

*Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”
División de Agronomía*



*Determinación de Fenoles y la Actividad Antioxidante de 39
Genotipos de Maíz*

*Por:
Víctor Manuel Hernández López*

*Tesis
Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:
Ingeniero en Agrobiología*

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto de 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DETERMINACIÓN DE FENOLES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE 39
GENOTIPOS DE MAÍZ

POR

VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ LÓPEZ

TESIS

QUE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

APROBADA

EL PRESIDENTE DEL JURADO

DR. FROYLÁN RINCÓN SÁNCHEZ

DRA. NORMA A. RUÍZ TORRES
SINODAL

DR. JUAN DE DIOS FIGUEROA CÁRDENAS
SINODAL

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA
SINODAL

EL COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA

DEDICATORIA

A mis hermanos:

Jesús Hernández López

José Antonio García Hernández

Pablo Hernández de Luna

A mi familia:

Juana Hernández López

Andrés Hernández López

Anita Hernández López

Guadalupe De Luna Juárez

Zenaida Hernández López

Antonio Hernández López

Personas que día a día luchan por mejorar y predicán con el ejemplo.

A una persona muy especial que siempre recordare.

Al pueblo mexicano: por solventar gran parte de mi educación.

A mi ALMA MATER por todo lo que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber otorgado la beca de tesis a través del proyecto de investigación con clave 41264-Z.

Al Dr. Froylán Rincón Sánchez por haber provisto todo lo necesario para la realización de este trabajo, por la gran ayuda prestada en el análisis e interpretación de los datos, en la revisión del trabajo y por darme la confianza en la participación en este proyecto.

A la Dra. Norma A Ruiz Torres, por todo el apoyo otorgado así como la atención prestada en la revisión del trabajo.

Al Dr. Juan de Dios Figueroa, por darme la oportunidad de realizar el trabajo de laboratorio en tan prestigiada institución (CINVESTAV-IPN unidad Querétaro).

Al Dr. Adalberto Benavides por la atención prestada en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña por haberme asesorado durante mi estancia en el laboratorio de toxicología.

A la M.C. Marcela Gaytán y al M.C. Juan Vélez, por su apoyo en la realización del trabajo de laboratorio.

A mis compañeros y amigos de generación Miguel Ángel Pérez Rodríguez, Javier Gutiérrez Díaz, Oscar Medina Ramos y Juan Trinidad Cruz, por todos esos momentos que vivimos juntos.

RESUMEN

México es uno de los países más importantes en el consumo de maíz, con una gran tradición en su cultivo y fuerte arraigo en su consumo, por constituir la base alimentaria de la población. El presente trabajo tuvo como objetivos determinar la cantidad total de compuestos fenólicos y evaluar la actividad antioxidante de genotipos de maíz. Se analizaron 39 muestras de maíz pertenecientes a dos fuentes de germoplasma (6 poblaciones y 33 cruza simples experimentales). La determinación total de fenoles se realizó por el método de vainillina, las antocianinas por el método de Andel-Aal y Huvl y la actividad antioxidante se evaluó por el método de DPPH. Se realizó la comparación entre los dos grupos de materiales genéticos con base en el análisis de varianza y con la información de las 33 cruza simples se realizó un análisis genético. Se encontraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.01$) entre el grupo de materiales genéticos en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y actividad antioxidante. El genotipo 15*53 obtuvo el valor más alto (29.975 Eq. (+) catequina mg g^{-1}) y el genotipo 19*42 el más bajo (4.445 Eq. (+) catequina mg g^{-1}) en el contenido de compuestos fenólicos, ambos pertenecientes a las cruza simples. En el análisis de efectos individuales, la hembra 15 (24.449 Eq. (+) catequina mg g^{-1}) obtuvo los valores más altos y la hembra 19 los más bajos (9.899 Eq. (+) catequina mg g^{-1}), mientras que para la variable antocianinas el genotipo 1313 mostró los mejores resultados (205.39 mg kg^{-1}) y el genotipo 2049 los peores (1.15 mg kg^{-1}), la hembra 13 mostró los mejores resultados (5.036 mg kg^{-1}) y la hembra 15 los peores (2.738 mg kg^{-1}), ambos pertenecientes a las poblaciones. La actividad antioxidante del genotipo 1313 fue mayor con 18.741 de ARA y el genotipo 2049 la menor con 1.640 de ARA, la hembra 13 obtuvo la mayor actividad antioxidante (9.499 de ARA) y la hembra 15 la menor (4.427 de ARA). Con base en los resultados obtenidos se deduce que la cantidad de compuestos fenólicos totales presentes en las muestras de maíz no está relacionada de manera directa con la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas ($r = -0.028$ y $r = 0.071$, respectivamente), mientras que para la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas existe una correlación de $r = 0.612^{**}$. Los compuestos fenólicos, las antocianinas y la actividad antioxidante lograron diferenciar a los materiales genéticos con base en su composición química y características del grano de maíz. En el análisis genético, las líneas

provenientes de la población enana (usadas como hembra) son las que determinan la mayor proporción de la varianza en las cruzas simples.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Generales.....	2
Específicos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. El maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	3
2. Importancia.....	3
3. La semilla del maíz.....	3
3.1. El pericarpio.....	3
3.2. La aleurona.....	4
3.3. El pedicelo.....	4
3.4. El endospermo.....	5
3.5. El germen.	5
4. Composición química y aspectos nutricionales.....	5
4.1. Carbohidratos.....	6
4.1.1. Carbohidratos simples.....	6
4.1.2. Carbohidratos complejos.....	6
4.2. Proteínas.....	6
4.3. Lípidos.....	7
4.4. Vitaminas.....	7
4.5. Minerales.....	7
4.6. Compuestos fenólicos.....	7
5. Los compuestos fenolitos en plantas.....	8
5.1. Estructura química y clasificación.....	9
5.1.1. Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos.....	9
5.1.2. Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles.....	10
5.1.3. Lignanos y neolignanos.....	10
5.1.4. Flavonoides.....	10

5.1.5. Taninos.....	11
6. Compuestos fenólicos encontrados en maíz.....	11
7. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	11
7.1. Métodos utilizados en la cuantificación de compuestos fenolitos.....	12
7.1.1. Técnicas espectrofotométricas.....	12
7.1.1.1. Ensayo de la vainillina.....	12
7.1.1.2. Método de Abdel-Aal y Huel (1999).....	13
8. Compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.....	13
8.1 Métodos para evaluar la actividad antioxidante.....	15
8.1.1 Método del DPPH.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Material genético.....	17
Preparación de las muestras.....	17
Experimento 1. Determinación de compuestos fenólicos.....	19
1.1. Extracción de compuestos fenólicos por el método de metanol.	19
1.1.1. Preparación de muestras.....	19
1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante el ensayo de la vainillina.....	19
1.2.1. Preparación de los reactivos.....	19
1.2.2. Curva de calibración.....	20
1.2.3. Determinación de la absorbancia en genotipos.....	20
1.2.4. Cálculo de compuestos fenólicos.....	21
Experimento 2. Determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH....	22
2.1. Preparación de los reactivos.....	22
2.2. Curva de calibración.....	22
2.3. Preparación de las muestras.....	23
2.4. Cálculo de la actividad antioxidante por DPPH.....	24
Experimento 3. Determinación de antocianinas por el método de Abdel-Aal y Huel	
(1999)	24
3.1. Preparación de los reactivos.....	24
3.2. Preparación de la muestra.....	24

3.3. Calculo de antocianinas totales.....	25
Diseño experimental.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Estructura del grano de maíz según Zazueta <i>et al.</i> (2002).....	4
3.1 Curva de calibración para el ensayo de vainillina, en la cual se realizó una relación entre la concentración de (+) catequina y la absorbancia a 492 nm.....	21
3.2 Curva de calibración para el método de DPPH, en la cual se realizó una relación entre la concentración de Trolox y la absorbancia a 520 nm.....	23
4.1. Relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antirradical.....	34
4.2. Relación entre el contenido de antocianinas y la actividad antirradical.....	35
Figura 4.3. Representación gráfica de la asociación entre las cruza simples, los testigos y los parámetros en estudio (F.EN, compuestos fenólicos, CAOx, capacidad antioxidante y ANTO, el contenido de antocianinas).	36

ÍNDICE DE CUADROS

3.1 Genotipos utilizados en el trabajo de investigación.....	18
4.1 Cuadrados medios y niveles de significancia del análisis de varianza para compuestos fenólicos y actividad antioxidante.....	28
4.2. Comparación de medias por genotipos para las variables evaluadas.....	29
4.3. Cuadrados medios y niveles de significancia del análisis de varianza para compuestos fenolitos y actividad antioxidante.....	31
4.4. Comparación de medias entre hembras (líneas endogámicas) para las variables evaluadas.....	32
4.5. Comparación de medias entre machos (líneas endogámicas) para las variables evaluadas.....	33

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de cereales, vegetales, frutas, flores y legumbres pigmentadas se ha asociado con la contribución a la reducción en la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas como lo son la diabetes, el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la obesidad (Rao *et al.*, 2001).

El maíz es la planta más domesticada del reino vegetal. Ha sido, por mucho, la base de la alimentación de los mexicanos desde las culturas prehispánicas (White y Jonson, 2003). Investigaciones recientes han dado a conocer información convincente de que el pigmento de los diferentes maíces aparte de poder ser utilizado como un pigmento natural, se le han atribuido algunas actividades biológicas, dentro de las que destaca su actividad antioxidante (Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Adom y Liu, 2002). Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1995). Ejemplos de sustratos oxidables son las proteínas, los lípidos, los glúcidos y el ADN (Auroma *et al.*, 1999). Dentro de las sustancias antioxidantes existen varios compuestos, entre los más estudiados están los polifenoles, antocianinas y flavonoides (Rao *et al.*, 2001). Propiedades y capacidades que se han demostrado mediante el uso de varios ensayos, entre los que está el ensayo del 2,2-difenil 1-picril hidrazilo (DPPH), el cual presenta la ventaja de ser un ensayo a corto plazo, que permite evaluar la actividad antioxidante de extractos con potencial biológico (Brand-Williams *et al.*, 1995).

La importancia de este estudio radica en que a pesar de que el maíz es parte importante de la dieta del mexicano, existe poca información científica respecto a su uso como una fuente natural de antioxidantes. Por lo que un análisis adecuado de los compuestos fenólicos del maíz, puede ayudar a determinar la capacidad antioxidante del grano y su potencial uso en la industria como un alimento funcional.

Objetivos

Generales

- Determinar los compuestos fenólicos totales y evaluar de la actividad antioxidante de 39 genotipos de maíz (*Zea mays* L.).

Específicos

- Determinar la cantidad total de compuestos fenólicos por el método de vainillina.
- Determinar la cantidad total de antocianinas por el método citado por Abdel-Aal y Hucl (1999).
- Evaluar la actividad antioxidante mediante el método 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. El maíz (*Zea mays* L.)

La planta domesticada del género *Zea*, pertenece a la familia *Gramineae*, de la subfamilia *Andropogonaceae*, tribu maidea, identificada como *Zea mays* L., es mejor conocida como maíz. Su nombre significa “lo que proporciona la vida” y es originario de Las Antillas (Reyes, 1990; White y Jonson, 2003).

