



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Unidad Iztapalapa

**UTILIZACIÓN DE MAÍZ PIGMENTADO
PARA LA ELABORACION DE UN
ALIMENTO FUNCIONAL**

TESIS

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

Presenta

I.B.I. Carlos Jiménez Pérez

Asesores

Dr. Gerardo Ramírez Romero

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

México D.F., Septiembre 2014





Esta Tesis fue elaborada en el Departamento de Biotecnología de la
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Fue desarrollada gracias al apoyo del ICyT/SECITI del Distrito Federal.



Dedicatoria

A mi mamá gracias por tu apoyo, confianza, motivación pero sobre todo el amor que me has brindado durante este camino. Gracias por enseñarme a superarme cada día, pero sin duda mi alegría más grande es tener el orgullo de ser tu hijo. Este trabajo es el fruto del esfuerzo que durante estos años hemos hecho tú y yo, el logro es de los dos.

A mis hermanos Lucy, Beto y Fredy que sin su apoyo y motivación no podría disfrutar el éxito, ya que este lo hemos logrado juntos.

A Elisa que después de tantos años seguimos aprendiendo juntos, pero sobre todo a la confianza y apoyo que me has brindado siempre.

A mis amigos pero en especial a Daniel, Liliana, Gerardo y Ruth que siempre han estado ahí cuando más los he necesitado y me han brindado el apoyo, motivación, pero sobre todo los grandes momentos de diversión.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio, Verónica, Abigail, Claudia, Azucena, Zaira, Ana por su apoyo y los grandes momentos que hemos pasado.



Agradecimientos

Dr. Gerardo por darme su apoyo y confianza pero sobre todo su amistad durante mi desarrollo profesional, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y permitirme desarrollar este proyecto del cual me enamore, y sobre todo compartir conmigo sus experiencias ya que he aprendido mucho de ellas.

Dra. Alma gracias por su tiempo para darme las asesorías que me permitieron desarrollar de la mejor manera este proyecto.

Les agradezco por ayudarme a concluir esta nueva etapa en mi vida, para poder seguir superándome profesionalmente.

Dra. Hirán por su apoyo y motivación que me ha brindado desde que inicie a involucrarme en los proyectos con los maíces pigmentados, ya que sin él no estaría en este punto de mi vida profesional.





Resumen

En la actualidad hay una tendencia de los consumidores hacia alimentos que además de su valor nutritivo ofrezcan un beneficio a la salud, el aumento en la demanda de estos productos ha llevado a desarrollar nuevas tecnologías para adicionarles componentes bioactivos que aporten un beneficio al organismo humano, a estos productos alimenticios se les ha llamado alimentos funcionales (AF). El objetivo del presente trabajo fue la elaboración de un AF a base de maíz pigmentado, para ello se nixtamalizó y fermentó masa de maíz de color azul empleando *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* GG que son microorganismos probióticos, y finalmente fue saborizado con pulpa de fruta la cual aportará vitaminas y minerales. Se evaluó la viabilidad de los probióticos en el AF y se cuantificó su potencial nutracéutico.

Los resultados a las 60 horas de fermentación mostraron concentraciones de 10^8 UFC/g_{masa} para los dos probióticos y fue hasta después de 30 días de ser almacenada en refrigeración que se observó disminución de un orden de magnitud en la concentración de los lactobacilos, llegando a 10^7 UFC/g_{masa}. En el AF con pulpa de guayaba hubo una conservación de la viabilidad de los lactobacilos a los 15 días de ser almacenada con una concentración de 10^7 UFC/g_{AF} mientras que al adicionar pulpa de tamarindo esto no ocurrió, probablemente el reducido valor de pH obtenido en el alimento tuvo una influencia negativa sobre la sobrevivencia de ambos microorganismos.

Al determinar la concentración de los compuestos nutracéuticos en el AF se observó que, el formulado con la pulpa de tamarindo presentó una disminución del 50% en la actividad antioxidante en relación al del maíz pigmentado, en tanto que con pulpa de guayaba hubo un incremento del 250% de la actividad antioxidante, esto se debe a que la guayaba presenta compuestos fenólicos en alta concentración.

Los resultados obtenidos muestran que es posible generar una masa fermentada con propiedades antioxidantes y función probiótica, que puede ser de interés para la industria alimentaria por su potencial para integrarse en formulaciones atractivas para la población e incluso apoya la producción de los maíces pigmentados que tienen un mercado y uso reducido en la actualidad.



Abstract

At present there is a tendency of consumers towards food who addition have nutritional value provide a benefit to health, the increase in demand for these products has led to development of new technologies to add bioactive compounds that are beneficial to organism, these foodstuffs have been called functional foods (FF). The aim of this work was the development of a FF based on pigmented corn, for this was nixtamalized and fermented corn dough blue using *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus rhamnosus* GG that are probiotic microorganisms, and was finally was flavored using fruit pulp that provide vitamins and minerals. The viability of the probiotic was evaluated in the FF and was quantified his nutraceutical potential.

The results at 60 hours of fermentation showed concentrations of 10^8 CFU/g_{masa} for both probiotics and was up after 30 days of being stored at refrigeration was observed decreasing one order of magnitude in the concentration of the lactobacilli, reaching 10^7 UFC/g_{masa}. In the FF with guava pulp there was a conservation of viability of lactobacilli at 15 days of stored with a concentration of 10^7 CFU /g_{FF}, while to adding with tamarind pulp this did not happen, probably the reduced pH value obtained in the feed had a negative influence on the survival of both microorganisms.

In determining the concentration of nutraceuticals in the FF was observed that, the formulated with tamarind pulp presented a 50% decrease in antioxidant activity compared to the pigmented maize, whereas with guava pulp there was an increase of 250% of the antioxidant activity, this is because the guava has a high concentration of phenolics compounds.

The results show that it is possible to generate dough fermented with properties antioxidants and probiotic function, which may be of interest to the food industry for its potential to integrated into attractive formulations for the population and even supports the production of pigment maize they have a limited market and use at present.



Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Índice de cuadros.....	v
Índice de figuras	v
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	2
2.1 Alimento Funcional.....	2
2.2 Probióticos.....	4
2.3 Compuestos bioactivos.....	6
2.3.1 Antioxidantes.....	6
2.3.2 Compuestos fenólicos	8
2.3.3 Antocianinas	9
2.3.4 Relación entre los compuestos fenólicos y los probióticos	10
2.4 Maíces pigmentados.....	11
2.5 Alimentos fermentados.....	14
2.6 Saborizantes en los alimentos	14
2.6.1 Edulcorantes.....	16
3 Justificación	17
4 Hipótesis	17
5 Objetivo General.....	18
5.1 Objetivos Particulares.....	18
6 Materiales y Métodos.....	19
6.1 Material biológico y químico	19
6.2 Elaboración de masa de maíz pigmentado.....	19
6.2.1 Tratamientos térmicos a la masa	20
6.3 Fermentación de la masa de maíz pigmentado nixtamalizada	21
6.3.1 Pre activación de las bacterias probióticas	21
6.3.2 Inoculación de la masa y evaluación de la viabilidad de los probióticos	21
6.4 Elaboración del alimento funcional.....	22
6.4.1 Elaboración de la pulpa de tamarindo	22



6.4.2 Elaboración de la pulpa de guayaba.....	22
6.4.3 Formulación del alimento funcional.....	23
6.5 Evaluación de los compuestos nutraceuticos	23
6.5.1 Preparación de las muestras	23
6.5.2 Extracción de los compuestos fenólicos.....	23
6.5.3 Cuantificación de fenoles totales	24
6.5.4 Cuantificación de antocianinas totales	24
6.5.5 Determinación de la actividad antioxidante	25
7 Resultados y discusión.....	26
7.1 Obtención de masa de maíz pigmentado nixtamalizado	26
7.1.1 Tratamientos térmicos a la masa	26
7.2 Preparación del inóculo de las bacterias ácido lácticas (BAL).....	28
7.3 Fermentación de la masa	29
7.4 Análisis fisicoquímico de la masa fermentada y viabilidad de las BAL.....	31
7.5 Formulación del alimento funcional.....	33
7.5.1 Integración de la pulpa de tamarindo	33
7.5.2 Propiedades fisicoquímicas del alimento funcional.....	33
7.5.3 Viabilidad de los probióticos en el alimento funcional	34
7.6 Evaluación del potencial nutraceutico del alimento funcional con pulpa de tamarindo. ...	35
7.6.1 Cuantificación de fenoles totales	35
7.6.2 Cuantificación de antocianinas totales	36
7.6.3 Determinación de la actividad antioxidante	37
7.7 Formulación del alimento funcional con pulpa de guayaba	38
7.7.1 Integración de la pulpa de guayaba	38
7.7.2 Viabilidad de los probióticos en el alimento funcional	39
7.7.3 Evaluación del potencial nutraceutico del alimento funcional con pulpa de guayaba....	40
8 Conclusiones.....	42
9 Bibliografía.....	43
10 Apéndice	47
10.1 Curva de ácido gálico	47



Índice de cuadros

Cuadro 1 Ejemplo de Alimentos Funcionales.....	3
Cuadro 2 Microorganismos utilizados como probióticos.	5
Cuadro 3 Compuestos antioxidantes presentes en los alimentos.....	7
Cuadro 4 Ejemplos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos	8
Cuadro 5 Composición nutrimental del maíz azul*	12
Cuadro 6 Composición nutrimental del tamarindo*	15
Cuadro 7 Composición nutrimental de la guayaba*	15
Cuadro 8 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de pulpa de tamarindo y el edulcorante.....	33
Cuadro 9 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de la masa fermentada con la pulpa de tamarindo para formular el alimento funcional.....	34
Cuadro 10 Cuantificación de la viabilidad de los Lactobacilos en las diferentes mezclas de la masa fermentada y la pulpa de tamarindo para formular el alimento funcional.....	35
Cuadro 11 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de la pulpa de guayaba y el edulcorante.....	38
Cuadro 12 Cuantificación de la viabilidad de los Lactobacilos en el alimento funcional formulado con las diferentes mezclas de la masa fermentada y pulpa de guayaba	39

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismo de reacción de reducción de radical DPPH.....	7
Figura 2 Ejemplo de estructuras de compuestos fenólicos	9
Figura 3 Mecanismo de reacción de compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	9
Figura 4 Estructura y grupos sustituyentes de las Antocianinas.....	10
Figura 5 Variedad de maíces pigmentados	11
Figura 6 Masa obtenida al utilizar un frasco de vidrio	26
Figura 7 Masa obtenida al utiliza matraz Erlenmeyer.....	26
Figura 8 Contaminación presente en la masa pasteurizada	27
Figura 9 Crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> en diferentes medios de cultivo. *Medio específico descrito por Escamilla-Hurtado et al. (2005).....	28
Figura 10 Crecimiento de <i>L. rhamnosus GG</i> en diferentes medios de cultivo. *Medio específico descrito por Escamilla-Hurtado et al. (2005).....	28
Figura 11 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con <i>P. pentosaceus</i> pre activado en medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble.....	29
Figura 12 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con <i>L. rhamnosus GG</i> pre activado en medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble.....	29
Figura 13 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con <i>L. casei Shirota</i> pre activado con medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble	30



Figura 14 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con <i>L. rhamnosus GG</i> pre activado en medio MRS adicionado con almidón soluble	30
Figura 15 Masa fermentada empacada en bolsa sellada al vacío.....	31
Figura 16 Cuantificación de bacterias viables de <i>L. casei Shirota</i> en la masa fermentada almacenada 30 días en refrigeración a 4°C	32
Figura 17 Cuantificación de bacterias viables de <i>L. rhamnosus GG</i> en la masa fermentada almacenada 30 días en refrigeración a 4°C	32
Figura 18 Concentración de fenoles totales (FT) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), las masas fermentadas con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo	36
Figura 19 Concentración de antocianinas totales (AT) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), las masas fermentadas con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo	37
Figura 20 Porcentaje de la actividad antioxidante (AA) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), la masa fermentada con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo	38
Figura 21 Concentración de fenoles totales (FT) en alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo y de guayaba	40
Figura 22 Concentración de antocianinas totales (AT) en el alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo y de guayaba	41
Figura 23 Porcentaje de la actividad antioxidante (AA) en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo y de guayaba	41



1 Introducción

En México uno de los problemas actuales son los malos hábitos en la alimentación y en consecuencia se tiene una mala nutrición, la cual, provoca enfermedades y un aumento de obesidad en la población, por lo que hay una tendencia de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo de nuevas tecnologías en la industria alimenticia para la producción de los alimentos funcionales (AF) (Alvídrez-Morales *et al.*, 2002).

En la elaboración de los AF es importante la utilización de productos naturales los cuales contienen componentes bioactivos como los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante presentes en los maíces pigmentados, así como la adición de probióticos que son microorganismos vivos que al ingerirse proporcionan un beneficio al organismo, como el mejorar la función inmunológica, reduciendo así las infecciones gastrointestinales al impedir el crecimiento y colonización de bacterias patógenas, por otro lado la adición de pulpa de fruta la cual le proporcionan sabor y aroma agradable, y en particular, las frutas contienen azúcares simples, como fructosa, sacarosa y glucosa, que se caracterizan por su fácil digestión y rápida absorción, además de aportar fibras, vitaminas, minerales y proteínas y por último la utilización de edulcorantes no calóricos como la estevia que es de origen natural, los cuales le confieren un sabor dulce similar al del azúcar pero sin el aporte calórico.



