



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

T E S I S

“ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UN
EXTRACTO POLIFENÓLICO DE *Opuntia* spp.
NANOENCAPSULADO E INCORPORADO EN TORTILLA DE MAÍZ”

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

M.C. EUNICE TRANQUILINO RODRÍGUEZ

ASESORES DE TESIS:

D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

D.C. JOSÉ OCTAVIO RODILES LÓPEZ

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, AGOSTO DEL 2021.



DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO 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: "Estudio de las propiedades antioxidantes de un extracto polifenólico de *Opuntia* spp. nanoencapsulado e incorporado en tortilla de maíz" presentado por la M.C. Eunice Tranquilino Rodríguez con matrícula No. 0325238X, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctora en Ciencias.

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


ATENTAMENTE

Morelia, Mich., a 17 de junio de 2021


COMITÉ SINODAL



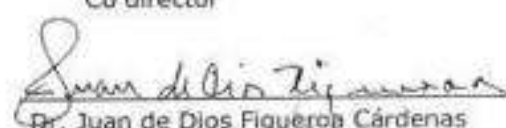
Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores
Director de Tesis



Dr. José Octavio Rodiles López
Co director



Dr. Carlos Cortés Penagos
Vocal



Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas
Vocal



Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez
Vocal

c.c.p. Archivo de la O BA

DEDICATORIA

A Dios; por darme la oportunidad de vivir, por haberme dado salud y permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y sobre todo por su infinito amor.

A mis padres; Enrique Tranquilino y Teresa Rodríguez, porque gracias a su ejemplo, a su apoyo, a sus consejos, a sus oraciones, y a la inmensa motivación de superación constante, me han convertido en una persona de bien, no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que me han y me siguen dando ¡los quiero mucho!

Al amor de mi vida; Yamin, por el gran amor, comprensión, confianza y tranquilidad que me has brindado siempre, y saber que estás y estarás toda la vida.

A mis hermanos; Kike y Kevin por estar a mi lado siempre; compartiendo toda clase de momentos, por crecer y formarnos juntos y saber que estamos para apoyarnos incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, a la Facultad de Químico Farmacobiología y al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos, por haberme dado la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado y ser un pilar importante en mi formación como profesionalista e investigadora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me brindó durante los estudios de doctorado, y con la cual me fue posible financiar mi posgrado.

A mi director de Tesis, el Dr. Héctor E. Martínez Flores, a quien admiro y respeto mucho como investigador, le agradezco haberme dado la oportunidad y confianza para realizar este proyecto, por su apoyo incondicional y por su valiosa dirección para llegar a la conclusión de esta tesis.

A mi co-director de Tesis, el Dr. J. Octavio Rodiles López, por ser un gran guía el transcurso de este proyecto, por su valiosa dirección en este trabajo, su gran apoyo y sobre todo su paciencia, por ser parte fundamental de este crecimiento como persona y como profesionalista le agradezco mucho el haber compartido sus conocimientos.

A los integrantes de mi comité sinodal, el Dr. Carlos Cortés Penagos, el Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas y a la Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez, por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo, y por su contribución en mi formación como profesionalista e investigadora, les agradezco mucho su tiempo y su experiencia.

Al Dr Guillermo C. G. Martínez Ávila, por permitirme realizar una estancia bajo su asesoría y a Israel y Alenjandra por su apoyo en para realización de algunos experimentos en el Laboratorio de Química y Bioquímica de la Universidad Autonoma de Nuevo León.

A la Dra. Martha E. García Pérez, por sus sugerencias y consejos para la mejora de este trabajo le agradezco mucho la orientación que me brindó y el impulsarme siempre a la mejora constante.

A mis amigos y/o colegas del laboratorio que de una forma u otra me ayudaron y apoyaron siempre que lo necesite de una manera cordial, ya sea con un consejo, con su compañía o con orientación académica durante la realización de este trabajo: Eréndira,

Robe, Lauro, Arian, Osvaldo, Jazz, Naye, Tere, Anai, Rafa, Esther, Gress, Guille, Mercedes, Areli, Julio, Karen, Alfonso y Migue.

“Agradezco infinitamente a todas las personas que ayudaron directa o indirectamente en la realización de este trabajo”

¡Muchas gracias por todo su apoyo!

“EL AGRADECIMIENTO ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN”

Lao-Tsé

ÍNDICE GENERAL

	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- NOPAL. <i>Opuntia spp.</i>	1
1.1.- DESCRIPCIÓN Y TAXONOMÍA.....	2
1.2.- PRODUCCIÓN.....	3
1.3.- COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y FITOQUÍMICA	4
2.- POLIFENOLES	4
2.1.- DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.....	4
2.2.- CLASIFICACIÓN.....	5
2.3.- BIOSÍNTESIS.....	6
2.4.- METABOLISMO	7
3.- POLIFENOLES EN <i>Opuntia spp.</i>	8
4.- SOBREPESO Y OBESIDAD.....	8
4.1.- FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD.....	9
4.2.- LA OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	9
5.- EFECTO DE POLIFENOLES DE <i>Opuntia spp.</i> EN LA OBESIDAD.....	10
6.- EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES.....	11
6.1.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	11
6.2.- FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES.....	12
7.- DESHIDRATACIÓN DE POLIFENOLES	13
7.1.- SECADO CONVENCIONAL.....	13
7.2.- SECADO POR ASPERSIÓN.....	13
8.- NANOENCAPSULACIÓN.....	14
8.1.- DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.....	14
8.2.- TÉCNICAS DE NANOENCAPSULACIÓN DE ALIMENTOS.....	15
8.3.- NANOENCAPSULACIÓN APLICADA A POLIFENOLES.....	17
9.- OPTIMIZACIÓN EN PROCESOS.....	18
10.- TORTILLA DE MAÍZ.....	19
10.1.- ALIMENTOS FUNCIONALES.....	20
II.- JUSTIFICACIÓN.....	22

III.- HIPÓTESIS	22
IV.- OBJETIVO GENERAL	23
1.- OBJETIVOS PARTICULARES	23
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	24
1.- MUESTRAS	24
2.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	24
2.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	24
3.- DESHIDRATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	26
3.1.- DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	26
3.2.- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS POR UPLC- Q/TOF-MS ²	27
4.- NANOENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	28
4.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL DE PARED.....	28
4.2.- NANOENCAPSULACIÓN USANDO MSR	29
4.3.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO POR UPLC-ESI-Q/TOF- MS ²	30
5.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES Y ESTABILIDAD EN EXTRACTO Y NANOCÁPSULAS DE <i>O. atropes</i>	31
5.1.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES	31
5.2.- ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	32
6.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TORTILLA DE MAÍZ ADICIONADA CON NANOCÁPSULAS CON <i>O. atropes</i>	33
6.1.- CALIDAD Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANO	33
6.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS.....	34
6.3.- ELABORACIÓN DE TORTILLAS DE MAÍZ.....	34
6.4.- VIDA DE ANAQUEL ACELERADA	35
6.5.- DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	36
VI.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
1.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN <i>O. ficus-indica</i> Y <i>O. atropes</i>	39
1.1.- <i>O. ficus-indica</i>	39
1.2.- <i>O. atropes</i>	44
1.3.- EFECTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO	48

2.- DESHIDRATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	50
2.1.- DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	50
2.1.- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS POR UPLC-Q/TOF-MS ²	52
3.- NANOENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>O. atropes</i>	56
3.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL DE PARED.....	56
3.2.- NANOENCAPSULACIÓN USANDO MSR.....	58
3.3.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO POR UPLC-ESI-Q/TOF-MS ²	64
4.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES Y ESTABILIDAD EN EXTRACTO Y NANOCÁPSULAS DE <i>O. atropes</i>	68
4.1.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES.....	68
4.2.- PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN ALMACENAMIENTO.....	69
5.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TORTILLA DE MAÍZ ADICIONADA CON NANOCÁPSULAS CON <i>O. atropes</i>	74
5.1.- CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE MAÍZ.....	74
5.2.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO EN HARINAS Y TORTILLAS.....	77
5.3.- ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO EN HARINAS Y TORTILLAS.....	78
5.4.- ANÁLISIS POLIFENÓLICO Y ANTIOXIDANTE EN HARINAS Y TORTILLAS.....	79
5.5.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN HARINAS.....	81
5.6.- VIDA DE ANAQUEL ACELERADA.....	83
5.7.- CONSUMO DIARIO DE ANTIOXIDANTES Y TORTILLAS.....	90
5.8.- DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	91
VIII.- CONCLUSIONES.....	95
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>Opuntia ficus-indica</i>	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>Opuntia atropes</i>	3
Tabla 3. Solventes utilizados para la extracción de varios compuestos polifenólicos. ...	12
Tabla 4. Valores experimentales para <i>O. ficus-indica</i>	39
Tabla 5. Modelo polinomial de segundo grado para <i>O. ficus-indica</i>	40
Tabla 6. Análisis de varianza para <i>O. ficus indica</i>	41
Tabla 7. Correlación entre variables dependientes en <i>O. ficus-indica</i>	42
Tabla 8. Optimización en extracciones para <i>O. ficus-indica</i>	43
Tabla 9. Valores experimentales de <i>O. atropes</i>	44
Tabla 10. Modelo polinomial de segundo grado para <i>O. atropes</i>	45
Tabla 11. Análisis de varianza para <i>O. atropes</i>	46
Tabla 12. Correlación entre variables dependientes en <i>O. atropes</i>	46
Tabla 13. Optimización en <i>O. atropes</i>	48
Tabla 14. Valores óptimos de extracción en <i>O. ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i>	50
Tabla 15. Deshidratación de extracto de <i>O. atropes</i>	51
Tabla 16. Perfil polifenólico de EODH obtenido por UPLC-Q/TOF-MS ²	53
Tabla 17. Perfil polifenólico de EODNA obtenido por UPLC-Q/TOF-MS ²	54
Tabla 18. Valores experimentales para la nanoencapsulación de <i>O. atropes</i>	60
Tabla 19. Modelo polinomial de segundo grado para nanoencapsulación.....	61
Tabla 20. Análisis de varianza para la nanoencapsulación.....	62
Tabla 21. Correlación entre las variables respuesta en el proceso de nanoencapsulación	63
Tabla 22. Perfil fenólico de nanocápsulas con extracto de <i>O. atropes</i> por UPLC-Q/TOF- MS ²	65
Tabla 23. Perfil polifenólico del extracto de <i>O. atropes</i> obtenido por UPLC-Q/TOF- MS ²	66
Tabla 24. Actividad antioxidante en EOA y en NEOA.	68
Tabla 25. Caracterización física del grano.	75
Tabla 26. Propiedades fisicoquímicas del grano.	76
Tabla 27. Caracterización bromatológica de harinas y tortillas.	77
Tabla 28. Análisis fisicoquímico de harinas y tortillas.....	79
Tabla 29. Características polifenólicos y antioxidantes de harinas y tortillas.	81
Tabla 30. Análisis microbiológico de harinas.....	82
Tabla 31. Parámetros de calidad de la tortilla.	82
Tabla 32. Parámetros de calidad de las tortillas a 41°C/60 % HR.....	90
Tabla 33. Digestión <i>in vitro</i>	93

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cultivo de <i>Opuntia</i> spp.	2
Figura 2. Representación química de una estructura fenólica.....	5
Figura 3. Polifenoles dietéticos; clasificación y ejemplos.	6
Figura 4. Metabolismo de polifenoles dietéticos.....	7
Figura 5. Representación de varias formas de las cápsulas.	15
Figura 6. Técnicas de nanoencapsulación de los alimentos.	16
Figura 7. Secador por nanoaspersión.	17
Figura 8. Extracción de compuestos polifenólicos en <i>O. ficus indica</i> y <i>O. atropes</i>	26
Figura 9. Deshidratación del extracto de <i>O. atropes</i>	27
Figura 10. Identificación por UPLC-Q/TOF-MS ² de polifenoles en extractos de <i>O. atropes</i>	28
Figura 11. Selección de material de pared para nanoencapsulación.	29
Figura 12. Nanoencapsulación del extracto de <i>O. atropes</i>	30
Figura 13. Identificación por UPLC-Q/TOF-MS ² de polifenoles en nanocápsulas y extracto de <i>O. atropes</i> purificados.....	31
Figura 14. Evaluación de estabilidad durante almacenamiento.	32
Figura 15. Productos; A) HMC y B) HMN.	34
Figura 16. Productos HMC y HMN empacados.....	36
Figura 17. Diagrama de superficie de respuesta para optimización simultánea en <i>O. ficus-indica</i>	43
Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta para la optimización simultánea en <i>O. atropes</i>	47
Figura 19. Extractos deshidratados A) EODH y B) EODNA.	50
Figura 20. Cromatogramas obtenidos por UPLC-Q/TOF-MS ² en muestras de <i>O. atropes</i> deshidratadas.....	55
Figura 21. Micrografías de nanocápsulas obtenidas por MEB.	57
Figura 22. Cromatogramas obtenidos por UPLC-Q/TOF-MS ² para nanocápsulas con extracto de <i>O. atropes</i> y extracto de <i>O. atropes</i> purificado..	67
Figura 23. Evaluación de estabilidad en almacenamiento en EOA y NEOA	72

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Evaluación de la eficiencia de encapsulación en almacenamiento.....	69
Gráfico 2. Evaluación de los ácidos fenólicos durante almacenamiento.	70
Gráfico 3. Evaluación de los flavonoides durante almacenamiento.	71
Gráfico 4. Evaluación de la inhibición del radical DPPH [•] durante almacenamiento.....	72
Gráfico 5. Evaluación de la inhibición del radical ABTS ^{•+} durante almacenamiento.....	73
Gráfico 6. Determinación de humedad en harinas y tortillas durante el almacenamiento.	83
Gráfico 7. Determinación de la Aw en harinas y tortillas durante almacenamiento.	84
Gráfico 8. Determinación del color; A) Luimosidad, B) Croma, C) °Hue; en harinas y tortillas durante almacenamiento.....	85
Gráfico 9. Determinación del pH en harinas y tortillas durante almacenamiento	86
Gráfico 10. Determinación de ácidos fenólicos en harinas y tortillas durante almacenamiento.....	87
Gráfico 11. Determinación de flavonoides en harinas y tortillas durante almacenamiento	88
Gráfico 12. Determinación del % Inhibición del radical DPPH [•] en harinas y tortillas durante almacenamiento.....	88
Gráfico 13. Determinación del % Inhibición del radical ABTS ^{•+} en harinas y tortillas durante almacenamiento.....	89

RESUMEN

La importancia en desarrollar investigación en la extracción de compuestos polifenólicos del género *Opuntia* spp., como fuente dietética de antioxidantes, es debido a que estos podrían ser responsables del beneficio protector en enfermedades crónicas como en el sobrepeso u obesidad que afectan al 75.2% de la población mexicana. El objetivo del presente estudio fue evaluar las propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos de un extracto de *Opuntia* spp. a través del proceso de nanoencapsulación, almacenamiento, digestión *in vitro* y en su incorporación en tortilla de maíz.

Se realizó la extracción de compuestos polifenólicos en harina de cladodios de *O. ficus-indica* y *O. atropes*, mediante un diseño Box-Behnken 3³ de superficie de respuesta, que incluyeron a los factores: concentración de etanol (70, 83 y 96%), temperatura (24, 50 y 76 °C) y tiempo (30, 75 y 120 minutos) y las respuestas que se evaluaron fueron; ácidos fenólicos, flavonoides y actividades antioxidantes por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. Posteriormente se deshidrató el extracto de *O. atropes* por dos métodos: en horno de secado (50°C/24h) y por nanoaspersión (flujo de gas 109 L/min, vacío 33 mbar, 105°C, 70% de aspersión), y se identificaron a los compuestos polifenólicos por UPLC-Q/TOF-MS². Para la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* se evaluaron materiales de pared; maltodextrina, aislado de proteína de soya y caseinato de calcio, por microscopía electrónica de barrido y el proceso de nanoencapsulación se llevó a cabo mediante un diseño Box Behnken 3³, y se evaluaron a los factores: formulación MP/E (1/1, 2.5/1, y 4/1), temperatura (95, 105 y 115 °C) y aspersión (40, 70 y 100%), las variables de respuesta fueron: rendimiento, velocidad de alimentación, tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación, ácidos fenólicos, flavonoides y actividades antioxidantes por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. Y se identificaron compuestos polifenólicos por UPLC-Q/TOF-MS² en el mejor tratamiento de nanoencapsulación. Se realizaron pruebas antioxidantes ([•]OH y H₂O₂) y de estabilidad en almacenamiento a 41°C/60% HR/48 días, en extracto de *O. atropes* (EOA) y en nanocápsulas con extracto de *O. atropes* (NEOA). Posteriormente, se evaluaron características polifenólicas y antioxidantes en tortilla control (TC; desarrolladas a partir de harina de maíz nixtamalizada) y tortillas con nanocápsulas (TN; desarrolladas a partir de harina de maíz nixtamalizada con 3 % de NEOA) y se evaluó la vida de anaquel de los productos a 41°C/60% HR/48 días, que fueron equivalentes a 192 días a 21°C. Finalmente, se evaluó en EOA, NEOA, TC y TN, la estabilidad de ácidos fenólicos, flavonoides y actividades antioxidantes por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} durante el proceso de digestión *in vitro*.

En esta investigación se determinó que, en condiciones optimizadas de extracción, los cladodios de *O. ficus-indica* y de *O. atropes* no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en su contenido fenólico y antioxidante, sin embargo, se necesitó 37.0% menos temperatura y 11.3% menos etanol, para la extracción en *O. atropes*, comparado con la extracción en *O. ficus-indica*. En el extracto de *O. atropes* se obtuvieron 0.920 mg EAG/g de ácidos fenólicos, 8.619 mg EQ/g de flavonoides, y actividad antioxidante de 0.160 mg EAG/g en términos de DPPH[•] y 0.567 mg EAG/g en ABTS^{•+}. Por lo que se utilizó el extracto de *O. atropes* en las etapas siguientes de deshidratación, nanoencapsulación e

incorporación en tortilla de maíz. La deshidratación por nanoaspersión no afectó el contenido de compuestos polifenólicos ni la actividad antioxidante del extracto de *O. atropes*, que presentó valores de 11.80 mg EAG/g de ácidos fenólicos y 22.26 mg EQ/g de flavonoides, e inhibición (%) del radical DPPH[•] de 17.92% y ABTS^{•+} de 54.08%, y se identificaron por UPLC-Q/TOF-MS² principalmente glucósidos de kaempferol e isoramnetina y el lignano medioresinol se identificó por primera vez en esta especie de *Opuntia* spp. Se encontró que la maltodextrina presentó mejores propiedades en la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* y un diseño Box Behnken 3³ permitió identificar el tratamiento de nanoencapsulación con las características de calidad más adecuadas y se confirmó que la nanoencapsulación protegió algunos isómeros de isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O- (ramnosil-hexósido) y 4-O-glucósido del ácido *p*-cumárico. Así mismo, las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* presentaron mayor actividad de captación del radical [•]OH y mayor estabilidad de sus componentes bioactivos durante almacenamiento comparados con el extracto de *O. atropes* libre. La incorporación de nanocápsulas con extracto de *O. atropes* en la harina de maíz nixtamalizada incrementó compuestos fenólicos y actividad antioxidante del alimento, y la nanoencapsulación logró proteger a estos compuestos durante la elaboración de tortilla. La vida de anaquel de la harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas se estableció en 144 días a 21°C, debido a que durante el almacenamiento y elaboración de la tortilla los flavonoides se siguieron preservando en un 59.84% que fueron equivalentes a concentraciones mayores a 14 mg EQ/100 g b.s. La evaluación de la digestión *in vitro*, comprobó el efecto protector de las nanocápsulas (NEOA), los ácidos fenólicos incrementaron un 19.5 %, los flavonoides un 41.81 % y actividad antioxidante por captura del radical ABTS^{•+} en un 19.17 % después de la digestión duodenal con respecto al extracto de *O. atropes* libre (EOA). Así mismo, la incorporación de NEOA en tortilla (TN) incrementó el contenido polifenólico y antioxidante después de la digestión duodenal *in vitro* en 10.74 mg EAG/100 g b.s. de ácidos fenólicos, 17.69 mg EQ/100g b.s. de flavonoides, 10.97 % actividad antioxidante en DPPH[•] y 31.44 % de actividad antioxidante en ABTS^{•+}, con respecto a TC. Por lo que se determinó que es factible incorporar nanocápsulas con extracto de *O. atropes* en tortilla de maíz y con ello incrementar la cantidad de compuestos bioactivos, principalmente flavonoides.

Palabras clave: *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia atropes*, compuestos bioactivos, flavonoides, alimento funcional.

ABSTRACT

The importance in developing research in the extraction of polyphenolic compounds of the genus *Opuntia* spp., as a dietary source of antioxidants, is since these could be responsible for the protective benefit in chronic diseases such as overweight or obesity that affect 75.2% of the Mexican population. The objective of the present study was to evaluate the antioxidant properties of polyphenolic compounds of an extract of *Opuntia* spp. through the process of nanoencapsulation, storage, digestion *in vitro* and its incorporation in corn tortilla.

The extraction of polyphenolic compounds in flour from cladodes of *O. ficus-indica* and *O. atropes* was carried out, using a response surface Box-Behnken 3³ design, which included the factors: ethanol concentration (70, 83 and 96%), temperature (24, 50 and 76 °C) and time (30, 75 and 120 minutes) and the responses that were evaluated were; phenolic acids, flavonoids and antioxidant activities by capturing DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. Subsequently, the extract of *O. atropes* was dehydrated by two methods: in a drying oven (50 °C/24h) and by nano-spray (gas flow 109 L/min, vacuum 33 mbar, 105 °C, 70% spray). and polyphenolic compounds were identified by UPLC-Q/TOF-MS². Wall materials were evaluated for the nanoencapsulation of the *O. atropes* extract; maltodextrin, isolate of soy protein and calcium caseinate, by scanning electron microscopy and the nanoencapsulation process was carried out using a Box Behnken 3³ design, and the factors were evaluated: formulation WP/E (1/1, 2.5/1, and 4/1), temperature (95, 105 and 115 °C) and spraying (40, 70 and 100%), the response variables were: yield, feeding speed, particle size, efficiency of encapsulation, phenolic acids, flavonoids and antioxidant activities by capturing DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. And polyphenolic compounds were identified by UPLC-Q/TOF-MS² in the best nanoencapsulation treatment. Antioxidant activity ([•]OH and H₂O₂) and storage stability tests were carried out at 41 °C/60% RH/48 days, in *O. atropes* extract (OAE) and nanocapsules with *O. atropes* extract (NOAE). Subsequently, polyphenolic and antioxidant characteristics were evaluated in control tortilla (TC; developed from nixtamalized corn flour) and tortillas with nanocapsules (TN; developed from nixtamalized corn flour with 3% NOAE) and the shelf life of the products at 41 °C/60% RH/48 days, which were equivalent to 192 days at 21 °C. Finally, the stability of phenolic acids, flavonoids and antioxidant activities by capturing DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals during the *in vitro* digestion process were evaluated in OAE, NOAE, TC and TN.

In this research it was determined that, under optimized extraction conditions, the cladodes of *O. ficus-indica* and *O. atropes* did not present significant differences ($p > 0.05$) in their polyphenolic and antioxidant content, however, 37.0% less temperature and 11.3% less ethanol were needed for the extraction in *O. atropes* as compared to *O. ficus-indica*. In addition, extracts from *O. atropes* had 0.920 mg GAE/g of phenolic acids, 8.619 mg QE/g of flavonoids, and antioxidant activity of 0.160 mg GAE/g in DPPH[•] and 0.567 mg GAE/g in ABTS^{•+} were obtained. Therefore, the extract of *O. atropes* was used in the following stages of dehydration, nanoencapsulation and incorporation in corn tortilla. Dehydration by nano-spray did not affect the content of phenolic compounds or the antioxidant activity of the extract of *O. atropes*. which presented values of 11.80 mg GAE/g of phenolic acids and 22.26 mg QE/g of flavonoids, and % inhibition of the DPPH[•] radical of

17.92% and ABTS^{•+} of 54.08%, and kaempferol and isoramnetin glycosides were identified mainly by UPLC-Q/TOF-MS² and medioresinol lignan was identified for the first time in this species of *Opuntia* spp. It was found that maltodextrin presented better properties in the nanoencapsulation of the *O. atropes* extract and a Box Behnken 3³ design allowed identifying the nanoencapsulation treatment with the most suitable quality characteristics and it was confirmed that nanoencapsulation protected some isomers of isoramnetin 3-O-rhamnoside-7-O- (rhamnosyl-hexoside) and 4-O-glucoside of *p*-coumaric acid. Likewise, the nanocapsules with *O. atropes* extract showed higher activity of capturing the •OH radical and greater stability of its bioactive components during storage compared to the free *O. atropes* extract. The incorporation of nanocapsules with *O. atropes* extract in the nixtamalized corn flour increased polyphenolic compounds and antioxidant activity of the food, and nanoencapsulation was able to protect these compounds during tortilla making. The shelf life of corn flour nixtamalized with nanocapsules was established at 144 days at 21 °C, since during the storage and elaboration of the tortilla the flavonoids continued to be preserved in 59.84%, which were equivalent to at concentrations greater than 14 mg EQ/100 g b.s. The *in vitro* digestion evaluation confirmed the protective effect of nanocapsules (NOAE), phenolic acids increased by 19.5%, flavonoids by 41.81% and antioxidant activity by capture of the radical ABTS^{•+} by 19.17% after the duodenal digestion with respect to the extract of *O. atropes* free (OAE). Likewise, the incorporation of NOAE in tortilla (TN) increased the polyphenolic and antioxidant content after duodenal digestion *in vitro* by 10.74 mg GAE/100 g b.s. of phenolic acids, 17.69 mg QE/100g b.s. of flavonoids, 10.97% antioxidant activity in DPPH• and 31.44% antioxidant activity in ABTS^{•+}, with respect to TC. Therefore, it was determined that it is feasible to incorporate nanocapsules with extract of *O. atropes* in corn tortilla and thereby increase the number of bioactive compounds, mainly flavonoids.

Key words: *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia atropes*, bioactive compounds, favonoids, functional food.

I.- INTRODUCCIÓN

En México, se han identificado y utilizado numerosas plantas en la medicina popular para prevenir y curar enfermedades crónicas, entre ellos, *Opuntia* spp., que incluye a los frutos, tallos, semillas y cladodios, ya que exhiben diversos beneficios para la salud y un alto potencial biotecnológico. Los cladodios de *Opuntia* spp. son una buena fuente de fibras dietéticas, lo que contribuye a reducir el peso corporal (Hasani-Ranjbar et al., 2013; Uebelhack et al., 2014; El-Mostafa et al., 2014), y los extractos de cladodios de *Opuntia* spp. contienen compuestos polifenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos (Corral et al., 2008; Guevara-Figueroa et al., 2010; Sánchez et al., 2014) que podrían ser responsables del beneficio protector de las dietas enriquecidas con *Opuntia* spp. en enfermedades crónicas, como la obesidad, donde la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel importante (Díaz et al., 2017).

La obesidad es un problema de salud grave y de preocupación mundial que no solo reduce la esperanza de vida, sino que también se asocia con el desarrollo de muchas enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad del hígado graso y cáncer, con alrededor de 650 millones de personas obesas en el mundo, se considera la quinta causa de riesgo de muerte (WHO, 2017; WCRF/AICR, 2017; Reilly et al. 2018).

Es por ello que cobra una gran importancia la inclusión de polifenoles en concentraciones adecuadas en la dieta, sin embargo, al ser moléculas sensibles a una gran variedad de factores ambientales y de procesamiento, es necesario mejorar su estabilidad para crear productos con una vida de anaquel prolongada. La encapsulación vía secado por aspersión es una estrategia utilizada para abordar este problema, y con ello disminuir la degradación, mejorar solubilidad y disponibilidad de este tipo de compuestos bioactivos (Ali et al., 2020; Assadpour y Jafari, 2019).

Los alimentos funcionales tienen el potencial de convertirse en el futuro de la prevención primaria de muchas enfermedades crónicas (Scicchitano et al., 2014). Además, los estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo regular de alimentos de origen vegetal se asocia con un menor riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (Dziki et al., 2014). Por lo tanto, la incorporación de fitoquímicos y particularmente de polifenoles naturales en la formulación de alimentos convencionales, como la tortilla de maíz, un producto de alto consumo por la población mexicana, puede mejorar sus potenciales beneficios para la salud y con ello contribuir en la prevención y disminución de factores de riesgo que se asocian con el sobrepeso y la obesidad.

1.- NOPAL. *Opuntia* spp.

El nopal es un alimento endémico de México. Existen alrededor de 200 especies y 101 se encuentran en nuestro país. El proceso de domesticación del nopal comenzó hace aproximadamente 8 mil años y fue el alimento principal de los grupos chichimecas. El territorio mexicano se considera el centro de mayor diversidad de cactus del continente,

así como el centro de diversidad. En la familia Cactaceae, el género *Opuntia* spp. presenta características morfológicas y anatómicas que le permiten adaptarse a diferentes condiciones ambientales, y al ser tan eficientes en el uso de agua crecen bien en ambientes áridos y semiáridos (Pareek et al., 2003; Griffith, 2004; Reyes-Agüero et al., 2005; SIAP, 2014; SIAP, 2020).

1.1.- DESCRIPCIÓN Y TAXONOMÍA


Opuntia spp. es una planta suculenta, xerófila, espinosa o sin espinas de múltiples propósitos (Griffith, 2004). Tiene diferentes partes, que incluyen flor, semilla, cladodios, fruto con piel y pulpa. *Opuntia* spp. es el género más importante económicamente, ya que tiene un gran número de especies que producen frutos y cladodios comestibles, también conocidos como tallos, almohadillas, nopales o pencas (Santo-Ares et al., 2009; Guevara-Figueroa et al., 2010; Arba et al., 2017). Anatómicamente los cladodios de la planta de *Opuntia* spp. son las partes espinosas o sin espinas en forma de paleta, oblongas (hasta 70-80 cm), gruesas y suculentas con diferentes anchos, poseen una epidermis cerosa que repele el agua y son capaces de realizar fotosíntesis y reproducción asexual, pueden tener pequeñas cerdas (glochidia) con púas en las areolas (Heuzé y Tran, 2017). La imagen del cultivo de *Opuntia* spp. (nopal verdura) se muestra en la Figura 1 (SADER, 2019).



Figura 1. Cultivo de *Opuntia* spp.


Opuntia ficus-indica (L.) Mill. es la especie del género *Opuntia* spp. más cultivada, estudiada y consumida a nivel mundial, sin embargo, hay otras especies de importancia regional, que han sido menos estudiadas como *Opuntia atropes* Rose, que es una especie endémica de México (Bravo-Hollis, 1978), conocida como "nopal blanco" (Colunga-García et al., 1986; Reyes-Agüero y Rivera, 2011), y es una especie apreciada por sus cladodios inmaduros o nopalitos (López-Gutiérrez et al., 2015). En las Tablas 1 y 2 se muestra la clasificación taxonómica de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill y *Opuntia atropes* Rose, respectivamente.

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Opuntia ficus-indica*.

Nombre científico:	<i>Opuntia ficus-Indica</i> L. Miller	
Clase:	Magnoliopsida	
Subclase:	Caryophyllidae	
Orden:	Caryophyllales	
Familia:	Cactaceae	
Subfamilia:	Opuntioideae	
Género:	<i>Opuntia</i>	
Subgénero	<i>Platyopuntia</i>	
Especie	<i>Opuntia ficus-indica</i>	

(Guiggi 2008; Scheinvar, 1999).

Tabla 2. Clasificación taxonómica *Opuntia atropes*.

Nombre científico:	<i>Opuntia atropes</i> Rose	
Reino:	Plantae	
División:	Tracheophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Orden:	Caryophyllales	
Familia:	Cactaceae	
Género:	<i>Opuntia</i>	
Especie	<i>Opuntia atropes</i>	

(Arias, 2008).

1.2.- PRODUCCIÓN

En México la principal producción de nopalitos es generada de marzo a junio, donde se concentra el 53.3% del volumen total nacional que asciende a 891 mil 821 toneladas, sembradas en 12 mil 799 hectáreas, de las cuales se cosechan el 97.8%; de éstas, el 16% se utiliza para producir tallos de cactus como hortaliza, 22% como forraje y 62% como fruta (tuna). A nivel nacional, los principales productores de este cultivo son Morelos y Ciudad de México, quienes aportan el 70.4 % del volumen total de nopales; le siguen en importancia, el Estado de México, con una participación de 10.2 %, y Jalisco, con el 4.12 %. La mayor producción de nopal se localiza en la zona centro de México. El tamaño que más se comercializa de la hortaliza es entre 15 a 20 centímetros de largo, y con un peso promedio de 100 gramos por pieza (Reyes-Agüero et al., 2005; SIAP, 2020).

Las características geográficas adecuadas para la producción de nopalitos son: altitud, 0 a 2,600 msnm; lluvia, hasta 400 mm; temperatura, 18 a 26 °C; edafología, suelos con textura arenosa, arcillosa y alto contenido de sales y pH de 6.5-8.5 (SIAP, 2019).

Los cultivares que pertenecen a *Opuntia ficus-indica* son los de mayor importancia económica en el mundo. Su consumo como verdura en el mercado interno ronda los 6.4 kg per cápita y existe una demanda creciente por él en Estados Unidos y Canadá, donde el producto alcanza ventas equivalentes a 31 y 2.9 millones de dólares, respectivamente (SIAP, 2020).

1.3.- COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y FITOQUÍMICA

El componente principal de los cladodios de *Opuntia* spp. es el agua (80 a 95%), seguido de carbohidratos (3 a 7%), fibras (1 a 2%) y proteínas (0.5 a 1%). Sin embargo, la composición química de los cladodios se modifica según la etapa de madurez, temporada de cosecha, condiciones ambientales, tratamiento poscosecha y especie (Guevara-Figueroa et al., 2010; Contreras-Padilla et al., 2011; Hernández-Urbiola et al., 2011).

Los cladodios de *Opuntia* spp. son conocidos por su alto contenido de fibra que incluye pectina, lignina, mucílago, celulosa y hemicelulosa, que son beneficiosos para el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Ayadi et al., 2009). Otros compuestos también se han relacionado con sus propiedades saludables en humanos: minerales, polifenoles, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos (El-Mostafa et al., 2014).

Aunque existen diferencias en la composición fitoquímica entre las especies de *Opuntia* spp. domesticadas y silvestres, se ha informado la presencia de compuestos antioxidantes (flavonoides, ácidos fenólicos, betaxantinas, betacianinas y alcaloides), pigmentos (carotenoides, betalaínas como indicaxantina) en todas las partes anatómicas de *Opuntia* spp. incluidas semillas, raíces, frutos, cladodios, etc. (Yasmeen et al., 2012; Ennouri et al. 2014).

2.- POLIFENOLES

Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas y constituyen un conjunto significativo de antioxidantes naturales que revelan simultáneamente numerosas actividades biológicas, como propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Kabera et al., 2014, Vyas, 2016; Luca et al., 2020; Myint et al., 2020).

2.1.- DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA

El término "fenólico" o "polifenol" se definen químicamente como sustancias que abarcan un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes o grupos hidroxilo, con subproductos funcionales (ésteres, éteres metílicos, glucósidos, etc.), y sus estructuras moleculares simples pueden diferir del polímero compuesto de alta masa molecular. El término "fenol" se explica porque presenta un anillo de fenilo que tiene sustituyentes hidroxilo simples o adicionales, mientras que "polifenol" se usa para expresar productos naturales que tienen por lo menos, anillos de fenilo dobles que llevan sustituyentes hidroxilo simples o adicionales (Harborne, 1989; Balasundram et al., 2006; Ghasemzadeh y Jaafar, 2014). La representación de la estructura química de un fenol se muestra en la Figura 2.

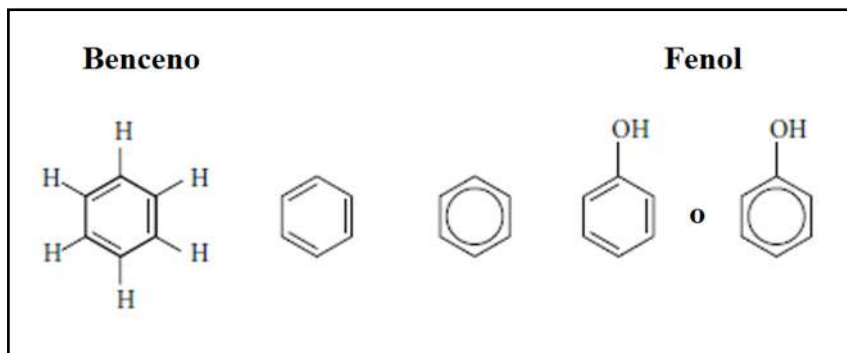


Figura 2. Representación química de una estructura fenólica.

Los polifenoles van desde estructuras simples como los ácidos fenólicos hasta formas complejas como los taninos. Al igual que todos los demás antioxidantes, la forma estructural del polifenol define su capacidad para eliminar los radicales libres. Lo más importante es el grado de metoxilación y el número de grupos -OH. Además, la actividad antioxidante está estrechamente entre el átomo de H y el átomo de O, en el grupo hidroxilo es menor que en los compuestos alifáticos, debido a que el grupo -OH está unido al sistema de anillo aromático. Este fenómeno resulta del efecto de resonancia de los anillos aromáticos (Yordi et al., 2012).

Los compuestos polifenólicos son antioxidantes importantes ya que los intermedios de radicales fenoxi son relativamente estables debido a la resonancia y actúan como terminadores de la ruta de propagación al reaccionar con otros radicales libres. Por otro lado, los grupos hidroxilo fenólicos pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a un radical libre que confiere actividades de captación de radicales. También amplían el sistema aromático conjugado para deslocalizar un electrón desapareado, y algunos compuestos fenólicos con grupos dihidroxi pueden conjugar metales de transición, evitando la formación de radicales libres inducidos por metales (Fernández-López et al., 2010).

2.2.- CLASIFICACIÓN

Los polifenoles se pueden dividir en cinco grupos estructurales: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos que, a su vez, se componen de varios subgrupos, y que se presentan en la Figura 3. De todas estas categorías, los flavonoides son el grupo más estudiado y muchos de ellos son los encargados de dar colores atractivos a frutos, flores y hojas (Pandey y Rizvi, 2009).

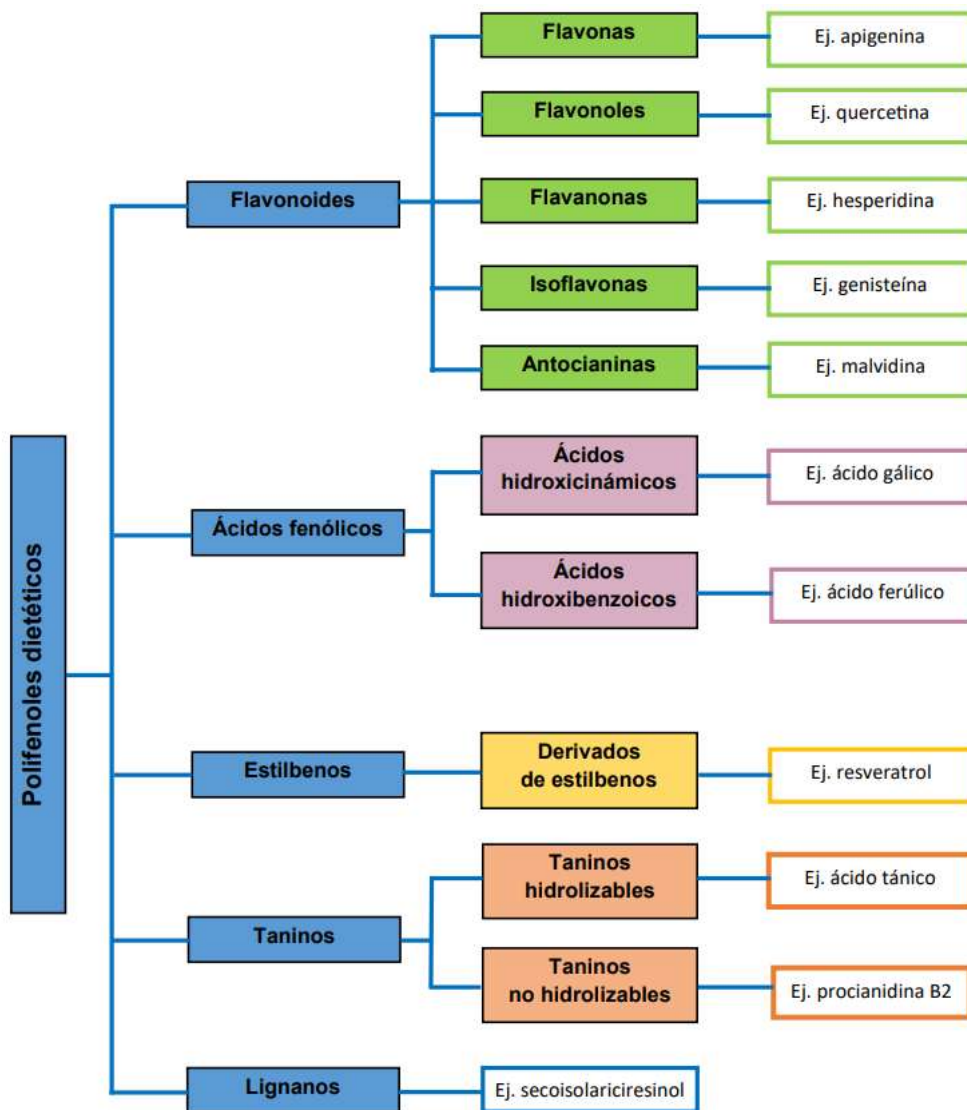


Figura 3. Polifenoles dietéticos; clasificación y ejemplos.

2.3.- BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de los compuestos polifenólicos tiene lugar en la superficie del retículo endoplásmico (RE) en las células vegetales (Acosta-Estrada et al., 2014). La fenilalanina y la tirosina son precursores de la biosíntesis de diferentes clases de compuestos polifenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, ligninas y taninos. En la biosíntesis de los compuestos polifenólicos intervienen una gran variedad de enzimas (Shahidi y Naczki, 2003). Por ejemplo, en la biosíntesis de flavonoides, también conocida como la vía de la rama de flavonoides, la combinación de tres moléculas de malonil coenzima A y p-cumaroil CoA, lleva a la formación de naringenina chalcona con la ayuda de

chalcona sintasa, seguida de la alteración en flavonona por chalcona isomerasa. La flavonona producida se convierte en diferentes clases de flavonoides individuales como flavona, flavonol, flavonol, flavanona, isoflavona y antocianinas (Shahidi y Yeo, 2018). Los compuestos polifenólicos sintetizados en el RE se transfieren a otros órganos diana a través de proteínas transportadoras de membrana y vesículas. Una gran proporción de los compuestos polifenólicos sintetizados se transfieren a la vacuola, en la que coexisten con otros ácidos orgánicos; aproximadamente el 80% de los compuestos polifenólicos se localizan en la vacuola. Mientras tanto, algunos compuestos polifenólicos se transfieren a la matriz de la pared celular y forman enlaces covalentes como éster, éter y enlaces C–C con sustancias de la pared celular (p. ej., celulosa, pectina, arabinosilano y proteínas estructurales) (Shahidi y Yeo, 2018).

2.4.- METABOLISMO

Tras su consumo ciertos polifenoles están presentes en forma de ésteres, glucósidos o polímeros; y, en consecuencia, no pueden absorberse en su forma nativa. Inicialmente, deben ser hidrolizados por las enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de su absorción. Durante la absorción, los polifenoles se someten a varios procesos de conjugación como metilación, sulfatación y/o glucuronidación inicialmente en las células intestinales y luego en el hígado (D Archivo et al., 2007). Los polifenoles no absorbidos se biotransforman en una serie de metabolitos fenólicos de bajo peso molecular dentro del intestino (Tomás-Barberán et al., 2016). Estos metabolitos pueden tener una mejor absorción que sus precursores y pueden tener propiedades beneficiosas para la salud en el sistema digestivo (efectos locales) y, después de ser absorbidos, en los tejidos y órganos (efectos sistémicos). En la Figura 4 se presenta el esquema del metabolismo de los polifenoles dietéticos (Cueva et al., 2017).

