

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE DE ZEÍNAS
EXTRAÍDAS DE MAÍZ BLANCO Y NEGRO NIXTAMALIZADO
Y SIN NIXTAMALIZAR, EMPLEANDO RATONES CON
HIPERCOLESTEROLEMIA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS**

P R E S E N T A :

IBQ. IRMA ELIZABETH RAMOS PÉREZ

**DIRECTORES: DRA. LETICIA GARDUÑO SICILIANO
DRA. CRISTIAN JIMÉNEZ MARTÍNEZ**



México, D.F.

DICIEMBRE 2010

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Química de Alimentos del Departamento de Ingeniería Bioquímica y en el laboratorio de Toxicología Preclínica del Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Leticia Garduño Siciliano y la Dra. Cristian Jiménez Martínez.

También, se contó con el apoyo económico del Instituto Politécnico Nacional a través del proyecto SIP 20100151, con el título: Determinación de la actividad antioxidante “in vivo” e “in vitro” de las zeínas de maíz nixtamalizado.

	Página
I. Índice General	V
II. Índice de Cuadros	viii
III. Índice de Figuras	ix
IV. Resumen	xi
V. Abstract	xii

I. INDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Dislipidemias	1
1.2. Dislipidemias en México	3
1.3. Estrés oxidativo	4
1.3.1. Generación <i>in vivo</i> de especies reactivas de oxígeno y mecanismos de defensa antioxidante	5
1.4. Estrés oxidativo y enfermedades	8
1.4.1. Estrés oxidativo y desarrollo de afecciones cardiovasculares	9
1.4.2. Estrés oxidativo y desarrollo de aterosclerosis	10
1.5. Los cereales	13
1.6. Maíz	13
1.6.1. Consumo de maíz en México	15
1.6.2. Diversidad del maíz en México	16
1.6.3. Composición química	18
1.6.4. Maíz como alimento funcional	20
1.6.5. Zeínas	21
2. Justificación	25
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
5. Diagrama de flujo	27
6. Materiales y métodos	28
6.1. Materiales	28
6.1.1. Material biológico	28
6.1.2. Material de laboratorio y equipo	28
6.2. Métodos	29
6.2.1. Acondicionamiento de los grano de maíz	29
6.2.2. Proceso de nixtamalización	30
6.2.3. Análisis químico proximal	30
6.2.4. Determinación de compuestos fenólicos totales	31
6.2.5. Extracción de zeínas por el método de Dickey <i>et al.</i> 1998	32
6.2.6. Electroforesis (SDS-PAGE)	33
6.2.7. Determinación de la capacidad antioxidante	33
6.2.7.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	33
6.2.7.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el	35

método del radical catiónico ABTS• ⁺	
6.2.8. Determinación de la actividad hipolipemiente de zeínas	37
6.2.9. Análisis estadístico	40
7. Resultados	41
7.1. Análisis químico proximal	41
7.2. Compuestos fenólicos totales	42
7.3. Electroforesis (SDS-PAGE) de los extractos de zeína	43
7.4. Evaluación de capacidad antioxidante	44
7.5 Actividad hipolipemiente de zeínas	45
7.5.1. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta normal	45
7.5.1.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR	45
7.5.1.2. Triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR	46
7.5.1.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR	47
7.5.1.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR	48
7.5.1.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR	49
7.5.1.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR	50
7.5.2. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta hipercolesterolémica	51
7.5.2.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR	51
7.5.2.2. Triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR	52
7.5.2.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR	53
7.5.3.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR	54
7.5.2.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR	56
7.5.2.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR	57
8. Discusión de resultados	58
8.1. Análisis químico proximal	58
8.2. Compuestos fenólicos totales	61
8.3. Electroforesis (SDS-PAGE) de los extractos de zeína	62
8.4. Evaluación de capacidad antioxidante	62
8.5 Actividad hipolipemiente de zeínas	64
8.5.1. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta normal	64
8.5.1.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR	64
8.5.1.2. Triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR	65
8.5.1.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR	66
8.5.1.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR	67
8.5.1.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR	68

8.5.1.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR	68
8.5.2. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta hipercolesterolémica	69
8.5.2.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR	69
8.5.2.2. Triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR	70
8.5.2.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR	71
8.5.3.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR	72
8.5.2.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR	73
8.5.2.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR	73
8.6. Corolario	74
9. Conclusiones	75
10. Referencias bibliográficas y electrónicas	76
11. Anexo	84
11.1. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de compuesto fenólicos totales	84
11.2. Curva tipo de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS ^{•+}	85

II. ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1.	Condiciones clínicas que implican las especies reactivas y radicales libres	9
2.	Composición química proximal promedio de las partes del grano de maíz (%)	20
3.	Equipo de laboratorio y especificaciones	29
4.	Identificación de lotes de maíz	30
5.	Formulación de la dieta hipercolesterolémica	38
6.	Distribución de ratones para estudio de perfil lipídico	39
7.	Composición química proximal de maíz blanco (MB) y negro (MN) sin nixtamalizar (S) y nixtamalizado (N)	41
8.	Evaluación de la capacidad antioxidante de zeínas extraídas de los maíces blanco y negro, nixtamalizado y sin nixtamalizar	44

III. INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Oxidación de LDL y formación de las células espumosas	12
2. Planta de maíz	14
3. Principales estructuras del grano de maíz	15
4. Consumo per capita de maíz en México durante el periodo de 1995-2005	16
5. Diagrama de flujo del trabajo experimental	27
6. Reacción química del reactivo de Folin	31
7. Reacción del DPPH con un compuesto antioxidante	34
8. Generación del radical catiónico ABTS ^{•+}	36
9. Concentración de compuestos fenólicos totales en extractos etanólicos de zeínas de maíz blanco y negro con y sin nixtamalización	42
10. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de zeínas extraídas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar por el método de Dickey <i>et al.</i> , 1998	43
11. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de colesterol total sérico en ratones macho ICR con dieta normal.	46
12. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR con dieta normal.	47
13. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-HDL séricas en ratones macho ICR con dieta normal.	48
14. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-LDL sericas en ratones macho ICR con dieta normal.	49
15. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de glucosa en ratones macho ICR con dieta normal.	50
16. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre el peso relativo de hígado en ratones macho ICR con dieta normal.	51
17. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de colesterol total sérico en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	52

18.	Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	53
19.	Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-HDL séricas en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	54
20.	Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-LDL séricas en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	55
21.	Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de glucosa en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	56
22.	Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre el peso relativo de hígado en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.	57
23.	Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales	84
24.	Curva tipo de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de radical catiónico ABTS ^{•+}	85

IV. RESUMEN

La dislipidemia es uno de los factores determinantes en el desarrollo de la aterosclerosis, que asociados con el estrés oxidativo (EO) juega un papel importante en la iniciación y progreso de disfunciones cardiovasculares; para contrarrestar sus efectos nocivos, la dieta juega un papel importante, al incluir alimentos ricos en compuestos bioactivos. Los cereales, forman parte de la nutrición de millones de personas, además de ser fuente de energía suministran componentes como proteínas, lípidos, carbohidratos y metabolitos con actividad antioxidantes, por lo que han sido clasificados como alimentos funcionales, ya que además de nutrir, ayudan en la prevención de enfermedades. Dentro de este grupo se encuentra el maíz (*Zea mays*) que entre otros componentes, presenta una alta concentración de proteínas, compuestos fenólicos (antocianinas y/o carotenoides). Las zeínas son las proteínas mayoritarias del maíz, y han sido utilizadas en la industria de los alimentos como aditivos para evitar la oxidación. En este trabajo se propuso la evaluación de la actividad antioxidante y/o hipolipemiante de las zeínas en un sistema biológico, administradas como suplemento de la dieta.

Para la obtención del extracto etanólico de zeínas se utilizaron 2 variedades de maíz criollo de la región de Tulancingo, Hidalgo. Una variedad blanca (MB) y una variedad negra (MN). Cada variedad se dividió en dos grupos: el primero fue molido sin procesar y el segundo se sometió a tratamiento térmico alcalino (nixtamalización); después del proceso correspondiente, a las harinas de los 4 lotes (MBS, MBN, MNS y MNN) se les realizó el análisis químico proximal, obteniendo que la nixtamalización modificó su composición proximal. Posteriormente, partiendo de las harinas desgrasadas, se realizó la extracción de zeínas en solución etanólica, a los que se les determinó compuestos fenólicos totales. La evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS^{•+} y por el método de DPPH de los extractos etanólicos de zeínas, mostró que el lote MNN, fue el de mayor actividad.

Para la evaluación biológica de los extractos de zeínas, se utilizaron 2 grupos de ratones: un modelo normolipidémico y uno hipercolesterolémico, a los cuales se administraron los extractos liofilizados de zeínas correspondientes a cada variedad y proceso. Aunque ello no provocó un efecto hipolipemiante homogéneo, los grupos administrados con extractos liofilizados de MBN tuvieron los mejores resultados en ambos modelos. La realización de este trabajo, puede servir como parte aguas para realizar futuros trabajos, en los que se sustituyan los extractos liofilizados de zeínas por hidrolizados de zeínas o adicionándolos a la dieta.

V. ABSTRACT

Dyslipidemia is one of the determining factors in the development of atherosclerosis, which is associated with oxidative stress (OS) it represent an important role in the initiation and progression of cardiovascular dysfunction; to prevent harmful effects, Diet plays an important role which include foods rich in bioactive compounds. Cereals, are part of the nutrition of millions of people, besides they are a source of energy supplying components such as proteins, lipids, carbohydrates and metabolites with antioxidant activity, so they have been classified as functional foods, because in addition to providing nutrients can help prevent disease. Within this group there is corn seed (*Zea mays*), which among other components, have a good concentration of proteins, phenolic compounds (anthocyanins and / or carotenoid). The zeins are the majority proteins of corn, and they have been used in the food industry as additives to prevent oxidation. The aim of present work is the evaluation of antioxidant activity and/or lipid-lowering capability of zein like a biological system, administered as a dietary supplement.

To obtain the ethanolic zein extract there were used 2 varieties of maize from the region of Tulancingo, Hidalgo. A white corn variety (WV) and a black corn variety (BV). Each variety was divided into two groups: the first was raw ground and the second was subjected to alkaline cooking, then to the corresponding process. For obtain the meals of the 4 batches: white corn variety raw (WCR), white corn variety nixtamalized (WCN), black corn variety raw (BCR) and black corn variety nixtamalized (BCN) were subjected to proximal chemical analysis, concluding that the proximal composition changed.

Zeins were extracted in ethanolic solution starting from the defatted meal, In these extracts were determined total phenolic compounds. Evaluation of antioxidant activity of zein ethanolic extracts was obtained by the method of radical cation ABTS • + and DPPH method showed that BCN was the best .

For biological evaluation of zein extracts, were used 2 groups of mice: one of them, a model normolipidemic and the hypercholesterolemic one. In the both cases there were administered freeze-dried extracts of zein for each raw and nixtamalized corn. Although the lipid lowering effect was not homogeneous, the groups dosed with freeze-dried extracts of WCN had the best results in both models. The completion of this work can serve as a watershed moment for future work, in which freeze-dried extracts are replaced by hydrolyzed zein in or additions to the diet to test its biological effect.



1. Introducción

1.1. Dislipidemias

El término dislipidemia se designa a la alteración de los lípidos plasmáticos que incluyen la elevación del colesterol total y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (col-LDL), con aumento de la trigliceridemia y descenso del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) (Carmena y Ordovás, 1999).

Las dislipidemias son enfermedades asintomáticas, detectadas por concentraciones sanguíneas anormales de colesterol, triglicéridos y/o col-HDL y son un factor causal de la aterosclerosis. Su aterogenicidad se debe, principalmente, a dos mecanismos: a) al cúmulo en el plasma de lipoproteínas que contienen la apoproteína B, con capacidad de alterar la función del endotelio y depositarse en las placas de ateroma y b) a la concentración insuficiente de col-HDL que protegen del desarrollo de la aterosclerosis (Aguilar-Salinas *et al.*, 2004).

Actualmente se conoce que los principales factores de riesgo para el desarrollo de dislipidemias, además de elevación de col-LDL y triglicéridos séricos, también son: una historia familiar de enfermedades cardiovasculares, índice de masa corporal elevado (sobrepeso y obesidad), presencia de hipertensión arterial, tabaquismo positivo, vida sedentaria y falta de actividad física. (Kanani y Sperling, 2002).

Los hábitos dietéticos y ambientales son considerados proaterogénicos, ya que ejerce sus efectos negativos preferencialmente en aquellos sujetos que están genéticamente predispuestos. Esta predisposición puede deberse a una respuesta aumentada a los factores ambientales o a una incapacidad de mantener la homeostasis ante situaciones de estrés metabólico (Carmena y Ordovás, 1999).

Las dislipidemias pueden ser clasificadas según su etiopatogenia, por una causa primaria o genética o ser secundarias a otras patologías o factores ambientales (Ministerio de salud de Chile, 2000).

Dislipidemias primarias: Se denominan dislipidemias primarias a las elevaciones exclusivas del colesterol plasmático (debidas al aumento de col-LDL), que no se acompañan de elevaciones de los triglicéridos y que se deben a causas genéticas. En el grupo de dislipidemias primarias se encuentran la hipercolesterolemia



familiar, que es una enfermedad hereditaria autosómica dominante debida a mutaciones del gen receptor de LDL, que codifica una glucoproteína fundamental para el aclaramiento del col-LDL plasmático (Bakic, 2007). Hipercolesterolemia poligénica, sus mecanismo patogénicos aún no son bien conocidos, parece que existe una heterogeneidad de las LDL, que altere su reconocimiento y unión al receptor, lo que dificultaría su aclaramiento plasmático y conllevaría su elevación (Carmena y Ordóvas, 1999). Hiperlipidemia familiar combinada, es un síndrome dislipidémico en el que los sujetos afectados pueden presentar elevación de LDL, de VLDL o de ambas lipoproteínas a la vez, mientras que la concentración de col-HDL se encuentra frecuentemente por debajo de lo normal (Goldstein *et al.*, 1973).

Dislipidemias secundarias: Se denominan dislipidemias secundarias a aquellas alteraciones de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas producidas por enfermedades, situaciones fisiológicas o factores externos capaces de alterar el metabolismo lipoproteico. El espectro de enfermedades y procesos que pueden causar o asociarse con una dislipidemia secundaria es muy amplio (Carmena y Ordovás, 1999).

Dentro de las principales causas de alteraciones adquiridas en los lípidos, se mencionan cuatro grupos principalmente (las cuatro D):

- Dieta: Imbalance entre la ingestión y el gasto calórico, el sedentarismo y dietas ricas en grasas saturadas contribuyen a las alteraciones lipídicas.
- Drogas (Fármacos): Medicamentos que tienen la capacidad de alterar el perfil lipídico.
- Desórdenes del metabolismo
- Desórdenes sistémicos (enfermedades) (Ramírez, 2005).

Los desordenes metabólicos y enfermedades constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de dislipidemias. Tal es el caso de:

Síndrome metabólico: Este síndrome esta caracterizado por un conjunto de factores metabólicos de riesgo en un individuo, que incluyen obesidad abdominal, dislipidemia, presión arterial elevada, resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, estado protrombótico y estado proinflamatorio (www.heart.org, 2010).



Hiperuricemia y gota: Existe una asociación entre la dislipidemia y la gota, con aumento de los triglicéridos plasmáticos e incremento de las VLDL. También se ha establecido que la hiperuricemia representa un factor de riesgo coronario, pero no sólo se asocia a la hiperlipemia, sino también a la hipertensión arterial y obesidad (Gibson *et al.*, 1979).

Hipotiroidismo: Es el resultado de un desorden endocrino debido a la deficiencia de la hormona tiroidea. En el curso del hipotiroidismo aparece precozmente una alteración de los receptores LDL, y debido a ello una disminución del catabolismo de dichas partículas conduce a su elevación en plasma, aumento de las LDL y del colesterol (Ascaso *et al.*, 1986, Bharaktiya *et al.*, 2010).

Enfermedades renales: Síndrome nefrótico; la dislipidemia es una manifestación habitual de este padecimiento, caracterizado por la elevación variable de los niveles de VLDL y LDL, lo que determina colesterol sérico elevado, aisladamente o con un aumento simultáneo de los triglicéridos. Insuficiencia renal crónica; la dislipidemia de la insuficiencia renal crónica se caracteriza por hipertrigliceridemia con aumento del contenido en triglicéridos de las VLDL y LDL, por descenso de la actividad de la lipasa hepática (LH) (Delfante, 2009; Santiváñez, 2008).

Dislipidemia diabética: Es la asociación de hipertrigliceridemia por aumento de VLDL, concentraciones de col-HDL inferiores a las normales y predominio en el plasma de partículas LDL pequeñas y densas, generalmente con elevación del col-LDL. La diabetes se asocia con un riesgo cardiovascular entre dos y cuatro veces superior al observado en la población general, y la dislipidemia es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular del diabético (Carmena y Ordóvas, 1999).

1.2. Dislipidemias en México

En México las dislipidemias son uno de los factores determinantes de la aterosclerosis más frecuentes (Aguilar-Salinas, 2005).

En el año 2000 se reportó una prevalencia nacional, en adultos mayores de 20 años, de 30.05% con hipertensión arterial sistémica, 10.7% con diabetes mellitus tipo 2 y 24.4% con obesidad; actualmente estas enfermedades tienen mayor



riesgo de mortalidad o complicaciones cuando se asocian a dislipidemias. En México, los valores promedio del colesterol presentan diferencias significativas entre las distintas zonas geográficas, como también entre diferentes niveles socioeconómicos de la población. Existe mayor prevalencia de hipercolesterolemia en los estratos socioeconómicos medios y altos, en la población del norte del país y a mayor edad. La prevalencia global de hipercolesterolemia es del 23.6% (Martínez-Hernández *et al.*, 2006).

De acuerdo con datos del Sistema Nacional de Información en Salud, en el año 2008 la diabetes mellitus era la primera causa de muerte con 14%, en segundo lugar se encontraban las enfermedades isquémicas del corazón con 11.1%, en tercer lugar las enfermedades cerebrovasculares con 5.6% y en séptimo lugar las enfermedades hipertensivas con 2.9% de las defunciones y en total representan un 33.6% del total de causas de muerte en nuestro país (www.sinais.salud.gob.mx, 2010).

En recientes investigaciones se ha informado que el riesgo cardiovascular promovido por la dislipidemia se asocia a un aumento de los marcadores de estrés oxidativo, posiblemente relacionado con la producción de radicales libres y de óxido nítrico (Pastromas *et al.*, 2008).

1.3. Estrés oxidativo

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos que lo utilizan. Este elemento desempeña una función importante como aceptor final de electrones durante la respiración celular y para la obtención de energía, pero también constituye el punto de partida para un daño celular conocido como estrés oxidativo (EO) (Pérez *et al.*, 2000, Elejalde, 2001). Si bien más del 95% del oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido completamente a H₂O durante la respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje (< 5%) es convertido a especies semireducidas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lindsay y Astley, 2002). Estas especies provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. No obstante, el



organismo tiene sus propios mecanismos de defensa antioxidante, pero en determinadas situaciones la defensa antioxidante puede ser ineficiente por la excesiva generación de EROS (Lee *et al.*, 2004).

El término estrés oxidativo se refiere a un severo desequilibrio entre la producción de especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante de un organismo, mismo que se ve desplazado a favor de las especies oxidantes.

El estrés oxidativo puede ser resultado de:

1. Disminución de los niveles de antioxidantes, ocasionados por: mutaciones que afectan la actividad de las enzimas antioxidantes (ej. CuZnSOD o Glutatión peroxidasa, o toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes. Por ejemplo; muchos xenobióticos (Xn) son metabolizados por conjugación con GSH, pero en altas dosis pueden ocasionar una disminución en los niveles de GSH ocasionando estrés oxidativo, inclusive si el Xn por si mismo, no es generador de especies reactivas. Dietas deficientes en minerales (ej. Zn^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Se) y/o antioxidantes también pueden ser causantes de EO.

2. Incremento en la producción de especies reactivas, causadas por: exposición de las células u organismos a concentraciones elevadas de O_2 o a otras sustancias tóxicas que por si mismas sean especies reactivas (ej. NO_2^*) o al ser metabolizadas generan especies reactivas (ej. Paraquat) o por la continua activación de los sistemas que de forma natural generan especies reactivas (ej. Inapropiada activación de los fagocitos en procesos inflamatorios crónicos) (Halliwell y Whiteman, 2004).

1.3.1. Generación *in vivo* de especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante

Las EROS y los radicales libres (RL) son moléculas o especies químicas capaces de aceptar electrones debido a que poseen uno o más electrones desapareados, lo que les hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxido-reducción.



Los procesos fisiológicos normales del organismo generan *per se* cierta tasa de sustancias oxidantes (Beckman y Ames, 1998; Lee *et al.*, 2004) las principales fuentes endógenas de especies oxidantes y radicales libres en el organismo son:

a) Generación de especies reactivas durante la respiración mitocondrial

En la formación de ATP a través del metabolismo oxidativo y transporte electrónico mitocondrial el O₂ se reduce normalmente hasta agua siguiendo la vía tetravalente. Es decir, en cada una de las etapas se transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial no es 100% eficiente y la reducción monoelectrónica del oxígeno genera O₂^{•-}. La dismutación espontánea y enzimática del O₂^{•-} da lugar a la formación de H₂O₂ y tanto el O₂^{•-} como el H₂O₂, pueden generar radicales [•]OH a través de reacciones de Fenton catalizadas por metales de transición. Por lo tanto, se estima que en condiciones fisiológicas normales entre el 1 y el 3% del oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres y EROS.

b) Reacciones en cadena de peroxidación lipídica

Los radicales libres y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado generando un radical lipídico (R[•]), el cual puede reaccionar con O₂ dando lugar a un radical peroxilo (ROO[•]). Los radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos, generando así nuevos radicales lipídicos (R[•]) e hidroxiperóxidos lipídicos (ROOH). Estos últimos se descomponen en radicales alcoxilo (RO[•]) y peroxilo (ROO[•]) contribuyendo a la propagación del daño oxidativo. Esta descomposición se ve facilitada por la exposición a luz ultravioleta o por la presencia de iones metálicos, a través de reacciones de Fenton. Así, metales de transición como el hierro y el cobre son capaces de acelerar la iniciación y propagación del proceso de peroxidación lipídica por el siguiente mecanismo:

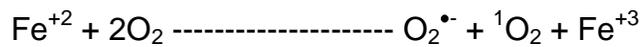




Los metales pueden descomponer los hidroperóxidos lipídicos generando radicales peroxilo y alcoxilo, acelerando las reacciones en cadena.



Los metales están implicados en la generación del oxígeno singlete, pudiendo además reaccionar con peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxilo (Leet *et al.*, 2004).



Existen además otros estímulos exógenos que incrementan la generación de EROS. Entre ellos cabe destacar diversos tipos de radiación, contaminantes ambientales, actividad física intensa, metabolización de fármacos, humo del tabaco, acción de células del sistema inmunológico, o dietas deficientes en antioxidantes (Beckman y Ames, 1998).

Para contrarrestar los efectos nocivos de las EROS el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante integrados por mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos o no enzimáticos. En los mecanismos enzimáticos se encuentran presentes algunas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) (Maritim *et al.*, 2003). Mientras que los mecanismos no enzimáticos se incluyen a las vitaminas A, C y E, glutatión, ácido α -lipoico, carotenoides, algunos minerales como el cobre, zinc y selenio, coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) y cofactores como ácido fólico, ácido úrico, albúmina y vitaminas B₁, B₂, B₆ y B₁₂ (Vega-López *et al.*, 2004).

Las EROS tanto de fuentes endógenas como exógenas están involucradas en la etiología de diversas enfermedades. La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el EO, ya que dietas ricas en frutas, vegetales y cereales están asociadas a la reducción de riesgo en el padecimiento de estas enfermedades, por el aporte de péptidos, vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Prior, 2003).



1.4. Estrés oxidativo y enfermedades

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación (reducción). Este proceso es esencial para la vida pues participa en muchos de los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo, que es un mecanismo complejo en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro (Elejalde, 2001). En la actualidad muchos procesos patológicos y el envejecimiento (Cuadro 1) han sido atribuidos al ataque de ERO o que estos estuvieran implicados en algunas de las fases o secuencias bioquímicas (Ballester, 1996).

En el envejecimiento es difícil diferenciar entre lo que son los procesos propios o procesos patológicos, una teoría de los ERO del envejecimiento supone una acumulación de lesiones orgánicas debidas a estas especies, así como menor actividad proteolítica que en células jóvenes, disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas antioxidantes y acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Harman, 1993).

En relación con las patologías asociadas con el EO, la oxidación de lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL) ha sido implicada en el desarrollo de la aterosclerosis (Abuja y Albertini 2001). El daño oxidativo a proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, reacciones de oxidación catalizadas por metales que inducen uniones entre residuos de aminoácidos en las cercanías de los sitios de unión con metales, reacción con aldehídos, uniones cruzadas entre proteínas y la fragmentación de péptidos (Beckman y Ames, 1998). Estas lesiones en las proteínas pueden introducir modificaciones, capaces de afectar la función de receptores, enzimas, proteínas transportadoras e incluso generar nuevos antígenos capaces de desencadenar la respuesta inmune (Halliwell y Whiteman, 2004). Los ácidos nucleicos son susceptibles al daño oxidativo, el cual incluye modificaciones en las bases nitrogenadas, formación de aductos entre bases y azúcares, uniones entre timina y tirosina, rupturas en la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Beckman y Ames, 1998). Si el EO es excesivo y los



sistemas de reparación del ADN son superados, estas modificaciones pueden conducir a la mutagénesis y carcinogénesis (Lee *et al.*, 2004).

CUADRO 1. Condiciones clínicas que implican especies reactivas y radicales libres

TEJIDO/SISTEMA/ORGANO	PATOLOGÍAS
Tracto gastrointestinal	Hepatitis, lesiones hepáticas
Ojos	Cataratas, daño a la retina
Piel	Dermatitis, pigmentos del envejecimiento
Dientes	Periodontitis
Articulaciones	Artritis
Sistema circulatorio	Aterosclerosis, ataques al corazón
Sistema respiratorio	Asma, hiperoxia
Sistema endocrino	Diabetes, pancreatitis
Sistema nervioso	Ictus, Parkinson, Alzheimer, demencia senil
Fallo multiorgánico	Cáncer

Fuente: Beckman y Ames ,1998; Meydani 2000; Lee et al., 2004.

1.4.1. Estrés oxidativo y desarrollo de afecciones cardiovasculares

El estrés oxidativo juega un papel importante en la iniciación y progreso de disfunciones cardiovasculares asociadas con enfermedades tales como aterosclerosis, hiperlipidemia, diabetes mellitus, hipertensión, cardiopatía isquémica e infarto agudo del miocardio (Taniyama y Griendling, 2003).

En padecimientos como la cardiopatía isquémica existen cambios enzimáticos, entre los que destaca la enzima xantina deshidrogenasa (XDH), predominante en el endotelio, con la función de depurar las xantinas mediante la formación de ácido úrico; como consecuencia de la isquemia esta enzima es oxidada y genera el radical O_2^{\bullet} , a partir del cuál se desatan una serie de reacciones que favorecen la formación de especies tóxicas que pueden perpetuar el daño oxidativo a la pared vascular y al miocardio (Delgado *et al.*, 2002).

Por otra parte, estudios clínicos han demostrado que en pacientes con hipertensión arterial (HTA) se producen cambios en los indicadores bioquímicos



que evidencian una situación de EO. Se presenta un aumento en los valores de los indicadores de daños a biomoléculas, así como disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total (Cruz *et al.*, 2004).

1.4.2 Estrés oxidativo y desarrollo de aterosclerosis

El término aterosclerosis se usa para denotar estados patológicos que tienen en común el engrosamiento y pérdida de la elasticidad de la pared arterial. Consiste en el depósito de sustancias grasas, como el colesterol y triglicéridos en las paredes de las arterias formando la capa aterosclerótica (Tortora y Anagnostak, 1981).

El colesterol y otros lípidos, como los triglicéridos, son transportados a través de la sangre por unas partículas esféricas llamadas lipoproteínas, las cuales son polipéptidos lipoprotéicos que se combinan en concentraciones variables con fosfolípidos, triglicéridos y colesterol, para formar complejos estables conocidos como lipoproteínas. Se distinguen 5 clases que se clasifican por sus propiedades físicas: quilomicrones (partículas lipídicas de gran tamaño y baja densidad), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Henry, 1997; Davidsohn y Bernard, 1983). Siendo las LDL y HDL las más importantes en la detección de enfermedades.

Las lipoproteínas de baja densidad son las encargadas de transportar alrededor del 75% del colesterol por todo el organismo, y varían directamente con el nivel de grasa animal y colesterol de la dieta. Las LDL pueden depositarse en las arterias, favoreciendo el proceso de oxidación. Este proceso se lleva a cabo cuando las ERO, se liberan de manera natural durante los procesos bioquímicos del organismo, pero aumentan cuando el cuerpo está expuesto a toxinas, como por ejemplo al humo del tabaco (Henry, 1997; Davidsohn y Bernard, 1983).

Existe una evidencia creciente que el EO constituye a la disfunción vascular y al proceso aterosclerótico (Bittner *et al.*, 2005). Principalmente en situaciones en las que los niveles de EO son elevados, como sucede en hipercolesterolemia, hiperlipidemia, tabaquismo, niveles elevados de angiotensina II o cuadros



infecciosos, una amplia variedad de genes que responden a la oxidación pueden activarse y codificar la expresión de factores de crecimiento, quimiocinas y moléculas de adhesión (Delgado y Martínez, 2009).

En la hipercolesterolemia e hiperlipidemia existe una elevada concentración de lípidos en la sangre y principal causante de aterosclerosis (Kawase *et al.*, 2000).

En la actualidad se ha planteado la hipótesis de que la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de las lipoproteínas apoB contribuye a la aterogénesis. La idea fundamental es que las reacciones iniciadas por los RL en ácidos grasos poliinsaturados y el colesterol de las lipoproteínas llevan a la formación de diversos productos que modifican la apoB-100 y que actúan como agentes nocivos sobre células de la pared arterial (Carmena y Ordovás, 1999).

En condiciones de EO, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son oxidadas y como consecuencia de este evento los grupos lisina de la lipoproteína apoB-100 cuya carga neta es negativa, impiden que las LDL-oxidadas sean reconocidas, evitando su paso al interior de la célula (Stocker y Keaney, 2004). La forma modificada de LDL es reconocida por un receptor de membrana distinto del apoB-100, al que se le denomina *receptor scavenger*. Este se localiza fundamentalmente en macrófagos y células musculares lisas, aunque ha sido encontrado en otras como las endoteliales. Al no estar regulado, permite a la célula cargarse indefinidamente de colesterol y transformarse en células espumosas (Buitrago *et al.*, 2005). En la figura 1 se observa la formación de las células espumosas que ocasionan la pérdida de integridad funcional endotelial.

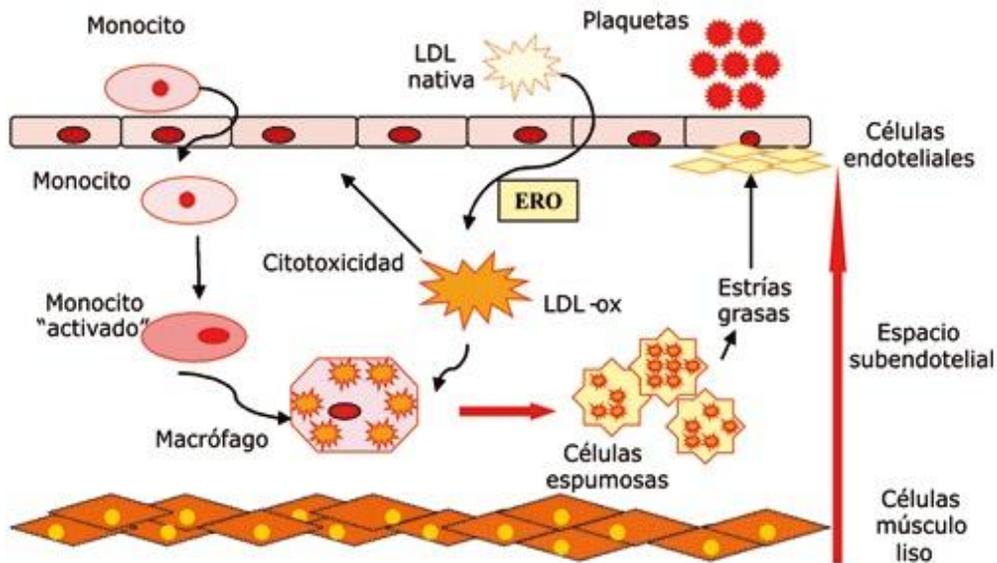


FIGURA 1. Oxidación de LDL y formación de las células espumosas

Fuente: Delgado y Martínez, 2009.

Las células espumosas son características de las lesiones ateroscleróticas y reciben su nombre por el aspecto vacuolado que presentan en preparaciones histológicas (Carmena y Ordovás, 1999).

El aumento de las células espumosas en la pared arterial contribuye al desarrollo del ateroma, reduciendo el diámetro de las arterias afectadas, contribuyendo a la patogénesis de la aterosclerosis, y por lo tanto la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Miquel y Ramírez, 2004).

La característica principal de los antioxidantes es su capacidad de atrapar los radicales libres. La mayoría de los compuestos antioxidantes de la dieta provienen de fuentes vegetales (frutas, vegetales y cereales) y están asociados a la disminución en el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas (Ames *et al.*, 1993).

Un alimento funcional es aquel que contiene un componente nutriente o no, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, que tienen un efecto fisiológico añadido por encima de su valor nutricional y cuyas acciones positivas justifican que pueda reivindicar su carácter funcional o incluso saludable. Según la concepción europea, el alimento funcional debe seguir siendo



en todo momento un alimento; es decir, es necesario que ejerza sus efectos benéficos consumido como tal, dentro de una dieta convencional y en la cantidad en la que habitualmente es ingerido (Silveira *et al.* 2003).

El término de alimento funcional también enfatiza la fuente vegetal que provee de compuestos que presentan un efecto de protección y/o prevención de enfermedades, así como efectos farmacológicos que modulan funciones terapéuticas en el cuerpo que resultan benéficas para la salud (Drago *et al.*, 2006). Los cereales tienen un alto contenido de compuestos nutricionales como almidones, proteínas y lípidos polares, con bajo contenido en grasas saturadas y relativamente ricos en ácidos grasos como el ácido linoléico, linolenico, tocoferoles y tocotrienoles que les confieren propiedades funcionales o de prevención de enfermedades (Zielinski y Kozowska, 2000).

1.5. Los cereales

La importancia de los cereales en la nutrición de millones de personas de todo el mundo es ampliamente reconocida. Debido a su ingesta relativamente elevada en los países en desarrollo, no se les puede considerar sólo una fuente de energía, sino que además suministran cantidades notables de proteínas (FAO, 1993).

En años recientes, los cereales han sido clasificados como alimentos funcionales porque proveen de fibra dietaria, proteínas, minerales, vitaminas, energía y antioxidantes requeridos para la mantener un estado saludable (Ötles y Cagindi, 2006). Entre los cereales más estudiados están el trigo, arroz, avena y maíz.

1.6. Maíz

El interés del maíz en la alimentación humana, además de ir unido a tradiciones y costumbres locales, se basa en cualidades alimenticias, culinarias y gastronómicas, sin nombrar las de economía, que lo hacen en extensas zonas del mundo y algunos países, el alimento más importante. Antes del descubrimiento de América, el maíz era la base de la alimentación de muchas comunidades indígenas, y aún en la actualidad persiste en la dieta del mexicano, degustando los platillos que con él se preparan (Museo Nacional de Culturas Populares, 1987).

El maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal (Agama *et al.*, 2004). El maíz es una planta herbácea, con raíz ramificada y un tallo centra con nudo y entrenudos (cañuto). De cada uno nace una hoja que envuelve parcialmente el entrenudo y después continua en forma libre. En la parte final del tallo aparece la inflorescencia masculina o espiga, productora del polen. Las mazorcas, generalmente una, en ocasiones dos y excepcionalmente tres, crecen a partir de los nudos de la parte media del tallo. De acuerdo con la raza, las mazorcas tienen de 8 a 16 hileras de granos y en cada una de ellas de 8 a 70 granos o semillas; algunas mazorcas llegan a tener mil o más granos (Museo Nacional de Culturas Populares, 1987). En la figura 2 se muestra la planta de maíz.

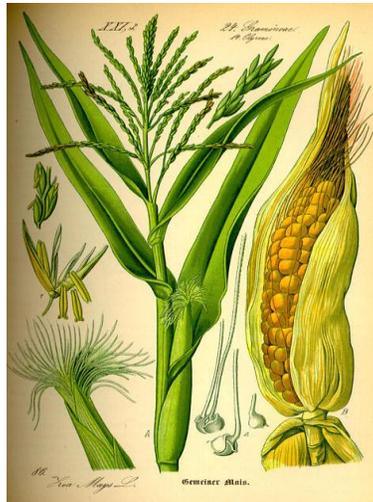


Figura 2. Planta de maíz
Fuente: www.mejoravegetal.criba.edu.ar

Su nombre común es Maíz; nombre científico: *Zea mays*, pertenece a la familia de las gramíneas y al género *Zea*. (www.infoagro.com, 2010).

El grano llamado botánicamente cariósipide es monocotiledón y se divide en tres partes fundamentales (Figura 3):

- 1) **Pericarpio:** Cubierta del fruto de origen materno, se le conoce como cascarilla. Se divide en epicarpio, mesocarpio y endocarpio. Las funciones primordiales del pericarpio son proteger al grano contra agentes bióticos

externos, impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir el agua y otros nutrientes durante la germinación. (Serna *et al.*, 1988b)

2) **Endospermo:** Representa del 82-84 % del peso seco del grano y su componente mayoritario son los carbohidratos. El endospermo es de dos tipos: vitreo y harinoso. El endospermo está cubierto por la capa de aleurona (Serna *et al.*, 1988b; Watson, 1987).

3) **Germen:** Compuesto por el axis embrionario y el escutelo que funciona como un órgano nutritivo para el embrión. Almacena nutrientes y hormonas, que son movilizadas por enzimas durante las etapas iniciales (Serna *et al.*, 1988b; Watson, 1987).

En la figura 3 se muestra un corte longitudinal del grano de maíz donde se muestran las estructuras principales.

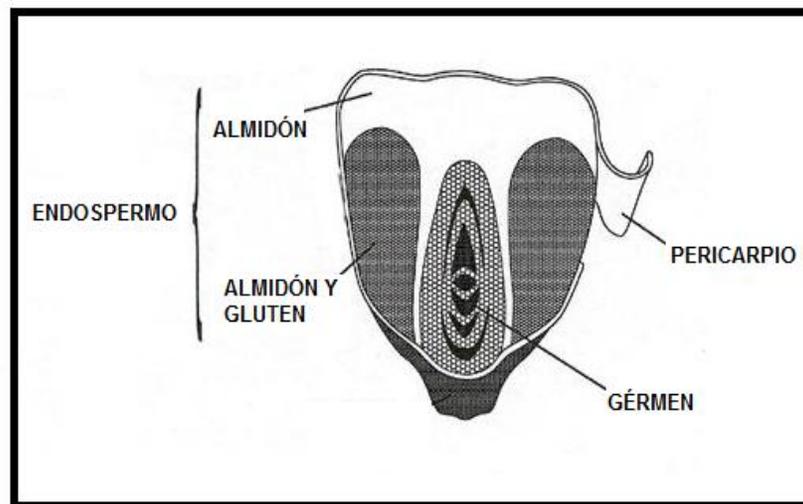


FIGURA 3. Principales estructuras del grano de maíz

Fuente: www.virtual.unal.edu.co

1.6.1. Consumo de maíz en México

Desde el punto de vista de la demanda del maíz, este grano se utiliza para consumo humano, para uso industrial y en la producción de alimentos balanceados. En México se consume principalmente en forma de tortilla, que se elabora a partir de masa de nixtamal. En varios estados de la República

Mexicana el cultivo constituye el sustento de muchas personas (Servicio de información agroalimentaria y pesquera, 2006).

En los últimos años el consumo de este cereal ha disminuido, en gran medida debido al incremento en los costos de producción, por aumentos en el precio de los insumos; lo cuál se ve reflejado en los precios altos del producto final, como son: granos, tortillas y masa. (Procuraduría agraria, 2003); y por otra parte, al cambio de hábitos alimenticios en la población, que prefiere consumir alimentos disponibles de manera rápida y fácil.

En la figura 4 se muestra la gráfica de consumo per capita de maíz en el periodo de 1995-2005, en el que es visible la tendencia a disminuir su consumo, sobre todo en el periodo de 2001 a 2005, en el que se presentó una disminución drástica, debido a la alza en el precio del maíz.

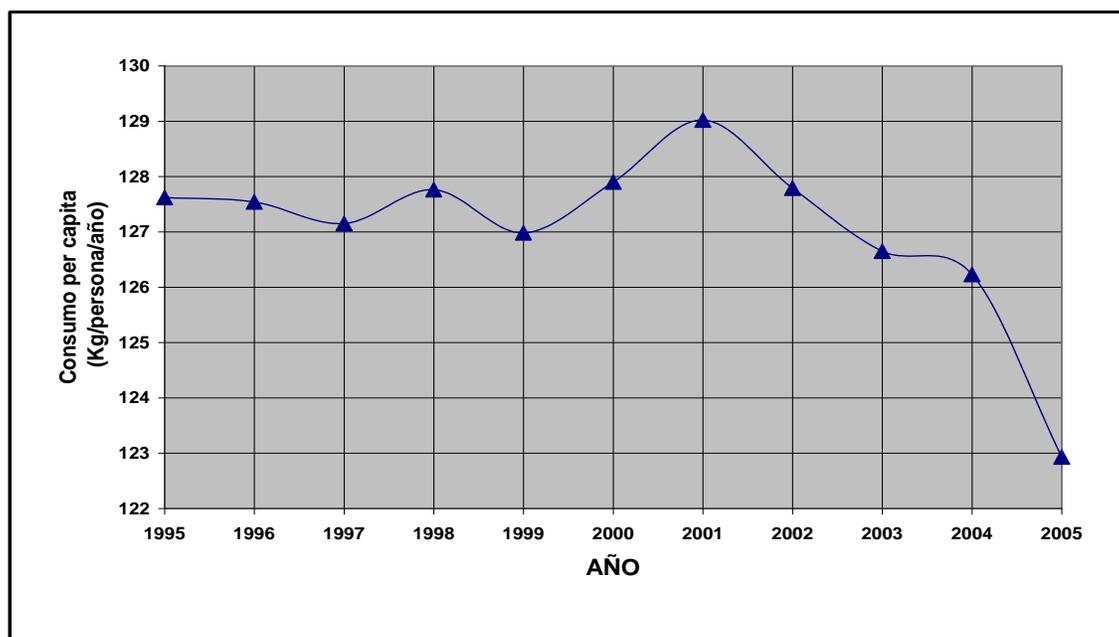


Figura 4. Consumo per capita de maíz en México durante el periodo de 1995-2005.

Fuente: FAO

1.6.2. Diversidad del maíz en México

Las variedades de maíz cultivadas para alimentación comprenden al maíz dulce y palomero, aunque también se utilizan el maíz dentado, amiláceo o harinoso y cristalino (FAO, 1993)



El maíz puede dividirse en diversas razas o grupos en función de la calidad, cantidad y composición del endospermo.

- **Maíz dentado (*Zea mays indentata*):** Tiene una cantidad variable de endospermo corneo (duro) y harinoso (suave). La parte córnea está a los lados y detrás del grano, mientras que la porción harinosa se localiza en la zona central y en la corona del grano. Se caracteriza por una depresión o “diente” en la corona del grano, que se origina por la contracción del endospermo harinoso a medida que el grano se va secando. Se usa principalmente como alimento animal, materia prima industrial y para la alimentación humana.
- **Maíz palomero (*Zea mays everta*):** Se caracteriza por un endospermo cristalino muy duro, que solamente tiene una pequeña porción de endospermo harinoso. Sus granos son redondos (como perlas), o puntiagudos (como el arroz). Se emplea principalmente para consumo humano en la forma de palomitas, dada su característica de expansión al someterse al calor. La capacidad de reventar parece estar condicionada por la proporción relativa de endospermo córneo, en el que los gránulos de almidón están incrustados en un material coloidal tenaz y elástico que resiste la presión de vapor generada dentro del grano al calentarse, hasta que alcanza un fuerza explosiva, que lo hace aumentar su volumen original unas 30 veces.
- **Maíz tunicado (*Zea mays tunicata*):** Se caracteriza porque cada grano está encerrado en una vaina o túnica. La mazorca está cubierta con “espatas” como los otros tipos de maíz.
- **Maíz cristalino (*Zea mays indurata*):** Contiene una gruesa capa de endospermo cristalino, que cubre un pequeño centro harinoso. Generalmente el grano es liso y redondo.
- **Maíz harinoso (*Zea mays amilaceo*):** Se caracteriza por un endospermo harinoso, sin endospermo cristalino.



- **Maíz dulce (*Zea mays saccharata*):** En este tipo de maíz, la conversión del azúcar en almidón es retardada durante el desarrollo del endospermo (Hoseney, 1991).

México posee la mayor diversidad genética de maíz, la cuál se manifiesta en variación de caracteres morfológicos vegetativos, así como de espiga, mazorca y grano, y en la composición química del grano. De las 436 razas de maíz reportadas en el continente americano, 50 se encuentran en México (Antuna *et al.*, 2008).

Dentro de las diferentes razas mexicanas, existen las variedades criollas que son resultado de la manipulación tradicional de los campesinos

1.6.3. Composición química

La composición química del grano de maíz, y por ende su valor nutritivo, depende del genotipo de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra. Los componentes químicos son:

Almidón: Componente principal del grano de maíz, al que corresponde hasta un 72 o 73 % del peso del grano. El almidón esta formado por dos polimeros de glucosa: amilasa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30% del almidón unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$. El polímero amilopectina también consiste de unidades de glucosa, pero en forma ramificada unidas por enlaces $\alpha(1,6)$ y constituye hasta el 70-75% del almidón. La composición del almidón esta determinada genéticamente.

Proteínas: Por orden de importancia constituye el segundo componente químico del grano y su contenido puede oscilar entre el 8 y el 11% del peso del grano y en su mayor parte se encuentra en el endospermo. De entre las proteínas que destacan por su abundancia son las **zeínas**.

Aceite y ácidos grasos: El aceite del grano de maíz es fundamental en el germen y viene determinado genéticamente, con valores que van del 3 al 8%. El aceite de maíz tiene un bajo nivel de ácidos grasos saturados: ácido palmítico y esteárico,



con valores medios del 11 y el 2% respectivamente. Pero tiene un contenido relativamente elevado de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoléico, con un valor medio cerca del 24%. Pero muy bajas de ácido linolénico y araquidónico.

Fibra dietaria: Los hidratos de carbono complejos del grano se encuentran en el pericarpio y la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y en menor medida en el germen.

Minerales: La concentración de cenizas en el grano de maíz es aproximadamente del 1.3%. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio de 11%, frente a menos del 1% en el endospermo. El germen proporciona cerca del 78% de todos los minerales del grano. El mineral que más abunda es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio, encontrándose en su totalidad en el embrión con valores aproximadamente del 0.9% en el maíz común. Como sucede con la mayoría de los granos de cereal, el maíz tiene un bajo contenido de calcio y oligoelementos.

Vitaminas liposolubles: El grano de maíz contiene vitaminas liposolubles como la vitamina A o carotenoide y la vitamina E. Los carotenoides se hallan sobre todo en el maíz amarillo, mientras que la vitamina E, se encuentra principalmente en el germen.

Vitaminas hidrosolubles: Se encuentran sobre todo en la capa de aleurona del grano y en menor cantidad en el germen y el endospermo. El maíz no tiene vitamina B12 y el grano maduro contiene sólo pequeñas cantidades de ácido ascórbico. Otras vitaminas como la colina, el ácido fólico y el ácido pantoténico, se encuentran en concentraciones muy bajas. (FAO, 1993)

En el cuadro 2 se muestra la composición química promedio de las partes de un grano de maíz.



CUADRO 2. Composición química proximal promedio de las partes del grano de maíz (%)

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: Watson, 1987.

1.6.4. Maíz como alimento funcional

Existen evidencias epidemiológicas considerables sobre el papel protector de un consumo elevado de cereales sobre las enfermedades crónico degenerativas. La fibra soluble, especialmente la pectina y la goma guar, pueden disminuir el riesgo de enfermedades coronarias. Los β - glucanos atenúan el incremento en la glucosa postprandial, en la insulina y posiblemente en los triglicéridos en pacientes diabéticos. La fibra insoluble mejora la función del colon. Los fitoestrógenos mejoran la salud al inhibir la agregación plaquetaria, además de ser antielargénicos, antihelmínticos, hepatoprotectores, antivirales, antimicrobianos y antiinflamatorios, tienen efectos sobre algunos tipos de cáncer (Adom y Liu, 2002; Martínez-Tomé *et al.*, 2004).

Estos fotoquímicos, al ser antioxidantes pueden tener un papel importante en la salud humana al actuar como captadores de ERO, modular algunos sistemas enzimáticos, quelar iones de metales prooxidantes como el zinc y el magnesio, además de transferir uno de sus electrones a los radicales libres. Los antioxidantes están concentrados en el salvado aunque también se encuentran en menor proporción en el endospermo (Adom y Liu, 2002; Martínez-Tomé *et al.*, 2004).

El grano de maíz completo, es rico en compuestos bioactivos, fibra insoluble (principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina), fibra soluble, pectina, goma guar, glucanos, xilanos y arabinoxilanos. Los granos de maíz, por ejemplo son una gran



fuelle de fitoestógenos, lignanos, saponinas, ácido fítico, tanino, esteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos felúrico, cafeico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, p-cumarico, gentisico, sinápico, isofelúrico, clorogénico, vainillico, p-hidroxi fenil acético y siringico. Estos compuestos se encuentran principalmente en el grano conjugados con azúcares, ácidos grasos o proteínas (Zielinski y Kozowska, 2000).

Debido a las características antes mencionadas el maíz se encuentran dentro del grupo de los alimentos funcionales, aunque, si bien el grano como tal, si un tratamiento previo no es completamente asimilable por el cuerpo humano, gracias a la sabiduría empírica de los antiguos pobladores del valle de México aumentaron su digestibilidad y le dieron un valor agregado a este grano, mediante el proceso de nixtamalización; el cuál, consiste en un tratamiento térmico alcalino, que cumple varias funciones: facilita el desprendimiento del pericarpio y pedicelo del grano de maíz, controla la actividad microbiana, mejora el sabor, aroma, vida de anaquel y el valor nutricional entre otras. (Serna-Saldívar *et al.*, 1988b).

La cocción alcalina y el remojo provocan la disolución y el hinchamiento de las capas del pericarpio, haciendo que las paredes celulares y los componentes de la fibra dietaria de esta parte del grano se vuelvan frágiles, facilitando su remoción. También se ve alterada la estructura y la solubilidad de las proteínas, aunque el maíz es deficiente en lisina y triptófano. Sin embargo la nixtamalización incrementa la disponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales (Serna-Saldívar, 1990).

1.6.5. Zeínas

Las prolaminas son proteínas de almacenamiento en la mayoría de los cereales y constituyen una fuente importante de proteína en la dieta (Shewry and Tatham, 1990).

Osborne (1924), mencionó que las prolaminas son solubles en alcohol y su nombre es derivado del elevado contenido de prolina y amidas nitrogenadas (derivadas de la glutamina).



El grano de maíz presenta un contenido de proteína que varía de 7 a 12%, dependiendo de la variedad de maíz que se trate. Del total de las proteínas del grano entero, alrededor del 52% son prolaminas, también llamadas zeínas, y se localizan principalmente en el endospermo del grano (Sánchez *et al.*, 2007).

Las zeínas se dividen en cuatro grupos y sus diferencias entre si radican en la composición de aminoácidos. Todos los grupos son ricos en glutamina y prolina, pero deficientes en lisina y triptofano, entre ellos difieren en el contenido de otros aminoácidos como metionina (alto contenido en α y β - zeínas), cisteína e histidina (ambos elevados en las α - zeínas). Las zeínas se encuentran en cuerpos proteicos en el endospermo y se clasifican en:

- a) α - Zeína, formada por subunidades con PM que varía entre 9-22 KDa, representa entre el 75-78% del total de la zeína. Es rica en glutamina, leucina, alanina y prolina, pero no presenta lisina.
- b) β - Zeína, es una subfracción con PM entre 14-16 KDa, representa entre el 10 y el 15% del total de la fracción de a zeína, extraíble únicamente en presencia de un agente reductor, son polipéptidos ricos en metionina.
- c) γ - Zeína con PM de 28 KDa. Representa entre el 5-10% del total de la fracción zeína, contiene polipéptidos ricos en metionina.
- d) δ - Zeína con PM de 10 KDa. Representa una pequeña proporción de la fracción zeína (Shewry and Tatham, 1990).

Desde la década pasada, los péptidos e hidrolizados de proteínas obtenidos a partir de alimentos emergieron como una nueva fuente natural de antioxidantes. Estos derivados de proteínas han demostrado tener buena capacidad antioxidante por medio de mecanismos como atrapamiento de radicales libres o capacidad de quelar iones. Estos péptidos se pueden obtener de la proteína proveniente de algunos alimentos como el huevo, soya, papa, trigo y maíz (Tang, 2010).

Existen diferentes métodos de extracción de zeínas y sus fracciones. Parris y Dickey (2001), caracterizaron la extracción y solubilidad de la zeína, y observaron que en el aislamiento de la zeína por extracción acuosa de etanol del maíz seco-molido, se produce una mezcla de las zeínas, polímeros covalentes ligados y



agregados de alto peso molecular, algunos de los cuales no son solubles en alcohol. Las partículas insolubles fueron identificadas como agregados proteicos que se forman cuando se calienta la solución, particularmente en condiciones alcalinas. Los agregados insolubles, no están presentes en los aislados de zeína. Aunque la zeína es una proteína que ya ha sido aislada y se encuentra caracterizada, permitiendo con ello conocer su estructura, además de ser usada como antioxidante en alimentos, hasta el momento no existen investigaciones que se enfoquen en caracterizar sus propiedades funcionales en un sistema biológico. A continuación se hace mención de algunos estudios en los que se han usado las zeínas:

- Shewry y Tatham (1990), realizaron una revisión bibliográfica de las proteínas de almacenamiento, en específico de las prolaminas contenidas en los cereales, destacando el maíz. Muestran el perfil electroforético de las 4 subunidades de zeína (α , β , δ y γ -zeína), así como sus respectivos pesos moleculares; también los esquemas de las estructuras de zeína, previamente mostradas por Argos *et al.*, 1982.
- Parris y Dickey (2001), caracterizaron la extracción y la solubilidad de las zeínas y observaron que en el aislamiento de la zeína por extracción acuosa de etanol de maíz seco-molido, se producía una mezcla de las zeínas, polímeros covalentes (dímeros, tetrámeros, etc.) y agregados de alto peso molecular, algunos de los cuáles no eran solubles en el alcohol.
- Elias *et al.*, (2008), encontraron que las proteínas tienen un buen potencial como aditivos con capacidad antioxidante en alimentos, porque pueden inhibir la peroxidación lipídica a través de múltiples vías, incluyendo la inactivación de ERO, atrapando radicales libres, quelando metales de transición prooxidantes, reducción de hidroperóxidos y alteración de las propiedades físicas del alimento.
- Tang *et al.* (2010), realizaron hidrólisis de zeína con alcalasa y separaron los péptidos por filtración en gel, ultrafiltración y HPLC en fase reversa, también evaluaron la actividad antioxidante de dichos hidrolizados mediante ABTS^{•+}, DPPH[•] y el anión superóxido (O₂^{•-}). Encontraron que la actividad antioxidante en



DPPH[•] y O₂^{•-} era dependiente del peso molecular del péptido, mientras que en ABTS^{•+} el PM no mostró tener relación alguna.



2. Justificación

En México, las principales causas de muerte por enfermedad están relacionadas con dislipidemias y afecciones cardiovasculares ocasionadas en gran medida por el cambio de hábitos alimenticios (incremento en el consumo de “comida rápida”) y sedentarismo en la población. Las dislipidemias se asocian a la producción exacerbada de radicales libres y ERO desencadenando un estado de estrés oxidativo; recientes investigaciones han demostrado que este desequilibrio prooxidante es uno de los principales agentes etiológicos en el desarrollo de aterosclerosis y para prevenir y contrarrestar estos efectos nocivos, la dieta juega un rol importante, ya que muchos de los alimentos de origen vegetal contienen fotoquímicos con actividad antioxidante, a la que se le ha relacionado con el efecto hipolipemiante observado en dichos alimentos. Tal es el caso de los cereales y en específico el maíz, el cual contiene almidones, lípidos polares y zeínas. En estudios previos se ha evidenciado que las proteínas obtenidas de alimentos comunes son buena fuente de antioxidantes y ya que en el maíz se encuentran presentes las zeínas, quienes han sido utilizadas como aditivo alimentario para evitar la oxidación, es de gran interés conocer el efecto de éstas sobre el perfil lipídico en un modelo murino.

3. Hipótesis

El maíz es un cereal que tiene alto contenido de proteínas, de las cuáles las zeínas son la principal fracción y a las cuales se les atribuye actividad antioxidante, por lo que su administración en un modelo hipercolesterolémico podría modificar favorablemente el perfil lipídico debido al efecto sobre la regulación de la oxidación de lípidos.



4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto que tienen las zeínas de maíz negro y blanco sin tratamiento y nixtamalizado sobre el perfil lipídico sérico en una población de ratones.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química proximal de maíz negro y blanco sin tratamiento y nixtamalizado.
- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en maíz negro y blanco sin tratamiento y nixtamalizado.
- Obtener de la fracción proteica mayoritaria (zeínas) de maíces negro y blanco sin tratamiento y nixtamalizado.
- Caracterizar por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida la fracción proteica obtenida de maíces negro y blanco sin nixtamalizar y nixtamalizado.
- Realizar el estudio del perfil lipídico, empleando ratones machos ICR.
- Determinar actividad antioxidante *in vitro* de zeínas de maíces negro y blanco sin nixtamalizar y nixtamalizado mediante los métodos de DPPH y del radical catiónico ABTS.

5. Diagrama de flujo

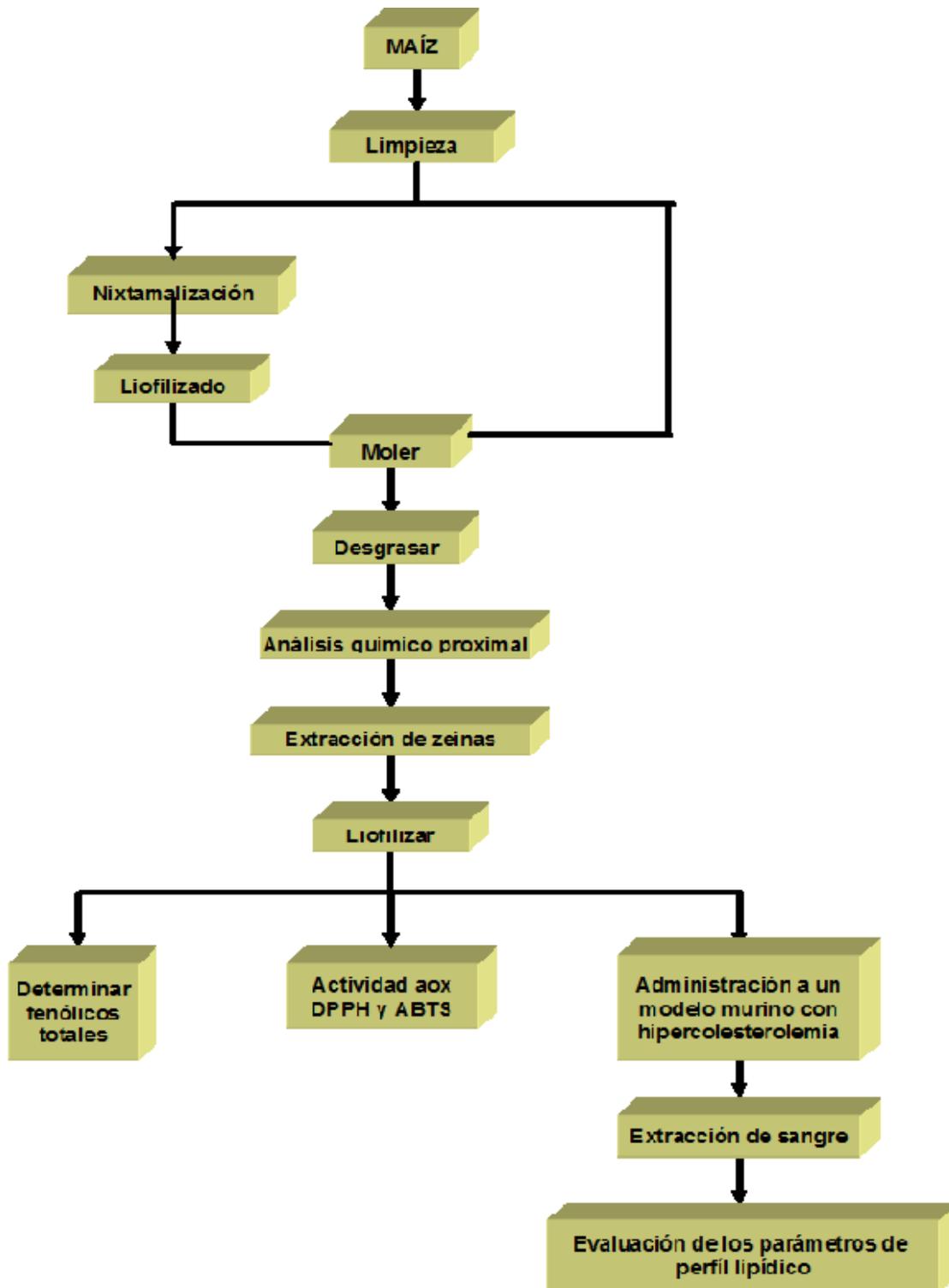


FIGURA 5. Diagrama de flujo del trabajo experimental



6. Materiales y métodos

6.1. Materiales

6.1.1. Material biológico

Se utilizaron dos variedades de maíz (*Zea mays*) criollo, una variedad blanca y una negra. Ambas sembradas en el ciclo primavera-verano 2007 en la región de Tulancingo, Hidalgo. El maíz se limpió, eliminando material extraño y granos rotos; posteriormente se identificaron con las claves mostradas en el cuadro 4.

Animales de experimentación:

Para la prueba de perfil lipídico se usaron ratones macho ICR de aproximadamente 8 semanas de edad y peso aproximado de 25-35 g, los cuáles se acondicionaron en jaulas metálicas a temperatura de 22 ± 1 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y humedad relativa de 60%, los animales recibieron alimento Lab Rodent 5001 y agua *ad limitum*, durante el transcurso del tratamiento.

6.1.2. Material de laboratorio y equipo

Para realizar las pruebas *in vitro* se utilizó el material de vidrio propio del laboratorio, reactivos de grado analítico y equipo de laboratorio (Cuadro 3)



CUADRO 3. Equipo de laboratorio y especificaciones

EQUIPO	MARCA	MODELO	VOLTAJE
Molino (2000 rpm)	Jankel y Kunkel	-----	115
Termobalanza (Capacidad max. 45 g)	Ohaus	MB45	100-120
Estufa	Precision	-----	110
Mufla	Linberg	51848	127
Equipo Kjeldahl	Labconco	60-1446-KSD	127
Equipo Soxhlet	Labline Instruments	5000	120
Potenciómetro	Hanna Instruments	H1-3221	120
Centrifuga	Lab-Tech	Hermle Z323K	120
Baño de agua digital	Poli-Science	-----	-----
Liofilizadora	Jouan	LP3	230
Espectrofotómetro UV/visible	Jenway	6505	230
Parrilla de calentamiento con agitación	Cimarec	SP131325	120
Cámara para electroforesis	Biorad	Mini PROTEAN	-----
Fuente de poder	Biorad	PowerPac Basic	100-120/220- 240
Ultracentrifuga Selectra	Winer Lab		

6.2. Métodos

6.2.1. Acondicionamiento de los granos de maíz

Se llevó a cabo una selección de los granos por su apariencia física, es decir, de tamaño mediano, no maltratados o quebrados, no germinados, libres de gorgojos y se separaron de objetos extraños como: piedras, pedazos de metal, hojas, cascarillas, entre otros. Una vez realizada la selección cada variedad de maíz fue dividida en dos: un lote fue nixtamalizado y molido; el otro fue molido sin tratamiento, la harina obtenida de cada lote fue tamizada y desgrasada con



hexano en una proporción 1:4, en agitación constante durante 24 h y en refrigeración (4°C). La harina desgrasada fue conservada en botes de aluminio en un lugar fresco y seco hasta su uso. En el cuadro 4 se muestran las claves de identificación, correspondiente a cada lote.

CUADRO 4. Identificación de los lotes de maíz

VARIEDAD	TRATAMIENTO	CLAVE
Maíz blanco	Sin nixtamalizar	MBS
Maíz blanco	Nixtamalizado	MBN
Maíz negro	Sin nixtamalizar	MNS
Maíz negro	Nixtamalizado	MNN

6.2.2. Proceso de nixtamalización

Se usó el método tradicional para la nixtamalización. Se pesaron 1.5 kg de maíz y se mezclaron con 4.5 L de solución de hidróxido de calcio al 1% en base al peso del grano. El maíz se coció por 60 min. a ebullición y se dejó reposar en el mismo recipiente de cocción por 16 h. Se eliminó la solución de cocimiento (Nejayote) y se lavó de 3-4 veces con agua corriente para eliminar el exceso de cascarilla y el hidróxido de calcio residual. Se colocó sobre papel absorbente por 2 h para eliminar el exceso de agua. El nixtamalizado se distribuyó en papel aluminio y se conservó en ultracongelación a -70°C/12 h para ser liofilizados. Una vez secos, los granos de maíz fueron molidos, tamizados y desgrasados con hexano en una proporción 1:4, en agitación constante durante 24h/4°C. La harina desgrasada, fue conservada en botes de aluminio en un lugar fresco y seco hasta su posterior uso.

6.2.3. Análisis químico proximal

El análisis químico proximal se realizó utilizando las técnicas de proteína por Kjeldahl (NX5.83), lípidos por Soxhlet (920.39), fibra dietaria total (958.29) y cenizas (923.03), recomendadas por la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C., 2005). La determinación de humedad se realizó usando termobalanza.

6.2.4. Determinación de compuestos fenólicos totales

La extracción se realizó en base al método desarrollado por Abdel-Aal y Hucl (1999).

Fundamento del método: Los compuestos fenólicos presentes se oxidan por acción del reactivo de Folin-Ciocalteu, que esta formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce por acción de los fenoles en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y del molibdeno (Mo_8O_{23}) en un medio básico de Na_2CO_3 acuoso. La coloración azul produce una absorbancia máxima de 750 nm. La reacción química del reactivo de Folin se presenta en la figura 6. La reacción es de óxido-reducción en la cual el ión fenolato es oxidado bajo condiciones alcalinas mientras que el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico en el que el reactivo de Folin se reduce y produce una solución coloreada de azul.

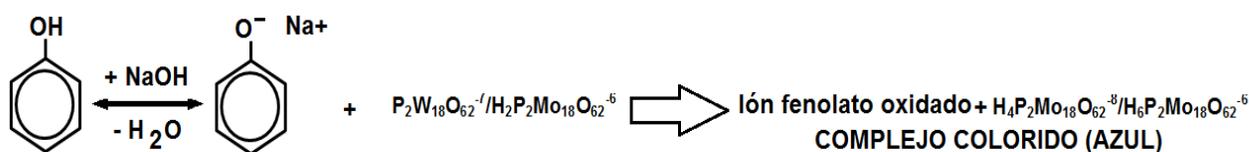


FIGURA 6. Reacción química del reactivo de Folin

Extracción

Se pesaron 0.5 g de harina de maíz y se adicionaron 5 mL de metanol acidificado (1% de HCl en metanol). Se agitó durante 16 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se recuperó el sobrenadante, se conservó en frascos ámbar y en refrigeración hasta su utilización. A los extractos obtenidos, se les determinaron compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1999), como a continuación se describe:

Tanto las zeínas como los compuestos fenólicos son solubles en soluciones etanólicas, así pues en la extracción de zeínas también se extrae una proporción de compuestos fenólicos (Osborne, 1924; Mohsen y Ammar, 2009).



Preparación de reactivos

1. Solución estándar de ácido gálico: Se pesaron 0.05 g y se adicionó 1 mL de etanol. Después, se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada y se preparó una dilución 1:10, obteniendo una concentración fina de 0.5mg/mL.
2. Reactivo de Folin-Ciocalteu: Se preparó una dilución 1:2 del reactivo Folin-Ciocalteu concentrado al momento de la reacción.
3. Solución de Na₂CO₃ al 10%.

Preparación de la muestra

Se colocaron 20 µL del extracto, se añadieron 1.58 mL de agua destilada. Se adicionaron 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 y se mezclaron; posteriormente se añadieron 0.3 mL de Na₂CO₃ al 10%. Los tubos con la mezcla se mantuvieron reaccionado a temperatura ambiente durante 1 hora, para el desarrollo de una coloración azul, transcurrido este tiempo, se leyó su absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles totales se calculó en base a la curva de calibración en µg equivalentes de ácido gálico/g muestra.

Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se realizó a partir de una solución de ácido gálico 0.5 mg/mL; de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 0.05 mL y se llevaron a un volumen de 1.6 mL con agua destilada, a partir de aquí se siguió el mismo procedimiento que para los extractos. En el anexo 11.1 se presenta la curva de calibración de ácido gálico.

6.2.5. Extracción de zeínas (DICKY *et al.* 1998)

Las harinas de maíz desgrasadas y fueron suspendidas en solución etanólica al 70% en una relación 1:4 (harina:disolvente (p/v)) a 60°C por un tiempo de 2h con agitación vigorosa, al termino de este tiempo se centrifugó a 10000 a 4°C durante 30 min, se separó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración, realizando 3 extracciones más al precipitado, para asegurar que se suspendiera la mayor



cantidad de zeínas de la harina. Al término de estas extracciones los sobrenadantes se juntaron y se concentraron en un baño de agua (50°C). El concentrado fue almacenado en tubos y congelado a 70°C hasta su liofilización.

6.2.6. Electroforesis (SDS-PAGE)

Fundamento del método: Es una técnica utilizada para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética, basado principalmente en el tamaño y el peso molecular de las proteínas (Wilson, 1986). La técnica fue propuesta originalmente por Laemmli, basándose en el hecho de que las proteínas corren en el gel en función a su peso molecular. Las proteínas pequeñas se desplazan más rápidamente y tienden a ubicarse en la parte inferior del gel, mientras que las grandes se sitúan a lo largo del mismo, quedando en la parte superior las proteínas de mayor peso molecular (Laemmli, 1970).

Los extractos etanólicos de zeínas obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y empleando geles de poliacrilamida al 20%, la concentración de proteína inyectada fue de 2mg/ 100 µL de solución amortiguadora y el volumen inyectado de 15 µL.

6.2.7. Determinación de la capacidad antioxidante

6.2.7.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

Esta determinación se llevo a cabo por el método desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995).

Fundamento del método: La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de zeínas, se evaluó usando el radical libre estable 2,2-difenil picril hidrazilo (DPPH) en una solución etanólica. La reducción del DPPH se monitoreó por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición de DPPH proporcionó un índice para estimar la capacidad del

compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica en la siguiente ecuación:



Donde: AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, resultando radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). El subíndice “n” está relacionado con la presencia de dos antioxidantes o dos grupos antioxidantes que difieren en su velocidad (rápida y lenta) para atrapar radicales. Esto podría explicar por qué bajo condiciones experimentales la cinética de desaparición de DPPH se comporta como una ecuación de segundo orden (Bondet *et al.*, 1997, Espín *et al.*, 2000):

$$\text{DPPH}\bullet = \text{DPPH}\bullet_0 e^{-Kt}$$

Donde DPPH• es la concentración del radical libre a cualquier tiempo. DPPH•0 es la concentración del radical libre al tiempo cero (0) y K la constante cinética de reacción de segundo orden dependiente de la concentración de antioxidante y t es el tiempo. La reacción entre el DPPH y un compuesto antioxidante (Figura 7) depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

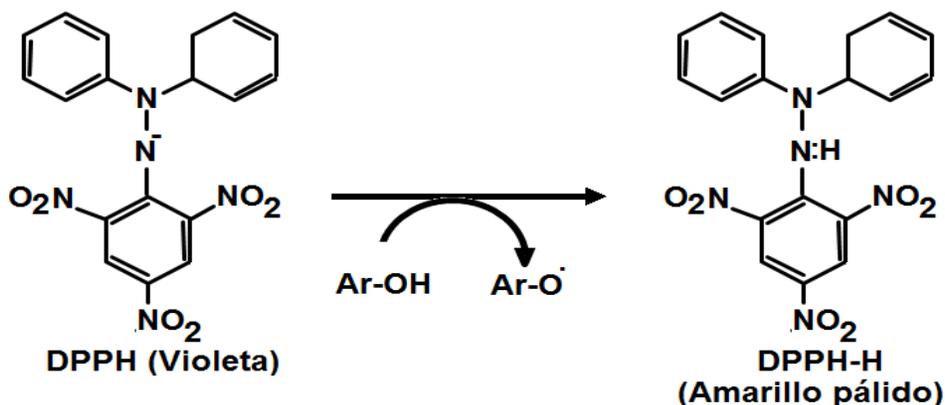


FIGURA 7. Reacción del DPPH con un compuesto antioxidante



Preparación de la muestra

En celdas de plástico, se añadieron 20 µL de extracto etanólico de zeínas o vitamina C con 200 µL de DPPH preparado al momento (125 µM), el cual se protegió de la luz y se aforó con metanol al 80%. Las muestras se leyeron transcurridos 60 min a una longitud de onda de 520 nm en espectrofotómetro. Las celdas se mantuvieron cubiertas y en la oscuridad a temperatura ambiente hasta tomar las lecturas. La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la ecuación propuesta por Burda y Oleszek (2001):

$$ARA = \left(1 - \frac{\text{Abs problema}}{\text{Abs control}} \right) \times 100$$

6.2.7.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de radical catiónico ABTS^{•+}

Se analizó mediante el método desarrollado por Re *et al.* (1999).

Fundamento del método: El método ABTS consiste en la generación del radical ABTS^{•+}, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un cromóforo azul verdoso con absorbancias máximas a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. En presencia de compuestos antioxidantes se produce una disminución de la absorbancia del radical catiónico ABTS^{•+}, ya que le es transferido un electrón por parte del antioxidante y de radical ABTS^{•+} (forma oxidada) pasa a su forma reducida ABTS cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 342 nm (Figura 8)

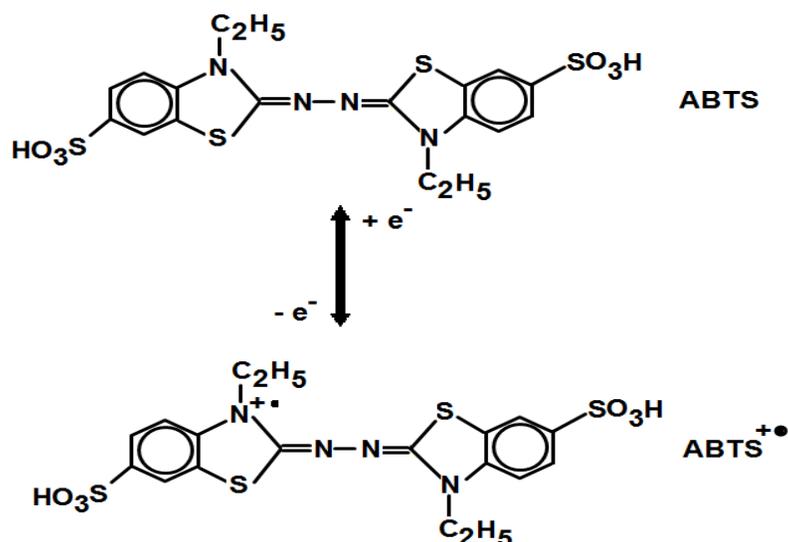


FIGURA 8. Generación del radical catiónico ABTS^{•+}

Preparación de reactivos

1. Solución acuosa de ABTS^{•+} 7 mM: sal diamonio ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis(3-etilenbenzotiazolina-6-sulfónico).
2. Solución de persulfato de potasio 2.45 mM

Preparación del radical ABTS^{•+}

La solución acuosa 7 mM de ABTS^{•+} se hizo reaccionar con 88 μ L de una solución de persulfato de potasio 2.45 mM. Se dejó en reposo por 16 h en completa oscuridad para que el radical alcance su estabilidad. Posteriormente, la solución del radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.700 ± 0.05 a una longitud de onda de 734 nm.

Preparación de la muestra

Una vez obtenidos los extractos etanólicos de zeínas, fueron llevados a la concentración más pequeña obtenida en la determinación de proteína de Bradford. Posteriormente, de estos extractos, se colocaron 10 μ L en una celda espectrofotométrica y se añadieron 2 mL de solución de ABTS^{•+} (absorbancia



0.700 ± 0.05 y se leyó la absorbancia inmediatamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm, esta lectura será el tiempo 0. La segunda lectura de absorbancia se realizó a los 6 min. Simultáneamente, se preparó el estándar de vitamina C y se llevó a la misma concentración que las muestras y se disolvió en etanol.

Preparación de la curva de calibración

Se prepararon soluciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM de Trolox. Se colocaron 10 µL en una celda espectrofotométrica y se añadieron 2 mL de la solución del radical ABTS^{•+}. Se midió la absorbancia al tiempo 0 y 6 min. En el anexo 11.2 se muestra la curva de calibración.

Cálculos

Los valores de absorbancia al tiempo 0 y 6 min de las muestras, Trolox y los estándares, se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs muestras } t_0 - \text{Abs muestras } t_6)}{\text{Abs muestras } t_0 - \left(\frac{\text{Abs solvente } t_0 - \text{Abs solvente } t_6}{\text{Abs solvente } t_0} \right)} \times 100$$

Posteriormente, se realizó una gráfica de % de inhibición contra mM Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico). La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de las muestras y los estándares fue calculada como Moles equivalentes de Trolox/Kg de muestra extraída en base seca.

6.2.8. Determinación de la actividad hipolipemiante de zeínas

Los animales de experimentación recibieron un tratamiento de dieta normal e hipercolesterolémica, la mitad del total de los grupos fueron alimentados con una dieta normal (alimento Lab Rodent molido), mientras la otra mitad fueron alimentados con dieta hipercolesterolémica, cuya formulación se muestra a continuación:



CUADRO 5. FORMULACIÓN DE LA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

INGREDIENTES	CANTIDAD (g/Kg)
Colesterol	10
Colato de sodio	5
Mantequilla	50
Azúcar glass	300
Caseína	100
Alimento Lab Rodent	535

FUENTE: Matsumada, 1986

Para realizar el estudio los animales fueron divididos en 26 grupos de 8 animales cada uno y fueron tratados con las zeínas, vitamina E y C (testigos positivos) y los respectivos vehículos (1 ml/100 g de peso de solución salina con tween, aceite mineral y agua), la distribución se realizó de acuerdo al cuadro 6.



CUADRO 6. Distribución de ratones para estudio de perfil lipídico

TRATAMIENTO	DIETA	DOSIS (mg/Kg peso corporal)	CLAVE
Zeínas MBS	Normal	D1: 160	MBS-DN-D1
		D2: 320	MBS-DN-D2
	Hipercolesterolémica		MBS-DH-D1
			MBS-DH-D2
Zeínas MBN	Normal	D1: 180	MBN-DN-D1
		D2: 360	MBN-DN-D2
	Hipercolesterolémica		MBN-DH-D1
			MBN-DH-D2
Zeínas MNS	Normal	D1: 136	MNS-DN-D1
		D2: 272	MNS-DN-D2
	Hipercolesterolémica		MNS-DH-D1
			MNS-DH-D2
Zeínas MNN	Normal	D1: 161	MNN-DN-D1
		D2: 322	MNN-DN-D2
	Hipercolesterolémica		MNN-DH-D1
			MNN-DH-D2
Vitamina C	Normal		VIT.C-DN
	Hipercolesterolémica	100	VIT.C-DH
Agua	Normal		AG.-DN
	Hipercolesterolémica	-----	AG.-DH
Aceite mineral	Normal		AC.-DN
	Hipercolesterolémica	-----	AC.-DH
Solución salina con tween	Normal		SOL.SAL-DN
	Hipercolesterolémica	-----	SOL.SAL.-DH

Las dietas normales e hipercolesterolémica se colocaron en comederos a razón de uno por cuatro animales al igual que los biberones. La duración del tratamiento fue de 28 días para todos los grupos. La toma de muestra sanguínea se realizó después de en un período de ayuno de 12 h y transcurrido este tiempo se tomaron las muestras por punción retroorbital. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 13000 rpm/15 min para obtener el suero sanguíneo, en el cuál se realizó la cuantificación de colesterol total, triglicéridos, glucosa, colesterol-HDL



usando para ello el autoanizador, Selectra II, Wiener Lab. El colesterol-LDL se calculó aplicando la fórmula de Friedwald :

Cálculos

$$\text{LDL} = (\text{Colesterol} - \text{HDL}) - (0.45 * \text{Triglicéridos})$$

6.2.9. Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticas entre grupos se realizaron por la prueba de ANOVA y Tukey considerando una ($P \leq 0.05$) como diferencia significativa. El análisis se realizó con el programa Sigma Stat v. 3.5.



7. Resultados

7.1. Análisis químico proximal

En el cuadro 7 se presentan los resultados obtenidos en el análisis químico proximal para las dos variedades de maíz sin nixtamalizar y nixtamalizadas. Las concentraciones están dadas en g/100 g muestra seca.

CUADRO 7. Composición química proximal de maíz blanco (MB) y negro (MN) sin nixtamalizar (S) y nixtamalizado (N)

Lote	Humedad	Proteína	Cenizas	Extracto Etéreo	Fibra	Carbohidratos
MBS	12.26±0.20 ^a	8.53±0.12 ^a	1.45±0.02 ^a	9.74±0.14 ^a	3.97±0.17 ^a	76.31±0.82 ^a
MBN*	5.18±0.08 ^b	8.92±0.14 ^b	1.94±0.03 ^b	8.04±0.13 ^b	3.34±0.13 ^b	77.76±0.99 ^a
MNS	12.20±0.20 ^{a,c}	7.28±0.11 ^c	1.11±0.02 ^c	9.55±0.14 ^c	2.91±0.22 ^c	79.15±0.71 ^a
MNN*	5.28±0.09 ^{b,d}	7.96±0.13 ^d	1.59±0.03 ^d	8.44±0.13 ^d	2.03±0.14 ^d	79.98±0.92 ^a
NORMA*	MAX. 11	MIN. 8	MAX. 1.5	MIN. 4	MAX. 2.0	-----

Los valores se presentan en g/100g en base seca y representan el promedio de 3 determinaciones ± EE. Diferente letra entre los promedios de las columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

* Los valores son comparados con la norma NMX-F-049-S-1980 para harinas de maíz nixtamalizado.

** Determinados por diferencia

Como se observa el contenido de humedad fue mayor en los lotes de maíz sin nixtamalizar MBS y MNS (12.26 y 12.20 g/100 g respectivamente) y menor en los lotes nixtamalizados (MBN y MNN), entre ellos no se encontró diferencia estadística significativa, la diferencia significativa se encontró ($P < 0.05$) entre los lotes MBS y MBN, así como en los lotes MNS y MNN.

La concentración de proteína en maíz blanco para ambos lotes (MBS y MBN) fueron las mayores (8.53 g/100g en MBS y 8.92 g/100g en MBN) y presentaron diferencia significativa entre ambas ($P < 0.05$); los de menor concentración fueron los lotes MNS y MNN, también con diferencia significativa entre ambos.

El contenido de cenizas en maíces nixtamalizados es mayor que en maíces sin nixtamalizar como se observa en los lotes MBN y MNN (1.94 y 1.59 g/100g respectivamente) en comparación con MBS y MNS (1.45 y 1.11 g/100g respectivamente). Entre los lotes de maíz sin nixtamalizar y nixtamalizados existe una diferencia significativa; así como también entre variedades ($P < 0.05$).

El contenido de lípidos fue menor en los lotes nixtamalizados (MBN: 8.04 g/100 g y MNN: 8.44 g/100g) y los de mayor concentración los lotes de maíz sin nixtamalizar. Estadísticamente se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos nixtamalizado y sin nixtamalizar de cada variedad, así como entre variedades ($P < 0.05$).

La concentración de fibra es mayor en los lotes de maíz de variedad blanca (MBS y MBN) y con menor concentración los lotes de maíz negro (MNS y MNN), encontrándose diferencia estadística significativa entre los lotes nixtamalizados y sin nixtamalizar de la misma variedad; así como entre variedades.

La concentración de carbohidratos en los lotes de maíz negro fueron ligeramente mayores (MNS: 79.15 g/100 g y MNN: 79.98 g/100 g) que en maíz blanco (MBS: 76.31 g/100 g y MBN: 77.76 g/100 g), sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los lotes de maíz blanco y negro.

7.2. Compuestos fenólicos totales

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de compuestos fenólicos totales de los extractos de zeínas de maíz blanco y negro tanto nixtamalizado como sin nixtamalizar.

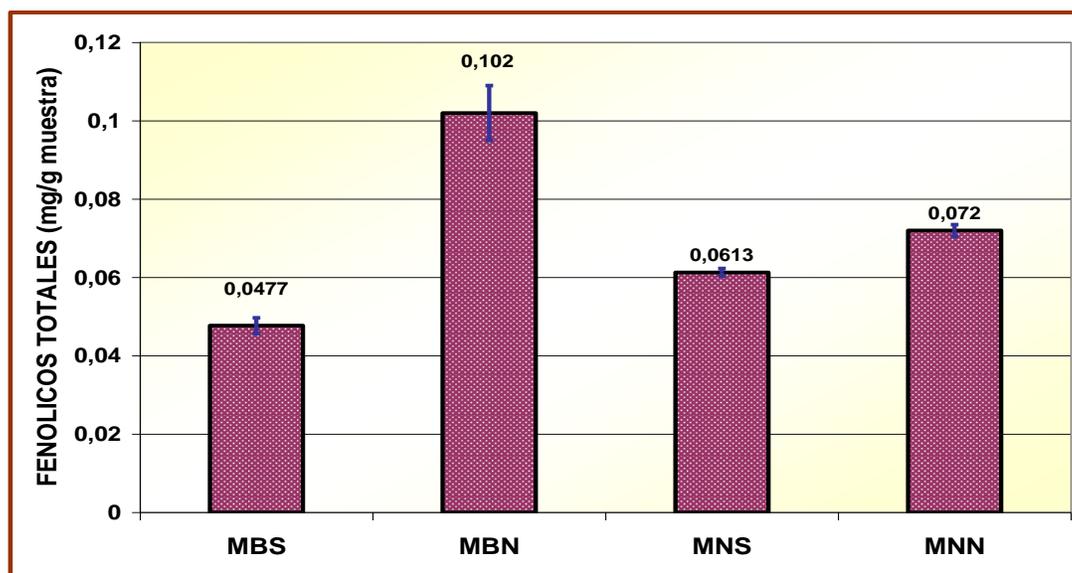


Figura 9. Concentración de compuestos fenólicos totales en extractos etanólicos de zeínas de maíz blanco y negro con y sin nixtamalización.

Los valores se presentan en mg eq de ácido gálico/g muestra en bases seca y representan el promedio de 5 determinaciones.

Como se observa en la figura 9 la concentración de fenólicos en MNS es ligeramente mayor que en MBS, encontrando diferencia significativa. En los lotes nixtamalizados, la concentración de compuestos fenólicos fue mayor en ambos lotes (MBN y MNN), entre los cuáles también se encontró diferencia significativa.

7.3. Electroforesis (SDS-PAGE) de los extractos etanólicos de zeínas

En la figura 10 se presenta el perfil electroforético de zeínas extraídas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar obtenidas por el método de Dickey *et al.* (1998).

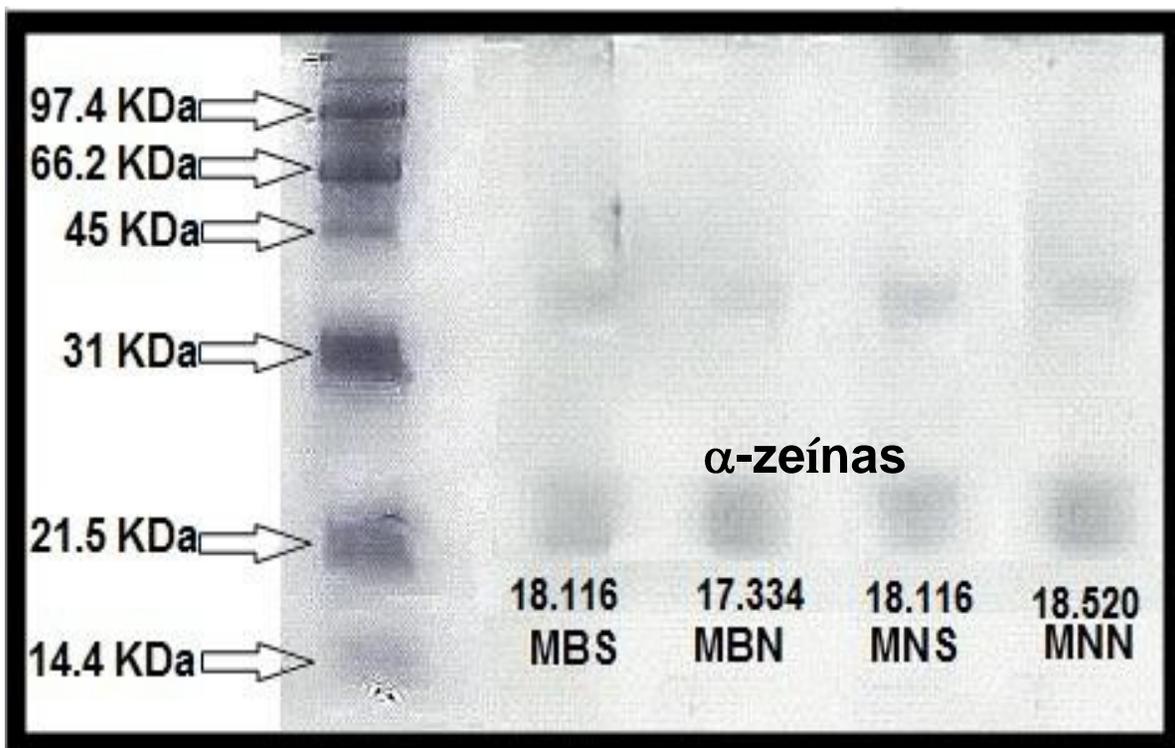


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de zeínas extraídas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar por el método de Dickey *et al.*, 1998. En el primer carril de la izquierda se encuentra el marcador de bajo peso molecular y los respectivos pesos moleculares de las bandas, en los subsecuentes 4 carriles se presentan los cuatro lotes de zeínas y sus pesos moleculares.

Como se observa en el perfil electroforético (figura 10), en los cuatro lotes de zeínas es evidente una banda, que corresponde a la fracción mayoritaria de zeína (α -zeína). Los pesos moleculares de las zeínas extraídas se encontraron en el intervalo de los 17.334 a los 18.520 KDa.



7.4. Evaluación de la capacidad antioxidante

En el cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante *in vitro* analizados por los métodos DPPH y ABTS para los extractos etanólicos de maíces blanco y negro, nixtamalizados y sin nixtamalizar. Los valores obtenidos por el método del radical ABTS se expresó como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (mM eq. Trolox/g muestra seca) y los resultados del radical DPPH se reportaron como actividad antiradicalaria (ARA, que es el % de decoloración). Por otra parte los resultados fueron comparados con la vitamina C, antioxidante de elevada actividad usado como referencia también en el estudio del perfil lipídico.

Cuadro 8. Evaluación de la capacidad antioxidante de zeínas extraídas de los maíces blanco y negro, nixtamalizados y sin nixtamalizar

LOTE	ABTS ^{•+}	DPPH [•]
MBS	0.32±0.002 ^a	11.99±0.11 ^a
MBN	0.22±0.004 ^b	8.17±0.14 ^b
MNS	0.42±0.004 ^c	28.87±0.15 ^c
MNN	0.65±0.004 ^d	44.11±0.15 ^d
Vitamina C	1.10±0.002 ^e	66.13±0.16 ^e

Los valores de ABTS^{•+} se presentan como mM eq de Trolox/g muestra seca y para DPPH[•] como actividad antiradicalaria (% ARA) y representan la media de cinco análisis realizados a cada extracto ± EE. Diferente letra entre los promedios de las columnas indican diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0.05)

Los extractos etanólicos de MNN presentaron la mayor actividad antioxidante por los dos métodos con valores de 0.65 mM eq. Trolox/g muestra seca y 44.11% de ARA y MBN presentó la menor actividad (0.22 mM eq. Trolox/ g muestra seca y 8.17% de ARA), en ambos métodos se encontró que hay diferencia significativa (P<0.05) entre ambos lotes.

Con respecto a los valores encontrados para la vitamina C, estos fueron 1.10 mM eq Trolox/g muestra seca y 66.13% de ARA, con diferencia significativa en los resultados de ambas técnicas para los cuatro lotes.



7.5. Actividad hipolipemiante de zeínas

7.5.1 Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nitamalizado y sin nixtamalizar con dieta normal

7.5.1.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR

Los resultados de colesterol total sérico obtenidos se muestran en la figura 11. Los grupos MBS-D1 y MBS-D2 tuvieron concentración de colesterol similar con un valor promedio de 62.4 mmol/L y no mostraron diferencia significativa con el grupo testigo (59.2 mmol/L). MBN-D1 y MBN-D2, entre estos grupos se observa una pequeña diferencia en concentración, la cuál estadísticamente no es significativa, así como tampoco con respecto al testigo. En general las concentraciones de colesterol de los grupos MBS y MBN fueron homogéneas y entre ellos se encontró presente el grupo con la menor concentración de colesterol (MBN-D2).

MNS-D2 (69 mmol/L) es el grupo con la concentración más alta de colesterol de ambos grupos de MNS y la diferencia no es significativa, así como no es significativa con el grupo testigo. MNN-D1 tuvo una concentración de 65.4 mmol/L y MNN-D2 con 69 mmol/L, este segundo fue el de mayor concentración de ambos, no encontrándose diferencia significativa. Ambos grupos MNS-D2 y MNN-D2 con una concentración de 69 mmol/L que fue la mayor de entre todos los grupos tratados con zeínas, no sólo coincidieron en el valor de concentración, también en que se les administrara la dosis más alta. No hay diferencia significativa del grupo de vitamina C con su grupo testigo.

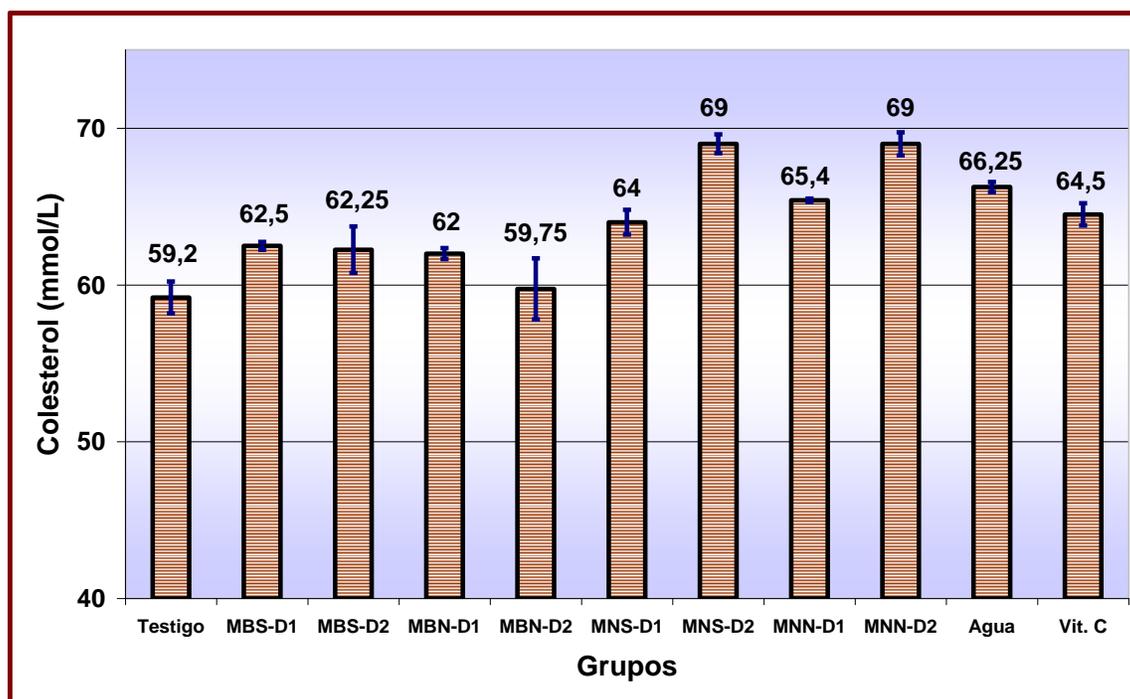


Figura 11. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de colesterol total sérico en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.1.2. Triacilgliceridos séricos en ratones macho ICR

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos de triglicéridos séricos en ratones macho al ser administrados con zeínas de maíz blanco y negro, nixtamalizado y sin nixtamalizar con una dieta normal. Los grupos MBS (D1 y D2) no presentaron diferencia significativa con el grupo testigo, aunque cabe resaltar que el grupo MBS-D2 (1.03 mmol/L) fue el de menor concentración de triglicéridos de todos los grupo tratados con zeínas.

Los grupos MBN-D1 y MBN-D2 tampoco tuvieron diferencia significativa y el grupo MBN-D2 (1.47 mmol/L) fue el de menor concentración de ambos. En los grupos MBS y MBN para ambos casos los grupos que mostraron una menor concentración de triglicéridos fueron los administrados con las dosis más altas (MBS-D2 y MBN-D2). Entre los grupos de MNS (D1 y D2) y MNN (D1 y D2), se observan concentraciones más homogéneas para ambas dosis en cada caso y

ninguno de estos grupos tuvo diferencia significativa, así como tampoco en el grupo de vitamina C con su testigo.

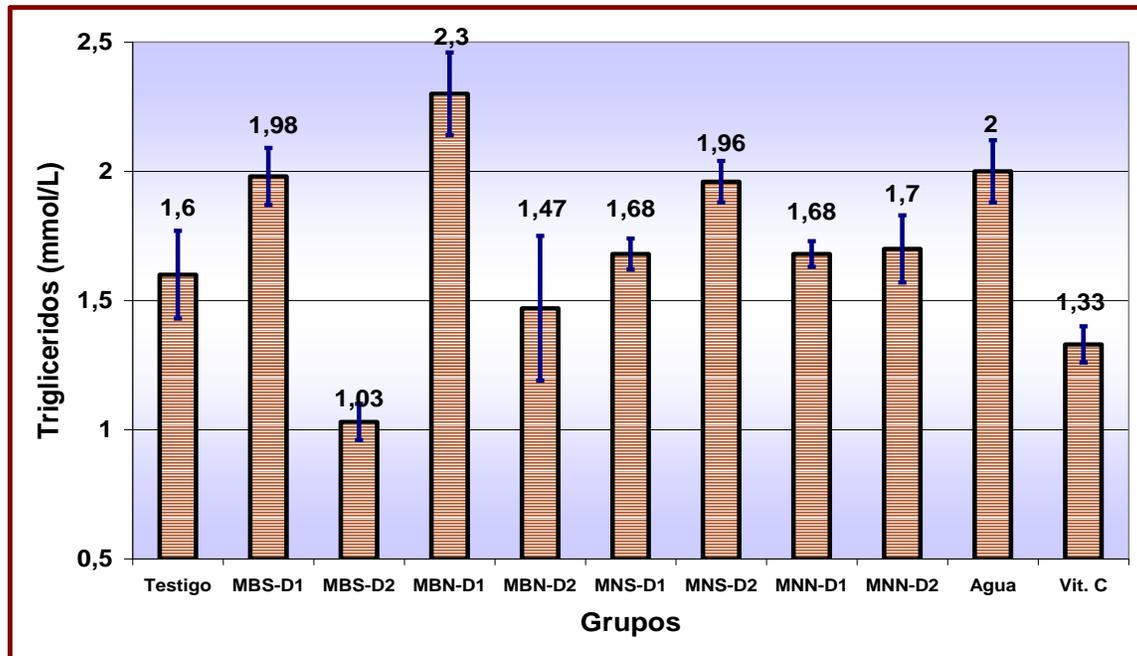


Figura 12. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.1.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR

Los resultados obtenidos en el estudio in vivo de col-HDL en ratones se muestran en la figura 13. En los grupos tratados con zeínas de maíz blanco (MBS y MBN) se observa una misma tendencia; en que los grupos de dosis más baja (MBS-D1:12.93 mmol/L y MBN-D1:11 mmol/L) tuvieron las concentraciones más altas de col-HDL; mientras que los grupos con la dosis mayor (MBS-D2:15.55 mmol/L y MBN-D2:12.33) tuvieron concentraciones menores de col-HDL y MBN-D2 tuvo concentración de col-HDL menor que el grupo testigo; ninguno de los grupos descritos anteriormente tuvo diferencia significativa con el grupo testigo. De los grupos de MNS, el grupo MNS-D2 (20.83 mmol/L) fue el de mayor concentración de todos los grupos, además de presentar diferencia significativa ($P < 0.05$) con el

grupo testigo (11.34 mmol/L), el grupo MNS-D1 (12.33 mmol/L) no tuvo diferencia significativa. Los grupos MNN-D1 y MNN-D2 tuvieron concentraciones similares entre si y no presentaron diferencia significativa con el testigo. El grupo control de vitamina C, tampoco presentó diferencia significativa con respecto a su testigo.

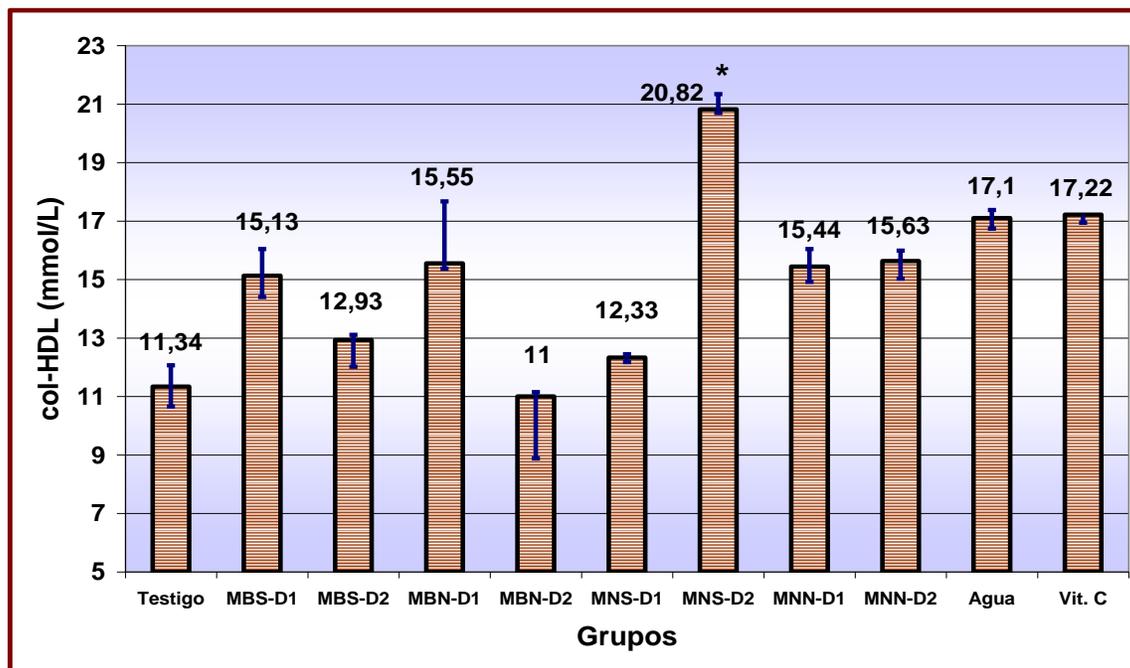


Figura 13. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-HDL séricas en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

* Diferencia significativa del grupo tratado con zeínas con respecto al testigo de solución salina+tween

7.5.1.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR

Los valores de concentración de col-LDL en ratones tratados con zeínas se muestran en la figura 14. MBS-D1 (45.8 mmol/L) y MBS-D2 (45.68 mmol/L) en la figura 14, se observa que tienen concentraciones similares entre si y con el grupo testigo (46.03 mmol/L), por lo que no hay diferencia significativa entre estos grupos. Los grupos de MBN (MBN-D1:46.32 mmol/L y MBN-D2: 45.14 mmol/L) tuvieron valores con una diferencia pequeña entre si y con el grupo testigo, pero no se encontró diferencia significativa. En el grupo MNS-D1 (50.82 mmol/L) la concentración de col-LDL fue mayor que en la del grupo MNS-D2 (48.96 mmol/L)

y que el grupo testigo, no obstante, no hubo diferencia significativa. MNN-D1 con una concentración de col-LDL de 48.52 mmol/L no presentó diferencia significativa con el grupo testigo, sin embargo el grupo MNN-D2 con 52.83 mmol/L de concentración de col-LDL, que fue la mayor, estadísticamente presentó diferencia significativa con el grupo testigo. La concentración col-LDL del grupo de vitamina C y su testigo no presentaron diferencias significativas.

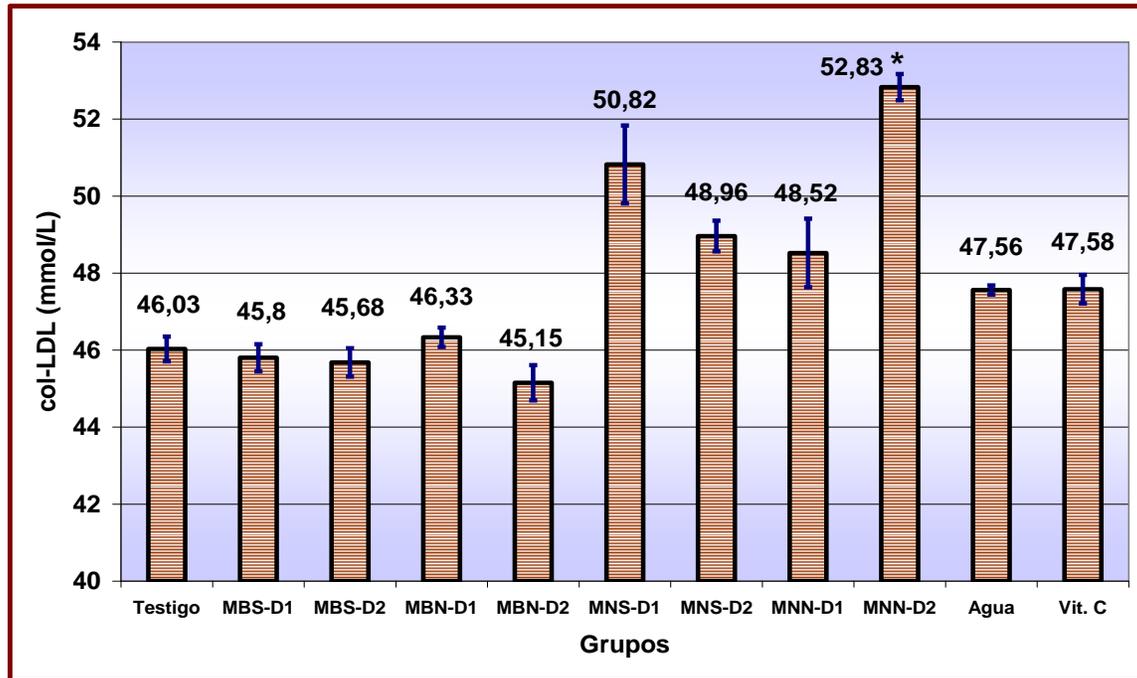


Figura 14. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-LDL sericas en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

* Diferencia significativa del grupo tratado con zeínas con respecto al testigo de solución salina+tween

7.5.1.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR

Las concentraciones de glucosa en los grupos tratados con zeínas (maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar) se presentan en el figura 15. Como se muestra en la gráfica MBS-D1 (39.4 mmol/dL) y MBS-D2 (43.5 mmol/dL) en ambos casos fueron superiores a la concentración del grupo testigo (32 mmol/dL) y a su vez, también los de mayor concentración de todos los grupos tratados con zeínas, aún así, no se encontró diferencia significativa de estos grupos con el grupo testigo. Los grupos MBN-D1 y MBN-D2 con valores similares de glucosa en

promedio tuvieron una concentración de 32.8 mmol/dL, no encontrándose diferencia significativa con el grupo testigo.

Los grupos MNS y MNN mostraron una tendencia en la que los grupos administrados con la dosis menor (MNS-D1: 35 mmol/dL y MNN-D1: 36.75 mmol/dL) tuvieron las concentraciones mayores de glucosa y los grupos administrados con la dosis mayor (MNS-D2: 31 mmol/dL y MNN-D2: 31.33 mmol/dL) concentraciones menores de glucosa, estadísticamente no se encontró diferencia significativa. La diferencia en las concentraciones de glucosa entre el grupo de vitamina C y su testigo no fue significativa.

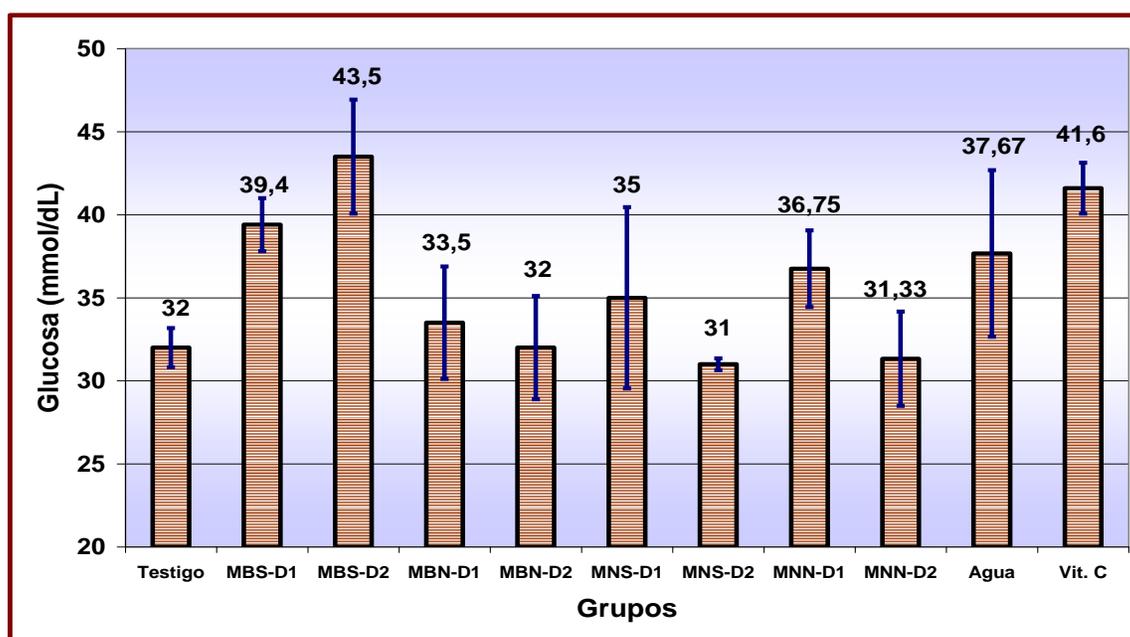


Figura 15. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de glucosa en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.1.6. Peso relativo del hígado en ratones macho ICR

Como se observa en la figura 16 el peso relativo de los grupos tratados con zeínas (MB y MN), así como los tratados con vitamina C, fueron similares; en general los resultados son homogéneos y estadísticamente no se encontró diferencia significativa. El valor promedio de todos los grupos fue de 4.43 %.

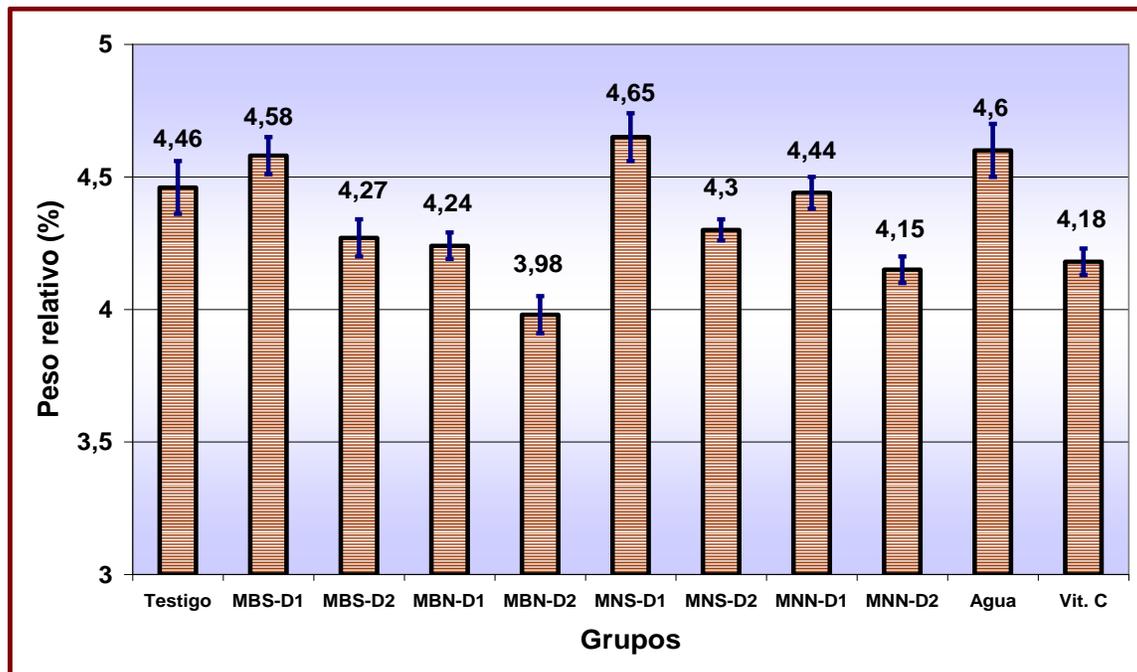


Figura 16. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre el peso relativo de hígado en ratones macho ICR con dieta normal.

Los límites de variación representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa

7.5.2. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con zeínas de maíz blanco y negro nitamalizado y sin nixtamalizar con dieta hipercolesterolémica

7.5.2.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR

Los valores de colesterol total en ratones macho ICR alimentados con dieta hipercolesterolémica, se observan en la figura 17. Las concentraciones de colesterol en los grupos tratados con zeína MBS entre si tuvieron una diferencia de alrededor de 18 mmol/L, el grupo MBS-D1 (68.6 mmol/L) tuvo la concentración más baja de ambos y de los grupos administrados con zeínas, no encontrándose diferencia significativa. MBN-D1 (84 mmol/L) y MBN-D2 (76.3 mmol/L) con una diferencia mucho menor a la de los grupos de MBS, tampoco tuvieron diferencia significativa. El MNS-D2 (110.2 mmol/L) estadísticamente presentó diferencia significativa con el grupo testigo y fue el de mayor concentración. Los grupos de MNN con una diferencia mínima en concentración de colesterol no tuvieron

diferencia significativa. Se presentó diferencia significativa entre los grupos testigo de dieta normal y dieta hipercolesterolémica. En el grupo de vitamina C, estadísticamente no se encontró diferencia con su testigo.

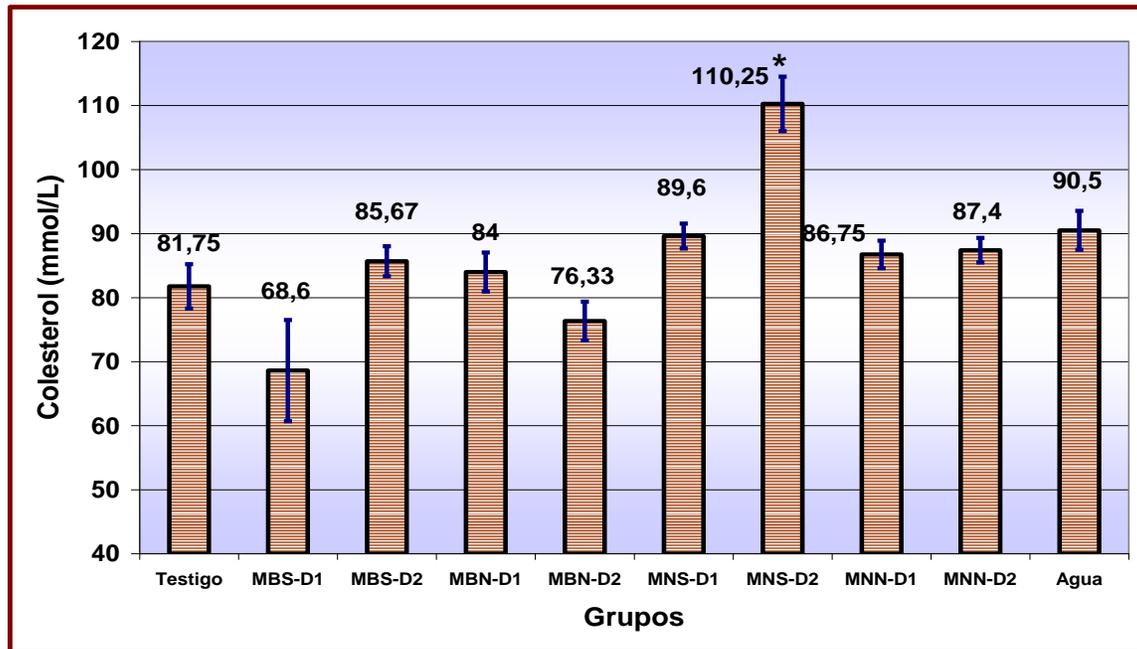


Figura 17. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de colesterol total sérico en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p < 0.05$ significa diferencia significativa.

* Diferencia significativa del grupo tratado con zeínas y dieta hipercolesterolémica con respecto al testigo de solución salina+tween

7.5.2.2. Triacilgliceridos séricos en ratones macho ICR

En la figura 18 se muestran las concentraciones de triglicéridos en ratones macho ICR obtenidas en el presente estudio.

Los grupos MBS (D1 y D2) estadísticamente no presentaron diferencia significativa con respecto al testigo; de los grupos de MBN, MBN-D2 con 2 mmol/L presentó diferencia significativa con el testigo y a su vez fue el grupo con la concentración más alta, mientras que MBN-D1 no tuvo diferencia significativa. Exceptuando al grupo MBN-D2, los grupos restantes tratados con MB tuvieron concentraciones menores de triglicéridos que la del grupo testigo (1.02 mmol/L). En los grupos de MNS (D1 y D2) no hubo diferencia significativa, así como tampoco en los grupo MNN (D1 y D2), todos ellos en comparación con el grupo

testigo. El grupo de vitamina C no presentó diferencia significativa con el grupo testigo.

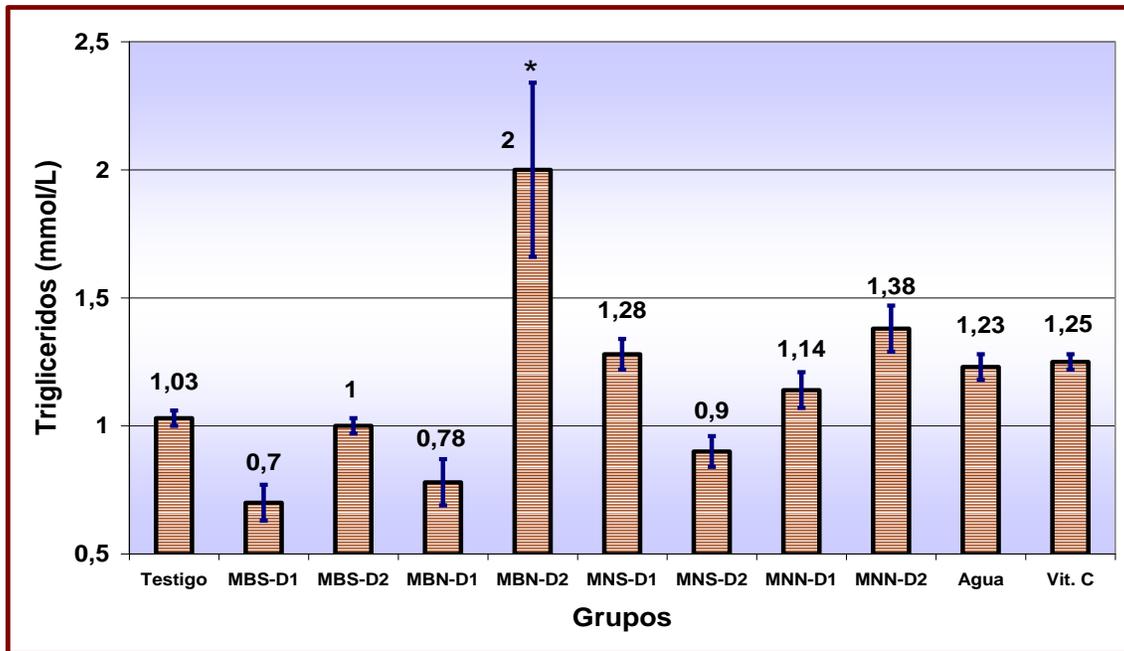


Figura 18. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p < 0.05$ significa diferencia significativa.

* Diferencia significativa del grupo tratado con zeínas y dieta hipercolesterolémica con respecto al testigo de solución salina+tween

7.5.2.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR

En la figura 19, se muestran los valores de col-HDL en ratones macho ICR tratados con zeínas de maíz.

Se observa que en el grupo MBS-D1 la concentración de col-HDL es un poco menor a la del grupo testigo y la de MBS-D2 es superior al testigo, sin embargo, no existe diferencia significativa. Semejante a los grupos anteriormente descritos, en el grupo MBN-D1 la concentración es menor a la del grupo testigo y en MBN-D2 la concentración es mayor por aproximadamente 4 mmol/dL, pero nuevamente no se encontró diferencia significativa. En los grupos de MNS (D1 y D2) las concentraciones de col-HDL entre ambos grupos se mantuvieron más

homogéneas y no presentaron diferencia significativa con el testigo. Para los grupos de MNN en ambas dosis (D1 y D2) se encontraron las mayores concentraciones de col-HDL y en específico el grupo MNN-D2(17.5mmol/L), además de ser el de mayor concentración de todos los grupos tratados con zeínas, fue el único grupo que estadísticamente presentó diferencia significativa ($P<0.05$) con el testigo. El grupo de vitamina C, estadísticamente no presentó diferencia con su grupo testigo.

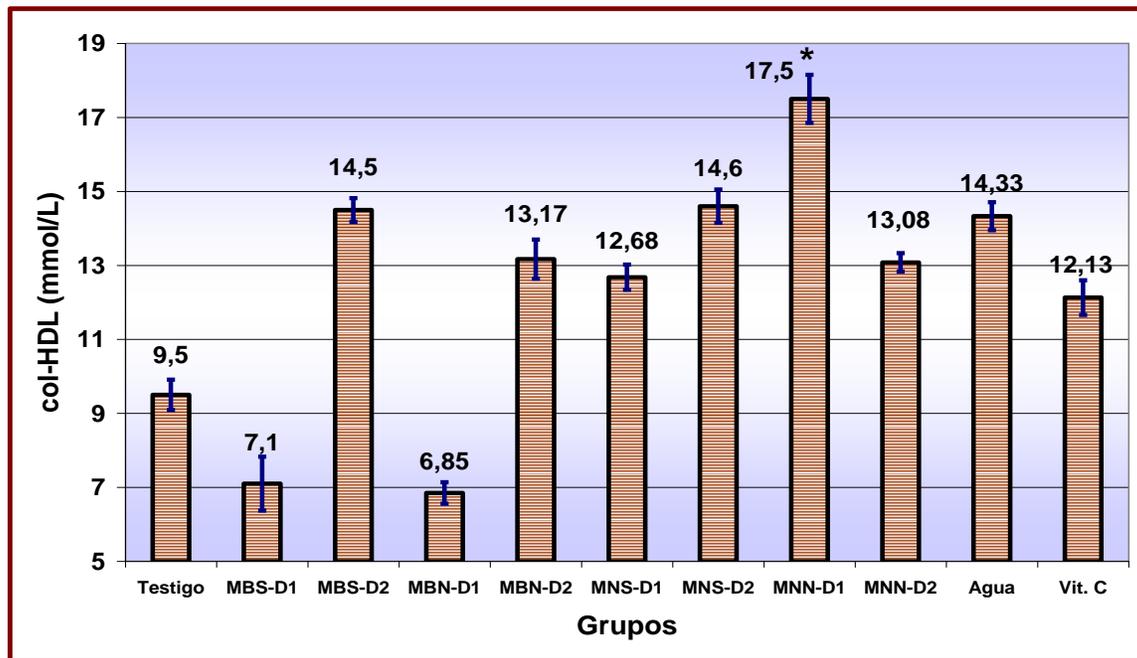


Figura 19. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-HDL séricas en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.2.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR

En la figura 20, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de col-LDL en ratones macho ICR administrados con zeínas.

Los grupos MBS-D1 y MBS-D2, estadísticamente no tuvieron diferencia significativa con el grupo testigo (77.02 mmol/L), aunque se observa que en el grupo MBS-D2 (67.14 mmol/L) se obtuvo la menor concentración de ambos

grupos, inclusive que el grupo testigo. En MBN-D1 y MBN-D2 se observa un comportamiento similar a de los grupos descritos anteriormente, en el que el grupo con la dosis mayor (MBN-D2: 64.77 mmol/L) resultó ser el de menor concentración de col-LDL para ambos grupos y que el grupo testigo; no se encontró diferencia significativa de MBS-D1 y MBS-D2 con el grupo testigo.

MNS-D2 es el grupo con la concentración más alta de col-LDL, la cuál fue de 95.07 mmol/L, sin embargo no se encontró diferencia significativa; el grupo MNS-D1 tuvo menor concentración que MBN-D2 y el grupo testigo, pero no menor s las concentraciones de MBS-D2 y MBN-D2.

Los grupos MNN-D1 y MNN-D2, tuvieron valores mayores s 70 mmol/L y similares a la concentración del grupo testigo (77.02 mmol/L), por lo tanto, no se encontró diferencia significativa. El grupo vitamina C, estadísticamente no presentó diferencia significativa con su grupo testigo.

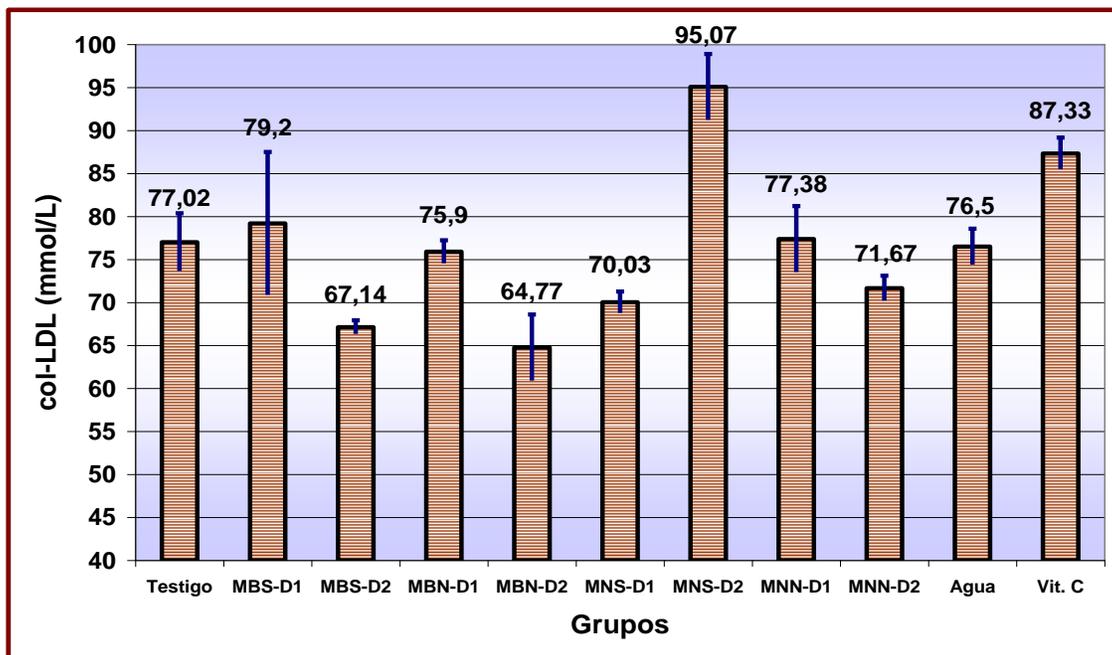


Figura 20. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de las col-LDL séricas en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.2.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR

Los resultados obtenidos de la determinación de glucosa en ratones macho ICR administrados con zeínas, se muestran en la figura 21.

En los grupos MBS-D1 (32 mmol/L) y MBS-D2 (51.67 mmol/L), aunque existe una diferencia entre ambos valores y principalmente de MBS-D1 con el grupo testigo (57 mmol/L), estadísticamente la diferencia no es significativa.

El comportamiento de los grupos MBN es semejante al descrito para MBS; siendo MBN-D1 (27.33 mmol/L) el de menor concentración con respecto a MBN-D2 (58 mmol/L) y al grupo testigo y no habiéndose encontrado diferencia significativa.

Los grupos de MNS (D1 y D2) no tuvieron diferencia significativa con respecto al testigo y el de menor concentración fue MNS-D2 con 53.75 mmol/L.

Los grupos MNN-D1 y MNN-D2, estadísticamente no tuvieron diferencia significativa con el grupo testigo, en este par de grupos el de menor concentración fue MNN-D2 con 65.2 mmol/L.

El grupo de vitamina C no presentó diferencia significativa con su grupo testigo.

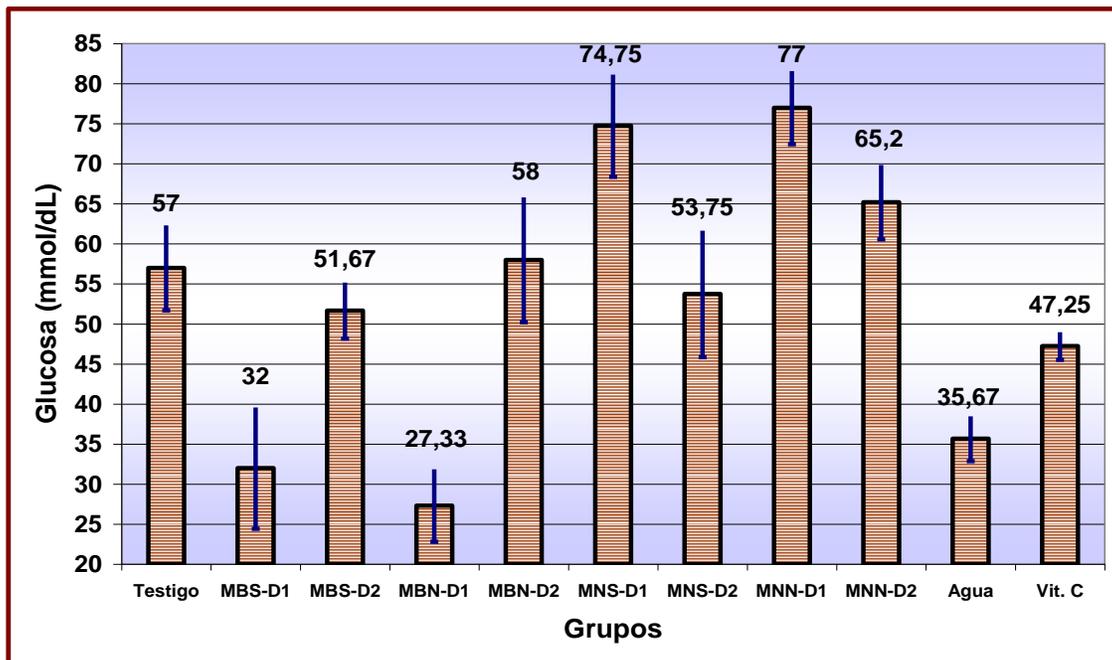


Figura 21. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre la concentración de glucosa en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p \leq 0.05$ significa diferencia significativa.

7.5.2.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR

Los pesos relativos de hígado de ratones macho ICR administrados con zeínas se muestran en la figura 22.

En los grupos de MBS, se encontró el grupo con el mayor peso relativo de todos los grupos tratados con zeínas y este fue MBS-D1 (7.92%); el grupo MBS-D2 (5.64 %) fue menor que el de dosis 1 y que el grupo testigo (6.39%), sin presentar diferencia estadísticamente significativa.

Los grupos MBN-D1(6.27%) y MBN-D2 (6.47%), con pesos similares entre ambos, estadísticamente no tuvieron diferencia significativa con el grupo testigo.

Aunque ligeramente menor el peso relativo del grupo MNS-D1 (5.94%) que el de MNS-D2 (6.17%) y el grupo testigo, tampoco se encontró diferencia significativa.

MNN-D1 (6.48%) y MNN-D2 (6.36%) no presentaron mucha variación en los peso relativos de ambos grupos, ni con respecto al testigo, por lo tanto, no se encontró diferencia significativa. Estadísticamente no se encontró diferencia significativa del grupo de vitamina C con su grupo testigo.

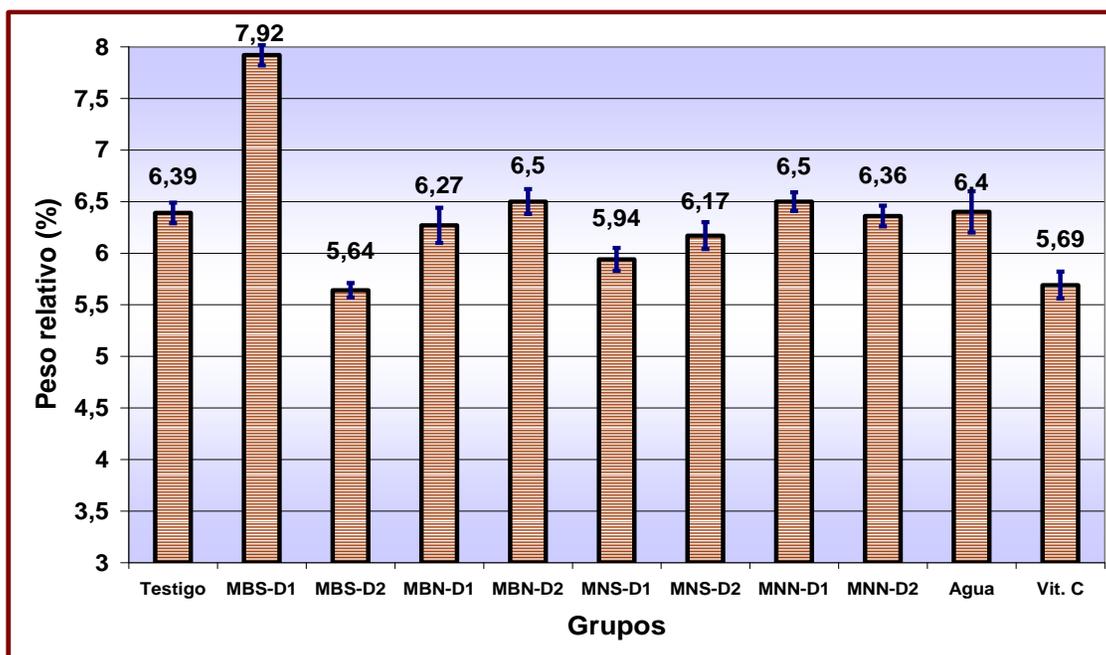


Figura 22. Efecto de zeínas liofilizadas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar (dos dosis cada uno) sobre el peso relativo de hígado en ratones macho ICR con dieta hipercolesterolémica.

Los límites de variación representan el error estándar. El análisis estadístico se realizó con Sigma Stat V.3.5. $p < 0.05$ significa diferencia significativa.



8. Discusión de resultados

8.1. Análisis químico proximal

Con respecto al contenido de **humedad**, como se describió en el cuadro 7, los lotes MBN y MNN con el menor contenido de humedad, esto es debido a que los lotes de maíz nixtamalizado, posterior a este procedimiento fueron liofilizados para evitar su descomposición a consecuencia de la humedad adquirida durante la nixtamalización; los lotes de maíz sin nixtamalizar (MBS y MNS) tuvieron contenidos de humedad mayores, por haber sido únicamente molidos y conservados en botes de aluminio para evitar que absorbieran más humedad del ambiente. El contenido de humedad de los lotes MBN (5.18 g/100 g) y MNN (5.28 g/100 g) fue comparado con la norma NMX-F-049-S-1980, cuyo valor límite es de 11 g/100 g, y ambos lotes tuvieron un contenido menor en aproximadamente un 50%, por lo tanto cumple con la norma. La humedad es un factor muy importante en la calidad de los alimentos, ya que de este depende su preservación. De acuerdo con Darrah (2003), en el caso de los granos y harinas de maíz, un porcentaje elevado de humedad los convierte en un sustrato adecuado para el crecimiento de mohos.

La concentración de **proteína** en los maíces nixtamalizados fueron las mayores, esto fue debido a que la solubilidad de las proteínas disminuye, al producirse interacciones hidrofóbicas, desnaturalización y enlaces cruzados entre proteínas (Paredes-López y Saharópulos-Paredes, 1983; Serna-Saldivar *et al.*,1990). Además investigadores como Bresani y Scrimshaw (1990), ha observado que existe un mejoramiento de la calidad de las proteínas, ya que la biodisponibilidad la lisina y el triptofano se incrementan considerablemente. Aunado a esto, posterior al proceso de nixtamalización, hubo pérdida de humedad durante la liofilización, favoreciendo aún más el incremento en la concentración de proteína. La norma mexicana para harinas de maíz nixtamalizado, establece un mínimo de 8 g/100 g y aunque el lote MNN con 7.96 g/100g es un poco menor a este valor se puede considerar como una diferencia despreciable y MBN con 8.92 g/100 g, aunque es superior al mínimo establecido por la norma, se encuentra dentro de los límites de calidad ya que sólo indica un mínimo, pero no un máximo en su



contenido; por lo tanto, mientras mayor sea el contenido de proteína, mayor será la proporción de zeínas en el maíz.

Las **cenizas** representan la materia inorgánica presente en el grano, principalmente los minerales. Durante la nixtamalización el grano es sometido a una cocción alcalina con Ca(OH)_2 , el cuál al estar disuelto en una solución acuosa disocia los iones que calcio son transportados por el agua hasta el pericarpio, el endospermo y el germen, donde se acumulan y se enlazan con el almidón (Trejo-González *et al.*, 1982). Como consecuencia de este proceso la concentración de zeínas en lo lotes nixtamalizados fue mayor que en los lotes sin nixtamalizar. Aunque la norma mexicana para harina de maíz nixtamalizado, establece un máximo de 1.5 g/100 g, otros investigadores como Watson (2003), encontró un contenido de cenizas que va del 1.1 al 3.9 g/100g, intervalo en el que se encuentran dentro los valores obtenidos en MBS y MNS.

El maíz tiene un bajo nivel de ácidos grasos saturados: ácido palmítico y esteárico, con valores promedio de 11% y 2%, respectivamente, pero con niveles relativamente elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoléico, con un valor promedio de 24%. (FAO, 1993). Los maíces sin nixtamalizar tuvieron un mayor contenido de **lípidos**, con respecto al de los nixtamalizados este es debido a que durante la nixtamalización, se produce una pérdida de las capas del pericarpio dejando más expuesto al grano y sus componentes, provocando que parte de los lípidos se saponifiquen, solubilizándose en el nejayote y eliminándose en los lavados posteriores a la cocción alcalina (Paredes-López y Saharópulos-Paredes, 1982). Es preferente que el maíz contenga poca grasa, pues la harina debe estar previamente desgrasada para facilitar la extracción de las zeínas.

Con respecto al contenido mínimo, la norma mexicana para harinas de maíz nixtamalizado establece una proporción de 4g/100g de lípidos, ambos lotes MBN: 8.04 g/100g y MNN: 8.44 g/100g presentaron el doble de la concentración señalada, sin embargo ambos lotes cumplen con lo requerido por la norma, ya que en ella sólo se establece una concentración mínima.



El maíz es un alimento considerado bajo en fibra y esta proviene principalmente del pericarpio, estructura compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Buendía, 1993). Estos carbohidratos resisten a la acción de las enzimas digestivas del humano, no se absorben en el intestino delgado y fermentan completa o parcialmente en el intestino grueso (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). En los cereales, predomina la fibra insoluble y su característica principal es que retiene poco agua, es poco fermentable y resiste a la acción de microorganismos del intestino (Thane *et al.*, 2005).

En los maíces nixtamalizados (blanco y negro) hubo un mayor contenido de fibra, principalmente por que conservaron el pericarpio al momento de la molienda y esto le confirió la mayor proporción de fibra a las harinas.

Los maíces nixtamalizados tuvieron un menor contenido de fibra debido en parte a que parte de la hemicelulosa que es el componente mayoritario de la fibra de maíz se solubiliza fácilmente en soluciones alcalinas diluidas (Buendía, 1981), además, otra buena proporción de fibra se pierde al momento de eliminar el pericarpio del grano cocido durante los lavados. En el caso particular del lote MBN el contenido relativamente alto de fibra con respecto al lote MNN pudo deberse a que el pericarpio, aún después de la nixtamalización permaneció fuertemente adherido al endospermo y no pudo eliminarse por completo del grano.

El máximo establecido por la norma mexicana es de 2 g/100g para harinas nixtamalizadas. Oropeza y Ortiz, 1989; FAO,1993; Watson, 2003; encontraron un intervalo amplio, desde 0.8 hasta 11.9 g/100g debido a las diferencias entre variedades. Las dos variedades analizadas MBS (3.97 g /100g) y MNS (2.91 g/100g), que se encuentran dentro de este intervalo.

El contenido de **carbohidratos** en los cuatro lotes fue calculado por diferencia de los otros componentes del químico proximal. Los lotes de maíz negro presentaron mayor contenido de carbohidratos, este resultado era previsible, debido a que el maíz blanco presentó una mayor concentración en los otros componentes (proteína, fibra dietaria, cenizas y lípidos). Boyer y Shannon (1987), encontraron que el contenido de carbohidratos en el grano de maíz puede representar hasta un



76% del peso del grano, que es similar a los obtenidos en MBS con 76.31 g/100g y MNS con 79.98 g/100g.

8.2. Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, de los que se han identificado más de 8000 que difieren en estructura químicas y en actividad (Dai *et al.*, 1995). En el maíz se les encuentra concentrados principalmente en el pericarpio, aleurona, endospermo y embrión (Pascual *et al.*, 2002; Jing y Giusti, 2005).

Tanto las zeínas como los compuestos fenólicos son solubles en soluciones etanólicas (Osborne, 1924; Mohsen y Ammar, 2009), en la extracción de las zeínas también se solubilizaron los compuestos fenólicos presentes en el grano.

Los maíces negros y azules, tienen un alto contenido de compuestos fenólicos, presentes como antocianinas, que le confieren el color al grano y se encuentran asociados con la capa de aleurona y el endospermo, mientras más pequeño sea el grano, hay mayor concentración de ellos por que la proporción de capa de aleurona es mayor que en granos grandes. En los maíces blancos los compuestos fenólicos se encuentran en mayor proporción en el pericarpio. (Betran *et al.*, 2000).

Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) mencionan que el proceso de nixtamalización que combina el efecto alcalino y térmico, disminuye la proporción de compuestos fenólicos en maíces, siendo más evidente en variedades blancas que en negras. En el caso particular de maíz blanco, se encontró que después de la nixtamalización la concentración de compuestos fenólicos se incremento, siendo un comportamiento diferente al reportado por Del Pozo *et al.*, 2006, probablemente debido a que no se eliminó completamente el pericarpio durante la nixtamalización, aunado a la eliminación de humedad por liofilización lo que aumenta la concentración final. En los maíces sin nixtamalizar también hay una arrastre de compuestos fenólicos al momento de la extracción de zeínas, pues para dicha extracción se partió de harinas de maíz, por lo que, el grano al haber perdido su estructura integral deja más expuestos todos sus componentes y por



consecuencia de la energía y el calor generado por esta operación, lo que pudo favorecer la ruptura no sólo de estructuras y también de algunos enlaces.

8.3. Electroforesis (SDS-PAGE) de los extractos etanólicos de zeínas

Los pesos moleculares de las zeínas extraídas van de los 17.334 a los 18.520 KDa, que es muy similar a lo reportado por Wang *et al.*, 2003, quienes encontraron que el peso molecular de α -zeína, extraídas de maíz amarillo se encontró en el intervalo de 18 a 26 KDa, un resultado similar fue el encontrado por Pérez-Xochipa (2010), quién al extraer zeínas de 25 variedades de maíces criollos, provenientes del estado de Puebla; en el perfil electroforético encontró bandas con pesos moleculares dentro del intervalo de 21.5 a 31 KDa, similares a los pesos moleculares de los lotes de maíz utilizados. Al comparar los resultados, estos concordaron, por lo tanto, las harinas de maíz fueron tratadas correctamente y la extracción etanólica de zeínas fue la adecuada. Respecto a las variaciones de PM entre las muestras de maíz sin nixtamalizar y nixtamalizadas, la diferencia puede ser consecuencia del proceso de cocción alcalina, el cuál desnaturaliza parte de las proteínas del maíz, entre ellas a las zeínas.

8.4. Evaluación de la capacidad antioxidante

En los extractos etanólicos de zeína de MB disminuyó la actividad antioxidante después de la nixtamalización, opuesto a lo ocurrido en los extractos etanólicos zeínas de MN.

Una posible explicación, puede ser basada en los resultados obtenidos por Del Pozo-Insfran *et al.*, (2006), Tang (2010) y Chen *et al.*, 1996 ya que durante la nixtamalización ocurre un cambio en la estructura de las proteínas y la liberación de algunos péptidos con actividad antioxidante que en su secuencia contengan aminoácidos como Histidina, Leucina, Prolina y Glutámico, extraídos con soluciones etanólicas, en las que también son solubles los compuestos fenólicos, que podrían incrementar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de zeínas. Específicamente en las variedades de maíces blancos Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006, encontraron que los compuestos fenólicos pierden capacidad



antioxidante durante la nixtamalización y en buena parte son eliminados con el pericarpio, por lo que, al comparar los resultados de MBS y MBN, se observó menor actividad antioxidante en MBN.

A diferencia del maíz blanco, los compuestos fenólicos contenidos en el maíz negro, están más disponibles después de la nixtamalización, pues se encuentran presentes en el pericarpio, capa de aleurona y una buena proporción se concentran en el endospermo y por el tipo de compuestos fenólicos (antocianinas aciladas) son más estables al proceso térmico alcalino (Fossen *et al.*, 1998) y sumado a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes, el proceso de nixtamalización favoreció la degradación parcial de las zeínas.

Por lo anterior, podría decirse que en el lote de MNN, se observó un sinergismo entre la capacidad antioxidante de las zeínas y posible presencia de péptidos antioxidantes más la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos que pudieran haber sido extraídos en la obtención de las zeínas. Y en los lotes sin nixtamalizar (MBS y MNS) su actividad antioxidante pudo deberse en gran medida a los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos de zeínas y en menor proporción a las zeínas.



8.5. Actividad hipolipemiante de zeínas

8.5.1 Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupos tratados con extractos liofilizados de zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta normal

8.5.1.1. Colesterol sérico total en ratones macho ICR

El colesterol es un derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno y se sintetiza en el hígado. Es un elemento indispensable en la producción esteroidea, síntesis de hormonas femeninas (estrógenos) principal componente de la bilis, catalizador activo de intercambios celulares, interviene activamente en la síntesis de los andrógenos e indispensable en la formación de membranas celulares. (Narro-Robles *et al.*, 2007 ; Angel y Angel, 2006).

Su origen exógeno principal son las grasas animales y aunque hay esteroides semejantes al colesterol presentes en vegetales, y que sólo son absorbidos en pequeñas cantidades, probablemente no son utilizados por el organismo. Las concentraciones sanguíneas de colesterol obedecen a múltiples factores como son: edad, género, peso corporal, herencia, dieta, función hepática, consumo de alcohol y actividad física (Kolmer, 1981; Narro-Robles *et al.*, 2007).

Las zeínas que son compuestos de origen vegetal y de naturaleza proteica no mostraron tener efecto de disminuir el colesterol en sangre en individuos sanos con una dieta normal, un factor que pudo tener influencia sobre este comportamiento, fueron las dosis administradas, que se establecieron al ser calculadas en base al consumo per-capita de maíz en México, el contenido de proteína de cada lote maíz (obtenido del análisis químico proximal, valores indicados en el cuadro 7) y correlacionado con la proporción promedio de zeínas (52%), dando como resultado que la dosis de los extractos liofilizados de zeínas fueran insuficientes para presentar un efecto evidente. En trabajos como el de Bakhit *et al.*, 1994, Sirtori *et al.*, 1977 y Verrillo *et al.*, 1985, quienes trabajaron con proteína de soya como hipolipemiante, utilizaron modelos normocolesterolémicos sin encontrar diferencias significativas en el colesterol sérico total de los grupos tratados con soya y los grupos controles.



El grupo administrado con Vitamina C, tuvo una concentración de colesterol (64.5 mmol/L) similar a los grupos tratados con extractos liofilizados de zeínas y menor que su grupo testigo (66.25 mmol/L), aunque aparentemente no se tuvo diferencia en la concentración de colesterol, se debe resaltar que el colesterol esta conformado por lipoproteínas (LDL y HDL) que varían en su proporción y en conjunto contribuyen en la concentración de colesterol total, aunado a esto, la acción antioxidante de vitamina C previene la oxidación del col-LDL , por lo que la vitamina C ayuda a la reducción en la acumulación de colesterol en las paredes celulares, aunque no propiamente reduzca los niveles de colesterol sérico (Naidu, 2003).

8.5.1.2. Triacilglicéridos séricos en ratones macho ICR

Los triglicéridos constituyen la principal fuente de reserva de energía en el organismo, pues son el componente mayoritario en los depósito de grasa del organismo y pueden ser oxidados y utilizados como fuente de energía (Kolmer, 1981). La lipoproteína lipasa y la lipasa hepática son enzimas involucradas en el proceso de hidrólisis de los triglicéridos e incrementan su actividad después de consumir alimentos y disminuyen su actividad en estado de ayuno (Cansen *et al.*, 1998).

Los grupos tratados con zeínas liofilizadas tanto en MB y MN, aunque no tuvieron diferencias significativas presentaron variaciones en sus concentraciones y estas pudieron haber estado relacionadas con el tamaño de los animales, la proporción de grasa y la actividad física, por otra parte, previo a la extracción del suero sanguíneo los ratones fueron puestos en ayuno por un período de 12 horas, lo que promueve al organismo hacer uso de sus reservas energéticas y aunque la actividad enzimática esta disminuida, no es basal y pudieron ser hidrolizados una parte de los triglicéridos.

La concentración de triglicéridos en el grupo de vitamina C resulto menor que su grupo testigo y en la mayoría de los casos menor que los grupos administrados con las zeínas liofilizadas; investigadores como Sokoloff *et al.*, 1966, demostraron



que en pacientes suplementados con Vitamina C, la concentración de triglicéridos en el plasma disminuyó al estimular la actividad de la enzima lipoproteína lipasa.

8.5.1.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR

Las lipoproteínas de alta densidad (col-HDL), son las lipoproteínas encargadas de transportar el colesterol desde los tejidos hasta el hígado. Estas moléculas tienen aproximadamente un 50% de proteínas por masa y un 50% de lípidos, por ello tienen una alta densidad (West, 1993). Estudios epidemiológicos han demostrado que mientras mayor sea la concentración de col-HDL y menor la de col-LDL pueden ayudar a prevenir o reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Revista Panamericana de Salud Pública, 2007).

El grupo MNS-D2, fue el que presentó la concentración más elevada de col-HDL (20.83 mmol/L), seguido del grupo MNN-D2 (15.62 mmol/L). Aunque los extractos etanólicos de zeínas de MNS no fuesen los que tuvieron la mayor actividad antioxidante *in vitro*, presentaron un efecto favorable *in vivo*. Para los grupos administrados con liofilizados de zeínas provenientes de MN que presentaron las concentraciones más elevadas la dosis administradas fueron las más altas, mientras que los grupos de MB las concentraciones de col-LDL se presentaron en los grupos administrados con las dosis más bajas. Implicando que los extractos de zeínas de MB, siendo consumidos en cantidades moderadas pueden tener suficiente efecto y no así en altas concentraciones y los extractos de zeínas de MN deben ser consumidos en mayores cantidades para observar un mejor efecto. En general los grupos administrados con zeínas liofilizadas tuvieron mayor concentración de col-HDL que el grupo testigo, y teniendo como antecedente que estas moléculas se sintetizan y secretan en el hígado (Laris *et al.*, 2005), se puede plantear la hipótesis de que dichos extractos estimulen al hígado para producir en mayor cantidad col-HDL.

En el grupo de vitamina C, se obtuvo una concentración de col-HDL de 17.22 mmol/L, pero no presentó un incremento considerable con su grupo testigo (17.1 mmol/L), sin embargo McRae (2007), tampoco encontró una diferencia



significativo en el incremento de col-HDL por la suplementación de vitamina C con respecto al grupo testigo.

8.5.1.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR

El efecto observado en los grupos MNS-D1 y MNN-D2, mostraron un incremento en la concentración de col-LDL no esperado, ya que en individuos sanos puede ser factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Estas lipoproteínas son las encargadas de transportar el colesterol a los tejidos productores de hormonas esteroideas, por lo tanto desempeñan un papel importante durante el crecimiento, pero en adultos un incremento en las col-LDL esta asociado al desarrollo de aterosclerosis (Revista Panamericana de Salud Pública, 2007; West, 1993).

En los grupos administrados con zeínas liofilizadas de MB, las concentraciones de col-LDL fueron menores y más homogéneas entre sí.

El comportamiento observado tanto para las zeínas liofilizadas de MB y MN, puede dar la pauta para futuros trabajos en los que se prueben dosis diferentes para encontrar la más adecuada en individuos sanos, como preventivo en el desarrollo de dislipidemias y enfermedades cardiovasculares, ya que Carrol (1982), mencionó que las proteínas de origen vegetal como la soya favorecen la disminución de col-LDL plasmático.

El grupo tratado con vitamina C tuvo una concentración de col-LDL similar a la de su grupo testigo y de los grupos administrados con zeínas liofilizadas de MB, sin embargo se observa que fue menor a la de los grupos de zeínas liofilizadas de MN, esta diferencia se debe a que el mecanismo de acción de la vitamina C es captar las ERO para reducir la peroxidación lipídica e inhibir la modificación oxidativa de las LDL, haciendo que conserven la capacidad de ser reconocidas por los receptores de membrana disminuyendo su concentración en el torrente sanguíneo (McRae, 2007).



8.5.1.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR

En los grupos MBS-D1, MBS-D2 y MNN-D1 se observa un ligero incremento en la concentración de glucosa, por las condiciones previas al estudio se esperaba que hubiera hipoglucemia, aunque en algunos casos se ha encontrado que en períodos de ayuno, se presente una hiperglucemia y una posible explicación es que por esta condición previa a la toma de muestra y a la actividad física, su organismo haya agotado la mayor parte de las reserva de glucógeno y para regular esta deficiencia por medio de la ruta de la gluconeogénesis tomará aminoácidos de las proteínas de la dieta y de las zeínas, para formar glucosa y usarla como fuente de energía (Kolmer, 1981). En los grupos restantes era de esperarse que no hubiera incremento en la glucosa, por la condición de ayuno.

Las concentraciones de glucosa en el grupo de vitamina C y su grupo testigo no tuvieron una diferencia marcada, pues no se ha encontrado que la vitamina C tenga algún efecto sobre la concentración de glucosa.

8.5.1.6. Peso relativo del hígado en ratones macho ICR

El incremento de peso en hígado, es principalmente causado por acumulación de lípidos en los hepatocitos, aunque la elevada actividad metabólica del ratón, tiende a limitar la cantidad de grasas acumulada en el cuerpo de estos animales (Webster y Liljegren, 1955).

En todos los grupos administrados con zeínas liofilizadas de MB y MN se observó que el peso relativo del hígado se mantuvo homogéneo, por lo que evidenciaron no ser tóxicas para los animales, así como tampoco favorecer la acumulación de lípidos en hígado. El comportamiento del grupo de vitamina c fue similar al de los grupos de extractos de zeínas y no favoreció la acumulación de lípidos en el hígado.



8.5.2. Perfil lipídico, glucosa y peso relativo de hígado para grupostratados con extractos liofilizados de zeínas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar con dieta hipercolesterolémica

8.5.2.1. Colesterol total sérico en ratones macho ICR

Altos niveles de colesterol sérico incrementan el riesgo de desarrollar aterosclerosis en humanos y en algunas cepas de ratón predispuestas para ello (Björkbacka *et al.*, 2004). En todos los grupos se observó incremento en los niveles de colesterol sérico, principalmente por la dieta, rica en grasas y carbohidratos, aunque en particular el grupo MNS-D2, presentó un incremento que rebasó considerablemente los niveles de colesterol del grupo testigo y de los otros grupos administrados con zeínas liofilizadas, el efecto pudo ser causado en primera instancia por la dosis, ya que en una dosis menor como la del grupo MNS-D1, la concentración de colesterol sérico se encontró un 18.7% por debajo del grupo MNS-D2, una relación similar entre grupos se observó en los grupos MBS-D1 y MBS-D2, en el que la dosis más baja tuvo mejor efecto al evitar que la concentración de colesterol sérico incrementara. Algunos estudios en animales han demostrado que otras proteínas de origen vegetal, como la proteína de soya disminuyen los niveles de colesterol total en plasma (Carrol y Kurowska, 1995). Aunque hasta el momento los mecanismos de acción todavía no están bien establecidos y se han sugerido algunos como son el incremento en la síntesis de ácidos biliares, incremento en la concentración de la apolipoproteína B y disminución de la producción de colesterol en hígado (Potter *et al.*, 1995). Por lo tanto es posible que a bajas dosis de extractos liofilizados de zeínas se active algún mecanismo como los planteados para la proteína de soya y que a concentraciones mayores de estos extractos se decline esta actividad produciendo un incremento en la concentración de colesterol total sérico.

En diferentes estudios se ha demostrado que la administración de vitamina C puede reducir la concentración de colesterol total en individuos con hipercolesterolemia y aterosclerosis (Turley *et al.*, 1976; Naidu, 2003), sin embargo en el presente trabajo no se observó dicho efecto, esto puede deberse a que la dosis de vitamina C fuera insuficiente para contrarrestar el incremento de



colesterol sérico inducido por la dieta, y de acuerdo con lo planteado por Linus Pauling (1970), es que mientras mayor sea la ingesta de vitamina C, mayores serían los efectos benéficos.

8.5.2.2. Triacilgliceridos séricos en ratones macho ICR

El rol de los triglicéridos en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares aún no está completamente establecido, aunque estudios retrospectivos han mostrado una relación entre la concentración de triglicéridos séricos y el riesgo de desarrollar estas enfermedades (Iso *et al.*, 2001).

En los grupos tratados con zeínas liofilizadas tanto de MB y MN se observó una notable disminución en la concentración de triglicéridos, esto puede ser debido a que el método que se empleó para medir los triglicéridos, cuantifica sólo los quilomicrones y no los triglicéridos totales (Galán-Zariñan, 2009). Además, estudios realizados con dietas a base de proteína de soya se encontró una disminución en la concentración de triglicéridos séricos y hepáticos, como resultado de la disminución en la expresión de los genes reguladores de la lipogénesis hepática e incrementó en la oxidación de los ácidos grasos (Torres y Tovar, 2007).

En el grupo de vitamina C y su testigo, el contenido promedio de triglicéridos fue de 1.24 mmol/L, y es menor a la concentración de estos grupos pero con dieta normal, el efecto de disminuir los niveles de triglicéridos ha sido estudiado por investigadores como Sokoloff *et al.*, 1966, quienes sugieren que la disminución en los niveles triglicéridos por la suplementación de vitamina C, podría tener efecto sobre la lipoproteína lipasa, que es la enzima encargada de degradar la mayor proporción de triglicéridos séricos; otra posible explicación es la planteada por Hanck y Weiser, 1977; que sugieren que la vitamina C tiene efecto en el metabolismo de los ácidos grasos y participa en la síntesis de carnitina, que es el principal transportador de ácidos grasos de cadena corta al interior de la mitocondria donde se lleva a cabo su oxidación.



8.5.2.3. Lipoproteínas de alta densidad (col-HDL) séricas en ratones macho ICR

Existe una correlación inversa entre la concentración plasmática de col-HDL y el riesgo de desarrollar cardiopatías y aterosclerosis. Uno de los mecanismos por medio del cuál las HDL evitan la formación del ateroma, es el transporte reverso de colesterol (Pérez-Méndez, 2004). En los grupos tratados con zeínas liofilizadas, se observa que a mayor concentración de zeínas, mayor es la concentración de col-HDL, a excepción del grupo MNN-D1 en el que a menor concentración se observó el mayor efecto, si bien existen investigaciones de otras proteínas de origen vegetal que pueden incrementar los niveles de col-HDL séricos, también es importante resaltar que los extractos liofilizados de zeínas, en su composición están presentes las zeínas y en menor proporción compuestos fenólicos, que pueden potenciar el efecto antioxidante de los extractos. Aunado a esto en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* se encontró que la mejor actividad la tuvieron los extractos etanólicos de MNN, esta podría ser una explicación de la diferencia significativa en el contenido de col-HDL. En el caso de los grupos MBS-D1 y MBN-D1, el contenido de col-HDL es muy bajo aún con respecto al grupo testigo, lo que favorece el aumento en la concentración de col-LDL y la oxidación de estas lipoproteínas por acción de los radicales libres producidos por la hipercolesterolemia; por lo tanto es preferible administrar los extractos liofilizados de zeínas de MBS y MBN en dosis mayores a estas, en estados de hiperlipidemia. Aunque sería importante realizar estudios posteriores con dosis diferentes, para corroborar que haya un incremento significativo en la concentración de col-LDL, ya que en el estudio realizado por Anderson *et al.*, 1995, encontraron que los niveles de colesterol total y col-LDL y triglicéridos disminuyeron su concentración significativamente, sin embargo la concentración de col-HDL, aunque aumentó su concentración, esta no fue significativa.

En el grupo de vitamina C se observa una disminución en la concentración de col-HDL con respecto a su grupo testigo, esta diferencia no fue significativa por lo tanto se podría sugerir que al suplementar individuos con hiperlipidemias es



recomendable elevar la dosis con respecto a la dosis suplementada a individuos sanos.

8.5.2.4. Lipoproteínas de baja densidad (col-LDL) séricas en ratones macho ICR

El incremento en la concentración de col-LDL en plasma, se ha postulado como un factor de riesgo primario para el desarrollo de enfermedades coronarias y aterosclerosis. Una elevada concentración de estas lipoproteínas en plasma, las hace blanco fácil de la oxidación, permitiendo así que sean fagocitados por monocitos ocasionando un proceso inflamatorio y acumulación de lípidos en la pared vascular por la formación de células espumosas (Abidi *et al.*, 2006; Buitrago *et al.*, 2005).

Las concentraciones de col-LDL en los grupos tratados con zeínas liofilizadas de MB, conservaron una correlación inversa con respecto a la concentración de col-HDL, esto se pone de manifiesto al comparar las concentraciones de col-HDL y LDL de un mismo grupo, es decir, los grupos que tuvieron mayor concentración de col-HDL, mostraron una tendencia a disminuir la concentración de col-LDL y viceversa. La mejor relación entre estas lipoproteínas es que el col-HDL sea elevado y el col-LDL tenga menor concentración, sin embargo en los grupos tratados con zeínas liofilizadas de MN se encontraron valores más dispersos, ya que en algunos casos, como el grupo MNS-D2 se favoreció el incremento en la concentración de col-LDL. Una posible explicación es que las zeínas en concentraciones altas fueran captadas por los receptores de LDL, en lugar de las col-LD, ya que estos receptores son los encargados de remover las col-LDL del plasma (Abidi *et al.*, 2006); mientras que a concentraciones menores únicamente favoreciera la regulación de estos receptores, promoviendo la disminución de col-LDL en el plasma. Beynen (1990) y Kurowska y Carroll (1990), al alimentar animales con dietas hiper y normocolesterolémicas enriquecidas con proteínas vegetales, la única diferencia aparente que encontraron fue una baja regulación de los receptores LDL hepáticos.



Entre el grupo de vitamina C y su grupo testigo, se encontró una diferencia en concentraciones, siendo el grupo de vitamina C el de mayor concentración de col-LDL, este efecto no es el esperado, pues al ser antioxidante debería haber favorecido su disminución, sin embargo, pudo haber ocurrido que la dieta rica en lípidos y carbohidratos contrarrestara el efecto benéfico de la vitamina C.

8.5.2.5. Concentración de glucosa en ratones macho ICR

Dentro de las causas de enfermedad cardiovascular se encuentra la concentración elevada de glucosa en sangre como factor de riesgo aterosclerótico, dentro de los mecanismos propuestos por la hiperglucemia se encuentra el aumento del estrés oxidativo (King *et al.*, 1999).

Los valores de glucosa en los grupos administrados con extractos liofilizados de zeínas son variables entre un grupo y otro, sin embargo se observa que en los grupos MBS-D1 y MBN-D1 existe una tendencia más marcada a disminuir la concentración de glucosa. En los grupos de zeínas liofilizadas de MN, el efecto hipoglucemiante se observa en MNS-D2 y MNN-D2. Debido a que no existe evidencia de estudios en animales en los que se haya probado la acción hipoglucemiante de las zeínas, no se conoce el mecanismo de acción por el cuál estos extractos sean hipoglucemiantes, y en relación a los resultados obtenidos en el presente trabajo, esta actividad esta en función de la dosis administrada de las zeínas liofilizadas y la variedad de la que provengan.

En ratones alimentados con dieta hipercolesterolémica no se observó efecto que la vitamina C tuviera efecto hipolipemiante.

8.5.2.6. Peso relativo de hígado en ratones macho ICR

La hepatomegalia es un término empleado para definir un aumento en el tamaño del hígado. El incremento en el tamaño del hígado puede esta ligado a múltiples factores como son infecciones, congestión vascular, obstrucción biliar y por depósitos (Muñoz-Bartolo, 2007).

En este estudio el incremento en el peso relativo de hígado de ratones alimentados con dieta hipercolesterolémica es ocasionado por una acumulación



de lípidos. Las variaciones entre grupo no resultaron ser significativas y aunque los extractos liofilizados de zeínas modificaron la concentración de lípidos en el plasma, no evitaron la deposición de grasas en el hígado, pero en algunos grupos como MBS-D2 y MNS-D1 la acumulación fue menor. La vitamina C con respecto a su grupo testigo evitó moderadamente la acumulación de los lípidos.

8.6 Corolario

El posible efecto antioxidante e hipolipemiente de las zeínas no se puede descartar, sería conveniente realizar otros estudios que den seguimiento al presente trabajo, sustituyendo los extractos liofilizados de zeínas por hidrolizados de zeínas o adicionando los hidrolizados a la dieta conservando las condiciones de trabajo y evaluando los mismos parámetros.



9. Conclusiones

- La composición química proximal de las muestras de maíces nixtamalizado y sin nixtamalizar, varió en función de la variedad y del proceso térmico alcalino.
- Los compuestos fenólicos totales en maíces nixtamalizados tuvieron mayor concentración que en los maíces sin nixtamalizar, y el MBN fue el de mayor concentración de los cuatro lotes.
- Con el proceso de extracción etanólico se obtiene un concentrado de zeínas enriquecido con una proporción de compuestos fenólicos.
- El extracto etanólico de zeínas obtenido a partir de muestras de MNN, mostró mediante los métodos del radical catiónico ABTS y DPPH, la mejor actividad antioxidante *in Vitro*.
- La administración de zeínas liofilizadas a animales de experimentación, no presentó un efecto hipolipemiante homogéneo, sin embargo, los grupos de animales de prueba, administrados con zeínas de maíz blanco nixtamalizado, modificaron de manera favorable el perfil lipídico tanto en la dieta normal, como en la dieta hipercolesterolémica.
- Los extractos de zeínas liofilizadas de MBS-D1 y MBN-D1 tuvieron una buena actividad hipoglucemiante en ratones administrados con dieta hipercolesterolémica.
- Las dosis administradas no tuvieron el mejor efecto; por lo tanto, será necesario probar dosis diferentes, para encontrar la de mejor resultado sobre perfil lipídico.



10. Referencias bibliográficas y electrónicas

- Abdel-Aal S., Hucl P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354
- Abidi P., Chen W., Kraemer FB., Li H., Liu J. (2006). The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new action mechanisms. *J Lipid Research.* 47:2134-2147
- AOAC. (2005). Association of Analytical Chemist, Official Methods of Análisis, 14th ed., Arlington, VA, EEUU.
- Abuja PM., Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chem.* 306:1-17
- Adom KK., Liu RH. (2002). Antioxidant Activity of Grains. *J Agric Food Chem.* 50(21):6182-6187
- Agama AE., Ottenhof MA., Farhat IA., Parédes LO., Ortiz CJ., Bello PLA. (2005). Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. *Agrociencia. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.* 39(4):419-429
- Aguilar-Salinas CA., Gómez FJ., Lerman I., Vázquez C., Pérez O., Posadas C. (2004). Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Rev de Endocrinología y Nutrición.* 12(1):7-41
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915-792
- Anderson JW., Johnstone BM., Cook-Newell ME. (1995). Meta-Analysis of the effect of soy protein intake on serum lipids. *The new Eng J Med.* 333(5):276-282
- Angel MG., Angel RM. (2006). Interpretación Clínica del Laboratorio. 7ª ed. Editorial Médica Panamericana, Colombia
- Antuna GO., Rodríguez HS., Arámbula VG., Palomino GA., Gutiérrez AE., Espinosa BA., Navarro OE., Andrio EE. (2008). Calidad Nixtamalera y Tortillera en Maíces criollos de México. *Rev Fitotecnia Mexicana.* 31(3):23-27.
- Argos P., Pedersen K., Marks., MD., Larkins BA. (1982). *J Biol Chem.* 257:9984-9990
- Ascaso JF., Martínez-Valls J., Serrano S., Pedro F., Soriano P., Carmena R. (1986). Hipotiroidismo primario y cardiopatía isquémica. *Med Clin (Barc).* 86:757-760
- Bakhit RM., Klein BP., Essex-Sorile D., Ham JO., Erdman JW., Potter SM. (1994). Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentration. *J Nutr.* 124:213-222
- Bakic M. (2007). Pathogenic aspects of atherosclerosis. *Acta Medica Medianae.* 46:25-29
- Ballester M. (1996). Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin Barc.* 107:509-515
- Bharaktiya S., Orlander PR., Woodhouse WR. (2010). Hypothyroidism. www.medscape.com



- Beckman KB, Ames BN. (1998). The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev.* 78:547-581
- Betran J., Bockholt AJ., Rooney LW. (2000). Blue corn. A.R. Hallauer (Ed.), *Specialty corns*. Boca Raton: CRC Press. Pp. 293-301
- Bittner A., Castro P., Pérez O., Corbalán P., Troncoso R., Chiang M. (2005). Inflamación y estrés oxidativo en el síndrome coronario agudo: ¿dos fenómenos relacionados? *Bol Esc Med.* 30(1):11
- Björkbacka H., Kunjathoor VV., Moore KJ., Koehn S., Ordija CM., Lee MA., Jeans T., Luster AD., Golenbock DT., Freeman MW. (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Medicine.* 10(4):416-421
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology.* 30:609-615
- Boyer CD., Shannon JC. (1987). Carbohydrates of the kernel. *Am Assoc Cereal Chem.* 1:139-161
- Brand-Williams W., Cuvelier E., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28:25-30
- Bressani R., Scrimshaw NS. (1958). Effect of lime treatment on in vitro availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. *J Agric Food Chem.* 6(10):774-778
- Buendia GMO. (1981). Características morfológicas de mazorca, propiedades físicas y de calidad protéica del maíz (*Zea mays L.*) normal y mejorado, relacionado con el proceso de nitamalización. Tesis de Licenciatura, UACH. Chapingo, México.
- Buitrago L., Delgadillo A., Guzmán N., Fernández N., Mejía I., González MP. (2005). Disfunción endotelial inducida por hipercolesterolemia: estudio "in vitro" en un modelo animal. *Rev Med.* 13(1):37-44
- Burda S., Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 49:2774-2779
- Carmena R y Ordovás JM. (1999). Dislipidemia diabética en Hiperlipemias clínicas y tratamiento. Editorial Doyma. Pp 139-153
- Carroll KK., Kurowska EM. (1995). Soy consumption and Cholesterol Reduction: Review of Animal and Human Studies. *J Nutr.* 125:594-5978
- Cortéz A., Wild-Altamirano. (1972). Contribución a la tecnología de la harina de maíz. Mejoramiento nutricional del maíz. Publicación INCAP L-3, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.
- Cruz E., Sanfiel L., Palacio M. (2004). Estrés oxidativo e hipertensión arterial esencial: una realidad clínica. *Rev Cubana Invest Biomed.* 23(3)



- Dai GH., Andary C., Mondolot-Cosson L; Boubals D. (1995). Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Europ J Plant Pathol.* 101:541-547
- Darrah PR. (1993). The rhizosphere and plant nutrition a quantitative approach. *Plant and Soil.* 155/156:3-22
- Davidsohn I, Bernard HJ, (1983). Diagnóstico clínico por el laboratorio. Sexta edición. Salvat editores S.A. Barcelona. Pp 634-878.
- Del Pozo-Insfran D., Brenes CH., Serna-Saldivar SO., Talcote ST. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research Int.* 39:696-703
- Delfante A. (2009). Abordaje nutricional del síndrome nefrótico. www.nutrilearnig.com.ar
- Delgado AE., Fernández JL., Brown C., León OH., Flores H., García RA. (2002) Estrés oxidativo e infarto agudo del miocardio. *Rev Cubana Med.* 41(6)
- Delgado RL., Martínez SG. (2009). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Rev Cubana Farm.* 43(1).
- Dickey LC., Dallmer MF., Radewonuk ER., Parris N., Kurantz M and Craig JC. (1998). Zein bath extraction from drye-milled corn cereal disintegration by dissolving fluid shear. *Cereal Chem.* 75:356-443
- Drago ME., López M., Saíinz TR. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mexicana de ciencias farmaceuticas* 37(4): 58-68
- Elejalde GJI. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna (Madrid).* 18(6):326-335
- Elias RJ., Kellerby SS., Decker E. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr.* 48(5):430-441
- Escudero-Álvarez E., González-Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutr Hosp.* 21(2):6172
- Escott-Stump S. (2005). Nutrición, diagnóstico y tratamiento. Quinta edición. McGraw Hill Interamericana. México.
- Espín C., Soler C., Wichers J., García C. (2000). Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antirradical Activity for Foodstuff. *J Agric Food Chem.* 48:1588-1592
- FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana.
- Fossen T., Cabrita L., Andersen OM. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chem.* 63(4): 435-440
- Galán-Zariñan G. (2009). Estudio del efecto de un simbiótico sobre el perfil lipídico en modelos murinos de hiperlipidemia. Tesis de maestría. IPN-ENCB. México.
- Gibson T., Kilbourn K., Simmonds HA. (1979). Mechanism and treatment of hypertriglyceridemia in gout. *Ann Rheum Dis.* 38:31-40



- Goldstein JL., Hazzard WR., Schrott HG., Bierman EL., Motulsky AG. (1973). Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 52:1533-1543
- Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-255
- Hanck A., Weiser H. (1977). Vitamin C and lipid metabolism. *Int J Vitam Nutr Res. Suppl* 16, 67
- Harman D. (1993). Free radical theory of aging. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine.*
- Henry JB. (1997). Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Novena edición. México
- Hisashi M. (1986). Effects of crude drugs on experimental hipercholesterolemia tea and its active principles. *J Entnopharm.* 17:213-224
- Iso H., Naito Y., Sato S., Kitamura A., Okamura T., Sankai T., Shimamoto T., Lida M., Komachi Y. (2001). Serum Triglycerides and Risk of Coronary Herat Disease among Japanese Men and Women. *Am J Epidemiol.* 153(5):490-499
- Jansen H., Breedveld B., Schoonderwoerd K. (1998). Role of lipoprotein lipase in postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis.* 4(1):S31-S34
- Jing P., Giusti MN. (2005). Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *J Agric Food Chem.* 43:389-391.
- Hoseney RC. (1991). Principles of Cereal Science And Technology. Amer Ass Of Cereal Chemists
- Kanani PM., Sperling MA. (2002). Hyperlipidemia in adolescents. *Adolesc Med.* 13(7):37-52
- Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H, Hosonot A. (2000). Effect of admnistration of fermented milk containig whey protein concentrate to rats men on serum lipids and blood presure. *J Dairy Sci.* 83:255-263
- King GL., Wakasaki H. (1999). Theoretical mechanisms by wich hyperglycemia and insulin resitance could be cause cardiovascular diseases in diabetes. *Diabetes Care.* 22:C31-C36
- Kolmer JA. (1981). Diagnóstico clínico por los Análisis de Laboratorio. Tercera edición. Editorial Interamericana México.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 680-685
- Lampe JW. (1999) Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr.* 70:475S-490S
- Laris EMR., Arteaga LA; Cuevas MA., Rigotti RA. (2005). El colesterol HDL: ¿un nuevo objetivo terapéutico en el manejo de las dislipidemias y la aterosclerosis?. *Rev Med Chile.* 133:823-832
- Lindsay DG., Astley SB.(2002). Europena research on the functional effects of dietary antioxidants. *EUROFEDA. Aspects Med.* 23(1/3):1-38
- Linus P. (1970). Evolution and the Need for ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 67(4):1643-1648



- Lee J, Koo N, Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3:21-33
- Maritim AC., Sanders RA., Watkins JB. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17(1):24-38
- Martínez-Hernández AF., Chávez-Aguirre R. (2006). Prevalencia y comorbilidad de dislipidemias en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 45(5):469-475
- Martínez-Tomé M., Murcia MA., Frega N. (2004). Evaluation of antioxidant capacity of cereal brans. *J Agric Food Chem* 52:4690-4699
- McRae MP. (2007). Vitamin C supplementation lowers serum low density lipoprotein cholesterol and triglycerides: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials. *J of Chiropractic Med*. 7:48-58
- Meydani M. (2000). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 71:1665S-1668S
- Mohsen SB., Ammar ASM. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*. 112:595-598.
- Museo de las Culturas Populares, SEP (1987). *El Maíz*. México. Tercera edición. Pp. 20-22
- Naidu KA., (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*. 2:1-7
- Narro-Robles J., Rivero O., López JJ. (2007). *Diagnóstico y tratamiento en la práctica médica*. Segunda edición. Manual Moderno. México.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. *El maíz en la nutrición humana*. Roma: FAO, 1993.
- Oropeza E., Ortiz LB. (1989). Evaluación nutricional de la proteína de seis cultivares de maíz (*Zea mays L.*). *Rev Fac Agron*. 15:228-230
- Osborne TB., (1924). *The Vegetable Proteins*, 2nd edn., Longmans, Green and Co.. London
- Ötles S., Cagindi Ö. (2006). Cereal based functional foods and nutraceuticals. *Acta Sci Pol., Technol Aliment*. 5(1): 107-112
- Paredes-López O., Saharópulos-Paredes ME. (1983). Maize – A review of tortilla production technology. *Bakers Digest*. 13:16-25
- Parris N. and Dickey LC., (2001). Extraction and Solubility Characteristics of Zein Proteins from Drye-Milled Corn. *J Agric Food Chem*. 49:3757-3760
- Pascual TS., Santos BC., Rivas GJC. (2002). LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J Sci Food Agric*. 82:1003-1006.
- Pastromas S., Terzi AB., Tousoulis D., Koulouris S. (2008). Postprandial Lipemia: An Under-Recognized Atherogenic Factor in patients with Diabetes Mellitus. *International Journal of Cardiology*. 126(1):3-12



- Pérez LM. (2000). El estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol.* 11(3):139-142
- Pérez-Méndez O. (2004). Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis. *Arch Cardiol Méx.* 74(1):53-67
- Pérez-Xochipa I. (2010). Estudio de la Variabilidad Genética de maíces criollos y su correlación con el contenido y estructura de las zeínas. Tesis de Doctorado. ENCB-IPN. México
- Potter SM., Messina M., Erdman JW. (1995). Overview of proposed mechanism for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr.* 125(3):606S-611S
- Prior RL. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular damage. *Am J Clin Nutr.* 78:570S-578S
- Procuraduría agraria. (2003). La productividad y competitividad del cultivo de maíz en el Estado de México. Dirección General de Estudios y Publicaciones, Procuraduría Agraria.
- Ramírez E. (2005). Dislipidemias secundarias. *Revista Colombiana de Cardiología.* 11(2):433-436
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26(9/10):1231-1237
- Revista Panamericana de Salud Pública. (2007). Relación entre el colesterol de HDL, los niveles muy bajos de colesterol LDL y los episodios cardiovasculares agudos graves. *Rev Panam Salud Pública.* 22(5):365
- Romero-Elías MJ., Figuero MH., Morale SMA., Rojas RA. (2009). Presence of oxidative stress in the vascular wall and its potential therapeutical management. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 28(3):112-129
- Sánchez FC., Salinas MY., Vázquez CMG, Velázquez CGA, Aguilar GN. (2007). Efecto de las prolaminas de maíz (*Zea mays L.*) sobre la textura de la tortilla. *Arch lat de nut.* 57(3):295-301
- Santibáñez V. (2008). Manejo de dislipidemia en enfermedad renal crónica. *Rev Peruana de Cardiología.* XXXIV(3):201-205
- Serna-Saldivar SO., Amaya Guerra CA., Herrera Macias P., Melesio Cuellar JL., Preciado Ortiz RE., Terrón Ibarra AD., Vázquez Carrillo G. (2008). Evaluation of the lime cooking and tortilla making properties of quality protein Maize hybrids grown in Mexico. *Plant Food Hum Nutr.* 63:119-125
- Serna-Saldivar SO., Gomez MH., Rooney LW. (1990). Technology, chemistry and nutritional value of alkaline-cooked corn products. *Adv in cereal Sci and Tech.* 10:243-307
- Serna-Saldivar SO., Knabe DA., Rooney LW., Tanksley TD., Sproule AM. (1988b). Nutritional value of sorghum and maize tortillas. *J Cereal Sci.* 7:83-94
- Servicios de información agroalimentaria y pesquera. (2006). Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012.



- Silveira-Rodríguez MB., Monereo S., Molina B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos?. *Rev Española de salud pública.* 77 (3): 317-331.
- Singleton L., Orthofer R., Lamuela-Raventos M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299:152-178
- Sirtori CR., Agradi E., Conti F., Mantero O., Gatti E. (1977). Soybean protein diet in the treatment of type II hyperlipoproteinaemia. *Lancet.* i:275-277.
- Shewry PR. and Tatham AS. (1990). The prolamin storage proteins of cereals seeds: structure and evolution. *Biochem J.* 267: 1-12
- Sokoloff B., Hori M., Saelhof CC., Wrzolek T., Imai T. (1966). Aging, atherosclerosis and ascorbic acid metabolism. *J Amer Geriatr Soc.* 14:1239
- Stockey R., Keaney JF Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis (Review). *Physiol Rev.* 84:1381-1478
- Tang X., He Z., Dai Y., Xiong YL., Xie M., Chen J. (2010). Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. 58:587-593
- Taniyama Y., Griendling KK. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension.* 42:1075-1781
- Thane CW., Jones AR., Stephen AM., Seal CJ y Jebb SA. (2005). Whole-grain intake of British young people aged 4-18 years. *The British J of Nutr.* 94(5):825-831
- Torres N., Tovar AR. (2007). The role of Dietary Protein on Lipotoxicity. *Nutrition Review.* 65(6):S64-S68
- Tortora GJ, Anagnostakos NP. (1981). *Principios de anatomía y fisiología.* Sexta edición. Harla México.
- Trejo-González A., Feria-Morales A., Wild-Altamirano C. (1982). The role of lime in the alkaline treatment of maize for tortilla production, modifications of proteins: Food, nutritional, and pharmacological aspects. *Am. Chem. Soc.* Pp. 245-263
- Verrillo A., De Teresa A., Giarrusso PC., La Rocca S. (1985). Soybean protein diets in the management of hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis.* 54:321-331
- Wang JF., Geil PH., Kolling DRJ., Padua GW. (2003). Analysis of Zein by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 51:5849-5854
- Watson SA., (2003). Description, development, structure and composition of the corn kernels. PJ White & LA Johnson. Eds., *Corn: chemistry and technology.* Pp 69-101
- Watson SA., (1987). Structure and composition. En SA Watson y PE Ramstad. Eds. *Corn: chemistry and technology,* St Paul, EE UU., Am Assoc Cereal Chem. Pp. 53-82
- Webster SH., Liljegren EJ. (1955). Organ: body-weight ratios for certain organs of laboratory animals. *Am J Anat.* 97:129-153



- West JB. (1993). Bases fisiológicas de la práctica médica. Doceava edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina
- Wilson CM. (1986). Serial Analysis of Zein by Isoelectric Focusing and Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. *Plant Physiol.* 82:196-202
- Zielinski H. and Kozłowska H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48:2008-2016.
- www.infoagro.com. Consulta julio 2010.
- www.virtual.unal.edu.co. Consulta agosto 2010
- www.siap.gob.mx. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Consulta octubre 2009.
- www.heart.org. Consulta octubre 2010
- www.sinais.salud.gob.mx. Consulta Octubre 2010
- www.mejoravegetal.criba.edu.ar. Consulta Octubre 2010

11. Anexo

11.1. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales

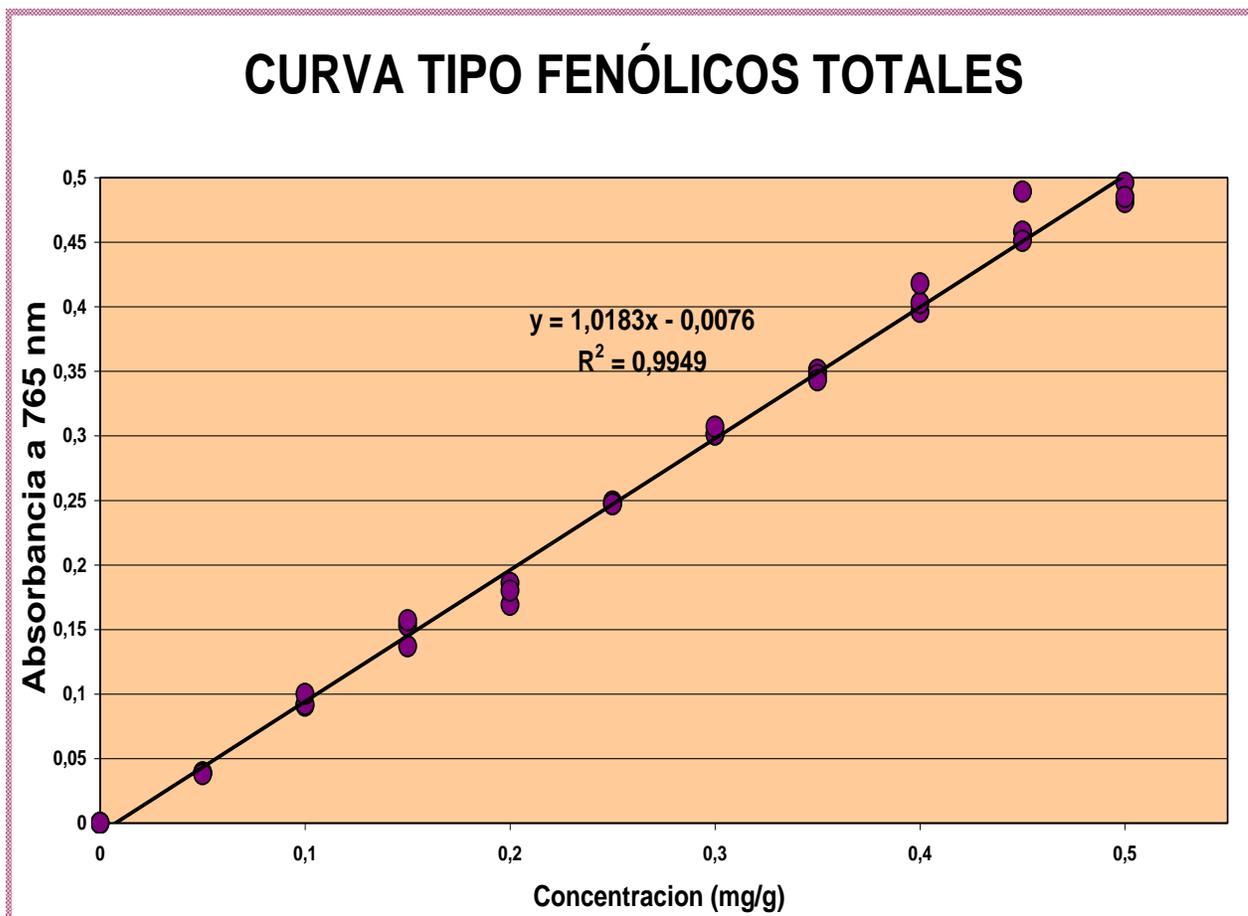


Figura 23. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales



11.2. Curva tipo de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de radical catiónico ABTS^{•+}

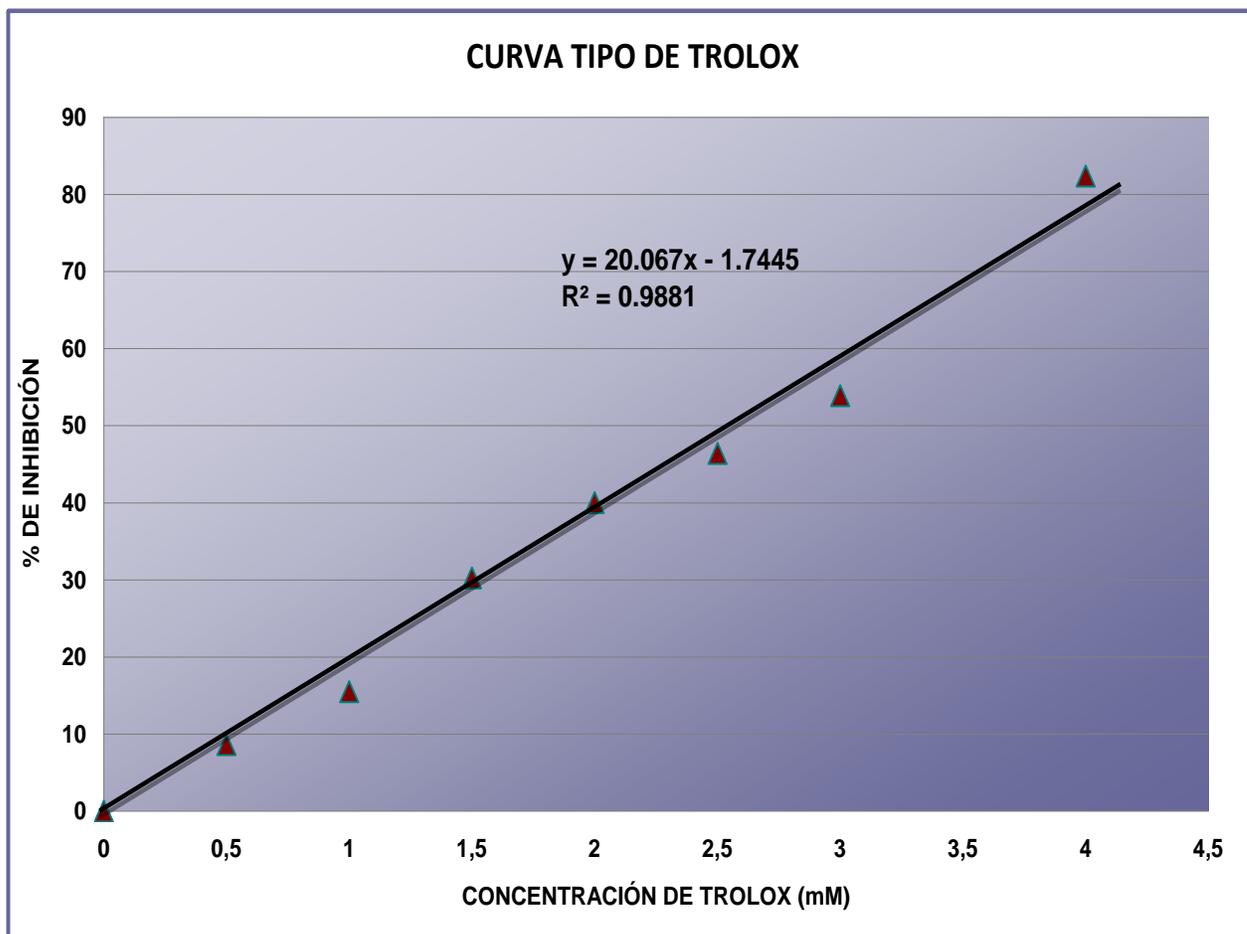


Figura 24. Curva tipo de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de radical catiónico ABTS^{•+}