2 Antecedentes

2.1 Alimento Funcional

La primera reseña histórica del uso de los alimentos funcionales (AF) viene de Japón donde en la década de los 80's y gracias a la ayuda del gobierno de ese país se comenzó la investigación y se propuso el término de alimentos saludables para uso específico, en inglés Foods for Special Health Use (FOSHU). Este concepto expone por primera vez la existencia de "alimentos con efecto específico sobre la salud" y en consecuencia, la población se puede beneficiar de su consumo. La expansión de los AF fue inmediata alcanzando una gran popularidad en otros países donde su demanda se ha incrementado.

La definición de alimento funcional más aceptado hasta el momento es la emitida por el ILSI (International Life Sciences Institute) como "aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y que sus efectos positivos justifican que pueden reivindicar sus características funcionales o incluso saludables" (Ramos *et al.*, 2008).

Un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural.
- Un alimento al que se le ha agregado o eliminado un componente por alguna tecnología o biotecnología.
- Un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes ha sido variada.
- Un alimento en el cual la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada.
- Cualquier combinación de las anteriores posibilidades.

En resumen, un AF (Cuadro 1), es aquel que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un beneficio adicional a la salud.



El desarrollo de AF está asociado en gran parte con:

- La identificación y caracterización de compuestos bioactivos, de su biodisponibilidad.
- El entendimiento científico de cómo se modulan procesos biológicos involucrados en la salud.

Cuadro 1 Ejemplo de Alimentos Funcionales.

ALIMENTO FUNCIONAL	COMPONENTE BIOACTIVO	PROPIEDAD FUNCIONAL
Yogures	probióticos	Mejora de funcionamiento intestinal y el equilibrio microbiano intestinal
Soya, espinacas y alfalfa	saponinas	Disminuyen el colesterol sanguíneo y poseen actividad anticancerígena.
Margarinas	Esteroles y estanoles de origen vegetal añadidos	Reducen niveles de colesterol LDL Disminuyen el riesgo de padecer afecciones cardiacas.
Maíces pigmentados y amaranto	fenoles, antocianinas y flavonoides	Prevención de colesterolemía, cáncer y envejecimiento celular
Huevos ricos en ácidos grasos esenciales omega-3	Ácidos grasos omega-3	Control de hipertensión, metabolismo de lípidos



2.2 Probióticos

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Füller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto benéfico para el huésped. Finalmente, Guaner y Schaafsma en 1989 acuñaron el término probiótico para aquellos microorganismos con actividad benéfica en el huésped (Vrese y Schrezenmeir, 2008).

En el 2001 Simmering y Blaut definieron a los probióticos como “organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al hospedero mejorando la microbiota intestinal”. Los efectos positivos de los probióticos dependen de la cepa bacteriana que se utiliza, de la existencia de un tipo o más bacterias y de su interacción, del tipo de producto en el que se incluyen, del tiempo de consumo del producto, de la genética propia del individuo, de la existencia o no de una patología, y de la dosis suministrada. Una concentración mínima en el intervalo de 10^9 - 10^8 UFC/g o mL de producto asegura la función probiótica, ya que si se tiene una concentración menor o igual a 10^6 UFC, el probiótico es incapaz de ejercer su beneficio a la salud (Gómez *et al.*, 2008).

Existen diferentes tipos de microorganismos utilizados como probióticos (Cuadro 2), sin embargo los más utilizados son las bacterias ácido lácticas (BAL) que son gram-positivos, y aunque prefieren las condiciones anaerobias son aerotolerantes, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos, produciendo ácido láctico como producto principal. Los géneros más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Bifidobacterium*. Las BAL se dividen generalmente en dos grupos de acuerdo a la forma de metabolizar los carbohidratos, las homofermentativas y las heterofermentativas. El grupo homofermentativo formado por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y varios *Lactobacillus* utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (glucolítica) para transformar una fuente de carbono principalmente en ácido láctico, mientras que las heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO_2 , etanol o acetato a través de la vía de la fosfocetolasa, entre las bacterias de este grupo se incluyen *Leuconostoc*, *Weisella* y algunos *Lactobacillus* (Ranadheera *et al.*, 2010).



Cuadro 2 Microorganismos utilizados como probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Otros microorganismos
<i>L. acidophilus</i> LA-5	<i>B. animalis</i> DN 173 010	<i>Streptococcus salvarius subsp. thermophilus</i>
<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>B. animalis subsp. lactis</i> Bd-21	<i>Lactococcus lactis</i> L1A
<i>L. casei</i> DN-114 001	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i>
<i>L. casei</i> CRL431	<i>B. infantis</i> HN019 (DR10)	<i>Enterococcus</i> LAB SF 68
<i>L. casei</i> F19	<i>B. longum</i> BB536	<i>Pediococcus acidolactici</i>
<i>L. casei</i> Shirota	<i>B. animalis</i> DN 173 010	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. johnsonii</i> La1 (Lj1)	<i>B. animalis subsp. lactis</i> Bd-21	<i>Streptococcus salvarius subsp. thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i> 299V		
<i>L. reuteri</i> ATTC 55730		

Los probióticos se utilizan en alimentos, especialmente en productos lácteos fermentados, siendo probablemente el yogurt el más utilizado, también en el queso y otros derivados de la leche. El consumo de probióticos puede ayudar a nuestro organismo a fortalecerse o a combatir algunas enfermedades. Estos son algunos de sus beneficios en el humano (Vrese y Schrezenmeir, 2008):

- Producen enzimas digestivas muy importantes como la β -galactosidasa la cual a su vez alivia la intolerancia a la lactosa en el intestino delgado.
- Generan un efecto antagónico en contra de diarrea infecciosa, que es causada por antibióticos.
- Disminuyen el colesterol por asimilación, modifican la actividad hidrolasa de las sales biliares y tienen efecto antioxidante.
- Mantienen la integridad de las mucosas, aumentan la movilidad del intestino aliviando el estreñimiento.
- Reducen las reacciones alérgicas inflamatorias.



- Efectos anticancerígenos en el colon.
- Refuerza el sistema inmunológico de respuesta inespecífica, incrementa la actividad fagocítica de células blancas, induce la síntesis de citocinas, incrementa la actividad lítica de las células, aumenta los niveles de inmunoglobulinas.
- Ayudan a controlar enfermedades urinarias en mujeres.
- Disminuyen el pH intestinal y destruyen las sustancias tóxicas.
- Producen compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) que inhiben a los microorganismos patógenos.

2.3 Compuestos bioactivos

2.3.1 Antioxidantes

Son sustancias sintéticas o naturales que previenen la oxidación o inhiben reacciones promovidas por oxígeno y peróxidos. Muchas de estas sustancias son utilizadas como conservadores de varios productos para evitar su deterioro. Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo. Ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o neutralizando los producidos en el cuerpo (Serrano-Maldonado, 2010). Por definición la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa, en general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto, los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y algunos aminoácidos.

El uso de antioxidantes naturales, como aditivos alimentarios para la inactivación de radicales libres tiene relevancia actual, no solo por las propiedades reductoras, sino porque son naturales y el consumidor los aprecia en el cuadro 3 se presentan ejemplos de compuestos antioxidantes y su fuente alimenticia.



2.3.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o fenoles son sustancias orgánicas que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo. Los fenoles agrupan un amplio intervalo de sustancias (Cuadro 4) que difieren en el número de átomos de carbono, en el número de grupos sustituyentes y posición del grupo hidroxilo (Figura 2). Los fenoles se consideran antioxidantes fuertes y secuestradores de radicales libres que inhiben la oxidación de lípidos, ya que interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con los radicales libres, quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno. El consumo promedio de fenoles al día es de un gramo, siendo las principales fuentes las frutas, diferentes tipos de té y café, además de encontrarse en cereales, legumbres y vegetales (Pérez-Lara, 2011).

Cuadro 4 Ejemplos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos

COMPUESTO FENOLICO	FUENTE ALIMENTARIA
Antocianinas	Fresas, ciruelas, maíz azul y rojo, uvas, berenjenas, rábano
Neohesperidina	Naranja
Oleuropeína	Aceitunas
Eugenol	Plátanos
Tirosol	Aceite de oliva
Lignano	Semillas de ajonjolí, centeno, brócoli, calabaza, soya y algunas bayas

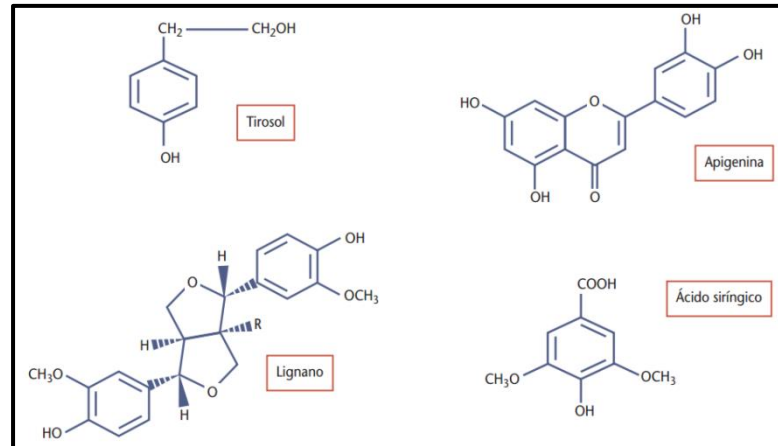


Figura 2 Ejemplo de estructuras de compuestos fenólicos

El método descrito por Singleton *et al.*, (1999) mide el total de fenoles (compuestos fenólicos) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), dichos compuestos reaccionan con el reactivo bajo condiciones alcalinas (Figura 3), por lo que la disociación de protones fenólicos da lugar a un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo de FC, así forma un complejo azul entre el fenolato y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico.

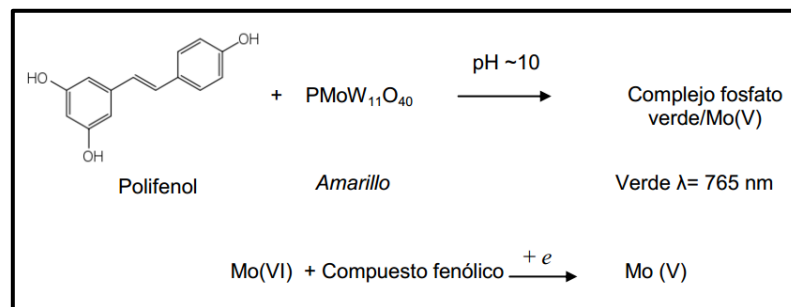


Figura 3 Mecanismo de reacción de compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu.

2.3.3 Antocianinas

Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, su fórmula básica está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos en su forma natural, esta estructura se encuentra esterificada a uno o varios azúcares, el color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula (Figura 4). Si en la molécula existe además del azúcar un radical acilo, entonces son antocianinas aciladas, en pH ácido las antocianinas son muy estables, pero esta estabilidad se reduce cuando el pH se aproxima a la neutralidad, llegando a destruirse completamente con pH superior a siete (Salinas Moreno *et al.*, 2003).



Además de encontrarse en frutos rojos, el maíz pigmentado también es fuente de antocianinas, al respecto Salinas Moreno *et al.*, (2005) realizaron extracciones de antocianinas en diferentes granos de maíces pigmentados reportando entre ocho y 10 diferentes antocianinas, de las cuales identificaron cinco tipos por la presencia de diferentes grupos sustituyentes (Figura 4) dentro de las cuales se halla en mayor proporción el grupo de cianidina 3-glucosido; están presentes también la pelargonidina 3-glucosido y peonidina 3-glucosido.

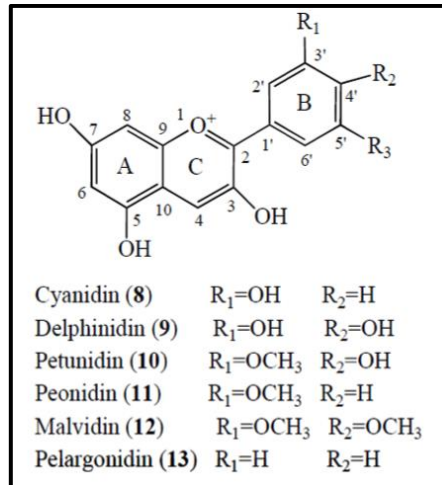


Figura 4 Estructura y grupos sustituyentes de las Antocianinas.

2.3.4 Relación entre los compuestos fenólicos y los probióticos

Distintos autores han sugerido que algunos compuestos fenólicos se comportan como activadores o en ocasiones como inhibidores de crecimiento dependiendo de su estructura química y su concentración. García-Ruiz *et al.*, (2007) encontraron que si la concentración de compuestos fenólicos es ≥ 500 mg/L el efecto es tóxico en el crecimiento microbiano, mientras que si la concentración está entre 100-250 mg/L, los microorganismos los toleraron e incluso los metabolizan.

En el estudio realizado por Lee *et al.*, (2006) se encontró que el crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Streptococcus typhimurium* se inhiben con la presencia de compuestos fenólicos del té y particularmente por sus metabolitos aromáticos. Evaluaron diferentes bacterias probióticas, y en particular los cultivos de *Lactobacillus casei* Shirota no sufrieron inhibición de crecimiento en la presencia de compuestos fenólicos. Por lo que el autor considera que es posible que las bacterias de la flora intestinal hayan desarrollado una mejor tolerancia a estos compuestos.



En el estudio de Parkar *et al.*, (2008) determinaron que *Lactobacillus rhamnosus* es menos sensible a los fenoles, ya que la concentración mínima para inhibirlo fue de 125 µg/mL de fenoles mientras que en el caso de patógenos como *S. typhimurium* o *E. coli* son inhibidos en concentraciones entre 8-16 veces menores al del lactobacilo, con lo que concluyen que su viabilidad no se ve afectada por los fenoles.