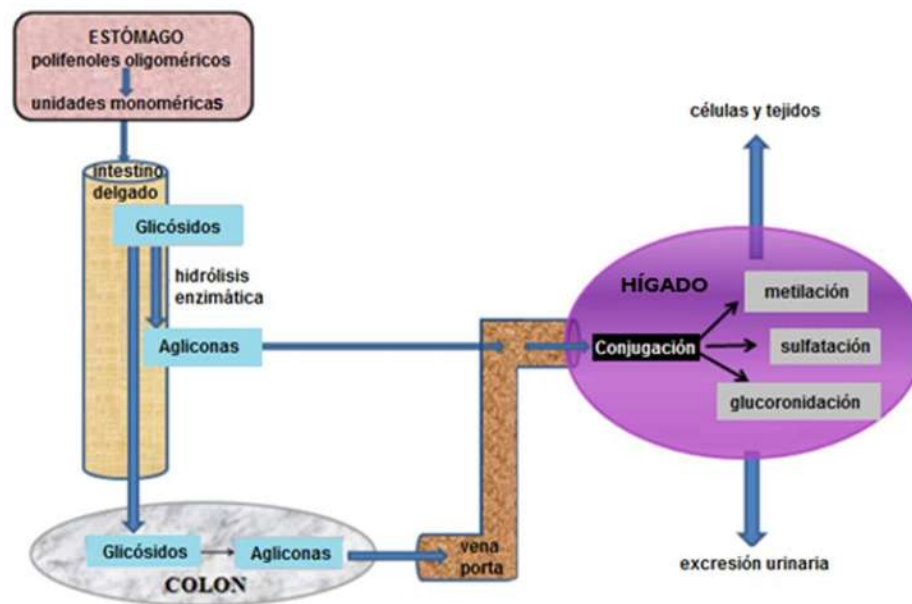


Figura 4. Metabolismo de polifenoles dietéticos.

3.- POLIFENOLES EN *Opuntia* spp.

Informes científicos han indicado que la presencia de moléculas naturales en *Opuntia* spp. pueden tener un gran interés potencial en la salud humana y en la medicina (Alimi et al., 2010; Valente et al., 2010; Morales et al., 2012). El género *Opuntia* spp. es rico en compuestos antioxidantes como los flavonoides, ácidos fenólicos, betaxantina y betacianina (Tesoriere et al., 2004). Y las diversas partes de la planta del cactus (pulpa, cáscara, semillas y cladodios) han revelado tener actividad antioxidante (Tounsi et al., 2011). Por lo que la planta de *Opuntia* spp. es una fuente interesante de compuestos bioactivos vegetales (Gaballah et al., 2016).

En los cladodios de *Opuntia* spp. se han identificado diferentes polifenoles, que incluyen ácidos fenólicos, como los ácidos; gálico, cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, ferúlico, salicílico, así como flavonoides; isoquercetina, isoramnetina-3-O-glucósido, nicotiflorin, rutina y narcisina (Gallegos-Infante et al., 2009; Valente et al., 2010; Bensadón et al., 2010; Guevara-Figueroa et al., 2010). De los extractos de cladodios del género *Opuntia* spp. se han aislado alcaloides, indicaxantina, neobetanina y varios flavonoides junto con abundantes polisacáridos (Valente et al., 2007), que han mostrado efectos antidiabéticos y antiglicación (Yang et al., 2008), además se ha mostrado capacidad de eliminación de radicales libres, por lo que confieren protección contra la oxidación de metales de transición y la peroxidación de lípidos (Zhou y Elias, 2013). También se ha atribuido actividades antidiabéticas y antioxidantes a cantidades significativas de polisacáridos, así como a lignanos, flavonoles y ácidos fenólicos en los extractos de cladodios (Rocchetti et al., 2018; Valente et al., 2010; Yang et al., 2008).

Evidencia de las investigaciones epidemiológicas muestra que los flavonoides en la dieta han recibido una mayor atención debido a sus considerables beneficios en la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes y las cardiovasculares (Cerella et al., 2014; Georgiev, 2014; Xiao et al., 2015). La mayoría de los flavonoides naturales son O-glucósidos y C-glucósidos; los glucósidos de flavonoides más abundantes en las plantas del género *Opuntia* spp. son los glucósidos de flavona y flavonol (Veitch y Grayer, 2011; Barreca et al., 2011; Xiao et al., 2014). Y se ha demostrado que los restos de azúcares en los flavonoides, su número y tipo, afectan su actividad biológica y está relacionada con diferencias en la biodisponibilidad (Antunes-Ricardo et al., 2015). Estudios recientes sobre *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill han demostrado que la isoramnetina y sus conjugados, poseen actividades antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas, hipolipidémicas y anticancerígenas (Keller et al., 2015; Antunes-Ricardo et al., 2015; Rodríguez-Rodríguez et al., 2015).

4.- SOBREPESO Y OBESIDAD

La prevalencia mundial del sobrepeso y la obesidad en todo el mundo casi se ha triplicado desde 1975, hasta el punto de que casi un tercio de la población mundial está ahora clasificada con sobrepeso u obesidad (GBD, 2015; OMS, 2020). La obesidad afecta negativamente a casi todas las funciones fisiológicas del cuerpo y constituye una importante amenaza para la salud pública. Aumenta el riesgo de desarrollar múltiples enfermedades,

como diabetes mellitus, cardiovasculares, varios tipos de cánceres, entre otras, lo cual tiene efectos negativos sobre la calidad de vida, la productividad laboral y los costos de atención médica (Czernichow et al., 2011; Singh et al., 2013; Lauby-Secretan et al., 2016). El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede perjudicar la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un índice simple de peso para la altura que se usa comúnmente para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Se define como el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de su altura en metros (kg/m^2). Para los adultos, la OMS define el sobrepeso y la obesidad de la siguiente manera: el sobrepeso es un IMC mayor o igual a 25; y la obesidad es un IMC mayor o igual a 30. El IMC proporciona la medida poblacional más útil del sobrepeso y la obesidad, ya que es la misma para ambos sexos y para todas las edades de los adultos (OMS, 2020).

4.1.- FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

El tejido adiposo, que antes se consideraba un depósito de almacenamiento, ahora se reconoce como un órgano endocrino. Los adipocitos sintetizan una serie de hormonas o moléculas activas llamadas adipocinas (Parto et al., 2016; Carbone et al., 2017), que tienen efectos antiinflamatorios y juegan un papel crítico en la integración del metabolismo sistémico con la función inmunológica (Mancuso, 2016). Sin embargo, el tejido adiposo también produce citocinas proinflamatorias, como la interleucina-1b, el factor de necrosis tumoral α e interleucina 18. Con el aumento de la adiposidad, la hiperplasia de adipocitos es impulsada principalmente por el reclutamiento de progenitores adipogénicos y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento similar a la insulina-1, el factor de necrosis tumoral- α , la angiotensina II y el factor estimulante de colonias de macrófagos. Los adipocitos sufren apoptosis, necrosis celular y fibrosis, que además inducen un estado proinflamatorio sistémico de bajo grado y disfunción del tejido adiposo. Una vez que se inicia la respuesta inflamatoria, se intensifica por el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo, lo que lleva a resistencia a la insulina, también se producen citocinas proinflamatorias, óxido nítrico sintasa inducible, especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno que se cree que promueven la resistencia a insulina que conduce a síndrome metabólico y diabetes mellitus (Parto y Lavie et al., 2017).

4.2.- LA OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

La inflamación del tejido adiposo genera estrés oxidativo, y el estrés oxidativo puede contribuir al establecimiento de un ciclo que favorece el aumento de la inflamación en el tejido adiposo (Romero-Martínez et al., 2017). El estrés oxidativo se produce por el desequilibrio entre la producción de radicales libres y antioxidantes en el organismo (Liguori et al., 2018). Los radicales libres se generan durante la función normal del sistema inmunológico y del proceso metabólico (Keshari et al., 2015). La oxidación celular forma las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) en muchos organismos vivos, las ROS más comunes incluyen el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxilo (ROO^{\cdot}) y el hidroxilo (OH^{\cdot}) y los radicales libres derivados del nitrógeno son el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el anión de peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) (Pavithra y Vadivukkarasi, 2015).

Los efectos beneficiosos de ROS/RNS tienden a ocurrir en concentraciones bajas a moderadas e implican su participación en diversas funciones fisiológicas y en numerosas vías de señalización celular (Wu et al., 2015). Los efectos nocivos de los radicales libres ocurren en los sistemas biológicos cuando hay una sobreproducción de ROS y RNS (Schinella et al., 2002). Cuando esto ocurre las células son protegidas por enzimas antioxidantes (por ejemplo, Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD), manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), SOD de células endoteliales, glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa y otras sustancias antioxidantes (por ejemplo, vitamina C, vitamina E, y glutatión). Sin embargo, cuando la generación de ROS y / o RNS sobrepasa la capacidad antioxidante, la acumulación resultante se conoce como estrés oxidativo, y contribuye al desarrollo de muchas condiciones patológicas (Matsuda y Shimomura., 2013). Un exceso de ROS induce la peroxidación de lípidos, lo que resulta en la desestabilización y desintegración de las membranas celulares o en la oxidación de otros componentes celulares como el ADN y las proteínas (Gaschler y Stockwell, 2017), por lo que varias enfermedades y condiciones de salud en los seres humanos están relacionadas con el estrés oxidativo; como la resistencia a la insulina, diabetes, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, envejecimiento, y cáncer, entre otras enfermedades no transmisibles (Miller y O'Callaghan, 2015; El-Hawary et al., 2020).

5.- EFECTO DE POLIFENOLES DE *Opuntia* spp. EN LA OBESIDAD

Los extractos de *Opuntia* spp. se podrían utilizar como ingrediente alimentario para disminuir la cantidad de ROS, atenuando la inflamación y el estrés oxidativo asociados a la obesidad (Stintzing y Carle, 2005; Wang et al., 2014). Varios informes han descrito el efecto de los extractos de *Opuntia* spp. en la reducción de la obesidad, la inflamación y la producción de lípidos (Rodríguez-Rodríguez et al. 2015; Garoby-Salom et al., 2016). Estos efectos se han atribuido a su contenido de compuestos antioxidantes como el ácido clorogénico, glucósidos de isoramnetina, quercetina-3-O-xilosil-ramnosilglucósido, quercetina, (+) - dihidroquercetina, quercetina-3-metil éter, kaempferol 3-O- (ramnosilglucósido) -7-O-ramnósido, kaempferol 3 -O-arabinofuranósido, kaempferol 3-arabinobiosido-7- arabinofuranósido y el ácido eucóico que son algunos de los antioxidantes identificados en las especies de *Opuntia* spp. (Santos-Zea et al. 2011; Astello-García et al. 2015). Andreu et al. (2018) mostraron que la actividad antioxidante de compuestos fenólicos *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill desempeñaron un papel importante contra el estrés oxidativo. Así mismo, investigaciones anteriores demostraron que el consumo de un extracto de isoramnetina purificado de *Opuntia ficus-indica* produjo una disminución del peso corporal y del colesterol total en ratones con obesidad inducida por la dieta (Rodríguez-Rodríguez et al., 2015). *Opuntia* spp. contiene flavonoides como kampferol o isoramnetina que pueden suprimir la acumulación de lípidos o inhibir la adipogénesis mediante la regulación de genes adipogénicos (Lee et al., 2015), además estos compuestos son capaces de retrasar los efectos prooxidantes en proteínas, ADN y lípidos mediante la generación de radicales estables (Osuna-Martínez et al., 2014), siendo útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer.

6.- EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

Los compuestos polifenólicos y otros compuestos antioxidantes se han vuelto más importantes económicamente a medida que se usan cada vez más en las industrias alimentaria y nutracéutica (Marqués et al., 2013). Estos se pueden agrupar en compuestos solubles en agua (ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides y quinonas) y compuestos insolubles en agua (taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos unidos a la pared celular). Esta clasificación es significativa debido a la composición nutricional o a los componentes, ya que su solubilidad y digestibilidad son necesarias para una utilización eficaz dentro del tracto gastrointestinal y algunas operaciones fisiológicas. Cuando los compuestos fenólicos son insolubles, no se pueden digerir, y se eliminarán total o parcialmente en las heces, mientras que los compuestos solubles pueden absorberse a través de los intestinos hacia el torrente sanguíneo como metabolitos (Acosta-Estrada et al., 2014).

Para lograr procesos de separación, así como la identificación y caracterización de los compuestos bioactivos, los materiales vegetales deben primero someterse a un proceso de extracción (Gligor et al., 2019). La eficacia de cualquier proceso de extracción depende principalmente de los disolventes, que se seleccionan de acuerdo con la polaridad del compuesto bioactivo deseado. Otros factores que también deben tenerse en cuenta son la afinidad molecular entre el solvente y el soluto, los procesos de transferencia de masa, las mezclas de codisolventes, las leyes ambientales, la toxicidad humana y la viabilidad financiera. El método de extracción "ideal" debe proporcionar altas tasas de extracción, no debe ser destructivo y debe ahorrar tiempo (Rombaut et al., 2014). Además, según los requisitos ambientales y el impacto económico, la industria alimentaria y nutracéutica prefiere la extracción y el procesamiento en verde para garantizar un extracto o producto seguro y de alta calidad (Chemat et al., 2012).

6.1.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Las técnicas de extracción más utilizadas incluyen extracción Soxhlet, maceración, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción de fluidos supercríticos, descarga eléctrica de alto voltaje, extracción de campo eléctrico por pulsos y extracción asistida por enzimas (Pasrija y Anandharamakrishnan, 2015; Luo et al., 2018).

En las industrias alimentarias se siguen empleando tecnologías convencionales para la extracción de compuestos polifenólicos a gran escala, tales como la extracción con disolvente (líquido-líquido y sólido-líquido) mediante la asistencia de factores externos (por ejemplo, agitación mecánica, o sistemas de calentamiento). La maceración es uno de los métodos convencionales de referencia para la extracción de compuestos polifenólicos (Ćujić et al., 2016), debido a su operación más simple, facilidad de mantenimiento y la baja inversión de capital requerida para la implementación inicial del sistema de extracción (Roohinejad et al., 2016; Zhu et al., 2017). La extracción convencional se refiere a la recuperación de compuestos de alto valor agregado a partir de matrices vegetales utilizando solventes convencionales con o sin tratamiento térmico. En un procedimiento experimental típico, las matrices de plantas se homogeneizan inicialmente y se sumergen en un disolvente o mezcla de disolventes, a menudo bajo una agitación constante, por lo

que las moléculas deseadas se extraen en función de los fenómenos de difusión y transferencia de masa (Poojary y Passamonti, 2015).

6.2.- FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

6.2.1.- SOLVENTES

La cantidad de compuestos polifenólicos a extraer dependerá de la polaridad del solvente y generalmente aumenta en el orden de metanol> etanol> acetato de etilo> acetona> n-butanol> agua (Vetal et al. 2013). La Tabla 3 detalla varios solventes aplicados para la extracción de algunos polifenoles (Azmir et al., 2013).

Tabla 3. Solventes utilizados para la extracción de varios compuestos polifenólicos.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Flavonoides	Flavonoles
Taninos	Ácidos fenólicos Flavonoles	Flavonas Taninos Ácidos fenólicos		

Las mezclas de alcoholes y agua han demostrado ser más eficientes en la extracción de constituyentes fenólicos (Yilmaz y Toledo, 2006; Pinelo et al., 2006). Ammar et al. (2015), mostraron que los extractos metanólicos y acuosos resultaron mejores en términos de alta extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en flores de *O. ficus-indica*. Así mismo, Guzmán-Maldonado et al. (2010) extrajeron una mayor cantidad de compuestos fenólicos del pericarpio del fruto de *O. matudae* utilizando metanol/agua como solvente de extracción.

6.2.2.- TIEMPO

La eficiencia de la extracción aumenta con el incremento de la duración de la extracción, en un cierto rango de tiempo. El aumento del tiempo no afectará la extracción después de que se alcance el equilibrio del soluto dentro y fuera del material sólido (Zhang, 2014). Varios investigadores han utilizado tiempos de extracción bastante variables que van desde unos pocos minutos hasta varias horas. Una extracción más prolongada no siempre mejora la eficiencia de la extracción, mientras que aumenta la posibilidad de oxidación de los fenólicos (Naczki y Shahidi., 2004).

6.2.3.- TEMPERATURA

El aumento de la temperatura mejora la eficiencia de la extracción ya que el calor permea las paredes celulares, incrementa la solubilidad y los coeficientes de difusión de los compuestos a extraer y disminuye la viscosidad del solvente facilitando así su paso a

través de la masa sólida del sustrato. No obstante, una temperatura excesiva puede degradar los compuestos fenólicos (Escribano-Bailon y Santos-Buelga., 2003). Un estudio de optimización mostró que se obtiene mayor cantidad de flavonoides totales de la piel de cladodios de *O. milpa alta* a una temperatura de extracción de 90 °C usando etanol al 80% y una relación de disolvente: materia prima de 25:1 (Cai et al., 2010).

7.- DESHIDRATACIÓN DE POLIFENOLES

7.1.- SECADO CONVENCIONAL

Después de la extracción acuosa en los extractos polifenólicos, el extracto debe ser secado. El secado se utiliza para aumentar la estabilidad y la vida útil (Akbarian et al., 2014), sin embargo, el proceso tradicional de secado puede dañar la calidad causando daño oxidativo, color dorado, cambio en sabor y solubilidad. Durante el secado con aire caliente, el polifenol puede tener una degradación enzimática y no enzimática (Abhay et al., 2016). El secado con aire caliente da como resultado la ruptura de las paredes celulares y la liberación de polifenoles unidos. Al mismo tiempo, se liberan enzimas oxidativas e hidrolíticas que pueden degradar los compuestos fenólicos liberados (Papoutsis et al., 2017; Salazar et al., 2018). El secado convencional con aire caliente por convección es utilizado habitualmente por la industria alimentaria, aunque, el inconveniente por ese método es la disminución del contenido de compuestos polifenólicos y de su actividad antioxidante (Lewicki, 2006). Por lo tanto, para mantener la calidad de los polifenoles, el proceso de secado debe realizarse bajo un ambiente de baja temperatura o vacío (Wang et al., 2009).

7.2.- SECADO POR ASPERSIÓN

El secado por aspersión es una tecnología de secado simple, rápida, reproducible y escalable (Arpagaus y Schwartzbach, 2008), que permite condiciones de temperatura suaves, adecuadas para compuestos bioactivos sensibles al calor y mantiene la calidad de nutrientes, colores y sabores (Fazaeli, et al., 2012). Los pasos del proceso de secado por aspersión son básicamente (1) calentamiento del gas de secado, (2) generación de gotas, (3) secado de las gotas y (4) recolección de partículas. Una forma de polvo secado por aspersión ofrece mayor estabilidad, mejor protección del medio ambiente (por ejemplo, oxidación, luz y temperatura), más fácil manejo y almacenamiento y redispersabilidad en soluciones acuosas (Murugesan y Orsat, 2012; Okuyama et al., 2006). Los polvos producidos son de alta calidad y por lo general tienen un bajo contenido de humedad y actividad de agua, por lo que son resistentes a la degradación microbiológica y oxidativa (Schmid, 2011; Shishir et al., 2018), lo que da como resultado una alta estabilidad en la vida útil (Anandharamakrishnan e Ishwarya, 2015).

8.- NANOENCAPSULACIÓN

Las últimas aplicaciones de la nanotecnología en la ciencia de los alimentos incluyen el desarrollo de alimentos funcionales y compuestos alimentarios de tamaño nanométrico, la formación de sistemas de suministro de compuestos bioactivos y las innovaciones en el envasado de alimentos. Dentro de la nanotecnología se incluye a la nanoencapsulación que tiene como objetivo mejorar las propiedades funcionales de los compuestos bioactivos o transportarlos eficazmente a su destino (Handford et al., 2015; Ozogul et al., 2017; Giosafatto et al., 2019). Los compuestos polifenólicos tienen importantes características antioxidantes y antimicrobianas, pero son inestables y susceptibles a procesos de degradación, poco solubles y, en la mayoría de los casos, su biodisponibilidad es relativamente baja (Esfanjani y Jafari., 2016). Por lo tanto, la incorporación directa de compuestos polifenólicos de las plantas en los alimentos puede afectar significativamente sus propiedades fisicoquímicas, estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad (Acevedo-Fani et al., 2017; Pešić et al., 2019), por lo que es necesario protegerlos, y una de las técnicas más prometedoras para ello es la nanoencapsulación.

8.1.- DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA

La encapsulación es una técnica común para crear una membrana externa o recubrimiento de un material sobre otro material, que se aplica para la protección y/o preservación de compuestos bioactivos, volátiles y susceptibles al deterioro bioquímico y térmico, y también se utiliza para enmascarar sabores y aromas indeseables (Desai y Park, 2005; Shishir, et al., 2018). Generalmente, el proceso nanoencapsulado da como resultado cápsulas con un tamaño menor a 1000 nm (Assadpour y Jafari, 2019).

La entrega de cualquier compuesto bioactivo a varios sitios dentro del cuerpo se ve afectada por el tamaño de las partículas (Kawashima, 2001; Hughes, 2005). Por lo tanto, la nanoencapsulación tiene el potencial de mejorar la biodisponibilidad, mejorar la liberación controlada y permitir una orientación precisa de los compuestos bioactivos en mayor medida que la microencapsulación (Mozafari et al., 2006).

Los materiales encapsulados pueden ser sustancias puras o una mezcla, que también se denominan material revestido, material del núcleo, activos, relleno, fase interna o carga útil. Por otro lado, los materiales de recubrimiento se conocen como material de empaque, cápsula, material de pared, película, membrana, portador o capa exterior (Fang y Bhandaria, 2010). Los materiales de recubrimiento generalmente están hechos de polisacáridos, gomas, proteínas, lípidos y polímeros sintéticos naturales o modificados (de Souza-Simões et al., 2017). La selección del material de recubrimiento depende de: la naturaleza del material del núcleo, proceso de encapsulación y uso del producto.

La morfología de la cápsula resultante depende de la disposición del material del núcleo y del proceso de deposición del material de recubrimiento, que se puede dividir en mononucleares, polinucleares y matriciales. Las cápsulas mononucleares tienen una cubierta exterior alrededor del núcleo; las cápsulas polinucleares tienen muchos núcleos que están atrapados en una cubierta; las cápsulas de matriz tienen el material del núcleo distribuido uniformemente dentro del material de la cubierta. Además, es posible tener

una cápsula mononuclear de múltiples capas o una cápsula con forma no esférica / forma irregular (Kim et al., 2004). La Figura 5 presenta diferentes formas de cápsulas.

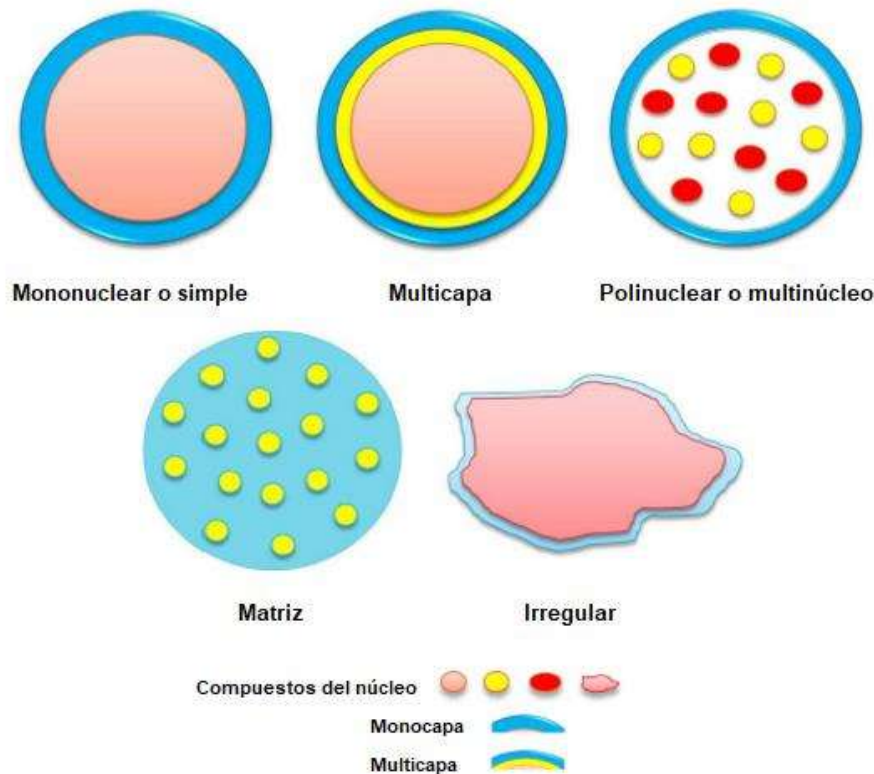


Figura 5. Representación de varias formas de las cápsulas.

8.2.- TÉCNICAS DE NANOENCAPSULACIÓN DE ALIMENTOS

Las tecnologías de nanoencapsulación se clasifican en cinco grupos en función del mecanismo o ingrediente principal utilizado para fabricar nanocápsulas en la industria alimentaria. Incluyen técnicas basadas en lípidos, técnicas inspiradas en la naturaleza, técnicas de equipamiento especializado, técnicas basadas en biopolímeros y otras técnicas diversas, como se muestra en la Figura 6.

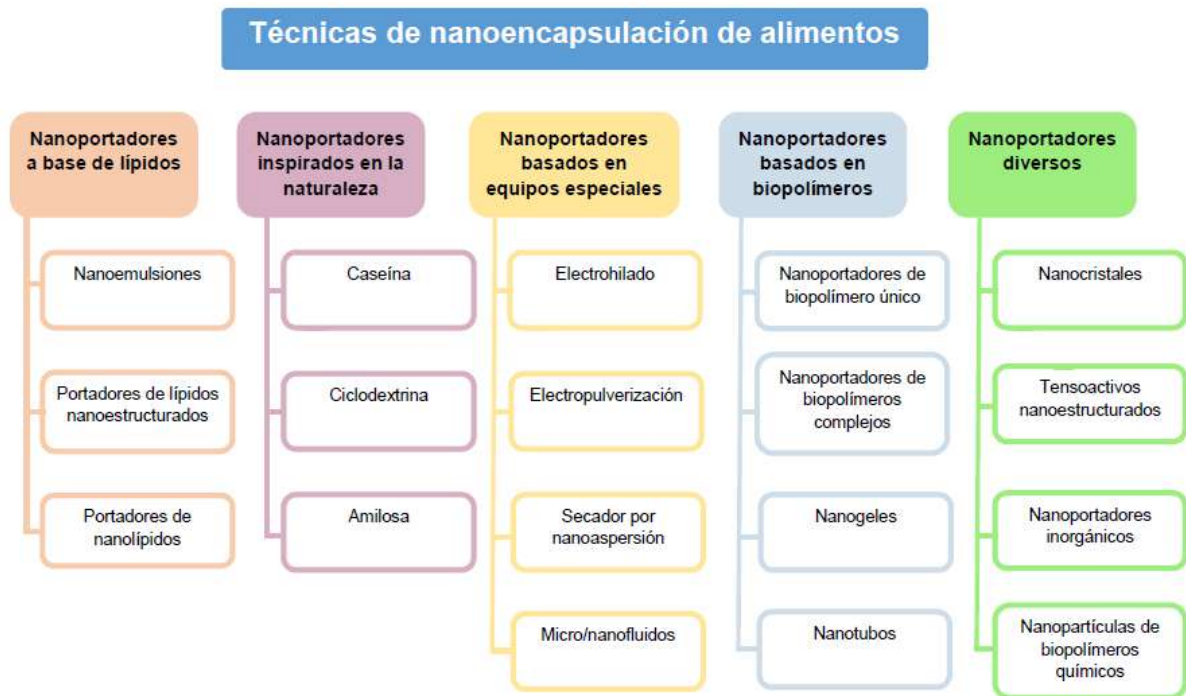


Figura 6. Técnicas de nanoencapsulación de los alimentos.

8.2.1.- SECADO POR NANOASPESIÓN

El secado por nanoaspersión es una tecnología en la que las propiedades del polvo fabricado dependen de la correlación e interdependencia de los parámetros del proceso y las variables de formulación. La Figura 7 ilustra los principales parámetros de proceso ajustables y las variables de formulación (Jafari, 2017).

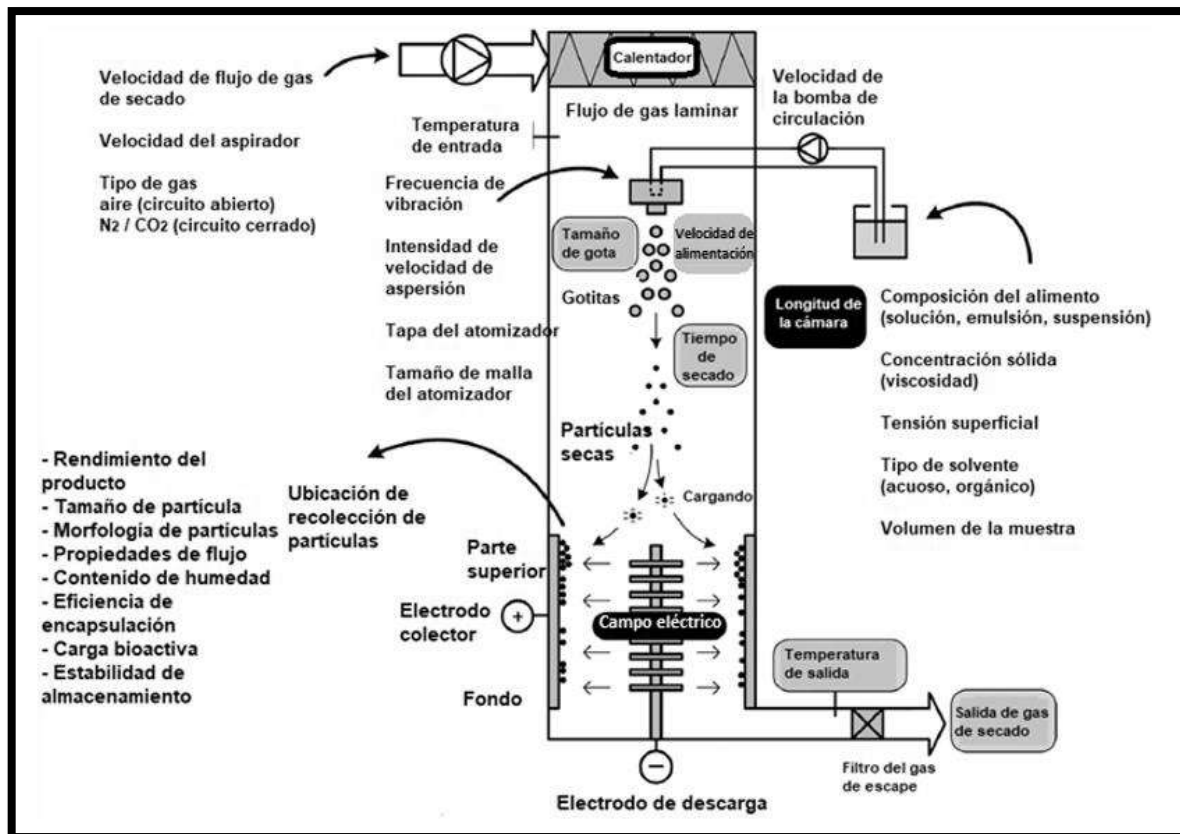


Figura 7. Secador por nanoaspersión (Jafari, 2017).

El secado por nanoaspersión es el método de encapsulación más popular en el sector alimentario debido a sus numerosas ventajas, por ser de funcionamiento continuo y flexible. El secado por nanoaspersión se basa en la conversión de un estado fluido a un polvo mediante un procesamiento continuo en el entorno de secado en caliente. Aumenta la transferencia de calor y se aplica a productos industriales sensibles al calor porque permite una distribución uniforme del tamaño de las partículas y una rápida eliminación del agua (Jafari, 2017).

El Nano Spray Dryer B-90 es la nueva tecnología desarrollada por Büchi para la nanoencapsulación de compuestos bioactivos, que de acuerdo con Li et al., (2010), Ngan et al. (2014) y Blasi et al. (2010), y que proporciona resultados muy satisfactorios para la formulación de partículas submicrónicas con rendimientos relativamente altos (70% a 90%) para pequeñas cantidades de muestra (50 mg a 500 mg).

8.3.- NANOENCAPSULACIÓN APLICADA A POLIFENOLES

La nanoencapsulación puede prevenir la degradación de compuestos polifenólicos debido a sus efectos protectores contra el impacto negativo de la luz, el oxígeno y el pH, y ayudar a mejorar la eficacia de los polifenoles en aplicaciones alimentarias y biomédicas,

reducir su tendencia a causar astringencia dentro de la boca y puede proteger a los polifenoles del metabolismo dentro del tracto gastrointestinal humano (Chawda et al., 2017), también puede prevenir la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos (Gómez-Estaca et al., 2012). Además, las nanopartículas cargadas de polifenoles se pueden utilizar para el desarrollo de nuevos tipos de alimentos funcionales, cuyo consumo puede ayudar a prevenir enfermedades (Madureira et al., 2015).

Se pueden utilizar diferentes materiales de pared o nanoportadores para los componentes polifenólicos, que actuarán como barrera protectora; y se pueden dividir generalmente en sistemas de administración basados en polisacáridos y proteínas (Aguirre y Borneo, 2019). Los polisacáridos como los almidones hidrolizados y los almidones emulsionantes se encuentran entre los materiales portadores más comunes. Las maltodextrinas tienen una alta solubilidad en agua y se utilizan comúnmente para encapsular polifenoles mediante secado por nanoaspersión (Maqsoudlou et al., 2020). Los materiales de las paredes como la maltodextrina proporcionan propiedades no higroscópicas a los polvos producidos a partir de ellos (Silva et al., 2013). Por lo tanto, se espera que los polvos fenólicos encapsulados en estos materiales de pared permanezcan más estables durante el almacenamiento. Recientemente, se ha informado que los nanoportadores de polisacárido-proteína también son prometedores para la encapsulación de polifenoles (Veneranda et al., 2018), debido a que los componentes activos se unen a la parte proteica del nanoportador a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, mientras que los polisacáridos contribuyen a la prevención de la degradación enzimática de proteínas en condiciones gástricas (Luo et al., 2015). Las proteínas de la leche y de la soya son las proteínas más utilizadas para la encapsulación de polifenoles (Ma et al., 2014). Se ha demostrado que con el uso de la tecnología de secado por nanoaspersión y utilizando materiales de pared como la goma arábiga, la proteína de suero, el alcohol polivinílico, el almidón modificado y la maltodextrina, pueden producir partículas submicrónicas por debajo de la escala de 1 μm , con rendimientos desde el 43% para la maltodextrina hasta el 94.5. % para almidón modificado (Li et al., 2010). Por otro lado, la maltodextrina ha mostrado una alta eficiencia de encapsulación del 86.3%, para los polifenoles de la grosella negra (*Ribes nigrum* L.) (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011). Fang y Bhandari (2011) reportaron que secaron el jugo de arayán mediante secado por aspersión con maltodextrinas y después de almacenarse a diferentes temperaturas y actividades de agua. La retención del contenido polifenólico y antocianinas totales durante el proceso de secado fue de aproximadamente 96% y 94%, respectivamente, lo que implicó que el secado por aspersión fue una buena técnica para secar polifenoles sensibles al calor.

9.- OPTIMIZACIÓN EN PROCESOS

El diseño experimental es una colección de herramientas que se utilizan para estudiar el comportamiento de un sistema, que implica planificar y realizar un conjunto de experimentos para determinar los efectos de las variables experimentales en ese sistema. Uno de los numerosos diseños experimentales para el modelado empírico es la metodología

de superficie de respuesta (MSR), que puede considerarse una técnica secuencial decisiva para desarrollar procesos punteros, mejorar el diseño y formulación de nuevos productos y mejorar su rendimiento (Hamzaoui et al., 2008; Kalavathy et al., 2009; Amini et al., 2010; Bashir et al., 2010; Geyikçi et al., 2012).

Actualmente, la industria alimentaria busca mejorar tanto el rendimiento del sistema como la eficiencia del proceso sin aumentar el costo y el tiempo, por lo que la MSR se está empleando para optimizar varios procesos (Chidambaram, 2016). La MSR es un conjunto de técnicas estadísticas que permiten la optimización multivariable y el modelado matemático de un proceso (Kalavathy et al., 2009) y permite tener una idea del grado de influencia de cada parámetro en la eficiencia del proceso y estudiar la interacción entre ellos mediante el establecimiento de un modelo matemático (funciones lineales, polinomiales, cuadradas y otros) (Khafri et al., 2017). Al establecer una ecuación modelo, la MSR puede evaluar la relación, así como interacciones entre los múltiples parámetros utilizando datos cuantitativos. Hay tres pasos en la implementación de la MSR; (1) diseño del experimento, es decir, Box Behnken o Diseño Central Compuesto (DCC); (2) análisis estadístico y de regresión para desarrollar ecuaciones modelo que representen el modelado de la superficie de respuesta; y (3) optimización de parámetros/variables a través de la ecuación del modelo (Wang et al., 2012).

El diseño de Box-Behnken (BBD), es una herramienta de MSR, que ha sido ampliamente utilizado por los investigadores para la optimización de ensayos experimentales (Bezerra et al., 2008). Es un diseño rotatable o casi rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental, se aplica cuando se tienen 3 o más factores y debido a que todos los puntos están a la misma distancia del centro, proporciona una estimación de la varianza igual en todas las direcciones (Gutiérrez y de la Vara, 2008). El diseño de Box-Behnken es un diseño MSR, algo menos eficiente que el diseño central compuesto, pero más eficiente que el diseño factorial de tres niveles, ya que permite una reducción en el número de experimentos a realizar, lo que se traduce en un menor consumo de reactivos y menor trabajo de laboratorio, desarrollo de modelos matemáticos que permitan evaluar la relevancia y significación estadística de los efectos de los factores en estudio, así como evaluar los efectos de interacción entre los factores (Ferreira et al., 2007).

10.- TORTILLA DE MAÍZ

Actualmente, la producción total de maíz (*Zea mays*) es de alrededor de 832.5 millones de toneladas métricas. Estados Unidos, Brasil, México, Argentina, India, Francia, Indonesia, Sudáfrica e Italia representan el 79% de la producción mundial de maíz. En México el 60-70% de la producción de maíz se utiliza como alimento para el ganado, y el 30-40% restante se utiliza para la producción de alimentos para el consumo humano (Gwirtz y García-Casal, 2014).

El maíz que se produce en el país en condiciones industriales se distribuye principalmente en las zonas urbanas, donde se consume principalmente en forma de tortilla. México es el principal consumidor de tortilla en el mundo, con un consumo anual cercano a

los 11 millones de toneladas de maíz, lo que representa un consumo per cápita de 79.5 kg de tortillas en el área rural y 56.7 kg en el área urbana (CEDRSSA, 2014). Sin embargo, las tortillas también tienen un papel importante en la dieta de personas de Centroamérica, y en Estados Unidos debido a la conciencia de sus beneficios para la salud (González-Ortega et al., 2017).

Para la producción de tortillas y otros productos, el maíz debe procesarse mediante un pretratamiento alcalino denominado proceso de nixtamalización, este es un procedimiento desarrollado y aplicado por las civilizaciones indígenas mesoamericanas (como la azteca y la maya) (Serna-Saldivar et al., 2015) y que todavía se utiliza en la actualidad. La cocción alcalina de granos de maíz tradicionalmente se hace con cal, que se compone principalmente de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. En la nixtamalización tradicional, los granos de maíz se cuecen en agua con cal y luego se dejan reposar a temperatura ambiente, lo que generalmente se lleva a cabo durante la noche. Durante la nixtamalización, el pH elevado y la temperatura elevada facilitan el ablandamiento del endospermo y la liberación del pericarpio. Después de remojar, se retira el líquido de cocción y remojo, el llamado nejayote. Luego, los granos cocidos alcalinamente (nixtamal) se lavan con agua para eliminar el exceso de cal, así como parte del pericarpio suelto. La capa de aleurona, es decir, la capa más externa del endospermo que es rica en proteínas y vitamina B1–3, permanece adherida al endospermo con almidón. La capa de aleurona también contribuye a la reducción de las pérdidas de proteínas y almidón durante la cocción, remojo y lavado (Santiago-Ramos et al., 2018). Después del lavado, el nixtamal se muele en piedra con la adición de agua para formar la masa. Pequeñas porciones de masa se forman en bolas que se aplanan en discos delgados. Las tortillas así formadas se cosen en un plato caliente. Las tortillas de mesa son relativamente económicas y son la fuente más importante de proteínas, calcio, fibra y energía (de la Parra et al., 2007; Palacios-Fonseca et al., 2009), además contienen cantidades importantes de varios nutraceuticos conocidos como fibra dietética insoluble y soluble, fenólicos, carotenoides, fitoesteroles y lípidos polares y apolares. El principal compuesto fenólico es el ácido ferúlico, reconocido como antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno (Serna-Saldivar et al., 2015).

10.1.- ALIMENTOS FUNCIONALES

Hoy en día, los alimentos no solo están destinados a proporcionar los nutrientes necesarios, sino también compuestos bioactivos que mejoren el bienestar físico y mental y que prevengan enfermedades crónicas o aquellas relacionadas con la nutrición, por lo que en el sector alimentario se han comenzado a desarrollar una amplia gama de productos enriquecidos con ingredientes bioactivos, como fibras dietéticas, antioxidantes y compuestos polifenólicos (Siro et al., 2008; Gómez y Martínez, 2018; Spina et al., 2019). A este tipo de productos se les conoce como alimentos funcionales. El término “alimentos funcionales” se utilizó por primera vez en Japón en la década de 1980. Recientemente Granato et al. (2017) definieron los alimentos funcionales como alimentos procesados industrialmente o naturales que, cuando se consumen regularmente dentro de una dieta diversa en niveles eficaces, tienen efectos potencialmente positivos en la salud más allá de la nutrición básica.

Los extractos de cladodios de *Opuntia* spp. han mostrado que son buenos candidatos para el desarrollo de nuevos alimentos saludables, debido a su alto contenido en compuestos biofuncionales (poli) fenólicos como los flavonoides (Kim et al., 2014; Serra et al., 2013), debido a su actividad antioxidante y la capacidad de mejorar biomarcadores asociados con el síndrome metabólico (Heinrich et al., 2014). Su consumo se ha asociado con la prevención en el desarrollo de enfermedades crónicas y como promotor para una mejor salud, calidad de vida y longevidad (Díaz et al., 2017). Debido a la popularidad de las tortillas en nuestro país, este alimento es una opción viable para la incorporación de nanocápsulas con polifenoles del género *Opuntia* spp. e incrementar la cantidad de compuestos bioactivos de este alimento, por lo que su consumo regular podría tener un efecto potencial en la prevención o disminución de los desequilibrios metabólicos asociados al sobrepeso u obesidad.

II.- JUSTIFICACIÓN

El nopal es fuente de compuestos polifenólicos con potencial antioxidante, la incorporación de estos compuestos en la alimentación humana podría ayudar a prevenir y/o revertir desajustes metabólicos relacionados con el estrés oxidativo. Estudios han sugerido que la obesidad se acompaña de un estado de estrés oxidativo crónico y se ha encontrado correlación positiva entre la baja ingesta de antioxidantes y la obesidad (García-García et al., 2008; Torres et al., 2015), así mismo, esta enfermedad es el principal problema de salud pública a nivel mundial, siendo México el país más afectado, donde el 75.2 % de la población presenta algún grado de sobrepeso u obesidad, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2018-19 (Shamah-Levy et al., 2020). La obesidad a su vez aumenta tres veces el riesgo de padecer diabetes, dislipidemias y resistencia insulínica, además se presentar mortalidad prematura o reducir la calidad de vida. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar las propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos de un extracto de *Opuntia* spp. a través del proceso de nanoencapsulación, almacenamiento, digestión *in vitro* y en su incorporación en tortilla de maíz, con lo cual se desarrolló un alimento con moléculas activas del tipo fenólico, provenientes de nanocápsulas con extracto de *Opuntia* spp. que podrían prevenir o complementar dietas dirigidas contra el sobrepeso u obesidad y así contribuir en mejorar la calidad de la alimentación en la población mexicana.

