



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

***“ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A
PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAIZ ELABORADAS
POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN”***

QUE PRESENTA:

Q.F.B. DIANA CECILIA MAYA CORTÉS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ASESORES:

**D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
D.C. JUAN DE DIOS FIGUEROA CARDENAS**

JULIO DEL 2009





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas

DR. DANIEL VAL ARREOLA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Estudios nutricionales y de absorción de calcio a partir de tortillas integrales de maíz elaboradas por un método ecológico de nixtamalización" presentado por la QFB. Diana Cecilia Maya Cortés, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, 19 de junio de 2009

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas

Dr. Rosalio Mercado Camargo

Dr. Carlos Rubén Soza Aguirre

Dr. Rafael Ortiz Alvarado

DEDICATORIAS

A mis padres Cecilia y Roberto:

Por siempre tener una palabra de aliento y ser el motor de mi vida.

A mis hermanos Paulina, Roberto y Liz:

Por su incondicional cariño y apoyo a lo largo de mi vida.

A Eugenio:

Por ser una parte importante en mi vida y permitirme ser parte de la suya, y por todo el apoyo para conmigo.

A mis asesores el D.C. Héctor Eduardo y el D.C. Juan de Dios:

Por darme la confianza y oportunidad de crecer en el ámbito profesional y personal.

A todos mis amigos Lore, Alejandro, Chayo, Ricardo, Trini, Mireya, Benjamín, Sandra, Leslie:

Por ofrecerme su amistad incondicional y apoyo en momentos importantes de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia y de forma muy especial, a mí Asesor de Tesis el D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores, por su apoyo, dedicación y tiempo otorgado al presente trabajo, así como a la invaluable labor de transmitir sus conocimientos con el fiel compromiso de mi satisfactoria formación académica.

A mi Co-asesor de tesis el D.C. Juan de Dios Figueroa Cárdenas, del CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro, por su valioso apoyo al otorgarme este proyecto de investigación y su constante participación en la realización del mismo.

A mi comité revisor de tesis, D.C. Rosalio Mercado Camargo, D.C. Carlos Rubén Sosa Aguirre y al D.C. Rafael Ortiz Alvarado, por su colaboración y tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

Al M.C. José Juan Vélez Medina y a la M.C. Marcela Gaytán Martínez, por su colaboración en la elaboración de las tortillas integrales de maíz y su apoyo con la caracterización fisicoquímica de los fémures de las ratas utilizadas en el ensayo biológico.

Al D.C. Raúl Cortés Martínez, a la D.C. Ruth A. Cuevas Villanueva, al Biólogo Benjamín Villalobos Castañeda y al M.C. Neftali del Laboratorio de Metalurgia, por su atenta y valiosa colaboración en la determinación de minerales en el Laboratorio de Espectroscopia de Absorción Atómica de la UMSNH.

A mis compañeros de laboratorio Q.F.B. Mireya Ramos Rendón, Q.F.B. María Trinidad Mora Bedolla, Q.F.B. Jaime Acosta Chávez, Q.F.B. Eugenio Bedolla Cornelio, I.B.Q. Luis Ernesto Prado Rodríguez y a la Q.F.B. Lupita estudiante del D.C. Rafael Ortiz Alvarado, por su invaluable colaboración durante el ensayo biológico en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos y el Laboratorio de Neurobiología de la UMSNH.

A CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo de investigación.

A la Facultad de Químico Fármaco Biología por la disposición de sus instalaciones y el apoyo para concluir satisfactoriamente el presente trabajo.

Al CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro por su apoyo de instalaciones y equipo de laboratorio para la realización de una parte experimental del trabajo

ÍNDICE

Página

INDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	ix
GLOSARIO	xi
I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	5
3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE MAÍZ	5
3.2 USOS DEL MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE TORTILLAS	7
3.3 IMPORTANCIA DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN	7
3.4 CAMBIOS QUÍMICOS Y FÍSICOS DEL MAÍZ DURANTE LA NIXTAMALIZACIÓN	8
3.5 LIMITANTES DEL PROCESO TRADICIONAL DE NIXTAMALIZACIÓN	9
3.6 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN LA DIETA	9
3.7 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO	10
3.8 RELACIÓN CALCIO-HUESO	11
IV. HIPOTESIS	14
V. OBJETIVOS	15
5.1 GENERAL	15
5.2 PARTICULARES	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 PREPARACIÓN DE HARINAS Y TORTILLAS	16
6.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MAÍZ BLANCO Y TORTILLAS	17
6.3 ENSAYO BIOLÓGICO	18
6.3.1 ELABORACIÓN DE DIETAS	18
6.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS DIETAS	20

6.3.3 DISTRIBUCIÓN Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	20
6.3.4 SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	21
6.3.5 CARACTERISTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS HUESOS DE LAS RATAS	22
6.3.5.1 DIMENSIONES FÍSICAS DE LOS HUESOS	22
6.3.5.2 FUERZA AL CORTE DE LOS HUESOS DE RATAS	22
6.3.5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DE LOS HUESOS	24
6.3.5.4 CALCIO Y MAGNESIO EN HUESOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	25
6.3.5.5 FÓSFORO TOTAL EN HUESO DE ACUERDO A NMX-AA 029-SCFI-2001	26
6.3.6 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALBÚMINA SÉRICA	27
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 PREPARACIÓN DE HARINAS Y TORTILLAS	28
7.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MAÍZ Y TORTILLAS	32
7.3 ENSAYO BIOLÓGICO	36
7.3.1 ELABORACIÓN DE LAS DIETAS	36
7.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS DIETAS	36
7.3.3 DISTRIBUCIÓN Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	38
7.3.4 GANANCIA EN PESO DURANTE EL ENSAYO BIOLÓGICO Y PER	39
7.3.5 SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	44
7.3.6 CARACTERISTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS HUESOS DE LAS RATAS	44
7.3.6.1 DIMENSIONES FÍSICAS DE LOS HUESOS	44
7.3.6.2 FUERZA AL CORTE DE LOS HUESOS DE RATAS	48
7.3.6.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) EN HUESO	58

7.3.6.4 CALCIO, MAGNESIO Y FÓSFORO EN HUESO	66
7.3.6.5 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALBÚMINA SÉRICA	70
7.3.6.6 OTRAS OBSERVACIONES DURANTE EL ENSAYO BIOLÓGICO	73
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Principales causas de osteopenias generalizadas.	13
Figura 2. Proceso ecológico de nixtamalización (Patente Mex pa/a/2005/011797).	16
Figura 3. Proceso tradicional de nixtamalización.	17
Figura 4. Medición de compresión con el Texturómetro TA-XT2 en los fémures de los animales alimentados con las dietas experimentales.	23
Figura 5. Ciclo de compresión; carga (P); carga máxima (P_m); W_P , trabajo plástico ($W_T = W_E + W_P$); W_E es el trabajo realizado durante la descarga; y la deformación (h).	24
Figura 6. Fijación de los fémures en pastillas de acrílico para Microscopia Electrónica de Barrido.	25
Figura 7. Maíz cocido con método tradicional.	29
Figura 8. Maíz cocido con método ecológico.	29
Figura 9. A la izquierda se observa la tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización y a la derecha con el método ecológico.	29
Figura 10. A la izquierda se observa el nejayote ecológico y a la derecha el tradicional.	30
Figura 11. A la izquierda se observan los sólidos sedimentables en el nejayote ecológico y a la derecha los del nejayote tradicional.	31
Figura 12. Sólidos sedimentables del nejayote ecológico.	31
Figura 13. Asignación y alimentación de los animales en jaulas individuales.	38
Figura 14. ANOVA en los datos de ganancia en peso durante los 28 días de experimento de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	40

Figura 15. Talla de los animales al final del experimento; dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).	41
Figura 16. ANOVA en los datos del alimento total consumido durante los 28 días de experimento de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®, DT (dieta de tortilla tradicional).	42
Figura 17. Análisis de ANOVA a los datos de calcio total consumido de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®, DT (dieta de tortilla tradicional).	42
Figura 18. Análisis de ANOVA a los datos de PER de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®, DT (dieta de tortilla tradicional).	43
Figura 19. PER semanal por grupo de dieta; dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta control de caseína (DC).	43
Figura 20. Análisis de ANOVA a los datos de peso de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®, DT (dieta de tortilla tradicional).	46
Figura 21. Talla de los fémures promedio de cada grupo de dieta. Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC).	46

Figura 22. Análisis de ANOVA a los datos de longitud de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	47
Figura 23. Análisis de ANOVA a los datos de espesor de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	47
Figura 24. Análisis de ANOVA a los datos de diámetro medio fémur-pelvis de los fémures de cada grupo. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	48
Figura 25. Fuerza de cizalla sobre un hueso.	49
Figura 26. Análisis de ANOVA a los datos de fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	50
Figura 27. Composición del hueso.	50
Figura 28. Propiedades biomecánicas del hueso.	51
Figura 29. Análisis de ANOVA a los datos de compresión de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	52
Figura 30. Representación esquemática del perfil de una huella y curva de carga vs. Deformación para un ensayo de compresión.	54
Figura 31. Curva de fuerza-desplazamiento.	55

Figura 32. Análisis de ANOVA a los datos de Módulo de elasticidad de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	56
Figura 33. Curvas de compresión de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	57
Figura 34. Aspecto de un hueso con osteopenia intracortical.	60
Figura 35. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de maíz blanco sin procesar (DB) y a la derecha se observa un sitio de resorción ósea anormal (50 μ m).	61
Figura 36. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta control de caseína (DC) y a la derecha se observan sitios de resorción y formación ósea normales (50 μ m).	62
Figura 37. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla ecológica (DE) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 μ m).	63
Figura 38. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla tradicional (DT) y a la derecha se observa varios sitios de resorción ósea (50 μ m).	64
Figura 39. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla Maseca® (DM) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 μ m).	65
Figura 40. Esquema general de regulación del metabolismo mineral.	67
Figura 41. Análisis de ANOVA a los datos de mg Ca/g de hueso de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).	68

- Figura 42.** Análisis de ANOVA a los datos de albúmina sérica de cada grupo. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de Caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional). 72
- Figura 43.** Presencia de alopecia en algunos animales alimentados con Dieta de Maíz blanco (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM); signo de desnutrición en el animal. 72
- Figura 44.** Diferencia de tamaño y volumen de la materia fecal provenientes de las dietas. Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC). 74

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro I. Formulación general de la Dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia.	18
Cuadro II. Mezcla de minerales AIN-93G.	19
Cuadro III. Mezcla de vitaminas AIN-93G.	20
Cuadro IV. Composición química del los nejayotes recuperados tanto por el método tradicional de nixtamalización (NT), como por el método ecológico de nixtamalización (NE).	33
Cuadro V. Composición química del Maíz blanco sin procesar (MB), tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización (TE), tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización (TT) y tortilla elaborada con harina instantánea Maseca® (TM).	35
Cuadro VI. Contenido de Calcio y Magnesio en Maíz blanco sin procesar (MB), tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización (TE), tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización (TT) y tortilla elaborada con harina instantánea Maseca® (TM).	35
Cuadro VII. Composición química de la Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC).	37
Cuadro VIII. Ganancia en peso y PER de los animales, alimento y calcio consumido durante los 28 días del ensayo. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).	40
Cuadro IX. Peso, longitud, espesor y diámetro medio de los fémures de cada grupo de dieta. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).	45

Cuadro X. Parámetros para la medición y fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo de dietas. Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC).	49
Cuadro XI. Parámetros para la medición y fuerza requerida para la compresión de los fémures de cada grupo de dietas. Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC).	52
Cuadro XII. Análisis Químico Elemental (SEM), relación Ca:P y grosor de hueso cortical en la superficie del corte transversal de los fémures de cada grupo de Dieta.	60
Tabla XIII. Contenido de Calcio y Magnesio en Fémur de ratas alimentadas con Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT) y Dieta de tortilla Maseca® (DM).	70
Tabla XIV. Contenido de albúmina sérica (g/dL) de cada grupo de dietas. Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), Dieta de tortilla ecológica (DE), Dieta de tortilla tradicional (DT), Dieta de tortilla Maseca® (DM) y Dieta Control de caseína (DC).	71

GLOSARIO

Aflatoxinas: Son micotoxinas producidas por muchas especies del género de hongos *Aspergillus*, los más notables *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*. Las aflatoxinas son tóxicas y carcinogénicas para animales, incluyendo humanos.

Anisotropía: Es la propiedad general de la materia según la cual determinadas propiedades físicas, tales como: elasticidad, temperatura, conductividad, velocidad de propagación de la luz, etc. varían según la dirección en que son examinadas. Algo *anisótropo* podrá presentar diferentes características según la dirección.

Antocianinas: Pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las flores y a los frutos.

DB: Dieta de maíz blanco sin procesar.

DC: Dieta control de caseína.

DE: Dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización.

DM: Dieta de tortilla Maseca®.

DT: Dieta de tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización

Efluente: Desechos líquidos o gaseosos, tratados o no, generados por diversas actividades humanas que fluyen hacia sistemas colectores o directamente a los cuerpos receptores. Comúnmente se habla de efluentes refiriéndose a los desechos líquidos.

Extracto etéreo: También conocida como grasa bruta, es conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con éter etílico (ésteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ceras, ácidos grasos libres).

Flavonoides: Término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos.

Fuerza de cizallamiento: Fuerza interna que desarrolla un cuerpo como respuesta a una fuerza cortante y que es tangencial a la superficie sobre la que actúa. También

llamada esfuerzo cortante.

Hidroxiapatita: También llamado hidroxiapatito, está formado por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y representa un depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total. El hueso desmineralizado es conocido como osteoide. Constituye alrededor del 60-70% del peso seco del tejido óseo, haciéndolo muy resistente a la compresión. El esmalte que cubre los dientes también lo contiene.

Hipogonadismo: (*Hipo-*: carencia o defecto de; *-gónada*: órgano sexual) es un trastorno en que los testículos no son funcionales o hay incapacidad genética del hipotálamo para secretar cantidades normales de GnRH (Gonadotropina). Las características sexuales masculinas no están desarrolladas: huesos finos, músculos débiles, vello leve, la voz se reduce un poco a su tono grave. Es una de las diversas causas de esterilidad.

Hirsuto: Pelo áspero, duro y disperso.

Hueso cortical: Se encuentra en las diáfisis de huesos largos, es homogéneo y muy resistente. Forma un conducto tubular que encierra la cavidad medular, donde asientan las principales estructuras neurovasculares junto con la médula ósea amarilla. La superficie externa está cubierta por el periostio formado por una capa exterior del tejido fibroso rica en vasos, nervios y terminaciones sensitivas; en ella se insertan ligamentos y tendones.

Hueso trabecular: Consta de una malla de pequeñas espículas entre las cuales hay cavidades con médula ósea roja o amarilla según su localización y edad. La superficie de las trabéculas tienen una capa osteogénica o endostio, la cual es responsable del remodelado más activo que en la compacta. Se encuentra en la epífisis de los huesos largos, el diploe de huesos planos y entre las dos tablas compactas de los huesos cortos y vértebras.

MB: Maíz blanco sin procesar.

Nejayote: Palabra de origen náhuatl que significa *caldo de cal* o agua proveniente de la cocción del maíz cal la cual se considera un desecho muy contaminante y con alto nivel de sólidos solubles y cal.

Nixtamalización: Proceso milenario de origen mesoamericano por el cual se prepara

la harina de maíz. La palabra proviene de *nixtamal*, que viene del náhuatl *nextli*, de cenizas de cal, y *tamalli*, masa de maíz cocido.

Osteoblastos: Son células del hueso, sintetizadoras del tejido óseo, por lo que están involucradas en el desarrollo y el crecimiento de los huesos. El desarrollo de los osteoblastos se ve influenciado por distintos factores que estimulan su formación como la hormona paratiroidea y la vitamina D.

Osteocalcina: Es una proteína de pequeño tamaño, producida por los osteoblastos durante la formación ósea, incorporándose dentro de la matriz del hueso.

Osteocitos: Son células que se forman a partir de la diferenciación de los osteoblastos, que a su vez derivan de las células osteoprogenitoras. Todos estos tipos celulares, junto con los osteoclastos (de distinto origen), constituyen los elementos celulares del tejido óseo. Los osteocitos se encuentran en mayor proporción en los huesos osificados.

Osteoclasto: célula multinucleada que degrada y reabsorbe hueso. Así como el osteoblasto, es implicado en la remodelación de hueso natural. Deriva de células hematológicas.

Osteonectina: Es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal.

Osteopenia: Es una disminución en la densidad mineral ósea que puede ser una condición precursora de osteoporosis. Sin embargo, no cualquier persona diagnosticada con osteopenia desarrollará osteoporosis.

Osteoporosis: Es una enfermedad en la cual disminuye la cantidad de minerales en el hueso, perdiendo fuerza la parte de hueso trabecular y reduciéndose la zona cortical por un defecto en la absorción del calcio, lo que los vuelve quebradizos y susceptibles de fracturas y de microfracturas, así como anemia y ceguera. La densidad mineral de los huesos se establece mediante la densitometría ósea.

Pelagra: Es una enfermedad causada por una dieta deficiente o insuficiencia del organismo para absorber la niacina (vitamina B3) o el triptófano (un aminoácido). Esta enfermedad es común en ciertas partes del mundo (por ejemplo, en personas

que consumen excesivas cantidades de maíz). Suele denominarse como la enfermedad de las tres D: dermatitis, diarrea y demencia, ya que se caracteriza por úlceras cutáneas escamosas, diarrea, cambios en la mucosa, además de confusión mental y alucinaciones.

PER: Relación de eficiencia proteica. Esta relación está definida como la ganancia en peso por proteína consumida.

Polifenol: Grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados.

Radiolúcido: Es una de las densidades que se utiliza en radiología especialmente en radiografías, se considera que un material es radiolúcido debido a que los rayos x traspasan fácilmente la estructura y en la radiografía se ve mas negro.

Resorción ósea: Desaparición total o parcial del tejido óseo.

Sialoproteínas óseas: Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha\beta3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

TE: Tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización.

TM: Tortilla elaborada con harina instantánea Maseca®.

TT: Tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

I. RESUMEN

Un paso esencial en la producción de tortilla es el cocimiento del maíz con cal, utilizando el proceso de nixtamalización, el cual mejora la calidad nutricional de la tortilla comparado con el maíz crudo. Sin embargo, uno de los mayores problemas que la industria tortillera tiene es que se pierde un alto porcentaje de sólidos (nutrientes) durante el proceso y el gran volumen de efluente contaminante producido en el agua de cocción y lavado (*nejayote*). El objetivo de esta investigación fue evaluar el valor nutricional de la tortilla integral proveniente de un proceso ecológico de nixtamalización (PE), el cual retiene nutrientes que se pierden en el proceso de nixtamalización tradicional (PT). Para preparar las tortillas, el grano de maíz fue cocido a temperatura de 90 °C por 40 min con agua y cal [1 % p/p de Ca(OH)₂] para el PT y sulfato de calcio (1.8% p/p de CaSO₄) para el PE; enseguida, los granos se reposaron 12 h. El nixtamal (granos cocidos y reposados) se enjuago y se molió hasta obtener masa, de la cual se elaboraron las tortillas de ambos procesos; además, tortilla comercial fue preparada a partir de harina Maseca®. Se evaluó la composición nutrimental y un ensayo biológico para conocer la biodisponibilidad del calcio en las tortillas elaboradas con los métodos ecológicos (TE), tradicional (TT) y de Maseca® (TM); el ensayo biológico consistió en alimentar durante 28 días a ratas con dietas elaboradas con las diferentes tortillas; al final, a los animales se les cuantifico la cantidad de calcio presente en hueso. En relación a los resultados, la TE tuvo 6.41% y 8% más proteína, 16.3% y 19% más grasa, y 117.4% y 143% más fibra comparada con las TT y TM, respectivamente. El valor de la Relación de Eficiencia Proteica (PER) de ratas alimentadas con la dieta de tortilla proveniente del método ecológico (DE) fue de 1.81, y no fue significativamente diferente ($P<0.05$) al de las ratas alimentadas con la dieta de tortilla tradicional (DT) (1.85); ambos fueron parcialmente diferentes comparados con los animales alimentados con la dieta de tortilla Maseca® (DM) (1.74). Además, los animales alimentados con la DE tuvieron 5.12% menos calcio en hueso comparado con los alimentados con la DT, esta disminución fue estadísticamente diferente. No obstante, no se observó diferencia significativa ($P<0.05$) en la fuerza máxima de compresión aplicada sobre

el fémur, lo cual indica que las propiedades viscoelásticas del material y su comportamiento sobre una posible fractura fueron similares, siendo de 13.67 N para los fémures de las ratas alimentadas con la DE y 13.45 N para los de la DT. Se concluye que el PE produjo una tortilla con alto contenido de fibra dietética, y no comprometió la calidad nutricional de ésta; el PE no generó efluentes contaminantes, y el valor de pH del nejayote fue de 5.17, implicando ser menos costoso en cuanto al tratamiento del agua de desecho, en comparación al valor de pH de 12 obtenido en el PT, lo cual representa una buena alternativa ecológica.

NUTRITIONAL STUDIES AND CALCIUM ABSORPTION OF WHOLE-GRAIN CORN TORTILLA MADE BY AN ECOLOGICAL METHOD OF NIXTAMALIZATION

II. SUMMARY

An essential step for producing tortilla is boiling corn with lime by the use of a nixtamalization process, which provides better nutritional quality to tortilla as compared with raw corn. Nevertheless, one of the greatest problems that the tortilla industry faces is the high percentage of solid lost (nutrients) during the process and the great volume of effluent pollutant produced in the water of boiling (*nejayote*). The aim of this research was to evaluate the nutritional value of a whole-grain tortilla prepared from an ecological process (EP) that retains nutrients that are lost during the traditional process (TP). For the preparation of the tortillas, the corn grain was coked at temperature of 90 °C for 40 min with water and lime (1% w/w Ca(OH)₂) for the TP and calcium sulphate (1.8% p/p de CaSO₄) for EP; then, the grains were steeped for 12 h. The nixtamal (cooked and steeped grains) were washed and grounded to obtain the masa, which was used to prepare the tortillas; also, commercial tortillas were prepared from flour Maseca. The nutritional composition and biological assay to know the bioavailability of the calcium in tortillas done from following processes, the ecological (ET), traditional (TT) and Maseca (MT) were evaluated; the biological assay consisted of feeding the rats for 28 days with the different tortillas; at the end of the assay the quantity of calcium present in bone was calculated. According with the results, the ET had 6.41% and 8% more protein, 16.3% and 19% more fat and 117.4% and 143% more fiber as compared to the TT and MT, respectively. The protein ratio efficiency (PER) value of rats fed with the diet from ecological process (ED) was 1.81, and was not different ($P < 0.05$) to the rats fed the traditional tortillas diet (DT) (1.85); however both were partially different compared to those rats fed with the Maseca tortillas diet (MD) (1.74). Also, the animals fed with ED) had 5.12 % less calcium in bone as compared with those fed with TD, the decrement in calcium was statistically different. Nevertheless, there was not significant differences ($P < 0.05$) in the maximum compression force applied on the femur, which indicates that viscoelastics properties of the materials and the behaviour on a possible fracture were similar, being of 13.67 N for ED and 13.45 N for TD. In conclusion, EP produced tortilla with high dietary fiber content, without

compromising the nutritional quality of this one; the EP not generates pollutants effluents, and the pH of the *nejayote* was of 5.17, implying that the treatment of the waste water could be less expensive, in comparison to the pH value of 12 obtained in the TP, which is a good ecological alternative.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

III. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.), también llamado maíz indio (Farnham *et al.* 2003) es uno de los cereales de mayor producción en el mundo (Milán *et al.* 2004, Proulx y Reddy 2009). Wertz (2005) menciona que el maíz tuvo su origen hace aproximadamente 9,000 años en la región central de México. Y desde entonces el maíz ha sido la base de la alimentación de las culturas mesoamericanas, trascendiendo hasta hoy en día en nuestro país. El maíz representa el 75.2% del volumen total de la producción agrícola en México, significando la base de la alimentación de la mayor parte de la población. El peso social de la agricultura del maíz es de gran trascendencia, ya que alrededor de 2.6 millones de personas se dedican a esta actividad. También la importancia del maíz radica en la gran diversidad de usos a que es destinado y una amplia penetración y trayectoria por múltiples encadenamientos agroindustriales (Gordillo 1990, INEGI, 1992).

3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE MAÍZ

Entre las diferentes partes del grano de maíz se encuentra una notoria diferencia en su composición química. El pericarpio o cubierta seminal tiene un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente un 87%, la que a su vez está constituida por un 67% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina (Burge y Duensing 1989). En el endospermo, el almidón constituye un 87%, proteínas un 8% y un contenido de grasas de 0.8%. Y por último, el germen posee un aproximadamente un contenido de ácidos grasos de un 33%, y también de proteínas aproximadamente un 20% y es aquí donde se encuentra la mayor cantidad de minerales (Bressani y Mertz 1958).

