides y formas básicas de antocianinas.  
**He y Giusti (2010)**

El esqueleto básico de las antocianinas es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio con diferentes sustituciones. Las antocianidinas (agliconas) son la estructura básica de las antocianinas. Cuando las antocianidinas están en su forma glucosilada (unido a un azúcar) se conocen como antocianinas, si además del azúcar en la molécula existe un radical acilo, entonces se llaman antocianinas aciladas (Konczak y Zhang 2004).

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

#### **b Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante está involucrada en la prevención del cáncer en la etapa de iniciación (Manson 2003). El maíz tiene una gran capacidad antioxidante muy superior a la de otros cereales tales como el trigo, avena y arroz (Adom y Liu 2002). Algunos investigadores (Sosulski y col 1982; Bondia-Pons y col 2009) reportaron que el ácido ferúlico en el maíz es el principal promotor de la actividad antioxidante. Sin embargo, las antocianinas (presentes principalmente en maíz azul) también poseen esta propiedad. Urias-Peraldí y col (2013) reportaron la actividad antioxidante de 25 maíces híbridos azules del centro de México, en donde los mayores valores de capacidad antioxidante los obtuvieron los genotipos con mayor contenido de ácido ferúlico y antocianinas. En un estudio realizado por Mora-Rochín y col (2010), elaboraron tortillas a partir de maíces comerciales, blanco y amarillo y criollos, azul y rojo, por los procesos de nixtamalización y cocción por extrusión; reportando que las tortillas retuvieron 43.8-83.6% y 75.2-93.2% de la actividad antioxidante total, respectivamente. Las tortillas elaboradas con harinas de maíz azul nixtamalizado y extrudido retuvieron los mayores ( $p < 0.05$ ) porcentajes



de actividad antioxidante total, 83.6% y 93.2%, respectivamente. Por otro lado, Aguayo-Rojas y col (2012) reportaron porcentaje de retención de actividad antioxidante en tortilla de maíz azul criollo extrudido de 75.4%. Los resultados de estas investigaciones indican claramente que la tecnología de extrusión permite retener importantes cantidades de compuestos nutraceuticos que se pierden en el proceso tradicional de producción de tortillas.

### 1) Métodos químicos de capacidad antioxidante

Sobre la base del mecanismo de inactivación de radicales libres, los principales métodos de capacidad antioxidante han sido generalmente divididos en dos categorías: (1) reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) y (2) métodos basados en la reacción de transferencia de electrones (ET, por sus siglas en inglés) (Masisi y col 2016). Leopoldini y col (2004) y Wright y col (2001) afirman que, aunque muchas reacciones antioxidantes se caracterizan por seguir un proceso químico ya sea HAT o ET, generalmente estos mecanismos de reacción ocurren de forma simultánea. Los ensayos basados en ET miden la capacidad de reducción de un antioxidante, y los ensayos basados en HAT cuantifican su capacidad para donar átomos de hidrógeno. Es evidente que la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno es un paso clave en la peroxidación de lípidos por la reacción en cadena de radicales. Por lo tanto, el método basado en HAT es más relevante para la capacidad antioxidante en el rompimiento de la cadena del radical. Los factores principales que determinan el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes, son la energía de disociación de enlace y el potencial de ionización (Huang y col 2005; Leopoldini y col 2011).

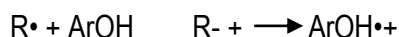
En los ensayos basados en HAT el radical libre elimina un átomo de hidrógeno del antioxidante (ArOH), quien a su vez se convierte en un radical. Este mecanismo se conoce como transferencia de átomos de hidrógeno. Una mayor estabilidad del radical ArO• corresponde a una mejor eficiencia del antioxidante, ArOH, por lo que es poco probable que reaccione con el sustrato (Leopoldini y col 2004).



En este mecanismo, la entalpía de disociación del enlace (BDE, por sus siglas en inglés) de los enlaces OH es un parámetro importante en la evaluación de la acción antioxidante, debido a que entre más débil es el enlace OH, más fácil será la reacción de inactivación de radicales libres (Leopoldini y col 2004). Los métodos basados en HAT, se componen de un generador de radicales libres sintético, una sonda molecular oxidable y un antioxidante (Huang y col 2005). Los métodos HAT incluyen los ensayos de Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC),

Fotoquimioluminiscente (PCR), Capacidad de Inhibición de la Peroxidación Lipídica (LPIC), Parámetro Antioxidante Total de Captura de Radicales (TRAP), eliminación de radicales ABTS, entre otros (Badarinath y col 2010; Dasgupta y Klein 2014).

En el siguiente esquema de reacción se ilustra un mecanismo ET, en el que un antioxidante transfiere un único electrón a un radical libre, convirtiéndose el mismo en un radical catión (Leopoldini y col 2004).



También en este caso, el catión radical derivado de la transferencia de electrones debe ser estable, para que no reaccione con moléculas del sustrato (Leopoldini y col 2004).

En los métodos ET, la reactividad relativa se basa en la desprotonación y el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, por lo que las reacciones ET son dependientes del pH. En condiciones ácidas, la capacidad de reducción puede ser restringida debido a la protonación de compuestos antioxidantes, mientras que, en condiciones básicas, la disociación de protones de los biocompuestos antioxidantes aumentará la capacidad de reducción de la muestra (Leopoldini y col 2004; Huang y col 2005). Los ensayos basados en ET implican dos componentes en la mezcla de reacción, antioxidantes y oxidante (sonda). La sonda en sí, es un oxidante y abstrae un electrón del antioxidante, lo que resulta en cambios de color. El grado del cambio de color es proporcional a la concentración de un antioxidante (Huang y col 2005).

Los métodos de ET incluyen los ensayos de fenoles totales, por el reactivo de Folin-Ciocalteu, DPPH• (radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil catión); Potencia Antioxidante de Reducción del ion Férrico (FRAP); N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) y Capacidad de Reducción de Cu (II) (CUPRAC), entre otros (Badarinath y col 2010).

## **2) Ensayo de actividad antioxidante celular (AAC)**

En el año 2007, Wolfe y Liu, desarrollaron un método para representar las reacciones que se llevan a cabo entre un radical libre y un antioxidante en una línea celular de cáncer de hígado. Cuando el sistema biológico recibe a través de la ingesta una matriz con compuestos con propiedades antioxidantes, estos biocompuestos son metabolizados y distribuidos en toda la célula. Este ensayo explica o proporciona un esquema de cómo sería la acción de los antioxidantes en un organismo vivo. En un ensayo de actividad antioxidante celular (AAC), se añade una solución de DCFHDA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato), y una solución de la sustancia bajo estudio en PBS (tampón fosfato salino) a pH 7.4 las células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Las células son incubadas a 37 ° C, y durante la incubación la DCFH-DA y los

biocompuestos de la muestra, se difunden a través de la membrana lipídica de la célula. Después, el resto no absorbido se elimina por lavado con PBS y se añade una solución de AAPH que después de su infiltración en la célula genera radicales libres que oxidan a la DCFH-DA al compuesto fluorescente DCF (Diclorofluoresceína). Los antioxidantes extinguen los radicales, lo que reduce la cantidad de DCF, cuya fluorescencia es registrada a 485 nm (excitación) y 520 nm (emisión) durante el análisis. El área bajo la curva de fluorescencia se puede comparar con la curva de calibración preparada para un antioxidante estándar como quercetina, y se expresa como su equivalente. Por otro lado, se han realizado modificaciones al método desarrollado por Wolfe y Liu, en donde se sugiere utilizar eritrocitos de la sangre en lugar de las células HepG2.

En la literatura ya existen reportes del uso del ensayo celular propuesto por Wolfe y Liu (2007) en diferentes alimentos. Se determinaron los valores de AAC de 25 frutas y vegetales, y se pudo observar que los valores de la AAC para estos alimentos fueron correlacionados positivamente con el contenido de fenólicos y ORAC totales (Wolfe y col 2008). Sin embargo, esto difiere del estudio de Eberhardt y col (2005) en extractos de brócoli, quienes reportan que no se encontró correlación entre ORAC y los métodos celulares de capacidad antioxidante.

### **c Actividad anticancerígena**

La actividad antiproliferativa se centra en las células cancerosas en las etapas de la progresión y promoción (Manson 2003). Reportes previos muestran que el consumo de cereales integrales, como el maíz, es un ingrediente en el futuro para alimentos funcionales, los cuales protegen de cáncer de colon (Janicke y col 2005).

La carcinogénesis es generalmente reconocida como un proceso de múltiples pasos, en el que ocurren distintas alteraciones moleculares y celulares. En estudios experimentales de carcinogénesis en roedores, el desarrollo del tumor consiste en varias etapas diferenciadas y a la vez estrechamente vinculadas, la iniciación del tumor, promoción y progresión. Aunque estas divisiones son una simplificación excesiva de la carcinogénesis, son importantes cuando se tienen en cuenta las posibles opciones para la quimioprevención.

La iniciación es un proceso rápido e irreversible que implica una cadena de eventos extra e intracelular. Estos incluyen la captación inicial de la exposición a un agente carcinógeno, su distribución y transporte a los órganos y tejidos en los que la activación metabólica puede ocurrir, la desintoxicación y la interacción covalente de especies reactivas con el ADN de células diana que conducen a daños genotóxicos. En contraste con la iniciación, la promoción de tumores se considera que es un proceso relativamente largo y reversible, en el que la

proliferación se activa y las células preneoplásicas se acumulan. La progresión, la etapa final de la transformación neoplásica, implica el crecimiento de un tumor con potencial invasivo y metastásico (Surh 1999).

De acuerdo con la clasificación convencional originalmente propuesta por Lee Wattenberg en 1981, los agentes quimiopreventivos se subdividen en dos categorías principales: agentes de bloqueo y agentes de supresión. Los agentes de bloqueo de carcinógenos evitan que éstos lleguen a los sitios finales para someterse a activación metabólica y posteriormente la interacción con macromoléculas celulares cruciales (por ejemplo, ADN, ARN y proteínas). Los agentes de supresión, por otra parte, inhiben la transformación maligna de las células iniciadas, ya sea en la promoción o en la etapa de progresión. Los fitoquímicos quimiopreventivos pueden bloquear o revertir la etapa premaligna (iniciación y promoción) del proceso de cáncer de múltiples etapas. También pueden detener o al menos retardar el desarrollo y la progresión precancerosa de células malignas.

#### **1) Estudios *In vitro***

De acuerdo con la literatura, existen pocos reportes de actividad antiploriferativa en líneas celulares de cáncer relacionados con el maíz. Sin embargo, los granos de maíz contienen una compleja mezcla de componentes fitoquímicos que se ha demostrado que algunos de ellos presentan actividad anticancerígena. Mora-Rochín (2011) realizó estudios dónde utilizó células Caco-2 tratadas con extractos de fitoquímicos libres y ligados, a una concentración 20  $\mu$ M de ácido ferúlico de tortillas nixtamalizadas y extrudidas de maíces criollos, blanco, amarillo, azul y rojo. Encontrando que el mayor efecto citotóxico en células Caco-2 lo presentaron fitoquímicos ligados de tortillas elaboradas por nixtamalización. Este resultado puede atribuirse a que el proceso de nixtamalización tradicional ocasiona la liberación, de la pared celular, compuestos potencialmente bioactivos, aun no identificados, con actividad anticarcinogénica, o que pueden actuar sinérgicamente con diferentes compuestos disponibles en el grano de maíz.

#### **2) Ensayos *In vivo***

Algunos efectos biológicos de los fitoquímicos relacionados con cereales integrales, han sido probados *In vivo*. En sus estudios, Shih y col (2005) demostraron la habilidad de las antocianinas en la inducción de enzimas de fase II en células hepáticas de rata alimentadas con 50  $\mu$ M de antocianinas, y la formación de células no cancerosas de mama con una dieta de 10 a 20  $\mu$ g/mL de antocianinas. Las antocianinas ocasionaron un incremento antioxidante mediante la activación de la enzima mas importante en el sistema fase II, la quinona reductasa, y activaron a

las enzimas glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. Por otro lado, un extracto de maíz azul mostró propiedades antimutagénicas al inhibir la carcinogénesis colorrectal en ratas macho F344 tratadas con 1,2-dimetilhidrazina (Hagiwara y col 2001; Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2006). La inhibición se atribuyó a las antocianinas presentes en el maíz azul, aunque no se descartó la posible acción de otros compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de maíz. Moreno y col (2007) analizaron dos experimentos con el fin de clasificar a la luteína obtenida de maíz amarillo, como agente bloqueador y / o agente supresor durante hepatocarcinogénesis en ratas Wistar. Por alimentación forzada con luteína (70 mg/kg de peso corporal) a las ratas durante varias semanas, en el experimento 1 (iniciación del proceso canceroso) la luteína no causó efecto bloqueador, mientras que en el experimento 2 (promoción del proceso canceroso), la luteína causó un efecto inhibitorio en esta etapa de la enfermedad, por lo que se puede clasificar a la luteína como agente supresor, reforzando que éste es un agente potencial para la quimioprevención del cáncer de hígado. Recientemente, Reynoso-Camacho y col (2015) reportaron una disminución en la incidencia de adenocarcinoma de colon (hasta 77.5%) en ratones con este padecimiento y alimentados con tortillas nixtamalizadas de maíz blanco y azul, además también observaron una inhibición de  $\beta$ -Glucuronidasa e inducción de enzimas desintoxicantes de hígado y colon, así como una disminución de la expresión de las dos proteínas proliferativas más importantes (K-ras y  $\beta$ -catenina) involucradas en la carcinogénesis del colon, mismas proteínas que se encuentran activas en las células HT-29, destacando así algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el efecto quimiopreventivo de las tortillas.

## **C PROCESAMIENTO DEL MAÍZ AZUL**

Debido a su gran diversidad genética, los maíces no contienen la misma composición química, presentan diferencias en sus propiedades y en su utilización final. Así, el maíz puede utilizarse en la producción de hojuelas para el desayuno y botanas (Salinas-Moreno y col 2003), aislamiento de almidón, el cual es materia prima en diversas industrias para la fabricación de harinas nixtamalizadas, para la industria molinera-tortillera (Salinas-Moreno y col, 2003), entre otros. En la industrialización del maíz, se aprecian dos formas de procesamiento: 1) molienda seca, y; 2) molienda húmeda. A través del primer proceso se obtiene la harina de maíz, con diferentes tamaños de partículas, y el germen del grano, del cual se extrae el aceite. En la molienda húmeda, se obtiene almidón, aceite y subproductos para alimento animal (gluten, harina de gluten y tortas de germen) (Sala y Barroeta 2003; Uriarte-Aceves y col 2015).

El uso primario del maíz azul se relaciona con la industria de colorantes naturales, debido al gran contenido de antocianinas, pigmentos responsables de su color característico. Recientemente, ha sido utilizado para elaborar tortillas y botanas pigmentadas debido a que estos productos se aprecian como promotores de salud (Adbel-Aal y col 2006; Ultrilla-Coello y col 2009; Serna-Saldívar 2010). Actualmente, la demanda de productos nixtamalizados de maíz azul recibió una mayor atención desde una perspectiva nutracéutica debido a sus posibles beneficios para la salud y sabor y color únicos (Urias-Peraldí y col 2013).

## **1 Proceso de nixtamalización**

El método tradicional de nixtamalización, se lleva a cabo por cocimiento alcalino del grano de maíz en agua (relación 3:1 agua: maíz) a 85-100°C por 30 a 90 min, adicionando hidróxido de calcio al 1 %. Después de esta etapa, el maíz se deja reposar por un periodo de 12 a 18 horas. El grano cocido con cal en agua es denominado nixtamal, y el residuo líquido (nejayote) rico en sólidos es descartado. Después el nixtamal es enjuagado dos o tres veces con agua, para remover los fragmentos de pericarpio desprendidos del grano. El nixtamal se muele para obtener una pasta fina llamada masa. Alrededor de 35 a 50 g de masa son aplanados, para obtener una circunferencia de 15 a 20 cm de diámetro y aproximadamente 0.2 a 0.3 cm de grosor, la cual es cocida por 1 a 1.5 min. Cuando se empieza a hinchar, la tortilla es volteada y cocida finalmente por otros 30 s (Serna-Saldivar y col 1990).

El proceso de nixtamalización es responsable de importantes características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales de productos a base de maíz, como la remoción del pericarpio, incorporación de calcio en los granos, mejoramiento de biodisponibilidad de niacina y formación de compuestos de sabor y color que imparten las características típicas de los productos terminados (Serna-Saldívar y col 1990). Sin embargo, este proceso consume mucho tiempo y energía; además, se produce una descarga de agua residual que crea un problema de contaminación (Cuevas-Rodríguez y col 2009).

### **a Efecto de la nixtamalización sobre los compuestos fitoquímicos**

Durante el proceso de nixtamalización existe pérdida de fenólicos totales, ácido ferúlico, antocianinas, carotenoides totales, entre otros fitoquímicos. Estas pérdidas son atribuidas al efecto combinado del procesamiento térmico y alcalino del proceso de nixtamalización, lo cual genera una alta concentración de materia orgánica en el nejayote, incluyendo parte del endospermo, el germen y compuestos fitoquímicos (Gutiérrez-Urbe y col 2010; Mora-Rochín y col 2010, 2016; Mendoza-Díaz y col 2012; Acosta-Estrada y col 2015). Aunado a lo anterior, está

el hecho de que algunos de estos compuestos son muy sensibles a la luz, calor, aire y pH (Velazco-Martinez y col 1997; Updike y Schwartz 2003; Gutierrez-Urbe y col 2014; Bello-Perez y col 2015).