III.- HIPÓTESIS

La nanoencapsulación protege a los compuestos polifenólicos y antioxidantes provenientes de *Opuntia* spp. durante el almacenamiento, digestión *in vitro* y en su incorporación en tortilla de maíz

IV.- OBJETIVO GENERAL

Evaluación de las propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos de un extracto de *Opuntia* spp. a través del proceso de nanoencapsulación, almacenamiento, digestión *in vitro* y en su incorporación en tortilla de maíz.

1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- ✍ Establecer las condiciones óptimas de extracción de compuestos polifenólicos de *Opuntia ficus-indica* y *Opuntia atropes*.
- ✍ Estudiar a los compuestos polifenólicos presentes en los extractos de *Opuntia ficus-indica* y *Opuntia atropes*.
- ✍ Investigar el efecto de diferentes parámetros en la encapsulación de un extracto de *Opuntia* spp. vía secado por nanoaspersión.
- ✍ Evaluar la estabilidad del extracto de *Opuntia* spp. nanoencapsulado durante el almacenamiento, digestión *in vitro*, y en su incorporación en tortilla.

V.-MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MUESTRAS

Se obtuvieron cladodios jóvenes de *Opuntia ficus-indica* y *Opuntia atropes* en Ziracuaretiro, Michoacán, México. Las especies de *Opuntia* spp. fueron identificadas consultando al herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Morelia, México).

2.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

2.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

De forma separada los cladodios de *O. ficus-indica* y *O. atropes* con peso de 80 ± 40 g se lavaron y desinfectaron, y se les quitaron las espinas. A continuación, los cladodios se cortaron en trozos de 1 x 1 cm y se deshidrataron a 50 °C durante 48 h en un horno (Ecoshel®, México). Las muestras deshidratadas de cada especie de nopal se trituraron de manera separada utilizando una licuadora Oster® (Newell Brands, México) y se pasaron por un tamiz (#60) para obtener harina con un tamaño de partícula $<260 \mu\text{m}$ para cada especie de nopal.

A continuación, se obtuvieron los extractos antioxidantes para *O. ficus-indica* y para *O. atropes* utilizando la relación harina de cladodio: disolvente de 1:10 p/v (3 g de harina de cladodio en 30 mL de disolvente, etanol). Se aplicó un diseño de Box-Behnken de tres variables con tres niveles cada una para estudiar la influencia de la concentración de etanol (70, 83 y 96%), la temperatura (24, 50 y 76 °C) y el tiempo (30, 75 y 120 min) en la extracción. Estas condiciones se basaron en experimentos desarrollados previamente por Cai et al. (2010) y Aguirre et al. (2013). Cada tratamiento se agitó en un baño de agua (Julabo SW22®, Alemania) a 100 rpm. Se obtuvieron 17 corridas experimentales que incluyeron 5 repeticiones en el punto central. Los extractos se centrifugaron a 3,087 g/10 min, se filtraron al vacío a través de papel de filtro Whatman para obtener un tamaño de partícula de $<2.5 \mu\text{m}$ y se colocaron en tubos Falcon oscuros para la posterior determinación de ácidos fenólicos, flavonoides y actividades antioxidantes por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}.

2.1.1.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS O FENOLES TOTALES

Los ácidos fenólicos se analizaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu, como lo describieron Makkar, et al. (1993), con modificaciones menores sugeridas por Treviño et al. (2017). Se añadió una alícuota de 250 μL del extracto a 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (2 N) y 250 μL de Na_2CO_3 al 20%, se agitó y se incubó a 40°C durante 30 min. Se añadió agua destilada (2 mL) y se agitó la mezcla. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro (VELAB®, USA). Se utilizó ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg EAG).

2.1.2.- DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Los flavonoides totales se evaluaron siguiendo el método propuesto por Liu et al. (2002). Se mezcló una alícuota de 150 μL de cada muestra y 150 μL de NaNO_2 al 5%. Luego, se agregaron 150 μL de AlCl_3 al 10% y 1 mL de NaOH 0.1 M y se agitaron. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 510 nm en un espectrofotómetro VELAB®. Se usó quercetina como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (mg EQ).

2.1.3.- ENSAYO ANTIOXIDANTE DPPH•

La captación de radicales DPPH• se determinó según lo descrito por Randhir y Shetty (2007), y con las modificaciones propuestas por Treviño et al. (2017). Se mezclaron 50 μL de cada muestra con 2.95 mL de solución DPPH• 60 μM (DPPH• + metanol), para obtener un volumen total de 3 mL. Las muestras se homogeneizaron durante 10 seg y se dejaron 30 min en la oscuridad. Finalmente, se leyeron a 517 nm de absorbancia en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg EAG) de acuerdo con la curva de calibración preparada con el mismo patrón o como el % de inhibición del radical DPPH• de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_c - A_m}{A_c} * 100$$

Donde A_c fue la absorbancia del patrón de referencia y A_m la absorbancia de la muestra.

2.1.4.- ENSAYO ANTIOXIDANTE ABTS•+

La captación de radicales ABTS•+ se evaluó de acuerdo con el método de Re et al. (1999). Una solución madre que contenía 2:1 v/v de ABTS•+ 7 mM y una solución de persulfato de potasio 2.45 mM, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16 h, y posteriormente se ajustó con etanol hasta una absorbancia de 0.70 ± 0.02 nm a 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 15 μL de cada muestra con 1485 μL de la solución preparada de ABTS•+. Después de 15 minutos, se midió la absorbancia a 734 nm (espectrofotómetro VELAB®) y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg EAG) de acuerdo con la curva de calibración preparada con el mismo patrón o como el % de inhibición del radical ABTS•+ de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_c - A_m}{A_c} * 100$$

Donde A_c fue la absorbancia del patrón de referencia y A_m la absorbancia de la muestra.

En la Figura 8 se muestra el esquema que se realizó para la extracción de compuestos polifenólicos en *O. ficus indica* y *O. atropes*.



Figura 8. Extracción de compuestos polifenólicos en *O. ficus indica* y *O. atropes*.

Una vez que se llevaron a cabo las determinaciones de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante para cada tratamiento de extracción tanto para *O. ficus-indica* como para *O. atropes*, se llevó a cabo una optimización en la extracción de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante cada especie de nopal, y se seleccionó a *O. atropes* la cual fue la especie de nopal que presentó condiciones de extracción más favorables para obtención de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Este extracto se utilizó posteriormente en las etapas de deshidratación, nanoencapsulación e incorporación en tortilla de maíz.

3.- DESHIDRATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

3.1.- DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

Se eliminó el etanol del extracto de *O. atropes* en un rotaevaporador (Science Med RE100-Pro) a una temperatura de 40 °C con la aplicación de vacío, y el extracto obtenido se filtró nuevamente con papel de filtro Whatman No. 5 (tamaño de partícula <math><2.5 \mu\text{m}</math>) y se ajustó al 1% de sólidos totales. Este extracto acuoso se deshidrató por dos métodos: en horno de secado a 50°C (Felisa[®]) y por nanoaspersión a 105 °C. Para la deshidratación en horno de secado, se colocaron 20 mL del extracto de *O. atropes* en una placa Petri de vidrio y se colocaron en el horno (Felisa[®]) a 50 °C durante 24 h. El material deshidratado se almacenó en una botella ámbar dentro de un desecador y en refrigeración hasta su posterior análisis. La deshidratación por nanoaspersión se realizó en un equipo Nano Spray Dryer Unit B-90[®] (Büchi, Suiza). Los parámetros del proceso fueron temperatura de entrada de 105 °C, flujo de gas de 110 L/min, vacío de 33 mbar, aspersion

del 70% y tamaño de malla de 7 μm . En los dos tratamientos se determinó el rendimiento (%) de los extractos obtenidos en polvo.

La cuantificación de ácidos fenólicos (Makkar et al. 1993; Treviño et al. 2017), flavonoides (Liu et al. 2002) y actividad antioxidante por captura del radical DPPH $^{\bullet}$ (Randhir y Shetty 2007; Treviño et al., 2017) y ABTS $^{+\bullet}$ (Re et al., 1999) se llevó a cabo en el extracto de *O. atropes* antes del secado, en el extracto de *O. atropes* deshidratado en horno de secado a 50 $^{\circ}\text{C}$ (EODH) y en el extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión (EODNA) como se muestra en la Figura 9.

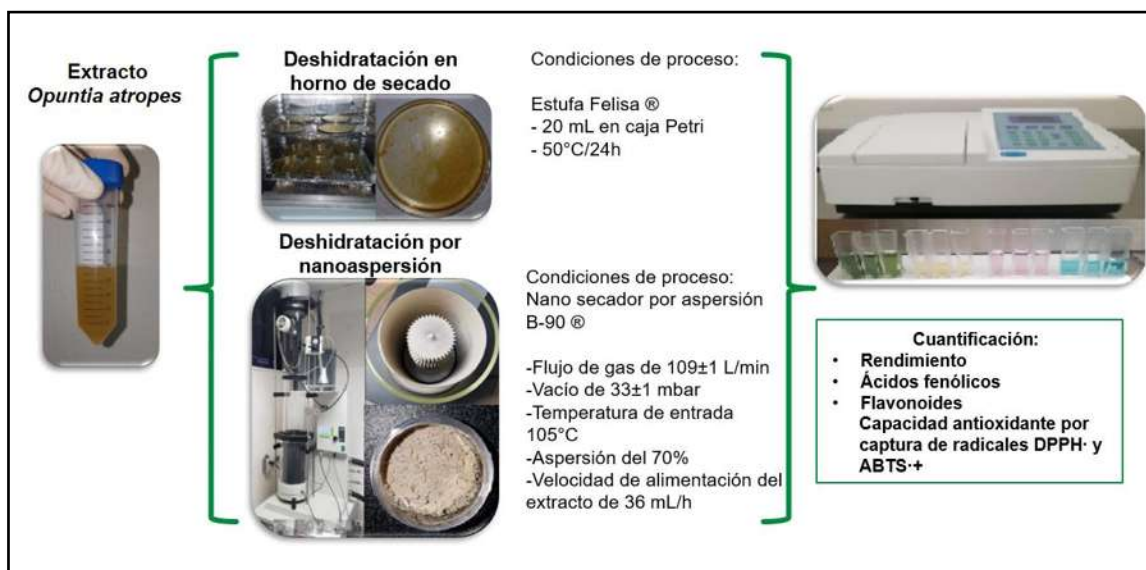


Figura 9. Deshidratación del extracto de *O. atropes*.

3.2.- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS POR UPLC-Q/TOF-MS 2

Para la identificación de los compuestos polifenólicos del extracto de *O. atropes* obtenidos por EODH y EODNA, se preparó una solución a 500 ppm con agua grado HPLC para cada muestra, se filtró en papel Whatman con poro de 0.2 μm y se colocó en los viales de cromatografía de vidrio de 2 mL.

Para la evaluación del perfil polifenólico se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) Acquity. La identificación cualitativa de los polifenoles se realizó con una columna analítica BEH PHENYL (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm , WATERS, Reino Unido) operada a 40 $^{\circ}\text{C}$. La separación en gradiente se realizó para cada muestra utilizando una fase móvil de disolvente A (agua con ácido fórmico al 0.1% [v/v]) y disolvente B (acetonitrilo al 100%) con un caudal constante de 0.3 mL por min. Las muestras se inyectaron (3 μL) con un muestreador automático en un tiempo de escaneo de 10 min.

El sistema UPLC se acopló a un espectrómetro de masas Q-TOF ortogonal acelerado Q-TOF (Q-TOF, WATERS, Reino Unido) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). Se utilizó el detector PDA para registrar los cromatogramas. Cada compuesto polifenólico se identificó de acuerdo con sus iones de fragmento de aglicona

característicos. Mediante la interpretación de sus patrones de fragmentación y la interpretación de los espectros de masas que se obtuvieron, estos datos se compararon con bases de datos como Phenol-Explorer y MassBank y con la información reportada por otras investigaciones (Guevara-Figueroa et al., 2010; Santos- Zea et al., 2011; Astello-García et al., 2015; Melgar et al., 2017; Mena et al., 2018), ver Figura 10.

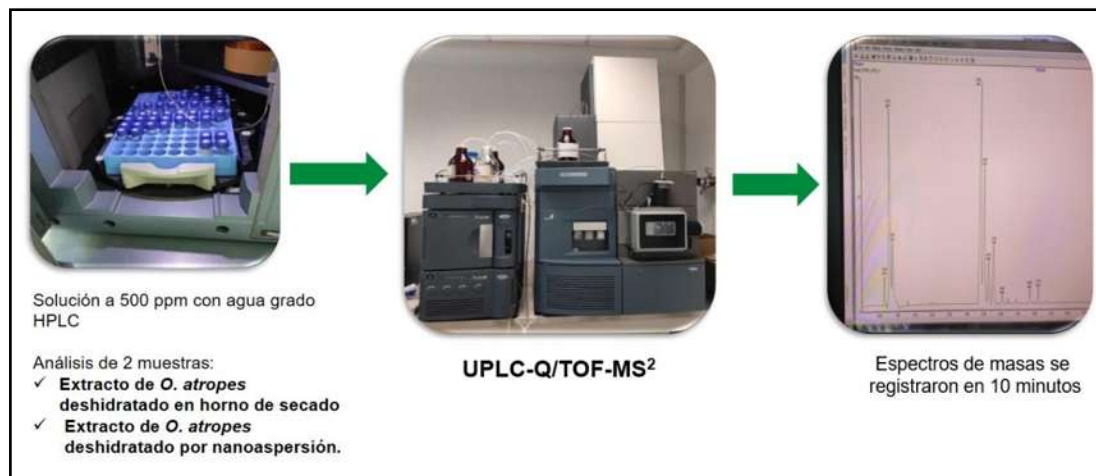


Figura 10. Identificación por UPLC-Q/TOF-MS² de polifenoles en extractos de *O. atropes*.

4.- NANOENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

4.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL DE PARED

Se evaluaron cinco formulaciones diferentes para ser utilizadas en el proceso de nanoencapsulación del extracto acuoso de *O. atropes*, que consideraron los siguientes materiales de pared: F1, maltodextrina; F2, aislado de proteína de soya; F3, aislado de proteína de soya + maltodextrina (1/1); F4, caseinato de calcio; y F5, caseinato de calcio + maltodextrina (1/1). En todos los tratamientos se utilizó una relación de material de pared/extracto de *O. atropes* (MP/E) de 2.5/1. El contenido de sólidos se ajustó al 1% en las formulaciones F1, F4 y F5, y en F2 y F3 se ajustó al 0.5% por tener un tamaño de partícula mayor. Las soluciones se filtraron al vacío con papel de filtro Whatman No. 5 (<math><2.5\ \mu\text{m}</math>). La nanoencapsulación se llevó a cabo en un Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, Suiza). Los parámetros utilizados fueron malla de 7 μm , temperatura de entrada a 105 $^{\circ}\text{C}$, flujo de gas de 110 ± 1 L/min, vacío de 33 ± 1 mbar y pulverización al 70%. La morfología y el tamaño de las nanocápsulas obtenidas se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las muestras se metalizaron con cobre en condiciones de vacío y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-7600F SEG-SEM (JEOL Ltd. Reino Unido), como se muestra en la Figura 11.

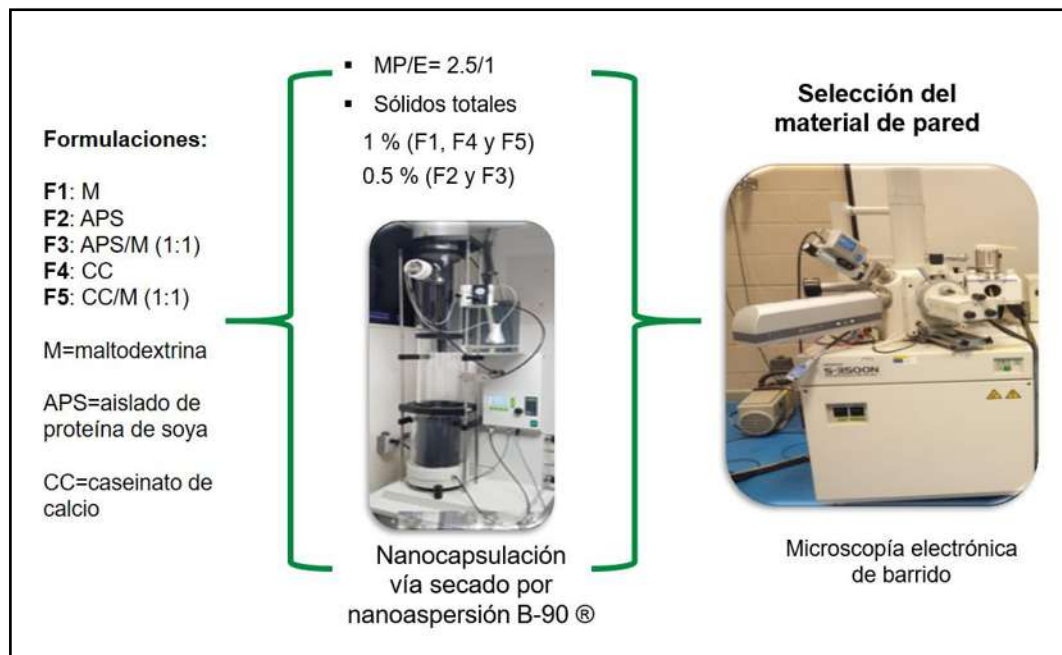


Figura 11. Selección de material de pared para nanoencapsulación.

4.2.- NANOENCAPSULACIÓN USANDO MSR

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas descritas en la sección 4.1, la maltodextrina fue el material de pared seleccionado para ser incluido en todos los tratamientos utilizados en los experimentos por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).

La combinación de tres factores, con tres niveles cada uno, se consideró en el diseño experimental utilizado para nanoencapsular los extractos de la siguiente manera: la formulación MP/E (material de pared ó maltodextrina/núcleo ó extracto de *O. atropes*) fue: 1/1, 2.5/1, y 4/1, temperatura de 95, 105 y 115 °C y aspersion de 40, 70 y 100%, utilizando un diseño de superficie de respuesta Box Behnken, para obtener 17 corridas experimentales que incluyeron 5 repeticiones en el punto central. Cada tratamiento se ajustó al 1% de sólidos y se filtró al vacío con Whatman No. 5 (<2.5 µm). Posteriormente, la solución de cada tratamiento se procesó por un Nano Spray Dryer B-90 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), el flujo de gas se mantuvo a 110 ± 1 L/min y el vacío fue de 33 ± 1 mbar y se utilizó una malla de 7 µm. Las variables de respuesta fueron: rendimiento (%), velocidad de alimentación (mL/h), tamaño de partícula evaluado en un analizador de nanopartículas SZ-100 (Horiba, Ltd., Japón), eficiencia de encapsulación (Robert et al., 2010), cuantificación de ácidos fenólicos (Makkar et al., 1993; Treviño et al., 2017), flavonoides (Liu et al., 2002) y actividad antioxidante por captura del radical DPPH[•] (Randhir y Shetty, 2007; Treviño et al., 2017) y ABTS^{•+} (Re et al., 1999), como se observa en la Figura 12.

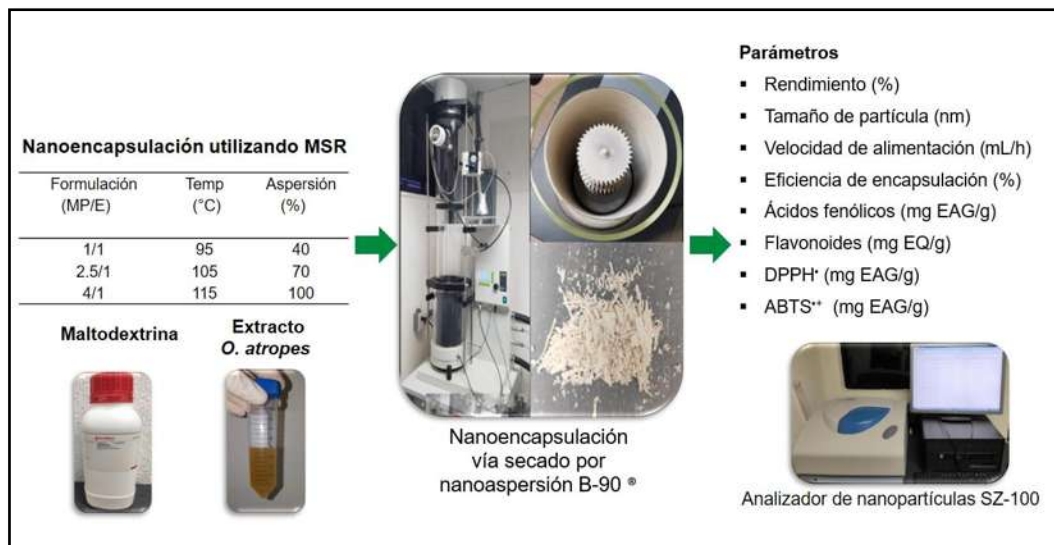


Figura 12. Nanoencapsulación del extracto de *O. atropes*.

4.3.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO POR UPLC-ESI-Q/TOF-MS²

Para la identificación de compuestos polifenólicos presentes en las nanocápsulas, primero se llevó a cabo su ruptura, para lo cual 300 mg de nanocápsulas se mezclaron con 3 mL de una solución de metanol: ácido acético: agua (50: 8: 42), y se agitaron durante 1 min en un Vortex VXT-5 (Scientific, EE. UU.), posteriormente se colocaron 40 min en baño de ultrasonidos (CIVEQ 8892) y se centrifugaron a 3,087 g/10 min. El sobrenadante se lavó 3 veces con 3 mL de una solución de metanol: etanol (1:1) y se centrifugó a 3087 g/10 min después de cada lavado. El sobrenadante de los 3 lavados se colocó en un horno a 50 °C para evaporar el disolvente, y luego se llevó a cabo una purificación con Amberlita XAD16N, para lo cual, se rehidrató el polvo que resultó del rompimiento de las nanocápsulas a 3 mL, y se colocó 1 mL de este, en una pipeta Pasteur de vidrio que se utilizó como columna de purificación, esta se lavó 3 veces con 1 ml de agua destilada y la recuperación del extracto se llevó a cabo con 3 mL de etanol absoluto, y se deshidrató a 50 °C/24 h. La muestra obtenida se preparó a 500 ppm con agua de calidad HPLC, se filtró sobre papel con un poro de 0.2 µm y se colocó en viales de vidrio de 2 mL, para la evaluación del perfil polifenólico. También se llevó a cabo la identificación de compuestos polifenólicos en el extracto crudo de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión previamente purificado con Amberlita XAD16N (se siguió el procedimiento de purificación descrito anteriormente), y se preparó una solución de 500 ppm con agua de calidad HPLC y se filtró sobre papel Whatman con un poro de 0.2 µm y se colocó en viales de vidrio de 2 mL, para su posterior análisis del perfil polifenólico por UPLC-ESI-Q/TOF-MS² como se describió en la sección 3.2. La identificación por UPLC-Q/TOF-MS² de compuestos polifenólicos en nanocápsulas con extracto de *O. atropes* se ilustra en la Figura 13.

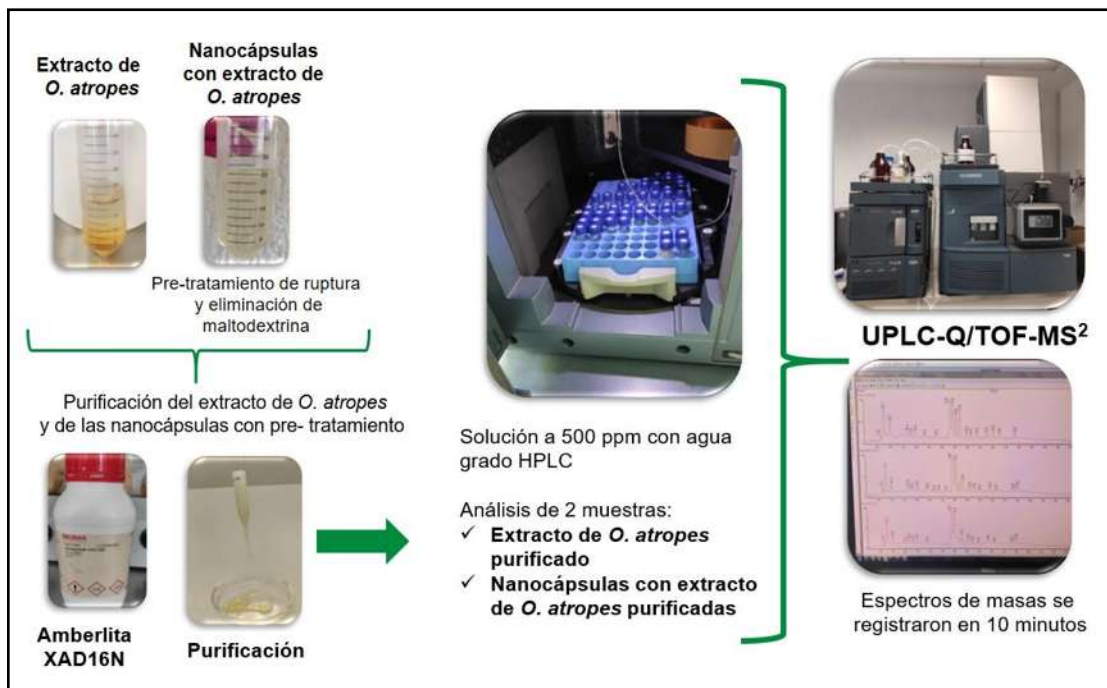


Figura 13. Identificación por UPLC-Q/TOF-MS² de polifenoles en nanocápsulas y extracto de *O. atropes* purificados.

5.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES Y ESTABILIDAD EN EXTRACTO Y NANOCÁPSULAS DE *O. atropes*

Se realizaron pruebas antioxidantes ($\cdot\text{OH}$ y H_2O_2) y de estabilidad durante el almacenamiento en el extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión y en las nanocápsulas con el extracto de *O. atropes*. Las pruebas se efectuaron tomando en consideración la siguiente equivalencia: 3.5 g de nanocápsulas contenían 1 g de extracto de *O. atropes*, por lo que 3.5 g de nanocápsulas fueron equivalentes a 1 g de extracto de *O. atropes*.

5.1.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES

El extracto de *O. atropes* y las nanocápsulas se disolvieron en dimetilsulfóxido para la prueba de captación del radical hidroxilo y, en buffer de fosfatos para la prueba de captación de peróxido de hidrógeno, y solo las nanocápsulas se sometieron a un proceso de ruptura por 40 min en un baño de ultrasonidos para llevar a cabo las determinaciones.

5.1.1.- ENSAYO DE CAPTACIÓN DE RADICALES HIDROXILO ($\cdot\text{OH}$)

La actividad antirradical de los extractos contra radicales hidroxilos se determinó de por el método propuesto por Smirnov y Cumbes (1989). Se añadió 1 mL de la solución de extracto a diferentes concentraciones (que fueron entre 0.1 y 35 mg/mL), enseguida se adicionaron 300 μL de FeSO_4 (8 mM) y 250 μL de H_2O_2 (20 mM). La reacción se inició mediante la adición de 1 mL de solución de ácido salicílico (3 mM) y luego se incubó por

30 min a 30 °C. Después, se agregaron 450 µL de agua destilada, y se midió la absorbancia a 510 nm. Se calculó la concentración efectiva media (CE₅₀).

5.1.2.- ENSAYO DE CAPTACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

La capacidad para eliminar especies reactivas de H₂O₂ se calculó siguiendo la técnica descrita por Ruch et al. (1989). En los tubos de ensayo, se agregaron 1.7 mL de la solución del extracto (en concentraciones entre 0.1 y 35 mg/mL), y se adicionaron 300 µL de solución de H₂O₂ (40 mM), se homogeneizó y se mantuvo a 22 °C por 3 min. La absorbancia se midió a 230 nm. Se calculó la concentración efectiva media (CE₅₀).

5.2.- ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Se evaluó la estabilidad del extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión y de las nanocápsulas con extracto de *O. atropes*. Se empaclaron 400 mg de cada producto en viales Eppendorf y se protegieron de la luz, el estudio de estabilidad se llevó a cabo en una cámara climática Ecoshel[®], a temperatura de 41 ± 1 °C y 60 ± 5 % de humedad relativa (HR), para lo cual se colocaron 5 muestras de cada producto, y los muestreos fueron realizados los días 0, 12, 24, 36 y 48 días.

Considerando que la temperatura ambiente estándar es de 21°C, una temperatura de 41°C tiene un Q10 de 2 unidades de manera teórica.

- A 21°C el valor de Q10 = 0 Temperatura ambiente estándar.
- A 31°C el valor de Q10 = 1
- A 41°C el valor de Q10 = 2 1 día = 4 días (2)²

Se evaluaron 48 días a 41°C, equivalentes a 192 días a 21°C (6.4 meses). En cada muestreo a cada producto se evaluó por triplicado el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical DPPH[•] y ABTS^{•+}, y la eficiencia de encapsulación en porcentaje como se observa en la Figura 14.

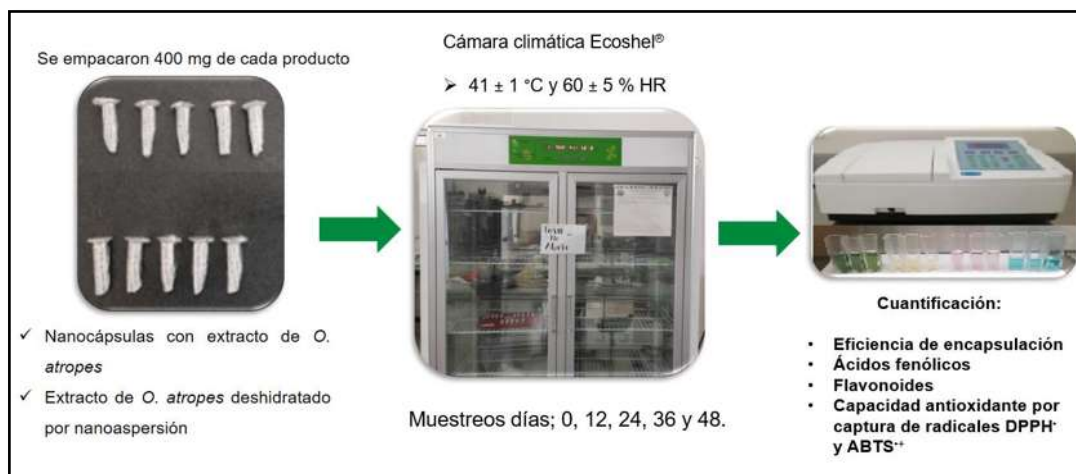


Figura 14. Evaluación de estabilidad durante almacenamiento.

6.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TORTILLA DE MAÍZ ADICIONADA CON NANOCÁPSULAS CON *O. atropes*

6.1.- CALIDAD Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANO

Se utilizó grano de maíz blanco calidad nixtamalera PURP, SA de CV, proveniente de Sinaloa, México. Se evaluaron algunos parámetros, los cuales se describen a continuación.

- Tamaño del grano. Se midió el largo, ancho y espesor del centro de 100 granos de maíz tomados al azar con un vernier digital.
- Peso de 1000 granos. Se tomaron 1000 granos de maíz al azar y se pesaron en una balanza analítica.
- Peso hectolítrico. Se siguió la técnica 55-10 de la AACC (2000). Se llenó un recipiente de volumen conocido (1 L) con granos de maíz y se pesó en balanza analítica. Se relacionó a un volumen de 100 L utilizando la siguiente fórmula: $\text{Peso hectolítrico} = (\text{Peso de granos de maíz}) / (\text{Volumen del recipiente}) \times 100$ (Método 55-10 de la AACC, 2000).
- Humedad. Se determinó mediante el método 44-19 de la AACC (2000).
- pH. Se siguió el método oficial 02-52 de la AACC (2000).
- Índice de flotación. En una solución de nitrato de sodio (300 mL) ajustada a 1.250 g/mL de densidad se vertieron 100 granos libres de impurezas, separando los granos uno del otro por medio de un agitador de vidrio, se agitó y se esperó 1 min para tomar lectura. El número de granos que ascendieron a la superficie se usó como el índice de flotación (NMX-FF034/2 SCFI, 2003).
- Color. Se utilizó un colorímetro manual (BYK Gardner USA) y se determinaron los parámetros de luminosidad, croma o saturación y el ángulo hue.

6.1.1.- NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL (Zavala, 2015).

Se mezcló 1 kg de maíz con 3 L de agua potable y 10 g de hidróxido de calcio, y se realizó la cocción en una estufa de gas por 35 min a 92 °C, a continuación, se dejó reposar a temperatura ambiente por 18 h y se decantó el nejayote. El grano de maíz nixtamalizado se lavó con 3 L de agua potable para remover el exceso de hidróxido de calcio y de pericarpio desprendido de los granos. El nixtamal se molió en molino de piedras (ARENAS[®]), agregando el agua necesaria para que la masa presentara un contenido de humedad de alrededor del 60%. La masa se deshidrató en un horno de secado (Ecoshel[®]) a 50 °C/24 h, se molió en una licuadora (Oster[®]) y se pasó por un tamiz No. 60 para obtener harina nixtamalizada con tamaño de partícula <260 µm.

A partir de la harina nixtamalizada se elaboraron dos productos:

- **Producto 1**= Harina de maíz nixtamalizada control (HMC).
- **Producto 2**= Harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas (HMN) (97% de harina de maíz nixtamalizada control + 3 % nanocápsulas con extracto de *O. atropes*), los productos se pueden observar en la Figura 15.



Figura 15. Productos; A) HMC y B) HMN.

6.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS

6.2.1.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Se cuantificó humedad, cenizas, proteína y extracto de etéreo por los métodos de AACC (2000), y los hidratos de carbono se obtuvieron por diferencia, restando la suma de la proteína, extracto etéreo y cenizas de 100.

6.2.2.- ANÁLISIS FISCOQUÍMICO

Se determinó pH (método 02-52 de la AACC, 2000), color con un colorímetro manual (BYK Gardner, USA), actividad de agua (Aw) (LabSwift-aw NOVASINA®) y se cuantificaron ácidos fenólicos, flavonoides, y actividad antioxidante por captura del radical DPPH[•] y ABTS^{•+}.

6.2.3.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizaron pruebas de mesófilos aerobios, coliformes totales, enterobacterias, mohos y levaduras por duplicado. Se utilizaron Placas 3M™ Petrifilm™. Posteriormente, se llevó a cabo la elaboración de tortilla a partir de la harina de maíz nixtamalizada control (HMC) y de la harina nixtamalizada con nanocápsulas (HMN).

6.3.- ELABORACIÓN DE TORTILLAS DE MAÍZ

Para la elaboración de las tortillas se siguió el método descrito por Méndez-Albores et al. (2004). La harina se rehidrató al 60%, y testales de masa de 30 ± 1 g fueron comprimidos con una máquina tortilladora (GONZALEZ®), para formar discos de 13.5 cm de diámetro y 1.2 mm de espesor. Estos discos se cocieron en un comal de hierro calentado a fuego directo, el cual alcanzó una temperatura promedio de 250 °C. Cada tortilla se coció por 17 s en el primer lado; 55 s en el segundo lado y nuevamente se volteó al primer lado por 17 s.

Elaboración de productos:

- **Producto 3.** Tortilla control (TC) (Producida a partir de HMC).
- **Producto 4.** Tortilla con nanocápsulas (TN) (Producida a partir de HMN).

6.3.1.- EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE CALIDAD DE LAS TORTILLAS DE MAÍZ

Rolabilidad. Se tomaron tres tortillas de cada tratamiento (TC y TN) después de 15 min de haber sido elaboradas (45 °C), se enrollarán sobre un tubo de vidrio de 2 cm de diámetro y se cuantificó el grado de rompimiento utilizando una escala del 1 al 5, donde: 1 = no presenta ruptura; 2 = rompimiento del 25%; 3 = rompimiento del 50%; 4 = rompimiento del 75% y 5 = rompimiento completo.

Grado de inflado: Tres tortillas de cada tratamiento (TC y TN) se elaboraron y cocieron en el comal por 17 s en la primera cara; 55 s en la segunda cara y nuevamente 17 s en la primera cara. Se observó el tamaño de la ampolla formada y se evaluó utilizando puntajes del 1 al 3, donde: 1 = inflado entre 75 a 100%; 2 = inflado entre 25 a 75% y 3 = inflado entre 0 y 25% (Cuevas-Martínez et al., 2010).

Pérdida de peso en la cocción: Tres tortillas de cada tratamiento (TC y TN) se pesaron antes y después de la cocción para determinar la pérdida de peso.

Textura: Se evaluó tensión y corte en tres tortillas de cada tratamiento (TC y TN). Para la prueba de tensión se cortó una tira, en forma de probeta ("I"), de la parte central de la tortilla, evitando los bordes. Las dimensiones de la tira fueron 32 mm de largo x 16 mm de ancho, y 1.2 mm de espesor. La prueba de tensión se obtuvo utilizando el equipo CT3 Texture Analizar (Brokfield®), con la sonda TA-26. Este accesorio consistió en unas pinzas de retención en las que se colocó la tira de tortilla y se sometió a tensión hasta lograr el rompimiento. De la curva resultante se obtuvo la fuerza máxima requerida (N). Las condiciones de prueba fueron: velocidad 2 mm/s y una distancia de 15 mm. Para las determinaciones de corte se utilizó el mismo equipo y sonda, pero se empleó una cuchilla plana y se utilizaron las mismas tiras de tortillas y se realizó el corte en la parte central de la tortilla. Las condiciones para esta prueba fueron: velocidad 2 mm/s, distancia de compresión 10 mm. Se registró la fuerza máxima (N) requerida para el corte de la tortilla (Arámbula-Villa et al., 2001; Mauricio et al., 2004).

6.3.2.- CARACTERIZACIÓN DE TORTILLA DE MAÍZ

Se realizó un análisis bromatológico y fisicoquímico a cada tratamiento de tortilla (TC y TN) cómo se mencionó en la sección de caracterización de harinas 6.2.1 y 6.2.2.

6.4.- VIDA DE ANAQUEL ACELERADA

Se evaluó en dos productos:

- Harina de maíz nixtamalizado control (HMC)
- Harina de maíz nixtamalizado con nanocápsulas (HMN)

Se empacaron 125 g de cada producto en bolsas trilaminadas al vacío, como se muestra en la Figura 16, el estudio de estabilidad se llevó a cabo en una cámara climática Ecoshel®, a temperatura de 41 ± 1 °C y 60 ± 5 % de humedad relativa (HR), para lo cual se colocaron 5 muestras de cada producto, y los muestreos fueron realizados los días 0, 12, 24, 36 y 48 días. Durante cada muestreo en cada producto se evaluó por triplicado;

humedad, color, A_w , pH, contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{+\bullet}$. Adicionalmente en cada muestreo se hidrató por separado tanto la harina de maíz nixtamalizada control (HMC) como la harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas (HMN) a una humedad aproximada del 60% y se elaboraron tortillas para evaluar por triplicado: rolabilidad, grado de inflado y pérdida de peso en la cocción, textura (tensión y corte), pH, color, A_w , cuantificación de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{+\bullet}$. Se realizaron análisis microbiológicos al inicio y final de la vida de anaquel por duplicado en las harinas. Se cuantificaron mesofilos aerobios, coliformes totales, enterobacterias, mohos y levaduras. Se utilizaron Placas 3M $^{\text{TM}}$ Petrifilm $^{\text{TM}}$, siguiendo las indicaciones del proveedor.



Figura 16. Productos HMC y HMN empacados

6.5.- DIGESTIÓN *IN VITRO*

El modelo de digestión *in vitro* se adaptó de Ryan et al. (2008). Las muestras de extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión, las nanocápsulas con extracto de *O. atropes*, la tortilla control y la tortilla con nanocápsulas (previamente las tortillas se sometieron a un proceso de molienda en licuadora por 1 min para simular la masticación), se colocaron de manera separada en matraces Erlenmeyer protegidos de la luz y se mezclaron con solución salina 0.9% para crear un volumen final de 20 mL. Las muestras se acidificaron a pH 2.0 con HCl 0.5 N y se adicionó 1 mL de una preparación de pepsina porcina (0.04 g de pepsina en 1 mL HCl 0.1 M) a cada muestra y se incubó a 37 °C en un baño de agua con agitación a 95 rpm durante 1 h. Después de la digestión gástrica, se extrajeron 5 mL de cada muestra y se centrifugaron a 3,087 g/10 min para su posterior análisis de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{+\bullet}$. A continuación, se aumentó el pH a 5.3 con bicarbonato de sodio 0.9 M seguido de la adición de 150 μ L de sales biliares; glicolato (0.04 g en 1 mL de solución salina), taurodesoxicolato (0.025 g en 1 mL de solución salina), taurocolato (0.04 g en 1 mL de solución salina) y 75 μ L de pancreatina (0.04 g en 500 μ L de solución salina). El pH de cada muestra se aumentó a 7.4 con NaOH 1 M. Las muestras se incubaron en un baño de agua con agitación (95 rpm) a 37 °C durante 2 h para completar la digestión duodenal del proceso de digestión *in vitro*, posteriormente se se centrifugaron a 3,087 g/10 min y realizó el análisis de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{+\bullet}$.

VI.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La optimización del proceso de extracción de compuesto polifenólicos y actividad antioxidante tanto de *O. ficus-indica* como de *O. atropes* se realizó utilizando un diseño Box-Behnken, por metodología de superficie de respuesta (MRS), a través del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVII. El diseño Box-Behnken incluyó 17 corridas experimentales con 5 repeticiones en el punto central de experimentación para cada especie de nopal, se evaluaron tres factores de proceso con tres niveles cada uno. Se evaluó el efecto de las variables independientes; concentración de etanol (70, 83, 96 %), temperatura (24, 50, 76 ° C) y tiempo (30, 75 y 120 minutos), sobre las variables respuesta; ácidos fenólicos, flavonoides totales y actividad antioxidante por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Se utilizó una ecuación polinómica de segundo orden para expresar cada variable respuesta, en función de las variables independientes de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$$

Donde Y fue la respuesta predicha, β_0 fue la constante (intercepto), β_1 , β_2 y β_3 fueron los coeficientes lineales, β_{12} , β_{13} y β_{23} fueron los coeficientes de interacción entre los tres factores investigados, y β_{11} , β_{22} y β_{33} fueron los coeficientes cuadráticos. A los tres factores de proceso se les asignó una letra para su codificación: (A) concentración de etanol; (B) temperatura; y (C) tiempo. El análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% se llevó a cabo para confirmar la significación del modelo de regresión estimado.

Así mismo, el estudio de nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* se realizó mediante un diseño Box-Behnken de MSR que incluyó 17 corridas experimentales con 5 repeticiones en el punto central. Se evaluaron tres factores de proceso, con tres niveles cada uno que fueron: formulación MP/E (1/1, 2.5/1, y 4/1), temperatura (95, 105 y 115 °C) y aspersión de (40, 70 y 100%) y las variables de respuesta fueron: rendimiento, velocidad de alimentación, tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación, ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}.

Se utilizó una ecuación polinómica de segundo orden para expresar cada variable respuesta, en función de las variables independientes de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$$

Donde Y fue la respuesta predicha, β_0 fue la constante (intercepto), β_1 , β_2 y β_3 fueron los coeficientes lineales, β_{12} , β_{13} y β_{23} fueron los coeficientes de interacción entre los tres factores investigados, y β_{11} , β_{22} y β_{33} fueron los coeficientes cuadráticos. A los tres factores de proceso se les asignó una letra para su codificación: (A) formulación; (B) temperatura; y (C) aspersión. El análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% se llevó a cabo para confirmar la significación del modelo de regresión estimado.