En términos de componentes químicos, el almidón corresponde un 72-73% del peso total del grano de maíz, su estructura ésta formada por dos polímeros, la amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal de unidades de glucosa, que constituye del 25-30% del almidón. La amilopectina también consiste de unidades de glucosa, pero tiene

una cadena lineal que posee ramificaciones y constituye del 70-75% del almidón. Otros azúcares como la glucosa, sacarosa y fructosa, se encuentran en cantidades que varían del 1-3% del peso en el grano (Mathews 1998).

Las proteínas constituyen el segundo componente químico del grano por orden de importancia. El contenido de proteínas para variedades comerciales es de 8-11% del peso del grano. Según Landry y Moureaux (1980), las proteínas del maíz están formadas por lo menos por cinco fracciones distintas: i) albúminas, ii) globulinas, iii) glutelinas, iv) prolaminas y v) el nitrógeno no proteico. La calidad nutritiva del maíz como alimento viene determinada por la composición de aminoácidos de sus proteínas. En el maíz común, existen carencias de lisina (158-166 mg/g de nitrógeno) y triptófano (2.7-3.7 mg/g de nitrógeno). Otro rasgo importante es el elevado contenido de leucina del maíz siendo este de un 12-15% (Bressani *et al.* 1990).

El aceite en el grano de maíz se encuentra en valores del 3-6%, éste se encuentra primordialmente en el germen donde se concentran otros compuestos como minerales y vitaminas que son considerados una reserva para una posterior germinación del grano. El aceite de maíz tiene un bajo nivel de ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico), con valores del 11 y 2%, respectivamente. En cambio, contiene niveles relativamente elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoleico, con un valor aproximado de 24%. Sólo se han encontrado cantidades muy pequeñas de ácidos linolénico y araquidónico. Además, el aceite de maíz es relativamente estable, por contener únicamente pequeñas cantidades de ácido linolénico y niveles elevados de antioxidantes naturales, como los polifenoles, antocianinas y flavonoides, los cuales están relacionados con la pigmentación del maíz (Bressani *et al.* 1990).

Los hidratos de carbono complejos o fibra dietética del grano de maíz se encuentran en el pericarpio y en la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y, en menor medida, en las del germen. El salvado de maíz está formado por un 75% de hemicelulosa, un 25% de celulosa y 0.1% de lignina, en peso en seco. El contenido de fibra dietética de los granos descascarados es menor que el de los granos enteros (Bressani *et al.* 1989).

La concentración de minerales es aproximadamente del 1.3%. El germen es la estructura del grano donde se encuentran la mayor cantidad de minerales, con un valor

medio del 11%; el mineral más abundante en el grano es el fósforo (300 mg/100g), en forma de fitato, en contraparte tiene un bajo contenido de calcio (22-55 mg/100g) y de otros elementos (Bressani *et al.* 1990).

También se encuentran vitaminas en el grano, tanto liposolubles como las vitaminas A y la E, como hidrosolubles como la tiamina y la riboflavina.

3.2. USOS DEL MAÍZ Y PRODUCCIÓN DE TORTILLAS

El maíz que se produce en México se industrializa y consume principalmente como tortillas (63.4%), del que un 66% se procesa por medio de la nixtamalización y el 34% en forma de harina instantánea. Del total de maíz consumido, el 20.6% se destina para consumo animal; el 3.7% se industrializa para producir jarabes, almidones y cereales para desayuno; el 1.5% se utiliza como semilla para siembra, y el 10.3% representa el volumen de pérdidas. Por otro lado, la producción industrial anual de tortillas es de aproximadamente 14 millones de toneladas, lo que representa ventas anuales de alrededor de 14,000 millones de dólares (INEGI 1992, Gordillo, 1990).

3.3. IMPORTANCIA DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN

La tortilla elaborada por el proceso de nixtamalización ha sido consumida desde épocas remotas en México, siendo parte de la cultura de muchos de los pueblos originarios de Mesoamérica (Mckenzie 2002) y trascendiendo su consumo en muchos casos a la actualidad. Este producto forma parte de la dieta de todos los estratos sociales en México, con un consumo *per cápita* de 325 g/día. En zonas rurales las tortillas proveen alrededor del 70% del total de las calorías y 50% de las proteínas ingeridas diariamente (Khan *et al.* 1980).

La nixtamalización se basa en el cocimiento del maíz (1 parte) en agua (2-3 partes) y cal (1-3% p/p de $\text{Ca}[\text{OH}]_2$) por 30-45 min, con posterior reposo de 16 a 24 h a temperatura ambiente. Ocurre en seguida un lavado del maíz para eliminar el exceso de cal y fragmentos de pericarpio desprendidos. Luego, los granos son molidos para obtener la masa, de la cual se obtienen las tortillas. La nixtamalización mejora el valor nutricional del maíz y destruye las aflatoxinas provenientes de hongos (Anguiano-Ruvalcaba *et al.* 2005). En general, las tortillas proveen aproximadamente 38.8% de las proteínas, 45.2% de las calorías y 49.1% del calcio de los requerimientos diarios de la dieta del mexicano (Acero-Godinez 2000).

3.4. CAMBIOS QUÍMICOS Y FÍSICOS DEL MAÍZ DURANTE LA NIXTAMALIZACIÓN

Durante el cocimiento alcalino del maíz ocurren una variedad de cambios en los componentes del grano de maíz que contribuyen a darle las características propias a la masa y tortilla. Dichas características son resultado de una serie de reacciones bioquímicas, entrecruzamientos e interacciones moleculares que modifican las características fisicoquímicas, estructurales y reológicas de los componentes de la masa, así como de las propiedades estructurales y de textura de la tortilla producida (Rodríguez *et al.* 1995). Un elevado porcentaje de estos cambios se debe a modificaciones en la estructura del almidón (Bressani *et al.* 1990).

La cal actúa sobre los componentes de la pared celular del grano de maíz y convierte la hemicelulosa en gomas solubles. De esta forma, el tratamiento térmico-alcalino gelatiniza el almidón y la mayor gelatinización se debe a la fricción durante la molienda, durante la cual también se dispersan parcialmente los gránulos hinchados dentro de la matriz, los que actúan como un pegamento que mantiene unidas las partículas de masa (Rooney y Suhendro 1999).

Las proteínas del maíz son de bajo valor nutricional, debido a que la mayor parte de ellas se componen de zeína, proteína deficiente en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano (Maner 1990), mejorando su calidad después de haber sido sujetas a la nixtamalización. Esto se atribuye a una disminución en la solubilidad de la zeína (Guerra 1978), mientras que la glutelina, de mayor valor nutricional, incrementa su solubilidad y disponibilidad de los aminoácidos esenciales (Paredes-López y Saharópulos 1983). La nixtamalización también hace disponible a la niacina, que previene la pelagra, enfermedad caracterizada por causar demencia y dermatitis (Trejo-González *et al.* 1982). Las tortillas suministran calcio, previniendo la osteoporosis, que se manifiesta como fragilidad de los huesos por pérdida de masa ósea (Vargas 1992, Niewoehner, 1988). Adicionalmente, debido al pH del medio, las cadenas de glucosa de la amilosa y la amilopectina se cargan, lo cual ayuda a disminuir la retrogradación. De cualquier manera, para unir todos estos eventos y producir una masa de alta calidad, tanto la nixtamalización como la molienda del nixtamal deben ser óptimos (Rooney y Suhendro 1999).

3.5. LIMITANTES DEL PROCESO TRADICIONAL DE NIXTAMALIZACIÓN

A pesar de todos los beneficios de calidad mencionados, el proceso de nixtamalización presenta limitantes tecnológicas y ecológicas. Un problema que le representa a la industria para preparar harinas instantáneas y masa de nixtamal es el gran volumen de nejayote (palabra de origen náhuatl que significa caldo de cal) o agua de desecho generada, el cual es muy contaminante y con alto contenido de sólidos solubles y cal. Como resultado de este proceso ocurren pérdidas importantes de tiamina, niacina, riboflavina, grasa, pericarpio (fibra) y almidón presentes en el nejayote (Martínez Flores y col, 2002a).

En la modernización de la transformación de maíz a tortilla se debe considerar: *a). La eliminación del nejayote*, el cual tiene un elevado pH alcalino que provoca incrustaciones a las tuberías del drenaje y contiene gran cantidad de sólidos solubles (5-14%), que favorecen el desarrollo de microorganismos; *b). Mejoría en el valor nutritivo de la tortilla*. Durante la etapa del cocimiento alcalino del grano de maíz se pierden nutrientes, al desprenderse el pericarpio y solubilizarse compuestos nitrogenados, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, los cuales se eliminan durante la etapa de lavado; *c. Ahorro de agua*. El proceso tradicional desperdicia el agua usada en las etapas de cocimiento y lavado del nixtamal, que no es recuperada. Para el ahorro de agua, es importante un proceso en el que el agua adicionada solamente sea la necesaria para la obtención de tortillas y, *d). Ahorro de energía*. Durante el calentamiento del agua usada para el cocimiento del maíz, se requiere que el calor generado de la combustión del gas se absorba y difunda hasta el agua, que es un material con bajo coeficiente de difusividad térmica, y luego, que el calor se introduzca al interior del grano de maíz, procedimientos que hacen que el sistema de cocimiento sea energéticamente ineficiente. Por lo anterior, se requiere que las nuevas tecnologías propuestas para la elaboración de tortillas de maíz presenten la mayor cantidad de ventajas posibles respecto al método tradicional.

3.6. IMPORTANCIA DEL CALCIO EN LA DIETA

El componente esencial de la nixtamalización es la cocción del maíz en hidróxido de calcio (cal). La cocción en cal tiene varias ventajas: facilita la remoción del pericarpio, controla la actividad microbiana y, mejora la absorción de agua y el valor nutricional. El remojo en agua de cal distribuye la humedad y la cal a todo el grano, y le proporciona el sabor característico

a las tortillas (Martínez Flores *et al.* 2002b). A continuación se describen algunas generalidades y se destaca la importancia del calcio en el organismo humano.

El calcio es el catión más abundante del organismo humano; generalmente, el 99% del calcio corporal total se encuentra en el esqueleto formando cristales de hidroxiapatita y el 1% restante en la sangre. En la sangre se encuentra en un 50% como calcio iónico libre, en un 10% ligado a iones (citrato y bicarbonato) y en un 40% ligado a proteínas (básicamente albúmina). La concentración del calcio intracelular es del orden de 10^{-6} M frente a 10^{-3} M en el líquido extracelular (Manolagas y Olefski 1988).

El calcio es considerado necesario para el normal crecimiento y desarrollo del esqueleto, así como también en los procesos de dentición, nervios, músculos y de las funciones enzimáticas (Gerstner 2002). Particularmente, el calcio ha sido motivo de interés debido a su conocido papel biológico en el metabolismo óseo. Los principales estudios realizados hasta el momento centran su atención en el impacto de este nutriente sobre la salud ósea durante el crecimiento, la edad postmenopáusica y en adultos mayores; observándose un incremento de la densidad mineral ósea o una reducción en la pérdida de la misma al aumentar la ingesta del mineral. En general, la recomendación de consumo para adultos mayores de 25 años es de 800 mg diarios y para adolescentes, adultos jóvenes y para mujeres embarazadas y lactando es de 1200 mg (Méndez y Wyatt 2000).

En el metabolismo del calcio intervienen principalmente tres hormonas, la parathormona, la calcitonina y la vitamina D y tres órganos o tejidos, el hueso, el riñón y el intestino delgado. Para mantener un equilibrio correcto en la homeostasis del calcio, la cantidad de calcio expulsada por los riñones debe ser igual a la absorción intestinal real. En estas condiciones, tiene lugar un intercambio con balance cero entre el calcio extracelular y el calcio óseo (Ramasamy 2006).

3.7. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO

La absorción del calcio ocurre principalmente en el intestino delgado a nivel del duodeno, llevándose a cabo principalmente por dos mecanismos: difusión pasiva y transporte activo. En la difusión pasiva el calcio cruza la mucosa intestinal por difusión dependiendo de los gradientes de concentración del catión y es un proceso no saturable. El transporte activo es un proceso saturable que requiere la presencia de vitamina D y energía (Cámara y Amaro

2002). Sin embargo, la retención de calcio en el organismo puede estar condicionada por otros factores; estos son factores individuales y psicológicos o extrínsecos y factores dietarios (Barberá y Farré 1992). Entre los factores dietarios que influyen en la absorción intestinal del calcio, se pueden citar el efecto que el fósforo pudiera tener sobre la absorción de calcio; se recomienda que la ingestión de fósforo no exceda el consumo de calcio, manteniéndose en una relación 1:1 (Ca:P); cuando la ingestión de fósforo es mayor a la de calcio, la absorción de este último se ve desfavorecida (Basabe *et al.* 2004). En el caso de los fitatos presentes en algunos alimentos de origen vegetal se considera la posibilidad de que pudieran actuar favoreciendo la formación de complejos insolubles con calcio, limitando con esto su absorción (Méndez y Wyatt 2000). Otro componente dietario que se reporta como inhibidor de la absorción intestinal de calcio es la fibra, debido a la capacidad de ésta para el intercambio catiónico, que reduce la biodisponibilidad de determinados minerales por su adsorción y eliminación por heces (López *et al.* 1997).

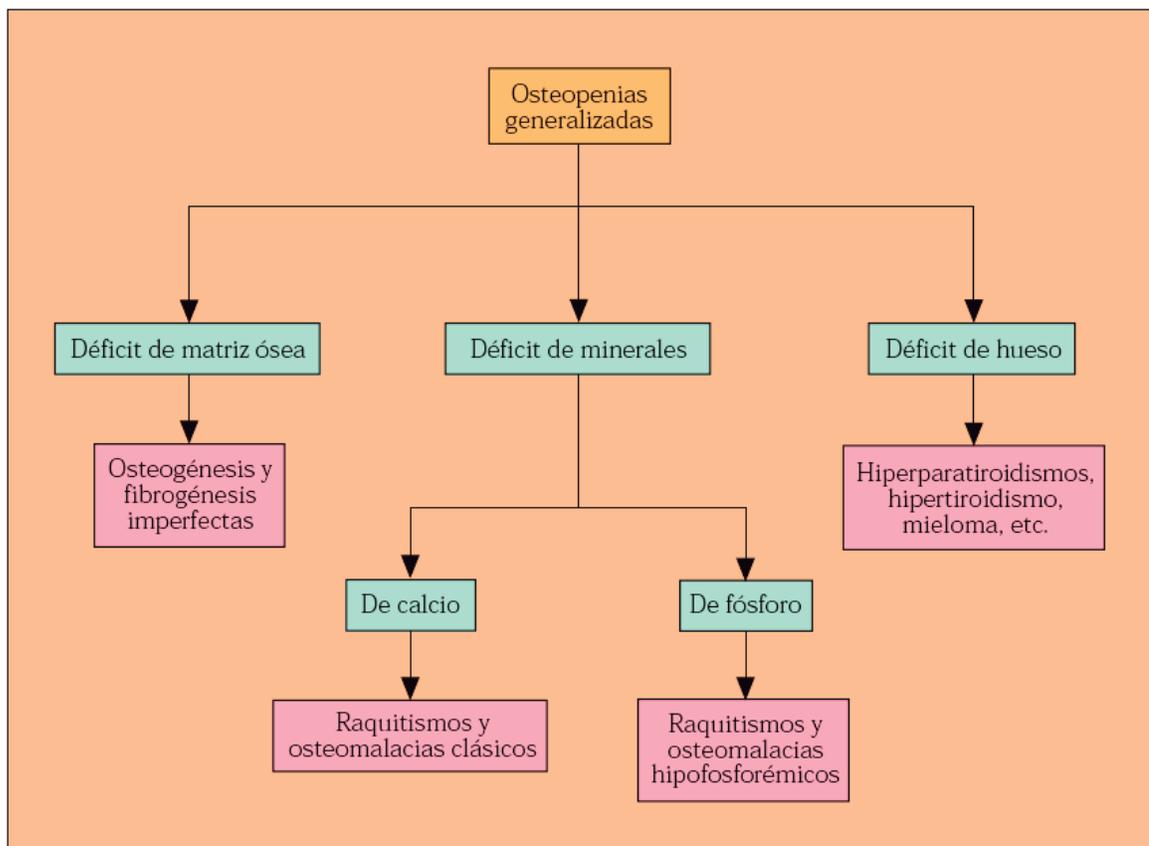
Por otra parte, además de conocer la composición química de las dietas, se recomienda evaluar la biodisponibilidad del calcio; para ello deben tomarse en cuenta todos los componentes dietarios tales como el calcio total, fósforo, proteína, magnesio, fibra, fitatos, ácidos grasos, vitamina D, lactosa y otros carbohidratos, ya que la influencia de todos ellos en conjunto determinará la biodisponibilidad del calcio (Greger 1988). La efectividad de cualquier nutriente depende de su biodisponibilidad, esto es cuanto se absorbe y cuanto realmente se utiliza. En general, sólo un 10 a 30% del calcio se absorbe de una dieta variada en un adulto sano (Gerstner 2002).

3.8. RELACIÓN CALCIO-HUESO

El hueso es un tejido conectivo que consiste esencialmente de una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la osteocalcina, la osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un

material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia (Ehrlich y Lanyon 2002). El desarrollo y homeostasis del hueso es un complejo proceso en el cual debe existir un balance entre la formación de hueso y su resorción. Las células encargadas de la formación y resorción del hueso son los osteoblastos y osteoclastos, respectivamente. Estas células y sus precursores están reguladas por factores autocrinos y paracrinos (Lazner *et al.* 1999). La perturbación del balance entre la formación y resorción del hueso así como dietas con carencia de este mineral, hacen que este se movilice desde el hueso para poder suplir los requerimientos necesarios del organismo; dando lugar a la osteopenia caracterizada principalmente por una disminución de la masa ósea (Figura 1), y consecuentemente la osteoporosis como manifestación más severa de la primera, en la cual ya se observa una fragilidad de los huesos, siendo estos más propensos a una fractura; la osteoporosis puede generarse por dos causas principales: i) por no haberse adquirido un adecuado pico de masa ósea en la adolescencia o ii) por perderse dicho pico de masa ósea (Zanchetta y Talbot 2001).

Se define la masa ósea como la cantidad de hueso que posee una persona determinada en un momento específico de su vida, y pico de masa ósea la cantidad máxima de masa ósea que adquiere un individuo en su vida. Para llegar a este pico o capital óseo, cada individuo está sometido a una serie de factores que pueden actuar de una forma negativa, minimizando la masa ósea, como de una positiva, aumentando la misma. Los factores que influyen sobre la adquisición del pico de masa ósea son los inherentes al propio individuo como lo es su peso, masa grasa y muscular, entre otros. En relación con la pérdida de masa ósea están todos los factores endógenos relacionados con la edad, entre los que se hallan la disminución de la función osteoblástica, la reducción paulatina de la absorción intestinal de calcio y otra serie de anomalías, todas las cuales producirán una pérdida ósea lenta que ocurre a partir de la edad adulta y persistirá a lo largo de la vida; también las pérdidas óseas motivadas por cambios fisiológicos, alcanzando su punto álgido con ocasión de la aparición de la menopausia en la mujer, teniendo también intervención en el hombre en las situaciones de hipogonadismo; y finalmente una serie de factores que de forma esporádica o continua inciden en la población (Lenza 1998).



Fuente: Lenza (1998).

Figura 1. Principales causas de osteopenias generalizadas.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

IV. HIPOTESIS

Las tortillas elaboradas con el método ecológico de nixtamalización, en el cual se sustituye el hidróxido de calcio por el sulfato de calcio, presentarán mayor contenido de nutrientes en comparación con el proceso tradicional de nixtamalización. Asimismo, el calcio contenido en la tortilla proveniente del método ecológico de nixtamalización presentará un porcentaje de biodisponibilidad de calcio similar o mayor comparado con las tortillas elaboradas por el método tradicional.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

V. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Evaluar la composición nutricional de tortillas integrales de maíz elaboradas por un proceso ecológico de nixtamalización, así como determinar su eficiencia proteica y el efecto sobre la absorción de calcio en hueso.

5.2. PARTICULARES

1. Elaborar las tortillas integrales por los procesos, ecológico de nixtamalización y, por el método tradicional.
2. Realizar el análisis químico proximal de las tortillas (humedad, cenizas, proteína, lípidos, y fibra dietética).
3. Realizar ensayos biológicos para evaluar la Relación de Eficiencia Proteica (ganancia en peso en función de la calidad de la proteína consumida en la dieta), y la absorción de calcio, fósforo y magnesio en hueso, así como la determinación de la cristalinidad y resistencia a la fractura de los huesos.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. PREPARACIÓN DE HARINAS Y TORTILLAS

El método ecológico de nixtamalización (Patente Mex PA/a/2005/011797) empleado para este trabajo se muestra en la Figura 2 y el del proceso tradicional se observa en la Figura 3.

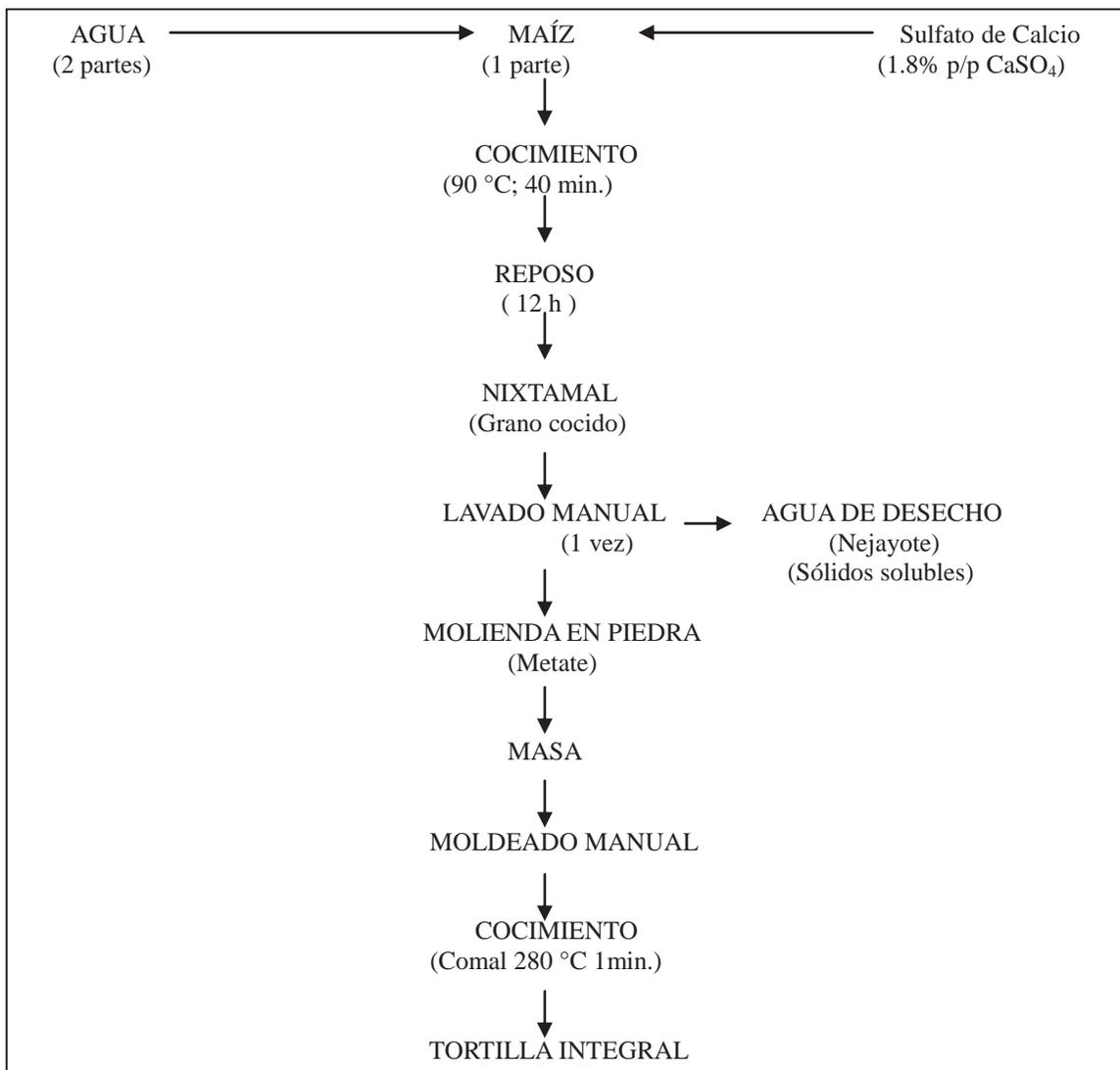


Figura 2. Proceso ecológico de nixtamalización (Patente Mex PA/a/2005/011797).