## **2 Proceso de cocción alcalina por extrusión**

Para superar las desventajas tecnológicas que presenta el proceso de nixtamalización, se han desarrollado nuevas tecnologías, la extrusión-cocción. La extrusión cocción es una técnica de procesamiento de alimentos continua ampliamente utilizada para procesar los cereales a productos para desayuno, botanas y harinas pregelatinizadas. Es un proceso tecnológico mixto, por el cual diversos biopolímeros (proteínas y/o almidones) o ingredientes alimenticios son mezclados, transportados y termoformados en un sistema de baja humedad (por lo general inferior al 18%) a temperaturas elevadas (140-190 °C) y a presiones altas (10-20 MPa), durante un tiempo corto (15-60 s), utilizando fuerzas de cizallamiento muy elevadas originadas por un tornillo sinfín. El cocimiento se logra por la aplicación de calor, por inyección de vapor a través de cilindros con chaqueta, y por disipación de energía mecánica. El cocido por extrusión combina el corte mecánico y calor para la gelatinización del almidón y la desnaturalización de proteínas, obteniéndose un producto plastificado y reestructurado con nuevas formas y texturas. Un extrusor está formado de cinco componentes principales: mecanismo de alimentación, tornillo y su mecanismo de conducción, camisa o cañón, dado o restrictor de flujo y mecanismo de corte (Harper 1989).

Este proceso tiene muchas ventajas: versatilidad, rendimiento alto, bajo costo y buena calidad del producto. Las condiciones de extrusión (tamaño de las partículas de grano, contenido de humedad de materias primas, configuración del tornillo y velocidad, entrada de calor, tamaño del dado y forma) están relacionadas con cambios en el valor nutricional del producto final (Milán-Carrillo y col 2006). En este proceso, se emplean pequeñas cantidades de agua, no hay generación de agua residual (nejayote) ni pérdidas de materia seca. Por lo tanto, nutrimentos y fitoquímicos asociados al pericarpio y tejidos de aleurona se conservan, y los productos resultantes son considerados como productos a partir granos integrales (Aguayo-Rojas y col 2012).

### **a Efecto de la extrusión sobre los compuestos fitoquímicos**

La mayoría de las investigaciones publicadas, han reportado disminuciones significativas en el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico después del proceso de extrusión, sin embargo, en estudios comparativos las pérdidas fueron menores que las provocadas por el

proceso de nixtamalización. Lo anterior es atribuido a que a diferencia de la nixtamalización, en la extrusión no existen pérdidas de sólidos, producto del nejayote, obteniéndose una mayor retención de compuestos fitoquímicos (Mora-Rochín y col 2010; Aguayo-Rojas y col 2012; Sánchez-Madrigal y col 2015).



#### **IV JUSTIFICACIÓN**

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Existen reportes en la literatura que algunos compuestos nutraceuticos que contienen los alimentos, gracias a sus efectos antioxidantes, se han asociado con la prevención y reducción de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer.

Los maíces criollos poseen una gran diversidad genética y potencial para producir alimentos funcionales que ayuden a la población más vulnerable a enfrentar los graves problemas de desnutrición y salud. A través de generaciones los maíces han conservado importantes compuestos fitoquímicos conocidos como nutraceuticos, con probados efectos positivos en nutrición y salud. Como la principal forma de consumo de éste cereal es la tortilla, es importante evaluar el perfil fitoquímico, así como las propiedades nutraceuticas que este producto presenta.

## **V OBJETIVOS**

### **A GENERAL**

Evaluar el efecto del proceso de elaboración de tortillas, por las vías de nixtamalización y extrusión, sobre el perfil fitoquímico (compuestos fenólicos totales, ácido fenólicos y antocianinas) y propiedades nutraceuticas (actividad antioxidante y actividad anticancerígena) de maíces criollos azules de Sinaloa.

### **B ESPECÍFICOS**

- 1 Elaborar de tortillas de maíz criollo azul y blanco híbrido comercial por los procesos de nixtamalización y extrusión.
- 2 Determinar los compuestos bioactivos (fenólicos totales, ácidos fenólicos, antocianinas) en tortillas de maíces criollos azules.
- 3 Determinar la capacidad antioxidante por diferentes métodos químicos (ORAC, ABTS y DPPH) de las tortillas de maíces criollos azules.
- 4 Determinar la actividad antioxidante a nivel celular de los extractos de tortilla de maíces criollos azules.
- 5 Evaluar el potencial inhibitorio de proliferación en células de cáncer de colon humano (HT-29) de extractos de tortillas de maíces criollos azules.

## **VI MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A MATERIALES**

El estudio se realizó en dos granos de maíz, un genotipo criollo azul que corresponde a la raza Elotero de Sinaloa (A-512) y un genotipo blanco híbrido (B-111) usado como control debido a su importancia comercial. El grano criollo azul fue colectado durante el año 2016 con campesinos tradicionales del municipio de Concordia en el estado de Sinaloa. Ambos materiales fueron manejados siguiendo las recomendaciones estándar. Las muestras de maíz se almacenaron a -4 °C hasta su uso.

### **B MÉTODOS**

#### **1 Producción de harinas instantáneas de maíces**

##### **a Harinas de maíz nixtamalizado**

Se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Milán-Carrillo y col (2004). Porciones de 300 g de maíz se cocieron en una disolución de cal (5.4 g cal/L) a 85°C; se usó una relación grano/medio de cocción de 1:3 y tiempos de nixtamalización y de reposo de 31 min y 8.1h, respectivamente. El licor de cocción (nejayote) se decantó y el nixtamal se enjuagó tres veces con agua destilada. El nixtamal se secó (55°C, 12 h), se enfrió a temperatura ambiente y se molió hasta obtener un tamaño de partícula de 0.180 mm de diámetro. Las harinas obtenidas, se guardaron en bolsas de polietileno selladas y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

##### **b Harinas de maíz extrudido**

Se aplicó la metodología reportada por Milán-Carrillo y col (2006). El maíz se fragmentó con ayuda de un molino doméstico. Los fragmentos (1-2 mm) de maíz se mezclaron con cal (0.21 g cal/100 g maíz) y, posteriormente, se acondicionaron con agua para alcanzar un contenido de humedad de 28%. La extrusión se realizó en un extrusor de tornillo simple modelo 20N (Brabender Inc, NJ, EUA). Las condiciones de extrusión fueron 85°C y 240 rpm, para la temperatura de extrusión y la velocidad de tornillo, respectivamente. Estas condiciones favorecen la producción de harinas de maíz extrudido, apropiado para la elaboración de tortillas. Los extrudidos se enfriaron y secaron a temperatura ambiente por 24 h, posteriormente se molturaron (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulde, CO, EUA) hasta obtener un tamaño de partícula de 0.180 mm de diámetro. Las harinas obtenidas, se guardaron en bolsas de polietileno selladas y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

#### **2 Elaboración de tortillas de harinas de maíz nixtamalizado y extrudido**

Las tortillas se prepararon siguiendo la metodología reportada por Milán-Carrillo y col (2006). 500 g de cada harina se mezclaron con suficiente agua para alcanzar una consistencia adecuada para la producción de tortillas, con ayuda de una prensa manual. Las tortillas se enfriaron a temperatura ambiente, se molieron para obtener harinas y se guardaron en bolsas de polietileno selladas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3 Determinación del contenido de compuestos fenólicos**

#### **a Extracción de fenólicos libres**

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

#### **b Extracción de fenólicos ligados**

La extracción de fenólicos ligados se realizó de acuerdo al método descrito por Adom y Liu (2002) con algunas modificaciones. El residuo del extracto libre fue digerido con 10 mL de NaOH 2M, se eliminó el  $\text{O}_2$  en presencia de  $\text{N}_2$  gas y la muestra se sometió a un tratamiento térmico por 30 min en baño María a  $95^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con 2 mL de HCl concentrado y se le agregaron 10 mL de hexano para remover lípidos. La mezcla resultante se extrajo con 10 mL de acetato de etilo cinco veces. La fracción de acetato de etilo fue recolectada y se evaporó a sequedad (Speed Vac Concentrator, Thermo Electron Concentrator). Los compuestos extraídos se reconstituyeron con 2 mL de metanol al 50% y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en la determinación de capacidad antioxidante atribuida a compuestos fenólicos ligados. Las extracciones se realizarán por cuadruplicado.

#### **c Fenólicos totales**

Para determinar la concentración de fenólicos totales de los extractos obtenidos anteriormente, se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col (1999). En una placa de 96 celdas, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto de fenólicos libres y ligados. El estándar utilizado, y los extractos se mezclaron con 180  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin, la reacción

se neutralizó con 50  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% y posteriormente se incubaron en el espectro, después de 90 min, se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument), usando metanol como blanco, se construyó una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico (EAG) /100 g de muestra en base seca. El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó al sumar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de libres y ligados. La determinación se realizó por cuadruplicado.

#### **4 Determinación del contenido de antocianinas totales**

El contenido de antocianinas totales por el método espectrofotométrico se determinó de acuerdo al método descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999). Se pesaron 0.5 g de muestra en un tubo de 50 mL, se agregaron 10 mL de etanol frío acidificado (95% metanol y 1 N HCl, 85:15, v/v). El tubo con la muestra fue pasado con nitrógeno, tapado, se agitó por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 x g por 10 min y se recolectó el sobrenadante. La absorbancia de las muestras se midió inmediatamente a 535 nm y 700 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). El contenido de antocianinas se calculó de la siguiente manera:

$$C = ((A_{535\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) / \epsilon) \times (\text{vol. total de extracto}) \times \text{PM} \times (1/\text{peso de muestra}),$$

Donde, C es la concentración total de antocianina (mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra),  $\epsilon$  es la absorción molar (cianidina-3-glucósido =  $25965 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) y PM es el peso molecular de cianidina-3-glucósido, 449.2 g.

#### **5 Determinación de niveles y perfiles de ácidos fenólicos**

El contenido de ácidos fenólicos se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de acuerdo al protocolo utilizado por Mora-Rochín y col (2010). Los extractos libres y ligados obtenidos anteriormente se usaron para cuantificar el contenido de ácidos fenólicos usando un HPLC (Perkin Elmer, Alemania), equipado con una columna de 250 mm x 4.6 mm, C-18 YMC y un detector UV-visible. La elución isocrática se condujo con 20% de acetonitrilo en agua ajustado a un pH 2 con ácido trifluoroacético, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y con una temperatura de columna de 25°C. La detección de los compuestos se llevó a cabo a 320 y 260 nm. El pico de identificación de cada ácido en los extractos de las muestras se basó en el tiempo de retención de estándares auténticos. La concentración de ácido ferúlico, *p*-cumárico, sinápico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico y vanílico en las

muestras, se calculó por extrapolación en una curva de calibración. Se inyectaron, para el análisis, 20  $\mu\text{L}$  de cada extracto.

## **6 Determinación de la capacidad antioxidante por métodos químicos**

### **a Método ORAC**

Se preparó una solución stock de fluoresceína (FL) (1.2 mM) pesando 39.87 mg del reactivo y disolviéndola en 100 mL de una solución reguladora de fosfatos (PBS) (75 mM, pH 7.4). De la solución stock anterior se preparó una segunda solución de FL por dilución (10  $\mu\text{M}$ ). La solución de trabajo de FL (0.1  $\mu\text{M}$ ) se preparó diariamente por dilución tomando 0.25 mL (250  $\mu\text{L}$ ) de la segunda dilución de FL en 25 mL de la solución reguladora de fosfatos (PBS). El generador de radicales libres (AAPH) (200 mM) se preparó diariamente pesando 207 mg del reactivo y aforando en un matraz volumétrico de 5 mL con solución reguladora de fosfatos (PBS). Se utilizó como estándar de referencia una solución de Trolox 1 mM (1000  $\mu\text{M}$ ) que se preparó a partir de una solución stock de trolox 5 mM (almacenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) con PBS. Para el ensayo se transfirieron alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  de los extractos de fenólicos libres y ligados (diluidas previamente con PBS) a una placa de 96 pozos, que se colocó en un lector de microplatos (Synergy<sup>TM</sup> HY Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA), donde fueron dispensados 150  $\mu\text{L}$  de FL (0.1  $\mu\text{M}$ ). La placa se agitó e incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min antes de agregar 25  $\mu\text{L}$  de la solución de AAPH. La reacción se llevó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la fluorescencia fue registrada (485 nm de excitación y 538 de emisión) cada 2 min durante 60 min para determinar el área neta bajo la curva que genera la pérdida de fluorescencia (AUC [AUCAOX AUCno AOX] con respecto a un blanco. Una curva de trolox fue utilizada como estándar (concentración de 25 a 100  $\mu\text{M}$ ). Los datos se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de muestra seca ( $\mu\text{mol ET} / 100\text{ g bs}$ ) (Ou y col 2001; Prior y col 2003).

### **b Método ABTS**

Las capacidades antioxidantes de extractos libres y ligados de tortillas nixtamalizadas y extrudidas para la eliminación de radicales libres se estimó en términos de la actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS propuesto por Re y col (1999), el cual se basa en la reducción del radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  por los antioxidantes presentes en los extractos evaluados. El ABTS se disolvió en agua desionizada a una concentración 7 mM. Una solución stock del catión radical ABTS ( $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ) se generó mediante la reacción de la solución de ABTS con persulfato potásico 2.45 mM (concentración final) y permitiendo que la mezcla reposara en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. Una

alícuota de la solución con el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 765 nm. Se tomó una lectura del blanco y los extractos (20 mL) se transfirieron a una cubeta de plástico y el ensayo se inició al adicionar 1980 mL de la solución ABTS<sup>•+</sup>. Se midió la absorbancia a 735 nm 15 min después de la mezcla inicial y se calculó la pérdida de absorbancia del ABTS<sup>•+</sup> respecto a un blanco. Se preparó una curva de calibración con Trolox y los datos se expresaron como micromoles equivalentes de trolox (ET) por 100 g de muestra en base seca (mmol de ET/100 g, bs).

### **c Método DPPH**

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

## **7 Determinación de la actividad antioxidante celular (AAC)**

### **a Cultivo de células HepG2**

La línea celular HepG2 fue cultivada en medio de crecimiento (WME complementado con 5% de FBS, Hepes 10 mM, 2 mM L-glutamina, 5 mg / mL de insulina, 0.05 mg / mL de hidrocortisona, 50 unidades / mL de penicilina, 50 $\mu$ g / mL estreptomina, y 100 mg / mL de gentamicina) y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> (Wolfe y col 2008). Las células se cambiaron de botella cada 2 a 3 días, al alcanzar una confluencia del 80%. Las células HepG2 usadas para los experimentos posteriores corresponden a los pases entre 12 y 20.

### **b Ensayo de citotoxicidad**

Se realizó una prueba de citotoxicidad de los extractos libres y ligados hacia células HepG2 utilizando el ensayo azul de metileno modificado (Felice y col 2009; Wolfe y col 2008). Las células HepG2 se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^4$  / pocillo en una placa de 96 pozos en 100  $\mu$ L de medio de crecimiento, y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio de crecimiento y las células se lavaron con PBS. Se añadieron 100  $\mu$ L de medio de tratamiento (WME complementado con 2 mM L-glutamina y 10 mM Hepes) con diferentes

concentraciones de extractos libres y ligados de las muestras a cada pocillo; los pozos que recibieron medio sin extracto sirvieron como control. Después de 24 h de incubación a 37 ° C se eliminó el medio de tratamiento y las células se lavaron con PBS. Las células se incubaron por 1 h a 37° C después de la adición de 50 µL de solución de tinción con azul de metileno (98% HBSS, 0.67% de gluteraldehído, 0.6% azul de metileno) a cada pozo. Después de la incubación, se retiró la solución de tinte y la placa se sumergió en agua desionizada fresca tres veces o hasta que el agua estuviera clara. La placa se dejó secar al aire antes de añadir 100 µL de solución de elución (49% PBS, etanol al 50%, ácido acético al 1%) a cada pocillo. La microplaca se colocó en un agitador de sobremesa por 20 min para permitir una elución uniforme. La absorbancia fue registrada a 570 nm con sustracción del blanco utilizando un lector de microplaca (Synergy™ HY Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Las diferentes concentraciones de los compuestos libres o ligados que disminuyeron la absorbancia > 10% en comparación con el control, se consideraron citotóxicas.

#### **c Ensayo de actividad antioxidante celular (AAC)**

Para el ensayo de AAC, las células HepG2, de los pases 12 y 20, se sembraron en placa de 96 pozos a una densidad de  $6 \times 10^4$  / pozo en 100 µL de medio de crecimiento. Los pocillos externos se llenaron con 100 µL de PBS para crear una atmosfera con humedad y reducir las fluctuaciones. Después de 24 h de incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> / 95% O<sub>2</sub>, se eliminó el medio de crecimiento y las células se lavaron con 100 µL de PBS estéril. Los pocillos por triplicado se trataron durante 1 h con 100 µL de medio de tratamiento que contiene los extractos (quercetina o muestra) con 25 mM DCFH-DA. En el protocolo “de lavado PBS”, los pocillos se lavaron con 100 µL de PBS, mientras que en el protocolo “no lavado PBS” los pozos no se lavaron. Se adicionó 100 µL de AAPH (600 µM) en HBSS (solución bufer de Hanks) sin rojo fenol a cada pocillo. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas pre-calentado (37°C) (Synergy™ HY Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA) para la generación de la cinética. Se utilizó el filtro de emisión de 485 nm y filtro de excitación de 528 nm, con un ajuste de sensibilidad de 50. La lectura de fluorescencia se tomó cada 5 min durante 1 h. En cada placa, también se incluyeron tres pozos de control y tres de blanco. Los pocillos de control contenían medio de tratamiento con DCFH-DA y HBSS con AAPH. Los pozos en blanco contenían medio de tratamiento con DCFH-DA y HBSS sin AAPH (Wolfe y Liu 2007).

