

## Informe final\* del Proyecto NE014

### Caracterización fenólica y de actividades biológicas de maíces con pigmentos antociano entre razas mexicanas\*

<b>Responsable:</b>	Biól. Yolanda Salinas Moreno
<b>Institución:</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro Campo Experimental Jalisco
<b>Dirección:</b>	Parque de Los Colomos s/n, Guadalajara, Jal, 44600, México
<b>Correo electrónico:</b>	salinas.yolanda@inifap.gob.mx
<b>Teléfono/Fax:</b>	01 (967) 674 9000 ext. 1426
<b>Fecha de inicio:</b>	Septiembre 15, 2016.
<b>Fecha de término:</b>	Marzo 14, 2019.
<b>Principales resultados:</b>	Base de datos, cartografía, fotografías, informe final.
<b>Forma de citar** el informe final y otros resultados:</b>	Salinas Moreno, Y. 2019. Caracterización fenólica y de actividades biológicas de maíces con pigmentos antociano entre razas mexicanas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Pacífico Centro-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. <b>Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto No. NE014.</b> Ciudad de México.

#### Resumen:

México es considerado como uno de los principales centros de origen del maíz debido a la enorme variabilidad que se tiene de esta gramínea, de la que se han descrito a la fecha cerca de 54 razas (Sánchez et al. 2000). Importantes esfuerzos se han realizado para coleccionar, re-coleccionar y resguardar en los principales bancos de germoplasma del país dicha diversidad (22931 accesiones, CONABIO, 2011). Sin embargo, el almacenamiento y continuo rejuvenecimiento de las colecciones representa un gasto considerable para el erario público, además de que al sacar las poblaciones de maíz de su "hábitat" natural, se frena su interacción con el ambiente. Una estrategia que se ha implementado, como forma para mantener las poblaciones de maíz de las distintas razas en su ambiente natural, ha sido introducir la modalidad de "custodio" entre los productores de las distintas regiones del país. Sin embargo, la modalidad de "custodio" implica destinar un pago para los productores que mantienen las poblaciones de determinadas razas identificadas por los expertos como "en peligro de extinción", adicionalmente, los productores interesados en esta actividad son generalmente de edad avanzada, por lo que en un horizonte de largo plazo no se tendrán muchos disponibles.

El uso de recursos públicos para el mantenimiento in situ de la biodiversidad en maíz se justifica si se ponderan los beneficios que puede representar para una sociedad el uso de dicha diversidad. La utilización de los recursos genéticos de maíz puede visualizarse de manera simple en función de la variabilidad en planta y en grano. La variabilidad en planta es aprovechada para resolver múltiples problemas de carácter agronómico y de productividad, en tanto que la del grano tiene que ver con su uso en los diversos procesos artesanales, culinarios e industriales para elaborar diferentes productos.

En lo que concierne a la variabilidad que se presenta en el grano con pigmentos antociano de las más de 50 razas de maíz descritas en México, los trabajos disponibles son reducidos y con un enfoque de estudio inter-racial. Se desconoce la variabilidad en contenido de antocianinas en las diferentes razas de maíz que presentan accesiones con colores de grano azul/morado, rojo y púrpura (Salinas et al. 2013). El perfil cromatográfico de antocianinas en los colores azul/morado y púrpura está estudiado en accesiones de algunas razas como Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita (Salinas et al. 2012).

El conocimiento de la diversidad en contenido y tipo de fenoles en el grano de las accesiones de maíz resguardadas en los distintos bancos de germoplasma del país puede ayudar a un mayor uso de los recursos genéticos de esta gramínea. El identificar colectas con contenidos sobresalientes de fenoles en sus granos, podría contribuir a detonar su uso en la elaboración de nuevos productos en los que se aprovechen las distintas actividades biológicas reportadas en algunos fenoles carentes de color como serían las proantocianidinas.

Por otro lado, la directriz actual en la industria de alimentos hacia la elaboración de alimentos funcionales, requiere la oferta de ingredientes funcionales, que agreguen color natural y antioxidantes a los alimentos.

Adicionalmente, la tendencia creciente en la industria alimenticia hacia el uso de pigmentos naturales, abre nuevas oportunidades para los maíces con un contenido sobresaliente de estos compuestos. Con relación a poblaciones de maíz con grano de coloraciones rojo "aladrillado", con presencia de proantocianidinas (PAs) y flavonoides, fenoles asociados con la tolerancia a daños por Fusarium (Pilu et al. 2011) es prácticamente nada lo que se ha avanzado en su caracterización. Adicionalmente, las PAs son taninos condensables, que en la alimentación de rumiantes tienen un valor importante por su participación en la reducción de gas metano (Battha et al. 2009; Piluzza et al. 2013). Hoy día las dietas para rumiantes incluyen una fracción de taninos condensados en combinación con taninos hidrolizables. Los maíces nativos con coloraciones de grano rojo "aladrillado" son comunes en razas adaptadas a los Valles Altos de nuestro país.

---

- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Octubre de 2018



# CARACTERIZACIÓN FENÓLICA Y DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE MAÍCES CON PIGMENTOS ANTOCIANO ENTRE RAZAS MEXICANAS

YOLANDA SALINAS MORENO

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES  
AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

## Contenido

Resumen .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1 Objetivos particulares.....	3
3. ANTECEDENTES.....	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
4.1 Selección de las accesiones de estudio.....	8
4.2 Evaluación de características físicas del grano .....	10
4.3 Análisis del contenido de diferentes tipos de compuestos fenólicos.....	11
4.4 Evaluación de actividades biológicas.....	20
4.4.1 Actividad antioxidante.....	20
4.4.2 Actividad antifúngica .....	26
4.4.3 Actividad antimutagénica.....	33
4.5 Identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz con pigmentos antociano .....	35
4.5.1 Preparación de las muestras para análisis de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	35
4.5.2 Preparación de las muestras para su análisis por LC-MS .....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
5.1 Selección de las accesiones de estudio.....	38
5.2 Evaluación de características físicas del grano .....	42
5.3 Análisis del contenido de diferentes tipos de compuestos fenólicos.....	45
5.3.1 Maíces con grano azul morado (AZM).....	50
5.3.2 Maíces de grano rojo cereza (RC).....	54
5.3.3 Maíces de grano rojo ladrillo (RL).....	57
5.4 Actividades biológicas.....	60
5.4.1 Capacidad antioxidante por color de grano .....	60
5.4.2 Actividad antifúngica .....	72
5.4.3 Actividad antimutagénica.....	76
5.5 Identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz con pigmentos antociano .....	80

5.5.1 Análisis de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	80
6. CONCLUSIONES.....	87
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## CARACTERIZACIÓN FENÓLICA Y DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE MAÍCES CON PIGMENTOS ANTOCIANO ENTRE RAZAS MEXICANAS

### Resumen

México es considerado como uno de los principales centros de origen del maíz (*Zea mays* L. ssp. *mays*). La diversidad genética que se tiene de esta especie es una de las mayores en el mundo, lo que se ve reflejado en las más de 50 razas de maíz descritas. En lo que concierne a la variabilidad que se presenta en el grano con pigmentos antociano en las razas de maíz descritas en México, los trabajos disponibles son reducidos y con un enfoque de estudio inter-racial. El objetivo general del estudio realizado fue determinar la composición fenólica y de actividades biológicas en el grano de maíces con pigmentos antociano entre razas mexicanas. Los resultados obtenidos mostraron que de los maíces con pigmentos antociano en su grano, los más abundantes en las diferentes razas de maíz son los de grano azul morado. Estos maíces fueron los de mayor contenido de fenoles solubles totales, atribuido a una mayor presencia de antocianinas, al presentar el mayor contenido promedio de estos compuestos. Su contenido de flavonoides fue igual a los maíces de grano rojo cereza y fueron los de menor contenido de proantocianidinas. Por su parte, los maíces de grano rojo cereza y rojo ladrillo presentaron un contenido igual de fenoles solubles totales. Los maíces de grano rojo ladrillo fueron los que presentaron el mayor contenido de flavonoides y de proantocianidinas de los tres colores de grano analizados. En los maíces de grano azul morado se observó que la capacidad antioxidante tiene una relación directa y altamente significativa con el contenido de antocianinas, relación que no se observó en los maíces de grano rojo cereza, que son también ricos en antocianinas. La mayor capacidad antioxidante se presentó en los maíces de grano rojo ladrillo, los cuales carecen prácticamente de antocianinas. La actividad antifúngica del grano de maíz se relacionó con un mayor contenido de proantocianidinas y flavonoides. Los maíces de grano rojo cereza fueron sobresalientes en esta actividad biológica, en relación a los de grano azul morado y rojo ladrillo. En los maíces de grano azul morado se identificaron entre 8 y 12 antocianinas, de las cuales la mayor proporción correspondió a las de tipo acilado. Los derivados de cianidina fueron los más abundantes, seguidos de los de perlargonidina, y en muy baja proporción de peonidina. El efecto de la raza sobre el perfil de antocianinas se manifestó en la proporción relativa de cada una de las antocianinas. En los maíces de grano rojo cereza se identificaron entre 8 y 12 antocianinas. La principal diferencia

en el perfil de antocianinas entre los maíces de grano azul morado y rojo cereza fue en relación a las antocianinas predominantes. En los maíces de color azul morado fueron cianidina 3-glucosido y cianidina 3-6 malonil glucósido; en los rojo cereza fueron perlargonidina 3-glucósido y perlargonidina 3-6 malonil glucósido. AZM y lo RC es que en estos últimos predominan los derivados de pelargonidina. En los maíces de grano rojo ladrillo la presencia de antocianinas fue marginal, su color característico es debido a otros compuestos fenólicos.

## **1. INTRODUCCIÓN**

México es considerado como uno de los principales centros de origen y diversificación del maíz (Sánchez *et al.*, 2000). Importantes esfuerzos se han realizado para coleccionar, re-coleccionar y resguardar en los principales bancos de germoplasma del país dicha diversidad (22931 accesiones, CONABIO, 2011). Sin embargo, el almacenamiento y continuo rejuvenecimiento de las colecciones representa un gasto considerable para el erario público, además de que al sacar las poblaciones de maíz de su “hábitat” natural, se frena de alguna manera su interacción con el ambiente. Una estrategia que se ha implementado, como forma para mantener las poblaciones de maíz de las distintas razas en su ambiente natural, ha sido introducir la modalidad de “custodio” entre los productores de las distintas regiones del país. Sin embargo, la modalidad de “custodio” implica destinar un pago para los productores que mantienen las poblaciones de determinadas razas identificadas por los expertos como “en peligro de extinción”, adicionalmente, los productores interesados en esta actividad son generalmente de edad avanzada, por lo que en un horizonte de largo plazo no se tendrán muchos disponibles.

El uso de recursos públicos para el mantenimiento *in situ* de la biodiversidad en maíz se justifica si se ponderan los beneficios que puede representar para una sociedad el uso de dicha diversidad. Sin embargo, no se puede aprovechar lo que no se conoce, por lo que el avanzar en la caracterización de la diversidad del maíz en sus distintos aspectos es una labor impostergable. La variabilidad en planta es aprovechada para resolver múltiples problemas de carácter agronómico y de productividad, en tanto que la del grano tiene que ver con su uso en los diversos procesos artesanales, culinarios e industriales para elaborar diferentes productos.

El conocimiento de la diversidad en contenido y tipo de fenoles en el grano de las accesiones de maíz resguardadas en los distintos bancos de germoplasma del país y la relación de estos compuestos con las distintas actividades biológicas puede contribuir a un mayor uso de los recursos genéticos de esta gramínea.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la composición fenólica y de actividades biológicas en el grano de maíces con pigmentos antociano entre razas mexicanas.

### **2.1 Objetivos particulares**

1. Realizar la caracterización fenólica (fenoles solubles totales, flavonoides totales, antocianinas totales, proantocianidinas o flabofenos) del grano de maíz en razas con variantes de grano de color azul/morado, rojo cereza y rojo ladrillo (rojo aladrillado) y su variabilidad de tonalidades dentro de cada color.
2. Determinar las actividades biológicas de actividad antioxidante, actividad antimutagénica y actividad antifúngica de los extractos fenólicos del grano de maíz en razas con variantes de grano de color azul/morado, rojo cereza y rojo ladrillo y su variabilidad de tonalidades dentro de cada color.
3. Efectuar un estudio de caso, dentro de cada color de grano para determinar la variabilidad en composición fenólica y de actividades biológicas dentro de una raza.
4. Definir colecciones núcleo de maíces con base en su perfil fenólico/antociano.

## **3. ANTECEDENTES**

México es uno de los principales centros de origen del maíz, y debido a esto la diversidad genética de esta gramínea es elevada. Se han descrito a la fecha cerca de 54 diferentes razas de maíz (Sánchez *et al.*, 2000). En muchas de ellas se presentan variantes de grano con diferentes colores, dentro de los cuales los más comunes son los morados y rojos con diferentes intensidades (Salinas, 2000). El color en estos maíces se debe a la presencia de polifenoles del tipo antocianinas (ANT), que son las más comunes (Harborne y Self, 1987;

Salinas *et al.* 1999), aunque en algunos maíces de grano rojo se reporta la presencia de flobafenos y proantocianinas (Gonzalez-Manzano *et al.*, 2008).

El estudio de los polifenoles se ha intensificado en los últimos años debido a la relación de una dieta elevada en estos compuestos con menor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas. Entre las múltiples actividades biológicas atribuidas a los polifenoles se cita la actividad antioxidante, que es de las más relevantes por su posible conexión con el efecto protector de los polifenoles hacia el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cánceres.

Los polifenoles del grano de maíz se clasifican en fenoles solubles o extractables y fenoles insolubles o ligados. Los primeros comprenden todos aquellos polifenoles que se solubilizan en el solvente usado para su extracción, debido a que se encuentran contenidos en las vacuolas celulares. Los fenoles insolubles o ligados por su parte, se encuentran ligados a componentes de pared celular (Naczk y Shahidi, 2004) y para extraerlos es necesario realizar una hidrólisis, sea alcalina, ácida o enzimática (Adom y Liu, 2002; Cuevas-Montilla *et al.*, 2011).

En los maíces con pigmento tipo antociano, los polifenoles asociados con su coloración característica se extraen predominantemente en la fracción de polifenoles solubles. En esta fracción se encuentran las antocianinas (ANT), que han sido de los grupos más estudiados (Salinas *et al.*, 1999; Espinosa, 2003; López-Martínez *et al.*, 2009). Se tienen reportes del contenido y tipo de las ANT predominantes en el grano en cerca de 25 razas de maíz (Espinosa, 2003). El contenido de estos flavonoides en el grano de maíz varía de acuerdo con su color, el maíz azul morado tiene más antocianina que el rojo cereza. La variabilidad reportada en las accesiones de grano con coloración azul/morada va desde 213.6 hasta 1294.6 mg equivalentes de cianidina 3-glucosido /kg de muestra seca. En las de coloraciones rojas la variación se ubica entre 30.7 a 188.1 mg de pelargonidina 3 glucósido equivalente/kg de muestra seca. En los maíces con coloración azul/morada las razas con los menores contenidos son Tehua y Tuxpeño (Salinas *et al.* 2012a), en tanto que las de mayor son Cónico y Chalqueño (Salinas *et al.*, 2012b). El perfil de ANT en los granos con tonalidad azul/morada es más complejo del que se observa en los rojo cereza. Se ha explorado también la actividad antioxidante (AA) de los extractos ricos en ANT a partir de maíces tanto azul/morados como

rojos y se ha señalado que los primeros (azul/morados) poseen mayor AA que los segundos (rojos) atribuido a una mayor concentración de ANT (Robles, 2004; de la Parra *et al.*, 2007; López-Martínez *et al.*, 2009; Mora-Rochin *et al.*, 2010), sin embargo, en razas como Bolita, esta relación no se cumple, ya que accesiones con valores menores de antocianinas exhiben elevados valores de AA (Salinas *et al.*, 2012b).

De la diversidad genética en maíz, pocas razas presentan variantes de grano con potencial para su uso en la extracción de pigmentos. Algunas de estas son Arrocillo, Elotes Cónicos y Purépecha (Díaz, 2003; Salinas *et al.*, 2005). Este color de grano no se abordará en el presente trabajo de investigación.

En algunas razas mexicanas de maíz también se presentan variantes de grano con coloraciones “rojo ladrillo” que se atribuye a compuestos diferentes a antocianinas, denominados flabofenos. En algunos de estos maíces pueden estar presentes en el endospermo también carotenoides, que contribuye a la coloración. Los flabofenos son en algunos casos también llamados proantocianidinas (PAs). Resultados aún no publicados obtenidos en el laboratorio de maíz del INIFAP muestran un contenido sobresaliente de PAs en el grano de accesiones color rojo ladrillo, de la raza Chalqueño, con relación a las de grano azul/morado. Sin embargo, no se han cuantificado los flabofenos en estas accesiones. La Figura 1 presenta fotografías digitales de los colores de grano azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo que se presentan en varias de las razas de maíz de México.



**Figura 1.** Fotografías que ilustran los colores de grano de las accesiones de maíz que se estudiaron en el trabajo. A= maíz azul/morado; B= maíz rojo cereza; C= maíz rojo ladrillo.

Los flavonoides en el grano de maíz con pigmentos antociano comprenden un grupo amplio de compuestos, dentro del cual se ubican las antocianinas, flavonoles, proantocianidinas y flobafenos. Cada uno de estos sub-grupos posee diferentes actividades biológicas. En general, todos los flavonoides poseen actividad antioxidante, pero la “potencia” de esta actividad va a depender de su estructura química particular (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Las antocianinas son importantes no solo por ser potentes antioxidantes, sino que además son colorantes naturales que se utilizan en la industria de alimentos. En este sentido, los maíces con potencial para la extracción comercial de pigmentos son los maíces morados, de los cuales se tiene poca diversidad en México.

En la fracción de polifenoles solubles del grano de maíz morado, algunos flavonoles como kaempferol y morin, están presentes en cantidades inclusive mayores que ácidos fenólicos como el ferúlico, que es el principal compuesto fenólico en el grano de maíz. Estos flavonoles presentan una tonalidad ligeramente amarilla, y se han asociado con un potencial antioxidante elevado, capaz de contrarrestar el estrés oxidativo, al estimular las enzimas antioxidantes endógenas en hígado, riñón y cerebro de ratas de laboratorio (Ramos-Escudero *et al.*, 2012).

Las proantocianidinas y flobafenos se clasifican dentro del grupo de los flavonoles, como un sub-grupo de los flavonoides. Su presencia en el grano de maíz se ha asociado con la tolerancia a la infestación por *Fusarium* (Pilu *et al.*, 2011). De manera general, las proantocianidinas se consideran relevantes para la salud cardiovascular al reducir la rigidez de venas y arterias y promover la estabilización del colágeno y el mantenimiento de la elastina, dos proteínas clave del tejido conectivo, que proporciona soporte a distintos órganos, articulaciones y vasos sanguíneos (de la Iglesia *et al.*, 2010).

La identificación de colectas con contenidos y tipos sobresalientes de fenoles en sus granos, podría contribuir a detonar su uso en la elaboración de nuevos productos en los que se aprovechen las distintas actividades biológicas reportadas en algunos fenoles carentes de color como serían las proantocianidinas.

Con relación a poblaciones de maíz con grano de coloraciones rojo ladrillo, con presencia de proantocianidinas (PAs) y flabofenos, que son compuestos fenólicos asociados con la tolerancia a daños por *Fusarium* (Pilu *et al.*, 2011) es prácticamente nada lo que se ha

avanzado en su caracterización. Adicionalmente, las PAs son taninos condensables, que en la alimentación de rumiantes tienen un valor importante por su participación en la reducción de gas metano (Bhatta *et al.*, 2009; Piluzza *et al.*, 2013). Hoy día las dietas para rumiantes incluyen una fracción de taninos condensados en combinación con taninos hidrolizables. Los maíces nativos con coloraciones de grano rojo ladrillo se presentan en razas adaptadas a los Valles Altos del país. Es quizá el color de grano menos común, dentro de la diversidad de colores con pigmentos antociano.

La presencia de los compuestos fenólicos (CF) en los diferentes alimentos contribuye a sus características distintivas de olor, sabor y color. Los CF se pueden encontrar en forma soluble o libre e insoluble o ligados. En el grano de maíz la fracción insoluble es la más importante por su contribución al contenido total de CF, pues representa alrededor de 98.9% (Adom y Liu, 2002). Sin embargo, en los maíces con pigmentos antociano, es la fracción soluble la que posee la mayor diversidad de este tipo de compuestos.

La identificación de distintas actividades biológicas asociadas a determinados CF ha contribuido a que el número de trabajos relacionados con su evaluación se incremente de manera substancial. Entre las actividades biológicas más estudiadas se halla la actividad antioxidante y antimutagénica, que se relacionan con la protección de biomoléculas a la oxidación por parte de radicales libres, generados durante el metabolismo celular, y la protección hacia una posible mutación del material genético (Mendoza-Díaz *et al.*, 2012). Son estas dos actividades biológicas asociadas a los CF lo que hace que su ingesta se asocie con beneficios a la salud.

Existe relación entre la estructura de los CF y sus actividades biológicas y la magnitud de éstas. En general se acepta que todos los CF poseen actividad antioxidante, pero las antocianinas son más potentes que los ácidos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1996). La actividad antimutagénica está asociada con la presencia de antocianinas (Mendoza-Díaz *et al.*, 2012), pero en forma más intensa con la presencia de ácidos fenólicos y flavonoles del tipo quercetina en maíz morado (Pedreschi y Cisneros-Zevallos., 2007). La actividad antifúngica se relaciona con un tipo particular de taninos hidrolizables (Glazer *et al.*, 2012) o con las procianidinas y flavonoles (Barros *et al.*, 2013).

Es pues relevante determinar el tipo de CF que predomina en una matriz vegetal, para poder asociarlo con la actividad biológica que presente el extracto, además de poder tener la identidad química de sus estructuras.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Selección de las accesiones de estudio**

La estrategia seguida para obtener las accesiones a usar en el estudio fue solicitar a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) un listado de accesiones clasificadas con color de grano azul, morado, negro y rojo. De la CONABIO se recibió un listado de 1007 accesiones de maíz con coloración azul morado, la cual es la más común en la mayoría de las razas de maíz en México. Esta base de datos contenía información para cada accesión referente a la raza a la cual pertenece, color de grano, año y lugar de colecta, coordenadas geográficas del lugar de colecta, número de catálogo, clave de identificación, entre otros datos. De esta lista se seleccionaron 456 accesiones y se solicitó a la CONABIO su archivo fotográfico para confirmar el color de su grano. Una vez que se revisó cada una de las fotografías, y con base en el dato de la raza a la cual pertenece cada accesión, se depuró la lista para tener 186 accesiones de grano azul morado pertenecientes a 21 razas mexicanas de maíz, las cuales se solicitaron al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

También se solicitó al banco de germoplasma de CIMMYT la relación de accesiones con grano azul morado resguardadas. La relación recibida contenía 168 accesiones de maíz con color de grano azul y azul oscuro. El listado se depuro al eliminar las que carecían de información sobre la raza a la que pertenecían, de origen exótico o con ubicación geográfica redundante, de manera que se eligieron únicamente 50 accesiones. En estas accesiones estaban representadas 12 razas de maíz ya consideradas en el listado proporcionado por la CONABIO, pero también seis razas diferentes adicionales. En conjunto se seleccionaron **236** accesiones de maíz con grano azul morado de **25** diferentes razas de maíz.

Para seleccionar las accesiones de grano color rojo cereza y rojo ladrillo, se solicitó a la CONABIO el archivo fotográfico de todas las accesiones clasificadas como de color rojo.

En los datos de pasaporte para ingresar muestras a los bancos de germoplasma no se hace distinción de las diferentes tonalidades en este color. Se revisó un total de 1050 archivos fotográficos, para seleccionar las referentes al color de grano rojo cereza y rojo ladrillo. De estos archivos se seleccionaron 99 accesiones de maíces con color de grano rojo cereza, provenientes de 17 razas y 44 accesiones con coloración rojo ladrillo, de 20 razas diferentes.

Se solicitó a CIMMYT el listado de accesiones de maíz con grano rojo resguardadas en su banco de germoplasma. Se recibió información de 70 accesiones, de las cuales se realizó una depuración y se eligieron 15 con grano rojo cereza, provenientes de siete razas y ocho con grano rojo ladrillo provenientes de 5 razas. En conjunto se seleccionaron 114 accesiones con coloración rojo cereza que provinieron de 18 razas, y 52 accesiones con grano rojo ladrillo procedentes de 20 razas mexicanas de maíz.

Para seleccionar las muestras de estudio se consideró:

a) Año de colecta. Se decidió trabajar con accesiones preferentemente colectadas en el periodo 2007-2012, para minimizar en lo posible el efecto de luz y oxígeno sobre los compuestos fenólicos del grano de maíz, particularmente las antocianinas, que son fotosensibles. Sin embargo, para contar con un listado que incluyera un mayor número de razas de maíz, algunas accesiones provienen de años anteriores a este periodo.

b) Uniformidad del color de grano. Dado que uno de los objetivos del proyecto es caracterizar accesiones de maíz por su color de grano, se consideró no incorporar accesiones que presentaran mezcla de granos de colores como blanco, amarillo o de un tono diferente al predominante. Esto fue inicialmente, pero al final se decidió incorporar algunas accesiones que tenían granos de otros colores, pues no se alcanzaba el número de muestras comprometidas.

c) Para accesiones de una misma raza, se seleccionaron aquellas obtenidas a alturas contrastantes y sitios distantes.

d) Se consideró también la distribución de la raza a la que pertenecen las accesiones. Esto es, para razas de amplia distribución, se procuró tener accesiones de los diferentes estados de la república.

La base de datos final contiene información que incluye:

1. Código único: Identificador único que ligará a los datos de las tablas.
2. Origen: Nombre de la accesión.
3. Colección: Nombre de la colección de donde se obtendrá el material.
4. Institución: Nombre de la institución a la que está adscrita la colección.
5. Numero de accesión: Número o clave asignado a la accesión por la colección.
6. Colector: Nombre(s) y apellidos de quién obtuvo el registro, colecta o accesión.
7. Número de colecta: Número o clave asignado por el colector al registro, colecta o accesión.
8. Fecha de colecta: Día, mes y año en que se colectó el registro, colecta o accesión.

Una vez obtenida la lista de accesiones seleccionadas se procedió a realizar un mapa de distribución geográfica para cada color de grano en el programa ArcGIS utilizando las coordenadas geográficas de cada accesión seleccionada.

#### **4.2 Evaluación de características físicas del grano**

Esta caracterización se realizó a partir de las muestras obtenidas de los bancos de germoplasma. Las variables determinadas fueron: color, peso de 100 semillas, tipo de endospermo y ubicación del pigmento en el grano. Los análisis se realizaron conforme a lo descrito por Salinas y Vázquez, (2006), con excepción de las variables tipo de endospermo y ubicación del pigmento en el grano, las que se realizaron de acuerdo con lo descrito por Bedolla y Rooney, (1982) y Salinas, (2000), respectivamente.

**Color.** La determinación se realizó por medio de un colorímetro (Hunter-Lab. Virginia, USA). El aparato se calibró de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con los mosaicos blanco y negro. El color se tomó sobre la superficie de los granos sanos colocados sobre una base de plastilina gris con el pedicelo hacia abajo y la corona hacia arriba, simulando la forma en que se encuentran en la mazorca. La determinación se realizó por triplicado. Esta manera de exponer los granos para la lectura del color se asumió porque experiencias previas en el

laboratorio han mostrado que, en los maíces con granos de los colores bajo estudio, si se expone la muestra como “granos libres” los resultados de las variables de color no corresponden con lo que visualmente se aprecia. Al respecto, se ha enviado una nota de investigación a la revista Fitotecnia Mexicana, donde se indica la forma correcta de exponer la muestra para medir el color del grano en maíces con pigmentos antociano.

**Peso de 100 semillas (PCS).** Se contaron manualmente 100 granos sanos de cada muestra, los cuales se eligieron de manera aleatoria, posteriormente fueron pesados en una balanza semi-analítica (marca sartorius, modelo BL 610. Gotinga, Alemania). El análisis se realizó por duplicado y se expresó en gramos.

**Tipo de endospermo (TE).** Mediante la observación subjetiva de los cortes longitudinales de 10 granos se clasificaron las muestras en función de la proporción de endospermo vítreo/harinoso, asignando los valores de 1, 2, 3, 4 y 5 a las proporciones de 100, 75, 50, 25 y 0 % de endospermo harinoso, respectivamente (Bedolla y Rooney, 1982).

**Ubicación del pigmento en el grano (UP).** De cada muestra se tomaron 10 granos de manera aleatoria que fueron puestos a remojar en agua destilada durante 15 min, para luego separar el pericarpio del resto del grano con ayuda de un bisturí. La ubicación del pigmento en el grano se realizó de manera visual, clasificándose por su ubicación en el pericarpio, capa de aleurona o ambas estructuras. Se clasificó la ubicación de acuerdo con: 1 = pericarpio, 2 = capa de aleurona y 3 = ambas estructuras (Salinas, 2000).

#### **4.3 Análisis del contenido de diferentes tipos de compuestos fenólicos**

**Preparación de la muestra.** Para la obtención de la harina del grano de maíz para la preparación de los extractos de compuestos fenólicos se realizaron algunas pruebas preliminares para determinar si se usaría grano entero desgrasado, grano entero sin desgrasar o grano sin germen, por el efecto que la grasa tiene sobre las distintas determinaciones de compuestos fenólicos. Para ello, se analizaron cuatro muestras para fenoles solubles totales, empleando las distintas condiciones del grano y se compararon los resultados entre ellas. En esta prueba, la extracción de compuestos fenólicos del grano de maíz se realizó empleando como solvente metanol (J.T. Baker, Xalostoc Edo. de Mex., México) acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Louis USA). Los compuestos fenólicos solubles del

grano de maíz se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), expresando el resultado en función del ácido ferúlico, que es el principal compuesto fenólico del grano de maíz. Los resultados indicaron que lo más conveniente era trabajar con la muestra de grano entero desengrasado (Cuadro 1), ya que la muestra a la que se le retiró el germen, mostraba una reducción significativa de los fenoles solubles totales (FST), debido a que el germen contiene una cantidad elevada de este tipo de compuestos, los cuales no se estarían cuantificando. El extracto de grano entero requirió realizar extracciones líquido-líquido con hexano para remover la grasa que se pudo extraer con el solvente utilizado. Esta acción resulta tediosa, genera una gran cantidad de contaminantes, y es tardada, por lo que se descartó como posibilidad.

**Cuadro 1.** Tratamientos probados en la preparación de la muestra del grano de maíz y su efecto en el contenido de fenoles solubles totales (FST).

Muestras probadas	Tratamiento	FST ( $\mu\text{g EAF/g muestra seca}$ )	Desviación Estándar
8	Grano entero	1497.24	71.47
	Grano desgerminado	905.34	4.73
	Grano desengrasado	1467.30	67.20
12	Grano entero	1735.30	0.45
	Grano desgerminado	1201.57	19.28
	Grano desengrasado	1736.79	25.91
15	Grano entero	1675.55	61.30
	Grano desgerminado	786.93	5.39
	Grano desengrasado	1566.10	29.71
16	Grano entero	1618.59	22.60
	Grano desgerminado	1047.21	25.24
	Grano desengrasado	1620.01	11.30

Para el acondicionamiento de la muestra previo a la molienda, se seleccionaron entre 40-45 granos los cuales fueron aplastados con un martillo y posteriormente troceados con ayuda de un “cutter”, para dejarlo en trozos pequeños, particularmente el germen y aumentar la superficie expuesta al solvente durante el desengrasado. El proceso de desengrasado de la muestra se realizó en un sistema Soxhlet, por un tiempo de ocho horas y empleando como solvente éter de petróleo (J.T. Baker; Xalostoc, Edo. De Méx., México). Al concluir el tiempo de desengrasado la muestra se colocó en una estufa a  $37 \pm 2$  °C por 14 horas para eliminar el

solvente (GRIEVE, modelo LW-201 C. Illinois, USA). La muestra previamente desengrasada y seca se molió en un molino tipo ciclónico (marca UDY Corporation, modelo 3010-080p. USA) con malla de 0.5 mm para la obtención de la harina a la cual se le determinó la humedad para expresar los resultados en base seca.

### **Preparación de extractos**

A partir de la harina de grano se realizó la extracción de los distintos compuestos fenólicos (fenoles solubles totales, antocianinas, flavonoides y proantocianidinas). Se utilizaron dos tipos de disolventes. Uno fue metanol acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (MeOHTFA), y el otro fue una mezcla de acetona: agua: ácido acético en proporciones 75:24.5:0.5 v/v/v (AceAqAc). La selección de los solventes se realizó considerando la polaridad de los diferentes compuestos fenólicos. El solvente MeOHTFA se utilizó para la extracción de las antocianinas debido a que estos compuestos son de mayor polaridad que flavonoides y proantocianidinas, además de que el pH ácido favorece su estabilidad; el solvente AceAqAc se empleó para la extracción de flavonoides y PAs, que son de menor polaridad que las antocianinas (Prior *et al.*, 2005). La cuantificación total de los compuestos fenólicos solubles o extractables en los distintos solventes empleados se realizó mediante métodos de espectrofotometría (Espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS, México). Se trabajó exclusivamente con la fracción de compuestos fenólicos (CF) solubles, por ser la de mayor diversidad (Ramos- Escudero *et al.*, 2012; Salinas *et al.*, 2017).

### **Extracción de compuestos fenólicos empleando como solvente metanol acidificado**

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se depositó 1.0 g de muestra pesado en balanza analítica (Sartorius, modelo TE214S; Gotinga, Alemania) y se mezcló con 20 mL de metanol (J.T. Baker, Xalostoc; Edo. De Méx., México) acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). La mezcla se sonó 15 min en un baño sonicador (Branson equipment, model 2510; Dabumry, USA) y se refrigeró 105 min para completar 2 horas de extracción. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 2660 x g por 10 min. (Centrifuga Hettich Zentrifugen, Modelo Universal 32; Alemania). Se recuperó el sobrenadante mediante decantación y se filtró con papel Whatman No. 4. Se midió el volumen del extracto y se colocó en refrigeración hasta su análisis. Este extracto se utilizó para cuantificar los fenoles

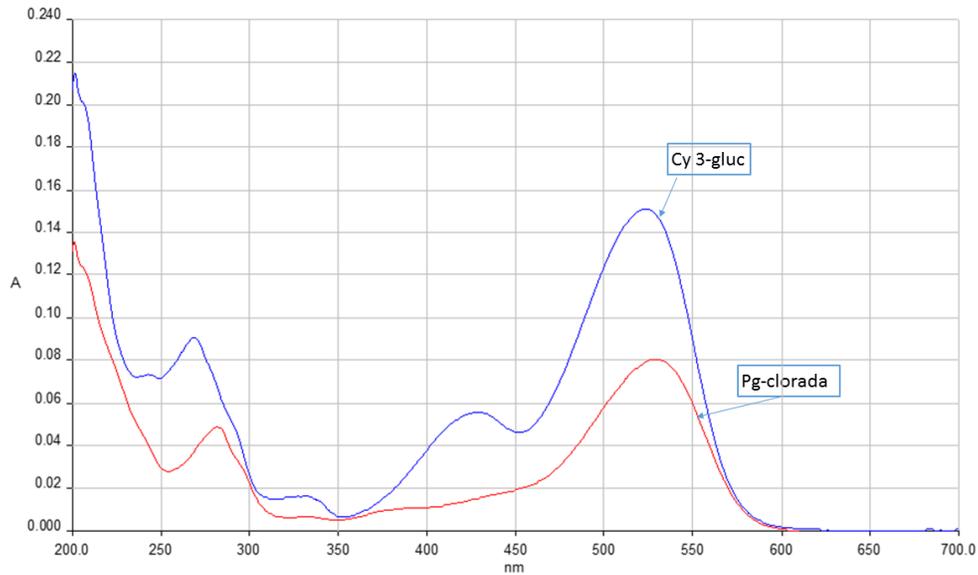
solubles totales y las antocianinas totales del grano de maíz de las accesiones bajo estudio. La extracción de cada muestra se realizó por duplicado.

### **Extracción de compuestos fenólicos empleando como solvente una mezcla de acetona:agua:ácido acético**

Se pesó 1.0 g de harina en una balanza analítica, se depositó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se mezcló con 20 mL del solvente preparado con acetona /agua /ácido acético (75:24.5:0.5 v/v/v) (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, Méx.). La muestra se llevó a un baño sonicador por 15 min. Se sometió a agitación en un agitador horizontal (New Brunswick, modelo G10; New Brunswick, N.J., USA) durante 60 min. Posteriormente, se centrifugó a 2660 x g por 10 min. El sobrenadante se recuperó, se filtró con papel Whatman No. 4, se midió el volumen del extracto y se almacenó en tubos de vidrio a -20°C protegiéndolos de la luz. A partir de este extracto se cuantificaron los flavonoides y proantocianidinas. La extracción de cada muestra se realizó por duplicado.

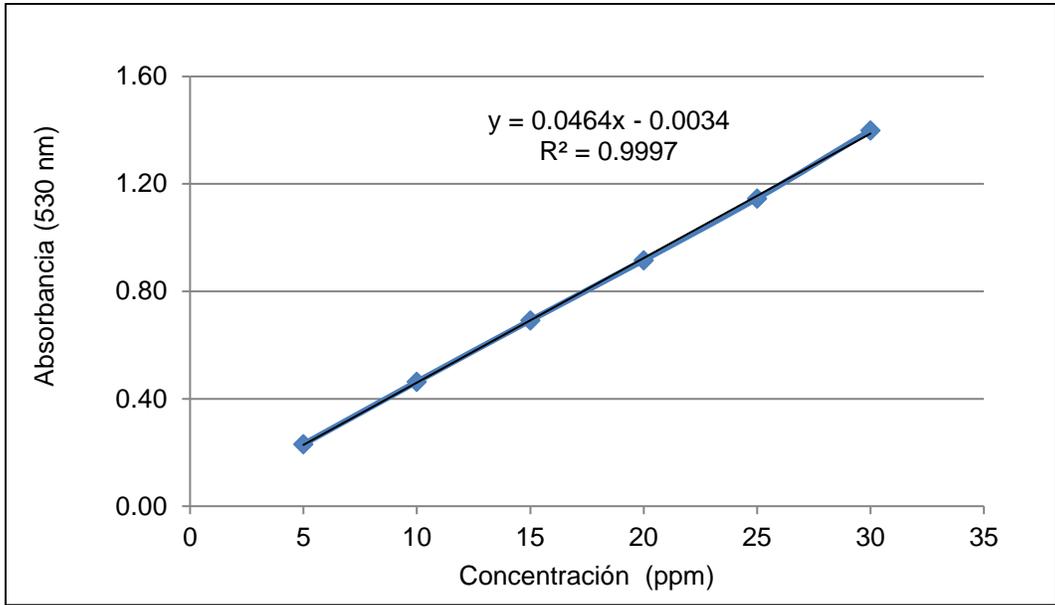
### **Cuantificación de antocianinas totales (ANT)**

Se utilizó el método descrito por Abdel-Aal *et al.* (1999), con las modificaciones de Salinas *et al.*, (2005). La cuantificación del contenido de antocianinas fue determinada directamente del extracto obtenido con MeOHTFA. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Lambda 25 UV-Vis (PerkinElmer, USA). Para comprobar que la longitud de onda seleccionada para cuantificar las antocianinas en cada color de grano (azul morado y rojo cereza), coincidía con lo reportado en los métodos de análisis previamente consultados, se realizaron barridos en el rango de 200-700 nm de algunas muestras de los dos colores de grano. Se corroboró que en las muestras de grano azul morado los máximos de absorción se ubicaron entre 525 y 529 nm, en tanto que en los de grano rojo cereza se encontraron entre 504 y 512 nm. De acuerdo con estos resultados, los extractos de antocianinas de las muestras de grano azul morado se leyeron a una longitud de onda de 530 nm, en tanto que los de grano rojo cereza se leyeron a 520 nm. En la Figura 2 se muestran los máximos de absorción en UV-vis de cianidina 3-glucósido y de pelargonidina clorada.

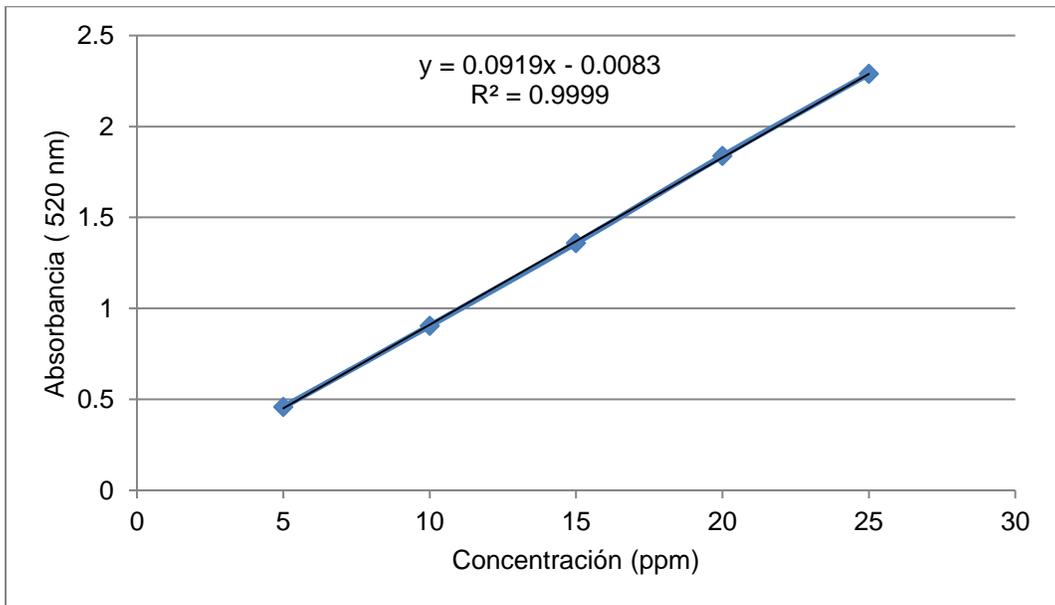


**Figura 2.** Máximos de absorción de estándares comerciales de cianidina 3-glucósido (Cy 3-gluc) y pelargonidina clorada (Pg-clorada).

Debido a que en los maíces de grano azul morado predominan los derivados de cianidina (Salinas *et al.*, 1999; Salinas *et al.*, 2003; Zilic *et al.*, 2012), se elaboró una curva patrón de cianidina 3-glucósido (Poliphenols, NW) para expresar el contenido de antocianinas totales del extracto en función de esta antocianina. En los granos de maíz de color rojo cereza dominan los derivados de pelargonidina (Salinas *et al.*, 1999; Salinas *et al.*, 2003) por lo cual se elaboró una curva patrón de pelargonidina clorada (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para expresar los resultados de antocianinas totales en función de esta antocianina. En las figuras 3 y 4 se presentan las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración de ambos estándares.



**Figura 3.** Curva patrón de cianidina 3-glucosido leída a una longitud de onda de 530 nm utilizada para calcular el contenido de antocianinas totales (ANT) en el grano de maíz de color azul morado.



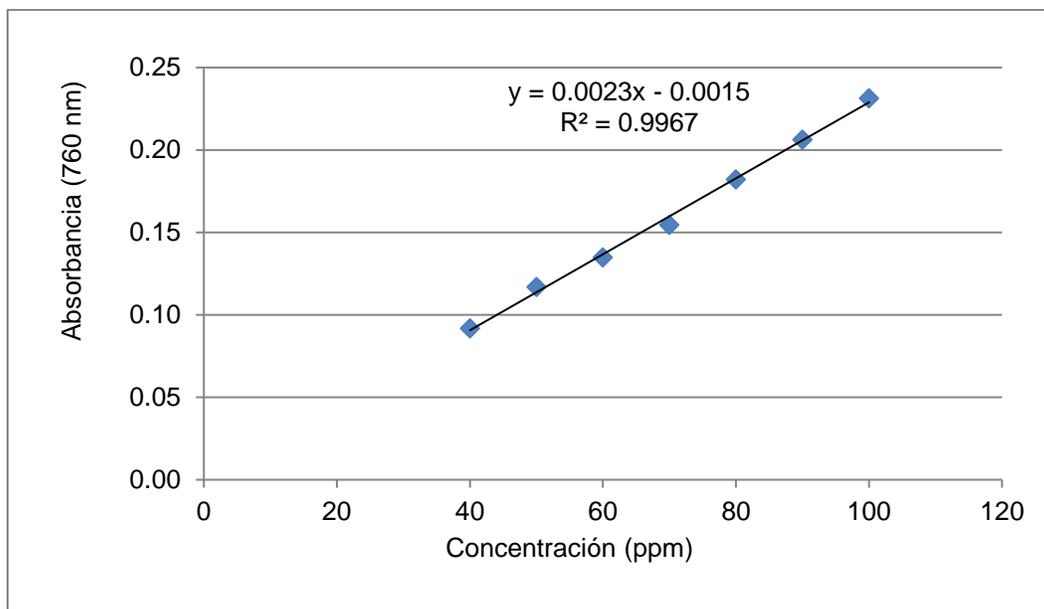
**Figura 4.** Curva patrón de pelargonidina clorada leída a una longitud de onda de 520 nm y utilizada para calcular el contenido de antocianinas totales (ANT) en el grano de maíz de color rojo cereza y rojo ladrillo.

En aquellos extractos con un contenido elevado de antocianinas, se realizaron las diluciones necesarias con el mismo disolvente utilizado en la extracción para obtener lecturas de absorbancia que se ubicaran dentro de los puntos de curva. El espectrofotómetro se calibró a una absorbancia cero con el solvente de extracción. El contenido de antocianinas totales, se expresó en mg equivalentes de cianidina 3-glucósido (ECG)/ kg MS para las muestras de grano azul morado y en mg equivalentes de pelargonidina clorada/kg MS para las muestras con grano rojo cereza y rojo ladrillo. Los análisis se realizaron por duplicado.

### **Fenoles solubles totales (FST)**

Se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu según lo descrito por Singleton y Rossi, (1965), con las adecuaciones realizadas por Salinas *et al.*, (2012a). En un tubo de ensayo se colocaron 100  $\mu$ L del extracto de MeOHTFA y se adicionaron 125  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu 1N (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), se agitó en vortex (Scientific Industries, modelo G560. USA) y se dejó reaccionar por 6 min en oscuridad, posteriormente se adicionaron 1250  $\mu$ L de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (J.T. Baker, Xalostoc Edo. de México, México) al 19 % (p/v) y 1525  $\mu$ L de agua destilada, se agitó la muestra y se dejó reaccionar durante 75 min en oscuridad, para finalmente centrifugar durante 10 min a 2660 x g para eliminar turbidez. La muestra se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Se elaboró una curva patrón utilizando ácido ferúlico como estándar (Sigma-Aldrich, Louis USA), ya que este ácido fenólico es el más abundante en el grano de maíz (De la Parra *et al.*, 2007). Las concentraciones para la realización de la curva fueron de 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm. Los valores de absorbancia obtenidos a 760 nm se relacionaron con los valores de concentración de los respectivos puntos de curva mediante un análisis de regresión lineal simple para obtener la ecuación correspondiente (Figura 5). El contenido de fenoles solubles totales se expresó como mg de ácido ferúlico equivalente /kg de muestra seca (mg EAF/kg MS). Los análisis se realizaron por duplicado.



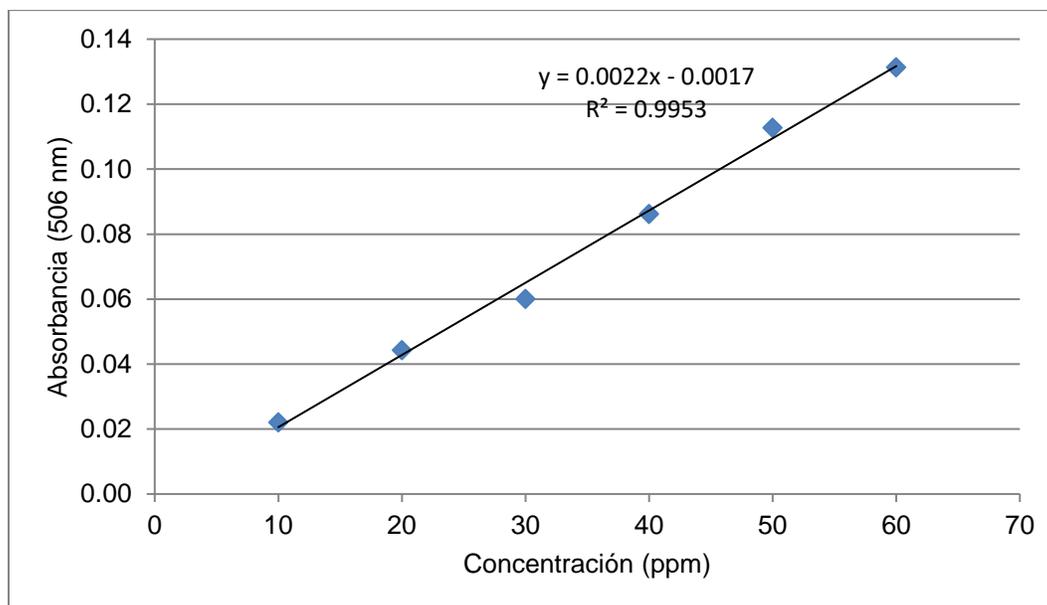
**Figura 5.** Curva patrón de ácido ferúlico utilizada para calcular el contenido de fenoles solubles totales (FST) del grano de maíz de color azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo.

### Flavonoides totales (FLAV)

La cuantificación de flavonoides totales se realizó empleando el método del cloruro de aluminio descrito por Sumczynski *et al.* (2015). Para realizar el análisis, en un tubo de ensayo se mezclaron 8.5 mL de etanol (J.T. Baker, Xalostoc Edo. de México, México) al 20 % (Etanol: Agua v/v), con 850  $\mu$ L del extracto obtenido con el solvente AcetAqAc y 375  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> 0.5 M (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México), la mezcla se agitó en Vortex y se dejó reaccionar durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 375  $\mu$ L de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Louis, USA) se agitó la muestra y se dejó reaccionar por 5 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 2.5 mL de NaOH 1 M (Fermont, Monterrey, N.L., México), se agitó la muestra y se dejó reaccionar durante 10 min, para finalmente centrifugar a 2660 x g durante 10 min para eliminar turbidez. La muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 506 nm.

Se elaboró una curva patrón utilizando catequina como estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), ya que este flavonoide es una de los más abundantes en el grano de maíz. Las concentraciones para elaborar la curva fueron de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm. Los valores de absorbancia obtenidos a 506 nm se relacionaron con los valores de concentración de los

respectivos puntos de curva mediante un análisis de regresión lineal simple para obtener la ecuación correspondiente. (Figura 6). Los resultados se expresaron como mg de catequina equivalente /kg de muestra seca (mg EC/kg MS). Los análisis se realizaron por duplicado.

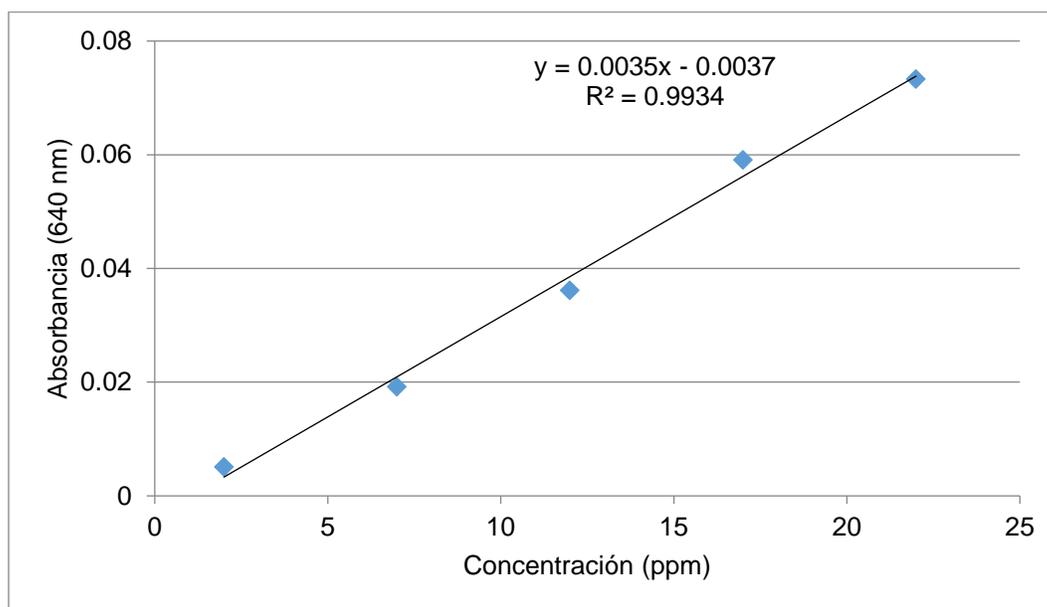


**Figura 6.** Curva patrón de catequina utilizada para calcular el contenido de flavonoides totales (FLAV) en el grano de maíz de los colores azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo.

### Proantocianidinas (PAs)

Se utilizó el método de DMAC 4-(Dimethylamino cinnamaldehyde) según lo descrito por Wallace y Giusti (2010). Para realizar la determinación se tomaron 2380  $\mu\text{L}$  de metanol HPLC (J.T. BAKER. Xalostoc Edo. de México, México) y se depositaron en un tubo de ensayo, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto AcetAqAc (acetona-agua-ácido acético) y 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de DMAC (SIGMA-ALDRICH, St. Louis USA) al 2 %. La mezcla se agitó en Vortex y se dejó reaccionar por 25 min en oscuridad y a temperatura ambiente. La muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. Se prepararon dos blancos para calibrar el equipo utilizando todos los reactivos indicados, pero en lugar de muestra, se utilizó el solvente de extracción. Se elaboró una curva patrón utilizando catequina como estándar (SIGMA-ALDRICH, St. Louis USA), por ser el metabolito más importante dentro de las proantocianidinas. Las concentraciones para la elaboración de la curva fueron de 2, 7, 12, 17 y 22 ppm. Los valores de absorbancia obtenidos a 640 nm se relacionaron con los,

valores de concentración de los respectivos puntos de curva para obtener la ecuación correspondiente (Figura 7). Los resultados se expresaron en miligramos equivalente de catequina (mg EC/kg de muestra seca (mg EC/kg MS)). Los análisis se realizaron por duplicado.



**Figura 7.** Curva patrón de catequina utilizada para calcular el contenido de proantocianidinas (PAs) en el grano de maíz de los colores azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo por el método DMAC.

#### 4.4 Evaluación de actividades biológicas

##### 4.4.1 Actividad antioxidante

Dado que se tenían los dos tipos de extractos (metanólico y acetónico) para cada accesión de grano, se realizaron pruebas preliminares de actividad antioxidante en los dos tipos de extractos para identificar en cual se obtenía la mayor actividad antioxidante. En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos para muestras de los tres colores de grano analizados. La mayor actividad antioxidante (AA) para las muestras de grano azul morado se presentó en el extracto de metanol acidificado, por lo que para las accesiones con este color de grano la prueba de actividad antioxidante se realizó con este extracto (metanol acidificado). En las accesiones de grano rojo cereza, una de las muestras analizadas presentó mayor (AA) en el extracto acetónico, sin embargo, considerando que el extracto metanólico favorece la

extracción de antocianinas y este color de grano posee una cantidad considerable de estos flavonoides, se utilizó también en estas muestras el extracto metanólico. En las de grano rojo ladrillo la mayor actividad antioxidante se obtuvo en el extracto acetónico, por lo que este extracto se seleccionó para realizar las determinaciones de actividad antioxidante. Los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante fueron ABTS y DPPH.

**Cuadro 2.** Actividad antioxidante en extractos metanólico acidificado y acetónico, de grano de maíz de diferentes colores.

Color de grano	Código único	Extracto de metanol acidificado		Extracto acetónico	
		µmol ET/g MS	Desviación estándar	µmol ET/g MS	Desviación estándar
AZM	039	5.7	0.1	3.5	0.1
	040	6.9	0.2	3.8	0.2
RC	012	1.8	0.1	2.3	0.1
	016	2.3	0.1	2.0	0.0
RL	001	1.7	0.0	2.5	0.0
	007	2.5	0.1	3.4	0.0

AZM: azul morado; RC: rojo cereza; RL: rojo ladrillo.

### Método ABTS

Se siguió la metodología descrita por Re *et al.*, (1999), la cual se fundamenta en medir el cambio de color de una solución del radical catión ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) al ser reducido por los compuestos antioxidantes del extracto.

El reactivo ABTS se prepara a una concentración 7 mM empleando como solvente agua. Es necesario generar el radical catión libre, esto se logra al mezclar en proporción 2:1 v/v, la solución de ABTS con una solución de persulfato de potasio 2.45 mM. La mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente y oscuridad por 12-14 horas.

La solución de trabajo del radical catión ABTS se diluye con un buffer de fosfatos 75 mM, pH=7.4. hasta tener una absorbancia de  $0.7000 \pm 0.0020$  leída a 734 nm.

El análisis de las muestras se realiza al mezclar en una celda de plástico 0.200 mL de extracto y 2.8 mL de solución de trabajo ABTS se agita y mide la absorbancia inmediatamente a 734 nm. La celda se almacena por 30 min bajo condiciones de oscuridad y posteriormente se

vuelve a medir la absorbancia. El espectrofotómetro se ajusta a cero empleando como blanco la solución buffer.

El porcentaje de ABTS reducido se calcula mediante la expresión de la ecuación (1), en donde se considera una corrección de absorbancia por el efecto diluyente de la muestra. Para tal fin, se mezclan 0.2 mL de buffer, que estaría sustituyendo a la muestra, con los 2.8 mL de solución de trabajo ABTS y se toma la lectura de absorbancia a 734 nm. Esta absorbancia es  $A_b$  en la ecuación.

$$\% \text{ de ABTS reducido} = \left(1 - \frac{A_m}{A_b}\right) * 100 \quad (1)$$

Donde:

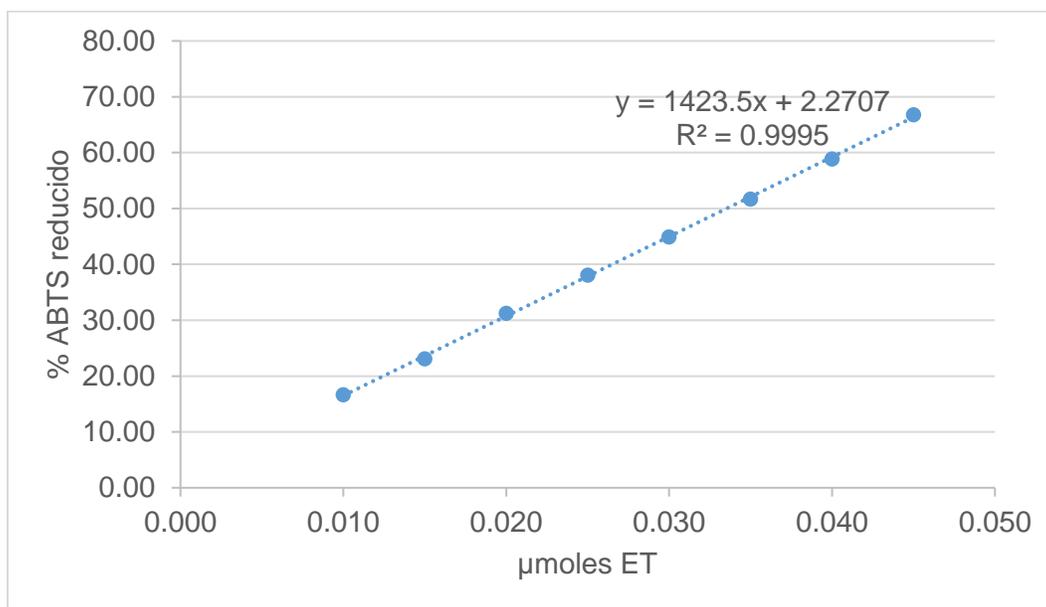
$A_m$  = absorbancia de la muestra después de los 30 min de reposo

Con el fin de expresar los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos del grano de maíz en función de un antioxidante conocido como es la forma hidrosoluble de la vitamina E, denominada comúnmente Trolox (6 - hidroxí - 2,5,7,8 - tetrametilcroman-2 ácido carboxílico), se preparó una curva patrón de este antioxidante. Se partió de una solución 500  $\mu$ M de Trolox solubilizado en el buffer de fosfatos. Los valores de absorbancia y porcentaje de ABTS reducido para los diferentes puntos de la curva preparada, se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Información sobre la curva patrón de Trolox preparada para expresar en este antioxidante la actividad antioxidante evaluada por el método de ABTS.

$\mu$ M de Trolox	$\mu$ L de solución stock de Trolox (500 $\mu$ M)	$\mu$ L de solución buffer para aforar a un mL	Absorbancia corregida ( $A_b - A_m$ )	% de ABTS reducido
50	100	900	0.1083	16.68
75	150	850	0.1486	23.10
100	200	800	0.2006	31.24
125	250	750	0.2415	38.06
150	300	700	0.2930	44.91
175	350	650	0.3340	51.69
200	400	600	0.3794	58.87
225	450	550	0.4271	66.80

Los datos de porcentaje de ABTS reducido se relacionaron con los respectivos valores de concentración de los puntos de curva, mediante un análisis de regresión lineal simple. La gráfica obtenida, así como la respectiva ecuación se presentan en la Figura 8.



**Figura 8.** Curva de calibración para el ensayo ABTS expresada en micromoles equivalentes de Trolox ( $\mu$ moles ET).

La actividad antioxidante de las muestras de grano analizadas se calculó mediante la ecuación (2), y se expresó en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca ( $\mu$ moles ET  $g^{-1}$  M.S.):

$$\mu\text{moles ET } g^{-1} \text{ MS} = \frac{y - 2.2707}{1423.5} * \frac{V_{ext}}{V_{ali}} * FD \quad (2)$$

Donde:

Y= Porcentaje de ABTS reducido

$V_{ext}$ = Volumen del extracto (mL)

$V_{ali}$ = Volumen de la alícuota tomada del extracto para su análisis (mL)

$P_{MS}$ = Peso de muestra seca (g)

FD= Factor de dilución

## Método DPPH

El DPPH (1,1-Diphenil-2-picril-hidrazina) es un radical libre estable que tiene un electrón de valencia desapareado en el átomo del puente de hidrógeno. La evaluación de la capacidad antioxidante por este método se fundamenta en el cambio de color que sufre la solución del radical al ser reducido por los compuestos antioxidantes de la muestra. A diferencia del método de ABTS, en el que es necesario formar el radical libre, en el método de DPPH, el reactivo es un radical estable. Para la aplicación del método por microplaca se siguió lo descrito por Fukumuto y Mazza (2000). Se utilizó una solución 60  $\mu\text{M}$  de DPPH solubilizado en metanol al 80 %. Esta solución presenta una absorbancia de entre 0.57 a 0.60 cuando se lee a una longitud de onda de 515 nm.

Para realizar el análisis de las muestras, una alícuota de 20 microlitros se colocó por cuadruplicado en los pozos de una microplaca de 96 pozos de fondo plano (Costar-Corning, USA). Se agregaron 200 microlitros de la solución de DPPH 60  $\mu\text{M}$ . En la placa se colocaron también ocho blancos, en los cuales en lugar de muestra se agregó un volumen de 20 microlitros de metanol al 80 %. La placa se colocó en un espectrofotómetro Multiscan Go (Thermo Fisher, USA) y se agitó. Se tomó la lectura después de un reposo de 30 min a temperatura ambiente.

Se elaboró una curva patrón de Trolox solubilizado en metanol al 80 %. Los puntos de curva, así como los valores de absorbancia corregida y el porcentaje de DPPH reducido se muestran en el Cuadro 4. Para el cálculo del DPPH reducido se usó la expresión (3):

$$\% \text{ de DPPH reducido} = \frac{A_b - A_m}{A_m} * 100 \quad (3)$$

Donde:

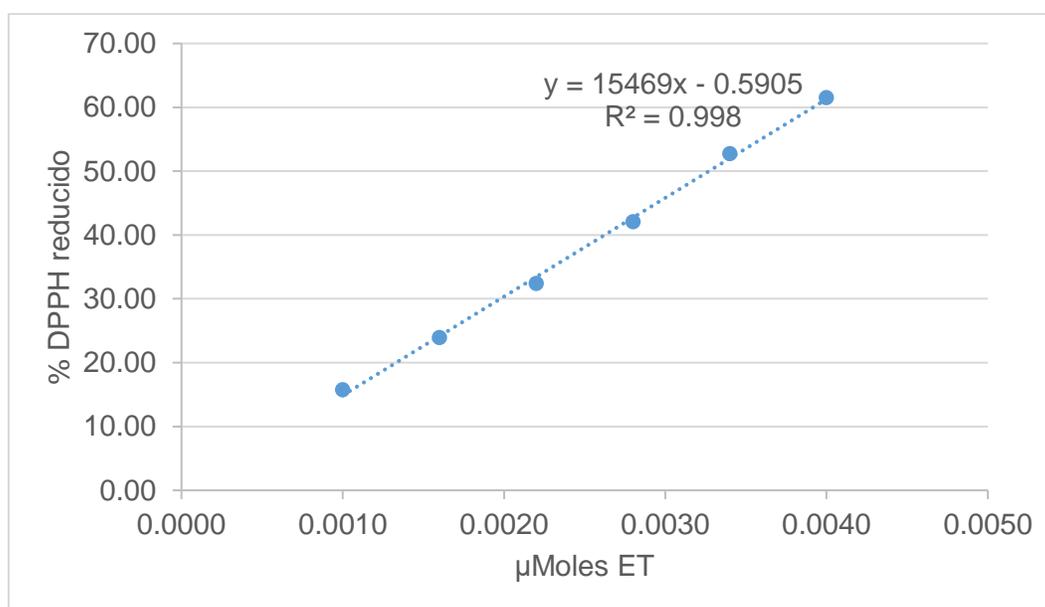
$A_m$ =Absorbancia de la muestra

$A_b$ =Absorbancia del blanco

**Cuadro 4.** Información sobre la curva patrón de Trolox preparada para expresar en este antioxidante la actividad antioxidante evaluada por el método de DPPH.

$\mu\text{M}$ de Trolox	$\mu\text{L}$ de solución stock de Trolox (500 $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ de metanol al 80% para aforar a un mL	Absorbancia corregida ( $A_b - A_m$ )	% de DPPH reducido
50	100	900	0.0559	15.78
80	160	840	0.0848	23.94
110	220	780	0.1147	32.40
140	280	720	0.1490	42.08
170	340	660	0.1868	52.76
200	400	600	0.2178	61.53

Los datos de porcentaje de DPPH reducido y la respectiva concentración de los puntos de la curva de Trolox se sometieron a un análisis de regresión lineal simple para obtener la gráfica de la Figura 9.



**Figura 9.** Curva de calibración para el ensayo DPPH expresada en micromoles equivalentes de Trolox ( $\mu\text{moles ET}$ ).

Los resultados de actividad antioxidante de los extractos del grano de las diferentes accesiones se calcularon por medio de la ecuación (4) y se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca ( $\mu\text{moles ET g}^{-1} \text{MS}$ ):

$$\mu\text{moles ET g}^{-1} \text{MS} = \frac{y + 0.5905}{15469} * \frac{V_{\text{ext}}}{V_{\text{ali}}} * P_{\text{MS}} * FD \quad (4)$$

Donde:

Y= Porcentaje de DPPH reducido

V<sub>ext</sub>= Volumen del extracto (mL)

V<sub>ali</sub>= Volumen de la alícuota tomada del extracto para su análisis (mL)

P<sub>MS</sub>= Peso de muestra seca (g)

FD= Factor de dilución.

#### 4.4.2 Actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica del grano de las accesiones se utilizó el extracto acetónico en los tres colores de grano, ya que se probó con el extracto de metanol acidificado (extracto de antocianina) sin que se observara ninguna inhibición. Por el contrario, se observó que este extracto favorecía el desarrollo del hongo.

De cada uno de los extractos acetónicos se tomó un volumen de 5 mL que se concentró en un rotaevaporador (marca Buchi modelo R-215, Suiza) para retirar el ácido acético y la acetona, que podrían tener efectos antimicrobianos. El extracto se ajustó a un volumen de 2 mL con agua destilada en tubos eppendorf y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Se empleó la prueba de microdilución en placa como prueba presuntiva de esta actividad. Se aplicó de acuerdo al método de microdilución en placa del documento M27-A2 del CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) publicado en 2004, que incorpora el uso del compuesto resazurina (azul de alamar).

#### Selección de la cepa a utilizar y su activación

Como primer paso en la implementación de la prueba se definió la cepa del hongo a utilizar que fue una cepa del hongo filamentoso *Fusarium oxysporum*, proveniente de la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP.

Para la activación de la cepa del hongo filamentoso se utilizó como medio de cultivo agar PDA (20ml/caja Petri) en el cual se colocó un disco de *Fusarium oxysporum*, previamente acondicionado. El acondicionamiento consistió en la elevación de la temperatura con agua a 37°C del criotubo, proveniente de un ultracongelador donde son resguardados estos

microorganismos. La cepa fue sembrada por impronta en el medio de cultivo. Las cajas Petri previamente rotuladas fueron incubadas a 28°C durante 7 días.

#### Preparación del inóculo fúngico

Se basa en el método del documento M38-P del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) donde se describen los parámetros para ensayar las actividades antifúngica y fungistática (MIC'S) en hongos filamentosos.

De la cepa de *Fusarium* activada previamente se cortó con asa microbiológica un cuadrado de 5 cm de lado del hongo desarrollado y se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía 150 mL de caldo PD. Al matraz con el caldo y el cuadrado del hongo se colocó un tapón de algodón para el ingreso de oxígeno y se incubó a 29°C durante 2 días con agitación suave a 120 rpm.

Una vez que el hongo desarrolló, se filtró el caldo en frasco y gasas estériles, vertiendo el contenido del caldo PD, procurando retener las hifas en la gasa. De esta manera se obtuvo una solución de conidios, libre de hifas que se ajustó a una concentración final de  $2 \times 10^5$  UFC/mL, mediante el uso de una cámara Neubauer y conforme la metodología de Bastidas (2013), para conteo celular.

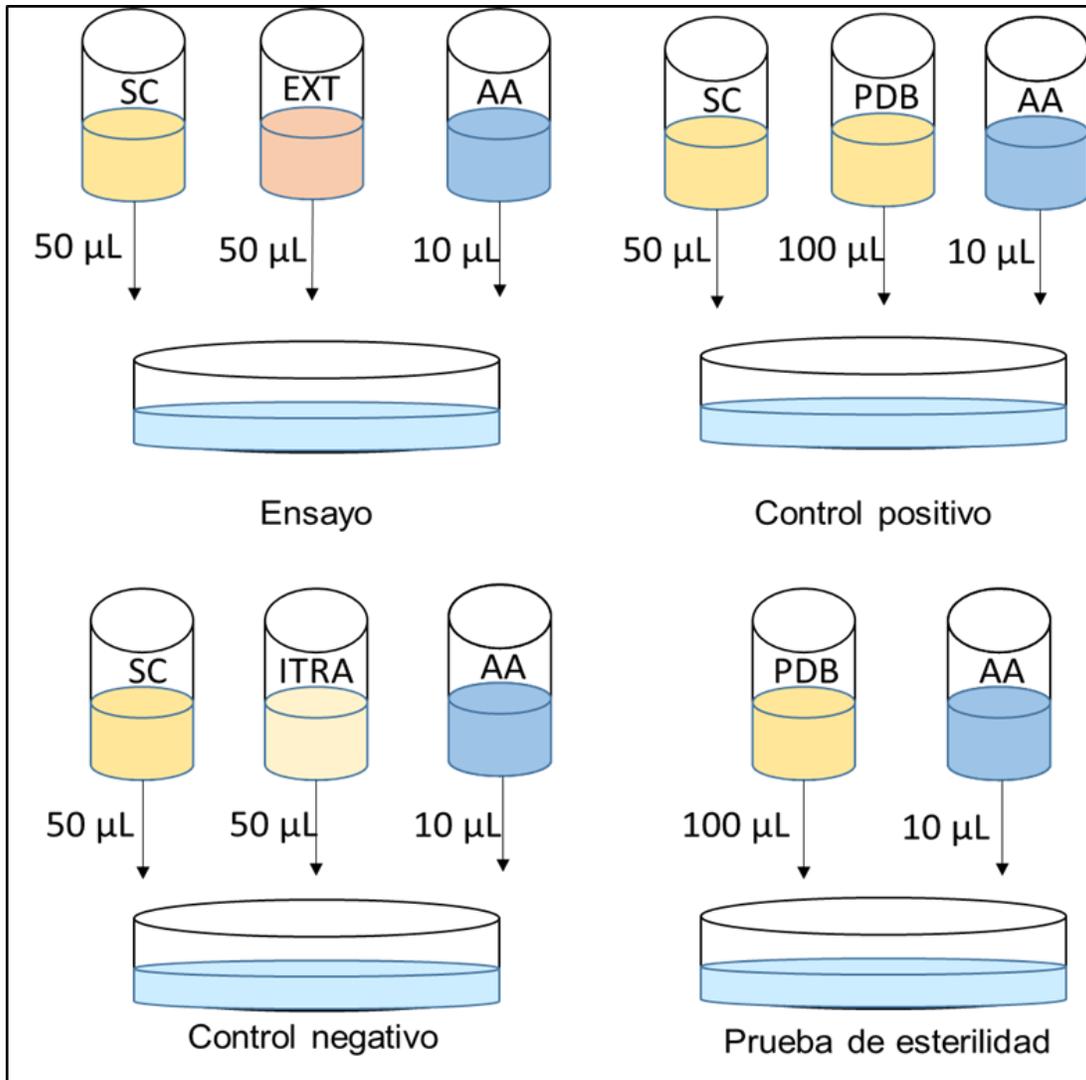
#### **Prueba de micro-dilución con azul de alamar**

Esta técnica se empleó como una forma de seleccionar los extractos del grano de maíz con mayores potenciales para la prueba de inhibición. Dado que es rápida y se pueden correr muchas muestras a la vez. Se basa en el método de microdilución en placa del documento M27-A2 (reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp) del CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute (2004), la cual fue modificada al adicionarse un indicador de crecimiento de óxido-reducción (azul de alamar). En esta técnica, el ingrediente activo es la resazurina, un compuesto no tóxico permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, que produce fluorescencia roja muy brillante o rosa. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad.

Para su implementación, en cada pocillo de la microplaca fueron colocados 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de conidios a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFC/mL y posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto del grano de maíz. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. En una fila de la placa fueron colocados 50  $\mu\text{L}$  de caldo PD más 50  $\mu\text{L}$  de solución de conidios como control positivo. Para el control negativo, se prepararon distintas concentraciones (5, 10, 20, 40, 80 y 160  $\mu\text{g/ml}$ ) de Itraconazol (antifúngico comercial). El propósito de utilizar estas concentraciones fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el desarrollo del hongo. Estas concentraciones se probaron por triplicado, se usaron 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración más 50  $\mu\text{L}$  de la solución de conidios. Seguido de esto se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de caldo PD en 4 pocillos de la placa como control de esterilidad. La placa se selló con Parafilm® y se colocó en incubación a 35°C durante 24 horas.

Después de la incubación se agregaron 10  $\mu\text{L}$  del reactivo azul de alamar (Thermofisher), en cada pocillo y la placa fue colocada en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO. Seguido a esto, se llevó a cabo una incubación durante 4 horas a 37°C dentro del equipo. Al concluir esta segunda incubación; se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 570 nm para obtener la absorbancia de cada pocillo (Figura 10).

Se calculó el promedio de las tres absorbancias de cada extracto y el promedio de todos los extractos para obtener la media poblacional. Se definió como punto de corte superior o positivo la absorbancia promedio de la fila que contenía únicamente la solución de conidios y caldo PD. El punto de corte negativo o inferior fue determinado por la absorbancia promedio a la cual ya no se observó desarrollo de crecimiento del hongo o cambio en el color del pocillo y se presentó a una concentración del antifúngico de 20  $\mu\text{g/mL}$  (ppm) o CMI, la cual mostró una absorbancia de 0.135.



**Figura 10.** Esquema de la implementación de la técnica de microdilución en placa para cada una de las formas ensayadas SC: Solución de conidios ( $2 \times 10^5$  UFC/mL); EXT: Extracto de proantocianidinas; AA: Azul de alamar; PDB: caldo papa-dextrosa; ITRA: Itraconazol diluido en PDB ( $20 \mu\text{g/mL}$ ).

En la Figura 11 se muestran fotografías del aspecto de los pocillos de la placa de dos muestras y los testigos tanto positivo como negativo. Todos aquellos extractos que produjeron una absorbancia menor de 0.142, que fue la absorbancia poblacional, fueron seleccionados para avanzar en el estudio y se canalizaron a la prueba de porcentaje de inhibición. De esta manera la prueba de microdilución con azul de alamar fungió como prueba “cedazo”, al avanzar

únicamente 62 extractos de un total de 120 que se analizaron. Esto es importante, pues la prueba de inhibición es mucho más tardada y costosa.

Tratamiento	Aspecto del pocillo
Extracto 17 Absorbancia: 0.140 Color de grano: Rojo cereza	
Extracto 24 Absorbancia 0.158 Color de grano: Azul morado	
Control positivo de fusarium Absorbancia 0.189 Punto de corte superior	
Control negativo Absorbancia 0.135 Punto de corte inferior.	

**Figura 11.** Evaluación de extractos y testigos positivo y negativo y las correspondientes fotografías digitales de los pocillos en la prueba de microdilución en placa con Azul de Alamar.

### Evaluación del porcentaje de inhibición de los extractos

El ensayo de la evaluación del porcentaje de inhibición se aplicó de acuerdo con la metodología descrita por Ochoa *et al.*, (2012). Este ensayo consiste en evaluar el desarrollo del hongo en una placa de agar (PDA) en la que se ha incorporado previamente una cantidad conocida de extracto. A esta prueba se sometieron los extractos seleccionados en la prueba de microdilución en placa.

En cada jornada de trabajo se preparó un volumen de caldo PDA suficiente para el número de placas a evaluar. Alícuotas de 10 mL de este medio se colocaron en tubos de vidrio de 13X160 mm y se esterilizaron. Posteriormente, y una vez que el medio en el tubo se enfrió hasta una temperatura de aproximadamente 45°C, se adicionaron 500 µL del extracto y la muestra se homogenizó en Vortex. En esta prueba se incorporaron los extractos de dos maíces de grano blanco: un híbrido experimental (200x201) y una variedad de polinización libre denominada blanco Veracruz. Es sabido que el grano de maíz es de los cereales consumidos por el hombre el que contiene las mayores cantidades de compuestos fenólicos (Adom y Liu, 2002). El ácido ferúlico, principal compuesto fenólico del grano de maíz, aunque carente de color, posee importantes actividades biológicas (Kumar y Pruthi, 2014). La incorporación de estos testigos se realizó para determinar la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos no coloridos. Se incorporó un control negativo, en el cual se agregaron 500 µL de Itraconazol a 20 ppm a tubos que contenían 10 mL del medio PDA. Como control positivo se utilizó el medio en la placa sin la adición de extractos. Se tuvieron dos repeticiones por muestra.

El medio con el extracto o el Itraconazol fue vertido en cajas Petri de 60x15 mm que se dejaron solidificar en condiciones asépticas (en campana de flujo laminar). Una vez solidificado el medio en las placas, se colocaron en la parte central de éstas, explantes de 0.5 cm por lado. Estos explantes provenían de un crecimiento del hongo en caja Petri por un periodo de siete días. Para asegurar que el tamaño de los explantes del hongo fuera homogéneo, estos fueron cortados de manera simétrica formando una cuadrícula con el asa sobre la superficie del agar donde desarrolló el hongo, procurando que la distancia entre líneas fuera la misma. Las cajas de Petri con los explantes del hongo se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  en oscuridad, hasta que el crecimiento de la caja testigo (PDA sin extracto) cubrió completamente la superficie de la placa. Esto requirió de un tiempo de incubación entre cinco y siete días, dependiendo de las condiciones ambientales. Si el ambiente es húmedo, el hongo crece más lentamente.

El diámetro de crecimiento del desarrollo micelial se midió con un vernier, tomando esta medida en dos direcciones diametralmente opuestas. El valor promedio de estas lecturas se relacionó con el diámetro de la caja del control positivo. El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinó mediante la expresión:

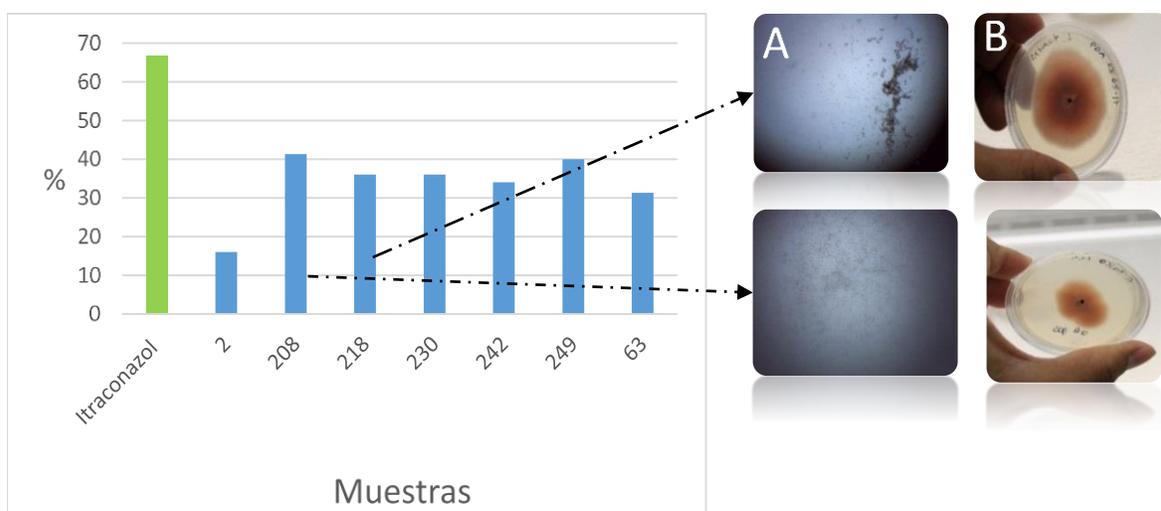
$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{CMP - CMT}{CMP} \right) (100)$$

Donde:

CMP= A el diámetro promedio del crecimiento micelial del control positivo

CMT= A el diámetro promedio del crecimiento micelial del tratamiento

En la Figura 12 se muestran resultados de algunas muestras tanto en la prueba de la microdilución con el azul de alamar así como sus resultados correspondientes con la prueba de inhibición. Teóricamente se esperaría que aquellos extractos que exhibieran poco desarrollo del hongo en la prueba de microdilución, mostraran valores de porcentaje de inhibición elevados. Sin embargo, es conveniente considerar que, si bien ambas pruebas se fundamentan en el potencial del extracto o antifúngico comercial para limitar el crecimiento y desarrollo del hongo, en la prueba de microdilución el crecimiento ocurre en un medio líquido, en el cual el agente antifúngico (sea extracto o Itraconazol) se encuentra disuelto y con una mayor posibilidad de ejercer sus capacidades para limitar el desarrollo del hongo. En la prueba de porcentaje de inhibición, el agente antifúngico se distribuye sobre la superficie de la placa de agar. Bajo estas condiciones, es posible que el hongo pueda defenderse mejor.



**Figura 12.** Relación entre las pruebas de microdilución en placa (A) y porcentaje de inhibición (B) en extractos de grano de maíz con diferentes contenidos de proantocianidinas.

#### **4.4.3 Actividad antimutagénica**

Para este ensayo se utilizaron los extractos obtenidos con metanol acidificado al 1 % con TFA. Para usar los extractos en la prueba, se tomaron 5 mL del extracto original y se concentraron a poco menos de 1 mL en un rotaevaporador. El extracto concentrado se ajustó a un volumen de 2 mL con DMSO a 5 ppm en agua estéril. Se realizó una prueba previa para verificar que el extracto por sí mismo no presentase efecto citotóxico o mutagénico. La decisión de utilizar el extracto metanólico para el ensayo de antimutagenicidad se fundamentó en la revisión de trabajos previos publicados en los que se señala que la actividad antimutagénica de extractos de grano de maíces con pigmentos antociano se debe a las antocianinas, las cuales favorecen su extracción al emplear metanol acidificado como disolvente (Pedreschi y Cisneros-Zevallos., 2007). La metodología empleada fue la descrita por Pedreschi y Cisneros-Zevallos (2007), basada en el ensayo de Ames.

#### **Ensayo de Ames**

Para esta prueba se utilizaron las cepas modificadas por ingeniería genética: *Salmonella entérica* Serovar Typhimurium cepa: LT2 TA100 ATTC: BAA-2721 y *Salmonella entérica* Serovar Typhimurium cepa: LT2 TA98 ATTC: BAA-2720. Las cepas se activaron en agar Luria Bertani (ALB) y se revisaron a las 24 horas de incubación, para determinar su desarrollo. A este crecimiento de activación se le llamó placa maestra. En ocasiones, las cepas en pase cero, no crecen abundantemente, y es necesario realizar una resiembra, hasta pase dos o tres, en los que las cepas ya se encuentran adaptadas.

Con la ayuda de un asa bacteriológica se sembró una pequeña cantidad de crecimiento del cultivo de la placa maestra en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo estéril Luria Bertani (LB) y sellado con tapón de algodón. La placa maestra fue sometida a análisis para determinar que la cepa contaba con las características específicas. El matraz inoculado con la cepa se incubó a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 horas con agitación suave (120 rpm) para obtener una densidad de  $2 \times 10^9$  bacterias/mL. Esto equivale en absorbancia a 1.2-1.4 a 600 nm. Conviene señalar que cuando se utiliza para el crecimiento de las bacterias el caldo Oxoid No. 2 (Thermo Scientific) los valores de absorbancia son considerablemente menores. Se fundió el agar de superficie y se mantuvo a una temperatura de  $48^\circ \pm 2^\circ \text{C}$  en una placa de calentamiento. Se adicionaron en cada tubo estéril 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de la cepa más 100  $\mu\text{L}$

de solución Buffer (Buffer fosfato sódico 0.1mM, pH 7.4), posterior a esto se añadieron 50  $\mu$ L del extracto a evaluar y se hizo una homogenización con vortex, a baja velocidad. La mezcla se dejó reposar 20 minutos y posteriormente se añadió el mutágeno. Se utilizó el metilmetanosulfonato en concentración de 1250  $\mu$ g/placa para TA98 y 2500  $\mu$ g/placa para TA100. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C/ 120 rpm para realizar el proceso de pre-incubación. Después de la pre-incubación se añadieron 2 mL de agar de superficie y se agitó con vortex durante 3 segundos, se vertió el contenido en la placa de agar medio mínimo, inmediatamente se realizaron movimientos circulares a la placa de tal manera que el agar de superficie se distribuyera uniformemente en el medio de cultivo. Se esperó la gelificación del medio y se incubaron las placas de forma invertida a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Se realizó el control positivo y negativo en cada uno de los dos casos siguiendo la misma metodología. Para el control negativo se sembró la cepa sin agregar el mutágeno, de manera que las colonias que desarrollaron se consideraron como “Revertantes”. Para el control positivo, se agregó el mutágeno, para que la cepa perdiera su mutación y fuese capaz de crecer en un ambiente restrictivo de biotina/histidina. En ninguno de los controles se agregó extracto. En todos los casos, el control negativo debe tener un menor número de colonias que el control positivo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al conteo de colonias revertantes con la ayuda de un contador de colonias digital. Cabe mencionar que la morfología colonial de *Salmonella typhimurium* es muy característica: son colonias blancas traslucidas, con superficie lisa y bordes regulares. La presencia de colonias con características diferentes a estas es un indicador de contaminación.

Al final del periodo de incubación de las placas se contó el número de colonias. En el caso del testigo negativo, las colonias que desarrollaron se consideran las que de manera espontánea mutan y crecen en el medio restrictivo de histidina. En el positivo, las cepas son mutadas por el agente mutagénico añadido a la placa. En el caso de las muestras en las que se agregó el extracto como agente protector, se espera que el número de colonias sea mayor que el testigo negativo, pero menor que el testigo positivo. Se calculó el promedio aritmético de cada uno de los tratamientos y de cada cepa. La actividad antimutagénica se expresó como

el porcentaje de inhibición de la actividad mutagénica y se calculó según lo indicado por Socaci *et al.* (2018), mediante la expresión  $\% IN = [1 - T/M] * 100$

Donde:

T= número de Revertantes por placa en presencia del mutagéno y del extracto

M= número de Revertantes por placa en el control positivo (sin extracto)

#### **4.5 Identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz con pigmentos antociano**

De la relación de accesiones analizadas por color de grano, se eligieron muestras relevantes por su pertenencia a alguna raza de maíz en particular, que fue el caso de las muestras que se sometieron al análisis de antocianinas. Para las muestras que se sometieron al análisis de cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopia de masas, la selección se realizó al interior de cada color de grano. Se tomaron dos muestras de grano azul morado, dos de rojo cereza y dos de rojo ladrillo.

##### **4.5.1 Preparación de las muestras para análisis de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

###### **Maíces de grano azul morado y rojo cereza**

La extracción de antocianinas se realizó a partir de 1.0 g de harina desgrasada y 15 mL de agua acidificada al 2 % con ácido fórmico (SIGMA-ALDRICH, St. Louis USA). La mezcla se sonicó por 15 min y posteriormente se puso en refrigeración por 105 min. Se centrifugó a 2660 x g por 10 min para recuperar el sobrenadante, mismo que se filtró con papel Whatman No. 4. Para el análisis de las muestras se utilizó un equipo Perkin Elmer series 200 (USA). Se utilizó una columna analítica Hypersil ODS-2 (250 x 46 mm) con tamaño de partícula de 5 µm. El análisis se realizó según lo descrito por Fossen *et al.* (2001), con las adecuaciones indicadas por Salinas *et al.* (2005). Se aplicó un sistema de gradientes con dos solventes: A: ácido fórmico/agua en proporción 1:9, B: ácido fórmico:agua:metanol, en proporciones 1:4:5 v/v/v , los cuales se de-gasificaron por 20 min. Antes de inyectar las muestras al equipo, se filtraron con acrodiscos de membrana 0.22 µm (Millipore Corporation M.A.). Se inyectó un volumen de 10 µL, la velocidad de flujo fue de 1.2 mL y el tiempo de corrida de 25 min. Se

ajustó la temperatura de la columna a 25°C. Para la identidad de los compuestos se usaron estándares comerciales de cianidina 3-glucósido (Cy 3-glu), pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-glu), peonidina 3-glucósido (Pn 3-glu) y malvidina 3-glucósido (Mv 3-glu) (Polyphenols, Nw), además de información publicada al respecto, por otros autores (Salinas *et al.*, 2012a; Paulsmeyer *et al.*, 2017).

Con el fin de identificar las antocianinas de tipo acilado, se realizó una hidrólisis alcalina empleando 1 mL del extracto al que se añadió KOH (J.T. Baker Xalostoc, Edo. de México, México) al 10 % hasta lograr un cambio en la coloración de rojo a azul. La solución se dejó reposar por 10 min en oscuridad. Posteriormente se agregó HCl 5N hasta obtener nuevamente el color rojo. La muestra se colocó en un matraz de decantación y se añadió un volumen similar de dietiléter para remover los residuos acilados liberados durante la hidrólisis. La fase acuosa se concentró a sequedad, se re-disolvió con una pequeña cantidad de HCl 0.01M y posteriormente se filtró con un acrodisco de membrana 0.22 µm antes de inyectarse al HPLC.

#### **4.5.2 Preparación de las muestras para su análisis por LC-MS**

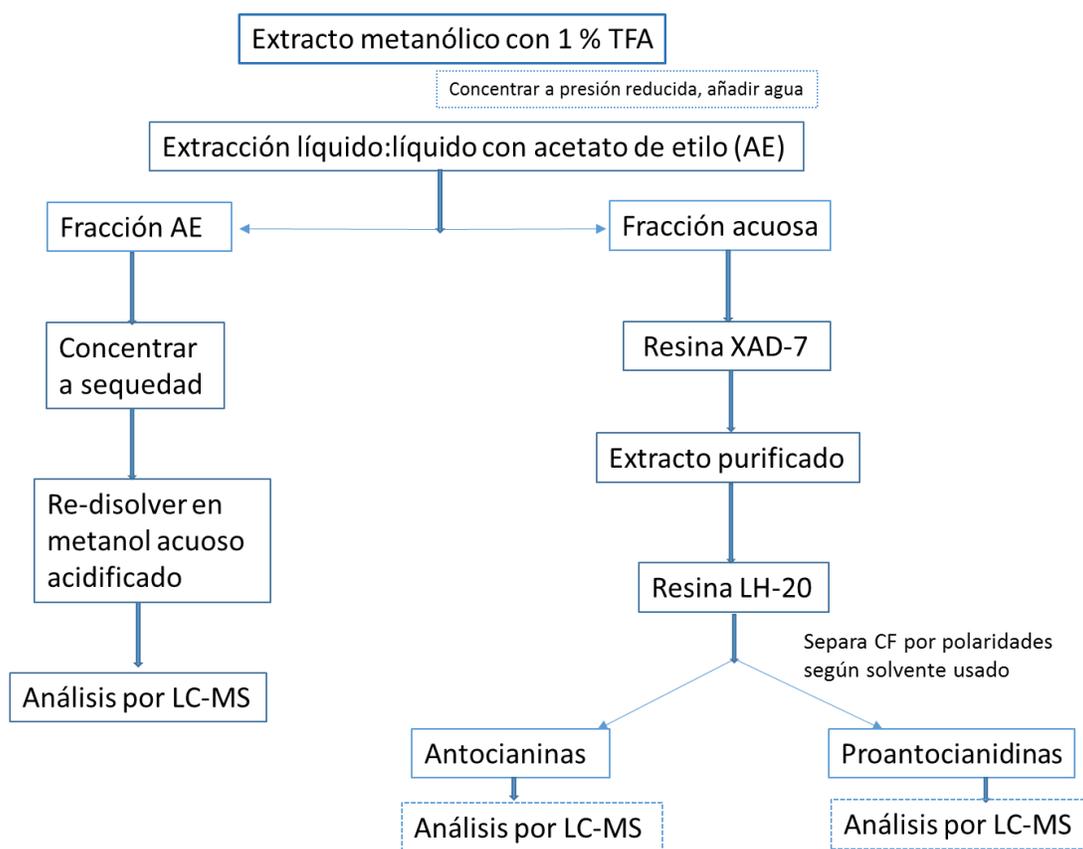
Para las accesiones de grano azul morado y rojo cereza, se pesó 1.0 g de muestra desgrasada, seca y molida y se depositó en un matraz erlenmeyer de 50 mL, se agregaron 20 mL de metanol acidificado con 1 % de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla se agitó manualmente para homogenizarla, y la boca del matraz se cubrió para prevenir la evaporación del disolvente. Los matraces se colocaron en un baño sonicador (Branson 2510, Eagle Road, Danbury, USA) por 15 min. Concluida esta etapa, se colocaron bajo refrigeración por 105 min, para luego centrifugarse por 10 min a 5400 g (Centrifuga Hettich Zentrifugen Modelo Universal 32, Tuttlingen, Alemania). Se recuperó el sobrenadante, se filtró con papel Whatman No. 4, y se midió su volumen.

Se realizó una purificación del extracto mediante una columna de resina XAD-7 para remover azúcares, péptidos, y otras impurezas. La resina se activó con agua acidificada con ácido acético 5 % por 24 horas. Un volumen del extracto se cargó a la columna y esta se lavó repetidas veces con ácido acético al 5 %. La columna se eluyó con metanol al 5 % con ácido acético. El extracto recuperado conteniendo los compuestos fenólicos se sometió a una segunda purificación para separar las antocianinas de las proantocianidinas. En este caso se usó una columna de resina LH-20, la cual se eluyó con dos solventes diferentes, uno de

polaridad media (agua:metanol:ácido) para remover las antocianinas y posterior, otro de baja polaridad (acetona) para remover las proantocianidinas.

### Preparación de muestras para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas.

Para este análisis se utilizaron los extractos metanólicos de las muestras 051 y 036 de grano AZM, 014 y 020 de grano RC y 003 y 006 de grano RL. El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo con lo indicado en la Figura 13.



**Figura 13.** Esquema de preparación de las muestras de maíz con diferentes colores de grano para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución con acoplamiento a espectroscopía de masas (LC-MS).

#### 4.6 Selección de muestras de grano de maíz con pigmentos antociano para integrar colecciones núcleo por contenido y perfil de antocianinas

De acuerdo con Frankel (1984) una colección núcleo es un conjunto limitado de accesiones que, empleando un mínimo de repeticiones, representa la diversidad genética de una especie cultivada y de sus parientes silvestres. Comúnmente, una colección núcleo está constituida por un 5 a 20 % de la colección total. Sin embargo, cuando se parte de colecciones muy grandes, esta proporción puede reducirse (Van Hintun *et al.* 2003). Se pueden conformar colecciones núcleo de especies vegetales con características particulares. En el caso particular del maíz, se puede decir que el conjunto de accesiones con grano pigmentado por compuestos tipo antociano, constituye por sí mismo una colección núcleo. Sin embargo, en un esfuerzo por agrupar de manera más precisa la diversidad en contenido y tipo de antocianinas, se pueden considerar que las muestras analizadas por cada color de grano, constituyen sub colecciones núcleo de maíz con pigmentos tipo antociano.

### **Análisis de la información obtenida**

Los datos obtenidos se analizaron bajo un diseño completamente al azar. Se efectuaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias cuando fue procedente. En el caso de las variables físicas de grano, composición fenólica actividad antioxidante, los datos también se analizaron con herramientas de estadística multivariada.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Selección de las accesiones de estudio**

Una vez definidas las accesiones de estudio, se procedió a solicitarlas a las diferentes instituciones en las que se encuentran resguardadas, conforme a los protocolos establecidos por cada institución. Los bancos de germoplasma de los que se obtuvieron las accesiones analizadas fueron: banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), de la Universidad Autónoma Chapingo, Universidad de Guadalajara y del banco de semillas comunitario bajo la responsabilidad del MC. Flavio Aragón Cuevas.

Para obtener las accesiones de los diferentes bancos de germoplasma se enfrentaron diferentes problemas que no se consideraron cuando se realizó el planteamiento del proyecto ante la fuente financiadora (CONABIO). Entre estos, el más recurrente fue la incapacidad de

los bancos de proveer la semilla solicitada debido a que no cuentan con muestra suficiente para la donación. Particularmente, en el banco de germoplasma del INIFAP del total de accesiones solicitadas, sólo se proporcionó un 70 %, porque de un buen número de accesiones no se cuenta con suficiente semilla. Esta situación obedece a que las instituciones del sector público con bancos de germoplasma no tienen recursos asignados para las tareas de multiplicación de las accesiones que resguardan.

En el Cuadro 5 se presenta información sobre el número de accesiones seleccionadas a partir de las bases de datos y con los archivos fotográficos proporcionados y las que fue posible obtener de los diferentes bancos de germoplasma. Algunas de las accesiones seleccionadas presentaban información de color diferente al que realmente pertenecen por lo cual en el presente documento se informa de acuerdo al color del grano apreciado visualmente y no a la información establecida en la base de datos proporcionada por los bancos.

**Cuadro 5.** Accesiones con grano azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo seleccionadas y obtenidas de los diferentes bancos de germoplasma del país.

<b>Color de grano</b>	<b>Accesiones seleccionadas a partir de la revisión de bases de datos</b>	<b>Accesiones obtenidas de los diferentes bancos de germoplasma y que fueron analizadas</b>
Azul morado	236	209
Rojo cereza	114	82
Rojo ladrillo	52	26

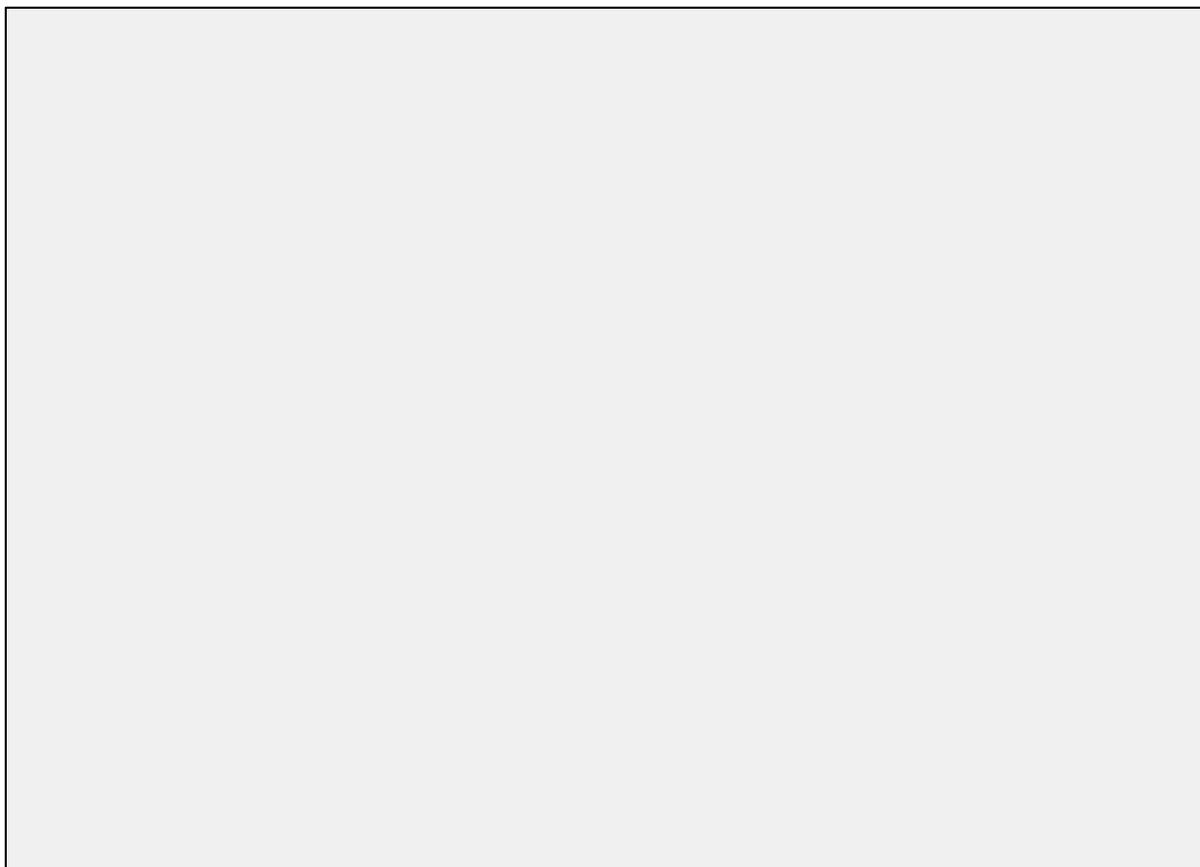
Se anexan por separado los archivos en Excel de las accesiones seleccionadas y obtenidas para cada color de grano.

En la Figura 14 se muestran las accesiones de color azul morado seleccionadas. Se aprecia que, de los estados del norte del país, es Chihuahua en el que se concentra un mayor número de accesiones que pertenecen a la raza Azul.



**Figura 14.** Distribución de las accesiones de maíz de grano azul morado consideradas en el estudio. El número entre paréntesis se refiere al número de accesiones para cada raza.

La distribución de las accesiones de maíz con grano rojo cereza se concentra en el centro y centro occidente del país, principalmente de las razas de Elotes Cónicos y Elotes occidentales (Figura 15). Este color de grano es actualmente bien valorado para la elaboración de tortillas, pues presentan un color rosado que resulta exótico para los comensales de restaurantes de lujo en las grandes ciudades.



**Figura 15.** Distribución de las accesiones de maíz de grano rojo cereza consideradas en el estudio. El número entre paréntesis se refiere al número de accesiones para cada raza.

En la Figura 16 se representa la ubicación de las accesiones de maíz con grano rojo ladrillo seleccionadas las cuales se distribuyen principalmente en el centro occidente, centro y sur del país.



**Figura 16.** Distribución en los diferentes estados del país de las accesiones de maíz de grano rojo ladrillo consideradas en el estudio. El número entre paréntesis se refiere al número de accesiones para cada raza.

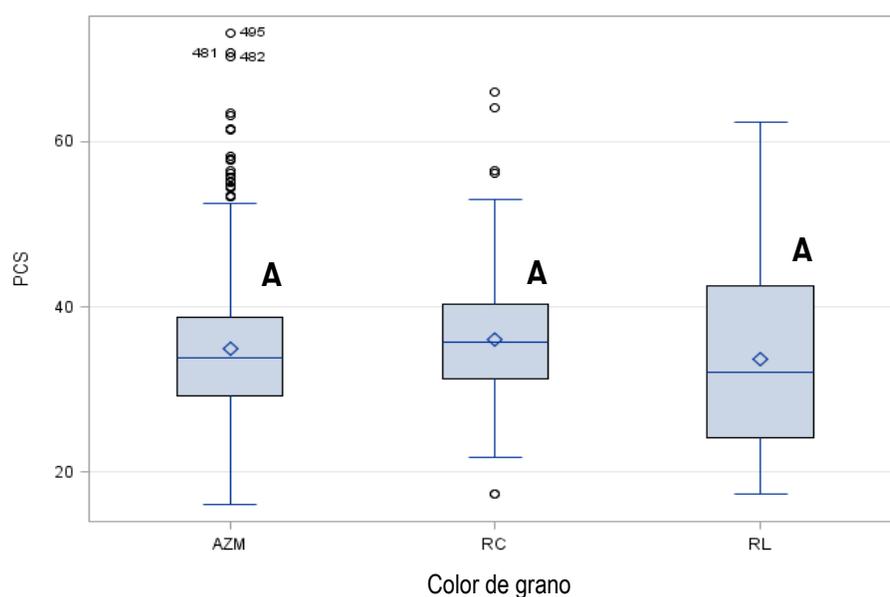
## 5.2 Evaluación de características físicas del grano

### Peso de cien semillas

El peso de cien semillas fue estadísticamente igual ( $p < 0,05$ ) entre los tres colores de grano, con valores promedio de 36.0, 35.0 y 33.6 g en las accesiones RC, AZM y RL, en ese orden (Figura 17). Estos valores son parecidos a los reportados por Salinas *et al.* (2012a) quienes analizaron accesiones de maíz de siete razas en Chiapas con una variación de 31.3 a 42.9 g. El PCS se ve afectado tanto por el tamaño del grano (largo, ancho y espesor) como por la densidad verdadera o peso específico. Esta última característica está determinada por la

proporción de endospermo harinoso y endospermo vítreo en el grano. El endospermo vítreo es más denso por lo que su peso específico es mayor. Así, un grano de tamaño pequeño, pero de endospermo vítreo tendrá un valor de PCS igual o mayor a un grano de tamaño medio o grande con un endospermo harinoso, que tiene un peso específico menor que el vítreo.

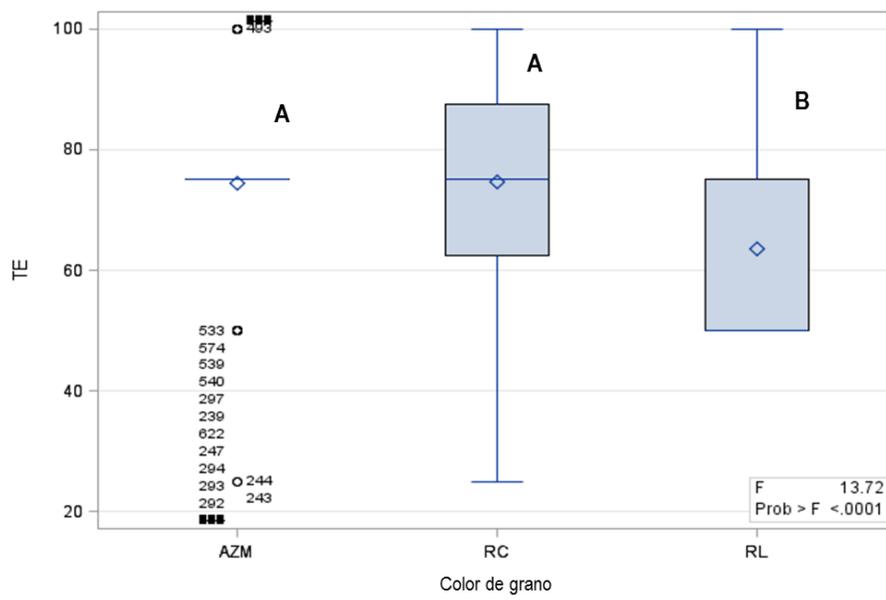
En el estudio realizado por Figueroa *et al.* (2013) en las razas denominadas antiguas (Palomero Toluqueño, Arrocillo Amarillo, Chapalote y Nal-Tel) se presentaron los menores tamaños de grano, con PCS promedio de 18.7 g, en tanto que en las exóticas precolombinas (Cacahuacintle, Harinoso de Ocho, Olotón y Maíz Dulce) se observaron los mayores PCS con un promedio de 34.4 g.



**Figura 17.** Valores promedio de peso de cien semillas por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

## Tipo de endospermo

El tipo de endospermo predominante en el grano de las accesiones de maíz analizadas fue el harinoso. Las accesiones de grano AZM y RC tuvieron un tipo de endospermo (TE) igual ( $p < 0.05$ ), con valores de 74.7 y 74.5 %, respectivamente, en tanto que las de grano RL fueron de un grano ligeramente menos harinoso al presentar un valor promedio de 63.6 % (Figura 18).

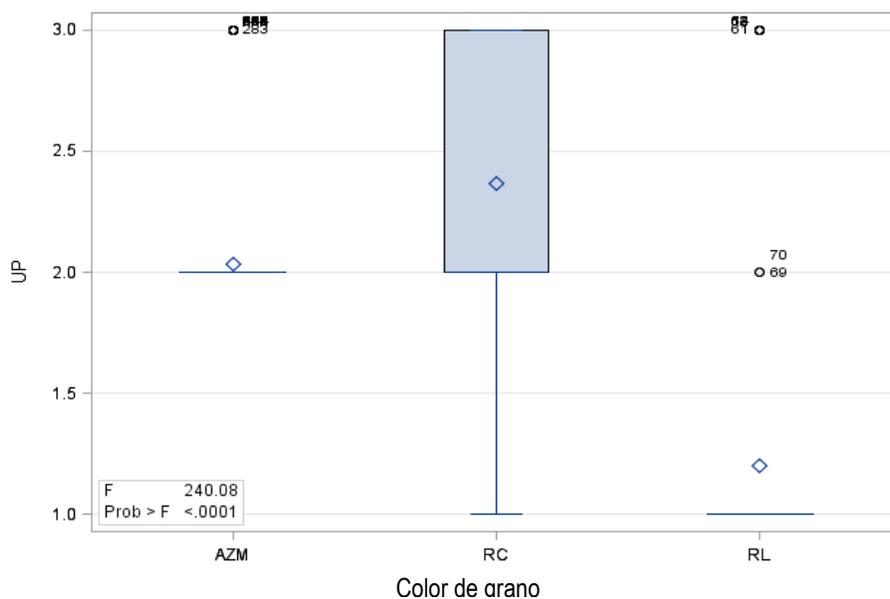


**Figura 18.** Valores promedio de tipo de endospermo (TE) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

## Ubicación del pigmento

La ubicación del pigmento tipo antociano en el grano de maíz es una característica relacionada con su color y de alguna manera con el uso al que se destinan este grupo de maíces especiales. Para el análisis estadístico de esta variable, se designó un número de acuerdo a la ubicación, según se señaló en la sección de Materiales y Métodos. De acuerdo con los resultados del estudio, los maíces de grano AZM poseen el pigmento exclusivamente en la capa de aleurona, y los de grano RL lo tienen en el pericarpio. Donde se encontraron

accesiones de grano con presencia de pigmento en ambas estructuras del grano fue en los de grano RC, por lo que su valor medio presenta elevada variación, desde 1 hasta 3 (Figura 19).



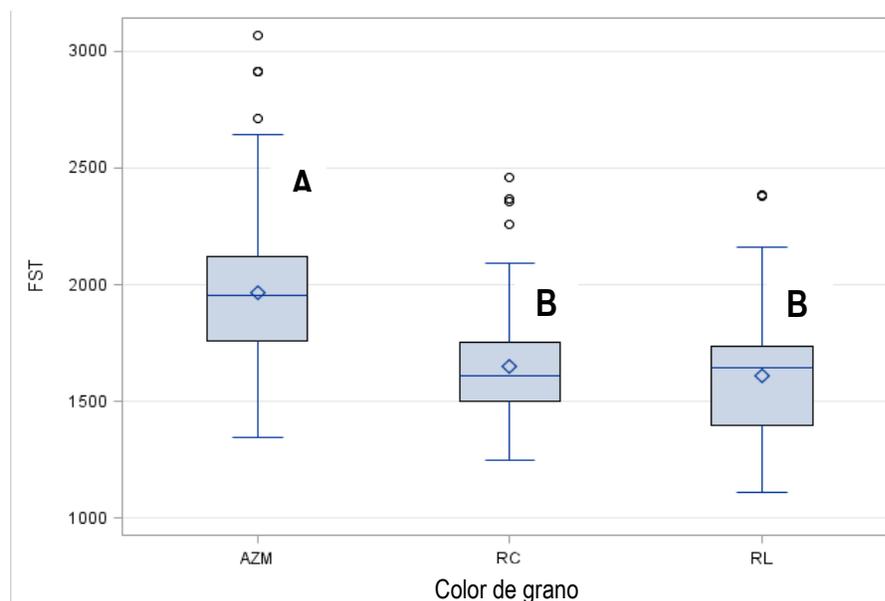
**Figura 19.** Ubicación del pigmento (UP) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo.

### 5.3 Análisis del contenido de diferentes tipos de compuestos fenólicos

Las variables de FST y CAT fueron cuantificadas en el extracto de metanol acidificado con ácido trifluoroacético, en tanto que las correspondientes a FLAV y PAs se determinaron en el extracto cuyo solvente fue una mezcla de acetona: agua:ácido acético, según se especifica en la sección de materiales y métodos.

El análisis estadístico de los datos para la variable FST indicó que los maíces de grano azul morado tienen mayor ( $P < 0.05$ ) contenido que los maíces de grano rojo cereza (RC) y rojo ladrillo (RL). Los FST de estos dos últimos colores de grano resultaron estadísticamente iguales entre sí (Figura 20). Los valores promedio fueron de 1965.6, 1649.9 y 1608.9  $\mu\text{g}$

equivalentes de ácido ferúlico (EAF)/g de muestra seca (MS) para los tres colores de grano AZM, RC y RL, en ese orden.

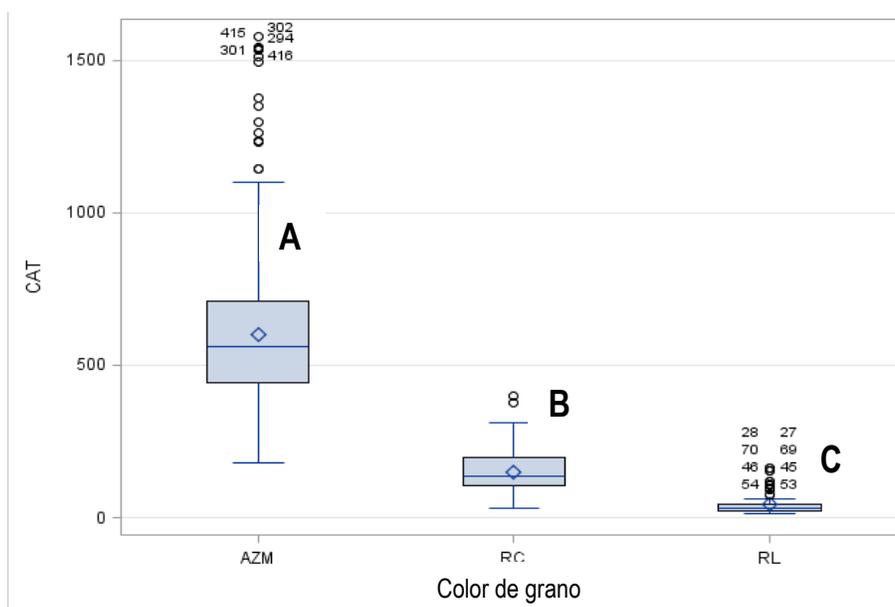


**Figura 20.** Valores promedio de fenoles solubles totales (FST) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

Conforme a lo esperado, el mayor contenido de antocianinas totales (CAT) se presentó en los maíces de grano azul morado, con un valor promedio de 601.8  $\mu\text{g}$  equivalentes de cianidina 3-glucósido (EC3G)/g de muestra seca (MS). En los maíces de grano rojo cereza el valor promedio fue 149.2  $\mu\text{g}$  equivalentes de pelargonidina clorada (EPC)/g MS y en los de grano rojo ladrillo fue 44.4  $\mu\text{g}$  EPC/g MS (Figura 21). En los maíces de grano AZM se usó una curva de cianidina 3-glucósido para realizar los cálculos porque en este color de grano predominan los derivados de cianidina; en los maíces de grano con tonalidades rojas se empleó una curva de pelargonidina clorada porque en esta coloración de grano predominan los derivados de pelargonidina (Salinas *et al.*, 1999; Zilic *et al.*, 2012). De acuerdo con estos

resultados, las accesiones de los maíces de grano AZM tienen alrededor de cuatro veces más antocianinas que las de grano RC.

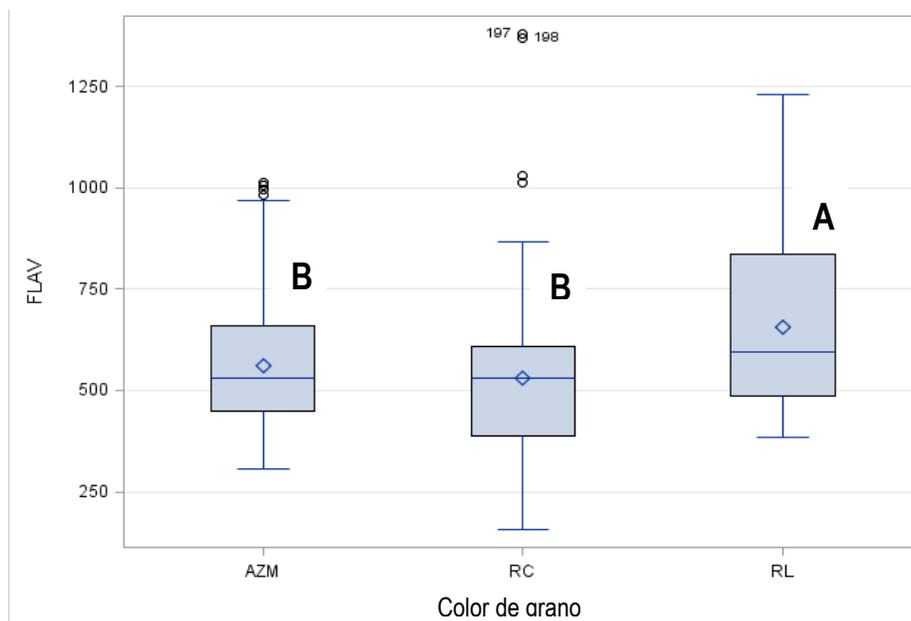
Un mayor contenido de antocianinas en maíces de grano AZM con relación a los de grano rojo ha sido previamente reportado por otros investigadores. En la raza Tuxpeño, Salinas *et al.* (2012a) reportaron valores de 300  $\mu\text{g/g}$  de MS en accesiones de grano AZM y de 71.6  $\mu\text{g/g}$  MS para las accesiones de grano RC. Por su parte, Zilic *et al.* (2012) señalaron valores de CAT de  $597.2 \pm 6.5$   $\mu\text{gEC3G/g}$  MS para una muestra de grano AZM y de  $15.4 \pm 1.6$   $\mu\text{gEC3G/g}$  MS.



**Figura 21.** Valores promedio del contenido de antocianinas totales (CAT) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

El mayor contenido de flavonoides se observó en las accesiones de grano RL ( $657.7$   $\mu\text{g}$  equivalentes de catequina (EC)/g de MS), que fue estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) al observado en las accesiones de grano AZM ( $562.7$   $\mu\text{g}$  EC/g MS) y RC ( $530.6$   $\mu\text{g}$  EC/g MS) (Figura 22). El método utilizado para la cuantificación de flavonoides totales se fundamenta

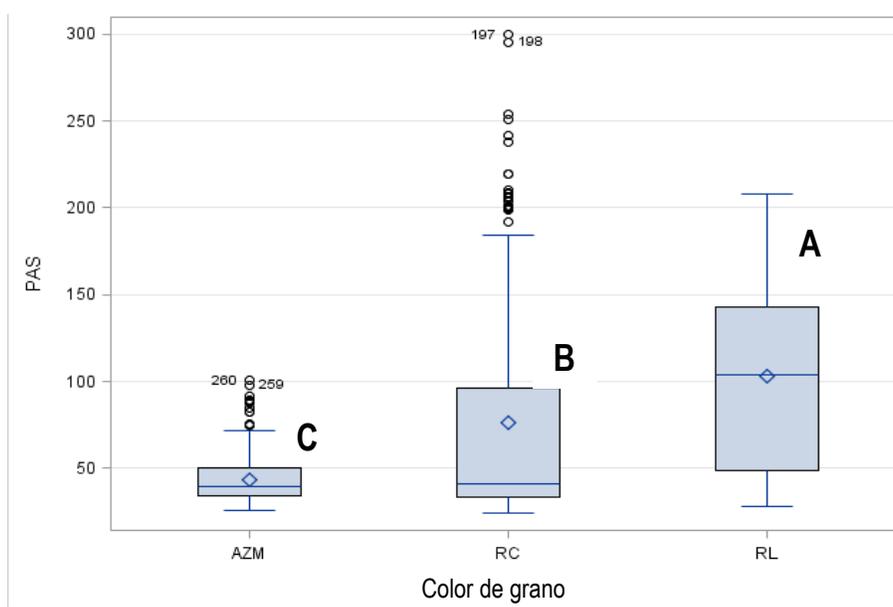
en la reacción entre el cloruro de aluminio y el grupo ceto del C4 y los grupos hidroxilo de los C3 y C5 de flavonas y flavonoles (Chang et al. 2002). Las proantocianidinas (PAs) y flabofenos no tienen en su estructura un grupo ceto, pero si un grupo hidroxilo en C3 o C4 que puede reaccionar con el cloruro de aluminio.



**Figura 22.** Contenido promedio de flavonoides (FLAV) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

El contenido promedio de proantocianidinas en los tres colores de grano analizados se muestra en la Figura 23. Los maíces de grano RL fueron los que presentaron los contenidos más altos, con una media de 103.2 mg equivalentes de catequina (EC)/g de MS, seguidos de los de grano RC con una media de 76.5 mg EC/g MS y con la menor media los de grano AZM con 43.2 mg EC/g MS.

El método de cuantificación de PAs utilizado en los diferentes colores de grano de maíz analizados se eligió después de correr algunas pruebas con los dos métodos colorimétricos factibles de utilizar (DMAC y vainillina). El método de vainillina tiene el inconveniente de que las muestras se leen a una longitud de onda en la que absorben las antocianinas, por lo que estos compuestos interfieren en la determinación. El método DMAC no presenta este problema, pues las muestras se leen a una longitud de onda (640 nm) en la cual ya no absorben las antocianinas. Sin embargo, dado que el grano de maíz presenta contenidos bajos de PAs, los valores de absorbancia son muy bajos, lo que incrementa el error experimental.



**Figura 23.** Contenido promedio de proantocianidinas (PAs) por color de grano de maíz. AZM=azul morado; RC=rojo cereza; RL=rojo ladrillo. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

Los resultados por color de grano, entre razas de maíz se describen a continuación para cada uno de los colores de grano analizados.

### 5.3.1 Maíces con grano azul morado (AZM)

Se analizó un total de 209 accesiones con este color de grano. En la propuesta inicial de proyecto se mencionó que se analizarían entre 200 y 300 accesiones, sin embargo, esto no fue posible por las dificultades enfrentadas para obtener las muestras de los bancos de germoplasma. Las accesiones analizadas provinieron de 22 razas. Las cinco razas con el mayor número de accesiones analizadas fueron: Elotes Cónicos (51), Elotes Occidentales (32), Azul (28), Bolita (17) y Cónico (15). De las razas Elotes Chalqueños, Nal-tel de altura, Negro de Tierra Caliente, Reventador y Tabloncillo únicamente se analizó una accesión (Cuadro 6).

En la mayoría de los trabajos publicados sobre FST en el grano de maíz los contenidos se expresan en función del ácido gálico que es un compuesto de amplia distribución en frutas y hortalizas, pero menos abundante en el grano de cereales como maíz, trigo y arroz, en los que el ácido ferúlico es predominante. Con base en esta información, los resultados sobre FST en el grano de las accesiones de maíz analizadas se reportan en función del ácido ferúlico. Se realizaron los cálculos de FST para algunas de las muestras, empleando curvas de ácido gálico y ácido ferúlico. Los resultados con la curva de ácido ferúlico fueron en promedio 34 % más altos que con la de ácido gálico.

De las variables de composición fenólica determinadas, la correspondiente a los compuestos fenólicos solubles totales (FST) fue la de mayor valor numérico, lo que es entendible ya que en esta se cuantifican todos los compuestos fenólicos del extracto del grano, incluyendo antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoles (quercetina y kamferol) y proantocianidinas. Comúnmente las muestras de grano con mayores contenidos de antocianinas tienen también un elevado contenido de FST (Shen *et al.*, 2009), tal es el caso del maíz morado en el que las antocianinas representan ~77.7 % de la fracción soluble de compuestos fenólicos (Pedreschi y Cisneros-Zeballos, 2006). En las muestras de grano azul morado los valores de FST promedio por raza variaron entre  $1461.1 \pm 1.7$  y  $2288.2 \pm 275.6$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico (EAF)/g muestra seca (MS). En el primer caso el valor proviene de una accesión de Elotes Chalqueños, en el segundo, es el promedio de ocho accesiones de la raza Mushito (Cuadro 6). El coeficiente de variación de la variable FST en algunas de las razas sobrepasó

el 15 %, por lo que se puede hablar de una gran variabilidad para esta variable en las razas que presentaron estos valores.

Los valores obtenidos son parecidos a los informados por otros investigadores como López-Martínez *et al.* (2009) quienes reportaron valores entre 1010 y 1230  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de muestra seca para cuatro muestras de maíz con grano azul morado de razas mexicanas. Por su parte, Herrera-Sotero *et al.* (2017) informaron un contenido de 2873  $\mu\text{g}$  EAG/g de muestra seca para un maíz de grano azul morado de la raza Mixteco. Sin embargo, en trabajos como el realizado por de la Parra *et al.* (2007) el contenido de 455  $\mu\text{g}$  EAG/g de muestra seca para una muestra de grano azul morado resulta muy inferior a lo obtenido en el análisis de FST efectuado en el grano de las accesiones analizadas.

El contenido de antocianinas totales (CAT) en el grano de las accesiones con color AZM varió de  $437.4 \pm 162$   $\mu\text{g}$  equivalentes de cianidina 3-glucósido (EC3G)/g de MS, en la raza Bolita con 17 accesiones analizadas, hasta  $886.5 \pm 512.7$   $\mu\text{g}$  EC3G/g de MS en la raza Conejo con dos accesiones analizadas. Las razas de maíz en las que se observó un mayor CAT en el grano fueron Conejo, Mushito y Elotes Chalqueños (Cuadro.6). En las razas Elotes Cónicos y Elotes Occidentales, se tuvo el mayor número de accesiones analizadas, y los valores de CAT fueron intermedios ( $675.2 \pm 180$  y  $560.8 \pm 211.1$  mg EC3G/g de MS). Las razas Conejo y Mushito son de distribución más restringida y pocos trabajos reportan valores de contenido de antocianinas en su grano. Estas razas se caracterizan por presentar un grano de tamaño más pequeño al que se presenta en razas como Elotes Chalqueño y Elotes Cónicos, por lo que es posible que sea el factor determinante para el mayor valor de CAT, que está referido en gramo de muestra. Sin embargo, resulta interesante ubicar a las razas de maíz Conejo y Mushito como potenciales para ser aprovechadas en procesos de elaboración de productos con color natural. Hasta ahora se tenían ubicadas únicamente a las razas Elotes Chalqueños y Elotes Cónicos como las más relevantes por su elevado contenido de antocianinas.

Los valores reportados para CAT en el grano de maíz con esta coloración son muy variables, ya que factores como origen del material genético, sitio de producción y proceso de extracción, van a ser determinantes. En 15 accesiones de grano AZM de la raza Elotero de Sinaloa se observó una variación entre 141 a 343  $\mu\text{g}$  EC3G/g MS (Mora-Rochín *et al.*, 2016). Para esta misma raza, pero en accesiones diferentes, en el presente estudio se observó un

valor promedio de  $603.7 \pm 147.2$   $\mu\text{g EC3G/g MS}$  lo que da idea de la variabilidad que se puede observar al interior de una raza de maíz.

El contenido de flavonoides (FLAV) en las accesiones de grano AZM varió entre  $329.15 \pm 8.5$  y  $767.39 \pm 21.6$   $\mu\text{g equivalentes de catequina (EC)/g de MS}$ . El menor valor se presentó en la accesión de la raza Negro de Tierra Caliente, y el mayor en las accesiones de la raza Elotero de Sinaloa. En estos maíces los valores de CAT y FLAV fueron parecidos.

El principio del método colorimétrico del cloruro de aluminio utilizado en este trabajo, se fundamenta en la formación de complejos estables entre el cloruro de aluminio y el grupo cetónico del carbono 3 o bien con los grupos hidroxilo de los carbonos 4 o 5 de la estructura de flavonoides del tipo flavanol, flavonol, flavanona, flavona e isoflavona.

**Cuadro 6.** Variables de composición fenólica en el grano de accesiones de maíz azul morado.

No. Accesiones por raza	Raza	Variables de composición fenólica							
		FST		CAT		FLAV		PAs	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
4	Arrocillo Amarillo	1948.7±224.2	11.5	646.5±171.9	26.6	746.3±141.8	19.0	51.8±3.3	6.4
28	Azul	2036.4±158.4	7.8	562.9±111.2	19.8	649.7±147.2	22.7	38.1±4.5	11.8
17	Bolita	1687.6±177.4	10.5	437.4±162.6	37.2	508.9±151.3	29.7	40.3±14.7	36.4
2	Celaya	1829.9±95.8	5.2	546.1±161.6	29.6	607.4±206.3	34.0	51.1±1.5	2.9
3	Chalqueño	2065.8±102.9	5.0	612.5±197.2	32.2	723.9±274.9	38.0	44.1±10.5	23.7
2	Conejo	1758.0±206.1	11.7	886.5±512.7	57.8	615.6±247.4	40.2	62.3±9.7	15.6
15	Cónico	1915.7±421.9	22.0	548.3±234.1	42.7	581.4±137.8	23.7	39.4±9.7	24.6
2	Cónico Norteño	2156.4±378.7	17.6	790.1±242.2	30.7	574.3±38.8	6.8	79.2±15.5	19.6
4	Elotero de Sinaloa	2008.6±324.2	16.1	603.7±147.2	24.4	517.5±31.3	6.0	44.5±12.0	26.9
1	Elotes chalqueños	1461.1±1.7	0.1	816.04±1.6	0.2	767.39±21.6	2.8	50.7±0.0	0.0
51	Elotes Cónicos	2059.1±261.3	12.7	675.2±180.1	26.7	571.4±129.9	22.7	45.3±12.3	27.2
32	Elotes Occidentales	1909.3±241.5	12.6	560.8±211.1	37.6	482.9±138.0	28.6	39.6±13.6	34.3
8	Mushito	2288.2±275.6	14.0	850.6±189.2	22.2	628.8±89.9	14.3	48.2±10.5	21.7
2	Nal-Tel	1671.8±275.6	16.5	482.6±232.3	48.1	700.7±97.5	13.9	29.8±4.9	16.4
1	Nal-tel de Altura Negro De Tierra	1961.01±11	0.6	795.69±10.6	1.3	422.31±17	4.0	64.34±2.6	4.0
1	Caliente	1857.69±61.4	3.3	482.73±13.6	2.8	329.15±8.5	2.6	44.77±0.3	0.7
6	Olotillo	2023.5±261.9	12.9	619.6±377.9	61.0	503.7±118.8	23.6	53.9±19.0	35.3
4	Oloton	1836.0±182.8	10.0	533.8±128.5	24.1	571.5±179.1	31.3	49.2±16.4	33.2
1	Reventador	1720.6±62.1	3.6	493.04±7.7	1.6	527.46±21.9	4.2	34.38±0.3	0.8
1	Tabloncillo	1746.2±1.7	0.1	483.47±2.0	0.4	473.34±22.3	4.7	30.48±0.4	1.2
11	Tepecintle	1941.8±377.6	19.4	523.4±356.1	68.0	450.8±131.3	29.1	44.5±11.8	26.5
10	Tuxpeño	1969.2±393.1	20.0	638.6±492.5	77.1	509.3±97.6	19.2	38.9±6.5	16.8

\* FST: fenoles solubles totales ( $\mu\text{g EAF/g MS}$ ); CAT: antocianinas totales ( $\mu\text{g EC3G/g MS}$ ); FLAV: flavonoides totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ ); PAs: proantocianidinas totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ ).

Para el grano de maíz, los valores de flavonoides reportados varían según el color del grano. En maíces de grano blanco y amarillo los valores encontrados por Zilic *et al.* (2012) variaron entre 248.6 y 293.6 mg equivalentes de catequina/kg de MS; en maíces de grano azul morado los valores fueron ligeramente mayores y variaron entre 307.4 y 337.5 mg equivalentes de catequina/kg de MS. Los valores de Zilic *et al.* (2012) son menores a los obtenidos en las accesiones de maíz analizadas. Estas diferencias pueden atribuirse al método de cuantificación utilizado, al solvente de extracción usado y a la naturaleza genética del material.

En las accesiones con los mayores contenidos de antocianinas los valores de FLAV fueron menores que los valores de CAT. No así en otras razas en las que ocurrió, al contrario, lo que se atribuye a que tienen un contenido importante de flavonoides distintos a antocianinas.

El contenido de proantocianidinas (PAs) en los maíces de grano AZM varió entre  $29.8 \pm 4.9$  y  $79.2 \pm 15.5$   $\mu\text{g}$  equivalentes de catequina (EC)/g MS. Estos valores extremos se observaron en las razas Nal-tel y Cónico Norteño, respectivamente.

Las PAs en el grano de maíz han sido poco estudiadas. Posiblemente debido a que se encuentran en cantidades bajas con respecto a otros compuestos fenólicos. En la fracción de compuestos fenólicos solubles del grano de maíz con coloración desde el rosa hasta el morado intenso se encuentran principalmente antocianinas, ácidos fenólicos, aminas fenólicas, flavonoides y proantocianidinas (Salinas *et al.* (2017).

De las cuatro variables de composición fenólica que se determinaron en los maíces de grano AZM, fue en la variable CAT en la que se observaron los mayores coeficientes de variación dentro de raza, lo que significa que las antocianinas son compuestos que se ven influenciados en mayor medida por factores como ambiente de producción y origen genético.

### **5.3.2 Maíces de grano rojo cereza (RC)**

El contenido de fenoles solubles totales (FST) en el grano de las accesiones de maíz rojo cereza (RC) varió desde  $1380.5 \pm 133.9$  hasta  $2312.3 \pm 76.8$   $\mu\text{g}$  (EAF)/g MS. El menor valor se observó en la raza Tuxpeño y el mayor en la raza Dulcillo del Noroeste en la que se analizó únicamente una accesión (Cuadro 7). Es posible que el elevado contenido de azúcares solubles del grano de esta raza haya influido en el elevado valor de FST.

**Cuadro 7.** Variables de composición fenólica en accesiones de maíz con grano rojo cereza.

No. Accesiones por raza	Raza	Variables de composición fenólica*							
		FST		CAT		FLAV		PAs	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
1	Bofo	1513.2±13.3	0.9	111.6±1.8	1.6	859.2±9.4	1.1	119.1±3.3	2.8
2	Bolita	1448.5±38.7	2.7	114.7±59.2	51.6	461.7±142.7	30.9	116.2±114.0	98.1
1	Celaya	1732.5±82.8	4.8	285.8±3.0	1.0	429.7±12.7	3.0	32.4±0.6	2.0
4	Cónico	1777.6±273.7	15.4	257.9±94.5	36.6	562.4±120.6	21.4	136.6±75.3	55.1
3	Cónico Norteño	1867.7±114.8	6.1	225.1±27.9	12.4	589.8±279.4	47.4	40.4±6.3	15.5
1	Dulcillo del Noroeste	2312.3±76.8	3.3	76.2±0.4	0.6	779.3±12.1	1.5	207.1±2.3	1.1
38	Elotes Cónicos	1680.8±171.5	10.2	161.3±63.1	39.1	545.4±162.6	29.8	52.5±34.8	66.3
22	Elotes Occidentales	1607.2±160.7	10.0	126.3±43.6	34.5	455.6±126.3	27.7	54.0±52.2	96.6
2	Mushito	1857.9±779.1	41.9	77.2±34.7	45.0	922.6±639.0	69.3	174.6±174.0	99.6
1	Olotillo	1459.5±12.1	0.8	145.1±0.1	0.1	492.2±15.2	3.1	182.0±3.3	1.8
2	Pepitilla	1451.1±45.5	3.1	149.9±30.0	20.0	512.5±76.8	15.0	203.1±4.3	2.1
1	Ratón	1401.6±14.4	1.0	106.9±0.0	0.0	353.8±3.5	1.0	239.9±2.6	1.1
1	Tabloncillo	1669.9±15.6	0.9	113.9±0.0	0.0	621.0±21.1	3.4	130.3±0.7	0.6
1	Tabloncillo Perla	1522.2±14.4	0.9	39.6±0.2	0.5	718.4±22.3	3.1	176.1±0.7	0.4
4	Tuxpeño	1380.5±133.9	9.7	87.5±40.3	46.1	433.7±153.2	35.3	122.8±99.2	80.8

\* FST: fenoles solubles totales ( $\mu\text{g EAF/g MS}$ ); CAT: antocianinas totales ( $\mu\text{g EC3G/g MS}$ ); FLAV: flavonoides totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ );

PAs: proantocianidinas totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ ).

El contenido de antocianinas totales (CAT) en las accesiones de grano RC varió entre  $39.6 \pm 0.2$  y  $285.8 \pm 3.0$   $\mu\text{g EPC/g MS}$ . El menor valor se observó en la raza Tabloncillo Perla de la cual se analizó solo una accesión y el mayor en la raza Celaya, de la cual se analizó también solo una accesión.

Los maíces de grano rojo cereza han sido poco estudiados. En una serie de trabajos publicado sobre compuestos fenólicos en el grano de maíz de diferentes colores, incluyendo el grano de maíz rojo, sin que se especifique que tono de rojo es. En los que se presenta la fotografía del grano se tienen el de Zilic *et al.* (2012) con un valor de  $15.4 \pm 1.64$  mg EC3G/kg MS. En el trabajo de López-Martínez *et al.* (2009) se indica que el grano es de pigmentación roja y los valores para seis muestras analizadas variaron entre 632 y 1000 mg EC3G/kg MS. En germoplasma nacional, Salinas *et al.* (2012a) reportaron valores de 71.6 mg EC3G/kg de MS para una accesión de la raza Tuxpeño; el promedio en seis accesiones analizadas de la raza Vandeño fue de 64.7 mg EC3G/kg de MS.

El contenido de flavonoides totales varió de  $353.8 \pm 3.5$  hasta  $922.6 \pm 639.0$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . El valor más bajo se presentó en la raza Ratón con únicamente una accesión analizada, en tanto que el valor más elevado lo tuvo la raza Mushito con dos accesiones analizadas. Las razas Elotes Cónicos y Elotes Occidentales, de las que se analizó el mayor número de accesiones y que son reconocidas por la presencia de esta coloración de grano, presentaron valores promedio de  $545.4 \pm 162.6$  y  $455.6 \pm 126.3$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . Un dato interesante es el hecho de que en las accesiones de grano RC, los valores de FLAV fueron siempre mayores que los de CAT. En razas como Mushito y Tabloncillo Perla la relación FLAV/CAT fue de 11 y hasta 18. Como se mencionó en párrafos anteriores, en la cuantificación de FLAV se incluyen todos aquellos flavonoides diferentes a antocianinas, que en este color de grano son de mayor relevancia que las mismas antocianinas y que no se han estudiado.

En la única muestra de grano RC analizada por Zilic *et al.* (2012) se reporta un dato de 237.2 mg EC/kg de MS. Este valor es parecido al obtenido en la accesión de la raza Ratón ( $353.8 \pm 3.5$   $\mu\text{g EC/g de MS}$ ).

Los maíces de grano RC sobresalieron por sus contenidos de proantocianidinas (PAs) que fueron en la mayoría de las razas más elevados que los observados en las accesiones de grano

AZM. El contenido de PAs varió entre  $32.4 \pm 0.6$  y  $239.9 \pm 2.6$   $\mu\text{g EC/g}$  de MS. El valor inferior se presentó en la accesión de la raza Celaya, el mayor correspondió a la accesión de la raza Ratón. No se tienen datos reportados sobre PAs para esta tonalidad roja en el grano de maíz. En los maíces de grano RC los mayores coeficientes de variación (CV) se observaron en las variables de CAT, FLAV y PAs.

### **5.3.3 Maíces de grano rojo ladrillo (RL)**

El contenido de fenoles solubles totales (FST) en las accesiones de grano rojo ladrillo (RL) varió entre  $1225.5 \pm 62.3$  y  $2381.7 \pm 0.6$   $\mu\text{g EAF/g MS}$ . El menor contenido se presentó en la accesión de la raza Ancho y el mayor en la accesión analizada de la raza Dulce de Jalisco (Cuadro 8).

Al igual que ocurrió en las accesiones de maíz con grano RC, en donde el mayor contenido de FST se observó en la accesión de maíz dulce (Dulcillo del Noroeste), en las accesiones de grano RL también el mayor valor se presentó en la accesión de grano dulce (Dulce de Jalisco). Este resultado puede estar influenciado por la elevada cantidad de azúcares simples que presentan los maíces dulces, los cuales son del tipo reductor, y pueden reaccionar con el reactivo de Folin y ser cuantificados como compuestos fenólicos. Para evitar esto, se recomienda eliminar los azúcares, previo a la extracción de los compuestos fenólicos. Esta acción no se realizó en las dos accesiones de grano dulce analizadas en el estudio.

Los valores para la variable CAT en el grano de las accesiones de grano RL fueron muy bajos en relación a lo observado en los maíces de grano AZM y RC. Se observó una variación de  $17.0 \pm 0.2$  a  $118.5 \pm 24.9$   $\mu\text{g EPC/g MS}$ . La mayoría de las muestras presentaron valores por debajo de los  $40$   $\mu\text{g EPC/g MS}$ . En el grano de maíz con esta tonalidad de color se presentan compuestos coloridos llamados flabofenos, los cuales son insolubles en los disolventes utilizados para extraer a las antocianinas.

El contenido de flavonoides (FLAV) varió entre  $435.6 \pm 52.0$  y  $1209.1 \pm 15.0$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . El menor valor se observó en la raza Olotillo con dos accesiones analizadas, el mayor se presentó en la accesión del maíz Dulce de Jalisco. Dado que los azúcares no reaccionan con el reactivo del método utilizado para cuantificar FLAV, es probable que el elevado valor de

FST que presentó esta raza se deba a una elevada proporción de flavonoides en el extracto utilizado para cuantificar los FST.

**Cuadro 8.** Variables de composición fenólica en accesiones de maíz con grano rojo ladrillo.

No. Accesiones por raza	Raza	Variables de composición fenólica							
		FST		CAT		FLAV		PAs	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
1	NI	1625.3±13.4	0.8	23.2±0.0	0.1	587.9±9.2	1.6	41.1±1.8	4.4
1	Ancho	1225.5±62.3	5.1	21.9±0.4	1.8	474.0±19.9	4.2	88.0±1.5	1.7
1	Celaya	1516.9±21.4	1.4	24.0±0.4	1.8	643.0±9.4	1.5	130.0±1.8	1.4
1	Chalqueño	1639.5±16.0	1.0	26.7±0.0	0.1	1208.5±22.2	1.8	179.1±2.3	1.3
1	Complejo Serrano de Jalisco	1314.0±0.6	0.0	23.1±0.2	0.9	503.4±19.3	3.8	111.7±1.1	1.0
3	Cónico	1673.2±97.8	5.8	30.0±5.0	16.8	719.9±144.0	20.0	128.4±59.4	46.3
1	Cónico Norteño	1748.4±19.6	1.1	33.5±0.8	2.3	875.8±23.5	2.7	130.9±1.5	1.1
2	Dulce	2038.8±151.8	7.4	35.5±7.0	19.6	571.3±86.0	15.1	137.5±31.4	22.9
1	Dulce de Jalisco	2381.7±0.6	0.0	41.8±0.1	0.1	1209.1±15.0	1.2	200.8±9.8	4.9
1	Dzit Bacal	1251.3±24.8	2.0	17.0±0.2	0.9	456.1±17.6	3.9	128.8±1.5	1.1
6	Elotes Cónicos	1796.3±139.4	7.8	53.0±55.0	103.7	917.8±108.9	11.9	130.2±48.0	36.9
4	Elotes Occidentales	1590.8±144.5	9.1	118.5±24.9	21.0	480.5±47.1	9.8	91.7±57.1	62.3
1	Mushito	1366.2±31.7	2.3	32.0±0.1	0.4	635.9±10.1	1.6	64.5±1.9	2.9
2	Nal-tel	1416.5±190.6	13.5	48.6±37.9	77.9	491.8±40.3	8.2	42.8±6.2	14.5
2	Olotillo	1254.9±166.7	13.3	20.5±1.7	8.5	435.6±52.0	11.9	78.0±58.6	75.1
3	Olotón	1620.3±111.1	6.9	24.7±9.3	37.6	521.5±112.5	21.6	48.1±17.2	35.8
1	Pepitilla	1429.5±5.8	0.4	43.9±0.7	1.6	655.2±25.2	3.8	163.6±1.5	0.9
2	Serrano	1563.0±371.0	23.7	39.8±29.5	74.0	585.7±14.0	2.4	45.2±23.0	51.0
1	Tepecintle	1244.9±20.8	1.7	22.3±0.4	2.0	438.8±18.2	4.1	87.5±2.9	3.4

\* FST: fenoles solubles totales ( $\mu\text{g EAF/g MS}$ ); CAT: antocianinas totales ( $\mu\text{g EC3G/g MS}$ ); FLAV: flavonoides totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ ); PAs: proantocianidinas totales ( $\mu\text{g EC/g MS}$ ).

Los datos sobre contenido de proantocianidinas (PAs) obtenidos para las accesiones de grano RL variaron entre  $41.1 \pm 1.8$  y  $200.8 \pm 9.8$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . El menor valor se presentó en la accesión cuya raza no fue identificada y el mayor lo mostró la accesión de maíz de la raza Dulce de Jalisco.

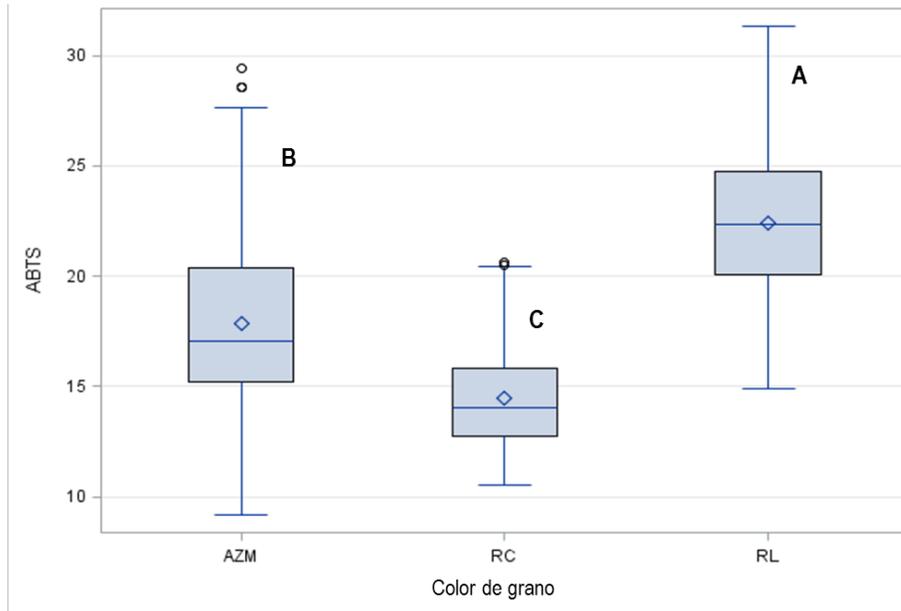
Los valores de PAs obtenidos para las accesiones de grano RL se ubican dentro del rango reportado por Luna-Ramírez (2011) en accesiones de la raza Elotes Chalqueños que varió entre  $38.8 \pm 1.2$  y  $382.1 \pm 25.6$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . Con el uso del método de la vainillina, Min *et al.* (2012) informaron un contenido de PAs de  $60$   $\mu\text{g EC/g MS}$ . Con el uso de este mismo método de cuantificación, Chen *et al.* (2017) concluyeron que el mayor contenido de PAs se presenta en el maíz de grano morado, seguido del maíz de grano rojo y por último el maíz de grano azul. El orden de contenido de PAs entre maíz de grano rojo y de grano azul coincide con lo observado en el presente trabajo.

## **5.4 Actividades biológicas**

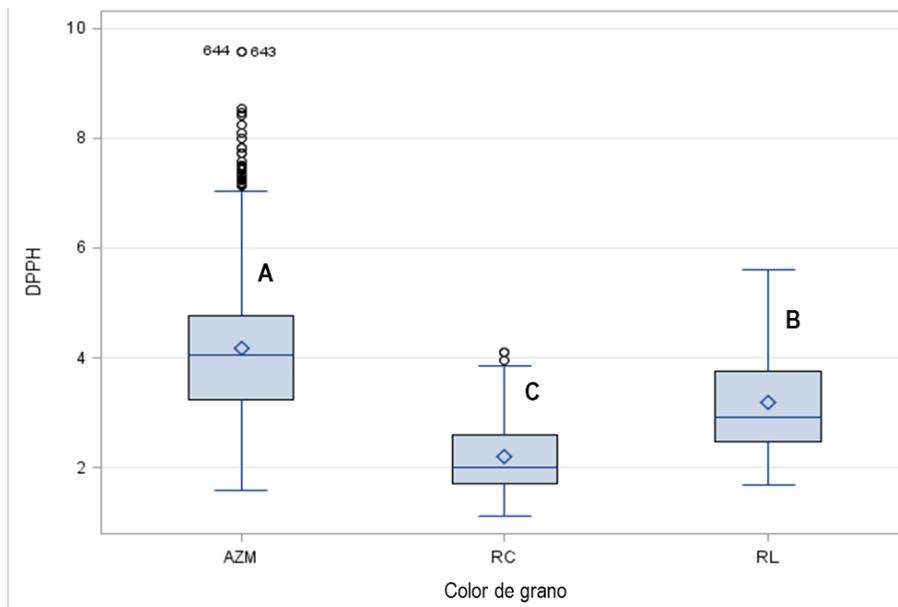
### **5.4.1 Capacidad antioxidante por color de grano**

Los maíces de grano RL promediaron la mayor capacidad antioxidante (CA) evaluada mediante el método de ABTS, seguidos de los maíces de grano AZM y por último los de grano RC (Figura 24). La mayor CA de los maíces RL se atribuye a compuestos fenólicos diferentes a antocianinas, entre los que pueden mencionarse las PAs y flavonoides no coloridos. De hecho, en el análisis de variables fenólicas por color de grano, los maíces RL tuvieron contenidos promedio de PAs y FLAV superiores a los de los maíces de grano AZM y RC (Figuras 22 y 23).

Con el método de DPPH el orden de la CA de los tres colores de grano fue distinto al obtenido con el método de ABTS. Con este método, los maíces de grano AZM mostraron mayor ( $P < 0.05$ ) CA que los de grano RL y grano RC (Figura 25). Este último color de grano presentó la menor ( $P < 0.05$ ) CA. Dado que para la evaluación de la CA por los dos métodos se utilizó el mismo extracto, este resultado significa que las antocianinas, que son los compuestos fenólicos que predominan en el extracto de los maíces de grano AZM, presentaron mayor afinidad con el radical libre del método DPPH.



**Figura 24.** Capacidad antioxidante (CA) promedio obtenida mediante el método de ABTS en los tres diferentes colores de grano de las accesiones analizadas. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).



**Figura 25.** Capacidad antioxidante (CA) promedio obtenida mediante el método de DPPH en los tres diferentes colores de grano de las accesiones analizadas. Letras diferentes en cada color de grano indican que el valor promedio es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ).

## **Maíces de grano azul morado**

Los resultados sobre capacidad antioxidante promedio por raza se presentan en el Cuadro 9. Los valores de capacidad antioxidante (CA) obtenidos con el método de ABTS fueron mayores que los obtenidos con el método de DPPH. La CA evaluada mediante el método de ABTS varió entre  $13.9 \pm 0.5$  y  $23.9 \pm 0.2$   $\mu$ moles equivalentes de Trolox (ET)/g MS. El valor menor se presentó en la accesión de la raza Tabloncillo, en tanto que el valor máximo se observó en la accesión de la raza Elotes Chalqueños. Con el método de DPPH los valores promedio de la CA por raza fueron desde  $3.3 \pm 1.2$  hasta  $7.4 \pm 1.7$   $\mu$ moles ET/g MS. El menor valor se presentó en la raza Bolita, el mayor lo tuvo la raza Mushito.

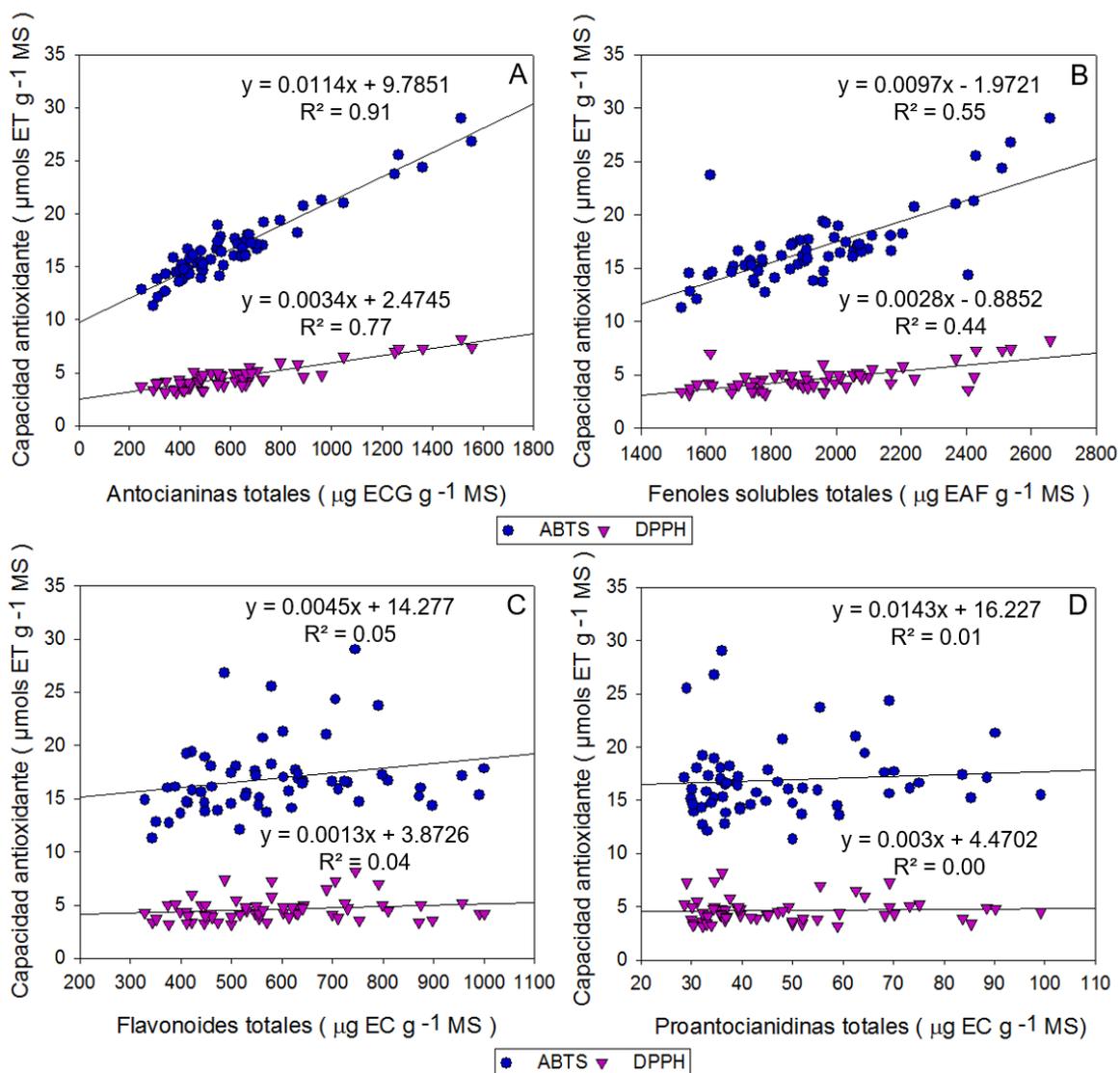
La CA del grano de maíz se debe a los compuestos fenólicos que este posee. De los distintos grupos de compuestos fenólicos los que mayor CA tienen son las antocianinas, y flavonoides del tipo quercetina (Rice-Evans *et al.*, 1996). Aunque en el extracto de fenoles solubles del grano de maíz, que es a partir del cual se realizó el análisis, se encuentran cantidades importantes de ácidos fenólicos como ferúlico, cafeíco y p-cumárico (Briones, 2008), el poder antioxidante de estas moléculas es inferior al de los flavonoides. En el extracto de FST de los maíces de grano AZM las antocianinas representan cerca del 30 % de los compuestos presentes y la CA se atribuye a estos flavonoides coloridos.

**Cuadro 9.** Capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos de ABTS y DPPH en el grano AZM de accesiones de maíz de diferentes razas.

No. Accesiones por raza	Raza	Capacidad Antioxidante*			
		ABTS		DPPH	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
4	Arrocillo Amarillo	19.1±2.2	11.7	4.1±0.3	8.2
28	Azul	20.0±3.2	15.9	4.0±0.7	18.2
17	Bolita	15.1±3.5	23.0	3.3±1.2	37.9
2	Celaya	15.4±1.0	6.5	3.8±0.2	6.1
3	Chalqueño	17.3±0.5	2.9	5.5±1.6	28.2
2	Conejo	19.6±5.8	29.4	6.0±1.4	22.8
15	Cónico	16.6±3.9	23.5	3.8±1.4	36.2
2	Cónico Norteño	19.5±2.6	13.6	4.5±0.4	9.4
4	Elotero de Sinaloa	20.1±4.9	24.3	5.4±1.5	28.8
1	Elotes chalqueños	23.9±0.2	0.9	7.3±0.1	1.5
51	Elotes Cónicos	17.7±2.6	14.9	4.1±1.1	26.7
32	Elotes Occidentales	17.2±2.9	16.8	3.6±1.1	29.9
8	Mushito	23.5±4.4	18.7	7.4±1.7	22.9
2	Nal-Tel	16.1±1.6	9.8	4.3±0.2	4.4
1	Nal-tel de Altura	19.4±0.2	0.8	6.0±0.2	3.3
1	Negro De Tierra Caliente	14.9±0.1	0.5	4.3±0.0	0.1
6	Olotillo	18.3±4.1	22.7	4.5±1.4	31.4
4	Oloton	17.7±2.7	15.3	4.3±1.0	23.2
1	Reventador	15.2±0.5	3.6	4.8±0.1	1.4
1	Tabloncillo	13.9±0.5	3.8	3.4±0.0	1.1
11	Tepecintle	16.1±4.2	26.2	3.6±0.9	26.1
10	Tuxpeño	18.2±5.6	30.7	4.0±2.2	53.3

\*Los valores de capacidad antioxidante están expresados en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox (ET)/g MS.

El grado de asociación entre las variables de composición fenólica y la capacidad antioxidante es distinta. En los maíces de grano AZM analizados por Ramírez (2017) que trabajó con las muestras del proyecto, se observó una elevada  $R^2$  para la relación entre la CA evaluada con el método de ABTS y el contenido de antocianinas totales (CAT). Esto significa que la CA podría estimarse a partir de la variable CAT, con un 91 % de confiabilidad (Figura 26 A). La confiabilidad de esta estimación decrece si el método de evaluación es el de DPPH ( $R^2=0.7732$ ).



**Figura 26.** Curvas de regresión entre las variables de capacidad antioxidante y las distintas variables de composición fenólica determinadas en el grano AZM de accesiones de razas mexicanas.

Los valores de  $R^2$  entre la CA y las variables de flavonoides totales (FLAV) y proantocianidinas totales (PAs) fueron muy bajos en relación a lo observado para las variables de antocianinas totales (CAT) y fenoles solubles totales (FST). Este resultado puede deberse a que los compuestos cuantificados en las variables FLAV y PAs no presentan CA capaz de ser evaluada por los mecanismos que sustentan los métodos de ABTS y DPPH.

Es importante destacar que las variables de FLAV y PAs se analizaron a partir de extractos de acetona: agua, ácido acético, que es un solvente distinto al utilizado para las variables CAT y FST. Múltiples trabajos han mostrado que el disolvente utilizado para extraer los compuestos fenólicos de matrices vegetales tiene un efecto muy relevante en la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos que se extraen. Los flavonoides identificados en el grano de maíz morado son flavonoles del tipo kampferol y quercetina. Sin embargo, estos flavonoides no han sido reportados en el grano de maíz AZM.

En el extracto de maíces con pigmentos antociano con metanol acidificado como disolvente, además de las antocianinas, se han identificado una cantidad importante de amidas fenólicas, las cuales por su estructura podrían tener actividad antioxidante menor aún que los ácidos fenólicos. Las amidas fenólicas absorben a una longitud de onda entre 298 y 318 nm (Collison *et al.*, 2015) y en maíz las que han sido identificadas son N, N' - dicoumaroil-espermidina, N-coumaroil-N-feruloilputrescina, y N, N-diferuloilputrescina. Se ha sugerido que estos compuestos podrían tener algún papel en la tolerancia de los granos de maíz a los insectos, pues se concentran en el pericarpio del grano. Según Collison *et al.*, (2015), las amidas fenólicas son más abundantes en los granos de maíz color rojo ladrillo, particularmente la N, N-diferuloil-putrescina.

### **Maíces de grano rojo cereza**

La capacidad antioxidante obtenida mediante el método de ABTS de las accesiones de grano rojo cereza en las razas de maíz analizadas varió entre  $11.8 \pm 1.3$  y  $18.8 \pm 0.6$   $\mu$ moles ET/g MS, con los valores extremos observados en las razas Tuxpeño y Dulcillo del Noroeste, respectivamente. Con el método de DPPH los valores observados fueron inferiores, tal como se presentó en los maíces de grano AZM, y variaron entre  $2.0 \pm 0.0$  y  $3.0 \pm 0.1$   $\mu$ moles ET/g MS. Con este método el valor menor se presentó en las razas Elotes Occidentales, Ratón y Tuxpeño y el mayor se manifestó en la raza Cónico Norteño (Cuadro 10).

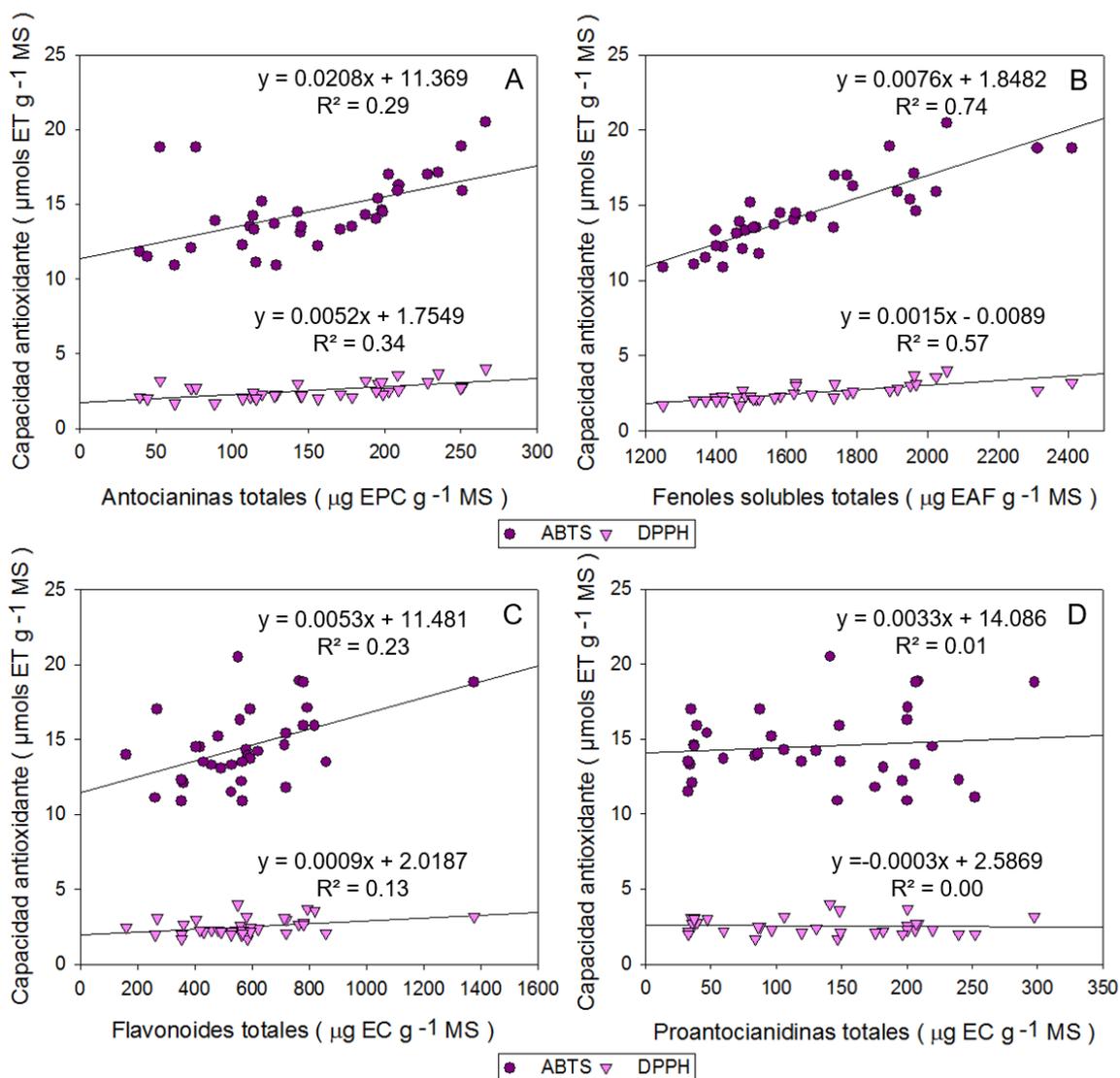
Al parecer, el radical libre del método de ABTS reacciona más fácilmente con los compuestos fenólicos de los extractos que el radical del método de DPPH. Esto mismo fue reportado por Zilic *et al.* (2012) al analizar la CA de maíces con granos coloridos.

**Cuadro 10.** Capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos de ABTS y DPPH en el grano RC de accesiones de maíz de diferentes razas.

No. Acciones por raza	Raza	Capacidad Antioxidante*			
		ABTS		DPPH	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
1	Bofo	13.5±0.3	2.5	2.1±0.0	1.0
2	Bolita	12.2±0.1	1.0	2.3±0.5	22.9
1	Celaya	13.5±0.2	1.6	2.2±0.0	0.3
4	Cónico	15.8±3.2	20.3	2.9±0.9	30.1
3	Cónico Norteño	16.1±0.8	5.0	3.0±0.1	4.9
1	Dulcillo del Noroeste	18.8±0.6	3.1	2.7±0.1	2.8
38	Elotes Cónicos	15.0±2.3	15.3	2.2±0.7	30.9
22	Elotes Occidentales	13.9±1.8	13.2	2.0±0.6	29.9
2	Mushito	16.6±3.1	18.5	2.1±1.4	67.1
1	Olotillo	13.1±0.2	1.9	2.2±0.1	2.4
2	Pepitilla	12.1±1.7	14.0	2.3±0.0	0.4
1	Ratón	12.3±0.0	0.1	2.0±0.0	2.3
1	Tabloncillo	13.1±0.2	1.9	2.2±0.1	2.4
1	Tabloncillo Perla	11.8±0.4	3.2	2.1±0.0	0.8
4	Tuxpeño	11.8±1.3	11.0	2.0±0.2	10.6

\*: Los valores de capacidad antioxidante están expresados en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox (ET)/g MS.

En los maíces con grano RC los valores de  $R^2$  de la regresión lineal obtenida entre los datos de CA y los FST fueron más elevados que la regresión de CA y CAT (Figura 27A) que mostró valores de  $R^2$  mucho menores. Esto significa que otros compuestos fenólicos, distintos a antocianinas, que están presentes en el extracto, reaccionan más fácilmente con el radical libre de los métodos aplicados para medir la CA. No existe relación entre la CA y las PAs del extracto (Figura 27D).



**Figura 27.** Curvas de regresión entre las variables de capacidad antioxidante y las distintas variables de composición fenólica determinadas en el grano de maíz color RC de accesiones de razas mexicanas.

### Maíces de grano rojo ladrillo

Los maíces de grano rojo ladrillo (RL) carecen prácticamente de antocianinas, su color característico se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos del tipo flavofenoles, que no se extraen de manera conjunta con las antocianinas, ya que su estructura química es más afín a los taninos condensables. Los valores de CA observados en el extracto del grano de estos maíces variaron entre  $18.3 \pm 1.2$  y  $31.1 \pm 0.3$   $\mu\text{moles ET/g MS}$ . Las razas que mostraron los

menores valores promedio fueron Olotón, con tres accesiones analizadas y Complejo Serrano de Jalisco con sólo una accesión analizada (Cuadro 11).

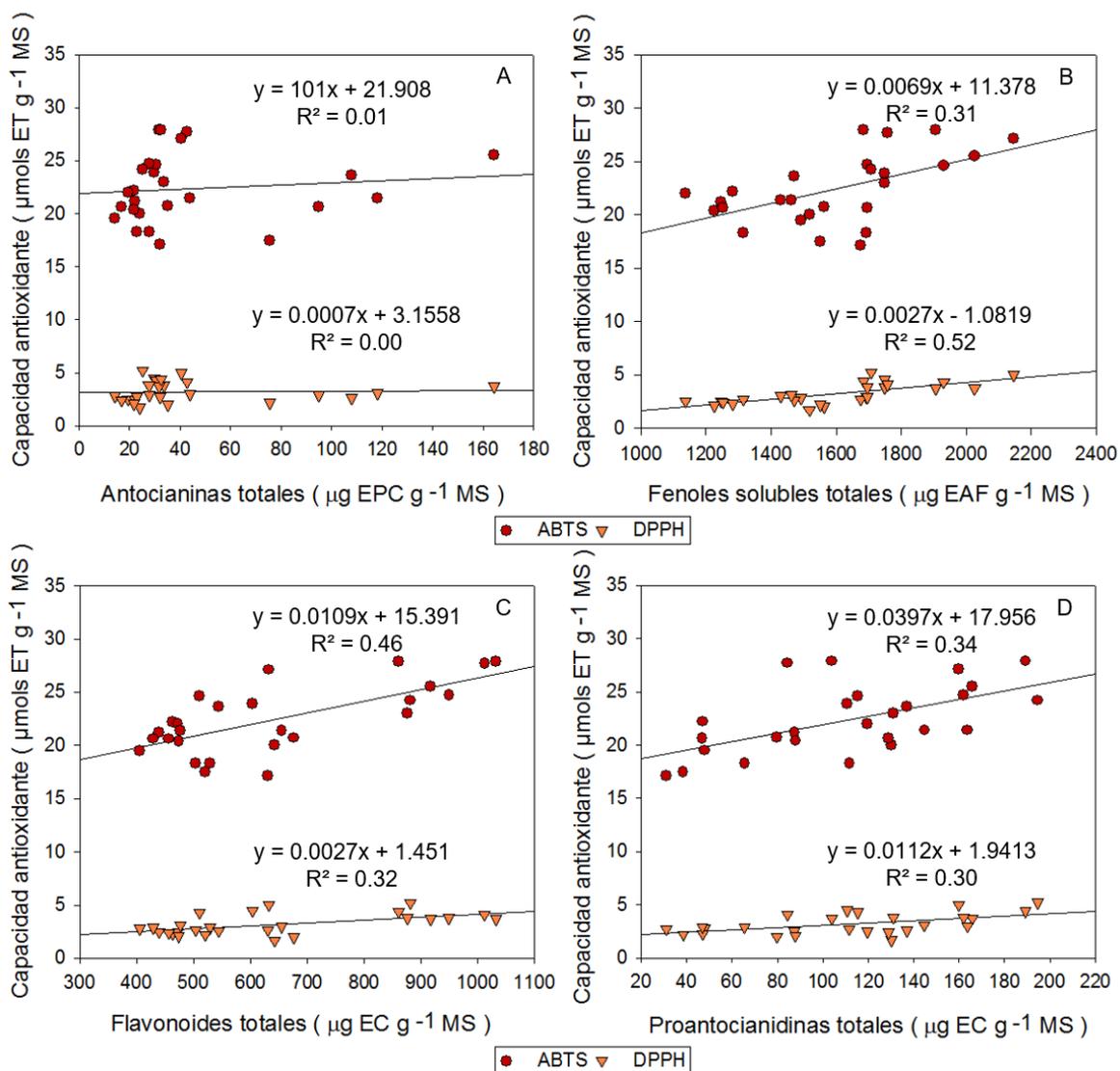
**Cuadro 11.** Capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos de ABTS y DPPH en el grano RL de accesiones de maíz de diferentes razas.

No. Accesiones por raza	Raza	Capacidad Antioxidante*			
		ABTS		DPPH	
		Promedio por raza	CV (%)	Promedio por raza	CV (%)
1	Ancho	20.3±0.8	4.0	2.1±0.0	0.5
1	Celaya	20.0±0.4	2.0	1.7±0.0	0.1
1	Chalqueño	25.2±0.1	0.5	4.5±0.1	2.2
1	Complejo Serrano de Jalisco	18.3±0.2	1.1	2.7±0.1	3.1
3	Cónico	22.9±2.0	8.6	3.8±1.6	42.5
1	Cónico Norteño	23.0±0.0	0.2	3.8±0.1	2.1
2	Dulce	25.8±1.8	7.0	4.6±0.5	10.5
1	Dulce de Jalisco	31.1±0.3	1.1	5.5±0.2	3.3
1	Dzit Bacal	20.6±0.8	3.7	2.4±0.1	4.4
6	Elotes Cónicos	26.2±1.9	7.2	3.9±0.3	7.8
4	Elotes Occidentales	22.8±2.3	10.0	2.8±0.2	7.4
1	Mushito	20.0±0.9	4.3	2.9±0.1	3.6
2	Nal-tel	19.8±3.3	16.7	2.2±0.1	2.3
2	Olotillo	19.5±3.4	17.4	2.4±0.1	3.8
3	Olotón	18.3±1.2	6.4	2.8±0.1	4.3
1	Pepitilla	21.4±0.4	2.0	3.0±0.1	3.3
2	Serrano	19.1±5.8	30.2	2.7±0.6	22.4
1	Tepecintle	21.2±0.3	1.5	2.5±0.0	0.5

\*: Los valores de capacidad antioxidante están expresados en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox (ET)/g MS.

Destaca el hecho de que los maíces de grano RL mostraron valores de CA mayores que los observados en los maíces de grano AZM y RL, que tienen contenidos sobresalientes de antocianinas. Esto significa que el grano de maíz color RL posee otros compuestos diferentes a las antocianinas, que poseen la capacidad de reducirse por la acción oxidante de los radicales presentes en los métodos de evaluación.

De acuerdo con los resultados de la Figura 28 podrían ser flavonoides diferentes a antocianinas y las proantocianidinas las que serían responsables de la elevada CA determinada en el grano de estos maíces.



**Figura 28.** Curvas de regresión entre las variables de capacidad antioxidante y las distintas variables de composición fenólica determinadas en el grano de maíz RL de accesiones de razas mexicanas.

La capacidad antioxidante (CA) de los compuestos fenólicos se atribuye a los grupos hidroxilo presentes en su estructura los cuales son capaces de donar rápidamente átomos de hidrógeno o electrones. Los métodos *in vitro* para medir la CA de extractos, tales como ABTS y DPPH se fundamenta en mecanismos de transferencia de electrones (ET) y átomos de hidrógeno (HAT). Se presenta diferenciación de la CA de los diferentes compuestos fenólicos

con base en su estructura química. La posición de los grupos hidroxilo en el anillo bencénico es relevante para su CA. Los grupos en las posiciones orto y para son más reactivos que los meta (Son y Lewis, 2002).

De acuerdo con los resultados observados sobre la CA evaluado con los dos métodos (ABTS y DPPH) en los tres colores de grano considerados, el método de DPPH mostró los valores más bajos de CA. Lo que significa que, de los CF del extracto usado en el ensayo, solo unos pocos fueron capaces de reducir el radical libre. A diferencia de lo observado con el método de ABTS, con el que se obtuvieron los mayores valores de CA de los extractos. Zilic *et al.* (2012) han señalado resultados similares y concluyen que el radical de ABTS es más sensible a ser reducido por los compuestos fenólicos del grano de maíz, que el radical de DPPH.

### **Análisis de componentes principales de las variables de composición fenólica y capacidad antioxidante en las accesiones de grano de los tres colores**

Con el fin de determinar la forma en que se agrupan las diferentes accesiones con base en su composición fenólica y capacidad antioxidante, se corrió un análisis de componentes principales (ACP). Los resultados obtenidos indicaron que los tres primeros componentes principales (CP) explican el 63.07 % de la variabilidad total (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Matriz de valores propios, proporción de cada componente y proporción acumulada del análisis de ACP de las variables físico-químicas del grano de las accesiones de maíz bajo estudio.

CP	Autovalor	Proporción	Acumulada
1	5.3157451	0.3797	0.3797
2	2.2431148	0.1602	0.5399
3	1.2711528	0.0908	0.6307

CP: componente principal.

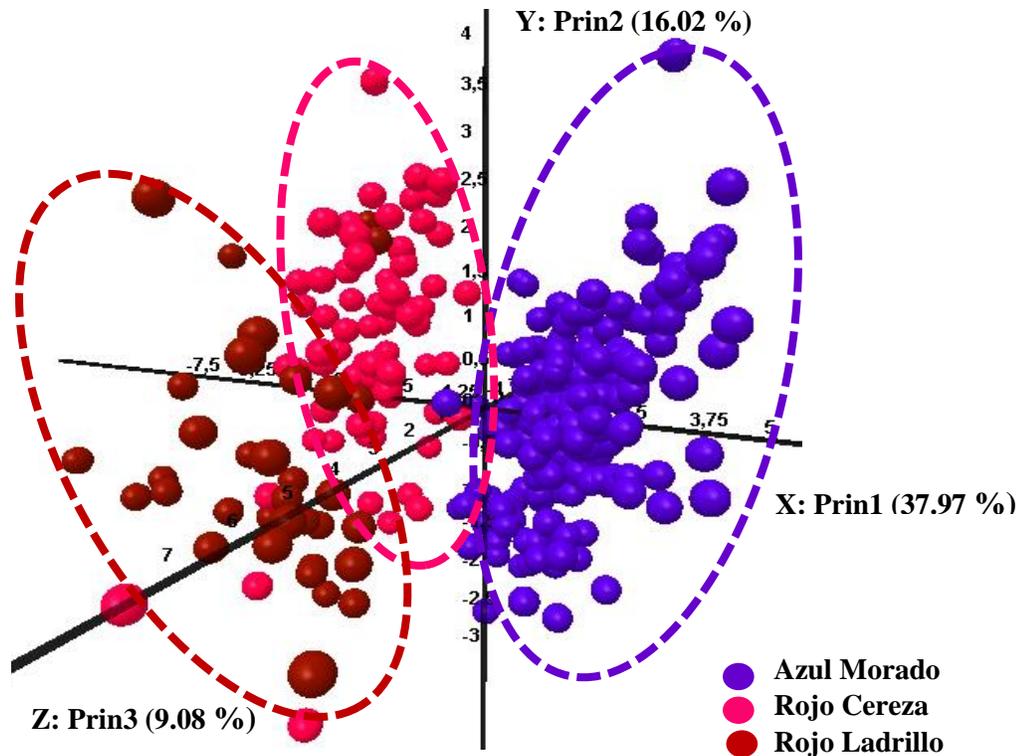
En el primer componente las variables que más contribuyen son las relacionadas con el color del grano y las variables de composición fenólica FST y CAT, además de la capacidad antioxidante evaluada con el método de DPPH. El CP 2 se explica a partir de las variables fenólicas de FLAV y PAs, en conjunto con la capacidad antioxidante medida con el método de ABTS. En el CP3 las variables que lo explican son las relacionadas con características

físicas de grano (Cuadro 13). La asignación no es estrictamente diferenciada. Sin embargo, si se pueden apreciar los tres grupos. Los valores positivos y negativos indican el tipo de relación: directa (+) e inversa (-).

**Cuadro 13.** Variables asociadas con cada uno de los tres primeros componentes principales.

<b>Variables</b>	<b>Prin1</b>	<b>Prin2</b>	<b>Prin3</b>
PCS	-0.039931	-0.228531	0.409409
TE	0.114428	-0.099306	0.689723
UP	0.014885	-0.386272	0.356428
L	-0.297058	-0.181767	0.117411
a	-0.379387	0.175805	0.185309
b	-0.363796	0.219928	0.134337
Hue	0.15611	-0.098139	-0.116933
Croma	-0.389668	0.196163	0.171079
FST	0.337455	0.15787	0.216283
CAT	0.386552	-0.033206	0.08713
FLAV	0.099273	0.411516	0.047663
PAs	-0.137836	0.411577	0.117901
ABTS	0.192093	0.455457	0.191501
DPPH	0.339561	0.236797	0.115318

De las variables de color, es croma la que mejor separa las diferentes accesiones, de las variables fenólicas es el contenido de antocianinas (CAT), en tanto que en capacidad antioxidante es el método de DPPH. La ubicación del pigmento (UP) es una variable que contribuye a explicar la variabilidad, lo mismo que las de composición fenólica FLAV y PAs, además de la CA medida con el método de ABTS. La contribución del CP3 a la variabilidad total es baja y para este componente las variables destacadas fueron las de peso de cien semillas (PCS), el tipo de endospermo (TE) y la ubicación del pigmento (UP). La distribución de las muestras en el plano formado por los tres primeros componentes se muestra en la Figura 29 donde se aprecia que las accesiones de grano AZM se separan con toda claridad de las de grano RC y RL, las que parecen estar en transición, lo que hace suponer que es variante una de otra.



**Figura 29.** Distribución de las accesiones de maíz analizadas en el plano de los tres primeros componentes principales.

#### 5.4.2 Actividad antifúngica

La medición de esta actividad biológica se realizó inicialmente con los extractos del grano de maíz de los tres colores de grano, obtenidos con dos disolventes. Los disolventes fueron: metanol acidificado al 1 % con ácido trifluoroacético (TFA) (extracto metanólico) y acetona: agua: ácido acético (extracto acetónico). Con el extracto metanólico se observó que el hongo favorecía su desarrollo, particularmente con los obtenidos de maíces de grano AZM. Esto se interpretó como que las antocianinas, que son los compuestos predominantes en este extracto, ejercen un efecto promotor del crecimiento del microorganismo. Con el extracto metanólico de los maíces de grano RC se observó algo similar, pero menos acentuado ya que tienen menor contenido de antocianinas. Con base en estos resultados, se decidió emplear el extracto acetónico para la evaluación de la actividad antifúngica del grano en los tres colores, ya que en las muestras analizadas en las pruebas preliminares se observó reducción del crecimiento y desarrollo del hongo en relación al testigo sin adición de extracto.

En el Cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de microdilución con azul de alamar y el porcentaje de inhibición promedio para cada una de las razas de maíz analizadas, así como el dato de porcentaje de inhibición del testigo negativo que fue el Itraconazol a una concentración de 20 ppm determinada como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Como durante la realización de las pruebas se tuvo problemas con el equipo lector de microplacas, con el que se efectuaba la lectura de microdilución con azul de alamar (MDAAL), no se pudo realizar esta prueba en el total de las muestras. Esto obligó a realizar la prueba de porcentaje de inhibición (%IN) en todas las accesiones que quedaron pendientes. De esta manera, para el caso de la raza Arrocillo Amarillo, en la que se tuvieron cuatro accesiones, dos de esas se analizaron por MDAAL, pero ninguna pasó la prueba para avanzar a la de porcentaje de inhibición; las otras dos que se tuvieron para analizar cuando el equipo lector de microplacas no funcionaba, se tuvieron que someter a la prueba de %IN y el valor de  $6.6 \pm 0.5$  representa el promedio de las dos accesiones.

En algunas razas como Conejo y Cónico Norteño se obtuvieron valores de % IN incluso superiores a lo observado en el testigo negativo que es el Itraconazol. Lo que significa que el grano de estas accesiones posee compuestos que se extraen favorablemente con el disolvente acetónico y que poseen la capacidad para limitar el desarrollo de la cepa de *Fusarium* usada en la evaluación. Un aspecto que debe considerarse es el elevado valor de los coeficientes de variación en la mayoría de las razas, debido a que los resultados contrastantes entre las accesiones. Sin embargo, en otros casos se tuvieron resultados consistentes de las accesiones como la raza Celaya, en la que se tiene un CV de 6.6 y un promedio de % IN de  $32 \pm 2.1$ , que es similar al Itraconazol.

De las accesiones de grano AZM analizadas, las razas de interés por sus resultados de actividad antifúngica son: Celaya, Conejo y Cónico Norteño.

En los maíces de grano rojo cereza (RC) varias de las razas analizadas presentaron valores promedio de % IN similares o incluso superiores al testigo, con valores de CV aceptables. En este color de grano nuevamente las accesiones de la raza Cónico Norteño resultaron sobresalientes al presentar un valor de  $41.7 \pm 6.4$ , con tres accesiones analizadas y un CV de 15.3 % (Cuadro 15). De manera general, este color de grano mostró resultados interesantes

en relación a la actividad antifúngica, que fueron mejores que lo observado en el color de grano azul morado.

**Cuadro 14.** Resultados de la actividad antifúngica determinada por la prueba de microdilución con Azul de Alamar y porcentaje de inhibición en las accesiones de grano AZM.

No. Accesiones por raza	Raza	Actividad Antifúngica			
		MDAAL*		%INHIBICIÓN	
		Pasaron prueba <sup>†</sup>	Muestras analizadas por MDAAL <sup>‡</sup>	Promedio por raza	CV (%)
4	Arrocillo Amarillo	0	2	6.6 ± 0.5	8.0
28	Azul	6	14	14.2 ± 7.3	51.8
17	Bolita	11	3	17.3 ± 4.8	27.9
2	Celaya	2	0	32 ± 2.1	6.6
3	Chalqueño	0	2	7.5 ± 2.8	37.7
2	Conejo	1	0	40.5 ± 0.7	1.7
15	Cónico	3	5	18.2 ± 14.3	78.8
2	Cónico Norteño	1	0	38.8 ± 5.7	14.9
4	Elotero de Sinaloa	0	2	22.0 ± 7.1	32.1
1	Elotes chalqueños	ND	1	13.5 ± 2.1	15.7
51	Elotes Cónicos	18	2	19.3 ± 4.6	24.1
32	Elotes Occidentales	18	0	23.0 ± 10.6	46.2
8	Mushito	1	7	21.5 ± 9.5	44.2
2	Nal-Tel	1	1	26.0 ± 15.6	59.8
1	Nal-tel de Altura	0	0	-	-
1	Negro De Tierra Caliente	0	0	-	-
6	Olotillo	2	1	17.7 ± 16.8	94.9
4	Oloton	0	2	11.9 ± 0.9	7.4
1	Reventador	0	0	-	-
1	Tabloncillo	0	0	-	-
11	Tepecintle	8	0	23.3 ± 10.2	43.9
10	Tuxpeño	7	0	21.8 ± 7.3	33.6
Testigo (-)				32.9±4.1	

\*: microdilución con Azul de Alamar; ‡: número de muestras no analizadas por la prueba de microdilución en placa con azul de alamar (MDAAL).

**Cuadro 15.** Resultados de la actividad antifúngica determinada por la prueba de microdilución con Azul de Alamar y porcentaje de inhibición en las accesiones de grano RC.

No. Accesiones por raza	Raza	Actividad Antifúngica			
		MDAAL*	% INHIBICIÓN	CV (%)	Muestras analizadas por MDAAL <sup>‡</sup>
Pasaron prueba	Promedio por raza				
1	Bofo	0	0	-	-
2	Bolita	2	0	27.3 ± 3.2	11.7
1	Celaya	0	0	-	-
4	Cónico	3	0	35.3 ± 5.5	15.7
3	Cónico Norteño	3	0	41.7 ± 6.4	15.3
1	Dulcillo del Noroeste	1	0	36.5 ± 4.9	13.6
38	Elotes Cónicos	14	1	32.1 ± 9.9	30.8
22	Elotes Occidentales	12	0	31.3 ± 6.9	22.1
2	Mushito	2	0	18.0 ± 14.1	78.6
1	Olotillo	0	0	-	-
2	Pepitilla	1	0	34.5 ± 2.1	6.1
1	Ratón	1	0	24.5 ± 0.7	2.9
1	Tabloncillo	0	0	-	-
1	Tabloncillo Perla	0	0	-	-
4	Tuxpeño	4	0	31.8 ± 6.4	20.1
Itraconazol (-)				32.9±4.1	

\*: microdilución con Azul de Alamar; ‡: número de muestras no analizadas por la prueba de microdilución en placa con azul de alamar (MDAAL).

Los resultados sobre actividad antifúngica para los maíces de grano rojo ladrillo (RL) se presentan en el Cuadro 16. Se esperaba que presentaran resultados sobresalientes en su actividad antifúngica, pero fueron superados por los maíces de grano AZM y RC. El número de accesiones analizadas de grano color RL fue considerablemente menor al analizado de los otros dos colores de grano debido a que en las bases de datos revisadas se encontraron pocos registros con esta coloración de grano.

En este color de grano destaca la raza Olotón, con resultados sobresalientes y consistentes entre las tres accesiones analizadas, que en promedio mostraron un % IN de  $41.5 \pm 0.7$  con un bajo valor de CV. También sobresalió la raza Cónico, con valor promedio de  $33.5 \pm 2.8$  % IN y un CV de 8.4 %. Esta raza también fue sobresaliente en el color de grano RC.

**Cuadro 16.** Resultados de la actividad antifúngica determinada por la prueba de microdilución con azul de alamar y porcentaje de inhibición en las accesiones de grano RL.

No. Accesiones por raza	Raza	Actividad Antifúngica			
		MDAAL*		%INHIBICIÓN	
		Pasaron prueba	Muestras analizadas por MDAAL <sup>£</sup>	Promedio por raza	CV (%)
1	Ancho	0	0	-	-
1	Celaya	0	0	-	-
1	Chalqueño	0	1	8.5 ± 0.7	8.3
1	Complejo Serrano de Jalisco	0	0	-	-
3	Cónico	2	0	33.5 ± 2.8	8.4
1	Cónico Norteño	0	0	-	-
2	Dulce	1	0	21.0 ± 2.8	13.5
1	Dulce de Jalisco	0	1	8.0 ± 0.0	0.0
1	Dzit Bacal	0	0	-	-
6	Elotes Cónicos	2	1	23.9 ± 16.4	68.4
4	Elotes Occidentales	1	1	24.8 ± 11.0	44.3
1	Mushito	0	1	4.5 ± 6.4	141.4
2	Nal-tel	1	0	29.5 ± 0.7	2.4
2	Olotillo	0	1	13.8 ± 6.7	48.9
3	Olotón	1	0	41.5 ± 0.7	1.7
1	Pepitilla	0	0	-	-
2	Serrano	0	2	8.7 ± 1.4	16.2
1	Tepecintle	0	0	-	-
Itraconazol (-)				32.9±4.1	

\*: microdilución con azul de alamar; £: número de muestras no analizadas por la prueba de microdilución en placa con azul de alamar (MDAAL).

### 5.4.3 Actividad antimutagénica

Por lo complejo de la prueba, se aplicó únicamente en una muestra de cada color de grano. Al inicio del trabajo previo se tuvieron problemas con los mutágenos seleccionados para la prueba, pues el 2-aminoantraceno, (2 AM) que se usó de acuerdo con lo descrito por Mendoza-Díaz *et al.* (2012) no funcionó como agente mutagénico (datos no mostrados). Una revisión más exhaustiva sobre el uso de agentes mutagénicos indicó que el 2 AM requiere que se utilice de manera conjunta con el factor de activación S9 para que funja como tal. El trabajo usado como referencia no indica este requerimiento que es vital para que se pueda lograr el testigo positivo. Se probaron otros mutágenos como el metilmetanosulfonato (MMS) y la azida de sodio. Este último mutágeno actúa solo en la cepa TA100 (Mortelmans

y Zeiger, 2000), pero en TA98 no funcionó bien. El MMS funcionó para ambas cepas, pero se requirieron concentraciones distintas (1250  $\mu\text{g/placa}$  para TA98 y 2500  $\mu\text{g/placa}$  para TA100). Los resultados obtenidos con el MMS se presentan en el Cuadro 17. En este caso se utilizaron los dos extractos tanto metanólico (MEOH) como acetónico (AAA). Se probaron a la concentración original del extracto y diluidos 50 % con DMSO a 5 ppm en agua estéril. El extracto AAA mostró citotoxicidad a la concentración del extracto original, al no permitir el crecimiento de ninguna colonia. El de MEOH si permitió evaluar la actividad antimutagénica (AAM). Con el extracto de AAA diluido, los resultados fueron diferentes entre las dos cepas bacterianas utilizadas. Para TA98 se obtuvieron valores de inhibición mayores (72.7 a 85.6 %) que para TA100 (15.9 a 40.2 %). La respuesta diferente se debe a que cada cepa tiene una reacción distinta, atribuido a su modificación genética particular.

En el caso de TA100 se presentó diferencia entre los maíces analizados. El mayor porcentaje de inhibición lo presentó el maíz AZM, el menor el maíz RC. Con el extracto MEOH sin diluir los valores fueron de 89.4, 81.1 y 72.3 % para los maíces AZM, RC y RL, respectivamente, para TA98. Para TA100 los resultados fueron menores (43.9, 38.9 y 41.4 % para AZM, RC y RL, en ese orden). Al diluir el extracto, los valores de porcentaje de inhibición se redujeron ligeramente para TA98; pero para TA100 se incrementaron. Al respecto, Socaci *et al.* (2018) reportaron que la actividad antimutagénica de extractos de granos agotados de cervecería fue mayor en aquellos con menores contenidos de fenoles solubles totales y actividad antioxidante. En contraste, Pedreschi y Cisneros-Zevallos (2006) reportaron una relación directa entre la cantidad de compuestos fenólicos, expresada en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido clorogénico/placa y el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad hacia TA98, en la fracción fenólica de un extracto de maíz morado.

En extracto metanólico de grano de maíz azul, Mendoza-Diaz *et al.* (2012) reportaron valores de porcentaje de inhibición de 56 y 62 para las cepas TA98 y TA100, en ese orden. En grano rojo, los valores fueron de 53 y 57 % para las cepas en el mismo orden. Los autores incluyeron en sus análisis una muestra de maíz de grano blanco y amarillo, en ambos casos los maíces con pigmentos antociano fueron superiores en cuanto a su capacidad antimutagénica. Pedreschi y Cisneros-Zevallos (2006) encontraron que la actividad antimutagénica y la actividad antioxidante se encuentran relacionadas al evaluar diferentes fracciones de

compuestos fenólicos obtenidos de un maíz morado. Según Socaci *et al.* (2018) un compuesto o extracto tiene una elevada actividad antimutagénica cuando el porcentaje de inhibición es  $\geq$  de 40; intermedio cuando los valores están entre 40 y 25; y bajo o nulo cuando el porcentaje de inhibición es menor de 25. Una comparación objetiva de resultados no es posible porque la concentración de compuestos fenólicos en cada estudio difiere, y aunque se utiliza el método de Ames en la mayoría de ellos, en cada estudio se aplican algunas particularidades que impiden una comparación objetiva.

**Cuadro 17.** Actividad antimutagénica de extractos de granos de maíz con pigmentos antociano sobre las cepas bacterianas de *S. typhimorium* TA98 y TA100.

Disolvente de extracción	Muestra	Número de revertantes			
		TA98 Media	% IN	TA100 Media	% IN
AAA	Control (-)	32±0.6		90.5±3.5	
	AZM051	NC	-----	NC	-----
	RC020	NC	-----	NC	-----
	RL006	NC	-----	NC	-----
AAA†	AZM051	36±4.6	72.7	237±5.7	40.2
	RC020	19±2.7	85.6	330±1.73	16.7
	RL006	181±9.9	-44.7	325±3.0	17.9
	MMS <sup>a</sup>				
MEOH	AZM051	14	89.4	222	43.9
	RC020	25	81.1	242	38.9
	RL006	36.5	72.3	232	41.4
MEOH†	AZM051	29.3±2.5	77.6	131±3.0	66.9
	RC020	36.5±5.5	72.3	152±10.3	61.6
	RL006	23±3.0	82.6	168±4.6	57.6
	MMS <sup>a</sup>	132±7.4		396±22.7	

a: MMS: metilmetanosulfonato usado como control positivo; NC: no crecimiento de colonias. AAA: acetona:agua:ácido acético; MEOH: metanol acidificado al 1 % con TFA. †: El extracto se usó diluido al 50 %.

La citotoxicidad observada en el extracto AAA de los maíces se atribuye a la composición de compuestos fenólicos lograda con cada tipo de disolvente, debido a sus diferencias en

polaridad. La concentración de FST, CAT, FLAV y PAs en los extractos de ambos disolventes antes de ser concentrados para remover los disolventes orgánicos se presentan en el Cuadro 18. Al realizar los cálculos de la cantidad de compuestos fenólicos expresada como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico/placa que causaron la citotoxicidad en los extractos AAA se tiene que fueron 9.87, 12.14 y 13.17  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ferúlico/placa para las muestras AZM051, RC020 y RL006, respectivamente (datos no mostrados). De estas variables, el contenido de FLAV fue entre dos y cuatro veces más elevado en el extracto AAA con relación al MEOH por lo que este grupo de compuestos fenólicos podría ser el responsable de la citotoxicidad observada. El método utilizado en este trabajo para la cuantificación de flavonoides se fundamenta en la formación de complejos estables entre el cloruro de aluminio y el grupo cetónico del carbono 3 o bien con los grupos hidroxilo de los carbonos 4 o 5 de la estructura de flavonoides del tipo flavanol, flavonol, flavanona, flavona e isoflavona. En el grano de maíz azul se ha reportado la presencia de catequina (flavanol) en cantidades entre  $13.9\pm 0.9$  a  $21.4\pm 1.5$  mg/kg (Del Pozo-Insfran *et al.* 2006), que presenta actividad antimutagénica sin ser citotóxica ni mutagénica a concentraciones de hasta 27 mg/g (Rocha-Guzmán *et al.*, 2007), que es muchas veces superior a lo reportado en el grano de maíz azul.

**Cuadro 18.** Concentración de las diferentes variables de composición fenólica en los extractos utilizados para determinar la actividad antimutagénica. Los valores de las variables fenólicas están expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de los respectivos compuestos usados en las curvas estándar.

<b>Extracto</b>	<b>CAT</b>	<b>FST</b>	<b>FLAV</b>	<b>PAs</b>
AAA006	0.37 $\pm$ 0.01	105.39 $\pm$ 0.49	28.64 $\pm$ 0.06	2.29 $\pm$ 0.0
AAA020	1.19 $\pm$ 0.00	97.09 $\pm$ 1.23	44.0 $\pm$ 1.41	3.01 $\pm$ 0.02
AAA051	2.35 $\pm$ 0.01	78.93 $\pm$ 0.09	43.32 $\pm$ 1.67	1.87 $\pm$ 0.02
MEOH006	1.23 $\pm$ 0.0	85.54 $\pm$ 0.7	14.64 $\pm$ 0.58	2.37 $\pm$ 0.0
MEOH020	3.56 $\pm$ 0.02	71.57 $\pm$ 1.1	9.80 $\pm$ 0.22	2.71 $\pm$ 0.08
MEOH051	11.06 $\pm$ 0.03	86.17 $\pm$ 0.06	9.84 $\pm$ 0.48	3.06 $\pm$ 0.0

## **5.5 Identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en el grano de maíz con pigmentos antociano**

### **5.5.1 Análisis de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

#### **Maíces de grano azul morado (AZM)**

En el extracto metanólico de los maíces de grano AZM se identificaron las antocianinas predominantes en tres accesiones de dos de las razas con mayor número de muestras analizadas. El perfil de antocianinas, entendido como el número de picos separados bajo el protocolo de análisis aplicado, fue similar entre las accesiones de las dos razas (Figura 30). Las diferencias se encontraron en la proporción relativa de cada antocianina en el cromatograma, lo cual se considera proviene de los diferentes ambientes de producción de las accesiones. Bajo el protocolo de análisis aplicado se obtuvieron de 10 a 12 antocianinas, con predominancia de las antocianinas 4 y 9, que corresponden a cianidina 3-glucósido y cianidina 3-malonilglucósido (Cuadro 19).

La hidrólisis alcalina de la muestra original (Figura 31 A y D) condujo a obtener los cromatogramas de la Figura 31 B y E. Los resultados fueron similares en las muestras de ambas razas, al apreciarse seis picos de los 12 que originalmente se tenían (Figura 30 A y D). Con el álcali se rompe el enlace éster con el cual se haya ligado el radical acilo al azúcar, en las antocianinas aciladas. Nótese que la proporción del pico 4, que corresponde a cianidina 3- glucósido se incrementa substancialmente en relación a la proporción que presenta en la muestra original (Figura 30 A y D), debido a que esta antocianina es la base estructural para la formación de las antocianinas aciladas derivadas de cianidina, las cuales, al perder el radical acilo, se convierten en cianidina 3-glucósido. Se logró la identidad de seis antocianinas, tres no aciladas y tres aciladas. Las antocianinas no aciladas identificadas fueron: cianidina 3- glucósido (pico 4), pelargonidina 3-glucósido (pico 6) y peonidina 3- glucósido (pico 8), de las cuales la más importante en cuanto a su proporción, fue la primera. Las antocianinas aciladas identificadas fueron: cianidina 3-malonilglucósido (pico 9), pelargonidina 3-malonilglucósido (pico 10) y cianidin 3 dimalonil glucósido (pico 11), de las que predominó la primera (Cuadro 19). De acuerdo con lo mencionado por Paulsmeyer *et al.* (2017), en el pico 11 co-eluyen cianidin 3 dimalonil glucósido y peonidin 3 malonil glucósido. En maíces de grano azul morado de la raza Elotero de Sinaloa, Mora-Rochin *et al.* (2016) reportaron la presencia de 10 antocianinas, de las cuales ocho correspondieron a

antocianinas aciladas, las que presentaron tanto el radical malato como succinato. Los autores no encontraron en estos maíces a peonidina 3 glucósido, que si se presentó en las muestras analizadas en el presente trabajo y que ha sido reportada en maíces de grano AZM por Zilic *et al.* (2012) y Collison *et al.* (2015).

En general, los trabajos publicados sobre composición de antocianinas en maíces de grano azul morado, coinciden en la presencia de las antocianinas dominantes (cianidina 3-glucósido y cianidina -3-(6"-malonil glucosido)), en donde se presentan discrepancias entre los distintos trabajos es en la presencia o no presencia de antocianinas minoría. Esto se debe principalmente al protocolo de extracción, purificación y análisis de estos compuestos. Es posible que también el origen genético del material empleado en los análisis contribuya a las diferencias.

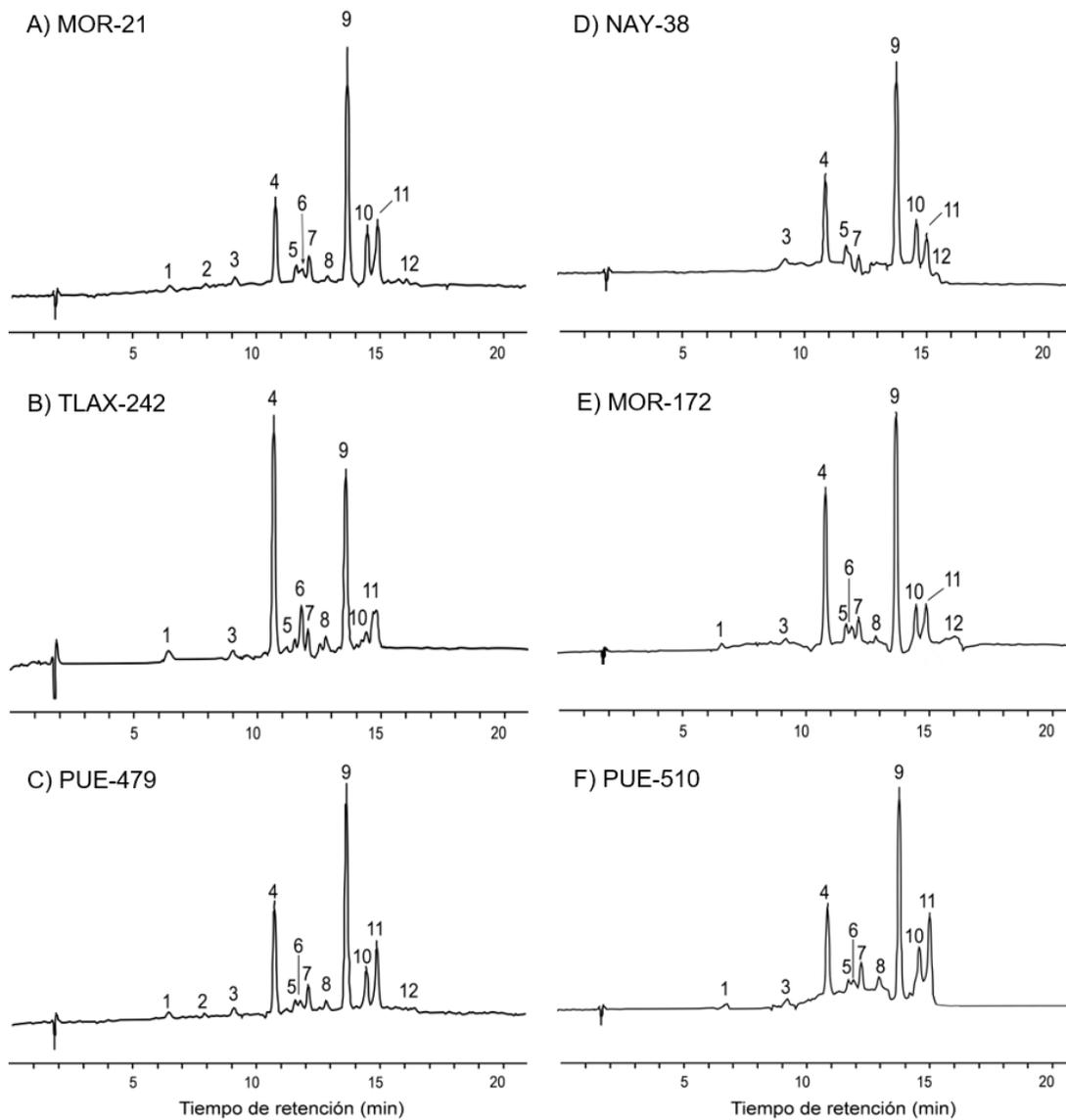
Salinas (2000) señaló que el perfil de antocianinas es determinado por el color del grano de maíz, y que la raza de la cual proviene la muestra tiene poca influencia. El efecto de localidad puede expresarse en la modificación de las proporciones de las diferentes antocianinas. También, es posible que algunas antocianinas se encuentren en niveles no detectables bajo las condiciones de análisis, y si la muestra se cultiva en otra localidad, la proporción de algunas que no se detectaban puede incrementar y poder apreciarse.

**Cuadro 19.** Tiempos de retención, identidad, tipo de antocianina y referencias empleadas para la identificación de las antocianinas del grano azul morado de accesiones de las razas Elotes Cónicos y Elotes occidentales separadas mediante HPLC.

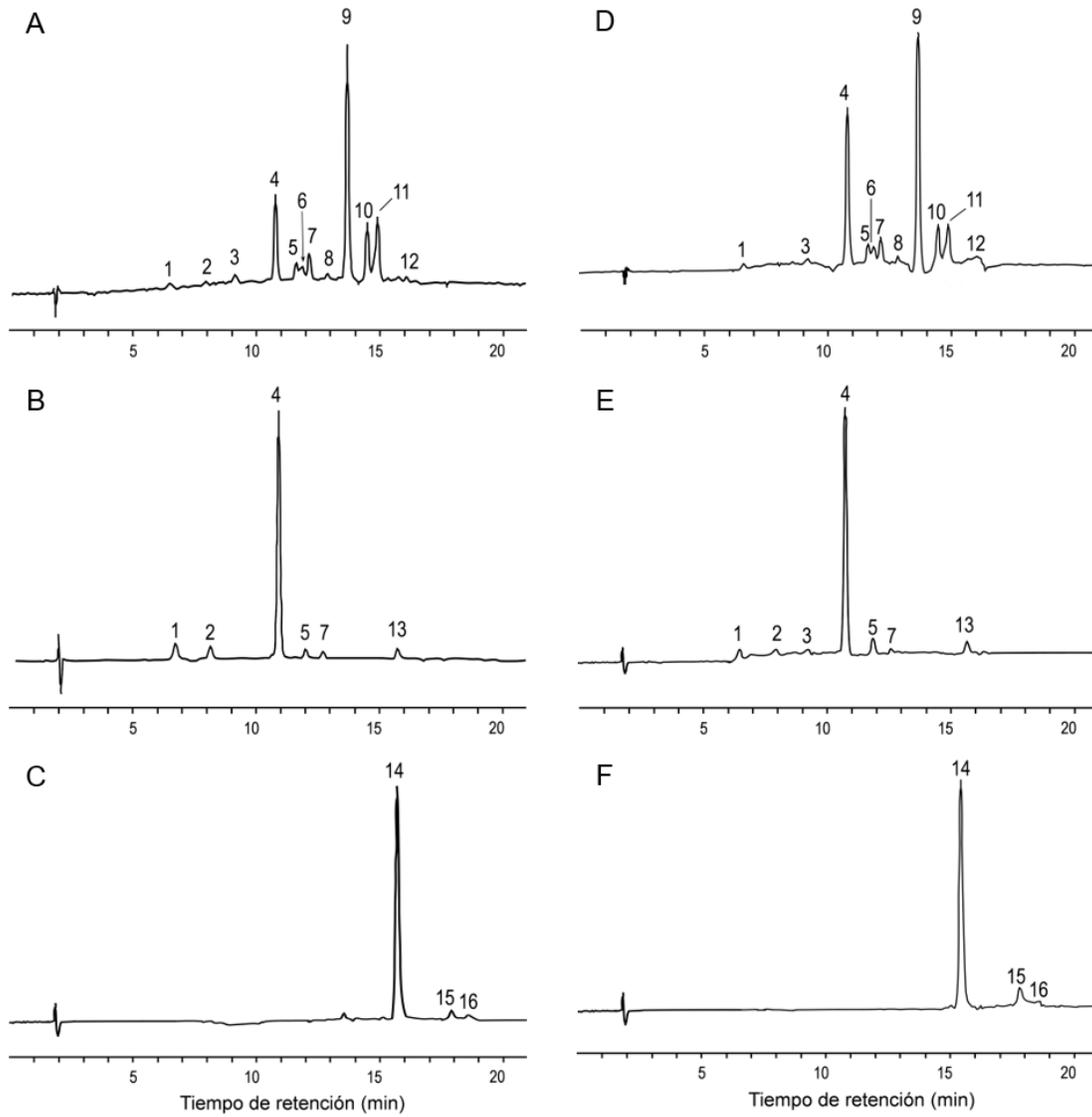
Pico	T <sub>r</sub> (min)	Identidad	Tipo de antocianina	Referencias
1	6.52	NI	No acilada	
2	7.97	NI	No acilada	
3	9.14	NI	Acilada	
4	10.8	Cianidina 3-glucósido	No acilada	Estándar
5	11.65	Derivado acilado	Acilada	
6	11.89	Pelargonidina 3-glucósido	No acilada	Estándar
7	12.17	Derivado acilado	Acilada	
8	12.90	Peonidina 3-glucósido	No acilada	Estándar
9	13.71	Cianidin 3-malonilglucósido	Acilada	Salinas <i>et al.</i> 2012; Paulsmeyer <i>et al.</i> 2017
10	14.52	Pelargonidina 3-malonilglucósido	Acilada	Salinas <i>et al.</i> 2012; Paulsmeyer <i>et al.</i> 2017
11	14.94	Cianidin 3 dimalonil glucósido	Acilada	Salinas <i>et al.</i> 2012; Paulsmeyer <i>et al.</i> 2017
12	16.15	NI	Acilada	
13	15.71	NI	Acilada	
14	15.78	Cianidina	Aglicona	Estandar
15	18.0	Pelargonidina	Aglicona	Estandar
16	18.67	Peonidina	Aglicona	Estandar

NI: no identificada

El cromatograma de la muestra hidrolizada con ácido en presencia de calor se muestra en la Figura 31 C y F. Con este tratamiento se libera de la estructura de la molécula de antocianina tanto el radical acilo como el azúcar de la glicosilación y se conserva únicamente la aglicona. Las agliconas (antocianidinas) del grano de maíz azul morado son cianidina, pelargonidina y peonidina. De estas, la predominante es la cianidina (89 %); la que se encuentra en menor proporción es la peonidina (< 3 %). En los maíces de grano morado, como los de origen peruano, también predomina cianidina, pero a diferencia de los de grano azul morado, en estos la proporción de peonidina es mucho mayor que la de pelargonidina (Pascual-Teresa *et al.*, 2002).



**Figura 30.** Cromatogramas de las antocianinas presentes en el grano de maíz azul morado (AZM) de accesiones de las razas Elotes Cónicos (A B y C) y Elotes Occidentales (D, E y F).



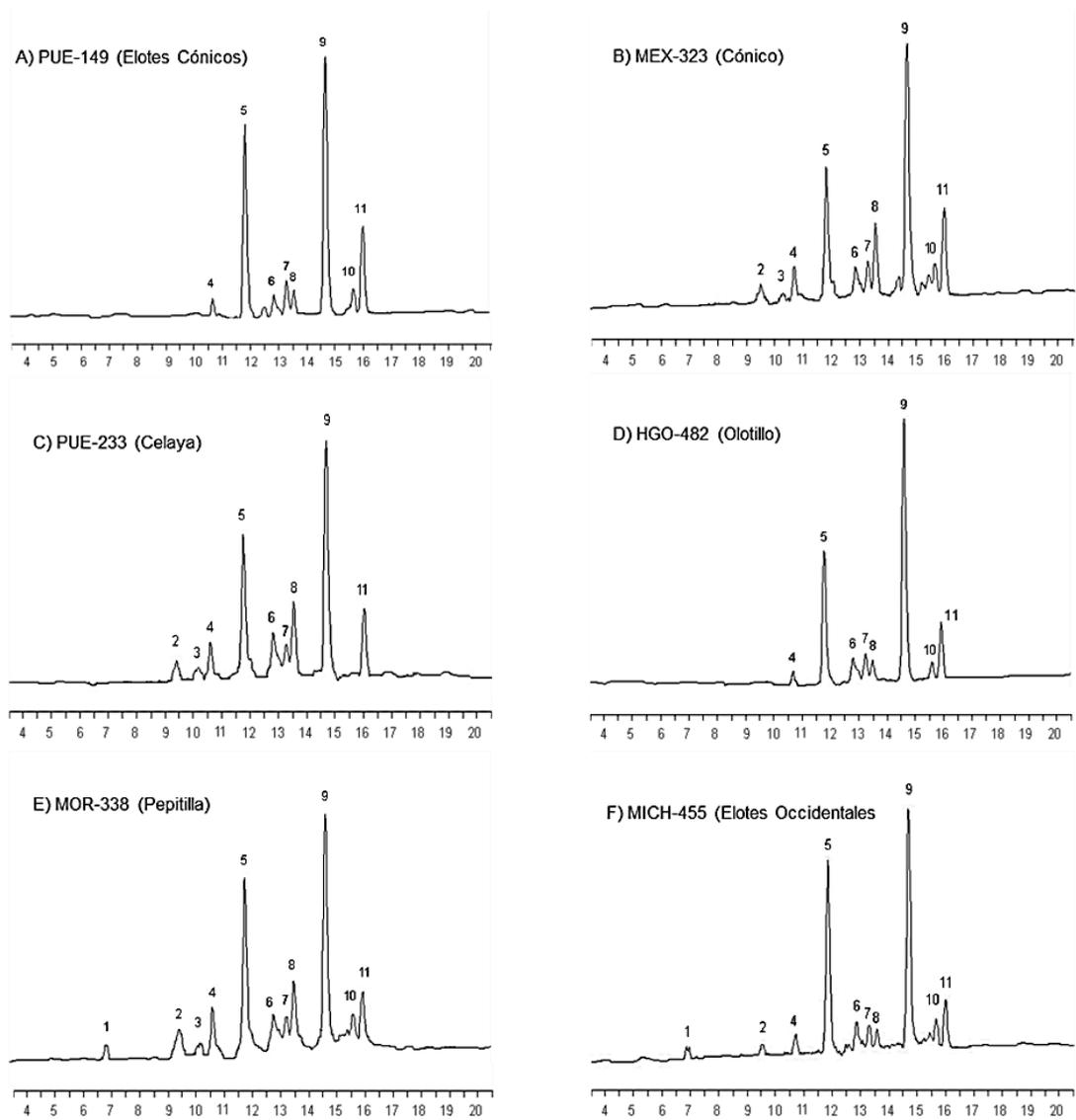
**Figura 31.** Cromatogramas de los extractos de antocianinas del grano azul morado de accesiones de maíz de las razas Elotes Cónicos, accesión MOR 21 (A) y Elotes Occidentales, accesión MOR 172 (B) en sus versiones de extracto sin hidrolizar (A y D), extracto con hidrólisis alcalina (B y E), y extracto con hidrólisis ácida (C y F).

### Maíces de grano rojo cereza

Para este análisis se seleccionaron seis muestras de grano rojo cereza de distintas razas. No se eligieron muestras de grano rojo ladrillo, porque presentan contenidos de antocianinas muy bajos, lo que dificulta el análisis de estos compuestos, pues muchas veces el ruido de la línea base del cromatograma confunde los picos, que son muy pequeños.

Las muestras analizadas fueron: PUE-149 (Elotes Cónicos), MEX-323 (Cónico), PUE-233 (Celaya), HGO-482 (Olotillo), MOR-338 (Pepitilla) y MICH-455 (Elotes Occidentales). Bajo el protocolo de análisis utilizado se lograron separar entre 9 y 11 picos (Figura 32). De estos, los picos 5 y 9 fueron los que se encontraron en mayor proporción, y corresponden a pelargonidina 3- glucósido y pelargonidina malonilglucósido (Cuadro 20), que coincide con lo reportado por Paulsmeyer *et al.*, (2017) en cuanto a la predominancia de estas dos antocianinas en maíces de grano color rojo cereza. En una accesión de grano rojo cereza de la raza Elotes Occidentales, Ramírez *et al.* (2018) reportaron como predominante dentro de las antocianinas no aciladas a pelargonidina 3-glucósido; sin embargo, los autores no identificaron a pelargonidin malonilglucósido como la predominante dentro de las antocianinas aciladas, sino que para ellos fue cianidina 3-6 malonil glucósido.

En los maíces de grano rojo cereza dominan los derivados de pelargonidina, a diferencia de los maíces de grano azul morado en los que dominan los derivados de cianidina (Salinas *et al.*, 1999; Espinosa, 2003). El perfil de antocianinas observado en las seis muestras fue similar, con pequeñas diferencias en cuanto a la presencia de picos pequeños de alta polaridad en algunas de ellas (MEX-323, PUE-233, MOR-338 y MICH-455), que podrían corresponder a pigmentos producto de reacciones de condensación entre catequina o epicatequina y alguna antocianina monoglucósido, que han sido reportados en muestras de grano azul morado y rojo cereza (González-Manzano *et al.*, 2008).



**Figura 32.** Cromatogramas de las antocianinas presentes en el grano rojo cereza (RC) de accesiones de maíz de diferentes razas.

De acuerdo con los resultados, los maíces de grano AZM presentan un perfil similar entre las accesiones de este color, independientemente de la raza de la cual provienen. Este resultado coincide con la reportado por Salinas *et al.* (1999) y con lo publicado recientemente por Collison *et al.* (2015) en maíces con esta tonalidad de grano.

**Cuadro 20.** Tiempos de retención, identidad, tipo de antocianina y referencias empleadas para la identificación de las antocianinas del grano de maíz rojo cereza (RC) de accesiones de diferentes razas separadas mediante HPLC.

Pico	Tr (min)	Identidad	Referencias*
1	6.9	NI	
2	9.5	NI	
3	10.2	NI	
4	10.7	Cianidina 3-glucósido	Estandar químico
5	11.8	Pelargonidina 3-glucósido	Estandar químico
6	12.8	Peonidina 3-glucósido	Estandar químico
7	13.3	Malvidina 3-glucósido	Estandar químico
8	13.5	Cianidina malonilglucósido	Paulsmeyer <i>et al.</i> (2017)
9	14.6	Pelargonidina malonylglucósido	Paulsmeyer <i>et al.</i> (2017)
10	15.6	NI	
11	16.0	Pelargonidina dimalonilglucósido	Paulsmeyer <i>et al.</i> (2017)

Tr= tiempo de retención; \*: se refiere a la referencia usada para la identificación del compuesto; NI= no identificado.

### 5.5.2 Análisis de compuestos fenólicos por LC-MS

Las muestras procesadas de acuerdo a lo descrito en la Figura 13 se infundieron en un equipo Waters que tiene la capacidad para realizar el análisis de masas de los compuestos presentes en el extracto. Este equipo pertenece al CIATEJ, unidad Guadalajara. Lamentablemente, el equipo sufrió un desperfecto en el “software”, y los resultados no se pudieron recuperar. Se podrán obtener una vez que se resuelva el desperfecto.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados más sobresalientes del análisis de variables de composición fenólica en las accesiones de maíz con los tres colores de grano fueron:

1. Los maíces de grano AZM fueron los de mayor contenido de fenoles solubles totales, atribuido a una mayor presencia de antocianinas, pues fueron los de mayor contenido de antocianinas totales. Estos maíces presentaron un contenido de flavonoides igual a los maíces de grano RC, pero fueron los de menor contenido de proantocianidinas. El color de grano AZM fue el más abundante dentro de las diferentes razas de maíz.

2. Los maíces de grano RC y RL presentaron un contenido igual de fenoles solubles totales. Los maíces de grano RL fueron los que presentaron el mayor contenido de flavonoides y de proantocianidinas de los tres colores de grano.
3. En los maíces de grano AZM se observó que la capacidad antioxidante tiene una relación directa y altamente significativa con el contenido de antocianinas, relación que no se observó en los maíces de grano RC.
4. La mayor actividad antifúngica del grano de maíz se presentó en los extractos con mayor contenido de proantocianidinas y flavonoides. Los extractos ricos en antocianinas favorecieron el desarrollo del hongo usado en la evaluación. Los maíces de grano rojo cereza fueron sobresalientes en esta actividad biológica, en relación a los de grano azul morado y rojo ladrillo.
5. En los maíces de grano AZM se identificaron entre 8 y 12 antocianinas, de las cuales la mayor proporción fueron antocianinas del tipo aciladas. Los derivados de cianidina fueron los más abundantes, seguidos de los de perlargonidina, y en muy baja proporción de peonidina. El efecto de la raza sobre el perfil de antocianinas se manifestó en la proporción relativa de cada una de las antocianinas.
6. En los maíces de grano RC se identificaron entre 8 y 12 antocianinas. La principal diferencia en el perfil de antocianinas entre los maíces de grano AZM y lo RC es que en estos últimos predominan los derivados de pelargonidina.
7. En los maíces de grano rojo ladrillo la presencia de antocianinas es muy baja, por lo que su color es debido a otros compuestos fenólicos como los flabofenos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E.-S. M., and P. A. HUCL. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*, 76: 350-354.

ADOM, K.K., and R.H. LIU. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182-6187.

BARROS, L., DUEÑAS, M., ALVES, C. T., SILVA, S., HENRIQUES, M., SANTOS-BUELGA, C., and FERREIRA, I. C. 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 41-45.

BASTIDAS, O. 2013. Cell counting with neubauer chamber, basic hemocytometer usage. Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting.

BHATTA, R., UYENO, Y., TAJIMA, K., TAKENAKA, A., YABUMOTO, Y., NONAKA, I., ENISHI, O. and KURIHARA, M. 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J Dairy Sci*, 92: 5512-5522.

BEDOLLA, S., and L. W. ROONEY. 1982. Cooking maize for masa production. *Cereal Foods World* 27(5): 219-221.

BRIONES, B. J. E. 2008. Compuestos fenólicos presentes en las estructuras del grano de maíz blanco y su relación con el oscurecimiento en tortilla. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 111p.

CHANG, C. C., YANG, M. H., WEN, H. M., and CHERN, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10:178–182.

CHEN, C., SOMAVAT, P., SINGH, V., and GONZALEZ DE MEJIA, E. 2017. Chemical characterization of proanthocyanidins in purple, blue, and red maize coproducts from different milling processes and their anti-inflammatory properties. *Industrial Crops and Products*, 109, 464-475. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.08.046

COLLISON, A., L. YANG, L. DYKES, S. MURRAY, and J.M. AWIKA. 2015. Influence of genetic Background on Anthocyanin and Copigment Composition and Behavior during Thermoalkaline Processing of Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 5528–5538.

CONABIO. 2011. Base de datos del proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Octubre de 2010. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html>

CUEVAS, M. E.; S. HILLEBRAND, A. ANTEZANA and P. WINTERHALTER. 2011. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 7068– 7074.

DÍAZ, V. A. 2003. Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L.) como colorantes en yogurt. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.

DE LA IGLESIA, R., MILAGRO, F. I., CAMPIÓN, J., BOQUÉ, N., and MARTÍNEZ, J. A. 2010. Healthy properties of proanthocyanidins. *BioFactors* 36:159-168.

DE LA PARRA, C., S.O. SERNA-SALDÍVAR, and R.H. LIU. 2007. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn production of masa, tortillas and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4177-4183.

DEL POZO-INSFRAN, D., C.H. BRENES, S.O. SERNA-SALDÍVAR and S.T. TALCOTT. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Res. Int.* 39:696-703.

ESPINOSA-GARCIA, B.M. 2003. Antocianinas en maíces de grano pigmentado (*Zea mays* L.) y medición de su actividad antioxidante. Tesis profesional de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México.

FIGUEROA, C. J. D., D. E. NARVÁEZ G., A. MAURICIO S., S. TABA, M. GAYTÁN M., J. J. VÉLES M., F. RINCÓN S. y F. ARAGÓN C. 2013. Propiedades físicas del grano y calidad de los grupos raciales de maíces nativos (criollos) de México. Rev. Fitotec. Méx. 36: 305-314.

FOSSEN, T., R. SLIMESTAD, and O.M. ANDERSEN. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarigrass (*Phalaris arundinacea*). J. Agric. Food Chem.49:2318–21.

FRANKEL, O.H. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. p. 161-170 en: Genetic manipulation: Impact on man and society (W. Arber, K. Llimensee, W.J. Peacock y P. Starlinger, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

FUKUMUTO, L.R., and G. MAZZA. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant activities of Phenolic Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 3597-3604.

GLAZER, I., MASAPHY, S., MARCIANO, P., BAR-ILAN, I., HOLLAND, D., KEREM, Z., and AMIR, R. 2012. Partial identification of antifungal compounds from Punica granatum peel extracts. Journal of agricultural and food chemistry, 60: 4841-4848.

GONZALEZ-MANZANO, S., J. J. PEREZ-ALONSO, Y. SALINAS-MORENO, N. MATEUS, A. M. S. SILVA, V. DE FREITAS, and C. SANTOS-BUELGA. 2008. Flavanol–anthocyanin pigments in corn: NMR characterization and presence in different purple corn varieties. Journal of Food Compositional Analysis 21:521-526.

HARBORNE J B and R SELFT. 1987. Malonated cyanidin 3 glucosides in *Zea mays* and other grasses. Phytochemistry 28:2417-2418.

HERRERA-SOTERO, M., GONZÁLEZ-CORTÉS, F., GARCÍA-GALINDO, H., JUAREZ-AGUILAR, E., DORANTES, M. R., CHÁVEZ-SERVIA, J., and GUZMÁN-GERÓNIMO, R. 2017. Anthocyanin Profile of Red Maize Native from Mixteco Race and Their Antiproliferative Activity on Cell Line DU145. In Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health. InTech.

KUMAR, N., and PRUTHI, V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. Biotechnology Reports, 4: 86-93.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.X., R.M. OLIART-RIOS, G. VALERIO-ALFARO, C.H. LEE, K.L. PARKIN, and H.S. GARCÍA. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1187-1192.

LUNA, R. K. Y. 2011. Variabilidad en el contenido de antocianinas y proantocianidinas en granos de maíz azul y rojo. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 63p.

M27-A2 (reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp) del CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute (2004).

MENDOZA-DÍAZ, S., M.C. ORTIZ-VALERIO, E. CASTAÑO-TOSTADO, J.D. FIGUEROA-CÁRDENAS, R. REYNOSO-CAMACHO, M. RAMOS-GÓMEZ, R. CAMPOS-VEGA, and G. LOARCA-PIÑA. 2012. Antioxidant capacity and antimutagenic activity of anthocyanin and carotenoid extracts from nixtamalized pigmented creole maize races (*Zea mays* L.) *Plant Foods Human Nutr* 67(4): 442-449.

MIN, B., L. GU, A.M. McCLUNG, C.J. BERGMAN, and M.H. CHEN. 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry* 133: 715-722.

MORTELMANS, K. and E. ZEIGER. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455 (2000) 29–60.

MORA-ROCHÍN, S., J.A. GUTIÉRREZ-URIBE, 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 corns processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science* 52:502-508.

MORA-ROCHIN, S., N. GAXIOLA-CUEVAS, J.A. GUTIERREZ-URIBE, J. MILAN-CARRILLO, E.M. MILAN-NORIS, C. REYES-MORENO, S.O. SERNA-SALDIVAR, and E.O. CUEVAS-RODRIGUEZ. 2016. Effect of traditional nixtamalization on anthocyanin

content and profile in Mexican blue maíz (*Zea mays* L.) landraces. *LWT – Food Science and Technology* 68: 563-569.

NACZK, M., and F. SHAHIDI. 2004. Extraction and analysis of phenolic in foods. *Journal of Chromatography A* 1054:95-111.

OCHOA-FUENTES, Y. M., CERNA-CHÁVEZ, E., LANDEROS-FLORES, J., HERNÁNDEZ-CAMACHO, S., y DELGADO-ORTIZ, J. C. 2012. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton (Buenos Aires)*, 81(1), 69-73.

PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C., and RIVAS-GONZALO. 2002. LC–MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1003-1006.

PAULSMEYER, M., L. CHATHAM, BECKER, T. M. WEST, L. WEST, and J. JUVIK. 2017. A survey of anthocyanin composition and concentration in diverse maize germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4341-4350.

PEDRESCHI, R., and L. CISNEROS-ZEVALLOS. 2006. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4557-4567.

PEDRESCHI, R., and L. CISNEROS-ZEVALLOS. 2007. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.) *Food Chemistry* 100: 956-963.

PRIOR, R.L., X. WU, and K. SCHAICH. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53: 4290-4302.

PILU R., CASSANI, E., SIRIZZOTTI, A., PETRONI, K., and TONELLI, C., 2011. Effect of flavonoid pigments on the accumulation of fumonisin B1 in the maize kernel. *J. Appl. Genetics*. 52(1), 145-152.

PILUZZA, G., L. SULAS, and S. BULLITTA. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*, In press.

RAMÍREZ, G. O. 2017. Actividad antioxidante del grano de accesiones de maíz (*Zea mays* L.) con pigmentos antociano. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo p. 112.

RAMÍREZ, L. B., SALCEDO, H. E. R., AULIS, M. F. F., LÓPEZ, M. A. R., OCAÑA, A. N., y RADILLO, J. J. V. 2018. Antocianinas de granos de maíz (*Zea mays* L.) rosa. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 43(3), 188-192.

RAMOS-ESCUADERO, F., A.M. MUÑOZ., C. ALVARADO-ORTIZ, A. ALVARADO and J. YAÑEZ. 2012. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of Medicinal Food* 15(2): 206-215.

RE, R., N. PELLEGRINI, A.P. PROTEGGENTE, M. YANG, and C. RICE-EVANS. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231–1237.

RICE-EVANS, C.A., N.J. MILLER, and G. PAGANGA. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. See comment in PubMed Commons below. *Free Radic Biol Med*. 20:933-956.

ROBLES R R R. 2004. Actividad antioxidante de masa y tortilla de maíces pigmentados. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 67 p.

ROCHA-GUZMÁN, N. E., HERZOG, A., GONZÁLEZ-LAREDO, R. F., IBARRA-PÉREZ, F. J., ZAMBRANO-GALVÁN, G., and GALLEGOS-INFANTE, J. A. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, 103(2), 521-527.

SALINAS, M. Y. 2000. Antocianinas en el grano de maíces criollos mexicanos. Tesis doctoral. Programa de Fisiología Vegetal, Centro de Genética. Colegio de Posgraduados., 102 p.

SALINAS-MORENO, Y., M. SOTO-HERNÁNDEZ, F. MARTÍNEZ-BUSTOS, V. GONZALEZ-HERNÁNDEZ y R. ORTEGA-PACZKA. 1999. Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. Revista Fitotecnia Mexicana. 22:161-174.

SALINAS MORENO, Y., MARTÍNEZ BUSTOS, F., SOTO HERNÁNDEZ, M., ORTEGA PACZKA, R., y ARELLANO VÁZQUEZ, J. L. 2003. Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. Agrociencia, 37:617-628.

SALINAS-MORENO, Y., G. SALAS-SÁNCHEZ, D. RUBIO-HERNÁNDEZ, and N. RAMOS-LOBATO. 2005. Characterization of Anthocyanin Extracts from Maize Kernels. Journal of Chromatographic Science 43:483-487.

SALINAS-MORENO, Y., F.J. CRUZ-CHÁVEZ, S.A. DÍAZ-ORTIZ, y F. CASTILLO-GONZÁLEZ. 2012a. Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. Revista Fitotecnia Mexicana 35(I): 33-41.

SALINAS-MORENO, Y. J.J. PEREZ-ALONSO, G. VAZQUEZ-CARRILLO, F. ARAGON-CUEVAS, y G.A. VELAZQUEZ-CARDENAS. 2012b. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes cónicos y bolita. Agrociencia 46: 693-706.

SALINAS-MORENO, Y., C. GARCÍA-SALINAS, J.L. RAMÍREZ-DÍAZ, and I. ALEMÁN DE LA TORRE. 2017. Phenolic compounds in maize grains and Its nixtamalized products. In: Phenolic compounds- Natural sources, Importance and Applications, Soto-Hernández, M., Palma-Tenango, M., and García-Mateos, R. (eds). InTech publications. pP:215-232.

SALINAS, M. Y. y G. C. VAZQUEZ. 2006. Metodologías de análisis de la calidad nixtamalera-tortillera en maíz. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Laboratorio de Maiz. Folleto técnico No. 23.

- SÁNCHEZ, J.J., M.M. GOODMAN and C.W. STUBER. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.
- SHEN, Y., JIN, L., XIAO, P., LU, Y. and BAO, J. 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* 49:106-111.
- SINGLETON, V.L., and J.A. ROSSI. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult* 16: 144-158.
- SON, S. and B. A. LEWIS. 2002. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:468-472.
- SOCACI, S. A., FĂRCAȘ, A. C., DIACONEASA, Z. M., VODNAR, D. C., RUSU, B., and TOFANĂ, M. 2018. Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 80, 180-187.
- SUMCZYNSKI, D., BUBELOVA, Z., SNEYD, J., ERB-WEBER, S. and MLCEK, J. 2015. Total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, crude fibre and digestibility in non-traditional wheat flakes and muesli. *Food Chemistry*. 174:319-325.
- VAN HINTUM, J. L.; BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C. Y HODGKIN, T. 2003. Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. IPGRI. Boletín Técnico No. 3. p. 44.
- WALLACE, T.C., and M.M. GIUSTI. 2010. Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. *Journal of Food Science* 75: 619-625.
- ZILIC, S., A. SERPEN, G. AKILHOĞLU, V. GÖKMEN, and J. VANČETOVIĆ. 2012. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:1224-1231.