2.4 Maíces pigmentados

Desde su domesticación en Mesoamérica, el maíz ha sido de gran importancia, en el México antiguo fue utilizado como sustento, también en la religión y el arte. Actualmente es uno de los más importante de los granos básicos producidos en el país; en el 2010 se registró una producción de 23 millones de toneladas de maíz de las cuales el 99.5% de esta producción se comercializó en el mercado en forma de grano de maíz de color amarillo o blanco y solo el 0.5 en grano de maíz pigmentado (Agropecuarias, 2013), en México se encuentra una de las diversidades genéticas de maíz más grandes a nivel mundial, considerando 59 razas ordenadas en cuatro grupos y algunos subgrupos de acuerdo a la similitud de sus características morfológicas, isoenzimáticas y climáticas del sitio de colecta (Sánchez, 2011), muchas de las cuales corresponden a variantes de grano pigmentado con coloraciones que van desde el negro hasta el rosa pálido (Figura 5). Espinosa Trujillo *et al.*, (2006) caracterizaron fenotípicamente 114 poblaciones de maíces de los Valles Altos Centrales de México reportando 6 grupos de colores de grano: blanco (28 poblaciones), amarillo (44), anaranjado (4), rojo (5), azul (18) y púrpura (5).

Los colores que presentan los maíces se deben a las antocianinas que se ubican en el pericarpio, en la capa aleurona o en ambos, y se ha evidenciado que estos maíces tienen propiedades nutraceuticas por la presencia de las antocianinas y fenoles, es decir que además de aportar nutrientes (Cuadro 5), ayudan a prevenir enfermedades (Beltran *et al.*, 2001).



Figura 5 Variedad de maíces pigmentados



Cuadro 5 Composición nutrimental del maíz azul*

Proteínas (g) 8.0	Saturados (g) 0.40	Sodio (mg) 1.0
Carbohidratos (g) 75.8	Monoinsaturados (g) 1.1	Hierro (mg) 2.5
Ác. Tartárico (g) 0.0	Poliinsaturados (g) 2.3	Vitaminas del complejo B
Vitamina A eq. (µg) 5.0	Minerales	Rivoflavina (mg) 0.10
Vitamina C (mg) 0.0	Potasio (mg) 284	Tiamina (mg) 0.43
Grasas (g) 4.3	Fósforo (mg)	Niacina (mg) 1.9

* 100 g de porción comestible; Fuente: (FAO/Latin Foods, 2013).

Por otra parte Salinas Moreno *et al.* (2012) cuantificaron las antocianinas totales (AT) en variedades de maíces pigmentados de Chiapas reportando concentraciones entre 276.8-904 mg/Kg en maíz azul y 64.7-547.7 mg/Kg en maíz rojo; así como una actividad antioxidante (AA) reportada en porcentaje de inhibición del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) entre el 72.2-86.5% en maíz azul y del 23-89.5% en maíz rojo, por otra parte Morán-Bañuelos *et al.*, (2012) reportaron concentraciones de 718.12-448.39 en maíz rojo y de 616.95-516.26 mg/Kg en maíz azul de maíces pigmentados del Distrito Federal.

Mora-Rochin *et al.* (2010) determinaron el contenido de fenoles totales (FT) reportado en miligramos de equivalentes de ácido gálico (mg EAG), cuantificando 142.1 mg EAG/100g en el maíz azul y 140.7 mg EAG/100g en el maíz rojo, asimismo resaltan la necesidad de ampliar las investigaciones al respecto.

El uso de maíces pigmentados es básicamente en alimentos tradicionales como elotes cocidos, tortillas y antojitos hechos con la masa obtenida después de nixtamalizarlo, también se utilizan para la elaboración de bebidas fermentadas de maíz como el pozol y el tesgüino.

La nixtamalización es el proceso en el que el grano de maíz se cuece en una solución alcalina, normalmente se utiliza hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) al 2% y agua a 90°C. Una vez que se mezclan el maíz, la cal y el agua, se tiene un periodo de reposo de entre 12 y 24 horas. Durante el reposo, el grano de maíz se hidrata y se suaviza el pericarpio. Al mismo tiempo, se controla la actividad microbiana al tener un valor de pH entre 10.5-11.6, se desnaturalizan las proteínas y el almidón se gelatiniza parcialmente (Viniegra, 2009).

Durante el proceso de nixtamalización, parte de la cal se absorbe sobre todo en el germen del grano y éste se hincha debido al efecto combinado de la gelatinización del almidón, la degradación parcial de la estructura del endospermo y la solubilización parcial de la pared celular y de la matriz proteica. Cuando el grano nixtamalizado es lavado, se logra la remoción del pericarpio, así como la eliminación del exceso de cal y de partes externas del grano como germen, endospermo y pedicelo.



Beneficios de la nixtamalización:

- Aumenta la cantidad de fibra, que ha sido reconocida como un componente importante y altamente deseable en los alimentos, ya que ejerce diversas funciones fisiológicas asociadas a la salud.
- No altera el valor de la calidad de la proteína del maíz, la cual es baja.
- Minimiza la pérdida de nutrimentos.

La nixtamalización se emplea principalmente para la elaboración de tortillas, tostadas y botanas entre otros productos elaborados con masa.

En el suelo de conservación del Distrito Federal, existen aproximadamente 28,599 hectáreas de uso agrícola y agroforestal, una gran proporción de ellas dedicada al cultivo de razas de maíz pigmentado, el cual tiene un uso exclusivo de autoconsumo y en una proporción muy baja para su venta local en la comunidad. Ante ello, resulta indispensable el estudio de los potenciales nutritivos y nutracéuticos de este material biológico para ampliar su limitado ámbito de uso, comercialización y transformación. La información científica generada con el desarrollo del presente proyecto ofrecerá alternativas para la transformación y comercialización del maíz pigmentado, de modo que se amplíen su mercado, se fomente su cultivo y se aprovechen los potenciales del producto.

Por lo que se ha propuesto potenciar su uso con la elaboración de productos de maíz pigmentado fermentado con BAL como una alternativa alimenticia con valor agregado, ya que en la cocina tradicional mesoamericana existe una gran variedad de productos basados en este proceso y que pueden dar pauta a productos comerciales. La Universidad Autónoma Metropolitana solicitó la patente de un producto derivado del maíz, en la que se describe la elaboración de una papilla a base de maíz nixtamalizado que se fermenta con BAL en condiciones específicas, y se formuló para dar una consistencia semi-sólida fina, presenta un agradable aroma y sabor a mezclas de maíz y leche fermentada, esta papilla con un aromatizante natural puede ser usada como materia prima, como espesante o saborizante. Por otro lado Domínguez y Schätzthauer (2005) desarrollaron una bebida fermentada a base de maíz utilizando bacterias probióticas.



2.5 Alimentos fermentados

Son aquellos que han estado sujetos a la acción de microorganismos para obtener cambios bioquímicos deseables y modificaciones en sus propiedades organolépticas y de calidad. Desde la época antigua, uno de los objetivos de fermentar los alimentos ha sido el enriquecer la dieta a través del desarrollo de una diversidad de sabores, aromas y texturas, también el conservarlos con la producción de ácido láctico, acético y alcohol.

El maíz fue la base de la alimentación de todos los pueblos mesoamericanos. Con él preparaban atoles, masas, tortillas, tamales y bebidas refrescantes, y algunos pueblos los fermentaban, aumentando la variedad de sabores y productos. Los pueblos que vivían en las zonas desérticas y semidesérticas aprovecharon diversas especies de maguey para proveerse de materiales útiles y alimentos, como el pulque.

En México se han mantenido las técnicas tradicionales de fermentación de los alimentos, principalmente se elaboran bebidas fermentadas a las cuales se les atribuye un efecto benéfico para la salud, en particular relacionado con el funcionamiento normal del intestino, entre las que se encuentran: el tascalate chiapaneco de cacao, el achocote hidalguense, el sendencho de maíz germinado de Michoacán, el tejuino de Colima, Nayarit y Sonora, el pozol tabasqueño, el tesgüino de los tarahumaras entre otros (Nava-Arenas, 2009).

2.6 Saborizantes en los alimentos

Son las sustancias o mezclas de sustancias con propiedades aromáticas y/o sápidas capaces de conferir o reforzar el aroma y/o el sabor de los alimentos. La principal característica que poseen estos preparados es que actúan directamente sobre los sentidos del gusto y del olfato con la misión de reforzar el sabor o el olor que ya dispone el alimento en cuestión, o en su defecto le transmiten un sabor y aroma dado para de ese modo hacerlo mucho más atractivo y gustoso, el sabor refiere a la sensación que un determinado alimento despierta en nuestras papilas gustativas una vez dentro de nuestra boca.

Existen dos tipos de saborizantes:

1. **Naturales**; como lo anticipa su denominación provienen de la naturaleza misma y tiene un uso excluyentemente alimenticio, obteniéndose a partir de métodos físicos que pueden ser, la concentración, la extracción y la destilación.



2. **Artificiales;** estos saborizantes resultan de un proceso químico de elaboración y tienen la misión de representar las características que presentan algunos productos naturales pero de forma artificial, estos productos químicos no tienen similares o equivalentes en la naturaleza.

La industria de las comidas rápidas se mantiene gracias a los saborizantes artificiales que lo único que hacen es engañar el paladar haciéndole creer que lo que nutre es lo que tiene buen sabor sin decirnos que la mayoría de los alimentos procesados son básicamente glutamato monosódico (saborizante más utilizado en la industria), espesantes, emulsionantes, colorantes y agua, los cuales en lugar de nutrir provocan obesidad y por consecuencia enfermedades como la diabetes, cardiovasculares entre otras. Por lo que es muy recomendable la utilización de saborizantes naturales ya que estos si nos dan un beneficio a la salud ya que algunos contienen componentes bioactivos y principalmente que nos nutren.

Para el presente trabajo se utilizaron como saborizante pulpa de tamarindo cuya composición nutrimental se presenta en el cuadro 6, y pulpa de guayaba con un valor nutrimental presentado en el cuadro 7.

Cuadro 6 Composición nutrimental del tamarindo*

Proteínas (g) 2.8	Saturados (g) 0.27	Sodio (mg) 28
Carbohidratos (g) 62.7	Monoinsaturados (g) 0.18	Hierro (mg) 2.8
Ác. tartárico (g) 12.5	Poliinsaturados (g) 0.06	Vitaminas del complejo B
Vitamina A eq. (µg) 10.0	Minerales	Rivoflavina (mg) 0.15
Vitamina C (mg) 4.0	Potasio (mg) 628	Tiamina (mg) 0.43
Grasas (g) 0.6	Fósforo (mg) 113	Niacina (mg) 1.9

* 100 g de porción comestible, fuente: (FAO/Latin Foods, 2013)

Cuadro 7 Composición nutrimental de la guayaba*

Proteínas (g) 0.8	Saturados (g) 0.17	Sodio (mg) 3
Carbohidratos (g) 11.8	Monoinsaturados (g) 0.05	Hierro (mg) 0.30
Ác. tartárico (g) 32	Poliinsaturados (g) 0.18	Vitaminas del complejo B
Vitamina A eq. (µg) 32	Minerales	Rivoflavina (mg) 0.05
Vitamina C (mg) 183	Potasio (mg) 284	Tiamina (mg) 0.05
Grasas (g) 0.6	Calcio (mg) 20	Niacina (mg) 1.2

* 100 g de porción comestible, fuente: (FAO/Latin Foods, 2013)



2.6.1 Edulcorantes

Los edulcorantes artificiales son sustancias que se utilizan en lugar de los endulzantes con azúcar o alcoholes del azúcar, también se pueden denominar sustitutos del azúcar. Pueden venir agregados a los alimentos y bebidas directamente para su consumo o usarse durante el horneado u otro proceso de preparación de alimentos. La mayoría de los productos dietéticos o de alimentos bajos en calorías que se consumen se hacen usando edulcorantes artificiales.

Algunos de los edulcorantes artificiales más usados son:

- Aspartame es una combinación de fenilalanina y ácido aspártico, son dos aminoácidos.
- Sucralosa es 600 veces más dulce que el azúcar.
- Sacarina es de 200 a 700 veces más dulce que el azúcar.
- Acesulfamo K.
- Ciclamato.
- Neotamo

Recientemente se ha incorporado la estevia que es un edulcorante no calórico distinguiéndose de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno, es de origen natural y se obtiene del extracto de la planta ***Stevia rebaudiana*** con características químicas y farmacológicas adecuadas para su uso en la alimentación humana y cuyo sabor es lo más parecido al azúcar (Duran *et al.*, 2012).

Sunanda y Veena (2014) realizaron estudios en ratones diabéticos utilizando extracto de raíz ***Stevia rebaudiana*** y reportaron que hubo una disminución del nivel de glucosa en la sangre y reduciendo el daño en los tejidos, con lo que concluyen que el extracto de raíz es un potencial antidiabético y puede ser utilizado en la prevención y/o tratamiento de la diabetes.



3 Justificación

En México hay un incremento en los problemas de salud como el sobrepeso, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes debido principalmente a los malos hábitos de alimentación y a otros factores como el estilo de vida en constante estrés y la falta de ejercicio. El elevado consumo de alimentos con bajo valor nutricional, como es la llamada “comida chatarra” (comida rápida, botanas con alto contenido de grasa, etc.) ha llevado a los consumidores preocupados por su salud a la búsqueda de alternativas de alimentos que aporten beneficios a la misma, como son los alimentos funcionales a partir de fuentes naturales.

