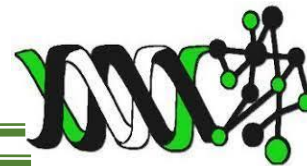




Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA



Posgrado en Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

“Caracterización fisicoquímica del extracto de muicle (*Justicia spicigera* Schechtendal)
y su adición exógena en un sistema alimentario (tortilla de maíz)”

Para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

PRESENTA:

M. en Biotec. Lurdes Adriana Álvarez Poblano

Director:

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Co-Director:

Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Asesora:

Dra. Angélica Román Guerrero

Iztapalapa, Ciudad de México a 28 de abril del 2022

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

Ciudad de México a 28 de abril del 2022.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

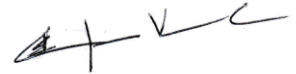
**“Caracterización fisicoquímica del extracto de muicle (*Justicia spicigera* Schechtendal)
y su adición exógena en un sistema alimentario (tortilla de maíz)”**

que presentó

M. en Bioctec. Lurdes Adriana Álvarez Poblano

Comité Tutorial:

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter



Co-Director: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez



Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero



Jurado:

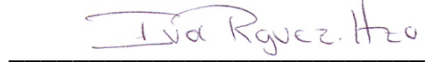
Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero



Secretario: Dr. Francisco Cruz Sosa



Vocal: Dra. María Eva Rodríguez Huevo



Vocal: Dra. María Isabel Reyes Arreozola



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca con número de asignación 592544 para la realización de esta investigación.

Al Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter, por haberme permitido formar parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Bioprocesos (edificio W-107), por aceptarme como su alumna, por su dirección y enseñanzas.

Al Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez, por el tiempo dedicado, por compartir sus saberes, experiencias, por ser siempre guía en la investigación y por mostrarme a estar siempre receptiva a adquirir nuevos conocimientos “no todo es el color”.

A la Dra. Angélica Román Guerrero, por sus enseñanzas, su excelente trato con las personas, por su asesoramiento y amistad.

También agradezco a mi familia, en especial a mi padre Leonardo Álvarez Mora y a mi hija Amelia Brighid Cervantes Álvarez quiénes compartieron cada momento conmigo, gracias por su cariño y comprensión, a mi gato Aslan quien me brindó su apoyo en contra del estrés.

A mi amigo Antonio Díaz, que, a pesar de no pertenecer al área técnica, escucho siempre mis presentaciones y siempre tuvo disposición a entenderlas.

A mis compañeros del laboratorio W-107 y R-003, Isabel Reyes, Daniel Gómez Luría, Luis Pascual, Brenda Vargas, Abraham García, Mariana Pérez, por su amistad y apoyo para la operación de los equipos del laboratorio.

A todas las personas que me ayudaron a lograr culminar esta etapa de mi vida, así como a Dios por siempre estar a mi lado, ¡muchas gracias!

RESUMEN

En la actualidad existe una creciente demanda por alimentos funcionales, que contengan ingredientes y aditivos (colorantes de origen natural), pero estos últimos resultan costosos y son difíciles de estandarizar al provenir de una fuente vegetal (frutas, hortalizas, flores, entre otros), ya que dependen de la estacionalidad, condiciones de cultivo y métodos de extracción.

En México existen muchas plantas nativas de fácil cultivo, que se emplean en la medicina tradicional, desde épocas prehispánicas, como *Justicia spicigera* Schechtendal, también conocida como muicle o muite, que además posee la capacidad de impartir coloración violácea, aportada por el contenido de antocianinas presentes en los extractos de esta planta, dentro de su contenido de polifenoles destacan el kaempferol, astragalina, alantoína, entre otros. Razón por la cual en el presente trabajo doctoral se propuso un estudio de caracterización físico-química, para una posterior aplicación en un alimento (tortilla) a base de harina de maíz nixtamalizado.

En la presente investigación fueron explorados diferentes métodos de extracción (ultrasonido y maceración), así como dos medios de disolución (agua y etanol), se concluyó que la extracción acuosa empleando maceración con temperatura de 55-57 °C durante 30 min, obtuvo la mayor cantidad de polifenoles y pigmentos de antocianinas presentes en las hojas de muicle.

Una vez estandarizado el método de extracción se procedió a aplicar el Extracto de Muicle (EM), en la harina de maíz nixtamalizada (NWMF). La cantidad de EM en NWMF fue de 0, 0.7, 1.7 y 2.7 g/100 g base seca. Las variaciones de masa y tortilla se etiquetaron como M_x y T_x respectivamente, donde "x" corresponde al contenido de EM en NWMF en base seca. Se observó que la adición del extracto de muicle a la masa de maíz blanco nixtamalizado, contribuyó al aporte de un contenido significativo de polifenoles totales que además ayudan a aumentar la capacidad antioxidante de las tortillas bajo condiciones intestinales, así como reducir significativamente el contenido del almidón total (ST), de las fracciones digeribles de almidón de rápida digestión (RDS) y del almidón de lenta digestión (SDS), aumentando la fracción no digerible de almidón resistente (RS). Este estudio permite formular alimentos que modulen la digestibilidad de las fracciones de almidón y obtener tortillas de harina de maíz, que imitan el color de las tortillas de maíz azul al adicionar el extracto de muicle, que también aporta antocianinas a menor costo y con un proceso de extracción simple.

ABSTRACT

There is currently a growing demand for functional foods containing ingredients and additives (natural colorants), but the latter are expensive and difficult to standardize since they come from a vegetable source (fruits, vegetables, flowers, among others), as they depend on seasonality, growing conditions and extraction methods.

In Mexico, there are many native plants of easy cultivation, which are used in traditional medicine since pre-Hispanic times, such as *Justicia spiciguera* Schechtendal, also known as muicle or muite, which also can impart violet coloration, provided by the content of anthocyanins present in the extracts of this plant. Kaempferol, astragalin, allantoin, among others, can be found within its polyphenol content.

For this reason, a physicochemical characterization study was proposed in this doctoral work, for a later application in food (tortilla) based on nixtamalized corn flour.

Different extraction methods were explored (ultrasound and maceration), as well as two dissolution media (water and ethanol). It was concluded that the aqueous extraction using maceration with a temperature of 55-57°C for 30 min, obtained the highest number of polyphenols and anthocyanin pigments present in the muicle leaves.

Once the extraction method was standardized, the Muicle Extract (ME) was applied to the nixtamalized cornflour (NWMF). The amount of ME in NWMF was 0, 0.7, 1.7, and 2.7 g/100 g dry basis. The dough and tortilla variations were labelled as Mx and Tx respectively, where "x" corresponds to the ME content in NWMF on a dry basis. It was observed that the addition of the muicle extract to the nixtamalized white corn dough, contributed with a significant content of total polyphenols that also help to increase the antioxidant capacity of tortillas under intestinal conditions, as well as significantly reduce the total starch (TS), the digestible fractions of rapidly digested starch (RDS) and slowly digested starch (SDS), increasing the non-digestible fraction of resistant starch (RS). This study allows the formulation of foods that modulate the digestibility of starch fractions and the obtainment of corn flour tortillas that mimic the colour of blue corn tortillas by adding muicle extract, which also provides anthocyanins at a lower cost with a simple extraction process.

ÍNDICE

1. Introducción	13
2. Antecedentes	14
2.1 El muicle (<i>Justicia spicigera</i> Schechtendal)	14
2.2 Diversidad de pigmentos en las plantas	15
2.1.2 Presencia de antocianinas en las plantas	17
2.2.2 Antocianinas	17
2.2.3 Estructura de las antocianinas y color	18
2.2.4 Aplicaciones de las antocianinas en la industria de alimentos	19
2.2.5 Mecanismos de acción de las antocianinas en el organismo	21
2.2.6 Las antocianinas presentes en el maíz	23
3. Justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26
6. Materiales y métodos	27
6.1 Diseño del estudio	27
6.2 Caracterización fisicoquímica	28
6.2.1 Extracción de las antocianinas de las hojas de muicle	28
6.2.2 Parámetros colorimétricos ($L^*a^*b^*$ y C)	28
6.2.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	29
6.2.4 Determinación del contenido de Polifenoles totales	29
6.2.5 Actividad antioxidante DPPH	30
6.2.6 Análisis Termogravimétrico (TGA)	30
6.2.7 Potencial Zeta ($Z\eta$)	30
6.2.8 Determinación del espectro de absorción UV-Vis	30
6.2.9 Determinación de antocianinas totales	31
6.2.10 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en el extracto acuoso de muicle	31
6.3 Tortillas de maíz con extracto de muicle	31
6.3.1 Preparación del extracto de muicle (EM) para dosificar la coloración en tortillas.	31
6.3.2 Preparación de la masa de harina de maíz con el extracto de muicle (EM)	32
6.3.3 Viscoelasticidad de la masa	32

6.3.4 Preparación de las tortillas	32
6.3.5 Parámetros colorimétricos en tortillas	33
6.3.6 Contenido de humedad.....	33
6.3.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	33
6.3.8 Contenido de Polifenoles Totales y Actividad antioxidante en condiciones gastrointestinales simuladas <i>in vitro</i>	33
6.3.9 Determinación del contenido de Polifenoles totales en tortilla	34
6.3.10 Actividad antioxidante DPPH	34
6.3.11 Actividad antioxidante ABTS	34
6.3.12 Hidrólisis enzimática y digestibilidad del almidón <i>in vitro</i>	34
6.3.13 Textura (compresión de la tortilla)	35
7. Resultados y discusión	36
7.1 Extractos de hojas	36
7.2 Parámetros de color (L*a* b* y C)	37
7.3 Espectros de absorción de los extractos de muicle.....	38
7.4 Espectrogramas de FTIR de los extractos de muicle	40
7.5 Contenido de polifenoles totales en los extractos de muicle	43
7.6 Actividad antioxidante (DPPH)	43
7.7 Análisis termogravimétrico (TGA)	44
7.8 Potencial Zeta (Z) del extracto acuoso de muicle	45
7.9 Espectros de absorción UV-Vis a diferente pH.....	46
7.10 Espectros de infrarrojo del extracto acuoso de muicle a diferente pH	48
7.11 Aplicación en un sistema alimenticio.....	49
7.11.1 Viscoelasticidad de la masa.....	49
7.12 Caracterización de las tortillas adicionadas con EM.....	51
7.12.1 Contenido de humedad.....	51
7.12.2 Dureza	51
7.12.3 El Color	52
7.12.4 FTIR	54
7.12.5 Polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS)	56
7.12.6 Digestibilidad del almidón <i>in vitro</i>	57
7.12.7 Análisis de componentes principales (PCA) aplicado a (M _x) y (T _x)	60
8. Conclusiones	62

Referencias bibliográficas	63
Anexo 1. Nomenclaturas descritas en la tesis.	72
Anexo 2. Cromatogramas obtenidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	73
Anexo 3. Curva patrón de polifenoles totales y radical DPPH	74
Anexo 4. Definiciones de los parámetros de color.....	75
Anexo 5. Lista de productos obtenidos	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos encontrados en la planta de muicle (<i>Justicia spicigera</i>).....	15
Cuadro 2. Ubicación y función de los pigmentos en las plantas.....	16
Cuadro 3. Uso de las antocianinas en diferentes segmentos alimentarios.....	20
Cuadro 4. Actividad biofuncional de las principales fuentes vegetales ricas en antocianinas.....	21
Cuadro 5. Valores colorimétricos de los extractos de las hojas de muicle.....	37
Cuadro 6. Comparación de la longitud de onda en la que la absorbancia es máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada uno de los extractos de muicle.....	39
Cuadro 7. Identificación de los grupos funcionales de los extractos de muicle.....	42
Cuadro 8. Contenido de polifenoles totales obtenido en los extractos de <i>J. spicigera</i>	43
Cuadro 9. Actividad antioxidante (DPPH) de los extractos de muicle.....	44
Cuadro 10. Potencial zeta del extracto acuso de muicle.....	46
Cuadro 11. Contenido de humedad y parámetros de compresión del primer ciclo en la tortilla.....	51
Cuadro 12. Valores colorimétricos de la masa y tortillas de maíz con extracto de muicle.....	52
Cuadro 13. Relación por deconvolución de las regiones de los espectros de FTIR.....	56
Cuadro 14. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en las muestras de tortilla (T_x).....	57
Cuadro 15. Parámetros cinéticos y fracciones de almidón digerible de las variaciones de la tortilla.....	59
Cuadro 16. Muestras y variables empleadas para el Análisis de Componentes Principales (PCA).....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estructuras de antocianidinas, dependiendo de los sustituyentes R1 y R2 en el anillo B.....	18
Figura 2. Producto acilado de la antocianina pelargonidina 3-O-(6-O-transcafeil)-2-O-(8-D-glucopiranosil)-8-D-glucopiranosido)-5-O-(8-D-glucopiranosido), en el que se observa un grupo glucósido en la posición 5, y un grupo soforosido, copigmentado con ácido cafeico.....	19
Figura 3. Estrategia experimental para la caracterización e incorporación del extracto de muicle (<i>J. spicigera</i>) en tortillas de harina de maíz blanco nixtamalizado.....	27
Figura 4. Hojas frescas de la planta de muicle la planta de <i>Justicia Spicigera Schechtendal</i>	36
Figura 5. Extractos de las hojas de muicle, empleando los siguientes tratamientos: a) agua con maceración y temperatura (MT/A), b) agua con ultrasonido y temperatura (UST/A), c) agua con ultrasonido (US/A), d) agua-etanol en proporción 70:30 con ultrasonido (US/AE-7:3), e) agua-etanol en proporción 50:50 con ultrasonido (US/AE-5:5), f) agua-etanol en proporción 30:70 con ultrasonido (US/AE-3:7) y g) etanol con ultrasonido (US/E).....	36
Figura 6. Espectros de absorción de los extractos de muicle.....	39
Figura 7. Espectros de FTIR, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes), de los extractos de las hojas de muicle en: a) MT/A, b) UST/A, c) US/A, d)US/AE-5:5, e) US/AE-7:3, f) US/AE-3:7 y g)US/E.....	40
Figura 8. Comparación de los perfiles encontrados en los espectros de FTIR de los extractos de las hojas de muicle, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes).....	41
Figura 9. Perfil térmico del extracto seco de muicle obtenido por maceración con temperatura, a una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 500 °C.....	45
Figura 10. Espectros de absorción en la región UV-Vis de 200 a 1000 nm, del extracto de muicle a diferente pH.	47
Figura 11. Tonalidad del extracto acuoso de muicle en diferente pH.....	47
Figura 12. Espectros de Infrarrojo del extracto de muicle a diferente pH, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes).....	48
Figura 13. a) Módulos de viscoelasticidad de la masa para las diferentes adiciones de extracto de muicle (EM) y b) Variación de los módulos de viscoelasticidad en la región newtoniana.....	50

Figura 14. Imágenes de masa y tortilla con diferente contenido de extracto de muicle (EM). Primera columna: variaciones de masa (M_x), segunda y tercera columnas: variaciones de ambos lados de la tortilla (T_x). Primera fila: control sin EM, segunda a cuarta filas: "x" denota los contenidos de EM (0.7, 1.7 y 2.7 g/100 g en base seca) con los que se elaboraron M_x y T_x	53
Figura 15. Espectros de Infrarrojo de las muestras de tortillas: a) T_0 , b) $T_{0.7}$, c) $T_{1.7}$ y d) $T_{2.7}$, evaluadas a diferentes días de almacenamiento.....	55
Figura 16. Espectro Infrarrojo (FTIR) de las variaciones de la tortilla con diferentes contenidos de extracto de muicle.....	55
Figura 17. Cinética de hidrólisis enzimática de las variaciones de la tortilla (T_x). La línea continua denota el ajuste por mínimos cuadrados de un modelo de decaimiento exponencial de primer orden.....	59
Figura 18. Representación gráfica del análisis de PCA, para las muestras de tortilla (T_x).....	61

1. Introducción

El muicle (*J. spicigera*) es un arbusto de hoja perenne con flores naranjas tubulares nativa de México y América Central. Se conoce comúnmente como muicle o muite. En la medicina tradicional mexicana, la planta de muicle ha sido una de las plantas más utilizadas debido a sus múltiples propiedades curativas. (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012). *J. spicigera* posee un contenido significativo de compuestos fenólicos entre ellos las antocianinas, que contribuyen a su actividad antioxidante, haciendo que esta planta sea una alternativa interesante para posibles aplicaciones en la industria alimentaria o farmacéutica.

En la población mexicana adulta existen graves problemas de sobrepeso, por lo que la búsqueda de la disminución de enfermedades ocasionadas por el síndrome metabólico, ha incrementado las investigaciones enfocadas en los compuestos bioactivos naturales debido a sus importantes beneficios para la salud.

En México el alimento base es el maíz, que se consume principalmente en forma de tortillas, existen diferentes variedades de maíz que también poseen coloraciones características (amarillas, moradas y azules) proporcionadas por los principios activos colorantes como β -carotenos y antocianinas, las variedades de maíz azul y morado presentan diversas antocianinas glicosiladas y resulta ser más costosa su producción debido a que el maíz presenta elementos transponibles dentro de su genoma, lo que dificulta el resultado de un maíz de coloración homogénea.

El presente trabajo propone la incorporación del extracto acuoso de muicle en un alimento que emplee como base el maíz (tortillas), debido al contenido de antocianinas y compuestos fenólicos que pudiera aportar, además de ayudar a disminuir el síndrome metabólico que afecta a la población mexicana.

2. Antecedentes

2.1 El muicle (*Justicia spicigera* Schechtendal)

El muicle pertenece a la familia de las acantáceas (Acanthaceae), las especies de *Justicia* se describen como erectas, hierbas perennes o sub-arbustos (Corrêa *et al.*, 2012), crece en México, América Central y algunas áreas de los Estados Unidos. Esta planta ha sido utilizada desde tiempos prehispánicos, como tinte para artesanías, pinturas y en medicina tradicional, no sólo en México sino también en Guatemala (Baqueiro-Peña *et al.*, 2014). Hay informes del siglo XVIII, que indican que esta planta se utilizó para obtener pigmentos azules en la Academia de San Carlos en España. La planta fresca tiene un brillo color verde; sin embargo, muestra "liliaceous" (del latín *Lilium*, típico del lirio) o violeta, matices que aparecen cuando se realizan extracciones con agua o mezclas de solventes (Baqueiro-Peña *et al.*, 2017). Los extractos acuosos de muicle producen un tono púrpura-rojizo profundo debido a su contenido de antocianinas (Pavón-García *et al.*, 2011), en extracciones de *Justicia spicigera* con acetato de etilo se han identificado antocianinas glucósiladas como malvidina-3-5-diglucósido, peonidina 3-5 diglucósido cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido que representan la mayor proporción (Awad *et al.*, 2015).

J. spicigera, actualmente se emplea en la medicina tradicional para tratar el cáncer, enfermedades circulatorias, diabetes, leucemia, anemia, giardiasis, fascioliasis, diarrea, nervios, reumatismo, inflamación de estómago y dolor de cabeza (Cid-Ortega *et al.*, 2021), debido a que tiene un contenido significativo de compuestos fenólicos (Cuadro 1), que contribuyen a su actividad antioxidante, haciendo que esta planta sea una alternativa interesante para posibles aplicaciones en la industria alimentaria o farmacéutica.

Para la extracción de compuestos fitoquímicos en las plantas se deben considerar los siguientes factores: agente de extracción, polaridad del agente de extracción, temperatura y tiempo. Todos estos factores juegan un papel importante en la extracción; sin embargo, dado que las reacciones pueden ocurrir entre fenoles y otras moléculas presentes en las plantas (lípidos, carbohidratos, y proteínas, sólo por mencionar algunos compuestos), se debe tener precaución, debido a la estabilidad que poseen las moléculas que imparten color (Baqueiro-Peña *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Compuestos encontrados en la planta de muicle (*Justicia spicigera*).

Compuesto	Referencia
Kaempferitrina glucósido de kaemferol, Criptoxantina, β -sistoterol, 3 β -glucosil-o-sitosterol y alantoína	Baqueiro-Peña <i>et al.</i> , 2014.
Kaempferitrina y astragalina	Cid-Ortega <i>et al.</i> , 2021.
Antocianinas glucósiladas como malvidina-3-5-diglucósido, peonidina 3-5 diglucósido, cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido	Awad <i>et al.</i> , 2015.

2.2 Diversidad de pigmentos en las plantas

Los pigmentos en las plantas son moléculas orgánicas que absorben la luz, energía que retienen por nano o microsegundos. La energía, debido a la presencia de múltiples átomos de carbono que comparten dobles enlaces alternos produce color. Hay muchos papeles que desempeñan los pigmentos en las plantas:

- La conversión de energía luminosa a energía química se da por la acción principal de las clorofilas.
- La señalización, ya sea para que la planta detecte aspectos de su entorno o para que otros organismos, como los animales, conozcan las plantas. Estos pigmentos pueden estar presentes en pequeñas o grandes cantidades.
- Algunas moléculas que pueden mostrar color; por ejemplo, los citocromos mitocondriales, en este caso debido a la presencia de hierro (Miller *et al.*, 2011).