#### **d Cuantificación de AAC**



Después de la sustracción del blanco a los valores iniciales de fluorescencia, se calculó el área bajo la curva de fluorescencia frente al tiempo para determinar el valor de AAC a cada concentración de extracto de maíz y tortilla. La siguiente ecuación fue utilizada para este ensayo:

$$\text{AAC (unidades)} = 1 - (\int \text{SA} / \int \text{CA})$$

donde:  $\int$  SA es el área integrada bajo la muestra en la curva de fluorescencia frente al tiempo, y  $\int$  CA es el área integrada bajo el control de la curva de fluorescencia frente al tiempo. La dosis media efectiva (EC50) de los extractos de maíz y tortilla fue calculada por el gráfico de efectos medios del log ( $f_a / f_u$ ) frente a log (dosis), donde  $f_a$  es la fracción afectada por el tratamiento (Unidades AAC) y  $f_u$  es la fracción no afectada ( $1 - \text{Unidades AAC}$ ) por el tratamiento. Los valores de EC50 se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar utilizando conjuntos de datos por triplicado obtenidos a partir del mismo experimento. Los valores de EC50 se convirtieron en valores de AAC, que se expresan como micromoles equivalentes de quercetina (EQ) por 100 g de muestra, utilizando el valor medio de EC50 para la quercetina a partir de tres experimentos separados.

## **8 Evaluación del potencial inhibitorio de proliferación en células de cáncer de colon humano (HT-29) y células antitumorales (NIH-3T3)**

### **a Cultivo de células**

Las líneas celulares HT-29 (human colorectal adenocarcinoma cell) y NIH-3T3 (mouse embryonic fibroblast cells) se obtuvieron de ATCC, Manassas, VA, USA. HT-29 fueron cultivadas con medio de crecimiento Gibco McCoy's 5A complementado con 10% de FBS, mientras que NIH-3T3 fueron cultivadas con medio de crecimiento Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) complementado con 10% de FBS, ambas líneas se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células HT-29 y NIH-3T3 usadas para los experimentos correspondieron a los pases entre 5 y 12, y entre los pases 25 y 35, respectivamente.

### **b Ensayo de proliferación celular**

Las células (HT-29 y NIH-3T3) se utilizaron a una densidad de  $2 \times 10^4$  / pozo en 100  $\mu$ L de medio de crecimiento en una placa de 96 pozos. Después de 24 h de incubación a 37°C en atmósfera de dióxido de carbono, con una humedad del 85% para permitir la adhesión celular, las células se trataron sustituyendo el medio de crecimiento por 100  $\mu$ L de DMEM medio que contenía los extractos ligados de las tortillas de maíces nixtamalizados y extrudidos a diferentes concentraciones 5, 10, 20 y 35 mg/mL y se incubaron a 6 h bajo las mismas condiciones. El control recibió todo excepto los extractos. Los extractos ligados se utilizaron para medir la

habilidad de las muestras para inhibir la proliferación celular. La proliferación celular se determinó usando el reactivo MTT Cell Proliferation Assay (Sigma, St Louis, MO) basado en ensayo colorimétrico. La proliferación celular fue medida por la habilidad de reducir el compuesto (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo) (MTT) a formazan. Después de 4 h de incubación y 1 h de agitación con solvente (0.04 - 0.1 N HCl en isopropanol) para disolver los cristales de formazan, la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplatos (Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Este ensayo se realizó tres veces por separado.

#### **c Determinación de la $CI_{50}$**

Se determinó la Concentración Inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) a través de la curva dosis respuesta de las concentraciones de extractos ligados del maíz crudo, tortilla nixtamalizada y tortilla extrudida utilizadas en el ensayo de citotoxicidad por MTT, las cuales fueron 5, 10, 20, 35 y 50 mg/mL, posteriormente se calcularon los datos de dichas concentraciones en logaritmo base 10 con el programa GraphPad Prisma 6 para obtener  $CI_{50}$ .

#### **d Evaluación de la muerte celular. Apoptosis y necrosis**

Los cultivos celulares se sembraron en placas de 24 pozos con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10%, v/v), después de 24 h se retiró el medio y se adicionaron los extractos ligados de las tortillas de maíz criollo azul nixtamalizado y extrudido a diferentes concentraciones, se dejaron en incubación durante 6 h. Posteriormente, las células se separaron de los pozos con tripsina, se lavaron con PBS y se centrifugaron hasta obtener un pellet de células, a éstas se le añadió 100  $\mu$ L de buffer, 1 mL de yoduro de propidio y 5 mL de anexina y se dejaron incubar 15 min en la campana de cultivo. Finalizada la incubación, cada muestra se analizó en el citómetro de flujo (Beckman Coulter Celular Cytomics FC500) hasta contabilizar 3 000 eventos celulares. Se consideraron que la población de células positiva para el marcaje con anexina y negativa para yoduro de propidio se encuentra en apoptosis temprana, mientras que la población positiva para ambos marcajes corresponde a células en apoptosis total y necrosis.

### **9 Análisis estadístico**

Se utilizaron procedimientos ANOVA para el análisis de los resultados experimentales utilizando el software Minitab versión 2013. Las diferencias entre tratamientos se determinaron con pruebas de comparación de Tukey

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A TORTILLAS DE MAÍCES NIXTAMALIZADOS Y EXTRUDIDOS

Se obtuvieron harinas de maíz criollo azul (A-512) y blanco comercial (B-111) nixtamalizadas y extrudidas aptas para la elaboración de tortillas. Las tortillas presentaron propiedades funcionales (hinchabilidad / roabilidad) y sensoriales (aceptabilidad) aceptables (**Fig 16**).

### B NIVELES Y PERFILES DE FITOQUÍMICOS (CONTENIDO DE FENÓLICOS TOTALES, ANTOCIANINAS Y ÁCIDOS FENÓLICOS) DE TORTILLAS DE MAÍZ CRIOLLO AZUL Y BLANCO COMERCIAL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL Y COCCIÓN ALCALINA POR EXTRUSIÓN

#### 1 Contenido de fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales (CFT) se determinó como la suma de fenólicos libres y ligados en genotipos de maíz crudo y tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión (**Cuadro 3**). Los materiales sin procesar presentaron los mayores ( $p < 0.05$ ) valores de CFT (A-512 = 244.0 y B-111 = 231.1 mg EAG/100 g bs). Estas cantidades de CFT de maíz criollo y blanco comercial fueron similares a las obtenidas en diferentes maíces mexicanos, chilenos y koreanos pigmentados, reportadas anteriormente (Salinas-Moreno y col 2012; Gonzalez-Muñoz y col 2013; Kang Mo y col 2014). Sin embargo, López-Martínez y col (2009) informó el CFT de dieciocho maíces pigmentados mexicanos más altos que los reportados en nuestro estudio. Las diferencias observadas en el contenido de fenólicos totales podrían ser atribuidas a antecedentes genéticos del grano, propiedades físicas del grano y particularmente a la relación relativa de las partes anatómicas del grano de maíz desde el pericarpio hasta el endospermo y capa de aleurona, las cuales son las más ricas en compuestos fenólicos (Adom y Liu 2002).

Los dos procesos de cocción utilizados para preparar tortillas afectaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los niveles de fenólicos en comparación con los granos crudos. Las tortillas extrudidas contenían aproximadamente el doble de CFT que las preparadas a partir de la harina nixtamalizada. La mayor retención y estabilidad de los compuestos fenólicos en tortillas extrudidas (> 80.3%) podría atribuirse probablemente al corto tiempo de proceso térmico del grano entero; por otra parte, durante el proceso de extrusión no hay pérdidas del componente anatómico del grano de maíz (Mora-Rochín y col 2010; Corrales-Bañuelos y col 2016).



a) A-512



b) B-111



c) A-512



d) B-111



e)



f)

**Fig 16.** Tortillas; (a, b) Nixtamalización; (c, d) Extrusión; (e) Hinchabilidad; (f) Rolabilidad.

**Cuadro 3.** Contenido de fenólicos totales y porcentaje de contribución en maíz criollo azul y blanco comercial y en sus tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Maíz	Producto	Contenido de Fenólicos					
		[mg equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100 g base seca (bs)]					
		Libre	%	Ligado	%	Total	%
A-512	Crudo	41.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	16.9	202.8 ± 3.1 <sup>b</sup>	83.1	244.0 ± 5.1 <sup>a</sup>	
	TN	21.7 ± 2.7 <sup>b</sup>	17.9	99.7 ± 3.0 <sup>c</sup>	82.1	121.4 ± 2.6 <sup>d</sup>	49.8
	TE	20.8 ± 1.2 <sup>c</sup>	10.2	183.0 ± 1.7 <sup>b</sup>	89.8	203.8 ± 2.5 <sup>bc</sup>	83.5
B-111	Crudo	32.6 ± 1.8 <sup>bc</sup>	14.1	200.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	86.8	231.1 ± 3.9 <sup>a</sup>	
	TN	16.3 ± 1.2 <sup>d</sup>	14.8	94.2 ± 3.8 <sup>c</sup>	85.2	110.5 ± 4.1 <sup>d</sup>	47.8
	TE	21.7 ± 0.4 <sup>e</sup>	11.7	163.9 ± 4.2 <sup>b</sup>	88.3	185.6 ± 3.8 <sup>c</sup>	80.3

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

Sin embargo, el menor porcentaje de retención de CFT en tortillas nixtamalizadas (47.8 a 49.8%) podría estar relacionado con el efecto combinado del pH alcalino alto y altas temperaturas durante el proceso de nixtamalización, así como las pérdidas físicas del pericarpio y la lixiviación de fenoles en el licor de cocción (Mora-Rochín y col 2010). Estudios similares también han encontrado reducciones de CFT en tortillas nixtamalizadas (De la Parra y col 2007; Mora-Rochín y col 2010).

En este estudio, se observó que el genotipo A-512 arrojó los mayores ( $p < 0.05$ ) valores en el CFT durante el proceso de nixtamalización (121.4 mg EAG/100 g bs) así como en el proceso de extrusión (203.8 mg EAG/100 g bs), cuando fueron comparados con las tortillas del genotipo B-111 elaboradas por el proceso de nixtamalización (110.5 mg EAG/100 g bs) y extrusión (185.6 mg EAG/100 g bs). Esto puede ser atribuido a la genética de cada material, así como también al tipo de fenólicos que estos contengan.

Por otro lado, en nuestro estudio, se observó que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en maíz crudo, así como en tortillas nixtamalizadas y extrudidas, se encuentran en forma ligada. La contribución porcentual de los compuestos fenólicos ligados al total varió de 83.1 a 86.8% en el maíz sin procesar, mientras que en las tortillas nixtamalizadas y extrudidas oscilaron entre 82.1 y 85.2% y 88.3 y 89.8% respectivamente (**Cuadro 3**).

## **2 Contenido de antocianinas totales**

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

La mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de antocianinas totales se observó en el maíz azul sin procesar (26.2 mg ECG/100 g bs) (**Cuadro 4**). En un estudio reciente, Mora-Rochín y col (2016) reportó un rango de antocianinas totales de 14.1 a 33.7 mg ECG/100 g bs en quince genotipos de maíz azul criollo originarios del estado de Sinaloa. La variabilidad en el contenido de antocianinas podría ser atribuida principalmente a la genética de cada genotipo. Sin embargo, diversos factores ambientales: luz visible, radiación ultravioleta, bajas temperaturas, sequías, estrés hídrico, entre otros, han manifestado inducir la acumulación de antocianinas en las plantas (Chalker-Scott 1999).

Ambos procesos (nixtamalización y extrusión) causaron pérdidas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de antocianinas cuando fueron comparados con los granos sin procesar. Las tortillas

**Cuadro 4.** Contenido de antocianinas totales y porcentaje de contribución de maíz criollo azul y sus tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Maíz	Producto	Contenido de Antocianinas Totales [mg equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG) / 100 g base seca (bs)]	
			%
A-512	Crudo	26.2±0.5 <sup>a</sup>	
	TN	12.3±0.1 <sup>b</sup>	46.9
	TE	6.7±0.1 <sup>c</sup>	25.6

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

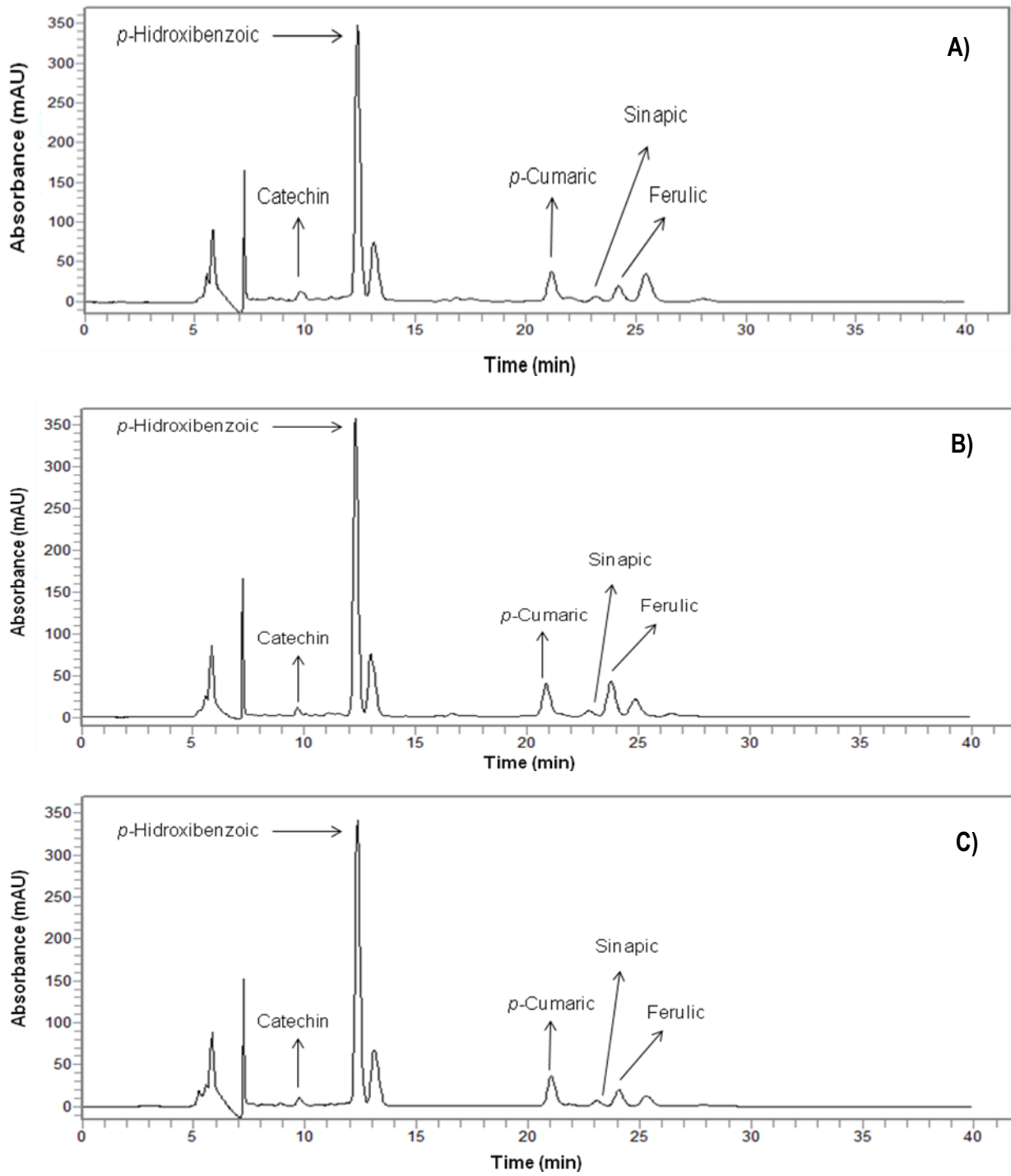
de los maíces azules elaboradas por el proceso de nixtamalización presentaron mayores ( $p < 0.05$ ) valores comparadas con las obtenidas por el proceso de extrusión, con un porcentaje de retención de 46.9%; mientras que en las tortillas elaboradas por extrusión el porcentaje de retención fue de 25.6%. En este estudio, las tortillas extrudidas mostraron pérdidas más altas ( $p < 0.05$ ) que las nixtamalizadas, lo que se puede atribuir a que durante el proceso de extrusión el grano entero está fragmentado dejando el pericarpio y la capa de aleurona más disponibles para efectos alcalinos y térmicos, de igual manera, el hidróxido de calcio que ha sido añadido durante el proceso de extrusión nunca se elimina, al contrario de lo que ocurre en la nixtamalización. En ese sentido, Sánchez-Madrigal y col (2015) observó que al aumentar las concentraciones de calcio durante el proceso de extrusión de maíz azul para obtener harinas, las antocianinas totales mostraron porcentajes de pérdidas de 47 a 59%.

