



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto del carbonizado pulverizado de diferentes
tipos de tortillas en trofozoitos de *Entamoeba
histolytica* en medio axénico.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JATZIRY MONTSERRAT LUGARDO AQUINO

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: **Alejandro Camacho Cruz**
Vocal **Aleida Mina Cetina**
Secretario **Augusto José González Canto**
1er Suplente: **Michelle Monserrath Camacho Lara**
2º Suplente: **Edgar Ricardo Vázquez Martínez.**

El tema se desarrolló:

LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM. CAMPUS: HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "EDUARDO LIZEAGA"

Asesor del tema:

Dr. Augusto José González Canto.

Sustentante:

Jatziry Montserrat Lugardo Aquino.

Contenido

Lista de abreviaturas.	1
1. Introducción.	1
2. Hipótesis.	4
3. Objetivo general.	4
3.1. Objetivos específicos.	4
4. Marco teórico.	6
4.1 Maíz.	6
4.1.2 Historia.	6
4.1.4 Importancia del maíz en México.	8
4.1.5 Granos del maíz.	8
4.2 Nixtamalización.	10
4.2.1 Cambios en la nixtamalización.	12
4.2.3 Nixtamalización y su efecto en maíces pigmentados.	12
4.3 Tortilla.	14
4.3.1 Tortilla de color azul.	15
4.3.2 El color en los diferentes tipos de tortillas.	15
4.3.3 Flavonoides.	16
4.3.4 Las antocianinas.	17
4.3.5 Efecto de la temperatura en las antocianinas.	19
4.3.6 Alimentos funcionales.	19
4.3.7 Tostadas de maíz.	20
4.4 Trigo.	20
4.4.2 Harina de trigo.	23
4.4.3 Tortillas de harina de trigo.	23
4.5 Pan de trigo Integral.	24
4.6 Proceso de carbonización.	25
4.7 La tortilla en relación con la amebiasis.	26
4.8 Amebiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>.	27

4.8.1 La amebiasis.....	27
4.8.2 Situación mundial.	27
4.8.3 <i>Entamoeba histolytica</i>	28
4.8.4 Estructura del trofozoíto.....	29
4.8.5 Estructura del quiste.	30
4.8.6 Fagocitosis.	31
4.8.7 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	32
4.8.8 Epidemiología.	33
4.8.9 Tratamiento.	34
5. Metodología.....	35
5.1 Descripción de la metodología.....	36
5.2 Estadística empleada.....	42
6. Resultados.....	43
6.1 Preparación del carbonizado.....	43
6.2 Crecimiento amebiano.	48
6.3 Ensayos con diferentes tipos de muestras incubadas con amebas.....	50
6.3.1 Tortilla de maíz azul.	50
6.3.2 Tortilla de maíz rojo.	54
6.3.3 Tortillas de maíz blanco.	59
6.3.4 Tortillas de maíz criollo.	63
6.3.5 Tortillas de harina comercial.	67
6.3.6 Tortillas de harina artesanal.	71
6.3.7 Pan de caja integral de trigo (comercial).	75
6.3.8 Tostadas horneadas de maíz azul.	79
6.4Potencial de hidrógeno (pH).....	86
6.5 Análisis estadístico entre las 6 diferentes tortillas carbonizadas y pulverizadas.	87
6.6 Análisis estadístico entre las 7 diferentes muestras carbonizadas pulverizadas y la muestra pulverizada.....	87
7. Análisis de resultados.....	90

8. Conclusiones.	96
9. Perspectivas.	98
10. Bibliografía.	99
11. Anexos.	

Lista de abreviaturas.

(A)	=	Artesanal
(C)	=	Comercial
°C	=	Grados Celsius
Ca ²⁺	=	Calcio
CO ₂	=	Dióxido de carbono
Ca(OH) ₂	=	Hidróxido de calcio
Fc	=	Fisher calculada
FAO	=	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fig.	=	Figura
g	=	Gramos
h	=	Hora
HDS	=	Diferencia significativa honesta.
INEGI	=	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
K ₂ HPO ₄	=	Fosfato dipotásico
Kcal	=	Kilo calorías
KH ₂ PO ₄	=	Fosfato monopotásico
mL	=	mililitros
NaCl	=	Cloruro de Sodio
OMS	=	Organización Mundial de la Salud
t	=	Tiempo
TPS-1	=	Medio monofásico
TYI-S33	=	Tripticasa Levadura hierro suero.

1. Introducción.

Actualmente se siguen investigando a los alimentos que son consumidos como parte de una dieta normal y que contienen componentes biológicamente activos, los cuales ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir dichas enfermedades (Paredes et al., 2010).

Dentro de los alimentos tradicionales mexicanos se encuentra la tortilla, la cual es elaborada principalmente de maíz blanco y amarillo, aunque los maíces azules y rojos también son empleados en menor frecuencia para su elaboración. Los pigmentos responsables de la coloración en las tortillas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides llamadas antocianinas, las cuales se ha reportado que ejercen efectos benéficos en la salud, cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (Pascual et al., 2007; Zhao et al., 2009; Muserref et al., 2014). Debido a sus propiedades antioxidantes captadoras de radicales, en los últimos años ha aumentado el interés en el consumo de la tortilla de maíz azul, debido a la cantidad de compuestos fenólicos que poseen, principalmente a la presencia de antocianinas.

Las tortillas artesanales elaboradas con maíz nixtamalizado son uno de los alimentos más importantes en la comida mexicana y reconocida como patrimonio intangible de la humanidad (Sánchez G.J.J. 2011).

En los últimos años se han investigado compuestos presentes en los distintos granos empleados para la elaboración de diferentes tortillas, por ejemplo, en el maíz azul, la capa de aleurona contiene pigmentos de antocianina que le dan el color, los diferentes compuestos le confieren propiedades distintas a cada tipo de maíz (Sánchez G.J.J. 2011).

En el artículo de "Medicina tradicional Mexicana-UNAM, 2009" se hace mención de que en el estado de Morelos se acostumbraba a comer tortilla quemada para aliviar dolores de estómago y empacho. Las enfermedades gastrointestinales son provocadas por virus, bacterias o protozoarios. Algunos patógenos comunes clasificados como bacterias son *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*. Existen otros microorganismos involucrados en estas enfermedades como *Entamoeba histolytica*, siendo un protozoario. Por lo anterior, se decidió conocer el efecto al emplear carbonizado pulverizados de diferentes tipos de tortillas en coincubación con una población de trofozoitos amebianos (*Entamoeba histolytica*) en medio axénico.

La amebiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la infección provocada por *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mundial, es responsable de aproximadamente 100 mil muertes por año en el mundo (Brandt H, Pérez-Tamayo R., 2011). Cuando el parásito invade el intestino grueso puede invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular (Romero R., 2008).

Con base a lo anterior se consideró importante realizar una investigación del efecto *in vitro* en una población de trofozoitos amebianos (*Entamoeba histolytica*) en medio axénico TYI-S-33, con 25, 50 y 100 mg de carbonizado pulverizado y observar diferencias entre los tipos de tortilla de maíz azul, tortilla de maíz roja, tortilla de maíz blanca y tortilla de maíz criolla, además de comparar con otro tipo de tortilla carbonizada proveniente de otro tipo de cereal, en este caso la tortilla de harina de trigo comercial y artesanal. Como también del pan integral de trigo, carbonizado y pulverizado, para comparar con las tortillas. Por

último, emplear tostada horneada de maíz azul, para observar el efecto de las muestras carbonizadas y de la no carbonizada.

2. Hipótesis.

Al usar diferentes tipos de tortillas, carbonizada y pulverizada, considerando la genética y la variación de la composición de diversos tipos de maíz, además del proceso de elaboración para los diferentes tipos de tortillas de maíz y de harina, entonces se tendrá un efecto diferente en el crecimiento amebiano.

3. Objetivo general.

Determinar el efecto *in vitro* de carbonizados pulverizados de diferentes tipos de tortillas en coincubación con una población de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

3.1. Objetivos específicos.

- Establecer un sistema óptimo de crecimiento amebiano axénico de *Entamoeba histolytica*.
- Llevar a cabo una metodología para la obtención de carbonizado de diferentes tipos de tortilla provenientes de maíz y trigo, pan integral), para someter por separado a cada muestra en coincubación con una población de trofozoitos amebianos (*Entamoeba histolytica*) en crecimiento.
- Comparar el efecto *in vitro* del crecimiento de la población amebiana con las diferentes muestras de carbonizado pulverizado de tortillas, pan integral y la muestra de pulverizado de tostadas de maíz azul.

- Observar y evaluar al microscopio fotónico los trofozoitos, en presencia de las diferentes muestras como son los tipos de tortilla de maíz, tortillas de harina, pan integral, carbonizado y pulverizado, así como la muestra de tostadas horneadas de maíz azul pulverizada y sin carbonizar para la identificación de la fagocitosis.

4. Marco teórico.

4.1 Maíz.

4.1.2 Historia.

Desde los inicios de la civilización, el maíz ha jugado un papel importante en la vida de los habitantes de América. En la época precolombina era la base de la alimentación entre los diversos pueblos autóctonos de México y Centroamérica. Existen evidencias que la existencia más antigua del maíz se remonta a unos 7,000 años de antigüedad. Este cereal era un alimento esencial en las civilizaciones maya y azteca; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz (Serna Saldívar et. al. 1990).

El maíz ha sido y es hasta la fecha un elemento fundamental en la dieta mesoamericana. Si bien las tortillas perdieron su monopolio en la mesa y casi nadie las conoce como tlixcalli (Náhuatl; tortilla o pan elaborado de maíz), a pesar de ello nunca han dejado de tener un lugar privilegiado. La tortilla es, para la gran mayoría de la población, el alimento más importante en su dieta. Donde la pobreza es más aguda, es el alimento principal, casi el único (Novelo V., García A., 1987).

Para la elaboración de la tortilla en México, dentro del contexto de tradición y cultura en los primeros quince días de agosto, se reserva la mayor cantidad de mazorcas para que sigan madurando, y así obtener la mazorca, cuyo principal uso es la preparación de masa para tortillas, lo cual es posible hasta la cosecha en noviembre; se trata de maíces del grupo cónico, con variedades de color amarillo, blanco, azul, pinto, rojo y el cacahuazintle blanco. En el primer caso, de acuerdo con el color del

grano, las variedades son el azul, destinado a la elaboración de tortilla; el blanco a la de tortillas y tamales, y el pinto para tortillas y atole (Rodríguez T., Chávez M., Thome H., Miranda G., 2017).

El nombre científico del maíz es *Zea mays* (Figura 1). La planta es anual, su rápido crecimiento le permite alcanzar hasta 2.5 m de altura, con un tallo erguido, rígido y sólido (Moreno J., 1986). Es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las mazorcas tiernas de maíz dulce son un manjar refinado que se consume de muchas formas. Las mazorcas verdes de maíz común también son usadas en gran escala, asadas y hervidas, o consumidas en estado de pasta blanda en numerosos países. La mayoría de los investigadores creen que el cereal se desarrolló a partir del teosinte, pariente más cercano al maíz. Otros creen, en cambio, que se originó a partir de un maíz silvestre, hoy en día desaparecido (Serna S., y col 1990).

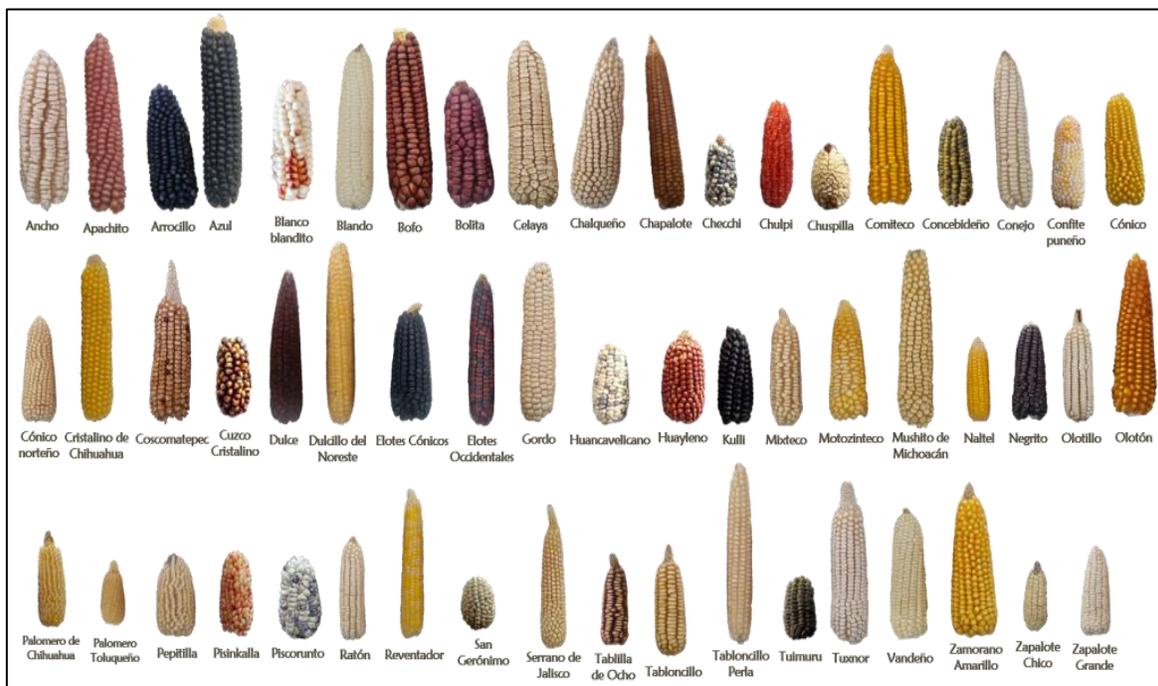


Fig. 1. Variedades de los distintos tipos de maíz.¹⁴

4.1.4 Importancia del maíz en México.

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México, tanto desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. La Figura 2, presenta el análisis del maíz en relación con los demás cereales que se producen en México, trigo, sorgo, cebada, arroz palay y avena. En cuanto a la evolución del volumen de la producción de maíz la tasa media anual de crecimiento de 1996 a 2006 fue de 2.0% (Galarza J. 2012).

México se posiciona entre el quinto y séptimo lugar como productor de maíz a nivel global (FAO, 2009).

ANO	MAIZ	TRIGO	SORGO	CEBADA	ARROZ PALAY	AVENA
1996	18,026.0	3,375.0	6,809.5	585.8	394.1	121.5
1997	17,656.3	3,656.6	5,711.6	470.7	469.5	96.5
1998	18,456.4	3,235.1	6,474.8	410.8	458.1	88.8
1999	17,708.2	3,020.9	5,720.3	454.1	326.5	133.1
2000	17,559.0	3,493.2	5,842.3	712.6	351.4	32.5
2001	20,134.3	3,275.5	6,566.5	761.6	226.6	88.9
2002	19,299.1	3,236.2	5,205.9	736.6	227.2	60.1
2003	20,703.1	2,715.8	6,759.1	1,081.6	273.3	94.1
2004	21,689.0	2,321.2	7,004.4	931.5	278.5	98.9
2005	19,341.1	3,015.2	5,524.4	760.7	291.1	127.1
2006	21,962.6	3,249.0	5,504.3	856.6	331.6	130.3
TMAC	2.0	-0.4	-2.1	3.9	-1.7	0.7

Fig. 2. Tasa media anual de crecimiento en % de la producción nacional de los principales cereales 1996-2006.²³

4.1.5 Granos del maíz.

El grano de maíz se denomina cariósipide o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla, conformada a la vez por el endospermo y el germen. Al endospermo, la

parte de mayor tamaño, corresponde cerca del 83% del peso del grano, en tanto que el germen equivale en promedio al 11% y el pericarpio al 5% (Serna-Saldívar, 1996).

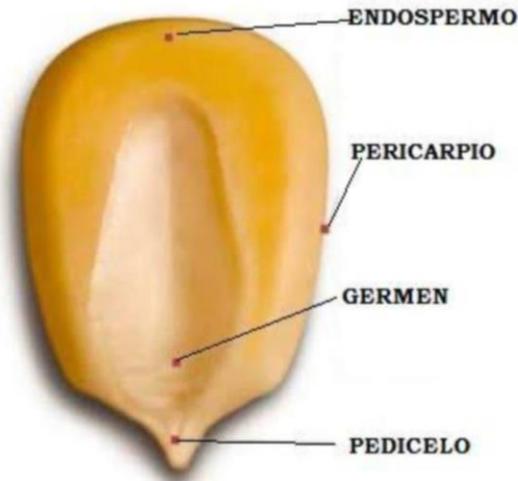


Fig. 3. Estructura del grano de maíz. ⁵⁵

El grano tiene cuatro estructuras físicas fundamentales: endospermo, germen, pericarpio, pedicelo o pilorriza (FAO, 1993), como se observa en la Figura 3. El pericarpio resiste la penetración del agua y protege al grano, está compuesto principalmente de cenizas, fibra y aceite, almidón y proteína, azúcares, vitaminas y minerales. La aleurona es una sola capa de células localizadas inmediatamente bajo el pericarpio, que contiene grandes cantidades de aceites, proteínas, minerales, cenizas, vitaminas y enzimas. La composición del maíz varía y se ve afectada por su genética y el ambiente (Almeida H., Rooney R., 1995).

La calidad del grano de maíz está asociada tanto con su constitución física, que determina la textura y dureza, como con su composición química, que define el valor nutrimental y las propiedades tecnológicas. La importancia relativa de estas características dependerá del destino final de la producción.

En forma general el grano de maíz presenta la composición química y estructural mostrada en la Tabla 1. El endospermo está en su mayor parte compuesto por almidón con algunas proteínas y trazas de grasas. La mayor parte de las grasas están contenidas en el germen, que además tiene un alto contenido proteico. La mayor parte de los azúcares están almacenados también en el germen (Paliwal et al., 2001).

Tabla 1. Composición de las distintas partes de maíz, en %.

Composición (%)	Endospermo	Germen	Pericarpio	Pedicelo
Almidón	87.6	8.3	7.3	5.3
Grasas	0.8	33.2	1.0	3.8
Proteínas	8.0	18.4	3.7	9.1
Cenizas	0.3	10.5	0.8	1.6
Azúcares	0.6	10.8	0.3	1.6
Resto	2.7	18.8	86.9	78.6
% de materia seca	83.0	11.0	5.2	0.8

4.2 Nixtamalización.

El término nixtamalización es de origen azteca, y se refiere al remojo y cocimiento del maíz en una solución de cal, para posteriormente molerlo y obtener la masa. Este cocimiento alcalino es realizado en México y en Centroamérica en forma artesanal para la producción de masa para hacer tortillas. Causa en el grano de maíz cambios físicos, químicos y reológicos que afectan la calidad de la masa y la tortilla (Roque L., Arámbula G., López M., Ortiz H., Carballo A., Herrera A., 2016).

EL proceso, consiste en el cocimiento del grano de maíz en una solución alcalina a temperaturas que oscilan los 80-100 °C por 30-45 minutos, para posteriormente dejar en reposo el grano en soluciones acuosas de hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, por tiempos largos de 8-24 horas. La solución de cocción o nejayote es drenada y el grano es lavado con agua, posteriormente el grano nixtamalizado es sometido a una molienda y secado para la producción de harina para la elaboración de tortilla y productos derivados, Figura 4 (Serna S. 1998). En nuestro país el consumo de productos derivados del maíz nixtamalizado es de aproximadamente 300 g per cápita diario en promedio (INEGI, 2005).