2. Importancia

Su importancia se realza en América ya que a este continente se le atribuye el origen central del maíz (Mangelsdorf y Lister, 1956; White y Jonson, 2003). El maíz ha formado parte importante en la vida política, cultural, social y religiosa de los pueblos mesoamericanos. En la actualidad el maíz sigue formando parte importante para muchos países en sus hábitos alimentarios, en la economía o como forraje; es por esto que ha sido objeto de estudio a escala global. El maíz ocupa el tercer lugar como cereal de producción e importancia, ya que el primero y segundo lugar los ocupan el arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.), respectivamente. Los países productores de esta gramínea son Estados Unidos de Norteamérica, China y Brasil (Taba *et al.*, 2004). En el año 2006 en México la producción fue de 21,816,400 toneladas (INEGI, 2007).

3. La semilla del maíz

La semilla está compuesta principalmente de cinco partes anatómicas como se puede observar en la Figura 2.1 que son: el pericarpio, la aleurona, el pedicelo, el endospermo y el germen (Zazueta *et al.*, 2002).

3.1. El pericarpio

Es la verdadera cubierta o cáscara del grano, compuesta por todas las capas exteriores del grano. El pericarpio está compuesto por una capa de cutícula cerosa que cubre a la epidermis; ambas retar dan la absorción de humedad al interior del grano (White, 2003).

El mesocarpio compuesto por células alargadas y estrechamente adheridas con numerosas cavidades que proveen interconexiones capilares entre todas las células facilitando la absorción de agua. La porción más interna del pericarpio está compuesta por células cilíndricas unidas estrechamente a la capa aleurona (capa celular que rodea completamente al grano y cubre tanto al endospermo como al germen). El pericarpio constituye aproximadamente el 5-6 % en peso seco del grano (White, 2003).

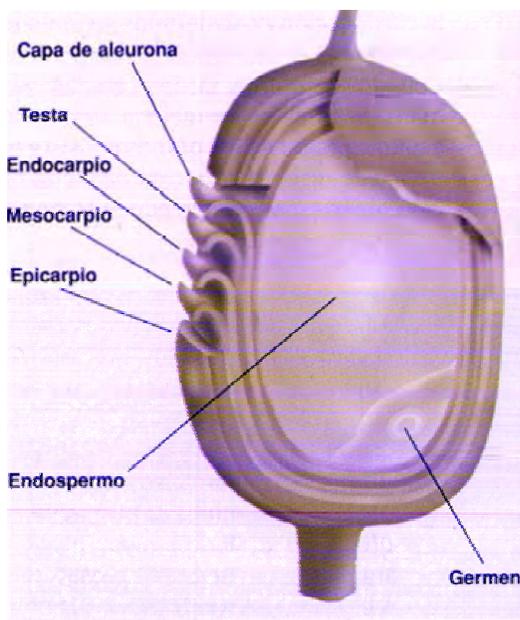


Figura 2.1 Estructura del grano de maíz según Zazueta *et al.* (2002).

3.2. La aleurona

Está compuesta por una capa simple de células de pared celular finas que se encuentra rodeando al endospermo y al germen. Algunas veces es más delgada en la región entre el germen y el endospermo que en el resto de la semilla. Las células de aleuronas son ricas en cuerpos proteicos discretos y lípidos; representa el 2.2 % en peso seco del grano (White, 2003). Otros autores han reportado que en la capa de aleurona se encuentra la mayor concentración de antocianinas en los maíces pigmentados (Straus, 1960; Hernández-X y Alanís-Flores, 1970).

3.3. El pedicelo

Representa aproximadamente el 0.8 % del grano y es la estructura celular con la que el

grano se encuentra unida al olote. Está compuesto de haces vasculares que terminan en la porción basal del pericarpio; consta de una capa exterior de abscisión que sella la punta del grano maduro; a esta capa le sigue una serie de células parenquimatosas en forma de estrellas, ligadas por sus puntas, formando una estructura frágil y porosa, conectadas con la capa de células cruzadas del pericarpio. Esta estructura es responsable de la absorción de líquidos del pedicelo al pericarpio (Watson, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

3.4. El endospermo

Está compuesto por células alargadas con paredes delgadas de material celulósico, empacadas con gránulos de almidón (de 5 a 30 μm) sumergidos en una matriz proteica continua (almidón-proteína). La unión e integridad estructural entre la proteína y los gránulos de almidón hace completamente duro al grano de maíz. El endospermo está compuesto de dos regiones: una harinosa y otra córnea, generalmente en una relación de 2 a 1. La región harinosa del endospermo se caracteriza por células grandes, por gránulos grandes y redondos con una matriz proteica delgada. El endospermo corneo tiene pequeñas células, pequeños gránulos de almidón y una densa matriz proteica. El endospermo constituye aproximadamente el 82-84 % del grano en peso seco (White, 2003).

3.5. El germen.

Es el embrión u órgano reproductor del grano y está compuesto por plúmula, radícula y escutelo. El escutelo constituye el 90 % del germen y funciona como un almacén de nutrientes, enzimas y hormonas que son movilizadas durante la germinación hacia la plúmula; aquí se almacenan del 81-85 % total del aceite del grano (White, 2003).

4. Composición química y aspectos nutricionales

Los principales componentes químicos del maíz son carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, fibra cruda y otras sustancias orgánicas libres de nitrógeno. Esta composición química del maíz varía de acuerdo a las condiciones climatológicas, a la variedad y dentro de las distintas zonas del mismo grano su composición varía de un lugar a otro (Zazueta *et al.*, 2002).

4.1. Carbohidratos

Al igual que todos los cereales, el maíz es una fuente importante de carbohidratos. Éstos químicos se dividen en simples y complejos.

4.1.1. Carbohidratos simples

Los azúcares constituyen aproximadamente el 2 % del peso total del grano; cerca del 65 % de éstos se encuentran en el germen y el 69 % de los carbohidratos del germen son almidón (Jackson y Shandera, 1995). Además, contienen monosacáridos (D-fructosa y D-glucosa) libres, disacáridos como sacarosa y maltosa, trisacáridos como rafinosa y oligosacáridos (Boyer y Shannon, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

4.1.2. Carbohidratos complejos

Generalmente representan un poco más del 71.5 % del peso total del grano. Los polisacáridos de mayor importancia en el maíz son los estructurales y los de reserva. Los carbohidratos estructurales son aquellos componentes que forman parte de la estructura de las paredes celulares del grano. Éstos carbohidratos son sustancias pécticas, hemicelulosa, celulosa y lignina (Boyer y Shannon, 1987; Jackson y Shandera, 1995). Los carbohidratos de reserva (almidón) son polisacáridos de almacenamiento energético de gran importancia en el maíz. Se encuentran principalmente en el endospermo (86 a 89 %) y, en menor cantidad, en el germen, pericarpio y pedicelo. Los gránulos de almidón contienen aproximadamente un 73 % de amilopectina y un 27 % de amilosa (Boyer y Shannon, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

4.2. Proteínas

Las proteínas representan aproximadamente el 10.3 % del grano integral, encontrándose principalmente en el endospermo (18.8 %) y el germen (9.4 %) (Jackson y Shandera, 1995). La distribución de las proteínas en el maíz es de 8 % albúminas (proteínas solubles en agua), 9 % de globulinas (solubles en soluciones salinas), 40 % de glutelinas (solubles en hidróxido de sodio) y 39 % de prolaminas (zeína) (Paredes-López y Saharópulos-Paredes, 1983).

El maíz, como todos los cereales, es deficiente en los aminoácidos esenciales lisina y

triptófano. Sin embargo, tanto las albúminas, cómo las globulinas y las glutelinas del maíz contienen un apropiado balance de aminoácidos esenciales y presentan un alto contenido del aminoácido esencial leucina (Wright, 1987).

Algunas variedades de maíces modificados o híbridos (opaco 2, QPM) presentan un aumento considerable del valor de la lisina y triptófano con respecto al maíz normal (Paredes-López y Saharópulos-Paredes, 1983).

4.3. Lípidos

Constituyen aproximadamente el 4.8 % del peso total del grano. Se encuentran en mayor proporción en el germen, aproximadamente el 84 % de los lípidos del grano y el 16 % restante se encuentra en el endospermo. Casi todos los lípidos del maíz son triacilglicéridos libres y los principales ácidos grasos que los componen son el linoléico con 50 %, el oléico con 35 %, palmítico 13 %, esteárico menos del 4 % y linolénico menos del 3 % (Weber, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

4.4. Vitaminas

El maíz contiene principalmente dos vitaminas liposolubles. La vitamina A (caroteno) con un contenido promedio de 2.5 mg/kg y la vitamina E con 36 mg/kg, con deficiencias en niacina y vitaminas del complejo B (Watson, 1987).

4.5. Minerales

La mayor parte de los minerales del maíz se encuentran en el germen. El más abundante es el fósforo que representa el 0.08 % del grano integral. Otros elementos inorgánicos que constituyen al grano son el potasio y el azufre, que se encuentran en forma orgánica cómo componentes de los aminoácidos azufrados (Watson, 1987).

4.6. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Se les ha encontrado principalmente

en el pericarpio, aleurona, endospermo y embrión, (Nakatani *et al.*, 1979; Ortega y González, 1989; Fossen *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2002; Jing y Giusti, 2005).

5. Los compuestos fenólicos en plantas

Los compuestos fenólicos considerados como metabolitos secundarios, constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en plantas que son parte importante de la dieta humana y animal (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales (Shahidi y Naczk, 1995). La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Dai *et al.*, 2005).

Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa (Butler, 1992).

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, tanto frescos como procesados (Clifford, 1992). Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, a través de las antocianidinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos (Shahidi y Naczk, 1995; Belitz y Grosch, 1988). Además, la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos hacia la formación de quinonas, catalizada por las enzimas polifenol oxidasas, produce un pardeamiento enzimático en los alimentos, fenómeno de vital importancia para asegurar la calidad de frutas y verduras durante el procesado (Shahidi y Naczk, 1995). Igualmente los compuestos fenólicos, y en concreto los taninos condensados o proantocianidinas se asocian con la astringencia que presentan muchas de las frutas comestibles antes de la maduración (Shahidi and Naczk, 1995).

En la actualidad este grupo de compuestos fitoquímicos presenta un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas

principalmente a la actividad antioxidante, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos (Rao *et al.*, 2001).

5.1. Estructura química y clasificación

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxido incluyendo derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, entre otros (Tsimidou, 1998). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. La forma más común de encontrarlos en la naturaleza es como glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Shahidi y Naczk, 1995).

Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

Según Harbome (1989) los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional:

5.1.1. Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos

Dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico y *p*-hidroxibenzoico, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenil acéticos en los vegetales (Belitz y Grosch, 1988).

5.1.2. Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (cafeíco, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hayan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeíco se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Belitz y Grosch, 1988). Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido (Bravo, 1998), mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio (Belitz y Grosch, 1988).

5.1.3. Lignanós y neolignanós

Son metabolitos de las plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de p-hidroxi fenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano (Harbome, 1989).

5.1.4. Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos (Shahidi y Naczki, 1995), siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandiól y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (p.e. apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (p.e. quercitina, mirecitina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales (Hertog *et al.*, 1993).

5.1.5. Taninos

Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifenico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos dan glucosa y ácido gálico (Chung *et al.*, 1998).

6. Compuestos fenólicos encontrados en maíz

En recientes estudios se ha reportado la presencia de (+) catequina, ácido ferúlico libre y esterificado, ácido *p*-cimarico, ácido galico (Pozo-Insfran *et al.*, 2006), antocianinas no aciladas como la pelargonidina-3-glucósido, y la peonidina-3-glucósido (Styles y Ceska, 1972; Fossen *et al.*, 2001; Jing y Giusti, 2005; Salinas *et al.*, 2005); antocianinas aciladas entre las cuales se puede citar: la cianidina-3-malonilglucósido y la cianidina-3-dimalonilglucósido (Fossen *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2005).

7. Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos de la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Pero hasta a hora ningún método desarrollado es cien por ciento confiable para la cuantificación de todos los compuestos fenólicos y que además puede ser aplicada a la amplia gama de productos alimentarios existentes. Estos análisis se pueden clasificar como los que determinan el contenido total de los fenoles o aquellos que cuantifican un grupo o una clase específico de compuestos fenólicos (Deshpande y Chervan, 1987; Jackman *et al.*, 1987; Makkar, 1989).

7.1. Métodos utilizados en la cuantificación de compuestos fenólicos

De manera general se pueden clasificar en tres categorías: Técnicas espectrofotométricas las cuales han sido desarrolladas para la determinación del contenido de compuestos fenólicos en materiales vegetales (Naczki *et al.*, 1992); ensayos ultravioletas basado en que cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta y por último técnicas cromatográficas que han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos (Jackman *et al.*, 1987; Karchesy *et al.*, 1989) así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos (Oh *et al.*, 1985).

7.1.1. Técnicas espectrofotométricas

Numerosos métodos espectrofotométricos han sido desarrollados para la determinación del contenido de compuestos fenólicos en materiales vegetales. Estos métodos pueden cuantificar todos los compuestos fenólicos extraíbles como grupo o pueden determinar una sustancia fenólica específica como la sinapina o el ácido sinápico (Naczki *et al.*, 1992) o una clase determinada de compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos (Price *et al.*, 1978; Brune *et al.*, 1991). Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrocalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos metahidroxilo libres en el anillo B (Swain and Hills, 1959; Price *et al.*, 1978; Goldstein y Swain, 1963; Gupta y Haslam, 1980) y los ensayos de Folin-Denis y Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales en alimentos vegetales y en bebidas (Brune *et al.*, 1991; Hoff y Singleton, 1977; Singleton *et al.*, 1985).

7.1.1.1. Ensayo de la vainillina

El método de la vainillina es ampliamente utilizado para la cuantificación de los proantocianidinas (taninos condensados) en frutas (Goldstein y Swain, 1963) y detección de taninos en sorgo (Prince *et al.*, 1978), el frijol y legumbres (Deshpande y Cheryan, 1985; Mejía *et al.*, 2003).

La prueba de la vainillina es específica flavan-3-ol, dihidrocalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos metahidroxilares en el anillo B (Swain and Hills, 1959; Price *et al.*, 1978; Goldstein and Swain, 1963; Gupta and Haslam, 1980). La (+) catequina es un monomero flavan-3-ol que se usa frecuentemente como estándar en análisis de la vainillina (Price *et al.*, 1978). El metanol es un solvente generalmente usado para la prueba de la vainillina. El análisis de la vainillina se reconoce generalmente como método útil para la detección y la cuantificación de taninos condensados en los materiales de planta debido a su sensibilidad, especificidad, y simplicidad (Deshpande y Cheryan, 1987).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con los proantocianidinas en soluciones ácidas. La vainillina reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 o 8. El producto intermedio de esta reacción deshidrata fácilmente para pasar de un rosa claro al producto de color rojo oscuro. El ensayo de la vainillina se debe de realizar en la oscuridad y bajo una temperatura controlada y obtener así resultados exactos y repetibles (Gupta y Haslam, 1980).

7.1.1.2. Método de Abdel-Aal y Huel (1999)

Es método simple y rápido para determinación de antocianinas totales; y se ha utilizado en cultivos como el frijol (Aparicio- Fernández *et al.*, 2004), maíz (Veles, 2004; Agama-Acevedo *et al.*, 2004), trigo y otros cereales.

8. Compuestos fenólicos y su actividad antioxidante

La capacidad antioxidante descrita para distintos polifenoles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial (Wang *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1995).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional (Berra *et al.*, 1995). Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de

aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, así como en procesos de envejecimiento por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos "*in vivo*" e "*in vitro*" (Tsimidou, 1998).

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido a estudios que les atribuyen efectos carcinógenos (Ito *et al.*, 1983; Velioglu *et al.*, 1998).

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación "*in vitro*". Los compuestos fenólicos actúan como prooxidantes quelando metales, bien de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker, 1997).

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas. La primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, enlentecer o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores. Entre los compuestos fenólicos con una reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente hidroxicinámico, hidroxibenzóico, caféico, clorogénico), taninos (elligataninos), calconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (Pratt, 1992; Pratt y Hudson, 1990).

Para comprender mejor la actividad fisiológica de estos compuestos se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante varía en función del grupo de compuestos estudiados y de su solubilidad en fase acuosa o lipídica. Asimismo, la gran diversidad de métodos

empleados proporcionan resultados numéricos distintos difíciles de comparar (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

8.1 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Robards *et al.*, 1999). Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Arena *et al.*, 2001; Moyer *et al.*, 2002).

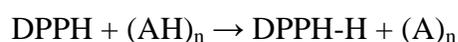
La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Robards *et al.*, 1999; Satue-Gracia *et al.*, 1997).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH (Arnao, 2000; Prior *et al.*, 1998). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias.

8.1.1 Método del DPPH

El análisis de la actividad antioxidante usando al DPPH, se ha utilizado en pulpas de frutos comerciales congelados (Kuskoski *et al.*, 2005), salvado de trigo (Yu *et al.*, 2003; Iqbal *et al.*, 2007), extractos metanólicos de plantas de la familia Euphorbiacea (Kumaran y Karunakaran, 2007), cutícula de frijol (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005), uvas (Lohachooopo *et al.*, 2004; Nakajica *et al.*, 2004), lechuga (Liu *et al.*, 2007), te negro y rojo (Lee *et al.*, 2003).

La actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil 1-picril hidrazilo (DPPH) en una solución metanólica fue evaluada por Brand-Williams *et al.*, (1995). La reducción del DPPH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y al sufrir una reducción por parte de un antioxidante, la adsorción desaparece. La desaparición del DPPH proporciona una medida que estima la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales libres. El modelo que explica esta actividad en un compuesto se ejemplifica con la ecuación siguiente:



Donde:

AH= Es un antioxidante que dona átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con una estructura molecular más estable, deteniendo así la reacción en cadena.

A= Es el nuevo radical libre formado, que puede interactuar con otro radical formando más moléculas estables como DPPH-A, A-A.

n= Se relaciona con la presencia de dos antioxidantes o grupos de antioxidantes difiriendo en su velocidad para atrapar radicales libres ya sea rápida o lenta.

Con esto se podría explicar que en condiciones experimentales la cinética de desaparición de DPPH se comporta como una ecuación de segundo orden (Bondet *et al.*, 1997; Espín *et al.*, 2000):

$$\text{DPPH} = \text{DPPH}_0 e^{-kt}$$

Donde:

DPPH= Concentración del radical libre a cualquier tiempo.

DPPH₀= Concentración del radical libre a tiempo cero.

K= Constante cinética de reacción de segundo orden dependiente de la concentración de antioxidante

t= Tiempo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Toxicología, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro y en el laboratorio de Análisis de los Materiales del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Querétaro.

Material genético

Los genotipos de maíz (*Zea mays* L.) utilizados para llevar a cabo el trabajo de investigación (Cuadro 1), fueron generados a través de la cruce de líneas endogámicas (♀) derivadas de una población enana, por líneas QPM (♂), como parte del proyecto de investigación “Estudio de los componentes genéticos y fisiológicos asociados con caracteres de calidad en cinco grupos heteróticos de maíz” apoyado por CONACyT con la clave 41264-Z. Las líneas de la población enana (Identificada con los números 11, 13, 15, 16, 17, 18 y 19) fueron proporcionadas por el programa de bajío del Instituto Mexicano del Maíz (UAAAN), y las líneas QPM (Identificada con los números 41, 42, 52, 53 y 56) fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

De los materiales genéticos utilizados, 33 corresponden a las cruces entre líneas endogámicas y seis testigos (Cuadro 3.1), dando un total de 39 genotipos estudiados.

Preparación de las muestras

Las muestras de maíz fueron molidas y posteriormente cribadas en una malla de 0.5 mm con la finalidad de homogenizarlas. La harina obtenida fue depositada en bolsas de papel celofán con su respectiva identificación.

Cuadro 3.1 Genotipos utilizados en el trabajo de investigación.

Materiales genéticos	Color	Origen	Año
<u>Cruzas simples</u>			
11*41	Blanco	Tepalcingo	2005
11*42	Blanco	Tepalcingo	2005
11*52	Blanco	Tepalcingo	2005
11*53	Blanco	Tepalcingo	2005
11*56	Blanco	Tepalcingo	2005
13*41	Blanco	Tepalcingo	2005
13*52	Blanco	Tepalcingo	2005
13*53	Blanco	Tepalcingo	2005
13*56	Blanco	Tepalcingo	2005
15*41	Blanco	Tepalcingo	2006
15*42	Blanco	Tepalcingo	2006
15*52	Blanco	Tepalcingo	2006
15*53	Blanco	Tepalcingo	2006
15*56	Blanco	Tepalcingo	2006
16*41	Blanco	Tepalcingo	2005
16*42	Blanco	Tepalcingo	2005
16*52	Blanco	Tepalcingo	2005
16*53	Blanco	Tepalcingo	2005
17*41	Blanco	Tepalcingo	2005
17*42	Blanco	Tepalcingo	2005
17*52	Blanco	Tepalcingo	2005
17*53	Blanco	Tepalcingo	2005
17*56	Blanco	Tepalcingo	2005
18*41	Blanco	Tepalcingo	2005
18*42	Blanco	Tepalcingo	2005
18*52	Blanco	Tepalcingo	2005
18*53	Blanco	Tepalcingo	2005
18*56	Blanco	Tepalcingo	2005
19*41	Blanco	Tepalcingo	2005
19*42	Blanco	Tepalcingo	2005
19*52	Blanco	Tepalcingo	2005
19*53	Blanco	Tepalcingo	2005
19*56	Blanco	Tepalcingo	2005
<u>Testigos</u>			
1313 (Población azul)	Azul	Tepalcingo	2005
2045 (CAFIME)	Blanco	Tepalcingo	2005
2046 (Población tropical)	Blanco	Tepalcingo	2005
2047 (CML287)	Amarillo	Tepalcingo	2005
2048 (6221)	Blanco	Tepalcingo	2005
2049 (6222)	Blanco	Tepalcingo	2005

Experimento 1. Determinación de compuestos fenólicos

1.1. Extracción de compuestos fenólicos por el método de metanol.

El protocolo empleado para la extracción de los compuestos fenólicos fue el descrito por Cardador-Martínez *et al.* (2002).

1.1.1. Preparación de muestras

Se pesaron 0.2 g de harina de maíz y se depositaron en un matraz Erlenmeyer, al cual se le añadieron 10 mL de metanol (100 %). El matraz fue cubierto con papel aluminio, tapado, sellado con papel parafilm y agitado por 24 horas; posteriormente la muestra fue centrifugada a una velocidad de 4500 rpm, a una temperatura de 4 °C, por un tiempo de 10 min y decantada cuidadosamente.