Se utilizó el software de IBM SPSS® Statistics para obtener el Coeficiente de correlación de Pearson y su significancia.

Los cromatogramas se produjeron utilizando el software OriginPro 2016.

Se realizaron pruebas de Tukey-Kramer o t de Student para comparación de medias utilizando el software JMP6 (SAS, Institute, Cary, NC, EE. UU.). Los resultados con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos y se utilizó software el GraphPad Prism 3.0. U.S.A. para graficar los resultados.

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN *O. ficus-indica* Y *O. atropes*.

1.1.- *O. ficus-indica*

Se realizó un estudio de las condiciones óptimas para la extracción de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante para *O. ficus-indica*. Los resultados del estudio de Box-Behnken se presentan en la Tabla 4. El tratamiento 4 produjo la mayor extracción de ácidos fenólicos, 1.039 mg EAG/g, y la mayor actividad antioxidante en DPPH* y ABTS** y el tratamiento 16 mostró mayor extracción de flavonoides, 10.392 mg EQ/g.

Tabla 4. Valores experimentales para *O. ficus-indica*.

CE	Etanol (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH* (mg EAG/g)	ABTS** (mg EAG/g)
1	70	24	75	0.972	3.095	0.118	0.579
2	70	50	30	0.768	4.051	0.131	0.595
3	70	50	120	0.891	6.467	0.156	0.628
4	70	76	75	1.039	6.951	0.162	0.643
5	83	24	30	0.924	8.419	0.110	0.591
6	83	24	120	0.910	8.080	0.119	0.570
7	83	50	75	0.884	7.248	0.125	0.628
8	83	50	75	0.822	6.993	0.122	0.546
9	83	50	75	0.855	8.291	0.130	0.538
10	83	50	75	0.868	8.090	0.139	0.620
11	83	50	75	0.844	7.617	0.140	0.529
12	83	76	30	0.890	8.922	0.149	0.605
13	83	76	120	0.800	7.793	0.140	0.541
14	96	24	75	0.539	7.011	0.056	0.230
15	96	50	30	0.528	7.820	0.085	0.386
16	96	50	120	0.610	10.392	0.105	0.465
17	96	76	75	0.761	9.263	0.108	0.461

CE= corrida experimental, Temp= temperatura. Los datos de ácidos fenólicos, flavonoides, DPPH* y ABTS** son el promedio de triplicados.

Los modelos polinomiales de segundo orden de la Tabla 5 muestran los coeficientes de regresión y la influencia de las condiciones de extracción sobre el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, así como las actividades antioxidantes; DPPH* y ABTS**.

Tabla 5. Modelo polinomial de segundo grado para *O. ficus-indica*.

Término	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH [*]	ABTS ^{**}
Intercepto	-2.0100	-53.6274	-3.7832×10 ⁻¹	-1.2918
A	8.5974×10⁻²	1.2632	1.2718×10⁻²	5.8549×10 ⁻²
B	-1.9096×10 ⁻²	1.3760×10 ⁻¹	1.3512×10 ⁻³	-5.5300×10 ⁻³
C	6.3521×10 ⁻³	-3.3937×10 ⁻²	2.5265×10 ⁻⁴	-2.7556×10 ⁻³
AA	-6.1600×10⁻⁴	-6.4763×10 ⁻³	-8.9615×10⁻⁵	-4.5084×10⁻⁴
BB	1.1482×10 ⁻⁴	3.9296×10 ⁻⁵	-7.2781×10 ⁻⁶	-2.6468×10 ⁻⁵
CC	-2.5226×10 ⁻⁵	3.1074×10 ⁻⁴	1.6567×10 ⁻⁶	1.0979×10 ⁻⁵
AB	1.1487×10 ⁻⁴	-1.1866×10 ⁻³	5.2514×10 ⁻⁶	1.2270×10 ⁻⁴
AC	-1.7692×10 ⁻⁵	6.6709×10 ⁻⁵	-2.0512×10 ⁻⁶	1.9572×10 ⁻⁵
BC	-1.6261×10 ⁻⁵	-1.6863×10 ⁻⁴	-4.1239×10 ⁻⁶	-8.8034×10 ⁻⁶

A =% de etanol; B = temperatura (° C); C = tiempo (min).

1.1.1.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

La influencia de los factores y la eficiencia del modelo se evaluó de acuerdo con los valores de p obtenidos. El valor p asociado se usa para estimar si F es lo suficientemente grande como para indicar significancia estadística; los valores de p inferiores a 0.05 indicaron que el modelo y los términos fueron estadísticamente significativos (Segurola et al., 1999). En la extracción de ácidos fenólicos, el análisis de varianza indicó que solo la concentración de etanol en un término lineal (A) y la contribución cuadrática de la concentración de etanol (AA) tuvieron efectos significativos (p<0.05) (Tabla 6). Por tanto, una menor concentración de etanol correspondió a una mayor extracción de ácidos fenólicos. Las condiciones óptimas de proceso pronosticadas por el modelo fueron: concentración de etanol (70.6 %), temperatura (24.0 °C) y tiempo (93.2 min), para obtener un máximo de 1.011 mg EAG/g de fenoles (Tabla 8).

Por otro lado, se puede observar en la Tabla 6 que, en la extracción de flavonoides, solo la concentración de etanol (A) como término lineal tuvo un efecto significativo (p<0.05), es decir, a mayor concentración de etanol, mayor extracción de flavonoides, y las condiciones óptimas de proceso pronosticadas por el modelo fueron: concentración de etanol (90.9 %), temperatura (76.0 °C) y tiempo (119.9 min), para obtener un máximo de 9.769 mg EQ/g de flavonoides (Tabla 8).

1.1.2.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Al analizar los resultados de la superficie de respuesta para los valores de DPPH^{*}, se encontró que la concentración de etanol (términos lineales y cuadráticos) y la temperatura (término lineal) fueron significativos (p<0.05) (Tabla 6). La reducción de la concentración de etanol y el aumento de la temperatura de extracción condujeron a una mayor actividad antioxidante en los extractos y las condiciones óptimas de proceso que maximizaron la actividad antioxidante fueron; concentración de etanol (71.7 %), temperatura (74.7 °C) y tiempo (120.0 min), para obtener un máximo de actividad antioxidante de 1.160 mg EAG/g por captura de radicales DPPH^{*} (Tabla 8).

En la actividad antioxidante evaluada por la captación de ABTS^{•+}, solo la concentración de etanol (A) y la contribución cuadrática de la concentración de etanol (AA) fueron significativas ($p < 0.05$) (Tabla 6). Por lo que que cerca del límite inferior de la concentración de etanol, se mejoró la capacidad de capturar el radical ABTS^{•+} en los extracto. Las condiciones óptimas de proceso fueron: concentración de etanol (74.0%), temperatura (62.1 °C) y tiempo (30.0 min), para obtener un máximo de actividad antioxidante de 0.644 mg EAG/g (Tabla 8).

Tabla 6. Análisis de varianza para *O. ficus indica*.

Término	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	0.0008	0.0057	0.0001	0.0016
B	0.5272	0.1179	0.0010	0.1677
C	0.6580	0.3541	0.1628	0.8855
AA	0.0282	0.1166	0.0185	0.0456
BB	0.3497	0.5429	0.7375	0.2386
CC	0.7971	0.9521	0.8203	0.7326
AB	0.0789	0.9666	0.3543	0.5864
AC	0.6384	0.7623	0.3746	0.7584
BC	0.2176	0.3376	0.5205	0.5016
R ²	0.87	0.77	0.93	0.84

A =% de etanol; B = temperatura (° C); C = Tiempo (min).

La Tabla 7 muestra los coeficientes de correlación (R) entre las variables de respuesta analizadas. Se encontró una fuerte correlación entre la concentración de ácidos fenólicos y la actividad antioxidante (DPPH[•], R = 0.766; ABTS^{•+}, R = 0.862), lo que sugiere que la actividad antioxidante puede atribuirse a los ácidos fenólicos presentes en los extractos, un hallazgo que concuerda con lo reportado por Ammar et al. (2015) quienes también encontraron que los ácidos fenólicos contribuyeron directamente a la actividad antioxidante en extractos obtenidos de flores de *O. ficus-indica*.

En el presente estudio, los flavonoides no mostraron una buena correlación con la actividad antioxidante de los extractos tanto en el caso de DPPH[•] (R = -0.101) como de ABTS^{•+} (R = -0.200). Esto podría deberse a que estos compuestos generalmente se unen a moléculas de azúcar a través de la glicosilación, lo que puede influir en la disminución de la actividad antioxidante *in vitro* (Plaza et al., 2014). Sin embargo, la alteración de las estructuras de estos azúcares o de los puntos de unión de las agliconas *in vivo* puede mejorar las propiedades antioxidantes y fisiológicas (Simkhada et al., 2010). En este contexto, debe tenerse en cuenta que el potencial antioxidante de los compuestos polifenólicos depende del número y ubicación de los grupos hidroxilo, así como de la presencia de donantes de electrones constituyentes (Lapornik et al., 2005). Es importante saber si

los compuestos polifenólicos presentes en los extractos presentan alguna actividad anti-oxidante, ya que es una característica que está directamente relacionada con los efectos beneficiosos para la salud.

Tabla 7. Correlación entre variables dependientes en *O. ficus-indica*.

Variable	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH [*]	ABTS ^{**}
Ácidos fenólicos	1			
Flavonoides	-0.269	1		
DPPH [*]	0.766**	-0.101	1	
ABTS ^{**}	0.862**	-0.200	0.874**	1

Correlación significativa en el nivel 0.01**. n=17.

1.1.3.- OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE TODAS LAS RESPUESTAS

Se utilizó la función de deseabilidad en MSR para demostrar simultáneamente que todas las respuestas se vieron afectadas por la combinación de los parámetros experimentales, lo que condujo a la adquisición de las condiciones óptimas basadas en los criterios establecidos de niveles máximos de todas las variables de respuesta. El enfoque general de la función de deseabilidad fue transformar primero la respuesta en una función de deseabilidad individual adimensional. La escala de la función de deseabilidad oscila entre 0 (respuesta completamente indeseable) y 1 (respuesta completamente deseada) (Derringer y Suich, 1980; Gonzalez et al., 2007; Candiotti et al., 2014).

En la Figura 17, el diagrama de superficie de respuesta tridimensional implicó que a una concentración de etanol cercana al límite inferior y a una temperatura superior, se favorecieron los rendimientos de todas las respuestas, generando un valor de deseabilidad general de 0.85 para la optimización simultánea.

A partir del diagrama de superficie se pudo lograr una optimización simultánea utilizando una concentración de etanol del 78.97%, una temperatura de 75.9 °C y un tiempo de extracción de 120 min. La función de deseabilidad predijo respuestas de 0.92 mg EAG/g para ácidos fenólicos, 8.79 mg EQ/g para flavonoides y 0.15 mg GAE/g (DPPH^{*}) y 0.61 mg GAE/g (ABTS^{**}) para las actividades antioxidantes.

Además, los valores óptimos predichos para cada variable de respuesta individual se compararon con los valores predichos por la optimización simultánea de todas las respuestas. Se observó que todos los valores obtenidos por optimización simultánea fueron inferiores a los obtenidos mediante optimización de respuesta individual. Sin embargo, solo hubo una disminución del 8.9% para los ácidos fenólicos y del 9.9% para los flavonoides, y la diferencia en la actividad antioxidante fue mínima, del 2.5% y del 4.3%, respectivamente, para las actividades depuradoras de los radicales DPPH^{*} y ABTS^{**}, por lo que el perfil polifenólico antioxidante óptimo en el extracto de *O. ficus-indica* se conservó en gran medida después de la optimización simultánea (Tabla 8).

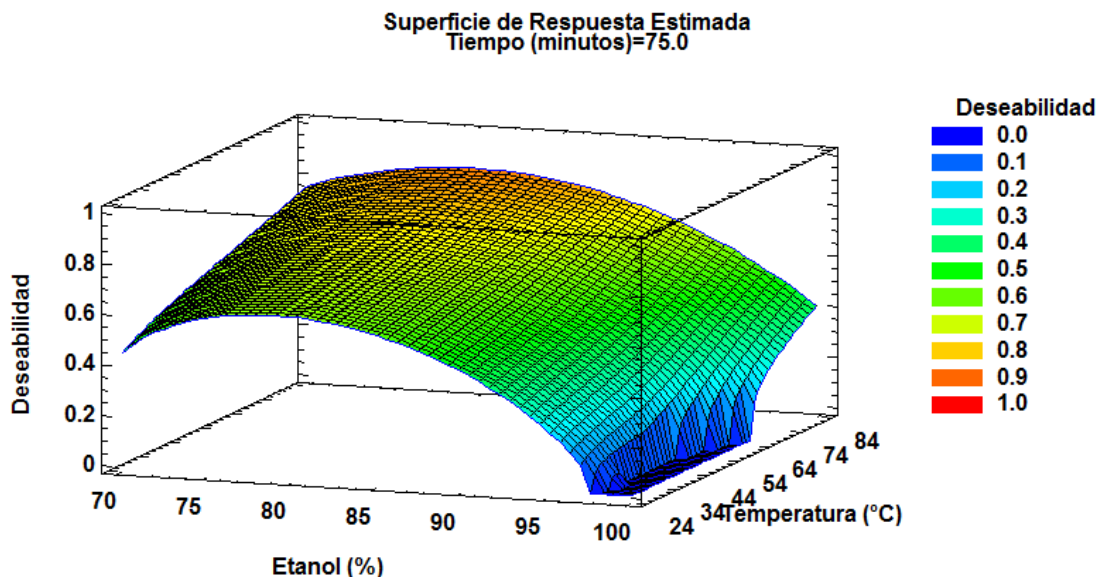


Figura 17. Diagrama de superficie de respuesta para optimización simultánea en *O. ficus-indica*.

Para validar los resultados predichos por optimización simultánea, los experimentos de verificación se realizaron por triplicado, obteniendo 0.907 mg EAG/g para ácidos fenólicos, 8.720 mg EQ/g para flavonoides, 0.153 mg EAG/g en actividad antioxidante para DPPH^{*} y de 0.612 mg EAG/g para ABTS⁺⁺ (Tabla 8). La proximidad entre estos resultados confirmó que el modelo fue adecuado para reflejar la optimización simultánea esperada, ya que la diferencia entre los valores predichos y experimentales fue menor al 5% para todas las respuestas. Los resultados estuvieron estrechamente relacionados con los datos obtenidos del análisis de optimización utilizando funciones de deseabilidad, lo que indicó que la incorporación del diseño Box-Behnken con la función de deseabilidad pudo optimizar eficazmente los parámetros de extracción.

Tabla 8. Optimización en extracciones para *O. ficus-indica*.

Variable de respuesta	Valor óptimo predicho (respuesta individual)	Valor óptimo predicho por optimización simultánea ¹	Valor óptimo experimental por optimización simultánea ¹
Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	1.011	0.921	0.907 ± 0.09
Flavonoides (mg EQ/g)	9.769	8.799	8.720 ± 0.27
DPPH [*] (mg EAG/g)	0.160	0.156	0.153 ± 0.01
ABTS ⁺⁺ (mg EAG/g)	0.644	0.616	0.612 ± 0.01

¹ 78.9% etanol; 75.9 °C; 120 min.

1.2.- *O. atropes*

El mismo diseño de Box-Behnken aplicado a *O. ficus-indica* se usó para analizar la extracción polifenoles en cladodios de *O. atropes* (Tabla 9). En este caso, el tratamiento 5 presentó la mayor extracción de ácidos fenólicos (1.130 mg EAG/g) mientras que el tratamiento 3 se extrajo la mayor cantidad de flavonoides (8.368 mg EQ/g) y la máxima actividad antioxidante de DPPH^{*} y ABTS^{**}.

Tabla 9. Valores experimentales de *O. atropes*.

CE	Etanol (%)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH [*] (mg EAG/g)	ABTS ^{**} (mg EAG/g)
1	70	24	75	0.789	7.091	0.122	0.457
2	70	50	30	0.854	7.722	0.134	0.504
3	70	50	120	1.087	8.368	0.173	0.640
4	70	76	75	0.904	5.752	0.129	0.518
5	83	24	30	1.130	7.548	0.096	0.458
6	83	24	120	0.733	8.061	0.094	0.390
7	83	50	75	0.661	6.286	0.106	0.416
8	83	50	75	0.650	6.902	0.113	0.484
9	83	50	75	0.610	7.257	0.118	0.444
10	83	50	75	0.634	5.904	0.099	0.405
11	83	50	75	0.608	6.186	0.116	0.468
12	83	76	30	0.786	6.236	0.132	0.474
13	83	76	120	0.870	5.191	0.121	0.467
14	96	24	75	0.306	5.287	0.043	0.200
15	96	50	30	0.532	7.609	0.083	0.278
16	96	50	120	0.831	5.804	0.074	0.247
17	96	76	75	0.786	6.515	0.114	0.366

CE= corrida experimental, Temp= temperatura. Los datos de ácidos fenólicos, flavonoides, DPPH^{*} y ABTS^{**} son el promedio de triplicados.

En la Tabla 10, los modelos polinomiales de segundo orden resaltan los coeficientes de regresión y su importancia en la extracción de ácidos fenólicos y flavonoides de *O. atropes*, y la actividad antioxidante (DPPH^{*} y ABTS^{**}) de los extractos.

Tabla 10. Modelo polinomial de segundo grado para *O. atropes*.

Término	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH*	ABTS**
Intercepto	4.0583	16.7498	2.5972×10^{-1}	-6.9133×10^{-1}
A	-3.1812×10^{-2}	-1.8522×10^{-1}	-1.6275×10^{-3}	3.4877×10^{-2}
B	-3.6933×10^{-2}	-8.2070×10^{-2}	-2.0972×10^{-3}	-3.8030×10^{-3}
C	-2.0830×10^{-2}	4.4570×10^{-2}	1.3144×10^{-3}	4.0273×10^{-3}
AA	2.9290×10^{-5}	8.0178×10^{-4}	-9.3195×10^{-6}	-2.6080×10^{-4}
BB	8.6834×10^{-5}	-7.1191×10^{-4}	-1.0096×10^{-5}	-2.0821×10^{-5}
CC	9.3062×10^{-5}	3.6210×10^{-4}	3.5432×10^{-6}	8.8518×10^{-6}
AB	2.6997×10^{-4}	1.8986×10^{-3}	4.7337×10^{-5}	7.7662×10^{-5}
AC	2.8205×10^{-5}	-1.0474×10^{-3}	-2.0513×10^{-5}	-7.1367×10^{-5}
BC	1.0277×10^{-4}	-3.3291×10^{-4}	-1.9230×10^{-6}	1.3034×10^{-5}

A =% de etanol; B = temperatura (° C); C = tiempo (min).

1.2.1.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

En la extracción de ácidos fenólicos, los factores significativos ($p < 0.05$) fueron la concentración de etanol, como término lineal, y el tiempo, como contribución cuadrática (Tabla 11). Por lo que, a menor concentración de etanol y mayor tiempo de extracción mayor rendimiento de ácidos fenólicos. Las condiciones óptimas para extraer ácidos fenólicos fueron concentración de etanol del 70.0%, temperatura de 75.9 °C y tiempo de extracción de 120 min, para un máximo rendimiento de 1.120 mg EAG/g de ácidos fenólicos (Tabla 13). En cambio, en la extracción de flavonoides los factores evaluados y sus interacciones no fueron significativos ($p > 0.05$) (Tabla 11), lo que significó que los límites establecidos en el diseño experimental no tuvieron influencia significativa para extraer flavonoides. Las condiciones óptimas de proceso establecidas por la MSR fueron concentración de etanol de 70.0%, temperatura de 24.0 °C y tiempo de extracción de 120 min, para obtener una extracción máxima de flavonoides de 9.327 mg EQ/g (Tabla 13).

1.2.2.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

También se evaluó la actividad captadora de radicales de los extractos obtenidos de harina de *O. atropes*. La concentración de etanol (A) y la temperatura (B), como términos lineales, así como su interacción (AB), impactaron significativamente ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante para DPPH* (Tabla 11), por tanto, a menor concentración de etanol y mayor temperatura de extracción, mayor actividad antioxidante en DPPH* de los extractos. Las condiciones óptimas del proceso que maximizaron la actividad antioxidante para DPPH* (1.160 mg EAG/g) fueron; concentración de etanol del 70.0%, temperatura de 48.8 °C y tiempo de extracción de 120 min (Tabla 13).

En la evaluación antioxidante para ABTS^{•+} (Tabla 11), solo la concentración de etanol (A) fue una variable significativa ($p < 0.05$), a menor concentración de etanol, mayor actividad antioxidante en ABTS^{•+} en los extractos. Las condiciones óptimas del proceso fueron; concentración de etanol de 70.0%, temperatura de 75.3 °C y tiempo de extracción de 119.8 min, lo que proporcionó una actividad antioxidante máxima para ABTS^{•+} de 0.605 mg EAG/g (Tabla 13).

Tabla 11. Análisis de varianza para *O. atropes*.

Término	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	0.0325	0.1131	0.0001	0.0001
B	0.4105	0.0749	0.0031	0.0514
C	0.6364	0.4374	0.6118	0.8322
AA	0.9501	0.7131	0.7835	0.1029
BB	0.2824	0.1204	0.0255	0.3125
CC	0.8392	0.1353	0.0716	0.1270
AB	0.4673	0.2159	0.2558	0.5682
AC	0.1688	0.3189	0.7027	0.5473
BC	0.0430	0.0769	0.2344	0.4706
R ²	0.72	0.75	0.93	0.91

A = % de etanol; B = temperatura (° C); C = Tiempo (min).

Las correlaciones entre las variables de respuesta analizadas evidenciaron una fuerte correlación entre la concentración de ácidos fenólicos y la actividad antioxidante (DPPH[•], $R^2 = 0.624$; ABTS^{•+}, $R^2 = 0.646$), sugiriendo que la actividad antioxidante se debe en gran medida a los ácidos fenólicos presentes en los extractos (Tabla 12). Los flavonoides se correlacionaron moderadamente con la actividad antioxidante (DPPH[•], $R^2 = 0.388$; ABTS^{•+}, $R^2 = 0.382$), por lo que, también contribuyeron en la actividad antioxidante presente en los extractos, aunque en menor grado que los ácidos fenólicos.

Tabla 12. Correlación entre variables dependientes en *O. atropes*

Variable	Ácidos fenólicos	Flavonoides	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
Ácidos Fenólicos	1			
Flavonoides	0.353	1		
DPPH [•]	0.624**	0.388	1	
ABTS ^{•+}	0.646**	0.382	0.9359**	1

Correlación significativa en el nivel 0.01**. n=17.

Se realizó una optimización simultánea para todas las variables respuesta con el uso de la función de deseabilidad en MSR, y la deseabilidad general fue de 0.89. De acuerdo con el diagrama de superficie de respuesta tridimensional (Figura 18), a menor concentración de etanol y a temperatura media en el rango evaluado se favoreció la extracción de compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante en los extractos.

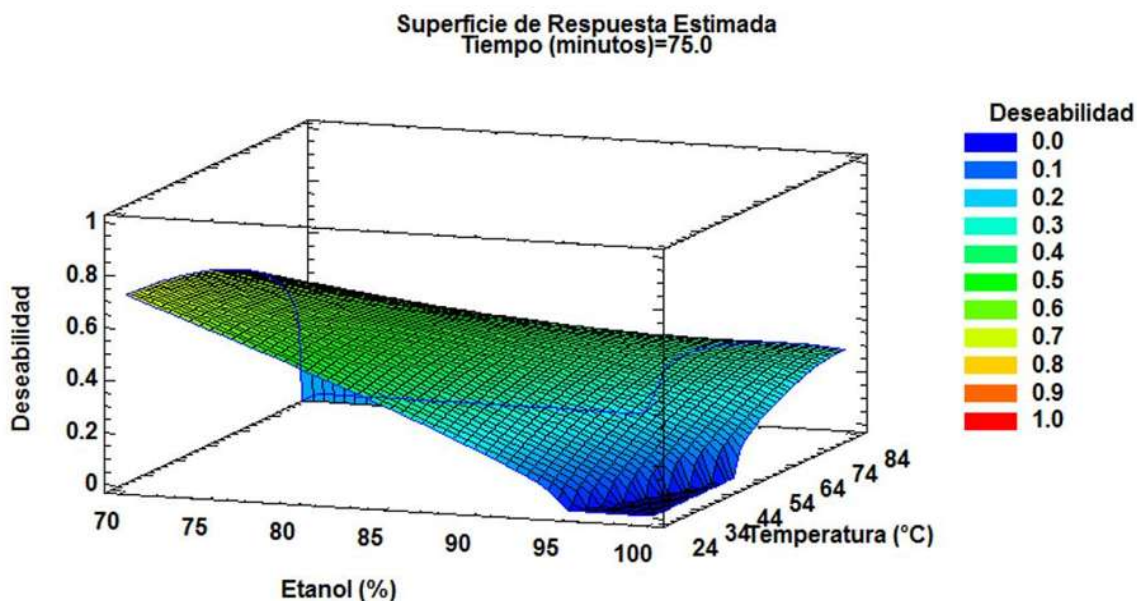


Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta para la optimización simultánea en *O. atropes*.

Las condiciones de proceso establecidas por optimización simultánea fueron: concentración de etanol de 70.0%, temperatura de 47.8 °C y tiempo de extracción de 120 min. La función de deseabilidad predijo respuestas de 0.978 mg EAG/g para ácidos fenólicos, 8.368 mg EQ/g para flavonoides y 0.160 y 0.588 mg EAG/g en las actividades antioxidantes para DPPH^{*} y ABTS⁺⁺, respectivamente (Tabla 13).

Los valores óptimos predichos de cada variable respuesta individual se compararon con los resultados predichos en la optimización simultánea para todas las respuestas, y se determinó el porcentaje de disminución. Como resultado solo hubo una disminución del 12.6% para los ácidos fenólicos y del 10.2% para los flavonoides, y la diferencia en la actividad antioxidante fue nula o muy baja (DPPH^{*}, 0.0%; ABTS⁺⁺, 2.8%), por lo que la actividad antioxidante óptima del extracto de *O. atropes* se conservó después de la optimización simultánea (Tabla 13).

Los resultados predichos por optimización simultánea fueron validados mediante experimentos, realizados por triplicado, para evaluar la idoneidad del modelo, y se obtuvo un contenido de ácidos fenólicos de 0.920 mg EAG/g, 8.619 mg EQ/g para flavonoides, 0.160 mg EAG/g en DPPH^{*} y 0.567 mg EAG/g para ABTS⁺⁺. Los resultados obtenidos de estos experimentos confirmaron la idoneidad del modelo desarrollado ya que la diferencia entre los valores predichos y los valores experimentales osciló alrededor del 5% para cada variable de respuesta (Tabla 13).

Tabla 13. Optimización en *O. atropes*.

Variable de respuesta	Valor óptimo predicho (como respuesta individual)	Valor óptimo predicho por optimización simultánea ¹	Valor óptimo experimental por optimización simultánea ¹
Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	1.120	0.978	0.920 ± 0.05
Flavonoides (mg EQ/g)	9.327	8.368	8.619 ± 0.24
DPPH [*] (mg EAG/g)	0.160	0.160	0.160 ± 0.003
ABTS ^{**} (mg EAG/g)	0.605	0.588	0.567 ± 0.03

¹ 70.0% etanol; 47.8 °C; 120 min.

1.3.- EFECTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO

1.3.1.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL

Se observó que en las dos especies de nopal la extracción de polifenoles y actividad antioxidante óptima fue cuando se utilizó menor concentración de etanol 78.9% en *O. ficus-indica* y 70.0% en *O. atropes*. A mayor concentración de etanol, la extracción de compuestos polifenólicos disminuyó, posiblemente debido a la menor penetración del etanol en la matriz de la planta como resultado de la alteración de las proteínas, lo que condujo a una menor solubilidad de algunos compuestos polifenólicos extraíbles (Tóth et al., 2014). Esto a su vez pudo haber afectado la tasa de extracción, mientras que el agua y una menor cantidad de etanol pudieron llegar a las células, como documentan Yang y Zhai (2010), favoreciendo así la extracción de compuestos polifenólicos.

1.3.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

Para obtener valores óptimos en la extracción de polifenoles con actividad antioxidante en *O. ficus-indica* se empleó temperatura de 75.9°C y en *O. atropes* fue de 47.8 °C. Por tanto, el aumento de la temperatura incrementó el fenómeno de difusión que ayudó a extraer los polifenoles presentes en las muestras, probablemente debido a los efectos vibracionales de las moléculas en la pared celular, lo que facilitó la migración de fitoquímicos libres al solvente, según informa Moahamad et al. (2010). El calentamiento aplicado en la extracción también podría haber mejorado la desorción de los componentes que forman la estructura celular del material vegetal, dado lugar a la liberación de algunos compuestos polifenólicos unidos a la lignina y a los polisacáridos (Wu et al., 2008; Cardozo et al., 2010; Santos-Zea et al., 2011). Esto pudo haber resultado en la mayor cantidad de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante en los extractos.

1.3.3.- EFECTO DEL TIEMPO

Se observó que 120 min fue el tiempo ideal para que se extrajerá mayor contenido de compuestos antioxidantes en las dos especies de nopal, resultados que coincidieron con lo informado por Aguirre et al. (2013), quienes identificaron como tiempo óptimo 2 h, para extraer polifenoles, sin afectar la actividad antioxidante, de la piel de *O. ficus-indica*.

Santos-Zea et al., (2011) reportaron rendimientos de ácidos fenólicos de 0.318 mg EAG/g y 0.593 mg EAG/g para dos variedades de la especie *O. ficus-indica* y en el presente estudio en *O. ficus-indica* y *O. atropes* por optimización simultánea se obtuvieron rendimientos de 0.907 mg EAG/g y de 0.920 mg EAG/g respectivamente, una mejora en comparación con los hallazgos de autores anteriores.

Sin embargo, otros investigadores han descrito concentraciones más altas de ácidos fenólicos, como Corral-Aguayo et al. (2008) quienes informaron 2.091 mg EAG/g en cladodios de *O. ficus-indica* M. cv Milpa Alta. Así mismo, Lemos et al. (2016), reportaron 2.840 mg EAG/g de ácidos fenólicos en *O. ficus indica* y 1.200 mg EAG/g de ácidos fenólicos para *O. atropes*. En la investigación de estos autores, *O. ficus-indica* presentó 3.020 mg EQ/g de flavonoides, y *O. atropes* 2.260 mg EQ/g de flavonoides, y en el presente estudio se tuvieron 8.720 mg EQ/g en *O. ficus-indica* y 8.619 mg EQ/g en *O. atropes*, que fueron 2.9 y 3.8 veces mayor el rendimiento respectivamente, comparado con estos autores. Estas variaciones en el contenido de polifenoles están relacionadas con las condiciones agroecológicas de la región donde se colectaron los cladodios, variedad, madurez del cladodio, método de extracción y cuantificación de compuestos (Koolen et al., 2013).

Los extractos de *O. ficus-indica* y de *O. atropes* presentaron concentraciones de ácidos fenólicos mayores que frutas como la tuna (0.723 mg de EAG/g b.s.) y papaya (0.538 mg de EAG/g b.s.), y fueron comparables con el aguacate (1.183 mg EAG/g b.s.) y menores que los que presentaron la guayaba (4.538 mg EAG/g b.s.) o las fresas (2.561 mg EAG/g b.s.) de acuerdo con el estudio de Corral-Aguayo et al. (2008).

Las pruebas con radicales DPPH^{*} y ABTS^{**} pueden brindar una idea de la estructura y su relación en la actividad antioxidante de los compuestos contenidos en los extractos (Bernini et al., 2018). Esta caracterización antioxidante proporcionó información sobre la reactividad química de los compuestos presentes en los extractos, y que presentan la capacidad de eliminar radicales libres por transferencia de electrones. Se ha informado que los valores de la actividad antioxidante total en extractos de *Opuntia* spp. se correlacionan con el contenido de flavonoides principalmente (Fernández-López et al., 2010).

Los extractos obtenidos en este estudio presentaron importante cantidad de compuestos polifenólicos, además se mostró su actividad antioxidante, por lo que tanto cladodios de *O. ficus-indica* como de *O. atropes* pueden ser alimentos atractivos para la industria alimentaria como ingredientes funcionales, con el fin de prevenir o disminuir el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas.

En la Tabla 14, se muestra de manera comparativa las condiciones de extracción y los valores óptimos de las variables respuesta tanto para *O. ficus indica* como para *O. atropes*, donde se observa que los rendimientos en la extracción de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura de radicales DPPH^{*} y ABTS^{**} no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.05$), sin embargo, para obtener estos rendimientos en *O. ficus-indica* se aplicó un 37.0% más temperatura y un 11.3% más etanol en comparación con *O. atropes*, por lo que en términos de costos de proceso se optó por el uso de *O. atropes* como fuente de compuestos polifenólicos y continuar con la deshidratación de este extracto.

Tabla 14. Valores óptimos de extracción en *O. ficus-indica* y *O. atropes*.

Variable de respuesta	<i>O. ficus indica</i> ¹	<i>O. atropes</i> ²
Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	0.907 ± 0.09 ^a	0.920 ± 0.05 ^a
Flavonoides (mg EQ/g)	8.720 ± 0.27 ^a	8.619 ± 0.24 ^a
DPPH [*] (mg EAG/g)	0.153 ± 0.01 ^a	0.160 ± 0.003 ^a
ABTS ^{**} (mg EAG/g)	0.612 ± 0.01 ^a	0.567 ± 0.03 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ¹ 78.9% etanol; 75.9 °C; 120 min. ² 70.0% etanol; 47.8 °C; 120 min.

2.- DESHIDRATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

2.1.- DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

El extracto de *O. atropes* obtenido por optimización simultánea se ajustó al 1% de sólidos, y se llevaron a cabo 2 métodos de deshidratación: deshidratación en horno de secado a 50 °C, y deshidratación por nanoaspersión a 105 °C. El extracto de *O. atropes* deshidratado en horno de secado (EODH) se obtuvo en forma de cristales de color ámbar (Figura 19). Su recuperación fue difícil por su higroscopicidad y, por tanto, presentó un bajo rendimiento, 49.70 ± 7.38% (Tabla 19). El extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión (EODNA) se obtuvo en forma de un polvo fino de color beige (Figura 19), aunque también se presentó higroscopicidad, su recuperación fue mayor y con un rendimiento de 74.29%, el cual se clasificó como alto por el uso de esta tecnología (Arpagaus et al., 2017), y fue comparable a lo informado por Saikia et al. (2015), donde estos investigadores obtuvieron alrededor del 80% de rendimiento para el extracto fenólico de la pulpa de *Averrhoa carambola* L.



Figura 19. Extractos deshidratados A) EODH y B) EODNA.

No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el contenido de ácidos fenólicos en los extractos, siendo 11.13 mg EAG/g para el extracto de *O. atropes* antes de la deshidratación (EOAD) y 10.62 mg EAG/g para EODH y 11.80 mg EAG/g para EODNA (Tabla 15). El contenido de flavonoides del EOAD fue 24.05 EQ/g y no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) con EODNA, que fue 22.26 EQ/g. Sin embargo, en EODH, sí hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) y se cuantificaron flavonoides de 19.22 ± 0.09 EQ/g, por lo que hubo una disminución de 20.08% con respecto al extracto de *O. atropes* antes del deshidratado.

Para la actividad antioxidante por captura del radical DPPH^{*}, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el porcentaje de inhibición de EOAD, que fue 18.32%, comparado con el de los dos tratamientos de deshidratado, que fue alrededor del 17% (Tabla 15). Para la actividad antioxidante en función del radical ABTS^{**}, no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre EOAD (53.49%) en comparación con el EODNA (54.08%). Sin embargo, se encontró menos inhibición en EODH (49.30%; Tabla 17) lo que indicó que el tratamiento de deshidratación en horno de secado disminuyó 7.8% de la actividad antioxidante para este radical.

Con base en estos resultados, se estableció que la deshidratación por nanoaspersión a 105 °C no afectó el contenido de compuestos polifenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) ni la actividad antioxidante (DPPH^{*} y ABTS^{**}) del extracto de *O. atropes*. Además, el secado por nanoaspersión a 105 °C presentó algunas ventajas sobre el secado en horno de secado a 50 °C, que están relacionadas con el rendimiento y el contenido de flavonoides y actividad antioxidante en ABTS^{**}. Sin embargo, si el deshidratado por nanoaspersión no está disponible, el secado en un horno a 50 °C/24 h podría ser un método factible para la deshidratación de extractos, aunque la disminución en la cantidad de algunos compuestos polifenólicos, como los flavonoides, y por lo tanto la actividad antioxidante del extracto se debe considerar, junto con un menor rendimiento y que el tiempo de deshidratación es mayor.

Tabla 15. Deshidratación de extracto de *O. atropes*.

Parámetro	EOAD	EODH	EODNA
Rendimiento (%)	-	49.70 ± 7.38	74.29 ± 3.09
Ácidos fenólicos (mg EAG/g)	11.13 ± 0.38 ^{a,b}	10.62 ± 0.27 ^b	11.80 ± 0.61 ^a
Flavonoides (mg EQ/g)	24.05 ± 1.44 ^a	19.22 ± 0.09 ^b	22.26 ± 1.02 ^a
DPPH [*] (mg EAG/g)	1.71 ± 0.04 ^a	1.63 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.03 ^a
% Inhibición (10 mg)	18.32 ± 0.42 ^a	17.76 ± 0.46 ^a	17.92 ± 0.31 ^a
ABTS ^{**} (mg EAG /g)	5.66 ± 0.00 ^a	5.19 ± 0.11 ^b	5.70 ± 0.05 ^a
% Inhibición (10 mg)	53.49 ± 0.07 ^a	49.30 ± 1.08 ^b	54.08 ± 0.48 ^a

EOAD= Extracto de *O. atropes* antes de la deshidratación, EODH= Extracto de *O. atropes* deshidratado en horno de secado a 50°C y EODNA= Extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión a 105 °C. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar de tres determinaciones. Medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

2.1.- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS POR UPLC-Q/TOF-MS²

Los compuestos polifenólicos en una matriz alimentaria se encuentran generalmente libres, esterificados y unidos a otras macromoléculas, como polisacáridos, fibra y proteínas (Juániz, et al., 2016). La aplicación de solventes como etanol y agua favorecieron la extracción de los compuestos polifenólicos, en su forma libre o como glucósidos.

Las Tablas 16 y 17 muestran los perfiles polifenólicos del extracto de *O. atropes* deshidratado en horno de secado (EODH) y el extracto deshidratado por nanoaspersión (EODNA), respectivamente, estos se obtuvieron por UPLC-Q/TOF-MS², y es importante mencionar que esta es una caracterización química tentativa de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos de *O. atropes*.

Las Figuras 20-A y 20-B muestran los tiempos de retención y los 8 picos encontrados tanto para EODH como para EODNA, respectivamente. En ambos casos, correspondieron principalmente a compuestos polifenólicos de tipo flavonoide, del grupo de los flavonoles, que fueron glucósidos kaempferol e isoramnetina. Como muestran las Tablas 16 y 17, los dos extractos presentaron cromatogramas muy similares y los picos correspondieron a los mismos compuestos polifenólicos para ambos tratamientos. Por tanto, los dos métodos de deshidratación conservaron adecuadamente la proporción en la que se encontraron estos compuestos bioactivos.

Las Tablas 16 y 17 muestran que para los dos tratamientos de deshidratación (EODH y EODNA), los picos 3 y 4 pertenecen al kaempferol 3-O- (ramnosil-galactósido) -7-O-ramnósido. Sin embargo, estos 2 compuestos tenían diferentes tiempos de retención; por lo tanto, se designaron como isómeros. En el pico 7, se detectó kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido. En los picos 5 y 6, estaban presentes dos isómeros de isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O- (ramnosil-hexósido) y en el pico 8 se encontró otro glucósido de isoramnetina, que fue isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido. El pico 1 correspondió al medioresinol, que es un lignano, que hasta ahora no ha sido reportado en el perfil polifenólico del género *Opuntia* spp. Este compuesto se encontró en una proporción similar con respecto a los glicósidos de kaempferol (kaempferol 3-O- [ramnosil-galactósido] -7-O-ramnósido).

A los lignanos se les atribuyen una amplia gama de propiedades fisiológicas que influyen positivamente en la salud humana (Durazzo, 2018). Su ingesta se relaciona principalmente con sus posibles acciones quimiopreventivas contra el cáncer, por sus propiedades fitoestrogénicas, y la prevención de enfermedades cardiovasculares (Anandhi et al., 2018; Xiao et al., 2018). La presencia de este lignano aumenta el número de compuestos bioactivos en los cladodios de *O. atropes* y, por lo tanto, su interés por la salud humana (Rodríguez et al., 2007; El-Mostafa et al., 2014), ya sea como molécula bioactiva individual o en conjunto con las otras moléculas presentes en el extracto. Finalmente, se detectó un ácido fenólico en el pico 2, que fue el 4-O-glucósido del ácido *p*-cumárico, en baja proporción con respecto al resto de compuestos polifenólicos.

La metodología utilizada en este estudio (UPLC-Q/TOF-MS²) brindó información sobre la proporción en la que se encontraban los compuestos polifenólicos que fueron principalmente glucósidos flavonoides. Como se observa en los cromatogramas presentados

en las Figuras 20-A y 20-B, la proporción de glicósidos de kaempferol con respecto a los glicósidos de isoramnetina fue mayor, y el lignano (medioresinol) se detectó en una proporción muy similar a la de los glicósidos de kaempferol.

Tabla 16. Perfil polifenólico de EODH obtenido por UPLC-Q/TOF-MS².

Pico N°	Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Ms ² FIM	Asignación tentativa	Clase de polifenol	Familia de polifenol	Fórmula molecular
1	0.78	387.1490	195.1070	Medioresinol	Lignano	Lignanós	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
2	1.98	325.1316	175.0132	Ácido <i>p</i> -cumárico 4-O-glicósido	Ácido fenólico	Ácidos hidroxicinnámicos	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
3	3.39	739.1702	175.0130	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido) -7-O-ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
4	3.49	739.1711	175.0131	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido) -7-O-ramnósido (isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
5	3.63	769.1743	175.0131	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
6	3.78	769.1764	175.0135	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido) (isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
7	4.84	593.1451	175.0128	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
8	5.10	623.1503	175.0129	Isoramnetina 3-O-glicósido 7-O-ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆

Tr= tiempo de retención, FIM= fragmento del ion molecular.

Tabla 17. Perfil polifenólico de EODNA obtenido por UPLC-Q/TOF-MS².

Pico N°	Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Ms ² FIM	Asignación tentativa	Clase de polifenol	Familia de polifenol	Fórmula molecular
1	0.78	387.1469	195.1059	Medioresinol	Lignano	Lignanos	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
2	1.98	325.1367	175.0133	Ácido <i>p</i> -cumárico 4- <i>O</i> -glucósido	Ácido fenólico	Ácidos hidroxicínamicos	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
3	3.39	739.1693	175.0129	Kaempferol 3- <i>O</i> - (ramnosil-galactósido) -7- <i>O</i> -ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
4	3.49	739.1671	175.0122	Kaempferol 3- <i>O</i> - (ramnosil-galactósido) -7- <i>O</i> -ramnósido (isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
5	3.63	769.1717	175.0126	Isoramnetina 3- <i>O</i> - ramnósido-7- <i>O</i> - (ramnosil-hexósido)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
6	3.78	769.1743	329.2764	Isoramnetina 3- <i>O</i> - ramnósido-7- <i>O</i> - (ramnosil-hexósido) (isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
7	4.84	593.1470	329.2766	Kaempferol 3- <i>O</i> - galactósido 7- <i>O</i> - ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
8	5.10	623.1507	329.2765	Isoramnetina 3- <i>O</i> - glucósido 7- <i>O</i> - ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆

Tr= tiempo de retención, FIM= fragmento del ion molecular.