### 3 Contenido de ácidos fenólicos

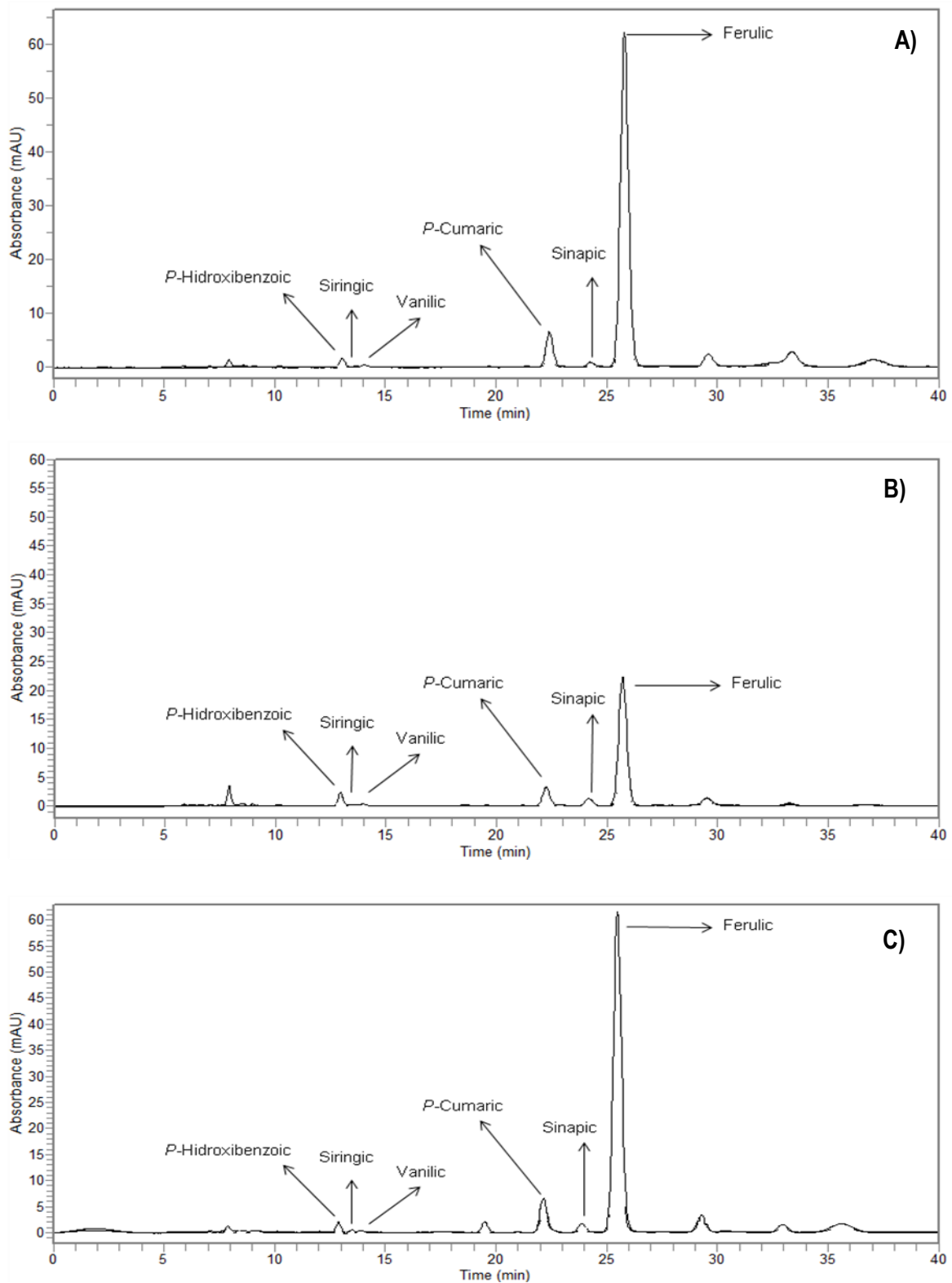
Diversos estudios han investigado la composición fenólica de diversos granos de cereales, no sólo por sus funciones estructurales de la pared celular, sino también por sus propiedades bioactivas y antioxidantes. Algunos ácidos hidroxicinámicos tales como sinápico, ferúlico y *p*-cumárico han sido identificados en diferentes genotipos de maíz blanco (Kennedy y col 1999; Bily y col 2004). El perfil de ácidos fenólicos por HPLC de extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial fue similar en maíces crudos y sus tortillas con la presencia de seis picos como se muestra en las **Fig 17 y 18**. Se lograron identificar seis diferentes ácidos fenólicos, incluyendo *p*-hidroxibenzoico, siríngico, vanílico, sinápico, *p*-cumárico y ferúlico. Los resultados indicaron que los ácidos vanílico y siríngico sólo se encontraron en la fracción ligada. Todos los demás ácidos fenólicos se presentaron en las fracciones libres y ligadas. Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico fueron los compuestos fenólicos predominantes en ambos maíces crudos, que varió de 168.4 a 185.9 y 15.6 a 21.4 mg de ácido fenólico/100 g bs, respectivamente (**Cuadro 5**).

La transformación de grano a tortilla por el proceso de nixtamalización causó disminuciones ( $p < 0.05$ ) en el contenido total de ácidos fenólicos cuando se compararon con el maíz sin procesar, observando disminuciones de hasta un 70%. Esta disminución puede ser atribuida a la pérdida del pericarpio durante la etapa de cocción, reposo y lavado durante el proceso de nixtamalización, parte anatómica donde se encuentra el mayor contenido de ácidos fenólicos en el maíz. Por otro lado, las tortillas elaboradas vía extrusión no mostraron diferencia significativa en el contenido de ácidos fenólicos totales comparadas con los granos crudos.





**Fig 17.** Perfil de ácidos fenólicos por HPLC de extractos libres de maíz azul. A) Crudo, B) TN y C) TE.



**Fig 18.** Perfil de ácidos fenólicos por HPLC de extractos ligados de maíz azul. A) Crudo, B) TN y C) TE.

**Cuadro 5.** Composición de ácidos fenólicos en maíz criollo azul y blanco comercial y en sus tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Maíz/ Producto	Fracción	Ácidos fenólicos [mg ácido fenólico/100 g base seca (bs)]						Total	
		Siríngico	Vanílico	<i>p</i> -Hidroxibenzoico	<i>p</i> -Cumárico	Sinápico	Ferúlico		
A-512	Crudo	Total	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	15.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	168.4 ± 4.2 <sup>d</sup>	192.1 ± 4.3 <sup>c</sup>
		Libre	ND	ND	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>i</sup>
		Ligado	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	14.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	168.0 ± 4.2 <sup>d</sup>	189.8 ± 3.2 <sup>cd</sup>
	TN	Total	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	47.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	65.3 ± 2.6 <sup>e</sup>
		Libre	ND	ND	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.3 <sup>g</sup>
		Ligado	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	44.7 ± 1.8 <sup>d</sup>	60.9 ± 4.3 <sup>ef</sup>
	TE	Total	1.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	18.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	167.4 ± 5.6 <sup>d</sup>	200.0 ± 4.6 <sup>bc</sup>
		Libre	ND	ND	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.6 ± 0.6 <sup>d</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>h</sup>
		Ligado	1.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	17.2 ± 0.9 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	165.8 ± 5.2 <sup>d</sup>	196.3 ± 4.3 <sup>c</sup>
B-111	Crudo	Total	1.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	21.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	185.9 ± 1.1 <sup>d</sup>	215.2 ± 1.8 <sup>a</sup>
		Libre	ND	ND	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.3 <sup>j</sup>
		Ligado	1.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	20.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	185.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	213.4 ± 4.3 <sup>a</sup>
	TN	Total	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	8.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	49.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	65.5 ± 1.8 <sup>e</sup>
		Libre	ND	ND	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>h</sup>
		Ligado	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	8.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	47.1 ± 49.4 <sup>a</sup>	62.0 ± 4.3 <sup>ef</sup>
	TE	Total	2.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	21.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.07 ± 0.0 <sup>b</sup>	178.7 ± 0.5 <sup>d</sup>	215.2 ± 1.8 <sup>a</sup>
		Libre	ND	ND	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.3 <sup>j</sup>
		Ligado	2.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	20.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	178.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	211.1 ± 2.3 <sup>a</sup>

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

Contrario al proceso de nixtamalización, en la extrusión permanecen todas las partes anatómicas del grano incluyendo el pericarpio y capa de aleurona. Estas características del proceso de extrusión, hacen que las tortillas obtenidas por dicho proceso contengan 3.6 veces más ácido ferúlico que las tortillas nixtamalizadas (**Cuadro 5**). La tortillas extrudidas de los genotipos A-512 y B-111 retuvieron 94.1 y 96.1% de ácido ferúlico total comparado con los granos crudos. Mora-Rochin y col (2010) reportaron resultados similares con 96.7% de retención de ácido ferúlico en la tortilla de maíz azul producida a partir de harina extrudida. Nuestro estudio mostró que el ácido ferúlico sometido al proceso de nixtamalización podría perderse en el pericarpio que se elimina en el proceso, hasta un 75% en comparación con el maíz crudo. De acuerdo con estos resultados, esta es la primera vez que los perfiles de ácidos fenólicos en forma ligada han sido reportados para las tortillas extrudidas y nixtamalizadas.

## **C BIOACTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES EN TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL Y BLANCO COMERCIAL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL Y COCCIÓN ALCALINA POR EXTRUSIÓN**

### **1 Determinación de capacidad antioxidante química (ORAC, ABTS y DPPH)**

La capacidad antioxidante de los granos enteros y sus tortillas producidas por ambos procesos se evaluaron utilizando ensayos químicos ORAC, DPPH y ABTS (**Cuadro 6**). Los tres ensayos de capacidad antioxidante se basan en diferentes mecanismos: transferencia de un solo electrón para los métodos DPPH y ABTS y transferencia de átomos de hidrógeno para el método de ORAC (Huang y col 2005). El primero mide la capacidad reductora de los antioxidantes y el segundo mide la capacidad donante de átomos de hidrógeno de antioxidantes que rompen la reacción radical en cadena. Por lo tanto, los resultados de estos tres ensayos pueden proporcionar información útil sobre las propiedades de los antioxidantes contenidos en maíz y tortillas. En general, la actividad antioxidante de las tortillas azules se encuentra en el siguiente orden: ORAC > ABTS > DPPH. Las metodologías utilizadas en este estudio se han utilizado ampliamente para medir la actividad antioxidante en la ciencia de los alimentos. Sin embargo, es importante mencionar que no pueden compararse porque cada uno mide la inhibición de diferentes radicales.

La capacidad antioxidante total del maíz azul y blanco comercial crudos utilizando las pruebas ORAC, DPPH y ABTS oscilaron entre 9357.7-10058.8, 3164.8-3265.7 y 7614.8-8733.1  $\mu\text{mol ET} / 100\text{g bs}$ , respectivamente (**Cuadro 6**). Los fenólicos ligados de los granos crudos fueron los principales contribuyentes (84.3 a 87.8%) a la capacidad antioxidante total. Diferentes

**Cuadro 6.** Capacidad antioxidante química de maíz criollo azul y blanco comercial y en tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Genotipo	Producto	ORAC <sup>1</sup>			DPPH <sup>1</sup>			ABTS <sup>1</sup>		
		Libre	Ligado	Total	Libre	Ligado	Total	Libre	Ligado	Total
<b>A-512</b>	<b>Crudo</b>	1616.6±127.0 <sup>a</sup>	8486.1±588.2 <sup>a</sup>	10058.8±740.9 <sup>a</sup>	570.9±37.2 <sup>a</sup>	2674.4±139.9 <sup>a</sup>	3164.8±185.6 <sup>a</sup>	932.4±15.5 <sup>a</sup>	6682.4±49.9 <sup>b</sup>	7614.8±41.8 <sup>b</sup>
	<b>TN</b>	1571.2±93.2 <sup>a</sup>	4296.4±376.9 <sup>b</sup>	5941.3±403.4 <sup>b</sup>	428.3±10.4 <sup>b</sup>	1475.4±113.6 <sup>b</sup>	1903.7±108.7 <sup>b</sup>	725.7±26.2 <sup>b</sup>	5555.9±291.9 <sup>c</sup>	6281.6±295.5 <sup>d</sup>
	<b>TE</b>	1283.2±115.3 <sup>b</sup>	8466.2±213.3 <sup>a</sup>	9749.4±184.0 <sup>a</sup>	376.1±16.1 <sup>bc</sup>	2583.3±132.1 <sup>a</sup>	3060.8±242.9 <sup>a</sup>	623.5±13.9 <sup>c</sup>	6623.0±219.2 <sup>b</sup>	7246.5±232.1 <sup>bc</sup>
<b>B-111</b>	<b>Crudo</b>	991.9±42.5 <sup>cd</sup>	8489.4±762.5 <sup>a</sup>	9357.7±834.7 <sup>a</sup>	589.7±48.8 <sup>a</sup>	2835.9±74.2 <sup>a</sup>	3265.7±79.9 <sup>a</sup>	609.4±22.9 <sup>c</sup>	8123.7±320.6 <sup>a</sup>	8733.1±309.9 <sup>a</sup>
	<b>TN</b>	977.1±65.8 <sup>bc</sup>	4016.9±374.8 <sup>b</sup>	5128.0±366.1 <sup>b</sup>	324.6±0.2 <sup>cd</sup>	1138.5±44.8 <sup>b</sup>	1463.7±44.9 <sup>c</sup>	533.7±11.4 <sup>d</sup>	6160.6±357.8 <sup>bc</sup>	6694.4±368.9 <sup>cd</sup>
	<b>TE</b>	844.2±38.6 <sup>d</sup>	8378.3±291.3 <sup>a</sup>	9222.4±317.2 <sup>a</sup>	277.6±12.3 <sup>d</sup>	2740.2±68.9 <sup>a</sup>	3017.8±61.9 <sup>a</sup>	406.3±28.2 <sup>e</sup>	7943.2±182.9 <sup>a</sup>	8349.5±167.6 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>[μmol equivalentes de trolox (ET)/100 g base seca (bs)]; valores dentro de columnas sin letras en común son diferentes (p < 0.05); TN = tortillas elaboradas con maíz nixtamalizado; TE = tortillas elaboradas con maíz extrudido.

investigaciones han reportado que los polifenoles ligados son los contribuyentes más importantes al contenido de antioxidantes y esta fracción representa aproximadamente el 98% del contenido total de antioxidantes en el maíz (Mora-Rochín y col 2010; Aguayo-Rojas y col 2012).

La capacidad antioxidante total disminuyó como resultado del procesamiento térmico cuando ambos granos se transformaron en tortillas. Los valores de ORAC, DPPH y ABTS para las tortillas extrudidas de los dos genotipos oscilaron entre 9222.4-9749.4, 3017.8-3060.8 y 7246.5-8349.5  $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g bs}$ , respectivamente (**Cuadro 6**). La retención de los niveles de capacidad antioxidante en tortillas extrudidas fue mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación con las tortillas elaboradas por el proceso de nixtamalización. Nuestros resultados indicaron que la propuesta de extrusión cocción es una estrategia fundamental para retener altos niveles de fitoquímicos (fenólicos totales y ácidos fenólicos), y el contenido de antioxidantes asociados con granos crudos. Esto es importante cuando se consideran los beneficios para la salud de los productos de granos enteros.

## **2 Actividad antioxidante celular (AAC)**

El método AAC tiene enormes ventajas sobre los ensayos de capacidad antioxidante químicos. Este ensayo proporciona más información, ya que toma en cuenta la captación celular, la distribución, la bioaccesibilidad y el metabolismo de componentes bioactivos, y por lo tanto proporciona una mejor predicción de la capacidad antioxidante de dichos compuestos. La actividad antioxidante celular se midió usando los protocolos con y sin lavado con PBS para tratar a las células después de la incubación. Entre los maíces crudos, los genotipos A-512 y B-111, con el protocolo sin lavado con PBS se observó que la AAC total varió de 37.7 a 99.3  $\mu\text{mol EQ} / 100 \text{ g (bs)}$ , respectivamente, mientras que con el protocolo de lavado con PBS, el maíz azul mostró la mayor AAC, con un valor de 18.7  $\mu\text{mol EQ} / 100 \text{ g (bs)}$ , seguido por el maíz blanco, que presentó valores de AAC de 11.4  $\mu\text{mol EQ} / 100 \text{ g de (bs)}$  (**Cuadro 7**).

Las fracciones ligadas de los maíces crudos presentaron los valores de AAC más altos que los de las fracciones libres, en ambos protocolos de PBS. La contribución de los fenólicos ligados a los valores totales de AAC fueron de 93.8 a 96.6% sin lavado con PBS, mientras que los compuestos fenólicos ligados aportaron 79.8 a 84.0% en lavado con PBS (**Cuadro 7**). Estos fenólicos son fisiológicamente esenciales, ya que esas fracciones pueden pasar a través del estómago y del intestino delgado llegando al colon, donde podrían tener un efecto antioxidante in situ (Chandrasekara y Shahidi 2012).

**Cuadro 7.** Actividad antioxidante celular (AAC) de las fracciones libres, ligadas y totales de maíz azul y blanco comercial y sus tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Genotipo	Producto	Sin lavado PBS				Con lavado PBS			
		AAC ( $\mu\text{mol EQ}/100 \text{ g bs}$ )				AAC ( $\mu\text{mol EQ}/100 \text{ g bs}$ )			
		Libre	Ligado	Total	Retención (%)	Libre	Ligado	Total	Retención (%)
A-512	Crudo	6.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> (6.2) <sup>1</sup>	93.1 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup> (93.8)	99.3 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>		3.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup> (16.0)	15.7 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup> (84.0)	18.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	
	TN	5.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (13.8)	34.3 $\pm$ 0.3 <sup>h</sup> (86.2)	39.8 $\pm$ 0.8 <sup>g</sup>	40.1 $\pm$ 1.4 <sup>c</sup>	2.6 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup> (28.6)	6.5 $\pm$ 0.3 <sup>f</sup> (71.4)	9.1 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	48.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
	TE	3.6 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup> (7.2)	48.9 $\pm$ 1.2 <sup>e</sup> (92.8)	78.2 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	78.8 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup> (25.5)	10.8 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup> (74.5)	14.5 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	77.5 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>
B-111	Crudo	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> (3.4)	36.4 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup> (96.6)	37.7 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>		2.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (20.2)	9.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup> (79.8)	11.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	
	TN	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup> (8.8)	15.6 $\pm$ 0.9 <sup>f</sup> (91.2)	17.1 $\pm$ 1.1 <sup>e</sup>	45.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (38.9)	3.3 $\pm$ 0.2 <sup>g</sup> (61.1)	5.4 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	47.4 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>
	TE	2.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup> (8.1)	24.8 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup> (91.9)	28.5 $\pm$ 1.9 <sup>bc</sup>	75.6 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (30.1)	5.8 $\pm$ 0.7 <sup>d</sup> (69.9)	8.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	72.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Los valores entre paréntesis indican la contribución porcentual de esta fracción correspondiente a la CAA total; valores dentro de columnas sin letras en común son diferentes ( $p < 0.05$ ); TN = tortillas elaboradas con maíz nixtamalizado; TE = tortillas elaboradas con maíz extrudido.

