

# TORTILLAS MADE WITH EXTRUDED FLOURS OF BLUE MAIZE AND CHÍA SEEDS AS AN NUTRITIOUS AND NUTRACEUTICAL FOOD OPTION

## TORTILLAS PREPARADAS CON HARINAS EXTRUIDAS DE MAÍZ AZUL Y SEMILLAS DE CHÍA COMO UNA OPCIÓN DE ALIMENTO NUTRITIVO Y NUTRACÉUTICO

Jorge Rodolfo León-Murillo<sup>1</sup>, Roberto Gutiérrez-Dorado<sup>1,2</sup>, Rosalía Reynoso-Camacho<sup>3</sup>, Jorge Milán-Carrillo<sup>1,2</sup>, Janitzio Xiomara Korina Perales-Sánchez<sup>1,2</sup>, Edith Oliva Cuevas-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Cd Universitaria, AP 1354, Culiacán, Sinaloa. 80000 México. <sup>2</sup>Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB-UAS, Ciudad Universitaria, AP 1354, Culiacán, Sinaloa. 80000 México. (creyes@uas.edu.mx). <sup>3</sup>Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro. Apdo. Postal 184, Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas. Querétaro, Querétaro. 76010 México.

### ABSTRACT

Tortillas with adequate nutrients and phytochemicals as a recommended option may improve health in older adults. In this research tortillas were prepared with native blue maize (*Zea mays* L.) and chía (*Salvia hispanica*) seeds processed by alkaline extrusion. The hypothesis was that alkaline extrusion would generate flours of both seeds with improved nutraceutical and nutritional characteristics compared to traditional products. The aim was then to evaluate extruded defatted chía flour addition on nutritional and nutraceutical properties of tortillas made with extruded native blue maize flour. Tortillas were prepared with a mixture 75% extruded blue maize flour +25% extruded defatted chía flour. Other tortillas from 100% extruded blue maize flour and commercial lime-cooked maize flour (Blue MASECA®) were used as control and reference. Nutritional, antioxidant, antihypertensive and hypoglycaemic properties of tortillas were evaluated *in vitro*. A completely randomized experimental design with one factor (type of tortilla) was used for data analysis. Tortillas added with extruded chía flour had higher protein, dietary fibre, essential amino acid (EAA) profile, *in vitro* protein digestibility (IVPD), and calculated protein efficiency ratio (C-PER) than control and reference tortillas. Tortillas with addition of extruded chía flour also had better antioxidant activity [oxygen radical absorbance capacity, (ORAC) 18006 vs 15531 Trolox equivalent, (TE)  $\mu\text{mol}$  per 100g of dry weight, (DW) sample], and better antihypertensive [(ACE) angiotensin-

### RESUMEN

Tortillas con nutrientes y fitoquímicos adecuados pueden ser opción para mejorar la salud de los adultos mayores. En esta investigación se preparó tortillas con harinas de maíz azul nativo (*Zea mays* L.) y chía (*Salvia hispanica*) procesadas por extrusión alcalina. La hipótesis fue que la extrusión alcalina generaría harinas con características nutraceuticas y nutricionales mejores respecto al producto tradicional. El objetivo fue evaluar la adición de harina de chía desgrasada extruida sobre propiedades nutricionales y nutraceuticas de tortillas elaboradas con harina de maíz azul nativo extruido. Estas tortillas se prepararon con una mezcla 75% de harina de maíz azul extruido +25% de harina de chía desgrasada extruida. Como control y referencia se utilizaron otras tortillas hechas con 100% de harina de maíz azul extruido y harina comercial de maíz cocido con cal (MASECA® azul). Propiedades nutricionales, antioxidantes, antihypertensivas e hipoglucemiantes de las tortillas se evaluaron *in vitro*. Para analizar los datos se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con un factor (tipo de tortilla). Las tortillas con adición de harina de chía extruida presentaron valores mayores de contenido de proteínas, contenido de fibra dietética, perfil de aminoácidos esenciales (EAA), digestibilidad proteínica *in vitro* (IVPD) y relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER) que las tortillas de control y de referencia. Las tortillas con adición de harina de chía extruida también presentaron mejor actividad antioxidante [capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), equivalentes de Trolox (TE) 18006 vs 15531  $\mu\text{mol}$  por 100g de muestra en (DW) peso seco], potencial antihypertensivo [inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, (ACE)  $\text{IC}_{50}=0.47$  vs. 0.65 mg de extracto  $\text{mL}^{-1}$ ] e hipoglucemiante ( $\text{IC}_{50}=20.07$  frente a 25.81 mg de extracto  $\text{mL}^{-1}$  para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa,

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4384-1286>.

Received: December, 2020. Approved: September, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 487-506. 2021.

converting enzyme inhibition,  $IC_{50}=0.47$  vs  $0.65$  extract  $mg\ mL^{-1}$ ] and hypoglycaemic ( $IC_{50}=20.07$  vs  $25.81$  extract  $mg\ mL^{-1}$  to  $\alpha$ -amylase inhibition, and  $IC_{50}=16.25$  vs  $19.69$  extract  $mg\ mL^{-1}$  to  $\alpha$ -glucosidase inhibition) potential than tortillas from 100% extruded blue maize flour. The use of extruded chía flour and blue maize flour allowed obtaining tortillas with enhanced nutritional, antioxidant, antihypertensive, and hypoglycaemic properties. The extrusion process consumes few water volumes without generating polluting effluents. An appropriate public policy in Mexico may promote these tortillas to be used to fight against malnutrition, and to reduce incidences of chronic degenerative diseases such as hypertension or diabetes.

**Key words:** maize tortillas, *Salvia hispanica*, older adults, alkaline extrusion, nutritional, nutraceutical.

## INTRODUCTION

In México, based on the 2018 Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID), there are 15.4 million older adults (OA) (60 years and older) in the country (INEGI, 2019). The increment in the population of OA has caused accumulation of some chronic degenerative diseases such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes, hypertension, cancer, among others (Prince *et al.*, 2015). Older adults experience changes in body composition related to age; one of the consequences of aging is that your muscles gradually weaken. The most severe cases are referred to as age-related sarcopenia, which is one of the main causes of frailty, bone fractures, and reduced quality of life among OA. Eating more protein is one of the best ways to reduce age-related muscle deterioration and prevent sarcopenia (Hida *et al.*, 2014).

In México, the main food product based on maize is the tortilla. The national population consume 1400 million tortillas per day. One of the main limitations in tortillas is the lack of lysine (León-López *et al.*, 2019). Tortillas are an excellent vehicle to enhance nutrition options for maize consumers, including OA. Maize kernels provide macronutrients (proteins, starch, dietary fibres, lipids) and micronutrients (vitamins, minerals). White and yellow maize are the most used for making tortillas, but in some regions blue maize is also used. Blue maize derived products have received increased attention due to their potential health benefits, as antioxidant, antimutagenic, anti-inflammatory, hypoglycemic.

e  $IC_{50}=16.25$  vs.  $19.69$   $mg$  de extracto  $mL^{-1}$  para la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa) mejor que las tortillas de 100% harina de maíz azul extruido. El uso de harinas extruidas de chía y maíz azul permitió obtener tortillas con propiedades nutricionales, antioxidantes, antihipertensivas e hipoglucemiantes mejoradas. El proceso de extrusión consume volúmenes de agua menores sin generar efluentes contaminantes. Una política pública adecuada en México puede promover el uso de estas tortillas para combatir la desnutrición y reducir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como hipertensión o diabetes.

**Palabras clave:** tortillas de maíz, *Salvia hispanica*, adultos mayores, extrusión alcalina, nutricional, nutracéutico.

## INTRODUCCIÓN

En México, con base en la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID) 2018, existen 15.4 millones de adultos mayores (OA) (60 años y más) en el país (INEGI, 2019). El incremento en la población de OA ha provocado la acumulación de algunas enfermedades crónico-degenerativas como las cardiovasculares, la diabetes tipo 2, la hipertensión, el cáncer, entre otras (Prince *et al.*, 2015). Los adultos mayores experimentan cambios en la composición corporal relacionados con la edad; una de las consecuencias del envejecimiento es que sus músculos se debilitan gradualmente. Los casos más graves se denominan sarcopenia relacionada con la edad que es una de las principales causas de fragilidad, fracturas óseas y reducción de la calidad de vida entre los OA. El consumo de más proteínas es una de las mejores maneras de reducir el deterioro muscular relacionado con la edad y prevenir la sarcopenia (Hida *et al.*, 2014).

En México, el principal producto alimenticio a base de maíz es la tortilla. La población nacional consume 1400 millones de tortillas al día. Una de las principales limitaciones en las tortillas es la falta de lisina (León-López *et al.*, 2019). Las tortillas son un vehículo excelente para mejorar las opciones nutricionales de los consumidores de maíz, incluidos los OA. Los granos de maíz proporcionan macronutrientes (proteínas, almidón, fibra dietética, lípidos) y micronutrientes (vitaminas, minerales). Los maíces blanco y amarillo son los más utilizados para hacer tortillas, pero en algunas regiones también se utiliza el maíz azul. Los productos derivados del maíz azul

Also, hypocholesterolaemic, antiatherosclerosis, anti-obesogenic, antiaging, anticancer; mainly due to the presence of compounds such as phenolic acids and anthocyanins (Serna-Saldívar *et al.*, 2013).

*Salvia hispanica* L. (Chía) is native to Mesoamerica; in 3500 B.C.E was used by Mayas and Aztecs as food and medicine (Orona-Tamayo *et al.*, 2016). Chía seeds dry weight (DW), contain approximately 15-25% protein, and 29-34% fat. Chía lipids possess almost 35-64% linolenic acid ( $\omega$ -3), and 17-35% linoleic acid ( $\omega$ -6) (León-López *et al.*, 2019). Chía seeds are a source of antioxidants due to the presence of some polyphenols as phenolic acids, flavonoids, or isoflavones (Orona-Tamayo *et al.*, 2016). Several biological activities, among them anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, hypoglycaemic, which help to prevent cardiovascular diseases, or cancer are associated with dietary polyphenols (Orona-Tamayo *et al.*, 2016).

Extrusion cooking uses high-temperature and pressure, and high-shear conditions in a short period result in molecular transformation and chemical reactions within the extruded products. Extrusion improves starch and protein digestibility and increases the retention of bioactive compounds and soluble dietary fibre (Reyes-Moreno *et al.*, 2018). Under the hypothesis that alkaline extrusion would generate flours of seeds of *Z. mays* and *S. hispanica* with improved nutraceutical y nutritional characteristics compared to the traditional product; the aim of this study was to evaluate extruded defatted chía flour addition on nutritional and nutraceutical properties of tortillas made from extruded native blue maize flour.

## MATERIALS AND METHODS

### Functional seeds used

Whole lots of native blue maize and black chía seeds were acquired in the "Rafael Buelna" market, which is located on the Hermenegildo Galeana St., in the first square of Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

### Production of extruded native blue maize (ECBMF) and defatted chía (EDCF) flours

For the production of extruded blue maize and defatted chía flours, some optimized processing conditions pertaining our

han recibido atención mayor debido a sus beneficios potenciales para la salud, como antioxidante, antimutagénico, antiinflamatorio, hipoglucemiante. También como, hipocolesterolémico, antiaterosclerótico, anti-obesogénico, antienvjecimiento, anticancerígeno, debido a la presencia de compuestos como ácidos fenólicos y antocianinas (Serna-Saldívar *et al.*, 2013).