La cultura gastronómica de las diferentes regiones del país ofrece fuentes de antioxidantes que están siendo subestimadas como es el caso de los maíces de color o pigmentados, los cuales además de ser la principal fuente de energía de la población mexicana, ahora se sabe que contiene compuestos antioxidantes que pueden integrarse a la dieta diaria.

Por lo anterior la formulación y elaboración de un alimento funcional a base de maíz pigmentado fermentado con probióticos y combinarlo con fruta para darle sabor y aroma agradable, es una alternativa viable para este nuevo mercado de consumidores.

La elaboración de este alimento ofrece una alternativa de comercialización para los maíces pigmentados cultivados en el Distrito Federal, que son una materia prima disponible, sin embargo sólo son de consumo local y están poco aprovechados en México a pesar de que contienen compuestos nutraceuticos.

4 Hipótesis

La combinación de los componentes nutraceuticos del maíz pigmentado, la función de los microorganismos probióticos adicionados y los nutrientes de la pulpa de fruta, formularan un alimento funcional con elevado valor nutricional y con las características sensoriales requeridas para la aceptación de los consumidores.



5 Objetivo General

Elaborar un alimento funcional empleando masa de maíz pigmentado adicionado con microorganismos probióticos para fermentarla y después enriquecer la formulación con pulpa de fruta y un edulcorante natural para promover su aceptación.

5.1 Objetivos Particulares

- ❖ Fermentar la masa de maíz pigmentado nixtamalizado utilizando microorganismos probióticos y verificar su viabilidad.
- ❖ Diseñar la formulación del alimento funcional con la masa fermentada y la pulpa de fruta.
- ❖ Verificar la viabilidad de los microorganismos probióticos en el alimento funcional elaborado.
- ❖ Evaluar el potencial nutracéutico en la masa fermentada y en el alimento funcional.



6 Materiales y Métodos

6.1 Material biológico y químico

Se obtuvieron granos de maíz azul (*Zea mays* L.) de la comunidad productora de la delegación Tláhuac del Distrito Federal, el cual fue limpiado para la eliminación de cualquier materia extraña y se almacenó en bolsas selladas al vacío.

Los microorganismos probióticos fueron proporcionados por la planta piloto 2 ubicada en la UAM-Iztapalapa y fueron *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus*.

Edulcorante a base de estevia marca Super Life

Los reactivos utilizados fueron:

- Medio de cultivo MRS marca FLUKA
- Agar MRS marca FLUKA
- Cloruro de Sodio (NaCl) marca J.T. Baker
- Almidón soluble marca HYCEL
- Metanol marca J.T. Baker
- Reactivo de Folin-Ciocalteu marca HYCEL
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) marca SIGMA-ALDRICH
- Ácido gálico marca SIGMA-ALDRICH
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) marca SIGMA-ALDRICH
- Ácido clorhídrico (HCl) marca J.T. Baker

6.2 Elaboración de masa de maíz pigmentado

Se realizó una nixtamalización parcial calentando agua con una relación 2:1 (agua-maíz) hasta alcanzar los 90°C, una vez alcanzada la temperatura se adicionó Ca(OH)₂ (cal grado alimenticio) en una relación 1% p/p se homogenizó y se agregó el maíz pigmentado (maíz azul), posteriormente se mantuvo en agitación y a temperatura constante durante 15 min. Se eliminó el agua de cocimiento a través de un colador y se enjuagó el maíz con agua potable a temperatura ambiente y con frotamiento manual para eliminar la cal, los granos fueron molidos utilizando un molino para café (Moulinex) sin la adición de agua, al obtener la harina de maíz está se colocó en un matraz Erlenmeyer para ser hidratada en una relación 4.5:1 (agua-harina).



6.2.1 Tratamientos térmicos a la masa

6.2.1.1 Esterilización

Este procedimiento se llevó a cabo colocando en los matraces la masa, enseguida se esterilizaron en una autoclave a 15 lb/pulg² por 10 minutos.

6.2.1.2 Pasteurización

Colocaron los matraces con masa en una autoclave a temperatura máxima sin cerrar completamente para no hacer vacío por 10 minutos transcurridos ese tiempo, los matraces se colocaron inmediatamente en una palangana con hielo.

6.2.1.3 Cocción

Se calentó agua purificada necesaria para tener una relación de 3:1 (agua-masa) hasta alcanzar los 70°C se agregó la masa y se continuó el calentamiento hasta alcanzar 90°C con agitación constante durante 25 minutos.

6.2.1.4 Análisis fisicoquímico de los tratamientos térmicos

A cada tratamiento térmico se le determinó la humedad por el método 925.10 de la AOAC (2005), actividad de agua utilizando el equipo Water Activity Meter 4_{TE} (AQUA LAB), pH utilizando un potenciómetro Star 3 (THERMO ORION) y la inocuidad de la masa recién elaborada y a las 24, 72 y 96 horas de almacenamiento en refrigeración a 4°C realizando dos diluciones en solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.1% de una muestra de un gramo de la masa y se realizó el método de cultivo en placa en agar MRS.



6.3 Fermentación de la masa de maíz pigmentado nixtamalizada

6.3.1 Pre activación de las bacterias probióticas

Se inocularon 10 mL del stock de cada bacteria probiótica en un matraz erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de caldo MRS respectivamente y se incubaron a 37°C por 24 horas, transcurridas las 24 horas el inóculo se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos para eliminar el caldo MRS, las células se re suspendieron en caldo MRS fresco y se incubaron por otras 24 horas, una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos para eliminar el caldo MRS, el botón celular que se obtuvo se re suspendió diferentes medios de cultivo los cuales contiene almidón y se incubaron por 48 horas.

- **Medio A** Formulación de medio con almidón de maíz, descrito en Escamilla-Hurtado *et al.* (2005).
- **Medio B** Caldo MRS adicionado con almidón de maíz.
- **Medio C** Formulación de medio con almidón soluble, como en medio A.
- **Medio D** Caldo MRS adicionado con almidón de soluble.

Transcurridas las 48 horas, los inóculos se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos para eliminar los medios de cultivo y los botones de células con almidón soluble (Stocks de BAL) se reservaron para la inoculación de las masas y se realizaron diluciones de los stocks en solución de NaCl 0.1% hasta 10^{-8} , para realizar un cultivo en placa en agar MRS y determinar las UFC/mL.

6.3.2 Inoculación de la masa y evaluación de la viabilidad de los probióticos

De los stocks obtenidos se inoculó el 25% (p/p) en la masa, homogenizándolas utilizando una espátula estéril y se incubaron a 37°C por 60 horas (se realizó por triplicado), se determinaron las UFC/g_{masa} tomando un gramo de masa fermentada y se realizaron diluciones en solución de NaCl 0.1% hasta 10^{-9} y se realizó un cultivo en placa en agar MRS (Se realizó por triplicado).



A la masa fermentada se le determinó la humedad por el método 925.10 de la AOAC (2005), actividad de agua utilizando el equipo Water Activity Meter 4_{TE} (AQUA LAB) y el pH utilizando un potenciómetro Star 3 (THERMO ORION).

Las masas se empacaron en bolsas individuales con 10 gramos de masa fermentada y se sellaron al vacío almacenándolas en refrigeración a 4°C. Se les determinó la viabilidad a los 5, 10, 15 y 30 días de almacenamiento.

6.4 Elaboración del alimento funcional

6.4.1 Elaboración de la pulpa de tamarindo

Al tamarindo se le eliminó la cascará y se colocó en una olla con agua suficiente para cubrir el tamarindo sin cascará calentándola a temperatura baja hasta obtener una consistencia espesa, la pulpa obtenida se filtró utilizando un colador para eliminar las semillas y tener una pulpa lo más homogénea posible, se agregó el edulcorante a base de estevia en diferentes relaciones de pulpa-edulcorante hasta obtener el sabor agrídulce característico de los dulces de tamarindo.

A la pulpa se le determinó la humedad por el método 925.10 de la AOAC (2005), actividad de agua utilizando el equipo Water Activity Meter 4_{TE} (AQUA LAB) y el pH utilizando un potenciómetro Star 3 (THERMO ORION).

6.4.2 Elaboración de la pulpa de guayaba

Se lavaron las guayabas para eliminar cualquier materia extraña y se cortaron por la mitad colocándolas en una olla con agua suficiente para cubrir las guayabas lavadas calentándola a temperatura baja hasta obtener una consistencia espesa, la pulpa obtenida se filtró utilizando un colador para eliminar las semillas y tener una pulpa lo más homogénea posible, se agregó edulcorante a base de estevia en diferentes relaciones de pulpa-edulcorante hasta obtener el sabor dulce.

A la pulpa se le determinó la humedad por el método 925.10 de la AOAC (2005), actividad de agua utilizando el equipo Water Activity Meter 4_{TE} (AQUA LAB) y el pH utilizando un potenciómetro Star 3 (THERMO ORION).



6.4.3 Formulación del alimento funcional

Se realizaron diferentes mezclas de la masa fermentada con las pulpas elaboradas con las siguientes relaciones (masa: pulpa): 3:1, 2:1 y 1:1, 1:0, las cuales fueron almacenadas en refrigeración.

Al alimento funcional (AF) se le determinó la humedad por el método 925.10 de la AOAC (2005), actividad de agua utilizando el equipo Water Activity Meter 4_{TE} (AQUA LAB) y el pH utilizando un potenciómetro Star 3 (THERMO ORION).

Se tomó un gramo del AF de las diferentes formulaciones recién elaboradas y a las 24 horas para determinar las UFC/g_{alimento} realizando diluciones en solución de NaCl 0.1% hasta 10⁻⁹ realizando el cultivo en placa en agar MRS (Realizar por triplicado).

6.5 Evaluación de los compuestos nutraceuticos

6.5.1 Preparación de las muestras

Las muestras de maíz azul, maíz azul nixtamalizado y la masa fermentada se deshidrataron en una estufa a 60°C por 24 horas; la pulpa de fruta y el alimento formulado se deshidrataron a 35°C por 36 horas ya que a la temperatura de 60°C los azúcares de las pulpas se caramelizaban.

Al tener las muestras deshidratadas se pulverizaron usando un molino para café (Moulinex), para así obtener una harina.

6.5.2 Extracción de los compuestos fenólicos

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos siguiendo el método descrito por Camacho-Hernández *et al.* (2011):

En un matraz erlenmeyer de 25 mL se colocó un gramo de harina de cada muestra y se adicionaron 8 mL de metanol acidificado (85% de metanol; 15% de HCl 1.0 N), se mezcló fuertemente, en forma manual utilizando una espátula, durante 2 minutos y se ajustó el pH a 1.0 con HCl (dilución 1:1, HCl concentrado: agua), se mantuvo en agitación a 100 rpm aproximadamente durante 30 minutos utilizando una parrilla de agitación múltiple y si era



necesario se reajustó el pH a 1.0 pasado el tiempo de agitación se centrifugaron a 3300 x g por 30 minutos a 25°C y el sobrenadante se aforó a 25 mL con metanol acidificado.

El extracto fenólico obtenido se utilizó para cuantificar los fenoles totales, antocianinas y determinar la actividad antioxidante.

6.5.3 Cuantificación de fenoles totales

Del extracto fenólico obtenido se cuantificó los fenoles totales siguiendo el método descrito por Serrano-Maldonado (2010):

A 500 µL de extracto fenólico se agregó 4.5 mL de agua, 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 500 µL de solución saturada de Na₂CO₃, se agitaron los tubos, se adicionaron 4.3 mL de agua destilada dejando reaccionar por 1 hora en obscuridad y se mido la absorbancia a 765 nm (se realizó por triplicado cada muestra). El contenido de fenoles totales fue calculado en equivalentes de ácido gálico utilizando una curva estándar (Anexo 1).

6.5.4 Cuantificación de antocianinas totales

Se colocaron 2.5 mL del extracto fenólico obtenido en una celda para espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 515 nm y se calculó la concentración de antocianinas utilizando la ecuación 1 descrita por Abdel-Aal y Hucl (1999):

$$C = \left(\frac{A}{e}\right) \times \left(\frac{VT}{1000}\right) \times MW \times \left(\frac{1}{PM}\right) \times 10^6$$

Dónde:

C=Concentración de Antocianinas (mg/Kg)

A=Lectura de absorbancia a 535 nm

e=Coficiente de absortividad molar (cianidina 3-glucósido=25965/cm*M)

VT=Volumen Total del extracto de Antocianinas

MW=Peso Molecular de la cianidina 3-glucósido=449

Ecuación 1



6.5.5 Determinación de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se siguió el método descrito por Salinas Moreno *et al.* (2012):

A 200 μL de extracto fenólico se le adicionaron 2800 μL de DPPH 60 μM , se midió la absorbancia a 517 nm al inicio, se dejó reaccionar en la obscuridad por 90 minutos y se midió la absorbancia, la actividad antioxidante se reporta como reducción del radical DPPH expresado en porcentaje utilizando la ecuación 2.

$$\text{inhibición}_{DPPH}(\%) = \left[\frac{(abs_{t_0} - abs_{t_{90}})}{(abs_{t_0})} \right] \times 100$$

abs_{t_0} = absorbancia al inicio

$abs_{t_{90}}$ = absorbancia a los 90 minutos de reacción

Ecuación 2

7 Resultados y discusión

7.1 Obtención de masa de maíz pigmentado nixtamalizado

Del maíz pigmentado nixtamalizado se obtuvo una masa con una humedad del 40% a la cual se le realizaron los diferentes tratamientos térmicos para tener una masa estéril.