Tanto el proceso de nixtamalización como el de extrusión utilizados para la elaboración de tortillas en el presente estudio causaron una disminución ( $p < 0.05$ ) de AAC en comparación con los granos crudos. Las cantidades reportadas en este estudio de AAC totales en el protocolo sin lavado con PBS para tortillas nixtamalizadas y extrudidas preparadas oscilaron entre 17.1 y 39.8  $\mu\text{mol EQ}/100\text{ g (bs)}$  y 28.5 a 78.2  $\mu\text{mol EQ}/100\text{ g (bs)}$ , respectivamente. Sin embargo, en el protocolo de lavado con PBS, los valores AAC total oscilaron entre 5.4 y 9.1  $\mu\text{mol EQ}/100\text{ g (bs)}$  para tortillas nixtamalizadas y de 8.3 a 14.5  $\mu\text{mol EQ}/100\text{ g (bs)}$  para tortillas extrudidas.

En ambos protocolos, los valores de AAC totales de las tortillas preparadas con harina de maíz nixtamalizado fueron menores ( $p < 0.05$ ) en comparación con las tortillas elaboradas con harinas de maíz extrudido (**Cuadro 7**). En general, la reducción de la AAC de las muestras de maíz pigmentado y blanco comercial durante la elaboración de las tortillas podría atribuirse a los efectos combinados del procesamiento alcalino y térmico, que facilitan la pérdida de ciertos compuestos antioxidantes y la reducción de los compuestos fenólicos totales.

Interesantemente, se observó una retención de los valores de AAC en tortillas extrudidas ( $>77.8\%$  sin lavado con PBS y  $>70.7\%$  con lavado con PBS). En ese sentido, se mostró una retención significativa de los valores de AAC en comparación con los granos crudos en tortillas extrudidas del genotipo A-512 (78.8% sin lavado con PBS y 77.5% con lavado con PBS). Esta retención se atribuye principalmente al proceso de extrusión cocción de corta duración de los granos enteros.

Los valores de AAC de los fitoquímicos libres y ligados del maíz criollo azul y blanco comercial así como de sus tortillas fueron determinados por primera vez en la presente investigación. De acuerdo con la literatura, existen reportes de valores de AAC en otros cereales (Kremer-Faller y col 2012; Zhang y col 2014) que comparados con los mostrados en este estudio son menores que los reportados en los genotipos A-512 y B-111.

### **3 Valores de $EC_{50}$ por AAC**

Los valores de  $EC_{50}$  (mg/mL) indican la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la fluorescencia de la DCF por la oxidación provocada por los radicales peroxilo en células HepG2 en comparación con un blanco. Esto significa que mientras más bajo sea el valor de  $EC_{50}$  de una muestra, mayor es su actividad antioxidante. Los valores de  $EC_{50}$  de los extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial y sus tortillas obtenidas por los procesos de nixtamalización y extrusión se muestran en el **Cuadro 8**. La oxidación de DCFH fue inhibida por los protocolos de lavado con PBS y no lavado con PBS entre la aplicación de los



**Cuadro 8.** Valores de EC<sub>50</sub> de extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial y de tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

Maíz	Producto	Sin lavado PBS		Con lavado PBS	
		EC <sub>50</sub> (mg/mL)		EC <sub>50</sub> (mg/mL)	
		Libre	Ligado	Libre	Ligado
A-512	Crudo	113.7 ± 1.6 <sup>e</sup>	7.6 ± 0.8 <sup>d</sup>	439.3 ± 2.7 <sup>c</sup>	83.5 ± 4.6 <sup>d</sup>
	TN	128.5 ± 1.1 <sup>d</sup>	93.1 ± 6.2 <sup>b</sup>	496.7 ± 12.3 <sup>bc</sup>	184.9 ± 2.3 <sup>b</sup>
	TE	197.6 ± 1.0 <sup>c</sup>	14.4 ± 1.0 <sup>cd</sup>	352.6 ± 10.5 <sup>d</sup>	37.5 ± 1.2 <sup>f</sup>
B-111	Crudo	554.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	19.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	578.7 ± 8.1 <sup>a</sup>	143.8 ± 2.8 <sup>c</sup>
	TN	476.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	135.4 ± 7.9 <sup>a</sup>	481.1 ± 21.8 <sup>bc</sup>	272.6 ± 0.7 <sup>a</sup>
	TE	189.8 ± 9.3 <sup>c</sup>	6.0 ± 0.5 <sup>d</sup>	530.3 ± 59.7 <sup>ab</sup>	60.0 ± 1.0 <sup>e</sup>

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

extractos y el tratamiento con AAPH (generador de radicales libres). En comparación con el protocolo con lavado PBS, el protocolo sin lavado PBS presentó valores de  $EC_{50}$  significativamente más bajos y una mayor AAC (**Cuadro 8**). De acuerdo con Wolfe y col (2008) este resultado se atribuye al tipo específico de los antioxidantes de la muestra y su ubicación en las células HepG2. Las diferencias en la solubilidad, tamaño molecular y la polaridad de la amplia variedad de compuestos presentes en una matriz alimenticia, les proporcionan una biodisponibilidad y distribución única a nivel de órganos y tejidos celulares, lo que permite la bioactividad en muchos sitios.

En el protocolo sin lavado con PBS los extractos ligados presentaron menores valores ( $p < 0.05$ ) de  $EC_{50}$  comparados con los extractos libres en todas las muestras (**Cuadro 8**). Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos en esta fracción, se deben principalmente a que más del 80% de los fitoquímicos en grano de maíz se encuentran ligados a pared celular, además, esta fracción proporciona más del 80% de la actividad antioxidante. De igual manera los extractos ligados de los maíces sin procesar mostraron valores de  $EC_{50}$  de 7.6 y 19.3 mg/mL para los genotipos A-512 y B-111, respectivamente. En este mismo protocolo, las tortillas elaboradas por el proceso de extrusión de ambos genotipos obtuvieron los valores (6.0 y 14.4 mg/mL) mas bajos comparados con las tortillas elaboradas por el proceso de nixtamalización (93.1 y 135.4 mg/mL).

En el protocolo con lavado con PBS los extractos ligados también presentaron menores valores ( $p < 0.05$ ) de  $EC_{50}$  comparados con los extractos libres en todas las muestras (**Cuadro 8**). De forma interesante, nuevamente las tortillas extrudidas de ambos genotipos mostraron los valores mas bajos de  $EC_{50}$  (37.5 y 60.0 mg/mL) comparados con las tortillas elaboradas por el proceso de nixtamalización (184.9 y 272.6 mg/mL). Los productos obtenidos vía extrusión, son considerados integrales, es decir, el grano al ser procesado conserva todas las partes anatómicas, sin embargo, en el proceso de nixtamalización, la fracción del pericarpio (fracción donde se encuentra más del 80% de los fenólicos en el grano de maíz), se desprende durante la etapa de cocción y reposo.

Por lo tanto, el énfasis en la distribución tanto del contenido de biocompuestos libres y ligados, y su actividad antioxidante es clave para entender el potencial benéfico para la salud del consumo de granos integrales (Wang y col 2014; Das y Singh 2015).

#### **4 Calidad antioxidante celular**

La Calidad Antioxidante Celular (CAC) es una medida de la actividad antioxidante celular proporcionada por 100  $\mu$ mol de fenolicos totales encontrados en el extracto, por lo que brinda

una medida del potencial de los antioxidantes presentes (Wolfe y Liu 2007; Song y col 2010). La Calidad Antioxidante Celular (CACT) (suma de la CAC libre y ligada) (**Cuadro 9**) del grano crudo y sus tortillas nixtamalizadas y extrudidas se determinaron a partir de sus valores de AAC y contenidos de fenólicos totales, y fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de quercetina (EQ) por 100  $\mu\text{mol}$  de fenólicos. La CACT del grano crudo y sus tortillas nixtamalizadas y extrudidas en el protocolo sin lavado con PBS varió desde 3.9 a 10.6, 2.5 a 4.2 y 10.6 a 15.7  $\mu\text{mol EQ} / 100 \mu\text{mol}$  de fenólicos totales, respectivamente. Mientras que en el protocolo con lavado con PBS, estos valores fueron de 2.1 a 2.4, 2.7 a 3.1 y 5.3 a 5.6  $\mu\text{mol QE} / 100 \mu\text{mol}$  de fenólicos totales, respectivamente. Para ambos protocolos, con y sin lavado PBS, las tortillas extrudidas mostraron la mayor CACT, mientras que en tortillas nixtamalizadas fue observada una CACT más baja o similar al grano crudo.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, sí tomamos en cuenta no solo las fracciones libres y ligadas de fitoquímicos de maíces crudos y tortillas procesadas, la CACT es similar o superior al fruto de granada que es el fruto con mayor CAC (12.6  $\mu\text{mol EQ} / 100 \mu\text{mol}$  de fenólicos, protocolo sin lavado PBS) reportado por Wolfe y col (2008). A pesar, que los fitoquímicos ligados son difíciles de digerir en el intestino superior, debido a que se encuentran principalmente en componentes de la pared celular, estos biocompuestos si pueden ser digeridos por la microflora intestinal en la parte del colon, generando de esta forma beneficios en la salud, específicamente reducir el riesgo de cáncer de colon (Adom y Liu, 2002).

## **D POTENCIAL INHIBITORIO DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO (HT-29) Y CÉLULAS ANTITUMORALES (NIH-3T3) DE EXTRACTOS LIGADOS DE TORTILLAS ELABORADAS CON MAÍZ CRIOLLO AZUL. EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN Y COCCIÓN ALCALINA POR EXTRUSIÓN**

### **1 Viabilidad celular**

En años recientes, el cáncer colorrectal ha sido el segundo más mortal y el tercer tipo de cáncer más diagnosticado en todo el mundo (Araujo y col 2011). Una estrategia que se utiliza comúnmente para luchar contra el cáncer de colon implica la prevención mediante intervenciones dietéticas (Brown y col 2001). Reportes previos muestran que el consumo de cereales integrales debido al contenido de fenólicos ligados es un ingrediente en el futuro para alimentos funcionales, los cuales protegen de cáncer de colon (Janicke y col 2005).

**Cuadro 9.** Calidad antioxidante celular de extractos libres y ligados de maíz azul y blanco comercial y de tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

<b>Calidad Antioxidante Celular</b>			
<b>[<math>\mu\text{mol}</math> equivalentes de quercetina (EQ)/100 <math>\mu\text{mol}</math> fenólicos totales]</b>			
<b>Maíz</b>	<b>Producto</b>	<b>Sin lavado PBS</b>	<b>Con lavado PBS</b>
<b>A-512</b>	<b>Crudo</b>	10.6 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>cd</sup>
	<b>TN</b>	4.2 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	2.7 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>
	<b>TE</b>	6.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	5.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
<b>B-111</b>	<b>Crudo</b>	3.9 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
	<b>TN</b>	2.5 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	3.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
	<b>TE</b>	15.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>

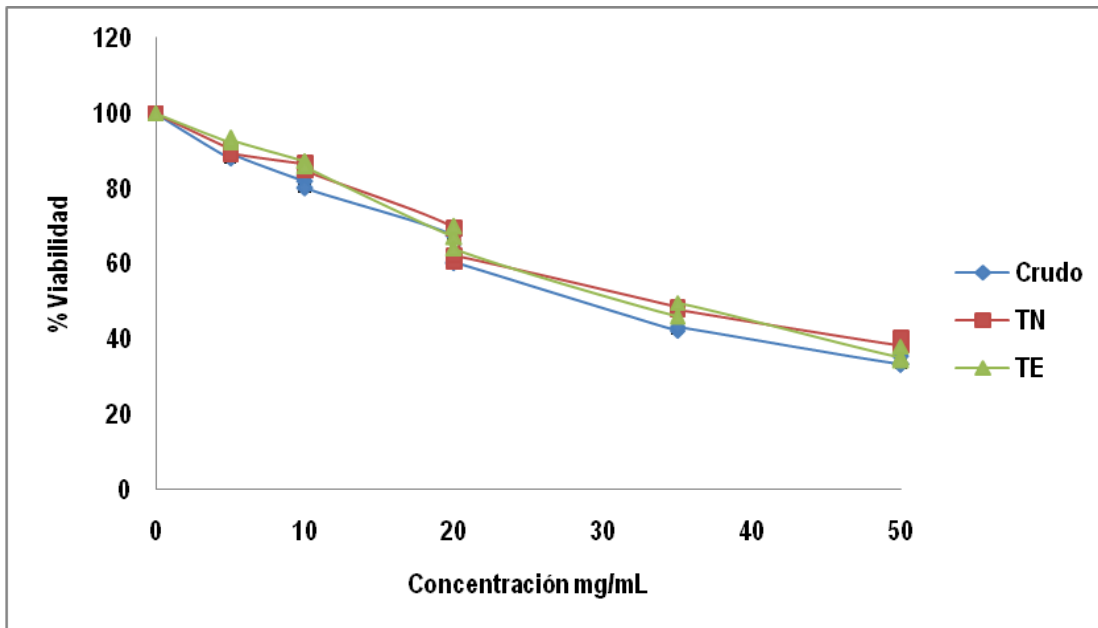
Valores dentro de columnas sin letras en común son diferentes ( $p < 0.05$ ); TN = tortillas elaboradas con maíz nixtamalizado; TE = tortillas elaboradas con maíz extrudido.

Las **Fig 19 y 20** y el **Cuadro 10 y 11** muestran el porcentaje de viabilidad celular y los valores de  $CI_{50}$  de los extractos de fenólicos ligados de maíz criollo azul crudo y sus tortillas elaboradas por los procesos de nixtamalización y extrusión.

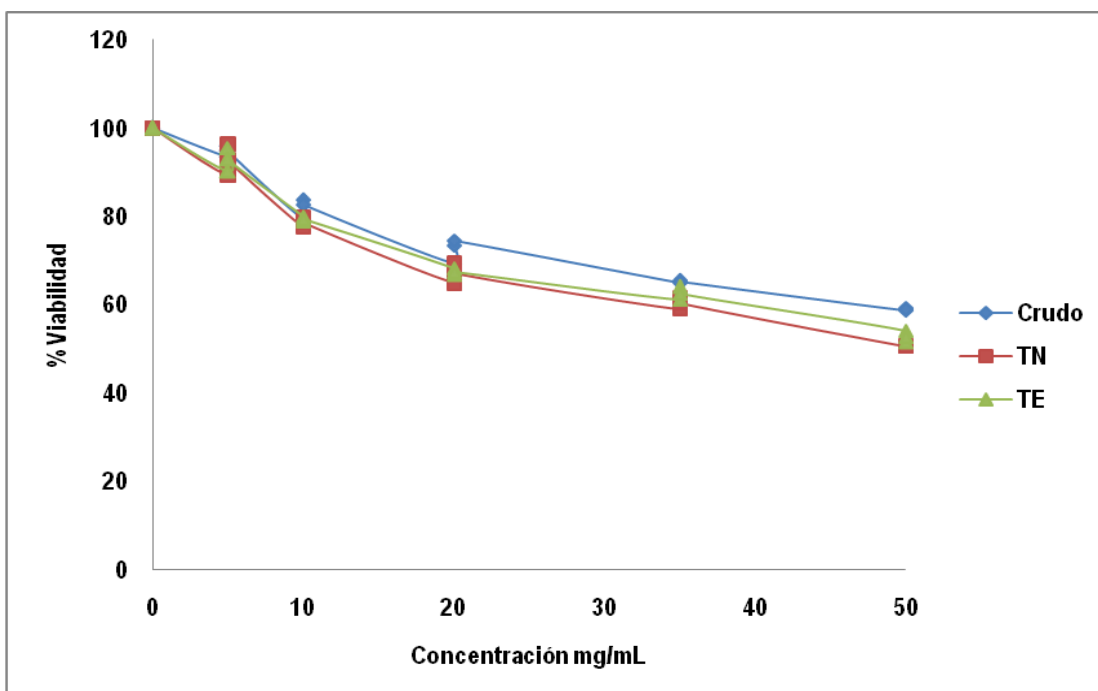
En esta investigación se utilizaron dos líneas celulares, una célula problema HT-29 (cáncer de colon, tumoral) y una célula no transformada NIH-3T3 (fibroblastos de embrión, antitumoral) para estudiar la especificidad de los extractos de fitoquímicos ligados hacia la proliferación de las células cancerígenas. Diferentes dosis 5, 10, 20, 35 y 50 mg/mL de fitoquímicos ligados de maíz azul sin procesar B-512 y sus tortillas nixtamalizadas y extrudidas fueron aplicadas a células HT-29, la línea celular de cáncer de colon humano, en donde claramente se muestra una relación en la disminución del porcentaje de viabilidad con el aumento de la dosis a las 6 h de exposición (**Fig 19, A**). El maíz azul crudo presentó los mayores ( $p < 0.05$ ) porcentajes de inhibición en las cinco dosis probadas comparados con las tortillas obtenidas por ambos procesos (**Cuadro 10**). De igual manera obtuvo un  $CI_{50}$  (29.3 mg/mL) menor que el de las tortillas en estudio (**Cuadro 11**). Este efecto podría ser atribuido a que el contenido de fenólicos y actividad antioxidante en granos crudos es mayor que en el grano procesado por nixtamalización y extrusión. Whent y col (2012) demostraron que extractos de fitoquímicos ligados de cinco diferentes cultivares de trigo a dosis de 20, 50 y 100 mg/mL inhibieron la proliferación de células HT-29, además encontraron que el mejor efecto citotóxico lo obtuvo el cultivar que curiosamente presentó el mayor contenido de ácido ferúlico y  $\alpha$ -tocoferol. La capacidad antioxidante de los compuestos fitoquímicos de los alimentos es por sí misma eficaz para reparar el daño oxidativo en las células y así crear un efecto quimiopreventivo, siendo este uno de los principales mecanismos para prevenir el cáncer (Haliwell y Aruoma, 1991). Por otro lado, estudios previos han demostrado que el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico tienen propiedades biológicas con efectos antiproliferativos en células de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 (Ferguson y col 2005; Janicke y col 2011), siendo estos ácidos fenólicos los de mayor abundancia encontrados en la fracción ligada del maíz azul y sus tortillas en este estudio.