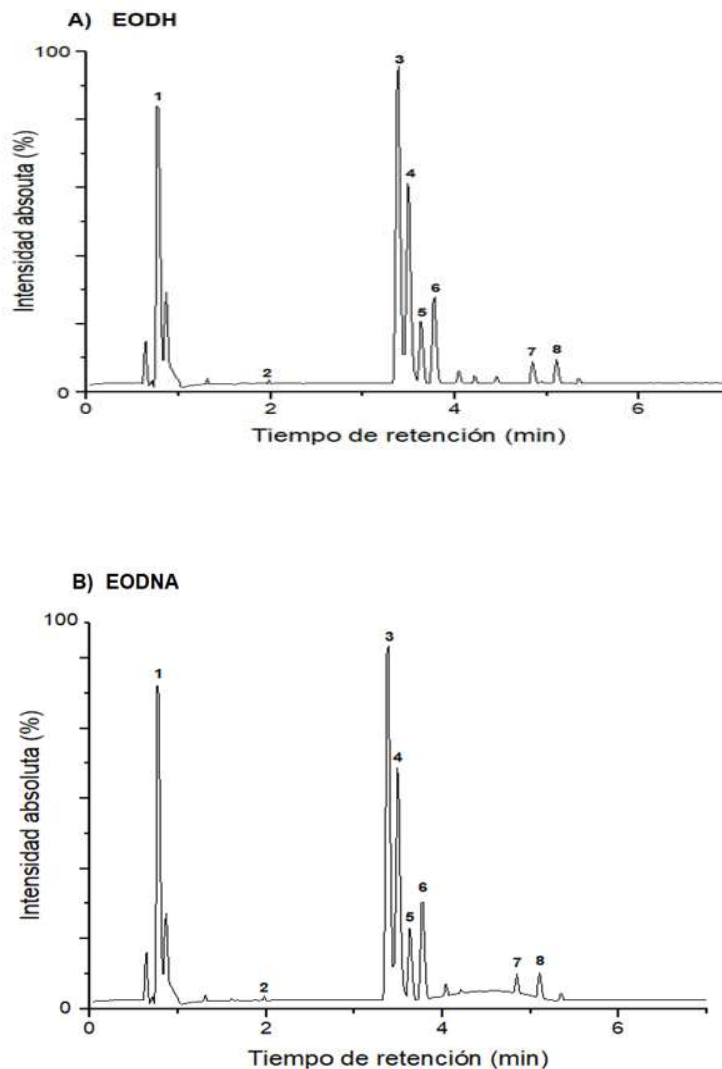


Figura 20. Cromatogramas obtenidos por UPLC-Q/TOF-MS² en muestras de *O. atropes* deshidratadas. A) Extracto de *O. atropes* deshidratado en horno de secado (EODH) B) Extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión (EODNA). Para la asignación de cada pico, consulte las Tablas 16 y 17.

Los resultados encontrados en este estudio coincidieron con lo reportado previamente por Park et al. (2007) quienes indicaron que tanto el kaempferol como la isoramnetina se encuentran principalmente como glucósidos en flores, frutos y cladodios de *Opuntia* spp. De Santiago et al. (2018) reportaron flavonoides en los cladodios de la especie de *O. ficus-indica* como los compuestos polifenólicos predominantes, de los cuales aproximadamente el 80% se derivaron de isoramnetina, mientras que los derivados de quercetina y kaempferol estaban en menor concentración. Guevara-Figueroa et al. (2010) analizaron diferentes variedades de cladodios de *Opuntia*, y encontraron la presencia de flavonoides en todas las variedades y en la investigación realizada por Santos-Zea et al. (2011), identificaron a los flavonoides presentes en diferentes variedades de cladodios de *Opuntia*

como isoramnetina y kaempferol, principalmente en sus formas glucosídicas en extractos crudos. En investigaciones previas han indicado que la isoramnetina es el flavonoide predominante en los cladodios de *Opuntia* spp. y el que tiene la mayor variedad de derivados glucosídicos (Ginestra et al., 2009; Kim y Park, 2009).

Los flavonoides como el kaempferol y los 3-*O*-glucósidos de isoramnetina, identificados en este estudio, se han asociado con un efecto antioxidante, un efecto antiinflamatorio intestinal y efectos cardioprotectores (Kuti et al., 2004; Matias et al., 2014). Por tanto, el consumo de estos extractos puede aportar importantes beneficios para la salud.

3.- NANOENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE *O. atropes*

3.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL DE PARED

El secado por nanoaspersión puede dar varios tipos de formas de partículas y nanocápsulas, como lisas y esféricas, colapsadas, con hoyuelos, arrugadas, similares a las pasas y muy arrugadas o dobladas (Nandiyanto y Okuyama, 2011), lo cual está relacionado con los parámetros de proceso y con la formulación de los tratamientos. La microscopía electrónica de barrido (MEB) se usa normalmente para examinar los polvos secados por aspersion, ya que proporciona información valiosa sobre la morfología de las partículas, como el tamaño, la forma y la estructura de la superficie de las partículas.

En la Figura 21 se presentan las diferentes formulaciones de las nanocápsulas elaboradas; la formulación que presentó una superficie lisa, con poca aglomeración entre partículas, morfología esférica y bien definida fue la formulación F1, donde se usó maltodextrina como material de pared, así mismo, se observó que el tamaño de partícula fue variado, donde la mayor parte de las partículas fueron menores a 1 μm , y de acuerdo con lo descrito por Fang y Bhandari, (2010), estas entran dentro de la escala nanométrica, ya que a los tamaños de las partículas formadas a través de la encapsulación por nanoaspersión las clasifican en macro (> 5 μm), micro (1 μm a 5 μm) y nano (<1 μm).

En la F3, que fue donde se utilizó aislado de proteína de soya y maltodextrina (1/1) como material de pared, se observaron nanocápsulas, sin embargo, su morfología fue muy variada ya que presentaron morfología esférica, amorfa y una considerable cantidad de cápsulas colapsadas. Y en las formulaciones F2, F4 y F5, se obtuvo una limitada cantidad de nanocápsulas, en su mayoría fueron microcápsulas de forma irregular, con superficie ampliamente abollada, que se pudo atribuir a la contracción de las partículas durante el proceso de secado (Robert et al., 2010), y también a la naturaleza química de las proteínas utilizadas como material de pared.

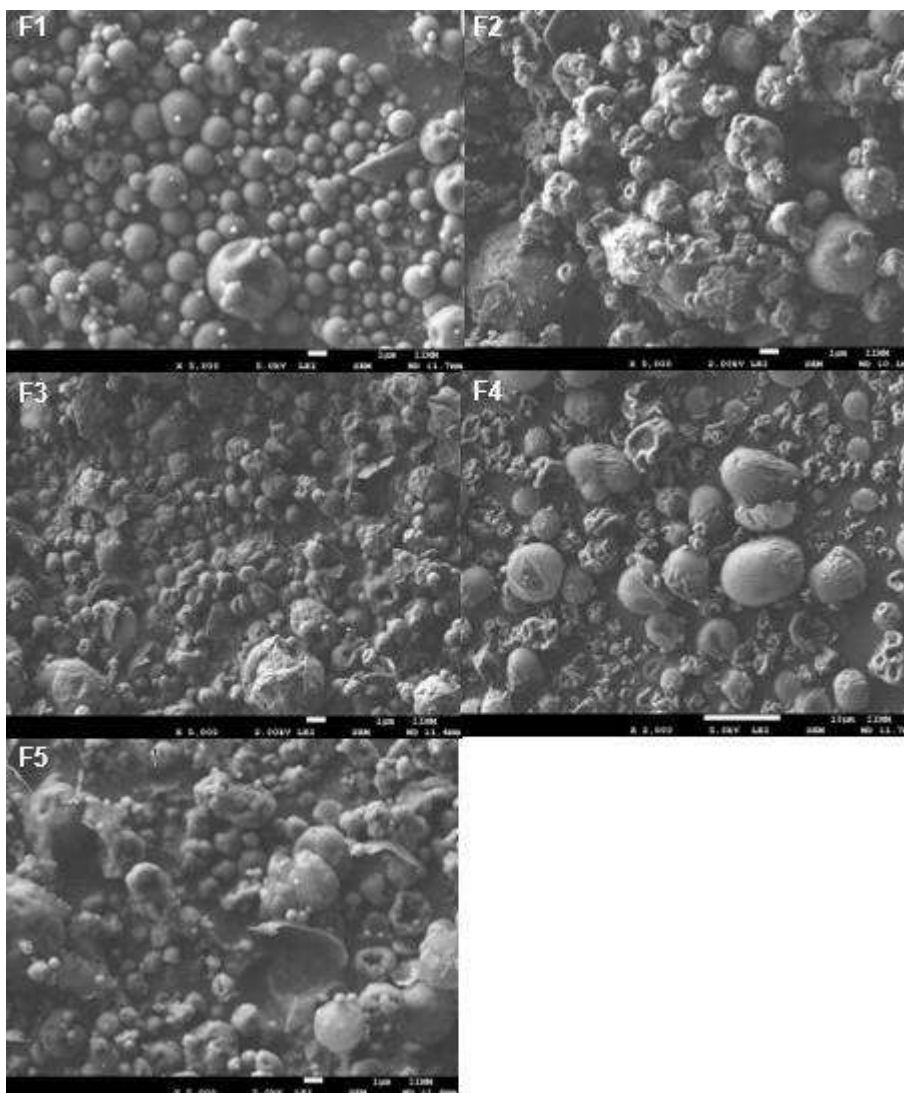


Figura 21. Micrografías de nanocápsulas obtenidas por MEB. F1: Nanocápsulas de maltodextrina con extracto de *O. atropes*, F2: Nanocápsulas de aislado de proteína de soya con extracto de *O. atropes*, F3: Nanocápsulas de aislado de proteína de soya y maltodextrina con extracto de *O. atropes*, F4: Nanocápsulas de caseinato de calcio con extracto de *O. atropes*, F5: Nanocápsulas de caseinato de calcio y maltodextrina con extracto de *O. atropes*.

Es probable que la interacción proteína-polifenol que se efectuó en las formulaciones F2 y F4, pudo ser principalmente por medio de interacciones hidrofóbicas no covalentes, estas interacciones posteriormente se pudieron haber estabilizado por enlaces de hidrógeno (Flores et al., 2015). En cuanto a la relación proteína-polisacárido que se presentaron en F3 y F5, pudo ser principalmente impulsada por interacciones electrostáticas. Sin embargo, como se mostró en las micrografías presentadas en la Figura 21, las interacciones entre el extracto y el material de pared que presentó proteína en su formulación

no fueron favorables debido a la formación de partículas amorfas, de gran tamaño y fracturadas. Las proteínas tienen la propiedad de responder a un cambio en el pH, ya que contienen grupos carboxílicos y amino, por lo que al modificar el pH del medio se podrían obtener mejores resultados.

Con base a los resultados obtenidos por MEB, el material más apropiado para llevar a cabo la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* fue la maltodextrina, la cual logró formar una película de recubrimiento adecuada. Se ha reportado que este material de pared minimiza el contacto de compuestos polifenólicos encapsulados con el oxígeno (Pourashouri et al., 2014), pueden durar más tiempo y que liberan los materiales encapsulados en condiciones simuladas del tracto digestivo (Medina et al., 2013).

3.2.- NANOENCAPSULACIÓN USANDO MSR

En la Tabla 18, se observa que el tratamiento T16 presentó el mayor rendimiento en la recuperación de las nanocápsulas con un 94.30%, mayor velocidad de alimentación, de 18.20 mL/h, y eficiencia de encapsulación del 89.10%, que se relacionó con una mayor aspersion y también se atribuyó a la cantidad de maltodextrina utilizada como material de pared, que estuvo en relación 4/1 con el extracto de *O. atropes*, lo cual afectó positivamente al rendimiento, la velocidad de alimentación y el porcentaje de nanoencapsulación del extracto, lo cual concuerda con la investigación de Arpagaus et al. (2017), donde reportaron que utilizando el Nano Spray-Dryer B-90 en condiciones optimizadas se pueden lograr rendimientos altos que van de 76% a 96% en diversas sustancias. Gu et al. (2015) mostraron que el rendimiento incremento con el aumento de la concentración del polímero de pared, lo cual coincidió con el presente estudio. Li et al. (2010) utilizaron como materiales de pared la goma arábiga, maltodextrina, alcohol polivinílico, almidón modificado y obtuvieron velocidades de alimentación de 3-25 mL/h, que fueron similares a las obtenidas en este estudio, sin embargo, estos autores emplearon una malla más pequeña que fue de 4 μm y en el presente estudio se utilizó una malla de 7 μm , por lo que la baja velocidad de alimentación se atribuyó a los componentes del extracto de *O. atropes*. Otras investigaciones han mostrado diferentes valores en la eficiencia de encapsulación, utilizando la misma tecnología, que van desde el 53% en la encapsulación de ácido fólico con almidón modificado informado por Pérez-Masiá et al. (2015), hasta un 99% en la eficiencia de encapsulación reportada por Dimer et al. (2015) para el resveratrol utilizando Poli (ϵ -caprolactona) como material de pared.

Por otro lado, el T2 presentó el rendimiento más bajo que fue de 21.43 % y eficiencia de encapsulación de 22.87%, y se atribuyó a que la formulación contenía una mayor cantidad de extracto, que fue en relación 1/1 respecto a la maltodextrina, por lo que las nanocápsulas obtenidas presentaron higroscopicidad debida al extracto de *O. atropes*, lo que dificultó su recuperación afectando el rendimiento y la eficiencia de encapsulación, además es probable que se hayan liberado algunos compuestos bioactivos durante la recuperación del polvo, debido a la alta higroscopicidad, lo que pudo favorecer el contacto con los radicales libres, causando así su deterioro (Silva et al., 2013). También presentó la más baja velocidad de alimentación que fue 2.80 mL/h, lo que se relacionó con la baja aspersion del tratamiento que fue del 40%.

El tamaño de partícula mayoritario que se presentaron en los diferentes tratamientos osciló entre 110-405 nm, y por tanto se obtuvieron nanocápsulas en todos los tratamientos, siendo el T6 donde se obtuvieron las nanocápsulas de menor tamaño con 110 nm y el T12 las nanocápsulas con mayor tamaño 405 nm. Li et al. (2010) reportaron tamaños de partícula por debajo de 1 μm para maltodextrina utilizando 0.1% en peso de concentración de sólidos, y en la presente investigación los resultados fueron similares, pero se utilizó 1% de sólidos. La evaluación del tamaño de las nanocápsulas obtenidas es importante debido a que las partículas más pequeñas exhiben una mayor velocidad de liberación del compuesto activo en comparación con las más grandes, debido a la diferencia en el área de superficie expuesta (Beck-Broichsitter et al., 2015).

Respecto a los ácidos fenólicos el tratamiento T1 presentó mayor cantidad con 1.72 mg EAG/g y el T2 mayor contenido de flavonoides con 11.94 mg EQ/g, el contenido polifenólico presente en los T1 y T2 fue debido a que presentaron mayor contenido de extracto en su formulación. En el T5 se obtuvo menor contenido de ácidos fenólicos que fue de 0.94 mg EAG/g y el T14 menor contenido de flavonoides que fue de 2.94 mg EQ/g, por lo que el contenido de ácidos fenólicos se redujo casi a la mitad en el T5 respecto al T1, y, por otro lado, el contenido de flavonoides se redujo cuatro veces en el T14 respecto al T2.

La mayor actividad antioxidante en DPPH \cdot la presentó el tratamiento T3 y en ABTS $^{2+}$ fue el T1, estos tratamientos presentaron mayor cantidad de extracto en su formulación que fue en relación de 1/1 (maltodextrina/extracto de *O. atropes*), en cambio el tratamiento T14 fue el que presentó menor actividad antioxidante para la captura del radical DPPH \cdot que fue de 0.24 mg EAG/g y para el ABTS $^{2+}$ fue de 0.32 mg EAG/g, el T14 es uno de los tratamientos que contuvo mayor cantidad de material de pared con respecto al núcleo, el cual fue 4/1 (maltodextrina/extracto de *O. atropes*), por lo que contuvo menor extracto de *O. atropes* y por tanto también la actividad antioxidante de estos tratamientos disminuyó con respecto a los tratamientos que presentaron mayor cantidad de extracto de *O. atropes* en su formulación.

Pisoschi et al. (2018) indicaron que la nanoencapsulación a veces puede conducir a una disminución en la cuantificación de la actividad antioxidante y/o compuestos polifenólicos debido a la unión del compuesto encapsulado al polímero. En la presente investigación este fenómeno pudo haber contribuido a la disminución de la actividad antioxidante en los tratamientos que contenían mayor cantidad de maltodextrina, ya que tanto para la actividad antioxidante en DPPH \cdot como en ABTS $^{2+}$ se presentó una disminución del 75% entre el tratamiento que presentó el mayor valor, comparado con el que presentó menor valor para estas dos variables respuesta, esto se puede observar en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores experimentales para la nanoencapsulación de *O. atropes*.

T	Form (MP/E)	Temp (°C)	Asp (%)	R (%)	Va (ml/h)	TP (nm)	EE (%)	AF (mg EAG/g)	FL (mg EQ/g)	DPPH* (mg EAG/g)	ABTS** (mg EAG/g)
1	1/1	95	70	67.97	7.23	233.80	43.34	1.72	8.78	0.65	0.91
2	1/1	105	40	21.43	2.80	163.43	22.67	1.66	11.94	0.70	0.82
3	1/1	105	100	39.46	12.00	229.80	25.59	1.70	9.85	0.73	0.82
4	1/1	115	70	24.62	7.40	127.77	66.35	1.68	8.33	0.40	0.74
5	2.5/1	95	40	50.00	3.00	194.17	31.91	0.94	5.80	0.48	0.47
6	2.5/1	95	100	83.13	6.00	110.87	53.41	0.96	5.37	0.36	0.48
7	2.5/1	105	70	81.08	11.26	236.63	79.59	1.44	2.84	0.51	0.45
8	2.5/1	105	70	76.10	10.40	268.67	82.42	1.42	1.65	0.51	0.50
9	2.5/1	105	70	70.98	10.00	176.70	81.40	1.41	2.25	0.51	0.47
10	2.5/1	105	70	72.04	9.93	175.30	80.12	1.40	2.20	0.46	0.44
11	2.5/1	105	70	63.24	12.30	200.43	82.37	1.40	2.51	0.48	0.44
12	2.5/1	115	40	58.45	4.00	405.20	32.57	1.24	5.83	0.46	0.51
13	2.5/1	115	100	85.22	9.00	154.77	55.69	0.95	7.02	0.29	0.45
14	4/1	95	70	83.24	8.50	225.03	72.23	0.98	2.04	0.24	0.32
15	4/1	105	40	88.89	8.80	243.67	86.77	1.02	2.33	0.35	0.41
16	4/1	105	100	94.30	18.20	275.00	89.10	0.98	1.55	0.34	0.32
17	4/1	115	70	81.27	7.30	146.93	80.72	0.97	1.31	0.25	0.44

T=tratamiento; Form=fomulación (MP/E); Temp=temperatura (°C); Asp=aspersión (%); R=rendimiento (%); Va= velocidad de alimentación (mL/h); TP= tamaño de partícula (nm); EE= eficiencia de encapsulación (%); AF= ácidos fenólicos (mg EAG/g); FL=flavonoides (mg EQ/g); DPPH* (mg EAG/g); ABTS** (mg EAG/g).

Los modelos polinomiales de segundo grado de la Tabla 19, muestran los coeficientes de regresión y la influencia de las condiciones de nanoencapsulación sobre el rendimiento, velocidad de alimentación, eficiencia de encapsulación, y sobre el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, así como sobre las actividades antioxidantes DPPH* y ABTS**.

Tabla 19. Modelo polinomial de segundo grado para nanoencapsulación.

Término	R	Va	EE	AF	FL	DPPH*	ABTS**
Intercepto	8.02110	-449.01419	-1753.59497	-22.52558	169.96253	-11.07895	3.57483
A	16.18500	1.45667	43.08139	-0.523333	-6.25583	-0.573889	-0.908611
B	-0.434750	8.50407	30.50637	0.433533	-2.60971	0.241533	-0.037375
C	0.347250	0.122483	3.76188	0.057367	-0.558986	0.000033	0.006208
AA		0.395444	-0.640556	0.053556	0.719444	0.005222	0.057222
BB		-0.040602	-0.140787	-0.001970	0.012062	-0.001207	0.000138
CC		-0.001353	-0.026340	-0.000216	0.002788	0.000027	4.1666×10 ⁶
AB		-0.02283	-0.242000	0.000500	-0.004667	0.004333	0.004833
AC		0.001111	-0.003278	-0.000444	0.007278	-0.000222	-0.000500
BC		0.001667	0.001350	-0.000258	0.001350	-0.000042	-0.000058

A = formulación (MP/E); B = temperatura (° C); C = aspersión (%). Va= velocidad de alimentación (mL/h); R= rendimiento (%); EE= eficiencia de encapsulación (%); AF= ácidos fenólicos (mg EAG/g); FL=flavonoides (mg EQ/g); DPPH* (mg EAG/g); ABTS** (mg EAG/g).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el efecto de los diferentes factores y sus interacciones sobre las diferentes variables respuesta evaluados por MSR se presentan en la Tabla 20, donde se observa que la formulación y la aspersión tuvieron un efecto lineal positivo y significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento. Se pronosticó mediante la ecuación polinomial de segundo grado que se pueden obtener un rendimiento de hasta del 94.4%, empleando la formulación (MP/E) 3.9/1, 114.4 °C y 90.6 % de aspersión.

Por otro lado, la formulación y la aspersión tuvieron un efecto lineal positivo y significativo ($p < 0.05$), así como un efecto cuadrático positivo y significativo ($p < 0.05$) de la temperatura para la velocidad de alimentación. En condiciones de proceso optimizadas, para la formulación (MP/E) 4/1, 105.65 °C y 100 % de aspersión, se pronosticó tener una velocidad de alimentación máxima de 15.51 mL/h. En el tamaño de partícula no se encontró un efecto significativo ($p > 0.05$) para los factores y sus interacciones evaluados en este estudio.

Para la eficiencia de encapsulación, se obtuvo que la formulación presentó un efecto lineal y la aspersión un efecto cuadrático, estos efectos fueron positivos y significativos ($p < 0.05$) sobre esta variable respuesta (Tabla 20). Se pronosticó 86.4% para la eficiencia de encapsulación en condiciones optimizadas: formulación (MP/E) 3.8/1, 107.8 °C y 74.36 % de aspersión.

Los resultados para ácidos fenólicos (Tabla 20), indicaron que la formulación en un término lineal (A) y cuadrático (AA), la interacción entre la temperatura y la aspersión (BC), y el término cuadrático de la temperatura (BB) y la aspersión (CC) tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en el contenido de ácidos fenólicos en los diferentes tratamientos de nanoencapsulación. Para el contenido de flavonoides, la formulación (A) y la contribución cuadrática de la formulación (AA), temperatura (BB) y aspersión (CC) presentaron efecto significativo ($p < 0.05$).

En la actividad antioxidante por captura del radical DPPH^{*}, la formulación en un término lineal (A), la interacción de la formulación y la temperatura (AB) y la temperatura en un término cuadrático (BB), tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$). Para el radical ABTS^{**} en mg EAG/g, se obtuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) para la formulación en un término lineal (A), y cuadrático (AA) y en la interacción de la formulación y la temperatura (AB), como se presenta en la Tabla 20.

Dependiendo de las variables de proceso que se manejen para nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* vía secado por nanoaspersión, se pronosticó que las nanocápsulas pueden contener hasta un máximo de ácidos fenólicos de 1.73 mg EAG/g, utilizando como parámetros de proceso: formulación (MP/E) 1.1/1, 111.7 °C y 54.5% de aspersión y de flavonoides hasta 12.03 mg EQ/g, con la formulación (MP/E) 1/1, 95.6 °C y 40.7% de aspersión. En cuanto a la capacidad antioxidante, la optimización de los parámetros fue: formulación (MP/E) 1/1, 102.4 °C y 40.1% de aspersión para un máximo valor de 0.73 mg EAG/g en DPPH^{*} y para ABTS^{**}; formulación (MP/E) 1/1, 95.0 °C y 96.2% de aspersión para obtener un valor máximo de 0.92 mg EAG/g.

Tabla 20. Análisis de varianza para la nanoencapsulación.

Término	R	Va	EE	AF	FL	DPPH [*]	ABTS ^{**}
	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
A	< 0.0001	0.0770	0.0024	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
B	0.3251	0.6593	0.3818	0.2041	0.8488	0.0706	0.5356
C	0.0292	0.0044	0.2186	0.1591	0.4315	0.1249	0.0567
AA		0.4498	0.8272	0.0047	0.0075	0.6730	< 0.0001
BB		0.0082	0.0624	0.0003	0.0277	0.0027	0.2349
CC		0.3096	0.0074	0.0003	0.0007	0.3938	0.7335
AB		0.7727	0.5953	0.8116	0.8800	0.0493	0.0003
AC		0.9663	0.9826	0.5302	0.4875	0.7258	0.0769
BC		0.6743	0.9522	0.0376	0.3949	0.6619	0.1510
R ²	0.75	0.84	0.86	0.98	0.96	0.93	0.99

A = formulación (MP/E); B = temperatura (° C); C = aspersión (%). Va= velocidad de alimentación (mL/h); R= rendimiento (%); EE= eficiencia de encapsulación (%); AF= ácidos fenólicos (mg EAG/g); FL=flavonoides (mg EQ/g); DPPH^{*} (mg EAG/g); ABTS^{**} (mg EAG/g).

En la Tabla 21 se muestran las correlaciones entre las variables dependientes analizadas, donde se encontró una correlación alta y positiva entre la concentración de ácidos fenólicos y la actividad antioxidante por captura de radicales DPPH^{*} y ABTS^{**}, de 0.81 en los dos casos. Lo que nos indicó que a medida que se incrementó el contenido de ácidos fenólicos en las nanocápsulas también se incrementó la actividad antioxidante tanto en DPPH^{*} como del ABTS^{**}. En los flavonoides se tuvo una correlación alta con la actividad antioxidante por captura del radical ABTS^{**}, de 0.86, por lo que a mayor cantidad de flavonoides en las nanocápsulas mayor actividad antioxidante en función del radical ABTS^{**}, sin embargo, también se obtuvo correlación negativa alta entre los flavonoides y

la eficiencia de encapsulación, de -0.86, lo que indicó que a mayor eficiencia de encapsulación hay un menor contenido de flavonoides en las nanocápsulas.

Tabla 21. Correlación entre las variables respuesta en el proceso de nanoencapsulación.

Variable	Va (mL/h)	R (%)	EE (%)	AF (mg EAG/g)	FL (mg EQ/g)	DPPH* (mg EAG/g)	ABTS** (mg EAG/g)
Va (mL/h)	1.00						
R (%)	0.48	1.00					
EE (%)	0.63**	0.66**	1.00				
AF (mg EAG/g)	-0.01	-0.68**	-0.28	1.00			
FL (mg EQ/g)	-0.48	-0.77	-0.86**	0.53*	1.00		
DPPH* (mg EAG/g)	-0.12	-0.64**	-0.57**	0.81**	0.62**	1.00	
ABTS** (mg EAG/g)	-0.33	-0.74**	-0.65**	0.81**	0.86**	0.77**	1.00

Va= velocidad de alimentación (mL/h); R= rendimiento (%); EE= eficiencia de encapsulación (%); AF= ácidos fenólicos (mg EAG/g); FL=flavonoides (mg EQ/g); DPPH* (mg EAG/g); ABTS** (mg EAG/g). Correlación significativa en el nivel 0.01** y 0.05*. n=17.

Para optimizar cada variable respuesta se requiere de diferentes condiciones de proceso, que incluyen a la formulación, temperatura y aspersion, en el proceso de nanoencapsulación, sin embargo, en esta investigación se consideraron diversas características o variables respuestas para obtener nanocápsulas con propiedades y calidad adecuadas. Ya que, si sólo se hace la optimización para una característica de las nanocápsulas, éstas condiciones de proceso pueden resultar inadecuadas para las otras características (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Se optimizaron simultáneamente cuatro variables de respuesta, de mayor interés para esta investigación y a su correlación (Tabla 21), que fueron: rendimiento, eficiencia de encapsulación, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical ABTS**. La función de deseabilidad arrojó un valor de 0.56 para estas respuestas. Se obtuvo un tratamiento óptimo (TO), en el que, las condiciones del proceso fueron las siguientes: formulación relación (MP/E) 1/1, temperatura 104.7 °C y aspersion del 88.3%. La función de deseabilidad pronosticó para TO, un rendimiento del 49.32%, una eficiencia de encapsulación del 53.24%, un contenido de flavonoides de 8.43 mg EQ/g y una actividad antioxidante en ABTS** de 0.82 mg EAG/g. Sin embargo, se observó que el T13 (Tabla 18) presentó mejores características para la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes*, en comparación con TO, ya que presentó un alto rendimiento de 85.22%, eficiencia de encapsulación de 55.69%, contenido de flavonoides de 7.02 mg EQ/g, y actividad antioxidante en ABTS** de 0.45 mg EAG/g, estos valores fueron más favorables que los previstos para el TO. Por tanto, se seleccionó T13 como el más adecuado para llevar a cabo la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes*, y tanto las nanocápsulas con extracto

de *O. atropes*, como el extracto de *O. atropes* (EODNA) sin encapsular, se caracterizaron por UPLC-Q/TOF-MS² para comparar el perfil polifenólico del extracto de *O. atropes* tanto en forma libre como nanoencapsulada.

3.3.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO POR UPLC-ESI-Q/TOF-MS²

El perfil cromatográfico obtenido por UPLC-Q/TOF-MS² tanto para las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* purificadas como para el extracto de *O. atropes* purificado, se presentan en las Tablas 22 y 23, respectivamente, donde se muestran los datos de los tiempos de retención, las asignaciones tentativas de cada pico para los compuestos identificados usando ionización negativa, los datos del fragmento del ion molecular predominante, fórmula molecular, la clase y familia de polifenoles a las que pertenecen.

Se presentaron algunas diferencias en los cromatogramas correspondientes al extracto de *O. atropes* y a las nanocápsulas con el extracto de *O. atropes*, por un lado, se identificaron más polifenoles en las nanocápsulas que fueron 18 con respecto a 17 del extracto. Se identificó al ácido *p*-cumárico 4-*O*-glucósido en las nanocápsulas, el cual se pudo haber recuperado debido a la protección que proporcionó la maltodextrina como material de pared y también se observó que los picos 10 y 11 en la Figura 22-A, tuvieron mayor intensidad que los picos 9 y 10 de la Figura 22-B, estos picos correspondieron a isómeros de la isoramnetina 3-*O*-ramnósido-7-*O*-(ramnosil-hexósido), y de acuerdo al tiempo de retención en el que se identificaron fueron los mismos compuestos tanto en el extracto como en las nanocápsulas, por lo que se puede inferir que el material de pared empleado en las nanocápsulas pudo haber contribuido en la protección de estos glucósidos de isoramnetina y por tanto en la disminución de la degradación.

Tabla 22. Perfil fenólico de nanocápsulas con extracto de *O. atropes* por UPLC-Q/TOF-MS²

Pico N°	Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Ms ² FIM	Asignación tentativa	Clase de polifenol	Familia de polifenol	Fórmula molecular
1	0.80	387.1436	342.1453	Medioresinol	Lignano	Lignanos	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
2	1.33	315.1125	175.0105	Isoramnetina	Flavonoide	Flavonoles	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
3	1.98	325.1315	163.0905	Ácido <i>p</i> -cumárico 4-O-glucósido	Acido fenólico	Ácidos hidroxicinámicos	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
4	2.25	355.1382	175.0108	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	Ácido fenólico	Ácidos hidroxicinámicos	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
5	2.79	755.1544	375.1250	Kaempferol 3-O-glucosil-ramnosil-glucósido	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
6	3.28	739.1664	173.1364	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
7	3.34	739.1675	175.0103	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
8	3.40	739.1659	175.0101	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
9	3.44	739.1636	431.2135	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido (Isómero III)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
10	3.56	769.1654	739.1613	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido)	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
11	3.70	769.1671	739.1619	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido) (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
12	3.97	593.1393	217.1594	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
13	4.12	593.1398	175.0105	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
14	4.30	593.1395	175.0103	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
15	4.36	623.1449	175.0109	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
16	4.74	593.1408	175.0108	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero III)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
17	4.84	623.1441	175.0107	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
18	5.00	623.1422	175.0103	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆

Tr=tiempo de retención; FIM= Fragmento del ion molecular.

Tabla 23. Perfil polifenólico del extracto de *O. atropes* obtenido por UPLC-Q/TOF-MS²

Pico N°	Rt (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Ms ² FIM	Asignación tentativa	Clase de polifenol	Familia de polifenol	Fórmula molecular
1	0.78	387.1415	342.1432	Medioresinol	Lignano	Lignanos	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
2	1.33	315.1111	175.0099	Isoramnetina	Flavonoide	Flavonoles	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
3	2.29	355.1360	175.0097	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	Ácido fenólico	Ácidos hidroxicinámicos	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
4	2.36	355.1363	175.0099	Ácido ferúlico 4-O-glucósido (Isómero I)	Ácido fenólico	Ácidos hidroxicinámicos	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
5	2.87	755.1499	361.1723	Kaempferol 3-O-(ramnosil-ramnosil-glucósido)	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
6	3.40	739.1607	643.1956	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
7	3.46	739.1620	175.0097	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
8	3.54	739.1603	365.2122	Kaempferol 3-O-(ramnosil-galactósido)-7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoide	Flavonoles	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
9	3.68	769.1613	739.1583	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido)	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
10	3.82	769.1624	739.1594	Isoramnetina 3-O-ramnósido-7-O-(ramnosil-hexósido) (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀
11	4.11	593.1376	175.0099	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
12	4.28	593.1367	175.0098	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
13	4.45	593.1371	175.0099	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
14	4.52	623.1407	175.0099	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
15	4.91	593.1359	175.0096	Kaempferol 3-O-galactósido 7-O-ramnósido (Isómero III)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
16	5.00	623.1403	175.0099	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido (Isómero I)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
17	5.15	623.1392	175.0095	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido (Isómero II)	Flavonoides	Flavonoles	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆

Tr=tiempo de retención; FIM= Fragmento del ion molecular.

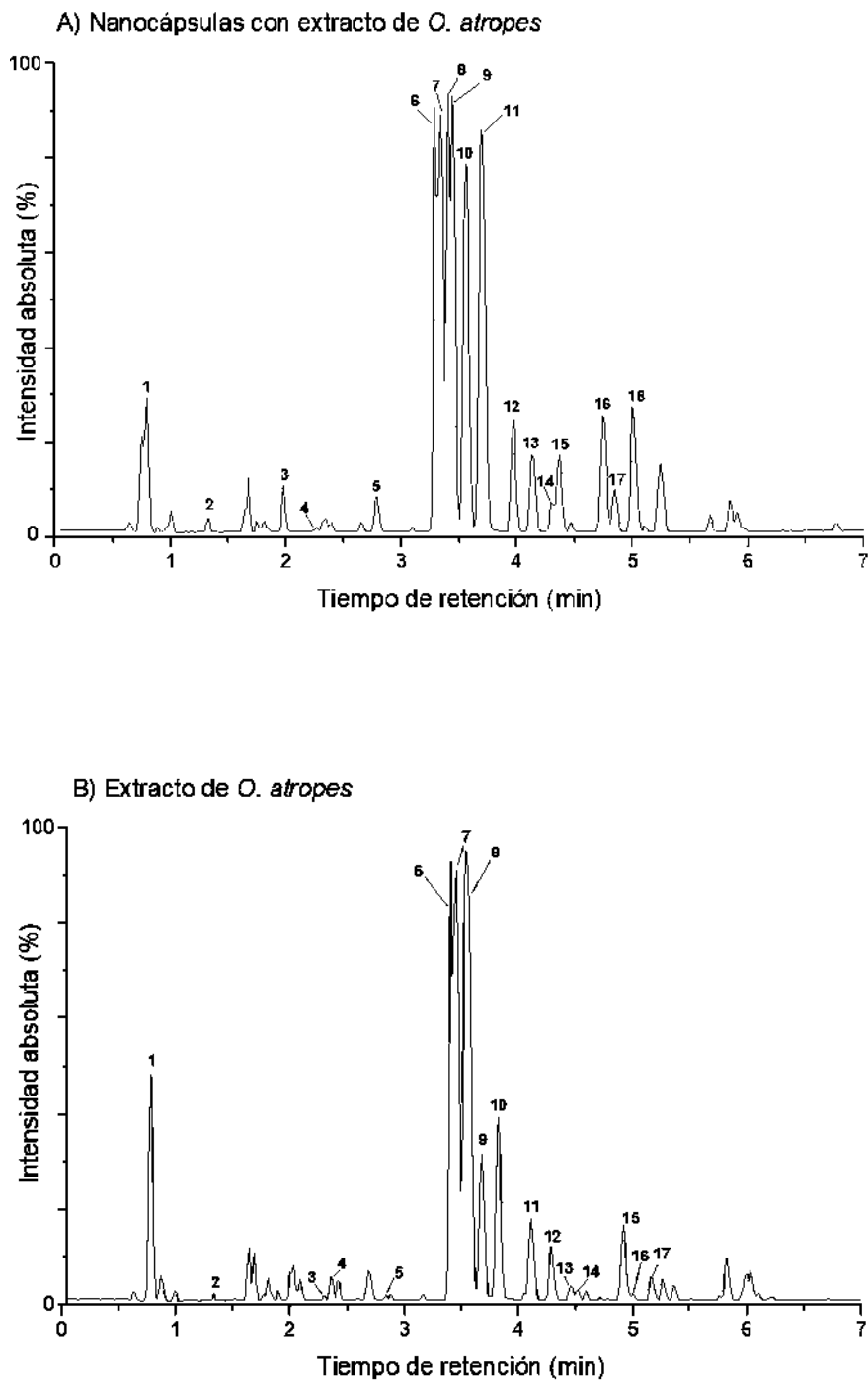


Figura 22. Cromatogramas obtenidos por UPLC-Q/TOF-MS² para nanocápsulas con extracto de *O. atropes* y extracto de *O. atropes* purificado. Para la asignación de cada pico, consultar las Tablas 22 y 23.

4.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES Y ESTABILIDAD EN EXTRACTO Y NANOCÁPSULAS DE *O. atropes*

En el extracto de *O. atropes* deshidratado por nanoaspersión (Tabla 15), y en las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* desarrolladas a partir del T13 (Tabla 18), se realizaron algunas pruebas antioxidantes como la captación del radical $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 y evaluación de la estabilidad polifenólica y antioxidante durante el almacenamiento, debido a que estos tratamientos de deshidratación y nanoencapsulación, respectivamente, mostraron mejores características para conservar los compuestos polifenólicos del extracto de *O. atropes*. A partir de esta sección se designaron como EOA (extracto deshidratado por nanoaspersión) y NEOA (nanocápsulas con extracto de *O. atropes* desarrolladas a partir del T13) para su identificación en el texto.

4.1.- PRUEBAS ANTIOXIDANTES

Es importante considerar la capacidad del extracto de *O. atropes* para capturar especies de relevancia biológica, como los radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, estos radicales están involucrados en la patología de la obesidad, y son de gran interés para este estudio. Los valores obtenidos para estos mecanismos antioxidante-antirradical, se muestran en la Tabla 24, donde se observa que el extracto de *O. atropes* tanto libre (EOA) como nanoencapsulado (NEOA) actúa como potente eliminador de radicales hidroxilo ya que su CE_{50} se encontró en concentraciones entre 3.28 y 2.73 mg/mL, respectivamente, en comparación con el radical peróxido de hidrógeno, para el cual se necesitó una mayor concentración del extracto ya sea en su forma libre o nanoencapsulada (EOA, NEOA) para llegar a su CE_{50} la cual fue >10.0 mg/mL en ambos tratamientos. NEOA mostró mejor capacidad para neutralizar al radical hidroxilo, ya que presentó una CE_{50} de 2.73 mg/mL comparado con EOA que presentó una CE_{50} de 3.28 mg/mL, lo cual se atribuyó a la oxidación del extracto de *O. atropes* libre (EOA), ya que se observó higroscopicidad en la muestra, a diferencia de las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* (NEOA) que al estar protegido el extracto de *O. atropes* con la maltodextrina como material de pared logró preservar de manera favorable su actividad contra el radical $\cdot\text{OH}$.

Tabla 24. Actividad antioxidante en EOA y en NEOA.

Parámetro	EOA	NEOA
$\text{CE}_{50} \cdot\text{OH}$ (mg/mL)	3.28 ± 0.16^a	2.73 ± 0.15^b
$\text{CE}_{50} \text{H}_2\text{O}_2$ (mg/mL)	> 10.0	> 10.0

Valor promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los resultados se expresaron por miligramo de extracto de *O. atropes*; donde 1 mg de EOA fue equivalente a 3.5 mg de NEOA.

Aunque se sabe que los polifenoles están presentes en el nopal, los estudios sobre su actividad antioxidante son limitados. Este estudio muestra el mecanismo antioxidante que podría seguir el extracto de *O. atropes*, debido a que se encontró que actúa como

eliminador del radical hidroxilo, este es el radical de oxígeno más reactivo conocido y es altamente tóxico debido a que puede romper enlaces covalentes en proteínas y carbohidratos y por tanto causar la peroxidación de lípidos y destruir las membranas celulares. Este radical es de corta duración ($\sim 10^{-9}$ s) pero al reaccionar muy rápidamente y sin selectividad, puede activar cascadas de reacciones con radicales que pueden promover enfermedades como artritis, aterosclerosis, cáncer y diabetes, entre otras (Prior, et al., 2015). Lee et al. (2002), reportaron para un extracto de *O. ficus indica* var. *saboten* un CE_{50} entre 1.5-2 mg/mL para el radical hidroxilo, esta concentración es más baja que la mostrada en el presente estudio tanto en EOA como en NEOA. En otro estudio realizado por Avila-Nava et al. (2014), el extracto de *O. ficus indica* presentó un CE_{50} de 5.6 mg/mL para neutralizar el efecto del radical hidroxilo, y en el presente estudio la concentración fue menor, entre 3.28 para EOA y 2.73 mg/mL para NEOA. Por otro lado, Avila-Nava et al. (2014), encontraron mayor actividad antioxidante del extracto de *O. ficus indica* para el peróxido de hidrógeno con una CE_{50} de 6.9 μ g/mL, comparado con en este estudio en donde el CE_{50} para el peróxido de hidrógeno, fue >10.0 mg/mL, para el EOA y para NEOA.

4.2.- PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN ALMACENAMIENTO

Durante el almacenamiento a 41 °C/65% de HR, se evaluó la eficiencia de encapsulación de los compuestos polifenólicos de extracto de *O. atropes* (Gráfico 1), en el que se observó que en el día 0, las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* (NEOA), tuvieron 55.68% de encapsulación, que fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo y al día 48 presentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del 6.35% por lo se siguió preservando el $49.33 \pm 0.39\%$ de encapsulación de los compuestos polifenólicos.