Los pigmentos vegetales se dividen en cuatro categorías principales que son:

- a) Tetrapirrol como clorofilas (que contienen magnesio). Las clorofilas son verdes y son necesarias para la fotosíntesis (Cuadro 2), son los pigmentos más abundantes. Otros tetrapirroles incluyen todos los citocromos y las ficobilinas (pigmentos fotosintéticos accesorios en las algas).
- b) Los carotenoides son moléculas solubles en lípidos de cadena larga presentes en todas las células eucarióticas. En las plantas, algunos carotenoides están involucrados en la fotosíntesis como pigmentos fotosintéticos accesorios o como antioxidantes. Estos carotenoides están unidos a la

membrana celular a menudo dentro de los complejos fotosintéticos en los cloroplastos. Otros carotenoides forman gotitas en las células, dando color principalmente a las flores y frutas.

- c) Los flavonoides son moléculas complejas, fenólicas y solubles en agua que se encuentran en casi todas las plantas vasculares. Se conocen más de 9000 y se incluyen en este grupo las flavonas, los flavonoles, las antocianinas y los isoflavonoides. Los flavonoides están presentes en la mayoría de las partes aéreas de la planta e incluso se encuentran en las raíces. Pueden absorber la luz ultravioleta, lo que confiere cierta protección a las plantas terrestres.
- d) Las betalaínas son como los flavonoides, complejas moléculas solubles en agua. Pero, a diferencia de los flavonoides, todos son indoles, contienen nitrógeno y se derivan del aminoácido tirosina. Son restringido a las plantas en el orden Caryophyllales que incluyen: las remolachas, amarantos, cactus y los hongos. Aquellas familias que contienen betalaínas no pueden sintetizar antocianinas (Miller *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Ubicación y función de los pigmentos en las plantas.

Color	Categoría	Asociaciones/ modificadores	Localización	Función
Verde, azul-verdoso y rojo	Tetrapirroles (por ejemplo, clorofilas)	Mg, Fe, Cu.	Membrana celular unida principalmente en plástidos, pero también se encuentran en otras partes celulares.	Fotosíntesis (clorofilas) o señalización.
Amarillo, naranja y rojo	Carotenoides	Algunos tienen O ₂ molecular.	Membrana unida en todas las células. Hay presencia de altos niveles en polen, pétalos y frutas.	Pigmento accesorio para la fotosíntesis, protección de clorofila de la foto-oxidación, señalización y almacenamiento.
Incoloro, blanco, amarillo-pálido, rojo púrpura y azul	Flavonoides (flavonas, flavonoles y antocianinas)	Temperatura, pH, metales, azúcares, ácidos orgánicos y copigmentos.	Se acumulan en las vacuolas celulares, en todas las células.	Protección contra el daño UV, señalización, antioxidantes, mecanismo de defensa y función biológica.
Rojo, morado y azul	Betalaínas (betaxantinas y betacianinas)	Debido a que las betalaínas contienen N ₂ en su estructura, pueden tener asociaciones con copigmentos (ácidos fenólicos, ácido ascórbico) y encapsulantes (ciclodextrinas)	Se acumulan en las vacuolas celulares.	Protección contra el daño UV, señalización y defensa.

(Khan, 2016; Miller *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2007).

2.1.2 Presencia de antocianinas en las plantas

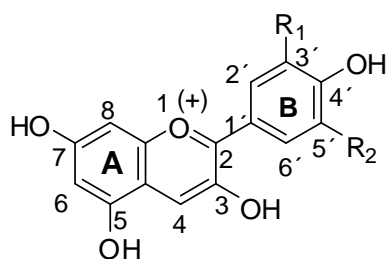
Las antocianinas se producen en prácticamente todos los órganos vegetativos en floración, pueden estar presentes en las raíces tanto subterráneas como aéreas, en brotes jóvenes, incluidas las yemas, en los pecíolos, así como en las láminas de las hojas, se encuentran en las vacuolas de casi todos los tipos de células en los tejidos epidérmicos, terrestres y vasculares de todos los órganos vegetativos. (Lee, 2002; Gould *et al.*, 2008). Hay órganos vegetativos rojos en las plantas de todos los biomas terrestres, desde las hepáticas basales hasta las angiospermas más avanzadas. Las plantas también muestran una gran diversidad en la expresión de antocianinas. En hojas, por ejemplo, las antocianinas pueden colorear toda la cuchilla, o restringirse a los márgenes, rayas, parches o manchas aparentemente aleatorias en la superficie de las láminas superiores, inferiores o ambas. En algunas hojas, solo el peciolo y las venas principales están pigmentadas de rojo, en otras es el tejido de la lámina interveinal, o las estípulas, o domatia que son antociánicas. Algunas hojas se vuelven rojas poco antes de llegar al término de su vida, otras son rojas solo mientras están creciendo, pero otros permanecen rojos durante toda su vida. En muchas especies, las antocianinas se producen solo cuando la planta no es saludable o ha estado expuesta a estrés, pero hay algunos que desarrollan los pigmentos rojos incluso bajo un crecimiento óptimo (Gould *et al.*, 2008).

2.2.2 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (Cuevas *et al.*, 2008). Se consideran dentro del subgrupo de los flavonoides, las antocianinas son el grupo de pigmentos naturales más ampliamente distribuidos en el mundo vegetal, son las responsables de una amplia gama de colores, que incluyen el azul, púrpura, violeta, rojo y naranja (Fennema *et al.*, 2000). A pesar de que poseen pocos grupos cromóforos (Lopes *et al.*, 2007), es decir dobles enlaces conjugados con grupos carbonilo o anillos aromáticos (Farrás *et al.*, 2000). Se han identificado más de 500 antocianinas, resultado de la combinación de antocianidinas y azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa (Clark, 2011). Están presentes en los tejidos vegetales, principalmente flores y frutas, pero también en órganos de almacenamiento, raíces, tubérculos y tallos. En las plantas superiores y plantas inferiores como algas, musgos y helechos (Gould *et al.*, 2008).

2.2.3 Estructura de las antocianinas y color

En las plantas, las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glicosilada, esto es, unidas a azúcares y en cuyo caso se denominan antocianinas. La estructura básica de las antocianinas es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos (Figura 1). El grado de hidroxilación y metilación en el anillo “B” de la molécula determina el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina. Aunque se han descrito diferentes antocianidinas, las más comunes en plantas son las siguientes: pelargonidina, cianidina, delphinidina, son más frecuentes en frutos; peonidina, petunidina y malvidina, lo son en flores (Aguilera *et al.*, 2011).



Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura 1. Diferentes estructuras de antocianidinas, dependiendo de los sustituyentes R1 y R2 en el anillo B.

El color de las antocianinas y antocianidinas resulta de la excitación de la molécula por la luz visible. La facilidad con la que la molécula es excitada depende de la movilidad relativa de los electrones de la estructura. Los dobles enlaces (Figura 1), que son abundantes en antocianinas y antocianidinas, son excitados más fácilmente y su presencia es esencial para el color (Fennema *et al.*, 2000). El color de las antocianinas también depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula que afectan la estructura resonante del anillo. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad (Figura 2). Dentro de los azúcares glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra variación en la estructura de las antocianinas es la acilación de los azúcares con ácidos orgánicos, los cuales pueden ser alifáticos, tales como malónico, acético, málico, succínico y oxálico, o bien aromáticos como *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sináptico, gálico y *p*-hidroxibenzoico (Garzón, 2008).

Las antocianinas aciladas se han descrito con mayor frecuencia en los últimos años, con sustituyentes alifáticos, aromáticos y azúcares, siendo los principales grupos acilantes los ácidos fenólicos que se encuentran preferentemente en el azúcar del C-3 (Figura 2).

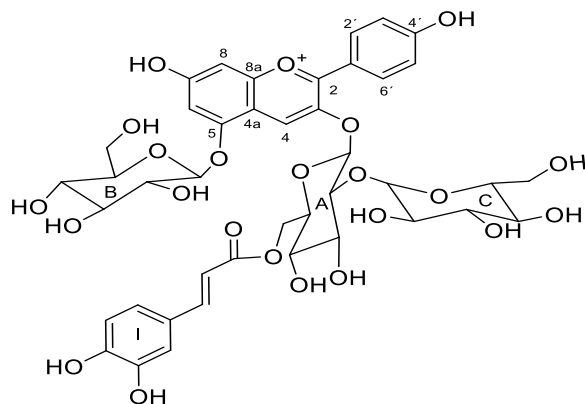


Figura 2. Producto acilado de la antocianina pelargonidina 3-O-(6-O-transcafeil)-2-O-(8-D-glucopiranosil)-8-D-glucopiranosido)-5-O-(8-D-glucopiranosido), en el que se observa un grupo glucósido en la posición 5, y un grupo soforósido, copigmentado con ácido cafeico (Lock, 1997).

1.2.4 Aplicaciones de las antocianinas en la industria de alimentos

En México los colorantes alimentarios, se regulan conforme al Acuerdo de aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias (Cuadro 3), en el que se mencionan los colorantes con Ingestión Diaria Admisible (IDA) establecida y los colorantes que pueden ser utilizados de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), así como su Color Index ó índice de color (C.I.) y el Sistema Internacional de Numeración para aditivos alimentarios (SIN).

Cuadro 3. Uso de las antocianinas en diferentes segmentos alimentarios.

EXTRACTO DE PIEL DE UVA EXTRACTO DE TEGUMENTO DE UVA ENOCIANINAS ANTOCIANINAS	
C.I. : No reportado	SIN: 163 (ii)
Sinónimos: Los principales colorantes son las antocianinas, glucósidos de antocianidinas (sales del 2-fenilbenzopirilio), como peonidina, malvidina, delphinidina y petunidina. Enocianina. Eno.	
Categoría del alimento	Límite máximo
Producto cárnico cocido	BPF
Producto cárnico curado crudo	BPF
Producto cárnico curado madurado	BPF
Productos cárnicos marinados o en salmuera	BPF
Productos cárnicos secos o desecados	BPF
Productos cárnicos empanizados o rebozados congelados	BPF
Vinos y sidra	BPF
Bebidas destiladas	BPF
Licores	BPF
Bebidas alcohólicas preparadas y cocteles	BPF
Bebidas saborizadas no alcohólicas	300 mg/L
Bebidas saborizadas no alcohólicas congeladas.	300 mg/L
Jarabes y concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas.	300 mg/L
Concentrados de manufactura para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas.	300 mg/L
Polvos para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas	300 mg/L
Alimentos preparados a base de cereales, de semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas	BPF
Productos de panificación	100 mg/kg
Suplementos alimenticios	500 mg/kg
EXTRACTO DE ZANAHORIA NEGRA ¹	SIN: 163(vi)
EXTRACTO DE RÁBANO ROJO ¹	SIN: 163(viii)
EXTRACTO DE PAPA DULCE MORADA ¹	SIN: 163(vii)

¹Se utilizarán bajo las BPF, en tanto la Autoridad Sanitaria u otros organismos internacionales como JECFA, el Codex Alimentarius, la Unión Europea y/o los Estados Unidos de América, no dispongan de evaluaciones toxicológicas que permitan establecer una IDA de estos extractos (Acuerdo de aditivos, 2012).

2.2.5 Mecanismos de acción de las antocianinas en el organismo

Las antocianinas se consideran productos de los metabolitos secundarios de las fuentes vegetales (Silva *et al.*, 2017), las antocianinas no son consideradas nutrientes, pero destacan por sus propiedades bifuncionales en el organismo (Cuadro 4), diversos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren una relación inversa entre el consumo y la incidencia de diversas enfermedades crónicas y degenerativas, así como las enfermedades cardiovasculares, trastornos del tracto urinario y varios tipos de cáncer. Las propiedades beneficiosas para la salud de estos metabolitos vegetales se han relacionado con su elevada actividad antioxidante y antirradical, pero también con otros mecanismos como la actividad anti mutagénica, la inhibición de enzimas y la inducción de enzimas de desintoxicación (Pozo-Insfran *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Actividad biofuncional de las principales fuentes vegetales ricas en antocianinas.

Antocianinas	Fuente vegetal	Actividad biofuncional	Referencias
Cianidina-3-glucósido y Cianidina-3-rutinósido	Moras (<i>Rubus jamaicensis</i> , <i>Rubus rosifolius</i> y <i>Rubus racemosus</i>)	Las antocianinas presentes en las moras, mostraron buena actividad antioxidante, la mayoría de los extractos obtuvieron un 50% de actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos a 50 µg/mL. Los extractos de hexano de <i>Jamaican Rubus</i> spp. exhibieron el mayor potencial para inhibir el crecimiento de células cancerosas, inhibiendo las células tumorales humanas de colon, mama, pulmón y gástricas.	Bowen-Forbes <i>et al.</i> , 2010.
Cianidina-3- sambubiósido, Cianidina-3-glucósido, Cianidina-3-xilosilrutinosida, Cianidina-3-rutinósido y Pelargonidina-3-rutinósido	Frambuesas negras (<i>Rubus occidentalis</i> L.)	Se mostró que estas dos antocianinas cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-xilosilrutinosida, presentes en la frambuesa negra, exhiben actividades biológicas potenciales que pueden ser utilizadas en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.	Tulio <i>et al.</i> , 2008.
cianidina-3-diglucósido-5-glucósido, cianidina-3- sinapoil-diglucósido-5-glucósido y cianidina-3- p-cumaroil - diglucósido-5-glucósido	Col morada (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>)	Se han realizado estudios que arrojan que la col morada presenta antocianinas aciladas mono y diaciladas, con ácidos fenólicos, que le otorgan una alta capacidad antioxidante, por lo que presenta un papel importante en la prevención de	Wiczkowski <i>et al.</i> , 2013.

		enfermedades asociadas al daño oxidativo.	
cianidina-3-malonilglucósido, cianidina-3-O-glucósido-2-malonilglucósido, cianidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido, peonidina-3-malonilglucósido, pelargonidina-3-malonilglucósido y peonidina-3-dimalonilglucósido.	Maíz morado (<i>Zea mays</i> L.)	Las antocianinas podrían ser un compuesto biofuncional principal en el maíz morado, para prevenir la vascularización renal, así como actuar como un agente potencial renoprotector en el tratamiento de la glomeruloesclerosis asociada a la diabetes.	Kang <i>et al.</i> , 2012; Zhao <i>et al.</i> , 2008.
Peonidina 3-p-hidroxibenzoil, peonidina-3-ferouil, peonidina-3.cafeoil, cianidina-3-cafeoil peonidina-3-dicafeoil	Papa morada (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	Se encontró en digestión intestinal que las antocianinas diaciladas poseían mayor estabilidad en comparación con las antocianinas monoaciladas y la estabilidad del grupo acilado en el proceso de digestión. Además, la capacidad de eliminación de radicales y la inhibición de xantina oxidasa (XO) mostró que los productos de la digestión poseían buenas actividades biológicas principalmente debido a su composición de antocianinas	Yang <i>et al.</i> , 2019.
delfinidina-3-sambubiosa	Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Las comparaciones entre los ensayos para determinar actividad antioxidante (FRAP y ORAC) dieron una relación lineal. Estos resultados sugieren que la antocianina es la principal fuente de capacidad antioxidante en el extracto de Jamaica.	Tsai <i>et al.</i> , 2002.
cianidina 3-O-glucósido acetaldehído (31), peonidina 3-O-glucósido acetaldehído (32), petunidina 3-O-glucósido acetaldehído (33) y malvidina 3-O-glucósido acetaldehído -	Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Se han realizado estudios acerca del papel de los polifenoles del vino en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Otros estudios han demostrado las propiedades quimiopreventivas de los componentes fenólicos del vino, y en particular de flavonoides y estilbenoides, en la lucha contra el cáncer y otras enfermedades degenerativas asociadas con procesos inflamatorios.	Amico <i>et al.</i> , 2014.

2.2.6 Las antocianinas presentes en el maíz

México, es el centro de origen y biodiversidad del maíz (*Zea mays* L.). El maíz tiene una amplia diversidad genética con 59 razas descritas con diferentes formas y colores que van desde el blanco hasta el amarillo, el rojo, el púrpura y azul (Herrera-Sotero *et al.*, 2017). Los granos de maíz pigmentados en colores rojo, azul y púrpura son ricos en antocianinas; varios informes han demostrado que los glucósidos de cianidina y peonidina son las principales antocianinas presentes en estos granos (Pozo-Insfran *et al.*, 2007). La particularidad de estas variedades es la capacidad de acumular altos niveles de antocianinas, que pueden superar los 1600 mg/100 g de harina seca expresado como equivalentes de cianidina-3-glucósidos (Petroni *et al.*, 2014). El contenido de antocianinas totales en los granos de maíz puede variar en función del color del grano. En los maíces con tonalidades azul/morado, púrpura o magenta el contenido es mayor que en los granos de color rojo (Salinas *et al.*, 2013).

Los glucósidos antociánicos simples o acilados, se localizan principalmente en la capa de aleurona del endospermo, afectando en gran medida al color del grano. Los granos de tamaño pequeño a mediano producen la coloración azul más oscura porque poseen una mayor proporción de capa de aleurona y están menos diluidos por el endospermo (Pozo-Insfran *et al.*, 2007).

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal más importante en México del que se produce la tortilla. Las tortillas son un alimento básico para los mexicanos, consumidas por el 94% de la población mexicana, con un consumo de 335 g/día per cápita, equivalente a 122 kg/año (Herrera-Sotero *et al.*, 2017). Los maíces blancos, así como los genotipos azul y púrpura/rojo se procesan actualmente en harina instantánea para la producción de tortillas, harinas pregelatinizadas, cereales de desayuno, extruidos y snacks. Los parámetros de procesamiento para la producción de estos productos varían significativamente según las propiedades físicas de los granos. Los granos de maíz azul tienen un endospermo más blando que el de los granos blancos utilizados en la nixtamalización, también conocida como cocción alcalina, por lo que requieren menos cocción y remojo (Pozo-Insfran *et al.*, 2007; Herrera-Sotero *et al.*, 2017). Desde el punto de vista nutricional, la nixtamalización tiene varios beneficios aumenta el contenido de calcio, hace que el niacina esté disponible y reduce la cantidad de micotoxinas presentes en el maíz. Por otro lado, la nixtamalización provoca la degradación de las antocianinas. Existen diversos estudios sobre el efecto de la nixtamalización en la tortilla azul, que se han centrado en los cambios en el contenido total de antocianinas, el perfil y la actividad antioxidante (Herrera-Sotero *et al.*, 2017).

A pesar de las características nutricionales de los productos alimenticios elaborados con maíz azul, su amplia comercialización se ve obstaculizada por la reducida disponibilidad de este cultivo, asociada a la

baja disponibilidad de suelo cultivable, debido a que los maíces pigmentados son producidos por agricultores de subsistencia, en suelos marginales, en pequeñas superficies y la mayor parte de su producción es para autoconsumo (Salinas *et al.*, 2013). Además del bajo rendimiento de las especies de maíz pigmentado, ocasionado por efecto de la polinización abierta, debido a que la generación de híbridos por entrecruzamientos es frecuente (Arleo C., 2015), como consecuencia las tortillas de maíz azul son más caras que las tortillas de maíz blanco, fáciles y ampliamente disponibles (Vernon-Carter *et al.*, 2020).

3. Justificación

Las plantas, han sido utilizadas para teñir diversos materiales desde la época prehispánica, así como en la medicina tradicional y los compuestos químicos que tienen la capacidad de impartir coloración no han sido explorados en plantas medicinales.

En diversos estudios se ha concluido que el muicle contiene antocianinas glicosiladas por la tonalidad (violácea) que presenta en extractos acuosos y la afinidad por los solventes más polares, por tal motivo en el presente trabajo doctoral se plantea la caracterización fisicoquímica del extracto de muicle (*J. spicigera*) que imparte el color.

En México, la mayor parte de la población adulta presenta sobrepeso y el alimento básico en el país es el maíz, que se consume principalmente en forma de tortillas, existen diferentes variedades de maíz que también poseen coloraciones características (amarillas, moradas y azules) proporcionadas por los principios activos colorantes como betacarotenos y antocianinas, las variedades de maíz azul y morado presentan diversas antocianinas glicosiladas y resulta ser más costosa su producción debido a que el maíz presenta elementos transponibles dentro de su genoma, lo que dificulta el resultado de un maíz de coloración homogénea, razón por la que se propone la incorporación del extracto acuoso de muicle en un alimento que emplee como base el maíz, debido al contenido de antocianinas y compuestos fenólicos que pudiera aportar, además de ayudar a disminuir el síndrome metabólico que afecta a la población mexicana.