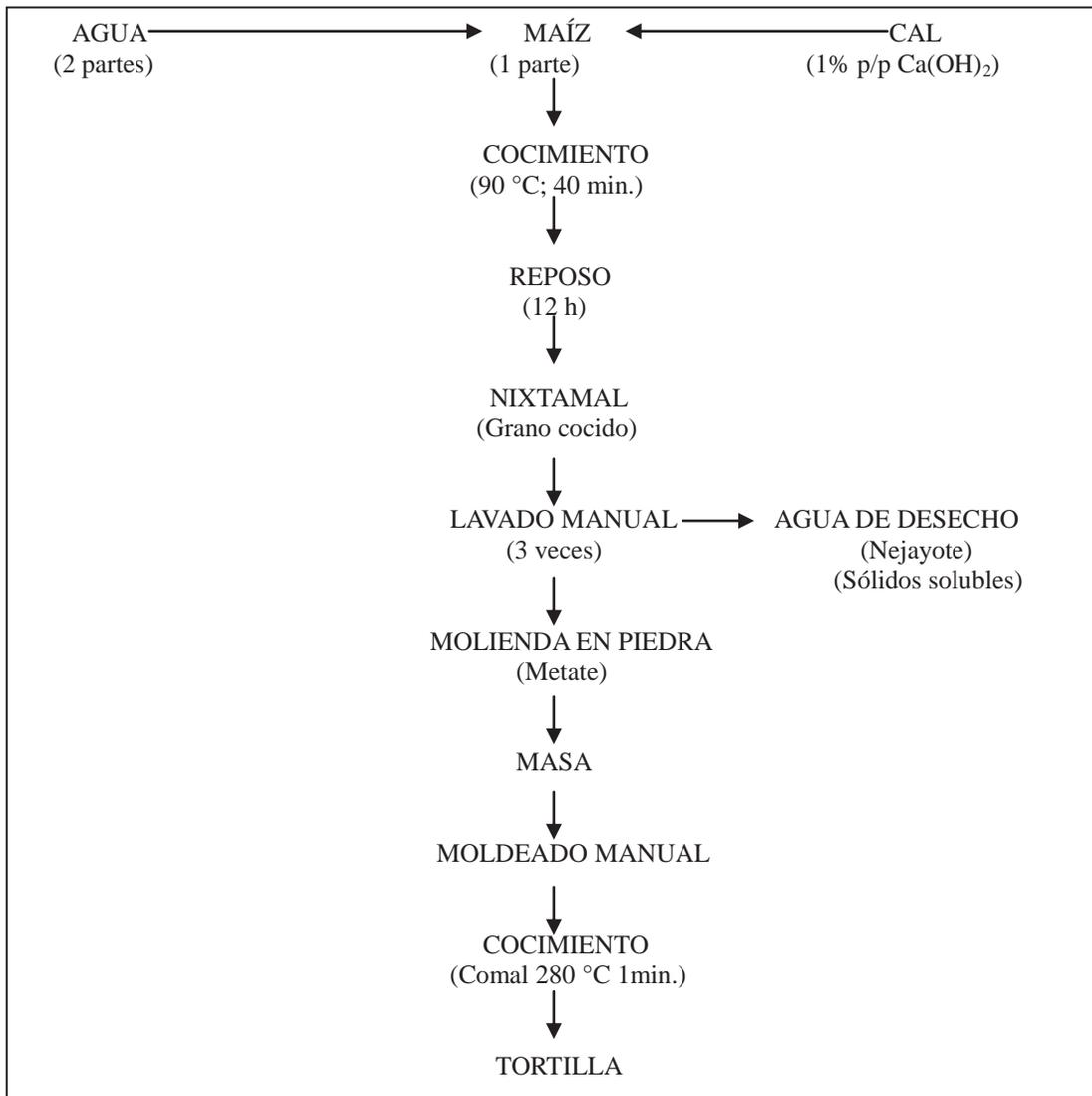


Figura 3. Proceso tradicional de nixtamalización.

6.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MAÍZ BLANCO Y TORTILLAS

Al maíz sin procesar y a las tortillas obtenidas por el proceso ecológico de nixtamalización, el método tradicional de nixtamalización y la harina instantánea Maseca® se les realizaron los siguientes análisis: humedad, proteínas, cenizas y lípidos usando los Métodos 934.01, 32.1.22, 942.05, 30.10 respectivamente de la AACC (2000). La fibra dietética se determinó usando el método de Prosky *et al.* (1988).

6.3. ENSAYO BIOLÓGICO

6.3.1. Elaboración de dietas

Con base a la composición química del maíz y de las tortillas se formularon las dietas experimentales en concordancia a la Dieta AIN-93G que esta establecida para ratas en crecimiento (Reeves 1997); su formulación general se observa en los Cuadros I, II, y III, obteniéndose las siguientes cinco dietas: i) Dieta de maíz sin procesar (DB); ii) Dieta de tortillas de maíz elaboradas con el método ecológico de nixtamalización (DE); iii) Dieta de tortillas de maíz preparadas con el método tradicional de nixtamalización (DT); iv) Dieta de tortilla elaboradas con la harina instantánea Maseca® (DM); v) Dieta control de caseína (DC). Las dietas fueron lo más isocalóricas e isoproteicas posibles, y variaron en su contenido de calcio, el cual fue proporcionado por cada una de las fuentes usadas como materia prima.

Cuadro I. Formulación general de la Dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia.

Ingredientes	g/Kg de dieta
Caseína (>85% de Nitrógeno)	200
Almidón	397.48
Almidón dextrinizado	132
Sacarosa	100
Celulosa	50
Aceite de frijol de soya	70
Mezcla de minerales AIN-93G (libre de Calcio)	35
Mezcla de vitaminas AIN-93G	10
L-Cistina	3
Bitartrato de Colina	2.5
Ter-butilhidroquinona (TBHQ) mg	14

Fuente: Reeves (1997).

Cuadro II. Mezcla de minerales AIN-93G.

Ingredientes	g/kg de mezcla
Carbonato de calcio	357.00
Fosfato de potasio (monobásico)	196.00
Citrato de potasio H ₂ O	70.78
Cloruro de sodio	74.00
Sulfato de potasio	46.60
Oxido de magnesio	24.00
Citrato férrico, U.S.P.	6.06
Carbonato de zinc	1.65
Carbonato de manganeso	0.63
Carbonato de cobre	0.30
Yodato de potasio	0.01
Selenato de sodio	0.01025
Paramolibdato de amonio 4H ₂ O	0.00795
Metasilicato de sodio 9H ₂ O	1.45
Cloruro de litio	0.0174
Acido bórico	0.0815
Fluoruro de sodio	0.0635
Carbonato de níquel	0.0318
Sacarosa (polvo fino)	221.026

Fuente: Reeves, (1997).

Cuadro III. Mezcla de vitaminas AIN-93G.

Ingredientes	g/kg de mezcla
Niacina	3.00
Pantotenato de calcio	1.60
Piridoxina HCl	0.70
Tiamina HCl	0.60
Riboflavina	0.60
Acido fólico	0.20
Biotina	0.02
Vitamina E acetato (500 IU/g)	15.00
Vitamina B12 (0.1%)	2.50
Vitamina A palmitato (500,000 IU/g)	0.80
Vitamina D3 (400,000 IU/g)	0.25
Vitamina K1/dextrosa mezcla (10 mg/g)	7.50
Sacarosa	967.23

Fuente: Reeves, (1997).

6.3.2. Caracterización de las dietas

A las cinco dietas elaboradas para el ensayo biológico se les realizaron los análisis de su composición química para verificar que todas tuvieran el mismo contenido de nutrientes; dichos análisis fueron: humedad, proteínas, cenizas, lípidos y fibra dietética, de acuerdo a los métodos anteriormente mencionados.

6.3.3. Distribución y manejo de los animales de experimentación

Para el experimento, se utilizaron ratas macho Wistar, de 22 días de nacidas, y un peso comprendido entre 47 y 63 g; éstas se mantuvieron en adaptación durante dos días con alimento comercial y agua *ad libitum*. Al tercer día, grupos de seis ratas fueron asignadas al azar para cada una de las cinco dietas experimentales. Las ratas se instalaron en jaulas individuales. Las condiciones ambientales que se mantuvieron fueron: temperatura de 22 °C y 12 h de luz artificial por 12 h de oscuridad en ambiente aislado de ruidos. Las dietas

experimentales y el agua fueron suministrados *ad libitum* a los animales por 28 días. Se llevó un registro del peso corporal desde el inicio del experimento hasta su etapa final, a intervalos de 7 días. El consumo de alimento se determinó pesando la dieta consumida, la dieta sobrante y la dieta tirada durante todo el ensayo. Se calculó el peso ganado y la proteína consumida a los 28 días por rata de cada grupo. El PER se calculó dividiendo el aumento de peso de la rata entre el peso de la proteína consumida. Se promedió el PER de cada grupo. Se reporta la calidad de la proteína de prueba como la relación porcentual del PER de la muestra respecto al PER de la caseína de referencia. Se corrigió el valor del PER del alimento de prueba asumiendo que el PER de la caseína permanece constante en un valor de 2.5, para lo cual se realizó el siguiente cálculo:

$$F = \frac{2.5}{\text{PER experiment al del grupo de caseína}}$$

$$\text{PER corregido} = \text{Per experimental} \times F$$

6.3.4. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas

Al término de los 28 días de experimento se sacrificaron los animales mediante una dislocación cervical, el cual es un método de sacrificio humanitario y usado habitualmente para la mayoría de los roedores pequeños que estén por debajo de 150 g (Marshall *et al.* 1994) ya que causa grandes lesiones al tronco encefálico produciendo inconsciencia inmediata y muerte. En ratones y ratas se sitúan el pulgar y el índice a cada lado del cuello junto a la base del cráneo o, de modo alternativo, se presiona una varilla junto a la base del cráneo y en ese momento con la otra mano, se tira rápidamente de la base de la cola o de los miembros posteriores, produciendo la separación entre las vértebras cervicales y el cráneo.

Posteriormente, a cada animal se le extrajo muestra de sangre por punción cardiaca y ambos fémures de cada ejemplar por cada grupo. La sangre se separó mediante centrifugación a 3500 rpm separando el suero y reservándolo para su posterior análisis. Los fémures se limpiaron con ayuda de un bisturí y un paño impregnado de alcohol, para dejarlo limpio de tejido muscular.

6.3.5. Características físicas y químicas de los huesos de ratas

6.3.5.1 Dimensiones físicas de los huesos

Las mediciones de los huesos (longitud, espesor y diámetro medio) fueron realizadas con un Vernier. El peso del fémur se cuantifico en base seca.

6.3.5.2 Fuerza al corte de los huesos de ratas

La resistencia del hueso a la fractura se relaciona con la cantidad de calcio retenido en el tejido óseo de las ratas. Para la medición se usó el Texturómetro TA-XT2 (Texture Technologies Corporation, Stable Micro Systems. Surrey, Inglaterra). En esta prueba se utilizo una cuchilla plana de 5 mm de espesor que se conecto al brazo sensor del equipo. Para ocasionar la fractura del hueso, la cuchilla se desplazo a una velocidad de 2 mm/s con una fuerza de 0.100 kg y una profundidad de 10 mm. Se reportó la cantidad de fuerza requerida para fracturar el hueso en g/mm. Para medir la fuerza de compresión sobre el fémur también se uso el mismo equipo Texturómetro TA-XT2 (Figura 4), en el cual se determino la fuerza máxima necesaria para la penetración (2 mm) sobre el material, la sonda fue una punta (90°), la cual se desplazo a una velocidad de 1 mm/s sobre el fémur de los animales sin necesidad de fracturarlo. El comportamiento viscoelástico de los fémures fue calculado usando experimentos de compresión, siguiendo el método reportado por Ponce-García *et al.* (2008), con estos datos se obtuvo el Modulo de Young o Modulo de Elasticidad (E) el cual fue determinado de la curva de carga-descarga en una deformación relativamente baja (Figura 5), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = \sigma/\epsilon$$

Donde σ (la fuerza/área) es la tensión normal y ϵ es la tensión. Y la tensión esta definida como:

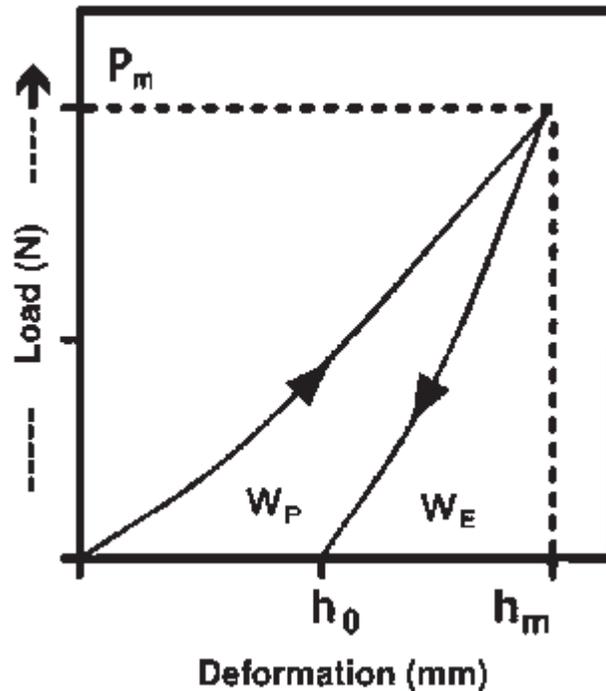
$$\epsilon = [(L_o - L_f)/L_o] \times 100$$

Donde L_o y L_f son el grosor inicial del fémur y la deformación final de este, después de la compresión, respectivamente. El área bajo la curva de carga proporciona el trabajo total

realizado (W_T) por el dispositivo. La contribución reversible elástica del trabajo total fue deducido del área bajo la curva de descarga, y la energía absorbida por la deformación plástica solo es la diferencia entre los dos ($W_P = W_T - W_E$).



Figura 4. Medición de compresión con el Texturómetro TA-XT2 en los fémures de los animales alimentados con las dietas experimentales.



Fuente: Ponce-García *et al.* 2008

Figura 5. Ciclo de compresión; carga (P); carga máxima (P_m); W_P , trabajo plástico ($W_T = W_E + W_P$); W_E es el trabajo realizado durante la descarga; y la deformación (h).

6.3.5.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de los huesos

Se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido ambiental con microsonda de análisis elemental ESEM XL30 PHILIPS, con un haz de electrones ajustado a 20Kv y aproximadamente 50 μ A de corriente. Dos fémures de cada grupo de dieta fueron cortados transversalmente y sujetos dentro de una pastilla de acrílico para lo cual se empleó un Kit AcryFix, los huesos fueron sujetos con cintillas de acrílico al momento de la elaboración de las pastillas (Figura 6). Estas fueron pulidas con una lija de agua para dejar expuesta el corte transversal del fémur y se les asignó una letra (A y B) para los fémures de la dieta de maíz blanco sin procesar, (C y D) dieta de tortilla Maseca®, (E y F) dieta de tortilla tradicional, (G y H) dieta de tortilla ecológica y (I y J) dieta control de caseína, una vez identificadas las pastillas se montaron en una placa de observación y se escaneo con el microscopio electrónico, las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el software para análisis de imágenes (IMAGE J). También se obtuvo una composición química elemental de la superficie del material con este mismo equipo.

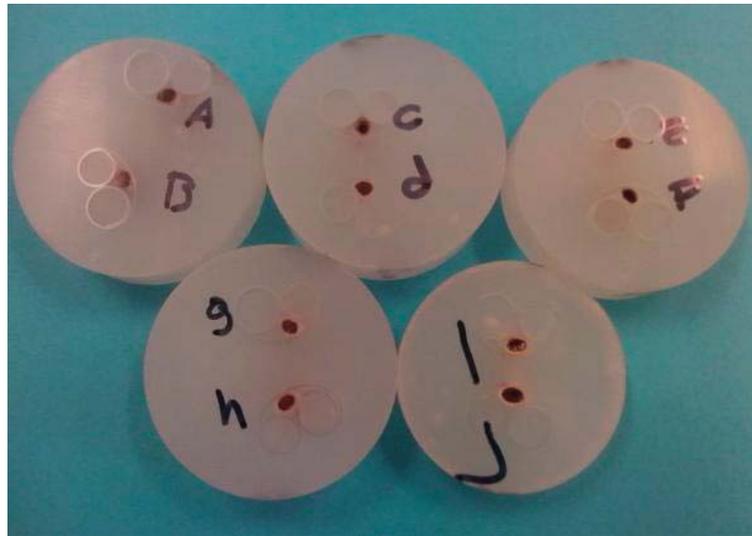


Figura 6. Fijación de los fémures en pastillas de acrílico para Microscopia Electrónica de Barrido.

6.3.5.4 Medición de calcio y magnesio en huesos por espectroscopia de absorción atómica

Digestión de la muestra

Se pesó 1 g de muestra seca y se transfirió a un vaso de precipitados de 150 ml y se le agregaron 10 mL de ácido nítrico concentrado. Se dejó reposar toda la noche. Enseguida se calentó cuidadosamente en un plato caliente hasta la desaparición de humos rojos (NO_2). Se enfrió el matraz y se le colocó una pequeña cantidad (2-4 mL) de HClO_4 al 70%. Se calentó hasta evaporarse a un volumen pequeño. Se transfirió la muestra a un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó con agua desionizada. En seguida se realizó la lectura en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (AA) PerkinElmer Modelo: AAnalyst 200. Condiciones de operación: -Longitud de onda: 422.7 nm (Ca) y 285.2 nm Mg; - Llama: aire (50) y acetileno (40) (oxidante); - Rango lineal: hasta 5.0 mg/L (Ca) y 0.5 mg/L (Mg); - Chequeo: 4.0 mg/L (Ca) y 0.3 mg/L (Mg)

Procedimiento para Ca

Se preparó por dilución de la solución patrón de calcio, una disolución de 50 mg/L. De ahí se prepararon matraces de 50 mL de soluciones patrón de Ca de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L mediante

las diluciones adecuadas de la solución de 50 mg/L. Se ajustó el cero de absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica ya preparado con agua destilada y se comprobó la sensibilidad de chequeo (4 mg/L Ca, A = 0.200). Se midió la absorbancia de todas las disoluciones patrones de menos a más concentradas para construir la curva de calibración. Se midió la absorbancia del calcio de la muestra problema en las condiciones mencionadas, tras diluir convenientemente la muestra original.

Procedimiento para Mg

Se preparó por dilución de la solución patrón de magnesio, una disolución de 10 mg/L. De ahí se prepararon en matraces de 50 mL soluciones patrón de Mg de 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 y 0.5 mg/L mediante las diluciones adecuadas de la solución de 10 mg/L. Se ajustó a cero de absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica ya preparado con agua destilada y se comprobó la sensibilidad de chequeo (0.3 mg/L Mg, A = 0.200). Se midió la absorbancia de todas las disoluciones patrones de menos a más concentradas para construir la curva de calibración. Se midieron en las condiciones mencionadas el contenido de magnesio en la muestra problema tras diluir convenientemente la muestra.

Cálculos y expresión de los resultados

Se interpolaron los resultados de las medidas de absorbancia de las muestras problemas diluidas en la curva de calibración de cada elemento y se calcularon las concentraciones en mg/L de Ca y Mg teniendo en cuenta las diluciones efectuadas. El resultado se expresó en mg/L de Ca y mg/L de Mg.

6.3.5.5 Fósforo total en hueso de acuerdo a la NMX-AA-029-SCFI-2001

Método de cloruro estano

Este método se basó en la reacción del fósforo contenido en la muestra como ortofosfato con el ácido molibdico para formar el ácido 12-molibdofosfórico según la reacción:



El ácido 12-molibdofosfórico fue reducido por el cloruro de estaño a azul de molibdeno, compuesto de composición desconocida que contiene una mezcla de Mo (VI) y Mo (V), que absorbe a 690 nm. La intensidad del color azul formado depende de la concentración de fosfatos adicionados al heteropoliácido. El método es aplicable cuando el contenido de fósforo en las muestras se encuentra entre las concentraciones de 0.01 mg P/L a 6.0 mg P/L. Todo el fósforo contenido en la muestra debe estar como ión ortofosfato (PO₄)⁻³, ya que el método espectrofotométrico es esencialmente específico para este ión ortofosfato (PO₄)⁻³. La materia orgánica de la muestra fue destruida por medio de una digestión con persulfato de amonio y ácido sulfúrico, rompiendo las ligaduras orgánicas del fósforo (C-P y/o C-O-P), e hidrolizando los polifosfatos a ortofosfatos.

6.3.6. Determinación cuantitativa de albúmina sérica

La determinación se realizó empleando un kit para Albúmina Verde de Bromocresol. Marca Spinreact Ref. 1001020. El principio del método es la combinación de la albúmina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra ensayada. Las condiciones del ensayo fueron: longitud de onda 630 nm; cubeta de 1 cm paso de luz y la temperatura de 37 °C.

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos tanto de la composición nutricional de las tortillas y maíz, así como los del ensayo biológico con las diferentes dietas experimentales fueron analizados mediante un análisis de varianza de medias (ANOVA de una vía), y para su comparación por pares se utilizó la Prueba de Tukey (P<0.05) para determinar las diferencias estadísticas significativas entre cada grupo de dieta, para observar la influencia de las dietas sobre la absorción de calcio en hueso. El análisis estadístico fue realizado empleando el software JMP (The Statistical Discovery Software) versión 6.0; previo al análisis estadístico de los datos obtenidos en la prueba de Difracción de rayos X en hueso se empleó el Software GraphPad Prism versión 5.01 para poder depurar el difractograma de las señales de ruido del espectro y graficar una señal más lisa.

ESTUDIOS NUTRICIONALES Y DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS INTEGRALES DE MAÍZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tortilla es considerada un alimento básico en la dieta de nuestro país y su producción ha aumentado en los últimos años al haber un incremento poblacional. Por tal motivo, se han buscado alternativas para optimizar el proceso tradicional de nixtamalización, como es el minimizar el gasto de agua ocurridas en el proceso de nixtamalización, así como generar efluentes menos dañinos para el medio ambiente. Lo anterior procurando que el producto final tenga un valor nutricional idóneo y sin afectar sus características organolépticas.

En este trabajo se presenta una alternativa ecológica al proceso de nixtamalización para minimizar el gasto de agua en los lavados del nixtamal, así como generar efluentes menos alcalinos y menos contaminantes, así como una propuesta tecnológica en la cual se pueda reflejar una disminución de pérdidas de nutrientes durante el proceso de nixtamalización dando como resultado final una tortilla integral.

7.1. PREPARACIÓN DE HARINAS Y TORTILLAS

El cocimiento del nixtamal se realizó de acuerdo a la Patente Mex PA/a/2005/011797. Para ello, 12 kilos de maíz blanco entero, fueron cocidos con 2 partes de agua y 1.8% de sulfato de calcio, a temperatura de 90 °C durante 26 min; los granos cocidos entonces fueron reposados durante toda la noche para permitir la hidratación de los gránulos de almidón. El agua sin residuos de pericarpio fue retirada del grano al enjuagar una sola vez el nixtamal. El nixtamal fue molido en un molino de piedras hasta remoler perfectamente el pericarpio presente en el grano (Figuroa *et al.* 2006). A la par se cocieron 12 kilos de maíz blanco entero por el método tradicional de nixtamalización. El aspecto del maíz cocido con el método tradicional fue un grano reblandecido del pericarpio, como se muestra en las Figuras 7 y 8. Una vez obtenidas las masas se procedió a la elaboración de las tortillas (Figura 9).



Figura 7. Maíz cocido con método tradicional.



Figura 8. Maíz cocido con método ecológico.



Figura 9. A la izquierda se observa la tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización y a la derecha con el método ecológico.

De los nejayotes recuperados de ambos procesos de nixtamalización se tomó una alícuota y se colocó en una probeta de 1 L y se dejó reposar por 1 h. En el nejayote tradicional se observó un precipitado de sólidos de 500 mL, mientras que en el nejayote ecológico solo alcanzaron a precipitar 40 mL de sólidos en la probeta, como se observa en las Figuras 10, 11 y 12. A los nejayotes recién recolectados se les midió el pH con un Potenciómetro (Hanna Instruments, modelo H18519); la lectura para el nejayote tradicional fue de 11.99, mientras que para el nejayote ecológico fue de 5.17; esta modificación de pH es una ventaja en el sentido de desecho de efluentes, pues al no ser alcalinos pueden desecharse sin que vayan deteriorando las tuberías o drenajes y sin causar mayores daños al medio ambiente. Aunado a que al presentar menor contenido de materia orgánica, la demanda bioquímica de oxígeno será menor en el nejayote ecológico, y por lo tanto la proliferación microbiana será menor al descargarse al drenaje y en el caso de las empresas que realizan el tratamiento de sus efluentes, requerirán menor tiempo y menor cantidad de insumos para su tratamiento.

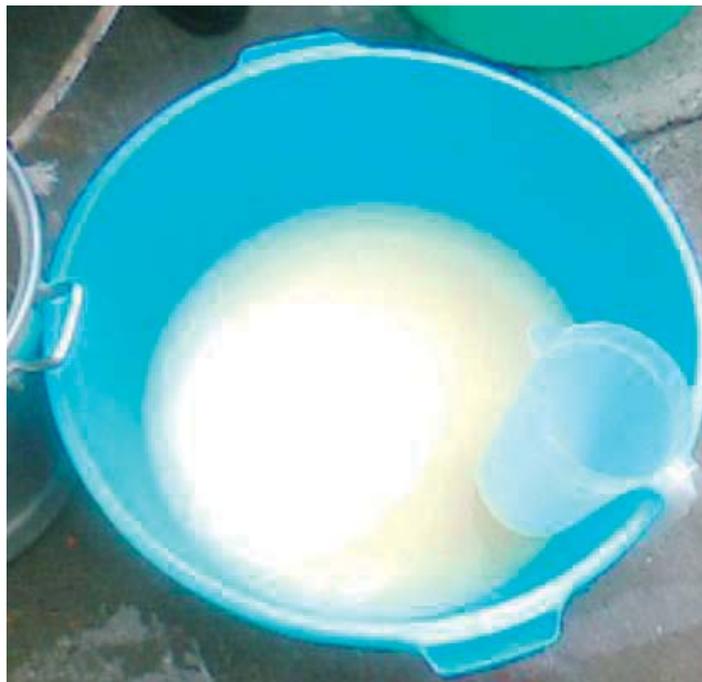


Figura 10. Apariencia del nejayote del método ecológico de nixtamalización.