En la transformación del grano de maíz a tortilla se observó que el proceso de nixtamalización mostró ligeros incrementos ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición de células HT-29 en las dosis 5, 10 y 20 mg/mL comparado con el proceso de extrusión; mientras que en las mayores dosis 35 y 50 mg/mL las tortillas por extrusión tuvieron mayores ( $p < 0.05$ ) valores de inhibición (**Cuadro 10**). Sin embargo, se observó que las tortillas elaboradas por el proceso de extrusión mostraron un mejor efecto citotóxico con un  $CI_{50}$  (33.1 mg/mL) que el obtenido por

### A. HT-29

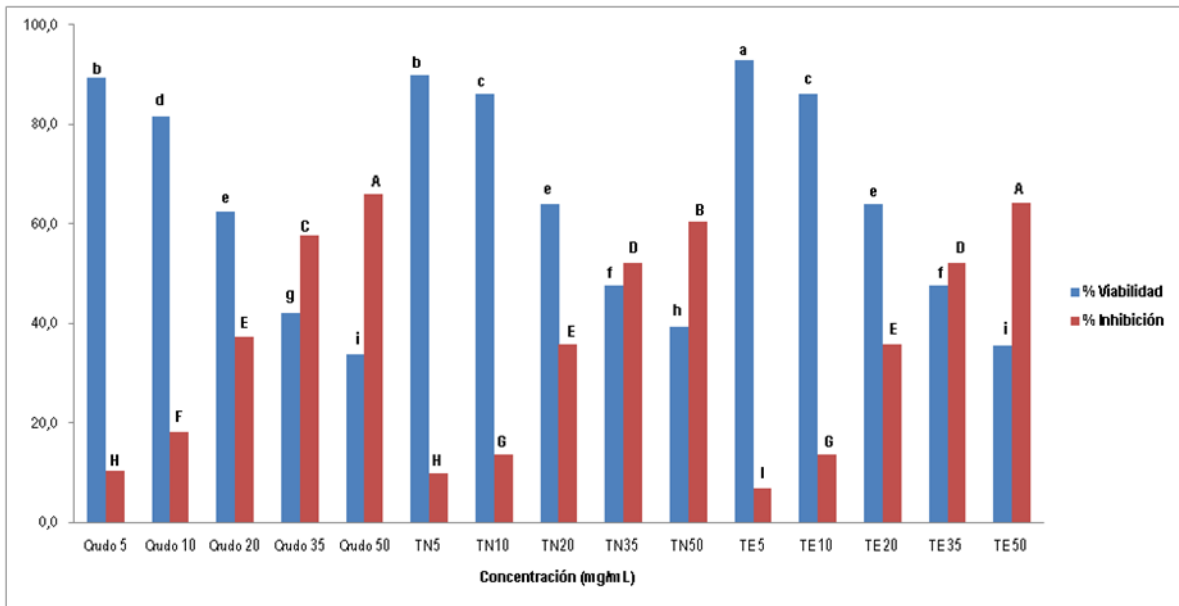


### B. NIH-3T3

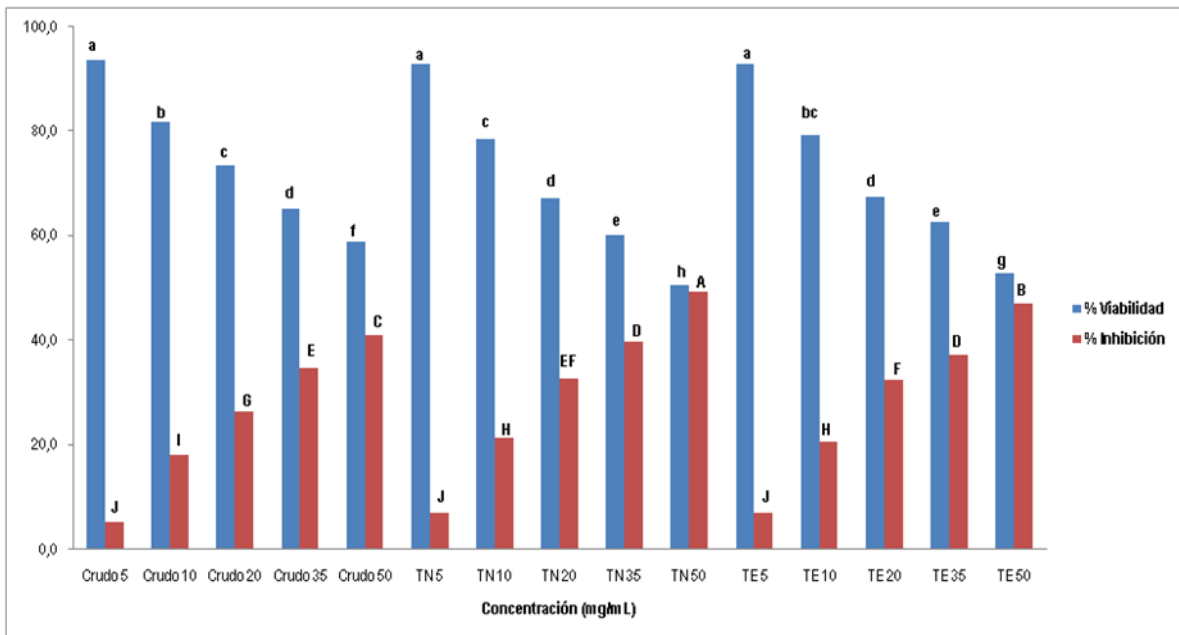


**Fig 19.** Curvas de respuestas de los cultivos de las líneas celulares: A. HT-29 (célula tumoral) y B. NIH-3T3 (célula antitumoral) a concentraciones crecientes de extractos ligados de maíz azul crudo, tortilla nixtamalizada y tortilla extrudida. Se representa el % de viabilidad con respecto al control.

### A. HT-29



### B. NIH-3T3



**Fig 20.** Histogramas de los cultivos de las líneas celulares: A. HT-29 (célula tumoral) y B. NIH-3T3 (célula antitumoral) a concentraciones crecientes de extractos ligados de maíz azul crudo, tortilla nixtamalizada y tortilla extrudida. Se representa el % de viabilidad e inhibición con respecto al control. Medias con la misma letra minúscula no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Medias con la misma letra mayúscula no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 10.** Porcentaje de viabilidad e inhibición celular en células HT-29 y NIH-3T3 de extractos ligados de maíz azul crudo y sus tortillas elaboradas por nixtamalización y extrusión.

Producto	Concentración (mg/mL)	HT-29		NIH-3T3	
		% Viabilidad	% Inhibición	% Viabilidad	% Inhibición
Crudo	5	89.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	10.4 ± 1.9 <sup>h</sup>	94.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	5.2 ± 1.2 <sup>i</sup>
	10	81.7 ± 1.6 <sup>d</sup>	18.3 ± 1.6 <sup>f</sup>	81.8 ± 2.3 <sup>b</sup>	18.2 ± 2.3 <sup>j</sup>
	20	62.7 ± 4.2 <sup>e</sup>	37.3 ± 4.2 <sup>e</sup>	73.5 ± 3.8 <sup>c</sup>	26.5 ± 3.8 <sup>g</sup>
	35	42.2 ± 0.9 <sup>g</sup>	57.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	65.3 ± 0.2 <sup>d</sup>	34.7 ± 0.2 <sup>e</sup>
	50	33.9 ± 1.3 <sup>i</sup>	66.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	59.0 ± 0.3 <sup>f</sup>	41.0 ± 0.3 <sup>c</sup>
TN	5	90.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>h</sup>	93.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	7.1 ± 3.5 <sup>j</sup>
	10	86.1 ± 1.2 <sup>c</sup>	13.9 ± 1.2 <sup>g</sup>	78.6 ± 1.2 <sup>c</sup>	21.4 ± 1.2 <sup>h</sup>
	20	64.2 ± 4.7 <sup>e</sup>	35.9 ± 4.7 <sup>e</sup>	67.2 ± 2.3 <sup>d</sup>	32.8 ± 2.3 <sup>ef</sup>
	35	47.7 ± 0.7 <sup>f</sup>	52.3 ± 0.7 <sup>d</sup>	60.3 ± 1.3 <sup>e</sup>	39.7 ± 1.3 <sup>d</sup>
	50	39.5 ± 1.0 <sup>h</sup>	60.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	50.7 ± 0.2 <sup>h</sup>	49.3 ± 0.2 <sup>a</sup>
TE	5	92.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.7 <sup>i</sup>	92.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	7.1 ± 2.6 <sup>j</sup>
	10	86.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	13.2 ± 0.9 <sup>g</sup>	79.4 ± 0.5 <sup>bc</sup>	20.6 ± 0.5 <sup>h</sup>
	20	67.0 ± 2.9 <sup>e</sup>	33.0 ± 2.9 <sup>e</sup>	67.5 ± 0.7 <sup>d</sup>	32.5 ± 0.7 <sup>f</sup>
	35	46.2 ± 3.2 <sup>f</sup>	53.8 ± 3.2 <sup>d</sup>	62.6 ± 1.4 <sup>e</sup>	37.4 ± 1.4 <sup>d</sup>
	50	35.7 ± 2.0 <sup>i</sup>	64.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	52.8 ± 1.3 <sup>g</sup>	47.2 ± 1.3 <sup>b</sup>

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



**Cuadro 11.** Valores  $CI_{50}$  de extractos ligados de maíz azul crudo, tortilla nixtamalizada y tortilla extrudida.

Maíz	Producto	$CI_{50}$ (mg/mL)	
		HT-29	NIH-3T3
B-512	Crudo	29.3	60.0
	TN	34.6	46.0
	TE	33.1	51.3

el proceso de nixtamalización (34.6 mg/mL) (**Cuadro 11**). Se ha reportado el posible efecto quimiopreventivo de tortillas elaboradas por el proceso tradicional de nixtamalización, observando una inhibición de  $\beta$ -Glucuronidasa, así como una disminución en la expresión de las dos proteínas proliferativas más importantes (K-ras y  $\beta$ -catenina) involucradas en la carcinogénesis del colon, mismas proteínas que se encuentran activas en las células HT-29 (Reynoso-Camacho y col 2015). Es importante mencionar que no existe evidencia científica hasta el momento sobre resultados del efecto antiproliferativo de tortillas extrudidas en líneas de cáncer de colon humano.

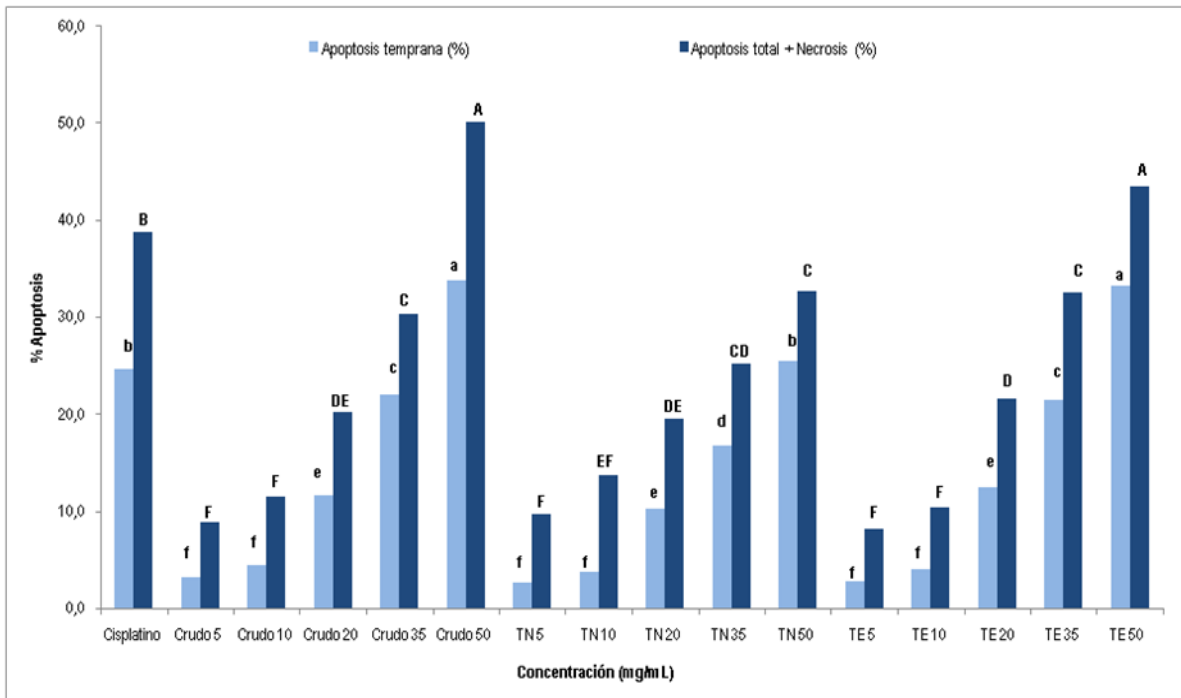
Por otro lado, los resultados indicaron que el porcentaje de viabilidad en la línea celular no transformada NIH-3T3 también disminuyó conforme la dosis de los extractos ligados de maíz azul de los tres productos en estudio (crudo, TN y TE) aumentó (**Fig 19, B**). Sin embargo, al comparar los porcentajes de inhibición con la línea de cáncer de colon HT-29 estos son significativamente menores en los tres productos estudiados (Crudo, TN y TE) (**Fig 20 y Cuadro 10**), lo que significa que los extractos ligados de maíz azul de estos productos son menos citotóxicos en células sanas confirmándolo también con los valores de  $CI_{50}$  (60.0, 46.0 y 51.3 mg/mL) respectivamente (**Cuadro 11**).

### **3 Efecto de extractos ligados de tortillas de maíz criollo azul sobre la inducción de apoptosis y necrosis en células HT-29 y NIH-3T3**

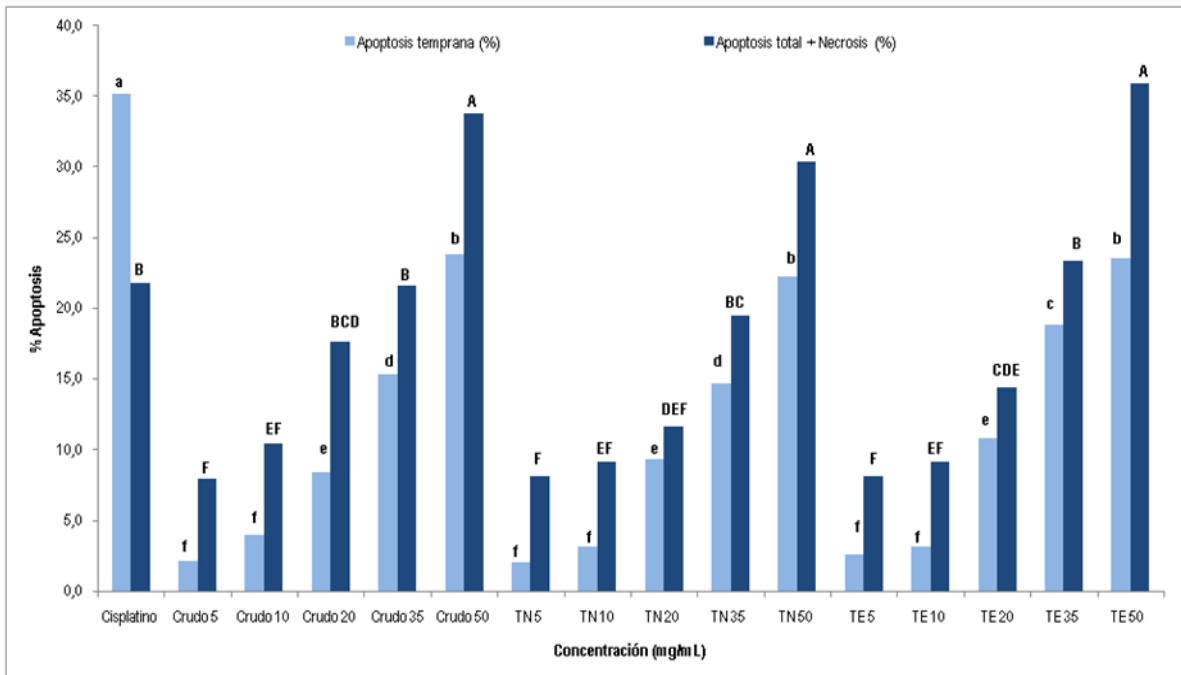
Los resultados del análisis de muerte celular de HT-29 y NIH-3T3 se presentan en la **Fig 21**. En estos resultados, se aprecia la utilización del fármaco Cisplatino para comparar el grado de apoptosis que este produce respecto a los extractos ligados de maíz azul y sus productos en estudio. El CDDP provocó 24.7% y 38.8% de apoptosis temprana y apoptosis total, respectivamente en HT-29; mientras que en NIH-3T3 indujo 35.2% y 21.8% de apoptosis temprana y apoptosis total, respectivamente. Este fármaco actúa directamente por la vía intrínseca de la apoptosis provocando la liberación del Citocromo C y así activa la cascada de caspasas.