Esto justifica una oportunidad de aprovechamiento de la planta de muicle, debido a que es considerada un recurso natural nativo de México, que suele emplearse para la medicina tradicional en padecimientos como enfermedades circulatorias, diabetes, leucemia, anemia, giardiasis, fascioliasis, diarrea, reumatismo, inflamación de estómago, entre otros; misma que no ha sido explorada por sus propiedades colorantes en alimentos, por tal razón su adición en un producto de mayor consumo, se espera que genere efectos sinérgicos sobre la salud de la población.

4. Hipótesis

La adición exógena del extracto de muicle (*J. spicigera*) en la masa de harina de maíz blanca nixtamalizada, le conferirá a la tortilla un mayor contenido de actividad antioxidante, por lo que este alimento podrá emplearse como una alternativa funcional para la disminución del síndrome metabólico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar el extracto de muicle (*J. spicigera*), así como los posibles beneficios en la reducción del síndrome metabólico e incrementar la actividad antioxidante, que las antocianinas pueden aportar al incorporarse en harina de maíz blanco nixtamalizado para la obtención de tortillas.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar la caracterización del extracto de muicle (*J. spicigera*), empleando diferentes medios de extracción.
- Realizar la aplicación el extracto acuoso de muicle (*J. spicigera*), en la masa de harina de maíz blanco nixtamalizado para la obtención de tortillas.
- Evaluar el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.
- Estudiar el efecto de la adición del extracto de muicle en las tortillas y su relación con la digestibilidad de las fracciones de almidón.

6. Materiales y métodos

6.1 Diseño del estudio

En este proyecto doctoral se plantea caracterizar los constituyentes químicos que aportan la coloración violácea del extracto de las hojas de muicle (*J. spicigera*) y evaluar dicho extracto en un sistema alimentario (Figura 3).

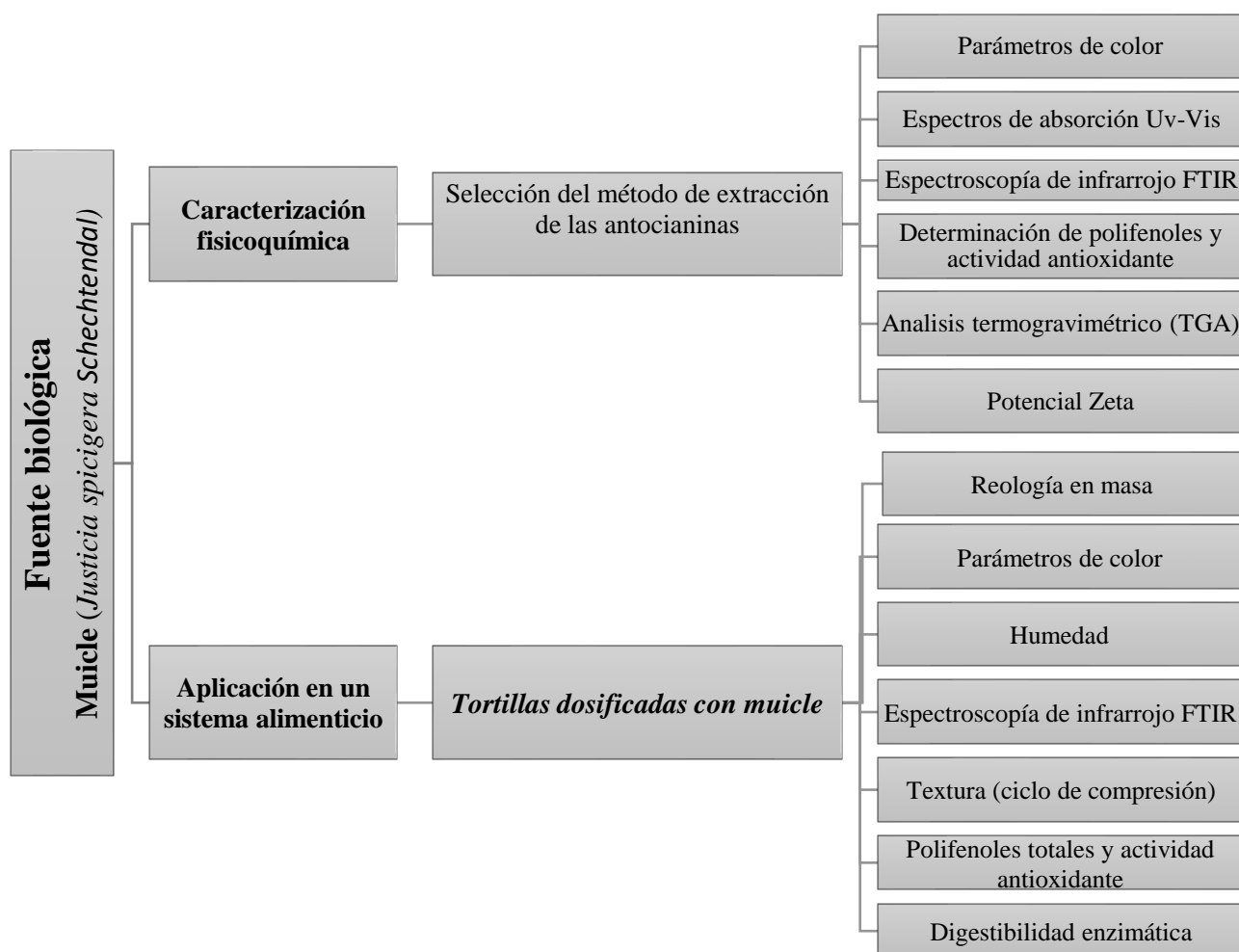


Figura 3. Estrategia experimental para la caracterización e incorporación del extracto de muicle (*J. spicigera*) en tortillas de harina de maíz blanco nixtamalizado.

6.2 Caracterización fisicoquímica

6.2.1 Extracción de las antocianinas de las hojas de muicle

La obtención de los extractos de muicle (*J. spicigera*) se basó en la metodología reportada por Baqueiro-Peña et al, 2017. Se colectaron las plantas de muicle adultas en el mes de Octubre del año 2019 en Yautepec Morelos, México (18°53' N, 99°04' O, 1210 m de altitud). Las hojas de muicle se limpiaron con un algodón húmedo con agua potable para eliminar los residuos de polvo o tierra, se dejaron secar a una temperatura de 40 °C/72 h y posteriormente se trituraron empleando un mortero. Las muestras fueron extraídas usando agua destilada, etanol absoluto y las soluciones agua:etanol en diferentes proporciones v/v (30:70, 50:50, 70:30). Para la obtención de los extractos, se colocaron 0.3 g peso seco de las hojas trituradas en frascos ámbar, posteriormente se agregó el solvente o la mezcla correspondiente, con un volumen de 25 mL de solución, las muestras fueron tratadas de la siguiente manera:

- a) Las muestras con diferentes disolventes: agua destilada, etanol absoluto y las soluciones agua-etanol en diferentes proporciones v/v (30:70, 50:50, 70:30), se les aplicó ultrasonido, (Branson 1800) a 42 kHz durante 30 min a 21 °C.
- b) La muestra con agua destilada se le aplicó ultrasonido (42 kHz durante 30 min), manteniendo una temperatura de 55-57 °C.
- c) La muestra con medio disolvente de agua destilada se maceró durante 30 min, manteniendo una temperatura de 55-57 °C.

Todas las muestras de los extractos fueron filtradas empleando organza, y posteriormente en un Papel Whatman No. 2, utilizando un equipo de vacío y almacenado en frascos ámbar en congelación, para ser empleados de manera inmediata (Baqueiro-Peña *et al.*, 2017).

6.2.2 Parámetros colorimétricos (L*a*b* y C)

Se determinaron los valores colorimétricos de cada uno de los extractos con diferente tratamiento empleando un colorímetro (Konica Minolta Spectrophotometer CM-3600A), las muestras fueron medidas en Transmitancia en una celda de cuarzo de 15 mL, empleando el sistema SCI, iluminante D65, se determinó para cada uno de los extractos una dilución con el mismo solvente de extracción de la muestra en particular, en el que la absorbancia máxima se mantuviera en el rango de 0.3-0.8 para la región visible de 400-700 nm.

Refiriéndose al L*a*b* de acuerdo con la escala CIELab como la localización de cualquier color en el espacio determinada por sus coordenadas rectangulares:

- L* (0 a 100) – Luminosidad.

-
- a^* (-100 a 100) - Rojo/verde, los valores $+a^*$ indican rojo y $-a^*$ indican verde.
 - b^* (-100 a 100) - Amarillo/Azul, los valores $+b^*$ indican amarillo, y $-b^*$ indican azul.
 - C - Cromaticidad, la distancia perpendicular al eje L.

6.2.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización por espectroscopia de FTIR, fue realizada a través de un espectrofotómetro Spectrum GX, Perkin Elmer, equipado con un accesorio universal para muestras de diamante, ATR. Para cada muestra se tomó el promedio de 20 escaneos a una resolución de 0.5 cm^{-1} , en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} para después seleccionar la región de análisis. El espectrograma de la celda vacía (aire) fue tomado como referencia (*background*). La línea base de todos los espectrogramas fue corregida.

A las muestras líquidas analizadas, se les restó el valor del blanco y se multiplicó por un factor, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes). La sustracción se realiza en espectros de absorbancia, ya que la escala de absorbancia es lineal. La diferencia de espectro se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$A_{(\text{espectro de diferencia})} = A_{(\text{muestra})} - (SF) * A_{(\text{referencia})}$$

Donde:

A = absorbancia.

SF = es un factor de escala.

6.2.4 Determinación del contenido de Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó usando el reactivo de Folin–Ciocalteu mediante la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965). Se mezcló una alícuota de $200 \mu\text{L}$ de los extractos de muicle con 1 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu (previamente diluido con agua en proporción 1:10 v/v) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente antes de adicionarle 0.8 mL de una solución de carbonato de sodio (7.5% p/v). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, al resguardo de la luz y posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Spectronic® Genesis 2). El contenido total de compuestos fenólicos se reportó como g equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100g de hojas en peso seco.

6.2.5 Actividad antioxidante DPPH

La capacidad de captación de radicales fue realizada por el método DPPH descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995), con ligeras modificaciones, 24 mg DPPH se disolvieron en 100 mL metanol esta solución se refrigeró a 4 °C, después se diluyó de la siguiente manera 10 mL Stock de DPPH se le agregaron 40 mL de metanol, esta solución se ajustó con el mismo disolvente o sol. Stock de DPPH hasta alcanzar un valor de absorbancia de 1.1 a 515 nm. Se utilizó Trolox como estándar y metanol como disolvente para la preparación de la curva patrón, para las muestras de los extractos de muicle se empleó la siguiente relación: 100 µL del extracto de muicle se le añadió 1mL DPPH, se incubaron durante 30 min antes de ser leídos a 515 nm en el espectrofotómetro (Spectronic® Genesis 2). Los resultados fueron expresados en mg equivalente de Trolox (ET) / 100 g peso seco.

6.2.6 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se empleó un analizador Termogravimétrico TA Instruments modelo TGA 2950 (New Castle, DE, EUA), se colocaron en la charola del equipo 4.5 mg del extracto acuoso seco de muicle, posteriormente fueron introducidas en el horno y el equipo se operó empleando una rampa de temperatura, realizando incrementos de 10 °C/min hasta llegar a 500 °C, usando N₂ como gas de purga. Con los resultados que arrojó el programa del equipo, se obtuvieron el % de pérdida de peso obtenido de la relación, final weight/starting weight (% W/W₀) y la derivada de la pérdida de peso en función de la temperatura.

6.2.7 Potencial Zeta (ζ)

Se realizaron soluciones del extracto acuoso de muicle. Se determinó el potencial Zeta de las soluciones a diferentes valores de pH, usando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones acuosas fue ajustado con una solución de HCl 0.1N y NaOH 0.1N. Se determinaron los valores de las cargas electrostáticas para el extracto crudo.

6.2.8 Determinación del espectro de absorción UV-Vis

A partir de las muestras obtenidas a diferente pH se determinó el espectro de absorción de 200-1100 nm, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis 2), se empleó como blanco agua y se buscó para cada uno de los extractos una dilución en la que la absorbancia máxima estuviera en 0.3-0.8 para la región visible 400-700 nm.

6.2.9 Determinación de antocianinas totales

Para la cuantificación de antocianinas (ACN) totales se empleará el método de pH diferencial reportado por Wrolstad (1976), el cual consiste en tomar dos alícuotas de la muestra problema; una de ellas es diluida con buffer de KCl-HCl a pH 1 hasta obtener una absorbancia entre 0.3-0.8 y la siguiente dilución empleando el buffer de acetato de sodio y ácido acético a pH 4.5. Posteriormente, cada una de las diluciones se leerá en un espectrofotómetro (Spectronic® Genesis 2) a dos longitudes de onda ($\lambda_{\text{máx}}$ y 700 nm).

La absorbancia del extracto se obtendrá a partir de la siguiente ecuación:

$$A = (A_{\text{máx pH 1}} - A_{700\text{nm pH 1}}) - (A_{\text{máx pH 4.5}} - A_{700\text{nm pH 4.5}})$$

Y el contenido total de antocianinas se calculó con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = (A/\epsilon L) (10^3) (PM) (F)$$

En donde:

A = Absorbancia

ϵL = Absortividad molar de cianidina-3-glucósido (26900 L/cm.mol)

L = Longitud de la celda (1 cm)

10^3 = Factor de conversión

PM = Peso molecular de cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol)

F = Factor de dilución

6.2.10 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en el extracto acuoso de muicle

Se empleó el extracto acuoso de muicle obtenido por maceración. El perfil de antocianinas se obtuvo mediante CLAR fase reversa, el equipo empleado fue un Cromatógrafo Agilent 1100 equipado con un detector de longitud de onda múltiple (MWD), desgasificador de vacío, bomba cuaternaria, compartimento termostático de la columna y un muestreador automático. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se empleó una columna Kromasil 25 C18 5 u 100A (4.6 × 250 mm) y Las longitudes de onda seleccionadas en el detector fueron 520 (antocianinas), 320 (ácidos hidroxycinámicos) y 280 (compuestos fenólicos) nm. Se realizó una elución isocrática, utilizando una disolución A de ácido fórmico al 10%, con velocidad de flujo de 0.50 mL/min y un volumen de inyección de 50 μ L (Del Carpio *et al.*, 2009).

6.3 Tortillas de maíz con extracto de muicle

6.3.1 Preparación del extracto de muicle (EM) para dosificar la coloración en tortillas.

El proceso de extracción se realizó de acuerdo con lo descrito en la Sección 5.2.1, utilizando agua y maceración, manteniendo una temperatura de 50-52 °C durante 24 h, debido a que fue el método de extracción que arrojó un mayor contenido de polifenoles totales, así como un espectro de absorción

característico de antocianinas, posteriormente el extracto se filtró a través de organza y en un Papel Whatman No. 2 empleando un equipo de vacío, el extracto (15 g de hojas secas en 350 mL) se ajustó a un contenido de Sólidos Totales de $2.59 \% \pm 0.05$, debido a que el contenido de antocianinas empleando el método de pH diferencial arrojó resultados erróneos, por el alto contenido de compuestos fenólicos en la muestra. El extracto fue almacenado en frascos ámbar en congelación, para ser empleado de manera inmediata.

6.3.2 Preparación de la masa de harina de maíz con el extracto de muicle (EM)

El extracto de muicle (EM), se mezcló con agua destilada en las siguientes proporciones másicas EM:Agua 0:18, 3:15, 7:11 y 11: 7, se añadieron 60 g de esta mezcla a 40 g de harina de maíz blanco nixtamalizado (NWMF). La cantidad de EM en NWMF fue de 0, 0.7, 1.7 y 2.7 g/100 g base seca. con la ayuda de un mezclador espiral de laboratorio (SP-800-J Alpha Simet Group, México), se mezclaron a baja velocidad (200 rpm) durante 10 min, seguido de más mezclando a mayor velocidad (500 rpm) durante 5 min. Las variaciones de masa y tortilla se etiquetaron como M_x y T_x respectivamente, donde "x" corresponde al contenido de EM en NWMF en base seca.

6.3.3 Viscoelasticidad de la masa

Las masas de harina de maíz con y sin extracto de muicle fueron analizadas con un Reómetro MCR 300 Physica (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany). Las muestras de masas (~5.0 g) fueron puestas cuidadosamente en el sistema de medición y se dejó reposar por 5 min a 25 °C para la recuperación de la estructura de la muestra, se utilizó aceite mineral para cubrir los bordes entre la geometría y la masa para evitar la deshidratación de la muestra. El mantenimiento de la temperatura se logró con un controlador de temperatura Physica TEK 150P. La prueba de barrido de amplitud se realizó con una geometría plato-paralelo con la parte superior estriado (PP50/2), en el intervalo de deformación 0.1-100% a 1 Hz y una separación de 0.005 m (Álvarez-Ramírez *et al.*, 2019).

6.3.4 Preparación de las tortillas

Se prepararon las tortillas con las masas hechas esferas con un peso aproximado de 30 ± 0.12 g y fueron prensados con una prensa manual de metal. Las masas fueron protegidas por dos láminas de plástico para evitar su adhesión en la prensa. Las tortillas tuvieron como resultado un diámetro aproximado de 14.0 ± 0.2 cm y un grosor aproximado de 0.15 ± 0.20 cm. Se cocieron en una placa calefactora magnética (Modelo C-MAG HS, IKA, México City, México) con una temperatura de 350 °C por un min de cada

lado de la tortilla y 15 s extra para que la tortilla inflará. Después fueron atemperados por 5 min cada lado a condiciones de laboratorio, aproximadamente 20 °C con una humedad relativa de 45%. Finalmente, las tortillas se guardaron individualmente en bolsas de polietileno con cierre hermético (Ziploc®) a una temperatura de refrigeración de 4 °C durante 4 d, para las pruebas realizadas.

6.3.5 Parámetros colorimétricos en tortillas

Las muestras de tortilla con y sin extracto de muicle fueron caracterizadas en reflectancia con un colorímetro portátil (NH310 High-quality portable colorimeter), en cada tortilla se tomó la lectura en 5 zonas distintas del mismo lado (segundo lado de la cocción o costra), esta prueba se realizó por triplicado, se emplearon las siguientes condiciones de operación: Intensidad de luz D65 y el Componente Especular Incluido (SCI). Se obtuvieron los valores colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^* y h^*), posteriormente se calculó la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) empleando la siguiente fórmula:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

6.3.6 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las tortillas, se monitoreo durante 4 d, se realizó por triplicado y fue analizado mediante el método de termogravimetría empleando un analizador de humedad Sartorius MA 35, con una temperatura de 130 °C durante 15 min.

6.3.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de tortilla con y sin extracto de muicle (EM), se caracterizaron por FTIR de acuerdo con la metodología descrita en la Sección 5.2.3.

6.3.8 Contenido de Polifenoles Totales y Actividad antioxidante en condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.

Las muestras de Tx (5 g) fueron trituradas en un motero, se homogenizaron en 15 mL de una mezcla de etanol y solución de ácido cítrico 1 M (1:4 v/v). La dispersión se sometió a ultrasonido (Procesador de ultrasonidos, Modelo VCX-750, Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, USA) a 750 W y 20 kHz, acoplado a una sonda de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, T 750 W 20 kHz por 60 min a temperatura ambiente (~20 °C) (Herrera-Sotelo *et al.*, 2017). Los extractos se prepararon en fresco antes de cada ejecución para evitar degradación. Los extractos fueron rota-evaporados y resuspendidos en 15 mL de agua destilada para reducir la interferencia del disolvente en los ensayos.

6.3.9 Determinación del contenido de Polifenoles totales en tortilla

El contenido de polifenoles totales se caracterizó de acuerdo con la metodología descrita en la Sección 5.2.4.

6.3.10 Actividad antioxidante DPPH

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la Sección 5.2.5.

6.3.11 Actividad antioxidante ABTS

La capacidad antioxidante de radicales fue determinada por el ensayo ABTS (Pellegrini *et al.*, 1999), con ligeras modificaciones, se empleó una solución acuosa de ABTS (7 mM) y una solución acuosa de persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ (2.45 mM) se dejaron reaccionar en la oscuridad a temperatura de refrigeración durante 16 h antes de su uso, posteriormente fueron mezcladas una proporción de 1: 1 (v/v), esta solución se diluyó con agua hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.02 a 734 nm.

Para las muestras de los extractos de tortilla se empleó la siguiente relación: a 200 μ L de extracto de muicle, se le añadieron 2 mL de ABTS (ajustado 0.70 absorbancia) posteriormente se incubaron durante 10 min antes de ser leídos a 734 nm en el espectrofotómetro (Spectronic® Genesis 2). Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox μ M (TE) / g de muestra seca.

