



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DE
TORTILLAS DE HARINA DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
PREPARADAS CON DIFERENTES PROCESOS
TECNOLÓGICOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JULIO CESAR RUBIO RODRIGUEZ

DIRIGIDA POR

DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Clasificación	1
1.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1	1
1.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	1
1.1.3 Epidemiología	2
1.1.4 Diagnostico	3
1.1.5 Diabetes y estrés oxidativo	3
1.1.6 Complicaciones de la diabetes	5
1.1.7 Tratamiento y prevención	6
1.2 Maíz	7
1.2.1 La importancia del maíz en México y el mundo	8
1.2.2 Composición química del grano de maíz	8
1.2.2.1 Fibra dietética	9
1.2.2.2 Compuestos fitoquímicos del maíz	9
1.3 Tortilla de maíz	9
1.3.1 Nixtamalización	10
1.4 El maíz, la tortilla y sus beneficios en la salud	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 General	14
3.2 Específicos	14
4. METODOLOGÍA	15

4.1 Materiales	15
4.1.1 Material biológico	15
4.1.2 Material químico	15
4.1.3 Muestras de experimentación	15
4.2 Métodos	15
4.2.1 Caracterización de las tortillas de maíz	15
4.2.1.1 Obtención del extracto de compuestos fenólicos	15
4.2.1.2 Compuestos fenólicos totales	16
4.2.1.3 Cuantificación de taninos condensados	16
4.2.1.4 Cuantificación de flavonoides totales	17
4.2.1.5 Cuantificación de antocianinas	17
4.2.1.6 Capacidad antioxidante	18
4.2.2 Inducción de diabetes con estreptozotocina	18
4.2.3 Grupos de experimentación	18
4.2.4 Cuantificación de glucosa sanguínea en ayuno	19
4.2.5 Análisis en orina	19
4.2.5.1 Determinación de proteínas por el método de Lowry	19
4.2.5.2 Determinación de creatinina en orina	19
4.2.5.3 Remanente de células beta	19
4.2.6 Análisis en plasma	20
4.2.6.1 Perfil lipídico	20
4.2.6.2 Química de 3 elementos	20
4.2.6.3 Cuantificación de insulina	20
4.2.7 Análisis estadístico	20
5. RESULTADOS	22
5.1 Caracterización de compuestos fenólicos	22
5.2 Efecto en los niveles de glucosa en sangre por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	23
5.3 Efecto en los niveles de insulina en plasma por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	25
5.4 Efecto en el consumo semanal de agua y alimento por el consumo	27

de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	
5.5 Efecto en el peso relativo de los riñones por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	29
5.6 Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles de urea y creatinina de ratas diabéticas	30
5.7 Efecto en los niveles perfil lipídico por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	32
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus	3
2	Clasificación taxonómica del maíz <i>Z. mays</i>	7
3	Composición porcentual de las fracciones del grano de maíz	8
4	Caracterización de compuestos fenólicos de harinas de maíz	22
5	Concentración de insulina en plasma de ratas sanas, diabéticas y ratas alimentadas con tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales causas de mortalidad general en México	2
2	Principales mecanismos de inducción de estrés oxidativo ocasionados por el aumento de glucosa	4
3	Estructura del grano del maíz	7
4	Tortillas y diferentes variedades de maíz	10
5	Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos en la glucosa en ayuno en ratas	24
6	Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos en la glucosa plasmática de ratas Wistar diabéticas después de cuatro semanas de tratamiento	25
7	Efecto del consumo de tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnologicos sobre el porcentaje remanente de células β (%FC β)	27
8	Efecto del consumo de tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnologicos sobre el consumo semanal de alimento (a) y agua (b) en ratas Wistar diabéticas	28
9	Peso relativo de los riñones como indicador de daño renal en ratas Wistar	30
10	Efecto en la concentración de los niveles plasmáticos de a) creatinina y b) urea	31
11	Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles en orina de a) creatinina y b) proteína	32
12	Lípidico de los grupos diabéticos tratados con tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos	33

Resumen

La diabetes es una de las principales causas de muerte en México debido a las complicaciones generadas por la hiperglucemia que trae consigo un aumento en radicales libres generando un estado de estrés oxidativo, una dieta con fibras y antioxidantes ofrece un efecto protector contra estas complicaciones. La tortilla de maíz, es un componente principal en la dieta del mexicano, la cual es una alternativa para la dieta del diabético. En este proyecto de investigación se evaluó el efecto antidiabético de tortillas elaboradas con harinas de maíz obtenidas mediante diferentes procesos tecnológicos, tecnología limpia (TL), que poseen mayor cantidad de fibra insoluble y como control se usaron tortillas elaboradas con harinas obtenidas de procesos de nixtamalización tradicional (NT). Se realizó una evaluación en las harinas de los principales compuestos fenólicos, posteriormente se alimentaron ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina con dietas suplementadas con estas harinas (15%) durante 3 semanas, una vez finalizado en periodo del tratamiento se evaluó el perfil lipídico y parámetros bioquímicos de daño renal. Los resultados indican que las tortillas elaboradas con TL no disminuyeron los valores de glucosa así como los parámetros bioquímicos de daño renal respecto al control diabético ($p < 0.05$). El consumo de las tortillas elaboradas con una de la harinas NT, produjo un decremento de la glucosa plasmática del 35.7% respecto al grupo de ratas diabéticas ($p < 0.05$). El consumo de tortillas con TL aumentó los niveles de HDL y disminuyeron los niveles de LDL. Estos resultados sugieren que las harinas obtenidas mediante tecnología limpia no disminuyen el daño renal ocasionado por la diabetes pero tienen un efecto benéfico en el perfil lipídico de ratas diabéticas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de carácter crónico, caracterizados por una concentración elevada de glucosa en sangre, resultado de una secreción deficiente de insulina, por la alteración en la acción de esta hormona o ambas (Ramos-Ibarra y col., 2006; American Heart Association, 2012).

1.1.2 Clasificación

1.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) también llamada insulino dependiente o diabetes juvenil, se manifiesta por causa de una destrucción auto-inmune de las células β pancreáticas, disminuyendo la producción de insulina, lo que trae como consecuencia una baja concentración de plasmática de esta hormona, esto produce un aumento en la concentración de glucosa en sangre, por lo cual es necesario administrar insulina en los pacientes con DM1. Este tipo de diabetes se presenta con una prevalencia del 5% en nuestro país (Asher y col., 2006; Federación Internacional de Diabetes, 2012).

1.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) también es llamada no insulino dependiente se manifiesta como un trastorno metabólico que cursa con hiperglucemia a causa del inadecuado uso de la insulina, el organismo presenta una resistencia a esta hormona. El desarrollo de DM2 se relaciona estrechamente con el síndrome

metabólico, así como, con la obesidad. La DM2 tiene una prevalencia del 90% de los casos reportados de diabetes (American Heart Association, 2012).

1.1.3 Epidemiología

La diabetes es un problema de salud pública tanto de carácter global como nacional, se estima que cerca de 366 millones de personas en el mundo tienen diabetes, y en México hay una prevalencia documentada hasta el 2011 de 10.2 millones de casos, esto de acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IDF), que tiene congruencia con lo reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT), donde reportan a 6.4 millones con diabetes diagnosticado y otro tanto que no lo sabe, además se reporta un aumento en la prevalencia de 30% entre 2006 y 2012. (ENSANUT, 2012; Federación Internacional de Diabetes, 2012).

En nuestro país la DM se ha convertido en la principal causa de muerte desde el 2000 al 2008, alcanzado una tasa del 14% de mortalidad en el 2008, esto reportado por la Secretaria de Salud (Figura 1).

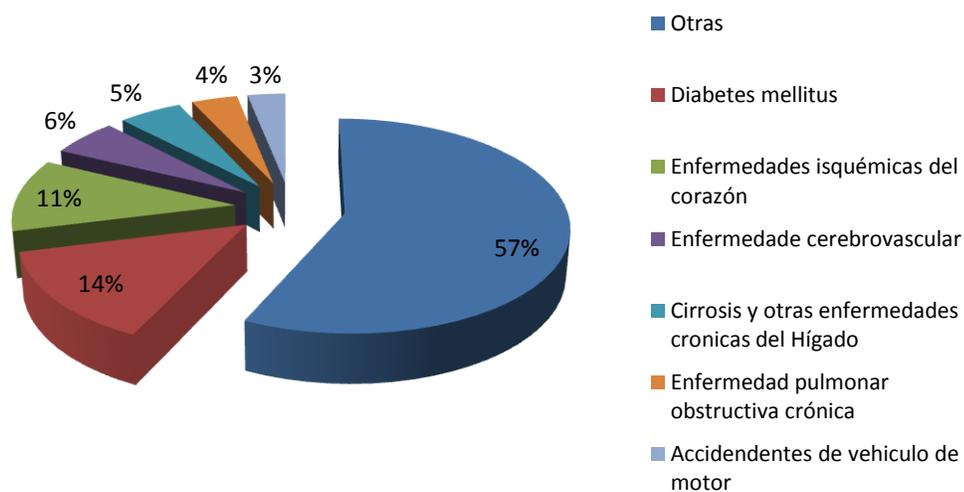


Figura 1. Principales causas de mortalidad general en México (SINAIS, 2008).

1.1.4 Diagnostico

La Asociación americana del Corazón (AHA / por sus siglas en ingles) hace referencia a los criterios recomendados para un diagnóstico correcto de la DM donde el parámetro a evaluar es la glucosa (Cuadro 1). También se hace referencia al porcentaje de hemoglobina glucosilada fracción HbA1c el cual no debe de superar el 7% y debe ser usado para monitorear la diabetes en los 3 últimos meses y no para usos de diagnostico. (American Heart Association, 2012).

Cuadro 1. Criterios para el diagnostico de DM

Parámetro	Valor recomendado
Glucosa en ayuno de 8 horas	≥ 126 mg/dl ó 7 mmol/l
Glucosa al azar	≥ 200 mg/dl ó 11.1 mmol/l
Glucosa a las 2 horas posterior a una carga de 75 g de glucosa anhidra	≥ 200 mg/dl ó 11.1 mmol/l

(Asociación Americana del Corazón, 2012).