En la **Fig 21** claramente se observa que hay una mayor muerte celular en la línea celular de cáncer de colon comparada con la línea celular no transformada. Esto se refiere al efecto de citotoxicidad de los extractos ligados que ejercen sobre los genes de estas líneas celulares. Interesantemente, se apreció que las concentraciones 20, 35 y 50 mg/mL de los extractos ligados de maíz azul crudo, tortilla nixtamalizada y tortilla extrudida aumentan la apoptosis total (temprana + tardía) + necrosis en las células HT-29.

### A. HT-29



### B. NIH-3T3



**Fig 21.** Medida de la apoptosis temprana y apoptosis total (temprana + tardía) + necrosis en HT-29 y NIH-3T3. Se representa el % apoptosis  $\pm$  desviación estándar. Medias con la misma letra minúscula no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Medias con la misma letra mayúscula no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Se han derivado diversas hipótesis que permiten explicar el mecanismo por el cual los extractos ligados de maíz azul y sus tortillas producen un aumento en la apoptosis: (i) los ácidos fenólicos presentes en la fracción ligada podrían inactivar los genes que codifican a las proteínas K-ras y  $\beta$ -catenina involucradas en el desarrollo de cáncer de colon las cuales se encuentran activas en células HT-29; (ii) es bien soportado que algunos ácidos fenólicos y estilbenos potencian la actividad de la caspasa 3 (Juan y col 2012), involucrada tanto en la vía extrínseca como intrínseca de la apoptosis, teniendo un papel central en el proceso ya que es la responsable de efectuar la fragmentación del ADN y por consiguiente, la muerte celular y (iii) la gran cantidad de ácido ferúlico que se concentra en esta fracción sobre todo en maíz sin procesar y en tortillas extrudidas. El ácido ferúlico al ser consumido se transporta en el organismo por difusión pasiva en sus formas libre y conjugada (Silberberg y col 2006) siendo absorbido en el tracto gastrointestinal por microorganismos, enzimas e incluso transportadores de glucosa también están involucrados, sin embargo en su forma ligada es capaz de llegar hasta el colon y ser liberado por acción enzimática (esterasas y xilanasas) ejerciendo un efecto preventivo sobre el cáncer de colon (Adom y Liu, 2002).

## VIII CONCLUSIONES

Se obtuvieron tortillas por los procesos optimizados propuestos, nixtamalización y extrusión, de los maíces criollo azul y blanco comercial, originarios del estado de Sinaloa; con buenas propiedades funcionales y sensoriales. Ambos procesos promovieron la pérdida de fenólicos totales, antocianinas y capacidad antioxidante total por métodos químicos (ORAC, DPPH y ABTS); sin embargo la alternativa de proceso, cocción por extrusión, generó menores pérdidas significativas comparadas con su contraparte nixtamalización. La fracción ligada representó la mayor contribución de fenólicos totales y capacidad antioxidante en todas las muestras en estudio. Se identificaron seis diferentes ácidos fenólicos en extractos ligados: ferúlico, *p*-cumárico, sinápico, siríngico y *p*-hidroxibenzoico vanílico; los ácidos ferúlico y *p*-cumárico fueron los de mayor abundancia en los granos y en las tortillas de los genotipos en estudio. Nuevamente, el proceso de extrusión en comparación con su contraparte, obtuvo una mayor retención en el perfil de ácidos fenólicos. El maíz criollo azul y sus tortillas elaboradas por ambos procesos presentaron mayores valores de AAC en ambos protocolos de lavado con y sin PBS, comparados con el maíz blanco comercial. Las tortillas elaboradas por el proceso de extrusión mostraron mayores porcentajes de retención comparadas con el proceso de nixtamalización. El mayor efecto citotóxico en células HT-29 se observó en las dosis 20, 35 y 50 mg/mL de fitoquímicos ligados de maíz criollo azul y sus tortillas elaboradas por ambos procesos. Se logró observar menor efecto citotóxico de éstos extractos en células NIH-3T3 no transformadas. Los extractos de fitoquímicos ligados del maíz criollo azul y sus tortillas elaboradas por ambos procesos claramente mostraron un aumento en la proporción de células HT-29 que entran en muerte celular vía apoptosis conforme aumenta la dosis. Es importante destacar que este estudio es el primero en reportar el perfil de ácidos fenólicos y capacidad antioxidante por diferentes ensayos químicos de tortillas elaboradas por el proceso de extrusión. Asimismo, es la primera vez que es evaluado el efecto que tienen los fitoquímicos libres y ligados de tortillas elaboradas vía nixtamalización y cocción alcalina por extrusión de maíz criollo azul del estado de Sinaloa, en la actividad antioxidante utilizando células HepG2; así como también el análisis del efecto antiproliferativo y proapoptótico de fitoquímicos ligados de éste cereal en células HT-29 y NIH-3T3. Sin embargo, se requiere de más investigación para determinar mecanismos específicos implicados en la muerte celular de células malignas para prevención de enfermedades crónicas como el cáncer de colon. Además, es importante el conocimiento del

perfil de compuestos fenólicos en su forma ligada, ya que esta fracción se asocia con la prevención de esta enfermedad.

## IX BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aal ESM y Hucl P. 1999.** A rapid method for quantifying total Anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3): 350-354.
- Abdel-Aal ESM, Young JC y Rabalaski I. 2006.** Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple and red cereal grains. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 54: 4696-4704.
- Acharya A, Das I, Chandhok D y Saha T. 2010.** Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3: 23-34.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA y Serna-Saldívar SO. 2013.** Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>.
- Acosta-Estrada BA, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA. 2015.** Chemopreventive effects of feruloyl putrescine from wastewater (Nejayote) of lime-cooked white maize (*Zea mays*). *Journal Cereal Science*, 64: 23-28.
- Adlercreutz H, Heinonen SM y Penalvo-Garcia J. 2004.** Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease. *Biofactors*, 22:229-236.
- Adom KK y Liu RH. 2002.** Antioxidant activity of grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:6182-6187.
- Aguayo-Rojas J, Mora-Rochín S. Cuevas-Rodríguez EO, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2012.** Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process whole pigmented mexican maize. *Plant Foods of Human Nutrition*, 67:178-185.
- Akron 2009.** The Chemical Database. The Department of Chemistry at the University of Akron. <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd> and search on CAS number.
- Alam MS, Kaur J, Khaira H y Gupta K. 2014.** Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Crc Critical Reviews in Food Science (just-accepted)*, 00-00.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 1996.** Cáncer. En *Biología Molecular de la Célula*. 3ª Ed. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A. pp 1346.
- Andreadi CK, Howells LM, Atherfold PA y Manson MM. 2006.** Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Molecular Pharmacology*, 69:1033-1040.
- Araujo JRAJR, Goncalves P y Martel F. 2011.** Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research (N.Y.)*, 31, 77-87.

- Arora D y Jaglan S. 2016.** Nanocarriers based delivery of nutraceuticals for cancer prevention and treatment: A review of recent research developments. *Trends in Food Science & Technology*, 54: 114-126.
- Arvanitoyannis IS, van Houwelingen-Koukaliaroglou M. 2005.** Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (5): 385–404.
- Averboukh F, Ziv Y, Kariv Y, Zmora O, Dotan I, Klausner JM, Rabau M y Tulchinsky H. 2011.** Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease: a comparison between Crohn's and ulcerative colitis. *Colorectal Disease*, 13: 1230–1235, Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02639.x>.
- Badarinath AV, Rao KM, Chetty CM, Ramkanth S, Rajan TV, Gnanaprakash K. 2010.** A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of Pharmacy Research*, 2(2): 1276–1285.
- Bagchi D, Preuss HG y Sarwoop A. 2015.** Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bello-Perez LA, Flores-Silva PC, Camelo-Méndez GA, Paredes-López O, Figueroa JD. 2015.** Effect of the nixtamalization process on the dietary fiber content, starch digestibility and antioxidant capacity of blue maize tortilla. *Cereal Chemistry*.
- Betran FJ, Bockholt AJ, Rooney LW. 2001.** Blue corn. En: Hallauer AR. Specialty Corns. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press. Pp 293-302.
- Bily AC, Burt AJ, Ramputh A, Livesey J, Regnault-Roger C y Philogene BR. 2004.** HPLC-PAD-APCI/MS assay of phenylpropanoids in cereals. *Phytochemical Analysis*, 15, 9–15.
- Block K y Gorin Y. 2012.** Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nature Reviews. Cancer*, 12(9): 627–637.
- Bondia-Pons I, Aura AM, Vourela S, Kolehmainen M, Mykkänen H y Poutanen K. 2009.** Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science*, 49:323-336.
- Borek C. 2004.** Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 3:333–341.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME y Berset C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Brown J, Byers T, Thompson K, Eldridge B, Doyle C, Williams AM. 2001.** Nutrition during and after cancer treatment: A guide for informed choices by cancer survivors—American Cancer



Society Workgroup on nutrition and physical activity for cancer survivors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 51, 153–181.

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

**Chalker-Scott L. 1999.** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemist Photobiology*, 70(1): 1–9.

**Chandrasekara A y Shahidi F. 2012.** Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 226–237.

**Chandrasekaran A, Idelchik MD y Melendez JA. 2016.** Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, 11, 91–102.

**Chen CY, Jang JH, Li MH y Surh YJ. 2005.** Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331:993–1000.

**Closa D y Folch-Puy E. 2004.** Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life*, 56:185–191.

**Cuevas-Rodriguez EO, Reyes-Moreno C, Eckhoff SR y Milán-Carrillo J. 2009.** Nixtamalized instant flour from corn (*Zea mays* L.) meal: optimization of nixtamalization conditions. *Cereal Chemistry*, 86 (1): 7-11.

**Das A y Singh V. 2015.** Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *Journal of Functional Food*, 13: 363–374.

**Dasari S y Tchounwou PB. 2015.** Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. National Institutes of Health. *Euro Journal Pharmacology*, 364-378.

**Dasgupta A y Klein K. 2014.** Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease. Academic Press.

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

**DeBerardinis RJ y Chandel NS. 2016.** Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5): 160-200.

- Del Pozo-Insfran D, Serna Saldívar SO, Brenes CH y Talcott ST. 2007.** Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chemists*, 84: 162-168.
- Del Pozo-Insfran D, Serna-Saldívar SO, Brenes CH, Talcott ST. 2006.** Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chemistry*, 84: 162-168.
- Derry MM, Raina K, Agarwal C y Agarwal R. 2013a.** Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Frontiers in Oncology*, 3: 119-126.
- Derry MM, Raina K, Balaiya V, Jain KA, Shrotriya S, Huber KM, Serkova NJ, Agarwal R y Agarwal C. 2013b.** Grape seed extract efficacy against azoxymethane-induced colon tumorigenesis in A/J mice: interlinking miRNA with cytokine signaling and inflammation, *Cancer Prevention Research*, 6: 625–633, Doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0053>.
- Doebley J. 2004.** The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 38: 37 – 59.
- Durackova Z. 2010.** Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59: 459–469.
- Eberhardt MV, Kobira K, Keck AS, Juvik JA, Jeffery EH. 2005.** Correlation analyses of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19): 7421-7431.
- Eckhoff SR, Paulsen MR, Yang SC. 2003.** Maize. En: Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Volumen 6. Reino Unido: Elsevier Science Ltd. Pp 3647-3653.
- El Bedoui J, Oak MH, Anglard P y Schini-Kerth VB. 2005.** Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovascular Research*, 67:317–325.
- Fakhruddin S, Alanazi W y Jackson KE. 2017.** Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury. *Journal of Diabetes Research*, 9327-9379.
- FAO. 1993.** El maíz en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

- Fearon ER y Vogelstein B. 1990.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759-767.
- Felice DL, Sun J, Liu RH. 2009.** A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *Journal of Functional Foods*, 1(1): 109-118.
- Ferguson L, Zhu S y Harris P. 2005.** Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 585–593.
- Fornaro R, Caratto M, Caratto E, Caristo G, Fornaro F, Giovinazzo D, Sticchi C, Casaccia M, Andorno E. 2016.** Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: the need for a real surveillance. *Program Clinical. Colorectal Cancer*, 15: 204–212, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.002>.
- Forstermann U, Xia N y Li H. 2017.** Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*, 120 (4): 713–735.
- Fukata M y Arditi M. 2013.** The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation, *Mucosal Immunology*, 6: 451–463, Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2013.13>.
- Geismann C, Arlt A, Sebens S y Schäfer H. 2014.** Cytoprotection “gone astray”: Nrf2 and its role in cancer. *OncoTargets and Therapy*, 7: 1497–1518, Doi: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S36624>.
- Goldberg RM, Sargent DJ, Morton FR y col. 2004.** A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal Clinical Oncology*, 22: 23-30.
- González-Muñoz A, Quesille-Villalobos AM, Fuentealba C, Shetty K y Gálvez-Ranilla L. 2013.** Potential of Chilean native corn (*Zea mays* L.) accessions as natural sources of phenolic antioxidants and in vitro bioactivity for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10995-11007.
- Grife R, Swallow C y Bapat B. 1998.** Molecular Biology of colorectal cancer. *Current problems in Cancer*, 2: 1-68.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre S, Eckmann L, Karin M. 2009.** IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15: 103–113, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>.

- Grivennikov SI y Cominelli F. 2016.** Colitis-associated and sporadic colon cancers: different diseases, different mutations? *Gastroenterology* 150 (2016) 808–810, Doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.062>.
- Guina T, Biasi F, Calfapietra S, Nano M, Poli G. 2015.** Inflammatory and redox reactions in colorectal carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340: 95–103, Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12734>.
- Gunter MJ y Leitzmann MF. 2006.** Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 145–156. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.06.011>.
- Gupta RC. 2016.** Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity, Academic Press, London, U.K.
- Gutiérrez-Urbe JA, Rojas-García C, García-Lara S, Serna-Saldivar SO. 2014.** Effects of Lime-Cooking on Carotenoids Present in Masa and Tortillas Produced from Different Types of Maize. *Cereal Chemistry*, 91(5): 508-512.
- Gutiérrez-Urbe JA, Rojas-García C, García-Lara S, Serna-Saldivar SO. 2010.** Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science*, 52: 410-416.
- Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamano S, Kadota T, Koda T, Nakamura M, Imaida K, Ito N y Shirai T. 2001.** Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, 171(1):17-25.
- Haliwell B y Aruoma OI. 1991.** DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281, 9–19.
- Harper JM. 1989.** Food extruders and their applications. In: *Extrusion Cooking* (edited by C. Mercier, P. Linko & J.M. Harper). Pp. 1–16. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- He J y Giusti MM. 2010.** Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Reviews. Food Science and Technology*, 1:163–87. Doi: <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>
- Holmstrom KM y Finkel T. 2014.** Cellular mechanisms and physiological consequences of redox dependent signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15 (6): 411–421.

- Huang D, Ou B, Prior RL, 2005.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- INEGI 2010.** Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México en cifras: Mortalidad. Disponible:
- Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G y Eisenbrand G. 2006.** Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50:52–57.
- Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis H y Oredsson S. 2011.** The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutrition and Cancer*, 63,611–622.
- Janicke B, Önning G y Oredsson SM. 2005.** Differential effects of ferulic acid and p-cumaric acid on S phase distribution and length of S phase on the human colonic cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6658-6665.
- Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, Van der Vliet A. 2008.** Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology & Medicine*, 45 (1): 1–17.
- Jeong W, Jung Y, Kim H, Park SJ, Rhee SG. 2009.** Thioredoxin-related protein 14, a new member of the thioredoxin family with disulfide reductase activity: implication in the redox regulation of TNF- $\alpha$  signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 1294–1303, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.021>.
- Jiménez-Nevárez JB. 2015.** Niveles de Fitoquímicos y Capacidad Antioxidante de Partes Anatómicas de Maíces Criollos Amarillos y Rojos. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Jing P, Bomser JA, Schwartzt SJ, He J, Magnuson BA, Giusti MM. 2008.** Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 9391–9398.
- Jing P, Noriega V, Schwartz SJ y Giusti MM. 2007.** Effects of growing conditions on purple corn cob (*Zea mays* L.) anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55: 8625-8629.
- Johnson IT. 2002.** Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chemists Toxicology*, 40: 1171-1178.

- Jr Ostlund RE, Racette SB, Okeke A y Stenson WF. 2002.** Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75: 1000 – 1004.
- Jurjus A, Eid A, Al Kattar S, Zeenny MN, Gerges-Geagea A, Haydar H, Hilal A, Oueidat D, Matar M, Tawilah J, Hussein IH, Schembri-Wismayer P, Cappello F, Tomasello G, Leone A y Jurjus RA. 2016.** Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: the links. *BBA Clinical*. 5: 16–24, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.11.002>.
- Kalra K. 2003.** Nutraceutical-Definition and Introduction. *Pharmacy Science*, 5: 1-2.
- Kang Mo K, Hye Suk K, Soon Kwon Kim y Young-Hwa K. 2014.** Correlation Analysis Between Antioxidant Activity and Phytochemicals in Korean Colored Corns Using Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 6, No. 4.
- Kennedy JF, Methacanon P y Lloyd LL. 1999.** The identification and quantitation of the hydroxycinnamic acid substituents of a polysaccharide extracted from corn bran. *Journal of Science Food and Agriculture*, 79, 464–470.
- Khor TO, Huang MT, Prawan A, Liu Y, Hao X, Yu S, Cheung WKL, Chan JY, Reddy BS, Yang BS, Kong AN. 2008.** Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer, *Cancer Prevention Research*, 1: 187–191, Doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0028>.
- Kinsella JE, Frankel E, German B y Kenner J. 1993.** Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology*, Pp 85-89.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE y Walborg JrEF. 1998.** The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspective*, 106: 289–295.
- Klepacka J y Fornal L. 2006.** Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 639-647.
- Konczak I y Zhang W. 2004.** Anthocyanins-more than nature's colors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 239–240.
- Kotecha R, Takami A y Espinoza JL. 2016.** Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7 (32): 52517–52529.
- Koutsilieri E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J y Riederer P. 2002.** Free radicals in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 249 (Suppl. 2): 111–115.