6.3.12 Hidrólisis enzimática y digestibilidad del almidón *in vitro*

Las muestras de tortillas frescas (Tx), se incubaron con α -amilasa pancreática (A-3176, 10-30 unidades. mg^{-1} sólido, Sigma Chemical Co. Louis, MO, USA) y amiloglucosidasa (A-7420, 14 unidades. mg^{-1} , Sigma Chemical Co. Louis, MO, USA) a 37 °C durante 120 min en condiciones de agitación suave. La determinación de las fracciones de almidón digeribles *in vitro* se realizó utilizando el método descrito por Englyst *et al.*, (1992), que se basa en la tasa de hidrólisis, la fracción de almidón fácilmente digerible (RDS) se tomó como aquella digerida en 20 min, la fracción de almidón lentamente digerible (SDS) como la digerida entre 20 y 120 min, y la fracción de almidón resistente (RS) fue la fracción no digerida después de 120 min (es decir, $RS = TS - RDS - SDS$). Los valores estimados se ajustaron al contenido de almidón disponible (base seca) determinado previamente, considerando como blanco la muestra de tortilla fresca sin extracto de muicle.

La cinética de la hidrólisis enzimática del almidón. se ajustó numéricamente a través del método de mínimos cuadrados por el modelo propuesto por Goñi *et al.*, 1997.

$$C(t) = C_{\infty}(1 - \exp(-k_H t))$$

Donde:

$C(t)$ es el almidón hidrolizado total,

C_{∞} es el equilibrio de concentración,

k_H es la constante de velocidad de hidrólisis.

6.3.13 Textura (compresión de la tortilla)

Para las pruebas de compresión para las tortillas con y sin extracto de muicle se usó un Texturometro Brookfield CT3-4500 (AMETEK Brookfield, Middle-borough, MA, USA) equipado con una sonda esférica TA18 (diámetro de 0.012 m). Cada tortilla fue colocada en la placa inferior del texturómetro que tiene un agujero cuadrado perforado (0.0254 m de diámetro). La muestra de tortilla fue comprimida a una velocidad de 0.001 m s^{-1} hasta alcanzar el 50% de penetración mediante el ciclo de compresión. Los valores fueron proporcionados por el software del equipo, se realizaron tres mediciones para cada muestra evaluada.

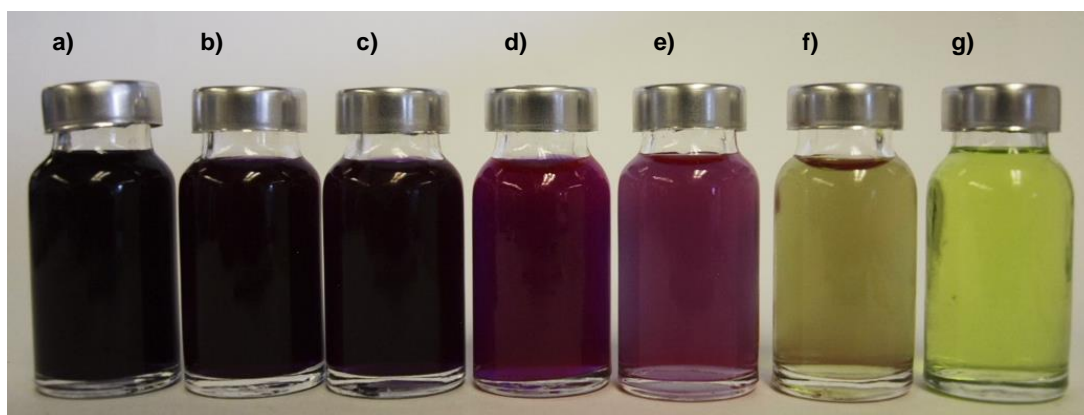
7. Resultados y discusión

7.1 Extractos de hojas

Los extractos de muicle se obtuvieron a partir de hojas frescas (Figura 4), se realizaron 3 tratamientos: ultrasonido (US), ultrasonido con temperatura (UST) de 55-57 °C y maceración con temperatura (MT) de 55-57 °C (Figura 5), esta última se evaluó con el propósito de contrastar el ultrasonido con la extracción tradicional que se emplea para esta planta, se consideró como factor clave no sobrepasar la temperatura de degradación de las antocianinas ≤ 60 °C.



Figura 4. Hojas frescas de la planta de muicle la planta de *Justicia spicigera* Schechtendal.



Solvente de extracción:	a) agua	b) agua	c) agua	d) agua:etanol	e) agua:etanol	f) agua:etanol	g) etanol
	100	100	100	70:30	50:50	30:70	100

Figura 5. Extractos de las hojas de muicle, empleando los siguientes tratamientos: a) agua con maceración y temperatura (MT/A), b) agua con ultrasonido y temperatura (UST/A), c) agua con ultrasonido (US/A), d) agua-etanol en proporción 70:30 con ultrasonido (US/AE-7:3), e) agua-etanol en proporción 50:50 con ultrasonido (US/AE-5:5), f) agua-etanol en proporción 30:70 con ultrasonido (US/AE-3:7) y g) etanol con ultrasonido (US/E).

7.2 Parámetros de color (L*a* b* y C)

En el siguiente cuadro se muestran los valores de los parámetros de color para cada uno de los extractos de muicle, observando que los extractos que emplearon etanol como solvente de extracción presentaron tonalidades amarillas (b +) y verdes (a -), en contraste con los extractos que utilizaron como solvente de extracción al agua las cuales presentaron tonalidades rojas (a +) y azules (b -).

Comparando los valores de Luminosidad (L*), éste fue mayor en los extractos que contenían etanol, Baqueiro-Peña *et al.*, (2017), realizaron la determinación de los valores de color para los extractos de muicle, sólo emplearon como método de extracción con ultrasonido y encontraron las mismas relaciones de color, ellos trabajaron con muestras de hojas frescas, secas y secas almacenadas durante 1 año y observaron que en los extractos que contenían el 70% de etanol de cada una de estas muestras, presentaban diferentes tonalidades de rosa, este último diferente al nuestro, esto puede ser debido al contenido de antocianinas de las muestras colectadas, que puede variar con la estacionalidad de la colecta, las condiciones nutricionales de la planta, también se ha observado que la cantidad de clorofila en el tejido de la hoja es influenciada por la disponibilidad de nutrientes y el estrés ambiental como la sequía, salinidad, frío y calor (Palta, 1990).

Cuadro 5. Valores colorimétricos de los extractos de las hojas de muicle.

Muestra	L*	a*	b*	C*	h°
MT/A	60.88 ± 0.34 ^{bcdefg}	14.08 ± 0.14 ^{bcdefg}	-23.78 ± 0.17 ^{bcdefg}	27.64 ± 0.19 ^{bcdeg}	300.64 ± 0.21 ^{bcdefg}
UST/A	62.53 ± 0.24 ^{acdefg}	7.01 ± 0.11 ^{acdefg}	-14.39 ± 0.01 ^{acdefg}	16.001 ± 0.05 ^{acdefg}	295.95 ± 0.36 ^{acdefg}
US/A	66.78 ± 0.45 ^{abdfg}	11.59 ± 0.27 ^{abdefg}	-18.28 ± 0.27 ^{abdefg}	21.64 ± 0.37 ^{abefg}	302.39 ± 0.33 ^{abdefg}
US/AE-5:5	72.86 ± 0.18 ^{abcefg}	0.91 ± 0.02 ^{abcefg}	-21.79 ± 0.09 ^{abcefg}	21.81 ± 0.09 ^{abefg}	272.38 ± 0.06 ^{abcefg}
US/AE-3:7	66.12 ± 0.001 ^{abdfg}	-17.16 ± 0.01 ^{abcdf}	14.60 ± 0.01 ^{abcdfg}	22.53 ± 0.01 ^{abcdfg}	139.60 ± 0.01 ^{abcdfg}
US/AE-7:3	77.18 ± 0.33 ^{abcdeg}	5.22 ± 0.44 ^{abcdeg}	-26.79 ± 0.37 ^{abcdeg}	27.30 ± 0.43 ^{bcdeg}	281.01 ± 0.79 ^{abcdeg}
US/E	92.56 ± 0.001 ^{abcdef}	-16.63 ± 0.001 ^{abcdf}	37.54 ± 0.001 ^{abcdef}	41.06 ± 0.001 ^{abcdef}	113.89 ± 0.001 ^{abcdef}

Los valores son medias ± error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P≤0.05).

Agua con maceración y temperatura (MT/A), agua con ultrasonido y temperatura (UST/A), agua con ultrasonido (US/A), agua-etanol en proporción 70:30 con ultrasonido (US/AE-7:3), agua-etanol en proporción 50:50 con ultrasonido (US/AE-5:5), agua-etanol en proporción 30:70 con ultrasonido (US/AE-3:7) y g) etanol con ultrasonido (US/E).

En estas determinaciones se observa que el tipo de solvente empleado en la extracción es determinante para las tonalidades o principios activos (clorofilas y antocianinas) que aportan el color en los extractos de *J. spicigera*, las clorofilas al ser compuestos liposolubles presentan una mayor afinidad por los

solventes orgánicos como el etanol, el dimetil éter, el dimetil formamida, acetona y metanol, comúnmente utilizados para la determinación del contenido de clorofilas (Humphrey 1980; Palta, 1990).

7.3 Espectros de absorción de los extractos de muicle

De cada una de las muestras de los extractos de muicle, se determinó el espectro de absorción en la región visible (400-700 nm), que se muestra en la Figura 6 y Cuadro 4.

Se ha demostrado que hay antocianinas presentes en plantas superiores juveniles y senescentes, la cianidina-3-glucósido, es el pigmento predominante en las hojas (Giltenson *et al.*, 2001). Para estimar el contenido de antocianinas de hojas en diferentes especies de plantas se encontró que el espectro de absorción en tres especies de plantas, el pico máximo de absorbancia correspondía a 550 nm, comparando esta longitud de onda con las muestras obtenidas de los extractos (Cuadro 6), se encontró que los extractos que emplearon agua como medio de extracción, la longitud de onda estaba alrededor de los 586-596 nm, por lo que pudiera tratarse de antocianinas, a pesar de que la longitud de onda no corresponde a lo reportado por Gitelson *et al.*, 2001, esto puede ser debido a que los extractos reportados se extrajeron con metanol y fueron acidificados con HCl. Otra posible causa es que las antocianinas pueden presentar desplazamientos en su $\lambda_{\text{máx}}$, debido a la copigmentación (efecto batocrómico). Lo anterior se confirma por Espinosa-Morales *et al.*, 2012, ellos determinaron la $\lambda_{\text{máx}}$ (581 nm) para los extractos acuosos de muicle y lo asociaron al mismo efecto causado por la copigmentación intermolecular típica de antocianinas dentro de flavonoides como taninos y catequinas o grupos glucosídicos que pueden actuar como copigmentos, también referenciaron que cuando la delfinidina sufre copigmentación, su $\lambda_{\text{máx}}$ se desplaza hasta valores más cercanos a los observados para el extracto acuoso de muicle ($\lambda_{\text{máx}} = 581\text{nm}$).

Para el caso de los extractos que emplearon etanol, se encontraron una o dos señales características de las clorofilas (Figura 6). Las señales que aparecen a los 650 y 665 nm pueden atribuirse a Clorofila-a y b, respectivamente (González *et al.*, 2020).

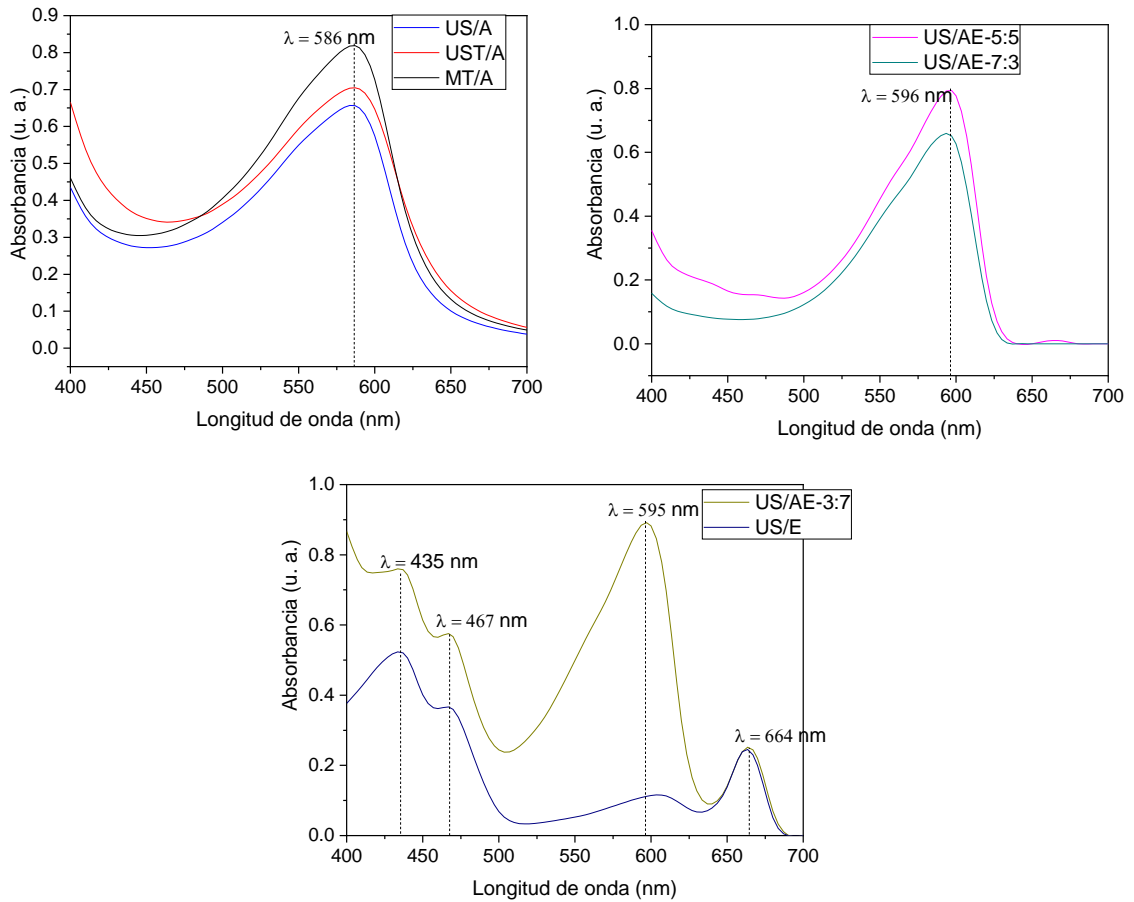


Figura 6. Espectros de absorción de los extractos de muicle.

Cuadro 6. Comparación de la longitud de onda en la que la absorbancia es máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada uno de los extractos de muicle.

Muestra	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Possible pigmento
MT/A	586	Antocianinas
UST/A	586	Antocianinas
US/A	586	Antocianinas
US/AE-5:5	596	Antocianinas
US/AE-7:3	596	Antocianinas
US/AE-3:7	(I)435, (II)467, (III)664 y (IV) 595	Antocianinas /clorofilas
US/E	(I)435, (II)467, (III)664	clorofilas

US =Ultrasonido 30 min a 42 kHz y T =Temperatura de 55-57 °C.

7.4 Espectrogramas de FTIR de los extractos de muicle

En las Figura 7 y 8, se muestran los espectros de infrarrojo (FTIR), para los extractos de muicle.

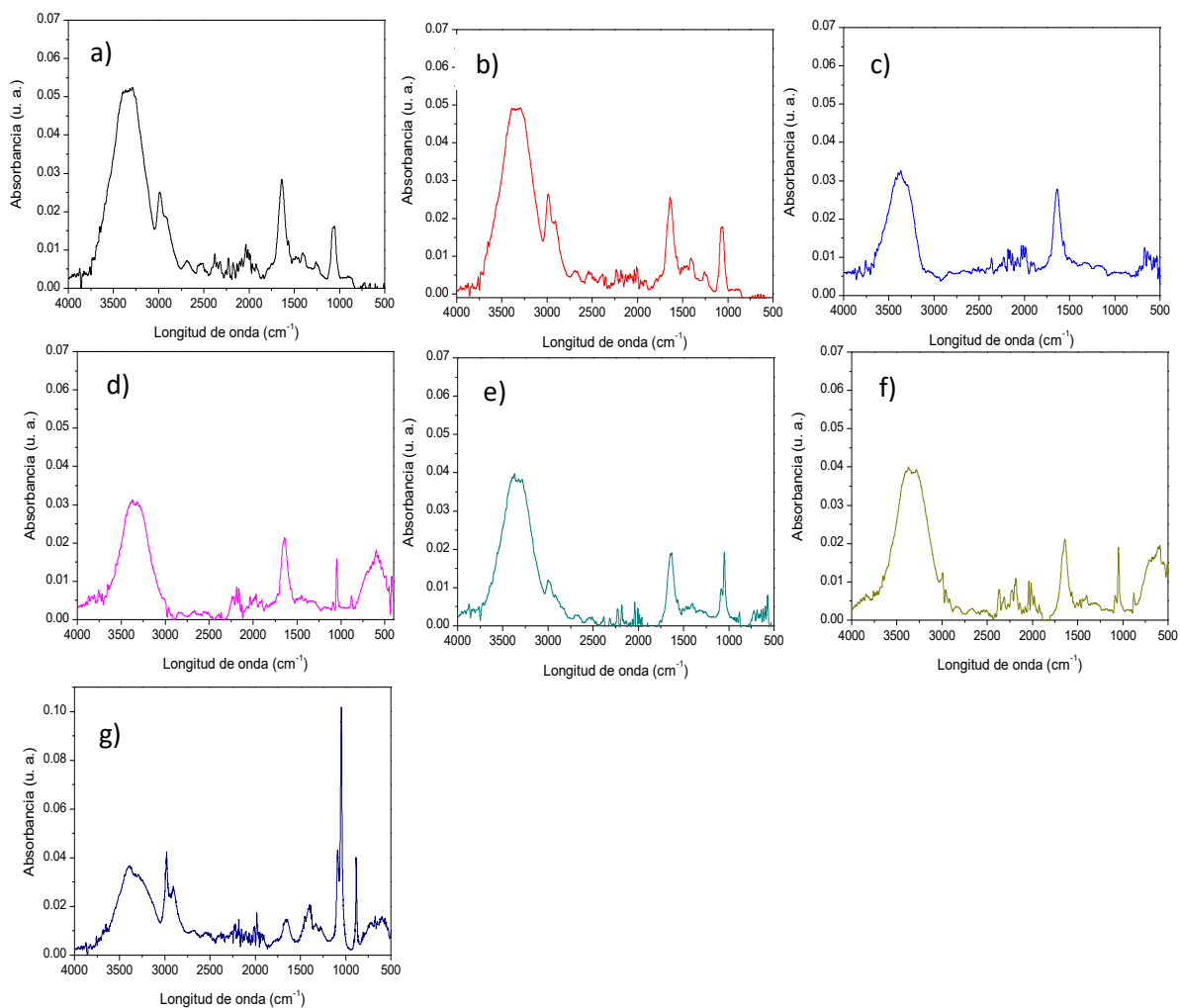


Figura 7. Espectros de FTIR, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes), de los extractos de las hojas de muicle en: a) MT/A, b) UST/A, c) US/A, d) US/AE-5:5, e) US/AE-7:3, f) US/AE-3:7 y g) US/E.