1.1.5 Diabetes y estrés oxidativo

Diversos estudios relacionan el daño ocasionado por el aumento de la glucosa en sangre y el aumento en la concentración de especies reactivas oxígeno (ROS) en pacientes con DM, este estado se reconoce como estrés oxidativo (Giacco y Brownlee, 2010).

Diversos mecanismos son los causantes del aumento de ROS en el organismo, entre los mecanismos tenemos la vía poliol o sorbitol la cual mediante una serie de reacciones bioquímicas se obtiene fructosa a partir de glucosa, generándose el sorbitol con la ayuda de la enzima aldosa reductasa. El aumento de fructosa por

esta vía disminuye la concentración de NADPH una molécula que interviene como cofactor en diversos procesos redox del organismo, como la síntesis del glutatión reductor (GSH) que es un importante antioxidante destructor de ROS (Giacco y Brownlee, 2010). La Figura 2 muestra una relación de los distintos mecanismos de daño ocasionados por estrés oxidativo.

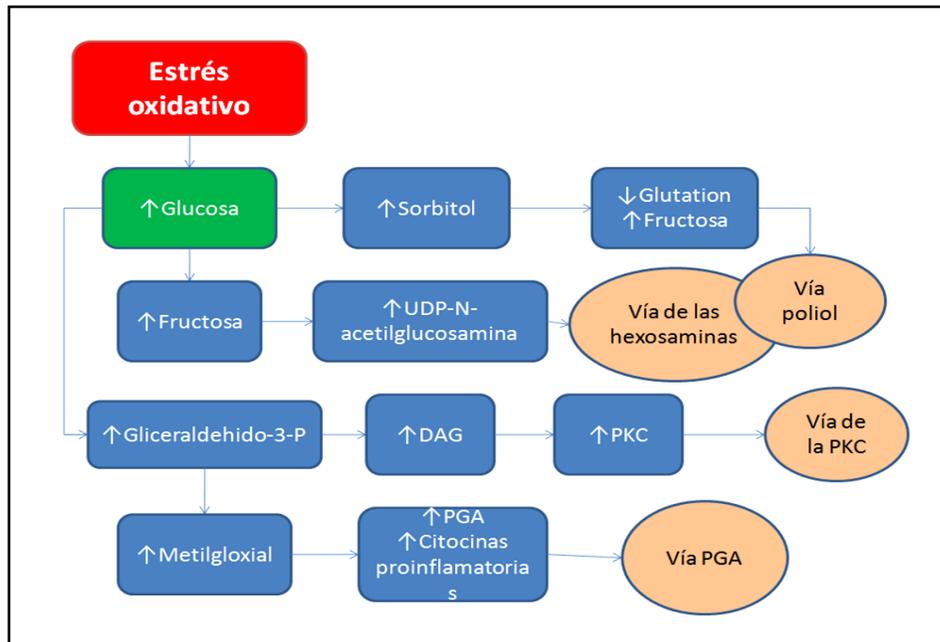


Figura 2. Mecanismos de inducción de estrés oxidativo ocasionados por el aumento de glucosa.

El aumento en la concentración de fructosa activa la vía de las hexosaminas, que provoca el aumento de UDP-N-acetilglucosamina por la reacción de la fructosa-6-fosfato y la glutamina. Esta glucosamina da origen a la formación de glicoproteínas y proteoglicanos, además provoca una sobreexpresión de genes como TGF α y β (Díaz, 2006; Giacco y Brownlee, 2010).

El aumento de diacilglicerol por la inhibición de la enzima glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa activa la vía de las proteínas cinasas C (PKC), las proteínas de la familia de las PKC están relacionadas con múltiples procesos inflamatorios como la

PKC- β en complicaciones de la retina, riñón, corazón y vascular (King, 2008; Giacco y Brownlee, 2010).

La producción de productos de la glucosilación avanzada (PGA), se debe a la reacción del grupo carbonilo de la glucosa y otros monosacáridos con el amino terminal de las proteínas y aminoácidos. Como resultado se obtienen moléculas modificadas química y biológicamente capaces de ocasionar graves daños al organismo. Por otro lado los PGA, que son producidos por las células endoteliales son liberados a la sangre y se unen mediante receptores a células como los macrófagos y células masangiales, donde incrementan la producción de ROS, que a su vez activa al Factor Nuclear Kappa-b (NF- κ b), promoviendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α induciendo un estado de inflamación (Karasu, 2010; Giacco y Browlee, 2010).

1.1.6 Complicaciones de la diabetes

Dentro de las complicaciones ocasionadas por la DM se tienen dos principales tipos como son los daños macro-vasculares y micro-vasculares.

Dentro de los macro-vasculares tenemos la aterosclerosis, que es una de las principales causas de muerte en pacientes con diabetes (Federación Internacional de Diabetes, 2012). Es una patología donde los lípidos se acumulan en el interior de las arterias en forma de placas llamadas ateromas que hacen más lento el flujo de sangre y afectan la irrigación en distintos tejidos y órganos, provocando infarto al miocardio (Wei y col., 1998; Eknoyan, 2007).

Dentro de las complicaciones micro-vasculares se tienen a la retinopatía diabética, la cual es la principal causa de ceguera irreversible en México (Prado-Serrano y col., 2009). La neuropatía diabética es la más común de las complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus. La cual se presenta con daño a los nervios como resultado de una hiperglicemia que puede afectar nervios craneales o de la columna vertebral y sus ramificaciones (Callaghan y col., 2012).

La nefropatía diabética es una patología donde hay lesiones renales originadas de los pequeños vasos. Donde se afecta la microcirculación renal originando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular. Lo que ocasiona que el riñón pierda la capacidad para funcionar apropiadamente. Esta condición se caracteriza por los niveles elevados de albúmina y presencia de proteína en la orina.

La nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal crónica en México, además de que es una de las complicaciones crónicas más graves y más frecuentemente observada en los pacientes con diabetes tipo 2. Dicha alteración es una de las principales causas de mortalidad por diabetes (Torres y Zacarias, 2004; Atlas de la diabetes de la IDF, 2012).

1.1.7 Tratamiento y prevención

El tratamiento farmacológico para la diabetes esta dirigido a disminuir la hiperglucemia; fármacos como las biguanidas mejoran la absorción de insulina, hay inhibidores para disminuir los niveles de glucosa postprandial. Algunos otros fármacos como las meglitinidas restauran la primera fase de secreción de insulina, disminuyen también los niveles séricos de glucosa postprandial previniendo los picos hiperglucémico entre la ingesta de alimentos (Menéndez y col., 2011).

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han publicado que poblaciones donde se consumen dietas como las mediterráneas o las vegetarianas, tienen un menor porcentaje de incidencia de enfermedades crónico degenerativas, esto se le atribuye a la relación de la alta concentración de compuestos como las fibras, principalmente las solubles, ácidos grasos omega, fitoesteroles, antioxidantes, entre los que destacan los compuestos fenólicos (Pitsavos y col., 2005).

1.2 Maíz

La clasificación taxonómica del maíz se muestra en el cuadro 2.

Con respecto al grano del maíz este está conformado por el pericarpio comúnmente llamado cascara, endospermo, germen y pedicelo como sus componentes principales que se muestran en la Figura 3.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del maíz

Reino	Plantae
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoideae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Z. mays</i>

(Hitchcock y Chase, 1971)

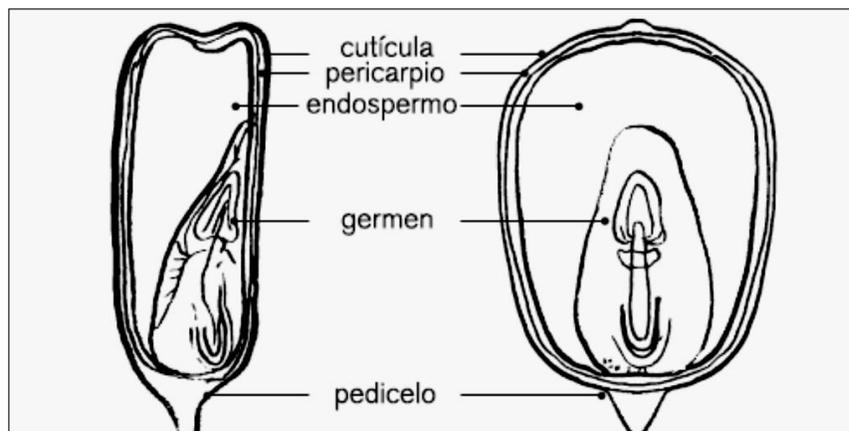


Figura 3. Estructura del grano del maíz (Paredes y col., 2006)

El componente con mayor peso porcentual en el grano es el endospermo, que posee un alto contenido de almidón. El germen con un 11% en el peso del grano representa un elevado contenido de grasas, proteínas y minerales. El pericarpio comprende el 5% del peso del grano y está constituido principalmente por fibra como la hemicelulosa y celulosa (Benítez, 2006).

1.2.1 La importancia del maíz en México y en el mundo

El maíz es una de las especies más relevantes y con un papel central en la alimentación, sociedad, cultura y economía de México. El maíz es uno de los cuatro principales cultivos producidos en el mundo, y en nuestro país ocupa la mitad de la superficie destinada al área agrícola (Kato y col., 2009).

1.2.2 Composición química del grano de maíz

En el Cuadro 3 se muestra la composición química de cada fracción del grano maíz en sus principales componentes como lo es la fibra, proteínas, lípidos y almidón. Donde el pericarpio o cubierta del grano de maíz se encuentra principalmente constituido por fibra cruda, la que a su vez es 67% hemicelulosa y 23% celulosa. Por otro lado en el endospermo el principal componente es el almidón con 87.6% (Watson, 1987; Burge y Duesing, 1989). Los granos de maíz se encuentran constituidos con un porcentaje de 4.5% de lípidos del cual el 85% se encuentra en el germen (Watson, 1987).