7.1.1 Tratamientos térmicos a la masa

7.1.1.1 Esterilización

Para este tratamiento primero se utilizó un frasco de boca ancha, con el cual no se encontraron las condiciones óptimas ya que se obtuvo una masa cocida como tamal (figura 6).



Figura 6 Masa obtenida al utilizar un frasco de vidrio

Al cambiar a un matraz Erlenmeyer de boca angosta, se obtuvo una masa (figura 7) con características fisicoquímicas adecuadas con una humedad del 75%, actividad de agua de 0.98 y un pH de 6.65.



Figura 7 Masa obtenida al utiliza matraz Erlenmeyer



Al realizar las pruebas de inocuidad de la masa esterilizada a 15 lb/pulg² durante 10 minutos, la masa no mostró contaminación, esto es favorable ya que las antocianinas son termolábiles y uno de los objetivos del proyecto es la conservación de los compuestos nutraceuticos.

7.1.1.2 Pasteurización

En este proceso se encontraron condiciones fisicoquímicas adecuadas para el crecimiento microbiano con una humedad del 70%, actividad de agua de 0.95 y un pH de 6.05, sin embargo al realizar las pruebas de inocuidad se presentó contaminación de la masa recién elaborada (figura 8).

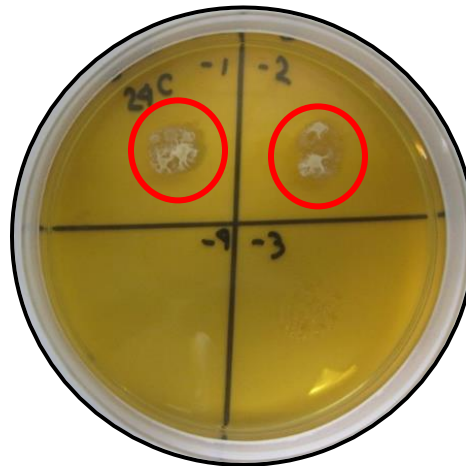


Figura 8 Contaminación presente en la masa pasteurizada

Al cambiar los tiempos de pasteurización a los 15 y 20 minutos la contaminación continuó y a los 25 minutos la masa terminó cocida, muy similar al caso de la esterilización con el frasco de vidrio. Por lo que este tratamiento no fue seleccionado.

7.1.1.3 Cocción

Se obtuvieron condiciones adecuadas con una humedad del 76%, actividad de agua de 0.99 y un pH de 6.55., y al realizar las pruebas de inocuidad no se presentó contaminación en la masa recién elaborada y a las 24 horas, pero a las 72 horas ya hubo contaminación similar a la de la pasteurización. Por lo que este tratamiento se descartó.



7.2 Preparación del inóculo de las bacterias ácido lácticas (BAL)

Se realizaron ensayos con diferentes medios de cultivo adicionados con almidón de maíz para el crecimiento de las BAL *P. pentosaceus* y *L. rhamnosus* GG, para así poder determinar el medio adecuado para su pre activación y poder fermentar la masa de maíz pigmentado, ya que la fuente de carbono disponible en esta es el almidón.

Como se observa en las figuras 9 y 10 en los medios de cultivo en donde se adicionó almidón soluble se tiene un mayor crecimiento de las BAL a las 24 horas de incubación.

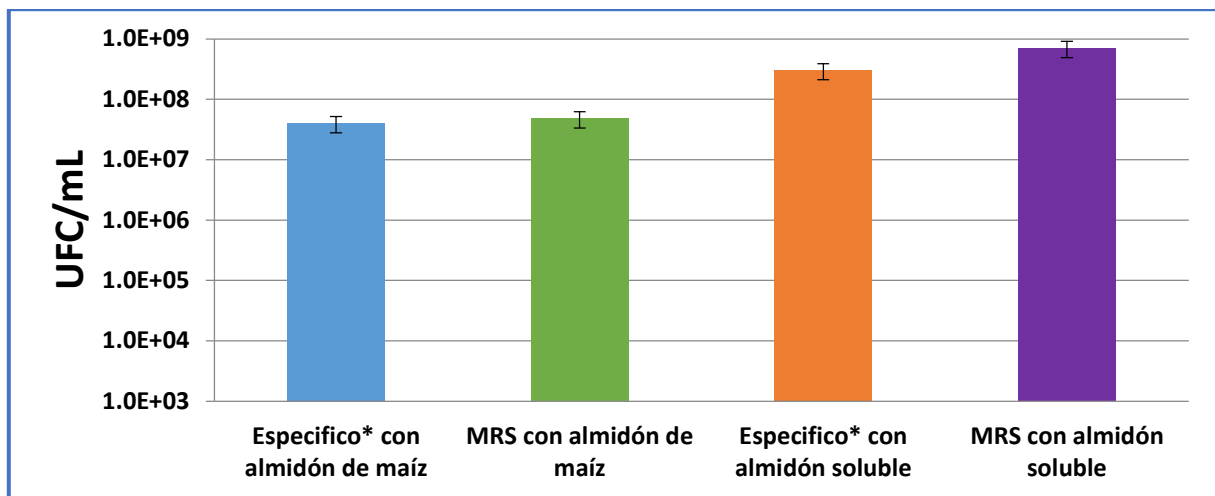


Figura 9 Crecimiento de *P. pentosaceus* en diferentes medios de cultivo. *Medio específico descrito por Escamilla-Hurtado et al. (2005)

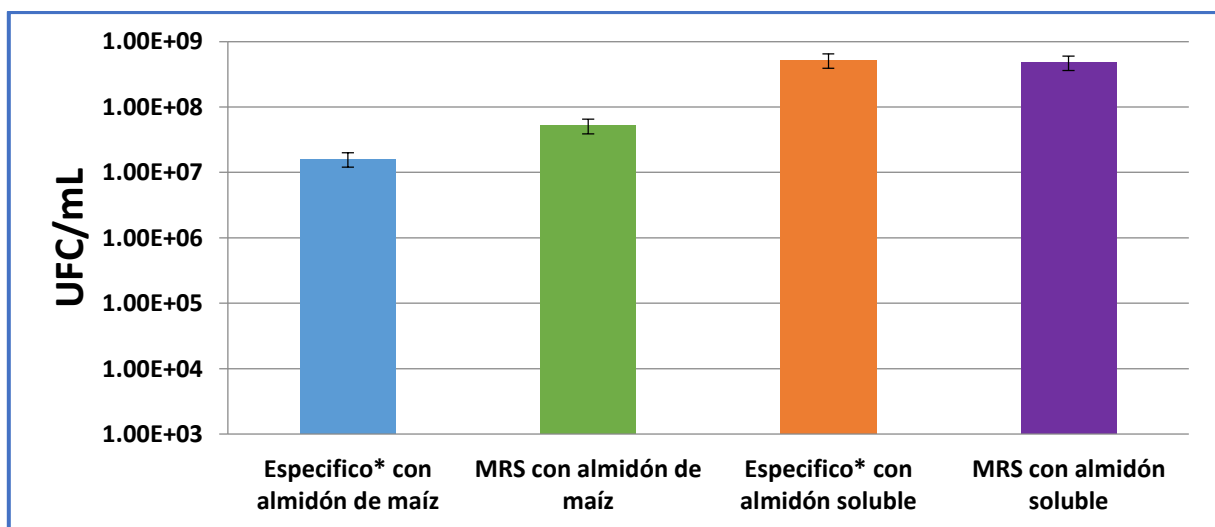


Figura 10 Crecimiento de *L. rhamnosus* GG en diferentes medios de cultivo. *Medio específico descrito por Escamilla-Hurtado et al. (2005)



Con base a los resultados obtenidos se determinó que el medio de cultivo de MRS adicionado con almidón soluble es el adecuado para realizar la pre activación de las BAL, por lo que se procedió a realizar la fermentación de la masa pre activando a las BAL con el medio seleccionado.

7.3 Fermentación de la masa

La fermentación de la masa de maíz pigmentado se llevó a cabo utilizando *P. pentosaceus* y *L. rhamnosus* GG pre activados a 37°C en el medio seleccionado durante 48 horas obteniendo un crecimiento menor a las 10^8 UFC/g como se muestra en las figuras 11 y 12.

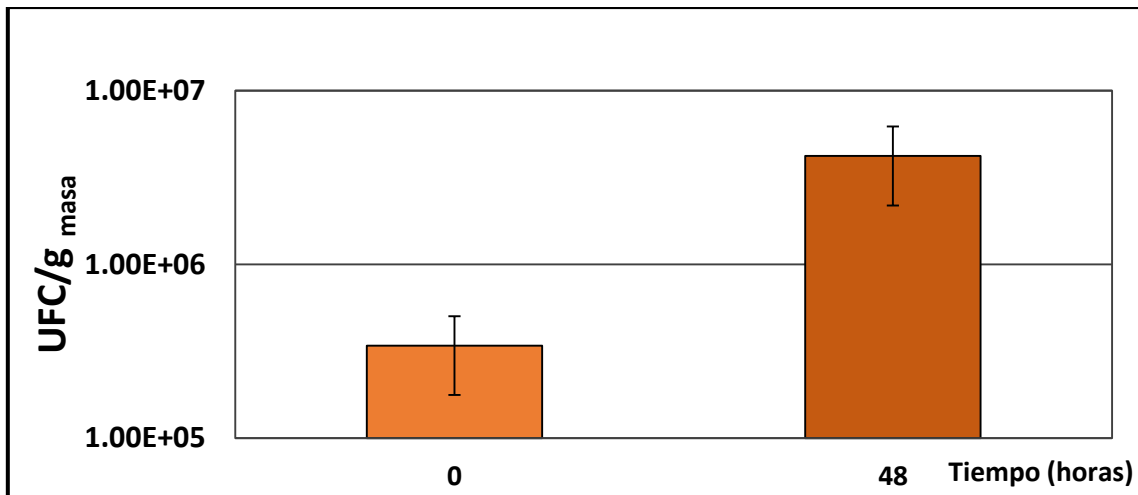


Figura 11 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con *P. pentosaceus* pre activado en medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble

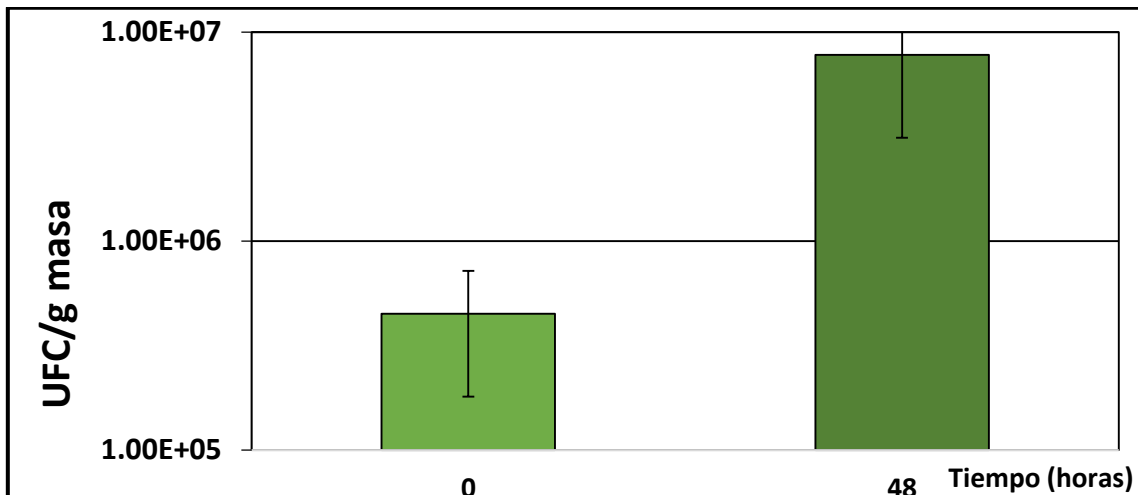


Figura 12 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con *L. rhamnosus* GG pre activado en medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble



La concentración observada está dentro del intervalo recomendado como la dosis adecuada para el ser humano (Gómez *et al.* 2008) sin embargo como en la bibliografía no se reporta a *P. pentosaceus* como una bacteria probiótica, se continuo fermentando con *L. rhamnosus* GG y se integró *L. casei* Shirota ampliamente reconocido como probiótico y esta fermentación se realizó pre activando a los lactobacilos en el medio seleccionado y fermentando las masas a 37°C durante 60 horas, obteniendo los resultados que se muestran en las figuras 13 y 14

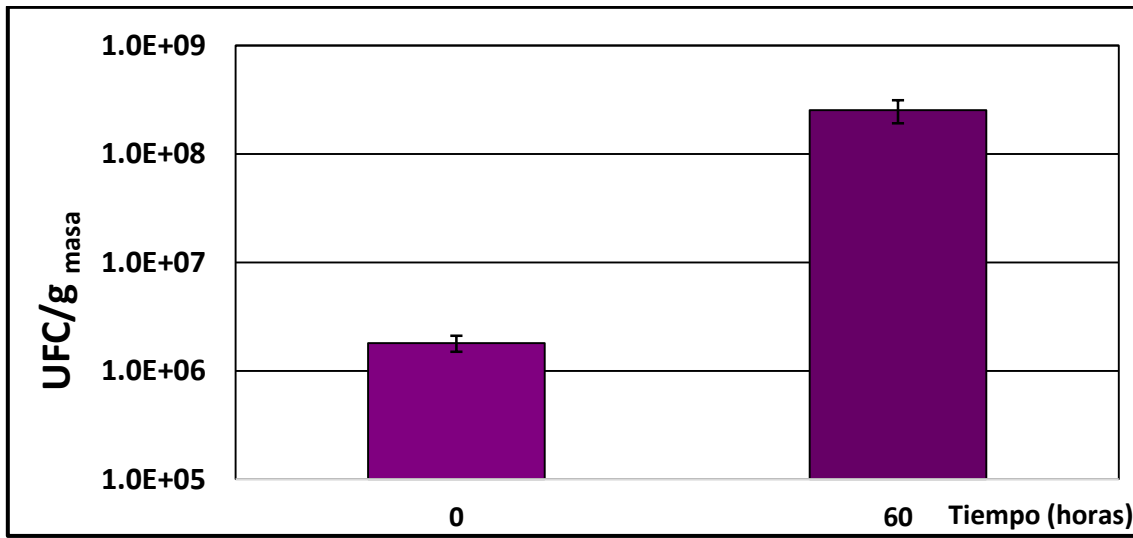


Figura 13 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con *L. casei* Shirota pre activado con medio de cultivo MRS adicionado con almidón soluble