La muestra fue depositada en un tubo de plástico previamente cubierto con papel aluminio, tapada, sellada con papel parafilm y almacenada en un congelador hasta su utilización.

1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante el ensayo de la vainillina.

Los compuestos fenólicos fueron expresados como equivalentes de (+) catequina (mg g^{-1}) y cuantificados según lo descrito por Deshpande y Cheryan (1987).

1.2.1. Preparación de los reactivos

Solución de (+) catequina.

Se pesaron 0.008, 0.006, 0.004, 0.002 y 0.001 g de (+) catequina, cada uno de los cuales se aforó a 10 mL con metanol (100 %).

Solución de vainillina (1 %).

Se peso 1 g de vainillina y se aforó a 100 mL con metanol (100 %), se cubrió de la luz y se almacenó en el congelador.

Ácido clorhídrico al 8 y 4 %.

Se tomaron 21.5 de ácido clorhídrico al 37.25 % y se aforó a 100 mL con metanol (100 %) para obtener la concentración de 8 %. Para la concentración de 4 % se tomaron 10.7 mL y se aforó a 100 mL con metanol (100 %).

Solución (1:1) de vainillina al 1 %: HCl al 8 %

Se tomaron 10 mL de cada una de las soluciones mencionadas y se mezclaron. La solución se preparó en el momento de utilizarla y en la oscuridad ya que se degrada con facilidad.

1.2.2. Curva de calibración

En una placa de 96 pozos se colocaron 0.05 ml de cada una de las concentraciones de (+) catequina y se le añadieron 0.2 mL de la solución 1:1 de vainillina al 1 % y HCl al 8 %. Se utilizó como blanco 0.05 mL de metanol al 100 % mas 0.2 mL de HCl al 4 %. Cada una de las concentraciones se realizó por triplicado, al igual que el blanco. Por último, la placa se leyó a una absorbancia de 492 nm en un espectrofotómetro (Termo Electrón Corporation, Multiskan, Lab-Tech Instrumentación, S.A. de C.V.). Del resultado de la curva de calibración se determinó la relación cuadrada (R^2) que fue de 0.999 y la ecuación de la recta (Figura 3.1), lo que indica que la determinación de la curva de calibración fue realizada de manera adecuada.

1.2.3. Determinación de la absorbancia en genotipos.

En una placa de 96 pozos se colocaron 0.05 mL de extracto metanólico de cada uno de los genotipos y se le añadieron 0.2 mL de la solución 1:1 de HCl al 8 % y vainillina al 1 %. Cada una de los extractos se realizó por triplicado y por último la placa se leyó a una absorbancia de 492 nm en un espectrofotómetro (Termo Electrón Corporation, Multiskan, Lab-Tech Instrumentación, S.A. de C.V.).

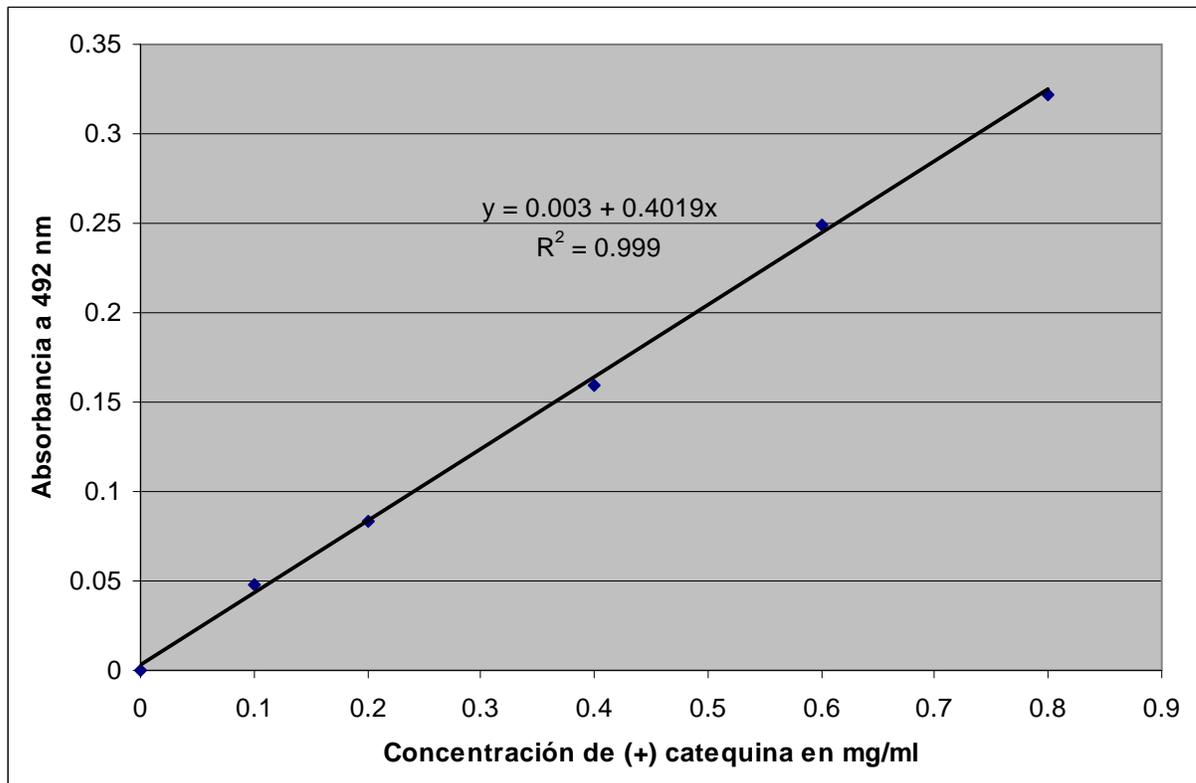


Figura 3.1 Curva de calibración para el ensayo de vainillina, en la cual se realizó una relación entre la concentración de (+) catequina y la absorbancia a 492 nm.

1.2.4. Cálculo de compuestos fenólicos

La absorbancia obtenida se sustituyó en la ecuación de la recta que surgió en la curva de calibración la cual fue despejada previamente:

$$X = \frac{(y - 0.003)}{0.4019}$$

Donde:

X= Concentración de equivalentes de (+) Catequina (mg g^{-1}).

Y= Absorbancia de la muestra a 492 nm.

0.003 y 0.4019 son las constantes obtenidas en la ecuación de la recta y corresponde al intercepto (b_0) y la pendiente (b_1) de regresión.

Experimento 2. Determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH.

El método original de Brand-Williams *et al.* (1995) modificado por Fukumoto y Mazza (2000) fue adaptado para su uso en microplaca.

Para el desarrollo del experimento 2, se utilizaron los extractos metanólicos obtenidos del experimento 1 a través del método de Cardador-Martínez *et al.* (2002).

2.1. Preparación de los reactivos

Solución de Trolox.

Se pesaron 0.01000, 0.00875, 0.00750, 0.00625, 0.00500, 0.00375, 0.00250, 0.00125 g de Trolox y se aforaron cada uno a 10 mL con metanol (100 %), para obtener concentraciones de 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 μM , respectivamente. Las soluciones se almacenaron en recipientes protegidos de la luz y en un congelador.

Solución de DPPH 150 (μM)

En un matraz de aforación completamente cubierto con papel aluminio se depositaron 0.0015 g de DPPH y se agregaron 20 mL de metanol (100 %) más 5 mL de agua destilada y se sonicó durante 5 minutos. Esta solución se preparó en el momento de utilizarla.

Solución de BHT 1000 μM

Se pesaron 0.0022 g de BHT y se aforó a 10 mL con metanol al (100 %), para obtener la concentración de 1000 μM .

2.2. Curva de calibración

En una placa de 96 pozos, se añadieron 0.02 mL de cada una de las concentraciones obtenidas de Trolox o de metanol, el cual funciona como control y 0.2 mL de solución de DPPH (150 μM). Cada una de las concentraciones de Trolox así como el metanol (100 %) se realizó por triplicado. La placa se leyó cada 10 min de 0 a 90 min a 520 nm en un espectrofotómetro (Termo Electrón Corporation, Multiskan, Lab-Tech Instrumentación, S.A. de C.V.). La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre

lecturas. De los resultados obtenidos se determinó la relación cuadrada (R^2) la cual fue de 0.9846 como observa en la Figura 3.2, lo que indica que el experimento se condujo de manera adecuada.

2.3. Preparación de las muestras

En una placa de 96 pozos, se añadieron 0.02 mL de extracto metanólico ó BHT (1000 μM) y 0.2 ml de solución de DPPH (150 μM). Los extractos y estándares se prepararon por triplicado. La placa se leyó cada 10 min de 0 a 90 min a 520 nm en un espectrofotómetro (Termo Electrón Corporation, Multiskan, Lab-Tech Instrumentación, S.A. de C.V.). La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre lecturas. Cabe mencionar que la curva de calibración y los extractos se realizan en la misma placa.

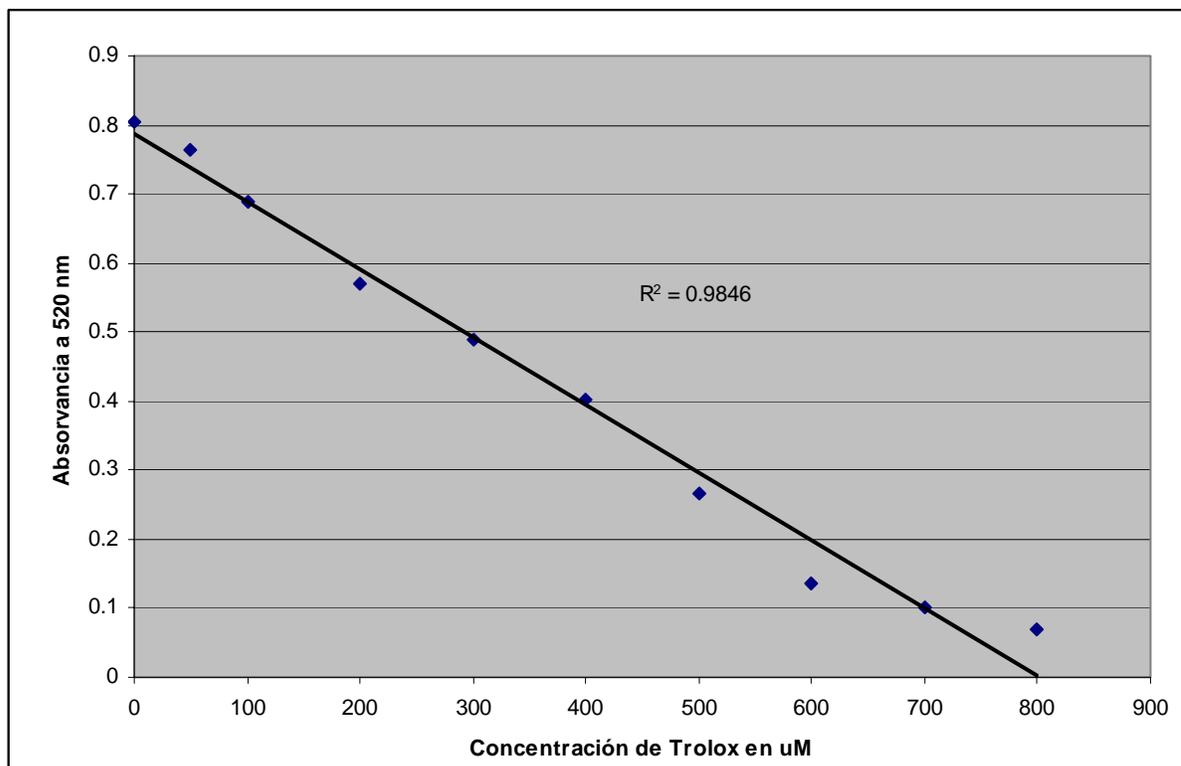


Figura 3.2 Curva de calibración para el método de DPPH, en la cual se realizó una relación entre la concentración de Trolox y la absorbancia a 520 nm.

2.4. Cálculo de la actividad antioxidante por DPPH

La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda y Oleszek, 2001):

$$ARA = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

Donde:

ARA= Actividad antirradical.

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra a 520 nm.

A_{control} = Absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

Experimento 3. Determinación de antocianinas por el método de Abdel-Aal y Hucl (1999).

El protocolo realizado para la extracción y cuantificación de antocianinas fue el recomendado por Abdel-Aal y Hucl (1999).

3.1. Preparación de los reactivos

Etanol acidificado

Se tomaron 85 mL de etanol al 95 % y se agregaron 15 mL de HCl 1.0 N.

Acido clorhídrico diluido

Se tomaron 50 mL de HCl 1.0 N y se adicionaron 50 mL de agua destilada.

3.2. Preparación de la muestra

La determinación de antocianinas totales se realizó en las harinas, siguiendo el método recomendado por Abdel-Aal y Hucl (1999). En un vaso de precipitado de 50 mL se colocaron 0.5 g de harina y se adicionaron 4 mL de etanol acidificado, se mezcló fuertemente, en forma manual, durante 2 min y se ajustó el pH a 1.0 con HCl diluido. Posteriormente se agitó durante 30 min con un agitador magnético y se reajustó el pH, cuando fue necesario, hasta completar el tiempo de agitación. El material obtenido fue centrifugado a 4500 rpm durante un tiempo de 45 min a temperatura ambiente y decantado. El sobrenadante se ajustó a 10 mL con un matraz volumétrico, usando etanol acidificado, se

realizó la lectura de la absorbancia en un Espectrofotómetro (GBS UV-Visible, Cintra 20, GBS Scientific Equipment Pty Ltd., Australia. Software: Spectral 1.50 release 2.0) a 535 nm y se usó etanol acidificado como blanco.

3.3. Calculo de antocianinas totales

El valor de absorbancia obtenido a 535 nm se sustituyó en la fórmula:

$$C = A \times 288.21 \text{ mg/kg}$$

Donde:

A= Absorbancia de la muestra a 535 nm.

C= Concentración total de antocianinas (mg kg^{-1}).

Diseño experimental

Para la prueba de fenoles totales y actividad antioxidante, se realizaron 2 repeticiones, y se utilizó un diseño completamente al azar cuyo modelo lineal fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, \dots, t$; $i =$ tratamientos

Donde:

y_{ij} = Respuesta en la i -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general.

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} = Error experimental.

Se realizó la comparación de medias a través de la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos obtenidos en cada una de las vari

ables evaluadas se analizaron con el Paquete Estadístico SAS versión 9.1.3.

A partir de la 33 cruas evaluadas, se realizó un análisis genético con el propósito de analizar por separado los efectos de las líneas enanas (♀), QPM (♂), así como la interacción hembra x macho. En las pruebas de hipótesis se consideró que las líneas representan una muestra aleatoria de las dos poblaciones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 4.1 se presentan los cuadrados medios de análisis de varianza para las variables compuestos fenólicos y actividad antioxidante, en ambas se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre genotipos. La descomposición de la suma de cuadrados de los genotipos en cruzas, testigos y la comparación cruza vs testigos permite efectuar las pruebas de hipótesis en fracciones. En todos los casos la diferencia estadística entre los genotipos fue similar ($P \leq 0.01$) a los niveles de la partición correspondiente (cruzas, testigos y cruza vs testigos), excepto en la comparación entre las cruza y testigos para la capacidad antioxidante (Cuadro 1). Lo anterior indica que existe diferencia entre los materiales (cruza y testigos), así como entre los dos grupos de materiales.

La comparación de medias para las variables evaluadas en este estudio, se presentan en el Cuadro 4.2. En la variable compuestos fenólicos se presenta un rango de variación de 8.445 a 29.975 Eq. (+) catequina mg g^{-1} , en las cruza 19*42 y 15*53, respectivamente. Sin embargo, para los testigos el rango de variación se redujo de 10.595 a 20.065 Eq. (+) catequina mg g^{-1} . El genotipo 15*53 y 15*42 mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos con 29.975 y 29.325 Eq. (+) catequina mg g^{-1} , respectivamente, mientras que los genotipos 19*41 y 19*42 mostraron la menor cantidad de compuestos fenólicos con 8.635 y 8.445 Eq. (+) catequina mg g^{-1} (Cuadro 4.2). Tanto en las cruza simples como en el grupo de testigos, el rango de variación es considerable, lo que permite mediante este parámetro lograr discriminar los materiales genéticos.

Adom y Liu (2002) cuantificaron los compuestos fenólicos de varios granos, entre los cuales se destaca al maíz, que obtuvo el valor más alto con 15.55 μM equivalentes de ácido gálico por gramo de grano. Además, mencionan que el compuesto más abundante encontrado, fue el ácido felúrico en tres formas: libre (0.1 %), soluble conjugado (1.0 %) y ligado (98.9 %).

Pozo-Insfran *et al.* (2006) al analizar harinas de tres genotipos de maíz (blanco, azul mexicano y azul americano), encontraron que el genotipo blanco contenía la mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguido por el genotipo azul americano y por último el genotipo azul mexicano, los valores obtenidos fueron: 4899, 451 y 1310 mg de compuestos fenólicos por kilogramo de grano. Estos resultados difieren debido a diversos factores; entre los que se pueden mencionar las condiciones ambientales, estacionales y geográficas en donde se desarrollaron los genotipos así como las características genéticas propias de los materiales utilizados (Adom y Liu, 2002; Kroon y Williamson, 1999; Emmons y Peterson, 1999).

En el presente trabajo las cruzas 15*42, 15*53 y ocho cruzas adicionales de color blanco presentan mayor contenido de compuestos fenólicos comparado con los valores de la población azul (1313) con 19.445 Eq. (+) catequina mg g⁻¹.

Pozo-Insfran *et al.* (2006) encontraron que el compuesto mas abundante en el genotipo blanco es el ácido felúrico, mientras que para los genotipos azules es el ácido *p*-cúmarico.

Cuadro 4.1 Cuadrados medios y niveles de significancia del análisis de varianza para compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

F.V.	G.L.	Compuestos Fenólicos (Eq. Cat. mg g ⁻¹)	Actividad antioxidante (ARA)
Genotipos	38	58.284 **	20.317 **
Cruzas (C)	32	42.449 **	9.082 **
Testigos (T)	5	35.415 **	96.011 **
C vs T	<u>1</u>	39.363 **	1.356 NS
Error	39	0.514	1.764
C.V. (%)		4.260	18.267

** = Significativo al nivel de 0.01 de probabilidad, G.L. = Grados de libertad; C.V. = Coeficiente de variación.

Cuadro 4.2. Comparación de medias por genotipos para las variables evaluadas.

Genotipo	Compuestos Fenólicos (Eq. Cat. mg g ⁻¹)	Actividad antioxidante (ARA)	Antocianinas (mg kg ⁻¹)		
11*41	11.300	nopqr	7.631	bcdef	4.640
11*42	12.460	nop	5.403	cdefgh	4.290
11*52	17.390	ijk	7.037	bcdefgh	3.850
11*53	16.805	ijkl	5.671	cdefgh	4.710
11*56	16.105	Klm	6.674	cdefgh	3.350
13*41	13.940	lmn	9.112	bcde	5.120
13*52	11.045	nopqr	9.382	bc	5.540
13*53	10.245	opqr	9.899	bc	4.980
13*56	13.210	mno	9.601	bc	4.510
15*41	18.220	ghijkl	3.572	efgh	2.260
15*42	29.325	a	4.961	cdefgh	2.150
15*52	21.460	bcdef	4.833	cdefgh	2.680
15*53	29.975	a	3.683	defgh	3.010
15*56	23.265	Bc	5.087	cdefgh	3.590
16*41	17.085	Ijk	9.077	bcde	3.640
16*42	20.820	cdefgh	6.463	cdefgh	4.520
16*52	24.150	b	8.216	bcdef	4.290
16*53	21.975	bcd	8.267	bcde	3.160
17*41	18.520	fghijk	9.753	bc	2.770
17*42	18.380	ghijkl	9.330	bc	5.260
17*52	21.075	Cdefg	8.946	bcde	5.430
17*53	17.945	hijk	9.683	bc	4.970
17*56	21.675	Bcde	7.283	bcdefg	5.010
18*41	12.265	nop	2.071	fgh	3.490
18*42	23.085	Bc	6.555	cdefgh	3.480
18*52	18.750	efghijk	5.511	cdefgh	2.460
18*53	16.780	jkl	3.657	defgh	4.350
18*56	18.620	fghijk	7.042	bcdefgh	4.370
19*41	8.635	qr	6.718	cdefgh	4.900
19*42	8.445	r	9.261	bc	4.510
19*52	11.570	nopq	9.184	bcd	4.940
19*53	9.540	pqr	8.681	bcde	5.560
19*56	11.300	nopqr	9.191	bcd	4.040
\bar{X}	17.132		7.214		4.116
1313	19.445	defghijk	18.741	a	205.390
2045	20.065	Defghi	12.338	B	6.240
2046	10.870	opqr	2.358	gh	3.310
2047	16.850	jkl	8.279	bcde	4.270
2048	10.595	opqr	2.123	gh	1.160
2049	13.155	mno	1.640	h	1.150
\bar{X}	15.163		7.579		36.920
Tukey	3.003		5.564		4.640

Valores con la misma letra dentro de cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha= 0.05$ %).

Al analizar el grupo de las cruzas simples, y efectuar la descomposición de la suma de cuadrados en hembras y machos (cruzas) y su interacción, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en los compuestos fenólicos entre las hembras (Cuadro 4.3). Los machos no mostraron diferencias significativas y la interacción hembra macho si muestra diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). Las hembras presentan una variación de 9.899 a 24.499 Eq. (+) catequina mg g^{-1} que son los valores obtenidos por las hembras 19 y 15, respectivamente (Cuadro 4.4). Aunque los machos no muestran diferencias estadísticas, si presentan diferencias numéricas de 14.281 a a 18.753 Eq. (+) catequina mg g^{-1} que son los valores obtenidos por los machos 41 y 42, respectivamente (Cuadro 4.5).

La diferencia entre los genotipos evaluados es debido a su composición genética básicamente, ya que todos fueron cultivados en la misma región geográfica (Tepalcingo), estación y año (2005), a excepción de los genotipos (15*41, 15*42, 15*52, 15*53 y 15*56) que fueron cultivados en la misma localidad el año 2006.

Tsai *et al.* (2002) mencionan que bajo diversas temperaturas y períodos de almacenaje, existe una pérdida de compuestos fenólicos, a los cuales se puede atribuir que los genotipos 15*53 y 15*42 obtuvieron los valores más altos.

En el Cuadro 1 se aprecia que son los genotipos mas recientes y prácticamente no se almacenó durante tiempo prolongado, a diferencia de los demás genotipos, que fueron cosechados con un año de anterioridad y por lo tanto posiblemente tuvieron perdidas en compuestos fenólicos por almacenamiento. La diferencia entre el resto de los genotipos es por su composición genética, donde la variación depende de las líneas enanas (♀), así como la interacción hembra x macho son la causa de dicha diferencia, ya que como se mencionó, existió diferencia altamente significativa entre hembras y su interacción (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Cuadrados medios y niveles de significancia del análisis de varianza para compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

F.V.	G.L.	Compuestos Fenólicos (Eq. Cat. mg g ⁻¹)	Actividad antioxidante (ARA)
Hembras	6	247.045 **	37.693 **
Machos	4	35.741 NS	1.207 NS
Hembras * Machos	22	16.283 **	2.717 NS
Error	33	0.539	1.621
C.V. (%)		4.285	17.648

** = Significativo al nivel de 0.01 de probabilidad, G.L. = Grados de libertad; C.V. = Coeficiente de variación.

Para la variable contenido de antocianinas, solo se presentan los valores originales (Cuadro 4.1) y la comparación de medias para hembras y machos (Cuadro 4.4 y 4.5). Los resultados se expresaron como miligramos de antocianinas por kilogramo de muestra analizada (mg kg⁻¹). El contenido de antocianinas presenta un rango de variación de 2.15 a 5.56 mg kg⁻¹ en las cruces 15*42 y 19*53, respectivamente. Sin embargo, para los testigos el rango de variación se amplió de 1.15 a 205.39. En la comparación de medias (Cuadro 4.2), se observa que el genotipo 1313 (población azul) muestra el valor mas alto con 205.39 mg kg⁻¹ (ver Cuadro 4.2), seguido por el genotipo 2045 con 6.24 mg kg⁻¹ (Cuadro 4.2), en tanto que los genotipos con menor cantidad de antocianinas fueron el 2048 y 2049 con 1.16 y 1.15 mg kg⁻¹ (ver cuadro 4.2), respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cortés *et al.* (2006), quienes determinaron el contenido de antocianinas en maíz utilizando el método recomendado por Salinas *et al.* (2005), encontrando 271.77 mg kg⁻¹. Las diferencias entre ambos trabajos se debe al método utilizado para la determinación de antocianinas, las localidades en las que fueron cultivadas y las características genéticas (Adom y Liu, 2002; Kroon y Williamson, 1999; Emmons y Peterson, 1999).

Cuadro 4.4. Comparación de medias entre hembras (líneas endogámicas) para las variables evaluadas.

Hembras	Compuestos Fenólicos (Eq. Cat. mg g ⁻¹)	Actividad Antioxidante (ARA)	Antocianinas (mg kg ⁻¹)
11	14.812 c d e	6.483 b c	4.168 a b
13	12.110 d e	9.499 a	5.036 a
15	24.449 a	4.427 c	2.738 b
16	21.008 a b	8.006 a b	3.903 a b
17	19.512 a b c	8.999 a	4.688 a
18	17.900 b c d	5.093 c	3.630 a b
19	9.899 e	8.607 a b	4.790 a
Tukey	6.045	2.469	1.547

Valores con la misma letra dentro de cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05\%$).

Al realizar la comparación de medias para hembras y machos en el contenido de antocianinas, se encontró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre hembras (Cuadro 4.4), mientras que los machos no muestran diferencias significativas (Cuadro 4.5). Las hembras presentan una variación de 2.738 a 5.036 mg kg⁻¹ que son los valores obtenidos por las hembras 15 y 13, respectivamente (Cuadro 4.4). Aunque los machos no muestran diferencias estadísticas, si presentan diferencias numéricas de 3.831 a 4.391 mg kg⁻¹ que son los valores obtenidos por los machos 41 y 53, respectivamente (Cuadro 4.5).

Mazza *et al.* (1999) encontraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas de cuatro variedades de uvas, y atribuyó esta diferencia al genotipo y a la estación en la cual el cultivo fue desarrollado; Salinas-Moreno (2005) estudió la cantidad de antocianinas de 15 variedades de frijol negro y encontró diferencias significativas, y sugirió que éstas diferencias son debidas al origen genético expresada en la variable en estudio.

La variable actividad antioxidante presenta un rango de variación de 2.071 a 9.899 de ARA, en las cruzas 18*41 y 13*53, respectivamente. Sin embargo, para los testigos el rango

de variación se amplió de 1.640 a 18.741 de ARA. Los genotipos 1313 (población azul) y 2045 (CAFIME) mostraron tener la mayor capacidad antirradical frente al DPPH obteniendo valores 18.741 y 12.338 de ARA, respectivamente, los genotipos 2048 (6221) y 2049 (6222) obtuvieron los valores más bajos con 2.123 y 1.640 de ARA frente al DPPH (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.5. Comparación de medias entre machos (líneas endogámicas) para las variables evaluadas.

Machos	Compuestos Fenólicos (Eq. Cat. mg g ⁻¹)	Actividad Antioxidante (ARA)	Antocianinas (mg kg ⁻¹)
41	14.281 a	6.934 a	3.831 a
42	18.753 a	6.995 a	4.035 a
52	17.921 a	7.587 a	4.170 a
53	17.609 a	7.077 a	4.391 a
56	17.363 a	7.480 a	4.145 a
Tukey	4.674	1.909	1.120

Valores con la misma letra dentro de cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Pozo-Insfran *et al.* (2006), en donde al evaluar tres genotipos de maíz (uno blanco y dos azules), los genotipos azules obtuvieron los valores más altos de actividad antirradical. Esto se debe al tipo de compuesto fenólico presente en cada uno de los genotipos evaluados, ya que algunos fenóles tienen estructuras químicas que facilitan la depuración de los radicales libres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002), como lo son las antocianinas encontradas en maíz azul, las cuales han manifestado un alto poder antioxidante (Tsai *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 1998; Wang y Lin, 2000), mientras que los genotipos blancos contienen compuestos fenólicos en su mayoría como el ácido felúrico, *p*-cúmarico, procatequinas, que si bien tienen un alto poder antioxidante no se comparan con las antocianinas (Pozo-Insfran *et al.*, 2006).

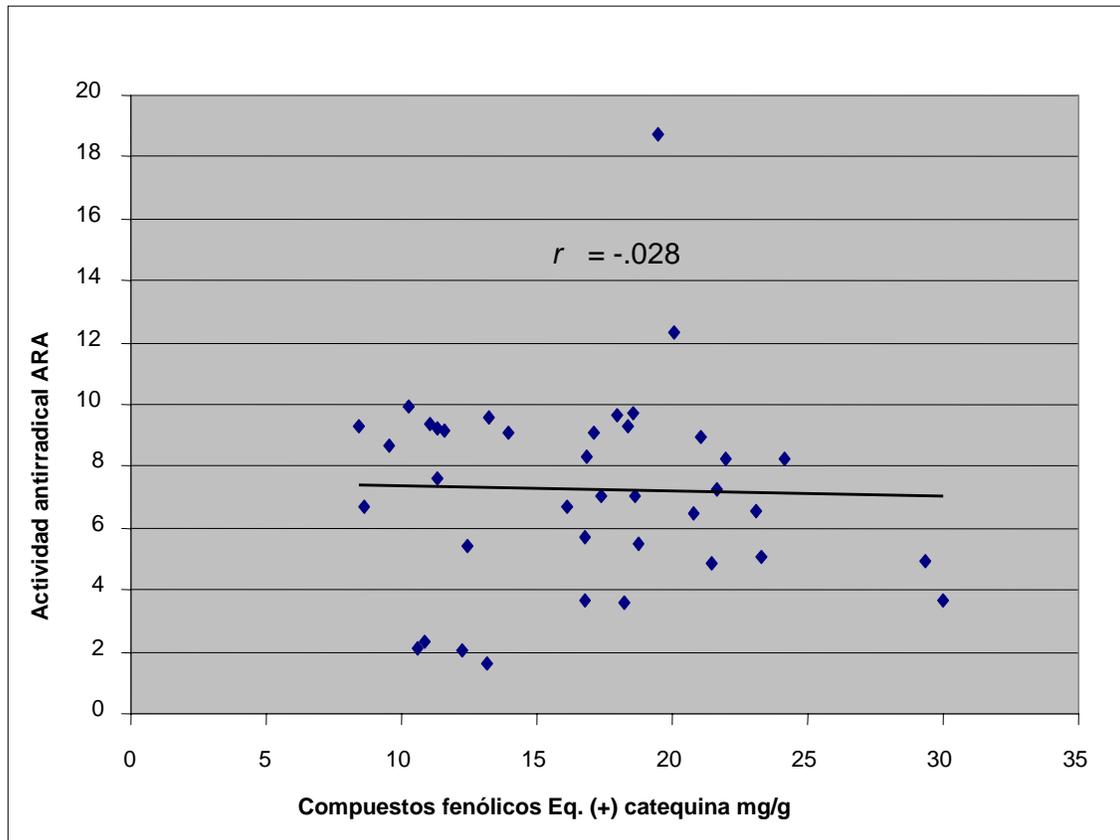


Figura 4.1. Relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antirradical.

En el análisis de varianza para hembras y machos; la variable actividad antioxidante presentó diferencias altamente significativa ($P \leq 0.01$) entre hembras (Cuadro 4.3), los machos y la interacción hembra x macho no muestra diferencias significativas. Las hembras presentan una variación de 4.427 a 9.499 de ARA que son los valores obtenidos por las hembras 15 y 13, respectivamente (Cuadro 4.4). Aunque los machos no muestran diferencias estadísticas, si presentan diferencias numéricas de 3.831 a 4.391 de ARA que son los valores obtenidos por los macho 41 y 53, respectivamente (Cuadro 4.5).

Como se observa en la Figura 4.1 no se encontró relación entre la cantidad de compuestos fenólicos en las muestras y su actividad antioxidante ($r = -.028$). Este resultado diferente de los obtenidos por Wang y Lin (2000), quienes encontraron una relación lineal entre el contenido de compuestos fenolitos y la actividad antirradical, al estudiar la frambuesa y la zarzamora. Sin embargo, Emmon y Peterson (1999) al analizar cuatro variedades de avena encontraron que una de las variedades contenía la mayor cantidad de compuestos fenólicos,

pero no mostraba la mayor capacidad antioxidante. Esto se debe principalmente a la naturaleza química de los compuestos fenólicos encontrados en cada una de los genotipos (Que *et al.*, 2006).

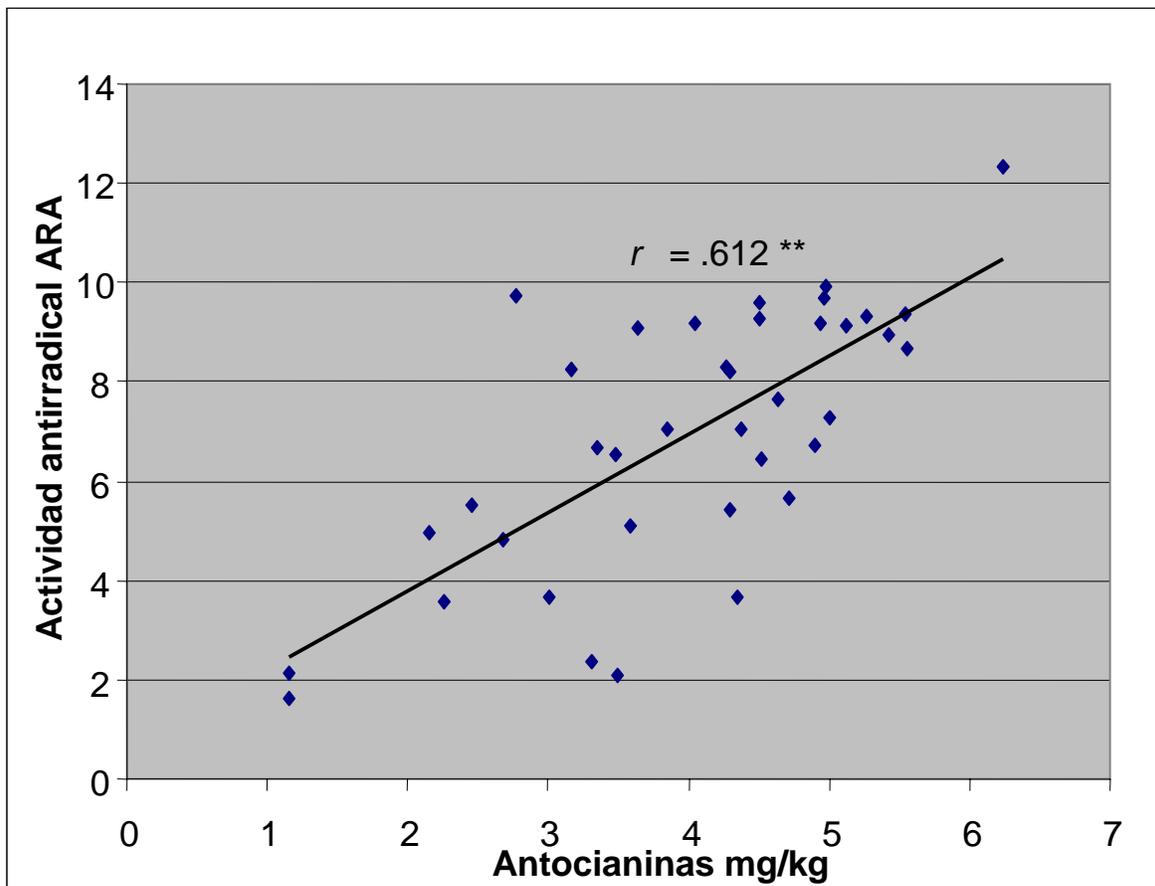


Figura 4.2. Relación entre el contenido de antocianinas y la actividad antirradical.

La concentración de antocianinas en las muestras de maíz está relacionada con su actividad antioxidante con un valor en el coeficiente de correlación de $r = 0.612^{**}$ (Figura 4.2). Estos resultados sugieren que las antocianinas encontradas en los genotipos de maíz son la principal fuente de capacidad antioxidante, lo cual concuerda con Tsai *et al.* (2002) quien demostró que las antocianinas de pétalos de rosa, aportaban de un 24 a un 52 % de la capacidad antioxidante total. Prior *et al.* (1998) al estudiar la actividad antioxidante de cuatro variedades de uva, encontraron una relación lineal ($R^2 = 0.77$) entre el contenido de antocianinas y su actividad antioxidante. Wang y Lin (2000) investigando la actividad

antioxidante en frutas encontraron una relación lineal entre la cantidad de antocianinas y la capacidad antioxidante ofrecida por cada uno de los tratamientos.

La dispersión gráfica para el análisis conjunto de la asociación entre los genotipos y los parámetros en estudio se presenta en la Figura 4.3.

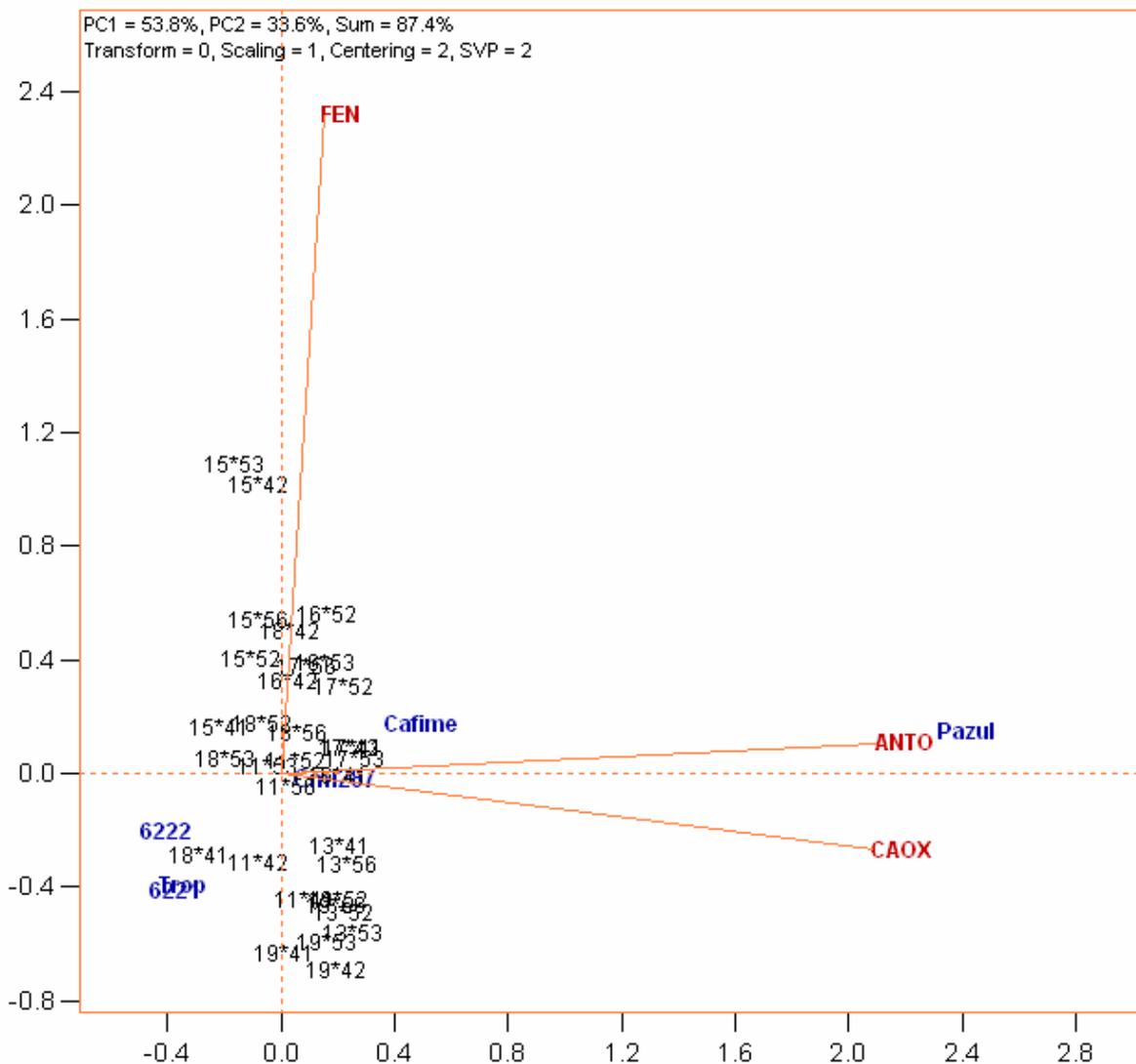


Figura 4.3. Representación gráfica de la asociación entre las cruza simples, los testigos y los parámetros en estudio (FEN, compuestos fenólicos, CAOX, capacidad antioxidante y ANTO, el contenido de antocianinas).

La Figura 4.3 muestra la asociación entre los compuestos fenólicos (FEN), la capacidad antioxidante (CAOX) y el contenido de antocianinas (ANTO). La asociación entre los parámetros esta indicada por el ángulo que forman los vectores a partir del origen, es decir,

la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas están altamente asociadas dado que el ángulo entre los dos vectores es pequeño. Por otro lado, el ángulo aproximado de 90° indica no asociación, como es el caso de los fenoles con la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas. Lo anterior es una explicación gráfica de la correlación obtenida con anterioridad (Figuras 4.1. y 4.2).

La interpretación de la Figura en los cuatro cuadrantes destaca que en el eje de las X (Primer componente de la Figura), esta principalmente determinado por la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas (CAOX y ANTO). Estos dos parámetros permiten diferenciar principalmente a los materiales genéticos asociados con los testigos, donde se encuentra la población azul en el sector derecho de la Figura. La población tropical y las dos poblaciones de CIMMYT (6221 Y 6222) están en el lado izquierdo del primer componente en tanto que el resto de los testigos en el lado derecho, lo cual hace la distinción entre los mismos. De acuerdo a la dispersión en la Figura 4.3, si se omite los valores correspondientes a la población azul, es posible hacer una discriminación más eficiente de las cruzas con respecto al componente principal uno (Eje de las X).

En el caso del eje de las Y, correspondiente al segundo componente, éste está asociado directamente a los compuestos fenólicos, componente que hace una distinción principalmente entre las cruzas simples, las cuales están ordenadas en relación al componente 2. Es decir, las cruzas simples (maíz blanco) están diferenciadas por los compuestos fenólicos, en tanto que los testigos (materiales contrastantes usados como referencia), son diferenciados por medio de la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas, y por consiguiente, las interrelaciones entre ellos.

V. CONCLUSIONES

La cantidad de compuestos fenólicos totales no está relacionada de manera directa con la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas.

Los compuestos fenólicos, las antocianinas y la actividad antioxidante lograron diferenciar a los materiales genéticos en base a su composición química y características del grano de maíz.

Las líneas provenientes de la población enana (usadas como hembra) son las que determinan la mayor proporción de la varianza en las cruces simples.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Aal, E-S. M. and P. Huel. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76(3): 350-354.
- Adom K. K. and R. H. Liu. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50:6182-6187.
- Agama-Acevedo, E., O. A. Marie, A. F. Imad, P. L. Octavio, O. C. Joaquín y B. P. Luis. 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia, Revista de Ciencia y Tecnología de America.* 29(11):643-649.
- Aparicio- Fernández, X., G. G. Yousef, G. Loarca-Piña, E. Mejía and M. A. Lila. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of black jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53:4615-4622.
- Arena, E., B. Fallico and E. Maccarone. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.* 74:423-427.
- Arnao, M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Food Sci. Technol.* 11:419-421.
- Aruoma, O. I., H. Kaur and B. Halliwell. 1999. Oxygen free radicals and human diseases. *Rev. Journal of the Royal Society of Health.* 111(5):172-177.
- Belitz, H-D. y W. Grosch. 1988. *Química de los alimentos.* Ed. Acribia España: Zaragoza. 813-1210.
- Berra, B., D. Caruso, N. Cortesi, E. Fedeli, M. F. Rasetti and G. Galli. 1995. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Riv. It. Sost. Grasse.* 72:285- 291.
- Bondet, V., W. Brand-Williams, and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss Technology.* 30: 609-615.