Cuadro 3. Composición porcentual de las fracciones del grano de maíz

Fracción (%)	Proteína	Extracto etéreo	Fibra cruda	Cenizas	Almidón	Azúcar
Endospermo	8.0	0.8	2.7	0.3	87.6	0.62
Pericarpio	3.7	1.0	86,7	0.8	7.3	0.34
Germen	28.4	33.2	8.8	10.5	8.3	10.8

(Watson, 1987)

1.2.2.1 Fibra dietética

La fibra dietética es aquella parte comestible de vegetales y carbohidratos análogos, que son resistentes a la absorción y digestión en el intestino delgado humano, con una parcial o completa fermentación en el intestino grueso, e incluye

polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros fitoquímicos como los compuestos fenólicos. La fibra dietética promueve efectos fisiológicos benéficos para el ser humano como disminución del colesterol y glucosa (Martínez y Figueroa, 2008).

La fibra dietética se clasifica de acuerdo a la solubilidad en agua de sus componentes. Donde se divide en fibra soluble que es aquella que es fermentada por la microflora del colon y fibra insoluble que no es digerida y es fermentada en una mínima cantidad, este tipo de fibra insoluble se excreta prácticamente integra (Tunglad y Meyer, 2002; Martínez y Figueroa, 2008).

1.2.2.2 Compuestos fitoquímicos del maíz

El grano del maíz posee compuestos fenólicos que son sustancias químicas propias del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y otras propiedades que benefician al organismo. Dentro de los principales tipos de compuestos fenólicos se tienen a los flavonoides que son pigmentos heterocíclicos aromáticos que poseen el maíz y otras plantas. Las antocianinas son otros compuestos de interés, estos son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides (Adom y Liu, 2002; Astrid, 2008; Escamilla- Jiménez y col., 2009).

1.3 Tortilla de maíz

La tortilla de maíz es uno de los alimentos tradicionales más importantes en nuestro país ya que se considera un alimento básico. Se estima que el consumo diario *per cápita* equivale al 27% de la ingesta diaria, y en las áreas más urbanizadas el consumo de tortilla equivale el 10% de la dieta. La tortilla proporciona el 70% de las calorías y 50% de las proteínas consumidas con la dieta diaria. Las tortillas se pueden encontrar en diferentes colores, esto se debe a los pigmentos naturales contenidos en las distintas variedades de maíz con el que se elaboran como se muestra en la Figura 5 (Flores y col., 2000; Guerrero-Villanueva y col., 2012).



Figura 4. Tortillas y diferentes variedades de maíz

1.3.1 Nixtamalización

Del náhuatl *nixtli*, cenizas, y *tamalli*, masa, la nixtamalización es un proceso tradicional mexicano que se ha transmitido de generación en generación en Mesoamérica, y todavía se utiliza en la actualidad como se hacía en tiempos prehispánicos. Se inicia con la adición de dos partes de una solución alcalina de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) aproximadamente al 1% a una porción de maíz. Esta mezcla se somete a cocción por un periodo de tiempo de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua hasta eliminar residuos de hidróxido obteniendo así el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal. Este maíz nixtamalizado es el que se usa para formar las tortillas que se calientan en un comal a 180-210 °C por dos minutos (Carvajal-Millán, 2007; Paredes y col., 2009).

La nixtamalización provee un tratamiento que incrementa el balance de aminoácidos esenciales además que se libera niacina también conocida como vitamina B3, que es esencial en el metabolismo de la célula y la reparación del DNA (Figuerola y col., 2001).

Durante la nixtamalización son eliminados mediante el nejayote una alta cantidad de vitaminas, minerales, proteínas, lípidos y carbohidratos solubles. También se pierde cerca del 64% del pericarpio debido al debilitamiento de sus paredes por el hidróxido, disminuyendo la cantidad de fibra insoluble (Arambula y col., 2002; Paredes y col., 2009).

En la actualidad se están introduciendo otros procesos de nixtamalización conocidos como ecológicos o tecnología limpia debido a que se usan sales de calcio como lo es sulfato de calcio CaSO_4 o también bicarbonato de calcio $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ en lugar del hidróxido de calcio. Este proceso permite conservar mayor cantidad del pericarpio y así asegurar mayor fibra insoluble y otros compuestos eliminados con el proceso tradicional (Veles, 2006. Patente).

1.4 El maíz, la tortilla y sus beneficios en la salud

La administración de dietas tradicionales que incluye la ingesta de tortillas de maíz, poseen un potencial efecto antidiabético y antihipertensivo debido a su concentración de compuestos antioxidantes. El extracto acuoso y el extracto etanólico de los granos de maíz poseen actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -glucosidasa que tiene como efecto la disminución en la absorción de carbohidratos desde el tracto digestivo, reduciendo así los picos en los niveles de glucosa postprandial. A su vez otros estudios muestran la actividad inhibitoria del maíz en la enzima convertidora de angiotensina I que forma parte de los mecanismos que regulan la presión arterial y también en la actividad de la enzima α -amilasa lo que disminuye la absorción de carbohidratos (Kwon y col., 2007; Lee y col., 2010).

Se ha evaluado el efecto *in vitro* de diferentes fibras derivadas de maíz en la actividad de la microbiota del intestino grueso, mostrando un aumento en la actividad de las bacterias que benefician al organismo (Maathuis y col., 2009).

Estudios han mostrado que la administración en la dieta de diferentes tipos de tortillas de maíz en una concentración del 27% ha disminuido la actividad de la β -glucuronidasa y aumenta la actividad de la enzima glutatión s-transferasa que son parámetros relacionados con el riesgo de cáncer de colon (Guerrero-Villanueva y col, 2012).

El alto contenido de antocianinas en el maíz pigmentado púrpura, muestra un efecto protector en la nefropatía diabética *in vitro* al disminuir la expresión de factores y citocinas proinflamatorias (Li y col., 2012).

La administración de dietas basadas en fibra de maíz mostraron un efecto hipoglucemiante en la glucosa postprandial y una disminución en la insulina circulante (Kendall y col., 2008).

La saponina del maíz administrado a ratas con diabetes inducida con estreptozotocina produjo un efecto hipoglucemiante y protector contra los daños renales y pancreáticos (Miao y col., 2008).

En base a lo anteriormente descrito es claro el efecto benéfico producido por el maíz y/o sus componentes, sin embargo, se tiene poca información acerca de los beneficios producidos por la tortilla, es especial aquella producida por nuevas tecnologías de nixtamalización.

2. HIPÓTESIS

Las tortillas de maíz (*Zea mays* L.) elaboradas con diferentes procesos tecnológicos debido a su elevado contenido de fibra ofrecen un efecto protector contra las complicaciones de la diabetes ocasionadas por la hiperglucemia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto protector antidiabético de tortillas de maíz elaboradas con harinas de maíz obtenidas con diferentes procesos tecnológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de tortillas elaboradas con harinas de maíz obtenidas mediante diferentes procesos tecnológicos.
- Evaluar el efecto de dietas suplementadas con las harinas de tortilla sobre los niveles de glucosa en ratas diabéticas.
- Determinar el efecto de las dietas suplementadas con las harinas de tortillas sobre el perfil lipídico y alteraciones renales en ratas diabéticas.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1 Biológico

Se emplearon ratas de la cepa Wistar macho provistas por la empresa RISMART S.A. de C.V. con un rango de peso de 250 a 300 g.

4.1.2 Químico

Reactivo de Folin de la marca Sigma para la cuantificación de compuestos fenólicos. Estreptozotocina (STZ) para la inducción química de diabetes en ratas de experimentación, de la marca Sigma. Tiras reactivas marca Roche para la determinación de glucosa sanguínea. Kits de química seca de la marca Vitros para la determinación de creatinina, glucosa, urea en suero, kits de reactivos de la marca Randox para la cuantificación de perfil lipídico.

4.1.3 Muestras de experimentación

Las muestras de análisis empleadas fueron harinas de maíz obtenidas mediante tecnología limpia las cuales fueron provistas por la empresa Sodif S.A de C.V, se denominaron como TL-1 y TL-2, las muestras que se utilizaron para comparar fueron harinas de maíz obtenidas por nixtamalización tradicional se denominaron como NT-1 y NT-2. Las cuales se utilizaron para elaborar tortillas las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se molieron para obtener las harinas.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterización de las tortillas de maíz

4.2.1.1 Obtención del extracto de compuesto fenólicos

Se realizó una extracción con 10 mL de metanol por cada gramo de tortilla, protegido de la luz y en agitación durante 24 h, posteriormente se centrifugo a 5000 x g por 10 min a temperatura ambiente, al sobrenadante se le denominó extracto de tortilla de maíz, a este se le realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos condensados, capacidad antioxidante y flavonoides.

4.2.1.2 Compuestos fenólicos totales

Se determinó utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999), que se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico) que al reducirse da una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a 760 nm. Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó una alícuota de 20 µl del sobrenadante del extracto de tortilla y se llevó a un volumen final de 250 µl, posteriormente se mezcló con 125 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 625 µl de Na₂CO₃ (20 %) y se dejaron reposar en la obscuridad por 2 h a temperatura ambiente. Después se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se basa por interpolación en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 µg), y se expresaron los resultados como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de harina (mg equivalentes AG/g de harina).

4.2.1.3 Cuantificación de taninos condensados

Se utilizó el método de la vainillina, descrito por Desphande y Cheryan (1987), haciendo una adaptación para utilizar microplaca. A una alícuota de 50 µl del sobrenadante obtenido del extracto de harinas de maíz se le agregó 200 µl de una

solución (1:1) recién preparada de vainillina al 1% en metanol y HCl 8% en metanol. Al blanco se le adicionaron 50 µl de metanol y 200 µl de HCl al 4 %. Para cuantificar los taninos condensados se determino la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro. Se utilizo una curva estándar de (+) catequina (0-0.8 mg/mL) y los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina/g de harina.

4.2.1.4 Cuantificación de flavonoides totales

Para llevar a cabo la cuantificación se tomaron 50 µl del extracto de harinas de maíz y se le adicionaron 180 µl de metanol, posteriormente se adicionaron 20 µl de una solución de 2-aminoetildifenilborato al 1%, y se procedió a leer la absorbancia a 404 nm en un espectrofotómetro y los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/g de harina (Siddhuraju y Becker, 2003).