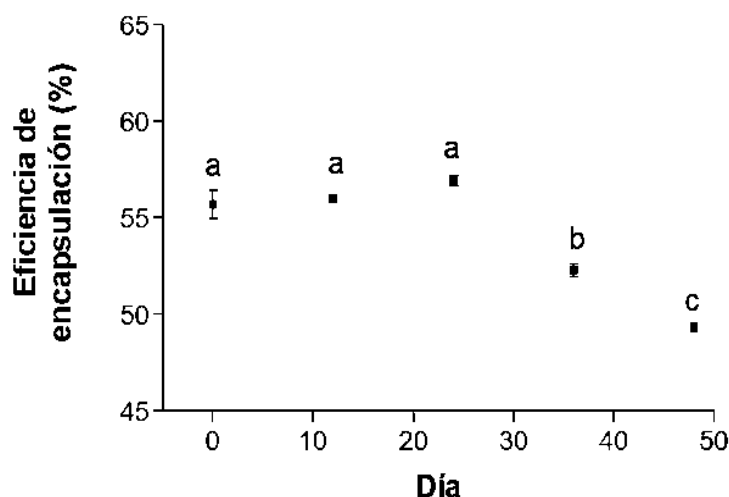


Gráfico 1. Evaluación de la eficiencia de encapsulación en almacenamiento. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los ácidos fenólicos aumentaron significativamente ($p < 0.05$) al día 36, tanto en las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* (NEOA), como en el extracto de *O. atropes*

(EOA), sin embargo, al día 48 disminuyeron (Gráfico 2). NEOA al día 0 presentó 3.33 mg EAG/g y al día 36 se obtuvo 6.13 mg EAG/g por lo que hubo un incremento del 84.08%, y al día 48 disminuyó a 5.36 mg EAG/g, por lo que el incremento del día 0 al día 48 de ácidos fenólicos fue de 60.96%. En EOA inició con una concentración al día 0 de 11.80 mg EAG/g que incrementó a 16.90 mg EAG/g al día 36, obteniendo un 43.2% más de estos compuestos, y al día 48 presentó una disminución a 15.09 mg EAG/g, por lo que el incremento de estos compuestos del día 0 al día 48 fue del 27.88%.

El aumento en estos compuestos bioactivos pudo ser debido a la hidrólisis de conjugados de polifenoles, dando como resultado moléculas de glucósidos más simples y/o liberación de polifenoles, y por tanto, se obtuvo mayor concentración de estos compuestos a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento; este comportamiento ya ha sido informado en la micoencapsulación de polifenoles de granada por Robert et al. (2010), donde los compuestos incrementaron a medida que pasó el tiempo de almacenamiento y posteriormente comienza a decrecer su valor.

También se observó en el Gráfico 2, que en el día 0 hay menor la concentración de ácidos fenólicos en NEOA que en EOA, aunque estos dos tratamientos tienen la misma concentración de extracto (3.5 de NEOA contiene 1 g de EOA, por lo que 3.5 g de NEOA equivale a 1 g de EOA), esto se atribuyó al proceso de encapsulación, como se mencionó anteriormente se pudieron haber formado algunos complejos con el material encapsulante, lo que disminuyó la cuantificación de estos compuestos. Sin embargo, se observó que durante el almacenamiento estos compuestos se fueron liberando, incrementando significativamente.

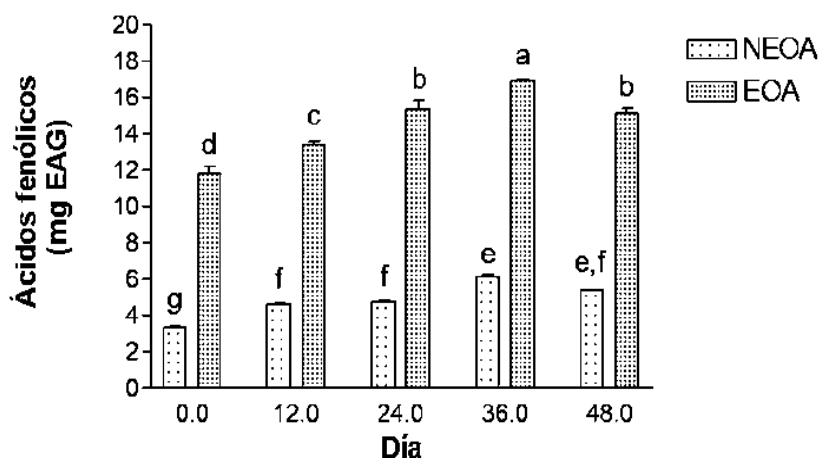


Gráfico 2. Evaluación de los ácidos fenólicos durante almacenamiento. NEOA (mg EAG/3.5 g) equivalentes a EOA (mg EAG/1 g). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En los flavonoides se observó un efecto contrario, en el Gráfico 3 se muestra que a medida que transcurrió el tiempo estos compuestos bioactivos disminuyeron, en EOA en el día 0 presentó 22.26 mg EQ/g de flavonoides y al día 48 fue de 13.12 mg EQ/g, que

representó una disminución del 41.06% de estos compuestos bioactivos. Se encontró menor pérdida de estos compuestos en NEOA que fue del 16.45%, donde el valor inicial de flavonoides al día 0 fue de 24.57 mg EQ/g y al día 48 fue de 19.79 mg EQ/g.

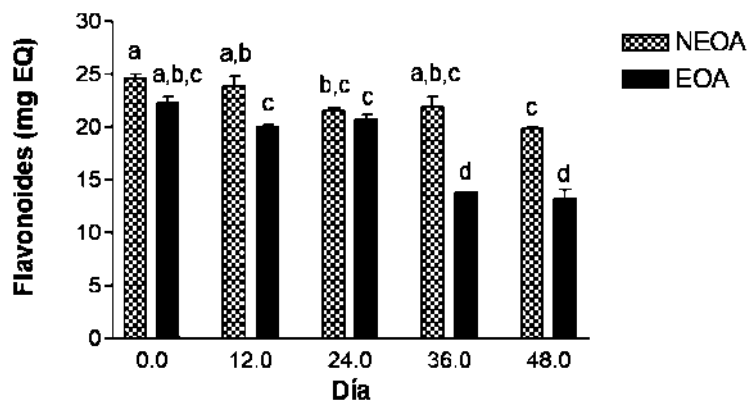


Gráfico 3. Evaluación de los flavonoides durante almacenamiento. NEOA (mg EQ/3.5 g) equivalentes a EOA (mg EQ/1 g). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La mayor degradación de flavonoides en EOA en comparación con NEOA, podría atribuirse a que el EOA no contienen ningún agente transportador, por lo que es más higroscópico y, por lo tanto, absorbe más agua, lo que facilita las reacciones de degradación. Por otro lado, la disminución de los flavonoides en NEOA se podría deber mayormente a los compuestos que se encontraban fuera de las nanocápsulas, los cuáles fueron más propensos a la oxidación que aquellos que estaban dentro (Tolun et al., 2020), como se observó al haber menor degradación en NEOA, lo que indicó que el material de encapsulación tuvo un efecto protector sobre los flavonoides, les brindó una estructura más estable, y se preservaron mejor estos compuestos.

En la Figura 23, se observan las características físicas de EOA y de NEOA durante el almacenamiento, donde se aprecia que EOA fue muy higroscópico durante el almacenamiento favoreciendo reacciones de oxidación y pérdidas de compuestos polifenólicos, en cambio en NEOA, aunque presentó cambios ligeros de coloración, la nanoencapsulación evitó la higroscopicidad del extracto de *O. atropes* y por tanto hubo menor degradación de compuestos bioactivos.



Figura 23. Evaluación de estabilidad en almacenamiento en EOA y NEOA

La actividad antioxidante se evaluó para conocer si los compuestos polifenólicos presentes en las diferentes muestras ya sea nanoencapsuladas o sin nanoencapsular, seguían teniendo la capacidad de eliminación de radicales libres. Para la inhibición del radical DPPH[•] se encontró que en NEOA disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en 7.45% al día 48, y por otro lado, se observó que en EOA, esta actividad tuvo una tendencia al incremento en el día 24, que pudo estar relacionado con la hidrólisis de algunos compuestos polifenólicos, y al día 48 disminuyó significativamente ($p < 0.05$), en un 5.66% (Gráfico 4); también se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante de NEOA con respecto de EOA al día 48.

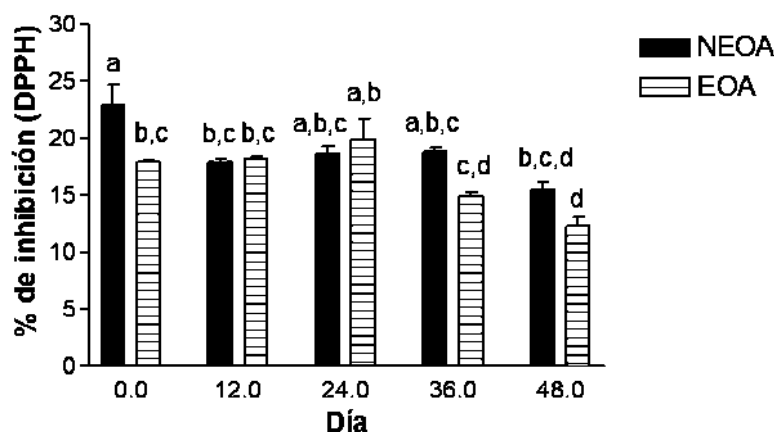


Gráfico 4. Evaluación de la inhibición del radical DPPH[•] durante almacenamiento. NEOA (35 mg); equivalentes a EOA (10 mg). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el Gráfico 5 se muestra el comportamiento durante el almacenamiento para la inhibición del radical ABTS^{•+}, en NEOA se presentó una disminución gradual y significativa ($p < 0.05$) del 7.06%, en cambio para EOA se tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$) en el día 24, atribuido a la liberación de algunos compuestos polifenólicos debido a reacciones de hidrólisis. Al día 48 la actividad de inhibición del radical disminuyó significativamente en un 22.49%.

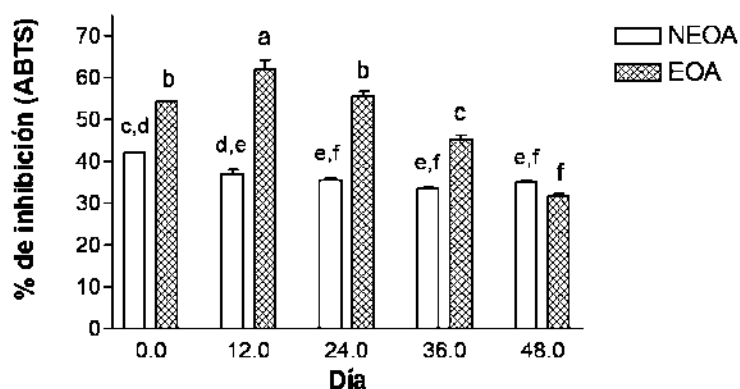


Gráfico 5. Evaluación de la inhibición del radical ABTS^{•+} durante almacenamiento. NEOA (35 mg); equivalentes a EOA (10 mg). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La diferencia en el comportamiento de los ácidos fenólicos y flavonoides, y actividad antioxidante (DPPH[•] y ABTS^{•+}) del extracto del *O. atropes* ya sea de manera libre o nanoencapsulado durante el almacenamiento se puede atribuir a que los compuestos bioactivos presentes tuvieron diferentes niveles de sensibilidad, que los afectan en varios grados durante el período de almacenamiento (Del Caro et al., 2004).

En el caso de NEOA se encontró un mayor porcentaje en el incremento de ácidos fenólicos y menor degradación de flavonoides en comparación con EOA, así mismo, en NEOA hubo disminución gradual de la actividad antioxidante en DPPH[•] y en ABTS^{•+}, esta mayor estabilidad encontrada en las nanocápsulas (NEOA), podría atribuirse a las uniones por puentes de hidrógeno o a interacciones electrostáticas de polifenoles a polímeros de maltodextrina que condujeron a la formación de conjugados, que pudieron tener características mejoradas de estabilidad (Fang y Bhandari, 2010), también pueden estar presentes uniones no covalentes que pudieron conducir a la formación de complejos de polifenol-polímero unidos por interacciones físicas, que posiblemente le brindaron atributos para la preservación de los compuestos polifenólicos presentes dentro de las nanocápsulas (Liu et al., 2019), sin embargo, estas uniones o interacciones también pudieron afectar su cuantificación como se mencionó anteriormente.

En EOA se observó un comportamiento similar, los ácidos fenólicos incrementaron durante el almacenamiento lo cual se relacionó con un incremento en la actividad antioxidante en DPPH[•] y ABTS^{•+}, sin embargo, conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento esta actividad fue disminuyendo, lo cual se relacionó con la disminución de otros compuestos presentes en EOA como son los flavonoides.

El efecto que se encontró en los diferentes tratamientos, además de ser atribuido a la nanoencapsulación, también pudo estar influenciado por la temperatura y humedad relativa (HR) de almacenamiento en la que se llevó a cabo el estudio.

Tolun et al., (2020) informaron que la estabilidad de los polifenoles encapsulados de orujo de uva con maltodextrina fue mucho mayor a 33% de HR que a 52% de HR durante

75 días de almacenamiento a temperatura ambiente, habiendo una disminución del 2.66% de los polifenoles a 33% de HR y del 4.68% a 52% de HR. En este estudio se empleó una HR mayor que fue del 60% y temperatura más elevada de 41 °C, que pudieron afectar la integridad de la estructura de algunos compuestos polifenólicos como los flavonoides, por ello hubo una mayor disminución de estos.

Por otro lado, Robet et al. (2010), evaluaron la estabilidad de polifenoles de granada encapsulados con maltodextrina a 60 °C por 56 días y encontraron una disminución del 10% del contenido de estos compuestos. En otro estudio Fang y Bhandari (2011), evaluaron la estabilidad de polifenoles de arándano utilizando maltodextrina como vehículo durante 6 meses a 40 °C y observaron una disminución entre el 9 y 37% de los compuestos polifenólicos. En estas investigaciones se evaluó a los compuestos polifenoles en función de los ácidos fenólicos, y en todos hubo una tendencia a disminuir durante el almacenamiento, contrario a lo que se observó en este estudio para el extracto nanoencapsulado o sin nanoencapsular de *O. atropes*, ya que estos compuestos incrementaron durante al almacenamiento, en cambio, en los flavonoides si hubo una disminución significativa así como en la actividad antioxidante durante el almacenamiento, como se mencionó anteriormente la diferencia en el comportamiento de los distintos compuestos bioactivos radica en la estructura y en los conjugados de polifenoles presentes en el extracto que les proporcionaron diferente grado de susceptibilidad ya sea en los diferentes tratamientos evaluados o cuando se compararon con extractos provenientes de diferentes fuentes naturales.

Debido a la alta higroscopicidad del extracto de *O. atropes* (EOA), la cual incrementó drásticamente en almacenamiento, no resultó factible su incorporación en alimentos deshidratados como la harina de maíz nixtamalizada, debido a que no habría una incorporación homogénea del extracto polifenólico de *O. atropes* en el alimento, por lo que en la siguiente etapa de la investigación solo se realizaron estudios sobre la incorporación de las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* en harina de maíz nixtamalizada y elaboración de tortilla.

5.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TORTILLA DE MAÍZ ADICIONADA CON NANOCÁPSULAS CON *O. atropes*

5.1.- CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE MAÍZ

5.1.1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL GRANO

En la Tabla 25 se presentan datos de calidad del grano de maíz utilizado en este estudio, las dimensiones del grano empleado fueron: largo 12.53 mm, ancho 8.62 mm y grosor 4.53 mm. Estos valores fueron similares con los reportados por Zavala (2015), la importancia de la medición de estos parámetros radica en que un grano con mayor tamaño requiere menor tiempo de cocimiento durante la nixtamalización, debido a la capacidad de hidratación a diferencia de los granos pequeños (Salinas-Moreno et al., 2010).

Otro aspecto importante es la evaluación de la dureza del grano, la cual se evaluó empleando el peso de los granos, el peso hectolítrico y el índice de flotación (Tabla 25). Se encontró un peso de 414 g/1000 granos, Aguayo-Rojas et al. (2012) indicaron que es deseable que el peso del grano sea superior a 300 g/1000 granos, debido a que a mayor cantidad de endospermo habrá mayor rendimiento en la harina, el valor encontrado es este trabajo fue superior a este. De acuerdo con Salinas y Vázquez (2006), 1000 granos grandes tienen un peso mayor a 380 g, los medianos entre 330 y 380 g y los pequeños presentan valores menores a 330 g, por tanto, el grano empleado en este trabajo se trató de un grano grande.

La NMX FF-034/1-SCFI-2002, establece un valor mínimo de 74 kg/hL para el peso hectolítrico del grano de maíz y el valor obtenido en esta investigación fue de 74.37 kg/hL. A mayor peso hectolítrico, el maíz será más duro. Gutiérrez-Cortez et al. (2010) informaron que granos con valores cercanos a 74.3 kg/hL son aptos para la nixtamalización y producción industrial de tortillas.

Por otro lado, el índice de flotación consistió en conocer la calidad de nixtamalización que tiene el maíz de acuerdo con el tiempo de cocción en medio alcalino e indirectamente se relacionó con la dureza y la cantidad de agua absorbida por el maíz, el pericarpio remanente y la pérdida de materia seca (NMX FF-034/1-SCFI-2002). El valor que se presentó para el índice de flotación del grano de maíz fue de 52 e indicó que el tiempo de nixtamalización ideal para este grano de maíz fue de 35 min y que el grano presentó dureza intermedia. La dureza del grano indica la fuerza necesaria para romper el pericarpio y penetrar en el grano. En la industria de la masa y tortilla se requieren variedades de maíz de dureza menor o intermedia, que retengan mayores cantidades de pericarpio durante el proceso, ya que el pericarpio solubilizado por la acción del álcali adquiere un carácter elástico que favorecerá las características de textura de masa (adhesividad y cohesión) y tortilla (plasticidad y suavidad) (Martínez-Bustos et al., 2001).

Tabla 25. Caracterización física del grano.

Parámetro		Valor
Tamaño del grano (100 granos)	largo (mm)	12.53 ± 1.03
	ancho (mm)	8.62 ± 1.34
	grosor (mm)	4.53 ± 0.64
Peso de 1000 granos (g)		395.21 ± 21.48
Peso hectolítrico (Kg/hL)		74.37 ± 0.57
Índice de flotación (número de granos)		52 ± 1.73

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

5.1.2.- PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DEL GRANO

En la Tabla 26 se muestran los resultados de las propiedades fisicoquímicas del grano. El contenido de humedad fue de 12.19%, parámetro que está por debajo en lo especificado por la NOM-247-SSA1-2008, que indica que la humedad no debe exceder el 15%. Por lo que es importante controlar este parámetro y evitar carga microbiana alta, particularmente en el contenido de mohos. El pH del grano de maíz fue similar al reportado por Zavala (2015) que fue de 6.45 y en este estudio fue de 6.59. También se evaluaron parámetros de color del maíz como luminosidad, la cual se evaluó en un rango de 0 a 100, donde 100 es blanco y 0 es negro. También se determinó la saturación o croma e indicó la pureza o qué tan vivo es el color, por lo que se pueden diferenciar colores apagados cerca del centro y se hacen más vivos a medida que se alejan y por último se cuantificó el tono o ángulo hue que es la apreciación visual del color, los ángulos encontrados y el tono que representaron fueron: 0° = rojo; 90° = amarillo, 180° = verde y 270° = azul (HunterLab, 2012). En luminosidad, se tuvo un valor de 64.02, indicando que la muestra está más cercana al color blanco, para el croma, se tuvo un valor de 15.13 por lo que se trata un color opaco y el valor °hue fue de 86.70 que indicó que se trató de un color amarillo. Estos valores coincidieron con los reportados en granos de maíz AS-900 (Zavala, 2015).

Tabla 26. Propiedades fisicoquímicas del grano.

Parámetro	Valor	
Humedad (%)	12.19 ± 0.02	
pH	6.59 ± 0.08	
Color	luminosidad	64.02 ± 0.77
	croma	15.13 ± 10.89
	°hue	86.70 ± 1.82

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Posterior a la evaluación de parámetros de calidad del grano de maíz, se llevó a cabo el proceso de nixtamalización, para obtener masa y posteriormente la masa se deshidrató para obtener las harinas: HMC y HMN. A partir de estas dos harinas se elaboraron tortillas TC y TN ajustando la humedad al 60% para la elaboración de estas.

Se obtuvieron los siguientes productos:

1. Harina de maíz nixtamalizada control (HMC)
2. Harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas (HMN)
3. Tortilla control (TC); elaborada a partir de HMC
4. Tortilla con nanocápsulas (TN); elaboradas a partir de HMN

A estos 4 productos se evaluaron diferentes análisis que incluyeron, análisis bromatológico y fisicoquímico, caracterización polifenólica y antioxidante, análisis microbiológico y características de calidad en las tortillas. Los resultados de estos análisis se describen a continuación.

5.2.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO EN HARINAS Y TORTILLAS

El análisis bromatológico de los productos desarrollados se muestran en la Tabla 27, en donde se observa que en la cantidad de proteínas no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre HMC con respecto a HMN, para ambos productos el valor de proteína se encontró por arriba del 7%, que es el valor mínimo establecido por la NMX-F-046-SCFI-2018, para harina de maíz nixtamalizada, así mismo, en las tortillas TC y TN no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en el contenido de proteína, estos valores también estuvieron por encima del 7%. En el contenido de lípidos tampoco se encontró diferencia entre HMC y HMN que fue del 3.69% y del 3.82%, respectivamente. En TC y TN tampoco hubo diferencia en el contenido de lípidos, en cambio para cenizas se encontró un mayor contenido en HMN de 1.52% comparado con HMC que fue de 1.39%, este incremento fue atribuido al extracto de *O. atropes* encapsulado, en cambio, no hubo diferencia en el contenido de cenizas entre TC y TN. Mashau et al. (2020), reportaron valores similares de minerales que fueron del 1.23% para harina de maíz y de 1.04 para tortilla. Así mismo, la cantidad de lípidos, proteínas y cenizas en las tortillas desarrolladas fueron muy parecidas a las informadas por Rendón-Villalobos et al. (2012) y están dentro de lo establecido por la NMX-F-046-SCFI-2018.

En cuanto al contenido de carbohidratos no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre HMC y HMN, que fueron de 85.96% y 85.57%, respectivamente, en cambio, el contenido de carbohidratos fue mayor en TN (86.58%) comparado con TC (85.92%). Estos resultados indicaron que nutricionalmente la incorporación de las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* en la harina de maíz nixtamalizada (HMN) no tuvo efecto significativo significativa ($p>0.05$), excepto un incremento menor en las cenizas, sin embargo, en las tortillas, la incorporación de las nanocápsulas en TN tuvo un aumento de alrededor del 1% con respecto a TC en carbohidratos.

Tabla 27. Caracterización bromatológica de harinas y tortillas.

Parámetro	HMC	HMN	TC	TN
Proteínas (% b.s.)	8.65 ± 0.03 ^{a,b}	8.46 ± 0.10 ^b	8.86 ± 0.15 ^a	8.53 ± 0.18 ^{a,b}
Lípidos (% b.s.)	3.91 ± 0.05 ^{a,b}	4.04 ± 0.21 ^a	3.73 ± 0.28 ^{a,b}	3.34 ± 0.25 ^b
Cenizas (% b.s.)	1.47 ± 0.01 ^b	1.61 ± 0.06 ^a	1.48 ± 0.00 ^b	1.53 ± 0.00 ^{a,b}
Carbohidratos (% b.s.)	85.96 ± 0.02 ^b	85.57 ± 0.11 ^b	85.92 ± 0.24 ^b	86.58 ± 0.2 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice, son significativamente diferentes ($p<0.05$). HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas.

5.3.- ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO EN HARINAS Y TORTILLAS

Algunos parámetros fisicoquímicos de los 4 productos desarrollados; como el pH, la A_w y el color se presentan en la Tabla 28. Se observa que el valor de pH para HMC fue de 9.03 y para TC de 9.11, no encontrándose diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos. El mismo efecto se encontró entre HMN y TN, que fueron de 8.61 y 8.63, respectivamente, por lo que las tortillas siguieron conservando el mismo pH que presentaron las harinas a partir de las cuales se elaboraron. Sin embargo, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del pH entre HMN con respecto a HMC y el mismo efecto se presentó en TN respecto a TC, esta disminución de pH se atribuyó a los compuestos polifenólicos de *O. atropes* ya que algunos son de naturaleza ácida.

La alcalinidad de la masa y tortillas varía dependiendo el número de lavados del maíz nixtamalizado, los lavados intensivos repercuten en pobres cantidades de hidróxido de calcio en la masa (Zazueta et al., 2002), por lo que es importante mantener un pH alcalino para que la masa y las tortillas no sean propensas al deterioro por el desarrollo de microorganismos (Martínez-Flores et al., 2004). Los productos que se desarrollaron en este trabajo se encontraron dentro del rango de la alcalinidad y fueron comparables con el trabajo realizado por López-Espíndola et al. (2020) que informan un rango entre 8.60 y 11.20 para harina de maíz nixtamalizada.

La actividad de agua (A_w), que es un factor crítico de causa de deterioro, es decir, cambios enzimáticos, pardeamiento no enzimático, deterioro de lípidos, perfil microbiano y estabilidad general de los alimentos (Eskin y Robinson, 2000). Las harinas HMC y HMN presentaron un valor de A_w de 0.170 y 0.177, respectivamente, este valor fue bajo y favorable, ya que el crecimiento microbiano se promueve a valores de A_w por arriba de 0.6. Los valores de A_w en este trabajo fueron inferiores al reportado por Temba et al., (2017) que fue de 0.43 en harina nixtamalizada. Es importante mencionar que, los alimentos con A_w alta son propensos a la proliferación de mohos que podría ir acompañada de contaminación por micotoxinas. Por lo tanto, establecer su nivel proporciona información sobre el nivel probable de contaminación microbiológica, así como el grado de deterioro de las grasas y otros componentes del alimento. En las tortillas se encontraron valores de 0.991 para TC y de 0.982 para TN, que son valores muy cercanos a 1, y por tanto se pueden llevar a cabo reacciones de deterioro, haciéndolas más susceptibles a daño microbiológico. Este aumento se debió al incremento de agua en las tortillas, se ha reportado A_w para tortilla entre 0.94-0.99 (Waniska et al., 2002).

Los parámetros de color se muestran en la Tabla 28. Los parámetros de luminosidad, croma y °hue, no tuvieron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores obtenidos para HMC y HMN, por lo que las harinas presentaron un color amarillo claro y opaco, en cambio, los valores de las tortillas TC y TN fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), a los de las harinas HMC y HMN, ya que presentaron valores inferiores en la luminosidad de 72.48 para TC y de 70.79 para TN, y valores superiores en croma de 25.84 en TC y de 25.24 en TN, y superiores al °hue en TC con 87.51 y en TN de 89.90, por lo que las tortillas presentaron color amarillo a diferencia del amarillo claro y opaco de las harinas, los valores de color que presentaron TC y TN, fueron similares a los informados por Hernández-Martínez et al. (2016), en donde reportan para la tortilla de maíz: luminosidad de 72.6, croma de 24.0 y °hue de 82.0. Por lo que la incorporación de nanocápsulas en

harina de maíz y tortillas no tuvo efecto significativo ($p>0.05$) en el cambio de color de los productos.

Tabla 28. Análisis fisicoquímico de harinas y tortillas.

Parámetro	HMC	HMN	TC	TN	
pH	9.03 ± 0.051 ^a	8.61 ± 0.032 ^b	9.11 ± 0.047 ^a	8.63 ± 0.026 ^b	
Aw	0.170 ± 0.001 ^c	0.177 ± 0.005 ^b	0.991 ± 0.000 ^a	0.982 ± 0.002 ^a	
Color	L	87.60 ± 0.50 ^a	85.30 ± 1.75 ^a	72.48 ± 1.64 ^b	70.79 ± 0.76 ^b
	C	15.37 ± 0.16 ^b	15.49 ± 0.31 ^b	25.84 ± 0.68 ^a	25.24 ± 0.62 ^a
	h	91.91 ± 0.23 ^a	91.69 ± 0.83 ^a	87.51 ± 0.95 ^c	89.90 ± 0.27 ^b

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice, son significativamente diferentes ($p<0.05$). HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas.

5.4.- ANÁLISIS POLIFENÓLICO Y ANTIOXIDANTE EN HARINAS Y TORTILLAS

Las características polifenólicas y antioxidantes tanto de las harinas como de las tortillas se presentan en la Tabla 29. Se observa que hubo un incremento significativo ($p<0.05$) para ácidos fenólicos en HMN de en un 14.28% con respecto a HMC, el contenido de flavonoides incrementó en un 85.29% en HMN comparado con HMC, y también hubo un incremento del 15.82% en la inhibición del radical ABTS^{•+} en HMN con respecto a HMC, sin embargo, para el radical DPPH[•] no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) entre las harinas HMC y HMN.

De manera similar en TN también se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante comparado con TC. En TN los ácidos fenólicos se cuantificaron en 38.85 mg EAG/100g b.s. que fueron 17.79% más ácidos fenólicos que los presentados por TC de 32.98 mg EAG/100g b.s. Por otro lado, no se detectaron flavonoides en TC, esto probablemente debido a la descomposición de los flavonoides por la liberación de los glucósidos por el calor y vapor durante la cocción (Chlopicka et al., 2012). En TN se cuantificaron 24.21 mg EQ/100g b.s., lo que mostró la protección de estos compuestos provenientes de *O. atropes* por medio de la encapsulación. Se presentó mayor actividad antioxidante en TN comparado con TC, la inhibición del radical DPPH[•] fue 7.04% mayor en TN con respecto a TC, y la actividad antirradical del ABTS^{•+} fue 16.52% significativamente mayor ($p<0.05$) en TN comparada con TC.

Otro aspecto importante que se observó en este estudio fue la reducción del contenido polifenólico y antioxidante en las tortillas de los tratamientos TC y TN, que se elaboraron a partir de las harinas HMC y HMN, respectivamente. Para ácidos fenólicos hubo una disminución del 21.47% en TC comparada con HMC, y TN disminuyó un 19.08% con respecto a HMN, un efecto mayor se encontró para los flavonoides, ya que estos compuestos no se detectaron en TC, por lo que estos compuestos se perdieron durante la cocción a partir de HMC (24.95 mg EQ/100g b.s.), por otro lado, en TN se detectó menor

cantidad de estos compuestos que fue un 47.63% de los que originalmente estaban contenidos en HMN.

También se observó disminución de la actividad antioxidante en DPPH[•], esta disminuyó 12.56% en HMC con respecto a TC, y hubo disminución del 6.14% en TN comparada con HMN, efecto similar se observó para la inhibición del radical ABTS^{•+}, el cual disminuyó en un 12.31% en TC comparado con HMC, y en TN hubo una disminución del 11.61% con respecto a la HMN. Estos resultados indicaron que la disminución tanto de los polifenoles como de la actividad antioxidante se atribuyeron a la degradación de compuestos bioactivos provenientes del maíz tanto en las tortillas TC como en las TN producidas a partir de harinas HMC y HMN, respectivamente, ya que la pérdida de compuestos fue muy similar e inclusive menor en TN con respecto a TC, lo que nos indicó que la encapsulación mantuvo la estabilidad de los polifenoles del extracto de *O. atropes* durante la cocción de la tortillas.

En un estudio reportaron que el contenido de fenoles o ácidos fenólicos para la masa fue de 41.8 mg EAG/100 g b.s. y para tortilla de 38.6 ± 1.3 EAG/100 g b.s. (López-Martínez et al., 2012), por lo que el valor que se obtuvo en las harina de maíz HMC para ácidos fenólicos de 42.0 mg EAG/100 g b.s., fue similar a lo reportado por estos autores, sin embargo, el valor que se obtuvo para tortillas en este estudio fue de 32.98 mg EAG/100 g b.s., el cual fue menor, lo que se podría atribuir en parte al proceso de secado de la masa y tamizado para la elaboración de la harina, donde pudieron quedar expuestos algunos compuestos polifenólicos haciéndolos más susceptibles a degradación durante la cocción de la tortillas. Hernández-Martínez et al. (2016), informaron valores 59.35 mg EAG/100 g b.s. de ácidos fenólicos en tortillas que fueron superiores también a los reportados en este estudio.

Mashau et al. (2020) reportaron un contenido de flavonoides de 10.03 EC/100 g b.s. y Chávez-Santoscoy et al. (2016), no detectaron flavonoides en tortillas de maíz blanco, lo cual coincide con el presente estudio, ya que no se detectaron estos compuestos en TC.

Colín-Chávez et al. (2020), evaluaron la actividad antioxidante en tortillas de maíz blanco comerciales e informaron valores de inhibición similares para el radical ABTS^{•+} de 34.6% y en este estudio fueron de 32.88%. Por otro lado, en la inhibición del radical DPPH[•] estos autores reportan inhibición del 32.0% que es superior a la de este estudio del 21.23%. La diferencia observada en la disminución de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante podría atribuirse al trasfondo genérico, las propiedades físicas del grano y la proporción relativa de las partes anatómicas del grano, porque el pericarpio y la capa de aleurona del endospermo son estructuras más ricas en compuestos fenólicos (Liu, 2007; Adom y Liu, 2002). Sin embargo, la incorporación de las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* incrementó tanto el contenido de polifenoles como la actividad antioxidante en HMN y TN respecto a los HMC y TC.

Los ácidos fenólicos y los flavonoides en los granos de maíz pueden estar en forma libre o enlazados a biomoléculas como proteínas y carbohidratos estructurales (Adom y Liu., 2002). La mayoría de los ácidos fenólicos en el maíz se encuentran enlazados, principalmente en los componentes de la pared celular, mientras que los flavonoides se encuentran principalmente en forma libre o soluble; en las antocianinas, que también son flavonoides, la porción ligada es relativamente baja (Cuevas-Montilla et al., 2011), esto

podría explicar en parte la degradación de estos compuestos durante la elaboración de la tortilla en TC. García-Rojas et al. (2020) reportaron una reducción del contenido de ácidos fenólicos en tortillas nixtamalizada del 16% y una disminución del 26% en tortillas que tenían incorporado el 9% de harina del hongo *P. agaves*. En el presente estudio se obtuvo una disminución de 21.47% de ácidos fenólicos para TC y del 19.08% para TN, por lo que a diferencia de lo que reportan García-Rojas et al. (2020), la encapsulación logró proteger a estos compuestos bioactivos provenientes de *O. atropes*, a diferencia de los compuestos bioactivos de *P. agaves* incorporados en forma de harina.

Tabla 29. Características polifenólicos y antioxidantes de harinas y tortillas.

Parámetro	HMC	HMN	TC	TN
Ácidos fenólicos (mg EAG/100 g b.s.)	42.00 ± 0.94 ^b	48.01 ± 0.73 ^a	32.98 ± 0.25 ^d	38.85 ± 0.70 ^c
Flavonoides (mg EQ/ 100 g b.s.)	24.95 ± 4.19 ^b	46.23 ± 3.85 ^a	ND	24.21 ± 3.98 ^b
DPPH [*] (mg EAG/ 100 g b.s.)	18.83 ± 0.45 ^a	19.17 ± 0.19 ^a	12.09 ± 0.29 ^c	15.97 ± 0.32 ^b
% Inhibición (250 mg b.s.)	33.79 ± 0.83 ^a	34.41 ± 0.35 ^a	21.23 ± 0.53 ^c	28.27 ± 0.59 ^b
ABTS ^{**} (mg EAG/ 100 g b.s.)	20.62 ± 0.59 ^b	28.26 ± 1.28 ^a	14.82 ± 2.21 ^c	22.92 ± 0.08 ^b
% Inhibición (250 mg b.s.)	45.19 ± 1.22 ^b	61.01 ± 2.67 ^a	32.88 ± 4.53 ^c	49.40 ± 0.17 ^b

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0.05$). HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. ND=No detectable (>1mg EQ/ 100 g b.s.).

5.5.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN HARINAS

El análisis microbiológico de las harinas HMC y HMN se muestra en la Tabla 30. Los límites de coliformes totales, mesofilos aerobios, y mohos y levaduras se encontraron dentro de los valores establecidos por la a NMX-F-046-SCFI-2018. La importancia de realizar estos análisis es debido a que una mayor carga microbiana podría tener una influencia directa en el deterioro del alimento.

Se realizaron mediciones para evaluar la calidad de las tortillas TC y TN elaboradas de las harinas HMC y HMN (Tabla 31). La pérdida de peso de las tortillas en TC fue de 23.12% y en TN del 23.54%, valores comparables al 23% reportado por Chel-Guerrero et al. (2015) y con lo reportado por Figueroa et al. (2001) que fue de 23.45%. Por tanto, la incorporación del 3% de nanocápsulas con extracto de *O. atropes* no fue suficiente para afectar este parámetro. La pérdida de peso en las tortillas de maíz se refleja en el rendimiento total, y las condiciones óptimas para que el agua penetre en el grano e interactúe con otros componentes son: un período combinado de cocción y remojo, para evitar su rápida eliminación durante la cocción de la tortilla (Arámbula-Villa et al., 2001).

Tabla 30. Análisis microbiológico de harinas.

Parámetro	HMC	HMN	NMX-F-046-SCFI-2018
Enterobacterias (UFC/g)	<10	<10	-
Coliformes totales (UFC/g)	<10	<10	<100
Mesofilos aerobios (UFC/g)	<10 000	<10 000	<50 000
Mohos y levaduras (UFC/g)	120 ± 14.14	125 ± 7.07	<1000

Valor promedio de 2 repeticiones ± desviación estándar. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas.

Se tuvieron valores de inflado de 1.0 y rolabilidad de 2.0 tanto para TC como para TN, por lo que la adición de las nanocápsulas no afectó estos parámetros. En otros estudios se ha informado de rolabilidad de 1.0 y de inflado de 2.0 para tortillas de maíz (Figuroa et al., 2001). Ramírez-Moreno et al. (2015) reportaron valores de inflado y rolabilidad con un valor 1.0 al adicionar harina de nopal *O. ficus indica* en un 3% en tortilla de maíz, por lo que se mostró que las adiciones de componentes de nopal en ciertas concentraciones no afectan estos parámetros de calidad en las tortillas respecto al control.

Los parámetros de textura que se evaluaron fueron: tensión, que simula la fuerza de rasgado con las manos y corte, que simula la fuerza de corte de un diente durante el masticado. Se tuvieron valores para tensión de 1.72 N para TC y de 1.77 para TN, por lo que no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre las muestras. Un efecto similar se observó para el corte que fue de 3.76 N y de 3.37 N, para TC y TN, respectivamente, en donde tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$). Esto significó que la interacción potencial entre los componentes de las nanocápsulas como la maltodextrina y los polifenoles con los componentes de la harina de maíz, no tuvo un efecto suficiente para cambiar la dureza de las tortillas TN con respecto a las TC. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Treviño-Mejía et al. (2016), que reportaron una fuerza de corte de 2.37 N y tensión de 1.03 N para tortilla de maíz y con los reportados por Santana-Gálvez et al. (2016) que tuvieron un valor de tensión de 2.24 N en tortillas de maíz.

Tabla 31. Parámetros de calidad de la tortilla.

Parámetro	TC	TN
Pérdida de peso	23.12 ± 1.05 ^a	23.54 ± 2.08 ^a
Grado de inflado	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
Rolabilidad	2.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 0.00 ^a
Tensión (N)	1.72 ± 0.10 ^a	1.77 ± 0.07 ^a
Fuerza de corte (N)	3.76 ± 0.33 ^a	3.37 ± 0.16 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p<0.05$). TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas.

5.6.- VIDA DE ANAQUEL ACELERADA

Se evaluó la vida de anaquel de las harinas HMC y HMN en condiciones de almacenamiento aceleradas para conocer de manera rápida la evolución en diferentes parámetros de calidad de estos alimentos, que incluyeron pruebas fisicoquímicas, polifenólicas, antioxidantes y microbiológicas. Este estudio se realizó a temperatura de 41 °C por 48 días que fueron equivalentes a 192 días a 21°C (6.4 meses), tomando como referencia que el incremento en 10 °C duplica las reacciones de deterioro en los alimentos. Se realizaron 5 muestreos cada 12 días en las harinas HMC y HMN, a partir de las cuales se elaboraron tortillas TC y TN, respectivamente, para evaluar algunas características de calidad.

En cuanto al análisis microbiológico de las harinas HMC y HMN, se llevaron a cabo al día 0 y al día 48, que incluyeron mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras y enterobacterias, y se encontró que presentaron valores inferiores a los límites de establecidos en la NMX-F-046-SCFI-2018, por tanto, se aseguró la calidad microbiológica de los productos.

En el Gráfico 6 se presenta el contenido de humedad de los 4 productos. Se observó que las harinas HMC y HMN no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en este parámetro, el cual osciló entre 5-6% entre el día 0 y el día 48, estando por debajo de lo establecido por la NMX-F-046-SCFI-2018 que indica un máximo del 12.5%. Musita (2020) indicó que el 12% de humedad es un factor crítico y determina la vida útil de las harinas nixtamalizadas, y que esto depende en gran medida de la humedad inicial de las harinas y del tipo de empaque, por lo que a menor humedad en las harinas nixtamalizadas habrá mayor vida de anaquel. Se han reportado valores de humedad entre el 5.31% - 5.96% para harinas de maíz blanco nixtamalizado (Jiménez-Pérez et al., 2015). En el presente estudio la humedad en tortillas TC y TN disminuyó significativamente ($p < 0.05$) del día 0 al día 48, lo cual indicó una menor retención de agua en los alimentos.

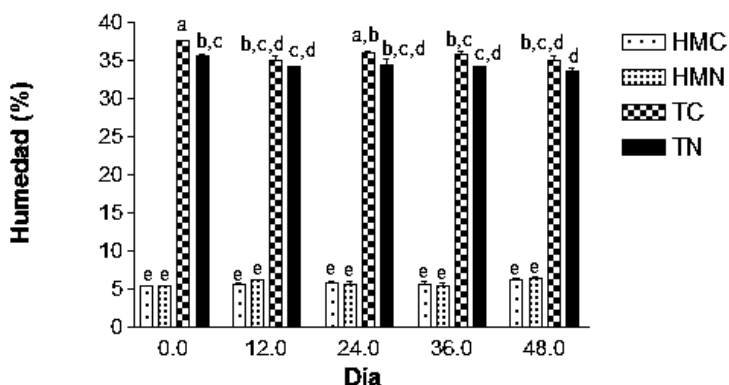


Gráfico 6. Determinación de humedad en harinas y tortillas durante el almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el Gráfico 7 se observan las variaciones de A_w en los cuatro tratamientos, y se muestra que en HMC y HMN hubo una tendencia al incremento de la A_w , sin ser significativas ($p>0.05$). En un estudio anterior se reportaron valores de A_w entre 0.155 a 0.170 para harinas de maíz nixtamalizadas, en los cuales tampoco encontraron modificaciones significativas durante 3 meses a 37 °C (Benjamin et al., 2017). Se ha descrito que, durante el almacenamiento a largo plazo, la A_w de un producto está en equilibrio con la humedad relativa de la atmósfera de almacenamiento (Njintang et al., 2010), e influye en gran medida la permeabilidad del empaque y área del empaque del producto, entre otros (Hruškova y Machová, 2002). En este estudio se empacó al vacío en bolsas trilaminadas lo que contribuyó a la estabilidad de este parámetro. En las tortillas TC y TN tampoco hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre el día 0 y el día 48.

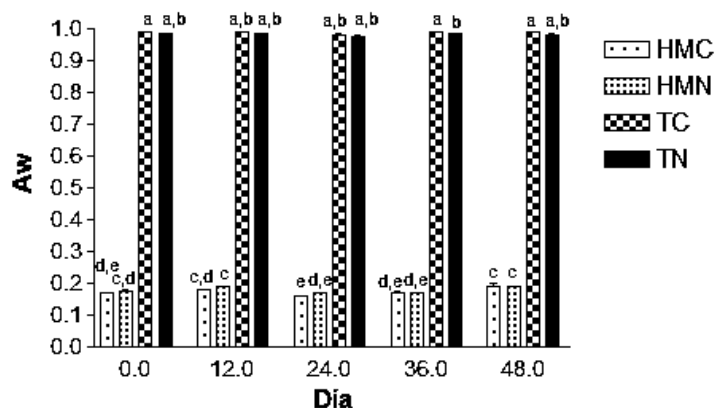


Gráfico 7. Determinación de la A_w en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Los cambios de color en los productos se evaluaron en función de la luminosidad, croma y °hue (Gráficos 8-A, 8-B y 8-C, respectivamente). En las harinas HMC y HMN no hubo cambios significativos ($p>0.05$) durante el almacenamiento a 48 días a 41°C, por lo que ambos productos conservaron un color amarillo claro y opaco. En las tortillas TC y TN no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en la luminosidad del día 0 al día 48. En el parámetro croma en TC si hubo diferencia del día 0 al día 48, este valor disminuyó y con ello aumentó la opacidad de la tortilla, en cambio en TN no hubo diferencia significativa ($p>0.05$), el valor del °hue aumentó significativamente ($p<0.05$) del día 0 al día 48 en TC y por tanto incrementó la tonalidad amarilla. TN al día 0 presentó una tonalidad significativamente ($p<0.05$) más amarilla que TC, atribuida a los compuestos fenólicos de *O. atropes*, sin embargo, esta tonalidad se conservó hasta el día 48 del almacenamiento.

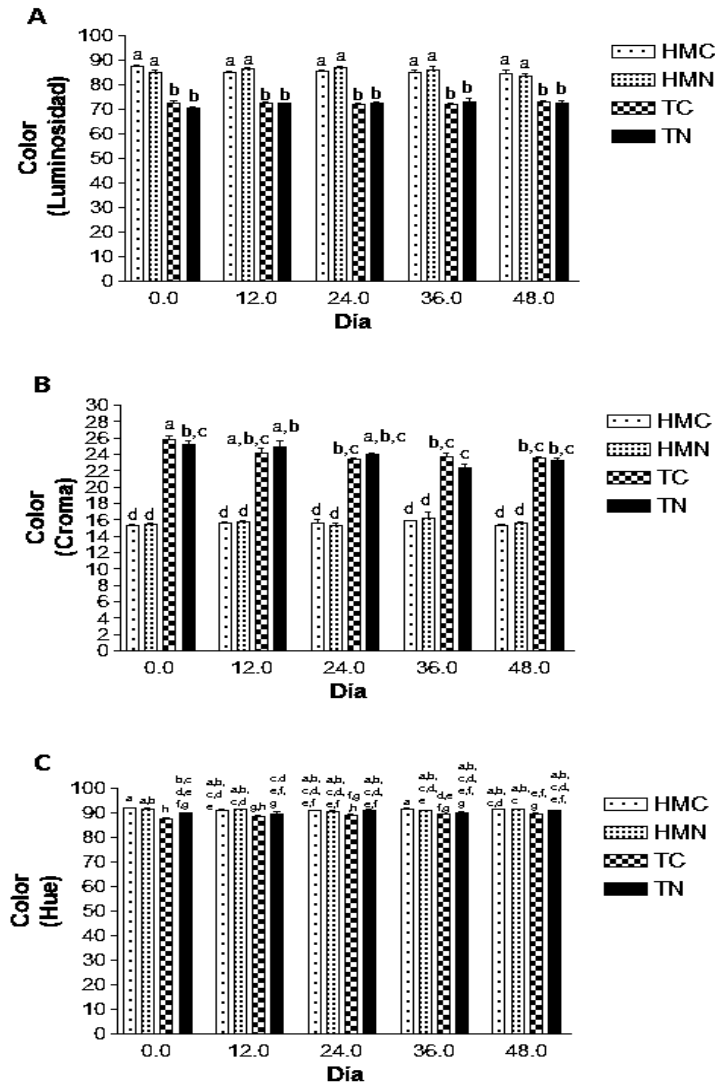


Gráfico 8. Determinación del color; A) luminosidad, B) cromas, C) °hue; en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El color tanto de las harinas como de las tortillas se debe principalmente a los carotenoides, pigmentos naturales presentes en el maíz (Salinas-Moreno et al., 2008). El color se considera un parámetro importante en la calidad de los productos porque está directamente relacionado con la aceptación por parte de los consumidores (Mercado-Pedraza et al., 2014). Por ello la importancia de mantener la estabilidad del color de las harinas durante el almacenamiento como sinónimo de calidad en los productos.

En el Gráfico 9 se puede observar que sí hubo disminución significativa ($p < 0.05$) del pH en los 4 productos (HMC, HMN, TC y TN) del día 0 al día 48, sin embargo, el pH de estos alimentos se encontró en el rango entre 8.28 - 8.70, que fue dentro del rango de alcalinidad e inclusive está por encima de lo reportado por otros autores que informaron

rangos de pH entre 6.10 - 7.88 para harinas de maíz blanco (Milán-Carrillo et al., 2004; Ayala-Rodríguez et al., 2009), y de 7.88 - 8.17 informado por Jiménez-Pérez et al., (2015). Serna-Saldívar et al. (1987) informaron que el pH es un parámetro importante en la calidad, debido a que tiene un efecto sobre el sabor, el crecimiento microbiano y por tanto la vida útil de las harinas.

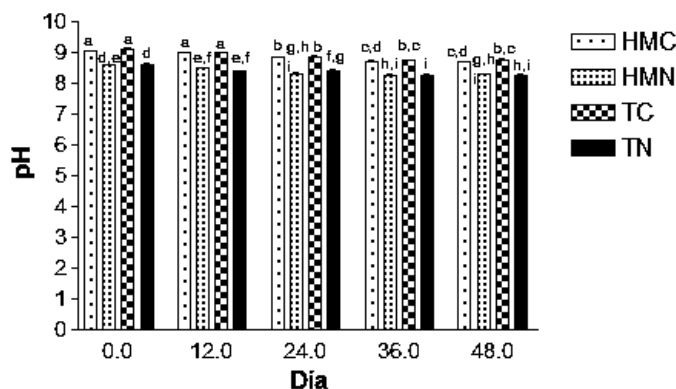


Gráfico 9. Determinación del pH en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC=harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La evaluación polifenólica y antioxidante en los 4 productos (HMC, HMN, TC y TN) también se llevó a cabo, estos compuestos fueron los de mayor interés para este estudio, debido a la incorporación de compuestos polifenólicos, que se incluyeron en forma de nanocápsulas con extracto de *O. atropes* en HMN y en TN. La evaluación de la estabilidad de estos compuestos bioactivos se llevó a cabo durante el almacenamiento en condiciones controladas de temperatura y humedad, en el caso de la harina HMN y, por otro lado, condiciones extremas a las que fueron sometidos estos compuestos bioactivos durante la cocción de las tortillas en TN, lo cual nos proporcionó información valiosa sobre la vida de anaquel de estos productos.

En el Gráfico 10 se muestran los valores obtenidos para ácidos fenólicos en los cuatro productos al inicio del estudio, día 0, y al final, que fue el día 48, observando que hubo una diferencia notable en la disminución de estos compuestos en los 4 productos. En HMC los ácidos fenólicos disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) un 14.92%, en HMN un 7.18%, en TC un 35.71% y en TN un 37.19%. Por lo que en las harinas se encontró una mayor estabilidad de estos compuestos bioactivos, que se relacionó a que no hubo cambios significativos tanto en la humedad como en la Aw, en cambio, durante la elaboración de las tortillas el incremento de la humedad y el proceso de cocción tuvo un efecto importante en la disminución de estos compuestos. Si bien, en la disminución de los ácidos fenólicos fue menor en las harinas HMC y HMN, durante el almacenamiento de las harinas se pudieron llevar a cabo algunas reacciones de hidrólisis de que pudieron dejar más expuestos a estos compuestos y por tanto facilitar su degradación durante la elaboración de tortillas.

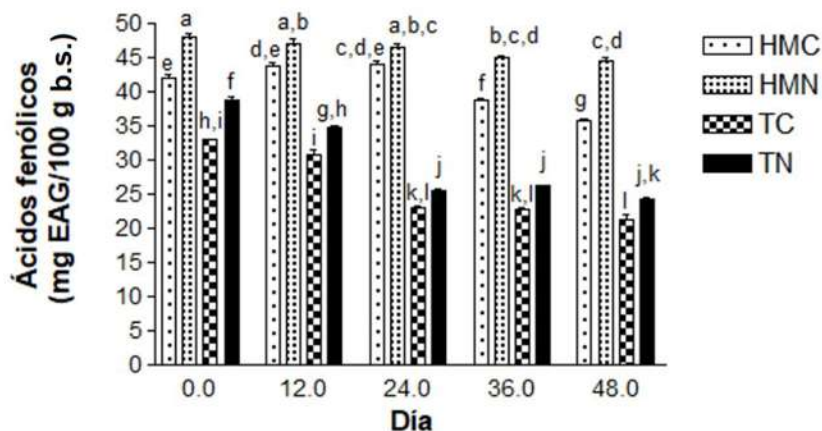


Gráfico 10. Determinación de ácidos fenólicos en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el Gráfico 11 se muestra el comportamiento que tuvieron los flavonoides durante el almacenamiento de las harinas y en la elaboración de la tortilla, en HMC hubo un ligero incremento al día 12 el cual no fue significativo ($p > 0.05$) con respecto al día 0, y por tanto continuó con una tendencia a la disminución de los compuestos durante el almacenamiento y se perdieron el 72.30% de estos compuestos, en cambio en HMN al día 12 se presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) de estos compuestos, el incremento en estos compuestos bioactivos pudo ser debido a la hidrólisis de conjugados de polifenoles, dando como resultado moléculas de glucósidos más simples y/o liberación de estos y por tanto, se obtuvo mayor concentración de estos al día 12 de almacenamiento. Abdel-Gawad et al. (2016) reportaron una tendencia similar de aumento en fenoles en mezclas de harinas compuestas. Posterior al día 12 los flavonoides fueron disminuyendo significativamente ($p < 0.05$) hasta el día 48, que presentaron una disminución del 38.71%. En TC no se detectaron estos compuestos ($< 1 \text{ mg}/100 \text{ g BS}$) y en TN se presentó un efecto similar a HMN, una tendencia al incremento al día 12, que podría estar relacionado con liberación de estos compuestos durante el horneado, ya que los constituyentes celulares se descomponen durante el tratamiento térmico (Nguimbou et al., 2013), sin embargo, posteriormente fueron disminuyendo hasta presentar disminución significativa ($p < 0.05$) del 52.22%.

En la actividad antioxidante en función de la inhibición del radical DPPH^{*}, se encontró disminución gradual de la actividad, siendo en HMC del 18.05%, en HMN del 8.7%, en TC del 13.47% y en TN del 15.91%. Aunque HMC y HMN iniciaron sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para la inhibición del radical DPPH^{*}, Gráfico 12, el incremento en la actividad de HMN con respecto a HMC pudo ser debido a la liberación de algunos glucósidos de polifenoles como los flavonoides que se mencionaron anteriormente, entre otros, lo que ocasionó mayor actividad antioxidante en HMN con respecto a HMC. Así mismo, en TN se presentó mayor actividad antirradical con respecto a TC, debido al mismo efecto.

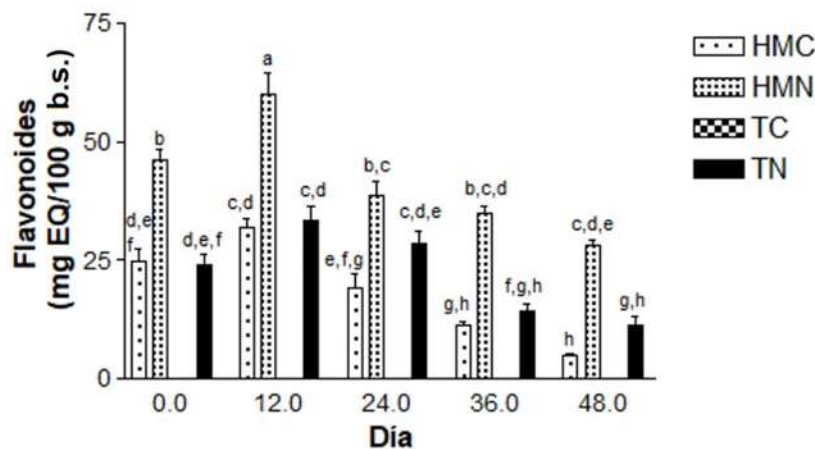


Gráfico 11. Determinación de flavonoides en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

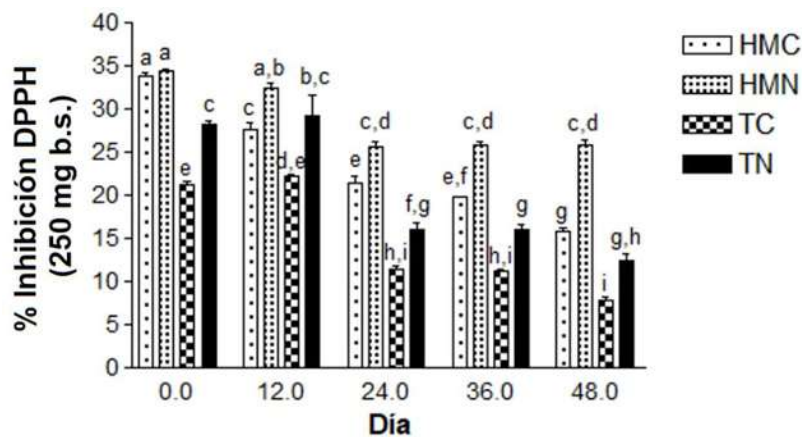


Gráfico 12. Determinación del % Inhibición del radical DPPH* en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la actividad antioxidante del radical ABTS^{•+} para HMC y HMN no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) del día 0 al día 24, sin embargo, posterior a ese periodo la actividad antirradical disminuyó significativamente hasta alcanzar una disminución del 18.61% en HMC, y del 17.46% en HMN, esta disminución fue similar a la que se presentó en las tortillas ya que TC presentó una disminución del 17.47% y TN del 15.94%, ver Gráfico 13.

La disminución del contenido de polifenoles (ácido fenólicos y flavonoides) y actividad antioxidante (DPPH* y ABTS^{•+}) en las harinas HMC y HMN durante el almacenamiento puede deberse a su degradación por oxidación. De acuerdo con Cavalcanti et al. (2011) muchos factores afectan la estabilidad de estos compuestos durante el almacenamiento, como el pH, el calor, la luz, la presencia de otros compuestos fenólicos, enzimas, iones

metálicos, azúcares, oxígeno entre otros. Por lo que uno o más de estos factores tuvieron un efecto sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos y por tanto, la disminución de los mismos en las harinas HMC y HMN y este efecto se reflejó en la elaboración de las tortillas TC y TN a las que se sumaron el incremento de humedad durante la elaboración de la masa, la fuerza mecánica durante el amasado y la cocción a 250°C que aunque fue por un tiempo corto, en conjunto todos estos factores influyeron en la disminución tanto de los compuestos polifenólicos como de la actividad antioxidante, aunque este efecto fue mayor en la tortillas (TC y TN), que las harinas (HMC y HMN).

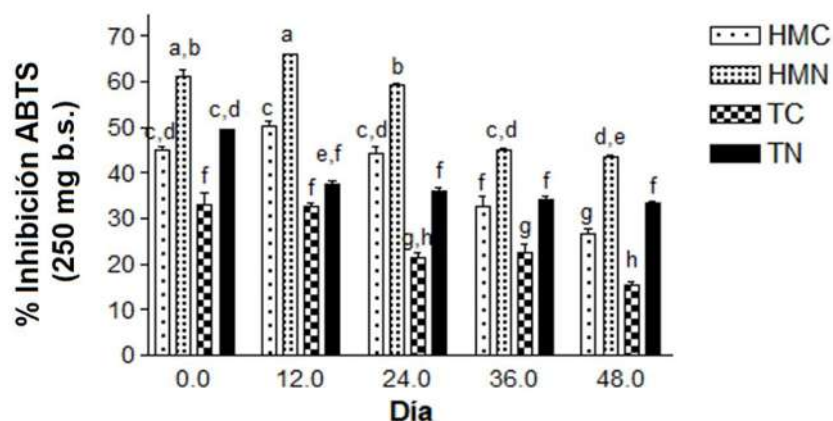


Gráfico 13. Determinación del % Inhibición del radical ABTS** en harinas y tortillas durante almacenamiento. HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Se evaluaron algunos parámetros de calidad en las tortillas TC y TN, desarrolladas a partir de harinas HMC y HMN, respectivamente, durante el periodo de almacenamiento comprendido entre el día 0 y el día 48, estos datos se muestran en la Tabla 32.

Se puede observar que tanto en TC como en TN no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en el porcentaje de pérdida de agua, sin embargo, en TN, hubo una tendencia mayor a la pérdida de agua comparada con TC. En el grado de inflado no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en TC del día 0 al día 48, por lo que las tortillas presentaron un valor de 1.00 que representó de un 75-100% de inflado, así mismo, en TN no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en el grado de inflado del día 0 al día 48, sin embargo, hubo una tendencia a disminución en el grado de inflado en el día 36 y 48. En la rolabilidad tampoco hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en TC ni en TN del día 0 al día 48, la rolabilidad que indicó el % de ruptura de la tortilla al enrollarse, presentó en TC en valores del 2.00 que representaron del 0-25% de ruptura de la tortilla, pero al día 48 hubo una tendencia al incremento en este valor a 2.33, en cambio en TN hasta el día 12 se presentó un valor de rolabilidad de 2.00, posteriormente hubo una tendencia al incremento y al día 48 presentó un valor de 2.66.

En cuanto a los parámetros de dureza, en la tensión no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el día 0 al día 48 tanto para TC como para TN,

sin embargo, también se presentó una tendencia al incremento de este valor que indica la fuerza necesaria para romper la tortilla con la mano. Por otro lado, en la fuerza que se necesita para hacer el corte en TC, no hubo diferencia del día 0 al día 48, pero en TN si hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) en la fuerza necesaria para romper la tortilla al día 48.

Tabla 32. Parámetros de calidad de las tortillas a 41°C/60 % HR.

Parámetro		Día 0	Día 12	Día 24	Día 36	Día 48
Pérdida de peso (%)	TC	23.12 ± 1.05 ^a	22.45 ± 2.18 ^a	23.45 ± 0.99 ^a	22.03 ± 0.59 ^a	23.03 ± 0.44 ^a
	TN	23.54 ± 2.08 ^a	23.05 ± 1.41 ^a	24.61 ± 0.67 ^a	24.64 ± 1.03 ^a	25.13 ± 0.76 ^a
Grado de inflado	TC	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
	TN	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.33 ± 0.57 ^a	1.66 ± 0.57 ^a
Rolabilidad	TC	2.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 0.00 ^a	2.33 ± 0.57 ^a
	TN	2.00 ± 0.00 ^a	2.00 ± 0.00 ^a	2.33 ± 0.57 ^a	2.33 ± 0.57 ^a	2.66 ± 0.57 ^a
Tensión (N)	TC	1.72 ± 0.10 ^a	1.92 ± 0.13 ^a	1.69 ± 0.02 ^a	1.98 ± 0.31 ^a	2.06 ± 0.30 ^a
	TN	1.77 ± 0.07 ^a	1.71 ± 0.09 ^a	1.98 ± 0.28 ^a	1.66 ± 0.34 ^a	1.96 ± 0.20 ^a
Corte (N)	TC	3.76 ± 0.33 ^a	3.15 ± 0.62 ^a	2.75 ± 0.03 ^a	3.13 ± 0.77 ^a	3.57 ± 0.97 ^a
	TN	3.37 ± 0.16 ^b	4.23 ± 0.15 ^{a,b}	3.99 ± 0.76 ^{a,b}	3.88 ± 0.38 ^{a,b}	4.65 ± 0.06 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0.05$). HMC= harina de maíz nixtamalizada control; HMN=harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas. TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas.

5.7.- CONSUMO DIARIO DE ANTIOXIDANTES Y TORTILLAS

El consumo diario promedio de tortilla de maíz per cápita en México es de 157 g (Secretaría de Economía, 2012), lo que equivaldría a 6 tortillas. Lo cual equivalen aproximadamente a 102 g de tortilla en base seca, de acuerdo con lo que se reportó en este estudio, por lo que un consumo de 6 tortillas con nanocápsulas de *O. atropes* (TN) equivaldría a consumir 28.27 mg EQ/ 100 g b.s. de flavonoides. Se estima que el consumo promedio de los mexicanos ≥ 19 años para los flavonoides es de 230.55 mg/día (Bai et al., 2014), por lo que el consumo del alimento elaborado en este trabajo representaría el 12.26% de este valor. Asimismo, Bai et al., (2014) informaron que del total de flavonoides la dieta del mexicano, el grupo de los flavonoles se encuentran entre 12.08 - 19.08 mg, y que de estos flavonoles la isorametina está presente en 0.40 mg y el kaempferol en 6.25 mg. En este estudio, resultados anteriores mostraron que los flavonoides que estaban incluidos en el extracto de *O. atropes* eran flavonoles, que incluían glucósidos de kaempferol principalmente seguidos de glucósidos de isoramnetina, y no se detectó a otro grupo de flavonoide, por lo tanto los 28.27 mg EQ/100 b.s. de flavonoides encontrados en las tortillas con nanocápsulas (TN) se trataron de flavonoles, por lo que estos compuestos en TN, estarían por encima del 100% de ingesta promedio del mexicano ≥ 19 años, reportado por Bai et al. (2014), por tanto, el alimento elaborado es fuente importante de estos compuestos bioactivos.

Debido a que los parámetros fisicoquímicos, texturales y microbiológicos evaluados tanto la harina de maíz (HMN) como las tortillas (TN) se encontraron dentro de los parámetros adecuados, se tomaron como referencia los valores de los flavonoides que fueron los compuestos de mayor interés en este estudio, para indicar la vida de anaquel de los alimentos, de manera directa la tortilla con nanocápsulas (TN) e indirecta la harina de maíz nixtamalizada con nanocápsulas (HMN).

Para establecer la vida útil de las tortillas con nanocápsulas (TN) y establecer los niveles adecuados de flavonoides se consideró que el alimento debe conservar al menos el 50% de sus compuestos bioactivos durante el almacenamiento. Estos compuestos fueron disminuyendo gradualmente al día 48 hasta un 52.22%, por lo que es adecuado que producto se consuma como límite al día 36, que equivale a 144 días a 21°C, para asegurar la ingesta de al menos el 50% de los flavonoides que equivaldría aproximadamente a 14 mg EQ/100g b.s., que está dentro del promedio de la ingesta diaria de los flavonoles.

Estudios en animales de laboratorio han mostrado que los flavonoides tienen beneficios para la salud, incluidos actividades antiinflamatorias, anticancerígenas, protección cardiovascular y neurológica (Benavente-García y Castillo, 2008; Lee et al., 2007).

Knekt et al. (2002) encontraron que con una ingesta diaria de flavonoides de por lo menos 24.2 mg, redujo el riesgo de padecer algunas enfermedades crónicas en las personas. También informaron que las personas con mayor ingesta de quercetina tuvieron menor mortalidad por cardiopatía isquémica y la incidencia de enfermedad cerebrovascular fue menor con ingestas más altas de kaempferol.

En un estudio llevado a cabo por Kim et al. (2020), indicaron disminución de la obesidad abdominal en mujeres con un consumo de flavonoides promedio de 451.0 mg/día, que incluía 42.2 mg de flavonoles/día. En este estudio se evaluaron concentraciones del consumo de flavonoles de 10.9 a 42.2 mg/día en donde la prevalencia de obesidad abdominal en mujeres se asoció inversamente con una mayor ingesta de flavonoles.

Aunque los mecanismos subyacentes asociados con los efectos preventivos de los flavonoides contra la obesidad aún no se han aclarado por completo, pueden explicarse por la capacidad de los flavonoides para afectar los transportadores de azúcar en sangre al aumentar la secreción de insulina, promover la proliferación de células pancreáticas y reducir la resistencia a la insulina, inflamación y estrés oxidativo en los músculos (Kawser-Hossain et al., 2016).

5.8.- DIGESTIÓN *IN VITRO*

Se evaluó la estabilidad del extracto de *O. atropes* (EOA), nanocápsulas con extracto de *O. atropes* (NEOA), tortilla control (TC) y tortilla con nanocápsulas (TN), bajo condiciones de digestión gástrica y duodenal *in vitro*. Los resultados se muestran en la Tabla 33, en donde se observa el comportamiento en la concentración de los compuestos polifenólicos y de la actividad antioxidante de los diferentes tratamientos (EOA, NEOA, TC y TN), antes de la digestión, después de la digestión gástrica y después de la digestión duodenal.

Los ácidos fenólicos se mantuvieron estables en EOA durante las etapas de digestión *in vitro*, ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el contenido

inicial (antes de la digestión) y final (después de la digestión duodenal) de estos compuestos. NEOA antes de la digestión presentó menor contenido de ácidos fenólicos con respecto a EOA, debido al proceso de nanoencapsulación, sin embargo, se pudo comprobar la liberación de los ácidos fenólicos después de la digestión gástrica ya que incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en un 48.49% y se mantuvieron sin cambios en la concentración después de la fase duodenal.

También se observó el efecto protector de la nanoencapsulación, ya que después de la fase duodenal, se presentaron 19.5% más ácidos fenólicos en NEOA con respecto a EOA. Jeong et al. (2020), evaluaron el efecto protector de extractos de arándanos y repollo nanoencapsulados con quitosano y carragenina y obtuvieron resultados similares a los del presente estudio, ya que informaron que la liberación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo durante la digestión gástrica y que estos compuestos se mantuvieron estables, comportamiento similar al del presente estudio, sin embargo, en el estudio de Jeong et al. (2020), los compuestos fenólicos disminuyeron después de la fase duodenal, a diferencia de lo que se encontró en esta investigación, ya que los ácidos fenólicos se mantuvieron estables aún después de la fase duodenal. En los alimentos desarrollados (TC y en TN), hubo un incremento de ácidos fenólicos después de la digestión gástrica con respecto al contenido inicial, y posteriormente después de la digestión duodenal disminuyó significativamente ($p < 0.05$), comparado con la digestión gástrica.

Bermudez-Soto et al. (2007) informaron una reducción en varios polifenoles después de digestiones similares en dos fases de una variedad de jugos de frutas, los cuales mostraron un mayor contenido de polifenoles después de la fase gástrica de la digestión, pero disminuyeron después de la fase duodenal. Es importante mencionar que el comportamiento de estos compuestos fenólicos también está influenciado por el contenido fenólico propio de las tortillas desarrolladas (TC y TN).

Los flavonoides en EOA disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) después de la digestión gástrica y mantuvieron sus niveles después de la digestión duodenal, por lo que hubo una disminución total del 24.01% de estos compuestos en EOA después de la digestión duodenal. En NEOA, el comportamiento de los flavonoides fue similar al de los ácidos fenólicos, debido a que durante la digestión gástrica se aumentaron los flavonoides lo cual se atribuyó a la liberación de estos compuestos en condiciones ácidas, estos compuestos se mantuvieron estables en condiciones duodenales, por lo que se observó el efecto protector de la nanoencapsulación ya que los flavonoides incrementaron en un 41.81% después de la digestión duodenal comparado con la fase inicial (antes de la digestión).

En TC no se detectaron estos compuestos durante las fases de la digestión *in vitro*, sin embargo, en TN el cual contenía nanocápsulas con extracto de *O. atropes* hubo una disminución después de la digestión duodenal, conservando solo el 79.93% de los flavonoides iniciales.

La evaluación de la actividad antioxidante en función del radical DPPH^{*}, proporcionó datos que indicaron que, bajo condiciones de digestión *in vitro*, hubo menor actividad antioxidante en función del radical DPPH^{*} después de la digestión duodenal, tanto para EOA como para NEOA, con una reducción del 32.21% y del 5.37%, respectivamente, comparada con la actividad antioxidante que presentaron estos productos antes de la

digestión. En cambio, en TC y TN hubo un incremento en la actividad antirradical (DPPH[•]) después de la digestión duodenal del 5.84% y del 7.7%, respectivamente, este incremento se atribuyó a los compuestos polifenólicos presentes en las tortillas y no al extracto de *O. atropes*, ya que como se mencionó antes, la actividad de este radical disminuyó tanto en EOA como en NEOA.

Tabla 33. Digestión *in vitro*

TTO	Parámetro	Antes de la digestión	Digestión gástrica	Digestión duodenal
EOA	AF (mg EAG/1g)	10.66 ± 0.39 ^{a,b}	10.95 ± 0.15 ^a	10.01 ± 0.26 ^b
NEOA	AF (mg EAG/3.5g)	6.30 ± 0.51 ^b	12.99 ± 0.21 ^a	12.44 ± 0.20 ^a
TC	AF (mg EAG/100g b.s.)	29.35 ± 0.66 ^c	80.22 ± 3.92 ^a	60.35 ± 0.65 ^b
TN		35.73 ± 1.07 ^c	92.04 ± 3.15 ^a	71.09 ± 0.73 ^b
EOA	FL (mg EQ/1g)	22.74 ± 1.05 ^a	16.76 ± 2.87 ^b	17.28 ± 1.34 ^b
NEOA	FL (mg EQ/3.5g)	17.17 ± 0.76 ^b	28.62 ± 3.91 ^a	29.51 ± 2.67 ^a
TC	FL (mg EQ/100g b.s.)	ND	ND	ND
TN		22.13 ± 0.75 ^a	20.49 ± 1.582 ^{a,b}	17.69 ± 1.73 ^b
EOA	% Inhibición DPPH [•] (10 mg)	43.18 ± 0.77 ^a	3.65 ± 2.28 ^c	10.97 ± 0.48 ^b
NEOA	% Inhibición DPPH [•] (35 mg)	19.58 ± 0.40 ^a	9.11 ± 0.68 ^c	14.21 ± 0.10 ^b
TC	% Inhibición DPPH [•] (250 mg)	18.76 ± 0.76 ^a	8.59 ± 2.23 ^c	24.60 ± 3.09 ^b
TN		27.87 ± 0.95 ^a	6.05 ± 1.10 ^c	35.57 ± 1.32 ^b
EOA	% Inhibición ABTS ^{•+} (10 mg)	53.08 ± 1.25 ^a	35.55 ± 2.99 ^b	40.91 ± 2.74 ^b
NEOA	% Inhibición ABTS ^{•+} (35 mg)	27.93 ± 1.37 ^c	48.18 ± 2.58 ^b	61.08 ± 0.62 ^a
TC	% Inhibición ABTS ^{•+} (250 mg)	34.45 ± 1.22 ^b	27.77 ± 0.63 ^c	46.47 ± 3.59 ^a
TN		45.56 ± 3.22 ^c	71.66 ± 1.75 ^b	77.91 ± 1.38 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Medias en el mismo renglón con el mismo superíndice, son significativamente iguales ($p < 0.05$). TTO=tratamiento; EOA= extracto de *O. atropes*; NEOA=nanocápsulas con extracto de *O. atropes*; TC=tortilla control; TN= tortilla con nanocápsulas; AF= ácidos fenólicos; FL=flavonoides.

Por otro lado, la actividad antioxidante en función del radical ABTS^{•+} disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en EOA un 12.17% después de la digestión duodenal, comparada con la actividad antioxidante antes de la digestión, a diferencia de NEOA, que aunque presentó menor actividad antioxidante para ABTS^{•+} antes de la digestión con respecto a EOA debido a la nanoencapsulación, después de la digestión duodenal la actividad antioxidante aumentó significativamente en un del 33.15%, el cual se podría relacionar con el incremento de los ácidos fenólicos y de flavonoides que se mencionaron anteriormente después de la digestión duodenal para NEOA, lo cual se atribuyó al efecto protector de

la nanoencapsulación. También se observó un incremento de la actividad antioxidante en ABTS^{•+} para TC y TN después de la digestión duodenal comparado con la actividad antioxidante antes de la digestión, este incremento fue del 12.02% en TC y del 32.35% para TN, por lo que las nanocápsulas con extracto de *O. atropes* al ser incluidas en la tortilla (TN) incrementaron el contenido polifenólico y antioxidante del alimento, los cuales se mantuvieron en condiciones gastrointestinales.

De Santiago et al. (2018), obtuvieron resultados similares para cladodios de *O. ficus indica* crudos o con diferentes procesos térmicos, sometidos a procesos de digestión *in vitro*. Estos autores indicaron que las enzimas y las condiciones digestivas retienen o degradan más los flavonoides que a los ácidos fenólicos, y que la pérdida de glucósidos de flavonoides durante la digestión podría atribuirse principalmente a su afinidad con las enzimas digestivas (Antunes- Ricardo et al., 2017). En el presente estudio, es probable que se haya presentado un comportamiento similar, lo cual también pudo disminuir la actividad antioxidante del extracto de *O. atropes* después de la digestión duodenal. Chaa-lal et al. (2018) también reportaron disminución del contenido fenólico, flavonoide y la actividad antioxidante de extractos de tres variedades de tuna después de la digestión gastrointestinal *in vitro* en comparación con los no digeridos.

En cambio, en NEOA el efecto protector de la nanoencapsulación del extracto de *O. atropes* fue evidente al incrementar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por captura del radical ABTS^{•+} después de la digestión duodenal, así mismo, el incremento en la actividad antioxidante también podría atribuirse a una mayor liberación de compuestos bioactivos con propiedades depuradoras como lo informaron Gullon et al. (2015), debido que el ambiente intestinal incluía enzimas que pudieron hidrolizar los enlaces entre compuestos polifenólicos y macro o micronutrientes que condujeron a su liberación (Ydjedd et al., 2017), lo que resultó en un mayor contenido polifenólico y antioxidante.

En los productos desarrollados TC y TN, los parámetros de ácidos fenólicos y actividad antioxidante (DPPH[•] y ABTS^{•+}) incrementaron después de la digestión duodenal con respecto a la fase inicial (antes de la digestión). Sin embargo, el incremento fue mayor en TN, el cual contenía las nanocápsulas con extracto de *O. atropes*, con respecto a TC, este incremento se tradujo en 10.74 mg EAG/100 g b.s. de ácidos fenólicos, 17.69 mg EQ/100g b.s. de flavonoides, 10.97 % actividad antioxidante en DPPH[•] y 31.44 % de actividad antioxidante en ABTS^{•+}, por lo que se logró incrementar el contenido polifenólico y antioxidante de la tortilla y se corroboró que estos compuestos continuaron viables y activos durante condiciones gastrointestinales *in vitro*.

VIII.-CONCLUSIONES

En condiciones optimizadas los extractos de *O. ficus indica* y *O. atropes* no presentaron diferencia en su contenido polifenólico y actividad antioxidante, sin embargo, para la extracción, en *O. ficus indica* se necesitó 37.0% más temperatura y 11.3% más etanol, en comparación con *O. atropes*, por lo que se optó por el extracto de *O. atropes* como fuente de polifenoles. Se investigó el perfil polifenólico, nanoencapsulación y estabilidad del extracto de *O. atropes* y con ello se desarrolló una tortilla enriquecida principalmente con flavonoles nanoencapsulados, y se mostró que la nanoencapsulación protegió a los compuestos bioactivos de *O. atropes* en condiciones de almacenamiento, procesamiento en tortilla y digestión *in vitro*. Por lo que este alimento se puede proponer como fuente de flavonoles antioxidantes en la dieta de la población mexicana para la prevención o disminución del riesgo de enfermedades cronicodegenerativas como el sobrepeso y la obesidad, debido a que el alimento desarrollado tiene una cantidad adecuada de estos compuestos bioactivos.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC, 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved methods. 9a ed. St. Paul, MN.

Abdel-Gawad, A. S., Rashwan, M. R. A., El-Naggar, E. A., Hassan, M. A. (2016). Composite Flours from Wheat-Legumes Flour. 1. Chemical Composition, Functional Properties and Antioxidant Activity. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 47, 430-442.

Abhay, S. M., Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Djaeni, M. (2016). Effect of hot-air drying temperature on the polyphenol content and the sensory properties of cocoa beans. *International Food Research Journal*, 23(4), 1479-1484.

Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2017). Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 12-22.

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, 152, 46-55.

Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6182-6187.

Aguayo-Rojas, J., Mora-Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E. O., Serna-Saldivar, S. O., Gutiérrez-Urbe, J. A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. (2012). Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process of whole pigmented Mexican maize. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(2), 178-185.

Aguirre, A., Borneo, R. (2019). Improving bioavailability of polyphenols using nanodelivery systems based on food polymers. *In Polyphenols in plants*, 4, 59-65.

Aguirre, J. J., De La Garza, T. H., Zugasti, C. A., Belmares, C.R., Aguilar, C. N. (2013). The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response Surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 436-442.

Akbarian, M., Ghasemkhani, N., Moayedi, F. (2014). Osmotic dehydration of fruits in food industrial: A review. *International Journal of Biosciences*, 4(1), 42-57.

Ali, M. B., Murtaza, S., Shahbaz, M., Ramzan, S., Ali, M. M. (2020). Nano-encapsulation of bioactive compounds: a diminutive review. *Journal of Agriculture and Food*, 1(2), 13-22.

Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Hfaiedh, M., Sakly, M., Zourgui, L., Rhouma, K. (2010). Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus-indica f. inermis* root extract in rats. *Phytomedicine*, 17(14), 1120-1126.

Amini, M., Abbaspour, K. C., Johnson, C. A. (2010). A comparison of different rule-based statistical models for modeling geogenic groundwater contamination. *Environmental Modelling & Software*, 25(12), 1650-1657.

Ammar, I., Ennouri, M., Attia, H. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Industrial crops and products*, 64, 97-104.

Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P. S. (2015). Spray drying for nanoencapsulation of food components. *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*, 180-197.

Anandhi, S. H.; Fata, J. E.; Kennelly, E. J. (2018). Phytoestrogens: The current state of research emphasizing breast pathophysiology. *Phytotherapy Res*, 32(9), 1707-1719.

Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, Á. A., Legua, P., Hernández, F. (2018). Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1566-1573.

Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., López-Pacheco, F., Alvarez, M. M., Serna-Saldívar, S. O. (2015). *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Industrial Crops and Products*, 76, 803-808.

Antunes-Ricardo, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Gutiérrez-Urbe, J. A., Cepeda-Cañedo, E., Serna-Saldívar, S. O. (2017). Bioaccessibility, intestinal permeability and plasma stability of isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.). *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1816.

Arámbula-Villa, G., González-Hernández, J., Ordorica-Falomir, C. A. (2001). Physico-chemical, structural and textural properties of tortillas from extruded instant corn flour supplemented with various types of corn lipids. *Journal of cereal science*, 33(3), 245-252.

Arba, M., Falisse, A., Choukr-Allah, R., Sindic, M. (2017). Biology, flowering and fruiting of the cactus *Opuntia* spp.: a review and some observations on three varieties in Morocco. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, 1-11.

Arias, M. S. (2008). Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Opuntia atropes* Rose, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En *Portal de Datos Abiertos UNAM* (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1314336>.

Arpagaus, C., Schwartzbach, H. (2008). Scale-up from the Büchi Mini Spray Dryer B-290 to the Niro MOBILE MINOR, *best@buch*, 52, 1-8.

Arpagaus, C., John, P., Collenberg, A., Rütli, D. (2017). Nanocapsules formation by nano spray drying. In *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, 346-401.

Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., de la Rosa, A. P. B. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130.

Assadpour, E., Jafari, S. M. (2019). Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. *Annual review of food science and technology*, 10, 103-131.

Avila-Nava, A., Calderón-Oliver, M., Medina-Campos, O. N., Zou, T., Gu, L., Torres, N., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of functional foods*, 10, 13-24.

Ayala-Rodríguez, A. E., Gutiérrez-Dorado, R., Milán-Carrillo, J., Mora-Rochín, S., López-Valenzuela, J. A., Valdez-Ortiz, A., Paredes-López, O., Reyes-Moreno, C. (2009). Nixtamalised flour and tortillas from transgenic maize (*Zea mays* L.) expressing amaranth: Technological and nutritional properties. *Food Chemistry*, 114(1), 50-56.

Ayadi, A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 40-47.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials A review. *Journal of Food Engineering*, 432–472.

Bai, W., Wang, C., Ren, C. (2014). Intakes of total and individual flavonoids by US adults. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(1), 9-20.

Bakowska-Barczak, A. M., Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial crops and products*, 34(2), 1301-1309.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.

Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., Gattuso, G. (2011). Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl) glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry*, 124 (2), 576–582.

Bashir, M. J., Aziz, H. A., Yusoff, M. S., Adlan, M. N. (2010). Application of response surface methodology (RSM) for optimization of ammoniacal nitrogen removal from semi-aerobic landfill leachate using ion exchange resin. *Desalination*, 254(1-3), 154-161.

Blasi, P., Schoubben, A., Giovagnoli, S., Rossi, C., Ricci, M. (2010). Alginate micro- and nanoparticle production by spray drying. *Proc. Meet. Lact. as a Carr. Inhal. Prod. Parma, Italy*, 137-138.

Bravo-Hollis, H., Sánchez Mejorada, H. (1978). Las cactáceas de México, Tomo I. México. D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 1-743.

Beck-Broichsitter, M., Paulus, I. E., Greiner, A., Kissel, T. (2015). Modified vibrating-mesh nozzles for advanced spray-drying applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92, 96-101.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6185-6205.

Benjamin, K. P., Augustin, G., Armand, A. B., Moses, M. C. (2017). Effect of aging on the physico-chemical and functional characteristics of maize (*Zea mays* L.) flour produced

by a Company at Maroua (Far North of Cameroon), during storage. *African Journal of Food Science*, 11(5), 134-139.

Bensadón, S., Hervert, D., Sáyago, S., Goñi, I. (2010). By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65 (3), 210-216.

Bermudez-Soto, M. J., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865–874.

Bernini, R., Barontini, M., Cis, V., Carastro, I., Tofani, D., Chiodo, R. A., Lupatelli, P., Incerpi, S. (2018). Synthesis and evaluation of the antioxidant activity of lipophilic phenethyl trifluoroacetate esters by *in vitro* ABTS, DPPH and *in cell-culture* DCF assays. *Molecules*, 23(1), 208.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

Cai, W., Gu, X., Tang, J. (2010). Extraction, purification, and characterisation of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(2), 108-116.

Candioti, L. V., De Zan, M. M., Cámara, M. S., Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.

Cardozo, M. L., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., Cuello, A. S., Dibenedetto, G., Isla, M. I. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: Prosopis flour. *Food Research International*, 43(5), 1505-1510.

Carbone, S., Lavie, C. J., Arena, R. (2017). Obesity and heart failure: focus on the obesity paradox. *In Mayo Clinic Proceedings*, 92(2), 266-279.

Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food research international*, 44(2), 499-509.

CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. (2014). Consumo, distribución y producción de alimentos: el caso del complejo maíz-tortilla, *Reporte del CEDRSSA*, 1-15.

Cerella, C., Teiten, M., Radogna, F., Dicato, M., Diederich, M. (2014). From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnology Advance*, 32 (6), 1111-1122.

Chaalal, M., Ydjedd, S., Harkat, A., Namoune, H., Kati, D. E. (2018). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on antioxidant potential of three prickly pear variety extracts. *Acta Alimentaria*, 47(3), 333-339.

Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Perez-Carrillo, E. (2016). Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. *Food Chemistry*, 192, 90-97.

Chawda, P. J., Shi, J., Xue, S., Young Quek, S. (2017). Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*, 1(4), 302-309.

Chel-Guerrero, L., Parra-Pérez, J., Betancur-Ancona, D., Castellanos-Ruelas, A., Solorza-Feria, J. (2015). Chemical, rheological and mechanical evaluation of maize dough and tortillas in blends with cassava and malanga flour. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4387-4395.

Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.

Chidambaram, R. (2016). Rice husk as a low cost nanosorbent for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid removal from aqueous solutions. *Ecological Engineering*, 92, 97-105.

Chlopicka, J., Pasko, P., Gorinstein, S., Jedryas, A., Zagrodzki, P. (2012). Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudo-cereal breads. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 548-555.

Colín-Chávez, C., Virgen-Ortiz, J. J., Serrano-Rubio, L. E., Martínez-Téllez, M. A., Astier, M. (2020). Comparison of nutritional properties and bioactive compounds between industrial and artisan fresh tortillas from maize landraces. *Current Research in Food Science*, 3, 189-194.

Colunga-García Marin, P., Hernández Xocolotzi, E., Castillo Morales, A. (1986). Variación morfológica, manejo agrícola tradicional y grado de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia*, 65, 7-49.

Contreras-Padilla, M., Perez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M. I., Hernández-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Muñoz, E. M., Rodríguez-García, M. E. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 38-43.

Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrillo-Lopez, A., Gonzalez-Aguilar, G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498-10504.

Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paromás, A. M., Santos-Buelga, C., Begoña, B., Moreno-Arribas, M. (2017). An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*, 22(1), 99.

Cuevas-Martínez, D., Moreno-Ramos, C., Martínez-Manrique, E., Moreno-Martínez, E., Méndez-Albores, A. (2010). Nutrition and texture evaluation of maize-white common bean nixtamalized tortillas. *Interciencia*, 35(11), 828-832.

Cuevas-Montilla, E., Hillebrand, S., Antezana, A., Winterhalter, P. (2011). Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(13), 7068-7074.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142.

Czernichow, S., Kengne, A. P., Stamatakis, E., Hamer, M., Batty, G. D. (2011). Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obesity reviews*, 12(9), 680-687.

D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348.

Del Caro, A., Piga, A., Pinna, I., Fenu, P. M., Agabbio, M. (2004). Effect of drying conditions and storage period on polyphenolic content, antioxidant capacity, and ascorbic acid of prunes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4780-4784.

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.

Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.

de la Parra, C., Serna Saldivar, S. O., Liu, R. H. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177-4183.

De Santiago, E., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Cid, C., De Peña, M. P. (2018). Digestibility of (poly) phenols and antioxidant activity in raw and cooked cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(23), 5832-5844.

de Souza-Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Ramos, Ó. L. (2017). Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: *In vitro* behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.

Díaz, M. D. S. S., de la Rosa, A. P. B., Héliès-Toussaint, C., Guéraud, F., Nègre-Salvayre, A. (2017). *Opuntia* spp.: characterization and benefits in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-17.

Dimer, F. A., Ortiz, M., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S. (2015). Inhalable resveratrol microparticles produced by vibrational atomization spray drying for treating pulmonary arterial hypertension. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 152-158.

Durazzo, A. (2018). Lignans. Phenolic compounds in food: Characterization and analysis (food analysis and properties). Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 2018, Chapter 11.

Dziki, D., Różyło, R., Gawlik-Dziki, U., Świeca, M. (2014). Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 48-61.

El-Hawary, S. S., Sobeh, M., Badr, W. K., Abdelfattah, M. A., Ali, Z. Y., El-Tantawy, M. E., Rameh, A. M., Wink, M. (2020). HPLC-PDA-MS/MS profiling of secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* cladode, peel and fruit pulp extracts and their antioxidant, neuroprotective effect in rats with aluminum chloride induced neurotoxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(10), 2829-2838.

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Androletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latrufe, N., Lizard, G., Naser, B., Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia*

ficus-indica) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.

Ennouri, M., Ammar, I., Khemakhem, B., Attia, H. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Opuntia ficus-indica* F. *Inermis* (Cactus Pear) Flowers. *Journal of medicinal food*, 17(8), 908-914.

Esfanjani, A. F., Jafari, S. M. (2016). Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532-543.

Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C. (2003). Methods in polyphenol analysis. *Polyphenol Extraction from Foods*. RSC, Cambridge, UK, 2-16.

Eskin, M., Robinson, D. S. (Eds.). (2000). *Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes*. CRC Press, 1-323.

Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.

Fang, Z., Bhandari, B., (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.

Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A. K., Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 667-675.

Fernández-López, J. A., Almela, L., Obón, J. M., Castellar, R. (2010). Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 253-259.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., E.G.P. da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.

Figuroa, C. J. D., Acero, G. M. G., Vasco, M. N. L., Lozano, G. A., Flores, A. L. M., González-Hernández, J. (2001). Fortification and evaluation of the nixtamal tortillas. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 51(3), 293-302.

Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Phillips, D. R., Kong, F. (2015). In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food chemistry*, 168(1), 225-232.

Gaballah, A. A., Embaby, H. E. S., Hame, Y. S., El-Samahy, S. K. (2016). Changes in physical and chemical properties of *Opuntia dillenii* fruits during the growing stages. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 18, 1-14.

Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., González-Laredo, R. F., Reynoso-Camacho, R., Medina-Torres, L., Cervantes-Cardozo, V. (2009). Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus indica*). *International journal of food sciences and nutrition*, 60(2), 80-87.

García-García, E., la Llata-Romero, D., Kaufer-Horwitz, M., Tusié-Luna, M. T., Calzada-León, R., Vázquez-Velázquez, V., Barquera-Cervera, S., Caballero-Romo, A. J., Orozco, L., Velásquez-Fernández, D., Rosas-Peralta, M., Barriguete-Meléndez, A., Zacarías-Castillo, R., Sotelo-Morales, J. (2008). La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública: Una reflexión. *Archivos de Cardiología de México*, 78(3), 318-337.

García-Rojas, D. A., Meneses, M. E., Martínez-Carrera, D., Figueroa-Cárdenas, J. D., Sánchez-Medina, M. A., Bonilla-Quintero, M., Petlalcalco-Sánchez, B., Martínez-Gutiérrez, P. A., Pérez-Herrera, A. (2020). Effect of *Pleurotus agaves* mushroom addition on the physicochemical and sensory properties of blue maize tortillas produced with traditional and ecological nixtamalization. *Food & Function*, 11(10), 8768-8779.

Garoby-Salom, S., Guéraud, F., Camaré, C., de la Rosa, A. P. B., Rossignol, M., Díaz, M. D. S. S., Salvaire, R., Negre-Salvayre, A. (2016). Dietary cladode powder from wild type and domesticated *Opuntia* species reduces atherogenesis in apoE knock-out mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 72(1), 59-70.

Gaschler, M. M., Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.

Georgiev, M. I. (2014). From plants to pharmacy shelf. *Biotechnology advances*, 6(32), 1051-1052.

Geyikçi, F., Kılıç, E., Çoruh, S., Elevli, S. (2012). Modelling of lead adsorption from industrial sludge leachate on red mud by using RSM and ANN. *Chemical Engineering Journal*, 183, 53-59.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. (2014). Optimization of reflux conditions for total flavonoid and total phenolic extraction and enhanced antioxidant capacity in pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) using response surface methodology. *The Scientific World Journal*, 1-10.

Giosafatto, C. V. L., Sabbah, M., Al-Asmar, A., Esposito, M., Sanchez, A., Villalonga Santana, R., Cammarota, M., Mariniello, L., Di Pierro, P., Porta, R. (2019). Effect of mesoporous silica nanoparticles on glycerol-plasticized anionic and cationic polysaccharide edible films. *Coatings*, 9(3), 172.

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., Ferreira, I. C. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols—A comprehensive review. *Trends in food science & technology*, 88, 302-315.

GBD, Global Burden of Disease Study. (2015). Obesity and Overweight Prevalence 1980-2015. *Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)*; 2017.

Gómez, M., Martinez, M. M. (2018). Fruit and vegetable by-products as novel ingredients to improve the nutritional quality of baked goods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2119-2135.

Gómez-Estaca, J., Balaguer, M. P., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2012). Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 82-91.

González-Ortega, E., Piñeyro-Nelson, A., Gómez-Hernández, E., Monterrubio-Vázquez, E., Arleo, M., Dávila-Velderrain, J., Martínez-Debat, C., Álvarez-Buylla, E. R. (2017). Pervasive presence of transgenes and glyphosate in maize-derived food in Mexico. *Agroecology and sustainable food systems*, 41(9-10), 1146-1161.

Gonzalez, A., Foster, K. L., Hanrahan, G. (2007). Method development and validation for optimized separation of benzo [a] pyrene–quinone isomers using liquid chromatography–mass spectrometry and chemometric response surface methodology. *Journal of Chromatography A*, 1167(2), 135-142

Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R., Bisignano, G., Faulds, C., Waldron, K. W. (2009). Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10323-10330.

Granato, D., Nunes, D. S., Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22.

Griffith, M. P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of botany*, 91(11), 1915-1921.

Gu, B., Linehan, B., Tseng, Y. C. (2015). Optimization of the Büchi B-90 spray drying process using central composite design for preparation of solid dispersions. *International journal of pharmaceutics*, 491(1-2), 208-217.

Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., León, R. A., Fomsgard, S. I., de la Rosa, A. P. B. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525-532.

Guiggi, A. (2008). Catalogue of the Cactaceae naturalized in Italy with notes on their taxonomy, nomenclature and distribution. *Riv Piem St Nat*, 29, 103-140.

Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2015). *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.

Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Rojas, A., Arjona, J. L., Cornejo-Villegas, M. A., Zepeda-Benítez, Y., Velázquez-Hernández, R., Ibarra-Alvarado, R., Rodríguez-García, M. E. (2010). Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process. *Journal of Cereal Science*, 51(1), 81-88.

Gutiérrez, P., de la Vara, S. (2008). Análisis y diseño de experimentos. 2ª edición, *Mc Graw-Hill Interamericana, México*, 432-446.

- Guzmán-Maldonado, S. H., Morales-Montelongo, A. L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from Central-México Region. *Journal of Food Science*, 75(6), 485-492.
- Gwartz, J. A., Garcia-Casal, M. N. (2014). Processing maize flour and corn meal food products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 66.
- Hamzaoui, A. H., Jamoussi, B., M'nif, A. (2008). Lithium recovery from highly concentrated solutions: Response surface methodology (RSM) process parameters optimization. *Hydrometallurgy*, 90(1), 1-7.
- Handford, C. E., Dean, M., Spence, M., Henchion, M., Elliott, C. T., Campbell, K. (2015). Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. *Food Control*, 57, 24-34.
- Harborne, J. B. (1989). Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics. *Academic Press Ltd, London, UK*, 1-28.
- Hasani-Ranjbar, S., Jouyandeh, Z., Abdollahi, M. (2013). A systematic review of anti-obesity medicinal plants-an update. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12(1), 1-10.
- Heinrich, M., Frei Haller, B., Leonti, M. (2014). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *Journal of Natural Products*, 77(3), 678-689.
- Hernández-Martínez, V., Salinas-Moreno, Y., Ramírez-Díaz, J. L., Vázquez-Carrillo, G., Domínguez-López, A., Ramírez-Romero, A. G. (2016). Color, phenolic composition and antioxidant activity of blue tortillas from Mexican maize races. *CYTA-Journal of Food*, 14(3), 473-481.
- Hernández-Urbiola, M. I., Pérez-Torrero, E., Rodríguez-García, M. E. (2011). Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) at varied ages in an organic harvest. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1287-1295.
- Heuzé, V., Tran, G. (2017). Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/120>
- Hughes, G. A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 1(1), 22-30.
- Hruškova, M. A. R. I. E., Machová, D. (2002). Changes of wheat flour properties during short term storage. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(4), 125-130.
- HunterLab. 2012. Application note, AN 1005.00. Hunter L, a, b vs. CIE L*, a*, b*. Measuring color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L*, a*, b*. [En línea]. Disponible en: URL: <http://www.hunterlab.com/an-1005b.pdf>
- Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, 1-34.

Jeong, S. J., Lee, J. S., Lee, H. G. (2020). Nanoencapsulation of synergistic antioxidant fruit and vegetable concentrates and their stability during in vitro digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1056-1063.

Jiménez-Pérez, C., Ramírez-Romero, G., Morán-Bañuelos, S. H. (2015). Instant flour from red and blue nixtamalized maize: production and textural properties of tortilla. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(1), 38-46.

Juániz, I., Ludwig, I., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D., Cid, C., de Peña, M. (2016). Catabolism of raw and cooked green pepper (*Capsicum annuum*) (poly)phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 27, 201–213.

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), 377-392.

Kalavathy, H., Regupathi, I., Pillai, M. G., Miranda, L. R. (2009). Modelling, analysis and optimization of adsorption parameters for H₃PO₄ activated rubber wood sawdust using response surface methodology (RSM). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70(1), 35-45.

Kawashima, Y. (2001). Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1), 1-132.

Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., Yang, W. M., Choi, H. Y., Cho, S. G. (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 569.

Keller, J., Camaré, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A. P. B., Rossignol, M., Santos, D. R., Salvayre, A., Negre, S. F., Guéraud, F. (2015). Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia* cladodes: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *Journal of physiology and biochemistry*, 71(3), 577-587.

Keshari, A. K., Verma, A. K., Kumar, T., Srivastava, R. (2015). Oxidative stress: a review. *The International Journal of Science and Technology*, 3(7), 155-162.

Khafri, H. Z., Ghaedi, M., Asfaram, A., Safarpour, M. (2017). Synthesis and characterization of ZnS: Ni-NPs loaded on AC derived from apple tree wood and their applicability for the ultrasound assisted comparative adsorption of cationic dyes based on the experimental design. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 371-380.

Kim, H., Park, S. (2009). Metabolic profiling and discrimination of two cacti cultivated in Korea using HPLC-ESI-MS and multivariate statistical analysis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(4), 346-352.

Kim, H., Song, M. J., Brian, H., Choi, K. (2014). A comparative analysis of ethnomedicinal practices for treating gastrointestinal disorders used by communities living in three national parks (Korea). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-31.

Kim, S. A., Kim, J., Jun, S., Wie, G. A., Shin, S., Joung, H. (2020). Association between dietary flavonoid intake and obesity among adults in Korea. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(2), 203-212.

Kim, J. W., Lee, K. S., Ju, H. K., Ryu, J. H., Han, S. H., Chang, I. S., Kang, H. H., Oh, G. S., Suh, K. D. (2004). Microencapsulation of cholesteryl alkanoate by polymerization-induced phase separation and its association with drugs. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(9), 2202-2213.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 76(3), 560-568.

Koolen, H. H., da Silva, F. M., Gozzo, F. C., de Souza, A. Q., de Souza, A. D. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2), 467-473.

Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food chemistry*, 85(4), 527-533.

Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K. (2016). Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 794-798.

Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.

Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J., Jang, Y. S. (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6490-6496.

Lee, S. Y., Park, H. S., Kim, D. J., Han, J. H., Kim, S. M., Cho, G. J., Yoo, H. J. (2007). Appropriate waist circumference cutoff points for central obesity in Korean adults. *Diabetes research and clinical practice*, 75(1), 72-80.

Lee, Y. J., Choi, H. S., Seo, M. J., Jeon, H. J., Kim, K. J., Lee, B. Y. (2015). Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish. *Food & function*, 6(8), 2824-2833.

Lemos, A. F. A., Pereira, A. A., Alcantara B. R., Dos Santos, C. D. (2016). Study of the variability, correlation and importance of chemical and nutritional characteristics in cactus pear (*Opuntia* and *Nopalea*). *African Journal of Agricultural Research*, 11(31), 2882-2892.

Lewicki, P. P. (2006). Design of hot air drying for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(4), 153-163.

Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F., Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304-310.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757-772.

Liu, C. L., Wang, J. M., Chu, C. Y., Cheng, M. T., Tseng, T. H. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(5), 635-641.

Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.

Liu, R., Yan, X., Liu, Z., McClements, D. J., Liu, F., Liu, X. (2019). Fabrication and characterization of functional protein-polysaccharide-polyphenol complexes assembled from lactoferrin, hyaluronic acid and (-)-epigallocatechin gallate. *Food & function*, 10(2), 1098-1108.

López-Espíndola, M., Herrera-Corredor, J. A., Balderas-López, J. M., Argumedo-Macías, A., Hernández-Cázares, A. S., Muñoz-Márquez Trujillo, R. A. (2020). Physicochemical characterization of corn masses (*Zea mays* L.) nixtamalized: case Córdoba, Veracruz, Mexico. *Agroproductividad*, 13(2), 9-14.

López-Martínez, L. X., Parkin, K. L., Garcia, H. S. (2012). Effect of processing of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips on the scavenging capacity of reactive nitrogen species. *International journal of food science & technology*, 47(6), 1321-1327.

López-Gutiérrez, D. M., Reyes-Agüero, J. A., Muñoz, A., Robles, J., Cuevas, E. (2015). Comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(4), 1072-1077.

Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoai, A. C., Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(4), 626-659.

Luo, Y., Pan, K., Zhong, Q. (2015). Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles. *International journal of pharmaceuticals*, 486(1-2), 59-68.

Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., Chen, G. (2018). Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112, 296-304.

Ma, J. J., Mao, X. Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S. W., Li, Y. H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 296-302.

Madureira, A. R., Pereira, A., Castro, P. M., Pintado, M. (2015). Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering*, 167, 210-216.

Makkar, H. P., Blümmel, M., Borowy, N. K., Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 161-165.

Maqsoudlou, A., Assadpour, E., Mohebodini, H., Jafari, S. M. (2020). Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers. *Advances in colloid and interface science*, 278, 102122.

Mancuso, P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and therapy*, 5, 47-56.

Marqués, J. L., Della Porta, G., Reverchon, E., Renuncio, J. A. R., Mainar, A. M. (2013). Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 238-243.

Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H. E., Sanmartín-Martínez, E., Sánchez-Sinenio, F., Chang, Y. K., Barrera-Arellano, D., Rios, E. (2001). Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(15), 1455-1462.

Martínez-Flores, H. E., Gaytán-Martínez, M., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Martínez-Bustos, F., Reyes-Vega, M. D. L. L., Rodríguez-Vidal, A. (2004). Effect of some preservatives on shelf-life of corn tortillas obtained from extruded masa. *Agrociencia*, 38(3), 285-292.

Matias, A., Nunes, S. L., Poejo, J., Mecha, E., Serra, A. T., Madeira, P. J. A., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activity of a flavonoid-rich concentrate recovered from *Opuntia ficus-indica* juice. *Food & function*, 5(12), 3269-3280.

Matsuda, M., Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity research & clinical practice*, 7(5), e330-e341.

Mashau, M. E., Mabodze, T., Tshiakhatho, O. J., Silungwe, H., & Ramashia, S. E. (2020). Evaluation of the content of polyphenols, antioxidant activity and physicochemical properties of tortillas added with bambara groundnut flour. *Molecules*, 25(13), 3035.

Mauricio, S, R, A., Figueroa-Cárdenas, J. D., Taba, S., Reyes-Vega, M. L., Rincón-Sánchez, F., Mendoza-Galván, A. (2004). Caracterización de accesiones de maíz por calidad de grano y tortilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(3), 213-222.

Medina, T. L., García, C. E. E., Calderas, F., Laredo, R. G., Sánchez, O. G., Gallegos-Infante, J.A., Rodríguez, R. J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *WT - Food Science and Technology*, 50(2), 642-650.

Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Barros, L., Ferreira, I. (2017). By-product recovery of *Opuntia* spp. peels: Betalainic and phenolic profiles and bioactive properties. *Industrial crops and products*, 107, 353-359.

Mena, P., Tassotti, M., Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Legua, P., Del Rio, D., Hernández, F. (2018). Phytochemical characterization of different prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) cultivars and botanical parts: UHPLC-ESI-MSn metabolomics profiles and their chemometric analysis. *Food Research International*, 108, 301-308.

Méndez-Albores, J. A., Villa, G. A., Del Rio-García, J. C., Martínez, E. M. (2004). Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1611-1614.

Mercado-Pedraza, E. B., Morales-Sanchez, E., Reyes-Vega, M., Gaytán-Martínez, M., Ortega Moody, J. A. (2014). Effects of a Low-Shear Transport System on the Physicochemical Characteristics of Nixtamal Corn Flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1330-1338.

Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., Cuevas-Rodríguez, E. O., Garzón-Tiznado, J. A., Reyes-Moreno, C. (2004). Nixtamalized flour from quality protein maize (*Zea mays* L). Optimization of alkaline processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(1), 35-44.

Miller, D. B., O'Callaghan, J. P. (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism*, 64(3), S40-S46.

Moahamad, M., Ali, M. W., Ahmad, A. (2010). Modelling for extraction of major phytochemical components from *Eurycoma longifolia*. *Journal of Applied Polymer Science*, 10, 2572-2577.

Morales, P., Ramírez, M., de Cortes, S., Carvalho, A., Ferreira, I. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 46(1), 279-285.

Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.

Murugesan, R., Orsat, V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 3-14.

Musita, N. (2020, December). Nixtamalization application to shelf life of corn flour. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 980(1), 1-10.

Myint, K. Z., Wu, K., Xia, Y., Fan, Y., Shen, J., Zhang, P., Gu, J. (2020). Polyphenols from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves and their functional properties. *Journal of food science*, 85(2), 240-248.

Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

Nandiyanto, A. B. D., Okuyama, K. (2011). Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*, 22(1), 1-19.

Ngan, L., Wang, S., Hiep, D., Luong, P., Vui, N., Dinh, T., Dzung, N. (2014). Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*, 40(6), 2165-2175.

Nguimbou, R. M., Njintang, N. Y., Makhlouf, H., Gaiani, C., Scher, J., Mbofung, C. M. (2013). Effect of cross-section differences and drying temperature on the physicochemical, functional and antioxidant properties of giant taro flour. *Food and bioprocess technology*, 6(7), 1809-1819.

Njintang, Y. N., Nguimbou, R. M., Scher, J. (2010). Effect of storage on the physicochemical, functional and rheological properties of taro (*Colocasia esculenta*) flour and paste. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 37-48.

NMX-FF-034/2-SCFI-2003 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS - PARA USO HUMANO - CEREALES - MAÍZ AMARILLO PARA ELABORACIÓN DE ALMIDONES Y DERIVADOS - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA AACC, 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved methods. 9a ed. St. Paul, MN.

NMX FF-034/1-SCFI-2002 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE I: MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA

NMX-F-046-SCFI-2018 HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO.

NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.

Okuyama, K., Abdullah, M., Lenggoro, I. W., Iskandar, F. (2006). Preparation of functional nanostructured particles by spray drying. *Advanced Powder Technology*, 17(6), 587-611.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2020). Obesidad y sobrepeso. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Osuna-Martínez, U., Reyes-Esparza, J., Rodríguez-Fragoso, L. (2014). Cactus (*Opuntia ficus-indica*): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Natural Products Chemistry & Research*, 2(6), 1-8.

Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A. R., Öz, M., Ozogul, F. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 677-684.

Palacios-Fonseca, A. J., Vazquez-Ramos, C., Rodríguez-García, M. E. (2009). Physicochemical characterizing of industrial and traditional nixtamalized corn flours. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 45-51.

Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.

Papoutsis, K., Pristijono, P., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Bowyer, M. C., Scarlett, C. J., Vuong, Q. V. (2017). Effect of vacuum-drying, hot air-drying and freeze-drying on polyphenols and antioxidant capacity of lemon (*Citrus limon*) pomace aqueous extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(4), 880-887.

Park, S. H., Kim, H., Rhyu, D. Y. (2007). Flavonoids from the stems of eastern pick-lypear *Opuntia humifusa*, Cactaceae. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(4), 254-258.

Pareek, O. P., Singh, R. S., & Vashishtha, B. B. (2003). Performance of cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] clones in hot arid region of India. *Journal of the professional association for cactus development*, 7, 121-130.

Parto, P., Lavie, C. J., Arena, R., Bond, S., Popovic, D., Ventura, H. O. (2016). Body habitus in heart failure: understanding the mechanisms and clinical significance of the obesity paradox. *Future cardiology*, 12(6), 639-653.

Parto, P., Lavie, C. J. (2017). Obesity and cardiovascular Diseases. *Current problems in cardiology*, 42(11), 376-394.

Pasrija, D., Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for extraction of green tea polyphenols: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 935-950.

Pavithra, K., Vadivukkarasi, S. (2015). Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*, 1(4), 42-46.

Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K. Z., Turner, C., Nordberg Karlsson, E. (2014). Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(15), 3321-3333.

Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M. J., Ros, G., Lagaron, J. M., López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168, 124-133.

Pešić, M. B., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Stanisavljević, N. S., Vukotić, G. N., Kojić, M. O., Gašić, M. U., Baraća, B. M., Stanojevića, P. S., Popovića, A. D., Banjac, R. N., Tešić, Ž. L. (2019). In vitro digestion of meat-and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? *Food chemistry*, 284, 28-44.

Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Turcuş, V., Predoi, G., Iordache, F. (2018). Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1326-1345.

Poojary, M. M., Passamonti, P. (2015). Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopenene from tomato pulp waste. *Food chemistry*, 188, 84-91.

Pourashouri, P., Shabanpour, B., Razavi, S. H., Jafari, S. M., Shabani, A., Aubourg, S. P. (2014). Oxidative stability of spray-dried microencapsulated fish oils with different wall materials. *Journal of aquatic food product technology*, 23(6), 567-578.

Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of functional foods*, 18, 797-810.

Ramírez-Moreno, E., Cordoba-Díaz, M., de Cortes Sánchez-Mata, M., Marqués, C. D., Goni, I. (2015). The addition of cladodes (*Opuntia ficus indica* L. Miller) to instant maize flour improves physicochemical and nutritional properties of maize tortillas. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 675-681.

Randhir, R., Shetty, K. (2007). Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 197-204.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Reilly, J. J., El-Hamdouchi, A., Diouf, A., Monyeki, A., Somda, S. A. (2018). Determining the worldwide prevalence of obesity. *The Lancet*, 391(10132), 1773-1774.

Rendón-Villalobos, R., Ortíz-Sánchez, A., Solorza-Feria, J., Trujillo-Hernández, C. A. (2012). Formulation, physicochemical, nutritional and sensorial evaluation of corn tortillas supplemented with chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Czech Journal of Food Sciences*, 30(2), 118-125.

Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., Hernández, H. M. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrocien- cia*, 39(4), 395-408.

Reyes-Agüero, J. A., Rivera, J. A. (2011). Agrobiodiversity of cactus pear (*Opuntia*, Cactaceae) in the meridional highlands plateau of Mexico. *Journal of Natural Resources and Development*, 1, 1-8.

Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chávez, J., Saéna, C. (2010) Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1386-1394.

Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., Lucini, L. (2018). Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7(2), 24.

Rodríguez, M., de Lira, C., Hernández, E., Cornejo, M., Palacios, A., Rojas, I., Muñoz, C. (2007). Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 107-112.

Rodríguez-Rodríguez, C., Torres, N., Gutiérrez-Urbe, J. A., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Leal-Díaz, A. M., Antunes-Ricardo, M., Marques-Mota, C., Ordar, G., Chavez-Santoscoy, R. A., Serna-Saldivar, O. S., Tovar, A. R. (2015). The effect of isorhamnetin

glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food & function*, 6(3), 805-815.

Rombaut, N., Tixier, A. S., Bily, A., Chemat, F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(4), 530-544.

Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Humarán, I. M., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., Rivera, D. J A., Hernández-Ávila, M. (2017). Diseño metodológico de la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino 2016. *Salud pública de México*, 59, 299-305.

Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R., Orlien, V., Lebovka, N. I. (2016). Negative pressure cavitation extraction: A novel method for extraction of food bioactive compounds from plant materials. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 98-108.

Ruch, R. J., Cheng, S. J., Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.

Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. A., O'Brien, N. M. (2008). Micellariation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 127-133.

Saikia, S., Mahnot, N. K., Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food chemistry*, 171, 144-152.

Salazar, N. A., Alvarez, C., Orrego, C. E. (2018). Optimization of freezing parameters for freeze-drying mango (*Mangifera indica* L.) slices. *Drying Technology*, 36(2), 192-204.

Salinas-Moreno, Y., Saavedra Arellano, S., Soria Ruíz, J., Espinosa Trujillo, E. (2008). Características fisicoquímicas y contenido de carotenoides en maíces (*Zea mays* L.) amarillos cultivados en el Estado de México. *Agricultura técnica en México*, 34(3), 357-364

Salinas-Moreno, Y., Aguilar-Modesto, L. (2010). Efecto de la dureza del grano de maíz (*Zea mays* L.) sobre el rendimiento y calidad de la tortilla. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 2(1), 5-11.

Salinas, M. Y., Vázquez, C. G. (2006). Metodologías de análisis de la calidad nixtamalera-tortillera en maíz. *Folleto técnico*, 23.

Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., Rivera-Dommarco, J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México. *Instituto Nacional de Salud Pública*, 1-268.

Sánchez, E., Dávila-Aviña, J., Castillo, S. L., Heredia, N., Vázquez-Alvarado, R., García, S. (2014). Antibacterial and antioxidant activities in extracts of fully grown cladodes of 8 cultivars of cactus pear. *Journal of food science*, 79(4), M659-M664.

Santana-Gálvez, J., Pérez-Carrillo, E., Velázquez-Reyes, H. H., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Application of wounding stress to produce a nutraceutical-rich carrot powder ingredient and its incorporation to nixtamalized corn flour tortillas. *Journal of Functional Foods*, 27, 655-666.

Santo-Ares T, Venusa de Silva M, Alves de Almeida CM, Oliveira D. (2009). Genetic diversity in cactus clones using ISSR Markers. *Acta Horticulturae*, 811, 55-65.

Santiago-Ramos, D., de Dios Figueroa-Cárdenas, J., Mariscal-Moreno, R. M., Escalante-Aburto, A., Ponce-García, N., Véles-Medina, J. J. (2018). Physical and chemical changes undergone by pericarp and endosperm during corn nixtamalization-A review. *Journal of Cereal Science*, 81, 108-117.

Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7054-7061.

Scheinvar, L. (1999). Taxonomía de las *Opuntias* utilizadas. *Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal*. FAO, 132, 21-28.

Schmid, K., (2011). Spray drying of protein precipitates and Evaluation of the Nano Spray Dryer B90. PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-University, Munich, 1-139.

Schinella, G., Tournier, H., Prieto, J., Mordujovich, B., Ríos, J. (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, 70, 1023-1033.

Scicchitano, P., Cameli, M., Maiello, M., Modesti, P. A., Muiesan, M. L., Novo, S., ... di Cardiologia, S. I. (2014). Nutraceuticals and dyslipidaemia: beyond the common therapeutics. *Journal of functional foods*, 6, 11-32.

SE (Secretaría de Economía). 2012. Análisis de la cadena de valor maíz-tortilla: situación actual y factores de competencia local. Dirección General de Industrias Básicas. Distrito Federal, México, 38.

SADER (2019). El cultivo del nopal verdura en México. <https://www.gob.mx/agricultura/cdmx/articulos/el-cultivo-de-nopal-verdura-en-la-ciudad-de-mexico?idiom=es>

Segurola, J., Allen, N. S., Edge, M., Mc Mahon, A. (1999). Design of eutectic photoinitiator blends for UV/visible curable acrylated printing inks and coatings. *Progress in Organic Coatings*, 37(1-2), 23-37.

Serna-Saldivar, S. O., Knabe, D. A., Rooney, L. W., Tanksley Jr, T. D. (1987). Effects of lime cooking on energy and protein digestibilities of maize and sorghum. *Cereal Chemistry*, 64(4), 247-252.

Serna-Saldivar^a, S.O. (2015). Chapter 1—History of corn and wheat tortillas. *Wheat Flour and Corn Products*, 1–28.

Serna-Saldivar^b, S. O., Gutiérrez-Urbe, J. A., García-Lara, S. (2015). Phytochemical profiles and nutraceutical properties of corn and wheat tortillas. *In Tortillas*, 65-96.

Serra, A. T., Poejo, J., Matias, A. A., Bronze, M. R., Duarte, C. M. (2013). Evaluation of *Opuntia* spp. derived products as antiproliferative agents in human colon cancer cell line (HT29). *Food Research International*, 54(1), 892-901.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2014). Mexican Horticulture Database [Online] Ministry of Agriculture, Government of Mexico. www.siap.sagarpa.gob.mx.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Nopalitos, de México para el mundo. <https://www.gob.mx/siap/articulos/nopalitos-de-mexico-para-el-mundo>

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020). El nopal, parte de la riqueza del campo mexicano. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-nopal-parte-de-la-riqueza-del-campo-mexicano?idiom=es>

Shahidi, F., Naczki, M. (2003). Biosynthesis, Classification and nomenclature of Phenolics in food and nutraceuticals. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press. Chapter 1. 1-14

Shahidi, F., Yeo, J. (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1573.

Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.

Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544.

Simkhada, D., Kurumbang, N. P., Lee, H. C., Sohng, J. K. (2010). Exploration of glycosylated flavonoids from metabolically engineered *E. coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(5), 754-760.

Smirnoff, N., Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.

Singh, G. M., Danaei, G., Farzadfar, F., Stevens, G. A., Woodward, M., Wormser, D., ... and Prospective Studies Collaboration. (2013). The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. *PloS one*, 8(7), e65174.

Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.

Spina, A., Brighina, S., Muccilli, S., Mazzaglia, A., Fabroni, S., Fallico, B., Rapisarda, P., Arena, E. (2019). Wholegrain durum wheat bread fortified with citrus fibers: Evaluation of quality parameters during long storage. *Frontiers in nutrition*, 6, 13, 1-13.

Stintzing, F. C., Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular nutrition & food research*, 49(2), 175-194.

Temba, M. C., Njobeh, P. B., Kayitesi, E. (2017). Storage stability of maize-groundnut composite flours and an assessment of aflatoxin B1 and ochratoxin A contamination in flours and porridges. *Food Control*, 71, 178-186.

Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Livrea, M. A. (2004). Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 80(4), 941-945.

Treviño, G. D. M., Sánchez, A. E. J., Gontes, P. I. C., Wong, P. R., Rojas, R., Martínez, A. G. C. G. (2017). Antioxidant profile of different types of herbal infusions and teas commercially available in Mexico. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 31(1), 67-77.

Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D. A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., Loarca-Piña, G. (2016). Fortification of Commercial Nixtamalized Maize (*Zea mays* L.) with Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Increased the Nutritional and Nutraceutical Content of Tortillas without Modifying Sensory Properties. *Journal of Food Quality*, 39(6), 569-579.

Tolun, A., Artik, N., Altintas, Z. (2020). Effect of different microencapsulating materials and relative humidities on storage stability of microencapsulated grape pomace extract. *Food chemistry*, 302, 125347.

Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., Espín, J. C. (2016). Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 19(6), 471-476.

Torres, D., Izquierdo, G., Cruz, B. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 240-9.

Tóth, M. E., Vígh, L., Sántha, M. (2014). Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress and Chaperones*, 19(3), 299-309.

Tounsi, M. S., Ouerghemmi, I., Ksouri, R., Wannas, W. A., Hammrouni, I., Marzouk, B. (2011). HPLC-determination of phenolic composition and antioxidant capacity of cactus prickly pears seeds. *Asian Journal of Chemistry*, 23(3), 1006.

Uebelhack, R., Busch, R., Alt, F., Beah, Z. M., Chong, P. W. (2014). Effects of cactus fiber on the excretion of dietary fat in healthy subjects: a double blind, randomized, placebo-controlled, crossover clinical investigation. *Current Therapeutic Research*, 76, 39-44.

Valente, L. M., da Paixão, D., Do Nascimento, A. C., dos Santos, P. F., Scheinvar, L. A., Moura, M. R., Tinoco, W. L., Gomes, F. N. L., da Silva, J. F. (2010). Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food chemistry*, 123(4), 1127-1131.

Valente, L. M., Scheinvar, L. A., da Silva, G. C., Antunes, A. P., Dos Santos, F. A., Oliveira, T. F., Tappin, M., Aquino, N., Pereira, A., Dos Santos, R. R. (2007). Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacognosy Magazine*, 3, 167-172.

Veitch, N., Grayer, R. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 28 (19), 1626-1695.

Veneranda, M., Hu, Q., Wang, T., Luo, Y., Castro, K., Madariaga, J. M. (2018). Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol. *Lwt, Food Science and Technology*, 89, 596-603.

Vetal, M. D., Lade, V. G., Rathod, V. K. (2013). Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: process intensification and kinetic studies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69, 24-30.

Vyas, M. (2016). A short review on anticancer investigations of *Strychnos nux-vomica*. *International Journal of Green Pharmacy*, 10(3), 1-4.

Waniska, R. D., Graybosch, R. A., Adams, J. L. (2002). Effect of partial waxy wheat on processing and quality of wheat flour tortillas. *Cereal chemistry*, 79(2), 210-214.

Wang, S., Gu, Y., Liu, Q., Yao, Y., Guo, Z., Luo, Z., Cen, K. (2009). Separation of bio-oil by molecular distillation. *Fuel Processing Technology*, 90(5), 738-745.

Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, S., Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), 1-18.

Wang, H., Liu, Y., Wei, S., Yan, Z. (2012). Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. *Food Chemistry*, 132(1), 582-587.

Wu, Chun-Wua, Murthy, H. N., Hahn, Eun-Joo, Lee, H. L., Paek, Kee-Yoeup. (2008). Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 254–258.

WCRF/AICR. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition and physical activity: Energy balance and body fatness. 2018. Available at <https://www.wcrf.org/dietandcancer/energy-balance-body-fatness>.

WHO | Obesity and overweight. 2017. WHO n.d. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Wu, P., Nielsen, T. E., Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 422-439.

Xiao, J., Muzashvili, T., Georgiev, M. (2014). Advance on biotechnology for glycosylation of high-value flavonoids. *Biotechnology Advances*, 32(5), 1145-1156.

Xiao, J., Ni, X., Kai, G., Chen, X. (2015). Advance in dietary polyphenols as aldose reductases inhibitors: Structure-activity relationship aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1), 16–31.

Xiao, Y., Zhang, S., Tong, H., Shi, S. (2018). Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phytotherapy Research*, 32(3), 384-394.

Yang, N., Zhao, M., Zhu, B., Yang, B., Chen, C., Cui, C., Jiang, Y. (2008). Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (4), 570-574.

Yang, Z., Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(3), 470-476.

Yasmeen, R., Hashmi, A. S., Anjum, A. A., Saeed, S., Muhammad, K. (2012). Antibacterial activity of indigenous herbal extracts against urease producing bacteria. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22, 416-419.

Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., Rezgui, F., Louaileche, H., Kati, D. E. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 827-835.

Yilmaz, Y., Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.

Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., Villares, E. U. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, well-being and health*, 2, 23-48.

Zavala, F. A. (2015). Efecto del proceso de nixtamalización por infrarrojo sobre el contenido de aflatoxinas en las tortillas de maíz, *Tesis de maestría, Universidad Michacana de San Nicolás de Hidalgo, México*, 1-77.

Zazueta, C., Ramos, G., Fernández-Muñoz, J. L., Rodríguez, M. E., Acevedo-Hernández, G., Pless, R. C. (2002). A radioisotopic study of the entry of calcium ion into the maize kernel during nixtamalization. *Cereal Chemistry*, 79(4), 500-503.

Zhang, X., Chen, F., Wang, M. (2014). Antioxidant and antiglycation activity of selected dietary polyphenols in a cookie model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (7), 1643-1648.

Zhou, L., Elias, R. (2013). Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chemistry*, 138 (2-3), 1503-1509.

Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., Li, S., Barba, F. J., Koubaa, M., Roohinejadde, S., Xiong, X., He, J. (2017). Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 40-47.

Producto de este trabajo de doctorado se publicaron los siguientes artículos de investigación:

1. Tranquilino-Rodríguez, E., Martínez-Flores, H. E., Rodiles-López, J. O., Dios Figueroa-Cárdenas, J. D., & Pérez-Sánchez, R. E. (2020). Optimization in the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *Opuntia ficus-indica* using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6), e14485. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14485>.
2. Tranquilino-Rodríguez, E., Martínez-Flores, H. E., Rodiles-López, J. O., & Avila, G. C. (2020). Nanoencapsulation and identification of phenolic compounds by UPLC-Q/TOF-MS² of an antioxidant extract from *Opuntia atropes*. *Functional Foods in Health & Disease*, 10(12), 505-519. <https://www.doi.org/10.31989/ffhd.v10i12>

Así mismo, durante el programa de doctorado se publicó el artículo de divulgación:

1. Eunice Tranquilino Rodríguez y Héctor Eduardo Martínez Flores. (2018). El poder de la sugestión y el efecto placebo. *Saber más, revista de divulgación de la UMSNH*, 41.



Optimization in the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *Opuntia ficus-indica* using response surface methodology

Eunice Tranquilino-Rodríguez¹ | Héctor Eduardo Martínez-Flores² |
José Octavio Rodiles-López² | Juan De Dios Figueroa-Cárdenas³ |
Rosa Elena Pérez-Sánchez²

¹Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

²Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

³CINVESTAV-IPN, Unidad Querétaro, Santiago de Querétaro, Mexico

Correspondence

Héctor E. Martínez-Flores, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, Morelia, Michoacan 58240, Mexico.
Email: hedu65@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to find the optimal conditions for the extraction of phenolic compounds as well as antioxidant activities from *Opuntia ficus-indica* via the response surface methodology using a maceration extraction technique. A Box–Behnken 3³ design was used to optimize the process variables (ethanol concentration: 70%, 83%, and 96%; temperature: 24, 50, and 76°C; time: 30, 75, and 120 min) in the extraction of phenolic compounds, and the DPPH* and ABTS** antioxidant activities. The Statgraphics Centurion XVII software used in this study predicted a maximal polyphenolic extraction and antioxidant activity when an ethanol concentration of 78.9%, a temperature of 75.9°C, and an extraction time of 120 min were used. The experimental validation of these conditions resulted in an extraction of 0.907 ± 0.09 phenolic acids, and flavonoids (8.720 ± 0.27 mg QE/g), as well as that of DPPH* (0.160 ± 0.01) and ABTS** (0.612 ± 0.01) antioxidant activities.

Practical applications

No publications have evaluated the influence of factors such as ethanol concentration, temperature and time, and their interactions, on simultaneously optimizing the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *O. ficus-indica*. Additionally, water and ethanol were used as solvents for the extraction of polyphenolic compounds; these are economical and recommended for their safe use in the food industry, in particular, to develop new functional foods.

1 | INTRODUCTION

The nopal (*Opuntia* spp.) is native to Mexico and is well adapted to arid and semi-arid zones. There are around 1,500 *Opuntia* species around the world. These plants produce edible stems known as pads, cladodes, nopal or *pencas* (Guevara-Figueroa et al., 2010). The cladodes of *Opuntia* spp. contain bioactive compounds, such as polyphenols, which are a large group of secondary metabolites produced by plants. Polyphenols possess diverse chemical structures and include phenolic acids or phenols—such as gallic acid, coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, and

salicylic acid—and flavonoids, such as isoquercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, nicotiflorin, rutin, and narcisin, among other classes of polyphenols (Bensadón, Hervert-Hernández, Sáyago-Ayerdi, & Goñi, 2010; Gallegos-Infante et al., 2009; Guevara-Figueroa et al., 2010; Valente et al., 2010).

The growing interest in developing research in the extraction of polyphenolic compounds from *Opuntia* spp. can be attributed to the positive impact of its antioxidant potential on health; this reduces the risk of cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and cancer (El Mostafa et al., 2014; Vauzour, Rodriguez-Matoes, Corona, Oruna-Concha, & Spencer, 2010).



Nanoencapsulation and identification of phenolic compounds by UPLC-Q/TOF-MS² of an antioxidant extract from *Opuntia atropes*

Running title: Nanoencapsulation of phenolics from *Opuntia*

Eunice Tranquilino-Rodríguez¹, Héctor E. Martínez-Flores^{2*}, José O. Rodiles-López²,
Guillermo C. G. Martínez-Avila³

¹Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. ²Facultad de Químico Farmacobiología. Tzintzuntzan 173. Col. Matamoros, C.P. 58000. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México. ³Research Center and Development for Food Industries, Campus of Agricultural Sciences, School of Agronomy, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco Villa s/n, Ex-Hacienda 'El Canadá', General Escobedo, Nuevo León, 66050, Mexico.

*Corresponding author: Héctor E. Martínez Flores. Facultad de Químico Farmacobiología. Tzintzuntzan 173. Col. Matamoros, C.P. 58000. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.

Submission Date: December 4th, 2020; Acceptance Date: December 29th, 2020; Publication Date: December 31, 2020

Please cite this article as: Tranquilino-Rodríguez E., Martínez-Flores H., Rodiles-Lopez J., Martínez-Avila G. Nanoencapsulation and identification of phenolic compounds by UPLC-Q/TOF-MS² of an antioxidant extract from *Opuntia atropes*. *Functional Foods in Health and Disease* 2020. 10(12): 505-519. DOI: <https://www.doi.org/10.31989/ffhd.v10i12.763>

ABSTRACT

Background: Nanoencapsulation is a technique that protects bioactive compounds such as polyphenolic compounds from environmental factors, through a biopolymer that acts as a wall system. Cladodes of *O. atropes* are an important source of polyphenolic compounds, flavonoids being the most abundant, these are mainly in the form of glycosides and their consumption has been related to a decrease in glucose and lipid profile through the elimination of intracellular radicals.

Purpose of the study: To study the formulation and process parameters that allow for obtaining the best experimental conditions for nanoencapsulation and protect the polyphenolic compounds of the *O. atropes* extract.

ARTÍCULO

El poder de la sugestión y el efecto placebo

Eunice Tranquilino Rodríguez y Héctor Eduardo Martínez Flores