- Boyer, C. and J. C. Shannon. 1987. Carbohydrates of the kernel. In: Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A. and Ramstad, P.E. ed. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, MN. USA.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*. 28:25-30.
- Bravo, L. 1998. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56(11):317-333.
- Brune, M., L. Hallberg, and A. B. Skanberg. 1991. Determination of iron binding phenolics groups in foods. *J. Food Sci.* 56: 128.
- Butler, L. G. 1992. Protein polyphenol interactions: nutritional aspects. Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol. 16(11):11-18.
- Cardador-Martínez, A., G. Loarca-Piña, and B. D. Oomah. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50: 6975-6980.
- Chung, K-T., T-Y. Wong, C-I. Wei, Y-W. Huang and Y. Lin. 1998. Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* 38(6):421-464.
- Clifford, M. N. 1992. Sensory and dietary properties of phenols. Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol. 16(11):18-23.
- Cortés, G. A., M.Y. Salinas, E. S. Martín-Martínez, F. Martínez-Bustos. 2006. Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science* (43):57-62.
- Dai, G. H., C. Andary, L. Mondolot-Cosson and D. Boubals. 2005. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Journal European Journal of Plant Pathology*. 101(5):541-547.
- Decker, E. A. 1997. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.* 55(1):396-398.
- Desphande, S. S. and M. Cheryan. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal of Food Science*. 50: 905-910.
- Deshpande, S. S. and M. Cheryan. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science*, 52(2): 332-334.
- Emmons, C. L. and D. M. Peterson. 1999. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem.* 76(6):902-906.

- Espín, J. C., R. C. Soler, and H. J. Wichers. 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:648-656.
- Fossen, T., R. Slimestad and M. O. Andersen. 2001. Anthocyanins from Maize (*Zea mays*) and Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2318-2321.
- Fukumoto, L.R. and G. Mazza. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3597-3604.
- Goldstein, J. L. and T. Swain. 1963. Changes in tannin in ripening fruits. *Phytochem*. 2:371-378.
- Gupta, R. K. and E. Haslam. 1980. Vegetable tannins: Structure and Biosynthesis. In: Hulse, J.H. ed. *Polyphenols in Cereals and legumes*. International development research center Ottawa, Canada: 15-31.
- Halliwell, B., M. A. Murcia, S. Chirico and O. I. Aruoma. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo; what they do and how they work? *Critical. Rev. Food Sci. Nutr*. 35:7-20.
- Harborne, J. B. 1989. General procedures and measurements of total phenolics. *Plant Phenolics from "Methods in Plant Biochemistry Series"*. Ed Academic Press, London.
- Hernández-X y G. Alanís-Flores. 1970. Estudio morfológico de 5 nuevas razas de maíz de la sierra madre occidental de México: Implicaciones Fitogenéticas y Fitogeográficas. *Agrociencia*. 581:3-30.
- Hertog, M. G. L., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina and F. Fidanza. 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven Countries. *Study Arch. Intern. Med*. 155:381-386.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman and B. Van de Putte. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem*. 41:1242-1246.
- Ho, C.1992. *Phenolic compounds in food*. 1st edition. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Hoff, J. F. and K. I. Singleton. 1977. A method for determination of tannin in foods by means of immobilized enzymes. *J. Food Sci*. 42:1566.

- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2007. Información estadística. En línea en: www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=siap01&c=5046 (modificado el 11 de julio de 2007; verificado 22 Julio de 2000).
- Iqbal, S., M. I. Bhangar and F. Anwar. 2007. Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 40: 361-367.
- Ito, N., S. Fukushima, A. Hasegawa and T. Ogiso. 1983. Carcinogeny of butylated hydroxy anisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 70:343-347.
- Jackman, L. R., R. Y. Yada and M. A. Tung. 1987. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins using for their qualitative and quantitative analysis. *Food Biochem.* 11:279-292.
- Jackson, D. S. and J. R. Shandera. 1995. Corn wet milling: Separation Chemistry and Technology. *Advances in Food and Nutrition Research*, 38: 271-279.
- Jing, P. and M. N. Giusti. 2005. Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:8775-8781.
- Lee., K. L., Y. J. Kim, H. J. Lee and C. Y. Lee. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51:7292-7295.
- Liu, X., S. Ardo, M. Bunning, J. Parry, K. Zhou, C. Stushnoff, F. Stoniker, L. Yu, and P. Kendall. 2007. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 40:552-557.
- Lohachoompol, V., G. Szrednicki and J. Craske. 2004. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5:248-252.
- Karchesy, J. J., Y. Bae, L. Chalker-Scott, R. F. Helm and L. Y. Foo. 1989. Chromatography of proanthocyanidins. *Chemistry and significance of condensed tanins*. Ed. Plenum Press New, York.
- Kroon, P. A. and G. Williamson. (1999). Hydroxinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of Science Food and Agriculture*. (79):355-361.

- Kumaran, A. and R. J. Karunakaran. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 40:344–352.
- Kuskoski, E. M., A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho, and R. Fett. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 25(4): 726-732.
- Makkar, H. P. S. 1989. Protein precipitation methods for quantification of tannins: A review. *J. Agric Food Chem*. 37:1197-1202.
- Mangelsdorf, P. C. and R. H. Lister. 1956. Archeological evidence on the evolution of maize in northwestern Mexico. *Botanical Museum Leaflets*. 17:151-178.
- Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y M.^a J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*. 17 (6):271-278.
- Martínez-Valverde, I., M. J. Periago y G. Ros. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*, mar. 50(1):5-18.
- Mazza, G., L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem*. (47):4009-4017.
- Mejía, E. G., G-M. Salvador, A-G. Jorge, R-C. Rosalía, R-R. Erica, P-H. José, G-C. Mario, C. Javier and K. James. 2003. Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *J. Agric. Food Chem*. 51: 5962-5966
- Moyer, R. A., K. E. Hummer, C. E. Finn, B. Frei and E. Wrolstad. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem*. 50:519-525.
- Naczk, M., P. K. J. Wanasundara and F. Shahidi. 1992. A facil spectrophotometric quantification method of sinapic acid in hexae-extracted and methanol ammonia water treated mustard and rapeseed meals. *J. Agric. Food Chem*. 44:444-452.
- Nakajima, J., I. Tanaka, S. Seo, M. Yamazaki, and K. Saito. 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.5:241–247.

- Nakatani, N., H. Fukuda and H. Fuwa. 1979. Studies on naturally occurring pigments: Major anthocyanin of Bolivian purple corn (*Zea mays* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 43:389-391.
- Oh, H. I., J. E. Hoff and L. A. Haff. 1985. Immobilized condensed tannins and their interactions with proteins. *J. Food Sci.* 50:1652.
- Ortega, P. R. and J. S. González. 1989. Aportaciones al estudio de la diversidad de maíz de las partes altas de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 12:105-119.
- Paredes-López, O. and M. E. Saharópulos-Paredes. 1983. A review of tortilla production technology. *Baker Digest*. 9:16-25.
- Pascual, T.S., B. C. Santos and G. J. C. Rivas. 2002. LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:1003-1006.
- Pozo-Insfran, D., C. H. Brenes, S. O. S. Saldivar and S. T. Talcott. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*. 39:696–703.
- Pratt, D.E. 1992. Natural antioxidant from plant material. Ed. ACS Symposium Series 507. American Chemical Society, Washington, D. C.
- Pratt, D. E. and B. J. F. Hudson. 1990. Natural antioxidant no exploited commercially. Ed. Elsevier Applied Sciences. *Food Antioxidants*. London.
- Price, M. L., S. Van Scoyoc and L. G. Buttler. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in shorgum. *J. Agric. Food Chem.* 26:1214-1220.
- Prior, R.L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. Mcewan, C. Obrien, N. Lischer, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G., Krenwer and C. M. Mainland. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* specie. *J. Agric. Food Chem.* 46:2686-2693.
- Que, F., L. Mao and X. Pan. 2006. Antioxidant activities of Wive Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research Internacional*. (39):581–587.
- Rao, A.V., D. Thurnham, L. Kholmeir, T. G. Truscott, A. Ledds, C. Hasler and S. Wearne. 2001. Tomatoes, Lycopene and Health. *Nutrition y Health Conference Report Lycopene and the Prevention of Cronic Diseases*. 1:11-14.
- Reyes, C.P. 1990. *El maíz y su cultivo*. 1ra. edición. AGT S.A., México.
- Robards, K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436.

- Salinas, M. Y., S. G. Salas, H. D. Rubio and L. N. Ramos. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*. 43:483-487.
- Salinas-Moreno, Y., L. Rojas-Herrera, E. Sosa-Montes y P. Pérez-Herrera. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia* (39): 385-394.
- Satue-Gracia, M. T., M. Heinonen and E. N. Frankel. 1997. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 45:3362-3367.
- Shahidi, F. and M. Naczk. 1995. *Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application.* Tecnmomic, Publishing CO., INC ed. Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Singlenton, V. L., M. Salgues, J. Zaya and E. Trousdale. 1985. Caftaric acid disappearance and conversion to product on enzymic oxidation in grape mass and wine. *American J. Enol. Viti.* 36:50-57.
- Straus, J. 1960. Maize Endosperm Tissue Grown in Vitro. III. Development of a Synthetic Medium. *American Journal of Botany.* 47(8):641-647.
- Styles, E.D. and O. Ceska. 1972. Flavonoid pigments in genetic strains of maize. *Phytochemistry.* 11: 3019-3021.
- Swain, T. and W. E. Hills. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of Phenolics Constituents. *J. Sci. Food Agric.*10:63-68.
- Taba, S., M. Van Ginkel, D. Hoisington and D. Poland. 2004. *Operations manual.* 3ra. Edición. CIMMYT, México.
- Tsai, P-J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Research International.* (35):351-356.
- Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital J. Food Sci.* 2(10):99-116.
- Veles, M. J. J. 2004. Caracterización de tostadas elaboradas con maíces pigmentados y diferentes métodos de nixtamalización. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Santiago de Querétaro, Qro.

- Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Gao and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46(10):4113-4117.
- Yu, L., P. Jonathan, H. Mary, W. John and H. Scott. 2003. Antioxidant properties of bran extracts from “akron” wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.* 51:1566-1570.
- Wang, S. Y. and H-S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48:(140-146).
- Wang, H., G. Cao and R. L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* (44):701-705.
- Watson, S. A. 1987. Structure and composition. In *corn: chemistry and technology and Ramstad, ed. American Association Cereal Chemistry. Std. Paul, Mv, USA.*
- Weber, E. D. 1987. Lipids of the kernel. In: *Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A. and Ramstad, ed. American Association Cereal Chemistry. St. Paul, MN. USA.*
- White, J. P. and A. L. Johnson. 2003. *Corn: Chemistry and Technology. 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul Minnessota.*
- White, P. 2003. *Corn: Chemistry and technology. Food science and human nutrition department Iowa state University. Ames Iowa. USA.*
- Wright, K. N. 1997. Nutritional properties and feedings values of corn and its by-products. In: *Corn: Chemistry and technology. Watson, S.A. and Ramstad, ed. American Association Cereal Chemistry. Std. Paul, MN, USA. Ch. 15. p. 447-478.*
- Zazueta-Morales, J. J.,F. Martínez-Bustos, N. Jacobo-Valenzuela, C. Ordorica-Falomir and O. Paredes-López. 2002. Effects of calcium hydroxide and screw speed on physicochemical characteristics of extruded blue corn. *Journal of Food Science.* 67:3350–3358.