Figura 11. Apariencia del nejayote del método tradicional de nixtamalización



Figura 12. A la izquierda se observan los sólidos sedimentables en el nejayote ecológico y a la derecha los del nejayote tradicional.

A los nejayotes obtenidos por el método ecológico de nixtamalización (NE) y por el método tradicional (NT), también le fueron realizados el análisis químico proximal (Cuadro IV).

Cuadro IV. Composición química de los nejayotes recuperados tanto por el método tradicional de nixtamalización (NT), como por el método ecológico de nixtamalización (NE).

Determinación	NT	NE
Sólidos totales (%)	3.91a	2.54b
Sólidos sedimentables	50ml/100ml	4ml/100ml
*Humedad (%)	19.4a	8.33b
*Cenizas (%)	17.86a	47.29b
*Extracto etéreo (%)	0.12a	0.10b
*Proteína (%)	4.52a	2.54b
*Fibra insoluble (%)	6.84a	0.55b
*Fibra soluble (%)	5.49a	0.0b
*Fibra total (FS + FI) (%)	12.34a	0.55b

* % reportados en base seca.

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n= 4)

A los datos obtenidos del análisis de los nejayotes y sus repeticiones se les realizó un ANOVA y la prueba de Tukey ($P < 0.05$), para hacer la comparación de medias; existiendo diferencia estadística significativa entre ambas muestras para todos las determinaciones, tal como se observa en el Cuadro IV. Para la determinación de sólidos sedimentables no se pudo realizar un análisis estadístico ya que solo se conto con una repetición.

6.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MAÍZ Y TORTILLAS

Para evaluar la calidad nutricional del maíz blanco sin procesar (MB) y de las tortillas elaboradas con el método ecológico de nixtamalización (TE), método tradicional (TT) y con

harina instantánea Maseca® (TM) se les realizó un análisis químico proximal, y los resultados se pueden observar en el Cuadro V. En este análisis se cuantificaron los componentes del maíz y de las tortillas; en lo que respecta a humedad, el MB, la TT, la TM y la TE, presentaron valores de 11.51%, 40.94%, 41.33% y 39.61%, respectivamente; los valores para MB y TT se asemejan a los reportados por Bressani *et al.* (1958). En la determinación de cenizas los valores oscilaron entre 1.07% y 1.39%, encontrándose que no hubo diferencia estadística significativa entre la TT y la TE, lo cual es importante resaltarlo ya que aun cambiando la fuente de calcio en el proceso de nixtamalización no interfirió en el contenido de minerales presentes en la tortilla; los valores son similares a los documentados por Bressani *et al.* (1990). En la mayoría de los estudios realizados sobre los cambios químicos que ocurren en el maíz durante el proceso de nixtamalización se ha reportado un aumento del contenido total de cenizas, debido a la cal que se utiliza en su cocción, y se incorpora a la tortilla. Según Pflugfelder *et al.* (1988), el contenido de calcio en la masa estará en función de la concentración inicial de cal, la temperatura de cocción, del tiempo de remojo y las características del maíz. Los cambios del contenido de otros minerales varían y dependen posiblemente de la pureza de la cal empleada y del tipo de aparato de molienda utilizado.

En valor más bajo del extracto etéreo lo tuvo la TM siendo de 2.57%, el cual no fue significativamente diferente con la TT, al presentar éste 2.63%; lo anterior debido a que se utilizaron condiciones similares en el proceso de nixtamalización empleado; la TE y la MB sí tuvieron una diferencia estadística significativa entre ambas y con respecto a las dos anteriores, siendo los valores de 3.06% y 4.66%, respectivamente. El valor encontrado para MB entra en el rango (4.2% - 5.2%) reportado por Bressani *et al.* (1990); en cuanto a los valores de extracto etéreo en tortilla todos están en el rango (0.8%-3.8%) reportado por Ranhotra (1985). En esta determinación se observó que hubo un incremento significativo de compuestos liposolubles en la TE en comparación con la TT y con la TM. Para proteína, el valor más alto lo tuvo MB el cual fue de 8.90%, muy parecido al rango reportado (9.1%-11.3%) por Bressani *et al.* (1990); y este valor fue el único que presentó diferencia estadística en relación de las demás.

En el contenido de fibra dietética de las muestras, el MB no tuvo diferencia estadística significativa con respecto a las medias de la TE; siendo el valor de 10.26% de

fibra insoluble y 1.83% de fibra soluble para el MB y de 9.78% de fibra insoluble con 1.79% de fibra soluble para la TE; esto a consecuencia del método ecológico de nixtamalización, en el cual el pericarpio del grano de maíz se conservó aun después de la cocción de éste, evitando pérdidas tanto de fibra insoluble como de soluble. En comparación la TT tuvo un 4.35% de fibra insoluble con 0.97% de fibra soluble y la TM un 3.90% de fibra insoluble con 0.86% de fibra soluble; las cuales mostraron diferencia estadística significativa con las dos muestras anteriores en cuanto a fibra insoluble, y solo la TM presentó diferencia estadística significativa en cuanto a fibra soluble con respecto a las demás; pudiendo observarse una pérdida considerable de fibra insoluble en aquellas tortillas que fueron elaboradas con el método tradicional de nixtamalización.

En cuanto al contenido de fibra total en las muestras, la cual es la suma de la fibra insoluble más la fibra soluble, el MB tuvo un valor de 12.09% y no fue estadísticamente diferente a la TE, la cual presentó un valor de 11.57%; pero si fueron estadísticamente diferentes de las medias obtenidas con la TT y con la TM, que fueron de 5.32% y 4.76%, respectivamente; éstas a su vez no presentaron diferencia estadística significativa. Todos estos valores fueron similares a los reportados por Bressani *et al.* (1990) y Ranhotra (1985).

También se les determinó calcio y magnesio mediante espectroscopia de absorción atómica y fósforo por un método colorimétrico; los resultados se observan en el Cuadro VI. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y se obtuvo el promedio y a las repeticiones se les realizó un análisis de ANOVA y una Prueba de Tukey con $\alpha=0.05$, para una comparación de medias.

Cuadro V. Composición química del maíz blanco sin procesar (MB), tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización (TE), tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización (TT) y tortilla elaborada con harina instantánea Maseca® (TM).

Determinación (%)	MB	TE	TT	TM
Humedad	11.51 ^a	39.61 ^b	40.94 ^c	41.33 ^d
Cenizas	1.07 ^b	1.14 ^{ab}	1.31 ^{ab}	1.39 ^a
Extracto etéreo	4.66 ^a	3.06 ^b	2.63 ^c	2.57 ^c
Proteína	8.90 ^a	7.96 ^b	7.48 ^b	7.37 ^b
Fibra insoluble	10.26 ^a	9.78 ^a	4.35 ^b	3.90 ^b
Fibra soluble	1.83 ^{ab}	1.79 ^{ab}	0.97 ^{bc}	0.86 ^c
Fibra total (FI + FS)	12.09 ^a	11.57 ^a	5.32 ^b	4.76 ^b
Extracto libre de nitrógeno	49.87	25.09	37.00	37.82

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P < 0.05). (n=4)
 Extracto libre de nitrógeno = 100 – (% proteína + % cenizas + % fibra dietética + % extracto etéreo).

Cuadro VI. Contenido de calcio y magnesio en maíz blanco sin procesar (MB), tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización (TE), tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización (TT) y tortilla elaborada con harina instantánea Maseca® (TM).

Determinación	MB (mg/100g)	TE (mg/100g)	TT (mg/100g)	TM (mg/100g)
Calcio*	7.12	105.42	162.98	86.95
Fósforo**	530.0	350.0	610.0	430.0
Magnesio*	122.06	121.39	145.39	219.06

* Espectroscopia de Absorción atómica. (n=2)

** NMX-AA-029-SCFI-2001 (n=2)

7.3. ENSAYO BIOLÓGICOS

7.3.1. Elaboración de las dietas

A partir del maíz y las tortillas elaboradas con los diferentes métodos de nixtamalización se elaboraron las dietas experimentales, tomando como referencia la formulación de la dieta AIN-93G para ratas en crecimiento (Reeves, 1997). Tratando de ser lo más isocalóricas e isoproteicas posible, variando solo en el contenido de calcio el cual se mantuvo constante de acuerdo a cada materia prima de la cual partió cada una. Para la preparación, inicialmente se homogenizaron todos los componentes sólidos y al final se agregó el aceite lentamente con movimientos constantes; enseguida se procedió a tamizar las dietas con una malla del #20 (840 μ) para terminar de homogenizarlas; las dietas permanecieron en refrigeración hasta su uso.

7.3.2. Caracterización de las dietas

Para cerciorarse de que todas las dietas experimentales tuvieran semejanza en su composición química, se les realizaron los análisis pertinentes (Cuadro VII); para la determinación de cenizas los valores obtenidos oscilaron entre 3.48-3.5%, no encontrándose diferencia estadística entre las dietas provenientes del maíz y de las tortillas; para la dieta control de caseína (DC) el valor fue de 4.16% y si fue diferente estadísticamente de las demás dietas, probablemente porque para la preparación de la dieta control se empleó una mezcla de minerales en la cual se incluía el calcio y para las demás dietas se utilizó una mezcla de minerales libre de calcio, este pudo ser el aporte extra de materia inorgánica que se cuantificó en el análisis. El valor de 3.5% de minerales se tomó como referencia de la Dieta AIN-93G (Reeves, 1997) para ratas en crecimiento, donde se cuida la relación Ca:P para evitar patologías en el riñón de los animales. En cuanto a extracto etéreo o lípidos, la Dieta AIN-93G recomienda un 7% para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia; en el presente trabajo, se ajustaron las dietas a 4%, que es la recomendación de lípidos para mantenimiento normal del animal, para dar oportunidad de observar un aumento si lo hubiera, más notorio del peso del animal en función de la calidad de la proteína consumida en el alimento administrado, y no en función del aporte de lípidos en la dieta; lo anterior debido a que fue de interés conocer la calidad de la proteína de cada una de las

dietas a probar. Los valores para extracto etéreo de las dietas provenientes del maíz y de las tortillas no presentaron diferencia estadística entre ellos, a la dieta control si se le agregó 7%, ya que esta dieta es considerada un control de crecimiento dentro del experimento.

Para el contenido de proteína el valor más alto se observó para la dieta control de caseína (DC), siendo de 20.36%, ya que es la recomendación de caseína en la dieta AIN-93G (Reeves, 1997) que se utilizó de referencia. A las demás dietas se les respeto el porcentaje de nitrógeno proteico que provenían de la materia prima (maíz, y tortillas), todas alrededor de 7%, sin presentar diferencia significativa entre ellas, como ya se menciona antes para evaluar la calidad proteica de cada dieta en particular. Los valores para fibra total (fibra insoluble + fibra soluble) en las dietas provenientes del maíz y de las tortillas se diluyeron un poco al prepararse las dietas, conservándose la similitud al no presentar diferencia estadística significativa entre la dieta de tortilla tradicional y la dieta de tortilla Maseca®; las demás dietas presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellas, pero todas a excepción de la dieta de tortilla Maseca® están dentro del 5% recomendado en la dieta AIN-93G (Reeves, 1997). Con esto se verifica que las dietas fueron lo más parecidas posibles entre ellas para no tener interferencias en el ensayo biológico.

Cuadro VII. Composición química de la dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Determinación (%)	DB	DE	DT	DM	DC
Cenizas	3.49a	3.50 a	3.50a	3.48 a	4.16b
Extracto etéreo	4.19a	4.17 a	4.03a	3.92 a	7.10c
Proteína	7.62b	7.77b	7.27a	7.10 a	20.36c
Fibra insoluble	8.79c	9.35d	4.05a	3.90 a	5.06b
Fibra soluble	1.57b	1.70b	0.93a	0.83 a	1.06c
Fibra total (FI + FS)	10.32c	11.07d	4.98a	4.73 a	6.12b
Extracto libre de nitrógeno	62.51	62.29	68.88	69.33	51.82

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P < 0.05). (n=4)
 Extracto libre de nitrógeno = 100 – (% proteína + % cenizas + % fibra dietética + % extracto etéreo)

7.3.3. Distribución y manejo de los animales de experimentación

Al comienzo del ensayo los animales fueron pesados y se descartaron los tres más pesados y los dos más ligeros, quedando un grupo de 30 animales con un peso comprendido entre 47 y 63 g. Como se menciona en la metodología se asignaron a los animales en jaulas individuales y se sometieron a dos días de adaptación con alimento comercial. Y al tercer día se asignaron al azar seis animales por dieta y comenzó la alimentación con las diferentes dietas experimentales [dieta de maíz blanco crudo sin procesar (DB), dieta de tortilla elaborada por el método ecológico de nixtamalización (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta control de caseína (DC)]; las cuales al igual que el agua purificada fueron suministrados *ad libitum* a los animales durante 28 días (Figuras 13).



Figura 13. Asignación y alimentación de los animales en jaulas individuales.

7.3.4. Ganancia en peso durante el ensayo biológico y PER

En el Cuadro VIII se muestra la ganancia en peso durante los 28 días de experimentación por grupo de dieta, y se observa que no hay diferencia estadística significativa (Figura 14) entre las dietas experimentales; sólo se observó una diferencia entre éstas y la dieta control de caseína (DC) (Figura 15). En cuanto al consumo de alimento, durante el ensayo se observó diferencia significativa (Figura 16) entre el consumo por parte del grupo de la DC y el del grupo de la DM, con un consumo promedio de 411.06 g y 338.45 g, respectivamente; referente a las demás dietas, entre la DE, la DT y la DB no hubo diferencia significativa entre sí, ni con respecto a las DC y DM. En relación al consumo de calcio, se observó una diferencia estadística significativa entre sí en todas las dietas experimentales (Figura 17); el consumo mayor de calcio durante el ensayo fue por parte de los grupos alimentados con la DC con 73.40 mg/día, la DT con 17.27mg/día, la DE con 12.93 mg/día, la DM con 8.35 mg/día y la DB con 0.77 mg/día; esto se debe que el aporte de calcio presente en las dietas DT, DE, DM, y DB no se ajustó y se mantuvo el contenido original de calcio contenido en las tortillas y el maíz, de los cuales se partieron para elaborar las dietas. Solo el contenido de calcio presente en la DC fue ajustado de acuerdo a la Dieta AIN-G93 (Reeves, 1997).

Con el monitoreo de la ganancia en peso corporal de los animales por grupo de dieta a lo largo del ensayo y el consumo de alimento, determinado pesando la dieta consumida, la dieta sobrante y la dieta tirada durante el mismo, se calculó el peso ganado y la proteína consumida a los 28 días por rata de cada grupo. El PER, el cual está definido como la ganancia en peso por proteína consumida (Hackler 1978), se calculó dividiendo el aumento de peso de la rata entre el peso de la proteína consumida (Figura 18). El valor más alto de PER fue el del grupo de la DC (2.2), tal como se esperaba, pues esta dieta se considera un control de crecimiento que contiene todos los nutrientes en las condiciones óptimas para el crecimiento de los animales; las ratas alimentadas con las dietas DT, DE y DM presentaron valores de PER de 1.85, 1.81 y 1.74, respectivamente, y no tuvieron diferencia estadística significativa entre sí; sin embargo, si tuvieron ambas una diferencia parcialmente significativa en relación al PER de la DM, quien tuvo un valor de 1.74; el PER de la DB fue el más bajo del ensayo (1.49), como se aprecia en la Figura 19.

Cuadro VIII. Ganancia en peso y PER de los animales, alimento y calcio consumido durante los 28 días del ensayo. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Ganancia total de peso (g)	Alimento total consumido (g)	Calcio total consumido (mg)	PER
DC	167.61 a	411.06 a	73.40 a	2.2a
DE	51.68b	345.52ab	12.93c	1.81b
DT	48.03b	335.49ab	17.27b	1.85b
DM	44.3b	338.45b	8.35d	1.74bc
DB	41.14b	354.26ab	0.77e	1.49c

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n= 6)

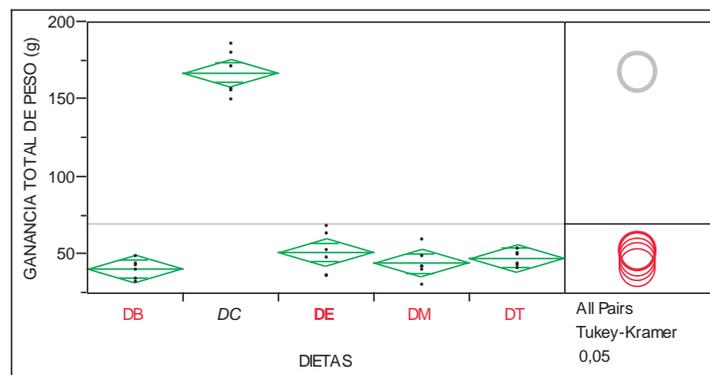


Figura 14. ANOVA en los datos de ganancia en peso durante los 28 días de experimento de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®, DT (dieta de tortilla tradicional).



Figura 15. Talla de los animales al final del experimento; a) dieta de maíz blanco sin procesar (DB), b) dieta de tortilla ecológica (DE), c) dieta de tortilla tradicional (DT), d) dieta de tortilla Maseca® (DM) y e) dieta Control de caseína (DC).

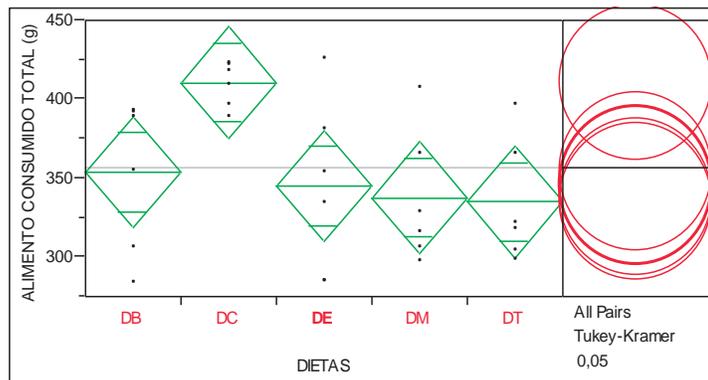


Figura 16. ANOVA en los datos del alimento total consumido durante los 28 días de experimento de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

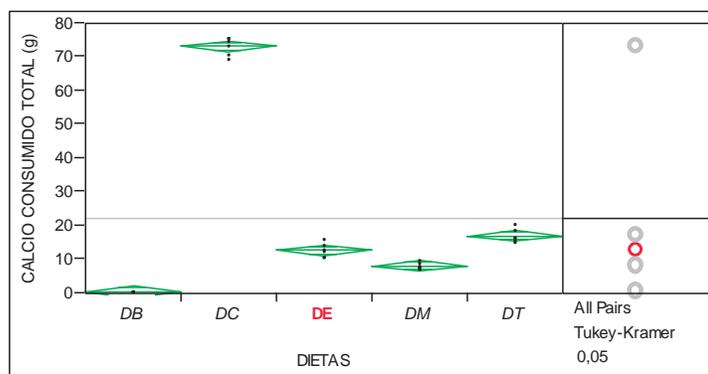


Figura 17. Análisis de ANOVA a los datos de calcio total consumido de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

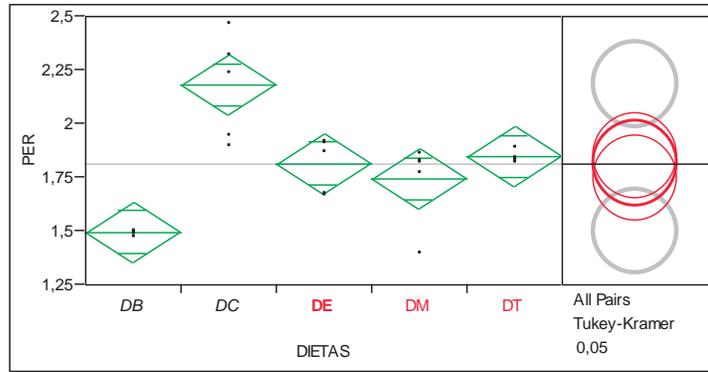


Figura 18. Análisis de ANOVA a los datos de PER de cada grupo de dieta problema. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

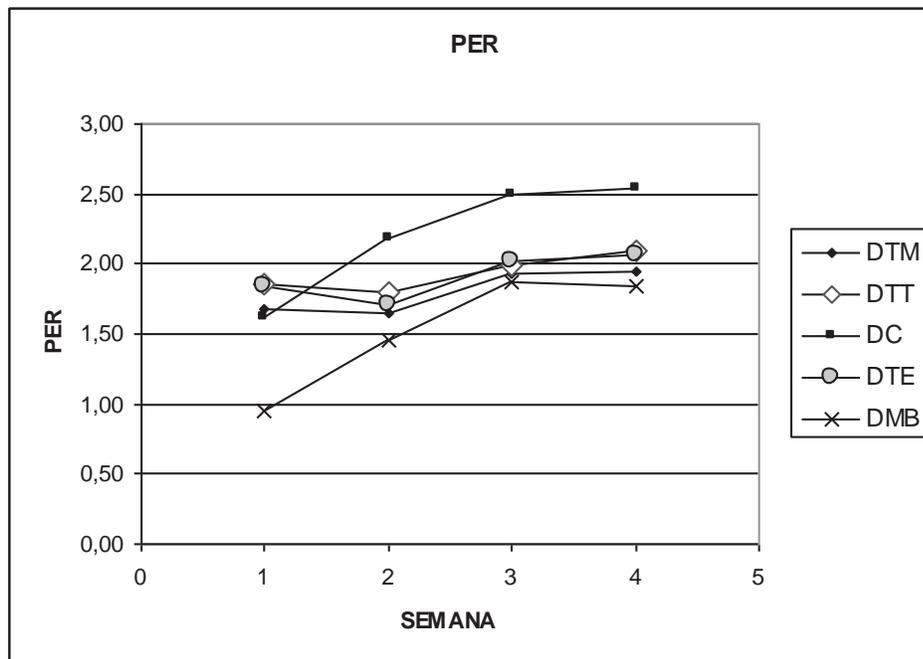


Figura 19. PER semanal por grupo de dieta; dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta control de caseína (DC).

7.3.5. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas

Al término del ensayo, a los animales se les retiró el alimento y se les dejó en ayuno por 6 h antes de su sacrificio, lo cual se hizo con la intención de evitar sueros lipémicos que pudieran interferir en la determinación de albúmina sérica. Los animales se sacrificaron mediante el método de dislocación cervical (Marshall *et al.* 1994). Posteriormente, a cada animal se le extrajeron 2 mL de muestra de sangre por punción cardíaca y ambos fémures de cada ejemplar por grupo. La sangre se separó mediante centrifugación a 3500 rpm separando el suero y reservándolo para su posterior análisis de albúmina sérica.

Los fémures se limpiaron con un bisturí y un paño impregnado de alcohol, para dejarlo limpio de tejido muscular y enseguida se caracterizó físicamente.

7.3.6. Características físicas y químicas de los huesos de ratas

7.3.6.1 Dimensiones físicas de los huesos

Las mediciones de longitud, espesor, diámetro medio y peso, se observan en el Cuadro IX. En cuanto al peso del fémur de los animales por grupo de dieta, la tendencia que se observó fue la siguiente: los fémures de las ratas alimentadas con la DC fueron quienes registraron el mayor peso (0.32 g) siendo estadísticamente diferente al resto de las dietas (Figura 20), como era de esperarse debido al contenido adecuado de calcio en la dieta (Reeves, 1997); le siguieron los pesos de los fémures de las ratas alimentadas con las dietas DE y DT, los cuales fueron de 0.20 g y 0.19 g, respectivamente, y fueron estadísticamente diferentes a todas las demás dietas, pero no entre sí; los valores de peso de los fémures de las ratas alimentadas con la DT encontrado en este trabajo fue semejante al de 0.18 g para tortilla de nixtamal que reportaron Martínez-Flores *et al.* (2002b); por último, los valores más bajos en cuanto a peso del fémur fueron para los animales alimentados con las dietas DM (0.15 g) y DB (0.11 g), valores que fueron estadísticamente diferentes entre sí y con respecto a las demás dietas del ensayo.