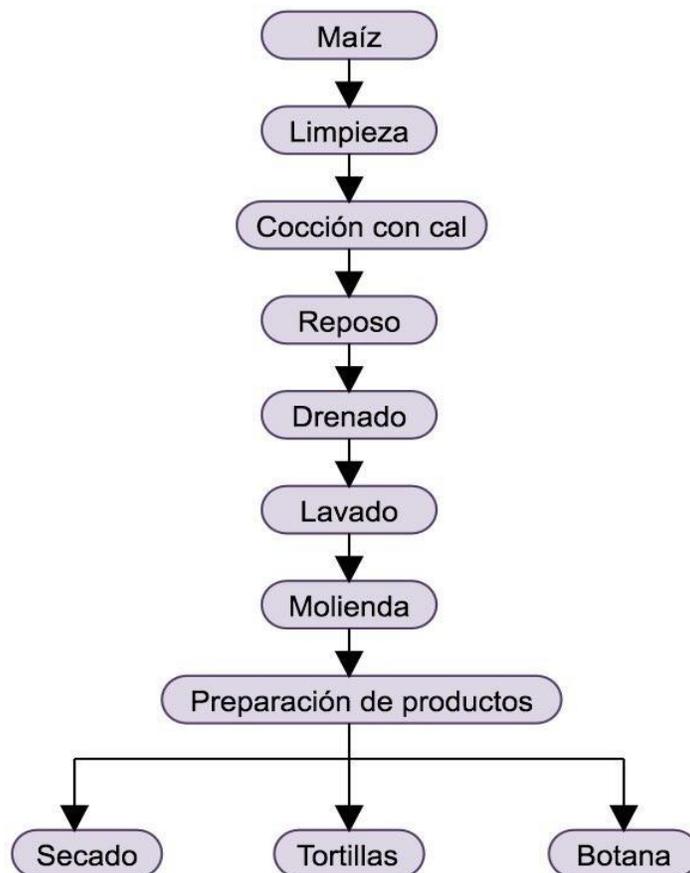


Fig. 4. Proceso industrial de maíz para obtener harina de maíz nixtamalizada.

4.2.1 Cambios en la nixtamalización.

En la etapa de nixtamalización el maíz se cuece parcialmente, lo que ocasiona una absorción de agua limitada, el debilitamiento de la estructura del endospermo y se restringe la hidratación de los gránulos de almidón con lo que se limita la lixiviación de la amilosa. Después, el grano semi cocido se deja reposar durante un tiempo breve que hace que la redistribución y la retrogradación se limiten si se compara con la masa fresca obtenida mediante este mismo proceso. La nixtamalización provoca que la estructura que une las células del endospermo, llamada lámina media, y las paredes celulares se degraden y se solubiliza parcialmente lo que permite que la calidad de la proteína de los productos de la masa no se vea afectada. Otro aspecto sobresaliente es que la membrana semipermeable que está alrededor del grano, denominada aleurona, permanece sobre el mismo durante este tratamiento, lo que minimiza la pérdida de nutrientes hacia el nejayote por el fenómeno llamado lixiviación (Gómez et al., 1990).

4.2.3 Nixtamalización y su efecto en maíces pigmentados.

La elaboración de productos nixtamalizados de maíces pigmentados es un proceso agresivo para los compuestos fenólicos principalmente las antocianinas ya que provoca pérdidas de estos compuestos en los productos obtenidos por esta tecnología. La estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la presencia de luz, oxígeno, pH, presencia de iones metálicos (Ca^{2+}) y de la temperatura (Bordignon et al., 2007), y por ello los maíces que contienen estas biomoléculas son difíciles de procesar. Este proceso reduce significativamente el contenido de antocianinas en los maíces pigmentados, pérdida que se debe a que

gran cantidad de estos compuestos se solubilizan en el agua de cocción con pH elevado y temperatura extrema, lo que degrada a los compuestos. Además, otras estructuras químicas derivadas de los polifenoles son afectadas por el rompimiento de enlaces éster, y como consecuencia se liberan los fenoles a la solución de cocimiento. La mayor parte de estos compuestos se encuentran en el pericarpio del grano, y son eliminados durante el lavado del nixtamal (ParraC. et al., 2007).

En un estudio se evaluó el efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas, en variedades de granos de maíz de colores rojo y azul. Los autores reportaron que los maíces con pigmentos en el pericarpio presentaron mayores pérdidas (73 y 100%), en contraste con los granos con pigmentos ubicados en la capa de aleurona que perdieron entre 19.5 y 50.2%, posiblemente por el efecto de protección del pericarpio a la capa de aleurona la cual mostró escaso daño. Además, los autores registraron un incremento en el contenido de cianidina 3-glucósido en harinas nixtamalizadas de maíz azul, y un cambio en el perfil de antocianinas de maíces de ambos colores, por una degradación de compuestos acilados que da lugar a la formación de nuevas estructuras químicas como antocianinas simples (Salinas et al., 2003). También describieron una pérdida de antocianinas durante el procesamiento del grano a masa (83 %) y tortilla (64 %) (Salinas et al., 2007). Por otra parte, se evaluaron el efecto de la nixtamalización sobre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante en tortillas elaboradas con maíz blanco, azul, rojo y morado. Estos autores encontraron una disminución en el contenido de antocianinas y fenoles debido al tratamiento térmico alcalino. Sin embargo, la masa y tortilla del maíz morado presentaron una mayor capacidad antioxidante, lo que atribuyen al elevado contenido de antocianinas y fenoles presentes en esta variedad de maíz,

demostrando así que la pérdida de antocianinas está relacionada con la variedad de maíz utilizada (López et al. 2011).

4.3 Tortilla.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, la tortilla se define como: producto elaborado con masa que puede ser mezclada con ingredientes opcionales, sometida a cocción.

La tortilla es un alimento de forma circular aplanada de 10 a 30 cm de diámetro y 0.2 a 0.6 cm de grosor, se elabora a partir de diferentes tipos de maíz. Es considerada como un alimento de primera necesidad para el 94% de la población mexicana, principalmente en las zonas rurales, donde su consumo es de 328 g diarios per cápita y provee el 70% del total de calorías, cerca de 50% de proteína y 49% del calcio (Novelo y García, 1987).

Generalmente en México, en el norte se prefiere el maíz blanco y en el sur el maíz amarillo para la elaboración de tortillas (Torres y Morales, 1997), aunque en algunas regiones también se utiliza maíz negro, morado, azul o rojo (Iturriaga, 1987). La tortilla aporta el 59% de la energía (1,363 kcal) y el 39% de las proteínas (29 g) de la ingesta diaria de los mexicanos. El consumo anual aparente per cápita es de 120 kg, esto es 328 g/día. En el Estado de Veracruz el cereal que más se consume es el maíz, principalmente en forma de tortillas (7 días/semana) (Verdalet et al., 2001).

4.3.1 Tortilla de color azul.

Son elaboradas con maíces de grano azul o rojo. En la tabla 2, se muestra la composición química de tortillas elaboradas de maíz blanco, amarillo y azul (Gutiérrez et al., 2008). La tortilla de maíz azul contiene un mayor porcentaje de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los datos pueden variar con respecto a las condiciones de procesamiento para la elaboración de la tortilla.

Tabla 2. Composición química de tres tipos de tortilla de maíz.

Contenido por 100 g	Tortilla de maíz blanco.	Tortilla de maíz amarilla.	Tortilla de maíz azul.
Humedad	42.4	47.5	47.5
Carbohidratos (g)	47.2	45.3	54
Proteína (g)	5.9	4.6	4.9
Lípidos (g)	1.5	1.8	2.7
Fibra (%)	4.4	2.0	2.0
Energía (cal)	224	214	259

4.3.2 El color en los diferentes tipos de tortillas.

Existen estudios nutrimentales de tortillas elaboradas con maíz blanco, amarillo y azul (Figura 5), sin embargo, hay pocos estudios sobre las tortillas de maíz azul desde el punto de vista biológico *in vitro*. Actualmente existe el interés por el estudio, desarrollo y producción de alimentos de maíces pigmentados debido a sus compuestos

fotoquímicos y a la obtención de productos con valor agregado, como es la tortilla de maíz azul.



Fig. 5. Diferentes tipos de tortilla de maíz. ⁴⁶

4.3.3 Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) Figura 6.

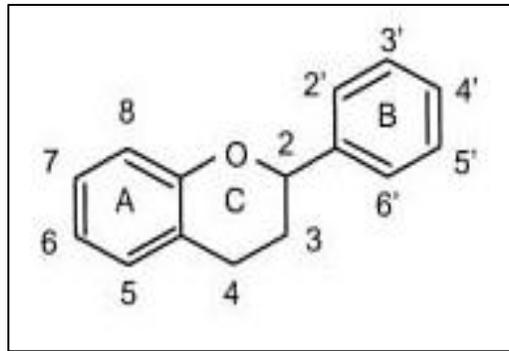


Fig. 6. Estructura del Flavonoide.⁴

Se han realizado estudios químicos-estructurales que han llevado al aislamiento y determinación estructural de flavonoides. Recientemente, un examen químico realizado con la resina de *Heliotropium sinuatum* permitió el aislamiento de ocho flavonoides (Torres R. y col 1996)

Dado que varios tipos de flavonoides son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos, se han hecho estudios de la actividad antibacteriana de los flavonoides con microorganismo de prueba y buscando encontrar una correlación entre el tipo de flavonoide y la actividad que presenta (Tomás-Barberán F. (1988); Cuadra P. (1994)).

4.3.4 Las antocianinas.

Representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (Strack y Wray, 1994). Las antocianinas (del griego anthos, flor y kyanos, azul) son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza, (Badui, 1993). Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan

desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales (Wagner, 1982). Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana.

Al igual que los flavonoides, el aglicón está formado por un esqueleto consistente en dos anillos bencénicos (A y B) y uno heterocíclico con oxígeno (C). El núcleo central flavilio constituye la antocianidina, que unida a la fracción azúcar, forma las antocianinas (Figura 3). (Badui, 1993)

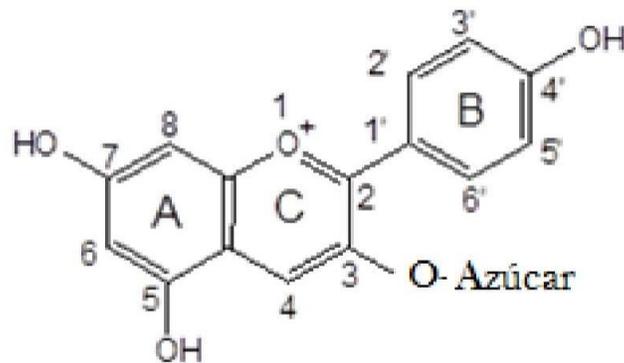


Fig. 7. Estructura de la antocianina.⁴

Se conocen aproximadamente 20 antocianidinas, las más importantes son pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez (figura 8), (Badui, 1993).

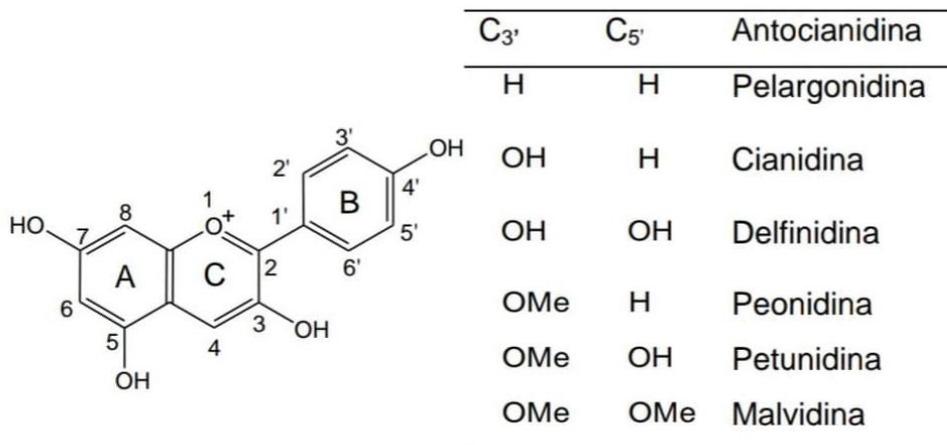


Fig. 8. Representación de las antocianinas. ⁴

4.3.5 Efecto de la temperatura en las antocianinas.

El efecto de la temperatura en la estabilidad de antocianinas es que los pigmentos antociánicos son notoriamente destruidos por el calor durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, existe un incremento logarítmico con un incremento aritmético de la temperatura (Badui, 1993). Así mismo el aumento de la temperatura resulta en una pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980).

4.3.6 Alimentos funcionales.

Un alimento es funcional si contiene un componente alimenticio (sea un nutriente o no) con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican que puedan reivindicarse que es funcional (fisiológico) o incluso saludable. Una reivindicación

funcional se refiere a las consecuencias positivas derivadas de las interacciones entre un componente de un alimento y las funciones genómicas, bioquímicas, celulares o fisiológica específicas, sin referencia directa a ningún efecto sobre la salud o la prevención de enfermedades (Robertfroid, 1998).

4.3.7 Tostadas de maíz.

Se denomina de esta forma la tortilla de harina de maíz nixtamalizado que se introduce en un horno en el cual por unos minutos logra tostar la tortilla, pero esta no lleva nada de grasa, es más natural, no cambia mucho de color, solo su textura y es crujiente. La NOM-187-SSA1/SCFI-2002 define a la tostada comal producto elaborado a partir de tortilla o masa que puede ser mezclada con ingredientes opcionales, sometido a un proceso de horneado, freído, deshidratado o cualquier otro, hasta obtener una consistencia rígida y crujiente.

4.4 Trigo.

Desde la antigüedad el trigo ha sido importante para la alimentación humana, íntimamente relacionada a la domesticación del trigo y cebada. Esta importancia se ha mantenido hasta el presente constituyendo uno de los cultivos de mayor producción representando un tercio de la producción mundial de cereales. Se cultivan dos tipos de trigo: el trigo blando o harinero (*T. aestivum*) y el trigo duro (*T. turgidum*), usados para la fabricación de pan en el caso del trigo harinero y de pasta del trigo duro (Álvarez ,2000).

Los tipos de trigo, de conformidad con sus características, los da a conocer el doctor Serna Saldívar y son los siguientes:

Durum o cristalino: Se trata de trigos tetraploides con endospermo vítreo, generalmente de color amarillo, utilizados para la producción industrial de pastas largas y cortas (sopas). Contienen 10-14 por ciento de proteína.

Duro o panadero: Es trigo de mejor calidad para procesos de panificación. Contiene de un 10.5 a un 14.5 por ciento de proteína, y produce un gluten tenaz y elástico. Dentro de esta categoría, existen de pericarpio rojo y blanco, y de hábito invernal y primaveral.

Suave o galletero: Es trigo que tiene un endospermo suave, con bajo contenido de proteína. Es el preferido para elaborar galletas, pasteles y productos afines, leudados con agentes químicos.

Ceroso: Este trigo tiene más de 95 % de amilopectina en su almidón. Es el trigo preferido para la elaboración de tallarines o fideos orientales.

Suelta: Es el trigo resultante de la hibridación del trigo Einkorn y Emmer. Se siembra en pequeñas áreas de Turquía, y es considerado un trigo silvestre.

Einkorn: Es el trigo ancestral, que dio origen al trigo común o spelta.

4.4.1 Composición del grano de trigo.

El grano de trigo se compone de varios tejidos, los cuales se esquematizan en la Figura 9. El germen o embrión, es el órgano reproductivo y de almacenamiento, representa entre 2 % y 3 % del peso del grano. El endospermo, principal fuente de energía durante la germinación, es la parte anatómica más abundante (81 % a 84 % del peso del grano). El pericarpio (salvado) está constituido por un conjunto

de capas que protegen al grano y comprende entre 14 % y 16 % del peso de este último (Corke H., 2004).

El endospermo es extraído mediante molienda para la obtención de harina y semolina, que son utilizadas en las industrias de panificación, galletería y pastas, mientras que el germen y el pericarpio se recuperan como subproductos (Nandini C. y Salimath P., (2001); Dexter J. y Sarkar A., (2004); Stevenson L. y col., (2012)). Solamente un 10 % del salvado producido se destina a la alimentación humana, principalmente como fuente de fibra en pan, galletas, cereales y otros (Hossain K. y col., (2013); Prückler M. y col., (2014)); el resto se dirige a la alimentación animal (Javed M. y col., (2012); Heuzé V. y col., (2013); Reisinger M. y col., (2014)).

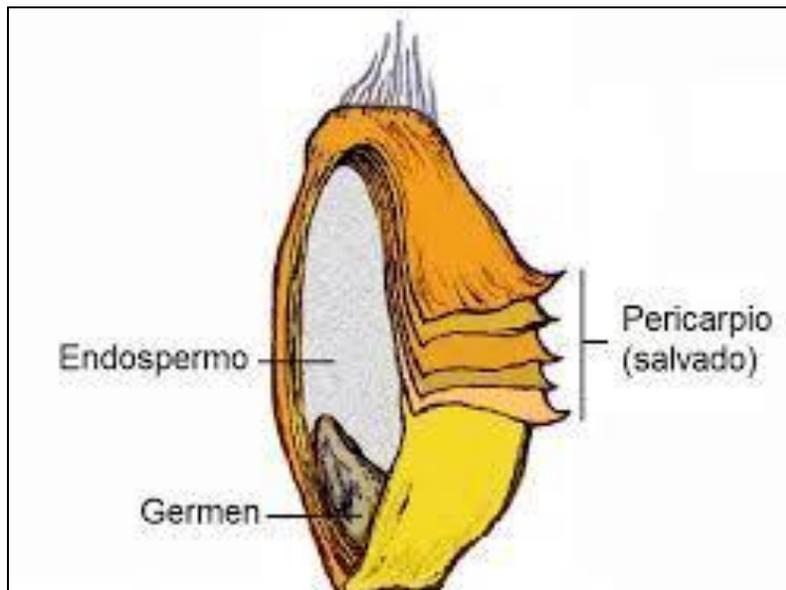


Fig. 9. Estructura del grano de trigo.⁵

4.4.2 Harina de trigo.

En efecto, el trigo es por lo general transformado en harina, la cual se destina a la elaboración de pan, galletas, pasteles, tortillas (las tradicionales tortillas de harina), pastas para sopas y una amplia gama de otros productos. Los estudiosos señalan que uno de los elementos más importantes del trigo es la proteína que se encuentra en el gluten. A su vez, es uno de los elementos fundamentales para la elaboración del pan.

La harina se utiliza para la elaboración de una gran variedad de alimentos, destacando los productos de la panificación. Por otro lado, el salvado se destina en su mayor parte a la alimentación animal (Heuzé V. y col., 2013) y tradicionalmente ha recibido menor atención en lo que respecta a sus propiedades nutrimentales, fitoquímicas y funcionales, por lo que su utilización para consumo humano se ha basado en aplicaciones específicas, apreciándose principalmente por su alto contenido de fibra insoluble (Prückler M. y col., 2014).

4.4.3 Tortillas de harina de trigo.

El consumo de tortillas de harina de trigo (Figura 10), se ha incrementado ampliamente, sobre todo en la parte Norte de México y sur de los Estados Unidos; se ha mostrado también un crecimiento de su comercialización (Serna S., 1988).

Las tortillas de harina de trigo se han preparado tradicionalmente de manera doméstica. El desarrollo de la tecnología de producción a nivel industrial se ha basado en los procesos domésticos. Se considera importante la utilización de diferentes tipos de harina de trigo para la

elaboración de tortillas ya que existen harinas para usos específicos y estas presentan características particulares, con las que se pueden evaluar distintos cambios químicos, reológicos y sensoriales (Bello., 1991).



Fig. 10. Tortillas de harina de trigo. (*Lugardo J.*)

Para que las tortillas de harina tengan buena calidad, debe de provenir de una buena harina, ya que la harina con bajo contenido de gluten produce tortillas poco flexibles y frágiles (García A., 1988).

4.5 Pan de trigo Integral.

Parece que fue en Egipto donde apareció el primer pan fermentado, cuando se observó que la masa elaborada el día anterior producía burbujas de aire y aumentaba su volumen, y que, añadida a la masa de harina nueva, daba un pan más ligero y de mejor gusto (3000 años a. de J.C.).

El pan es un producto obtenido por la cocción, de una masa fermentada con diferente proceso de elaboración (Alcázar J, 2002.). Entre los principales está el amasado y fermentado. Al añadir agua a la harina de trigo, se forma una masa por hidratación de las proteínas del gluten (gliadina y gluteina) las cuales le otorgan viscosidad, elasticidad y

cohesividad (Coultrate T., 2007). La fermentación se lleva a cabo por la respiración aerobia de la levadura la cual tiene dos funciones: favorecer la maduración de la masa y producir gas para airear la masa y el pan (Quaglia, G. 1991).

Parte del agua es retenida también por gránulos de almidón dañado, las propiedades visco elásticas de la masa dependen de la fracción glutenina, que es capaz de formar una extensa red tridimensional (Coultrate T.P, 2007).



Fig. 11. Pan integral de trigo (*Lugardo J.*)

4.6 Proceso de carbonización.

Durante la carbonización la biomasa se degrada y se producen fracciones sólidas, líquidas y gaseosas. Las reacciones que se llevan a cabo en este proceso son: hidrólisis, deshidratación, descarboxilación, polimerización y aromatización. Si bien, la hidrólisis es la reacción predominante en este proceso, las reacciones no tienen un orden determinado, ya que suceden al mismo tiempo y de manera interconectada entre ellas (Funken et al. 2009; Lucian et al. 2017).

Debido a que la hidrólisis es la reacción con más baja energía de activación, es la primera en llevarse a cabo. Reacciones de deshidratación ocurren igualmente en la matriz, eliminando los grupos funcionales hidroxilo en forma de agua. Los grupos carboxilo son eliminados en forma de CO₂ por medio de descarboxilación. Debido a que los grupos funcionales hidroxilo y carboxilo son reemplazados por grupos carbonilo y alqueno por las dos reacciones mencionadas anteriormente (deshidratación y descarboxilación (Fang et al. 2017)

La carbonización hidrotérmica se clasifica habitualmente respecto a la temperatura. El proceso a alta temperatura se lleva a cabo de 300 a 800 °C, a esta temperatura se producen nanotubos de carbono y materiales a base de grafito. En cambio, en el proceso a baja temperatura (180°C a 250 °C), se realizan reacciones de deshidratación y polimerización del material, que dan como resultado materiales carbonosos funcionalizados (Liu, C.et al. 2010).

4.7 La tortilla en relación con la amebiasis.

En el artículo de "Medicina Tradicional Mexicana-UNAM" hace mención de que la civilización tlahuica que habitó el altiplano central de México en el siglo XIII, actualmente lo que representa el estado de Morelos, consumía tortilla quemada para aliviar el dolor de estómago y empacho. Otro artículo que se consultó fue el de "Medicina Tradicional en comunidades negras de la Costa Chica, Oaxaca-PROTECCIÓN Y CURA" menciona un remedio con dos tortillas quemadas licuadas y hervidas con una raja de canela y brasas en té para el empacho. A pesar de no encontrar artículos científicos ni referencias bibliográficas que afirman

este hecho, se encontraron muchos remedios caseros que involucran consumir "tortilla quemada".

4.8 Amebiasis y *Entamoeba histolytica*.

4.8.1 La amebiasis

Es una enfermedad parasitaria del ser humano causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Este parásito se establece en el intestino grueso, donde se puede comportar como un comensal inofensivo o, por el contrario, invadir la mucosa intestinal y causar la destrucción del tejido (Saavedra E., Olivos A., 2017). La amebiasis se considera como una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo y constituye dentro de las enfermedades de origen parasitario, especialmente en el mundo en desarrollo, la tercera causa de muerte después de la malaria y la esquistosomiasis. No todas las infecciones con *E. histolytica* conducen a la enfermedad y sólo una de cada 10 infecciones progresan hacia la enfermedad (Chacín-Bonilla J., 2013).

4.8.2 Situación mundial.

De acuerdo con la "Asociación de Médicos de Sanidad Exterior. A.M.S.E". La amebiasis por *Entamoeba histolytica* es un parasitismo de amplia dispersión mundial y de elevada prevalencia. Es una de las pocas enfermedades, que por el contrario a lo que sucede en general, presenta una incidencia que puede estar subestimada, ya que es frecuente el diagnóstico de amebiasis por *Entamoeba histolytica* cuando en realidad lo detectado en las heces son amebas de otras especies no patógenas.

En los países no industrializados, la prevalencia de amebiasis está relacionada con la capacidad de disponer de fuentes de agua y saneamiento adecuado, ya que la transmisión se produce principalmente a través de contaminación de alimentos y de aguas fecales. En los países industrializados la prevalencia de amebiasis puede ser mayor en hombres que tienen sexo con hombres, viajeros, inmigrantes recientes, inmunocomprometidos y población institucionalizada. Se estima que existen unos 500 millones de parasitados en el mundo, y que se producen por su causa de 50.000 a 100.000 muertes anuales, debido a sus complicaciones. En México, por ejemplo, la tasa de incidencia de la amebiasis intestinal desde 1995 hasta 2000 fue de entre 1000 y 5000 casos entre 100 000 habitantes por año (A.M.S.E, 2012).

4.8.3 *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica (Figura 12), fue descubierta por Friedrich Lösch en 1873 en Rusia, quien la aisló de un paciente con disentería incluso, estableció la relación existente entre la enfermedad y el protozoario en perros infectados experimentalmente con quistes amebianos procedentes de humanos. En 1925 Boeck y Drbohlav fueron los primeros en cultivar exitosamente a *E. histolytica* usando el medio de suero-huevo de Locke. Otros medios frecuentemente utilizados para cultivar cepas patógenas fueron los descritos por Balamuth y Jones en 1946 (Romero C. 1993); en 1961 Diamond logró el primer cultivo axénico y, en 1978, Sargeant diferenció la variante patógena de *E. histolytica* de una no patógena mediante patrones electroforéticos de isoenzimas (Gómez J., Córtes J., Cuervo S., 2007).



Fig. 12. Trofozoito de *E. Histolytica* a 60x (Lugardo J.UME HGM, Lab patología).

Entamoeba histolytica es un organismo unicelular con ciclo de vida bifásico; es decir, presenta dos etapas biológicas en las cuales su forma es diferente. El trofozoíto representado en la Figura 12, comúnmente llamado ameba, que habita, se nutre y multiplica dentro del intestino del hospedero humano, y es capaz de destruir cualquier tipo de célula y casi cualquier tejido. La otra es el quiste, que asegura la persistencia del parásito en el ambiente externo y es la forma responsable de iniciar la infección en nuevos hospederos cuando los quistes son ingeridos al consumir agua o alimentos contaminados con ellos (Chávez B., González A., 2013).

4.8.4 Estructura del trofozoíto.

El trofozoíto (Figura 13), corresponde a la forma vegetativa, móvil, que emite pseudópodos a base de material protoplásmico locomotor y se encuentra en las materias fecales recién emitidas, es móvil, proliferativo e invasivo, con forma irregular. El citoplasma presenta dos zonas que no están separadas físicamente, pero sí bien diferenciadas: el ectoplasma y

el endoplasma. El ectoplasma es hialino y transparente, sin inclusiones. En la zona endoplasmática se encuentran: vacuolas, lisosomas, cisternas aplanadas semejantes a los sistemas de Golgi, y un sistema reticular membranoso similar a un retículo endoplásmico (Campos J., Monroy S., Villalba J., 2011). En el citoplasma se presentan numerosas vacuolas limitadas por una membrana que tiene características moleculares muy específicas para su función en el transporte de diversos materiales que se internalizan durante los mecanismos llamados fagocitosis (Chávez B., González A., 2017).

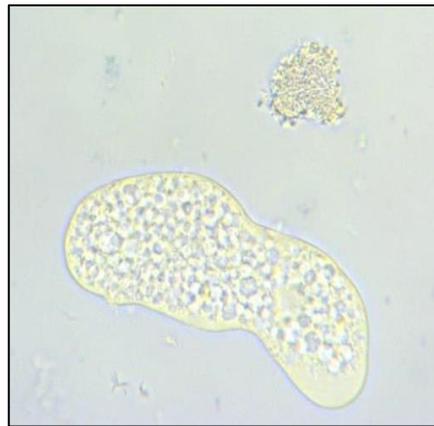


Fig. 13. Estructura de trofozoíto de *E. histolytica* a 60x (Lugardo J.UME HGM, Lab patología)

4.8.5 Estructura del quiste.

El quiste es una forma infectiva y de latencia, con estructura esférica u ovoide. Según su grado de madurez, presenta de uno a cuatro núcleos y una capa gruesa de quitina que le permite resistir a las condiciones adversas del ambiente y al pH ácido del estómago (Saavedra E., Olivos

A., 2017). Los quistes son completamente esféricos y miden de 10 a 20 micrómetros (Figura 14) (Chávez B., González A., 2017).

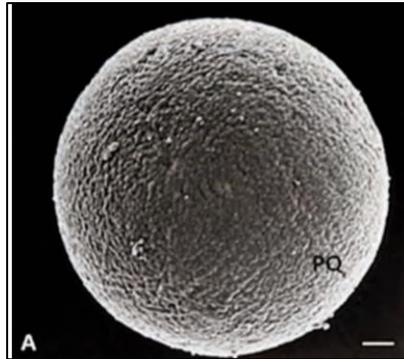


Fig. 14. Estructura del quiste de *E. histolytica*.⁹

4.8.6 Fagocitosis.

La fagocitosis de *Entamoeba histolytica* es el proceso que consiste en la ingestión de fragmentos celulares, células vivas, partículas inertes, y la típica ingestión de glóbulos rojos (eritrofagocitosis). En este proceso, la unión del parásito puede estar mediada por fuerzas electrostáticas, pero también existen mecanismos altamente específicos en los que intervienen moléculas de superficie, cistein proteasas, y componentes del citoesqueleto. Este proceso va acompañado por la formación de la fagolisosoma, dirigido por GTPasas y proteínas Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco (Campos J., Monroy S., Villalba J., 2011). Los pseudópodos participan en la captura de alimento mediante los mecanismos celulares conocidos como pinocitosis, para ingerir líquidos, y fagocitosis, para capturar sólidos (Gómez J., Córtes J., Cuervo S., 2007).

La fagocitosis es un proceso activo en *E. histolytica* que durante mucho tiempo se ha considerado un indicador de virulencia (eritrofagocitosis) (Huston C., 2003). Este proceso involucra la polimerización de la actina por un gran número de proteínas y contribuye al daño que realiza en el tejido este parásito (Hitara K., 2007). En múltiples organismos, la fagocitosis es el paso final en la vía de la apoptosis y sirve para limitar la inflamación, previniendo el derrame al medio del contenido intracelular tóxico de las células muertas. En *E. histolytica*, la ingestión de células muertas podría limitar igualmente la respuesta inflamatoria del huésped y permitir que este protozoo establezca una infección persistente (Huston C., 2003).

4.8.7 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

El ciclo de vida se inicia con la ingestión de un quiste infeccioso. Debido a su dura cubierta no es dañado, aunque si reblandecido, por la acción de los jugos gástrico y pancreático, lo cual permite su exquistación en el intestino grueso, donde puede desarrollar infección invasora o no hacerlo. Al romperse el quiste, el trofozoíto termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos (Haque R., y col. 2003). Si el trofozoito continúa avanzando por el colon, inicia su proceso de enquistación con la formación de un prequiste mononuclear, en el cual se inicia un proceso de división celular que da lugar a un quiste tetranuclear, en el cual termina el proceso de formación de la pared del quiste, el cual es expulsado con la materia fecal (Tanyuksel M. y col. 2003.). La estructura del quiste es muy resistente, sobre todo en climas húmedos, y puede infectar si es ingerido. El proceso del ciclo de vida lo apreciamos resumido en la Figura 15.

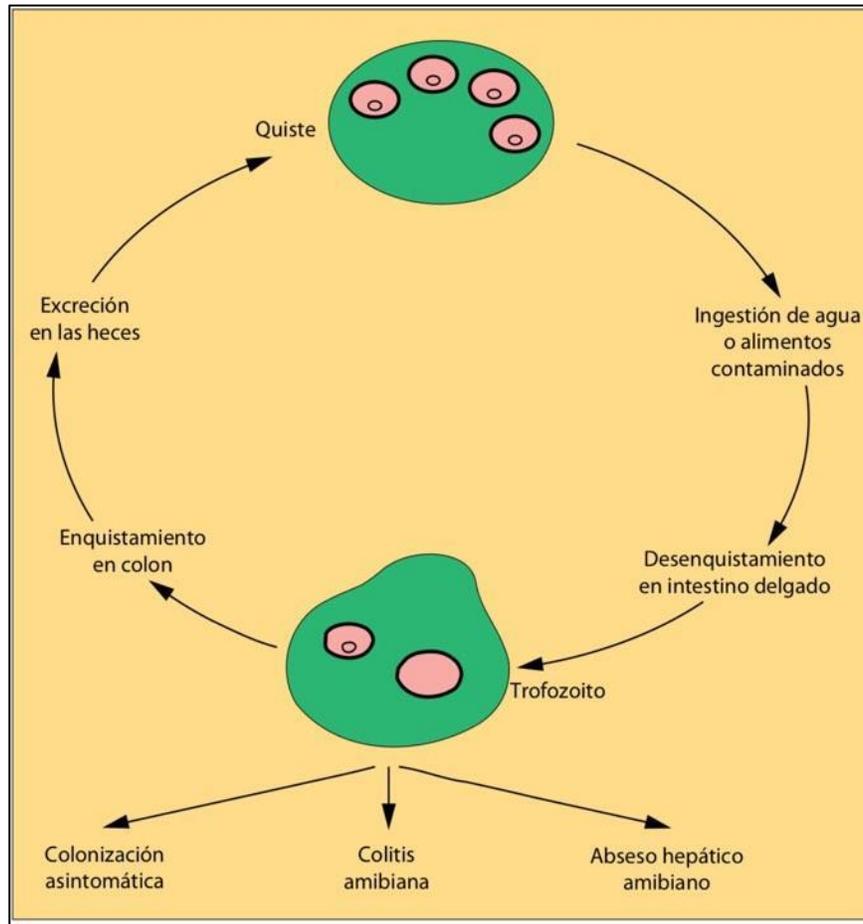


Fig. 15. Ciclo de vida de *E. histolytica*.⁴⁸

4.8.8 Epidemiología.

La amebiasis es una de las parasitosis más tempranamente reconocidas y universales (Petri WA., 2000). Los factores de riesgo en las naciones desarrolladas son: ser inmigrante de un país en vías de desarrollo, haber viajado a lugares del trópico, tener compromiso inmune, ser un hombre que tiene sexo con hombres. Vale la pena anotar que, actualmente, este último factor de riesgo puede deberse en parte a un sesgo por la búsqueda de la homosexualidad como factor de riesgo de muchas entidades, lo cual lleva a un enfoque que podría llegar a ser

discriminatorio (Meyer IH. 2002). Se estima en 50 millones el número de casos anuales, lo que resulta en 40 a 110 mil muertos por año. En México, la prevalencia es de 8,4%. La amebiasis puede transmitirse a través del consumo del agua, incluso en naciones desarrolladas, dado que no se usan marcadores parasitológicos para determinar la calidad pureza del agua; por lo tanto, en toda nación con amebiasis endémica pueden presentarse brotes de infección por consumo de agua contaminada (Moran P. y col., 2009).

4.8.9 Tratamiento.

Se recomienda tratar todos los casos de infección con *E. histolytica*. Cuando no es posible diferenciar esta ameba de otras morfológicamente iguales se recomienda no tratar a los casos asintomáticos. La selección y su vía de administración, se basa en la localización de los trofozoítos en la luz o pared intestinal o en tejidos extraintestinales. En caso de amebiasis intestinal sin disentería, se debe prescribir un antiamebiano no absorbible, como la diyodohidroxiquinoleina, que se administra tres veces al día durante una a tres semanas, o la paromicina, también tres veces al día durante 10 días; también puede usarse uno absorbible, como la nitazoxamida, que se usa una vez al día durante tres días (Petri WA, 2003).

El tratamiento depende del diagnóstico clínico. Éstos se suelen dividir en luminales, como las 8-hidroxiquinolinas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (teclozán, etofamida, quinfamida, etc.), o tisulares, como los nitroimidazoles (metronidazol, secnidazol, ornidazol). El metronidazol presenta una acción mixta, es decir, tanto luminal como tisular (Guerrant R., 2001; Haque R., 2003).

5. Metodología.

Para dicho proyecto se muestra el diagrama de bloques de la metodología empleada para llevar a cabo la coincubación de las células amebianas (*E. histolytica*) con las 7 diferentes tipos de muestras carbonizadas pulverizadas y la muestra pulverizada sin carbonizar. Figura 17.

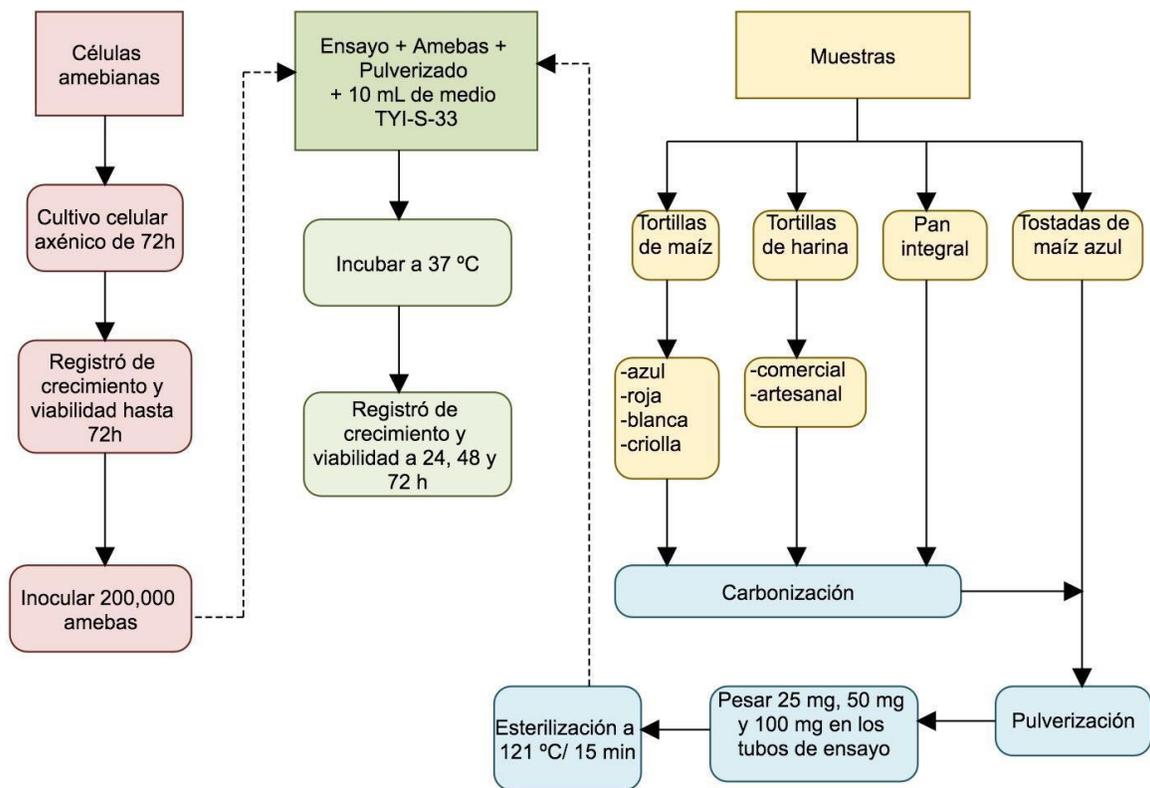


Fig. 16. Esquema de bloques para la estrategia experimental.

5.1 Descripción de la metodología.

a) Muestra.

Para las muestras utilizadas se obtuvieron 4 diferentes tortillas provenientes de maíz, azul, roja, blanca y criolla, se adquirió aproximadamente 600 g, en un mercado con la misma proveedora para evitar variación en su elaboración. Además de 2 diferentes tipos de tortilla de harina de trigo, una comercial y una artesanal, todas las tortillas se mantuvieron en refrigeración 2 días. Otra muestra fue el pan integral de trigo comercial y tostadas horneadas de maíz azul comercial, estas muestras permanecieron almacenadas sin refrigeración.

b) Preparación de las diferentes muestras.

Previamente se lavó el área de trabajo (campana de extracción, pinzas, mechero y el tripié) y se cubrió con aluminio la superficie interna de la campana. Las tortillas se pesaron en una balanza, después se colocó una por una en el tripié y debajo el mechero para proceder con el carbonizado. Al obtener las tortillas completamente carbonizadas, se pulverizó con un mortero de porcelana, todo el pulverizado obtenido se tamizó, con número de malla 60, es decir, con un tamaño de partícula de 0.25 mm. Posteriormente se pesó el pulverizado ya tamizado y se guardó en un frasco ámbar, este se mantuvo en refrigeración a una temperatura de -2°C hasta su posterior utilización en cada ensayo. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para el pan integral de trigo. Para la muestra de las tostadas horneadas de maíz azul solo se pulverizaron con el mortero.

c) Pesado y esterilización.

De las muestras previamente acondicionadas, se pesaron por separado en balanza analítica cantidades de 25 mg, 50 mg y 100 mg, directamente en tubos de ensayo con capacidad de 13 mL. Los tubos con la muestra ya pesada se esterilizaron a una temperatura de 121°C por 15 min.

d) Medio amebiano TYI-S-33 (Diamond et al, 1978).

Para la preparación del medio, se midieron 3.6L de agua en un recipiente y se pusieron en agitación, posteriormente se pesaron las cantidades de los siguientes compuestos y se agregó uno por uno hasta su disolución.

Compuesto.	Cantidad
Biosato	120g
Dextrosa	10g
K ₂ HPO ₄	4g
KH ₂ PO ₄	2.4g
NaCl	8g
Cisteína	4g
Ácido Ascórbico	8g
Fac	90mg

Una vez que todos los compuestos se disolvieron, se ajustó el pH a 6.8, el medio se dividió en contenedores de vidrio de 1 L con tapa de rosca y se sometieron a esterilización. Después se realizó prueba esterilización y

en la campana de esterilización se adicionaron vitaminas y 10 % de suero adulto bovino. Los contenedores de vidrio se etiquetaron y se mantuvieron en un cuarto frío a -2 °C hasta ser utilizados.

e) Acondicionamiento de caja para incubación de amebas.

En condiciones de esterilidad se adicionó 200, 000 amebas y se aforo a 45 mL con medio TYI-S-33 a una caja estéril con capacidad de 50 mL, la caja se mantuvo en incubación por 72 h, después del tiempo de crecimiento, la caja se revisó contraluz para verificar que fuera homogénea y con un microscopio invertido a 10 x con el cual se comprobó que estuviera libre de contaminación, para poder ser utilizada en los posteriores ensayos.

f) crecimiento amebiano.

Para estandarizar el crecimiento amebiano se realizaron tres ensayos por duplicado, referidos como control, con 10 mL de medio TYI-S-33 y 200,000 amb/ mL, partiendo de un cultivo previamente incubado a 72 h.

g) Previo al ensayo.

Se limpió con benzal la campana de esterilización, posteriormente se prendió la lámpara UV por 15 minutos, para asegurar el campo de esterilidad, y se usó un mechero para mantener una zona aséptica. Luego de una caja que contenía las amebas en medio amebiano axénico (TYI-S-33), previamente incubado por 72 h, se colocó en hielo durante 5 min con la finalidad de desprender los trofozoítos de la superficie interna, pasando el tiempo de enfriamiento se extrajo 1 mL para realizar por duplicado el conteo de amebas vivas y muertas, que se describe

más adelante. Con el total de amebas, se calculó la relación para conocer el volumen necesario para inocular el ensayo con 200,000 amebas/mL. (Se llevó a cabo el ensayo solo si la viabilidad era $\geq 90\%$).

h) Ensayo.

Cada ensayo estuvo constituido de un lote control y un lote experimental con las concentraciones de 25, 50 y 100 mg del carbonizado pulverizado de cada muestra y depositados en los tubos (todo por duplicado). Se adicionó el volumen conocido que contenía 200,000 amebas y se aforó a 10 mL con medio TYI-S-33. Se incubaron los tubos a una temperatura de 37°C con una inclinación aproximada de 15°, durante 72 h.

Control	200,000 amebas + 10 mL de medio amebiano.	
25 mg	200,000 amebas + 25 mg de carbonizado pulverizado de tortilla + 10 mL de medio amebiano.	
50 mg	200,000 amebas + 50 mg de carbonizado pulverizado de tortilla + 10 mL de medio amebiano.	
100 mg	200,000 amebas + 100 mg de carbonizado pulverizado de tortilla + 10mL de medio amebiano.	

Fig. 17. Tabla representativa de los ensayos para el monitoreo del efecto de diferentes muestras en coincubación con *Entamoeba histolytica*.

i) Conteo y registro.

Previamente los tubos que contenían los ensayos realizados en su lapso de incubación se colocaron en hielo 5 min, para después en condiciones de esterilidad, se extrajeron 800µL, de este volumen se tomó una alícuota de 50 µL y se adicionó a un microtubo de 0.5 mL, este a su vez

se mezcló con 50 μ L de azul de tripano al 0.4%, se resuspendió y se depositó en una cámara de Neubauer, después se observó en un microscopio fotónico con objetivo 10x y se contaron las células muertas y vivas en los 4 cuadrantes más grandes (encerrados en azul en la figura 19) de la cámara que contienen 16 casillas. Este procedimiento se realizó por duplicado y con un registro de crecimiento a las 24, 48 y 72h.

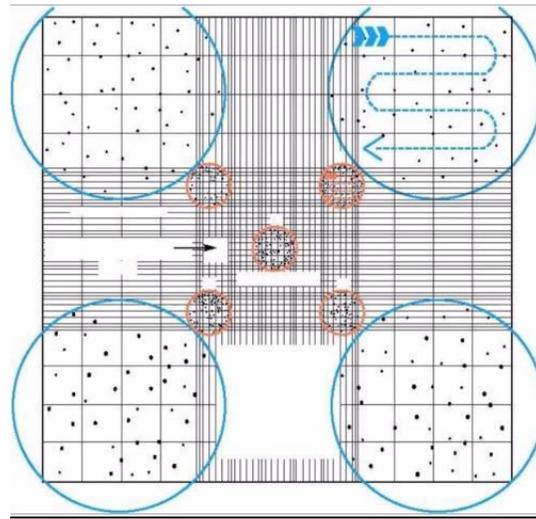


Figura 18. Representación de la cámara de Neubauer para llevar a cabo el proceso de conteo celular.

j) residuos peligrosos e infecciosos.

Al finalizar el conteo y registro de los tubos que contenían el ensayo con las amebas y las diferentes muestras, se les agregó jabón y se sometieron a esterilización para poder desecharlas en contenedores etiquetados como residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBIB).

5.2 Estadística empleada.

En el experimento cada ensayo estaba constituido de un total de ocho tubos, un tubo control y 3 tubos que contenían las tres distintas concentraciones (mg), cada uno por duplicado, de los cuales se realizaron 5 ensayos por muestra, es decir, de las gráficas posteriores cada barra será del promedio de 20 datos. Se utilizó la desviación estándar como estrategia estadística para verificar el trabajo experimental.

Para un análisis estadístico, se realizaron ANOVAS de un factor con una sola muestra por grupo en los tres tiempos de monitoreo (24, 48 y 72 h), para verificar si se presenta diferencia significativa en el efecto de inhibición, entre los diferentes tipos carbonizados pulverizados a partir de tortillas, además de comparar la diferencia entre las muestras de tortillas y en el efecto con la muestra de pan integral de trigo y la de tostada horneada de maíz azul.

Con los resultados de ANOVA, se llevó a cabo la prueba Tukey al presentarse diferencia significativa, para verificar en cuáles muestras utilizadas presentaron diferencia.

6. Resultados.

6.1 Preparación del carbonizado.

A continuación, se muestran una serie de fotografías, en donde se ilustra el desarrollo del acondicionamiento de las diferentes muestras de tortilla que se describe en la metodología.



Fig. 19. Carbonización de las tortillas por flama (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).

El proceso que se llevó a cabo para la carbonización de las 7 muestras en la campana de extracción se representa en la Figura 19.

La comparación de las muestras de tortillas de maíz y las tortillas carbonizadas, se ilustran desde en la Figura 20 hasta - Figura 23.



Figura 20. Comparación de tortillas azules y las tortillas azules carbonizadas (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).



Fig 21. Comparación de tortillas rojas y de tortillas rojas carbonizada (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).



Fig 22. Comparación de tortillas blancas y tortillas blancas carbonizadas (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).



Fig 23. Comparación de tortillas criollas y tortillas criollas carbonizadas (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).

La representación de la tortilla de harina de trigo comercial y la tortilla después de ser carbonizada se presenta en la Figura 24, la tortilla de harina artesanal se obtuvo de manera similar. En la Figura 25 se presenta el pan integral sin carbonizar y el pan después de haber sido carbonizado.



Fig 24. Comparación de tortillas de harina de trigo y tortillas de harina de trigo carbonizadas (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).

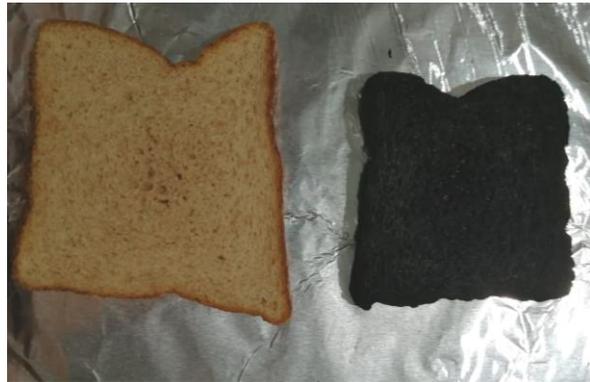


Fig 25. Comparación de pan integral y pan integral carbonizado (*Lugardo J.UME HGM, Lab patología*).

El resultado después de pulverizar con mortero las muestras carbonizadas se presenta en la Figura 26, posteriormente se presenta el pulverizado después de ser tamizado (Figura 27), se obtuvieron resultados similares después del tratamiento para todas las muestras que fueron carbonizadas.



Fig 26. Carbonizado y pulverizado de las muestras (Lugardo J.UME HGM, Lab patología).



Fig 27. Carbonizado, pulverizado y tamizado de las muestras (Lugardo J.UME HGM, Lab patología).

El pulverizado con mortero y tamizado a partir de la muestra de tostadas horneadas de maíz azul, se presenta en la figura 28.



Fig 28. Pulverizado y tamizado de la muestra (Lugardo J.UME HGM, Lab patología).

A Continuación se muestra el registro del peso inicial, el peso del pulverizado tamizado y el rendimiento de los diferentes tipos de muestras utilizadas en el proyecto, con los datos se obtiene que el rendimiento aproximado es de 11% después de someter las muestras al tratamiento para obtener el carbonizado pulverizado, la muestra no carbonizada presentó mayor rendimiento de 97.1 %, ya que al no ser carbonizada no pierde la humedad. Tabla 3.

Tabla 3. Pesos de los diferentes tipos de muestras y sus rendimientos obtenidos.

Muestras	Peso de las tortillas (g)	Peso del pulverizado tamizado (g)	Rendimiento (%)
Tortilla de maíz azul	587.0	67.5	11.5
Tortilla de maíz blanco	424.2	46.1	10.8
Tortilla de maíz rojo	654.5	74.2	11.1
Tortillas de maíz criollo	420.0	44.1	10.5
Tortillas de harina de trigo C	306.0	33.6	11.0
Tortillas de harina de trigo A	400.2	45.6	11.4
Pan integral de trigo	234.7	21.1	9.0
Tostadas de maíz azul	90.0	87.4	97.1

6.2 Crecimiento amebiano.

Después de llevar a cabo la elaboración del medio amebiano y cultivar las amebas en la caja acondicionada para su posterior utilización en los siguientes ensayos, se observaron las amebas (*Entamoeba histolytica*) en el medio de cultivo después de las 72 h de incubación para conocer las condiciones óptimas de crecimiento, ya que en este tiempo, las células presentan las mejores condiciones para ser coincubadas, de igual forma se observó por el microscopio para caracterizar su morfología.

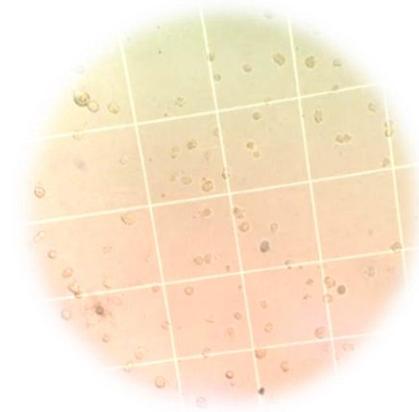


Fig 29. Trofozoitos de amebas (*Entamoeba histolytica*) previamente incubadas a 72 h, en cámara de Neubauer (Lugardo J.UME HGM, Lab patología).

Se consideró tener un antecedente del crecimiento amebiano, el cual debería seguirse con los ensayos incubados con las diferentes muestras utilizadas en el proyecto. Por lo que una vez obtenido el cultivo confluyente se realizó el crecimiento amebiano en las condiciones descritas en la metodología sin el uso de pulverizado, para la cual se realizaron tres ensayos por duplicado, referidos como control, partiendo del cultivo previamente incubado a 72 h.

Después de realizar la incubación de las amebas con el medio de cultivo se estandarizó el crecimiento amebiano axénico llevándose a cabo el conteo de las amebas con la cámara de Neubauer, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Promedio de tres ensayos control de crecimiento amebiano axénico.

Tiempo (h)	Amebas/mL
24	30,000
48	70,000
72	120,000

Una vez integrados los resultados en una tabla se realizó un gráfico para observar la tendencia de crecimiento en los tres diferentes tiempos de monitoreo.

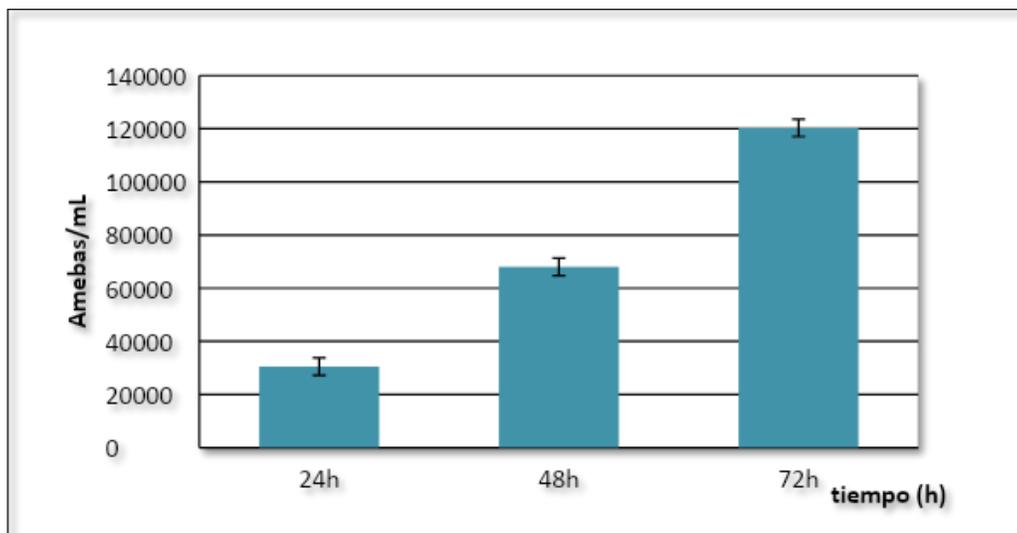


Gráfico 1. Crecimiento amebiano axénico.

Se obtuvo un sistema óptimo de crecimiento amebiano (Gráfica 1), en el cual la población amebiana presentó un crecimiento exponencial, donde pasando las 24h de incubación se obtuvo un registro promedio de 30,000 amebas/mL y a las 72h la población aumentó con una magnitud de 120,000 amb/mL.

Por otro lado, después de que se mantuvo un sistema de crecimiento celular amebiano óptimo de *Entamoeba histolytica*, se realizaron cinco ensayos en coincubación para cada una de las 7 muestras carbonizadas y pulverizadas y la muestra pulverizada sin carbonizar, los resultados se presentan a continuación.

6.3 Ensayos con diferentes tipos de muestras incubadas con amebas.

6.3.1 Tortilla de maíz azul.

La primera muestra de tortilla a partir de maíz, que se utilizó para coincubar las células amebianas, fue de carbonizado pulverizado de tortillas azules, ya que dentro de las variantes de tortillas de maíz que se consumen diariamente, la azul es muy típica. Además del interés de coincubar la muestra a partir de dicha tortilla por ser caracterizada con pigmentos azules debido a las antocianinas aún presentes después del proceso de nixtamalización del maíz. Los valores registrados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz azul.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	27490	17900	17900	16600
48	59480	37000	37690	37240
72	121500	55000	55600	57500

En los resultados se observa que a las 24 h la inhibición en las tres concentraciones es aproximadamente de 35 %, para el monitoreo de 48 h de 38% y para las 72 h la reducción aproximada resultó ser aproximada de 45 a 47%, los ensayos control se tomaron como 0% de inhibición de la población amebiana (Tabla 6).

Tabla 6. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas azules, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	34.8%	34.8%	35.6%
48	0%	37.7%	38.4%	38%
72	0%	45.27%	45.76%	47.32%

Para poder comparar la viabilidad en co-incubación con la muestra de tortillas azules y verificar el efecto que se presenta, en la tabla 7, se presentan los resultados con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas azules, se observa una disminución de la viabilidad en comparación con los ensayos control, ya que se presentó menor al 90%, la menor viabilidad obtenida fue de 82% en las concentraciones de 50 y 100 mg, a las 24 y 48 h respectivamente.

Tabla 7. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas azules.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	92.5%	88.0 %	82.0 %	87.5%
48	91.7%	87.0 %	85.0 %	82.0 %
72	95.0 %	89.0 %	87.5%	88.0 %

La fagocitosis es un proceso activo que presenta *E. histolytica*. Al realizar el conteo amebiano también se registró cuantas amebas fagocitarón con las tres concentraciones de carbonizado pulverizado, durante el monitoreo de los tres tiempos. La Tabla 8, muestra los resultados de la fagocitosis, a las 24h la fagocitosis resultó ser aproximada de 50% para las tres concentraciones, a mayor tiempo y mayor concentración de pulverizado carbonizado se observó un aumento de células fagocíticas, ya que a las 72 h se alcanzó fagocitosis de 97% con concentración de 100 mg.

Tabla 8. Registro de la fagocitosis amebiana expresada en porcentaje, con carbonizado pulverizado de tortillas azules.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	49.3%	50.1%	52.0 %
48	0%	62.5%	78.3%	86.6%
72	0%	83.3%	91.6%	97.0 %

Para corroborar los resultados se presentan microfotografías de los ensayos control contra los ensayos con el carbonizado pulverizado de tortillas azules, a las 72 h del monitoreo.

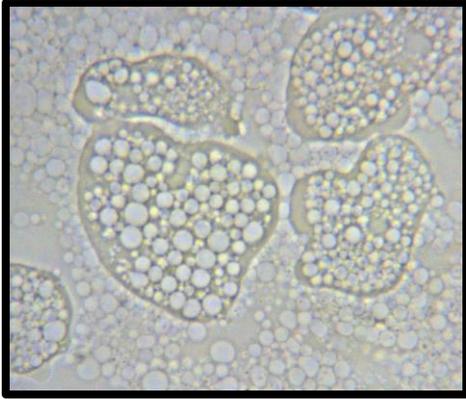


Fig 30. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 31. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla azul (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

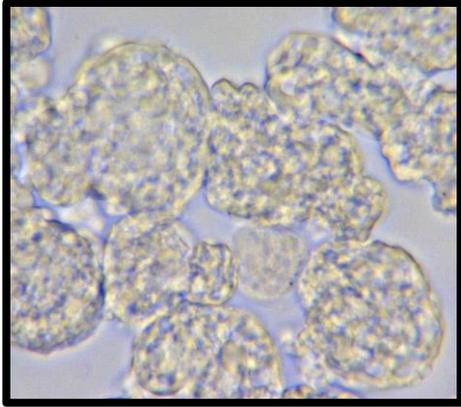


Fig 32. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 33. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla azul (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

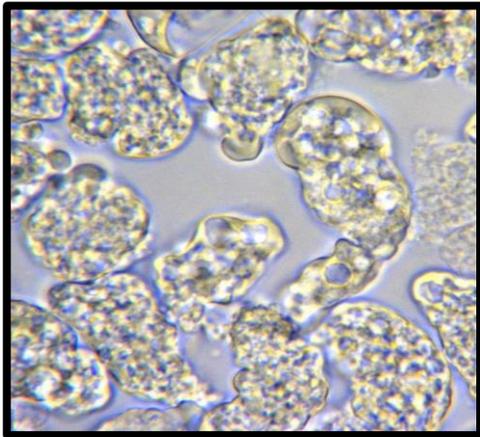


Fig 34. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 35. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla azul (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.2 Tortilla de maíz rojo.

La segunda muestra utilizada de tortillas de maíz rojo carbonizada y pulverizada, para dar seguimiento y observar el efecto con la pigmentación roja debido a las antocianinas presentes en el maíz con el que se elaboran las tortillas utilizadas en el proyecto, se siguieron las mismas condiciones que se describen anteriormente en la metodología, los resultados del conteo amebiano de los cinco ensayos realizados se registraron en la Tabla 9.

Tabla 9. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz rojo.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	28500	18000	18250	19000
48	58500	40500	40750	40750
72	112500	65000	65500	65250

Los datos obtenidos de los experimentos se representan en porcentaje la inhibición del crecimiento de la población amebiana en co-incubación con el carbonizado pulverizado de tortilla de maíz roja, desde las 24 h, hasta la culminación del monitoreo a las 72 h, tomando al control como 0%. La tabla 10, presenta los datos obtenidos en la inhibición amebiana, el porcentaje menor que se observa es en el tiempo de 48 h, aproximadamente se reduce un 39 % para las tres concentraciones, el mayor porcentaje de reducción poblacional es de 42.4 % a las 72 h con la concentración de 50mg de carbonizado pulverizado de tortilla roja.

Tabla 10. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas rojas, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	36.8%	36.0%	33.2%
48	0%	37.4%	39.6%	39.6%
72	0%	42.2%	42.4%	42.2%

La viabilidad en los tubos control resultó de 90-95%, a diferencia de los ensayos con muestra, la viabilidad fue en algunos casos menor a 90%, la menor viabilidad se presentó en la concentración de 50mg a las 72h de monitoreo resultando de 77.75% (Tabla 11).

Tabla 11. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas rojas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	95.0%	91.2%	81.5%	84.5%
48	90.0%	90.6%	86.4%	84.0%
72	90.0%	83.1%	77.7%	82.1%

Utilizando pulverizado de tortilla roja, se observó la presencia de la fagocitosis en células amebianas, siendo semejante a la que se observó en la tortilla azul, a mayor tiempo y mayor concentración de pulverizado la fagocitosis aumenta, en la Tabla 12, se presentan los resultados, a las

72 h la fagocitosis resultó de 89.75 a 98.75 % en las tres concentraciones establecidas.

Tabla 12. Registro de la fagocitosis amebiana expresada en porcentaje, con carbonizado pulverizado de tortillas rojas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	68.6%	59.6%	76.9%
48	0%	76.0 %	72.7%	79.6%
72	0%	89.7%	92.0%	98.7%

Se presentan microfotografías de los ensayos control contra los ensayos con el carbonizado pulverizado de tortillas rojas, a las 72 h del monitoreo.

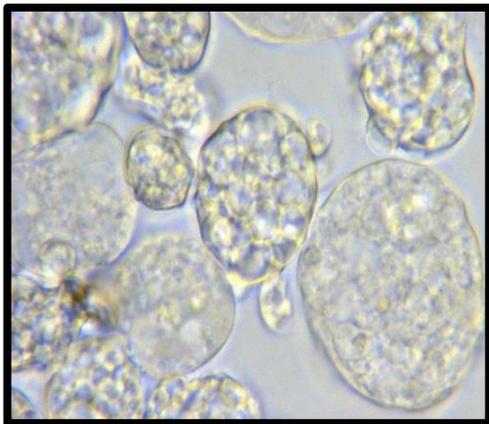


Fig 36. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

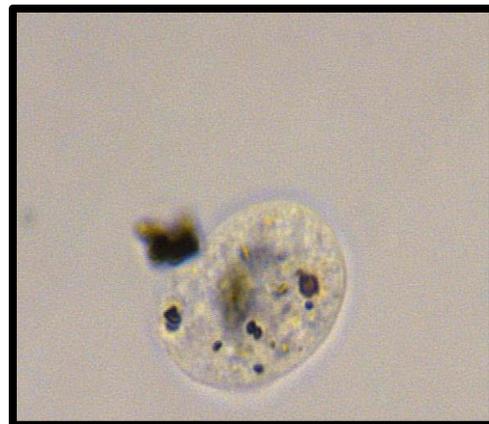


Fig 37. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla roja (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

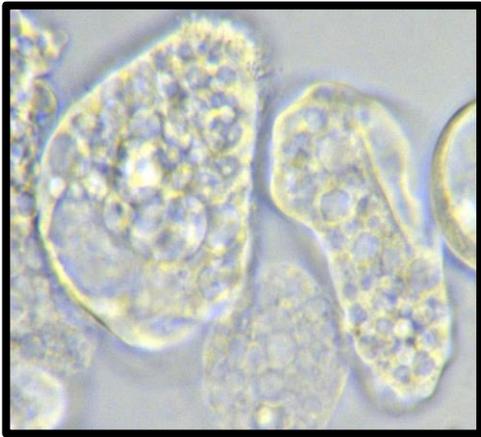


Fig 38. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

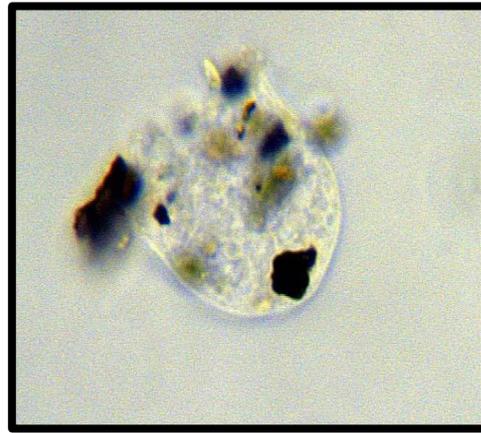


Fig 39. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla roja (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

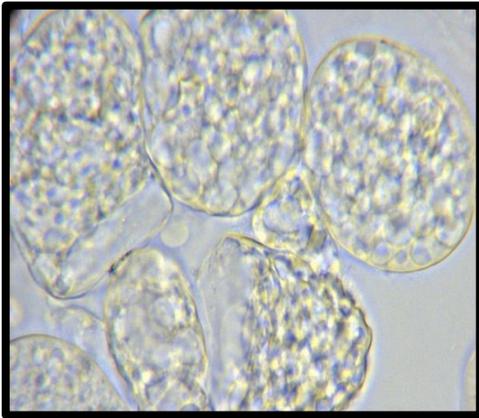


Fig 40. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

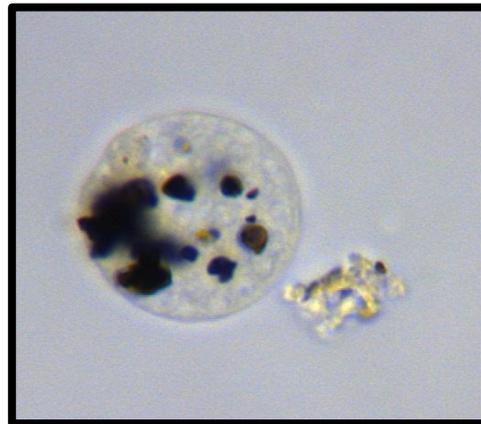


Fig 41. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla roja (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.3 Tortillas de maíz blanco.

La tercera muestra utilizada a partir de maíz fue la de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz blanco, al considerar que esta es carente de pigmentación proveniente de compuestos fenólicos, por lo tanto el efecto en la inhibición del crecimiento amebiano, al ser co-incubado con la muestra a partir de tortilla blanca se espera que resulte distinto, debido a la diferencia en la coloración. Los resultados del crecimiento durante las 72 h de monitoreo se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz blanco.

tiempo (h)	control	25 mg	50 mg	100 mg
24	27500	17500	16250	18750
48	57500	35000	33750	33750
72	112500	55000	52500	56250

La máxima inhibición de la población amebiana con carbonizado pulverizado de tortillas blancas, resultó de 50 a 51.8 % a las 72 h del monitoreo, este rango de inhibición incluye las tres diferentes concentraciones utilizadas. Tabla 14.

Tabla 14. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas blancas, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	42.9%	40.8%	39.5%
48	0%	50.9%	49.6%	48.0%
72	0%	50.3%	50.8%	51.8%

En cuanto a la viabilidad, los ensayos control se presentaron de 92 a 97% y los experimentos en co-incubación con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortilla blanca resultaron aproximadamente de 80 a 91% de viabilidad, la menor resultó de 85.28% en los ensayos de 100 mg a las 24h del tiempo registrado. Lo descrito se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas blancas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	97.1%	89.6%	80.0%	85.2%
48	96.0%	91.0%	90.2%	87.0%
72	92.0%	91.0%	91.0%	89.5%

Las células amebianas también fagocitan en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas de maíz blanco, a mayor tiempo y mayor concentración de pulverizado se obtuvo 97 % de fagocitosis amebiana.

Tabla 16. Registro de la fagocitosis amebiana expresada en porcentaje, con carbonizado pulverizado de tortillas blancas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	48.5%	48.5%	43.6%
48	0%	71.7%	71.4%	77.5%
72	0%	94.4%	94.7%	97.0%

Nuevamente los resultados se presentan microfotografías de los ensayos control contra los ensayos con el carbonizado pulverizado de tortillas blancas, a las 72 h del monitoreo.

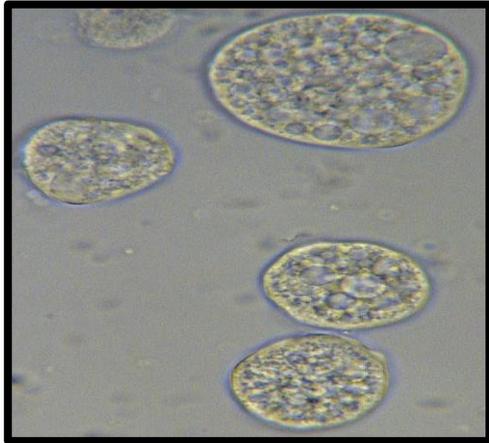


Fig 42. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología)

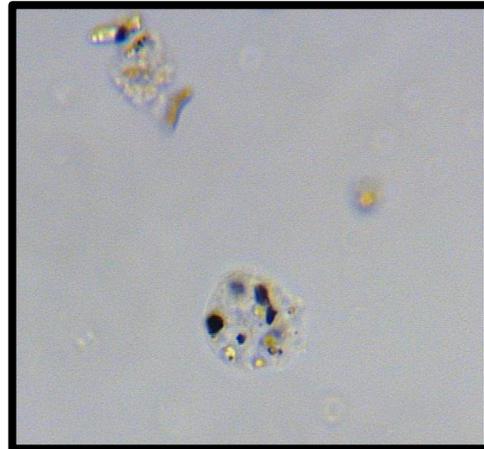


Fig 43. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla blanca (Lugardo J., UME HGM, Lab patología)

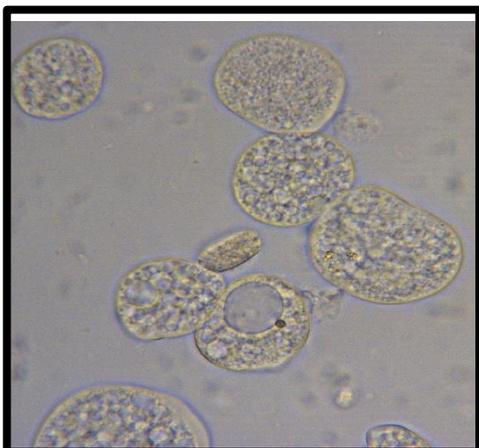


Fig 44. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

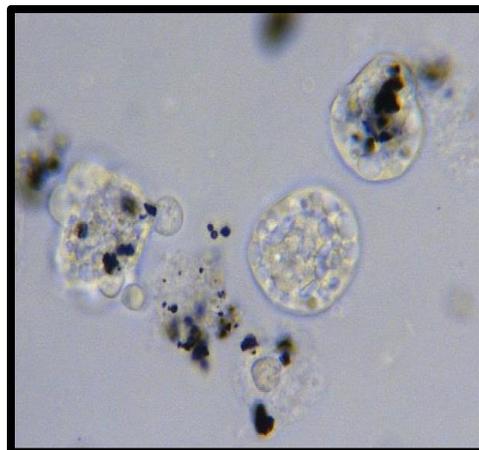


Fig 45. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla blanca (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 46. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

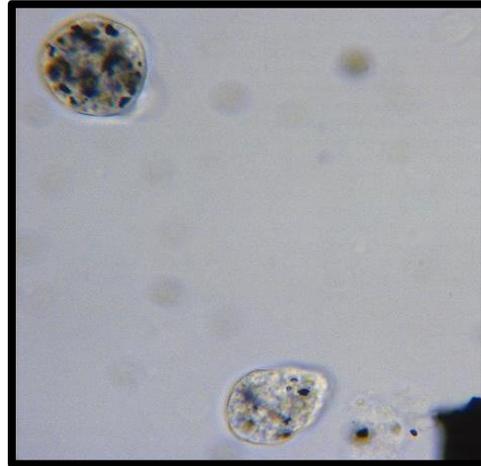


Fig 47. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla blanca (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.4 Tortillas de maíz criollo.

La cuarta y última muestra a partir de tortilla de maíz criollo carbonizado pulverizado. Para este tipo de maíz no se encontró información si la pigmentación café característica de las tortillas sea proveniente de algún compuesto, como es el caso de las antocianinas en las tortillas del maíz azul y rojo. Sin embargo, el estudio propuesto con el maíz criollo se debe a la ligera variación genética entre los diferentes tipos de maíces. Los resultados se representan con la tabla 17.

Tabla 17. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz criollo.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	18900	19000	20000	20000
48	59500	34990	36100	38060
72	109640	65340	67500	67500

Los datos obtenidos de la inhibición del crecimiento de la población amebiana en co-incubación con el carbonizado pulverizado de tortilla de maíz criolla, expresados en porcentaje, desde las 24 h a las 72 h, se muestran en la tabla 18, se observa que, en el tiempo de 48 h, aproximadamente se reduce 40 % para las tres concentraciones siendo el porcentaje más alto para la muestra de maíz criollo.

Tabla 18. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas criollas, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	27.4%	27.9%	27.9%
48	0%	41.1%	41.1%	36.0%
72	0%	36.7%	38.4%	38.3%

Para la viabilidad, la menor resultó de 89.6% en los ensayos de 25 mg a las 24 h del tiempo registrado. En general se mantuvo mayor a 90 % como en los ensayos referidos como control. Esto se observa en la Tabla 19.

Tabla 19. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas criollas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	97.0%	89.6%	90.0%	91.0%
48	93.0%	91.0%	90.2%	90.0%
72	93.0%	90.0%	89.0%	87.0%

Los resultados de la fagocitosis que se obtuvo con el carbonizado pulverizado de tortilla de maíz criollo, durante los tres tiempos del monitoreo, se muestran en la tabla 20. A las 24h la fagocitosis resultó ser de 43 y 50 % aproximada para las tres concentraciones, a mayor tiempo y mayor concentración de pulverizado carbonizado se mantuvo el aumento que se presentó para las anteriores muestras con tortilla de maíz, a las 72 h la fagocitosis fue de 98.2% para la mayor concentración.

Tabla 20. Registro de la fagocitosis amebiana expresada en porcentaje, con carbonizado pulverizado de tortillas criollas.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	43.0%	50.0%	52.1%
48	0%	69.0%	71.2%	85.6%
72	0%	89.1%	92.0%	98.2%

Las microfotografías presentes a continuación, son el resultado de los trofozoitos en los ensayos control, comparados con los ensayos con carbonizado pulverizado de tortillas de maíz criollo, a las 72 h del monitoreo.



Fig 48. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

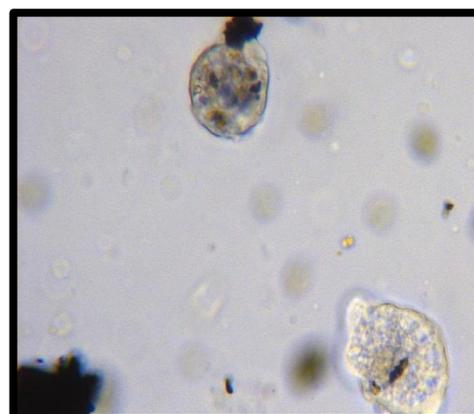


Fig 49. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla criolla (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

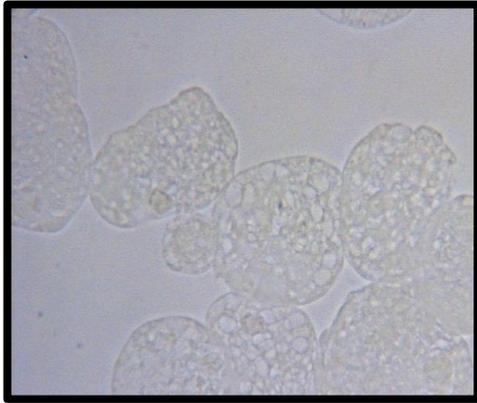


Fig 50. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

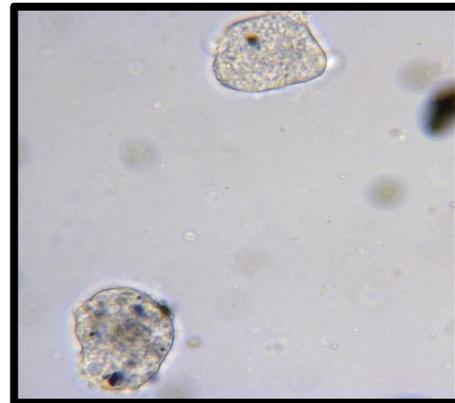


Fig 51. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla criolla (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

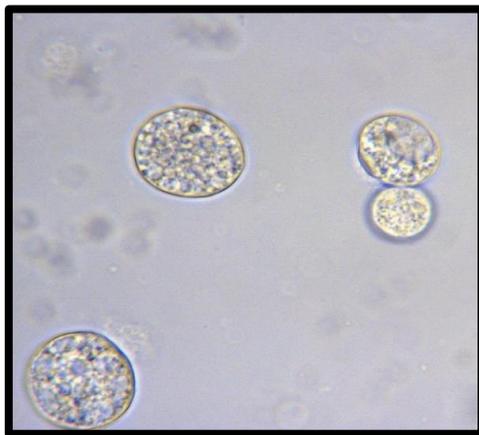


Fig 52. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

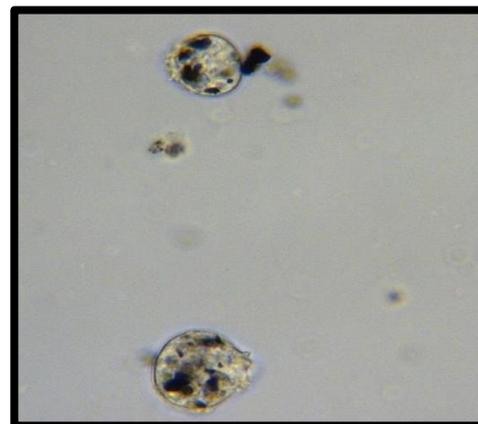


Fig 53. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla criolla (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.5 Tortillas de harina comercial.

La quinta muestra utilizada fue proveniente de trigo, es decir tortilla de harina de trigo comercial. Se buscó observar el efecto de otro tipo de tortilla con diferente composición. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de harina de maíz comercial.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	31,250	26,650	27,750	24,000
48	56850	52375	50875	49750
72	120000	88475	84500	82625

Se presentó inhibición del crecimiento de la población amebiana al co-incubar las amebas con el carbonizado pulverizado de tortilla de harina comercial (Tabla 22). Al tiempo de 24 h en la concentración de 50 mg se presentó la menor inhibición siendo de 11.20%, al registro de 48 h en la misma concentración de 17.55 % y a las 72 h la reducción fue de 35-38%, para las tres concentraciones utilizadas.

Tabla 22. Inhibición de la población amebiana en co-incubacion con carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo comercial, expresada en porcentaje.

Tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	14.7%	11.2%	17.2%
48	0%	23.1%	17.5%	21.2%
72	0%	34.6%	37.9%	36.9%

El menor porcentaje de viabilidad fue de 89.6% para la concentración de 100 mg para el monitoreo a 48 y 72 h, esto se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo comercial.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	95.2%	92.0%	94.3%	90.2%
48	96.0%	92.5%	94.4%	89.6%
72	96.5%	90.4%	93.6%	89.6%

En cuanto al efecto de la fagocitosis, a mayor concentración y a mayor tiempo la fagocitosis aumenta. Esto se observa en la tabla 24, a las 72 h de registro y con 100 mg de muestra se obtuvo 97 % de fagocitosis.

Tabla 24. Registro de la fagocitosis amebiana expresada en porcentaje, con carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo comercial.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	30.7%	36.3%	37.5%
48	0%	76.0%	76.9%	80.0%
72	0%	92.1%	95.0%	97.0%

Para corroborar los resultados de la tabla anterior se presentan microfotografías de los ensayos control contra los ensayos con el

carbonizado pulverizado de tortillas de harina (comercial), a las 72 h del monitoreo.



Fig 54. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

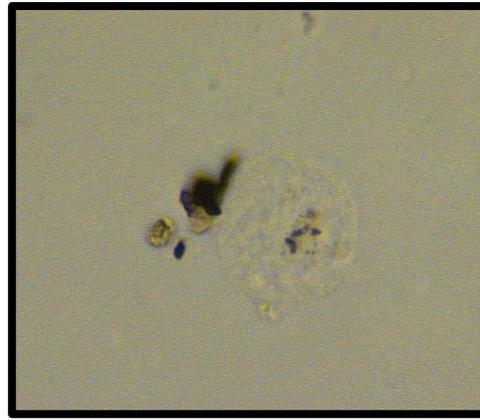


Fig 55. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla de harina (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

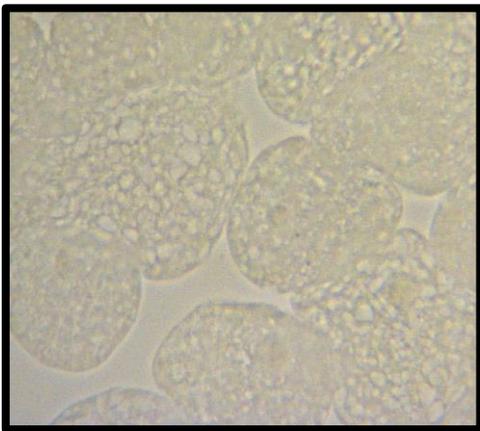


Fig 56. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

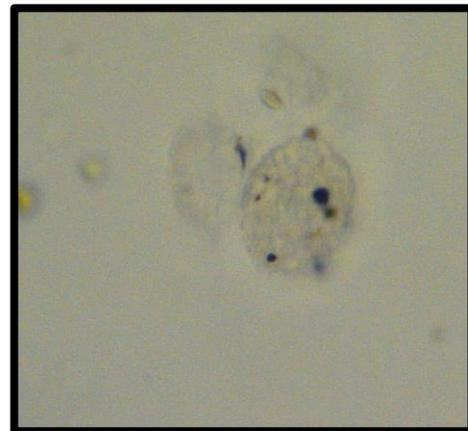


Fig 57. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla de harina (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

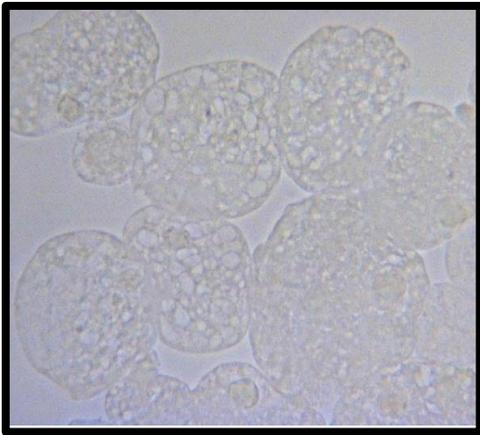


Fig 58. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

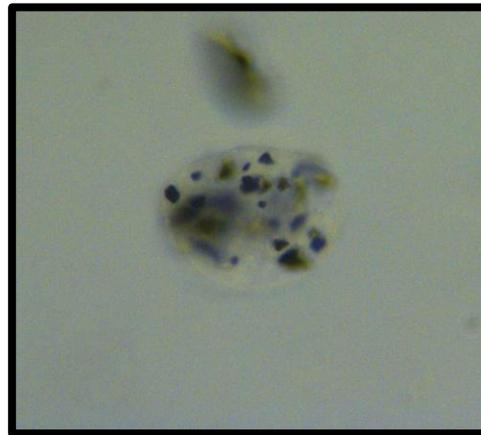


Fig 59. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla de harina (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.6 Tortillas de harina artesanal.

La sexta muestra fue tortillas de harina de trigo artesanal para poder comparar el efecto en el crecimiento amebiano al incubarse con dicha muestra y con la muestra de tortillas de harina de trigo comercial, ya que al ser artesanal la composición no es estandarizada y puede presentar variación en las cantidades de los componentes que la conforman. Los resultados se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo artesanal.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	32500	25000	20500	23250
48	65000	55500	52000	52500
72	136000	84000	88000	87000

Los resultados mostraron que, la máxima inhibición del crecimiento amebiano con el carbonizado pulverizado de tortilla de harina artesanal es de 38.2 % al monitoreo de 72h, sin embargo, es importante mencionar que para esta muestra se observó que a las 48 h se presentó menor inhibición de la que ocurrió a las 24 h, esto se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo artesanal, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	23.0%	26.9%	25.6%
48	0%	14.3%	20.0%	19.3%
72	0%	38.2%	35.9%	36.0%

En tanto a la viabilidad se observó que al usar la muestra carbonizada pulverizada de harina comercial la viabilidad registrada en porcentaje en dichos ensayos fue de 90.2 % a 95.6 %, lo que quiere decir que la viabilidad no se ve afectada, (Tabla 27).

Tabla 27. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de tortillas de harina de trigo artesanal.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	95.2%	91.5%	95.0%	95.6%
48	95.0%	90.7%	93.7%	94.7%
72	90.0%	90.2%	92.0%	92.5%

La fagocitosis amebiana con la muestra resultó que al tiempo de co-incubación de 24 h se observó de 27 a 30 %, a las 48 h de 62 a 77 % y en la culminación del ensayo se observó de 89 a 98 %.

Tabla 28. Registro de la fagocitosis amebiana con carbonizado pulverizado de tortillas de harina artesanal, en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	27.7%	30.7%	28.5%
48	0%	62.5%	76.9%	68.5%
72	0%	89.7%	92.0%	98.7%

A continuación, se muestran las microfotografías de los trofozoitos con diferentes concentraciones de muestra comparados con un control, a las 72 h del monitoreo.

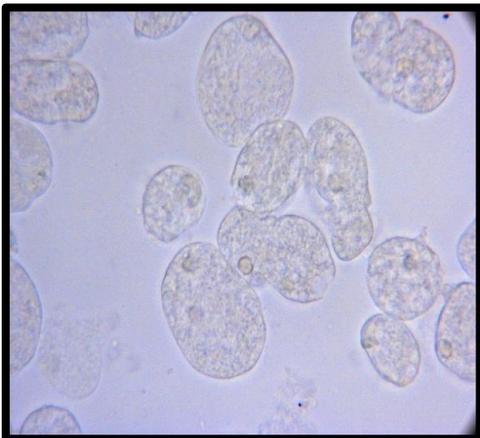


Fig 60. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

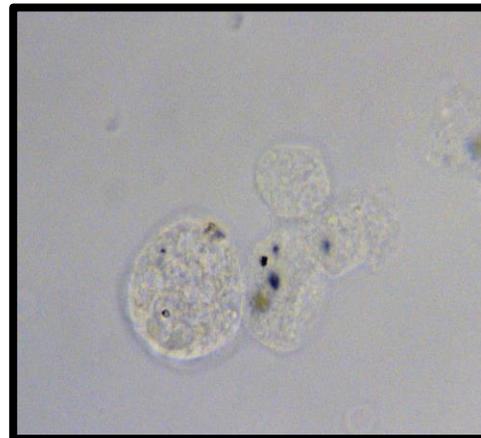


Fig 61. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de tortilla de harina (A) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

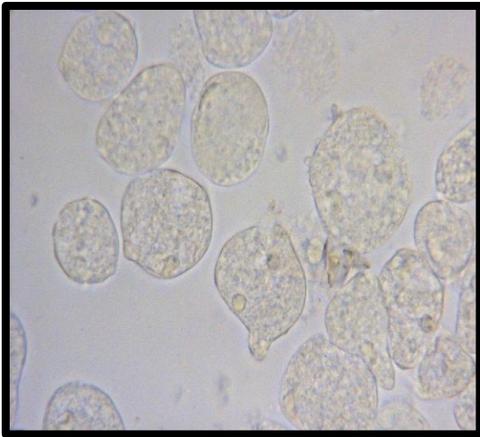


Fig 62. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

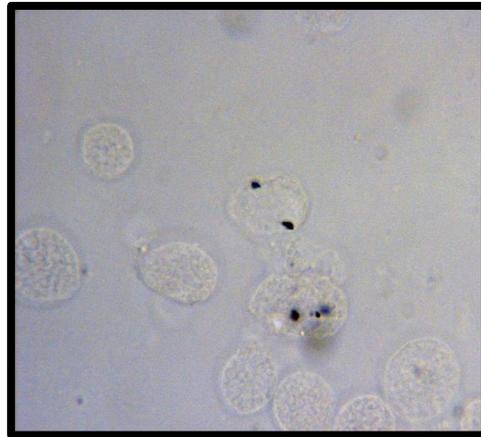


Fig 63. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tortilla de harina (A) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

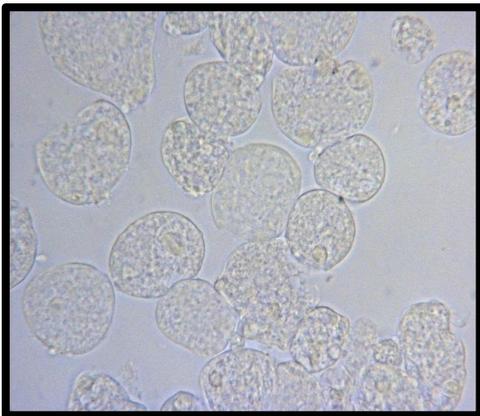


Fig 64. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 65. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de tortilla de harina (A) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.7 Pan de caja integral de trigo (comercial).

La séptima muestra fue el pan integral comercial, la metodología empleada fue la misma usando concentraciones de carbonizado pulverizado, se buscó observar el efecto en el crecimiento amebiano al ser coincubado con otro tipo de alimento diferente a la tortilla sin embargo proveniente de un cereal. La tabla 29 muestra los resultados.

Tabla 29. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de carbonizado pulverizado de pan integral de trigo.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	37625	26575	23125	20200
48	78500	57700	53000	51500
72	111250	90000	85000	85000

Se presentó disminución en la población amebiana, esto se observa en la Tabla 21, la inhibición mayor fue de 34.3 % al tiempo de 48 h de monitoreo, cabe resaltar que al tiempo de 72h la máxima inhibición para esta muestra fue de 29.1%

Tabla 30. Inhibición de la población amebiana en co-incubacion con carbonizado pulverizado de pan integral de trigo comercial, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	29.3%	28.5%	26.3%
48	0%	26.5%	32.4%	34.3%
72	0%	29.1%	23.6%	23.6%

El porcentaje de viabilidad que resultó en la población amebiana con la muestra de carbonizado pulverizado de pan integral se mantuvo mayor a 90 %, siendo la mayor de 97.5 a las 24 h de monitoreo con una concentración de 50 mg y la menor viabilidad de 90 % a las 72 h con una concentración de 50 y 100 mg. Tabla 31.

Tabla 31. Viabilidad expresada en porcentaje, presente en la población amebiana en co-incubación con carbonizado pulverizado de pan integral trigo comercial.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	95.0%	93.5%	97.5%	92.0 %
48	93.5%	92.6%	95.0%	90.5%
72	92.0%	91.7%	90.0%	90.0%

La fagocitosis que se presentó en las células amebianas al ser co-incubadas con la muestra de pan integral, se muestra en la Tabla 32, donde se observa que a mayor tiempo y mayor concentración la fagocitosis aumenta ya que a las 72 h de monitoreo y con 100 mg de muestra se obtuvo 97 % de fagocitosis amebiana.

Tabla 32. Registro de la fagocitosis amebiana con carbonizado pulverizado de pan integral de trigo comercial.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	47.5%	50.0%	42.5%
48	0%	61.5%	70.0%	71.4%
72	0%	87.0%	85.7%	97.0%

Para corroborar los resultados de los trofozoitos co-incubados con carbonizado de pan integral, se presentan microfotografías de los ensayos maíz criollo, a las 72 h del monitoreo.

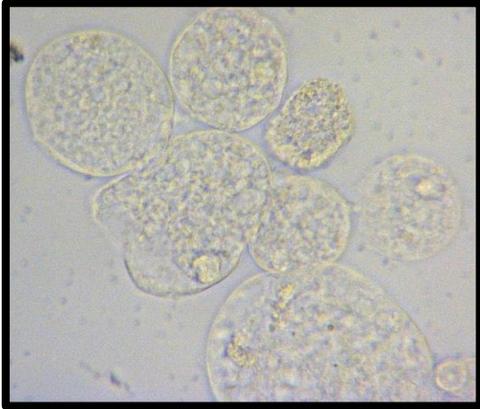


Fig 66. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 67. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado de pan integral (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 68. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).



Fig 69. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de pan integral (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

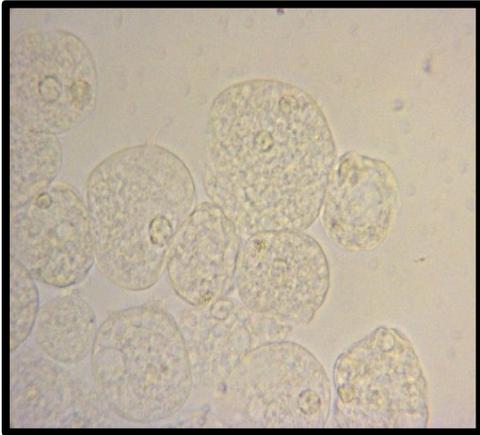


Fig 70. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

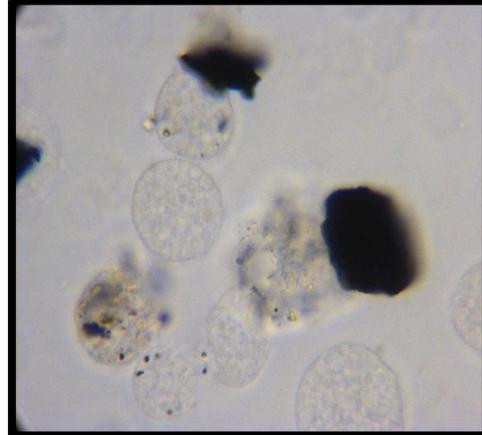


Fig 71. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de pulverizado de pan integral (C) (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

6.3.8 Tostadas horneadas de maíz azul.

La octava y última muestra utilizada fue pulverizado de tostadas horneadas, al ser un alimento a base de maíz azul, mismo que es utilizado para la elaboración de las tortillas azules, se logró comparar el efecto de las muestras carbonizadas y la no carbonizada en co-incubación con la población amebiana. Los resultados se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Crecimiento amebiano axénico con diferentes concentraciones de pulverizado de tostadas horneadas de maíz azul.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	30417	29667	29167	29667
48	78833	65000	60500	60800
72	125000	121000	120000	122500

No se obtuvo un efecto en la inhibición de la población amebiana en co-incubación con la muestra de tostadas horneadas de maíz azul pulverizadas, al compararse con el control, esto puede observarse en la tabla 34, ya que a las 24 h de monitoreo fue de 2 a 4 %, a las 48 h de 0.86 a 8 % y a las 72 h de 0 a 4 %, cabe resaltar que la inhibición expresada en porcentaje no sobrepasa de 10 % con la muestra al no estar no carbonizada.

Tabla 34. Inhibición de la población amebiana en co-incubación con pulverizado de tostadas horneadas de maíz azul, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	2.4%	4.1%	2.4%
48	0%	4.8%	8.0%	0.8%
72	0%	0.0%	4.0%	2.0%

La viabilidad de las células amebianas en los ensayos co-incubados con la muestra de tostadas horneadas de maíz azul, fue mayor de 90 % (Tabla 35). En el registro de 24 h el menor porcentaje fue de 94.3 %, a las 48 h de 92.3 % y en la culminación del ensayo a las 72 h la menor fue de 90 %.

Tabla 35. Viabilidad presente en la población amebiana en co-incubación con pulverizado de tostadas horneadas de maíz azul.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	95.2%	97.0%	94.3%	95.7%
48	94.7%	96.5%	92.3%	92.3%
72	90.0%	92.8%	90.2%	92.0%

El efecto de la fagocitosis en las células amebianas al ser co-incubadas con la muestra pulverizada de tostadas horneadas de maíz azul resulto de 77.8 % con la concentración de 100 mg y a las 72 h de monitoreo (Tabla 36).

Tabla 36. Fagocitosis amebiana con pulverizado de tostadas horneadas de maíz azul, expresada en porcentaje.

tiempo (h)	control	25mg	50mg	100mg
24	0%	17.2%	17.5%	22.8%
48	0%	45.0%	45.4%	53.3%
72	0%	61.5%	75.0%	77.8%

Para corroborar los resultados de los trofozoitos co-incubados con el pulverizado se presentan las siguientes microfotografías.

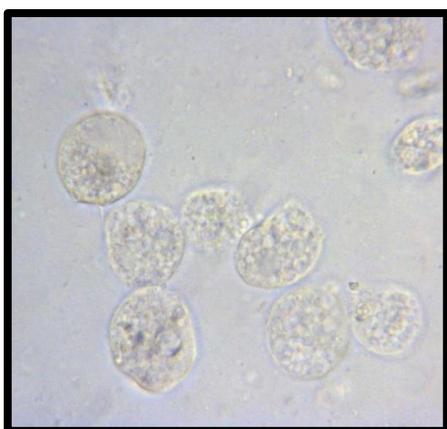


Fig 72. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

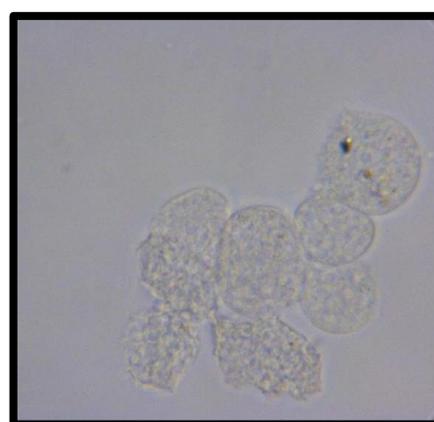


Fig 73. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 25 mg de pulverizado tostadas horneadas (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

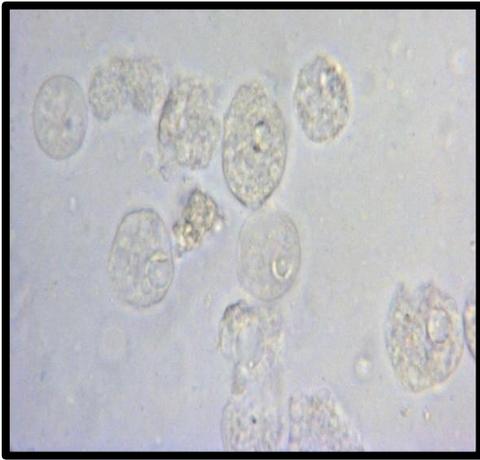


Fig 74. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

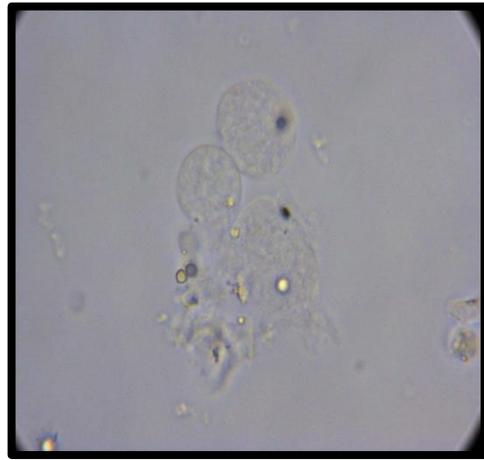


Fig 75. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 50 mg de pulverizado de tostadas horneadas (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

