

## Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

### **Tortillas funcionales elaboradas a base de maíz azul, mezquite y cálices de jamaica**

### **Functional tortillas made from blue corn, mesquite and hibiscus calyces**

Authors/Autores: Villanazul-Verdugo, M.C., Gómez-Aldapa, C.A., Gutiérrez-Dorado, R., Reyna-Fuentes, G., Perales-Sánchez, J.X.K., Félix-Sámano A.L., Reyes-Moreno, C.

ID: e1722

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1722>

Received/Fecha de recepción: July 09<sup>th</sup> 2024

Accepted /Fecha de aceptación: December 05<sup>th</sup> 2024

Available online/Fecha de publicación: January 13<sup>th</sup> 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Villanazul-Verdugo, M.C., Gómez-Aldapa, C.A., Gutiérrez-Dorado, R., Reyna-Fuentes, G., Perales-Sánchez, J.X.K., Félix-Sámano A.L., Reyes-Moreno, C. (2025) Functional tortillas made from blue corn, mesquite and hibiscus calyces. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1722. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1722>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

## Tortillas funcionales elaboradas a base de maíz azul, mezquite y cálices de jamaica

### Functional tortillas made from blue corn, mesquite and hibiscus calyces

#### Tortillas Funcionales Extrudidas/

#### Extruded Functional Tortillas

Villanazul-Verdugo, M.C.<sup>1</sup>() , Gómez-Aldapa, C.A.<sup>2</sup>() , Gutiérrez-Dorado, R.<sup>1,3\*</sup>() , Reyna-Fuentes, G.<sup>1</sup>() , Perales-Sánchez, J.X.K.<sup>1,3</sup>() , Félix-Sámano A.L.<sup>3</sup>() , Reyes-Moreno, C.<sup>1,3</sup>()

<sup>1</sup>Programa de Posgrado Integral en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área Académica de Química, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. <sup>3</sup>Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México

#### \*Corresponding Author:

Roberto Gutiérrez-Dorado. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Calzada de las Américas, Nte 2771. 80030, Culiacán, Sinaloa, México. Teléfono: (667) 231 1146. E-mail: [rgutierrez@uas.edu.mx](mailto:rgutierrez@uas.edu.mx)

## RESUMEN

En México, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y los tumores cancerosos son las principales causas de muerte. Una opción viable para minimizar el efecto nocivo de estas enfermedades es el consumo de granos integrales y partes comestibles de plantas, solas o en combinación, por ejemplo, la mezcla de maíz azul, mezquite y cálices de jamaica, en la elaboración de alimentos funcionales; esto, debido a sus altos contenidos de compuestos bioactivos. En esta investigación se desarrolló una mezcla compuesta optimizada de harinas de maíz azul extrudido (EBCF), vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF) y cálices de jamaica (HCF) para elaborar tortillas funcionales. Se usó un diseño experimental L-Optimal, se probaron 16 mezclas con diferentes niveles de inclusión de las tres harinas. Se optimizó la mezcla para obtener tortillas con las mejores características nutraceuticas (contenidos altos de compuestos fenólicos, antocianinas, flavonoides, actividad antioxidante) y aceptabilidad sensorial adecuada. La mezcla optimizada consistió en 82.8 % EBCF, 10 % FEMPF y 7.2 % HCF. Las tortillas producidas con esta mezcla mostraron altos valores de compuestos fenólicos totales (356 mg eq. de ácido gálico/100g), antocianinas (11.7 mg eq. de cianidina 3-glucósido/100g), flavonoides (37.7 mg eq. de catequina/100g) y actividad antioxidante (5,912  $\mu$ mol eq. de Trolox/100g) y una aceptabilidad sensorial ubicada entre me gusta ligeramente y me gusta moderadamente en una escala hedónica de once puntos. Estas tortillas

funcionales representan una estrategia novedosa para reducir las enfermedades crónicas degenerativas en México.

### **PALABRAS CLAVE:**

*Zea mays* L., *Prosopis laevigata*, *Hibiscus sabdariffa*, extrusión, optimización, fitoquímicos, alimentos funcionales.

### **ABSTRACT**

In Mexico, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, and cancerous tumors are the leading causes of death. A viable option to minimize the harmful effect of these diseases is the consumption of whole grains and edible parts of plants, alone or in combination, for example, the mixture of blue corn, mesquite and jamaica calices, in the preparation of functional foods; this, due to its high content of bioactive compounds. An optimized composite mix of extruded blue corn flour (EBCF), fermented-extruded mesquite pods (FEMPF), and hibiscus calyces (HCF) was developed to produce functional tortillas. Using an L-Optimal experimental design, 16 mixtures, with different inclusion levels of the three flours were tested. The mixture was optimized to obtain tortillas with the best nutraceutical characteristics (high content of total phenolic compounds, anthocyanins, flavonoids, and antioxidant activity) and adequate sensory acceptability. The optimized mixture consisted of 82.8 % EBCF, 10 % FEMPF, and 7.2 % HCF. The tortillas produced with this mixture showed high values of total phenolic compounds (356 mg eq. of gallic acid/100g), anthocyanins (11.7 mg eq. of cyanidin 3-glucoside/100g), flavonoids (37.7 mg eq. of catechin/100g), and antioxidant activity (5,912  $\mu$ mol eq. of Trolox/100g), along with a sensory acceptability falling between liking slightly and liking moderately on an eleven-point hedonic scale. These functional tortillas represent a novel strategy to reduce chronic degenerative diseases in Mexico.

### **KEY WORDS**

*Zea mays* L., *Prosopis laevigata*, *Hibiscus sabdariffa*, extrusion, optimization, phytochemicals, functional foods.

### **Introducción**

La nutrición representa un proceso preponderante para el organismo que consiste en la asimilación de nutrimentos para llevar a cabo funciones básicas de la vida en las que se incluyen el crecimiento, la reproducción y la preservación de la salud (Serón-Arbeloa *et al.*, 2022).

En este sentido, la “malnutrición” involucra los desequilibrios (déficit o excesos) del consumo calórico y/o nutrimental por parte de los seres humanos. Esta afección es una de las principales problemáticas de salud a nivel mundial y puede ser consecuencia de la pobreza o la mala elección de los alimentos, o bien, resultado de una enfermedad (Serón-Arbeloa *et al.*, 2022; OMS, 2024).

Las personas desnutridas, con sobrepeso, obesidad y los adultos mayores son poblaciones con sistema inmunológico comprometido; presentan vulnerabilidad alta a enfermedades infecciosas y crónico-degenerativas. Es por ello por lo que, la

desnutrición, el sobrepeso, la obesidad y las enfermedades crónico-degenerativas, principalmente hipertensión, enfermedades del corazón, diabetes mellitus, tumores malignos, son los principales padecimientos de salud y causas de muerte en México (Thun *et al.*, 2017).

En nuestro país, el principal producto alimenticio del maíz es la tortilla, con un consumo promedio diario de 1,400 millones de tortillas. Los granos de maíz proporcionan macronutrientes (proteínas, almidón, fibra dietética, lípidos) y micronutrientes (vitaminas, minerales). Los maíces blanco y amarillo son los más utilizados para hacer tortillas, pero en algunas regiones también se utiliza el maíz azul. Durante las últimas décadas los productos derivados del maíz azul han recibido atención ya que aportan beneficios potenciales para la salud, como antioxidante, antimutagénico, antiinflamatorio, hipoglucemiante, hipocolesterolémico, antiaterosclerótico, anti-obesogénico, antienvjecimiento, anticancerígeno, debido a la presencia de compuestos como ácidos fenólicos y antocianinas (Serna-Saldívar *et al.*, 2013).

Se ha informado que las vainas de la especie *Prosopis* son una fuente de compuestos bioactivos con actividades antioxidante, antiinflamatoria y antihipertensiva (Díaz-Batalla *et al.*, 2018). Además, la harina de vaina de *Prosopis laevigata* es una buena fuente de lisina, aminoácidos azufrados y compuestos fenólicos totales, con mayor capacidad de eliminación de radicales libres que la soya y el frijol común (Díaz-Batalla *et al.*, 2018). Sin embargo, las vainas de mezquite presentan una alta cantidad de azúcares simples, por lo que es importante eliminarlos, o reducirlos significativamente, para que estas no representen un producto con alto contenido calórico, con potencial hiperglucémico elevado. Es por lo que, Díaz-Batalla (2019) realizó una investigación en donde obtuvo una harina integral fermentada de la vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) con bajo contenido de azúcares simples. La fermentación se llevó a cabo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a 27 °C durante 5 días, hasta el agotamiento de los azúcares. La harina fermentada de vainas de mezquite obtuvo mejoras en sus características nutrimentales en comparación con harinas no fermentadas de la vaina de mezquite.

Por otro lado, México es uno de los principales productores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en América, destacando el cáliz seco de la fruta en la elaboración de concentrados y decocciones (SIAP, 2023). El cáliz de jamaica contienen alrededor del 40 % de fibra dietética, ofreciendo un potencial significativo para fortificación de alimentos con el propósito de incrementar su valor nutracéutico (Ariza & Flores, 2014). Diferentes investigaciones han reportado que los cálices de jamaica son una fuente importante de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y antocianinas los cuales le confieren un potencial antioxidante y farmacológico relacionados en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Agüero *et al.*, 2014; Ariza & Flores, 2014).

La combinación e incorporación de cereales, leguminosas y partes anatómicas de plantas en la elaboración de alimentos como lo son el maíz azul, el mezquite y los cálices de jamaica, puede considerarse una opción para minimizar el efecto causado por enfermedades crónico-degenerativas al contener altos niveles de compuestos bioactivos.

La extrusión es una alternativa a la nixtamalización, no genera efluentes contaminantes, consume bajos niveles de agua, tiempo y energía, y presenta una mayor retención de nutrimentos y fitoquímicos. La extrusión alcalina (proceso ecológico) genera harinas para tortillas con mejores características nutracéuticas y nutricionales respecto al proceso tradicional de cocción alcalina (Milán-Carrillo *et al.*, 2006; Gutiérrez-Dorado *et al.*, 2008; Mora-Rochín *et al.*, 2010; Reyes-Moreno *et al.*, 2018). La tortilla obtenida por el proceso de extrusión tiene la capacidad para mejorar el estado nutricional de los mexicanos y reducir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas. La fortificación de tortillas de maíz azul criollo con harinas de leguminosas y frutos, como el mezquite y la jamaica, representa una opción factible para mejorar sus propiedades nutracéuticas (Gámez-Valdez *et al.*, 2021; León-Murillo *et al.*, 2021; Bon-Padilla *et al.*, 2022). Sin embargo, la utilización de otros ingredientes, diferentes al maíz, para la fortificación de tortillas compromete las propiedades de aceptabilidad sensorial del producto, lo cual debe procurar sacrificarse lo menos posible. En este sentido, es necesario estimar los niveles de inclusión de los ingredientes (harinas) en la mezcla compuesta para elaborar tortillas con propiedades sensoriales aceptables (que el producto no sea rechazado) por los consumidores. Para esta tarea destaca los diseños estadísticos para mezclas y las técnicas de optimización de la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 2009). Cabe señalar que, durante la optimización de los procesos alimentarios, comúnmente se considera idóneo optimizar con más de una variable de respuesta, que permitan describir las características de calidad y rendimiento de los sistemas alimenticios en estudio. Algunas de estas variables se buscan maximizar y otras minimizar. En diferentes casos, estas respuestas compiten, es decir, mejorar una respuesta puede tener un efecto opuesto en otra (Milán-Carrillo *et al.*, 2012). En esta investigación se desarrolló una mezcla compuesta optimizada a base de harinas de maíz azul extrudido (EBCF), vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF) y cálices de jamaica (HCF) adecuada para elaborar tortillas funcionales.

## Material y Métodos

### Materiales

Para la obtención de las tortillas se utilizaron lotes de 500 g de harina de maíz azul (*Zea mays* L), vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) y cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) procedentes de Puebla, del Valle del Mezquita, Hidalgo y de Guerrero, respectivamente.

### Métodos

#### Obtención de las harinas

Para la producción de harina de maíz azul extruido (EBCF) se utilizaron condiciones de proceso optimizado propias de nuestro laboratorio (Milán-Carrillo *et al.*, 2006). Lotes de 500 g de granos de maíz azul se colocaron en una licuadora doméstica para obtener sémola la cual pasó por una malla de cribado US40 (0.425 mm). Previo a la extrusión, la sémola se atemperó (25 °C) y se mezcló con cal (0.21 g por 100 g de sémola) y agua para conseguir un contenido de agua de 28 g por 100 g de sémola húmeda. Todos los lotes se envasaron y se almacenaron a 4-8 °C

durante 12 h. La obtención de la harina de vaina de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF), se logró primero fermentando las vainas de mezquite y posterior extrusión. Para ello, un lote de un kilogramo de harina integral de vaina de mezquite fue sometida a un proceso de fermentación, en el cuál la harina se dispersó en 2 L de agua, para posteriormente pasteurizarse e inocularse con *Saccharomyces cerevisiae* a una temperatura constante de 27 °C durante 5 días o hasta el agotamiento de los azúcares (Díaz-Batalla, 2019). Una vez concluida la fermentación, la mezcla fermentada se deshidrató en estufa de convección (Thermo Scientific, MA, USA) a 65 °C durante 4 h para obtener vainas deshidratadas de mezquite fermentado para después ser extrudidas siguiendo la metodología de Díaz-Batalla *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Lotes de 500 g de vainas deshidratadas de mezquite fermentado se colocaron en una licuadora doméstica para obtener sémola la cual debe pasar por una malla de cribado US40 (0.425 mm). La sémola se mezcló con agua para conseguir un contenido de agua de 16 g por 100 g de sémola húmeda. Todos los lotes se envasaron y se almacenarán a 4-8 °C durante 12 h. Antes de la extrusión, la sémola se atemperó (25 °C). Los procesos de extrusión de maíz azul y de vainas de mezquite fermentado se llevaron a cabo en un extrusor de laboratorio de un solo tornillo Modelo 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, USA). Las condiciones óptimas de operación del extrusor (temperatura de extrusión, ET y velocidad del tornillo, SS) fueron para el maíz azul, ET=85 °C y SS=240 rpm (Milán-Carrillo *et al.*, 2006); y para las vainas de mezquite fermentado, ET=150 °C y SS=170 rpm (Díaz-Batalla *et al.*, 2018); durante la extrusión del mezquite fermentado la temperatura del barril fue de 110, 130 y 150 °C para las zonas de calentamiento 1, 2 y 3, respectivamente, mientras que en el caso del maíz azul la temperatura de barril de las tres zonas de calentamiento fue la misma (85 °C). El material extruido se dejó enfriar, equilibrar en condiciones ambientales; se molió para pasar por una malla de cribado US80 (0.180 mm) y se envasó. Las harinas extruidas de maíz azul y vainas de mezquite fermentado se almacenaron a 4-8 °C. Para la obtención de la harina de cálices de jamaica (HCF), dichos cálices fueron deshidratados (65 °C, 4 h). Lotes de 500 g de cálices de jamaica deshidratados se colocaron en una licuadora doméstica para obtener sémola la cual pasó por una malla de cribado US80 (0.180 mm). Todos los lotes se envasaron y se almacenaron a 4-8 °C hasta su uso.

### Obtención de las tortillas

Para la obtención de las tortillas se utilizaron lotes de 500 g de cada una de las mezclas compuestas a base de EBCF, FEMPF y HCF en las proporciones indicadas en el diseño de experimentos. La masa se obtuvo para cada una de las mezclas compuestas combinando cada una de estas con agua a 60 °C hasta obtener una consistencia adecuada. Posteriormente, la masa fue extendida en una capa delgada con forma de discos con ayuda de una prensa manual, y fue recortada en discos más pequeños y uniformes con un diámetro de 15 cm y un peso de 28 g a 30 g. Las tortillas fueron cocidas a temperaturas que variaron entre 400 °C y 450 °C en planchas de calentamiento durante 40 y 60 s. Las tortillas obtenidas con cada uno de los tratamientos (diferentes mezclas compuestas) se les evaluaron las variables de respuesta: aceptación global de las tortillas (prueba sensorial), actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales (pruebas nutracéuticas).

## **Evaluación de las variables de respuesta**

### **Evaluación sensorial: aceptabilidad global (OA) de tortillas**

Para la evaluación sensorial se seleccionó un panel de 30 jueces no entrenados de ambos sexos (18-35 años) quienes fueron consumidores habituales de tortillas. Los jueces plasmaron sus resultados en una planilla de evaluación para cada muestra de tortillas, donde los atributos a evaluar fueron sabor, olor, color, textura y aceptación general, haciendo uso de una escala LAM (labeled affective magnitud), la cual es una escala bidireccional de 100 mm con una descripción verbal con rangos que van desde -100 (máximo valor de disgusto imaginable) hasta +100 (máximo valor de gusto imaginable), en donde cero (ni me gusta, ni me disgusta) es el punto central. Posteriormente estos valores fueron transformados a una escala de 0 a 100 [0=máximo valor de disgusto imaginable; 100= máximo gusto imaginable, donde 50=ni me gusta, ni me disgusta] (Cardello & Schutz, 2004). Esta transformación se realizó para poder analizar mediante regresión cada una de las respuestas de aceptabilidad de las muestras de tortillas. Finalmente, las muestras de tortillas restantes se secaron y se molieron para que pasarán por una malla de cribado US80 (0.180 mm) y después se envasaron en bolsas de plástico a 4-8 °C, para posteriormente determinar las variables de respuesta nutraceuticas (actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales).

## **Evaluación de las variables nutraceuticas**

### **Obtención de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados**

La obtención de los compuestos fenólicos libres se efectuó suspendiendo 0.5 g de muestra en 10 mL de una mezcla de etanol y agua (80:20, v/v) (Dewanto *et al.*, 2002). La muestra suspendida se agitó en un homogeneizador rotativo circular de tubos (50 rpm, 10 min), posteriormente se centrifugó (8000 rpm, 10 °C, 10 min) y a la pastilla remanente se le realizó una segunda extracción con etanol al 80 %; el sobrenadante de las dos extracciones se concentró a 45 °C usando equipo a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation), y los extractos recuperados se evaporaron a 45 °C hasta sequedad (1 - 2 noches) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los sedimentos obtenidos después de la extracción de compuestos fenólicos libres se desgrasaron con hexano, posteriormente se hidrolizaron con 10 mL NaOH (2 M) a 95 °C y 25 °C durante 30 y 60 minutos, respectivamente, y se neutralizaron con HCl. Los extractos fenólicos ligados se obtuvieron con cuatro extracciones con 10 mL de acetato de etilo (Adom & Liu, 2002; Adom *et al.*, 2003). Posteriormente, los extractos se evaporaron y almacenaron hasta su uso. Las extracciones de los compuestos fenólicos se realizaron por cuadruplicado.

### **Contenido de compuestos fenólicos totales**

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (TPC) se preparó una solución estándar de ácido gálico, se inyectaron 20 µL de la solución estándar (25 - 600 ppm), y extractos libres y ligados sobre una microplaca de 96 pocillos. Cada punto de la curva estándar y extracto se hizo reaccionar con reactivo Folin-Ciocalteu y NaCO<sub>3</sub> (7 %, v / v) añadiendo 180 y 50 µL, respectivamente, para dejar incubar a 25 °C durante 90 minutos. Las muestras se introdujeron a un lector de microplacas modelo Multiskan Skyhigh (thermoscientific, Singapur) para medir su absorbancia a

750 nm utilizando etanol como blanco, y los resultados de TPC se calcularon sumando los valores de compuestos fenólicos obtenidos para los extractos libres y ligados, y se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 100 gramos de muestra en peso seco (mg GAE / 100 g, ps) (Singleton *et al.*, 1999). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### Contenido de flavonoides totales

La medición para flavonoides totales (TF) se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico descrito por Xu & Chang (2007). Para ello, se combinaron 20  $\mu$ L de extracto con 80  $\mu$ L de agua destilada, a los que se añadieron 6  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  y luego 12  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$ , dejando reposar la mezcla durante 5 minutos después de agregar cada reactivo. Finalmente, se añadieron 40  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  1M y 20  $\mu$ L de agua destilada. Los extractos se dejaron reposar durante 30 minutos y luego se midieron a 415 nm usando un lector de microplacas modelo Multiskan Skyhigh (Thermo Scientific, Singapur), utilizando catequina como estándar para la curva de calibración. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se calcularon sumando los flavonoides libres y ligados, expresándose como mg equivalentes de catequina por cada 100 g de muestra en peso seco (mg CAE / 100 g, ps).

### Contenido de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales (TA) se evaluó acorde a la metodología propuesta por Abdel-Aal & Huel (1999). Para esta medición, 0.5 g de muestra se homogenizaron con 10 mL de una solución de metanol acidificado (metanol al 95 % y HCl 1 N, 85:15, v/v) en un tubo de centrífuga de 10 mL. Al tubo con la muestra se le inyectó nitrógeno gas para eliminar el  $\text{O}_2$ , se agitó por 30 min y posteriormente se centrifugó (3,000g / 4 °C /10 min) (Sorvall RCSC, Sorvall Instruments, Dupont, Wilmington, DE, EUA). Se recolectó el sobrenadante. La absorbancia de los extractos se leyó a 535 nm y 700 nm en un espectrofotómetro (UV-vis Genesys 10 UV Thermo Electron Corporation, Madison, WI, EUA). El contenido de antocianinas se calculó de la siguiente manera:

$$TA = [(A_{535\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) / (\epsilon)] \times [(\text{Vol. total del extracto, L}) \times (\text{PM})] \times [1/(\text{Peso de la muestra, g})] \times [1/(\text{ruta óptica, cm})]$$

Dónde: TA = Contenido de antocianinas totales (mg equivalentes de Cianidina 3-Glucósido (EC3G)/ 100 g de muestra, peso seco)

A = Absorbancia

$\epsilon$  = Absorción molar de Cianidina 3-Glucósido (25,965/cm/M)

PM = Masa molar de Cianidina 3-Glucósido (449.2g/mol)

### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AoxA) de las muestras se evaluó usando el ensayo de decoloración descrito por Re *et al.* (1999). Se preparó una solución de ABTS mezclando 0.0192 g del radical con 5 mL de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  2.45 mM, dejándola reposar en

oscuridad durante 16 horas. Luego, se diluyeron 500  $\mu\text{L}$  de la solución ABTS en 45 mL de una solución tampón de fosfatos (PBS) con  $\text{pH} = 7.4$ , ajustando su absorbancia a un rango de 0.7 - 1.0 a 734 nm. Una vez ajustada la absorbancia del radical, se añadieron 1980  $\mu\text{L}$  del radical ajustado a 20  $\mu\text{L}$  de extracto, y su absorbancia se midió a 734 nm con un espectrómetro de cubeta modelo Multiskan Skyhigh (Thermo Scientific, Singapur) 6 minutos después de añadir el radical. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra en peso seco ( $\mu\text{mol TE} / 100 \text{ g, ps}$ ).

### Diseño experimental, análisis estadístico, optimización y validación.

**Diseño experimental:** Para mezclas de tres componentes, el espacio experimental de la mezcla es un triángulo con vértices que corresponden a las formulaciones que son mezclas puras (mezclas que son 100 % de un solo componente). Sin embargo, en algunos casos existen problemas de investigación donde deben hacerse restricciones respecto a los componentes de la mezcla. En nuestro caso, se realizaron restricciones en los tres componentes de la mezcla, las cuales fueron:  $0.550 \leq X_1 \text{ (EBCF)} \leq 0.850$ ;  $0.100 \leq X_2 \text{ (FEMPF)} \leq 0.300$ ;  $0.050 \leq X_3 \text{ (HCJ)} \leq 0.150$ ; donde, en cualquier punto del área experimental  $X_1 + X_2 + X_3 = 1.0$  (es decir, 100 %). Hay que recordar que, cada punto en la gráfica corresponde a una combinación específica de las proporciones de los componentes. En los diseños para mezclas con restricciones la situación se simplifica mediante la introducción de pseudocomponentes, los cuales tienen relación con los componentes originales de la mezcla. En estos casos la región experimental no tiene forma estándar, sino que tienen la forma de un politopo irregular (un politopo es una figura en un espacio euclidiano de varias dimensiones; un politopo irregular, a diferencia de los politopos regulares, tiene caras, vértices o ángulos que no son todos iguales). En estos casos destacan los diseños óptimos o tipo "Optimal" los cuales son mejores que otros diseños clásicos con respecto a la utilización de criterios de restricción. En este tipo de diseños de mezclas se transforman los niveles originales  $X_i$  de los componentes a una escala  $X'_i$  conveniente para el análisis estadístico. Esto es, la escala original utilizada [proporciones de los componentes (EBCF, FEMPF y HCJ) expresadas como fracciones de la mezcla original ( $X_1, X_2$  y  $X_3$ )] se convierte a una escala "Pseudo" en la cual cada componente representa una fracción de la parte "activa" de la mezcla, de tal manera que, el total de la suma de estas fracciones "Pseudo" se ajuste a 1.0. L-Pseudo es la escala predeterminada en la metodología de superficie de respuesta (MSR), y a los diseños que usan esta escala se llaman diseños con Pseudo-valores acotados inferiormente, L-Optimal o Óptimo L. Este diseño fue empleado para esta investigación. En estos diseños el valor mínimo de cada componente en la mezcla activa se convierte en cero y el valor máximo se aproxima a uno. Lo cerca que esté de uno depende de las restricciones impuestas. La ecuación usada para calcular los Pseudo-valores acotados inferiormente es:  $X'_i = (X_i - L_i) / (1 - \sum L_i)$ , donde  $L_i$  es el nivel mínimo del componente "i" en la mezcla original base. En esta investigación, la mezcla de los tres componentes [ $X_1$  (EBCF),  $X_2$  (FEMPF) y  $X_3$  (HCJ)] siempre contendrá al menos 55 % de EBCF ( $X_1 = 0.55$ ), al menos 10 % de FEMPF ( $X_2 = 0.10$ ) y al menos 5 % de HCJ ( $X_3 = 0.05$ ). Por lo tanto, el 70 % de la mezcla de harinas ( $X_1 + X_2 + X_3 = 0.7$ ) está predeterminada y se le conoce como mezcla original base. Por lo tanto, el experimento se realizó para determinar el 30 % restante (parte "activa" de la mezcla). Los valores originales de los componentes de la mezcla, los cuales se encuentran en los rangos delimitados por las restricciones escritas anteriormente para cada

componente de la mezcla, se convirtieron en valores L-Pseudo de la siguiente manera: componente L-pseudo de EBCF ( $X'_1$ ) = [fracción de EBCF en la mezcla original ( $X_1$ ) - 0.55] / 0.30; componente L-pseudo de FEMPF ( $X'_2$ ) = [fracción de FEMPF en la mezcla original ( $X_2$ ) - 0.10] / 0.30; y componente L-pseudo de HCJ ( $X'_3$ ) = [fracción de HCJ en la mezcla original ( $X_2$ ) - 0.05] / 0.30. Además, la escala L-Pseudo también debe cumplir la condición  $X'_1 + X'_2 + X'_3 = 1.0$ . El análisis estadístico de regresión, varianza y optimización se realiza empleando valores transformados L-Pseudo. Posteriormente, las formulaciones especificadas (por ejemplo, la mezcla óptima o cualquier otra mezcla especificada en el diseño experimental) en escala L-Pseudo para los Pseudo-componentes de la mezcla se transforman en formulaciones para los componentes originales de la siguiente manera:  $X_i = L_i + X'_i (1 - \sum L_i)$ .

En resumen, para obtener la proporción de las tres harinas (EBCF, FEMPF, HCF) en la mezcla compuesta optimizada se usó un diseño experimental L-Optimal (diseño para mezclas con restricciones para los 3 componentes, mencionadas anteriormente) de la MSR. A partir de las restricciones impuestas para los tres componentes de la mezcla, los niveles de inclusión de las tres harinas en las mezclas compuestas fueron:  $X_1$  (EBCF) = 0.5650, 0.6123, 0.6460, 0.6501, 0.6698, 0.6982, 0.7227, 0.7442, 0.7580, 0.7803, 0.8294,  $X_2$  (FEMPF) = 0.0154, 0.1000, 0.1206, 0.1273, 0.1802, 0.2058, 0.2112, 0.2377, 0.2573, 0.3000 y  $X_3$  (HCF) = 0.0500, 0.0883, 0.0906, 0.0967, 0.1196, 0.1350, 0.1500. El diseño experimental constó de 16 mezclas compuestas diferentes (16 experimentos) (Tabla 1). Las variables de respuesta fueron: compuestos fenólicos totales (TPC), antocianinas totales (TA), flavonoides totales (TF), actividad antioxidante (AoxA) y aceptabilidad global (OA) de las tortillas (variable de aceptación sensorial).

**Análisis estadístico de regresión y varianza:** Se aplicó regresión múltiple de mínimos cuadrados de la MSR para mezclas para ajustar modelos de regresión adecuados y reproducibles. El método de regresión múltiple de mínimos cuadrados para modelos de mezclas es una técnica estadística utilizada para modelar y analizar sistemas en los que la respuesta o variable dependiente ( $Y_i$ ) está influenciada por una combinación de variables independientes ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) que representan las proporciones de los componentes de una mezcla. Los modelos para mezclas difieren de los polinomios usuales empleados en diseños de superficie de respuesta debido a la restricción  $\sum X_i = 1.0$ . Los modelos ajustados para las mezclas pueden ser lineal ( $Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$ ), cuadrático ( $Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$ ) o de orden superior (cúbico completo o cúbico especial) los cuales suelen ser necesarios en modelos para mezclas donde los fenómenos estudiados son complejos o porque la región experimental es la región de operabilidad completa. En los modelos lineales  $\beta_1$ , representa la respuesta esperada para la mezcla con el máximo nivel de inclusión del componente 1 (EBCF) y los mínimos niveles de los otros dos componentes (FEMPF y HCF):  $X_1 = 0.85$ ,  $X_2 = 0.10$ ,  $X_3 = 0.05$ ;  $\beta_2$ , representa la respuesta esperada para la mezcla con el máximo nivel de inclusión posible (teórico) del componente 2 (FEMPF) y los mínimos niveles de los otros dos componentes (EBCF y HCF):  $X_2 = 0.45$ ,  $X_1 = 0.55$ ,  $X_3 = 0.05$ ; y  $\beta_3$ , representa la respuesta esperada para la mezcla con el máximo nivel de inclusión posible (teórico) del componente 3 (HCF) y los mínimos niveles de los otros dos componentes (EBCF y FEMPF):  $X_3 = 0.35$ ,  $X_1 = 0.55$ ,  $X_2 = 0.10$ . En los modelos cuadráticos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  representan la porción de mezcla lineal del modelo, mientras que  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  y  $\beta_{23}$  representan una mezcla sinérgica o antagónica

cuando hay una curvatura derivada de una mezcla no lineal (Montgomery, 2009). Para verificar la significancia de los parámetros del modelo (coeficientes de los modelos de regresión,  $\beta_i$ ) se aplicó análisis de varianza con un  $\alpha = 0.1$ , asimismo, se estimó la significancia del modelo de regresión completo empleando  $\alpha = 0.05$ . Para estimar la bondad de ajuste de los modelos de regresión se emplearon los parámetros estadísticos coeficiente de determinación ( $R^2$ ), coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ajustada), coeficiente de determinación predicha ( $R^2$ predicha), coeficiente de variación (CV) y probabilidad de falta de ajuste ( $p$  falta de ajuste). Los modelos de predicción obtenidos se emplearon para representar gráficamente el sistema, y con ello poder analizar gráficamente en el sistema el efecto de las variables independientes (componentes de la mezcla  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) sobre las variables de respuesta ( $Y_i$ ).

**Optimización:** El método numérico de deseabilidad global (D) de la MSR se empleó como técnica de optimización para obtener tortillas con las mejores características nutraceuticas (valores máximos de TPC, TA, TF, AoxA) y adecuada aceptabilidad sensorial (valor máximo posible de OA). Para ello, se emplearon los cinco modelos matemáticos de regresión obtenidos para las variables de respuesta estudiadas, los cuales se emplearon para estimar los valores teóricos de las cinco variables de respuesta en diferentes puntos de la región experimental seleccionados de manera aleatoria. Estos valores predichos fueron transformados en valores de deseabilidad individual para cada variable de respuesta [ $d_i(X)$ ], mediante el empleo de una ecuación de transformación planteada por la metodología de superficie de respuesta para el objetivo de maximizar el valor de cada variable de respuesta. Este método de deseabilidad consiste en transformar los valores predichos con los modelos matemáticos  $\hat{Y}_i(X)$  en un valor de deseabilidad individual [ $d_i(X)$ ], que toma valores en un rango de 0 a 1 y mide el grado de deseabilidad de la respuesta en relación con el valor óptimo que se intentó alcanzar (máximo). Las deseabilidades individuales se combinaron usando la media geométrica para obtener la deseabilidad global [ $D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4 \times d_5)^{1/5}$ ]. La deseabilidad global es una opción lógica, ya que si alguna  $d_i(x) = 0$ , la deseabilidad global sería  $D = 0$ , indicando que las tortillas son inaceptables. Valores de  $D$  entre 0.6 y 0.8 son adecuados para sistemas alimenticios, siendo el valor ideal óptimo  $D = 1$ .

**Validación:** Para validar las condiciones óptimas, se elaboraron cinco réplicas de mezclas compuestas con la proporción óptima de los tres componentes ( $X_1 =$  EBCF,  $X_2 =$  FEMPF y  $X_3 =$  HCJ) para posteriormente elaborar tortillas a partir de dichas mezclas; a las tortillas se le evaluó experimentalmente por triplicado cada una de las variables de respuesta estudiadas. Posteriormente, se construyó un intervalo de confianza teórico para cada respuesta, partiendo de la zona de optimización y utilizando un nivel de confianza del 95 %. Para que un modelo pase la prueba de validación es necesario que el promedio de las cinco réplicas de cada respuesta se ubique dentro del rango teórico mencionado anteriormente.

El diseño experimental, el análisis de varianza y regresión, la optimización y la validación se realizó utilizando el Software Design Expert versión 11 (Design Expert, 2018; Stat-Ease, Inc., 1300 Godward Street Northeast, Suite 6400, Minneapolis, MN 55413, EUA).

## Resultados y Discusión

### Obtención de la mezcla compuesta optimizada a basa de EBCF, FEMPF Y HCF

A continuación, se mostrarán los modelos matemáticos de regresión generados para cada variable de respuesta estudiada. Posteriormente, estos modelos se emplearon para estudiar el comportamiento de las variables de respuesta en función de los componentes de la mezcla (proporciones de las harinas empleadas en la mezcla compuesta). Asimismo, los modelos de regresión se usaron para generar valores teóricos de las variables de respuesta en el área de experimentación de manera aleatoria y convertir dichos valores a valores de deseabilidad individual para cada respuesta. A partir de los valores de deseabilidad individual obtenidos, se calculó la deseabilidad global en cada punto aleatorio seleccionado de la región experimental. Finalmente, se seleccionó el valor de deseabilidad global con el valor máximo posible. La mezcla compuesta obtenida con esta deseabilidad máxima correspondió a la mezcla compuesta optimizada a base de EBCF, FEMPF y HCF adecuada para preparar tortillas funcionales sensorialmente aceptables con valores altos de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas totales.

### Modelos de predicción

En la Tabla 1 se muestran los resultados experimentales para cada una de las variables de respuesta estudiadas, correspondientes a cada una las diferentes combinaciones de proporciones de cada tipo de harina utilizada (EBCF, FEMPF y HCF) para el desarrollo de la mezcla compuesta a base de EBCF, FEMPF y HCF (16 tratamientos indicados en el diseño de experimentos). A partir de los datos experimentales se realizó regresión lineal múltiple de mínimos cuadrados para obtener modelos de predicción para cada variable de respuesta estudiada y los cuales se muestran a continuación.

### Actividad Antioxidante (AoxA)

En la Tabla 1 se puede observar que los valores de AoxA de las tortillas estuvieron en un rango de 3,005 a 6,076  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100g, dw.

El análisis de regresión y varianza mostró un modelo lineal significativo ( $p < 0.05$ ) de la proporción de EBCF, FEMPF y HCF. El modelo de predicción para la AoxA usando variables codificadas fue:

$$\text{AoxA} = 5948 \cdot \text{EBCF} + 2168 \cdot \text{FEMPF} + 5461 \cdot \text{HCF}$$

Este modelo de predicción explicó el 90.09 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de AoxA de las tortillas. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue de 0.8857 y la falta de ajuste fue no significativa (probabilidad igual a 0.7570). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo ( $\text{CV} = 6.88\%$ ) fue menor al 10 %. Estos valores indican que el modelo de predicción para la AoxA de las tortillas fue adecuado y reproducible.

A partir de este modelo de predicción se construyó una gráfica tridimensional (Figura 1A). En un gráfico típico de un diseño para mezclas, los ejes representan las proporciones de los componentes de la mezcla. Dependiendo de cuántos componentes se estén analizando, el gráfico puede ser bidimensional (para dos componentes) o tridimensional (para tres componentes). En la presente investigación es de tres componentes, por lo que la gráfica presenta forma de triángulo. En el caso del diseño L-Optimal, los gráficos consisten en triángulos acotados por los niveles máximos y mínimos de los tres componentes de la mezcla compuesta, mencionados anteriormente en la sección de análisis de regresión y varianza ( $0.550 \leq X_1$  (EBCF)  $\leq 0.850$ ;  $0.100 \leq X_2$  (FEMPF)  $\leq 0.450$ ;  $0.050 \leq X_3$  (HCJ)  $\leq 0.350$ ). Sin embargo, se puede observar en la Figura 1 que la región experimental graficada está acotada, y no corresponde a toda el área del triángulo del gráfico. Esto se debe a que, la región experimental debe cumplir con las restricciones originales mencionadas en la sección del diseño experimental ( $0.550 \leq X_1$  (EBCF)  $\leq 0.850$ ;  $0.100 \leq X_2$  (FEMPF)  $\leq 0.300$ ;  $0.050 \leq X_3$  (HCJ)  $\leq 0.150$ ). Es por ello por lo que, la región experimental graficada (gráfica de contornos) no tiene una forma estándar (p.ej. un triángulo), sino que, tienen la forma de un polígono irregular; se debe recordar que, un polígono es una figura en un espacio euclidiano de varias dimensiones, mientras que, un polígono irregular, a diferencia de los polígonos regulares, tiene caras, vértices o ángulos que no son todos congruentes. Esta gráfica de contornos, los cuales representan los diferentes valores de la respuesta AoxA, es de utilidad para interpretar los resultados de AoxA en función de los componentes de la mezcla compuesta. En la gráfica triangular, para los tres componentes en la mezcla, *el eje del componente i*, que representa el aumento de la variable de respuesta, es la recta o rayo que se extiende del punto base  $X_i =$  mínimo valor del nivel de inclusión del componente i,  $X_j =$  (diferencia entre el máximo y mínimo valores teóricos posibles del nivel de inclusión del componente j)  $/ (p - 1)$ , para toda  $j \neq i$  y  $p =$  número de componentes en la mezcla, al vértice opuesto donde  $X_i =$  máximo valor teórico posible del nivel de inclusión del componente i,  $X_j =$  mínimo valor del nivel de inclusión del componente j para toda  $j \neq i$ . En el triángulo, el punto base siempre se localiza en el centroide de la frontera de  $(p - 2)$  dimensiones del diseño que está opuesto al vértice correspondiente (coordenadas del vértice:  $X_i =$  máximo valor teórico posible del nivel de inclusión del componente i,  $X_j =$  mínimo valor del nivel de inclusión del componente j para toda  $j \neq i$ ). La longitud del eje del componente es igual al promedio entre el máximo y mínimo valores del nivel de inclusión teóricos posibles del componente i. Sin embargo, la superficie de contornos real para cada respuesta está acotada por los niveles mínimos y máximos de los criterios de restricción empleados en el estudio de investigación. Es por ello por lo que, en la superficie de contornos real graficada en la Figura 1, los componentes  $X_2$  (FEMPF) y  $X_3$  (HCJ) están restringidos en sus niveles de inclusión superiores, de manera diferente a los niveles superiores considerados en el área del triángulo.

**Tabla 1. Diseño experimental L-Optimal de la metodología de superficie de respuesta para la obtención de diferentes mezclas compuestas a base de harina de maíz azul extrudido (EBCF), harina de vaina de mezquite fermentada-extrudida (EFMPF) y harina de cáliz de jamaica (HCF).**

Orden		Componentes de la mezcla			Variables de respuesta				
Std	Corrida	X <sub>1</sub> : EBCF	X <sub>2</sub> : EFMPF	X <sub>3</sub> : HCF	AoxA	TPC	TF	TA	OA
1	16	<b>0.8294</b>	0.1206	<b>0.0500</b>	5860.5	334.9	37.91	9.22	57.5
2	2	<b>0.8294</b>	0.1206	<b>0.0500</b>	5715.51	347.5	38.75	8.99	56.11
3	3	0.7442	0.2058	<b>0.0500</b>	4355.76	334.2	<b>39.73</b>	6.60	55.85
4	1	0.6501	<b>0.2999</b>	<b>0.0500</b>	3595.32	<b>318.9</b>	25.62	<b>4.56</b>	47.96
5	7	0.7580	<b>0.0154</b>	0.0883	4997.6	365.7	38.25	11.47	51.36
6	10	0.6982	0.2112	0.0906	4214.06	337.1	30.83	9.41	52.06
7	9	0.6982	0.2112	0.0906	4454.57	366.5	25.65	9.91	53.45
8	8	0.6982	0.2112	0.0906	4966.83	358.6	29.04	10.07	47.9
9	12	0.6460	0.2573	0.0967	3720.65	347.5	23.14	9.30	48.33
10	11	0.7803	0.1000	0.1196	5548.03	377.9	37.38	14.84	<b>57.6</b>
11	14	0.7803	0.1000	0.1196	<b>6076.19</b>	<b>389.4</b>	37.22	15.72	53.98
12	15	0.7803	<b>0.3000</b>	0.1350	3696.45	376.6	<b>17.29</b>	9.60	41.11
13	5	<b>0.5650</b>	<b>0.3000</b>	0.1350	<b>3044.85</b>	366.2	20.38	8.45	<b>43.65</b>
14	6	0.7227	0.1273	<b>0.1500</b>	5869.23	384.9	38.76	<b>15.84</b>	50.56
15	4	0.6123	0.2377	<b>0.1500</b>	4135.18	379.4	23.11	13.81	44.56
16	13	0.6698	0.1802	<b>0.1500</b>	4273.87	377.0	22.93	12.09	45.15

<sup>1</sup>Diseño experimental L-Optimal con tres componentes de la mezcla; 16 experimentos (mezclas compuestas). EBCF = harina de maíz azul extrudido, FEMPF = harina de vainas de mezquite fermentadas-extrudidas, HCF = harina de cálices de jamaica, AoxA = actividad antioxidante ( $\mu\text{mol eq. de Trolox /100 g}$ ), TPC = compuestos fenólicos totales ( $\text{mg eq. de ácido gálico /100 g}$ ), TF = flavonoides totales ( $\text{mg eq. de catequina /100 g}$ ), TA = antocianinas totales ( $\text{mg eq. de cianidina-3-glucósido /100 g}$ ), OA = aceptabilidad global de tortillas. \*Los valores en negrita de las variables de proceso y respuesta corresponden a los valores mínimos y máximos utilizados y obtenidos, respectivamente.

Con base a lo mencionado anteriormente, se puede decir que, en las gráficas de la Figura 1, el componente  $X_1$  (EBCF) aumenta del centroide de la frontera inferior del triángulo con valor  $X_1 = 0.55$  al vértice correspondiente con un valor de  $X_1 = 0.85$ , mientras que el componente  $X_2$  (FEMPF) aumenta del centroide de la frontera derecha del triángulo con valor  $X_2 = 0.10$  al vértice correspondiente con un valor de

$X_2 = 0.45$ . El componente  $X_3$  (HCJ) aumenta del centroide de la frontera izquierda del triángulo con valor  $X_3 = 0.05$  al vértice correspondiente con un valor de  $X_3 = 0.35$ .

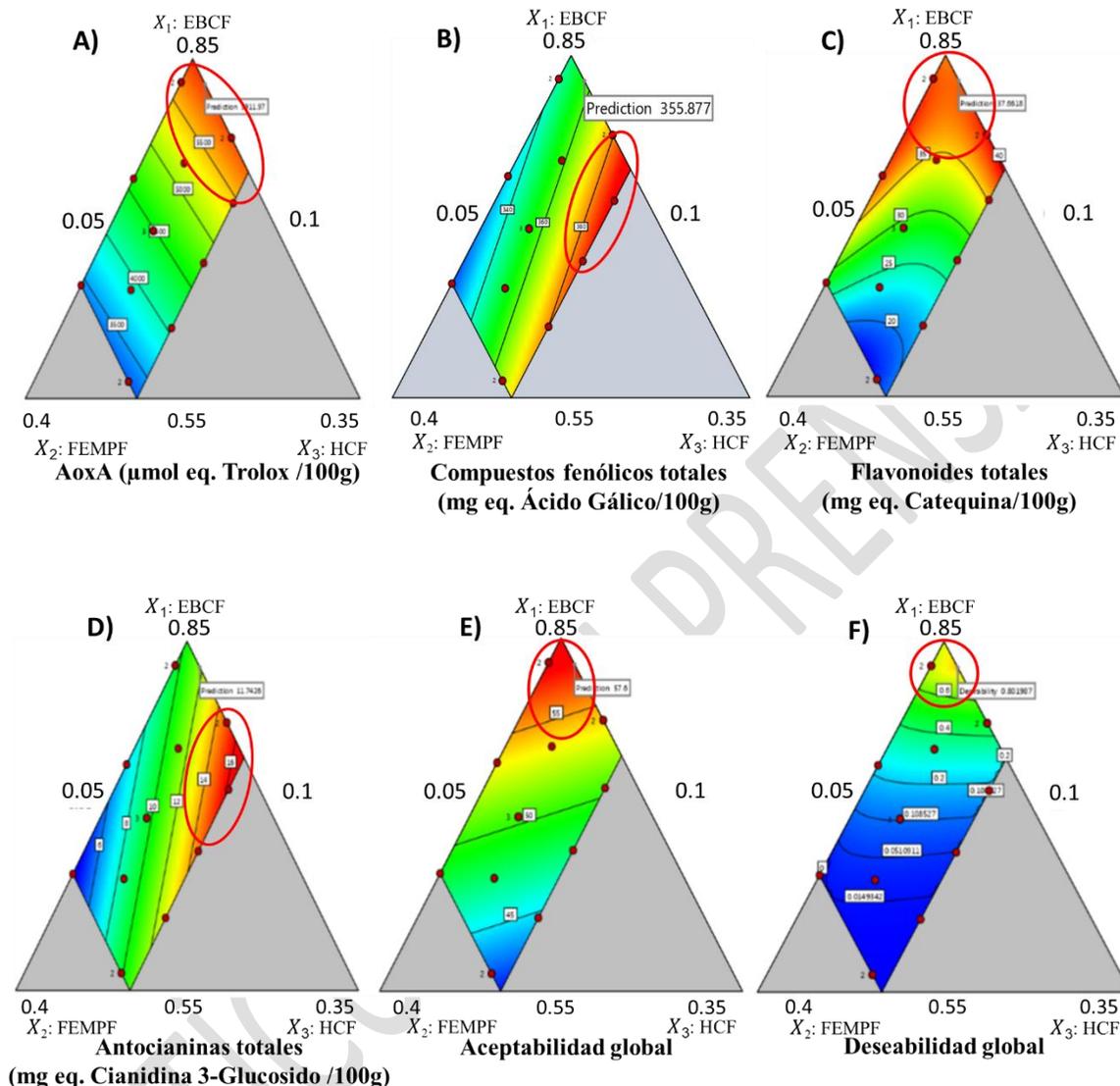
En la Figura 1A se puede observar que los valores de AoxA en las tortillas son más altos (valores deseables) cuando el valor del componente  $X_1$  [contenido de harina de maíz azul extrudido (EBCF)] en la mezcla compuesta es alto y los valores del componente  $X_3$  [contenido de harina de cálices de jamaica (HCF)] van desde bajos hasta altos (de 0.05 a 0.15), mientras que el valor del componente  $X_2$  [contenido de harina de vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF)] es bajo. De acuerdo con el análisis de varianza, realizado a los términos del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de AoxA, se encontró que, los componentes de la mezcla compuesta que tuvieron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre esta respuesta fueron  $X_1$  (EBCF) y  $X_2$  (FEMPF), mientras que el componente  $X_3$  (HCJ) no tuvo efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la respuesta AoxA (efectos = 2682.37, -2479.54 y 117.75 para  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ , respectivamente). Se puede observar en la Figura 1A que, mientras el incremento del nivel de inclusión de EBCF en la mezcla causó un aumento de AoxA, el incremento del nivel de inclusión de FEMPF en la mezcla compuesta causó una disminución de AoxA. Esto puede deberse al mayor contenido de compuestos fenólicos de los ingredientes EBCF y HCF que la FEMPF. Diferentes investigaciones han reportado que existe una alta correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos (Gámez-Valdez *et al.*, 2021; Félix-Medina *et al.*, 2024). Mora-Rochín *et al.*, (2010) concluyeron que el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante y principal responsable de la actividad antioxidante en el maíz. Resultados similares han sido reportado por Aguayo-Rojas *et al.*, (2012) quienes encontraron que los compuestos fenólicos presente en tortillas extrudidas de maíces pigmentados son los principales compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante. Por otro lado, Félix-Medina *et al.*, (2021) evaluaron botanas extrudidas de maíz azul y frijol encontrando que la capacidad antioxidante esta mayormente asociada a los compuestos fenólicos. De acuerdo con la Figura 1A se puede observar que los valores teóricos (predichos con el modelo de predicción) más altos de AoxA estuvieron en el rango de 5526 a 5893  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100g, ps.

### Compuestos Fenólicos Totales (TPC)

En la Tabla 1 se puede observar que los valores de TPC de las tortillas tuvieron valores en un rango de 318.9 a 389.4 mg equivalentes de ácido gálico/100g, ps.

El análisis de varianza mostró un modelo lineal significativo ( $p < 0.05$ ) de la proporción de EBCF, FEMPF y HCF. El modelo de predicción para el TPC usando variables codificadas fue:

$$\text{TPC} = 345 \cdot \text{EBCF} + 314 \cdot \text{FEMPF} + 494 \cdot \text{HCF}$$



**Figura 1. Gráficas de contornos de predicción de cada una de las variables de respuesta y deseabilidad global en condiciones óptimas. A) Actividad antioxidante (AoxA), B) Compuestos fenólicos totales (TPC), C) Flavonoides totales (TF), D) Antocianinas totales (TA), E) Aceptabilidad global de las tortillas (OA), y F) Deseabilidad global (D).**

Este modelo de predicción explicó el 85.28 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de TPC de las tortillas. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue de 0.8301 y la falta de ajuste fue no significativa (probabilidad igual a 0.9333). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo ( $CV = 2.41\%$ ) fue menor al 10 %. Estos valores indican que el modelo de predicción para TPC de las tortillas fue adecuado y reproducible.

A partir de este modelo de predicción se construyó una gráfica tridimensional con forma de triángulo conteniendo una superficie de contornos con forma irregular (Figura 1B). Cabe mencionar que esta grafica tiene un comportamiento igual al mencionado para la gráfica mencionada anteriormente para la AoxA. En la sección de resultados correspondiente a la respuesta para AoxA se explicó como aumentan los niveles de inclusión de los tres componentes de la mezcla compuesta, lo que también se aplica para todas las variables de respuesta estudiadas en esta investigación.

En la Figura 1B se puede observar que los valores de TPC en las tortillas son más altos (valores deseables) en la zona donde los niveles de inclusión de los componentes  $X_1$  [contenido de harina de maíz extrudido (EBCF)] y  $X_3$  [contenido de harina de cálices de jamaica (HCF)] en la mezcla compuesta son altos, mientras que el nivel de inclusión del componente  $X_2$  [contenido de harina de vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF)] es bajo. De acuerdo con el análisis de varianza, realizado a los términos del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de TPC, se encontró que los tres componentes de la mezcla compuesta ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) tuvieron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre esta respuesta (efectos = -28.79, -33.22 y 51.92 para  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ , respectivamente). Se puede observar en la Figura 1B que, mientras el incremento del nivel de inclusión de EBCF y FEMPF en la mezcla compuesta causó una disminución de TPC, el incremento del nivel de inclusión de HCF en la mezcla compuesta causó un aumento de TPC. A diferencia de la respuesta AoxA, que se discutió anteriormente, aquí el incremento en el nivel de inclusión de EBCF tuvo un efecto negativo sobre TPC, mientras que, en AoxA tuvo un efecto positivo. Esto puede deberse al mayor contenido de compuestos fenólicos del ingrediente HCF que los ingredientes EBCF y FEMPF, ya que el componente HCF ( $X_3$ ) de la mezcla presentó el mayor efecto significativo sobre la respuesta TPC. Estos valores de TPC más altos se encuentran en la misma zona donde se encuentran los valores más altos de AoxA, confirmando la alta correlación entre TPC y AoxA, como ha sido reportado previamente en la literatura (Mora-Rochín *et al.*, 2010; Félix-Medina *et al.*, 2024). Por otra parte, Colín *et al.*, (2020) evaluaron tortillas elaboradas a partir de maíz azul y blanco, identificando que las tortillas de maíz azul presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación a las producidas a partir de maíz blanco. Este aumento en la capacidad antioxidante se ha asociado a que el maíz azul es una potencial fuente de compuestos fenólicos (polifenoles) (Astorga-Gaxiola *et al.*, 2023; Menchaca-Armenta *et al.*, 2021). Además, Gaxiola *et al.*, (2017) observaron que la fracción de compuestos fenólicos insolubles en el maíz contribuyen alrededor del 85 % de la capacidad antioxidante total en el maíz. En nuestra investigación también se encontró que la fracción de compuestos fenólicos ligados representó el mayor contenido de TPC. De acuerdo con la Figura 1B se puede observar que los valores teóricos más altos de TPC estuvieron en el rango de 380 a 394 mg equivalentes de ácido gálico/100g, ps.

### Flavonoides Totales (FT)

En la Tabla 1 se puede observar que los valores de TF tuvieron valores en un rango de 17.29 a 39.73 mg equivalentes de catequina/100g, ps.

El análisis de regresión y varianza mostró un modelo significativo ( $p < 0.05$ ) de la proporción de EBCF, FEMPF y HCF. Además, el modelo también dependió significativamente de las interacciones doble EBCF\*FEMP y triple EBCF\*FEMPF\*HCF de estos factores. El modelo de predicción para TF usando variables codificadas fue:

$$TF = 37 * EBCF + 6 * FEMPF + 48 * HCF + 54 * EBCF * FEMPF - 309 * EBCF * FEMPF * HCF$$

Este modelo de predicción explicó el 90.83 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de TF de las tortillas. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue de 0.8750 y la falta de ajuste fue no significativa (probabilidad igual a 0.1341). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV= 9.12 %) fue menor al 10 %. Estos valores indican que el modelo de predicción para TF de las tortillas fue adecuado y reproducible.

A partir de este modelo de predicción se construyó una gráfica tridimensional con forma de triángulo conteniendo la superficie de respuesta de contornos real con forma irregular (Figura 1C). El incremento de los valores de los niveles inclusión de los componentes ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) de la mezcla compuesta en la gráfica ya fue explicado en la sección de la respuesta AoxA.

En la Figura 1C se puede observar que los valores de TF en las tortillas son más altos (valores deseables) cuando el valor del componente  $X_1$  [contenido de harina de maíz azul extrudido (EBCF)] en la mezcla compuesta es alto y los valores del componente  $X_3$  [contenido de harina de cálices de jamaica (HCF)] van desde bajos hasta altos (de 0.05 a 0.15), mientras que el valor del componente  $X_2$  [contenido de harina de vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF)] va de un nivel bajo a un nivel intermedio. De acuerdo con el análisis de varianza, realizado a los términos del modelo de regresión cúbico ajustado a los datos de TF, se encontró que la parte lineal del modelo de regresión, nombrada porción de mezcla lineal, y que agrupa a los tres componentes de la mezcla compuesta ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) en un solo término, tuvo efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre esta respuesta. Del análisis de varianza también se encontró que, los efectos de la interacción doble  $X_1 * X_2$  y la interacción triple  $X_1 * X_2 * X_3$ , de los componentes de la mezcla compuesta, fueron significativas ( $p < 0.05$ ). En estos casos, el análisis del efecto de los componentes de la mezcla debe realizarse en términos de la interacción de máximo orden, en este caso la interacción triple. A partir de la interpretación de la interacción triple se puede ver que, el comportamiento de la Figura 1C indicó que el contenido de TF incrementó significativamente en mezclas con mayor nivel de inclusión del componente  $X_1$  (EBCF) y menor nivel de inclusión del componente  $X_2$  (FEMPF), mientras el contenido del componente  $X_3$  (HCF) se mantuvo en un rango de intermedio a alto ( $X_3 = 0.10 - 0.15$ ). Por otro lado, cuando el nivel de inclusión del componente  $X_3$  en la mezcla permaneció fijo en un nivel bajo ( $X_3 = 0.05$ ), el contenido de TF incrementó muy poco en mezclas con mayor nivel de inclusión del componente  $X_1$  (EBCF) y menor nivel de inclusión del componente  $X_2$  (FEMPF). Esto puede deberse a que los valores más bajos de TF en el segundo caso fueron mucho más altos que en el primer caso, mientras que, los valores altos de TF en ambos casos fueron similares. En general, la interpretación de esta interacción triple indica que los niveles de inclusión altos de EBCF y los niveles de inclusión bajos de FEMPF y HCF en la mezcla compuesta

favorecen los valores altos de TF en las tortillas. Esto indica que, aunque las tres harinas (EBCF, FEMPF y HCF) son una fuente importante de compuestos flavonoides, los resultados indican que la harina EBCF presenta los contenidos más altos de compuestos flavonoides. Es ampliamente conocido que, los compuestos flavonoides son parte de los compuestos fenólicos totales. Es por ello por lo que, estos valores de TF más altos se encuentran en una zona cercana donde se encuentran los valores más altos de TPC y AoxA. De acuerdo con la Figura 1C se puede observar que los valores teóricos más altos de TF estuvieron en el rango de 35 a 37 mg equivalentes de catequina/100g, ps.

### Antocianinas Totales (AT)

En la Tabla 1 se puede observar que los valores de TA de las tortillas tuvieron valores en un rango de 4.56 a 15.84 mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/100g, ps.

El análisis de regresión y varianza mostró un modelo lineal significativo ( $p < 0.05$ ) de la proporción de EBCF, FEMPF y HCF. El modelo de predicción para la TA usando variables codificadas fue:

$$TA = 10 \cdot EBCF + 1.0 \cdot FEMPF + 31 \cdot HCF$$

Este modelo de predicción explicó el 96.34 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de TA de las tortillas. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue de 0.9577 y la falta de ajuste fue no significativa (probabilidad igual a 0.2012). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV= 6.27 %) fue menor al 10 %. Estos valores indican que el modelo de predicción para TA de las tortillas fue adecuado y reproducible.

A partir de este modelo de predicción se construyó una gráfica tridimensional, con forma de triángulo conteniendo en su interior la región experimental real con forma irregular (Figura 1D) debido a las restricciones interpuestas en los niveles de inclusión de los componentes de la mezcla compuesta. El rayo de incremento de los niveles de inclusión de cada uno de los componentes de la mezcla en la gráfica triangular fue explicado en la sección de la respuesta AoxA.

En la Figura 1D se puede observar que los valores de TA son más altos (valores deseables) en la zona donde los niveles de inclusión de los componentes  $X_1$  [contenido de harina de maíz extrudido (EBCF)] y  $X_3$  [contenido de harina de cálices de jamaica (HCF)] en la mezcla compuesta son altos, mientras que el nivel de inclusión del componente  $X_2$  [contenido de harina de vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF)] es bajo. De acuerdo con el análisis de varianza, realizado a los términos del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de TA, se encontró que, los componentes de la mezcla compuesta que tuvieron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre esta respuesta fueron  $X_2$  (FEMPF) y  $X_3$  (HCF), mientras que el componente  $X_1$  (EBCF) no tuvo efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la respuesta TA (efectos = -0.6397, -7.83 y 7.46 para  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ , respectivamente). Se puede observar en la Figura 1D que, mientras el incremento del nivel de inclusión de HCF en la mezcla causó un aumento de TA, el incremento del nivel de inclusión de FEMPF en la mezcla

compuesta causó una disminución de TA. A diferencia de las respuestas AoxA, TPC y TF que se discutieron anteriormente, aquí el incremento en el nivel de inclusión de EBCF en la mezcla compuesta no afectó el contenido de TA, mientras que, en AoxA, TPC y TF sí tuvo un efecto significativo. Esto puede deberse al mayor contenido de antocianinas totales del ingrediente HCF que los ingredientes EBCF y FEMPF, ya que el componente HCF ( $X_3$ ) de la mezcla presentó un efecto positivo significativo sobre la respuesta TA, mientras que el componente EBCF ( $X_1$ ) no tuvo efecto significativo sobre TA y el componente FEMPF ( $X_2$ ) tuvo un efecto significativo negativo sobre la respuesta TA. El bajo o nulo contenido de antocianinas en el ingrediente FEMPF puede ser la causa de la disminución en el contenido de TA en las tortillas elaboradas con mezclas con altos niveles de inclusión de este ingrediente. Por otro lado, el ingrediente EBCF es una buena fuente de TA, por lo que el incremento o disminución de este componente en las mezclas compuestas puede ser la causa de que el contenido de TA en las tortillas no haya sido afectado significativamente. Los valores de TA más altos se encuentran en la misma zona donde se encuentran los valores más altos de AoxA, TPC y TF, indicando una posible correlación entre TPC y TA, así como entre TF y TA, lo cual no ha sido reportado previamente en la literatura. Esto puede ser debido a que las antocianinas forman parte de la clase generalizada de compuestos fenólicos nombrados flavonoides y al igual que los compuestos fenólicos destaca su papel protector contra el estrés oxidativo ya que actúan como eliminadores de radicales (Astorga-Gaxiola et al., 2023). Por otro lado, Aguayo-Rojas et al., (2012) evaluaron tortillas a partir de maíces pigmentados mexicanos, encontrando que las actividades antioxidantes más altas en estas tortillas pueden estar relacionadas con la concentración de antocianinas y fenólicos totales presentes en los diferentes maíces. Además, Mora-Rochín et al., (2016) reportan que los pigmentos presentes en maíz azul provienen mayormente de antocianinas y compuestos fenólicos, siendo estos lo que le proporcionan la propiedad antioxidante a este tipo de maíces. De acuerdo con la Figura 1D se puede observar que los valores teóricos más altos de TA estuvieron en el rango de 14 a 17 mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/100g, ps.

### Aceptabilidad Global (OA) de las tortillas

En la Tabla 1 observamos que la OA de las tortillas presentó valores con un mínimo y máximo de 43.65 y 57.6, respectivamente; estos valores se encontraron en la escala LAM entre me disgusta ligeramente (43.65) y me gusta moderadamente (57.6).

El análisis de varianza mostró un modelo lineal significativo de la proporción de EBCF, FEMPF y HCF. El modelo de predicción para la OA usando variables codificadas fue:

$$OA = 59 \cdot EBCF + 44 \cdot FEMPF + 37 \cdot HCF$$

Este modelo de predicción explicó el 86.12 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de OA de las tortillas. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue de 0.8399 y la falta de ajuste fue no significativa (probabilidad igual a 0.7254). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo ( $CV = 4.10\%$ ) fue menor al 10 %. Estos valores indican que el modelo de predicción para OA de las tortillas fue adecuado y reproducible.

Similar a lo hecho en las otras variables de respuesta, a partir de este modelo de predicción para OA se construyó una gráfica tridimensional con forma de triángulo (Figura 1E), la cual contiene dentro el área experimental real con forma de polígono irregular, delimitada por las restricciones impuestas para cada uno de los componentes de la mezcla compuesta.

En la Figura 1E se puede observar que los valores de OA son más altos (valores deseables) cuando el nivel de inclusión del componente  $X_1$  [contenido de harina de maíz extrudido (EBCF)] en la mezcla compuesta es alto, mientras que los niveles de inclusión de los componentes  $X_2$  [contenido de harina de vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF)] y  $X_3$  [contenido de harina de cálices de jamaica (HCF)] causan una disminución importante de la aceptabilidad global (OA) de las tortillas. De acuerdo con el análisis de varianza, realizado a los términos del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de OA, se encontró que los tres componentes de la mezcla compuesta ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) tuvieron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre esta respuesta (efectos = 17.83, -8.65 y -6.18 para  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ , respectivamente). Se puede observar en la Figura 1E que, mientras el incremento del nivel de inclusión de FEMPF y HCF en la mezcla compuesta causó una disminución de la OA de las tortillas, el incremento del nivel de inclusión de EBCF en la mezcla compuesta causó un aumento de la OA de las tortillas; lo cual es reafirmado por los efectos negativos de los componentes FEMPF y HCF de las mezclas y el efecto positivo del componente EBCF (-8.65, -6.18 y 17.83, para  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_1$ , respectivamente) sobre la respuesta OA de las tortillas. El efecto positivo del componente EBCF de la mezcla compuesta fue el que afectó mayormente la respuesta OA. Esto puede deberse a que las vainas de mezquite fermentado y los cálices de jamaica pueden contener algunos compuestos que imparten aceptación sensorial indeseable en las tortillas funcionales. Los valores de OA más altos se encuentran en una zona cercana donde se encuentran los valores más altos de AoxA, TPC, TF y TA. De acuerdo con la Figura 1E se puede observar que los valores teóricos más altos de OA estuvieron en el rango de 54 a 59, en una escala de 0 a 100. Estos valores se encontraron en la escala LAM entre me gusta ligeramente (54) y me gusta moderadamente (59).

### Optimización

Una vez obtenidos los modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta estudiadas (AoxA, TPC, TF, TA y OA), se utilizó el método numérico de deseabilidad para encontrar los valores óptimos para los niveles de inclusión adecuados de las harinas (HMAE, HVMFE y HCJ) para la obtención de tortillas funcionales con valores altos de sus propiedades nutraceuticas y sensoriales.

En la Figura 1F se puede observar el gráfico tridimensional mostrando el efecto de los niveles de inclusión (porcentajes) de las harinas EBCF, FEMPF y HCF sobre la variable de optimización deseabilidad global (D). La deseabilidad global se obtiene a partir de la media geométrica [ $D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4 \times d_5)^{1/5}$ ] de las deseabilidades individuales de las 5 variables de respuesta utilizadas para llevar a cabo la optimización del proceso. La deseabilidad global es una opción lógica, ya que si alguna  $d_i(x) = 0$ , la deseabilidad global sería  $D = 0$ , indicando que la tortilla es inaceptable. El procedimiento lógico para llevar a cabo la optimización del proceso consistió en estimar valores de las variables de respuesta en múltiples puntos de la región experimental mediante el uso de sus respectivos modelos de regresión

obtenidos a partir del análisis de regresión y varianza realizados previamente. Posteriormente, los valores estimados de las variables de respuesta fueron transformados a valores de deseabilidad individual  $d_i(x)$ ; esta variable toma valores entre 0 y 1 mediante ecuaciones de transformación planteadas por la metodología de superficie de respuesta para el objetivo de maximizar el valor de cada variable de respuesta. A partir de la ecuación mostrada, se calcularon valores de deseabilidad global (D) en cada uno de los puntos de experimentación seleccionados. Una vez calculados los valores de deseabilidad global, se obtuvieron gráficos de deseabilidad global, en los cuales se observa el comportamiento de dicha variable (D) en función de las variables independientes (nivel de inclusión de las harinas EBCF, FEMPF y HCF).

El valor de Deseabilidad global óptimo seleccionado fue  $D = 0.8019$  y el cual se encuentra ubicado en las mejores proporciones para las harinas. Los valores óptimos seleccionados para la inclusión del porcentaje de las harinas fueron de  $X_1$  (EBCF) = 0.828 (82.8 %),  $X_2$  (FEMPF) = 0.10 (10 %) y  $X_3$  (HCF) = 0.072 (7.2 %).

De igual manera, se obtuvo una gráfica (Figura 2), en donde se observan los valores de deseabilidad individual asociados con la deseabilidad global (D) seleccionada. Dichos valores fueron  $d_{AoxA}=0.94$ ,  $d_{TPC}=0.52$ ,  $d_{TF}=0.90$ ,  $d_{TA}=0.63$  y  $d_{OA}=1$ . Esto indica que la mayoría de las deseabilidades obtenidas estuvieron arriba de 0.63 que es considerable aceptable y bueno (López-Ríos et al., 2018). Ahora en lo referido a la deseabilidad global óptima se aprecia un valor de 0.8, recordando que para que la deseabilidad global sea favorable debe tener valores  $\geq 0.8$ , esto nos indica que la combinación de variables independientes óptimas (niveles óptimos de inclusión de las harinas EBCF, FEMPF y HCF) logra resultados favorables para todas las respuestas. Aunque la mayoría de las respuestas indicaron que la combinación de las deseabilidades individuales fue efectiva, se podría sugerir encontrar otra para la  $d_{TPC}=0.52$ .

### Validación de las condiciones óptimas

Para validar las condiciones óptimas, se produjeron 3 réplicas de la mezcla compuesta de las harinas EBCF, FEMPF y HCF (extrusión, secado y molienda por triplicado de maíz azul, fermentación, extrusión, secado y molienda por triplicado de vainas de mezquita, secado y molienda por triplicado de cálices de jamaica) con los mejores porcentajes de inclusión para cada una de ellas [(EBCF (82.8 %), FEMPF (10 %) y HCF (7.2 %)] para así obtener las tortillas funcionales. A estas tortillas se les evaluó experimentalmente por triplicado AoxA, TPC, TF, TA y OA. En la Tabla 2 podemos observar los resultados de las variables de respuesta evaluadas experimentalmente a las tres réplicas de tortillas; cabe mencionar que, los promedios de los resultados experimentales (Tabla 2) se contrastaron con los valores medios que arrojaron los modelos matemáticos de predicción para cada una de las variables de respuesta [AoxA= 5912  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100g (ps), TPC= 356 mg equivalentes de ácido gálico/100g (ps), TF= 37.7 mg equivalentes de catequina/100g (ps), TA= 11.7 mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/100g (ps) y OA= 57.6]. Se puede observar que los valores experimentales de las variables de respuesta fueron similares a los valores predichos mediante los modelos matemáticos de regresión, mencionados anteriormente, indicando que las condiciones óptimas (mezcla óptima de las harinas EBCF, FEMPF y HCF) fueron adecuadas y reproducibles. Asimismo,

los valores experimentales promedio de cada variable de respuesta analizada cayeron dentro de los intervalos de confianza teóricos del 95 % creados a partir de la zona óptima de la Figura 1F, reforzando estadísticamente lo comentado anteriormente.

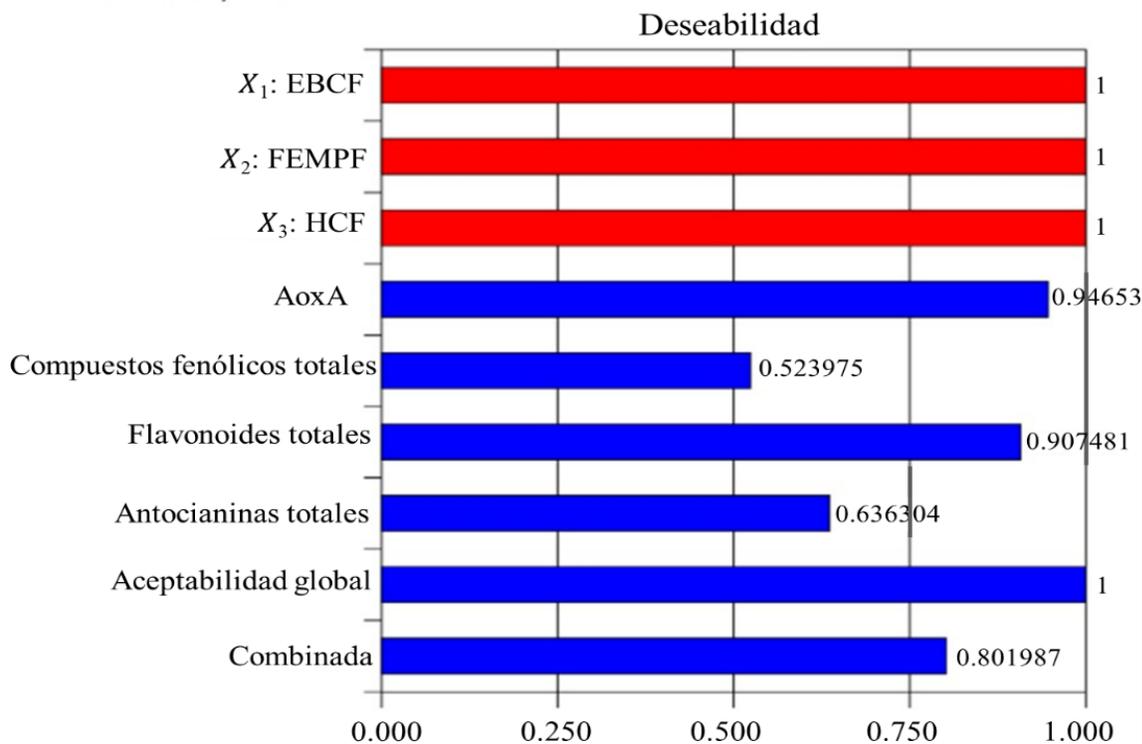


Figura 2. Deseabilidad individual de las respuestas y deseabilidad global de la mezcla compuesta optimizada.

**Tabla 2. Resultados experimentales de las variables de respuesta evaluadas a partir de tres réplicas de preparación de tortillas funcionales utilizando niveles óptimos de inclusión de EBCF (82.8 %), FEMPF (10 %) y HCF (7.2 %).**

Variabes de response <sup>1</sup>	Resultados experimentales	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación (CV, %)
AoxA	5960 5847 5901	5902.7	56.52	0.96
TPC	356.3 355.5 356.0	355.9	0.40	0.11
TF	36.8 37.9 38.1	37.6	0.70	1.86
TA	11.8 11.9 11.6	11.8	0.15	1.30
OA	59.2 57.2 56.3	57.6	1.48	2.58

<sup>1</sup>AoxA = actividad antioxidante ( $\mu\text{mol eq. de Trolox /100 g}$ ), TPC = compuestos fenólicos totales ( $\text{mg eq. de ácido gálico /100 g}$ ), TF = flavonoides totales ( $\text{mg eq. de catequina /100 g}$ ), TA = antocianinas totales ( $\text{mg eq. de cianidina-3-glucósido /100 g}$ ), OA = aceptabilidad global de las tortillas.

## Conclusiones

La obtención de los niveles óptimos de inclusión de las harinas de maíz azul extrudido (EBCF), vainas de mezquite fermentado-extrudido (FEMPF) y cálices de jamaica (HCF) a una mezcla compuesta de harinas permitió obtener tortillas funcionales con valores altos de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y antocianinas totales, así como, aceptación sensorial aceptable. Por lo tanto, como resultado de sus características sensoriales, nutricionales, fitoquímicas y antioxidantes, las tortillas funcionales desarrolladas en esta investigación son una alternativa viable a las tortillas elaboradas de solo maíz, las cuales son pobres en nutrimentos, principalmente en la calidad de sus proteínas, y que actualmente consumen los mexicanos. Asimismo, estas tortillas funcionales representan una estrategia novedosa para reducir las enfermedades crónicas degenerativas en México. Sin embargo, en un futuro es necesario realizar una caracterización más profunda de las tortillas funcionales para validar su potencial real para impactar de manera positiva en la salud de los consumidores.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, Marco Cesar Villanazul Verdugo, Roberto Gutiérrez Dorado, Carlos Alberto Gómez Aldapa, Janitzio Xiomara Korina Perales Sánchez, Cuauhtémoc Reyes Moreno; desarrollo de la metodología, Marco Cesar Villanazul Verdugo, Grissel Reyna Fuentes, Ana Luisa Félix Sámano; manejo de software, Roberto

Gutiérrez Dorado, Janitzio Xiomara Korina Perales Sánchez; validación experimental, Roberto Gutiérrez Dorado, Carlos Alberto Gómez Aldapa, Janitzio Xiomara Korina Perales Sánchez; análisis de resultados, Marco Cesar Villanazul Verdugo, Roberto Gutiérrez Dorado, Grissel Reyna Fuentes, Manejo de datos, Roberto Gutiérrez Dorado, Carlos Alberto Gómez Aldapa; escritura y preparación del manuscrito, Marco Cesar Villanazul Verdugo, Roberto Gutiérrez Dorado, redacción, revisión y edición, Roberto Gutiérrez Dorado, adquisición de fondos, Roberto Gutiérrez Dorado, Carlos Alberto Gómez Aldapa, Janitzio Xiomara Korina Perales Sánchez, Cuauhtémoc Reyes Moreno. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

## Agradecimientos

Este trabajo corresponde a la primera parte de la investigación y se desarrolló en «Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales», Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) y en el «Laboratorio de Química de Alimentos» del Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. También, se agradece el apoyo brindado por CONHACYT por la beca recibida para el alumno Marco Cesar Villanazul Verdugo para los estudios de maestría en ciencias con Orientación en Biotecnología Agroalimentaria.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

- Abdel-Aal, E.S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76, 350-354.
- Adom, K., & Liu, R. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Adom, K., Sorrells, M., & Liu, R. (2003). Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7825-7834. <https://doi.org/10.1021/jf030404i>
- Aguayo-Rojas, J., Mora-Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E. O., Serna-Saldivar, S. O., Gutierrez-Urbe, J. A., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2012). Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process of whole pigmented Mexican maize. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 178-185. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0288-y>
- Agüero, M., Segura, C., & Parra, J. (2014). Análisis comparativo de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de cuatro marcas de tisanas de *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) comercializadas en Costa Rica. *Uniciencia*, 28(1), 34-42. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=475947233004>
- Ariza-Flores, R., Serrano-Altamirano, V., Navarro-Galindo, S., Ovando-Cruz, M. E., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., Michel-Aceves, A. C., Guzmán-Maldonado, S. H., & Otero-Sánchez, M. A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'Alma Blanca' y 'Rosalíz' de color claro, y 'Cotzaltzin' y 'Tecoanapa' de color rojo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 181-185. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802014000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000200009&lng=es&tlng=es)
- Astorga-Gaxiola, A. H., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Jiménez-Edeza, M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Castañeda-Ruelas, G. M., & Mora-Rochín, S. (2023). Release of phenolic compounds with antioxidant activity by human colonic microbiota after *in vitro* fermentation of traditional white and blue maize tortillas. *International Food Research Journal*, 30(1), 240-251. <https://doi.org/10.47836/ifrj.30.1.20>
- Bon-Padilla, B.K., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Reynoso-Camacho, R., Gómez-Aldapa, C.A., Gómez-Favela, M.A. et al. (2022). Tortillas made from nixtamalized maize and extruded chickpea flours: a product with improved *in vitro* nutritional and antihypertensive properties. *Cereal Chemistry*, 99(5), 1154-1165. <https://doi.org/10.1002/cche.10577>
- Cardello, A.V., & Schutz, H.G. (2004). Research note numerical scale-point locations for constructing the lam (labeled affective magnitude) scale. *Journal of Sensory Studies*, 19(4), 341-346. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2004.tb00152.x>

- Colín, C., Virgen, J.J., Serrano, L.E., Martínez, M.A., & Astier, M. (2020). Comparison of nutritional properties and bioactive compounds between industrial and artisan fresh tortillas from maize landraces. *Current Research in Food Science*, 3(1), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.05.004>
- Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959-4964. <https://doi.org/10.1021/jf0255937>
- Díaz-Batalla, L. (2019). Valor nutrimental de harinas de vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) y efecto de su consumo en un alimento obtenido por extrusión sobre el desarrollo de dislipidemia en ratón C57BL/6J [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/biblioteca/digital/231104/2674>
- Díaz-Batalla, L., Hernández-Urbe, J., Gutiérrez-Dorado, R., Téllez-Jurado, A., Castro-Rosas, J., Pérez-Cadena, R., & Gómez-Aldapa, C. (2018). Nutritional characterization of prosopis laevigata legume tree (Mesquite) seed flour and the effect of extrusion cooking on its bioactive components. *Foods*, 7(8), 124. <https://doi.org/10.3390/foods7080124>
- Félix-Medina, J. V., Montes-Ávila, J., Gutiérrez-Dorado, R., Morales, F. J., Mesías, M., Quintero-Soto, M. F., & Delgado-Andrade, C. (2024). Exploring Maillard reaction markers and melanoidins to investigate toxicological and antioxidant profiles of optimized expanded snacks from corn/common bean mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104 (14), 9035-9045. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13730>
- Félix-Medina, J. V., Gutiérrez-Dorado, R., López-Valenzuela, J. A., López-Ángulo, G., Quintero-Soto, M. F., Perales-Sánchez, J. X. K., & Montes-Ávila, J. (2021). Nutritional, antioxidant and phytochemical characterization of healthy ready-to-eat expanded snack produced from maize/common bean mixture by extrusion. *LWT*, 142, 111053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111053>
- Gómez-Valdez, L. C., Gutiérrez-Dorado, R., Gómez-Aldapa, C., Perales-Sánchez, J. X. K., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Mora-Rochín, S., & Reyes-Moreno, C. (2021). Effect of the extruded amaranth flour addition on the nutritional, nutraceutical and sensory quality of tortillas produced from extruded creole blue maize flour. *Biotecnia*, 23(2), 103–112. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i2.1385>
- Gaxiola, N., Mora, S., Cuevas, E.O., León, L., Reyes, C., Montoya, A., & Milán, J. (2017). Phenolic acids profiles and cellular antioxidant activity in tortillas produced from Mexican maize landrace processed by nixtamalization and lime extrusion cooking. *Plant Food for Human Nutrition*, 72(1): 314-1320. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0624-3>
- Gutiérrez-Dorado, R., Ayala-Rodríguez, A.E., Milán-Carrillo, J., López-Cervantes, J., Garzón-Tiznado, J.A., López-Valenzuela, J.A., Paredes-López, O., & Reyes-Moreno, C. (2008). Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays* L). *Cereal Chemistry*, 85 (6), 808e816. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-6-0808>
- León-Murillo, J. R., Gutiérrez-Dorado, R., Reynoso-Camacho, R., Milán-Carrillo, J., Perales-Sánchez, J. X. K., Cuevas-Rodríguez, E. O., & Reyes-Moreno, C. (2021). Tortillas made with extruded flours of blue maize and chia seeds as a nutritious and nutraceutical food option. *Agrociencia*, 55, 487–506. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i6.2555>
- López-Ríos, V. I., & Sosa-Palacio, D. F. (2018). Influencia de los valores locales en los diseños cD-óptimos para el modelo logístico. *Tecnológicas*, 21(43), 147-158. <https://doi.org/10.22430/22565337.1062>
- Menchaca-Armenta, M., Frutos, M. J., Ramírez-Wong, B., Quintero-Ramos, A., Torres-Chávez, P. I., Valero-Cases, E., Muelas-Domingo, R., Ledesma-Osuna, A.I., & Campas-Baypoli, O. N. (2021). The Effect of Nixtamalization Extrusion Process and Tortillas Making on the Stability of Anthocyanins from Blue Corn through the Kinetic and Thermodynamic Parameters. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, 334-339. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00910-x>
- Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J.X.K., Cuevas-Rodríguez, E.O., Ramírez-Wong, B., & Reyes-Moreno C. (2006). The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science*, 41(7), 727-736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00997.x>
- Milán-Carrillo, J., Montoya-Rodríguez, A., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J.X.K., and Reyes-Moreno, C. (2012). Optimization of extrusion process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Applied Mathematics*, 3,1516-1525.
- Montgomery, D. C. (2009). Design and analysis of experiments (7th ed.). Wiley.
- Mora-Rochín, S., Gaxiola-Cuevas, N., Gutiérrez-Urbe, J. A., Milán-Carrillo, J., Milán-Noris, E. M., Reyes-Moreno, C., ... & Cuevas-Rodríguez, E. O. (2016). Effect of traditional nixtamalization on anthocyanin content and profile in Mexican blue maize (*Zea mays* L.) landraces. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.009>
- Mora-Rochín, S., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52, 502-508.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2024). Malnutrición. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Reyes-Moreno, C., Reyes-Fernández, P.C., Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J., Mora-Rochín, S. (2018). Changes in nutritional properties and bioactive compounds in cereals during extrusion cooking. In: Zahid-Qamar, S. (ed.). *Extrusion of Metals, Polymers, and Food Product*. (pp. 103-124). Rijeka, Croatia: INTECH.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2023). Producción agrícola por estado. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). <https://www.gob.mx/siap>
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuele, R. (1999). Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-165. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Serna-Saldívar, S. O., Gutiérrez-Urbe, J. A., Mora-Rochin, S., & García-Lara, S. (2013). Potencial nutraceutico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Revista fitotecnica mexicana*, 36(Supl.

3-a), 295-304. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000500006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000500006&lng=es&tlng=es)

Serón-Arbeloa, C., Labarta-Monzón, L., Puzo-Foncillas, J., Mallor-Bonet, T., Lafita-López, A., Bueno-Vidales, N., & Montoro-Huguet, M. (2022). Malnutrition screening and assessment. *Nutrients*, 14, 2392. <https://doi.org/10.3390/nu14122392>

Thun, M.J., Linet, M.S., Cerhan, J.R., Haiman, C.A., & Schottenfeld, D. (2017). *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York, NY: Oxford University Press, pp 1328. <https://doi.org/10.1093/oso/9780190238667.001.0001>

Xu, B., Chang, S. (2007). A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), 159-166. <https://doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>

ARTÍCULO EN PRENSA