Para el parámetro de longitud del fémur de los animales de las diferentes dietas experimentales (Figura 21), no se observó ninguna diferencia significativa notoria entre ellas (Figura 22), cayendo todos los valores dentro del rango de 2.49 a 2.57 cm; sólo los fémures de las ratas alimentadas con la DC presentaron el valor más alto de longitud de fémur (2.97

cm), el cual fue diferente significativamente al de las demás dietas experimentales. Los valores para este parámetro coinciden a los que reportaron Martínez Flores y col. (2002b) para tortillas de nixtamal y harina de maíz crudo, encontrando dichos autores valores de 25.07 mm y 25.05 mm, respectivamente. Para el siguiente parámetro a discutir, se observó que los animales alimentados con las dietas DC presentaron el mayor valor de espesor medio del fémur (0.34 cm) (Figura 23), resultando diferente significativamente del resto de las dietas y, el valor más bajo lo obtuvo el grupo de DB (0.25cm), con diferencia estadísticamente significativa al resto de las dietas. Quedando sin diferencia notoria entre sí, solo con respecto a los valores de los fémures de las ratas alimentadas con las dos dietas antes mencionadas, las DT, DE y DM con 0.29 cm todas ellas. Los valores obtenidos al realizar la medición de diámetro medio del fémur (fémur-pelvis), siguieron la misma tendencia que la medición de longitud de éste (Figura 24), no encontrándose diferencia significativa entre las dietas DT, DE, DM y DB, solo DC tuvo diferencia estadística significativa con respecto a las demás dietas, mostrando esta última el valor más alto (0.74cm) y para el resto oscilaron los valores entre 0.62 y 0.67 cm.

Cuadro IX. Peso, longitud, espesor y diámetro medio de los fémures de cada grupo de dieta. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Peso (g)	Longitud (cm)	Espesor medio (cm)	Diámetro medio Fémur-pelvis (cm)
DC	0.32a	2.97 ^a	0.34a	0.74 ^a
DE	0.20b	2.57b	0.29b	0.67b
DT	0.19b	2.50b	0.29b	0.65b
DM	0.15c	2.50b	0.29b	0.65b
DB	0.11d	2.49b	0.25c	0.62b

Medias con distinta letra en la misma columna, tienen una diferencia estadística significativa. (P < 0.05). (n= 6).

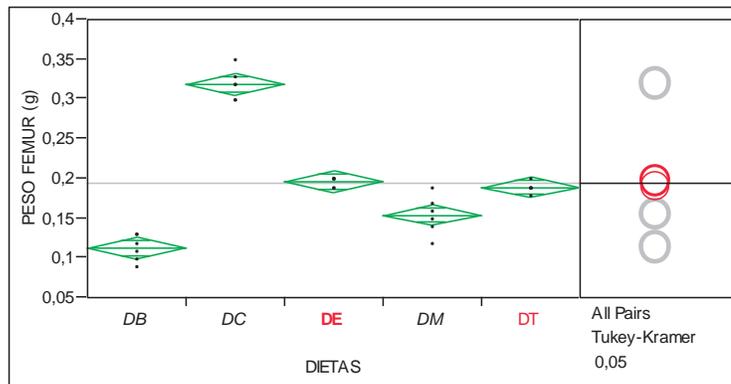


Figura 20. Análisis de ANOVA a los datos de peso de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).



Figura 21. Talla de los fémures promedio por grupo de dieta. a) dieta control de caseína (DC), b) dieta de tortilla ecológica (DE), c) dieta de tortilla tradicional (DT), d) dieta de tortilla Maseca® (DM) y e) dieta de maíz blanco sin procesar (DB),

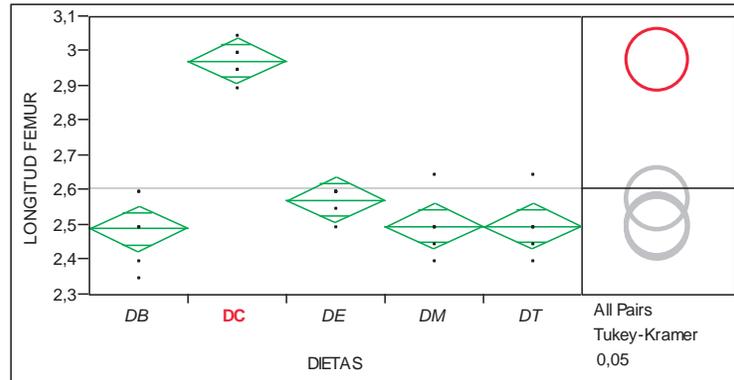


Figura 22. Análisis de ANOVA a los datos de longitud de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

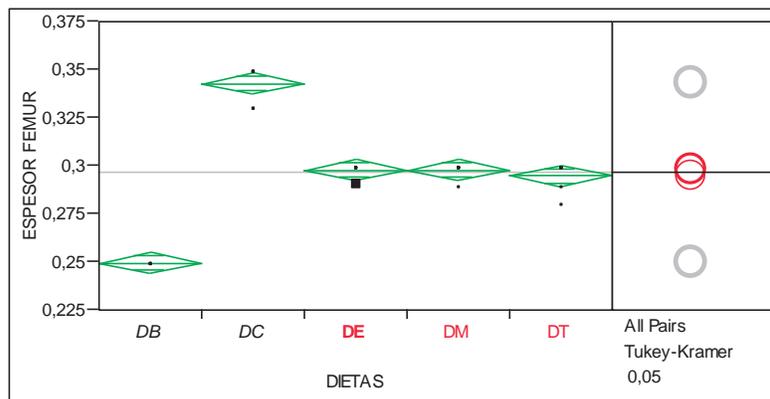


Figura 23. Análisis de ANOVA a los datos de espesor de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

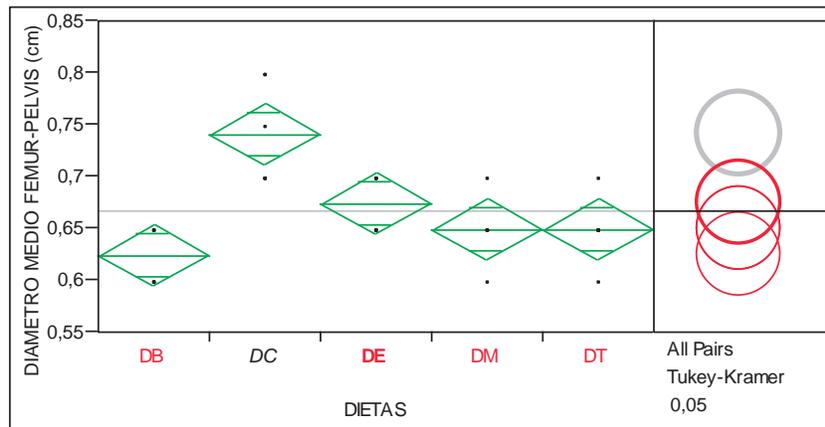
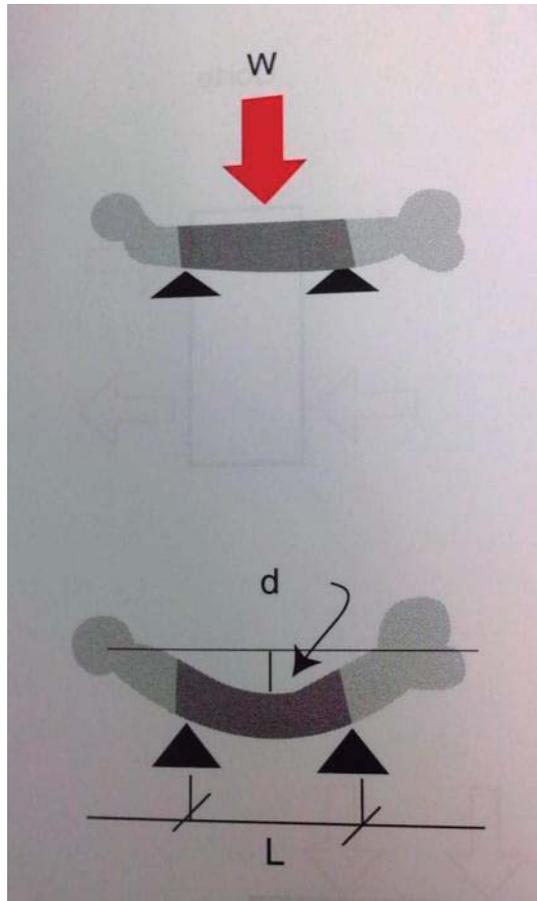


Figura 24. Análisis de ANOVA a los datos de diámetro medio fémur-pelvis de los fémures de cada grupo. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

7.3.6.2 Fuerza al corte de los huesos de ratas

Se empleó un Texturómetro TA-XT2 (Texture Technologies Corporation, Stable Micro Systems, Surrey, England) e inicialmente se determinó la fuerza (g/mm) requerida para fracturar el fémur de los animales de manera transversal como se muestra en la Figura 25 y los únicos valores que fueron diferentes del resto, fueron los de la DC (Cuadro X), obteniendo el valor más alto en fuerza requerida para fracturar el fémur, siendo de 1808.76 g/mm; en cuanto a los demás datos aunque existió una diferencia de 50.25% entre los datos obtenidos de la DE y la DB que fueron los datos más altos y los más bajos para las dietas experimentales, no se observó diferencia significativa debido a que los datos presentaron una desviación estándar alta entre ellos (Figura 26).



Fuente: Zanchetta y Talbot 2001.

Figura 25. Fuerza de cizalla sobre un hueso.

Cuadro X. Parámetros para la medición y fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo de ratas. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Velocidad (mm/s)	Distancia (mm)	Fuerza (kg)	Fuerza requerida Para fractura (g/mm)
DC	2	10	0.1	1808.76a
DE	2	10	0.1	1149.14b
DT	2	10	0.1	1087.35b
DM	2	10	0.1	910.48b
DB	2	10	0.1	577.52b

Medias con distinta letra en la misma fila tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n= 6).

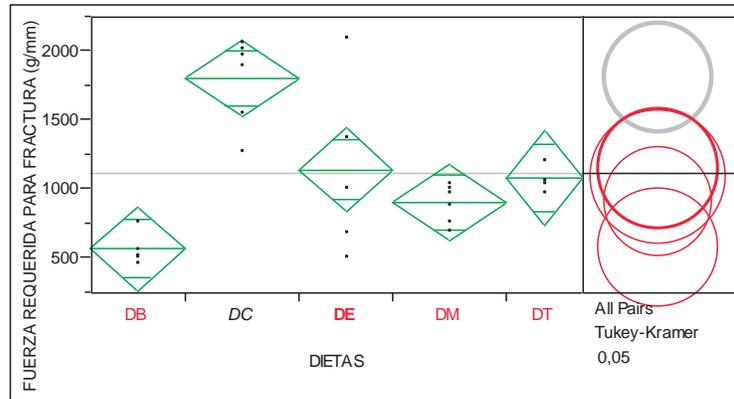


Figura 26. Análisis de ANOVA a los datos de fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo de ratas. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

Debido a lo anterior, se busco una variante de esta metodología, en el mismo equipo Texturómetro, en la cual se pudiera observar una mayor reproducibilidad entre las mediciones y observar diferencias entre las dietas experimentales, debido a que el material óseo es radicalmente distinto a cualquier otro tratado por la mecánica clásica. Su estructura es heterogénea y anisótropa, y sus propiedades mecánicas varían no sólo entre distintos individuos, sino, para un mismo individuo (Rincón *et al.* 2004) (Figura 27 y 28).

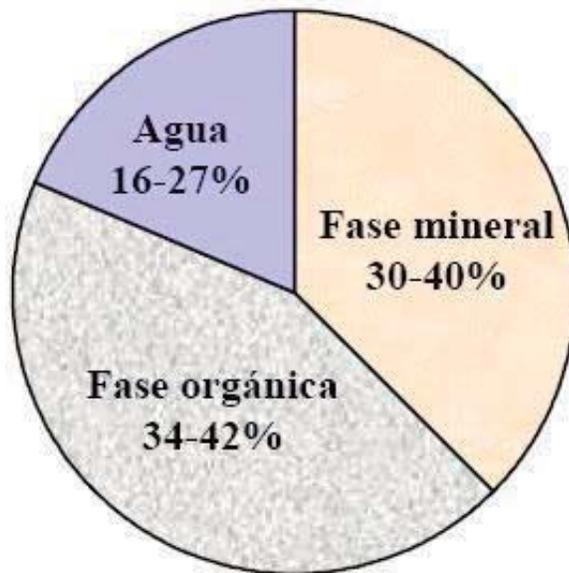
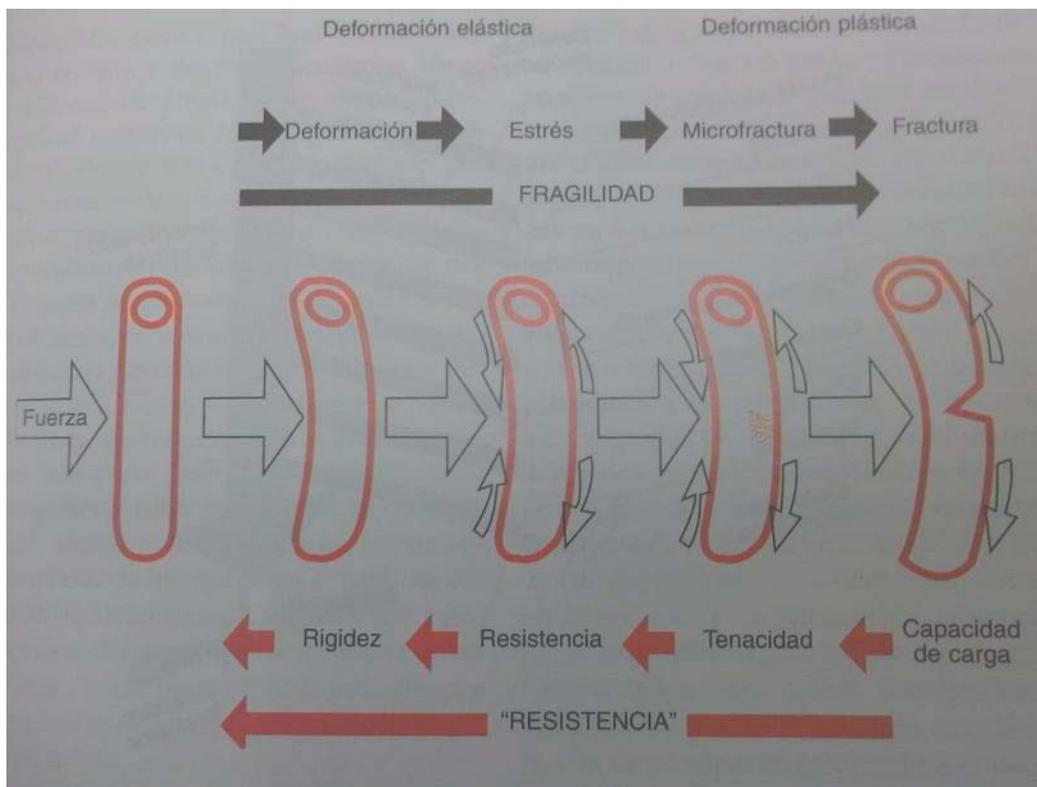


Figura 27. Composición del hueso.



Fuente: Zanchetta y Talbot, 2001

Figura 28. Propiedades biomecánicas del hueso.

El parámetro que se eligió fue el de compresión, en el cual se determinó la fuerza máxima necesaria para la penetración (2mm) de una punta cónica (90°) en el fémur de los animales sin necesidad de fracturarlo. En esta medición se obtuvieron datos reproducibles (Cuadro XI), observándose que la tendencia fue la misma que en la anterior medición; el valor más alto de fuerza (N) se obtuvo para los datos de DC, habiendo diferencias entre las dietas experimentales; también, los valores para las DE y DT registraron los valores más altos de ensayo pero no presentaron diferencia entre ellas, ya que solo tuvieron una diferencia de 1.6% de la DE con respecto a la DT, en cambio la DM y la DB resultaron diferentes con un 31.41% entre ellas y con respecto al resto (Figura 29). Este parámetro es importante debido a la información que podemos deducir de él, dado que la rigidez del fémur está dada principalmente por la fase mineral en el hueso, la cual representa de un 30% a un 40% de la composición de éste. Se puede inferir que la cantidad de fuerza necesaria para la compresión de material, en este caso el hueso, es proporcional a la concentración de la fase

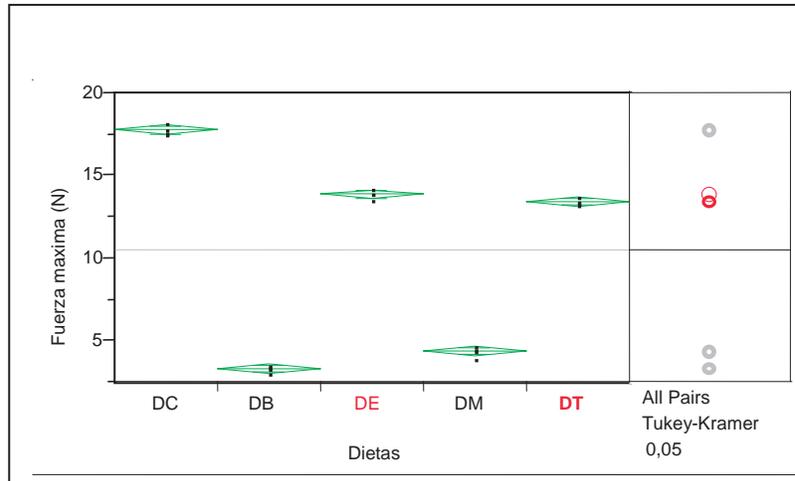


Figura 29. Análisis de ANOVA a los datos de compresión de los fémures de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

Cuadro XI. Parámetros para la medición y fuerza requerida para la compresión de los fémures de cada grupo de dietas. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Velocidad (mm/s)	Distancia (mm)	Fuerza máxima compresión (N)	Modulo de Young (MPa)
DC	0.1	0.2	17.77a	626,34 ^a
DE	0.1	0.2	13.67b	446,55b
DT	0.1	0.2	13.45b	438,41b
DM	0.1	0.2	4.35c	136,36c
DB	0.1	0.2	3.31d	71,78c

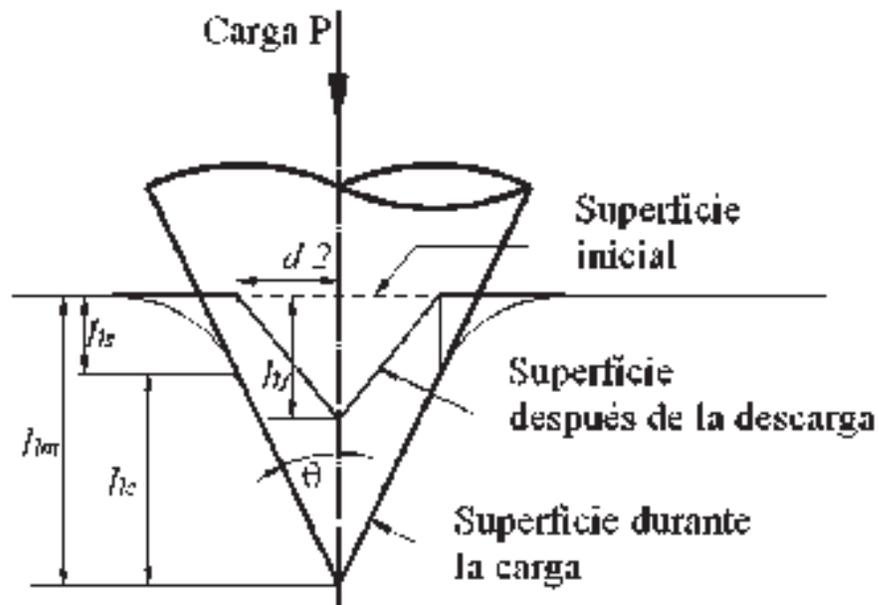
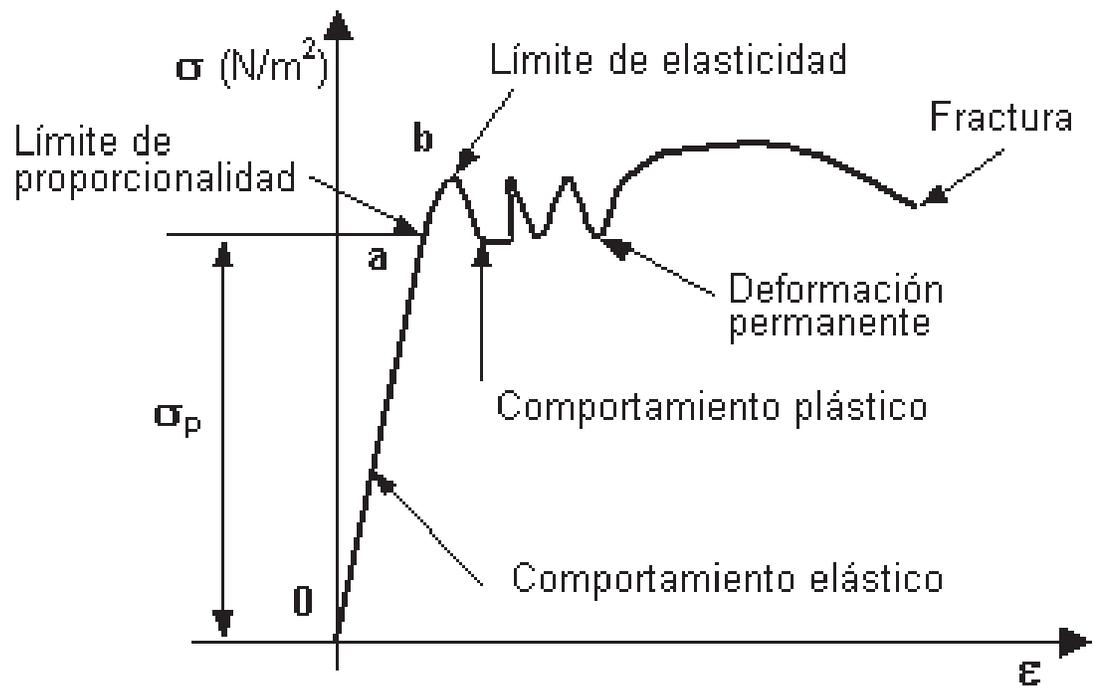
Medias con distinta letra en la misma fila tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n= 4).

mineral de éste. Se debe tomar en cuenta otros factores que pudieran alterar sus propiedades mecánicas, ya que el tejido óseo no es una estructura estática sino un tejido con una marcada capacidad de renovación. Este fenómeno de renovación se denomina remodelado óseo y tiene una doble finalidad: mantener la integridad mecánica del esqueleto y contribuir a la regulación homeostática del calcio. La remodelación tiene lugar mediante la sucesión temporal de los fenómenos de resorción ósea (osteoclastos) y de formación ósea (osteoblastos), que se establecen en zonas microscópicas que se denominan unidades de

remodelación (Lazner *et al.* 1999). Por otra parte, la morfología del hueso permite tener un material rígido y ligero al mismo tiempo. La rigidez la confiere la capa exterior, formada de material compacto, mientras que en el interior adopta una forma esponjosa que le permite minimizar el peso (Rincón *et al.* 2004).

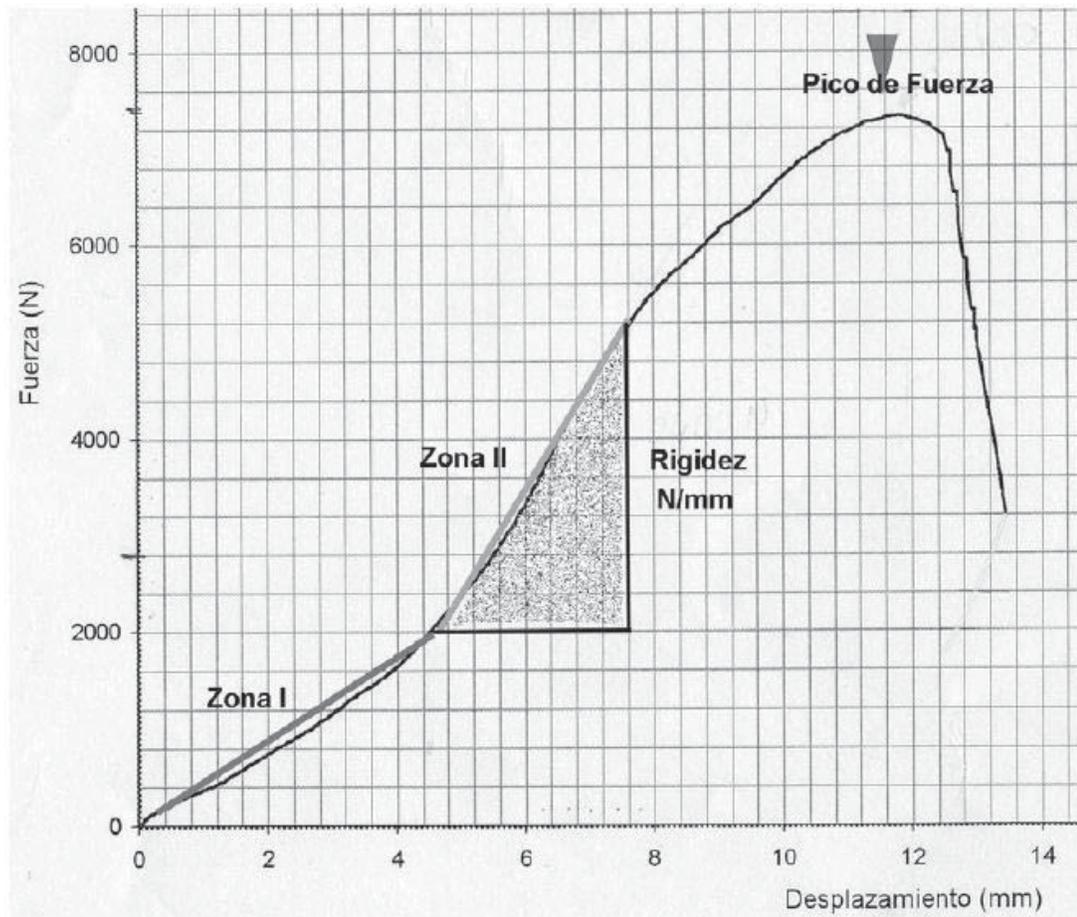
Existe un equilibrio entre la formación y resorción ósea por lo que el balance óseo es cero. Sin embargo, cuando se altera el proceso de remodelado óseo, a causa de múltiples factores, como la ingesta inadecuada de calcio y de vitamina D, se observan trastornos patológicos como la osteoporosis, que es una enfermedad multifactorial caracterizada por una mayor resorción que formación ósea, y que se define como un trastorno esquelético con una disminución de la resistencia ósea y una mayor predisposición a las fracturas por disminución de la masa ósea (Mira y De la Fuente 2007).