La chía (*Salvia hispanica* L.) es originaria de Mesoamérica; en el año 3500 a.EC. mayas y aztecas la utilizaban como alimento y medicina (Orona-Tamayo *et al.*, 2016). Las semillas de chía en peso seco (DW), contienen aproximadamente 15-25% de proteína y 29-34% de grasa. Los lípidos de la chía poseen casi un 35-64% de ácido linoléico ( $\omega$ -3), y un 17-35% de ácido linoleico ( $\omega$ -6) (León-López *et al.*, 2019). Las semillas de chía son una fuente de antioxidantes debido a la presencia de algunos polifenoles como ácidos fenólicos, flavonoles o isoflavonas (Orona-Tamayo *et al.*, 2016). Diversas actividades biológicas, entre ellas antiinflamatoria, antioxidante, antihipertensiva, hipoglucemiante, las cuales ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares o cáncer, están asociadas con los polifenoles en la dieta (Orona-Tamayo *et al.*, 2016).

La cocción por extrusión utiliza temperatura alta y presión, y condiciones de alto cizallamiento en un período corto dando como resultado transformación molecular y reacciones químicas dentro de los productos extruidos. La extrusión mejora la digestibilidad del almidón y la proteína y aumenta la retención de compuestos bioactivos y fibra dietética soluble (Reyes-Moreno *et al.*, 2018). Bajo la hipótesis de que la extrusión alcalina generaría harinas de semillas de *Z. mays* y *S. hispanica* con características nutracéuticas y nutricionales mejores respecto al producto tradicionales mejores respecto al producto tradicional, el objetivo de este estudio fue evaluar la adición de harina de chía desgrasada extruida sobre las propiedades nutricionales y nutracéuticas de tortillas elaboradas con harina de maíz azul nativo extruido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Semillas funcionales utilizadas

Lotes de maíz azul nativo y semillas de chía negra se adquirieron en el mercado "Rafael Buelna" que se encuentra en la calle Hermenegildo Galeana, en la plaza principal de Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

laboratory were used (Milán-Carrillo *et al.*, 2006; León-López *et al.*, 2019). Chía seeds were defatted using an oil press machine (model DL-ZYJ05). Batches of 500g of seeds native blue maize or defatted chía were ground in a domestic blender to obtain fine powder and grits that passed through a US40 (0.425 mm) screening mesh but were retained over a US200 (0.074 mm) screening mesh. The grits were mixed with lime (0.21g per100g grits) and water to achieve a water content of 28g per 100g of wet grits. All lots were packed and stored at 4 °C for 12 h. Before extrusion, the grits were tempered (25 °C).

The extrusion procedures were carried out on a single screw laboratory extruder Model 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, USA). The extruder optimal operation conditions for seeds (Extrusion temperature, ET and screw speed, SS) were for native blue maize, ET=85 °C at SS=240 rpm (Milán-Carrillo *et al.*, 2006); and for defatted chía: ET=147 °C at SS=237 rpm (León-López *et al.*, 2019). Extrudate material was cooled, equilibrated at environmental conditions, milled to pass through a US80 screening mesh and packed. Extruded native blue maize and defatted chía flours were stored at 4 °C.

### Quality evaluation of tortillas

Tortillas were prepared from the flour mixture 75% extruded blue maize flour+25% extruded defatted chía flour, this proportion of flours was chosen based on a preliminary study (León-López *et al.*, 2019). Also, tortillas from 100% ECBMF and commercial lime-cooked maize flour (Blue MASECA®) were used as control and reference. The reference MASECA® product is the commercial contemporary version of *nixtamal*, which is an ancient Mexican product. It is obtained cooking maize kernels in water and lime, then ground to make dough for tortillas.

The tortillas were prepared with water at 30 °C until obtaining an adequate consistency. Tortillas puffing was evaluated throughout their cooking using a 1 to 3 scale: 1=no puffing, 2=intermediate puffing, and 3=complete puffing (Milán-Carrillo *et al.*, 2006). The tortilla rollability was performed 30 min after preparation. Tortillas rolled in a glass stick of 2.54 cm of diameter, and the degree of breakage of tortilla surface (0-100%) indicated the rollability (1-5) based on the Bedolla and Rooney's scale as it follows: 0%=1, 25%=2, 50%=3, 75%=4 and 100%=5 (Milán-Carrillo *et al.*, 2006).

For sensory evaluation of tortillas, squared pieces pre-heated at 45 °C were presented in one plate to taste. The testing panel (120 panellists; ages ranging between 18-62 y) were habitual tortilla consumers who assessed flavour, odour, colour, texture, and general acceptance. The panellists were asked to indicate their degree of liking or disliking using a 9-category hedonic scale (1= extremely disliking to 9= extremely liking). Samples of tortillas

### Producción de harinas extruidas de maíz azul nativo (ECBMF) y de chía desgrasada (EDCF)

Para la producción de harinas extruidas de maíz azul y de chía desgrasada se utilizaron condiciones de proceso optimizadas propias de nuestro laboratorio (Milán-Carrillo *et al.*, 2006; León-López *et al.*, 2019). Las semillas de chía se desgrasaron primero con una máquina de prensado de aceite (modelo DL-ZYJ05). Lotes de 500 g de semillas de maíz azul nativo o de chía desgrasada se colocaron en una licuadora doméstica para obtener sémola, la cual se pasó por una malla de cribado US40 (0.425 mm) y se retuvo sobre una malla de cribado US200 (0.074 mm), junto con polvo fino. La sémola se mezcló con cal (0.21 g por 100 g de sémola) y agua para conseguir un contenido de agua de 28 g por 100 g de sémola húmeda. Todos los lotes se envasaron y se almacenaron a 4 °C durante 12 h. Antes de la extrusión, la sémola se atemperó (25 °C).

Los procedimientos de extrusión se llevaron a cabo en un extrusor de laboratorio de un solo tornillo Modelo 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, USA). Las condiciones óptimas de operación del extrusor para las semillas (temperatura de extrusión, ET y velocidad del tornillo, SS) fueron para el maíz azul nativo, ET=85 °C a SS=240 rpm (Milán-Carrillo *et al.*, 2006); y para la chía desgrasada, ET=147 °C a SS=237 rpm (León-López *et al.*, 2019). El material extruido se dejó enfriar, equilibrar en condiciones ambientales; se molió para pasar por una malla de cribado US80 y se envasó. Las harinas extruidas de maíz azul nativo y de chía desgrasada se almacenaron a 4 °C.

### Evaluación de la calidad de las tortillas

Las tortillas se elaboraron a partir de la mezcla de harinas 75% harina de maíz azul extruido+25% harina de chía desgrasada extruida; la proporción se eligió con base en un estudio preliminar (León-López *et al.*, 2019). También se utilizaron tortillas de 100% ECBMF y harina comercial de maíz cocido con cal (MASECA® azul) como control y referencia. El producto MASECA® de referencia es la versión comercial contemporánea del *nixtamal*, el cual es un producto mexicano ancestral que se obtiene al cocer granos de maíz en agua con cal, y luego se muele para hacer masa para tortillas.

Las tortillas se prepararon con agua a 30 °C hasta obtener una consistencia adecuada. El inflado de las tortillas se evaluó durante la cocción con una escala de 1 a 3; 1=sin inflado, 2=inflado intermedio y 3=inflado completo (Milán-Carrillo *et al.*, 2006). La característica de enrollado ("rolabilidad") de la tortilla se realizó 30 min después de su elaboración. Las tortillas se enrollaron en una varilla de cristal de 2.54 cm de diámetro, y el grado de rotura de la superficie de la tortilla (0-100%) indicó la

were dried and milled to pass through a US80 screening mesh to determine chemical composition, nutritional and nutraceutical properties; then packed in plastic bags.

#### **Chemical composition, soluble and insoluble dietary fibre (SDF-IDF)**

The following methods of the AOAC (2012) were used to evaluate proximate composition: Moisture (925.09B): drying at 130 °C; lipids (method 920.39C): defatting in a Soxhlet apparatus with petroleum ether; protein (method 960.52): micro-Kjeldahl (Nx6.25); soluble and insoluble dietary fibre (method 985.29): enzymatic-gravimetric method for total dietary fibre.

#### **Nutritional properties: essential amino acid (EAA), *in vitro* protein digestibility (IVPD), chemical score (CS), and calculated protein efficiency ratio (C-PER)**

The EAA composition was determined using an analytical scale (4.6×250 mm) hypersil ODS C18 column (SGE, Dandenong, Australia) kept at 38 °C and connected to a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (GBC, Dandenong, Australia). HPLC equipped with a fluorescence detector >LC 5100 set respectively at 270 and 316 nm for excitation and emission. Tryptophan was detected at 280 nm with an ultraviolet detector (León-Lopez *et al.*, 2019). The IVPD was quantified using a multi-enzyme system (Rathod and Annapure, 2016) with little modifications. The chemical score (CS) was calculated as  $CS = (\text{Content of the most limiting EAA}/\text{REAAAR}) \times 100$ ; where EAA=essential amino acid and REAAAR=recommended amino acid requirements for children (3-years-old and older) and adults (FAO, 2013). C-PER (calculated protein efficiency ratio) was calculated based on the IVPD and the EAA composition of the sample as it is summarized by the AOAC (2012). All determinations were carried out in triplicate.

#### **Extraction of free and bound phytochemical compounds**

The extraction of free and bound phenolics was done according to the method described by Mora-Rochín *et al.* (2010). The solvents used to the extraction of free and bound phytochemical compounds were respectively 80% chilled ethanol and ethyl acetate. All extractions were performed by triplicate.

#### **Antioxidant activity (AoxA) and total phenolic content (TPC)**

The 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolline-6-sulfonic acid), ABTS assay was performed diluting free and bound extracts with ethanol. Aliquots of 20 µL of each dilution were taken

rolabilidad (1-5) con base en la escala de Bedolla y Rooney, como sigue 0%=1, 25%=2, 50%=3, 75%=4 y 100%=5 (Milán-Carrillo *et al.*, 2006).

Para la evaluación sensorial de las tortillas, se presentó a los panelistas trozos cuadrados de tortilla en un plato, precalentados a 45 °C para su degustación. El panel de evaluadores (120 panelistas; edades entre 18 y 62 años) eran consumidores habituales de tortillas que evaluaron el sabor, el olor, el color, la textura y la aceptación general. A los panelistas se pidió que indicaran su grado de agrado o desagrado en una escala hedónica de 9 categorías (1= extremadamente desagradable a 9= extremadamente agradable). Las muestras de tortillas se secaron y se molieron para que pasaran por una malla de cribado US80 para determinar la composición química y las propiedades nutricionales y nutraceuticas; después se envasaron en bolsas de plástico.

#### **Composición química, fibra dietética soluble e insoluble (SDF-IDF)**

Para evaluar la composición proximal se utilizaron métodos de la AOAC (2012). Humedad (925.09B): secado a 130 °C; lípidos (método 920.39C): desengrasado en un aparato Soxhlet con éter de petróleo; proteínas (método 960.52): micro-Kjeldahl (Nx6.25); fibra dietética soluble e insoluble (método 985.29): método enzimático-gravimétrico para la fibra dietética total.

#### **Propiedades nutricionales: aminoácidos esenciales (EAA), digestibilidad proteínica *in vitro* (IVPD), calificación química (CS) y relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER)**

La composición de EAA se determinó con una columna hypersil ODS C18 de escala analítica (4.6×250 mm) (SGE, Dandenong, Australia) mantenida a 38 °C y conectada a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (GBC, Dandenong, Australia). El HPLC estaba equipado con un detector de fluorescencia >LC 5100 con ajustes respectivos a 270 y 316 nm para excitación y emisión. El triptófano se detectó a 280 nm con un detector ultravioleta (León-López *et al.*, 2019). La IVPD se cuantificó con el uso de un sistema multi enzimático (Rathod y Annapure, 2016) con modificaciones. La calificación química (CS) se calculó como  $CS = (\text{Contenido más limitante de EAA}/\text{REAAAR}) \times 100$ ; donde EAA= aminoácido esencial y REAAAR= requerimientos de aminoácidos recomendados para niños a partir de los 3 años y adultos (FAO, 2013). El C-PER (relación de eficiencia proteínica calculada) se calculó en base al IVPD y a la composición de EAA de la muestra tal y como lo resume la AOAC (2012). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

and mixed with 2.0 mL of diluted radical cation ABTS<sup>+</sup>; 6 min later the absorbance was determined at 734 nm in a UV-visible spectrophotometer (GENESYS 10UV, Thermo electron, Inc, Madison, WI, USA). The oxygen radical absorbance capacity - ORAC assay was done, diluting free and bound phenolic extracts in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). Aliquots of 25  $\mu$ L of diluted extracts mixed with 150 mL of fluorescein (0.1 mM) and 25  $\mu$ L of the peroxy radical 2,2-azobis(2-amidopropane dihydrochloride, AAPH (200 mM). After 30 min, fluorescence (485 nm for excitation and 538 nm for emission) was measured at 37 °C and 2 min intervals for 60 min, using a Synergy microplate reader (Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT).

The results of ABTS and ORAC assays were expressed as [Trolox equivalent, TE  $\mu$ mol per 100g of dry weight, DW sample]. The TPC of free and bound extracts was determined using 20 mL of appropriate dilutions of extracts, oxidized with 180 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After 20 min, the resulting blue color's absorbance was measured at 750 nm. TPC was reported as Gallic acid equivalent, GAE mg per 100 g of dry weight, DW sample. All measurements were carried out in triplicate.

#### Antihypertensive potential (IC<sub>50</sub>)

The ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitory activity in total phenolic extracts (sum of free and bound phenolic extracts) was determined using the Dojindo ACE Kit-WST test kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). This method is based on an indicator colorimetric detection after a redox reaction. The absorbance (Abs) at 450 nm was measured using a Microplate Reader (Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). The IC<sub>50</sub> (concentration of phenolic extract that caused an inhibition of 50% in the ACE activity) values were calculated from different concentrations of the phenolic extracts and ACE inhibitory activity values using the Prism v5 software (GraphPad Prism) (León-López *et al.*, 2019).

#### Hypoglycaemic potential [ $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase inhibition activities]

The inhibitory activity of total phenolic extracts (sum of free and bound phenolic extracts) against  $\alpha$ -amylase was determined by the colorimetric measurement of maltose released after stopping the starch reaction and  $\alpha$ -amylase with 3,5-dinitrosalicylic acid (Kazeem *et al.*, 2013). The inhibitory activity of these extracts against  $\alpha$ -glucosidase was determined by measuring the formation of p-nitrophenol by  $\alpha$ -glucosidase

#### Extracción de compuestos fitoquímicos libres y ligados

La extracción de los fenoles libres y ligados se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Mora-Rochín *et al.* (2010). Los disolventes utilizados para la extracción de los compuestos fitoquímicos libres y ligados fueron respectivamente etanol refrigerado al 80% y acetato de etilo. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

#### Actividad antioxidante (AoxA) y contenido de fenólicos totales (TPC)

El ensayo del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS, se realizó por dilución de extractos libres y ligados con etanol. Alícuotas de 20  $\mu$ L se tomaron de cada dilución y se mezclaron con 2.0 mL del catión radical ABTS<sup>+</sup> diluido y 6 min después se determinó la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-visible (GENESYS 10UV, Thermo electron, Inc, Madison, WI, USA). El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno, ORAC, se llevó a cabo con la dilución de los extractos fenólicos libres y ligados en tampón de fosfatos 75 mM (pH 7.4). Alícuotas de 25  $\mu$ L de extractos diluidos se mezclaron con 150 mL de fluoresceína (0.1 mM) y 25  $\mu$ L del radical peróxido 2,2-azobis(2-amidopropano dihidrocloruro, AAPH (200 mM). Después de 30 min, se midió la fluorescencia (485 nm para excitación y 538 nm para emisión) a 37 °C en intervalos de 2 minutos durante 60 minutos, por medio de un lector de microplacas Synergy (Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT).

Los resultados de los ensayos ABTS y ORAC se expresaron como [equivalentes de Trolox (TE) en  $\mu$ mol por 100g de muestra en peso seco (DW)]. El TPC de los extractos libres y ligados se determinó por 20 mL de diluciones apropiadas de los extractos, oxidados con 180 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 20 minutos, se midió la absorbancia del color azul resultante a 750 nm. El TPC se reportó como equivalente de ácido gálico, GAE mg por 100 g de muestra en peso seco, DW. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### Potencial antihypertensivo (IC<sub>50</sub>)

La actividad inhibidora de la ACE (enzima convertidora de angiotensina) en los extractos fenólicos totales (suma de los extractos fenólicos libres y ligados) se determinó con el kit de prueba Dojindo ACE Kit-WST (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japón). Este método se basa en una detección colorimétrica del indicador tras una reacción redox. La absorbancia (Abs) a 450 nm se midió a través de un lector de microplacas (Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). Los valores

after reacting with p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNP) (Kazeem *et al.*, 2013). The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition percentages were calculated using the following equations:

$\alpha$ -amylase inhibition (%)=

$$[(A_{540}\text{control} - A_{540}\text{extract}) / (A_{540}\text{control})] \times 100$$

$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)=

$$[(A_{405}\text{control} - A_{405}\text{extract}) / (A_{405}\text{control})] \times 100$$

IC<sub>50</sub> values (%) were calculated from the plots of inhibition percentage *vs.* concentration of phenolic extract using the Prism v5 software (GraphPad Prism).

### Statistical analyses

Data on the chemical composition, nutritional properties, antioxidant activity, phenolic compounds content, and nutraceutical properties of flours and tortillas were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the multiple mean comparison test (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Nutritional and nutraceutical properties of extruded blue maize and defatted chía flours

#### Chemical composition and nutritional properties

The protein content (% dry weight, DW) of extruded native blue maize and defatted chía flours was 10.05 and 31.57%. The lipid content of extruded grain flours ranged from 5.88 to 6.08%, DW; the extruded defatted chía flour had the lowest value. This flour had higher mineral content than extruded blue maize flour (5.22 *vs.* 1.69%, DW). The dietary fibre content varied from 12.78%, DW (extruded blue maize flour) to 48.50%, DW (extruded defatted chía flour). In both flours, the highest dietary fibre corresponded to the insoluble dietary fibre fraction whose content ranged from 10.70%, DW (extruded blue maize flour) to 40.49%, DW (extruded defatted chía flour), a similar behaviour to the corresponding unprocessed grains. While extrusion did not show significant changes ( $p > 0.05$ ) in protein content between unprocessed grains and extruded grains.

However, a small decrease in lipid content was found associated with the extrusion process conditions used (extrusion temperature, screw speed, pressure, high-shear force), causing complex

of IC<sub>50</sub> (concentración de extracto fenólico que provocó una inhibición del 50% en la actividad de la ACE) se calcularon a partir de concentraciones diferentes de los extractos fenólicos y de los valores de actividad inhibitoria de la ACE con el programa Prism v5 (GraphPad Prism) (León-López *et al.*, 2019).

### Potencial hipoglucemiante [actividades de inhibición de la $\alpha$ -amilasa y la $\alpha$ -glucosidasa]

La actividad inhibitoria de los extractos fenólicos totales (suma de los extractos fenólicos libres y ligados) contra la  $\alpha$ -amilasa se determinó mediante la medición colorimétrica de la maltosa liberada tras detener la reacción del almidón y de la  $\alpha$ -amilasa con ácido 3,5-dinitrosalicílico (Kazeem *et al.*, 2013). La actividad inhibitoria de estos extractos contra la  $\alpha$ -glucosidasa se determinó al medir la formación de p-nitrofenol por parte de la  $\alpha$ -glucosidasa tras reaccionar con el p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNP) (Kazeem *et al.*, 2013). Los porcentajes de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa se calcularon por medio de las ecuaciones siguientes:

$\alpha$ -inhibición de la amilasa (%)=

$$[(A_{540}\text{control} - A_{540}\text{extracto}) / (A_{540}\text{control})] \times 100$$

$\alpha$ -inhibición de la glucosidasa (%)=

$$[(A_{405}\text{control} - A_{405}\text{extracto}) / (A_{405}\text{control})] \times 100$$

Los valores IC<sub>50</sub> (%) se calcularon a partir de los gráficos del porcentaje de inhibición *vs.* la concentración del extracto fenólico, con el uso del programa Prism v5 (GraphPad Prism).

### Análisis estadísticos

Los datos sobre la composición química, las propiedades nutricionales, la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos, y las propiedades nutraceuticas de harinas y tortillas se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Propiedades nutricionales y nutraceuticas de las harinas extruidas de maíz azul y de chía desgrasada

#### Composición química y propiedades nutricionales

El contenido de proteínas (% peso seco, DW) de las harinas extruidas de maíz azul nativo y de chía desgrasada fue de 10.05 y 31.57%. El contenido en

formation between lipids and other macromolecules (starch), making its extraction difficult and causing an apparent decrease in the lipid content in the samples (Félix-Medina *et al.*, 2020). Also, minerals and insoluble fibre experienced an increase in both seeds after the extrusion process. This mineral increase may be due to the addition of lime during the conditioning of both flours (Mora-Rochín *et al.*, 2010; León-López *et al.*, 2019). While the increase in insoluble dietary fibre content can be attributed to the formation of materials (protein-polysaccharide complexes) resistant to enzymatic degradation that are generated during the heating-cooling cycles that occur during extrusion (Félix-Medina *et al.*, 2020).

In general, the EAA content in both extruded seed flours were higher than those of the pattern suggested by FAO (2013) for the requirement of EAA for children (3-years-old and older) and adults (Table 1). In both processed seed flours Lys showed to be a limiting EAA. The extrusion process caused a small decrease in the EAA content of both seed flours (data comparison to unprocessed seeds are not

lípido de las harinas de semillas extruidas osciló entre el 5.88 y el 6.08%, DW; la harina de chía desgrasada extruida tuvo el valor más bajo. Esta harina tenía un mayor contenido en minerales que la harina de maíz azul extruido (5.22 frente a 1.69%, DW). El contenido de fibra dietética varió entre el 12.78%, DW (harina de maíz azul extruido) y el 48.50%, DW (harina de chía desgrasada extruida). En ambas harinas, la mayor cantidad de fibra dietética correspondió a la fracción de fibra dietética insoluble, cuyo contenido osciló entre el 10.70%, DW (harina de maíz azul extruido) y el 40.49%, DW (harina de chía desgrasada extruida), un comportamiento similar al de los correspondientes granos sin procesar. Mientras que la extrusión no mostró cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en el contenido de proteínas entre los granos sin procesar y los granos extruidos.

Sin embargo, se encontró una disminución pequeña en el contenido de lípidos, asociada con las condiciones del proceso de extrusión utilizadas (temperatura de extrusión, velocidad del tornillo, presión, fuerza de cizallamiento). Esto provocó la formación

**Table 1. Nutritional properties of commercial *nixtamal* blue maize flour (blue MASECA™), and extruded native blue maize and defatted chia flours.**

**Cuadro 1. Propiedades nutricionales de la harina de maíz azul nixtamalizada comercial (MASECA® azul), y de las harinas extruidas de maíz azul nativo y de chía desgrasada.**

Property	Blue MASECA™	Extruded blue maize flour	Extruded defatted chia flour	FAO†
EAA‡ (g per 100g protein)				
His	2.66±0.04b	3.23±0.02a	2.07±0.03c	1.60
Ile	2.93±0.02b	2.71±0.05c	3.31±0.08a	3.00
Leu	12.96±0.08a	8.01±0.04b	6.08±0.15c	6.10
Lys	2.96±0.03c	3.73±0.05b	4.72±0.13a	4.80
Met+Cys	3.82±0.06b	5.60±0.04a	2.53±0.07c	2.30
Phe+Tyr	7.69±0.04a	6.52±0.06b	5.11±0.13c	4.10
Thr	2.89±0.03b	2.95±0.03a	2.61±0.08c	2.50
Trp	0.51±0.03c	0.61±0.02b	1.60±0.05a	0.66
Val	4.62±0.04b	5.76±0.05a	4.37±0.09c	4.00
Total	41.04	39.12	32.40	29.06
EAA Chemical score				
Limitant AAE	Lys	Lys	Lys	
IVPD§ (%)	72.01±0.10c	77.32±0.12b	85.09±0.12a	
C-PER <sup>b</sup>	1.13±0.02c	1.69±0.04b	2.19±0.03a	

<sup>a,b</sup> Means with different letter per row are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) <sup>†</sup>EAA requirements for children (3 years and older), and adults according to FAO (2013); <sup>‡</sup>EAA = Essential amino acid(s); <sup>§</sup>IVPD = *In vitro* protein digestibility (%); <sup>b</sup>C-PER = Calculated protein efficiency ratio. <sup>•</sup> <sup>a,b</sup> Letras diferentes por fila indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) <sup>†</sup>EAA requerimientos para niños (a partir de 3 años) y adultos de acuerdo con FAO (2013); <sup>‡</sup>EAA = aminoácido esencial (es); <sup>§</sup>IVPD = digestibilidad proteínica *in vitro* (%); <sup>b</sup>C-PER = relación de eficiencia proteínica calculada.

shown). It has been reported that the loss of some EAA is directly proportional to the intensity of the extrusion conditions (temperature, screw speed, moisture content), where screw speed variable is that with the greatest impact. Also, it is due to the Maillard reaction, where amino group of lysine reacts with the reducing sugar (Félix-Medina *et al.*, 2021). The *in vitro* protein digestibility (IVPD) of extruded seed flours was 77.32 - 85.09% (Table 1). The extrusion process caused an increase in both blue maize and defatted chía.

During the extrusion, the protein digestibility of seeds increased due to the destruction of anti-nutritional factors (mainly enzymatic inhibitors) and protein denaturation. That is a consequence of the applied conditions (temperature, humidity, and cutting forces) (León-López *et al.*, 2019). The C-PER value of extruded seed flours was 1.69, and 2.19 in blue maize and defatted chía, respectively (Table 1). The nutritional parameter C-PER was determined using the IVPD and EAA values of the flours. Despite the extrusion process caused a slight decrease in the content of essential amino acids, the C-PER value improved, due to the increase in the IVPD values of the samples.

### **Antioxidant activity (AoxA) and total phenolic content (TPC)**

The AoxA, evaluated by ORAC methodology, of both extruded grain flours was 15773 (blue maize) and 25905 (defatted chía) TE  $\mu\text{mol}$  per 100 g DW sample (Table 2). The AoxA of the extruded grain flours, evaluated by ABTS methodology, showed a similar tendency. The TPC of extruded grain flours ranged from 307.62 to 645.50 GAE mg per 100 g DW sample; the flour of extruded blue maize had the lowest value. The application of the extrusion process at optimal conditions producing extruded seed flours increased the AoxA, as it was evaluated by ORAC and ABTS procedures when compared to unprocessed seeds.

This increase in AoxA could result from the release of antioxidant phenolic compounds during the extrusion process, oxidation preventing of phenolic compounds in the extruded product by enzymatic inactivation during the processing, and the presence of Maillard reaction products (Félix-Medina *et al.*, 2020). Regarding the TPC of extruded blue maize

de complejos entre los lípidos y otras macromoléculas (almidón), dificultó su extracción y causó una disminución aparente del contenido de lípidos en las muestras (Félix-Medina *et al.*, 2020). Además, los minerales y la fibra insoluble experimentaron un incremento en ambas semillas tras el proceso de extrusión. Este aumento de minerales puede deberse a la adición de cal durante el acondicionamiento de ambas harinas (Mora-Rochín *et al.*, 2010; León-López *et al.*, 2019). Mientras que el aumento del contenido de fibra dietética insoluble puede atribuirse a la formación de materiales resistentes (complejos proteína-polisacárido) a la degradación enzimática que se generan durante los ciclos de calentamiento-enfriamiento que se producen durante la extrusión (Félix-Medina *et al.*, 2020).

En general, el contenido de EAA en ambas harinas de semillas extruidas fue superior a los del patrón sugerido por la FAO (2013) para el requerimiento de EAA para niños (3 años y más) y adultos (Cuadro 1). En ambas harinas de semillas procesadas la Lys resultó un EAA limitante. El proceso de extrusión causó una pequeña disminución en el contenido de EAA de las harinas de ambas semillas (no se muestran los datos de comparación con semillas sin procesar). La pérdida de algunos EAA se ha reportado que es directamente proporcional a la intensidad de las condiciones de extrusión (temperatura, velocidad del tornillo, contenido de humedad); la variable de la velocidad del tornillo es la que tiene el impacto mayor. También se debe a la reacción de Maillard, donde el grupo amino de la lisina reacciona con el azúcar reductor (Félix-Medina *et al.*, 2021). La digestibilidad proteínica *in vitro* (IVPD) de las harinas de semillas extruidas fue del 77.32 - 85.09% (Cuadro 1). El proceso de extrusión provocó un aumento tanto en el maíz azul como en la chía desgrasada.

Durante la extrusión, la digestibilidad proteínica de las semillas aumentó debido a la destrucción de los factores anti nutricionales (inhibidores enzimáticos principalmente) y a la desnaturalización de las proteínas. Esto es consecuencia de las condiciones aplicadas (temperatura, humedad y fuerzas de corte) (León-López *et al.*, 2019). El valor C-PER de las harinas de semillas extruidas fue de 1.69 y 2.19 para el maíz azul y la chía desgrasada, respectivamente (Cuadro 1). El parámetro nutricional C-PER se determinó a partir de los valores de IVPD y EAA de las harinas. A pesar de que el proceso de extrusión provocó una ligera dis-

**Table 2. Antioxidant activity, total phenolic content, and antihypertensive and hypoglycemic potentials of commercial nixtamal blue maize flour (Blue MASECA®), and extruded flours of native blue maize and defatted chia seeds.****Cuadro 2. Actividad antioxidante, contenido de fenólicos totales y potencial antihipertensivo e hipoglucemiante de la harina de maíz azul nixtamalizada comercial (MASECA® azul) y de las harinas extruidas de maíz azul nativo y chía desgrasada.**

Property	Blue MASECA™	Extruded blue maize flour	Extruded defatted chia flour
ORAC antioxidant activity†			
Free phenolics	2146±72c	3159±101b	10335±222a
Bound phenolics	10239±342c	12614±510b	15570±414a
Total	12385±489c	15773±597b	25905±607a
ABTS antioxidant activity†			
Free phenolics	935±44c	1306±65b	4511±203a
Bound phenolics	2970±167c	3950±148b	12360±477a
Total	3905±132c	5256±177b	16871±698a
Phenolic compounds‡			
Free phenolics	65.07±1.10c	68.01±2.36b	289.10±5.09a
Bound phenolics	147.29±2.49c	239.71±4.01b	356.40±7.12a
Total	212.36±3.14c	307.72±4.69b	645.50±14.2a
ACE inhibition (IC <sub>50</sub> )§	2.35±0.06a	0.51±0.03b	0.38±0.02c
α-amylase inhibition (IC <sub>50</sub> )§	30.01±1.42a	27.06±1.03b	3.98±0.17c
α-glucosidase inhibition (IC <sub>50</sub> )§	21.03±1.31a	19.02±1.01b	5.01±0.23c

<sup>ab</sup> Means with different letter in the same row are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>Trolox equivalents, TE  $\mu\text{mol}$  per 100 g DW sample; <sup>‡</sup>Gallic acid equivalents, GAE mg per 100 g DW sample; <sup>§</sup> extract mg mL<sup>-1</sup>. <sup>◆</sup> <sup>ab</sup> Letras diferentes por fila indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox, TE, por 100 g de muestra DW; <sup>‡</sup>mg equivalentes de ácido gálico, GAE, por 100 g de muestra DW; <sup>§</sup>mg de extracto mL<sup>-1</sup>.

flour for tortillas, there are no reports in the literature. However, the content of these compounds fell within the range reported for unprocessed blue maize (142-320 GAE mg per 100 g DW sample) (Serna-Saldívar *et al.*, 2013, Mora-Rochín *et al.*, 2010). While, the content of total phenolic compounds in extruded chia flour was similar to that reported by León-López *et al.* (2019). Also, TPC increased ( $p \leq 0.05$ ) during the preparation of extruded seed flours.

The bound phenolic compounds were the main fraction responsible for improving TPC (Table 2). This increase in TPC may be accountable for the improvement in AoxA of extruded seed flours. The extrusion process increases the phenolic compounds content due to the destruction of cell walls and the release of phenolic compounds. The formation of Maillard reaction products also was quantified as phenolic compounds (Félix-Medina *et al.*, 2020). Félix-Medina *et al.*, (2021) stated that the extrusion process conditions (humidity, temperature, screw speed) have a crucial impact on the levels of bioactive

minución del contenido de aminoácidos esenciales, el valor de C-PER mejoró, debido al aumento de los valores de IVPD de las muestras.

### Actividad antioxidante (AoxA) y contenido de fenólicos totales (TPC)

La AoxA evaluada con ORAC de las dos harinas de semillas extruidas fue 15773 (maíz azul) y 25905 (chía desgrasada)  $\mu\text{mol}$  TE por 100 g de muestra DW (Cuadro 2). La AoxA de las harinas de semillas extruidas evaluada por ABTS mostró una tendencia similar. El TPC de las harinas de semillas extruidas osciló entre 307.62 y 645.50 mg de GAE por 100 g de muestra DW; la harina de maíz azul extruido tuvo el valor más bajo. La aplicación del proceso de extrusión en condiciones óptimas para la producción de harinas de granos extruidos incrementó la AoxA, tal y como se evaluó mediante los procedimientos ORAC y ABTS en comparación con semillas sin procesar.

compounds (phenolic acids, flavonoids) by releasing, degrading or composition.

### **Antihypertensive [inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE)] and hypoglycaemic [inhibition of $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase] potentials**

The antihypertensive potential is defined as  $IC_{50}$  [the (extract mg mL<sup>-1</sup>) concentration required to produce 50% inhibition in the activity of ACE]. The phenolic compounds extracted from flours of extruded blue maize and extruded defatted chía had improved (lower value)  $IC_{50}$  [0.51 and 0.38 extract mg mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 2)] than unprocessed seeds. The improvement of  $IC_{50}$  value during the extrusion process of blue maize and defatted chía seeds could occur by releasing and forming bioactive compounds (phenolic compounds and Maillard reaction products) with antihypertensive potential (León-López *et al.*, 2019). The ACE inhibitory potential of extruded chía flour, better than that of extruded blue maize flour, may be due to the difference in the type of phenolic compounds present in those flours.

Phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes) inhibit the *in vitro* ACE activity. The degree of inhibition of the ACE activity depends on the absorption and metabolism of those compounds and their action mode related to the class (subclass) and the structure of the phenolic compound used (Al-Shukor *et al.*, 2013). Phenolic compounds present in extruded seed flours and obtained by the extrusion process at optimal conditions may be used as functional food supplements or natural medicines to treat hypertension.

The hypoglycaemic potential is defined as  $IC_{50}$  [the concentration (extract mg mL<sup>-1</sup>) required to produce inhibition of 50% of the activity of  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -glucosidase enzymes]. Extruded defatted chía flour showed better (lower  $IC_{50}$  value) hypoglycaemic potential ( $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$ =3.98 mg/mL,  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =5.01 extract mg mL<sup>-1</sup>) than extruded blue maize flour ( $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$ = 27.06 extract mg mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =19.02 extract mg mL<sup>-1</sup>) (Table 2). The commercial *nixtamal* maize flour had potential hypoglycaemic (Blue MASECA®:  $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$ =30.01 extract mg mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =21.03 extract mg mL<sup>-1</sup>) slightly lower than extruded blue maize flour.

Este aumento en AoxA podría ser resultado de la liberación de compuestos fenólicos antioxidantes durante el proceso de extrusión, la prevención de la oxidación de los compuestos fenólicos en el producto extruido por inactivación enzimática durante el procesamiento y la presencia de productos de la reacción de Maillard (Félix-Medina *et al.*, 2020). En cuanto al TPC de la harina de maíz azul extruido para tortillas, no existe información en la literatura. Sin embargo, el contenido de estos compuestos estuvo dentro del intervalo reportado para maíz azul sin procesar (142-320 mg de GAE por 100 g de muestra DW) (Serna-Saldívar *et al.*, 2013, Mora-Rochín *et al.*, 2010). Mientras que el contenido de compuestos fenólicos totales en la harina de chía extruida fue similar al notificado por León-López *et al.*, (2019). Así mismo, el TPC aumentó ( $p \leq 0.05$ ) durante la preparación de las harinas de semillas extruidas.

Los compuestos fenólicos ligados fueron la principal fracción responsable de la mejora del TPC (Cuadro 2). Este aumento del TPC puede ser responsable de la mejora de la AoxA de las harinas de semillas extruidas. El proceso de extrusión aumenta el contenido de compuestos fenólicos debido a la destrucción de las paredes celulares y la liberación de compuestos fenólicos. La formación de productos de la reacción de Maillard también se cuantificó como compuestos fenólicos (Félix-Medina *et al.*, 2020). Félix-Medina *et al.*, (2021) afirmaron que las condiciones del proceso de extrusión (humedad, temperatura, velocidad del tornillo) tienen un impacto crucial en los niveles de compuestos bioactivos (ácidos fenólicos, flavonoides) por liberación, degradación o composición.

### **Potencial antihipertensivo [inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)] e hipoglucemiante [inhibición de la $\alpha$ -amilasa y la $\alpha$ -glucosidasa].**

El potencial antihipertensivo se define como  $IC_{50}$  [la concentración (mg de extracto mL<sup>-1</sup>) necesaria para producir una inhibición del 50% en la actividad de la ACE]. Los compuestos fenólicos extraídos de las harinas de maíz azul extruido y de chía desgrasada extruida presentaron un mejor (menor valor) de  $IC_{50}$  [0.51 y 0.38 mg de extracto mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 2)] que las semillas sin procesar. La mejora en el valor  $IC_{50}$  durante el proceso de extrusión de las semillas de maíz azul y chía desgrasada pudo producirse por la liberación y formación de compuestos

These results suggest that extruded defatted chía flour is a great source of strong natural inhibitors for  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. All the above information about the high antioxidant, antihypertensive and hypoglycaemic potential of extruded defatted chía flour may help with its effective utilization as a functional food ingredient for promoting health.

### **Nutritional, nutraceutical, technological, and sensory properties of tortillas made from extruded flours of blue maize and defatted chía**

#### **Chemical composition and nutritional properties**

Tortillas made with the flour mixture from extruded blue maize and defatted chía had higher proteins (15.38 *vs* 10.11%, DW), lipids (6.01 *vs* 5.70%, DW), minerals (2.58 *vs* 1.68%, DW), total dietary fibre (21.57 *vs* 10.84%, DW), soluble dietary fibre (3.54 *vs* 1.75%, DW), and insoluble dietary fibre (18.03 *vs* 9.09%, DW) than tortillas prepared with 100% extruded blue maize flour. Tortillas from Blue MASECA® had 8.09, 2.35, 1.53, 8.75, 0.83, and 7.92%, DW, for proteins, lipids, minerals, and total, soluble and insoluble dietary fibre.

Adding extruded chía flour to tortillas also improved lysine (4.10 *vs* 3.69 g per 100g protein) and tryptophan (0.86 *vs* 0.59 g per 100g protein) compared to tortillas of 100% extruded blue maize flour (Table 3); maize is deficient in these essential amino acids. Furthermore, the tortillas with extruded chía flour addition had higher IVPD (84.01 *vs* 77.01%) and C-PER (2.11 *vs* 1.66) in comparison with tortillas produced with 100% extruded blue maize flour. Tortillas from Blue MASECA® had the lowest values of lysine (2.98 g per 100g protein), tryptophan (0.52 g per 100g protein), IVPD (75.82%), and C-PER (1.14) (Table 3). The Academy of Nutrition and Dietetics (AND) recommend increasing consumption of whole grains, legumes, nuts, and fruits and vegetables. Dietary fibre is associated with a risk reduction of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and select cancer types (Dahl and Stewart, 2015).

Rendón-Villalobos *et al.* (2012) evaluated the effects of chía powder supplementation on the physicochemical, sensory characteristics and starch digestibility in tortillas. They used composite flours containing 5, 10, 15, and 20% of chía seed flour

bioactivos (compuestos fenólicos y productos de la reacción de Maillard) con potencial antihipertensivo (León-López *et al.*, 2019). El potencial inhibitor de la ACE de la harina de chía extruida, mejor que el de la harina de maíz azul extruido puede deberse a la diferencia en el tipo de compuestos fenólicos presentes en estas harinas.

Los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos) inhiben la actividad de la ACE *in vitro*. El grado de inhibición de la actividad de la ACE depende de la absorción y el metabolismo de estos compuestos y su modo de acción relacionado con la clase (subclase) y la estructura del compuesto fenólico utilizado (Al-Shukor *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos presentes en las harinas de semillas extruidas obtenidos a través del proceso de extrusión en condiciones óptimas se pueden usar como complementos alimenticios funcionales o medicamentos naturales para tratar la hipertensión.

El potencial hipoglucemiante se define como IC<sub>50</sub> [la concentración (mg de extracto mL<sup>-1</sup>) necesaria para producir la inhibición del 50% de la actividad de las enzimas  $\alpha$ -amilasa o  $\alpha$ -glucosidasa]. La harina de chía desgrasada extruida mostró un mejor potencial hipoglucemiante ( $\alpha$ -amilasa, IC<sub>50</sub>=3.98 mg de extracto mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -glucosidasa, IC<sub>50</sub>=5.01 mg de extracto mL<sup>-1</sup>) que la harina de maíz azul extruido ( $\alpha$ -amilasa, IC<sub>50</sub>= 27.06 mg de extracto mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -glucosidasa, IC<sub>50</sub>=19.02 mg de extracto mL<sup>-1</sup>) (Cuadro 2). La harina comercial de maíz nixtamalizado tuvo un potencial hipoglucemiante (MASECA® azul:  $\alpha$ -amilasa, IC<sub>50</sub>=30.01 mg de extracto mL<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -glucosidasa, IC<sub>50</sub>=21.03 mg de extracto mL<sup>-1</sup>) ligeramente inferior al de la harina de maíz azul extruido.

Estos resultados sugieren que la harina de chía desgrasada extruida es una gran fuente de inhibidores naturales de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Toda la información anterior sobre el alto potencial antioxidante, antihipertensivo e hipoglucemiante de la harina de chía desgrasada extruida puede ayudar a su uso efectivo como ingrediente alimentario funcional para promover la salud.

### **Propiedades nutricionales, nutraceuticas, tecnologicas y sensoriales de las tortillas elaboradas con harinas extruidas de maíz azul y de chía desgrasada**

#### **Composición química y propiedades nutricionales**

Las tortillas elaboradas con la mezcla de harinas extruidas de maíz azul y chía desgrasada tenían más

**Table 3. Nutritional properties of tortillas from commercial nixtamal blue maize flour, extruded native blue maize flour, and mixture of extruded blue maize and defatted chia flours.****Cuadro 3. Propiedades nutricionales de las tortillas elaboradas con harina de maíz azul nixtamalizada comercial (MASECA® azul), harina extruida de maíz azul nativo y mezcla de harinas extruidas de maíz azul y chíá desgrasada.**

Property	Blue MASECA™	Extruded blue maize flour	Extruded blue maize flour + extruded chia flour†	FAO‡
EAA§ (g per 100g protein)				
His	2.69±0.02c	3.17±0.04a	2.94±0.04b	1.60
Ile	2.85±0.03a	2.74±0.03b	2.89±0.08a	3.00
Leu	12.59±0.20a	7.79±0.17b	7.63±0.13b	6.10
Lys	2.98±0.04c	3.69±0.05b	4.10±0.08a	4.80
Met+Cys	3.48±0.11b	3.59±0.13b	4.83±0.12a	2.30
Phe+Tyr	7.63±0.10b	8.77±0.14a	6.17±0.13c	4.10
Thr	2.75±0.06b	2.70±0.07b	2.87±0.07a	2.50
Trp	0.52±0.03c	0.59±0.02b	0.86±0.03a	0.66
Val	5.41±0.12b	5.53±0.10b	5.41±0.14b	4.00
Total	40.90	38.57	37.70	29.06
Chemical score	0.62	0.76	0.85	
Limitant EAA	Lys	Lys	Lys	
IVPD (%)	75.82±1.16c	77.01±1.30b	84.01±1.42a	
C-PER <sup>b</sup>	1.14±0.05c	1.66±0.06b	2.11±0.05a	

<sup>ab</sup> Means with different letter in the same row are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>FTOA elaborated with the mixture [75% ECBMF + 25% EDCF (extruded defatted chia flour)]; <sup>‡</sup>Essential amino acids requirements for children (3y and older), and adults according to FAO (2013); <sup>§</sup>EAA = Essential amino acid; <sup>¶</sup>C-PER=Calculated protein efficiency ratio. ♦ <sup>ab</sup> Letras diferentes por fila indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>FTOA elaborado con la mezcla [75% ECBMF + 25% EDCF (harina de chíá desgrasada extruida)]; <sup>‡</sup>Requerimientos de aminoácidos esenciales para niños (a partir de 3 años) y adultos de acuerdo con FAO (2013); <sup>§</sup>EAA = aminoácidos esenciales; <sup>¶</sup>C-PER= relación de eficiencia proteínica calculada.

and maize, since chíá seeds generally contain more proteins than cereals. In agreement with this research, those authors reported that nutritionally, all chíá tortillas had higher ( $p \leq 0.05$ ) levels of protein, lipids, and total dietary fibre than the control. They also observed that reduced enzymatic starch hydrolysis rate, and predicted glycaemic index recorded in tortilla supplemented with chíá seed, indicated slow digestion features. In the end, they stated that due to increased total dietary fibre, lower digestion, and predicted glycaemic index values, tortilla supplemented with chíá seed can be considered a nutraceutical food.

Unlike Rendón-Villalobos *et al.* (2012), in this research it was decided to process chíá by alkaline extrusion (adding 0.21% lime during extrusion processing) to produce chíá flour lime-cooked by extrusion. Alkaline extrusion cooking is a continuous process that uses a combination of high temperature, pressure and high-shear in a short period of time,

proteínas (15.38 *vs* 10.11%, DW), lípidos (6.01 *vs* 5.70%, DW), minerales (2.58 *vs* 1.68%, DW), fibra dietética total (21.57 *vs* 10.84%, DW), fibra dietética soluble (3.54 *vs* 1.75%, DW) y fibra dietética insoluble (18.03 *vs* 9.09%, DW) que las tortillas elaboradas con 100% harina de maíz azul extruido. Las tortillas elaboradas con MASECA® azul tuvieron 8.09, 2.35, 1.53, 8.75, 0.83, y 7.92%, DW, de proteínas, lípidos, minerales, y fibra dietética total, soluble e insoluble.

La adición de harina de chíá extruida a las tortillas también mejoró la lisina (4.10 *vs* 3.69 g por 100 g de proteína) y el triptófano (0.86 *vs* 0.59 g por 100 g de proteína) respecto a las tortillas de harina de maíz azul extruido al 100% (Cuadro 3); estos aminoácidos esenciales son deficientes en el maíz. Además, las tortillas con adición de harina de chíá extruida tuvieron IVPD mayor (84.01 *vs* 77.01%) y C-PER (2.11 *vs* 1.66) en comparación con las tortillas producidas con harina de maíz azul extruido al 100%. Las tortillas

which causes many beneficial biochemical changes compared to raw seeds (Reyes-Moreno *et al.*, 2018).

Those changes mainly are protein denaturation improving protein bioavailability; starch gelatinization which improves physicochemical and techno-functional properties; retrogradation of gelatinized starch, increasing resistant starch content; lipid modification by interaction with starch, which improves formation of resistant starch; microorganism and enzyme inactivation increasing shelf life; reduction of antinutritional compounds, enhancing bioavailability of proteins and minerals; formation of volatile flavour components which improves acceptance; and increased dietary fibre and resistant starch making greater beneficial effects on health.

During extrusion there is a high retention of nutrients and bioactive compounds (Reyes-Moreno *et al.*, 2018). Due to all the positive effects of extrusion, extruded products have a high microbiological, nutritional and nutraceutical quality. In addition, using lime during maize and chía extrusion improves calcium content of the extruded product, as well as the alkaline flavour characteristic of *nixtamal* products such as tortillas.

### Antioxidant activity and antihypertensive potential

Tortillas from flour mixture of extruded blue maize and defatted chía had higher antioxidant activity (ORAC: 18006 *vs.* 15531 TE mmol per 100 g sample, DW), and better antihypertensive (0.47 *vs.* 0.65 extract mg mL<sup>-1</sup>) potential than tortillas from 100% extruded blue maize flour due to concentration effect by the addition of extruded chía defatted flour that has higher antioxidant activity and phenolic compounds content (Table 4). Tortillas from Blue MASECA® showed AoxA (ORAC)=12129 TE μmol per 100 g sample DW, and antihypertensive potential of IC<sub>50</sub>=2.22 extract mg mL<sup>-1</sup> (Table 4). The addition of extruded chía defatted flour to tortillas of extruded blue maize flour improved the nutraceutical properties in those tortillas.

Sánchez-Madrigal *et al.* (2014) developed tortilla chips with high antioxidants from extruded and lime-cooked blue maize flours prepared with different sources of calcium. They reported that tortillas made by extrusion had higher AoxA and TPC than tortillas

de MASECA® azul tuvieron los valores más bajos de lisina (2.98 g por 100g de proteína), triptófano (0.52 g por 100g de proteína), IVPD (75.82%) y C-PER (1.14) (Cuadro 3). La Academia de Nutrición y Dietética (AND) recomienda aumentar el consumo de cereales integrales, leguminosas, frutos secos y frutas y verduras. La fibra dietética se asocia con una reducción del riesgo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cáncer (Dahl y Stewart, 2015).

Rendón-Villalobos *et al.* (2012) evaluaron los efectos de la suplementación con harina de chía sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de las tortillas y la digestibilidad del almidón; utilizaron harinas compuestas que contenían 5, 10, 15 y 20% de harina de semillas de chía y harina de maíz, ya que las semillas de chía en general contienen más proteínas que los cereales. En concordancia con esta investigación, aquellos autores señalaron que, en el aspecto nutricional, todas las tortillas con chía tenían niveles más altos ( $p \leq 0.05$ ) de proteína, lípidos y fibra dietética total que el control. Además, observaron que la reducción en la tasa de hidrólisis enzimática del almidón, y el índice glucémico previsto que se registraron en tortilla adicionada con semillas de chía, indicaba características de digestión lenta. Por último señalaron que debido al aumento de la fibra dietética total, a la digestión menor y a los valores estimados de índice glucémico, la tortilla adicionada con semillas de chía se puede considerar un alimento nutraceutico.

A diferencia de Rendón-Villalobos *et al.* (2012), en esta investigación decidimos procesar la chía por extrusión alcalina (con adición de 0.21% de cal durante el proceso de extrusión) para producir harina de chía cocida por extrusión alcalina. La cocción por extrusión alcalina es un proceso continuo que utiliza una combinación de temperatura alta, presión y cizallamiento en un período de tiempo corto, lo cual causa muchos cambios bioquímicos benéficos respecto a las semillas crudas (Reyes-Moreno *et al.*, 2018).

Los cambios principales son desnaturalización de las proteínas lo cual mejora la biodisponibilidad; gelatinización del almidón, lo cual mejora propiedades fisicoquímicas y tecno funcionales; retrogradación del almidón gelatinizado para aumentar contenido de almidón resistente; modificación de los lípidos, cuya interacción con el almidón mejora la formación de almidón resistente; inactivación de microorganismos y enzimas con aumento de su vida útil;

**Table 4. Nutraceutical, sensory, and technological properties of tortillas from commercial *nixtamal* blue maize flour (Blue MASECA™), extruded native blue maize flour, and mixture of extruded flours of blue maize and defatted chia.****Cuadro 4. Propiedades nutraceuticas, sensoriales y tecnologicas de las tortillas de harina de maíz azul nixtamalizada comercial (MASECA® azul); de harina extruida de maíz azul nativo y de la mezcla de harinas extruidas de maíz azul y chíá desgrasada.**

Property	Blue MASECA™	Extruded blue maize flour	Extruded blue maize flour + extruded chia flour†
Nutraceutical			
AoxA <sup>‡</sup> (ORAC)	12129±611c	15531±578b	18006±704a
Antihypertensive potential			
ACE inhibition (IC <sub>50</sub> ) <sup>§</sup>	2.22±0.11a	0.65±0.02b	0.47±0.02c
Hypoglycemic potential			
α-amylase inhibition (IC <sub>50</sub> ) <sup>§</sup>	29.09±1.38a	25.81±1.02b	20.07±0.74c
α-glucosidase inhibition (IC <sub>50</sub> ) <sup>§</sup>	21.34±0.93a	19.57±1.01b	16.25±0.83c
Sensory/Technological			
Global acceptability <sup>¶</sup>	8.43±1.68a	8.25±1.49a	8.34±1.23a
Color	8.41 ± 0.31a	8.15 ± 0.25b	7.22 ± 0.58b
Flavor	8.50 ± 0.25a	8.22 ± 0.44b	7.60 ± 0.87b
Texture	8.41 ± 0.35a	8.21 ± 0.23a	7.71 ± 0.88b
Puffing	2.92±0.28a	2.96±0.21a	3.00±0.00a
Rollability	2.00±0.00a	2.08±0.28a	1.08±0.28b

<sup>ab</sup> Means with different letter in the same row are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>‡</sup>75% extruded blue maize flour + 25% extruded defatted chia flour; <sup>‡</sup>Trolox equivalents, TE  $\mu\text{mol}$  per 100 g DW sample; <sup>§</sup>extract mg mL<sup>-1</sup>; <sup>¶</sup>Degree of liking or disliking using a 9-category hedonic scale (1 = extremely disliking to 9 = extremely liking). ♦ <sup>ab</sup> Letras diferentes por fila indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>†</sup>75% de harina de maíz azul extruido + 25% de harina de chíá desgrasada extruida; <sup>§</sup> $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox, TE, por 100 g de muestra, DW; <sup>¶</sup>mg de extracto mL<sup>-1</sup>; <sup>¶</sup>Grado de agrado o desagradado mediante una escala hedónica de 9 categorías (1 = extremadamente desagradable a 9 = extremadamente agradable).

prepared by lime-cooking. Those authors attributed the observed phenomenon to the short-time thermal extrusion that minimized the damage of phenolic compounds in the flour and caused destruction of the cell walls, releasing phenolic compounds from their native matrix. Whereas the lime-cooking process caused physical loss of the pericarp and leached phenolics into the cooking liquor, resulting in lower phenolic content in *nixtamal* flour; a controlled extrusion-cooking technology may be used to develop foods with functional potential. As it would allow the retention or increase of phenolic compounds related to antioxidant activity in a higher proportion than traditional *nixtamal* lime-cooking (Mora-Rochín *et al.*, 2010).

León-López *et al.* (2019) reported that tortillas from a mixture of commercial *nixtamal* white maize flour (MASECA®) and extruded defatted chia flour had higher AoxA (12499 *vs.* 5985 TE  $\mu\text{mol}$  per 100 g, DW) and better antihypertensive potential (IC<sub>50</sub>=0.67 extract mg mL<sup>-1</sup>) than MASECA® tortillas,

reducción de compuestos anti-nutricionales, lo cual mejora la biodisponibilidad de proteínas y minerales; formación de componentes volátiles de sabor que mejora aceptación; y aumento de la fibra dietética y el almidón resistente, con efectos benéficos mayores sobre la salud.

Durante la extrusión se produce gran retención de nutrimentos y compuestos bioactivos (Reyes-Moreno *et al.*, 2018). Debido a todos los efectos positivos de la extrusión, los productos extruidos tienen una calidad microbiológica, nutricional y nutraceutica alta. Además, el uso de cal durante la extrusión de maíz y chíá mejora el contenido de calcio del producto extruido, así como el sabor alcalino característico de los productos *nixtamalizados*.

#### Actividad antioxidante y potencial antihipertensivo

Las tortillas procedentes de la mezcla de harinas extruidas de maíz azul y chíá desgrasada presentaron

in them AoxA was not detected. They concluded that the addition of chía to maize flour improved nutraceutical properties of the maize tortilla; and reported that extruded defatted chía flour had high nutraceutical potential due to a high antioxidant and antihypertensive value. As the extruded chía flour was processed from unextruded but defatted chía flour, they reported as well that the releasing and composition of bioactive compounds (phenolic compounds and Maillard reaction products) with antioxidant and antihypertensive potential could occur during extrusion.

Phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes) can inhibit the *in vitro* ACE activity (Al-Shukor *et al.*, 2013). In literature there are reported some hypotheses on the mechanisms of inhibition of phenolic compounds on ACE: competitive inhibition, by the structure of phenols that alter their function by agglutination; non-competitive inhibition, both substrate and inhibitor bind to the enzyme simultaneously and reversibly; metal sequestration, ACE is a  $Zn^{2+}$ -dependent metalloproteinase and phenolic compounds can chelate non-specific metals exhibiting an ACE inhibitory effect; the interactions between phenols and the disulphide bridges (oxidized cysteines) that reside on the surface of the ACE, causing slight modifications in the structure of the ACE (Al-Shukor *et al.*, 2013).

### Hypoglycaemic potential

**$\alpha$ -amylase inhibition.** In recent years, natural sources of  $\alpha$ -amylase inhibitors have received much interest due to the search for an alternative to synthetic enzyme inhibitors such as acarbose, metformin, and orlistat, which have been found to exhibit adverse effects, mild efficacy and can cause gastrointestinal distress as a side effect (Oyedemi *et al.*, 2017). Certain plant phenolics can partially inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase enzyme and hence demonstrated therapeutic benefits such as hypoglycaemic effect and are therefore useful in the dietary management of Type II diabetes (Kazeem *et al.*, 2013; Oyedemi *et al.*, 2017).

Tortillas of extruded blue maize flour with addition of extruded defatted chía flour had an  $\alpha$ -amylase inhibition better than tortillas from 100% extruded blue maize flour ( $IC_{50}$ =20.07 *vs.* 25.81 extract mg

una actividad antioxidante mayor (ORAC: 18006 *vs.* 15531  $\mu$ mol TE por 100 g de muestra, DW), y un potencial antihipertensivo mejor (0.47 *vs.* 0.65 mg de extracto  $mL^{-1}$ ) que las tortillas procedentes de harina de maíz azul extruido al 100%, debido al efecto de concentración por adición de harina de chía desgrasada extruida que tiene mayor actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos (Cuadro 4). Las tortillas de MASECA® azul mostraron AoxA (ORAC)=12129  $\mu$ mol TE por 100 g de muestra DW, y un potencial antihipertensivo de  $IC_{50}$ =2.22 mg de extracto  $mL^{-1}$  (Cuadro 4). La adición de harina de chía desgrasada extruida a tortillas de harina de maíz azul extruido mejoró las propiedades nutraceuticas en dichas tortillas.

Sánchez-Madrugal *et al.* (2014) desarrollaron totopos con contenido de antioxidantes alto a partir de harinas de maíz azul extruido y cocido con cal, preparadas con fuentes de calcio diferentes. Esos autores indicaron que las tortillas elaboradas por extrusión tenían AoxA y TPC mayor que las tortillas elaboradas por cocción con cal y atribuyeron el fenómeno observado a la extrusión térmica de duración corta que minimizó el daño de los compuestos fenólicos de la harina y provocó la destrucción de las paredes celulares y liberó los compuestos fenólicos de su matriz nativa. Mientras que, el proceso de cocción con cal provocó la pérdida física del pericarpio y la lixiviación de los fenoles en el licor de cocción y redujo el contenido fenólico en la harina de nixtamal; la tecnología de cocción por extrusión controlada puede utilizarse para desarrollar alimentos con potencial funcional. Ya que permitiría retener o aumentar los compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante en proporción mayor que la cocción tradicional del nixtamal con cal (Mora-Rochín *et al.*, 2010).

León-López *et al.* (2019) encontraron que las tortillas de una mezcla de harina comercial de nixtamal de maíz blanco (MASECA®) y harina de chía desgrasada extruida tenían AoxA (12499 *vs.* 5985  $\mu$ mol TE por 100 g, DW) mayor y potencial antihipertensivo mejor ( $IC_{50}$ =0.67 mg de extracto  $mL^{-1}$ ) que las tortillas MASECA® en las cuales no se detectó AoxA. Entonces concluyeron que la adición de chía a la harina de maíz mejoraba las propiedades nutraceuticas de la tortilla de maíz; e informaron que la harina de chía desgrasada extruida tenía un potencial nutraceutico alto debido a valores altos antioxidante y antihipertensivo. Como a partir de la harina de chía

mL<sup>-1</sup>) (Table 4). The addition of chía to maize flour improves the hypoglycaemic potential of the maize tortilla. The high hypoglycaemic potential of extruded defatted chía flour may be due to the high  $\alpha$ -amylase inhibition value of unprocessed defatted chía flour from extruded flour was obtained. As well as the releasing phenolic compounds and forming Maillard reaction products with hypoglycaemic potential by extrusion processing. Phenolic compounds can bind to reactive sites of the  $\alpha$ -amylase enzyme and alter its catalytic effects (Kazeem *et al.*, 2013; Oyedemi *et al.*, 2017).

**$\alpha$ -glucosidase inhibition.** The effective management of diabetes mellitus, especially non-insulin-dependent Type II diabetes, involves preventing the excessive rise of the blood glucose level by inhibiting the digestive starch enzymes. The  $\alpha$ -glucosidase, which is a membrane-bound enzyme located in the epithelium of the small intestines, catalyses the cleavage of glucose from disaccharides for subsequent absorption. Earlier studies reported that the retardation of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme by inhibitors would be one of the most effective ways to control Type II diabetes (Kazeem *et al.*, 2013).

Tortillas from flour mixture of extruded blue maize and defatted chía had better  $\alpha$ -glucosidase inhibition than tortillas from 100% extruded blue maize flour ( $IC_{50}=16.25$  vs.  $19.69$  extract mg mL<sup>-1</sup>) (Table 4). The addition of chía to maize flour improved the hypoglycaemic properties of the maize tortilla. The phenolic compounds present in extruded defatted chía would be mainly responsible for the increased  $\alpha$ -glucosidase enzyme inhibitory potential of those tortillas. Proença *et al.* (2017) reported strong inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by phenolic compounds such as flavonoids.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors are one of the effective classes of antidiabetic therapeutics capable of ameliorating hyper-glycemia especially postprandial hyperglycaemia over  $\alpha$ -amylase inhibitors.

Bhatia *et al.* (2019) reported that  $\alpha$ -glucosidase inhibition occurs by a competitive type of inhibition, docked into the binding site of the protein. Also, the hypoglycaemic effect would be related to non-covalent interactions between polyphenols and enzymes. This interaction may happen due to hydroxyl and galloyl groups present in the molecular structure of polyphenols. Thus, making phenolics

desgrasada sin procesar se preparó la harina extruida, esos autores indicaron también que la liberación y los cambios en la composición de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y productos de la reacción de Maillard) con potencial antioxidante y antihipertensivo pudo ocurrir durante la extrusión.

Los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos) pueden inhibir la actividad de la ACE *in vitro* (Al-Shukor *et al.*, 2013). En la literatura, se consignan algunas hipótesis acerca de mecanismos de inhibición de los compuestos fenólicos sobre la ACE: inhibición competitiva, por la estructura de los fenoles que alteran su función por aglutinación; inhibición no competitiva, tanto el sustrato como el inhibidor se unen a la enzima de forma simultánea y reversible; secuestro de metales, la ACE es una metaloproteinasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> y los compuestos fenólicos pueden quelar metales no específicos y mostrar un efecto inhibidor de la ACE; las interacciones entre los fenoles y los puentes disulfuro (cisteínas oxidadas) que residen en la superficie de la ACE, lo cual provocó modificaciones ligeras en la estructura de la ACE (Al-Shukor *et al.*, 2013).

### Potencial hipoglucemiante

**Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.** En años recientes, las fuentes naturales de inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa han recibido mucho interés debido a la búsqueda de una alternativa a los inhibidores sintéticos de la enzima, como la acarbosa, la metformina y la tetrahidro-lipostatina, que se ha descubierto que presentan efectos adversos, una eficacia leve y pueden causar malestar gastrointestinal como efecto secundario (Oyedemi *et al.*, 2017). Ciertos fenólicos de plantas pueden inhibir parcialmente la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa y por lo tanto han demostrado beneficios terapéuticos como el efecto hipoglucemiante; de manera que son útiles en la gestión dietética de la diabetes tipo II (Kazeem *et al.*, 2013; Oyedemi *et al.*, 2017).

Las tortillas de harina de maíz azul extruido con adición de harina de chía desgrasada extruida tuvieron una inhibición de la  $\alpha$ -amilasa mejor que las tortillas de harina de maíz azul extruido al 100% ( $IC_{50}=20.07$  vs.  $25.81$  mg de extracto mL<sup>-1</sup>) (Cuadro 4). La adición de chía a la harina de maíz mejora el potencial hipoglucemiante de la tortilla de maíz. El potencial hipoglucemiante alto de la harina de chía desgrasada extruida puede deberse al valor alto de inhibición de

capable of forming hydrogen bonds with the polar groups of enzymes. Also, enzymes included hydrophobic amino acids and galloyl groups which show hydrophobicity in polyphenols, making possible that polyphenols bind to enzymes through hydrophobic association. The galloyl group can play an important role in interacting with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase; its position in the molecules affecting the efficiency of those enzymes (Ali-Asgar, 2012).

## CONCLUSIONS

Extruded defatted chía flour added to dough of extruded native blue maize flour enhanced tortillas improving nutritional, antioxidant, antihypertensive, and hypoglycaemic potential and they were still sensorially acceptable. Tortillas added with extruded defatted chía flour had higher values of protein, dietary fibre, *in vitro* protein digestibility, and calculated protein efficiency ratio.

Alkaline extrusion generated flours of native blue maize and defatted chía seeds with improved nutraceutical y nutritional characteristics compared to the traditional product. Thus, enhanced tortillas are an advisable option for the nutrition of older adults.

In the alkaline extrusion process a small volume of water was used that did not generate polluting effluents. This product may become a valuable staple, useful against malnutrition and chronic degenerative diseases in Mexico.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Convocatoria 2019 - Ciencia de Frontera (Grupal) for the funds supporting this research (ID Number: 263352). To Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) under the Universidad Autónoma de Sinaloa, for supplementary funds.

## LITERATURE CITED

- Al-Shukor, N., J., Van-Camp, G.B. González, D. Staljanssens, K. Struijs, M.J. Zotti, K. Raes, and G. Smagghe. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure-activity relationships. *J. Agr. Food Chem.* 61:11832–11839.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2012. Methods: 925.09B, 920.39 C, 960.52, and 985.29. Latimer Jr., G.W. (ed). *Official Methods of Analysis of*

la  $\alpha$ -amilasa de la harina de chía desgrasada sin procesar a partir de la cual se obtuvo la harina extruida. Así como, a la liberación de compuestos fenólicos y la formación de productos de reacción de Maillard con potencial hipoglucemiante por el procesamiento de extrusión. Los compuestos fenólicos pueden unirse a sitios reactivos de la enzima  $\alpha$ -amilasa y alterar sus efectos catalíticos (Kazeem *et al.*, 2013; Oyedemi *et al.*, 2017).

**Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa.** El tratamiento eficaz de la diabetes mellitus, en especial de la diabetes no insulino dependiente tipo II, consiste en prevenir el aumento excesivo del nivel de glucosa en sangre por medio de la inhibición de las enzimas digestivas del almidón. La  $\alpha$ -glucosidasa, la cual es una enzima unida a la membrana y localizada en el epitelio del intestino delgado, cataliza la separación de la glucosa de los disacáridos para su posterior absorción. Estudios previos informaron que el retraso de la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por inhibidores sería una de las formas más eficaces de controlar la diabetes tipo II (Kazeem *et al.*, 2013).

Las tortillas de la mezcla de harinas extruidas de maíz azul y chía desgrasada tuvieron una mejor inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa que las tortillas de harina de maíz azul extruido al 100% ( $IC_{50}$ =16.25 vs. 19.69 mg de extracto  $mL^{-1}$ ) (Cuadro 4). La adición de chía a la harina de maíz mejoró las propiedades hipoglucemiantes de la tortilla de maíz. La presencia de los compuestos fenólicos en la chía desgrasada extruida pudo ser la causa principal del mayor potencial inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de esas tortillas. Proença *et al.* (2017) informaron sobre la inhibición fuerte de la  $\alpha$ -glucosidasa por compuestos fenólicos como los flavonoides. Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa son una de las clases eficaces de terapéutica antidiabética capaces de mejorar la hiperglucemia; en especial la hiperglucemia postprandial por encima de los inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa.

Bhatia *et al.* (2019) informaron que la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa se produce por un tipo de inhibición competitiva, acoplada al sitio de unión de la proteína. Además, el efecto hipoglucémico estaría relacionado con las interacciones no covalentes entre los polifenoles y las enzimas. Esta interacción puede producirse debido a los grupos hidroxilo y galóilo presentes en la estructura molecular de los polifenoles. De este modo, los fenoles son capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos polares de las enzimas.

- the Association of Official Analytical Chemists. AOAC INTERNATIONAL. 19<sup>th</sup> Ed. Gaithersburg, MD, USA. 2 vols. + ills. ISBN: 0935584838 / 9780935584837.
- Bhatia, A., B. Singh, R. Arora, and S. Arora. 2019. *In vitro* evaluation of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. *BMC Complement Altern. Med.* 19: 74.
- Dahl, W.J., and M.L. Stewart. 2015. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health implications of dietary fibre. *J. Acad. Nutr. Diet.* 115:1861-1870.
- FAO (United Nations Food and Agriculture Organization). 2013. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper 92. FAO. Rome, Italy. 66 p.
- Félix-Medina, J.V., J. Montes-Ávila, C. Reyes-Moreno, J. X. K. Perales-Sánchez, M.A. Gómez-Favela, E. Aguilar-Palazuelos, and R. Gutiérrez-Dorado. 2020. Second-generation snacks with high nutritional and antioxidant value produced by an optimized extrusion process from corn/common bean flours mixtures. *LWT – Food Sci. Technol.* 124:109172.
- Félix-Medina, J.V., R. Gutiérrez-Dorado, J.A. López-Valenzuela, G. López-Ángulo, M.F. Quintero-Soto, J.X.K. Perales-Sánchez, and J. Montes-Ávila. 2021. Nutritional, antioxidant and phytochemical characterization of healthy ready-to-eat expanded snack produced from maize/common bean mixture by extrusion. *LWT – Food Sci. Technol.* 142:111053.
- Hida, T., A. Harada, S. Imagama, and N. Ishiguro. 2014. Managing sarcopenia and its related-fractures to improve quality of life in geriatric populations. *Aging. Dis.* 5:226-237.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2019. Comunicado de Prensa Núm. 475/19. 30- sep-2019. 9 p. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2019/edad2019\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2019/edad2019_Nal.pdf) (Retrieved: March 2021).
- Kazeem, M.I., J.O. Adamson, and I.A. Ogunwande. 2013. Modes of inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. *Biomed Res. Int.* Article ID 527570. 6 p.
- León-López, L., C. Reyes-Moreno, A.H. Ley-Osuna, J.X.K. Perales-Sánchez, J. Milán-Carrillo, E.O. Cuevas-Rodríguez, and R. Gutiérrez-Dorado. 2019. Improvement of nutritional and nutraceutical value of nixtamalized maize tortillas by addition of extruded chia flour. *Biocencia XXI* 3: 56-66.
- Milán-Carrillo, J., R. Gutiérrez-Dorado, J.X.K. Perales-Sánchez, E.O. Cuevas-Rodríguez, B. Ramírez-Wong, and C. Reyes-Moreno. 2006. The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *Int. J. Food Sci.* 41:727-736.
- Mora-Rochín, S., J.A. Gutiérrez-Urbe, S.O. Serna-Saldívar, P. Sánchez-Peña, C. Reyes-Moreno, and J. Milán-Carrillo. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J. Cereal Sci.* 52:502-508.
- Orona-Tamayo, D., M.E. Valverde, and O. Paredes-López. 2016. Chia - The New Golden Seed for the 21st Century: Nutraceutical Properties and Technological Uses. *In: Nadathyr, S. (ed.) Sustainable Protein Sources.* Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp: 265-281.
- Además, las enzimas incluyen aminoácidos hidrofóbicos y grupos galoílo que muestran hidrofobicidad en los polifenoles y logran que los polifenoles se unan a las enzimas por medio de una asociación hidrofóbica. El grupo galoílo puede desempeñar un papel importante en la interacción con la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa; su posición en las moléculas afecta a la eficacia de dichas enzimas (Ali-Asgar, 2012).

## CONCLUSIONES

La harina de chía desgrasada extruida añadida a la masa de harina de maíz azul criollo extruido mejoró el potencial nutricional, antioxidante, antihipertensivo e hipoglucemiante de las tortillas, y conservaron su aceptabilidad sensorial. Las tortillas a las cuales se añadió harina de chía desgrasada extruida tuvieron valores más altos de proteína, fibra dietética, digestibilidad proteínica *in vitro*, y relación de eficiencia proteínica calculada.

La extrusión alcalina generó harinas de maíz azul criollo y de semillas de chía desgrasadas con características nutraceuticas y nutricionales mejoradas respecto al producto tradicional. Por lo tanto, las tortillas mejoradas son una opción aconsejable para la nutrición de los adultos mayores.

En el proceso de extrusión alcalina se utilizó un volumen de agua pequeño que no generó efluentes contaminantes. Este producto se puede convertir en un valioso alimento básico, útil contra la desnutrición y las enfermedades crónicas degenerativas en México.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Convocatoria 2019 - Ciencia de Frontera (Grupal) por los fondos que apoyaron esta investigación (Número de ID: 263352). Al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por los fondos complementarios.

—End of the English version—

-----\*-----

- Oyedemi S.O., B.O. Oyedemi, I.I. Ijeh, P.E. Ohanyerem, R.M. Coopoosamy, and O.A. Aiyegoro. 2017. Alpha-amylase inhibition and antioxidative capacity of some antidiabetic plants used by the traditional healers in Southeastern Nigeria. *Sci. World J.* article ID 3592491.
- Prince, M.J., F. Wu, Y. Guo, L.M. Gutiérrez-Robledo, M. O'Donnell, R. Sullivan, and S. Yusuf. 2015. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet* 385:549–562.
- Proença, C., M. Freitas, D. Ribeiro, E.F.T. Oliveira, J.L.C. Sousa, S.M. Tomé, M.J. Ramos, A.M.S. Silva, P.A. Fernandes, and E. Fernandes. 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity relationship study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32: 1216–1228.
- Rathod, R.P., and U.S. Annature. 2016. Effect of extrusion process on antinutritional factors and protein and starch digestibility of lentil splits. *LWT - Food Sci. Technol.* 66:114-123.
- Rendón-Villalobos, R., A. Ortiz-Sánchez, J. Solorza-Feria, and C.A. Trujillo-Hernández. 2012. Formulation, physicochemical, nutritional, and sensorial evaluation of corn tortillas supplemented with chía seed (*Salvia hispanica* L.). *Czech J. Food Sci.* 30:118–125.
- Reyes-Moreno, C., P.C. Reyes-Fernández, E.O. Cuevas-Rodríguez, J. Milán-Carrillo, and S. Mora-Rochín. 2018. Changes in nutritional properties and bioactive compounds in cereals during extrusion cooking. *In: Zahid-Qamar, S. (ed.) Extrusion of Metals, Polymers, and Food Products.* London, UK. IntechOpen, pp. 103-124. DOI: 10.5772/intechopen.68753.
- Sánchez-Madrigal, M.A., A. Quintero-Ramos, F. Martínez-Bustos, C.O. Meléndez-Pizarro, M.G. Ruiz-Gutiérrez. 2014. Effect of different calcium sources on the antioxidant stability of tortilla chips from extruded and nixtamalized blue corn (*Zea mays* L.) flours. *Food Sci. Technol.* 34:143-149.
- Serna-Saldívar, S.O., J.A. Gutiérrez-Urbe, S. Mora-Rochin, and S. García-Lara. 2013. Nutraceutical potential of native maize and changes during traditional and extrusion processing. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:295-304.