- Krazeisen A, Breitling R, Moller G y Adamski J. 2002.** Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. *Advances Experimental Medicine and Biology*, 505:151–161.
- Kremer-Faller AL, Fialho E y Liu RH. 2012.** Cellular Antioxidant Activity of Feijoadá Whole Meal Coupled with an in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4826–4832.
- Kweon MH, In Park Y, Sung HC, Mukhtar H. 2006.** The novel antioxidant 3-Ocaffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radical Biology & Medicine*, 40: 1349–1361.
- Lambeth JD y Neish AS. 2014.** Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology*, 9, 119–145.
- Lambeth JD. 2004.** NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3): 181–189.
- Landry WD y Cotter TG. 2014.** ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. *Biochemical Society Transactions*, 42 (4): 934–938.
- Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M. 2004.** Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22): 4916-4922.
- Leopoldini, M, Russo N, Toscano M. 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2): 288-306.
- Lin SJ, Shyue SK, Hung YY, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB y Chen YL. 2005.** Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25:334–340.
- Little AC, Sulovarib A, Danyala K, Heppner DE, Sewarda DJ, Van der Vliet A. 2017.** Paradoxical roles of dual oxidases in cancer biology. Review Article. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 117–132.
- Liu L, Guo J, Zhang R, Wei Z, Deng Y, Guo J y Zhang M. 2015.** Effect of degree of milling on phenolic profiles and cellular antioxidant activity of whole brown rice. *Food Chemistry*, 185: 318–325.

- Liu RH y Finley J. 2005.** Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4311-4314.
- Liu RH. 2004.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134: 3479-3485.
- Liu RH. 2007.** Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46: 207-219.
- Liu RH. 2012.** Health benefits of phytochemicals in whole foods. In *Nutritional health* (pp 293-310). Humana Press.
- López-Alarcón C y Denicola A. 2013.** Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763: 1-10.
- López-Martínez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee CH, Parkin KL y Garcia HS. 2009.** Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1187–1192.
- López-Martínez LX, Parkin KL y Garcia HS. 2012.** Effect of processing of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips on the scavenging capacity of reactive nitrogen species. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1321–1327.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C y Jiménez L. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manson MM. 2003.** Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Molecular Medicine*, 9: 11–18.
- Markowitz SD y Bertagnolli MM. 2009.** Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(25): 2449-2460.
- Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA y Gerner EW. 2003.** Molecular Biology of Cancer. En: *Chemotherapeutic Agents*. Donald JA editor. 6ª ed. Tucson, Arizona. John Wiley & Sons, Inc. Pp 14-16.
- Masisi K, Beta T, Moghadasian MH. 2016.** Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196: 90-97.
- McClements DJ. 2015.** *Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mendoza-Díaz S, Ortiz-Valerio MC, Castaño-Tostado E, Figueroa-Cárdenas JD, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gómez M, Campos-Vega R, Loarca-Piña G. 2012.** Antioxidant Capacity and Antimutagenic Activity of Anthocyanin and Carotenoid Extracts from



Nixtamalized Pigmented Creole Maize Races (*Zea mays* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, DOI 10.1007/s11130-012-0326-9.

**Migliore L, Migheli F, Spisni R, Copped F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. 2011.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 792362, Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/792362>.

**Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Cuevas-Rodríguez EO, Garzón-Tiznado JA y Reyes-Moreno C. 2004.** Nixtamalized flour from quality protein maize (*Zea mays* L). Optimization of alkaline processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(1): 35 – 44.

**Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez JXK, Cuevas-Rodríguez EO, Ramírez-Wong B, Reyes-Moreno C. 2006.** The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(7): 727-736.

**Mohd Suzairi MS, Tan SC, Ahmad Aizat AA, Mohd Aminudin M, Siti Nurfatimah MS, Andee ZD, Ankathil R. 2013.** The functional-94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiology*, 37: 634–638, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.05.007>.

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

**Mora-Rochin S, Gutiérrez-Uribe JA, Serna-Saldivar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C y 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 Science*, 52: 502-508.

**Moreno FS, Toledo LP, de Conti A, Heidor R, Jr Jordao A, Vannucchi Helio, Cardozo TM y Ong RT. 2007.** Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. *Chemico-Biological Interactions*, 168: 221–228.

**Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC y Blomhoff R. 2005.** Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81:277S–283S.

- Nair HB, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Chaturvedi MM, y Aggarwal BB. 2010.** Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1833-1843.
- Nesci A y Etcheverry M. 2009.** Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus section Flavisclerotia* characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal Ecology*, 2: 44–51.
- Okarter N y Liu RH. 2010.** Health benefits of whole grain phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50: 193–208.
- OMS 2015.** Organización Mundial de la Salud. Cáncer: datos y cifras. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Consultado en Febrero de 2015.
- Ortega Paczka R. 2003.** La diversidad del maíz en México. In: Esteva, G. and Marielle, C. (eds), Sin maíz no hay país. CONACULTA, México, pp. 123 – 154.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 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.
- Palacios-Velarde O, Ortega-Corona A, Guerrero-Herrera M, Hernández-Casillas JM y Peinado-Fuentes LA. 2008.** Componente 1: Diversidad y Distribución Actual de los Maíces Nativos en Sinaloa. En: Proyecto FZ002. Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. CONABIO e inifap. Culiacán, Sinaloa.
- Pan MH y Ho CT. 2008.** Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical Society Reviews*, 37 (11): 2558–2574.
- Pancione M, Remo A y Colantuoni V. 2012.** Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology Research International*, 509348, Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/509348>.
- Pedreschi R y Cisneros-Zevallos L. 2006.** Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54: 4557-4567.
- Pérez-Herrero E y Fernández-Medarde A. 2015.** Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79.

- Pineda-Hidalgo KV, Méndez-Marroquín KP, Vega-Álvarez E, Chávez-Ontiveros J, Sánchez-peña P, Garzón-Tiznado JA, Vega-García MO y López-Valenzuela JA. 2013.** Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in México. *Hereditas*, 150: 53–59.
- Prasad S, Gupta SC y Tyagi AK. 2017.** Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B and Jacob R. 2003.** Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3273-3279.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A y Oksman-Caldntey KM. 2001.** *Journal of Applied Microbiology*, 90(4): 494-507.
- Raina K, Agarwal C, Agarwal R. 2013.** Effect of silibin in in human colorectal cancer cells: targeting the activation of NF-κB signaling, *Mol. Carcinog.* 52: 195–206, Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/mc.21843>.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231–1237.
- Reczek CR y Chandel NS. 2015.** ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8–13.
- Redondo-Blanco S. 2014.** Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos. Tesis. Master en biomedicina y oncología molecular. Pp: 13.
- Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB y Diederich M. 2008.** Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochemistry Pharmacology*, 76: 1340-51.
- Reynoso-Camacho R, Guerrero-Villanueva G, Figueroa JD, Gallegos-Corona MA, Mendoza S, Loarca-Piña G y Ramos-Gómez M. 2015.** Anticarcinogenic Effect of Corn Tortilla Against 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Carcinogenesis in Sprague–Dawley Rats. *Plant Foods of Human Nutrition*, 70:146–152.

- Rossin D, Calfapietra S, Sottero B, Poli G, Biasi F. 2017.** HNE and cholesterol oxidation products in colorectal inflammation and Carcinogenesis. Review Article. *Free Radical Biology and Medicine*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.017>
- Roy K, Wu Y, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Jiang G, Lu G, Antony S y Doroshov JH. 2015.** NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science*, 128(12): 863–875.
- Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA y Zielenska M. 2008.** Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current Genomics*, 9, 394–408.
- SAGARPA 2017.** Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. SIAP, SIACON. Consulta de indicadores de producción nacional de maíz. Disponible de [www.sagarpa.com.mx](http://www.sagarpa.com.mx). Consultado en Noviembre de 2017.
- Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Shibata W, Yanai A, Ogura K, Omata M. 2009.** Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth, *Clinical Cancer Research*, 15: 2248–2258, Doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1383>.
- Sala R y Barroeta AC. 2003.** Manual de microscopía de piensos (Vol. 122). Univ. Autónoma de Barcelona.
- Salinas-Moreno Y, Pérez-Alonso JJ, Vázquez-Carrillo G, Aragón-Cuevas F y Velázquez-Cardelas GA. 2012.** Anthocyanins and antioxidant activity in maize grains (*Zea mays* L.) of chalqueño, elotes cónicos and bolita races. *Agrociencia*, 46:693-706.
- Salinas-Moreno YF, Martínez-Bustos M, Soto-Hernández R, Ortega-Paczka y Arellano V. 2003.** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia*, 37: 617-628.
- Sánchez JJ, Goodman MM y Stuber CW. 2000.** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Economic Botany*, 54(1): 43-59.
- Sánchez-Madriral MÁ, Meléndez-Pizarro CO, Martínez-Bustos F, Ruiz-Gutiérrez MG, Quintero-Ramos A, Márquez-Meléndez R y Campos-Venegas K. 2014.** Structural, functional, thermal and rheological properties of nixtamalised and extruded blue maize (*Zea mays* L.) flour with different calcium sources. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2): 578-586.
- Sánchez-Madriral MÁ, Quintero-Ramos A, Martínez-Bustos F, Meléndez-Pizarro CO, Ruiz-Gutiérrez MG, Camacho-Dávila A, Ramírez-Wong B. 2015.** Effect of different calcium on

the bioactive compounds stability of extruded and nixtamalized blue maize flours. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5): 2701-2710.

**Serna-Saldívar SO, García-Lara S y Gutiérrez-Urbe JA. 2011.** Perfil fitoquímico y propiedades nutraceuticas de maíces pigmentados y sus tortillas. En: Preciado-Ortíz R, Montes-Hernández S. Amplitud, Mejoramiento, Usos y Riesgos de la Diversidad Genética de Maíz en México. Chapingo, Edo. de México: Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Pp 75-92.

**Serna-Saldívar SO, Gomez MH, Rooney LW. 1990.** Technology, chemistry, and nutritional value of alkaline cooked maize products. In: Pomeranz, Y. (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. 10. AACC International, St. Paul MN, pp. 243-307.

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

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

**Shih PH, Yeh CT y Yen GC. 2005.** Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chemists of Toxicology*, 55: 1557–1566.

**Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A y Remesy C. 2006.** The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition*, 45:88–96.

**Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

**Song W, Derito CM, Liu MK, He X, Dong M, Liu RH. 2010.** Cellular antioxidant activity of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6621-6629.

**Sosulski F, Krygier K y Hogge L. 1982.** Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 337-340.

- Sousa E, Pessanha M, Alves R, Colleen C, Clevidence Y y Novotny J. 2005.** Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53: 2589–2599.
- Surh Y. 1999.** Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research*, 428: 305–327.
- Surh YJ. 2003.** Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Review Cancer*, 3(10): 768-780.
- Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. 2010.** Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138, Doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>.
- Tsuda T, Horio F y Osawa T. 2002.** Cyanidin 3-O-β-D-glucoside suppresses nitric oxide production during zymosan treatment in rats. *Journal Nutrition Science Vitaminol*, 48: 305-310.
- Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H y Osawa T. 2003.** Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Nutrient-gene Interactions*, 200: 2125-2130.
- Ullah MF y Khan MW. 2008.** Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9 (2): 187–195.
- Ultrilla-Coello RG, Agama-Acevedo E, Barba De La Rosa AP, Martínez-Salgado JL, Rodríguez-Ambríz SL y Bello-Pérez LA. 2009.** Blue maize: morphology and starch synthase characterization of starch granule. *Plant Foods of Human Nutrition*, 64: 18-24.
- Updike AA, Schwartz J. 2003.** Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6184-6190.
- Uriarte-Aceves PM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Mora-Rochín S, Reyes-Moreno C, Puangpraphant S, Milán-Carrillo J. 2015.** Physical, compositional, and wetmilling characteristics of Mexican blue maize (*Zea mays* L.) landrace. *Cereal Chemistry*. 92(5): 491-492.
- Urias-Peraldí M, Gutiérrez-Urbe JA, Preciado-Ortiz RE, Cruz-Morales AS, Serna-Saldívar SO, García-Lara S. 2013.** Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. *Field Crops Research*, 141, 69-76.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M y Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39: 44–84.

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M y Mazur M. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1–40.
- Velazco-Martínez M, Angulo O, Velazquez-Courtier DL, Arroyo-Lara A, Monroy-Rivera JA. 1997.** Effect of dried solid of nejayote on broiler growth. *Metabolism and Nutrition* 76,1531-1534.
- Virgili F y Marino M. 2008.** Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. Review Article. *Free Radical Biology & Medicine*, 45:1205–1216.
- Wang J, Guleria S, Koffas MA y Yan Y. 2016a.** Microbial production of valueadded nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 97-104.
- Wang L, Wang W, Rui Z, y Zhou D. 2016b.** The effective combination therapy against human osteosarcoma: Doxorubicin plus curcumin co-encapsulated lipid-coated polymeric nanoparticulate drug delivery system. *Drug Delivery*, 1-33.
- Wang T, He F y Chen G. 2014.** Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Food*, 7, 101—111.
- Weiss RB y Christian MC. 1993.** New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs*. 46:360–377. [PubMed: 7693428].
- Whent M, Huang H, Xie Z, Lutterodt H, Yu L, Fuerst EP, Morris CF, Yu L y Luthria D. 2012.** Phytochemical Composition, Anti-inflammatory, and Antiproliferative Activity of Whole Wheat Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2129–2135.
- Wolfe KL y Liu RH. 2007.** Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22): 8896-8907.
- Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. 2008.** Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18): 8418-8426.
- Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. 2001.** Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6): 1173-1183.
- Wung BS, Hsu MC, Wu CC y Hsieh CW. 2005.** Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sciences*, 78:389–397.

- Young GP, Hu Y, Le Leu RK y Nyskohus L. 2005.** Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Molecular Nutrition of Food Research*, 49: 571-584.
- Zhang L, Liu R y Niu W. 2014.** Phytochemical and antiproliferative activity of proso millet. *PLoS ONE*, 9(8), 1040-1058.
- Zhu Y, Li T, Fu X, Abbasi AM, Zheng BS y Liu RH. 2015.** Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Functional Foods*, 19: 439–450.



## Abreviaturas

°C; grados centígrados

AAC; Actividad Antioxidante Celular

AAPH; 2,2'-azobis (2-amidinopropano);

ABTS; 2,2-bis--azino (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico);

ADN; Ácido desoxirribonucleico

ANOVA; análisis de varianza

APC; gen de la poliposis adenomatosa coli

ARN; Ácido ribonucleico;

AUC; área bajo la curva

bs; base seca;

BDE; entalpía de disociación de enlace

Ca; calcio

CAC; Calidad Antioxidante Celular

CACT; Calidad Antioxidante Celular Total

CCR; Cáncer colorrectal

CDDP; cis-diaminodicloroplatino

CDK; quinasas dependientes de ciclina

CFT; Contenido de Fenólicos Totales

Cl<sub>50</sub>; concentración de extracto requerida para inhibir un 50% de células

Cl; cloro

CO<sub>2</sub>; dióxido de carbono

col; colaboradores

DCF; Diclorofluoresceína oxidada

DCFH; Diclorofluoresceína reducida

DCFH-DA; 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato

DMEM; Dulbecco's Minimum Essential Medium

DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil;

EAG; equivalente de Ácido Gálico

EGC; equivalentes de cianidina-3-glucósido

EC<sub>50</sub>; concentración de extracto requerida para alcanzar un 50% de AAC

em; emisión

EQ; equivalente de Quercetina  
Equiv; equivalentes  
ET; Equivalentes de Trolox;  
ET; métodos basados en la reacción de transferencia de electrones  
ex; excitación  
EUA; Estados Unidos de América  
FBS; suero fetal bovino  
Fig; figura  
FL; fluoresceína  
FRAP; capacidad reductora de plasma férrico  
g; gramo  
g; gravedades  
h; horas  
ha; hectárea  
HAT; reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno  
HBSS; solución bufer de Hanks  
HCl; ácido clorhídrico  
HepG2; línea celular de cáncer hígado  
HNPPC; cáncer colorrectal hereditario no polipoideo  
HPLC; cromatografía de líquidos de alta resolución  
HR; humedad relativa  
HT-29; línea celular, adenocarcinoma de colon humano  
INEGI; Instituto Nacional de Estadística y Geografía  
Kg; kilogramo  
L; litro  
mg; miligramos  
min; minuto  
mL; mililitro  
mm; milímetros  
MTT; bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo, Ensayo de proliferación celular  
NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH; hidróxido de sodio  
ND; No Determinado  
NF- $\kappa$ B; factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas  
NIH-3T3; línea celular, fibroblasto de embrión de ratón  
nm; nanómetros  
NMX; Norma Mexicana  
OMS; Organización Mundial de la Salud  
ORAC; Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno  
p38; proteína 38  
p53, proteína 53  
PBS, solución reguladora de fosfatos  
PCR; ensayo Fotoquimioluminiscente  
pH; potencial de hidrógeno  
Pt, platino  
Rb, rubisco  
ROS; por sus siglas en inglés, Especies reactivas de oxígeno;  
rpm; revoluciones por minuto  
s; segundos  
SAGARPA; Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación  
SOD, Superóxido dismutasa;  
TE; tortillas elaboradas mediante el proceso de cocción alcalina por extrusión  
Ton, Toneladas  
TN, tortillas elaboradas mediante el proceso de tradicional de nixtamalización  
TNF; factor de necrosis tumoral  
TRAP; Parámetro Antioxidante Total de Captura de Radicales  
UV; ultravioleta  
WME; medio de crecimiento celular William's  
 $\mu$ g; microgramo  
 $\mu$ L; microlitros  
 $\mu$ M; micromolar  
 $\mu$ mol; micromol