En cuanto al comportamiento biomecánico del hueso, las fibras de colágeno son las que proporcionan a éste la flexibilidad y resistencia a la tensión, mientras que las partes minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. La resistencia a la compresión del hueso es más elevada que su resistencia a la tracción, debido a su mineralización. El tejido óseo es muy anisotrópico debido a las osteonas que dan una direccionalidad muy concreta. Además, el hueso tiene un comportamiento viscoelástico ya que su respuesta mecánica cambia en función de la velocidad de deformación aplicada y sus propiedades mecánicas dependen de manera considerable de su densidad, por lo cual el hueso trabecular muy poroso y el hueso cortical muy denso tienen propiedades diferentes. La humedad también influye sobre las propiedades mecánicas del hueso por el efecto plastificante del agua (Navas *et al.* 2007). Para evaluar las diferencias biomecánicas de un material sobre otro se deben comprender los fundamentos mecánicos de los materiales. La Figura 30 muestra una curva de carga vs deformación en un ensayo de compresión. La tendencia de las curvas que se observaron en este trabajo fue similar a la mostrada en la Figura 31 en donde la primera pendiente de la curva de fuerza desplazamiento o Zona I ha sido descrita por Hamer *et al.* (1996) y corresponde a la absorción de la compresión por el cartílago articular y partes blandas. La Zona II muestra la carga del hueso. La pendiente registrada en esta región es la que mide la rigidez del hueso. El pico de fuerza o medición máxima de fuerza en una muestra indica la inflexión producida por la aparición de la fractura ósea.



Fuentes: Meza *et al.* 2008; www.fisicanet.com.ar/.../ap01_elasticidad.php

Figura 30. Representación esquemática del perfil de una huella y curva de carga vs deformación para un ensayo de compresión



Fuente: Serra *et al.* 2006

Figura 31. Curva de fuerza-desplazamiento

El tejido óseo de origen animal presenta las mismas características biomecánicas que el humano y se usa frecuentemente en investigación (Serra *et al.* 2006). Con las gráficas XY obtenidas del ensayo de compresión se puede calcular el parámetro de Módulo de Elasticidad, que se define como la razón entre el incremento de esfuerzo y el cambio correspondiente a la deformación unitaria. Si el esfuerzo es una tensión o una compresión, el módulo se denomina módulo de Young (E) y tiene el mismo valor para una tensión que para una compresión, siendo una constante independiente del esfuerzo siempre que no exceda de un valor máximo denominado límite elástico (Martínez y Azuaga 1997); esta relación es fácilmente identificable en el diagrama fuerza-deformación (Figura 29), desde el

origen hasta llegar al límite de elasticidad, puesto que la pendiente del segmento de esta gráfica es el módulo de elasticidad del material. El módulo de Young más alto fue para la DC, siendo de 626.34 MPa, el cual fue diferente del resto. La DE tuvo un 1.8% de diferencia con respecto a la DT, la cual no presentó diferencia significativa entre ellas pero sí con respecto a las demás. Las DM y DB mostraron una diferencia de 47.4% de la primera con respecto a la segunda, aunque esta diferencia es grande no fue diferente estadísticamente entre ambas, pero sí con relación a las anteriores (Figura 32). Aunque da la impresión de ser una medida de las propiedades elásticas de los materiales, E es una medida de rigidez; entre mayor sea el valor de esta constante, mayor es la rigidez del material como se puede apreciar en las gráficas de la Figura 33 (Rayas *et al.* 2003).

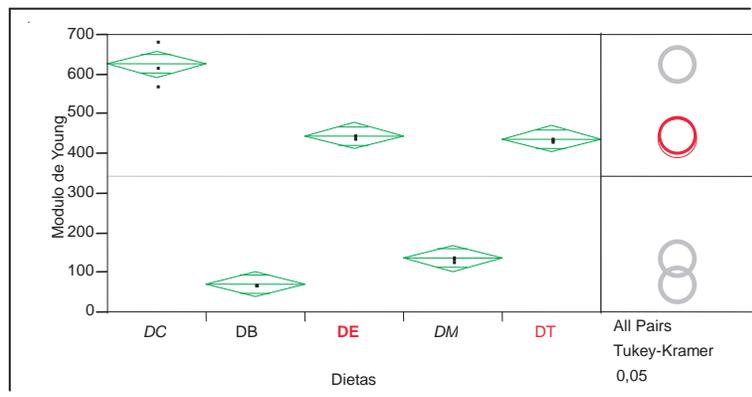


Figura 32. Análisis de ANOVA a los datos de Módulo de elasticidad de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

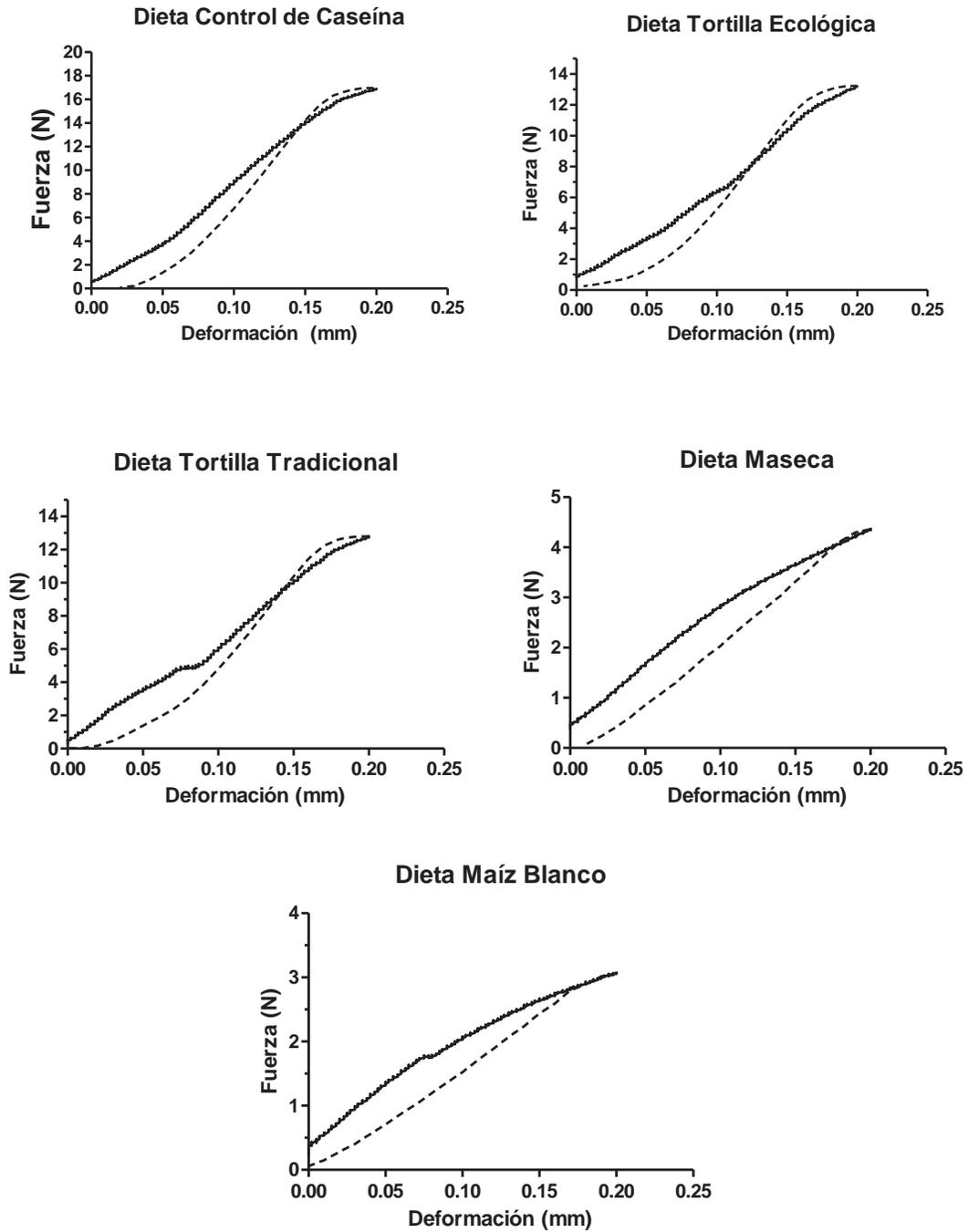


Figura 33. Curvas de compresión de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (Dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

7.3.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en hueso

Los fémures cortados transversalmente previamente inmovilizados y pulidos en pastillas de acrílico, como se describe en la metodología, fueron escaneados con un microscopio electrónico de barrido para conocer la morfología y dimensiones del tejido óseo en la superficie de éste. Este análisis arrojó datos muy importantes y contundentes. Contundentes en el sentido de que la dieta de tortilla ecológica de nixtamalización (DE) a pesar de contener un 5.12% menos calcio que la dieta de tortilla tradicional de nixtamalización (DT) no presentó diferencia significativa en cuanto a las dimensiones de grosor en el hueso cortical de los fémures analizados, siendo ambos de 0.33mm de grosor, ni en fuerza requerida para su compresión, esto quiere decir que aun siendo menor el contenido de calcio en la DE éste puede resultar ser más biodisponible para el organismo. En cuanto al grosor de los fémures de las demás dietas, el mayor valor fue obtenido en la dieta control de caseína (DC), siendo de 0.48 mm; la dieta de tortilla Maseca® (DM) tuvo un valor por debajo de la DE y de la DT, siendo respectivamente de 0.30 mm y 0.28 mm; la dieta de maíz blanco sin procesar (DB) presentó el grosor menor de todas las dietas. Este dato es muy importante ya que el grosor del hueso cortical está dado principalmente por la fase inorgánica del hueso, siendo ésta la que le confiere dureza y resistencia al hueso (Navas *et al.* 2007). Si se considera como referencia normal de grosor la DC (0.48 mm) se tiene que la DT y la DE solo alcanzan el 68.75% del grosor normal, esto debido a que la tortilla aun siendo una muy buena fuente de calcio, al aportar un 49.1% de los requerimientos diarios recomendados (Acero-Godínez 2000), por sí sola no cubre el requerimiento total diario recomendado (800–1000 mg/día), y en vista de que en las dietas experimentales probadas en este trabajo están hechas con base en maíz y tortilla, respetando el contenido de calcio que poseía cada tortilla, parece razonable que los huesos de DT, DE, DM y DB no alcanzarán las dimensiones y características de los DC. Sin embargo, el grosor de los fémures de la DT y de la DE sí superó a los encontrados para la DM y la DB, que fueron de 0.30 y 0.28, respectivamente. Esto es contundente ya que si bien no resulta la DE superior en cuanto a aporte de calcio que la DT por lo menos si lo es con respecto a la DM, siendo ésta la tortilla a nivel industrial más consumida en nuestro país.

El grano de maíz no es considerado una fuente de calcio, por el contrario, la cantidad de calcio presente es muy baja (7.12 mg/100g), esto pudo ser evidenciado en éste

estudio debido a que la micrografía (50 μm) de la DB presento en la superficie del corte, zonas de resorción ósea muy marcadas las cuales se observan en la Figura 34 dentro de óvalos de color verde; estas anomalías observadas en este trabajo y en base a soporte bibliográfico fueron caracterizadas como osteopenia intracortical (Figura 35), la cual se caracteriza por la producción de estriaciones o áreas radiolúcidas longitudinales corticales (Zanchetta y Talbot 2001), debidas a que el aporte de calcio en esta dieta era muy bajo, y al saber que debe existir un equilibrio entre la absorción intestinal neta y las perdidas obligatorias urinarias de calcio, para poder permanecer constante la concentración sérica de calcio y calcio óseo. Cuando la concentración de calcio sérico disminuye, los receptores sensibles al calcio en la glándula paratiroides detectan el cambio y estimulan la secreción de PTH (parathormona, también denominada hormona paratifoidea). Esta actúa sobre el hueso estimulando la resorción ósea para liberar calcio y sobre el riñón para reducir la excreción urinaria de dicho mineral e incrementar la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (dihidroxicolecalciferol), a través de la activación de la hidroxilasa renal encargada de transformar el $25(\text{OH})\text{D}_3$ (hidroxicolecalciferol) en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, metabolito que actúa sobre el intestino aumentando la absorción de calcio y sobre el hueso mediando la formación de osteocalcina, proteína implicada en la formación ósea; todo esto hace que los niveles de calcio sean incrementados alcanzando sus valores normales. Otros factores externos como fisiológicos, relacionados con el crecimiento, embarazo lactancia, pueden influir en la eficiencia de la absorción del calcio (Matkovic 1991).

Dada la alta proporción de calcio corporal presente en el hueso y la importancia del hueso como el principal reservorio de éste, el desarrollo y el mantenimiento óseo son el mayor determinante de las necesidades de esta mineral. Ya que aproximadamente de un 40 – 45% de la masa ósea de un adulto se forma durante la adolescencia (Henry *et al.* 2004), pudiendo alcanzar hasta un 90% de su masa ósea a los 17 años. Por lo anterior, una ingesta inadecuada de calcio durante el desarrollo y crecimiento del organismo es especialmente importante para maximizar el pico de masa ósea (Weaver 2000), y con esto poder reducir el riesgo de fracturas osteoporóticas en la edad adulta.

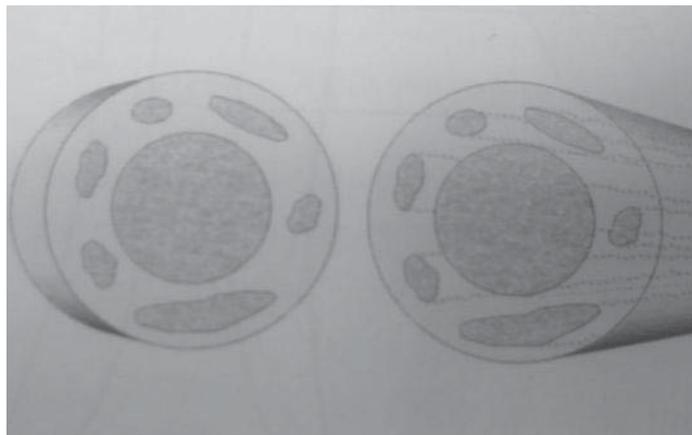
En cuanto a la micrografía (50 μm) del fémur de la rata alimentada con la DC se observan sitios de resorción y formación de huesos normales; para los correspondientes a la DT y a la

DE se observan mayores sitios de resorción que de formación, y para la DM la micrografía señala sitios de resorción más ampliamente distribuidos y pocos sitios de formación.

Por otra parte, la micro sonda de análisis elemental del microscopio electrónico, también permitió conocer la composición elemental de la superficie del hueso, la cual se observa en el Cuadro XII. Se visualiza que el mayor contenido de calcio en hueso lo presentó el fémur de la rata alimentada con la DC (8.80%), en seguida el de la DT y el de la DE siendo de 7.67% y 7.58%, respectivamente; para el fémur de la rata alimentada con la DM el valor fue de 7.34%, con una diferencia de 0.33% con respecto a las dos anteriores, y por último el correspondiente a la DB, siendo de 6.68% de calcio presente en el hueso.

Cuadro XII. Análisis Químico Elemental (SEM), relación Ca:P y grosor de hueso cortical en la superficie del corte transversal de los fémures de cada grupo de ratas.

Elemento (%)	DC	DE	DT	DM	DB
C	51.14	54.09	53.76	55.60	58.94
O	33.37	32.60	32.63	31.24	29.09
Na	0.38	0.30	0.30	0.30	0.31
Mg	0.30	0.28	0.33	0.30	0.44
P	5.91	5.14	5.20	5.12	4.60
K	0.10	0	0.10	0.11	0.15
Ca	8.80	7.58	7.67	7.34	6.68
Ca:P	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Grosor (1:1mm)	0.48mm	0.33mm	0.33mm	0.30mm	0.22mm



Fuente: Zanchetta y Talbot, 2001.

Figura 34. Aspecto de un hueso con Osteopenia intracortical.

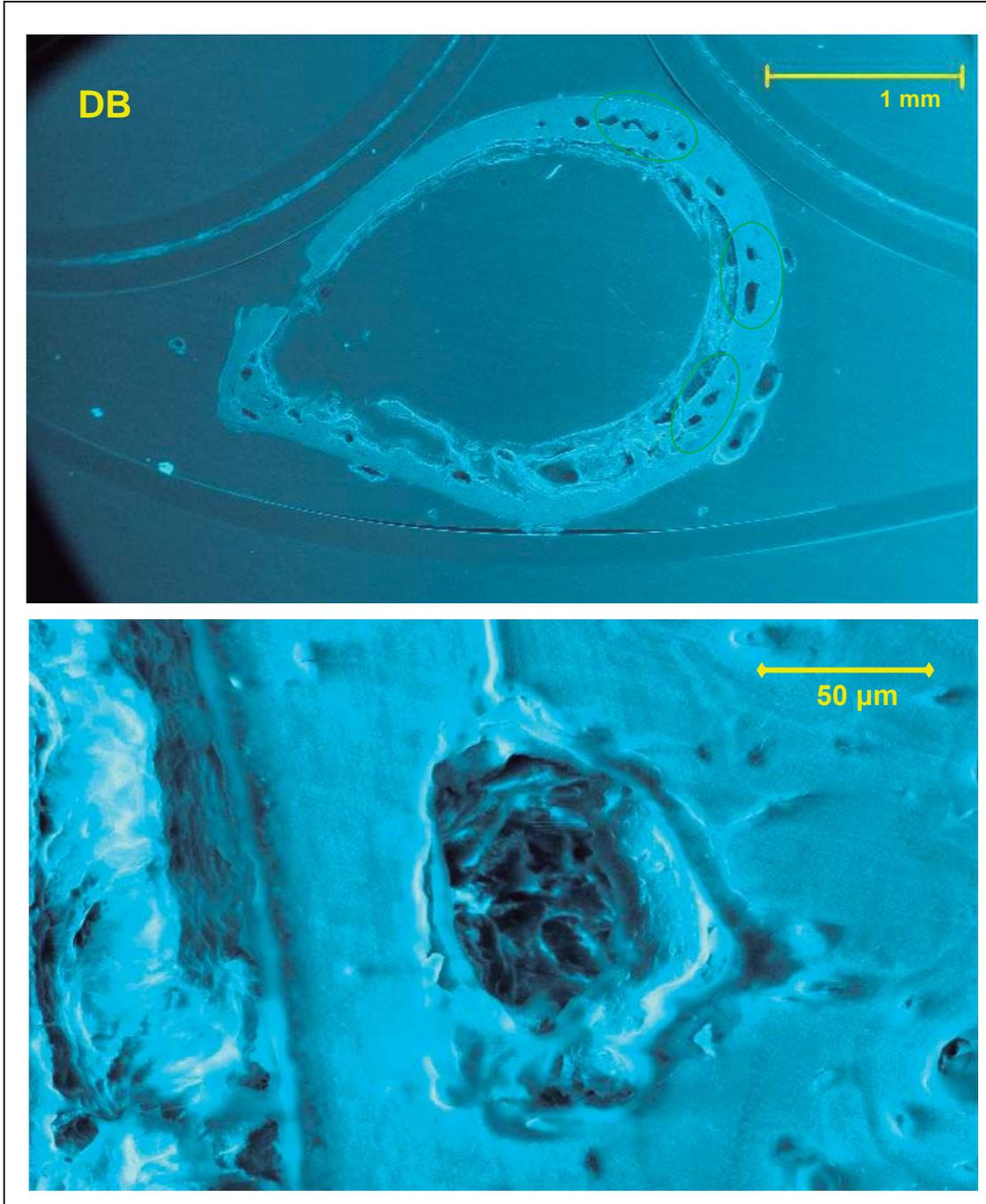


Figura 35. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de maíz blanco sin procesar (DB), en óvalos verdes marcados sitios de resorción ósea y abajo se observa un sitio de resorción ósea anormal (50 µm).

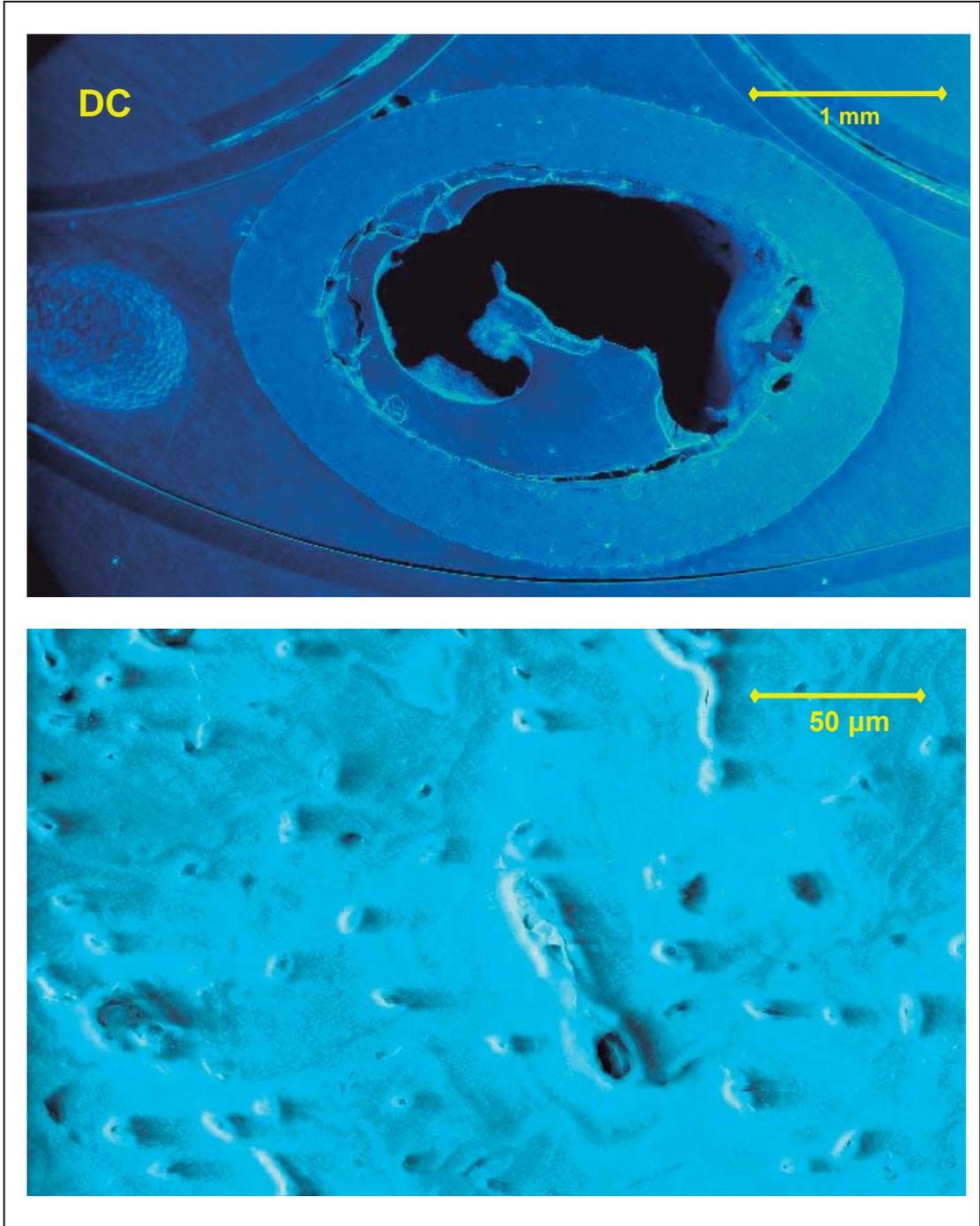


Figura 36. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta control de caseína (DC) y abajo se observa un sitio de resorción ósea normal (50 μm).