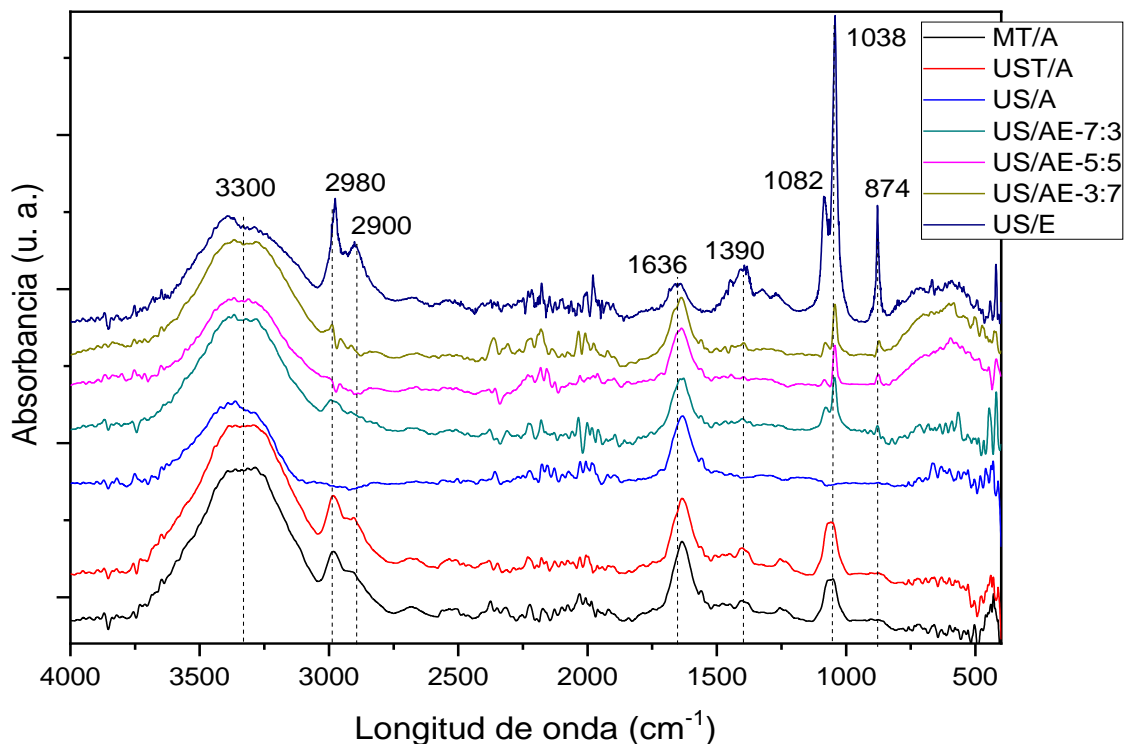


Figura 8. Comparación de los perfiles encontrados en los espectros de FTIR de los extractos de las hojas de muile, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes).

Para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos de muile, se buscó la estructura básica de las antocianinas, que se compone de un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos (anillo A y C) y el grupo fenólico (anillo B), el color característico depende de los de sustituyentes en el anillo B (Espinosa-Morales *et al.*, 2012), por lo que se buscaba encontrar el enlace C=C, -C-C, característico de la estructura.

En el Cuadro 7, se muestra la identificación de los grupos funcionales por espectroscopia de infrarrojo, el primer grupo funcional que se encontró en todos los extractos corresponde al grupo OH, el estado de este grupo funcional se cree que es polimérico y en muestras húmedas como en este caso aparece la señal de estiramiento H-O-H ($3600-3100\text{ cm}^{-1}$) y también se observa la flexión de $1640-1615\text{ cm}^{-1}$. Para la señal de 1636 cm^{-1} , se determinó una amina primaria $-\text{NH}_2$ ($1640-1560\text{ cm}^{-1}$), de baja a mediana intensidad, esta puede presentar flexión de tijera, tanto en aminas alifáticas como aromáticas.

Para la región de 2900 cm^{-1} , se determinó el grupo $-\text{CH}_2-$, que presenta dobletes de estiramiento asimétrico y vibración simétrica.

Se encontró en la señal de 1390 cm^{-1} , el grupo aldehído $-\text{CHO}$, que tiene presencia en las regiones de 1410-1380 cm^{-1} , con un origen de torsión de los C-H. En la región de 1802 cm^{-1} se identificó el grupo éster (1300-1050 cm^{-1}). En la longitud de onda de 874 cm^{-1} , se identificó el grupo funcional del ácido carboxílico (960-875 cm^{-1}), con una señal de ancha a mediana intensidad, con origen de torsión fuera del plano del dímero del carboxilo.

Cuadro 7. Identificación de los grupos funcionales de los extractos de muicle.

Grupo funcional y longitud de onda	Muestras						
	MT/A	UST/A	US/A	US/AE-5:5	US/AE 7:3	US/AE-3:7	US/E
-OH (3300 cm^{-1})	√	√	√	√	√	√	√
-CH₃ (2980 cm^{-1})	√	√	-	-	-	-	√
-CH₂- (2900 cm^{-1})	√	√	-	-	-	-	√
-NH₂ (1636 cm^{-1})	√	√	√	√	√	√	√
-CHO (1390 cm^{-1})	√	√	-	-	-	-	√
-COO- (1802 cm^{-1})	-	-	-	-	-	-	√
-(C=O)-O- (C=O)- (1038 cm^{-1})	√	√	√	√	√	√	√
-COOH (874 cm^{-1})	-	-	-	√	-	√	√

√, Indica la presencia del grupo funcional.

7.5 Contenido de polifenoles totales en los extractos de muicle

Para determinar el contenido de polifenoles totales se empleó el reactivo de Folin–Ciocalteu, se realizó una curva patrón, para estimar la concentración en equivalentes de ácido gálico (GEA) en los extractos de muicle.

El contenido de polifenoles totales de los extractos de muicle se comparó (Cuadro 8), con lo reportado por Baqueiro-Peña *et al.*, (2017). Encontrado que los extractos que obtuvieron mayor contenido de polifenoles eran los que contenían como medio de extracción agua empleando ultrasonido, obteniendo valores desde 1.06 ± 0.03 g de equivalentes de ácido gálico/100g de peso seco para hojas frescas, de manera similar el mayor contenido de polifenoles se encontró en los extractos acuosos, que además emplearon temperatura de 55-57 °C (maceración con temperatura (MT/A) y ultrasonido con temperatura UST/A).

Cuadro 8. Contenido de polifenoles totales obtenido en los extractos de *J. spicigera*

Muestra	g Equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g de hoja seca
MT/A	1.993 ± 0.007^{cdefg}
UST/A	1.985 ± 0.025^{cdefg}
US/A	1.486 ± 0.100^{abdefg}
US/AE-5:5	1.183 ± 0.017^{abcefg}
US/AE-7:3	1.742 ± 0.002^{abcdfg}
US/AE-3:7	0.899 ± 0.072^{abcdeg}
US/E	0.146 ± 0.005^{abcdef}

Los valores son medias \pm error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

US = Ultrasonido 30 min a 42 kHz y T=Temperatura de 55-57°C.

7.6 Actividad antioxidante (DPPH)

Se analizó la actividad antioxidante en los extractos de muicle, empleando el método del radical DPPH, se realizó la curva patrón, para estimar la concentración en equivalentes de trolox (TE). En el Cuadro 9, se muestra la actividad antioxidante de los extractos de muicle, comparando estos resultados con lo reportado por Baqueiro-Peña *et al.*, 2017. se encontró que los extractos de hojas secas obtenidos por ultrasonido y con las mezclas de etanol-agua en proporción 50:50 y 70:30 reportaron una mayor actividad

antioxidante, de manera similar en el presente trabajo doctoral se obtuvo una mayor actividad antioxidante con la mezcla etanol-agua en proporción 50:50 y 70:30.

Cuadro 9. Actividad antioxidante (DPPH) de los extractos de muicle.

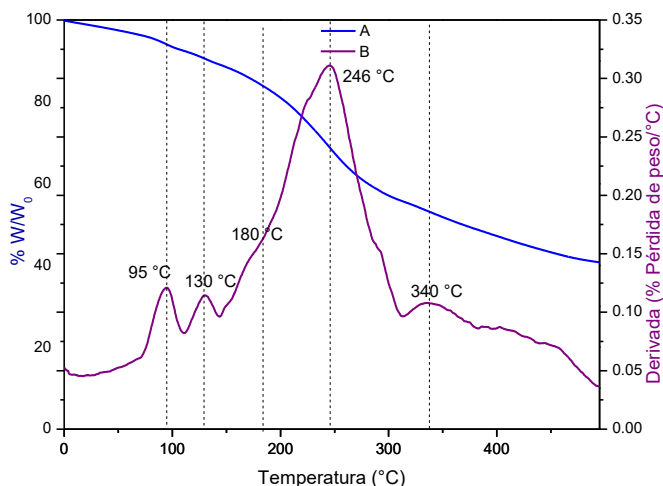
Muestra	mg Equivalentes de Trolox (TE)/100g de hoja seca
MT/A	0.316 ± 0.014 ^{defg}
UST/A	0.335 ± 0.048 ^{defg}
US/A	0.383 ± 0.024 ^{dfg}
US/AE-5:5	0.557 ± 0.029 ^{abcg}
US/AE-7:3	0.454 ± 0.051 ^{abfg}
US/AE-3:7	0.645 ± 0.066 ^{abceg}
US/E	0.050 ± 0.028 ^{abcdef}

Los valores son medias ± error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

US = Ultrasonido 30 min a 42 kHz y T=Temperatura de 55-57°C.

7.7 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es un análisis térmico que se emplea para medir la cantidad y velocidad de cambio en la masa de la muestra en función de temperatura y tiempo. Se utiliza para caracterizar cualquier material que exhiba pérdida de peso o fase, cambios como consecuencia de la descomposición, deshidratación y oxidación (Saadatkhah *et al.*, 2020). En particular, para esta muestra se realizó para determinar los límites de descomposición térmica, en el termograma típico del % de la pérdida de peso (%W/Wo), Figura 9, el perfil cambio de peso con respecto a la temperatura (Curva A), se observan dos etapas de la pérdida que van de 0 °C a 180 °C y de 339 °C a 500 °C. El cambio de pérdida de peso respecto a la temperatura (%W/Wo)/T, mostró la velocidad de la variación de la masa, observándose en la Figura 9 (Curva B), cinco temperaturas: 95 °C, 130 °C, 180 °C, 246 °C y 340 °C. En estudios realizados por Teixeira-Neto *et al.*, 2012, observaron que las antocianinas son muy sensibles al calor y se descomponen incluso a temperaturas de alrededor de 100 °C, por lo que el primer evento de pérdida de peso puede asignarse a este suceso, la pérdida de peso por debajo de los 200°C se debe únicamente al agua adsorbida y por encima de los 200 °C se debe a la presencia de antocianinas intercaladas, que se descomponen por pasos consecutivos de deshidratación y escisión.



Temperatura (°C)	% de Pérdida de peso
95.27	93.99
130.07	90.54
180.17	84.48
246.11	68.65
340.02	52.88

Figura 9. Perfil térmico del extracto seco de muile obtenido por maceración con temperatura, a una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 500 °C.

7.8 Potencial Zeta (ζ) del extracto acuoso de muile

El extracto acuoso de muile obtenido por maceración, mostró un potencial zeta con carga negativa en el rango del pH 1 a 12, a medida que el pH se hace más alcalino, estas partículas tienden a adquirir una carga más negativa y se observa el efecto contrario en los valores de pH ácido (Cuadro 10). En el rango de pH ácido, disminuye la carga negativa, pero jamás se observó la carga positiva característica de las antocianinas en el pH de 1-3, aunque la tonalidad es similar a la que presenta una antocianina en este rango de pH, la sensibilidad al pH es el principal factor limitante en una antocianina, afectando el color, la estructura y la estabilidad química. En soluciones ácidas, la antocianina es roja, por la carga positiva del catión flavilio, pero con el aumento del pH la intensidad de color disminuye y en solución alcalina se obtiene una tonalidad azul (Lopes *et al.*, 2007), una de las posibles razones por las que no se aprecia esta carga positiva es por el gran contenido de polifenoles que presenta este extracto.

La magnitud del potencial zeta da una indicación de la estabilidad potencial de un sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta negativo o positivo, entonces tenderán a repelerse entre sí y no hay tendencia a flocular. Sin embargo, Si las partículas tienen valores de potencial zeta bajos, entonces no hay fuerza para prevenir que las partículas que se unen y floculen. La línea

divisoria general entre las suspensiones estables e inestables generalmente se toman de + 30mV o - 30mV. Partículas con potenciales zeta más positiva que + 30mV o más negativas que -30mV se consideran estables. Razón por la cual una opción para la estabilización por cargas electrostáticas pudiera ser el quitosano (carga positiva) con el extracto colorido de muicle. El quitosano es el único polímero catiónico pseudonatural y, por lo tanto, encuentra muchas aplicaciones que se derivan de su carácter único (Rinaudo, 2006),

Cuadro 10. Potencial zeta del extracto acuso de muicle.

Muestra	ζ (mV)
pH 1	-2.06 ± 1.07
pH 2	-6.81 ± 0.09
pH 3	-6.09 ± 0.42
pH 4	-8.83 ± 0.14
pH 5	-9.53 ± 1.11
pH 6	-11.67 ± 0.96
pH 7	-11.87 ± 0.47
pH 8	-13.90 ± 1.23
pH 9	-16.53 ± 0.55
pH 10	-15.83 ± 0.35
pH 11	-20.00 ± 1.18
pH 12	-20.21 ± 1.23
pH 12.6	-20.77 ± 0.71

7.9 Espectros de absorción UV-Vis a diferente pH

En los espectros de las muestras de muicle a diferentes pH (Figura 10), en la región visible (400-700 nm) se determinó que la longitud de onda en la que la absorbancia es máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) para el pH de 1 a 4 se presenta en 488 nm y para el pH de 5 a 12.6 en la región de 590 nm, comparando estas longitudes de onda con lo reportado por Bruto (1987), él menciona que las antocianinas poseen una máxima absorción de la luz a una longitud de onda entre 465 y 550 nm. Por lo que la muestra de muicle no cumple esas condiciones, debido a la cantidad de polifenoles que presenta en la región de 320 nm. De acuerdo con el fundamento de la metodología de pH diferencial para determinar el contenido de antocianinas monoméricas totales de Giusti *et al.*, 2001, que establece que a pH 1 se presenta un color rojo debido a la presencia de la forma de ion oxonio, de antocianinas mientras que a pH 4.5 se presenta la forma incolora, por lo que el espectro de absorbancia disminuye. La propiedad de cambio de color dependiente del pH de las antocianinas viene de la naturaleza iónica de la antocianina. En general, las antocianinas son rojizas en condiciones ácidas, rosa en condiciones neutras y azul en condiciones básicas (Roy *et al.*,

2021), en la muestra de muicle se observa un comportamiento similar, adquiriendo a pH ácido la tonalidad naranja, aún pH neutro tonalidad rosa y a pH alcalino la muestra adquiere una tonalidad violácea (Figura 11), además en el pH alcalino, se presenta su mayor cromaticidad o expresión de color, por lo que la aplicación del sistema alimenticio ideal estaría en este pH. Para comprobar que efectivamente el extracto acuoso de muicle presentara antocianinas se empleó Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), en la que se observa a 520 nm una señal característica de antocianinas (Anexo 2).

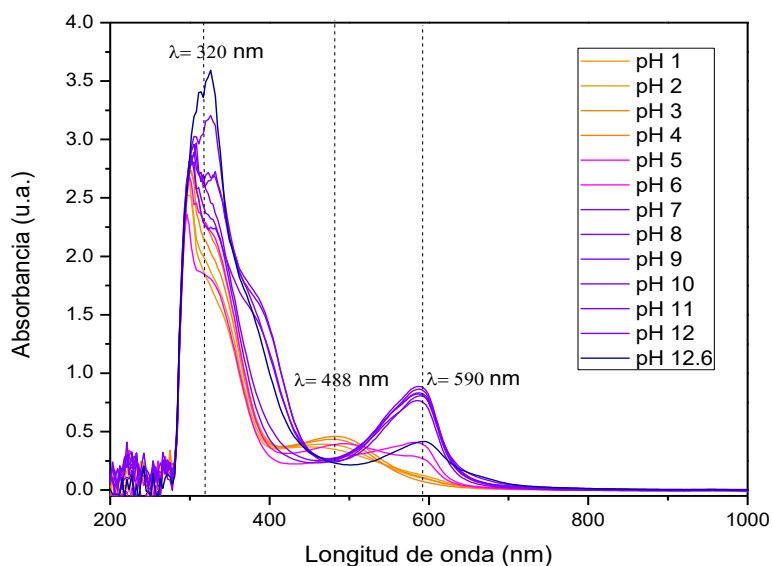


Figura 10. Espectros de absorción en la región UV-Vis de 200 a 1000 nm, del extracto de muicle a diferente pH.



pH = 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 12.6

Figura 11. Tonalidad del extracto acuoso de muicle en diferente pH.

7.10 Espectros de infrarrojo del extracto acuoso de muicle a diferente pH

Se adquirieron los espectros a diferente pH, en una longitud de onda de 4000 a 500 cm^{-1} (Figura 12), y se observaron los mismos grupos funcionales en cada uno de los espectros de infrarrojo, por lo que la estructura de las antocianinas no presenta una degradación por efecto del pH, sino un cambio conformacional en la estructura. Se ha observado que las antocianinas cambian a diferentes pH. Este cambio de color está relacionado con las transformaciones estructurales reversibles como colorimétricas y espectrales (Tang *et al.*, 2019).

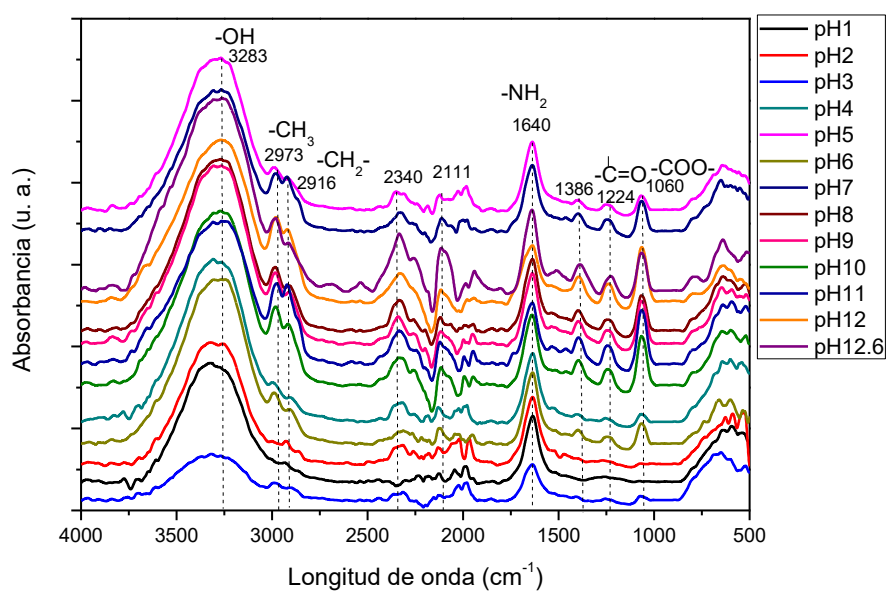


Figura 12. Espectros de Infrarrojo del extracto de muicle a diferente pH, empleando el método de sustracción espectral (eliminación de solventes).

7.11 Aplicación en un sistema alimenticio

7.11.1 Viscoelasticidad de la masa

Las propiedades viscoelásticas influyen en la fabricación de las tortillas en cuanto a los procesos de laminación, corte y conformación. La Figura 13-a presenta los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función de la deformación. Ambos módulos no dependían de la deformación hasta un valor aproximado del 1% de deformación. A valores de deformación más altos, el módulo de almacenamiento G' mostró un comportamiento monótono decreciente, reflejando que la microestructura de la masa se debilitaba a medida que aumentaba la tasa de deformación. Por otro lado, el módulo de pérdida G'' presentó un pequeño rebasamiento de la deformación en el rango de deformación de aproximadamente 3-30%.

En la Figura 13-b, se muestra el efecto del extracto de muicle (EM) en la región viscoelástica lineal. La magnitud de ambos módulos disminuyó con el aumento del contenido de EM. Se ha postulado que los componentes del almidón y los compuestos fenólicos pueden interactuar para formar complejos de inclusión a través de fuertes efectos hidrofóbicos o complejos con una unión mucho más débil a través de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, el resultado de estas interacciones en las propiedades de los alimentos, es decir, la viscoelasticidad de la masa, aún no se comprende del todo y parece depender del tipo y la estructura tanto de los compuestos fenólicos, como de los componentes del almidón (Zhu, 2015; Chávez-Santoscoy *et al.*, 2016), reportaron una tendencia similar a la mostrada en la Figura 23-b para mezclas de extractos de harina de maíz nixtamalizada (NWMF) y frijol negro (*Phaseolus vulgaris*).