4.2.1.5 Cuantificación de antocianinas

Para la determinación de antocianinas se realizó una extracción diferente, para la cual a 0.5 g de harina de cada tipo de tortilla se le adicionaron 4 mL de etanol acidificado (85 mL de etanol al 95 % + 15 mL de HCl 1.0 N); se protegio de la luz y se mezclo durante 2 min, después se ajusto el pH a 1.0 con HCl. Posteriormente se agito durante 30 min protegido de la luz, para después centrifugar 10 000 x g por 20 min a temperatura ambiente, y por último se obtuvo el sobrenadante.

Una vez que el extracto fue obtenido se continuo con el método descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999) con algunas modificaciones de Rivera-López (1998). Al sobrenadante del extracto de harina de maíz se llevo a un volumen de 10 mL en un matraz aforado usando etanol acidificado. Posteriormente se leyo la absorbancia en un espectrofotómetro a 535 nm. El valor de la absorbancia obtenido se sustituyo en la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/g \text{ de muestra}) \times 10^6$$

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidina 3- glucósido/kg de muestra.

4.2.1.6 Capacidad antioxidante

Se mezcló el radical ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM en agua, para producir el radical ABTS. Posteriormente la solución concentrada de ABTS• se diluyó con un buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Después se adicionaron 10 μ L de muestra en 990 μ L de la dilución de ABTS a 734 nm y después de 6 minutos se midió la absorbancia a la misma longitud de onda. La concentración inhibitoria media (IC50), es una medida de utilidad para establecer la concentración de una sustancia, que se requiere para inhibir el 50 % del radical ABTS. 4.2.8 Evaluación de la capacidad antioxidante con el reactivo ABTS. La técnica descrita por Re y col. (1999) y Van Den Berg y col. (1999).

4.2.2 Inducción de diabetes con estreptozotocina

La estreptozotocina (45 mg/kg) se preparó una solución amortiguadora de citrato 0.1 mol/L, pH 4.5, esta será administrada por vía intraperitoneal en un volumen de 1 mL/kg. Después de 48 a 96 h de la administración de estreptozotocina, las ratas que presentaron un valor de glucosa de 200–300 mg/dL fueron las utilizadas para llevar a cabo el estudio.

4.2.3 Grupos de experimentación

Para la fase experimental *in vivo* se formaron 6 grupos de seis ratas en cada uno; se utilizó como control ratas diabéticas a las que no se les dará tratamiento; habrá un control con las ratas sanas sin tratamiento. Diferentes grupos de ratas diabéticas fueron alimentados con dietas suplementadas con las diferentes harinas de maíz al 15%: 1) NT-1, 2) NT-2, 3) TL-1 y 4) TL-2. Cada semana se determino los niveles de

peso corporal y glucosa sanguínea. Después de cuatro semanas los animales se sacrificarán.

4.2.3 Cuantificación de glucosa sanguínea en ayuno

El nivel de glucosa (mg/dL) se cuantificó en sangre de la vena caudal de la rata, con un mínimo de 8 horas de ayuno. Para ello se emplea un glucómetro de la marca ROCHE[®], cuyo rango de lectura es de 20-600 mg/dL de glucosa y tiras reactivas de la marca Accu-Check[®].

4.2.4 Análisis en orina

Para la obtención de orina, los animales fueron separados en jaulas individuales en condiciones de ayuno, por un lapso de 12 h. La orina se recolecto para la detección de proteínas y creatinina.

4.2.5.1 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Para determinar la concentración de proteínas en orina se utilizó el método de Lowry (1951).

4.2.5.2 Determinación de creatinina en orina

La determinación de este parámetro se realizó utilizando un Kit enzimático de la marca Randox Laboratories. La lectura se realizó con un espectrofotómetro marca Bio-Rad modelo SMART SPEC[™].

4.2.5.3 Remanente de células beta

El porcentaje remanente de células β (% FC β), se estimo a partir de la glucosa en ayunas y los niveles de insulina basal partiendo de la siguiente ecuación:

$$\% \text{FC}\beta = \frac{\text{INSULINA} \times 360}{\text{GLUCOSA}-63}$$

4.2.6 Análisis en plasma

La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca y fue recolectada en tubos vacutainer Lila con anticoagulante y centrifugada por 15 min a 3,500 rpm.

4.2.6.1 Perfil lipídico

Se realizó un perfil lipídico que consta de colesterol total, HDL y triglicéridos mediante el uso de kits de química clínica de la marca Bio-Rad y se midió en un espectrofotómetro marca Bio-Rad modelo SMART SPEC. La concentración de LDL se calculó mediante la fórmula $\text{LDL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - \text{TG}/5$

4.2.6.2 Química de 3 elementos

Se realizó un perfil bioquímico de tres elementos en el cual vienen incluidas las pruebas de glucosa, urea y creatinina, que sirven para monitorear el daño ocasionado por la hiperglucemia en órganos como los riñones. Este perfil se cuantificó utilizando kits de química seca y se leerá en el lector Vitros Dt-60II

4.2.6.3 Cuantificación de insulina

Se cuantificó mediante el uso de un kit de Elisa en placa de la marca Millipore.

4.2.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm el error estándar (EE). La

evaluación estadística de los datos se determinó utilizando la prueba de Tukey-Kramer con un valor de α de 0.05. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico JMP 10 versión Windows 7.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de compuestos fenólicos

Se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos condensados, antocianinas y flavonoides para determinar si las tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnológicos con respecto a las tortillas comerciales son diferentes debido al proceso de nixtamalización (Cuadro 4).

Cuadro 4. Caracterización de compuestos fenólicos de harinas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

Parámetro	NT-1	NT-2	TL-1	TL-2
Fenoles totales¹	36.10 ± 0.54 ^a	42.01 ± 1.04 ^a	46.25 ± 4.44 ^b	33.58 ± 0.84 ^a
Antocianinas²	3.13 ± 0.102 ^a	1.71 ± 0.101 ^b	2.93 ± 0.091 ^a	1.809 ± 0.13 ^b
Flavonoides³	7.12 ± 0.919 ^a	3.64 ± 0.338 ^b	2.47 ± 0.35 ^b	3.69 ± 0.62 ^b
Taninos condensados⁴	50.18 ± 0.37 ^a	28.91 ± 11.3 ^b	35.71 ± 4.07 ^{ab}	33.98 ± 4.3 ^b
Capacidad antioxidante (IC₅₀)⁵	28.30 ± 0.78 ^b	43.53 ± 1.6 ^a	34.23 ± 0.08 ^c	38.53 ± .51 ^{ab}

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

1 Expresados en mg eq. ácido gálico/100 g de harina

2 Expresados en mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina

3 Expresados en mg de (+)catequina/g de harina

4 Expresados en mg eq. (+)catequina/100 g

5 Expresados como µg/ml por el método ABTS.

Se observó que la concentración de compuestos fenólicos que presentó la harina de maíz TL-1 fue más alta en comparación con la harina TL-2 en un 27%, y

superior a la harina NT-1 y NT-2 en un 22% y 9% respectivamente ($p < 0.05$). Con respecto a la cuantificación de antocianinas, se observó que la harina NT-1 presentó una concentración similar a TL-1, mientras que la harina NT-2 es similar a TL-2, siendo estas últimas menores que las primeras harinas ($p < 0.05$). Se observó que la concentración de taninos condensados fue superior en las tortillas elaboradas con NT-1 en un 42%, 29% y 32% respectivamente con respecto a NT-2, TL-1 y TL-2.

La capacidad antioxidante se determinó utilizando la concentración media para inhibir el 50% del radical ABTS (IC_{50}). Las tortillas elaboradas con la harina de maíz de la marca NT-1 presentaron un IC_{50} de 28.30 ± 0.78 y este valor fue menor comparado con el obtenido para NT-2, TL-1 y TL-2 en un 1.5, 1.2 y 1.4 veces respectivamente, siendo NT-2 y TL-2 similares ($p < 0.05$).

5.2 Efecto en los niveles de glucosa en sangre por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

En la Figura 5 se observa el efecto semanal del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos en los niveles de glucosa en sangre periférica de ratas diabéticas. El día cero representa el inicio del experimento y se observó que hay diferencia significativa del grupo control sano con respecto a los demás grupos debido a la administración previa de estreptozotocina. En la primera semana ya se observa una disminución de glucosa en un 19% en el grupo de ratas alimentadas con tortillas NT-1 y TL-2 en la segunda semana el grupo alimentado con NT-1 disminuyó los niveles de glucosa en un 46%. Sin embargo, para la tercera semana se observó que este mismo grupo tuvo una disminución sólo del 20%, pero esta no fue significativa.

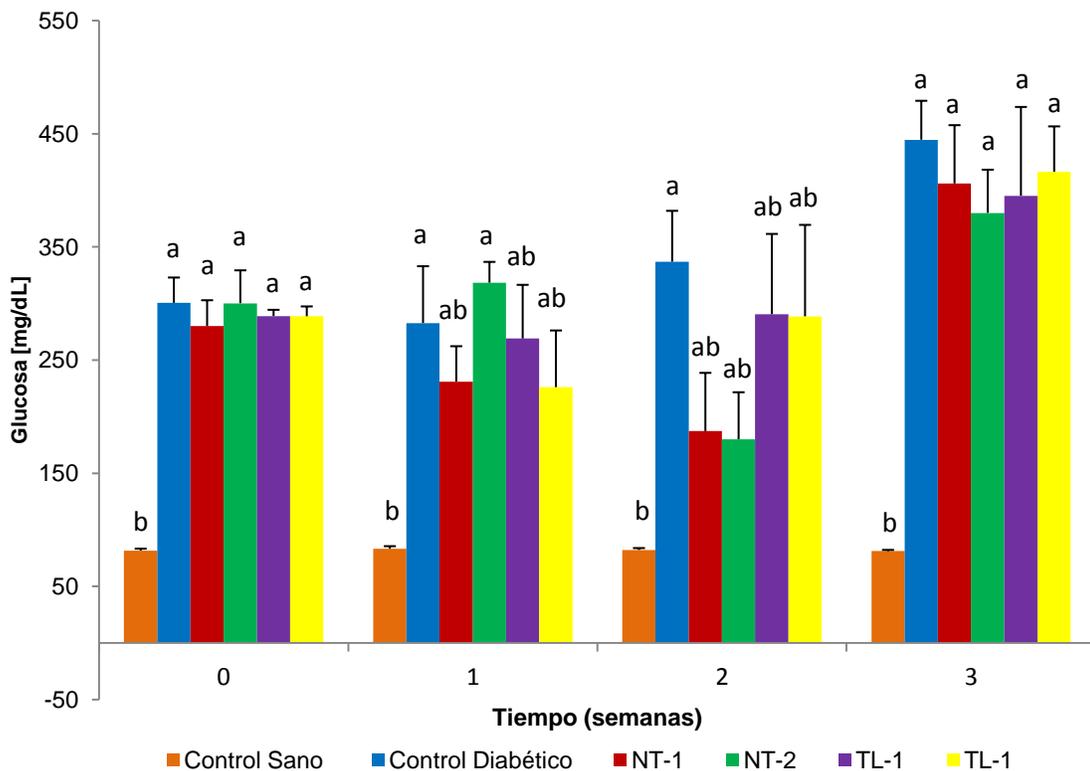


Figura 5. Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles de glucosa de ratas diabéticas.

Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

Después del sacrificio de los animales de experimentación se utilizó sangre extraída mediante punción cardíaca y se midió la concentración de glucosa en plasma utilizando un kit enzimático. Se observó que los niveles de glucosa del grupo control diabético (360.75 ± 37.28 mg/dL) y control sano (96.5 ± 8.70 mg/dL) fueron estadísticamente diferentes, por otro lado el grupo alimentado con tortillas de harina de maíz de NT-1 tuvo un decremento del 35.7%, el grupo NT-2 mostró una disminución del 22.4%, los grupos de harina elaboradas con otro proceso tecnológico TL-1 y TL-2 a pesar de no tener un decremento significativo mostraron una disminución del 15.9% y 6.8% respectivamente ($p < 0.05$) (Figura 6).

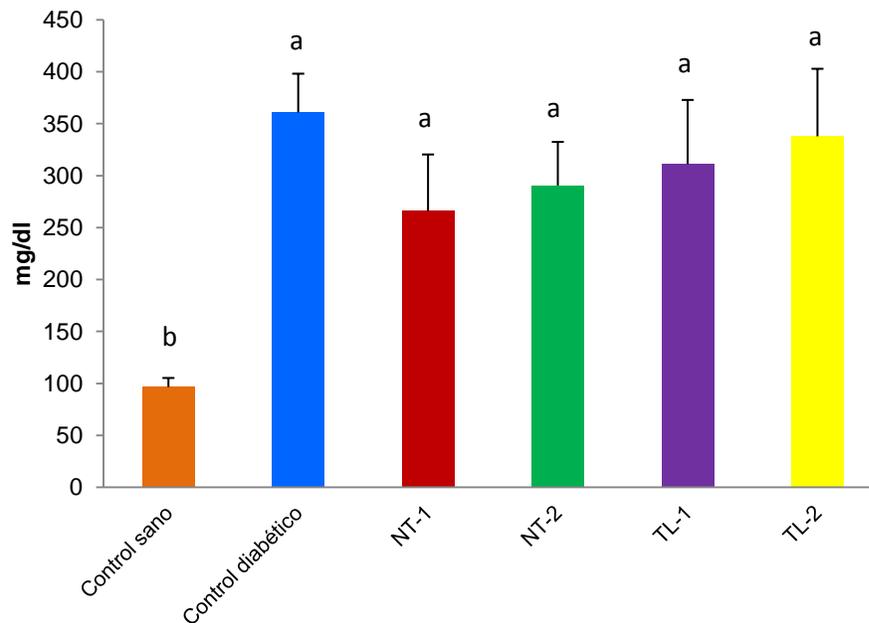


Figura 6. Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre la glucosa plasmática de ratas Wistar diabéticas después de cuatro semanas de tratamiento.

Los valores representan la media de la concentración de glucosa en plasma \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

5.3 Efecto en los niveles de insulina en plasma por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

Se observa en el Cuadro 5 los niveles de insulina plasmática en ratas Wistar diabéticas después del tratamiento con diferentes tortillas de maíz, donde el grupo control diabético tuvo una concentración de 1.42 ± 0.093 ng/dL lo que representa un decremento de 2.8 veces respecto al control sano que tuvo una concentración 4.01 ± 0.20 ng/dL, solamente el grupo alimentado con tortillas de harina de maíz NT-1 muestra diferencia significativa donde se observó un incremento respecto al grupo control diabético de un 8% ($p < 0.05$). Los grupos restantes del tratamiento no tuvieron diferencia significativa con respecto al grupo control diabético, el grupo alimentado con tortillas de NT-2 tuvo un incremento del 16.20% y los grupos

alimentados con tortillas de las harinas TL-1 y TL-2 tuvieron un incremento del 8.5% y 6.3% respectivamente ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Concentración de insulina en plasma de ratas diabéticas alimentadas con tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

Grupo	Insulina (ng/dL)
Control sano	4.01 ± 0.20 ^a
Control diabético	1.42 ± 0.093 ^b
NT-1	1.72 ± 0.041 ^b
NT-2	1.65 ± 0.058 ^b
TL-1	1.54 ± 0.040 ^b
TL-2	1.51 ± 0.059 ^b

Los valores se presentan como la media de la concentración en plasma ± E.E Valores con diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Prueba de Tukey-Kramer.

Respecto al porcentaje remanente de células beta (%FC β) que hace referencia a las células funcionales beta pancreáticas, se observó un porcentaje funcional en el grupo control sano de un 80.3% que es estadísticamente diferente en comparación con el grupo control diabético que solo representa un 3.4% ($p < 0.05$). A pesar de que no hay diferencia significativa por parte de los otros grupos con respecto al control diabético, el grupo de tortillas de NT-1 mostraron un porcentaje del 6%, el grupo de harina TL-1 presentó un 3.8% respecto al control diabético. Por otro lado, los grupos de harina NT-2 y TL-2 tuvieron un porcentaje de 3.14% y 1.6% de células funcionales respectivamente (Figura 7).

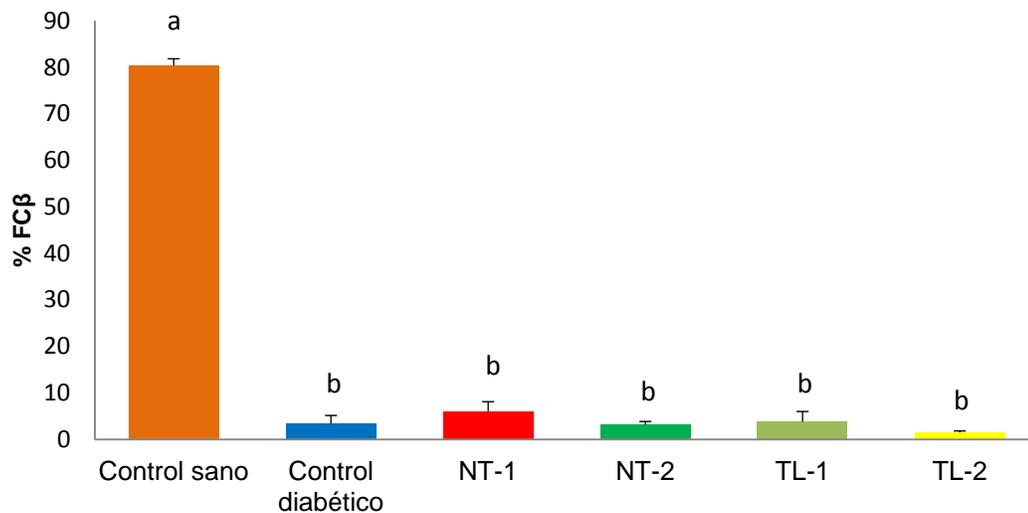


Figura 7. Efecto del consumo de tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnologicos sobre el porcentaje remanente de celulas β (%FC β) de ratas diabéticas.

Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

5.4 Efecto en el consumo semanal de agua y alimento por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

Al inicio del tratamiento se puede observar que a partir de la primera semana el grupo control diabético mostró un incremento en el consumo de alimento con respecto al grupo control sano tendencia que se mantiene a lo largo del estudio. El grupo alimentado con dieta suplementada con tortilla de NT-1 en la primera semana tuvo un aumento con respecto al control diabético del 9.8% pero para la segunda y tercera semana tiene un decremento del 15%. El grupo NT-2 tuvo un incremento en la primera semana del 10.9% con respecto al control diabético pero las siguientes semanas no tiene diferencia significativa respecto al control diabético. Los grupos alimentados con las harinas TL-1 y TL-2 no mostraron ningún efecto (Figura 8a).