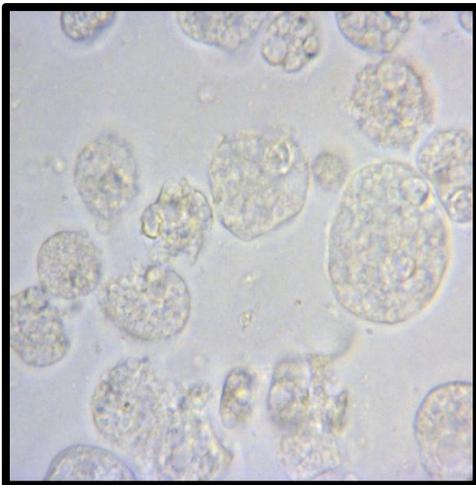


Fig 76. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72 h en medio TYI-S-33 axénico. Ensayo control (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

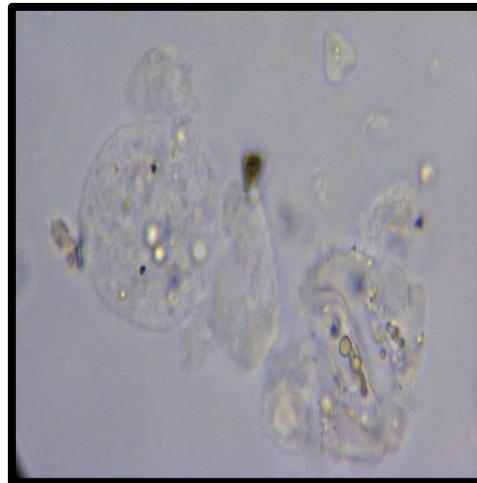
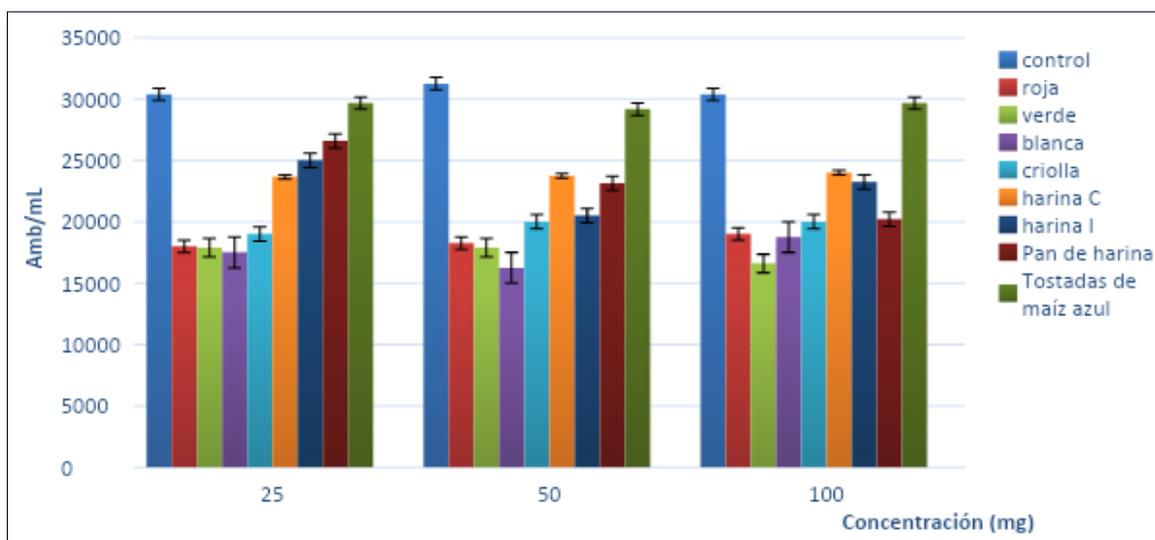


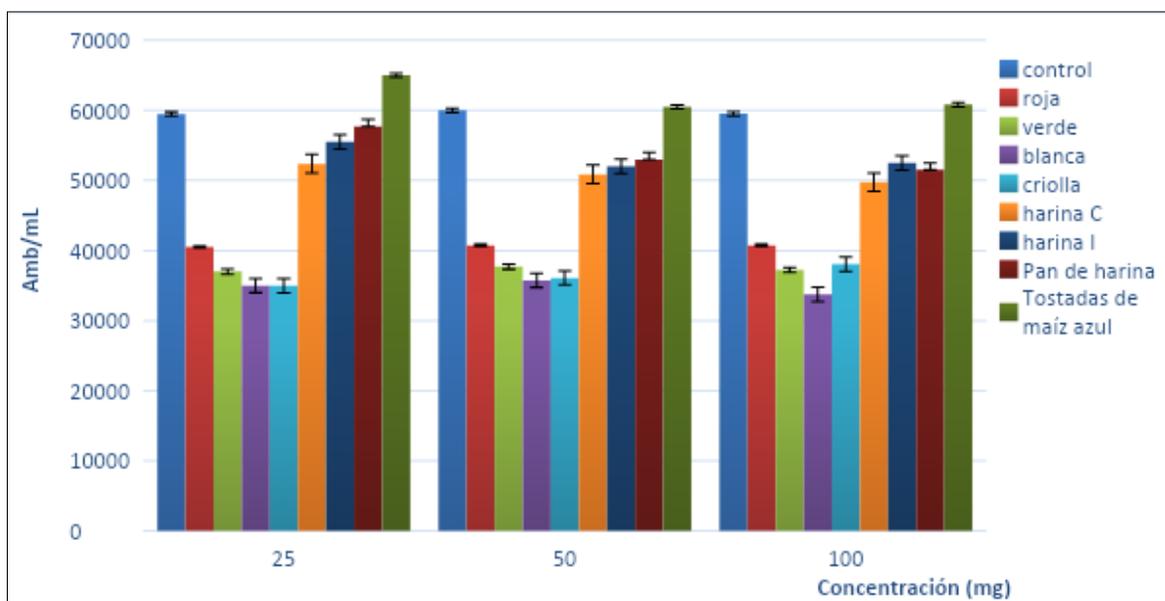
Fig 77. Microfotografía a 60x de trofozoitos de *E. histolytica* a las 72h en medio TYI-S-33 axénico. Con 100 mg de tostadas horneadas (Lugardo J., UME HGM, Lab patología).

Para comparar el efecto en el crecimiento amebiano con las ocho diferentes muestras, se realizaron gráficas para los tres diferentes tiempos de incubación.

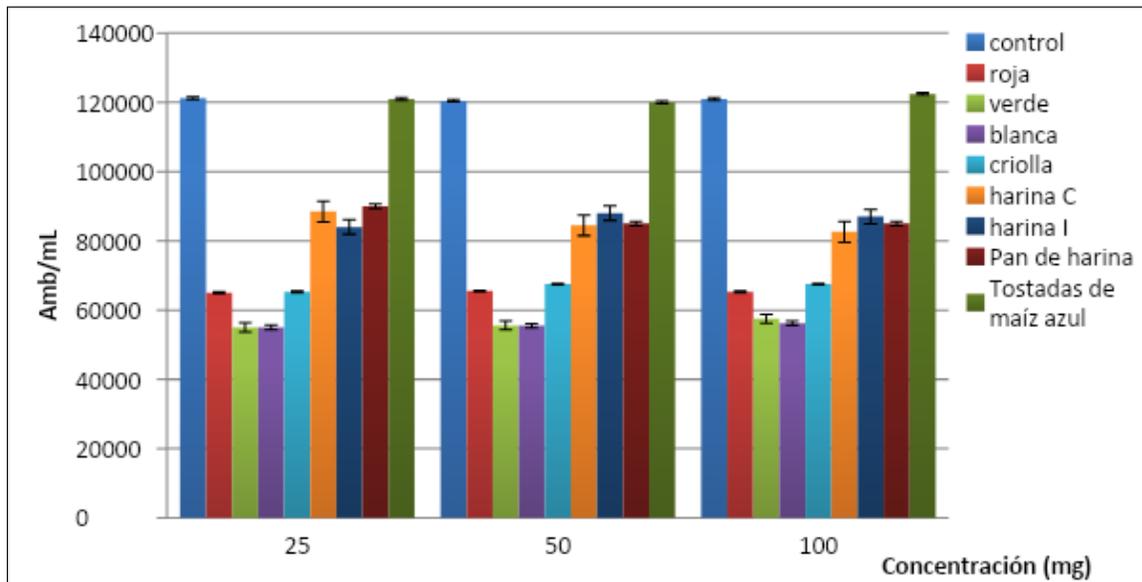
Gráfica 2. Crecimiento amebiano axénico a las 24 h de co-incubación con las 8 muestras diferentes muestras.



Gráfica 3. Crecimiento amebiano axénico a las 48 h de co-incubación con las 8 muestras diferentes muestras.



Gráfica 4. Crecimiento amebiano axénico a las 72 h de co-incubación con las 8 muestras diferentes muestras.



En la gráfica 2, se puede observar que desde las 24 h de incubación hay inhibición en las muestras carbonizadas con tortillas de maíz en un rango de 15,000 a 20,000 amb/mL, para el caso de las tortillas de harina y el pan integral el crecimiento fue cercano al 25,000 amb/mL.

De igual forma en las gráficas 3 y 4, el efecto sigue comportándose de la misma manera, se observó un límite con las 4 tortillas de maíz que hace diferencia en el crecimiento con las muestras a partir de tortilla de harina y pan integral, como se mencionó el grano de maíz y el grano de trigo presentan diferencias en su composición. En el caso de la muestra de tostada de maíz azul no presentó inhibición amebiana, al compararse en las gráficas las barras que representan los ensayos control y las barras para la tostada de maíz azul son similares entre sí, de lo que podemos

inferir que es necesario una carbonización previa, para el efecto inhibitorio.

Otro punto que se resalta de la gráfica es que, para el caso de la concentración, esta no se ve afectada, el crecimiento es el mismo si se realiza una co-incubación con 25, con 50 o con 100 mg.

En el caso de los resultados microfotografías, todas las ilustraciones de los ensayos con las ocho muestras alimenticias diferentes, representan las amebas (*E. histolytica*) en medio axénico y sin contaminación de otros microorganismos. Se observaron los trofozoitos fagocíticos de diferente tamaño, además de que adoptaron una forma circular a diferencia de los trofozoitos en los ensayos control.

Para el conteo de las células que fagocitaron en la muestra pulverizada de tostadas horneadas de maíz azul, al no estar la muestra carbonizada no hay un contraste que permita visualizar las células con partículas fagocitadas, sin embargo, se observaron puntos de color beige por lo que se deduce que las amebas fagocitaron.

Cabe resaltar que todos los ensayos cumplen con los siguientes requisitos:

- ✓ Promedio de cinco ensayos realizados para cada muestra, en donde cada ensayo cuenta con un par de tubos, que a su vez se cuenta cada tubo por duplicado en la cámara de Neubauer, es decir, cada barra representa el promedio de 20 datos.
- ✓ Viabilidad celular inicial para los ensayos mínima del 90%
- ✓ Previo cultivo amebiano axénico hasta un crecimiento celular 72h en todos los tubos.
- ✓ Desviación estándar para cada barra menor a 30%.

6.4 Potencial de hidrógeno (pH)

Al finalizar cada uno de los diferentes ensayos al intervalo de 72 h de monitoreo, se midió el pH de los ensayos control y los ensayos con diferentes muestras de carbonizado pulverizado y el pulverizado sin carbonizar. Se registraron los resultados obtenidos del potencial de Hidrógeno de las amebas co-incubadas con los diferentes tipos de muestras, el rango de pH fue de 6.28 a 6.59 (Tabla 37)

Tabla 37. pH de los ensayos con las 8 diferentes tipos de muestras, después de ser co-incubadas con las amebas.

Carbonizado pulverizado	control	25mg	50mg	100mg
Tortilla azul	6.32	6.43	6.40	6.47
Tortilla roja	6.32	6.34	6.37	6.47
Tortilla blanca.	6.28	6.42	6.44	6.45
Tortilla criolla	6.40	6.41	6.40	6.51
Tortilla de harina (C)	6.46	6.40	6.47	6.53
Tortilla de harina (a)	6.51	6.53	6.59	6.46
Pan Integral	6.48	6.44	6.47	6.53
Tostadas de maíz azul	6.42	6.49	6.52	6.52

6.5 Análisis estadístico entre las 6 diferentes tortillas carbonizadas y pulverizadas.

Para relacionar los datos obtenidos de las seis muestras de carbonizado pulverizado a partir de los diferentes tipos de tortilla de maíz y las tortillas de harina comercial y artesanal, se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA), para comprobar si existe diferencia significativa con $\alpha=0.05$, es decir, si se presenta diferencia en al menos una muestra de tortilla en los tres tiempos de monitoreo (24, 48 y 72h).

Al ser F que se calculó menor que la F crítica, se presenta diferencia significativa en al menos una muestra de tortilla, con $\alpha=0.05$. En la tabla 38 se muestran los resultados del análisis estadístico a los tres diferentes tiempos de monitoreo.

Tabla 38. Resultados de la prueba ANOVA, para los seis diferentes tipos de tortillas

Tiempo de monitoreo (h).	F calculada	F crítica	Diferencia significativa
24	2.88	3.11	NO
48	2.06	3.11	NO
72	2.73	3.11	NO

6.6 Análisis estadístico entre las 7 diferentes muestras carbonizadas pulverizadas y la muestra pulverizada.

Debido al efecto que resultó al emplear diferentes muestras de tortillas, se utilizó el pan integral como otro tipo de alimento carbonizado y así comprobar si con cualquier tipo de alimento que se logre carbonizar el efecto fuese el mismo. La tostada horneada de maíz azul se utilizó ya que está elaborada a partir de maíz azul, esta no fue carbonizada para observar la diferencia entre el efecto al utilizar un alimento no

carbonizado. En la tabla 39, se presenta el análisis estadístico de las 6 muestras de tortilla, la muestra de pan integral y la muestra de tostada horneada de maíz azul, en los tres tiempos de monitoreo.

Tabla 39. Resultados de la prueba ANOVA, para los ocho diferentes tipos de muestras

Tiempo de monitoreo (h).	F calculada	F crítica	Diferencia significativa
24	22.41	2.66	SI
48	103.82	2.66	SI
72	248.77	2.66	SI

Al ser F que se calculó mayor que la F crítica, indica que se presentó diferencia significativa con $\alpha=0.05$, entre al menos una de las muestras, para identificar cuáles muestras presentaron diferencia se realizó la prueba Tukey, los resultados se muestran en la tabla 40.

Tabla 40. Resultados de la prueba Tukey.

Tiempo (h)	Muestras que presentaron diferencia.		
24 h	Tostadas de maíz azul		Tortilla azul
			Tortilla roja
			Tortilla blanca
			Tortilla criolla
			Tortillas de harina
			Tortillas de harina
			Pan integral
48 h	Tostadas de maíz azul	Tortillas de harina y pan	Tortilla azul
			Tortilla roja
			Tortilla blanca
			Tortilla criolla
			Tortillas de harina
			Tortillas de harina
			Pan integral
72 h	Tostadas de maíz azul	Tortillas de harina y pan	Tortilla azul
			Tortilla roja
			Tortilla blanca
			Tortilla criolla
			Tortillas de harina
			Tortillas de harina
			Pan integral

En la tabla se puede observar que resaltan dos diferencias, por una parte, las casillas de tortillas de maíz, siendo las muestras que tuvieron mayor inhibición al estar en coincubación con las células amebianas y por otro lado la casilla mayor de la muestra de tostadas de maíz que presentó diferencia con todas las muestras, ya que no inhibió la población amebiana.

7. Análisis de resultados.

Para el proyecto de investigación fue necesario buscar información de alimentos funcionales para estar dentro de un contexto actualizado por un lado y tener referencia de otros artículos en relación con el tema. De dicha búsqueda se encontró que los compuestos fenólicos que interfieren con la coloración que percibimos en los alimentos, como las antocianinas, ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Las antocianinas son compuestos de interés ya que además de su impacto sobre las características sensoriales en los alimentos, tienen una implicación en la salud humana a través de distintas vías (Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

En la actualidad se han realizado estudios que demuestre que los alimentos además de cumplir con el aporte nutricional que los caracteriza también proporcionan algunos beneficios para la salud, y para incluirlos en la promoción de los "alimentos funcionales".

Tomando en cuenta la pigmentación y a la variación genética de los diversos tipos de maíz que se utilizan para elaborar las distintas tortillas, en el proyecto se utilizaron muestras carbonizadas de tortillas de maíz con distinta coloración, por lo que se enfatiza, que ya se sabe que las tortillas de maíz azul y rojo tienen coloración proveniente de las antocianinas (Strack y Wray, 1994). El interés del proyecto es buscar si

dentro de las propiedades antimicrobianas mencionadas en la bibliografía también abarca un impacto antiamebiano, por tal motivo, se visualizó una posibilidad en que el efecto de los diferentes carbonizados pulverizados a partir de distintos tipos de maíz en coincubación con células amebianas (*Entamoeba histolytica*) en medio TYI-S-33, se obtendrían resultados distintos dependiendo del tipo de muestra, una hipótesis fue que los diferentes carbonizados contendrían distintas trazas de antocianinas y minerales o compuestos generados después del proceso de carbonización, siendo los factores principales para inducir diferentes rangos de la inhibición del crecimiento amebiano. Al compararse los resultados gráficos de inhibición del crecimiento se observó que en las muestras provenientes de tortilla de maíz azul, rojo, blanco y criolla al ser co-incubadas con las células amebianas produjeron la inducción de la inhibición del crecimiento en un intervalo entre el 35 % a 60 % de inhibición, desde las 24 hasta las 72 h respectivamente.

Con respecto a otra dinámica de evaluar los resultados, se realizó un análisis de varianza en los tres tiempos de duración del ensayo, comparando los datos, se comprobó que no existe diferencia significativa con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, en el efecto de inhibición entre los diferentes tipos de carbonizado pulverizado, es decir las 4 muestras actúan como inhibidores de *E. histolytica*, por lo que es posible que las antocianinas no tienen relación con la inhibición del crecimiento amebiano, como se mencionó anteriormente en la bibliografía citada los compuestos fenólicos son sensibles y pueden degradarse a altas temperaturas.

Con los resultados obtenidos con las cuatro muestras carbonizadas a partir de tortillas, se buscó probar lo mismo usando tortillas de harina u

otro alimento carbonizado siendo el caso del pan integral, dicho lo anterior, se comparó el efecto *in vitro*, al incubar células amebianas con muestras carbonizadas y pulverizadas de tortillas de harina de trigo y con pan integral. Al realizar el análisis estadístico con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, se encontró que existe diferencia al monitoreo de 48 y 72 h en la inhibición entre las muestras de carbonizado pulverizado de tortillas de maíz y las muestras de carbonizado pulverizado de tortillas de harina comercial y artesanal. Estas dos últimas presentaron de 15% a 20% menor inhibición, sobre todo al compararse con la muestra de tortilla azul y tortilla blanca. Posiblemente los compuestos y cenizas que conforman el carbonizado pulverizado de las diversas muestras de tortillas de maíz es lo que hace que el efecto de inhibición en el crecimiento amebiano sea diferente entre las muestras.

En el caso de la muestra carbonizada y pulverizada proveniente del pan integral, hay diferencia significativa con respecto a las muestras a partir de tortillas de maíz, inhibe 24 % menos el crecimiento amebiano al estar en co-incubación, con respecto a la muestra de carbonizado pulverizado de tortillas de harina y pan integral no se presenta diferencia significativa en los tres tiempos de monitoreo.

El orden de inhibición de las muestras se presenta de la siguiente forma, carbonizado pulverizado de tortillas de maíz > carbonizado pulverizado de tortilla de harina > carbonizado pulverizado de pan integral de trigo. Ante dicho gradiente en porcentaje de inhibición del crecimiento amebiano de *E. histolytica*, posiblemente, el carbonizado proveniente de las muestras de tortillas y del pan integral actúan como agente antiamebiano. El propósito de utilizar un agente antiamebiano, es detener el crecimiento de esta clase de célula amebiana, en el organismo

parasitado, sería conveniente proporcionarle tortilla de maíz carbonizada para permitir que funcione como un atenuante y dar pauta de que desarrolle sus propios mecanismos de defensa.

No obstante, en un estudio reciente se buscó comparar las propiedades nutricionales y compuestos funcionales, en tortillas de maíz azul y maíz blanco, hechas a mano, y tortillas blancas industriales, en donde se reporta una diferenciación en el contenido de minerales, un resultado interesante fue que el calcio resultó ser mayor para las dos tortillas elaboradas de forma artesanal. También se hizo análisis químico proximal (AQP) en las tres muestras, con los resultados se encontró que el contenido de cenizas fue significativamente mayor en las tortillas hechas a mano. El contenido de cenizas en ambos tipos de tortillas hechas a mano aumentó debido a la cal que se incorporó a los granos de maíz durante el proceso de nixtamalización (Colín-Chávez y col, 2020). Con base a la información de dicho proyecto, se puede hacer referencia a que, en el carbonizado posiblemente los minerales resultantes se encuentran en cantidades diferentes y eso repercute las diferencias significativas entre las tortillas de maíz comparadas con las tortillas de harina y pan integral, mencionadas con anterioridad, con ello se sugiere realizar un análisis químico o un espectro de masas para comprobar si hay diferencia en la composición residual de los carbonizados.

En caso contrario, al ser co-incubadas de forma *in vitro* las células amebianas de *Entamoeba histolytica* con la muestra pulverizada de tostadas horneadas de maíz azul, no presentó inhibición en la población amebiana. Cabe resaltar que, para que haya un efecto en la inhibición de la población amebiana, la muestra alimenticia debe estar en condición de carbonización y pulverización. Reafirmando que las antocianinas al parecer no influyen en la inhibición del crecimiento de *E.*

histolytica siendo el carbonizado lo que influye en la inhibición. Por otro lado, se han realizado investigaciones con carbón activado en donde la capacidad antibacteriana se ha evaluado satisfactoriamente frente a cepas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (R. Carmen y col., 2017).

Los resultados obtenidos con respecto a la viabilidad amebiana previamente co-incubadas con las muestras carbonizadas pulverizadas a partir de tortilla de maíz se encontraron valores alrededor de 80% de viabilidad amebiana. Con las muestras a partir de tortilla de harina, pan integral y tostadas horneadas de maíz azul la viabilidad fue mayor a 90 % de la misma forma que los ensayos control. Debido a esto se puede decir que la viabilidad de *Entamoeba histolytica* no se ve afectada con las distintas muestras carbonizadas pulverizadas, el rango va de 85 % a 90 % de viabilidad, durante las 72 h del ensayo.

En cuanto al proceso metabólico de ingestión de partículas, o bien fagocitosis de la muestra carbonizada y pulverizada, se observó con las ochos diferentes muestra al ser co-incubadas con *Entamoeba histolytica*. La fagocitosis es un proceso en el que se interiorizan partículas $\geq 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro (Botelho y Grinsteiri, 2011). Se compone de varias etapas, la quimiotaxis, el reconocimiento de los microorganismos por medio de los receptores, la internalización y la destrucción de este (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003). Sin embargo, cabe resaltar que, aunque las células amebianas presentaron fagocitosis con todas las muestras utilizadas en el proyecto, como ya se mencionó la viabilidad de la ameba no se afecta. Otro punto importante, al examinar los trofozoitos con el microscopio fotónico 60x representado en las microfotografías, se observó que los ensayos control cumplen con la morfología típica del protozario, a diferencia de los ensayos que contienen diversas

concentraciones de muestra del carbonizado pulverizado y no carbonizado, además las amebas aparentemente reducen su tamaño y adoptan una forma circular en presencia del carbonizado pulverizado. Para el caso del pulverizado de tostada horneada de maíz azul, no se observaron cambios en la morfología de los trofozoitos, es decir no reducen su tamaño ni adoptan la forma circular. Sin embargo, es necesario señalar que en la revisión bibliográfica no se encontró información de la fagocitosis de carbonizado de partículas por amebas.

Por último, al culminar cada uno de los ensayos, se midió el pH con el potenciómetro a las muestras del ensayo constituidas por los tubos control y los que contenían las diferentes muestras de carbonizado, los valores medidos resultaron alrededor de 6.5 con las ocho muestras utilizadas descartando así la posibilidad de que al agregar el pulverizado el pH presentara variación e influyera en la inhibición del crecimiento amebiano, ya que como se revisó en la bibliografía el pH óptimo de crecimiento de *Entamoeba histolytica* es de 6.8 a 7.

8. Conclusiones.

- Se mantuvo un crecimiento amebiano axénico óptimo por 72 h, partiendo de un cultivo previamente incubado a 72h.
- El pulverizado en los cuatro diferentes tipos de tortillas de maíz tiene efecto en la inhibición en el crecimiento amebiano (*in vitro*) desde ~35% hasta ~60%, desde el inicio y hasta la culminación del ensayo.
- Se presentó efecto en la inhibición de la población amebiana de *Entamoeba histolytica*, con las muestras carbonizadas, ordenadas de la siguiente forma. Tortillas de maíz > tortillas de harina de trigo artesanal > pan integral de trigo.
- El alimento debe estar previamente carbonizado y pulverizado para que tenga un efecto en la inhibición de la población amebiana *in vitro*.
- Los compuestos y cenizas de las diversas muestras carbonizadas y pulverizadas hacen que el efecto de inhibición en el crecimiento amebiano sea diferente.
- La inhibición del crecimiento amebiano no depende de la concentración del carbonizado pulverizado de tortillas de maíz, los porcentajes son cercanos en tres registros de tiempo.
- Se obtuvo una viabilidad celular amebiana del 90% en los ensayos control y en general una viabilidad en los experimentales del 85%.
- Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* fagocitan pulverizado de los ochos distintas muestras alimenticias, las partículas fagocíticas aumentan al aumentar el tiempo y aumentar la concentración.

- La morfología de los trofozoitos presentó un cambio al introducir el carbonizado pulverizado de los siete diferentes tipos de muestra carbonizada.
- Los trofozoitos no adoptan la forma circular con presencia del pulverizado no carbonizado.

9. Perspectivas.

- 1) Probar las muestras de tortilla carbonizadas y pulverizadas que tuvieron mayor efecto de inhibición en el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, en un modelo animal, es decir realizarlo de forma in vivo, para proporcionar información si el carbonizado sirve para contra restar la amebiasis.
- 2) Realizar un análisis químico de los compuestos que se encuentran presentes en los carbonizados, para determinar qué compuestos de esa materia orgánica son los que presentan el efecto.
- 3) Realizar al menos otros dos ensayos con alimentos provenientes de cereales, no carbonizados, para confirmar que efectivamente no tienen ningún efecto de inhibición.
- 4) Llevar a cabo una extracción de flavonoides y antocianinas en las tortillas o en alimentos que contengan un porcentaje mayor en su composición química, para poder observar el efecto que causan con la ameba, ya que al estar carbonizadas las muestras ya no están 100% presentes, y al ser estudiados se han encontrado que inhiben otros tipos de microorganismos.

10. Bibliografía.

1. Alcázar J, 2002. Diccionario Técnico de Industrias Alimentarias. Cuzco, Perú.
2. Almeida H. D. y Rooney R. (1995). American Association of cereal quality lab. Soil and crops sciences. Texas A & M University, College Station. Pp 443-474.
3. Álvarez J. B. (2000). Uso de especies y cultivos infrautilizados en la mejora de la calidad en cereales. En A. De Ron, & M. Santalla, "Actas de mejora genética vegetal" Córdoba: Gráficas SOGAL. Pp 85.
4. Badui, Salvador.1993. Química de los alimentos. Longman de Mexico, SA de CV. Cap. 7. Pp 417-427.
5. Balandrán-Quintana, René., Mendoza Ana. (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. Ciencia UAT.
6. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. *Parasitología Clínica*. Editores Salvat, Barcelona, España. 1986. Pp 882
7. Bordignon L. M. T., C. Gauche., E. Gris F., L. Falcao D. 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-FoodScienceTechnology*, 40:549-599
8. Candil A. Diagnóstico parasitológico de la amibiasis. En: Romero Cabello R (Comp). Amibiasis en el siglo XXI. México: Sociedad Mexicana de Parasitología e Instituto para el Desarrollo Integral de la Salud; 2008.

9. Chávez B., González A., (2013), *Entamoebahistolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *Revista ciencia*. Pp 42-49
10. Clark CG, Cunnick CC, Diamond LS. 1992. Entamoeba histolytica: its conversion of 'nonpathogenic' amebae to the 'pathogenic' form, a real phenomenon. *Experimental Parasitology* 74: 307-314.
11. Colín- ChavezCitlali, José J. Virgen-Ortiz, Luis E. Serrano-Rubio, Miguel A. Martinez-Tellez. (2020) Comparación de propiedades nutricionales y compuestos bioactivos entre tortillas frescas industriales y artesanales de variedades locales de maíz. *ELSEVIER*, Vol 3. Pag 189-194.
12. Coultate T.P, 2007. Manual de química y bioquímica de los alimentos. Ed Acribia S.A Zaragoza. España
13. Corke, H. (2004). Grain, morphology of internal structure. In C. Wrigley, H Corke, and Y. C. Walker (Eds.), *Encyclopedia of Grain Science* (pp. 30-38). New York, USA: Editorial Elsevier Ltd.
14. Cuadra,P; Fajardo,V; Muñoz,O; Arrieta,A y Urzúa,A; *Planta Medica*; **60**; 598 (1994).
15. Dexter, J. E. and Sarkar, A. K. (2004). Dry Milling. In C. Wrigley, H. Corke, and Y. C. Walker (Eds.), *Encyclopedia of Grain Science* (pp. 363-375). New York, USA: Editorial Elsevier Ltd.
16. Del maíz.com Enciclopedia ilustrada. [en línea] (actualizado 2020)

disponible en : delmaiz.info/tipos-de-maiz/ [último acceso el 11 junio de 2020]

17. Diamond LS. (1961), Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134: 336-37
18. Dobell, C. y Laidlaw, P.P., 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* 18:238-318.
19. Espinosa Cantellano ME, Martínez-Palomo AM. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *ClinMicrobiol Rev.* 2000; 13:318-31.
20. Fang, J., Zhan, L., Ok, Y. S., & Gao, B. (2017). Minireview of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
21. FAO. 1993. *El maíz en la nutrición humana*. Roma. Pp. 172.
22. FAO. 2009. *Perspectivas alimentarias análisis de los mercados mundiales*. SMIA. <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural>.
23. Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc 2019, Registro mercantil de Madrid, (actualizado al 20 de Septiembre del 2019) Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/corning-cellgro-trypan-blue/15393661>. (Último acceso 20 de Septiembre del 2019) .
24. Funke, A., & Ziegler, F. (2010). Hydrothermal carbonization of biomass: a summary and discussion of chemical mechanisms for

- process engineering. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(2), 160-177.
25. Galarza Juan Manuel (2012) Situación actual y perspectiva del maíz en México 1996-2012. "Servicio de información agroalimentaria y pesquera" Pp 13.
26. Galindo Fonte L. Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. La Habana: Editorial Elfos Scientae; 2000.
27. García Acosta Virginia (1988). Los precios del trigo en la historia colonial de México. Edición de la casa chata Ciesas. Hidalgo y Matamoros.
28. Gathiram V, Jackson TF. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 1987; 72 (10): 669-72.
29. Gerardo J. F. CruzCerroa, Marlene Velásquez Yucrab , Julio Santiago Contrerasb , José L. Solís Velizc , Mónica M. Gómez Leónc , RiittaKeiski (2016). Estudio de carbones activados impregnados con quitosano y su comparación con carbones comerciales. *RevSocQuím Perú*. 82(3) 2016.
30. Gómez M.H., R.D. Waniska and L.W. Rooney. 1990. Effects of nixtamalization on grinding conditions on the starch in masa. *Starch/Stärke* 42: 475-482.

31. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe R, et al. (2001), practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis.* 32:331-50.
32. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. (2003) Amebiasis. *N Engl J Med.* 348:1565-73.
33. Heuzé, V., Tran, G., Baumont, R., Lebas, F., Lessire, M., Noblet, J., and Renaudeau, D. (2013). Animal feeds resources information system. Wheat bran. A programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO, in Feedipedia.org. [Enlínea]. Disponible en: <http://www.feedipedia.org/node/726>.
34. Hirata KK, Que X, Melendez-Lopez SG, Debnath A, Myers S, Herdman DS, et al. (2007) A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* is less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Exp Parasitol.* 115:192-9.
35. Hossain, K., Ulven, C., Glover, K., Ghavami, F., Simsek, S., Alamri, M. S., ..., and Mergoum, M. (2013). Interdependence of cultivar and environment on fiber composition in wheat bran. *Australian Journal of Crop Science.* 7(4): 525-531.
36. Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 71:9.
37. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2005. Estadísticas sociodemográficas. Portal 13 de junio del 2007. URL; <http://www.inegi.gob.mx>

38. Javed, M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Ambreen, G., Rashee, H., and Ikram-ul-Haq (2012). Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research*. 6(4): 724-733.
39. Kumae Shashank and Abhay K. Pandey. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Pp. 1-16.
40. Liu, C., Tang, Z., Chen, Y., Su, S., & Jiang, W. (2010). Characterization of mesoporous activated carbons prepared by pyrolysis of sewage sludge with pyrolusite. *Bioresource Technology*, 101(3), 1097-1101.
41. Lucian, M., & Fiori, L. (2017). Hydrothermal Carbonization of Waste Biomass: Process Design, Modeling, Energy Efficiency and Cost Analysis. *Energies*, 10(2), 211.
42. Martínez-Palomo A. (1989). *Amibiasis*. México. Editorial Médica Panamericana. pp. 204
43. Martínez P. (1994). *Biología Celular del efecto citopático de Entamoeba histolytica*. México D.F. Trillas. pp. 66-77
44. Meyer IH. (2002) Smearing the quee. " medical bias in the medical care of gay men" (commentary). *Int J Epidemiol*. Pp. 500-3.
45. Moran P, Gómez A, Valadez A, García G, Ramos F, González E. (2009). Periodicity and patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in HIV+/ AIDS patients in México. *Ann Trop Med Parasitol* 103 (4) Pp. 307-15.

46. Moreno J. López G., Vela R., 1987. Survival of *Azotobacter* spp in dry soils. *Enviromm. Microbial.*, cap 51: pp 120-121.
47. Murguía D. Diagnóstico clínico de la amibiasis. En: Romero Cabello R (Comp). *Amibiasis en el siglo XXI*. México: Sociedad Mexicana de Parasitología e Instituto para el Desarrollo Integral de la Salud; 2008.
48. Nandini, C. D. and Salimath, P. V. (2001). Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and Bajra with Good Chapati/Roti (indian flat bread) making quality. *FoodChemistry*. 73(2): 197-203.
49. Norma Oficial Mexicana NOM-187-ssa1/scfi-2002, productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba
50. Noroeste. Tortilla icono alimentario. 2017. [en línea](actualizado el 25 de junio del 2017) Disponible en: <https://www.noroeste.com.mx/publicaciones/view/tortilla-icono-alimentario-1088827> [Último acceso el 11 de junio del 2020]
51. Olivos-García A, Saavedra E, Ramos-Martínez E, Nequiz M, Pérez-Tamayo R. (2009) Molecular nature of virulence in *Entamoebahistolytka*. *InfectGenetvol* 9, 1033-7.
52. Olivos-García A., Saavedra E., Nequiz M., Pérez-Tamayo R. (2011), Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoebahistolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina* (México). Vol 54 no.2, pp 11

53. Paliwal R.L., G. Granados., H.R. Lafitte y A.D. Violic. (2001). "El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción". FAO. Roma.
54. Parra C, S. Serna S., R Hai L. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*, 55:4177-4183.
55. Petri WA Jr, Haque R, Lyerly D, Vines RR. (2000) Estimating the impact of amebiasis on Health. *ParasitolToday*. 16 Pp. 320-1
56. Petri WA Jr. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 2003; 19 (11): 523-6.
57. Petri WA Jr, Mondal D, Peterson KM, Duggal P, Haque R. Association of malnutrition with amebiasis. *Nutr Rev* 2009; 67 (Suppl. 2):S207-15
58. Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E., and Kneifel, W. (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *Food Science and Technology*. 56(2): 211-221.
59. Quaglia, G, 1991. *Ciencia y tecnología de la panificación*. Ed. Acibia, Zaragoza.
60. Que es el maíz. Maíces del nansan, 2012, Nlog [en línea] (actualizado al 21 de noviembre del 2012) disponible en: https://maicesdelnansa.blogspot.com/2012/11/que-es-el-maiz-dentado.html?m=1&fbclid=IwAR2o7tyl7udYH5P84mD5ivZ8pSd_sqH34M4Zj_V2cIcfC8JX2LhOUM-E294 [Último acceso el 11 de junio del 2020]

61. Ralston K, Petri WA Jr. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol*; 27 (6) Pp 253-62.
62. Reisinger, M., Tirpanalan, Ö., Huber, F., Kneifel, W., and Novalin, S. (2014). Investigations on a wheat bran biorefinery involving organosolv fractionation and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*. 170: 53-61.
63. Robertfroid MB. (1998) Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. Brussels: LSI Europe. Pp 17.
64. Robinson GL. (1968), The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62: 285-94.
65. Rodríguez T., Chávez M., Thome H., Miranda G., (2017), Elaboración y consumo de tortillas como patrimonio cultural de San Pedro del Rosal, México. *Región y sociedad*. no. 70. Pp. 156-179
66. Romero R. 1993. *Microbiología y Parasitología Humana*, Editorial Médica Panamericana, México D.F.
67. Romero R. (2008). *Amibiasis en el Siglo XXI*. México D.F. Sociedad Mexicana Parasitología, A.C. pp.58-62
68. Roque L., Arámbula G., López M., Ortiz H., Carballo A., Herrera A., (2016), Nixtamalización de cinco variedades de maíz con diferente dureza de grano: impacto en consumo de combustible y cambios fisicoquímicos. *AGROCIENCIA* 50: 727-745
69. Sánchez G.J.J. (2011), *Diversidad del Maíz y el Teocintle*, "Recopilación, generación, actualización y análisis de información

acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México".(México). pp 8-11.

- 70.Saavedra E., Olivos A., (2017), Amibiasis. Revista ciencia. Volumen 68 número 1, pp. 17
- 71.Serna-Saldivar, S. O., Gomez, M.H., Rooney, L.W. (1990). Technology, Chemistry, and Nutritional Value of Alkaline- Cooked Corn Products. Cap. 4. En: Advances in Cereal Sci. &Technology. Vol. X., Y. Pomeranz, ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul,MN.
- 72.Serna-Saldivar, S.O. 1998. Evaluación de la calidad protéica nutrimental de dos harinas mixtamalizadas (regular y fortificada) mediante bioensayos con ratas de laboratorio. Reporte de asesoría. Grupo Industrial Maseca, S.A. Monterrey, N.L., México.Reporte de asesoría. Grupo Industrial Maseca, S.A. Monterrey, N.L., Mexico
- 73.Snow M, Chen M, Guo J, Atkinson J, Stanley SL Jr. Differences in complement-mediated killing of *Entamoeba histolytica* between men and women-an explanation for the increased susceptibility of men to invasive amebiasis. Am J TropMedHyg 2008; Pp.922-3.
- 74.Stevenson, L., Phillips, F., O'sullivan, K., and Walton, J. (2012). Wheat bran: its composition and benefits to health, a european perspective. International Journal of FoodSciences and Nutrition. 63(8): 1001-1013.
- 75.Timberlake C.F.(1980). Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry. FoodChemistry, 5:69-80.

76. Tomás-Barberán, F; Msonthi, J y Hostettmann, K; *Pytochemistry*; 27; 753 (1988).
77. Torres, R; Modak, B; Urzúa, A; Villarroel, L; DelleMonache, F y Sanchez-Ferrando, F; *Bol. Soc. Chil. Quim*; 41, 195 (1996).
78. UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009 (en línea). Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/pueblos.php?I=2&t=ocuilteco&demand=empacho&orden=14&v=m#demanda>. (Último acceso Septiembre 2019).
79. Verdalet G.I., M.M.Ojeda. R. y Ë.R. Silva. H. 2001. Diagnóstico alimentario y nutricional en familias mexicanas. *Información Tecnológica* 5:12-79.
80. Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. A DNA Sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun*. 1999; 67: 5925-9.
81. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872013000500009
82. <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/133-amebiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial>
83. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v11n1/v11n1a06.pdf>
84. <http://www.scielo.br/pdf/csp/v25n1/16.pdf>
85. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei112e.pdf>

86. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/64_2/PDF/EntamoebaHistolytica.pdf