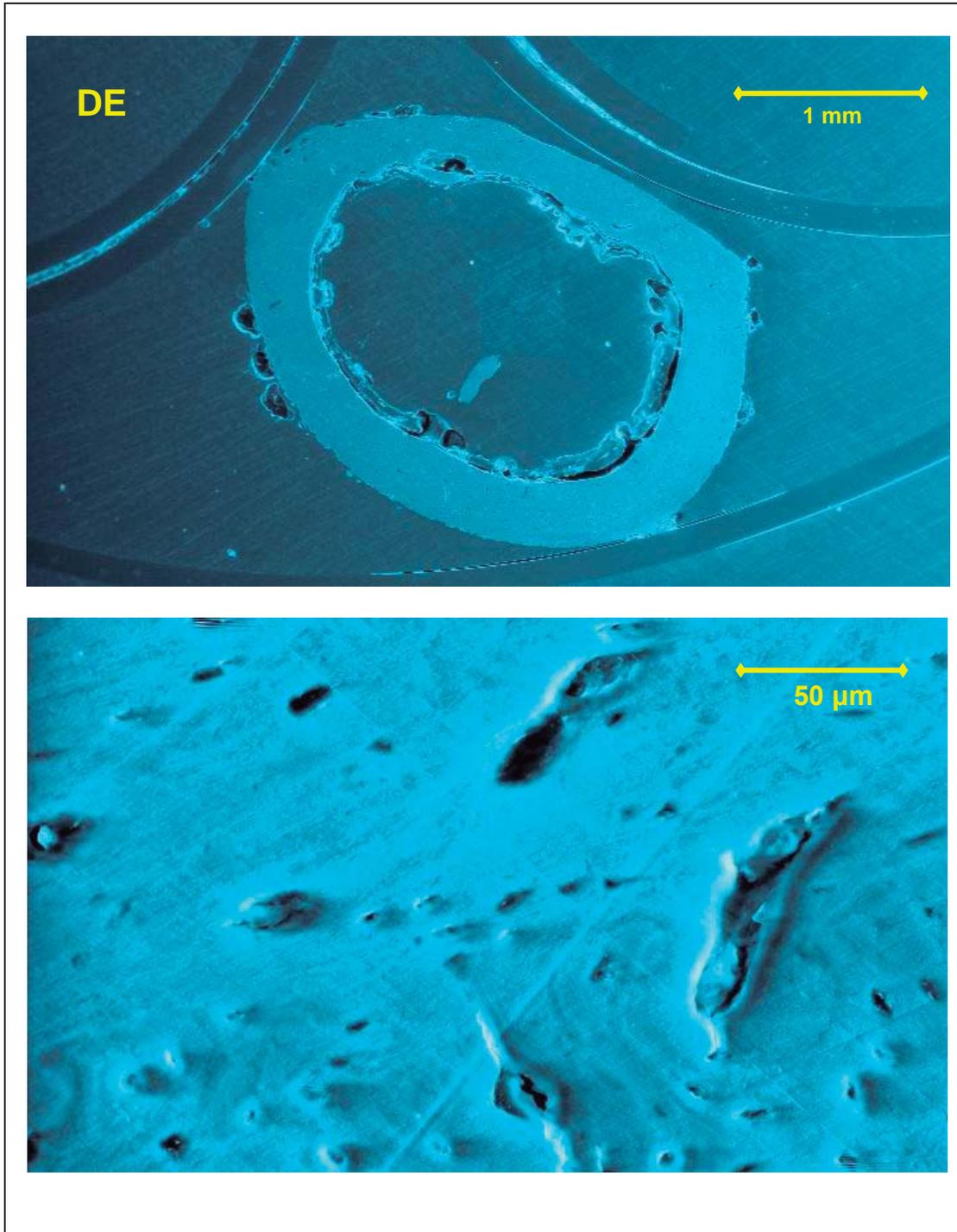


Figura 37. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla ecológica (DE) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 µm).

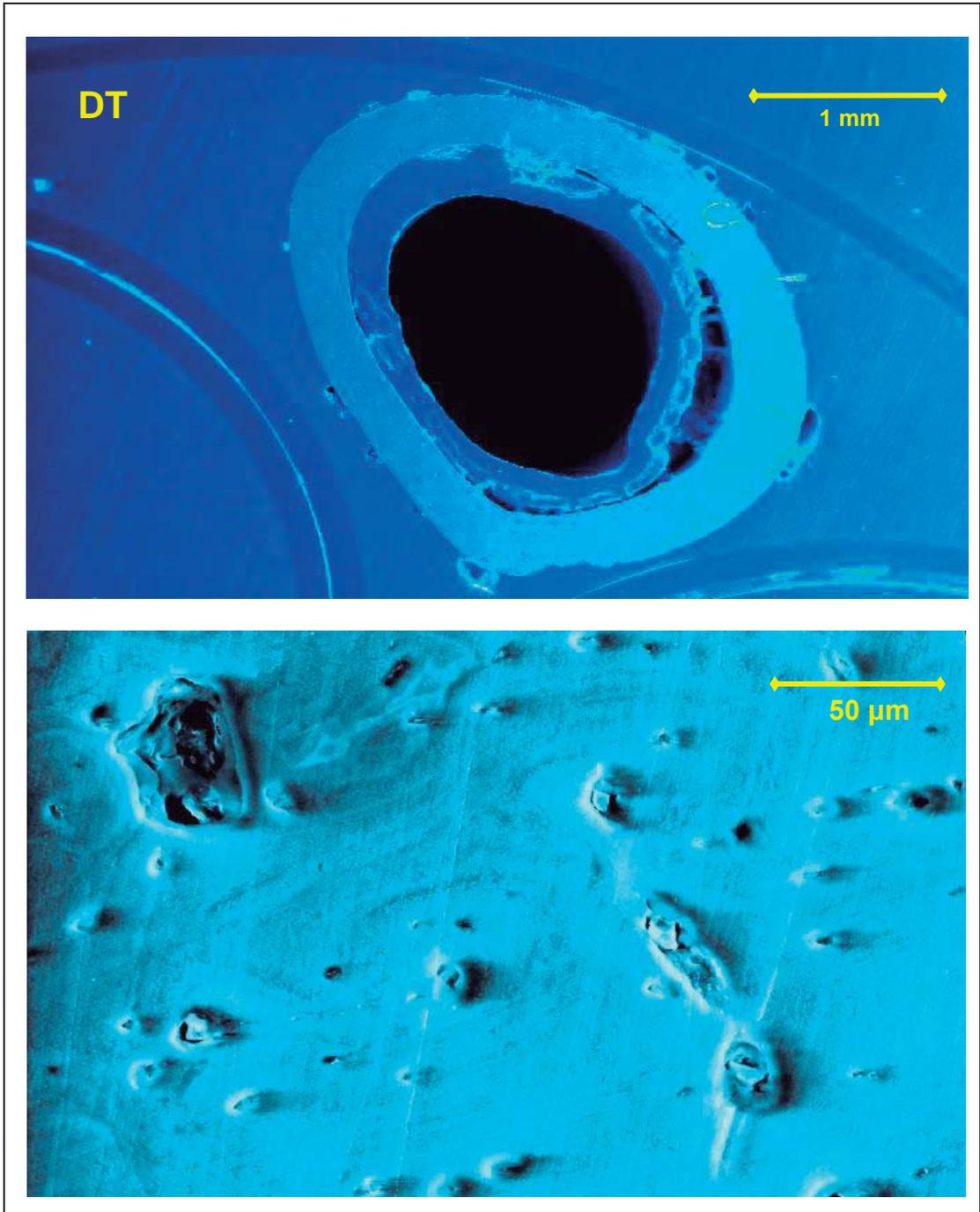


Figura 38. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla tradicional (DT) y a la derecha se observa varios sitios de resorción ósea (50 μ m).

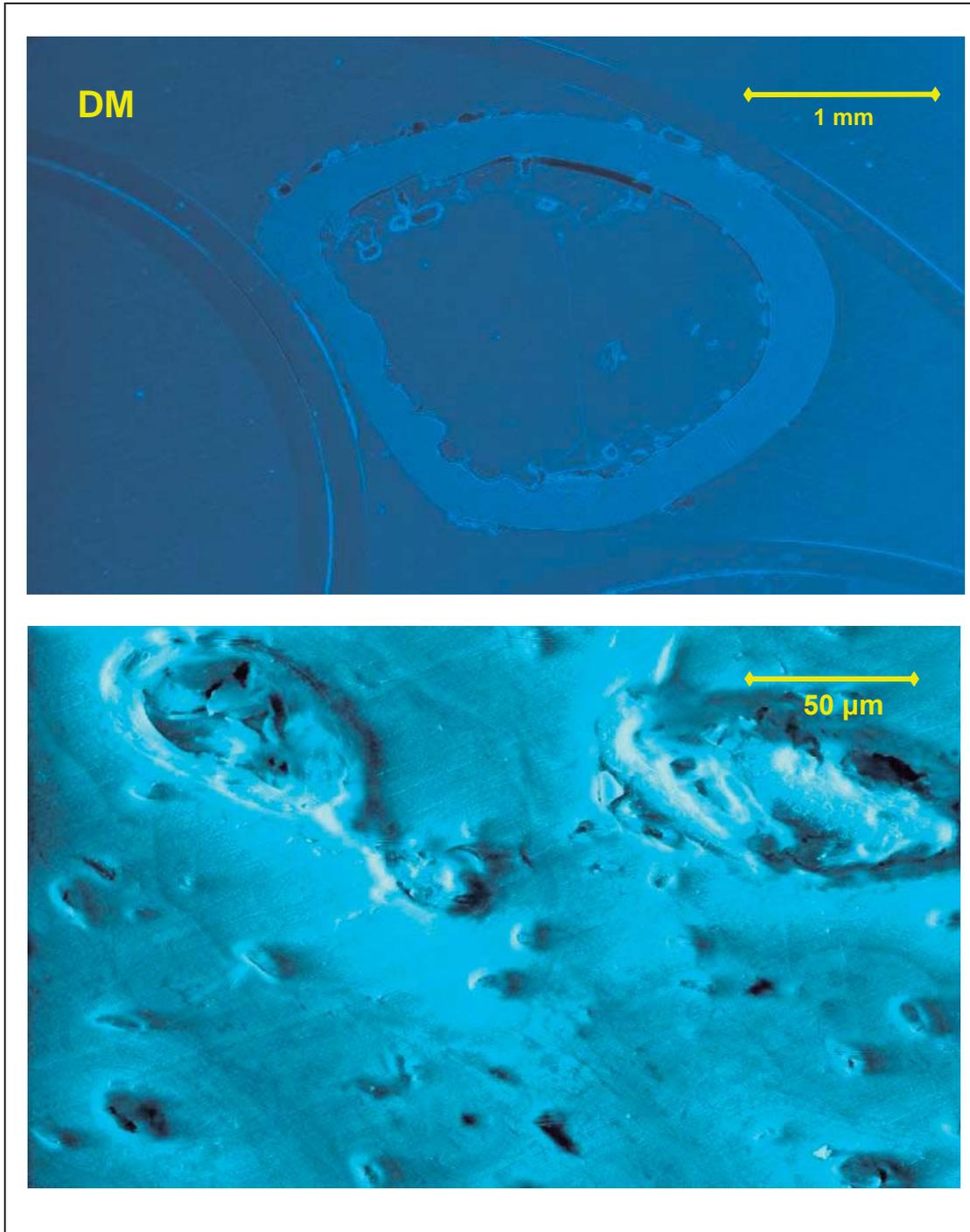


Figura 39. Arriba micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla Maseca® (DM) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 µm)

7.3.6.4 Calcio, magnesio y fósforo en hueso

El calcio, el fósforo y el magnesio son los minerales presentes en mayor cantidad en hueso y son esenciales para darle la fuerza y la forma. Sin embargo, estos también participan en numerosos procesos biológicos de tal importancia que se ha desarrollado un complejo sistema de regulación homeostática para mantener sus concentraciones séricas en límites muy estrechos (Janie *et al.* 2001). El calcio es un elemento esencial de la regulación intercelular ya que interviene en la conducción nerviosa, la contractilidad muscular, el mecanismo de secreción y acción de diversas hormonas y enzimas citosólicas, la permeabilidad de membranas, así como en el proceso de coagulación de la sangre y la mineralización del hueso. El fósforo forma parte de los fosfolípidos de membrana, de los nucleótidos que conforman el ARN y el ADN, y también de los enlaces de alta energía de moléculas como ATP y GTP y segundos mensajeros (AMPc, GMPc); puede actuar como regulador de diversas enzimas y participa en la regulación ácido-base. Su mayor depósito es el esqueleto, donde junto al calcio es el mineral más abundante. El magnesio participa como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas, entre ellas aquellas en que participa el ATP, en los procesos de replicación, transcripción y traducción de la información genética y en la producción o destrucción de la acetilcolina (Riancho y González 2004). Aunque en la regulación de la homeostasis mineral intervienen numerosos órganos y hormonas, los principales efectores son el intestino, el riñón y el hueso, sobre los que actúan las hormonas calcitropas (PTH, vitamina D y calcitonina), modulando la absorción, eliminación y depósito de manera que se mantengan unos niveles séricos constantes (Figura 40). La interrelación entre el sistema hormonal y los niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio es tan estrecha que, con frecuencia, la interpretación de los cambios debe ser realizada en conjunto para que tenga sentido fisiopatológico (Riancho y González 2004).

El contenido de calcio en el fémur, se puede considerar un indicador de la biodisponibilidad de calcio y esta en relación a la retención de calcio por parte del animal. Varios investigadores han indicado que el calcio en las tortillas tiene una biodisponibilidad de 85-93% y que éstas son fuente muy accesible de este mineral en la dieta mexicana (Figueroa *et al.* 2001).

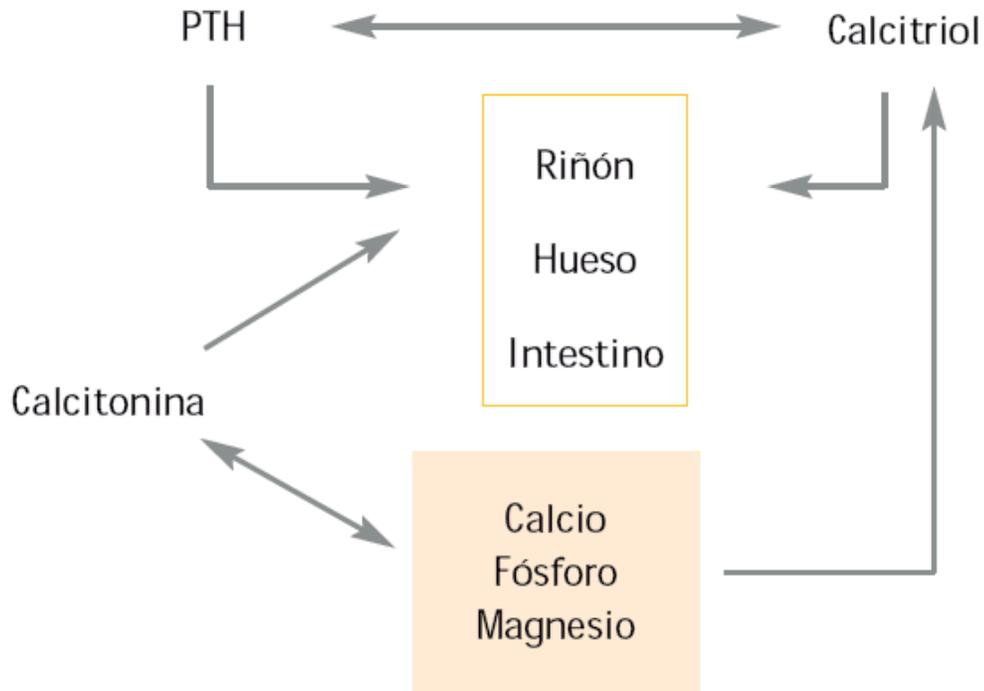


Figura 40. Esquema general de regulación del metabolismo mineral.

Los huesos de las ratas alimentadas con la DC registraron la mayor concentración de calcio y fósforo, siendo de 248.67 mg/g y 149.97 mg/g de hueso, respectivamente, obteniendo así la mejor relación Ca:P (1.65), siendo esta última importante debido a que este equilibrio está relacionado con la asimilación y fijación de ambos minerales en hueso. Por otra parte, en cuanto al contenido de calcio en los fémures de las ratas alimentadas con las demás dietas (DT, DE, DM y DB) si existió una diferencia significativa entre ellas (Figura 41). Siendo los provenientes de la DT la que obtuvo el mayor contenido de calcio con respecto a las anteriores, 157.49 mg/g en hueso, enseguida con una pequeña diferencia de 5.12% con respecto a DT quedaron los provenientes de la DE, la cual sí resultó superior a los provenientes de la DM, la cual quedó con una diferencia de 22.90% por debajo de los provenientes de la DE, y 26.40% por debajo de los provenientes de la DT; los provenientes de la DB quedaron por debajo de todas las dietas, presentando un contenido de 34.81 mg/g en hueso, concentración que nos explica los múltiples sitios de resorción ósea sobre el fémur de este último grupo de dieta, indicio de que el calcio del hueso en éste, y que posiblemente estaba siendo removido para cubrir la concentración normal de calcio sérica y

las pérdidas obligadas normales en heces y orina por el animal; estos valores de calcio son muy similares a los que reportan Figueroa *et al.* (2001), en el cual evaluaron la calidad nutricional de las tortillas de nixtamal fortificadas con vitaminas y proteínas de soya.

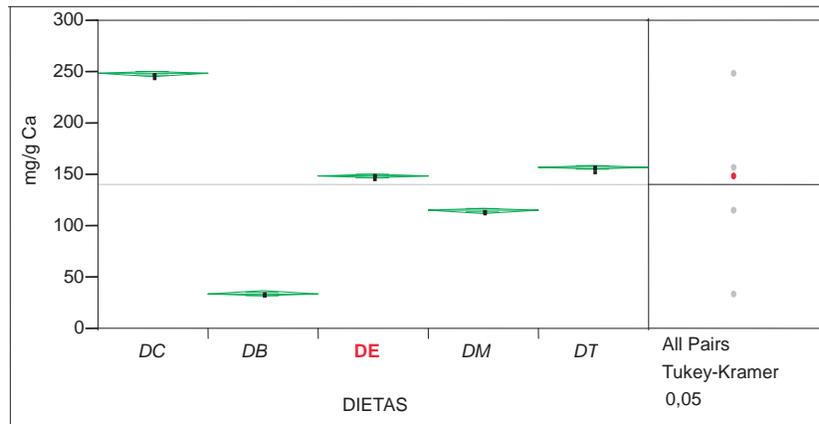


Figura 43. Análisis de ANOVA a los datos de mg Ca/g de hueso de cada grupo de dieta. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

En cuanto a fósforo se observó la misma tendencia que para las concentraciones de calcio, la mayor registrada en las dietas experimentales fue en los huesos de las ratas alimentadas con la DT (84.50 mg/g en hueso), lo cual nos da una relación Ca:P de 1.86; para la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DE se observó una disminución de 5.96% con respecto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DT, pero mantuvo una buena relación de Ca:P (1.88); en cuanto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DM, ésta resultó con una diferencia respecto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DT de 29.72% y 1.94 en la relación Ca:P y por último la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DB fue el valor más bajo de fósforo en hueso, siendo de 33.44% menor a los provenientes de la DT, y con una relación Ca:P de 0.63; éstos datos se asemejan a los reportados por Figueroa *et al.* (2001). En relación a la ingesta elevada de fosfatos se ha descrito que se puede

favorecer el desarrollo de la osteoporosis, especialmente cuando la ingesta de calcio es baja, como es el caso del grupo de dieta DB, ya que actualmente se recomienda que la relación Ca/P sea igual a 1 ó superior, considerándose relaciones inferiores a 1 como un factor desencadenante de la pérdida de masa ósea (Teegarden *et al.* 1998).

Por otro lado, el magnesio es un ion fundamentalmente intracelular. En el plasma circula el 1% del magnesio corporal total (55% en forma iónica, 20% unido a proteínas y el resto formando complejos con aniones). En el tejido óseo mineralizado se encuentra un 70%, siendo éste el principal depósito de magnesio, aunque su contenido total, de unos 18 g, esté muy alejado del contenido en calcio y fósforo. Sin embargo, el líquido intersticial del tejido óseo, muy rico en minerales, puede tener un papel en la reposición del magnesio, como en la respuesta rápida frente a la acidosis, sin precisar mediación celular (Riancho 2004). El contenido de magnesio en los animales alimentados con las diferentes Dietas experimentales (DC, DE, DT, DM y DB) se observan también en el Cuadro XIII y entre ellos al igual que el contenido de calcio, también se evidencia una diferencia estadística significativa, para este caso la DM presente la mayor concentración de magnesio en hueso, siendo de 5.43mg/g; en cuanto al contenido de magnesio en DT fue de un 10.86% menor con respecto al DM; la DC también resulto menor, con 15.83%, y la DE también fue un 27.80% menor con respecto a la DM; y por último la DB presento el contenido de magnesio más bajo del ensayo biológico, siendo de 0.17mg/g. El magnesio es un componente en el hueso que desempeña un papel en el metabolismo del calcio y la fuerza del hueso, posiblemente por cambios hormonales. En la deficiencia de magnesio hay una disminución en la síntesis, liberación, y la acción de hormona de paratiroides y 1,25 vitamina D. Esto puede contribuir a la pérdida de Densidad mineral ósea (DMO) vía retenciones inferiores de calcio, disminución de la absorción intestinal y disminución de la resorción de calcio en el túbulo distal en el riñón, pero hasta el momento poco se conoce sobre los efectos del consumo de magnesio sobre la DMO en individuos sanos, y no existen datos para determinar el consumo óptimo de magnesio para la salud del hueso (Ryder *et al.* 2005).

Cuadro XIII. Contenido de calcio y magnesio en fémur de ratas alimentadas con dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT) y dieta de tortilla Maseca® (DM).

Determinación	DB (mg/g)	DE (mg/g)	DT (mg/g)	DM (mg/g)	DC (mg/g)
Calcio*	34.81e	149.42c	157.49b	115.20d	248.67 ^a
Magnesio*	0.17e	3.92d	4.84b	5.43a	4.57c
Fósforo	56.24	79.46	84.50	59.38	149.97
Ca:P	0.63	1.88	1.86	1.94	1.65

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P < 0.05).

* Espectroscopia de absorción Atómica (n=2).

Fósforo determinado mediante NMX-AA-029-SCFI-2001.

7.3.6.5 Determinación cuantitativa de albúmina sérica

La albúmina es la proteína más abundante del plasma, la cual es producida en el hígado y está constituida por 585 aa con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula y tiene un peso molecular de 67 kDa (Sugio *et al.* 1999). Tiene múltiples funciones, como transportar y almacenar ácidos grasos, oligoelementos, Ca⁺², hormonas sexuales, bilirrubina y medicamentos, además ejerce entre el 75% y 85% de la presión oncótica. La albúmina se utiliza en pacientes con quemaduras, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, desnutrición, problemas cardiovasculares e hipovolemia (Cristancho *et al.* 2007).

Antes de iniciar el experimento biológico, se cuantificó albúmina en sangre para conocer el estado nutricional de los animales antes del ensayo, se determinó la cantidad de albúmina sérica en seis animales obtenidos al azar y la concentración promedio encontrada fue de 4.11g/dL; éste es un valor normal ya que el rango recomendado es de 3.5-5 g/dL. Y nuevamente al terminar el ensayo biológico se volvió a cuantificar albúmina sérica, esta vez en todos los animales de cada grupo de las diferentes dietas y los promedios son los que se muestran en el Cuadro XIV. Con este parámetro se evidenció una situación real, la tortilla a pesar de ser la base de alimentación en México y en otros países de América Latina, como

tal no es un alimento nutricionalmente completo, a consecuencia de la escasa calidad de las proteínas del maíz, que se debe fundamentalmente a las deficiencias de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano (Bressani *et al.* 1953; Bressani *et al.* 1960); debido a lo anterior, en este trabajo se encontró un valor considerado como desnutrición leve en humanos según Villamayor *et al.* (2006) (< 3.5 – 2.8g/dL de albúmina sérica) para todos los grupos de animales alimentadas con dietas a base de tortilla y maíz (DB, DM, DT y DE), siendo la DC la única en mostrar un valor normal para este parámetro (Figura 42). La desnutrición resulta de la ingestión insuficiente de nutrientes, lo que desencadena una condición patológica por la carencia principalmente de proteínas, de carbohidratos y lípidos o deficiencia de oligoelementos esenciales donde se incluye el yodo, la vitamina A y el hierro (Fe). (Parra-Gómez *et al.* 2003). Otra observación física en los animales que resultaron con desnutrición leve, fue una apariencia diferente en el pelo (hirsuto y opaco) en comparación con las ratas alimentadas con la DC en las cuales se observó un pelo liso y brillante. La pérdida de pelo se manifestó principalmente en las extremidades inferiores (Figura 43). Este fenómeno ocurrió posiblemente por la deficiencia de proteína de buena calidad, así como de vitaminas y minerales (Stylianopoulos 1999).

Cuadro XIV. Contenido de albúmina sérica (g/dL) de cada grupo de ratas. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dieta	Albúmina (g/dL)	Valores de referencia*			
		Valores normales (g/dL)	Desnutrición Leve (g/dL)	Desnutrición Moderada (g/dL)	Desnutrición Grave (g/dL)
DC	4.09 ^a	3.5-5	< 3.5 – 2.8	2.7 – 2.1	< 2.1
DE	3.48 ^{ab}	3.5-5	< 3.5 – 2.8	2.7 – 2.1	< 2.1
DT	3.42 ^b	3.5-5	< 3.5 – 2.8	2.7 – 2.1	< 2.1
DM	3.24 ^b	3.5-5	< 3.5 – 2.8	2.7 – 2.1	< 2.1
DB	2.97 ^b	3.5-5	< 3.5 – 2.8	2.7 – 2.1	< 2.1

Medias con distinta letra en la misma columna, tiene una diferencia estadística significativa. (P < 0.05). (n= 6) * Valores de referencia en humanos (Villamayor y col., 2006).

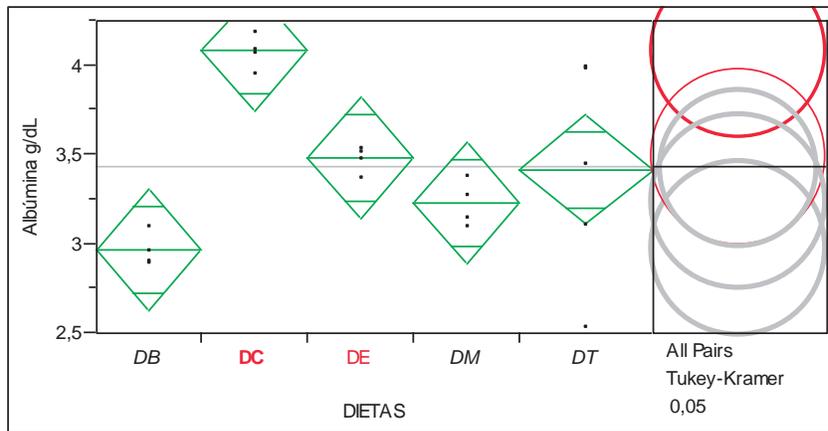


Figura 42. Análisis de ANOVA a los datos de albúmina sérica de cada grupo. DB (dieta de maíz blanco sin procesar), DC (dieta Control de caseína), DE (dieta de tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización). DM (dieta de tortilla Maseca®), DT (dieta de tortilla tradicional).

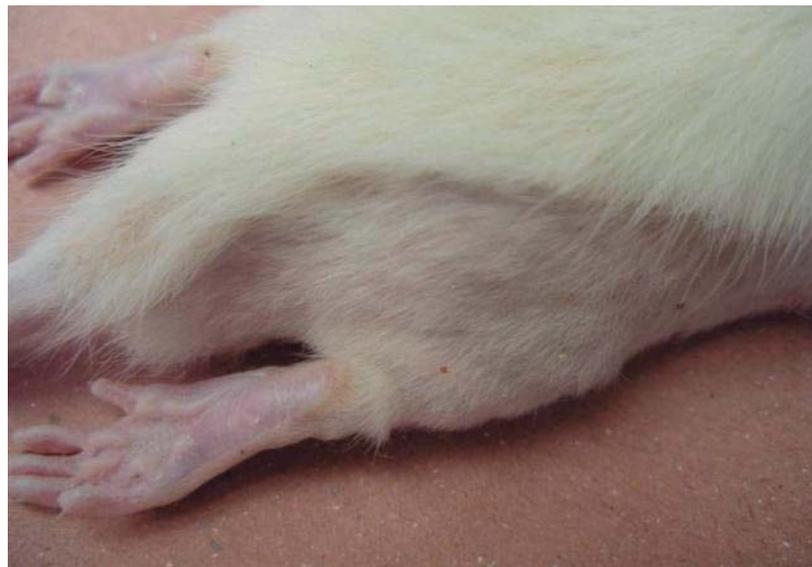


Figura 43. Presencia de alopecia en algunos animales alimentados con dieta de maíz blanco (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), y dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM); signo de desnutrición en el animal.

7.3.6.6 Otras observaciones durante el ensayo biológico

Durante el ensayo biológico se pudo observar que el volumen fecal de los animales alimentados con las dietas DB, DE y DC fue determinado de manera subjetiva y fue mayor al proveniente de los animales alimentados con las dietas DT y DM (Figura 44); esto se puede inferir de acuerdo a la diferencia en el aporte de fibra dietética en las diferentes dietas experimentales; ya que las primeras dietas contenían un aporte mayor de este componente, siendo de 10.32%, 11.07% y 6.12%, respectivamente. Las DT y DM contuvieron un aporte más bajo de fibra dietética, siendo de 4.98% y 4.73%, respectivamente. La materia fecal de DC midió 1.5 cm de longitud, la de la DE 1.3 cm, y la de la DB 1.1 cm, siendo las mayores, debido al adecuado aporte de fibra en estas dietas; mientras que la materia fecal de la DT y de la DM solo alcanzaron 1.0 cm de longitud y ésta última tuvo un aspecto más firme y compacto, lo cual indica evacuaciones menos periódicas y con mayor tiempo de residencia en el intestino; lo anterior puede posiblemente indicar una menor susceptibilidad de padecer cáncer de colon, como efecto local y una disminución en la absorción de los ácidos biliares, ya que éstos se unen a los residuos fenólicos y urónicos en la matriz de los polisacáridos, impidiendo la formación de micelas y la absorción de las grasas en el intestino. Como consecuencia de la depleción de ácidos biliares pueden disminuir los niveles de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis de novo de nuevos ácidos biliares, disminuyendo así la concentración de colesterol en sangre, también se observa una disminución de la absorción de glucosa, lípidos, aminoácidos y minerales; de estos últimos la absorción del calcio ha sido ampliamente estudiada, viéndose que el calcio atrapado y transportado hasta el colon se libera al hidrolizarse la fibra por efecto de las bacterias colónicas. Los ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación principalmente de la fibra soluble, facilitan la absorción de este calcio a través de las paredes del colon e incluso de las del recto (Escudero y González 2006).

La viscosidad de un alimento en la luz intestinal está gobernada por una parte por las características inherentes a la propia naturaleza de las fibras, tales como la presencia de polisacáridos solubles cargados, peso molecular, número de coloides en solución y su tamaño; y por otra parte las condiciones que establecen el medio intestinal durante la digestión (López *et al.* 1997).

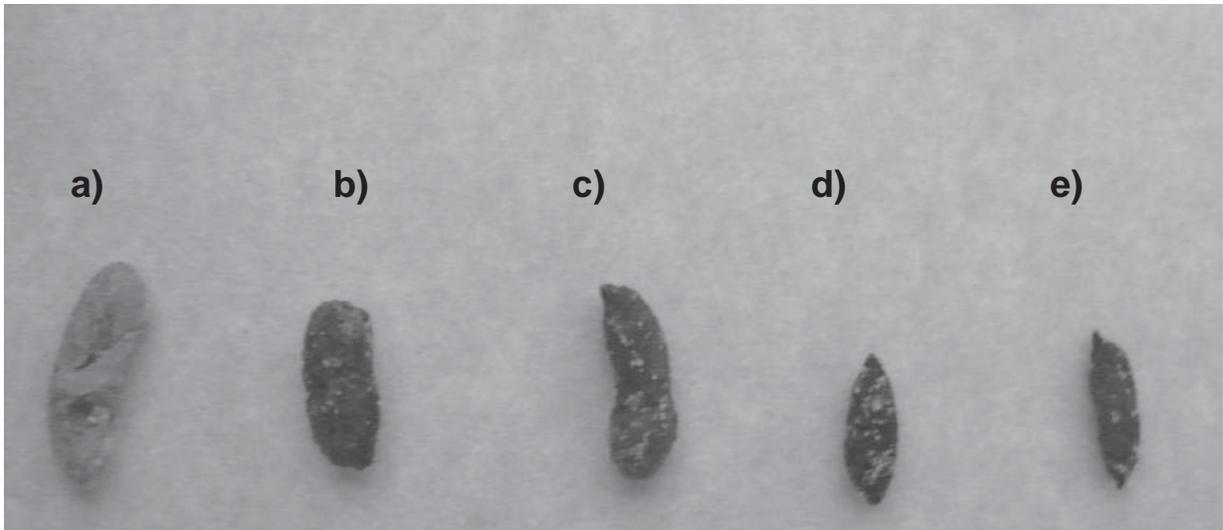


Figura 44. Diferencia de tamaño y volumen de la materia fecal provenientes de las dietas. a) Dieta Control de caseína (DC), b) Dieta de Maíz blanco sin procesar (DB), c) Dieta de tortilla ecológica (DE), d) Dieta de tortilla tradicional (DT) y e) Dieta de tortilla Maseca® (DM)

NUTRITIONAL STUDIES AND CALCIUM ABSORPTION OF WHOLE-GRAIN CORN TORTILLA MADE BY AN ECOLOGICAL METHOD OF NIXTAMALIZATION

VIII. CONCLUSIONES

- El método ecológico de nixtamalización resulta ser una alternativa viable al proceso tradicional de nixtamalización, debido a que el consumo de agua durante el proceso se logró disminuir en los lavados del nixtamal de tres veces a una vez durante el proceso; también en este trabajo se evidencio una disminución en la pérdida de materia orgánica proveniente del grano durante la nixtamalización, debido a que el cocimiento se llevo a cabo en condiciones menos alcalinas. Y el pH resultante del nejayote fue de 5.17 en comparación al 11.99 encontrado para el método tradicional, por lo cual éste efluente resultara menos costoso para su tratamiento como agua residual, por lo tanto este método se puede considerar para la elaboración de tortillas con menores daños al medio ambiente.
- La tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización logró una mejora a nivel nutricional con respecto a la tortilla tradicional y mejoró sustancialmente en comparación con la tortilla elaborada con la harina instantánea Maseca®; en cuanto a proteína tuvo un incremento del 6%, de extracto etéreo un 14% y de fibra dietética total 117%, con respecto a la tortilla tradicional y un 8% de proteína, 19% de extracto etéreo y 143% de fibra dietética total en comparación con la tortilla Maseca®; el mayor beneficio de la tortilla elaborada con el método ecológico es que no solo podrá considerarse como una fuente de calcio sino que debido a que no pierde el pericarpio del grano, la convierte en una buena y accesible fuente de fibra dietética; el cual es un componente dietario que ha tenido actualmente importancia, debido a que contribuye a solventar problemas de salud pública como las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, el cáncer de colon, y que de alguna manera pueden ser prevenidas si en nuestra alimentación incluimos fibra dietética; la recomendación diaria son 25g de fibra al día, si se considera que el consumo *per capita* de tortilla es de alrededor de 325 g/día, con ese consumo se aseguraría cubrir el requerimiento diario de fibra dietética.

- En el proceso ecológico de nixtamalización se empleo CaSO_4 como la fuente de calcio, y durante el ensayo biológico no hubo diferencia significativa entre el PER alcanzado por parte del grupo de animales alimentados con la tortilla ecológica con respecto al alimentado con tortilla tradicional, habiendo solo una diferencia de 0.04 unidades, aunque sí existió una notoria diferencia significativa de los alimentados con la tortilla ecológica con respecto a los de la tortilla Maseca® y del maíz blanco sin procesar.

NUTRITIONAL STUDIES AND CALCIUM ABSORPTION OF WHOLE-GRAIN CORN TORTILLA MADE BY AN ECOLOGICAL METHOD OF NIXTAMALIZATION

IX. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists 10th ed. The Association, St. Paul, MN. USA.
- Acero-Godinez M.G. 2000. **Uso del cerdo como modelo biológico para evaluar la calidad de la tortilla por dos procesos de nixtamalización y la fortificación de vitaminas y pasta de soya.** (Tesis de Maestría). Programa Institucional en Ciencias Pecuarias PICP. Colima, Colima. México. 14-16 pp.
- Anguiano-Ruvalcaba, G.L., A. Verver y Vargas-Cortina y D. Guzmán-De Peña. 2005. **Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa.** *Salud pública de México* 47(5):369-374
- Barberá, R. y R. Farré. 1992. **Revisión: Biodisponibilidad de los elementos traza.** *Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria* 32:381-399
- Basabe, B., V.M.C. Mena, V.M. Faci, V.A. Aparicio, S.A.M. López y A.R.M. Ortega. 2004. **Influencia de la ingesta de calcio y fósforo sobre la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(2): 203-208
- Bressani, R., G. Arroyave and N.S. Scrimshaw. 1953. **The nutritive value of Central American corns. I. Nitrogen, ether extract, cruda fiber and minerals of twenty four varieties in Guatemala.** *Food Research* 18: 261-267.
- Bressani, R., V. Benavides, E. Acevedo and M.A. Ortiz. 1990. **Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during rural tortilla preparation.** *Cereal Chemistry* 67 (6):515-518.
- Bressani, R., M. Breuner y M.A. Ortiz. 1989. **Contenido de fibra ácido y neutrodetergente y de minerales menores en maíz y su tortilla.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 39:382-391.

- Bressani, R., L.G. Elias, M. Santos, D. Navarrete y N.S. Scrimshaw. 1960. **El contenido de nitrógeno y de aminoácidos esenciales de diversas selecciones de maíz.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 10:85-100.
- Bressani, R. and E.T. Mertz. 1958. **Studies on corn protein IV. Protein and amino acid content of different corn varieties.** *Cereal Chemistry* 35:227-235.
- Bressani, R., R. Paz y Paz y N.S. Scrimshaw. 1958. **Corn nutrient losses. Chemical changes in corn during preparation of tortillas.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6:770-774.
- Burge, R.M. and W.J. Duensing. 1989. **Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran.** *Cereal Foods World* 34:535-538.
- Cámara, M.F. and L.M.A. Amaro. 2002. **Influence of dietary factors on calcium bioavailability.** *Biological Trace Element Research* 89:43-52
- Cristancho, P.R.E., C.J. Ramón y R.L.F. Arbeláez. 2007. **Proteínas plasmáticas como marcadores de peso molecular.** BISTUA Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona 5(2):58-67.
- Ehrlich, P.J. and L.E. Lanyon. 2002. **Mechanical strain and bone cell function: a review.** *Osteoporosis International* 13:688-700.
- Escudero, A.E. and S.P. González. 2006. **La fibra dietética.** *Nutrición Hospitalaria* 21(2):61-72.
- Farnham, D.E., G.O. Benson and R.B. Pearce. 2003. **Corn perspective and culture.** En: **Corn: Chemistry and technology.** 2nd. edition. Pamela J. White, L.A. Johnson editors. American Association of Cereal Chemists. pp. 1.
- Figueroa-Cárdenas J.D., M.G. Acero Godínez, N.L. Vasco Méndez, A. Lozano Guzmán, L.M. Flores Acosta y J. González Hernández. 2001. **Fortificación y evaluación de tortillas de nixtamal.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51(3):293-302.
- Figueroa-Cárdenas J.D., A. Rodríguez-Chong y J.J. Véles-Medina. 2006. **Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas masas y tortillas integrales.** *Patente mexicana PA/a/2005/011797.*
- Gerstner G. 2002. **El desafío de la fortificación.** *Énfasis Alimentación* 4:62-65.
- Gordillo A.G. 1990. **La industrialización y comercialización de maíz en México. El maíz en la década de los 90.** Ayuntamiento de Zapopan. 261-274 pp.

- Greger J.L. 1988. **Calcium bioavailability**. *Cereal Foods World* 33(9):796-800.
- Guerra V.R. 1978. **Extrusión una nueva tecnología aplicada al procesamiento de maíz normal y opaco-2**. (Tesis de Licenciatura). Fac. de Química. UNAM. México, DF.
- Hamer, A.J., J.R. Strachan, M.M. Black, C.J. Ibbotson, I. Stockley and R.A. Elson. 1996. **Biomechanical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement a comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone**. *Journal of Bone Joint Surgery* 78-B(3):363-368.
- Henry, Y.M. D. Fatayerji and R. Eastell. 2004. **Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck and radius in men and woman: relative contributions of bone size and volumetric bone mineral density**. *Osteoporosis International* 15(4):263-273.
- INEGI. 1992. **Abasto y comercialización de productos básicos**. México.
- Janie, E.M., M. Cregor and J. Sojka. 2001. **Interstitial fluid calcium, magnesium and phosphorus concentrations in bone, muscle and subcutaneous tissue sampled with ultrafiltration probes**. *Current Separations* 19(3):81-85.
- Khan, M.N., L.W. Rooney, D.T. Rosenow and F.R. Miller. 1980. **Sorghums with improved tortilla making characteristics**. *Journal of Food Science* 45(5):720-725.
- Landry, J. and T. Moureaux. 1980. **Distribution and amino acid composition of protein groups located in diferent histological parts of maize grain**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28(6):1186-1191.
- Lazner, F., M. Gowen, D. Pavasovic and I. Kola. 1999. **Osteopetrosis and Osteoporosis: two sides of the same coin**. *Human Molecular Genetics* 8(10):1839-1846.
- Lenza R.H. 1998. **Osteopenia y osteoporosis. Concepto. Clasificación, etiopatogenia y epidemiología**. *Medicine* 86(7):4023-4030
- López G., G. Ros, F. Rincón, M.J. Periago, C. Martínez y J. Ortuño. 1997. **Propiedades funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal**. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47(3):203-207.
- Maner H.J. 1990. **La calidad proteínica del maíz y la nutrición de porcinos**. En: **Maíz de alta calidad proteínica**. Parte II. CIMMYT-Purdue. Editorial Limusa, México DF. 65 pp.

- Manolagas S.C. and J.M. Olefski. 1988. **Metabolic bone and mineral disorders. Contemporary Issues in Endocrinology and metabolism.** Churchill Livingstone, New York, USA. 13-33 pp.
- Marshall, S., A. Milligan and R. Yates. 1994. **Experimental techniques and anaesthesia in the rat and mouse.** *AZCCART News* 7(1):4.
- Martínez-Flores H.E., F. Martínez-Bustos, C.J.D. Figueroa and J. González-Hernández. 2002a. **Studies and biological assays in corn tortillas made from fresh masa prepared by extrusion and nixtamalization processes.** *Journal of Food Science* 67(3):1196-1199.
- Martínez-Flores H.E., C.J.D. Figueroa, F. Martínez-Bustos, J. González-Hernández, G.M.E. Rodríguez, A.M.L. Baños López and M.G. Garnica-Romo 2002b. **Physical properties and composition of femurs of rat fed with diets based on corn tortillas made from different processes.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 53:158-160.
- Martínez P., M. Azuaga. 1997. **Medición del Modulo de Elasticidad de Young.** Laboratorio IV. Dpto. de Física-UBA.
- Mathews, van Holde. Bioquímica. 2ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill interamericana. España. 1998.
- Matkovic V. 1991. **Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modeling and consolidation of bone mass.** *American Journal Clinical Nutrition* 54:245S-260S.
- McKenzie D. 2002. **Are tortillas a Giffen Good in Mexico?.** *Economics Bulletin* 15(1):1-7.
- Méndez E.R.O. y J.C. Wyatt. 2000. **Contenido y absorción del calcio proveniente de la dieta del noroeste de México. Una retrospectiva bibliográfica.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(4):330-333.
- Meza J. M., E.E. Franco, M.C.M. Farias, F. Buiochi, R.M. Souza y J. Cruz. 2008. **Medición del módulo de elasticidad en materiales de ingeniería utilizando la técnica de indentación instrumentada y de ultrasonido.** *Revista Metalúrgica de Madrid* 44(1):52-65.
- Milán J., R. Gutiérrez-Dorado, E.O. Cuevas-Rodríguez, J.A. Garzón-Tiznado and C. Reyes-Moreno. 2004 **Nixtamalized flour from quality protein maize (*Zea mays* L), optimization of alkaline processing.** *Plant Foods for Human Nutrition* 59:35-44.

- Mira, F.L.M. y D.E. De la Fuente. 2007. **Osteoporosis: una patología con afectación personal, familiar, laboral y social.** *Medicina y Seguridad del Trabajo* 52(206):43-47.
- Navas, S. De S.J., M.C. Soto, F.L.E. Fandiño y L. De Larrauri. 2007. **Banco de huesos y tejidos Fundación Cosme y Damián.** *Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de Cabeza y Cuello* 35(2):58-64.
- Niewoehner C. 1988. **Calcium and osteoporosis.** *Cereal Foods World* 33(9):784-787.
- NMX-AA-029-SCFI-2001. **Análisis de aguas – Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas** – Método de prueba (cancela a la NMX-AA-029-1981). 1-21 pp.
- Paredes-López O. and M.E. Saharópulos. 1983. **Maize. A review of tortilla production technology.** *Bakers Digest* 13:16-25.
- Parra-Gómez L.R., J. Téllez-Girón, B.C. Escobar. 2003. **La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio.** *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 46(1):32-36.
- Pflugfelder R.L., L.W. Rooney and R.D. Waniska. 1988. **Dry matter losses in commercial corn masa production.** *Cereal Chemistry* 65:127-132.
- Ponce-García N., C.J.D. Figueroa, G.A. López Huape, H.E. Martínez and R. Martínez-Peniche. 2008. **Study of viscoelastic properties of wheat kernels using compression load method.** *Cereal Chemistry* 85(5):667-672
- Prosky L., Nils-George Asp, F.T. Scheizer, W.J. DeVries and I. Furda. 1988. **Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study.** *Journal of the Association Official Analytical Chemistry* 71(5):1017-1023.
- Proulx A.M. and M.B. Reddy. 2009. **Fermentation and lactic acid addition enhance iron bioavailability of maize.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(7):2749-2754.
- Ramasamy I. 2006. **Recent advances in physiological calcium homeostasis.** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 44:237-273.
- Ranhotra G.S. 1985. **Nutritional profile of corn and flour tortillas.** *Cereal Foods World* 30(10):703-704.
- Rayas J.A., R. Rodríguez-Vera y A. Martínez. 2003. **Medición del módulo de Young en el hule látex usando ESPI.** *Revista Mexicana de Física* 49(6):555-564

- Revees P.G. 1997. **Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet.** *Journal of Nutrition* 127(5):838S-841S.
- Riancho M.J.A. y M.J. González. 2004. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Cap. 2. Metabolismo de Calcio, del Fósforo y del magnesio. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander, España. 7-12 pp.
- Rincón R.E, F.A. Ros, A.R. Claramunt y M.F. Arranz. 2004. **Caracterización mecánica del material óseo.** *Revista Tecnológica y Desarrollo* 2:4-8.
- Rooney L.W. and E.L. Suhendro. 1999. **Perspectives on nixtamalization (alkaline cooking) of maize for tortillas and snacks.** *Cereal Foods World* 44: 466-470.
- Ryder K.M., R.I. Shorr, A.J. Bush, S.B. Kritchevsky, T. Harris, K. Stone, J. Cauley and F.A. Tylavsky. 2005. **Magnesium intake from food and supplements is associated with bone mineral density in healthy older white subjects.** *Journal of the American Geriatrics Society* 53(11):1875-1880.
- Serra P.T., F. Roure y Q.A. Navarro. 2006. **Efecto de la congelación en rodillas animales: Estudio biomecánico experimental.** *Biomecánica* 14(2):72-80.
- Stylianopoulos C. 1999. **Efectos de la fortificación y enriquecimiento de tortillas de maíz en el crecimiento y desarrollo cerebral de ratas durante dos generaciones.** (Tesis de maestría). Centro de Biotecnología del Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. México. 65-67 pp.
- Sugio S., A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, and K. Kobayashi. 1999. **Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution.** *Protein Engineering* 12:439-446.
- Teegarden D., R.M. Lyle, G.P. McCabe, L.D. McCabe, W.R. Proulx, K. Michon, A.P. Knight, J.C. Conrad and C.M. Weaver. 1998. **Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women.** *American Journal of Clinical Nutrition* 68:749–754.
- Trejo-Gonzalez A., A.M. Feria-Morales and C. Wild-Altamirano. 1982. **The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation.** *Advances in chemistry series* 198:245-263.

- Vargas L.J.M. 1992. **Desarrollo de procedimientos tecnológicos para la utilización de amaranto en la producción de harinas instantáneas.** (Tesis de Doctorado). CINVESTAV-IPN. Irapuato, Gto., México.
- Villamayor B.L., R.G. Llimera, V.J. Vidal, C.G. Pérez-Crespo, N.C. Iniesta, S.M.C. Mira, P.M. Martínez and I.S. Rabell. 2006. **Valoración nutricional al ingreso hospitalario: iniciación al estudio entre distintas metodologías.** *Nutrición Hospitalaria* 21(2):163-72
- Weaver C.M. 2000. **The growing years and prevention of osteoporosis in later life.** *Proceedings of the Nutrition Society*, 59:103-106.
- Wertz S.K. 2005. **Maize: the native North American's legacy of cultural diversity and biodiversity.** *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 18:131-156.
- Zanchetta J.R. and J.R. Talbot. 2001. **Osteoporosis. Fisiopatología, Diagnóstico, Prevención y Tratamiento.** Editorial Médica Panamericana, S.A.