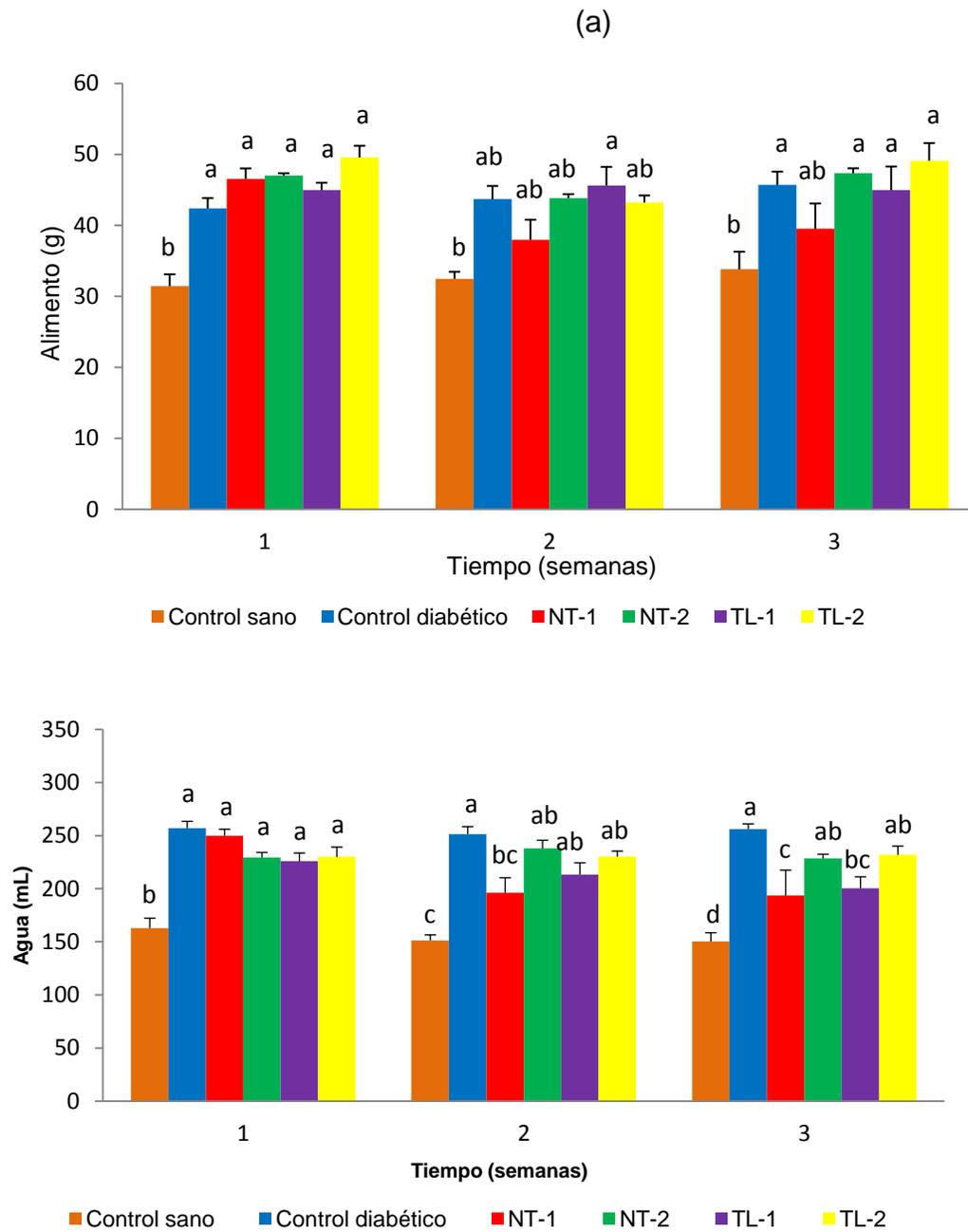


Figura 8. Efecto del consumo de tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnologicos sobre el consumo semanal de alimento (a) y agua (b) en ratas Wistar diabéticas.

Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

Respecto al consumo de agua, en la primera semana se observó que hay un incremento significativo del control diabético frente al grupo sano tendencia que se mantiene hasta la tercera semana ($p < 0.05$). Para la segunda semana el grupo alimentado con tortillas NT-1 muestra un decremento significativo del 28.2% respecto al control diabético, efecto mantenido en la tercera semana donde presenta un decremento del 32.4%. El grupo alimentado con tortillas de TL-1 muestra una disminución desde la primera semana con respecto al control diabético misma que se mantiene hasta la tercera semana donde se observó un decremento del 27.8%. Los grupos alimentados con tortillas de NT-2 y TL-2 fueron los grupos que presentaron menor disminución en el consumo de agua manteniendo un decremento aproximado del 10% a lo largo del estudio ($p < 0.05$) (Figura 8b).

5.5 Efecto en el peso relativo de los riñones por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

La concentración alta de glucosa en sangre provoca un exceso de filtración y reabsorción en los riñones ocasionando hipertrofia renal que ve reflejado en el tamaño de los riñones, el peso relativo de los riñones es un índice de daño renal causados por hiperglucemia. En la Figura 9 se muestra el peso relativo de los riñones (peso del riñón entre el peso del animal) observando que el promedio del peso relativo de los riñones del grupo control diabético es mayor en un 32% respecto al promedio del peso relativo de los riñones observado en el grupo control sano. Los grupos alimentados con tortillas de NT-1 y NT-2 tuvieron un incremento en el peso relativo respecto al control diabético en un 7.7% y 5% respectivamente. Por otro lado los grupos alimentados con las tortillas elaboradas con TL-1 y TL-2 mostraron un peso relativo similar al control diabético.

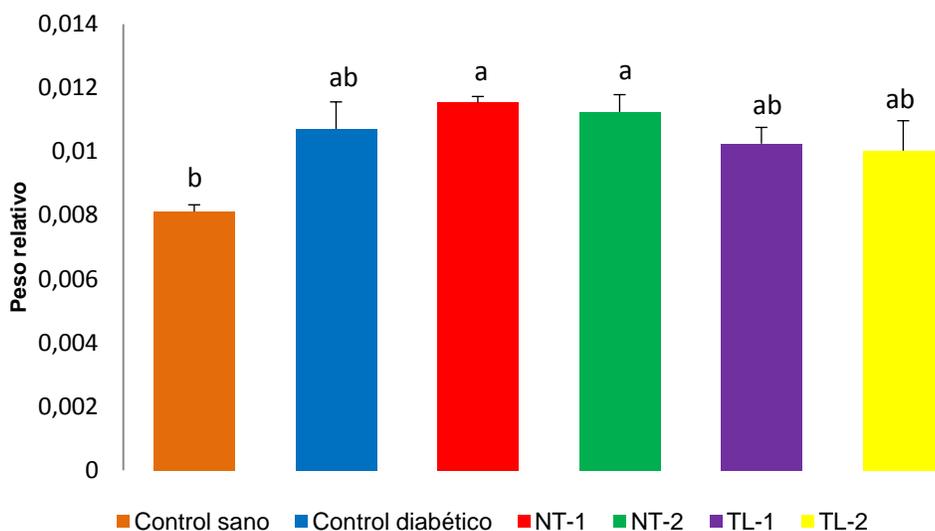


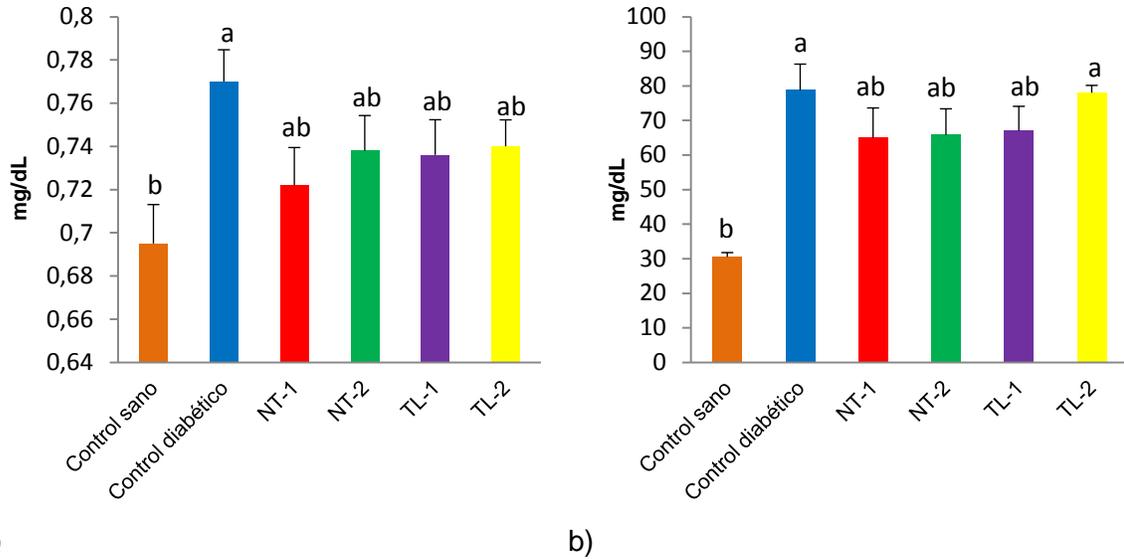
Figura 9. Peso relativo de los riñones como indicador de daño renal en ratas Wistar alimentadas con una dieta suplementadas con harinas de tortillas elaboradas con diferentes procesos tecnológicos.

Los valores representan la media del peso relativo de los riñones \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

5.6 Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles de urea y creatinina de ratas diabéticas

Tras el sacrificio de los animales de experimentación se midió en el plasma extraído por punción cardiaca los niveles de urea y creatinina. En la Figura 10a se puede observar que el grupo control diabético mostró una mayor concentración de creatinina respecto al control sano en un 10.7%, efecto similar se observa en la Figura 10b donde la concentración de urea tuvo un incremento del 58%. El grupo NT-1 mostró niveles menores de creatinina en plasma en un 6.6% y sus niveles de urea en un 21.1%. El grupo alimentado con tortillas de NT-2 también disminuyó sus niveles de creatinina en un 4.3%, así como, sus niveles de urea en un 19.6% respecto al control diabético ($p < 0.05$). Los niveles observados en el grupo TL-1 muestra un decremento tanto en creatinina como en urea de 4.6% y 17.5% respectivamente. El grupo TL-2 también tuvo un ligero decremento para creatinina

de 4%, sin embargo no tuvo diferencia en sus niveles de urea respecto al control diabético (Figura 10b).



a) b)
 Figura 10. Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles plasmáticos de creatinina (a) y urea (b) de ratas diabéticas.

Los valores representan la media de la concentración en plasma ± E.E. las letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

En la Figura 11a se observan los valores de creatinina en orina de los animales en tratamiento. El grupo control diabético presentó concentraciones menores de creatinina hasta 4.5 veces respecto al control sano, por otro lado los grupos de experimentación no tuvieron diferencia significativa respecto al grupo control diabético, aunque el grupo TL-1 presentó el mayor incremento respecto al control diabético duplicando su concentración ($p < 0.05$).

La concentración de proteína en orina muestra al grupo control diabético con una concentración 2.4 veces mayor al control sano. El grupo alimentado con tortillas de NT-1 tuvo un decremento en un 20% respecto al grupo control diabético. Los otros grupos del experimento disminuyeron los niveles de proteína de manera similar, sin presentar diferencia significativa respecto al grupo control diabético ($p < 0.05$) (Figura 12b).