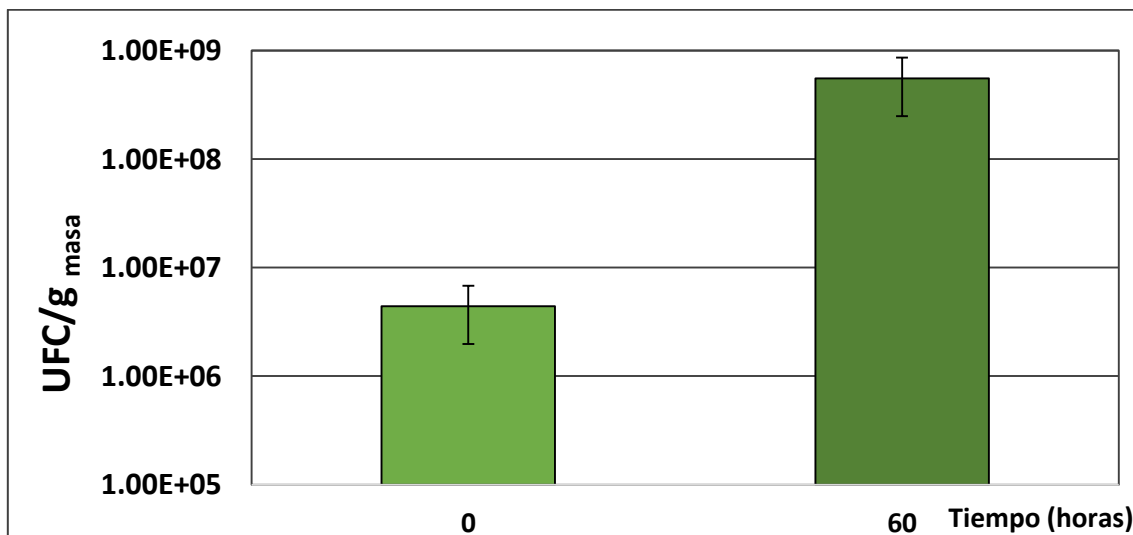


Figura 14 Fermentación de masa de maíz pigmentado nixtamalizado con *L. rhamnosus* GG pre activado en medio MRS adicionado con almidón soluble



Al realizar la fermentación de la masa durante 60 horas se obtuvo una cuenta de lactobacilos viables en el orden de 10^8 UFC/g_{masa} para cada BAL obteniendo concentraciones similares a lo reportado por Domínguez *et al* (2005) que fermentaron maíz de alta calidad proteica con un consorcio bacterias probióticas (*L. casei* Shirota, *L. plantarum*, *L. johnsonii* LA1) y una cepa aislada de una muestra de pozol) para elaborar una bebida de maíz fermentado obteniendo una concentración de 10^9 UFC/mL, y en el caso de Díaz-Ruiz *et al.* (2003) que aislaron y cuantificaron un conjunto de BAL obtenidas del pozol elaborado tradicionalmente reportando concentraciones de hasta 10^9 UFC/mL, por lo que los resultados obtenidos al fermentar masa de maíz pigmentado utilizando una sola cepa de lactobacilo muestra que la masa de maíz pigmentado es un medio favorable para el crecimiento de los Lactobacilos.

7.4 Análisis fisicoquímico de la masa fermentada y viabilidad de las BAL

La masa fermentada presentó una humedad del 45%, actividad de agua de 0.93 y un pH de 4.16 para *L. casei* Shirota y una humedad del 50%, actividad de agua de 0.96 y un pH de 4.26 para *L. rhamnosus* GG y en las figuras 16 y 17 se presenta las UFC de lactobacilos viables durante el almacenamiento de la masa fermentada en bolsas selladas al vacío (figura 15).



Figura 15 Masa fermentada empacada en bolsa sellada al vacío.

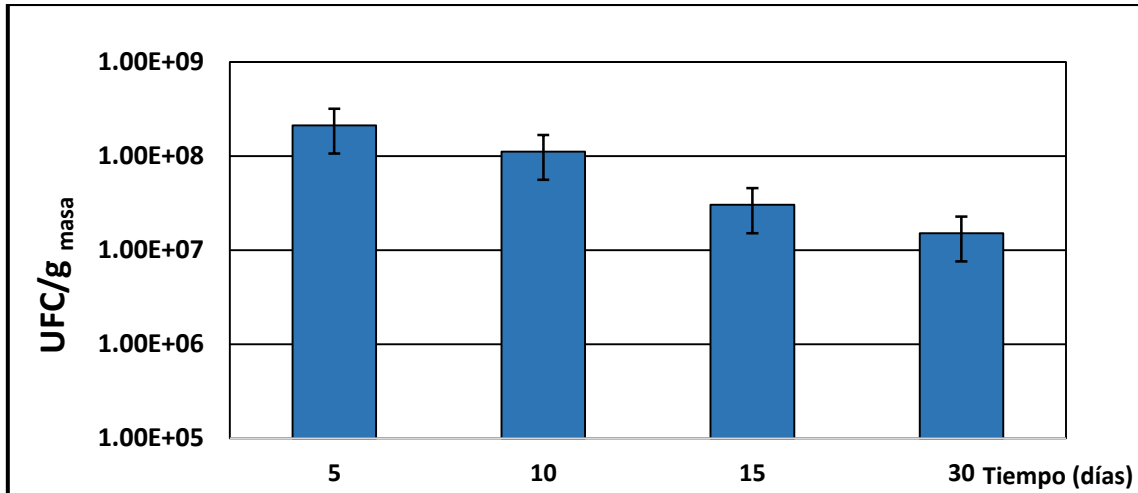


Figura 16 Cuantificación de bacterias viables de *L. casei* Shirota en la masa fermentada almacenada 30 días en refrigeración a 4°C

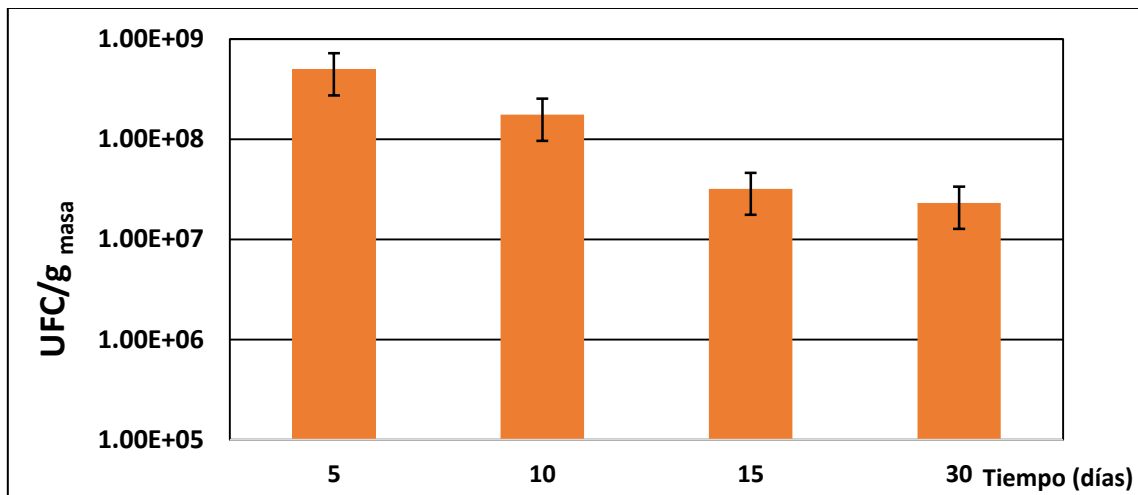


Figura 17 Cuantificación de bacterias viables de *L. rhamnosus* GG en la masa fermentada almacenada 30 días en refrigeración a 4°C

Al analizar los resultados obtenidos se observa que si hubo la conservación de la viabilidad de los Lactobacilos en la masa al ser almacenada en refrigeración teniendo una disminución de un orden de magnitud en la viabilidad de 10⁸ a 10⁷ UFC/g_{masa}.



7.5 Formulación del alimento funcional

7.5.1 Integración de la pulpa de tamarindo

La pulpa de tamarindo presentó una humedad del 35%, actividad de agua de 0.83 y un pH de 2.01 sin la adición del edulcorante, en el cuadro 8 se presentan las propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas, en las que se destaca que la variación del pH el cual aumenta al disminuir la proporción de pulpa de tamarindo.

Cuadro 8 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de pulpa de tamarindo y el edulcorante

Relación (pulpa: edulcorante)	a_w	pH	Humedad (%)
4:1	0.85	2.35	37
3:1	0.86	2.85	35
2:1	0.85	3.05	36
1:1	0.84	3.14	35

A través de un análisis sensorial a nivel laboratorio, se buscó identificar cuál de las mezclas elaboradas presentaba el sabor agridulce característico de los dulces tradicionales de tamarindo. Los resultados obtenidos señalan que la mezcla con proporción 2:1 presentó el sabor mejor aceptado por los individuos que la probaron. Una vez seleccionada la mezcla se procedió a integrarla a la masa fermentada.

7.5.2 Propiedades fisicoquímicas del alimento funcional

Se realizaron las diferentes mezclas de la masa fermentada con la pulpa de tamarindo, buscando que no se perdiera el sabor agridulce de la pulpa de tamarindo, los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 9 donde se observa que no hay diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas al variar la relación de masa : pulpa.



Cuadro 9 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de la masa fermentada con la pulpa de tamarindo para formular el alimento funcional

Lactobacilos	Relación (masa : pulpa)	a_w	pH	Humedad (%)
<i>L. casei</i> Shirota	3:1	0.93	3.96	42
	2:1	0.92	4.05	38
	1:1	0.89	3.98	32
<i>L. rhamnosus</i> GG	3:1	0.94	4.12	45
	2:1	0.91	4.07	41
	1:1	0.88	4.10	35

Al realizar un análisis sensorial a nivel laboratorio con las diferentes mezclas, se concluyó que no hubo pérdida del sabor agridulce en ninguna de ellas, por lo que se le realizó en cada una la cuantificación de la viabilidad de los lactobacilos y los resultados se presentan a continuación.

7.5.3 Viabilidad de los probióticos en el alimento funcional

Se determinó la viabilidad de los lactobacilos en el alimento funcional al momento de la mezcla y a las 24 horas de ser almacenados en refrigeración a 4°C, como se observa en el cuadro 10, la presencia de pulpa de tamarindo limitó el crecimiento bacteriano, llegando a ser imperceptible su presencia a través del tipo de prueba realizada tanto para *L. casei* Shirota como para *L. rhamnosus* GG.

Cabe destacar que el tamarindo es una fruta ácida (pH cercano a 2) y los lactobacilos solo llegan a sobrevivir en pH mayor o igual a 3, lo cual pudo tener un efecto considerable sobre la sobrevivencia de los microorganismos.



Cuadro 10 Cuantificación de la viabilidad de los Lactobacilos en las diferentes mezclas de la masa fermentada y la pulpa de tamarindo para formular el alimento funcional

<i>Lactobacillus</i>	Relación (masa : pulpa)	UFC/g _{alimento}	
		0 horas	24 horas
<i>L. casei</i> Shirota	3:1	1.5×10^7	0
	2:1	2.3×10^5	0
	1:1	3.4×10^4	0
	1:0	2.5×10^8	1.9×10^8
<i>L. rhamnosus</i> GG	3:1	2.2×10^7	0
	2:1	1.2×10^5	0
	1:1	1.6×10^4	0
	1:0	5.5×10^8	4.8×10^8

7.6 Evaluación del potencial nutracéutico del alimento funcional con pulpa de tamarindo.

7.6.1 Cuantificación de fenoles totales

Como se muestra en la figura 18 se presenta una disminución aproximada del 20% de los fenoles totales presentes en el maíz pigmentado al momento de la nixtamalización parcial, mientras que después del proceso de fermentación la proporción de pérdida es menor por lo que este proceso no afecta de manera considerable la integridad de los compuestos fenólicos, reportes previos señalan que una nixtamalización tradicional puede reducir hasta el 40% de la concentración de este tipo de compuestos como lo reportado por Serna-Saldivar *et al.* (2013), sin embargo las condiciones en que se realizó la nixtamalización y posterior fermentación generaron una menor pérdida, incluso el integrar la pulpa de tamarindo no mostró efecto negativo sobre este parámetro.

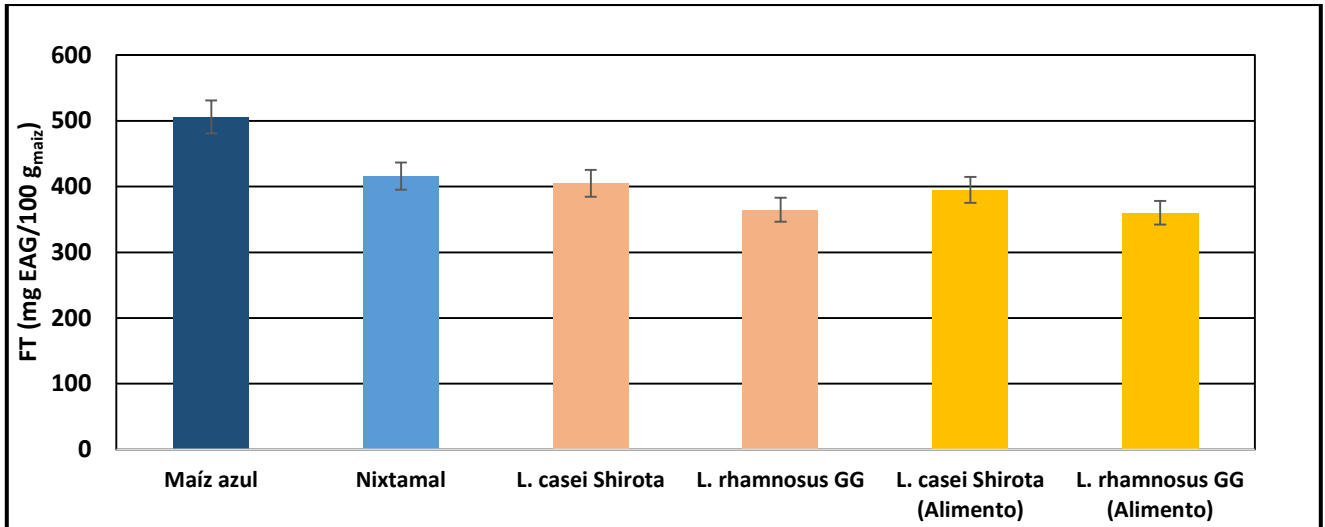


Figura 18 Concentración de fenoles totales (FT) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), las masas fermentadas con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo

7.6.2 Cuantificación de antocianinas totales

Durante el proceso de nixtamalización parcial se puede observar una disminución del 85% de las antocianinas totales (figura 19), esto puede ser debido a que las antocianinas son inestables en medios alcalinos, como es el caso del proceso de nixtamalización, y observándose que no hay una diferencia significativa en la concentración de antocianinas entre las masas fermentadas con los lactobacilos. Otros autores ha reportado entre el 30 y 60 % de pérdida al nixtamalizar maíces de color azul de diferentes orígenes (Salinas Moreno *et al.*, 2003); Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Morán *et al.*, 2012).

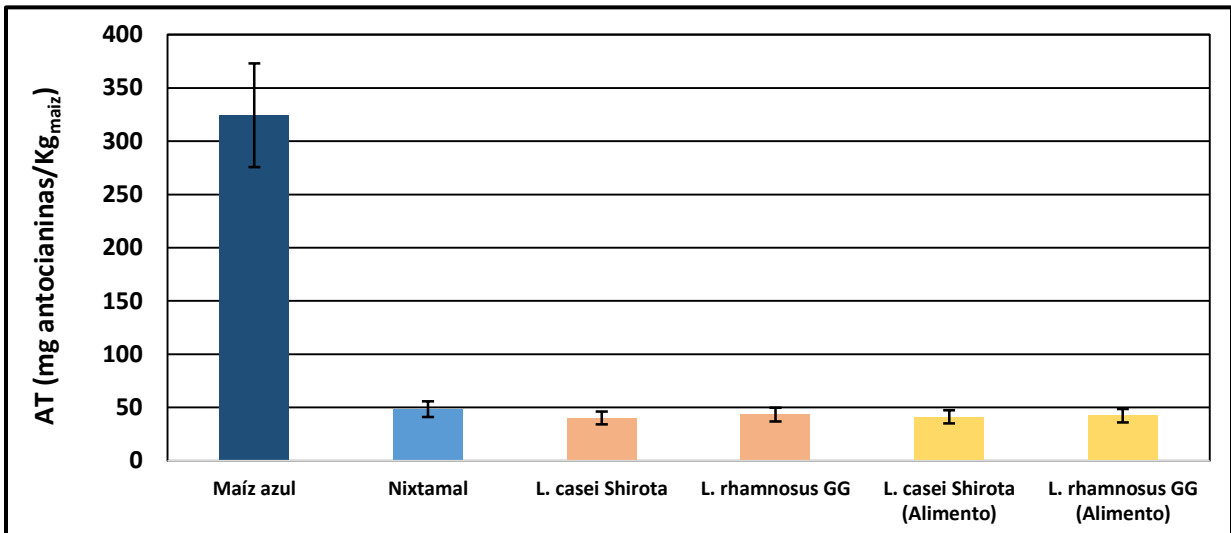


Figura 19 Concentración de antocianinas totales (AT) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), las masas fermentadas con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo

7.6.3 Determinación de la actividad antioxidante

Los resultados obtenidos respecto al porcentaje de inhibición del radical DPPH indican que después del proceso de nixtamalización hubo una disminución de 69% en grano a 45% en nixtamal, y después de la fermentación e integración de la pulpa de tamarindo, los valores estuvieron entre 33% y 36% sin diferencia significativa entre ellos (Figura 20), considerando los resultados anteriores, el poder antioxidante está dado por la presencia y conservación de compuestos fenólicos en las diferentes etapas del proceso.

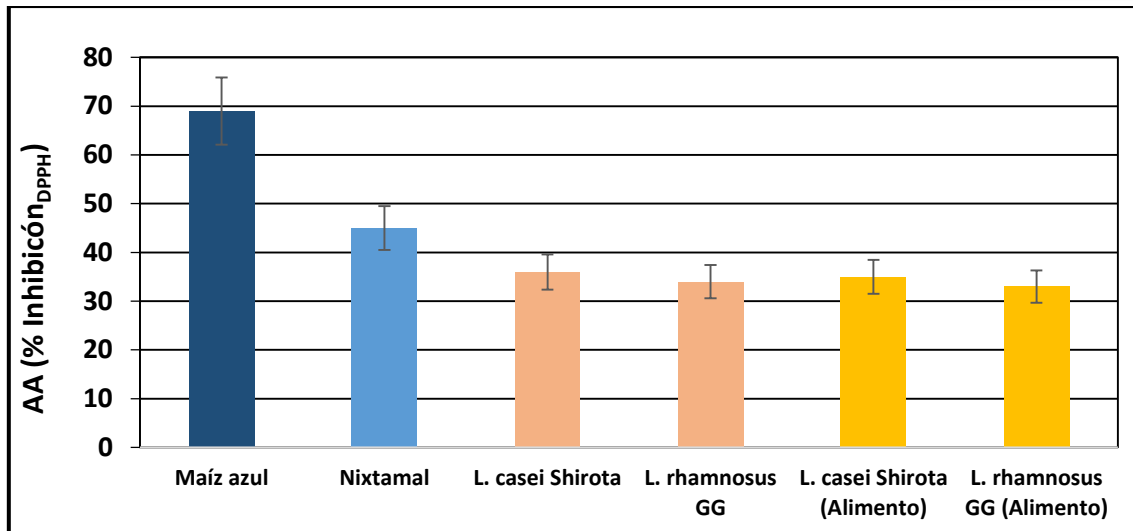


Figura 20 Porcentaje de la actividad antioxidante (AA) del maíz azul, maíz azul nixtamalizado (nixtamal), la masa fermentada con los lactobacilos y en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos al fermentar masa de maíz pigmentado nixtamalizado se observa que hay una conservación de las propiedades nutraceuticas del maíz pigmentado e que al incorporar la función probiótica de los lactobacilos el alimento formulado posee propiedades funcionales.

7.7 Formulación del alimento funcional con pulpa de guayaba

7.7.1 Integración de la pulpa de guayaba

La pulpa de guayaba presentó una humedad del 38%, actividad de agua de 0.85 y un pH de 4.15 sin la adición del edulcorante y en el cuadro 11 se presentan las propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas, en las que se destaca que la variación del pH el cual aumenta proporcionalmente con la pulpa de guayaba.

Cuadro 11 Propiedades fisicoquímicas de las diferentes mezclas de la pulpa de guayaba y el edulcorante

Relación (pulpa: edulcorante)	a_w	pH	Humedad (%)
4:1	0.85	4.35	34
3:1	0.86	4.65	36
2:1	0.85	5.05	38
1:1	0.84	5.56	37



A través de un análisis sensorial a nivel laboratorio, se buscó descartar las mezclas con sabor dulce obteniendo que la mezcla con proporción 1:1 presentó el sabor mejor aceptado por los individuos que la probaron. Una vez seleccionada la mezcla se procedió a integrarla a la masa fermentada.

7.7.2 Viabilidad de los probióticos en el alimento funcional

En el primer ensayo se presentó una contaminación por lo que se realizaron pruebas de inocuidad por separado de la masa sin fermentar, masa fermentada y de la pulpa de guayaba, con lo que se observó que la contaminación se presentaba desde la masa antes de ser fermentada y al cambiar de maíz se volvió hacer la prueba de inocuidad y ya no se presentó contaminación alguna, con lo que se determinó que el maíz pigmentado que se utilizó para este trabajo tiene una vida de anaquel de 6 meses aproximadamente.

Una vez que se verificó que no había contaminación alguna se fermentó la masa y se formuló el alimento funcional con la pulpa de guayaba en diferentes proporciones, se determinó la viabilidad de los lactobacilos al momento de la mezcla y a las 24 horas de ser almacenadas en refrigeración a 4°C, los resultados obtenidos muestran que a diferencia de lo observado al integrar la pulpa de tamarindo, en este caso si hay sobrevivencia de los lactobacilos en todos de los casos (Cuadro 12).

Cuadro 12 Cuantificación de la viabilidad de los Lactobacilos en el alimento funcional formulado con las diferentes mezclas de la masa fermentada y pulpa de guayaba

<i>Lactobacillus</i>	Relación (masa : pulpa)	UFC/g _{alimento}	
		0 horas	24 horas
<i>L. casei</i> Shirota	3:1	3×10^7	2×10^7
	2:1	1×10^5	1.5×10^5
	1:1	2×10^4	3×10^4
	1:0	1×10^8	2×10^8
<i>L. rhamnosus</i> GG	3:1	3×10^7	2.5×10^7
	2:1	4×10^5	3×10^5
	1:1	2×10^4	2.5×10^4
	1:0	3×10^8	4×10^8



7.7.3 Evaluación del potencial nutracéutico del alimento funcional con pulpa de guayaba.

7.7.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Como se observa en el figura 21 hay un incremento de un 300% aproximadamente en la concentración de fenoles totales en comparación con el alimento formulado con la pulpa de tamarindo, esto debido a que la guayaba presenta un alto contenido de fenoles como lo reporta Restrepo-Sánchez *et al.*, (2009) con concentraciones de hasta 626 mg EAG/100g en guayabas sin ningún tratamiento.

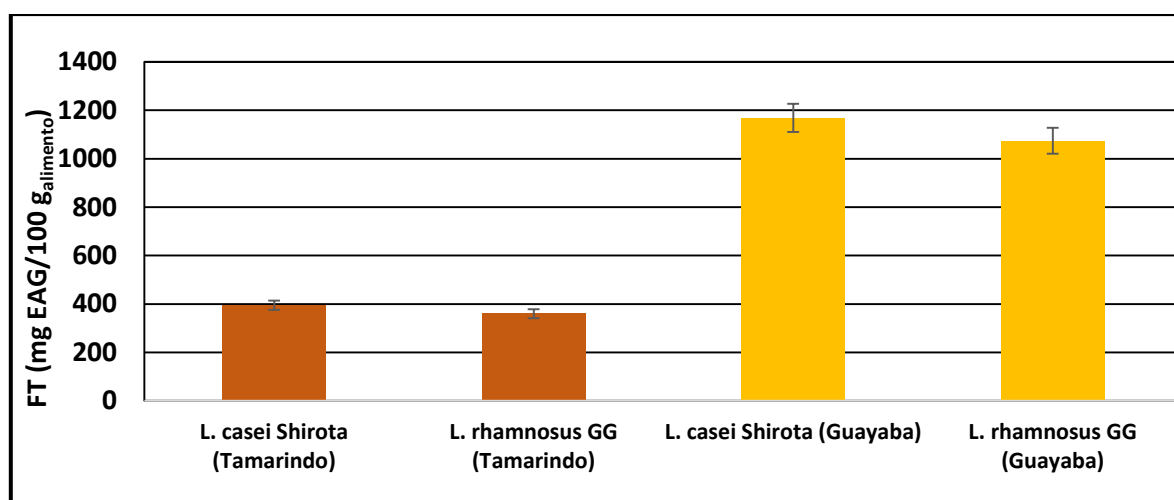


Figura 21 Concentración de fenoles totales (FT) en alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo y de guayaba

7.7.3.2 Cuantificación de antocianinas totales

En la concentración de antocianinas no se observa ningún cambio entre los alimentos formulados con las pulpas de tamarindo y guayaba como se presenta en la figura 22, esto debido a que las frutas utilizadas no contienen antocianinas y las concentraciones reportadas son las obtenidas del maíz pigmentado.