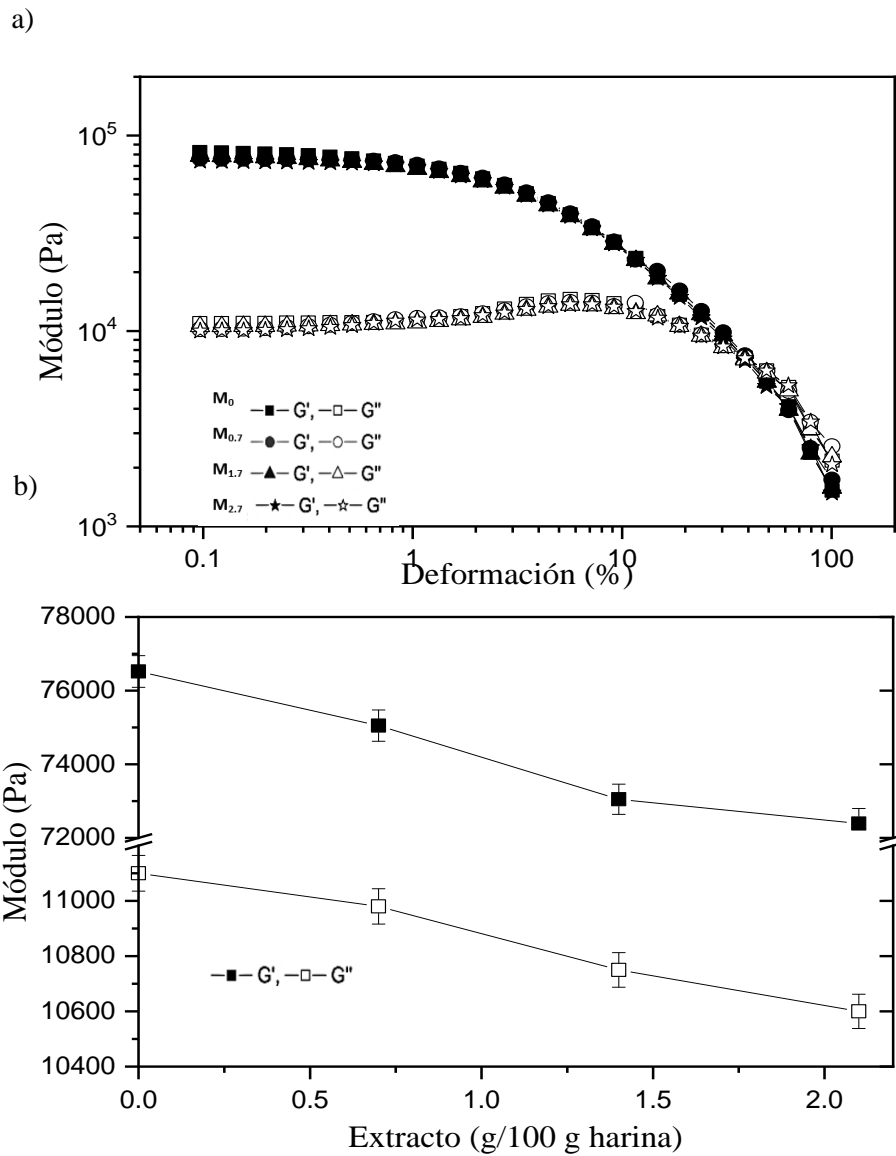


Figura 13. a) Módulos de viscoelasticidad de la masa para las diferentes adiciones de extracto de muicle (EM) y b) Variación de los módulos de viscoelasticidad en la región newtoniana.

7.12 Caracterización de las tortillas adicionadas con EM

7.12.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad de la T_x recién hecha mostró un aumento no significativo a medida que el contenido de EM era mayor. El contenido de humedad (Cuadro 11) osciló entre 48.2 g /100 g para T_0 a 50.4 g/100 g para $T_{2.7}$. Sin embargo, todas las tortillas mostraron una disminución en el contenido de humedad, la disminución del contenido de humedad fue más leve a medida que el contenido de ME era mayor. Así, T_0 experimentó una pérdida de contenido de humedad de aproximadamente 18%, mientras que $T_{2.7}$ sólo de ~13% en 4 d, Vernon-Carter *et al.*, (2020) encontraron resultados y tendencias similares para las tortillas que contienen antocianinas. Los resultados de viscoelasticidad de la masa y del contenido de humedad de las tortillas, sugieren que las interacciones entre polifenoles y los componentes del almidón fueron más probablemente impulsadas por enlace de hidrógeno que por enlace hidrofóbico.

7.12.2 Dureza

La dureza de las variaciones de la tortilla recién preparadas no se afectó significativamente por la adición de EM (Cuadro 11). El valor de la dureza presentó un aumento de T_0 (Control) a $T_{2.7}$. Esto representa que la interacción principal entre los componentes del EM (los polifenoles, antocianinas, etc.) y los componentes de la harina de maíz (el almidón) no son suficientes para cambiar la dureza de las tortillas enriquecidas. Sin embargo, la deformación en el punto de dureza y la extensión máxima después del ciclo de deformación mostraron un aumento importante. La extensión máxima, aumento considerablemente para las tortillas dosificadas con EM. A su vez, este resultado indica que el EM mejoró la elasticidad de las tortillas, efecto que podría atribuirse a las interacciones amilosa-polifenoles que retardan la formación de estructuras de doble hélice (Biliaderis, 1991).

Cuadro 11. Contenido de humedad y parámetros de compresión del primer ciclo en la tortilla

Muestra	Contenido de humedad		Parámetros de compresión		
	(g/100 g) Fresco	(g/100 g) 4 Días	Dureza (N)	Deformación en dureza (mm)	Extensión máxima (mm)
T_0 (Control)	48.2 ± 1.1 ^a	34.6 ± 0.9 ^d	2.48 ± 0.13 ^{ab}	7.71 ± 0.23 ^b	11.25 ± 0.23 ^d
$T_{0.7}$	48.9 ± 1.7 ^a	37.1 ± 1.1 ^c	2.73 ± 0.11 ^a	8.39 ± 0.24 ^a	13.58 ± 0.24 ^c
$T_{1.7}$	49.9 ± 1.8 ^a	40.9 ± 1.2 ^b	2.34 ± 0.09 ^{ab}	8.34 ± 0.33 ^a	14.22 ± 0.33 ^b
$T_{2.7}$	50.4 ± 1.6 ^a	43.8 ± 0.8 ^a	2.81 ± 0.12 ^a	8.67 ± 0.31 ^a	15.11 ± 0.23 ^a

Los valores son medias ± error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

7.12.3 El Color

La Figura 14, presenta imágenes de las variaciones en masa Mx (columna izquierda) y tortilla Tx (columnas central y columnas de la derecha). La primera fila corresponde a los controles M₀ y T₀ controles sin EM, y muestra la expresión de color característica de estos productos. Las filas dos a cuatro, representan M_x y T_x con cantidades crecientes del EM aplicado a diferentes dosis. La masa y las tortillas elaboradas con variedades de maíz azul suelen presentar tonalidades azules/púrpuras (Bello-Perez *et al.*, 2015), mismas que se observaron al adicionar el EM, la intensidad del color fue reforzada por mayores cantidades de adición de EM. El Cuadro 12, presenta los parámetros de color de las variaciones de masa y tortillas en función de los contenidos de EM.

El parámetro de color b* (los valores +b* indican amarillo, y -b* indican azul) mostraron valores cada vez más negativos en las variaciones Mx y Tx que contenían mayores cantidades de EM. Esto es indicativo de que el color tendió a mostrar una tonalidad más azul. Asimismo, el parámetro a* (los valores +a* indican rojo y -a* indican verde), mostró valores positivos significativamente más altos, lo que indica que, a medida que aumenta la concentración de EM, aumentan la tonalidad roja. Como era de esperar, L* (luminosidad) disminuyó al aumentar la concentración de EM. Es interesante notar que el procesamiento térmico al que fue sometida la masa para obtener tortillas produjo una disminución de los valores de los parámetros L* y b* pero aumentó el de a*. Los valores de L* (29-46) presentados por Tx en este trabajo están en el rango de valores reportados para las tortillas de maíz azul (Hernández-Martínez *et al.*, 2016). Sin embargo, los valores reportados por estos autores para tortillas elaboradas con diferentes variedades de maíz azul fueron negativos para a* (indicativo de que tendían a mostrar más tonalidad verde) y valores positivos de b* (indicativo de que tendían a presentar un color amarillo que azul), esto puede ser debido a que en el maíz no solo hay antocianinas, sino también se pueden encontrar carotenoides (caroteno, xantofilas, luteínas y zeaxantina) y su principal aporte en la tonalidad son las notas amarillas (Rouf Shah *et al.*, 2016).

Cuadro 12. Valores colorimétricos de la masa y tortillas de maíz con extracto de muicle.

Muestra	L*	a*	b*
M ₀ (control)	78.68 ± 0.22 ^a	2.65 ± 0.24 ^d	17.63 ± 0.16 ^a
M _{0,7}	54.44 ± 0.14 ^b	10.33 ± 0.37 ^c	-3.63 ± 0.12 ^b
M _{1,7}	43.57 ± 0.24 ^c	13.52 ± 0.36 ^b	-9.65 ± 0.15 ^c
M _{2,7}	34.16 ± 0.54 ^d	16.75 ± 0.43 ^a	-12.67 ± 0.19 ^d
T ₀ (control)	71.64 ± 0.14 ^a	4.20 ± 0.37 ^d	20.29 ± 0.12 ^a
T _{0,7}	48.14 ± 0.24 ^b	10.73 ± 0.36 ^c	-2.37 ± 0.15 ^b
T _{1,7}	36.63 ± 0.54 ^c	13.35 ± 0.43 ^b	-5.77 ± 0.09 ^c
T _{2,7}	29.22 ± 0.57 ^d	17.63 ± 0.41 ^a	-8.29 ± 0.10 ^d

Los valores son la media ± el error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P ≤ 0,05). Mx y Tx denotan respectivamente las variaciones de masa y tortilla, con el subíndice "x" denota la cantidad de extracto de muicle añadida a la harina de maíz blanco nixtamalizado de maíz blanco nixtamalizado (g/100 g d.b).

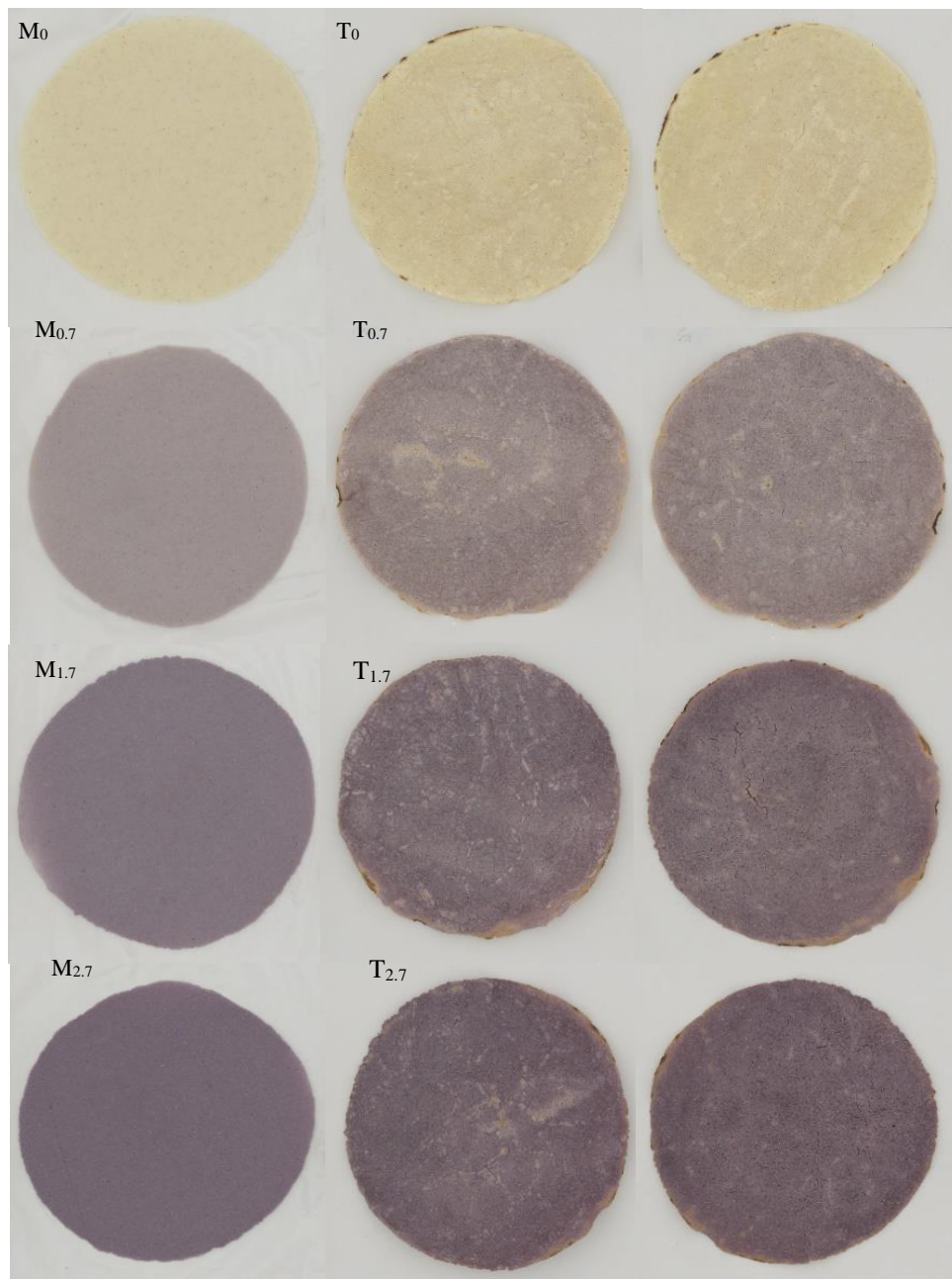


Figura 14. Imágenes de masa y tortilla con diferente contenido de extracto de muicle (EM). Primera columna: variaciones de masa (M_x), segunda y tercera columnas: variaciones de ambos lados de la tortilla (T_x). Primera fila: control sin EM, segunda a cuarta filas: "x" denota los contenidos de EM (0.7, 1.7 y 2.7 g/100 g en base seca) con los que se elaboraron M_x y T_x.

7.12.4 FTIR

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo para cada una de las muestras de tortilla, esto se realizó para observar si existía alguna asociación entre las moléculas de almidón y el pigmento (Figuras 15 y 16). Los espectros FTIR de las variaciones de las tortillas se muestran en la Figura 25, la banda ancha en el rango 3000-3700 cm^{-1} , se atribuye comúnmente al estiramiento del -OH ($\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$) vinculada a los efectos de la hidratación, así como al estiramiento del NH (3280 cm^{-1}) vinculado a los grupos amida A de las proteínas. El pequeño pico a unos 2930 cm^{-1} está vinculado al estiramiento CH y refleja el contenido de complejos de inclusión de amilosa-ácidos grasos y ácidos grasos libres (Flores-Morales *et al.*, 2012). Comercialmente la harina de maíz nixtamalizada contiene $\sim 4,71\%$ de lípidos (Treviño-Mejía *et al.*, 2016) por lo que la formación de complejos en la NWMF es esperable. La banda ancha localizada en el rango 1700-1600 cm^{-1} con un gran pico en torno a 1640 cm^{-1} refleja C=O y suele estar relacionada con el grupo amida I de las proteínas de la masa de maíz (Flores-Morales *et al.*, 2012). La respuesta a $1080\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ refleja el estiramiento de los grupos C-O, C-C y C-H y las vibraciones de flexión del grupo C-O-H. La región $1080\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ ha sido señalada como característica de las estructuras del almidón (Van Soest *et al.*, 1995). La banda a unos 1022 cm^{-1} muestra sensibilidad a las estructuras amorfas. La contribución a 1047 cm^{-1} muestra sensibilidad a las estructuras cristalinas. A este respecto, la relación $1047/1022$ se considera un indicador de estructuras ordenadas en el almidón en relación con las estructuras amorfas (Van Soest *et al.*, 1995). La región cercana a 995 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de flexión del grupo COH que refleja las interacciones entre el agua y el almidón (por ejemplo, los enlaces de hidrógeno) (Van Soest *et al.*, 1995). El Cuadro 13, presenta las relaciones FTIR $995/1022$ y $1047/1022$ obtenidos por deconvolución numérica del espectro en la región del almidón. La relación $995/1022$ mostró un ligero aumento, indicando la mejora de las estructuras de almidón hidratado. Curiosamente, este resultado coincide con el contenido de humedad estimado (Cuadro 11). Por otro lado, la relación $1047/1022$ no mostró variaciones significativas con la adición de EM, lo que sugiere que los componentes del extracto de muicle no tuvieron un efecto apreciable en la estructura cristalina de corto alcance de las cadenas de almidón.

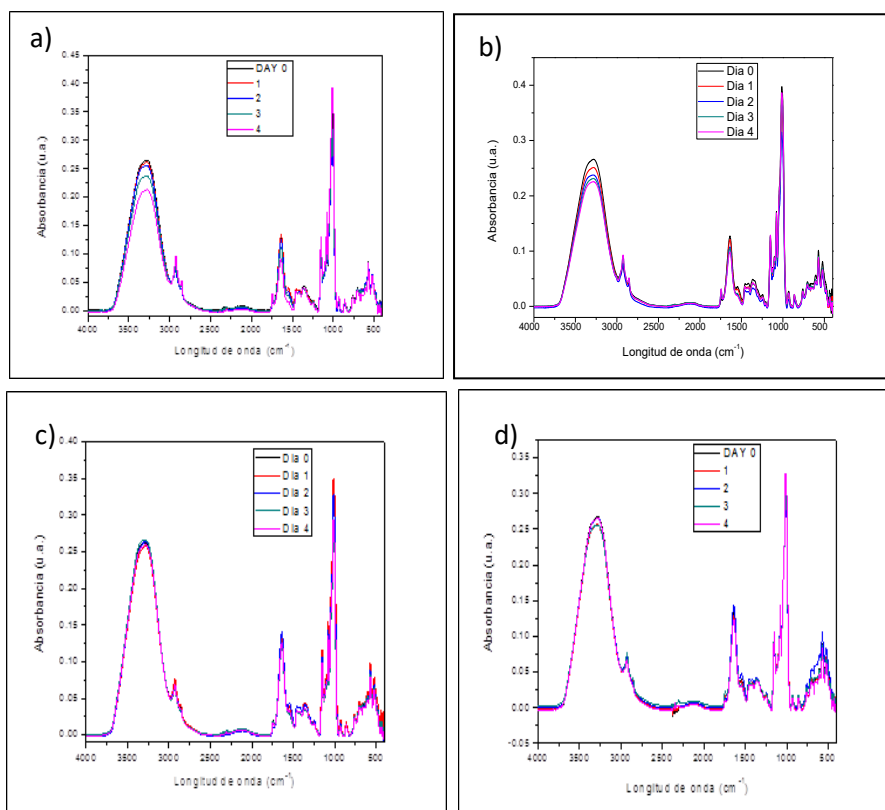


Figura 15.

Espectros de Infrarrojo de las muestras de tortillas: a) T₀, b) T_{0.7}, c) T_{1.7} y d) T_{2.7}, evaluadas a diferentes días de almacenamiento.

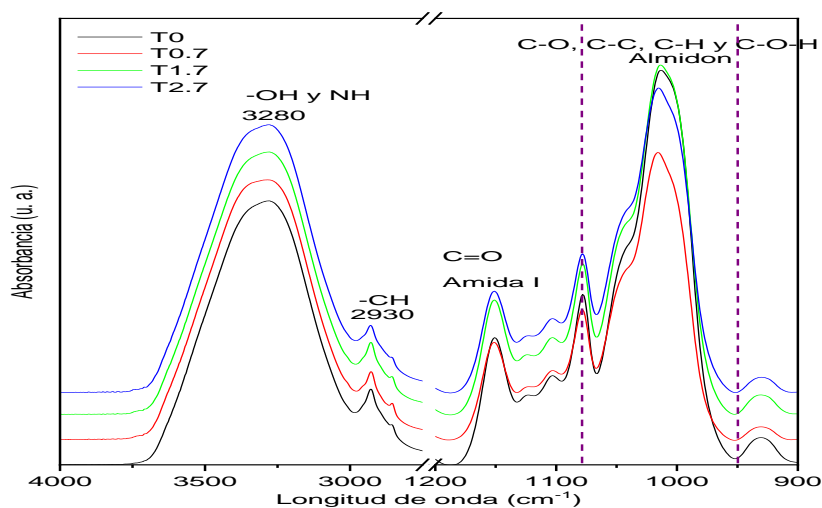


Figura 16. Espectro Infrarrojo (FTIR) de las variaciones de la tortilla con diferentes contenidos de extracto de muñe.

Cuadro 13. Relación por deconvolución de las regiones de los espectros de FTIR

Muestra	995/1022	1047/1022
T₀ (Control)	1.11 ± 0.16 ^{bc}	0.32 ± 0.02 ^a
T_{0.7}	1.17 ± 0.12 ^{ab}	0.36 ± 0.01 ^a
T_{1.7}	1.28 ± 0.09 ^a	0.37 ± 0.02 ^a
T_{2.7}	1.22 ± 0.10 ^a	0.37 ± 0.02 ^a

Los valores son medias ± error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

7.12.5 Polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS)

Los extractos de plantas pueden contener diversos compuestos químicos entre ellos polifenoles y se determinan empleando técnicas analíticas en conjunto como lo son el Contenido de Polifenoles Totales (TPC) y la Actividad antioxidantes con diferentes radicales (ABTS y DPPH), el Cuadro 14 muestra los valores de los polifenoles T_x , así como la actividad antioxidante evaluada bajo condiciones gástricas (pH 2) e intestinal (pH 7). Todos los T_x mostraron un contenido significativamente mayor de TPC y una mayor actividad antioxidante a medida que aumentaba la EM en las tortillas.