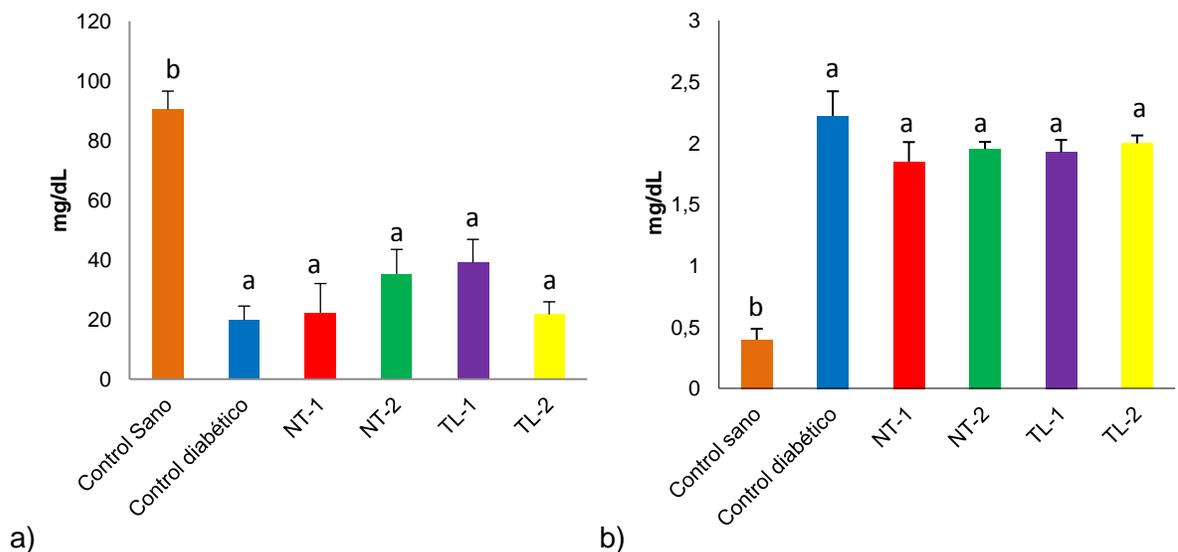


Figura 11. Efecto del consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos sobre los niveles en orina de creatinina (a) y proteínas (b) de ratas diabéticas.

Los valores representan la media de la concentración en orina \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

5.7 Efecto en los niveles perfil lipídico por el consumo de tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos

La Figura 12 muestra los niveles del perfil lipídico en plasma de los diferentes grupos del tratamiento, donde se puede observar que los animales del control diabético presentaron mayor concentración de colesterol total, LDL y triglicéridos, respecto al control sano ($p < 0.05$). El grupo NT-1 tuvo un decremento en colesterol total respecto al control diabético en un 7.5%, NT-2 en un 11.3%, TL-1 en un 14.6% y TL-2 en un 7% ($p < 0.05$).

Los niveles de HDL en plasma se elevaron en los tratamientos con respecto al control diabético ($p < 0.05$), donde el grupo alimentado con TL-1 mostró el mayor aumento con un 43.15%. Los grupos NT-1 y TL-2 mostraron un comportamiento

similar con un aumento del 28.8% y 37.8%, el grupo NT-2 presento el menor aumento con un 15.7% ($p < 0.05$).

Se puede observar una disminución de los niveles de colesterol LDL por parte de los grupos del tratamiento, donde el grupo control diabético presento un aumento en comparación con los grupos alimentados con tortillas NT-1, NT-2, TL-1 y TL-2 de 1.42, 1.33, 1.98 y 1.5 veces respectivamente ($p < 0.05$).

Respecto a los niveles de triglicéridos, se observa una decremento por parte de los grupos de estudio respecto al grupo control diabético, donde los grupos alimentados con tortillas TL-1 y TL-2 mostraron un decremento del 32% y 25.8% respectivamente. Por su parte los grupos alimentados con tortillas NT-1 y NT-2 tuvieron una disminución menor con 19.3% y 17% ($p < 0.05$).

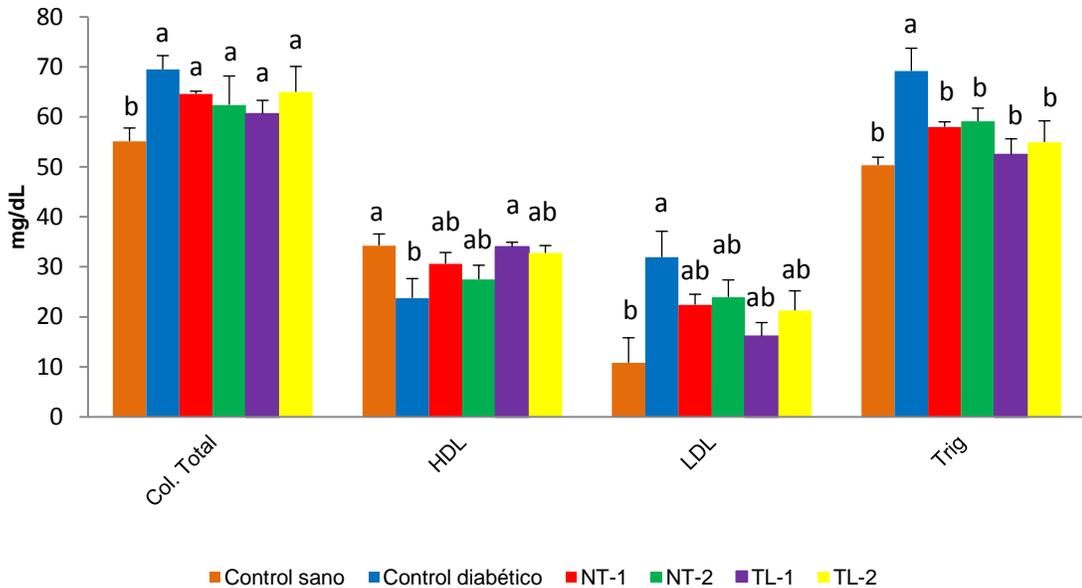


Figura 12. Perfil lipídico de los grupos diabéticos tratados con tortillas de maíz elaboradas con diferentes procesos tecnológicos.

Los valores representan la media de la concentración en plasma \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey-Kramer.

6. DISCUSIÓN

En el grano del maíz se han identificado diversos compuestos fenólicos que se han relacionado con las propiedades que pueden otorgar con beneficio a la salud como las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias que ayudan a prevenir el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas (Scalbert y col., 2005; Escamilla- Jiménez y col., 2009). No hay mucha bibliografía reportada sobre la caracterización de compuestos fenólicos en tortillas de maíz, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden comparar con los reportados por Guerrero-Villanueva y col. (2012) donde evaluaron tortillas de diferentes tipos de maíz (*Zea mays* L.) reportando una concentración para fenoles totales de 16.6 ± 1.8 mg ácido gálico/100 g de harina de tortilla, 3.1-7.0 mg eq. (+)catequina/g de harina para flavonoides y una concentración para antocianinas de 18.3-64.1 mg de cianidina 3-glucosida/kg muestra. Otros estudios realizados por Parra y col. (2007), evaluaron la concentración de compuestos fenólicos y antocianinas en harina, tortillas y frituras de diferentes especies de maíz obteniendo concentraciones de 30.5-51.1 mg ácido gálico/100 g de harina de tortilla para los compuestos fenólicos libres y respecto a antocianinas una concentración de 0.29-3.81 mg de cianidina 3-glucoside/100 g muestra.

Como se observa en el cuadro 4 la harina de tortillas de NT-1 presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos que pueden ser responsables de los efectos protectores que ofreció a los grupos de ratas diabéticas. Los resultados anteriores son de gran importancia en beneficio a la salud debido a que a estos compuestos presentan capacidad antioxidante..

Los niveles de glucosa obtenidos en sangre periférica. Se puede observar en la tercera semana de tratamiento que los grupos no presentan decremento respecto al control diabético (Figura 5) sin embargo en la concentración en plasmática se observa decremento por los grupos NT-1, NT-2 y TL-1. Se ha reportado que los niveles de glucosa pueden variar en función al método utilizado para la

cuantificación, así como, el origen de la toma de muestra. De esta manera en la figura 6 se puede observar un resultado más claro acerca de los niveles de glucosa sérica obtenida del corazón y cuantificada mediante un kit enzimático, en la cual, el grupo tratado con maíces elaborados con tortilla NT-1 y NT-2 presentaron una disminución mas importante de glucosa respecto al control diabético.

El efecto hipoglucemiante observado en los grupos del estudio puede ser ocasionado por los compuestos fenólicos que han demostrado tener un efecto hipoglucemiante. (Ludwing y col., 1999; Kendall y col., 2008; Miao y col., 2008).

La insulina tiene un papel importante en la utilización de glucosa; estimula la formación de glucógeno al inducir la vía metabólica de la glucogénesis por acción sobre la enzima glucógeno sintetasa, inhibe la gluconeogénesis y promueve el aumento del transporte de glucosa en los tejidos periféricos, como músculos y adipocitos (Flores y col., 2005). En el cuadro 5 se observa que todos los grupos del estudio no presentaron un efecto sobre la concentración de insulina y los valores descritos en la Figura 7 muestran que los distintos grupos diabéticos presentaron un porcentaje muy bajo de células β pancreáticas funcionales (%FC β), en comparación con el grupo control sano, lo que indica que hay un severo daño en los animales de experimentación debido a que la estreptozotocina con la que se induce diabetes destruye las células beta del páncreas provocando un descenso en la producción de insulina. Por lo tanto, el efecto sobre la disminución de la concentración de glucosa no está relacionado con una mayor secreción de insulina y por lo tanto con ninguna protección sobre las células β pancreáticas.

Se ha reportado que algunos compuestos fenólicos son capaces de incrementar el transporte de glucosa a células dependientes de insulina como a los adipocitos y al músculo, entre dichos compuestos se encuentran las procianidinas y el ácido gálico que ejercen un efecto similar a la insulina estimulando la captación de glucosa. En los adipocitos actúan movilizandando la translocación a la membrana plasmática y posterior activación de GLUT-4. (Naowaboot y col., 2012).

La sed excesiva es un síntoma característico en la diabetes, ya que una manera de eliminar la glucosa en sangre es mediante la orina. Lo que ocasiona un alto consumo de agua por los animales con diabetes (Federación Mexicana de Diabetes, 2003). Los resultados representados de la Figura 8b muestran que el grupo que se alimentó con tortillas NT-1 disminuyó su consumo de agua, esto podría estar relacionado con su efecto hipoglucemiante.