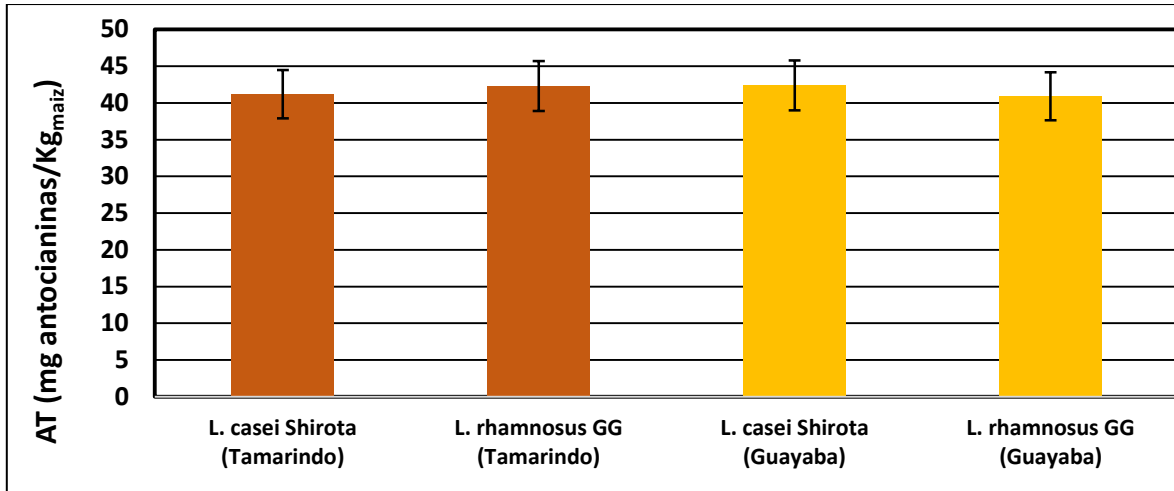


Figura 22 Concentración de antocianinas totales (AT) en el alimento funcional formulado con pulpa de tamarindo y de guayaba

7.7.3.3 Determinación de la actividad antioxidante

En la figura 23 se muestra el resultado más favorable ya que se presenta un incremento en la actividad antioxidante de un 250% aproximadamente en comparación a lo obtenido con el alimento formulado con pulpa de tamarindo, como ya se había mencionado, la actividad antioxidante es principalmente proporcionada por los compuestos fenólicos y dado que la guayaba presenta altas concentraciones de estos compuestos hay un incremento considerable en la actividad antioxidante que presenta el alimento funcional.

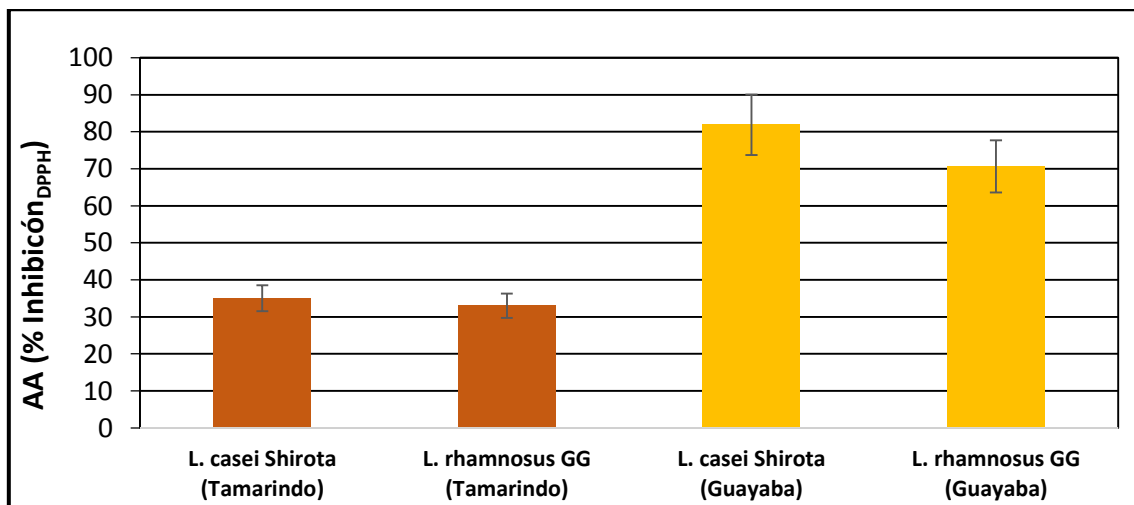


Figura 23 Porcentaje de la actividad antioxidante (AA) en el alimento funcional formulado con la pulpa de tamarindo y de guayaba



8 Conclusiones

El método propuesto usando *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* GG permite fermentar masa de maíz pigmentado nixtamalizado logrando una concentración para cada bacteria de 10^8 UFC/g_{masa}.

Se logró conservar la viabilidad de las BAL en la masa fermentada al ser empacada en bolsas al vacío y refrigeradas a 4°C por un periodo de 30 días.

El alimento funcional conserva los compuestos fenólicos que le otorgan capacidad antioxidante.

Al formular el alimento funcional con la masa fermentada y la pulpa de tamarindo no se logró conservar la viabilidad de las BAL.

La pulpa de guayaba aumenta la actividad antioxidante del alimento funcional en comparación con la pulpa de tamarindo y permite conservar la viabilidad de los probióticos, resultando ésta la mejor formulación para el alimento funcional.

Se determinó que la vida de anaquel del tipo de maíces pigmentados criollos utilizados es de un máximo de 6 meses.



9 Bibliografía

- Abdel-Aal, E., y Hucl, P. (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350–354. doi:10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Agropecuarias, C. (2013). Las variedades criollas del maíz, los mercados especializados y las estrategias de vida de los productores. In *Claridades Agropecuarias* (pp. 3–6). México, D.F.: ASERCA.
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B. E., y Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública Y Nutrición*, 3(3).
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (W. Horwitz, Ed.) (18th ed.). Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- Beltran, F. J., Bockholt, A. J., y Roodey, L. W. (2001). Blue corn. In C. P. LLC (Ed.), *Specialty Corns* (2nd ed., pp. 293–301). Boca Raton, FL, USA: A R Hallauer.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Camacho-Hernández, I. L., Navarro-Cortez, R. O., Aguilar-Palazuelos, E., Zazueta-Morales, J., Valenzuela, V. L., y Gallegos-Infante, J. A. (2011). Cambios de color y antocianinas en una botana de tercera generación elaborada por extrusión a partir de harina de maíz azul y almidón de maíz. In *Memorias del Smposium Internacional sobre tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento de Maíz*.
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Serna-Saldivar, S. O., y Talcott, S. T. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays L.*) products. *Food Research International*, 39(6), 696–703. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.014
- Díaz-Ruiz, G.; Guyot, J. P.; Ruiz-Teran, F.; morlon-Guyot, J. and Wachter, C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria : a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol , a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4367–4374. doi:10.1128/AEM.69.8.4367
- Domínguez, M., y Schätzthauer, M. (2005). Desarrollo de una bebida fermentada a base de maíz utilizando bacterias probióticas. In *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* (Vol. 2).



- Duran, S.; Rodríguez, M.; Córdón, K.; Record, J. (2012). Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4), 203–206.
- Escamilla-Hurtado, M. L., Valdés-Martínez, S. E., Soriano-Santos, J., Gómez-Pliego, R., Verde-Calvo, J. R., Reyes-Dorantes, A., y Tomasini-Campocosio, A. (2005). Effect of culture conditions on production of butter flavor compounds by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in semisolid maize-based cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 305–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.014
- Espinosa Trujillo, E., Mendoza Castillo, M. C., y Castillo González, F. (2006). Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29, 19–23.
- FAO/Latin Foods. (2013). *Tabla de composición de alimentos de America Latina*.
- García-Ruiz, A.; Bartolomé, B.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; moreno-Arribas, M. V. (2007). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19, 835–841.
- Gómez, S., Nova, E., y Marcos, A. (2008). Probióticos. In *Alimentos funcionales. aproximación a una nueva alimentación* (pp. 90–103). Madrid, España.
- Lee, H.; Jenner, M.; Seng Low, C. and Lee, Y. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157, 876–884.
- Moran-Bañuelos, S. H.; Jiménez-Pérez, C.; Ramíre-Romero, G. (2012). Conservación de antocianinas en la cadena Zea mays L.-tortilla. *Revista Latinoamericana de Química*, 39 (suplem), 185.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., y Milán-Carrillo, J. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 502–508.
- Nava-Arenas, D. (2009). *Estudio de cambios estructurales y en algunos compuestos fenólicos durante la elaboración de tesgüino de maíz azul (Zea mays)*. Instituto Politécnico Nacional.
- Parkar, S.; Stevenson, D.; Skinner, M. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 295–298.
- Pérez-Lara, M. C. (2011). *Estudio de la viabilidad de Lactobacillus casei Shirota en una gelatina de pitaya (Stenocereus griseus H.)*. Instituto Politécnico Nacional.



- Ramos, E., Romeo, J., Wärberg, J., y Marcos, A. (2008). ¿Más que un alimento? In *Alimentos funcionales. aproximación a una nueva alimentación* (pp. 32–45). Madrid, España.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., y Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7.
- Restrepo-Sánchez, D.; Narváez-Cuenca, C. y Restrepo-Sánchez, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517–1522.
- Salinas Moreno, Y., Cruz Chávez, F. J., Díaz, S. A., y Castillo, F. (2012). Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 33–41.
- Salinas Moreno, Y.; Martínez-Bustos, F.; Soto-Hernández, M.; Ortega-Paczka, R.; Arellano-Vázquez, J. L. (2003). Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia*, 37, 617–628.
- Salinas Moreno, Y.; Rubio Hernandez, D. y Díaz Velázquez, A. (2005). Extracción y usos del pigmento de maíz (*Zea mays*) como colorante en yogur. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(3).
- Sánchez, G. J. J. (2011). Diversidad del Maíz y el Teocintle. In *Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Serna-Saldivar, S. O.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Mora-Rochin, S. and García-Lara, S. (2013). Potencial nutracéutico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3-A), 295–304.
- Serrano-Maldonado, M. J. (2010). *Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Simmering, R., y Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics--the tasty guardian angels? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 19–28.
- Sunanda, S.; Veena, G. (2014). No Title Antidiabetic, antidyslipidemic and antioxidative potential of methanolic root extract of stevia rebaudiana (bertoni) on alloxan induced diabetic mice. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(7), 1859–1872.



Viniegra, G. (2009). Escenarios para el maíz en México. In *Temas selectos de la cadena maíz-tortilla. Un enfoque multidisciplinario* (pp. 55–64). México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Vrese, M., y Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. In Ulf Stahl · Ute E.B. Donalies · Elke Nevoigt (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (pp. 1–66). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.



10 Apéndice

10.1 Curva de ácido gálico

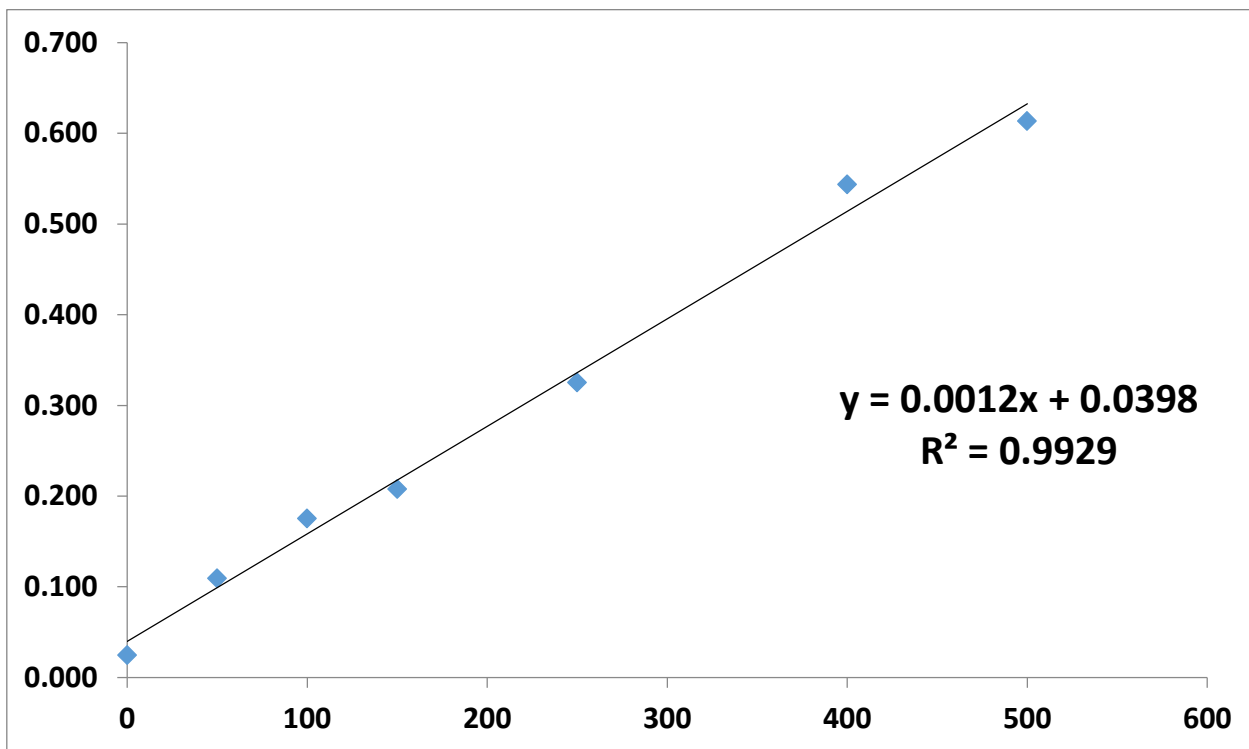


Gráfico 1A Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Tabla 1A Datos para la curva estándar de ácido gálico.

Ácido gálico [mg/L]	abs
0	0.024
50	0.109
100	0.175
150	0.208
250	0.325
400	0.543
500	0.613