El contenido de TPC y la actividad antioxidante ABTS fueron mayores en condiciones intestinales que en condiciones gástricas, mientras que lo contrario ocurrió con la actividad antioxidante DPPH. Las tortillas sin adición de EM tuvieron un contenido significativo de TPC tanto en condiciones gástricas como intestinales. El maíz contiene ácidos fenólicos, entre los que predominan los ácidos ferúlico y p-cumárico, que son muy abundantes en sus formas ligadas (Salinas-Moreno *et al.*, 2017). La liberación de polifenoles fue ~70% mayor en condiciones gástricas y ~36% mayor en condiciones intestinales para $T_{2.7}$ que para T_0 .

El aumento del contenido de polifenoles fue acompañado por un aumento significativo de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante DPPH en condiciones gástricas fueron similares a las reportados por Hernández-Martínez *et al.* (2016) para tortillas de diferentes variedades de granos de maíz azul. Para la tortilla azul naturalmente pigmentada, Camelo-Méndez *et al.* (2016) reportaron valores de actividades ABTS de 13,1 $\mu\text{mol TE/g d.b}$, este resultado sugiere que la incorporación exógena de pigmentos como

el extracto de *J. spicigera*, puede utilizarse para afinar la actividad antioxidante de las tortillas de maíz, recordando que la bioaccesibilidad se considera como la cantidad de polifenoles que están disponibles para su absorción en el intestino delgado (Ahmad *et al.*, 2014).

Cuadro 14. Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante en las muestras de tortilla (T_x).

Muestra	Polifenoles Totales		DPPH		ABTS	
	Polifenoles gástricos (mg de GAE/100 g de base seca)	Polifenoles intestinales (mg de GAE/100 g de base seca)	DPPH gástrico ($\mu\text{mol TE/g}$ de base seca)	DPPH intestinal ($\mu\text{mol TE/g}$ de base seca)	ABTS gástrico ($\mu\text{mol TE/g}$ de base seca)	ABTS intestinal ($\mu\text{mol TE/g}$ de base seca)
T₀ (Control)	45.88 \pm 0.44 ^d	66.31 \pm 0.44 ^d	18.45 \pm 0.44 ^b	12.76 \pm 0.24 ^d	3.94 \pm 0.26 ^{cd}	16.53 \pm 0.32 ^c
T_{0.7}	62.02 \pm 0.91 ^c	77.11 \pm 0.91 ^c	19.09 \pm 0.91 ^b	15.25 \pm 0.37 ^c	4.44 \pm 0.22 ^c	16.10 \pm 0.33 ^{bc}
T_{1.7}	68.52 \pm 0.76 ^b	84.87 \pm 0.76 ^b	19.62 \pm 0.76 ^b	16.87 \pm 0.43 ^{ab}	5.93 \pm 0.19 ^{ab}	17.49 \pm 0.42 ^b
T_{2.7}	78.03 \pm 0.64 ^a	90.67 \pm 0.64 ^a	20.73 \pm 0.64 ^a	17.91 \pm 0.41 ^a	6.82 \pm 0.13 ^a	19.27 \pm 0.35 ^a

Los valores son medias \pm error estándar, de tres repeticiones. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

7.12.6 Digestibilidad del almidón *in vitro*

El almidón total en la tortilla no se vio afectado por la adición del EM (Cuadro 15), y osciló entre 72.24 g /100 g para T_0 y 71.73 g/100g para $T_{2.7}$. La cinética de hidrólisis enzimática de T_x se presenta en la Figura 17, la hidrólisis presentó un patrón de decaimiento exponencial que puede ser modelado por una ecuación exponencial de primer orden. Los valores de la constante de velocidad de hidrólisis estimada y el avance limitante de la hidrólisis se muestran en el siguiente cuadro. La constante de velocidad, así como el porcentaje de hidrólisis limitante fue significativamente mayor a partir de T_0 , fueron menores a medida que se incrementaba el contenido de EM en las tortillas. Esto sugiere que las reacciones amilolíticas fueron más lentas con la presencia de los componentes EM. Como consecuencia, las fracciones digeribles del componente de almidón tendieron a mostrar reducciones significativas. En el Cuadro 15, se puede apreciar que las fracciones RDS y SDS se redujeron de aproximadamente 46,25 y 23,22% en T_0 a aproximadamente 25.24 y 16.48% en $T_{2.7}$, respectivamente.

Esta disminución de las fracciones RDS y SDS se reflejó en un aumento en la fracción RS de aproximadamente 2.06% en T_0 a 30,01 en $T_{2.7}$. (Camelo-Mendez *et al.*, 2016) reportaron tendencias similares para tortillas hechas con harina de maíz azul, hipotetizando que las interacciones antocianinas-

almidón estaban detrás de la reducción de la fracción RDS. (An *et al.*, 2016) informaron que la inhibición de las enzimas es el mecanismo más probable implicado en la reducción de la digestibilidad de las cadenas de almidón por los compuestos fenólicos. (Giuberti *et al.*, 2020) han publicado que la inhibición directa de las enzimas digestivas α -glucosidasas y la formación de complejos de inclusión y no inclusión con el almidón son mecanismos implicados en la modulación de la digestibilidad del almidón por los polifenoles.

Las interacciones de unión entre los compuestos fenólicos y las enzimas libres están implicadas en la inhibición de las enzimas digestivas α -glucosidasas. Estos autores concluyeron que este papel de los compuestos fenólicos en la digestibilidad del almidón es probable que representen una estrategia adecuada para diseñar nuevos alimentos funcionales que disminuyan la digestibilidad del almidón y para el control de la diabetes la diabetes de tipo II.

Ecuación exponencial de primer orden:

$$C(t) = C_{\infty} (1 - \exp(-k_H t))$$

Donde:

$C(t)$ = Almidón hidrolizado total

C_{∞} = Concentración de equilibrio (es decir, limitante)

k_H = La constante de velocidad de hidrólisis.

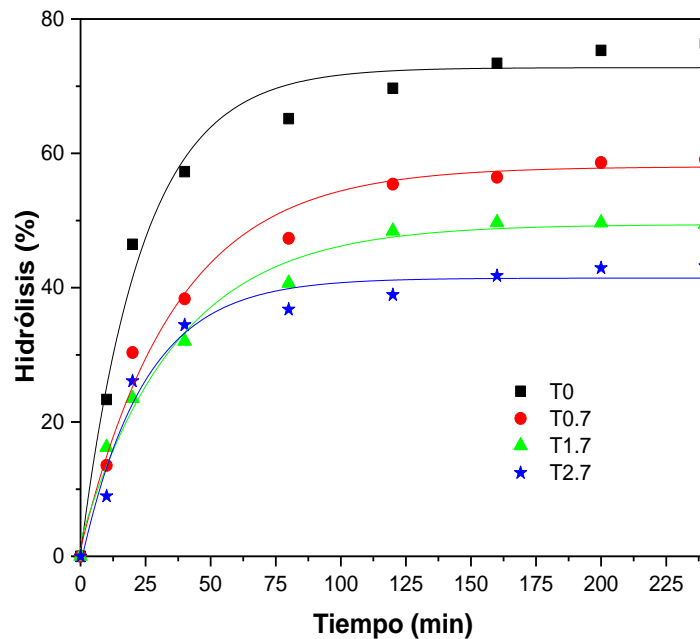


Figura 17. Cinética de hidrólisis enzimática de las variaciones de la tortilla (T_x). La línea continua denota el ajuste por mínimos cuadrados de un modelo de decaimiento exponencial de primer orden.

Cuadro 15. Parámetros cinéticos y fracciones de almidón digerible de las variaciones de la tortilla.

Muestras	$k_H \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$C_\infty \text{ (%)}$	TS (g/100 g)	RDS (%)	SDS (%)
T_0 (Control)	4.19 ± 0.17^a	72.75 ± 2.32^a	72.24 ± 1.54^a	46.45 ± 0.24^a	23.22 ± 0.29^b
$T_{0.7}$	3.75 ± 0.14^b	61.04 ± 2.05^b	71.78 ± 1.72^a	31.32 ± 0.37^b	25.23 ± 0.28^a
$T_{1.7}$	3.02 ± 0.12^c	52.74 ± 1.98^c	72.04 ± 1.33^a	24.41 ± 0.36^c	24.94 ± 0.25^a
$T_{2.7}$	3.26 ± 0.10^{bc}	42.54 ± 1.68^d	71.73 ± 1.15^a	25.24 ± 0.41^c	16.48 ± 0.25^c

Los valores son medias \pm error estándar, de tres réplicas. Los superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

7.12.7 Análisis de componentes principales (PCA) aplicado a (M_x) y (T_x)

Se llevó a cabo este estudio para evaluar la relación que existe entre las variables. el PCA se realizó para cuatro puntuaciones y diecisiete características de la masa y tortilla (Cuadro 16). La Figura 18, muestra la distribución de las puntuaciones y los atributos. El primer componente C1 representa el 58.95% de la varianza total, mientras que el segundo componente C2 representa el 25.58%. Esto indica que muchas variables no son realmente independientes, ya que pueden agruparse en un conjunto limitado de variables principales.

Se puede observar que las puntuaciones de la muestra de tortillas T_x se mueven a lo largo de una línea, lo que sugiere que la adición del extracto de muicle indujo una variación gradual de los atributos de la masa y la tortilla. La puntuación $T_{1,7}$ mostró una fuerte desviación de las otras muestras, lo que indica que la tortilla con el mayor contenido de EM posee características que son significativamente diferentes de las tortillas con las del menor contenido de EM.

En cuanto a los atributos pueden agruparse en cuatro grupos, lo que indica que existen fuertes correlaciones entre las variables agrupadas. Además, los componentes C1 y C3 están alineados en dirección opuesta, lo que significa que las variables contenidas en estos dos clústeres presentan anticorrelaciones. Un patrón similar se observó similar para los componentes C2 y C4. Por otra parte, los componentes C1 y C2 tienen una gran distancia angular, de unos 70-80°, lo que indica que estas variables en el clúster C1 son independientes de las variables en el clúster C2. En este sentido, los atributos de la masa y la tortilla se pueden explicar a partir de las variables contenidas en los clusters C1 y C2 (o también en los clusters C2y C3).

Por ejemplo, el contenido de RDS está fuertemente alineado con los parámetros de color L^* y b^* (cluster C1). Por otro lado, las proporciones FTIR 995/1022 y 1047/1022 están correlacionados con la capacidad antioxidante DPPH y con el parámetro de color a^* (Componente C3). En general, los resultados del PCA mostraron que los atributos de las tortillas añadidas con EM pueden ser de variables experimentales que son relativamente fáciles de cuantificar.

Cuadro 16. Muestras y variables empleadas para el Análisis de Componentes Principales (PCA).

Muestra (T _x)	Variable	Codificación
T ₀	Módulo de almacenamiento (G')	GS
	Módulo de pérdida (G'')	GL
	Humedad	MC
	Dureza	HD
T _{0.7}	Extensión máxima	ME
T _{1.7}	Relación FTIR 995/1022	R995
T _{2.7}	Relación FTIR 1047/1022	R1047
	Parámetros de color	L *, a * y b *
	Polifenoles totales	PH
	Actividad antioxidante en condiciones intestinales	ABTS y DPPH
	Constante de tasa de hidrólisis	KH
	Porcentaje máximo de hidrólisis	MH
	Almidón de digestión rápida y digestión lenta	RDS y SDS

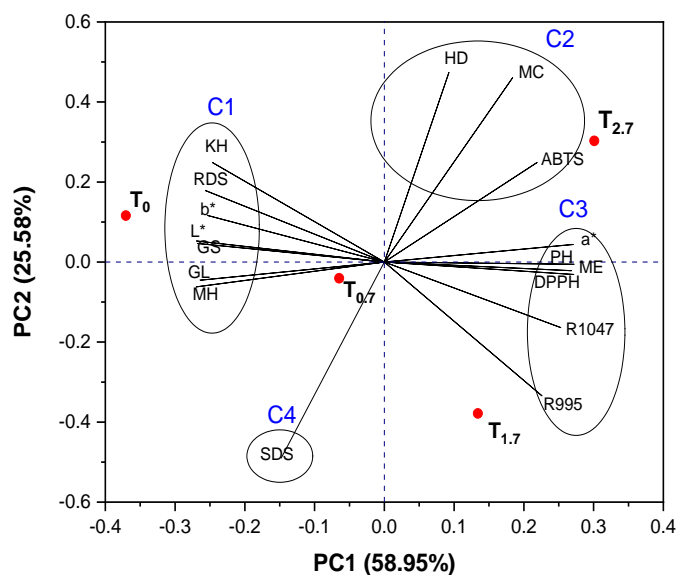


Figura 18. Representación gráfica del análisis de PCA, para las muestras de tortilla (T_x).

8. Conclusiones

Los extractos de muicle en los que se observó una tonalidad violeta fueron aquellos que emplearon solo como medio de extracción agua (espectros de absorción y parámetros de color). Por el contrario, aquellos que utilizaron etanol presentaron el perfil característico de clorofilas, en combinación con la tonalidad violeta. Comparando las metodologías de ultrasonido y maceración, se determinó que el mayor contenido de polifenoles, se presentó en los extractos que empleaban agua como medio de disolución, maceración y temperatura.

Los espectros de absorción de los extractos acuosos de muicle evaluados con diferentes soluciones buffers, se observó que el pigmento violáceo es muy cromático en las soluciones alcalinas, se estima que su mayor estabilidad se presenta en esta región, por lo que la elección del sistema alimentario debería ser más cercano a un pH alcalino, razón por la cual se eligió la tortilla.

La adición del extracto de muicle a la masa de maíz blanco nixtamalizado, tiene un gran potencial para aumentar la capacidad antioxidante de las tortillas bajo condiciones intestinales y gástricas, debido al contenido de polifenoles presentes en el extracto de muicle, así como reducir significativamente las fracciones de almidón digeribles y aumentar la fracción no digerible (almidón resistente). Este estudio permite diseñar alimentos, en los que se puede modular la digestibilidad de las fracciones de almidón y obtener tortillas que imitan el color de las tortillas de maíz azul al adicionar el extracto de muicle.

La combinación de un alimento básico y el extracto acuoso de muicle empleado en la medicina tradicional, es un enfoque innovador para promover la ingesta sistemática de productos alimenticios saludables a bajo costo, como lo es la tortilla adicionada con extracto de muicle, siendo este alimento base del consumo en la población mexicana.

Referencias bibliográficas

Acuerdo, por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación publicado el 16 de Julio de 2012.

Aguilera O. M., Reza V., Chew M. M. & Mea V. J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 8 (2): 16–22.

Ahmad, H., Canovas, J., Barrajon-Catalan, E., Carreres, J. E., Vicente, V., & Garcia- Perez, J. V. (2014). Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6190–6198. <https://doi.org/10.1021/jf501414h>.

Alvarez-Ramirez, J., Escarela-Perez, R., Vernon-Carter, E. J., & Carrillo-Navas, H. (2019). Large amplitude oscillatory shear (Laos) rheology of nixtamalized corn masa. *Journal of Cereal Science*, 88, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.05.004>.

Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., & Tringali, C. (2004). Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar Nerello Mascalese'. *Food chemistry*, 88(4), 599-607.

An, J. S., Bae, I. Y., Han, S. I., Lee, S. J., & Lee, H. G. (2016). *In vitro* potential of phenolic phytochemicals from black rice on starch digestibility and rheological behaviors. *Journal of Cereal Science*, 70, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.010>.

Arleo Capovilla, M. (2015). Detección y cuantificación de organismos genéticamente modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados, mediante análisis molecular. Tesis para obtener el grado de biotecnología, Universidad de la República.

Awad, N. E., Abdelkawy, M. A., Hamed, M. A., Souleman, A. M., Abdelrahman, E. H., & Ramadan, N. S. (2015). Antioxidant and hepatoprotective effects of Justicia spicigera ethyl acetate fraction and characterization of its anthocyanin content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8), 91-96.

Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 401-414.

Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). Physicochemical and antioxidant characterization of *Justicia spicigera*. *Food chemistry*, 218, 305-312.

Bello-Pérez, L. A., Flores-Silva, P. C., Camelo-Méndez, G. A., Paredes-López, O., & Figueroa-Cárdenas, J. D. D. (2015). Effect of the nixtamalization process on the dietary fiber content, starch digestibility, and antioxidant capacity of blue maize tortilla. *Cereal Chemistry*, 92, 265–270. <https://doi.org/10.1094/cchem-06-14-0139-R>.

Biliaderis, C. G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1), 60–78. <https://doi.org/10.1139/y91-011>.

Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554-560.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Camelo-Méndez, G. A., Agama-Acevedo, E., Sanchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. A. (2016). Effect on in vitro starch digestibility of Mexican blue maize anthocyanins. *Food Chemistry*, 211, 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.024>.

Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2015) Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 9. pp. 25-33.

Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., & Perez-Carrillo, E. (2016). Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. *Food Chemistry*, 192, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.113>.

Cid-Ortega, S., Monroy-Rivera, JA & González-Ríos, Ó. (2021). Extraction of Kaempferitrin and Astragalín from *Justicia Spicigera* by Supercritical Fluid Extraction and Its Comparison with Conventional Extraction. *Journal of Food Engineering and Technology*, 10 (2), 35-44.

Clark M. (2011). *Handbook of Textile and Industrial Dyeing. Applications of Dyes*, 2(8): 293. Woodhead Publishing. Online version available at:

<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHTIDVAD1/handbook-textile-industrial/handbook-textile-industrial>

Corrêa, G. M., & Alcântara, A. F. D. C. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(1), 220-238.

Cuevas M., Antezana A., & Winterhalter P. (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. Memorias del Encuentro Final Alfa Lagrotech, Cartagena, Colombia, 21-26.

Del Carpio Jiménez, C., Serrano Flores, C., & Giusti, M. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 76-86.

Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum arabic–chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313-1318.

Espinosa-Morales, Y., Reyes, J., Hermosín, B., & Azamar-Barrios, J. (2012). Characterization of a Natural Dye by Spectroscopic and Chromatographic Techniques. *MRS Proceedings*, 1374, 49-59. doi:10.1557/opl.2012.1377.

Farrás J., García J. & Urpi F. (2000). *Química orgánica estructura y reactividad*, Tomo 2. Editorial Reverté. Barcelona. Pág. 774.

Fennema O., Damodaran S. & Parkin K. (2000). *Química de los alimentos*, 2da edición. Editorial Acribia. Zaragoza. Págs. 807-817.

Flores-Morales, A., Jiménez-Estrada, M., & Mora-Escobedo, R. (2012). Determination of the structural changes by FT-IR, Raman, and CP/MAS13C NMR spectroscopy on retrograded starch of maize tortillas. *Carbohydrate Polymers*, 87, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.011>.

Garzón G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3): 27-36.

Gitelson, A. A., Merzlyak, M. N., & Chivkunova, O. B. (2001). Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry and photobiology*, 74(1), 38-45.

Giuberti, G., Rocchetti, G., & Lucini, L. (2020). Interactions between phenolic compounds, amyolytic enzymes and starch: An updated overview. *Current Opinion in Food Science*, 312, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.003>

Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry* (pp. F.1.2.1–F.1.2.13). New York: John Wiley and Sons Inc.

Giusti M. M. y Wrolstad R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.

Goñi, I., García-Alonso, A., & Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17, 427–437. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00010-9).

Gould K., Davies K. M. y Winefield C. (2008). *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Springer Science & Business Media. Págs. 108, 109, 179, 284 y 288.

Gonzalez, M., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J., Reyes, I., & Alvarez-Poblano, L. (2020). Effect of the drying temperature on color, antioxidant activity and in vitro digestibility of green pea (*Pisum sativum* L.) flour. *Starch-Stärke*, 72(9-10), 1900228.

Herrera-Sotero, M. Y., Cruz-Hernández, C. D., Trujillo-Carretero, C., Rodríguez-Dorantes, M., García-Galindo, H. S., Chávez-Servia, J. L., ... & Guzmán-Gerónimo, R. I. (2017). Antioxidant and antiproliferative activity of blue corn and tortilla from native maize. *Chemistry Central Journal*, *11*(1), 1-8.

Hernández-Jaimes, C., Utrilla-Coello, R. G., Carrillo-Navas, H., García-Márquez, E., Meraz, M., Bello-Pérez, L. A., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Corn starch acid hydrolysis at the onset gelatinization temperature: Morphology, crystallinity, viscoelasticity, and thermal properties. *Starch-Stärke*, *66*(7-8), 636-644.