El peso relativo de los riñones es un índice que se utiliza para analizar un posible daño renal debido a la hipertrofia causada por la excesiva reabsorción tubular (Spomeka y col., 2006; Zaffar y Hassan, 2010). Los resultados obtenidos en el experimento sobre el peso relativo de los riñones de los animales en tratamiento no mostraron ninguna protección al compararlos con el control diabético (Figura 9).

Un perfil muy utilizado para evaluar la función renal es la química sanguínea de 3 elementos que se compone por glucosa, creatinina y urea, en plasma o suero (Spomeka y col., 2006). De manera normal la glucosa que se filtra en el riñón se reabsorbe a la sangre en su totalidad pero si se presenta un exceso de glucosa, se excede el límite de reabsorción, lo que nos lleva a un estado de hiperglucemia causando daño renal y alterando el equilibrio renal donde aumenta la filtración glomerular disminuyendo la concentración de creatinina en orina ocasionando niveles séricos altos de creatinina y urea (Bazari, 2007). En la Figura 10 se observó que los grupos alimentados con las tortillas de NT-1 tuvo un ligero decremento sobre los niveles de creatinina en suero sin llegar a ser significativa respecto al control diabético. Los niveles de proteína en orina, así como, los niveles de creatinina son parámetros utilizados para diagnosticar el daño renal. En la Figura 10 se muestra la concentración de creatinina y proteína en orina de 12 horas, donde ningún grupos mostró cambios importantes respecto al control diabético. Por lo tanto, los compuestos bioactivos presentes en la tortilla, ni el efecto hipoglucemiante fueron suficientes para mejorar la alteración renal.

La disminución de daño renal se ha relacionando con compuestos fenólicos, en un estudio realizado por Yamabe y col. (2006) reportaron una disminución de los parámetros de daño renal, como la proteína urinaria con la administraron de compuestos fenólicos del té verde a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Debido principalmente a la capacidad de reducir especies reactivas de oxígeno y por su actividad antiinflamatoria al inhibir a NFκB y disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF-α (Santangelo y col., 2007). Es importante mencionar que en este estudio la cantidad de fenoles administrados fue muy alta, así como, el perfil de estos diferentes comparada con los reportados en la tortilla.

En los niveles obtenidos en el perfil lipídico que se muestran en la Figura 12, los grupos alimentados con las tortillas TL-1 aumentan significativamente la concentración de HDL, disminuyen la concentración de LDL y triglicéridos efectos positivos en el perfil lipídico debido posiblemente a su alta concentración de fibra otorgada por el uso del pericarpio en la nixtamalización, se han reportado múltiples beneficios de la fibra en problemas cardiovasculares (Satija, 2012). Por otro lado, en la diabetes tipo 1 existe un aumento en la absorción de colesterol por parte de los intestinos, lo que afecta las concentraciones plasmáticas de LDL que son importantes en el metabolismo del colesterol (Goldstein y col., 2003). Por lo tanto, el efecto observado en los niveles de colesterol podrían estar relacionados con una protección a nivel intestinal o con una disminución en la síntesis de este lípido.

7. CONCLUSIONES

- Las tortillas de maíz NT-1 presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos.
- Las tortillas elaboradas con harina de maíz NT-1 tuvieron un efecto hipoglucemiante y esta actividad no está relacionada con una mayor concentración de insulina.
- El efecto hipoglucemiante mostrado por los animales tratados con tortillas elaboradas con harina de NT-1 no mejora la alteración renal, ni el perfil lipídico.
- Las harinas TL-1 y TL-2 a pesar de ser elaboradas con un proceso tecnológico que sugiere una conservación mayor de compuestos bioactivos comparada con el proceso tradicional, no produce mayores beneficios relacionados con la diabetes.

6. REFERENCIAS

American Diabetes Association. Diabetes Care. **2012.** 35:564-572.

Abramoff M, Niemeijer M, Russell S. Automated detection of diabetic retinopathy: barriers to translation into clinical practice. Expert Rev Med Devices. **2010;** 7(2): 287–296.

Adom K, Liu R. Antioxidant activity of grains. J Agric Food Chem. **2002;** 50(21):6182-6187.

Asher P, et al. Guía de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. ALAD, **2006;** 14(8):9-12.

Astrid-Garzón G, Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. Acta Biol Colomb. **2008;** 13(3):27-36,

Benítez C. El Maíz: origen, composición química y morfología. Materiales avanzados, UNAM. **2006;** 7:15-20.

Benz B. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz. **2001;** 98(4):2104-2106.

Callaghan B, Cheng H, Stables C. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. Lancet Neurol. 2012; 11(6):521-534

Carvajal-Millán E. una alternativa para convertir un residuo del proceso de nixtamalización del maíz en un producto de alto valor agregado. Tecnociencias. **2007;** 1(2):4-6.

Carvajal-Millán E. una alternativa para convertir un residuo del proceso de nixtamalización del maíz en un producto de alto valor agregado. Tecnociencias. **2007;** 1(2):4-6.

Cruz M, Gómez M, Ortiz M, Entzana A, Suárez C, Santillán V. Situación actual y perspectivas del Maíz en México 1996-2012. SIAP. **2012.**

Díaz Daríel. Hiperglucemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. Rev Cubana Invest Biomed. **2006;** 25(3):1-9.

Eknoyan G. Obesity, diabetes and chronic kidney disease. Curr Diab Rep. **2007;** 7(6):449-53.

Escamilla-Jiménez C, Cuevas-Martínez E, Guevara-Fonseca J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM. **2009**; 52(2):73-75.

Figueroa J, Acero G, Vasco M, Lozano G, Flores A, Gonzalez H. Fortificación y evaluación de tortillas de nixtamal. Arch Latinoam Nutr. **2001**; 51(3):293-302.

Flores R, Martínez F, Salina Y, Kil Y, González J, Ríos E. Physicochemical and rheological characteristics of comercial nixtamalised Mexican maize flours for tortillas. J Sci Food Agric. **2000**; 80:657-664.

Federación Internacional de Diabetes. Atlas de diabetes. **2012**.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. J Am Heart Assoc. **2010**; 107(9):1058-1070.

Guerrero-Villanueva M, Loarca-Piña M, Mendoza-Díaz S, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho R, Figueroa-Cárdenas J. Efecto del consumo de tortilla de maíz pigmentado (*Zea mays* L.) en indicadores de riesgo de cáncer de colon. Revista electrónica de divulgación de la investigación. **2012**; 2.

Jugenheimer R. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México. 1988; 841.

Karasu Cimen. Glycoxidative Stress and Cardiovascular Complications in Experimentally Induced DM2: Effects of Antioxidant Treatment. Open cardiovasc med j. **2010**; 4:240-256.

Kato T, Mapes C, Mera L, Serratos J, Bye R. Origen y diversificación del maíz. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1ª edición. **2009**; 116.

Kendall C, Esfahani A, Evans A, Sanders L, Josse A, Vigen E, Potter S. Effect of Novel Maize-based Dietary Fibers on Postprandial Glycemia and Insulinemia. J Am Coll Nutr. **2008**; 27(6):711-718.

King, George. The Role of Inflammatory Cytokines in DM2 and Its Complications. J Periodontal. **2008**. 79:1527-1534.

Kwon YI, Apostolidis E, Kim YC, Shetty K. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. J Med Food. **2007**; 10(2):266-275.

- Lee CH**, Garcia HS, Parkin KL. Bioactivities of kernel extracts of 18 strains of maize (*Zea mays*). J Food Sci. **2010**; 75(8):C667-672.
- Li J**, Lim S, Kim J, Kang S, Kang Y. Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy. J Nutr Biochem. **2012**; 23(4):320-31.
- Maathuis A**, Hoffman A, Evans A, Sanders L, Venema K. The effect of the undigested fraction of maize products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic in vitro model of the human proximal large intestine. J Am Coll Nutr. **2009**. 28(6):657-66.
- Menéndez T**, Lafita F, Artola S, Núñez-Cortés J, García A, Puig M, García S, Álvarez G, García A, Mediavilla J, Miranda C, Romero G. Recommendations for the pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. **2011**; 58(3):112-120.
- Miao M**, Zhang G, Miao Y, Shi J, Liu H. Influence of *Zea mays* L. saponin (ZMLS) on ultrastructure of kidney and pancreas in diabetes rats induced by streptozocin. China journal of chinese materia medica. **2008**; 33(10):1179-1183.
- Naowaboot J**, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Prawan A, Kukongviriyapan U, Itharat A. Mulberry leaf extract stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation in rat adipocytes. Am J Chin Med. **2012**; 40(1):163-75.
- Paredes O**, Guevara F, Bello L. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas Mesoamericanas. Colección "la ciencia para todos, No. 2012". 1a ed. Editorial: FCE. **2006**; 2:16-58.
- Paredes O**, Guevara F, Bello L. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. Ciencias. **2009**; 92-93.
- Piperno D**, Flannery K. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry date and their implications. **2001**;98(4):2101-2103.
- Pitsavos C**, Demosthenes B, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. Am J Clin Nutr. **2005**; 82:694-9.

Prado-Serrano A, Guido-Jiménez M, Camas-Benitez J. Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *Rev Mex Oftalmol.* **2009**; 83(5):261-266.

Ramos-Ibarra María, Batista-González Cecilia, Gómez Beliada, Zamora-Pérez Ana. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud.* **2006**; 8:7-15.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario de la Producción Agrícola. México, D.F. **2008**.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2005**; 45:287-306.

Secretaria de salud. Encuesta nacional de salud y nutrición. **2012**.

Sistema Nacional de Información en salud (SINAIS). Principales causas de muerte en México. **2008**

Torres A, Zacarías R. Nefropatía diabética. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González.* **2002**; 5:24-32.

UNAM. Nuevo Atlas de México. Instituto de Geografía. 2a edición. México, D.F. **2007**.

Veles-Medina J. Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas masa y tortillas de harina. Cinvestav. **2006**.

Walter M, Marchesan E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Braz Arch Biol Technol.* **2011**; 54:371-377.

Wei M, Gaskill S, Haffner S, Stern. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diab Care.* **1998**. 7:1167-1172.

Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. Therapeutic potential of epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **2006**; 9(1):228-236.

Yamagishi S, Takanori M. Advanced Glycation end Products, Oxidative Stress and Diabetic Nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* **2010**; 3:101-108.