Hernández-Martínez, V., Salinas-Moreno, Y., Ramírez-Díaz, J. L., Vázquez-Carrillo, G., Domínguez-López, A., & Ramírez-Romero, A. G. (2016). Color, phenolic composition and antioxidant activity of blue tortillas from Mexican maize races. *CyTA - Journal of Food*, *14*, 473-481. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1136842>.

Humphrey, A. M. (1980). Chlorophyll. *Food Chemistry*, *5*(1), 57-67.

Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, *197*, 1280-1285.

Kang, M. K., Li, J., Kim, J. L., Gong, J. H., Kwak, S. N., Park, J. H. Y., ... & Kang, Y. H. (2012). Purple corn anthocyanins inhibit diabetes-associated glomerular monocyte activation and macrophage infiltration. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *303*(7), F1060-F1069.

Lee, DW (2002). Antocianinas en hojas: distribución, filogenia y desarrollo. *Advances in Botanical Research*, *37*, 37-53. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)37042-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37042-3).

Lock S. O. (1997). Colorantes naturales. 1ra. Edición. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica de Perú. Págs. 95-103.

Lopes T., Xavier M., Quadri M. G., & Quadri, M. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology*, *13*(3): 291-

297.

Miller, R., Owens, S. J., & Rørslett, B. (2011). Plants and colour: flowers and pollination. *Optics & Laser Technology*, 43(2), 282-294

Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L.A. et al. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol*, 143(2), 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>

Palta, J. P. (1990). Leaf chlorophyll content. *Remote sensing reviews*, 5(1), 207-213.

Pavón-García, L. M. A., Pérez-Alonso, C., Orozco-Villafuerte, J., Pimentel-González, D. J., Rodríguez-Huezo, M. E., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Storage stability of the natural colourant from *Justicia spicigera* microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying. *International journal of food science & technology*, 46(7), 1428-1437.

Petroni, K., Pilu, R., & Tonelli, C. (2014). Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. *Planta*, 240(5), 901-911.

Pozo-Insfran, D. D., Serna Saldivar, S. O., Brenes, C. H., & Talcott, S. T. (2007). Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chemistry*, 84(2), 162-168.

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 and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division pp. 25, 28 y 29.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.

Román-Guerrero A. (2012). Estudio cinético termodinámico de la interacción intermolecular de antocianinas con goma de mezquite y sus fracciones. Tesis para obtener el grado de Doctora en Biotecnología. UAM-I, Pág. 38.

Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995.

Roy, S., & Rhim, J. W. (2021). Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(14), 2297-2325.

Saadatkah, N., Carillo Garcia, A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., ... & Chaouki, J. (2020). Experimental methods in chemical engineering: thermogravimetric analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 34-43.

Salinas-Moreno, Y., García-Salinas, C., Ramírez-Díaz, J. L., & Alemán-de la Torre, I. (2017). Phenolic compounds in maize grains and its nixtamalized products. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic compounds - natural sources, importance and applications* (pp. 215–232).

Salinas Moreno, Y., García Salinas, C., Coutiño Estrada, B., & Vidal Martínez, V. A. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista fitotecnica mexicana*, 36, 285-294.

Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., & Pintado, M. E. (2017). Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(14), 3072-3083.

Simas Frauches, N., Montenegro, J., Amaral, T., Abreu, J. P., Laiber, G., Junior, J., ... & Teodoro, A. J. (2021). Antiproliferative activity on human colon adenocarcinoma cells and in vitro antioxidant effect of anthocyanin-rich extracts from peels of species of the myrtaceae family. *Molecules*, 26(3), 564.

Singlenton V., Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdiphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144- 158.

Tang, B., He, Y., Liu, J., Zhang, J., Li, J., Zhou, J., ... & Wang, X. (2019). Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. *Dyes and Pigments*, 170, 107643.

Teixeira-Neto, Â. A., Izumi, C. M., Temperini, M. L., Ferreira, A. M. D. C., & Constantino, V. R. (2012). Hybrid materials based on smectite clays and nutraceutical anthocyanins from the Açaí fruit. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012(32), 5411-5420.

Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D. A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., & Loarca- Piña, G. (2016). Fortification of commercial nixtamalized maize (*Zea mays* L.) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) increased the nutritional and nutraceutical content of tortillas without modifying sensory properties. *Journal of Food Quality*, 39, 569–579. <https://doi.org/10.1111/jfq.12251>.

Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., & Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food research international*, 35(4), 351-356.

Tulio Jr, A. Z., Reese, R. N., Wyzgoski, F. J., Rinaldi, P. L., Fu, R., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (2008). Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1880-1888.

van Soest, J. J. G., Tournois, H., de Wit, D., & Vliegthart, J. F. G. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 279, 201–214. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00270-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00270-7)

Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L. A., Gonzalez, M., Reyes, I., & Alvarez-Poblano, L. (2020). Supplementing white maize masa with anthocyanins: Effects on masa rheology and on the in vitro digestibility and hardness of tortillas. *Journal of Cereal Science*, 91, Article 102883. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102883>.

Vernon-Carter, E.J., Gómez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., & Moreno-Terrazas, R.C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin – in – water

emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies* 27: 625-641

Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food research international*, 51(1), 303-309.

Yang, Z. W., Tang, C. E., Zhang, J. L., Zhou, Q., & Zhang, Z. C. (2019). Stability and antioxidant activity of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8) subjected to simulated in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2604-2614.

Zhao, X., Corrales, M., Zhang, C., Hu, X., Ma, Y., & Tauscher, B. (2008). Composition and thermal stability of anthocyanins from Chinese purple corn (*Zea mays* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10761-10766

Zhu, F. (2015). Interactions between starch and phenolic compound. *Trends in Food Science & Technology*, 43, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.003>.

Anexo 1. Nomenclaturas descritas en la tesis.

Nomenclatura	Descripción
EM	Extracto de muicle, obtenido por maceración empleando agua y temperatura
NWMF	Harina de maíz nixtamalizada
M _x	variaciones de masa donde "x" corresponde al contenido de EM en NWMF en base seca.
T _x	variaciones de tortilla donde "x" corresponde al contenido de EM en NWMF en base seca.
TPC	Contenido de Polifenoles Totales
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
RDS	Almidón de digestión rápida
SDS	Almidón de digestión lenta
TS	Almidón resistente
PCA	Análisis de Componentes Principales
L* a* b* y C*	Parámetros de color
ABTS y DPPH	Técnicas analíticas que emplean radicales ABTS* y DPPH* para la determinación de la actividad antioxidante

Anexo 2. Cromatogramas obtenidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

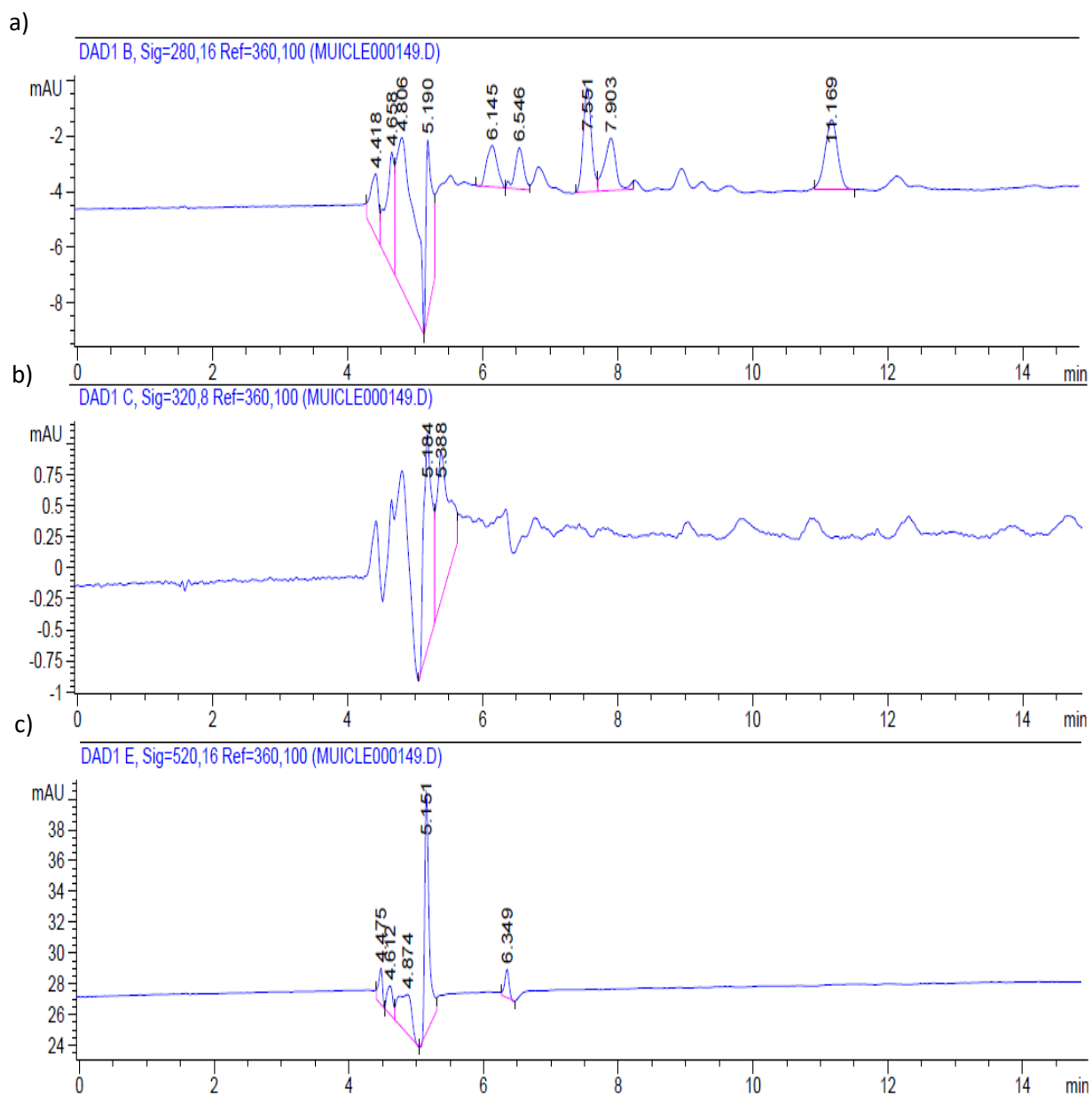
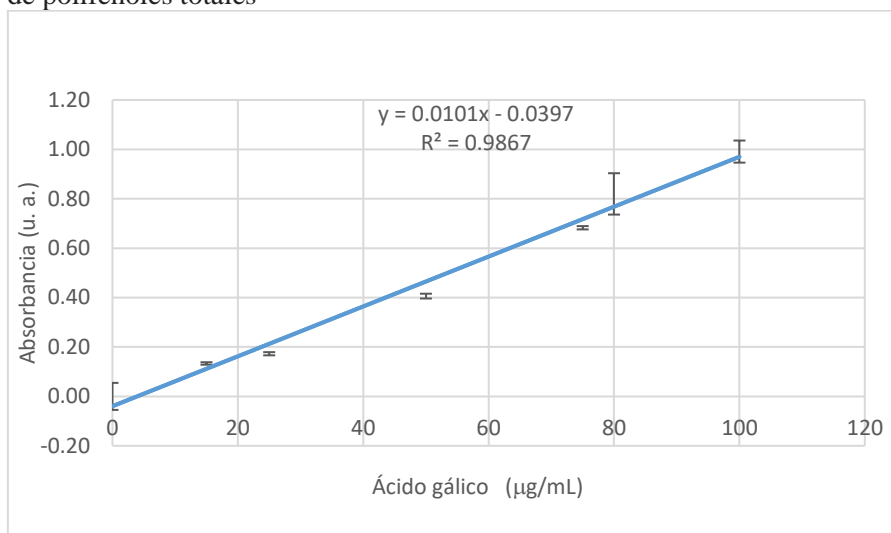


Figura 1. Cromatogramas del extracto de muicle a distintas longitudes de onda: a) 280 nm, b) 320 nm y c) 520 nm.

Anexo 3. Curva patrón de polifenoles totales y radical DPPH

Curva patrón de polifenoles totales



De la curva patrón se obtuvo por regresión lineal el modelo matemático $y = 0.0101x - 0.0397$ con un ajuste (R^2) del 0.9867. Se empleó la siguiente relación:

$$\text{Equivalentes de ácido gálico (GAE)} \frac{\text{mg}}{100\text{g}} = \left(\frac{\text{Absorbancia} + 0.0397}{0.0101} \right) / 1000) * DF * 25 * mf$$

Donde:

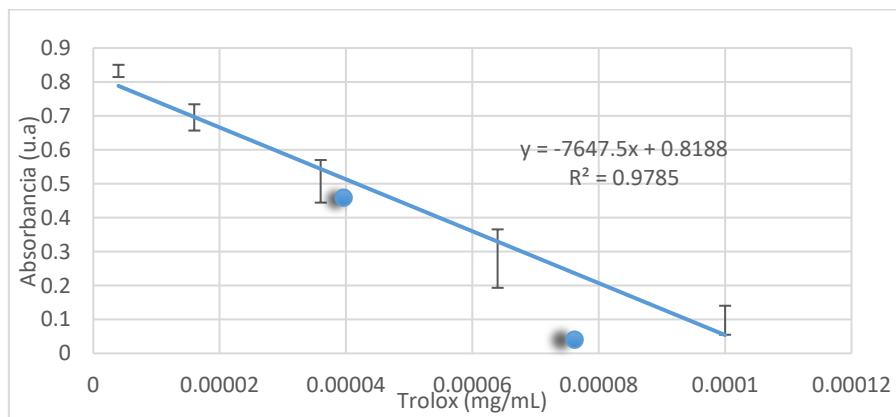
1000 = factor de conversión de μg a mg

DF = factor de dilución de la muestra

mf = g de H_2O de la hoja/ g peso seco (0.91)

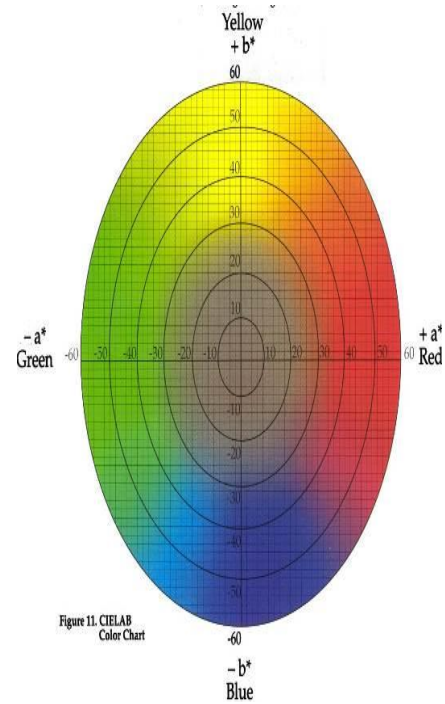
25 = mL de la disolución (g hojas/mL disolvente)

Curva Patrón de equivalentes de Trolox de actividad antioxidante para el radical DPPH.



Anexo 4. Definiciones de los parámetros de color.

a*,b*	Representan los colores o tonos.	
(a,0)	Rango de tonos	
	Rojos: +a* (valores positivos)	
	Verdes: -a* (valores negativos)	
(b,0)	Rango de tonos	
	Amarillos: +b* (valores positivos)	
	Azules: -b* (valores negativos)	
L*	Luminosidad de la muestra	
	(L=0) Negro, (L=100) Blanco.	
	Entre más grandes son los valores de L, la muestra es más clara, o más blanca (en muestras opacas leídas en reflectancia).	
C*	Define la Intensidad de color, el color con cromas mayor es más intenso, vivido o fuerte.	$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$
ΔE^*_{ab}	La diferencia de color ΔE^*_{ab} en unidades de espacio de color $L^*a^*b^*$, indica el grado de diferencia contra el estándar, pero no la dirección; es decir hacia rojos a*, amarillos b*, azules -b* y verdes -a*.	$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$



% de fuerza aparente Calcula la fuerza de coloración de un colorante.

La fuerza aparente se calcula mediante la suma de los valores de K/S o absorbancia en todo el espectro de 400 a 700 nm.

Reflectancia (muestras opacas)

$$\% \text{ int. aparent.} = \frac{\sum_{i=400}^{n=700} \frac{k}{s} \text{ Muestra}}{\sum_{i=400}^{n=700} \frac{k}{s} \text{ Estandar}} \times 100$$

Transmitancia (muestras traslúcidas)

$$\% \text{ int. aparent.} = \frac{\sum_{i=400}^{n=700} \text{ Abs Muestra}}{\sum_{i=400}^{n=700} \text{ Abs Estandar}} \times 100$$

Anexo 5. Lista de productos obtenidos

Publicación obtenida de la tesis

Alvarez-Poblano, L., Roman-Guerrero, A., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2020). Exogenous addition of muicle (*Justicia spicigera Schechtendal*) extract to white maize tortillas affects the antioxidant activity, texture, color, and *in vitro* starch digestibility. *LWT*, *133*, 110120.

Participación en publicaciones

Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L. A., Gonzalez, M., Reyes, I., & Alvarez-Poblano, L. (2020). Supplementing white maize masa with anthocyanins: Effects on masa rheology and on the *in vitro* digestibility and hardness of tortillas. *Journal of Cereal Science*, *91*, 102883.

Gonzalez, M., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J., Reyes, I., & Alvarez-Poblano, L. (2020). Effect of the drying temperature on color, antioxidant activity and *in vitro* digestibility of green pea (*Pisum sativum L.*) flour. *Starch-Stärke*, *72*(9-10), 1900228.

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)



Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Lurdes Adriana Álvarez-Poblano, Jaime Vernon-Carter

Por la presentación del trabajo:

CARACTERIZACIÓN DEL COLOR DE LOS EXTRACTOS DE MUILLE (JUSTICIA SPICIGERA)

ID: 813

Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera
PRESIDENTE DEL AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Huatulco, Oaxaca, México 7 al 10 de Mayo de 2019



Otorga la presente

CONSTANCIA

A la: M.C. Lurdes Adriana Álvarez Poblano

Por su participación como evaluadora de los proyectos finales de la asignatura de Taller de Investigación II en el evento "Scientific Parade". del P.E. de la Ingeniería en Industrias Alimentarias, que se llevo a cabo el 19 de mayo.

"Forjando destinos, construyendo futuro."



Instituto Tecnológico
Superior del Oriente
del Estado de Hidalgo
Dirección General

Mtro. Justo Juan Manuel Martínez Licona
Director General

Apan, Hgo a 19 de mayo del 2021



Agente Capacitador Externo Reconocido por
la Secretaría del Trabajo y Previsión Social
Número de Registro STPS: ITS020624FY8-0013

Dependencia: Instituto Tecnológico Superior
del Oriente del Estado de Hidalgo
No. de Constancia: 017/2021 #FormatoElectrónico

Fecha de expedición del diploma: 19 de mayo del 2021

Expide: ITESA, APAN

Duración: 2 hrs

Objetivo: Participar como evaluador de los proyectos finales
desarrollados y presentados por estudiantes de la Ingeniería en
Industrias Alimentarias en la asignatura de Taller de Investigación II.



SERVICIOS DE EXTENSIÓN



Otorga la presente

CONSTANCIA

A la: M. B. Lurdes Adriana Álvarez Poblano

Por impartir la conferencia “Empleo de colorantes naturales en los alimentos” en el marco del evento Encuentro Internacional Tendencias de la Ingeniería en la Industria Alimentaria, en el contexto del COVID-19 que se llevó a cabo del 15 al 17 de Julio .

“Forjando destinos, construyendo futuros”

Mtro. Justo Juan Manuel Martínez Licona
Director General



Apan, Hgo a 17 de julio del 2020.



Agente Capacitador Externo Reconocido por
la Secretaría del Trabajo y Previsión Social
Número de Registro STPS: ITS020624FY8-0013



Dependencia: Instituto Tecnológico Superior
del Oriente del Estado de Hidalgo
No. de Constancia: 081/2020 #formatoElectrónico

SERVICIOS DE EXTENSIÓN

Fecha de expedición del diploma: 17 julio del 2020
Lugar: Plataforma Google Meet

Expide: ITESA, APAN

Objetivo.-Intercambio de conocimientos entre investigadores, docentes, estudiantes, y el sector productivo acerca de las nuevas tendencias de la ingeniería en la industria alimentaria para fortalecer la formación académica de los estudiantes, así como los vínculos de colaboración entre los investigadores de distintas instituciones educativas y el sector productivo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00263

Matrícula: 2153804152

Caracterización fisicoquímica del extracto de muicle (*Justicia Spicigera* Schechtendal) y su adición exógena en un sistema alimentario (tortilla de maíz)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 28 del mes de abril del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO
DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA



LURDES ADRIANA ALVAREZ POBLANO
ALUMNA

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

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: LURDES ADRIANA ALVAREZ POBLANO

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

Aprobar

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO

VOCAL

DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA

SECRETARIO

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA