



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE
COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS DE
MAÍCES COLORIDOS NATIVOS DE MÉXICO**

TESIS

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

PRESENTA:

ANTONIO SANJUAN RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA



MÉXICO, CD de México.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ARTURO NAVARRO OCAÑA
VOCAL: HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOMEZ
SECRETARIO: BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN
1er. SUPLENTE: INES MIRANDA MARTINEZ
2° SUPLENTE: ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
CONJUNTO E. FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TÉCNICO: MARÍA FERNANDA FERNÁNDEZ AULIS

SUSTENTANTE: ANTONIO SANJUAN RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a la cual es un orgullo y privilegio pertenecer.

A la Facultad de Química y a todos los profesores que a lo largo de mi estancia hicieron un excelente trabajo para formarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis. Número de becario: 21445

Al apoyo económico de CONACYT 2012-CB180128

Al apoyo económico del proyecto PAPIIT-IN220015

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por permitirme formar parte de su investigación, su apoyo a lo largo de todo el proyecto realizado y durante la conclusión del mismo.

A los miembros del jurado y a todos mis compañeros en el Laboratorio 321 y a lo largo de la carrera.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	4
1. El Maíz	4
1.1. Generalidades.....	4
1.2. Origen	5
1.3. La planta del maíz.....	6
1.4. Estructura y composición del grano de Maíz.....	7
2. Maíz híbrido y mejorado	8
2.1. Variedades sintéticas.....	9
2.2. Variedades mejoradas	9
2.3. Variedades criollas.....	10
3. Maíz Criollo en México.....	11
4. Compuestos Bioactivos	13
4.1. Historia y definición de los compuestos bioactivos.....	13
4.2. Clasificación y síntesis de compuestos bioactivos	14
5. Compuestos Bioactivos en Maíz	17
5.1. Terpenos.....	18
5.2. Carotenoides	19
5.3. Compuestos fenólicos	20
5.4. Flavonoides	22
5.5. Antocianinas	23
5.5.1. Perfil de Antocianinas	29
5.6. Ácidos Hidroxicinámicos	30
5.6.1. Ácido Ferúlico.....	31
5.7. Xilano.....	33
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS.....	35
Objetivo General.....	35
Objetivos particulares	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
Materiales y equipo	37

Desarrollo experimental por etapas	41
Etapa 1. Preparación de las muestras.....	41
Etapa 2. Cuantificación de compuestos bioactivos por métodos espectrofotométricos ...	42
Etapa 3. Determinar el perfil de antocianinas y cuantificación de ácidos hidroxicinámicos por HPLC y cuantificación de Xilanos.....	42
Métodos	44
Cuantificación de Carotenos.....	44
Cuantificación de Antocianinas.....	44
Cuantificación de Fenoles	45
Cuantificación de Flavonoides	45
Cuantificación de Xilanos (DNS).....	46
Determinación de perfil de Antocianinas	47
Cuantificación de Ácidos Hidroxicinámicos.....	48
Análisis estadístico	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Etapa 1. Preparación de las muestras.....	50
Etapa 2. Cuantificación de compuestos bioactivos por métodos espectrofotométricos	50
Cuantificación de Carotenos.....	51
Fenoles, Flavonoides y Antocianinas totales.....	52
Fenoles totales	53
Flavonoides totales	54
Antocianinas totales.....	55
Etapa 3	57
Perfil de antocianinas.....	57
Ácidos Hidroxicinámicos	67
Xilanos.....	68
Conclusiones.....	70
ANEXO	71
Bibliografía.....	74

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es ampliamente considerado como un cultivo importante en todo el mundo, en especial en México, debido a que es la base de la alimentación y el país es considerado como uno de los centros de origen de esta especie.

México cuenta con una gran diversidad de maíces distribuidos a lo largo de todo el territorio, los cuales están adaptados a las condiciones climatológicas y geográficas de cada región agroecológica; más de 50 razas de maíz han sido descritas. Dentro de estas, se encuentran los maíces criollos coloridos o pigmentados.

Los maíces coloridos contienen compuestos de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y bioactivas tales como antocianinas, carotenos, fenoles y flavonoides. Las antocianinas junto con otros flavonoides, son responsables del color rojo, azul, morado o negro en el maíz por lo que representan una fuente de colorantes naturales. Además, varios estudios han revelado propiedades antimutagénicas, y quimiopreventivos. Por otro lado, estudios acerca de la ingesta dietética de polifenoles y flavonoides demuestran una correlación entre estos y la reducción en el estrés oxidativo, crecimiento de tumores y la enfermedad cardíaca coronaria. Finalmente, los carotenos son el precursor de la vitamina A y tienen la propiedad de absorber la luz azul y ultravioleta por lo que también actúan como antioxidantes.

Sin embargo, a pesar de la enorme diversidad que se tiene en México en cuanto a razas y variedades de maíz, son pocos los trabajos publicados sobre las características físicas y químicas de sus granos y más reducido aún es el número de estudios realizados en maíces con pigmentados.

Por ello es necesario ampliar este tipo de estudios para cubrir una mayor cantidad de razas que presenten variantes de grano pigmentado.

MARCO TEÓRICO

1. El Maíz

1.1. Generalidades

Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas –a menudo, una por tallo– son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1,000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1,000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42% del peso en seco de la planta (FAO 1993).

Maíces de diferentes tipos y colores (que van del blanco al amarillo, rojo y morado) son cultivados. Maíz harinoso (*Z. mays var. amylacea*), también conocido como el maíz "suave", tiene granos, principalmente de color blanco con corona redondeada o plana, que consiste casi en su totalidad de endospermo blando y una pequeña porción de endospermo duro. Maíz calicó (*Z. mays var. Indurata*), también conocido como maíz de indias, tiene un almidón suave en el centro rodeado por una cáscara dura, y su color varía del blanco al rojo. Maíz dentado (*Z. mays var. indentata*) es amarillo o blanco con una corona deprimida. Maíz dulce (*Z. mays var. saccharata* y *Z. mays var. rugosa*) tiene un mayor contenido de azúcar que otros tipos de maíz y se consume en diferentes formas (hervidos, asados, congelados o enlatados). Maíz palomero (*Z. mays var. everta*) se utiliza principalmente para hacer estallar; esta capacidad está vinculada a un denso relleno de almidón en el endospermo. Maíz ceroso (*Z. mays var Ceratina*), su almidón principalmente consiste en amilopectina (aproximadamente 99%), y la amilosa está presente en muy pequeñas cantidades; el almidón de dicho maíz produce pasta que tiene una baja tendencia a la retrogradación con características muy parecidas al almidón de papa. El maíz blanco tiene endospermo de color blanco que contiene mayor cantidad de endospermo vítreo en relación con endospermo harinoso y se prefiere para

productos nixtamalizados como las tortillas (Singh *et al.*, 2011). Granos de maíz azul, morado, y rojo son ricos en antocianinas con propiedades antioxidantes y bioactivos bien establecidos (Adom y Liu, 2002).

1.2. Origen

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7,000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (Puebla, México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. Crece desde los 58° de latitud norte en el Canadá y Rusia hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4,000 metros de altura en los Andes peruanos. Pese a la gran diversidad de sus formas, al parecer todos los tipos principales de maíz conocidos hoy en día, clasificados como *Zea mays*, eran cultivados ya por las poblaciones autóctonas cuando se descubrió el continente americano. Por otro lado, los indicios recogidos mediante estudios de botánica, genética y citología apuntan a un antecesor común de todos los tipos existentes de maíz. La mayoría de los investigadores creen que este cereal se desarrolló a partir del teosinte, *Euchlaena mexicana* Schrod, cultivo anual que posiblemente sea el más cercano al maíz. Otros creen, en cambio, que se originó a partir de un maíz silvestre, hoy en día desaparecido. La tesis de la proximidad entre el teosinte y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos o parcialmente homólogos. Ha habido introgresión (retrocruzamiento reiterado) entre el teosinte y el maíz y sigue habiéndola hoy en día en algunas zonas de México y Guatemala donde el teosinte puede crecer en los cultivos de maíz. Galinat (1977) señala que siguen siendo viables esencialmente dos de las diversas hipótesis sobre el origen del maíz: la

primera es que el teosinte actual es el antecesor silvestre del maíz, y/o un tipo primitivo de teosinte es el antecesor silvestre común del maíz y del teosinte; la segunda es que una forma desaparecida de maíz tunicado fue el antecesor del maíz, y el teosinte fue, en cambio, una forma mutante de dicho grano tunicado. En cualquier caso, la mayoría de las variedades modernas del maíz proceden de material obtenido en el sur de los Estados Unidos, México y América Central y del Sur (FAO 1993).

1.3. La planta del maíz

Se puede definir la planta del maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos. El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. La fase vegetativa consta de dos ciclos. En el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; en este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción; este ciclo acaba con la emisión de los estigmas.

La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor; durante la segunda etapa, el peso de los granos aumenta con rapidez (Tanaka y Yamaguchi, 1972).

La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción como consecuencia, en el terreno de la evolución, de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas ecológicas concretas (Barber, 1979).

1.4. Estructura y composición del grano de Maíz

El grano de maíz se denomina en botánica cariósipide o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla, como se ve en la Figura 1.

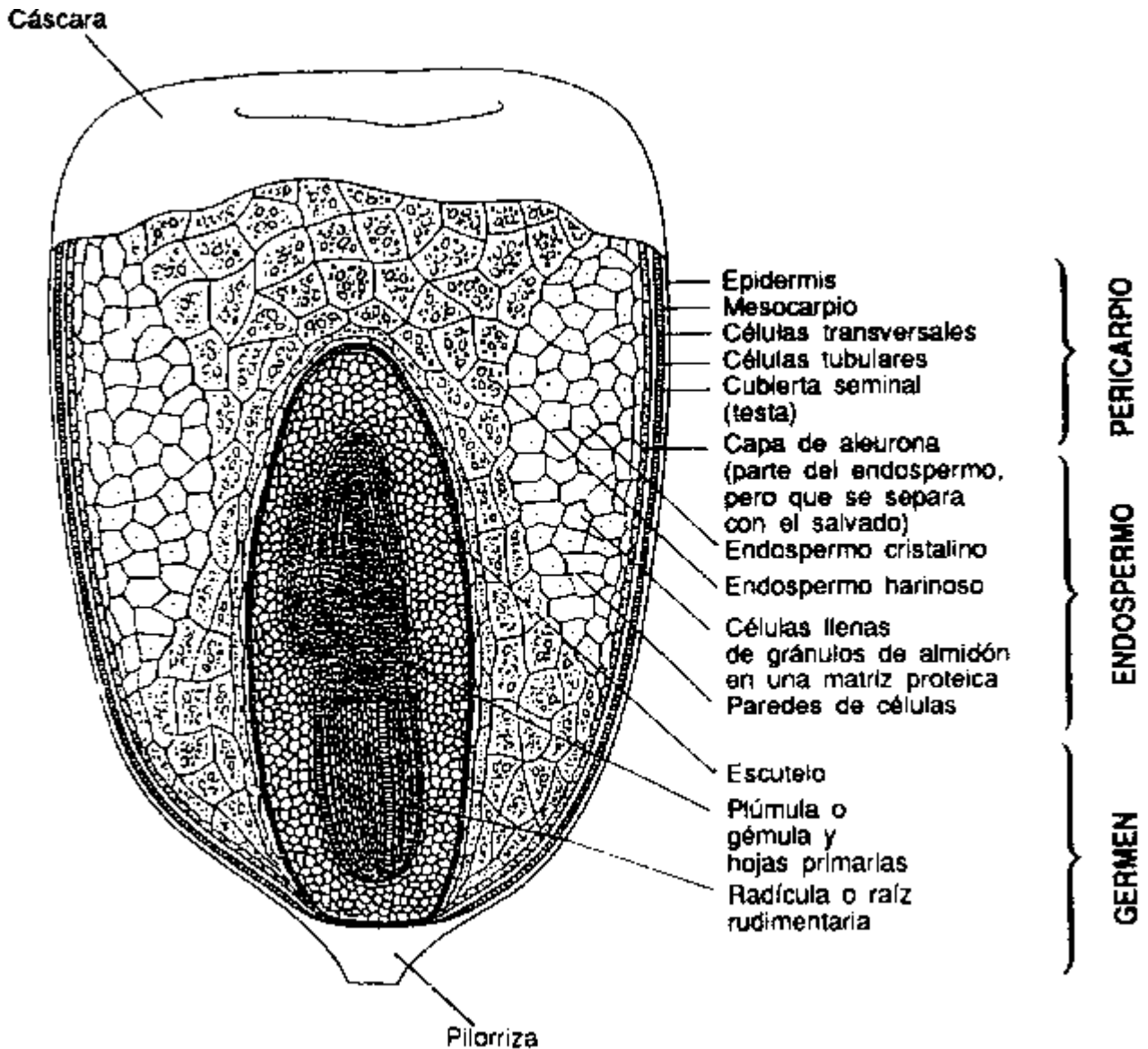


Figura 1. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal aumentado aproximadamente 30 veces) (FAO, 1993).

En la figura 1 se muestran también las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara, o salvado; el endospermo; el germen o embrión; y la piloriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo) (FAO 1993).

El grano de maíz se compone de endospermo (82-83%), germen (10-11%), pericarpio (5-6%), y aleurona (2-3%). El pericarpio es la capa más externa que se caracteriza por alto contenido de fibra cruda, que consiste principalmente de hemicelulosa, celulosa y lignina. El grosor del pericarpio varía en los diferentes tipos de maíz. El endospermo se compone de un gran número de células, cada uno lleno con gránulos de almidón incrustados en una matriz de proteína. Las paredes celulares consisten en polisacáridos no amiláceos (β -glucano y arabinosilano), proteínas, y ácidos fenólicos. El grano de maíz tiene dos tipos de endospermo, harinoso y corneo. El endospermo harinoso contiene gránulos sueltos de almidón que rodean la fisura central, mientras que el endospermo córneo ha embalado con fuerza gránulos de almidón más pequeños hacia la periferia. El germen está compuesto de embriones, el órgano vivo del grano, y el escutelo que nutre al embrión. El germen se caracteriza por un alto contenido de lípidos (aproximadamente 33%) y proteínas (aproximadamente 18%). El aceite proveniente del germen es bajo en ácidos grasos saturados y alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Dicho aceite de germen es relativamente estable debido a la presencia de altos niveles de antioxidantes naturales, y se considera bueno para la salud debido a su composición, que consiste principalmente de ácido oleico y linoleico. El endospermo constituye aproximadamente 82-83% del grano y contiene aproximadamente 87-88% de almidón que consiste en amilosa y amilopectina (Singh *et al.*, 2011).

2. Maíz híbrido y mejorado

El maíz híbrido es la progenie de la primera generación de un cruzamiento entre líneas endogámicas.

La hibridación es un método de mejoramiento genético que utiliza la polinización cruzada, entre progenitores genéticamente distintos, con el propósito de obtener recombinación genética.

Después de llevarse a cabo la polinización cruzada, se cultivan generaciones segregantes y se seleccionan líneas puras, una vez que se ha alcanzado la homocigocidad. El propósito es identificar y seleccionar líneas que combinen genes

deseables provenientes de ambos progenitores. Las líneas seleccionadas se evalúan mediante pruebas de progenie para verificar la presencia de una combinación de genes deseables. Las líneas que demuestran ser superiores pueden multiplicarse como un nuevo cultivar.

2.1. Variedades sintéticas

Es un incremento de semilla por apareamiento aleatorio a partir de una cruce múltiple, se cruzan en pares seis u ocho líneas endogámicas y las progenies obtenidas se cruzan siguiendo un esquema sistemático hasta que todas participan en la cruce final con igual frecuencia.

Se caracterizan por:

- Expresan menor potencial productivo de grano que los híbridos varietales.
- Poseen mayor potencial productivo de grano que las variedades mejoradas.
- Especial para zonas de temporal deficiente, con condiciones de lluvia y ambiente desfavorable. Su ámbito de recomendación es la provincia de “mediana Productividad”, así como las “tierras marginales”, es decir donde es muy difícil el ambiente para el maíz.
- Baja uniformidad de altura de planta y mazorca.
- La cosecha se efectúa en forma manual.
- La semilla se puede obtener de la propia parcela por cuatro o cinco años después debe renovarse.
- Facilidad para producción de semilla, ya que es un sólo lote aislado.

2.2. Variedades mejoradas

Una variedad mejorada es un grupo de plantas con características bien definidas, semejantes, obtenidas a través de la aplicación de alguna técnica o metodología de mejoramiento genético, las cuales poseen características sobresalientes y comportamiento superior al de las variedades existentes o predecesoras.

Sus características son:

- Poseen menor potencial productivo de grano que las variedades sintéticas.
- Mayor potencial productivo de grano que variedades criollas.

- Específico para zonas de temporal deficiente, es decir en las provincias de “tierras marginales”.
- Poseen mediana a escasa productividad.
- Baja uniformidad de altura de planta, mazorca, tamaño de mazorca.
- La cosecha se realiza en forma manual.
- La semilla para siembra se obtiene de la propia parcela.
- Facilidad para producción de semilla, ya que es sólo un lote.

2.3. Variedades criollas

Se caracterizan por:

- Poseen limitado potencial productivo de grano.
- Específico para temporal deficiente o con problemas de falta de humedad y manejo. Su ubicación es en las provincias de “baja productividad”, así como en “tierras marginales”.
- Poseen baja uniformidad de altura de planta y mazorca.
- La cosecha debe efectuarse en forma manual.
- La semilla se obtiene de la propia parcela.
- Presenta facilidad para producción de semilla, ya que implica un sólo lote aislado.
- Poseen ventajas comparativas por tipo especial de grano, para uso diferenciado.

Híbridos no convencionales

Se obtienen de la combinación de variedades con una línea, un híbrido simple con una variedad, una variedad con híbrido simple, un híbrido con otro híbrido.

Se caracterizan por:

- Mayor potencial productivo de grano que variedades sintéticas e híbridos varietales, dependiendo del tipo de híbrido no convencional.
- Responden muy bien en provincias de “buen potencial productivo”.
- Se obtienen de la combinación de: a) variedad x línea (mestizos), b) híbrido simple x variedad, c) variedad x híbrido simple, d) híbridos o variedades estabilizadas e) híbrido x híbrido.
- Presentan baja uniformidad en altura de planta, mazorca y tamaño de mazorca.
- Se requiere nueva semilla pero también puede obtenerse de la propia parcela.

- La producción de semilla es relativamente fácil, así como el control de progenitores.
- La productividad de semilla es buena, al obtenerse de cruza simple o variedad (Guzmán Máximo 2015).

3. Maíz Criollo en México

El cultivo del maíz en México se hace actualmente en un amplio intervalo de altitud y variación climática, desde el nivel del mar hasta los 3,400 msnm. Se siembra en zonas tórridas con escasa precipitación, en regiones templadas, en las faldas de las altas montañas, en ambientes muy cálidos y húmedos, en escaso suelo, en pronunciadas laderas o en amplios valles fértiles, en diferentes épocas del año y bajo múltiples sistemas de manejo y desarrollo. A esta gran diversidad de ambientes, los agricultores, indígenas o mestizos, mediante su conocimiento y habilidad, han logrado adaptar y mantener una extensa diversidad de maíces nativos.

El maíz como cultivo es un sistema dinámico y continuo. Su polinización es libre y hay movimiento o flujo de semilla por los agricultores año con año al mantener, intercambiar y experimentar con semilla propia o de otros vecinos de la misma localidad o de regiones distantes. A diferencia de las plantas silvestres, esto dificulta la distinción de unidades discretas para clasificar su diversidad. Una aproximación a su estudio y entendimiento ha sido seleccionar en este continuo las principales unidades (tipos o formas) que le caracterizan y a las que se han denominado razas. El término raza se ha utilizado en el maíz y en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo. Las razas se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales, los cuales se asocian a una distribución geográfica y climática más o menos definida y a una historia evolutiva común.

El concepto y la categoría de raza son de gran utilidad como sistema de referencia rápido para comprender la variación de maíz, para organizar el material en las colecciones de bancos de germoplasma y para su uso en el mejoramiento, así como

para describir la diversidad a nivel de paisaje. Sin embargo, cada raza puede comprender numerosas variantes diferenciadas en formas de mazorca, color y textura de grano, adaptaciones y diversidad genética.

Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas (Cónico, por la forma de la mazorca), tipo de grano (Reventador, por la capacidad del grano para explotar y producir palomitas), por el lugar o región donde inicialmente fueron colectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpan, Veracruz; Chalqueño, típico del Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (Zapalote Chico en el Istmo de Oaxaca o Apachito en la Sierra Tarahumara).

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz, de las cuales 64 (29%) se han identificado, y descrito en su mayoría, para México.

De las 64 razas que se reportan para México, 59 se pueden considerar nativas y 5 que fueron descritas inicialmente en otras regiones (Cubano Amarillo, del Caribe, y cuatro razas de Guatemala -Nal Tel de Altura, Serrano, Negro de Chimaltenango y Quicheño), pero que también se han colectado o reportado en el país.

Las razas de maíz de México se han agrupado, con base en caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas) en siete grupos o complejos raciales (Figura 2).

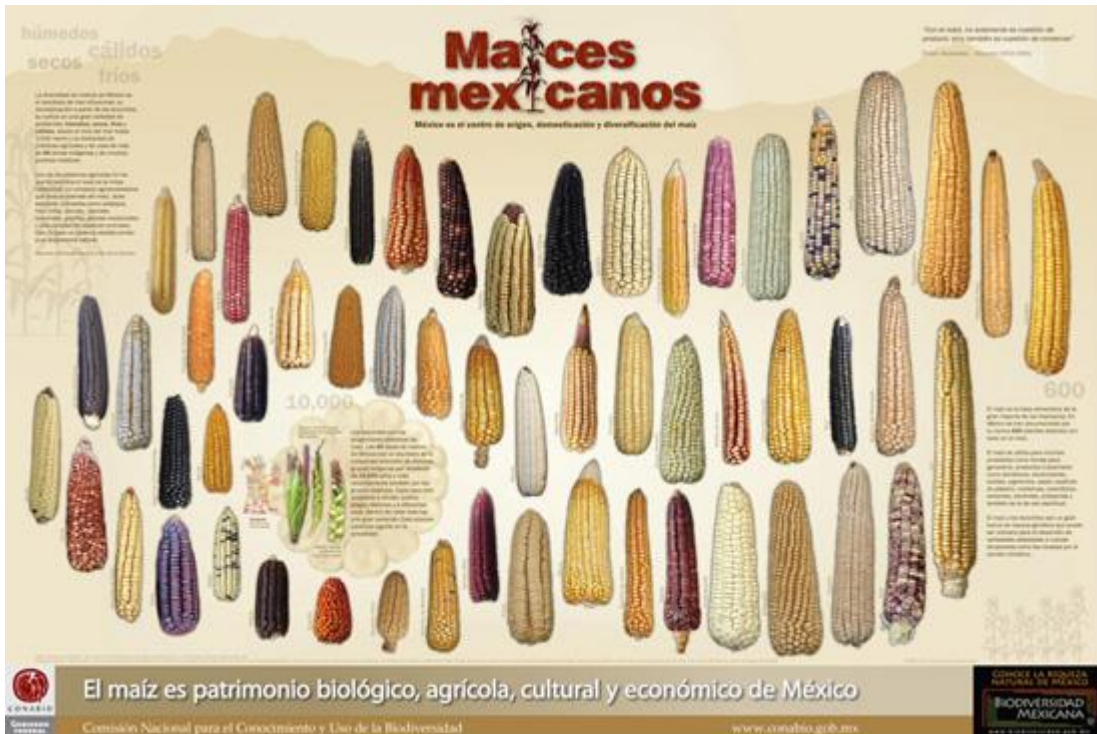


Figura 2. Razas de Maíz en México

A pesar de la enorme diversidad que se tiene en México en cuanto a razas y variedades de maíz nativas o criollas, es reducido el número de estudios realizados en maíces con pigmentos del tipo antociana. Solamente en algunas razas de maíz que presentan variantes de grano con pigmentos antocianínicos se ha determinado el contenido de antocianinas. Sin embargo, es necesario ampliar este tipo de estudios para cubrir una mayor cantidad de razas que presenten variantes de grano pigmentado de coloraciones rojas, moradas y azules. (Salinas Moreno *et al.* 2013)

4. Compuestos Bioactivos

4.1. Historia y definición de los compuestos bioactivos

Típicamente, los compuestos bioactivos de las plantas se producen como metabolitos secundarios (Bernhoft, 2010). Los metabolitos secundarios son aquellos que a menudo se producen en una fase posterior al crecimiento, no tienen ninguna función en este (aunque pueden tener la función de supervivencia), tienen estructuras químicas inusuales, y se forman a menudo como mezclas de miembros de una familia química (Martin y Demain, 1978). La producción de metabolitos

secundarios en diferentes especies es principalmente seleccionada a través del curso de la evolución y la necesidad particular de esa especie (Dudareva y Pichersky, 2000). De entre los metabolitos secundarios algunos tienen efecto sobre los sistemas biológicos, a estos se les consideran bioactivos. De manera simple, cuando se habla de los compuestos bioactivos en plantas se refiere a metabolitos secundarios capaces de producir efectos farmacológicos o toxicológicos en animales y humanos (Bernhoft, 2010)(Azmir *et al.*, 2013).

4.2. Clasificación y síntesis de compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos de las plantas se dividen en tres categorías principales: (a) terpenos y terpenoides (aproximadamente 25000 tipos), (b) alcaloides (aproximadamente 12000 tipos) y (c) compuestos fenólicos (aproximadamente 8000 tipos) (Croteau *et al.*, 2000).

Las estructuras generales de las diferentes categorías de compuestos bioactivos se muestran en la figura 3.

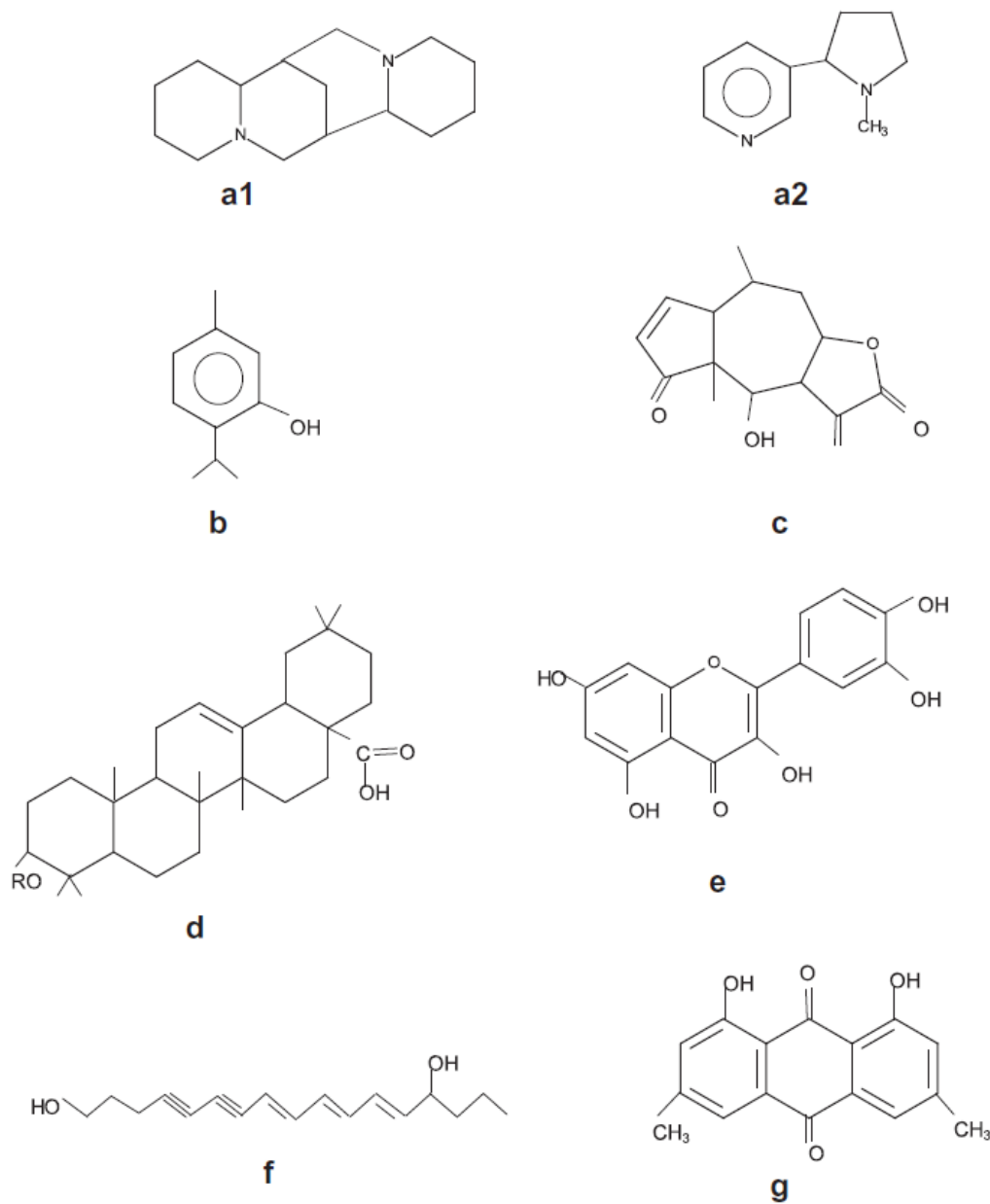


Figura 3. Estructuras generales de las diferentes categorías de compuestos bioactivos: alcaloides (a1 y a2), monoterpenos (b), sesquiterpenos (c), triterpenos, saponinas, esteroides (d), flavonoides (e), poliacetilenos (f), policétidos (g) (Azmir *et al.*, 2013).

La mayoría de los compuestos bioactivos pertenecen a una de las familias; de los cuales, cada uno tiene características estructurales particulares derivados de la forma en que se construyen en la naturaleza (biosíntesis). Hay cuatro vías principales para la síntesis de compuestos bioactivos (Figura 4): (1) ruta del ácido

shikímico, (2) ruta del ácido malónico, (3) vía del ácido mevalónico y (4) ruta del metileritritol fosfato (MEP) (Tiaz y Zeiger, 2006). Los alcaloides son producidos por los aminoácidos aromáticos (vía ácido shikímico) y por los aminoácidos alifáticos (Ciclo del ácido tricarbóxico). Los compuestos fenólicos se sintetizan a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. A través de la ruta del ácido mevalónico y vía MEP se producen los terpenos (Azmir *et al.* 2013).

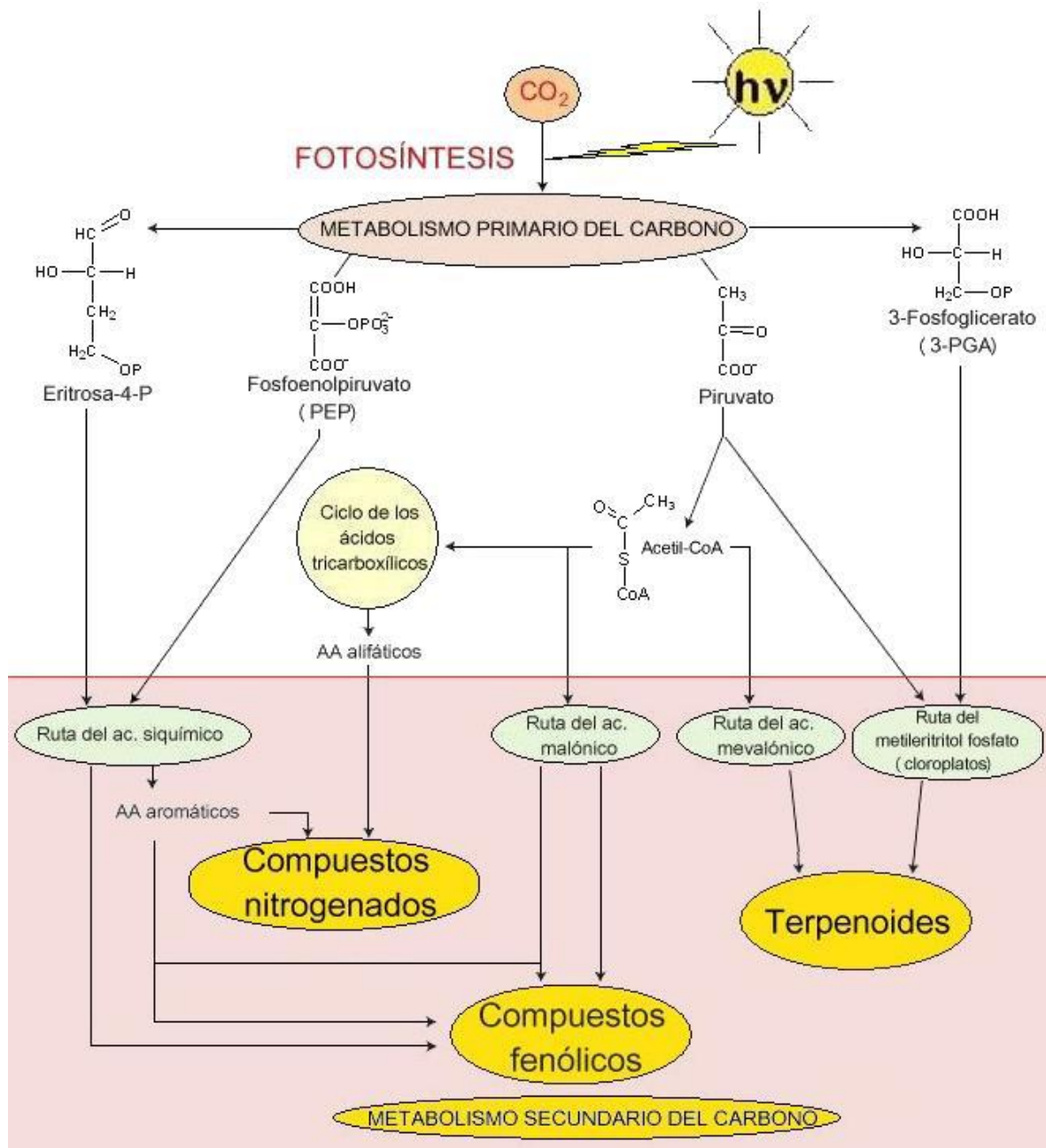


Figura 4. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios. (Ávalos Y Elena 2009)

5. Compuestos Bioactivos en Maíz

Algunos compuestos bioactivos, como carotenoides, antocianinas y compuestos fenólicos, que están asociados con la promoción de la salud y prevención de enfermedades, que están presentes en frutas y verduras, se han reportado también en maíz.

A continuación, se describen los compuestos bioactivos que se encuentran en Maíz, así como sus propiedades y características.

5.1. Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran fitohormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (estructura de membrana celular).

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (Figura 5). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

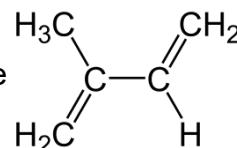


Figura 5. Isopreno

El grupo de los terpenos, incluye fitohormonas, pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en la industria alimentaria y cosmética. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaria, antimicrobianas, etc.

Los terpenos de mayor tamaño son los tetraterpenos y politerpenos, entre los que se encuentran los carotenoides (Figura 6) (Ávalos Y Elena 2009).

Además, los carotenoides con moléculas que contienen oxígeno son también conocidos como xantofilas, que son la fuente de color amarillo en el maíz. Los carotenoides varían en el maíz según el tipo y el genotipo (Adom y Liu, 2002).

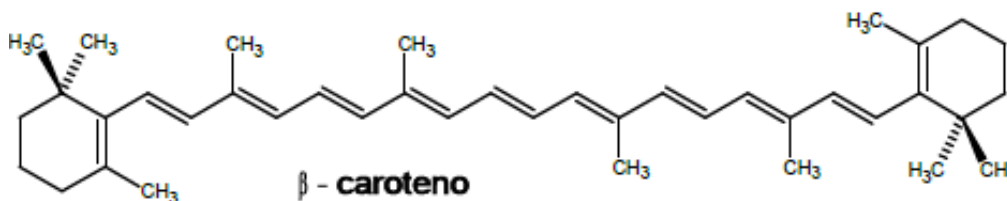


Figura 6. Estructura de β-caroteno

5.2. Carotenoides

Los carotenoides se localizan en los orgánulos subcelulares, cloroplastos, cromoplastos y, donde parecen estar asociados principalmente con proteínas y servir como pigmentos accesorios en la fotosíntesis.

Dos clases de pigmentos carotenoides, carotenos y xantofilas, son los responsables del color amarillo y naranja del endospermo del maíz. En general, α- y β-caroteno son los principales carotenos, mientras que β-criptoxantina, luteína y zeaxantina son la mayoría de las xantofilas. Además de la alta actividad antioxidante, α- y β-caroteno y β-criptoxantina han presentado actividades de provitamina A, mientras que la luteína y la zeaxantina han atraído mucha atención debido al posible papel en la prevención de cataratas (Zilić *et al.* 2012).

Algunos estudios acerca del contenido de β-Caroteno en el grano de maíces coloridos (Tabla 1) muestran que el contenido en maíz no representa una fuente considerable de dicho compuesto comparando con otra parte de la planta como lo son las hojas donde (Pérez *et al.* 2012) reportan una concentración de 5339 µg β-Caroteno/g b.s.

Tipo de Maíz	Concentración (µg β-Caroteno/ g grano b. s.)	Referencia
Blanco	0.00 – 0.04	
Amarillo	0.05 – 0.33	
Rojo	0.20	(Singh <i>et al.</i> , 2011)
Azul	0.23	
Alto en caroteno	0.45	
Maíces coloridos	1.35	(Ku <i>et al.</i> 2014)

Tabla 1. Contenido de β-Caroteno en diferentes muestras de granos de maíces coloridos.

5.3. Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos Y Elena 2009).

Los ácidos fenólicos y flavonoides representan la forma más común de los compuestos fenólicos que se encuentran en el grano de maíz entero; existen de forma soluble, ya sea libres o conjugado, o insolubles ligados a otros compuestos. La función más importante de los flavonoides solubles es su capacidad para impartir color a la planta en la que se producen. Los flavonoides son responsables de la mayoría de coloraciones naranja, escarlata, carmesí, malva, violeta, y azul en plantas (Cuevas Montilla *et al.* 2011).

Dentro de este grupo (Flavonoides) se encuentran las antocianinas, que se diferencian de otros polifenoles por poseer azúcares dentro de sus grupos funcionales y, en su mayoría, presentar varios grupos –OH. Las diferencias individuales entre las antocianinas dependen del número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de azúcares que están unidos a la molécula, a la posición de

esa unión y la naturaleza y número de ácidos aromáticos unidos al azúcar en la molécula. (Cuevas Montilla *et al.*, 2008)

La mayoría de los estudios en los que se analiza la concentración de antocianinas también realizan la cuantificación de fenoles totales y de manera general se reportan los resultados como equivalentes de ácido gálico o tánico por cada gramo de grano entero (Tabla 2).

Tipo de Maíz (color)	Concentración (mg ácido gálico/ g. grano b. s.)	Referencia
Negro	4.57– 5.65	(Lopez-Martinez <i>et al.</i> 2009)
Morado	5.39 – 34.00	
Rojo	2.83 – 6.17	
Azul	3.43	
Azul Mexicano	1.31	(Del Pozo-Insfran <i>et al.</i> 2006)
Azul Americano	0.45	
Púrpura ceroso	6.90	(Harakotr <i>et al.</i> 2014)
Coloridos	3.53	(Ku <i>et al.</i> 2014)
Blanco	1.70 – 2.60	(Singh <i>et al.</i> , 2011)
Amarillo	2.85 – 5.51	
Rojo	2.43 – 4.65	
Azul	2.66 – 3.43	
Alto en Caroteno	3.20	
Negro	4.57	
Morado	4.65	
Naranja	2.15	

Tabla 2. Contenido de Ácido gálico en diferentes muestras de granos de maíces coloridos.

5.4. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, designadas como A, B y C (Figura 7).

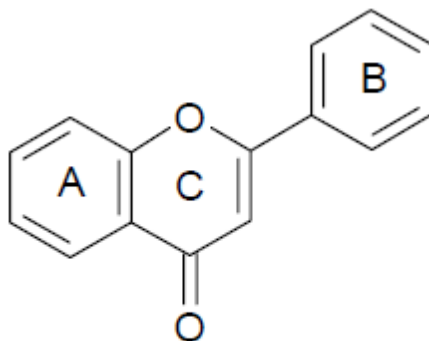


Figura 7. Estructura básica de un Flavonoide

Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas).

Está comprobado que los flavonoides son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del ambiente. Pueden actuar como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización.

En su relación con el hombre, se utilizan para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepática protectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas.

Otra de las propiedades de los flavonoides es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. Utilizados en la industria

de los cosméticos por su actividad desodorante y reductora de la hiperpigmentación causada por la vejez.

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) o agua (Cartaya Y Reynaldo, 2001).

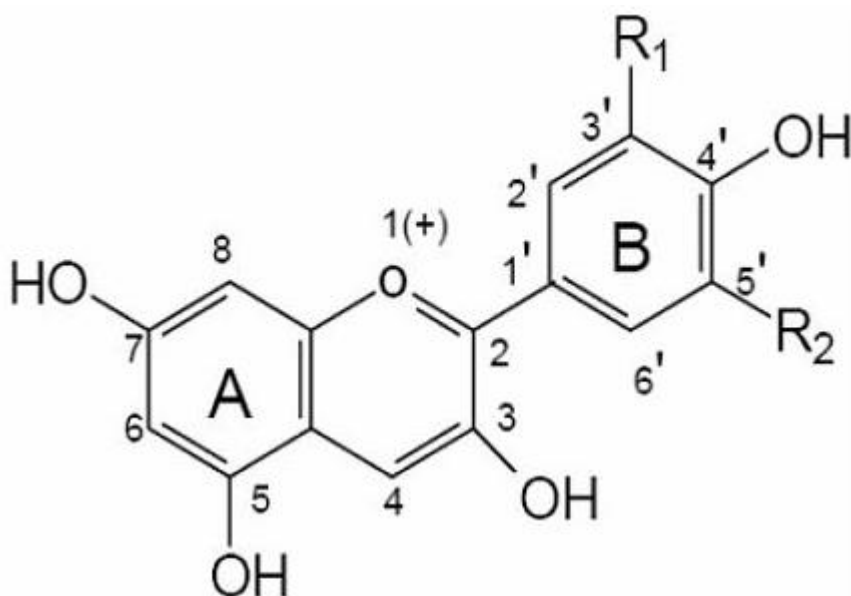
(Ku *et al.* 2014) en su estudio con maíces coloridos de la Universidad Nacional de Kyumgpook Korea reporta un promedio de 2.70mg equivalente de naringina/g grano b. s.

5.5. Antocianinas

Las antocianinas, son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visibles para el ojo humano; forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. (Cuevas Montilla *et al.*, 2008).

Son responsables de los colores rojo, púrpura y azul de muchas frutas, verduras y granos de cereales incluidos el Maíz. Simples o acilados, las antocianinas se encuentran principalmente en la capa de aleurona o pericarpio del endospermo del maíz, que afecta en gran medida el color del grano.

Su fórmula básica está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos (Figura 8). Se trata de flavonoides, es decir, sustancias derivadas del núcleo flavano, con un anillo-A benzoil y un anillo-B hidroxicinamoil (Durst y Wrolstad, 2001).



Aglicona	Substitución		λ_{max} (nm)
	R1	R2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura 8. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

La diferencia de color depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, etc. (Cuevas Montilla *et al.*, 2008).

Estas son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino. En medio ácido (pH 1) la forma predominante es la del ión flavilio, el cual da el color rojo; en un pH entre 2 y 4 la base quinoidal predomina dando coloración azul. En un pH entre 5 y 6 predomina la pseudobase carbinol y el pH superior a 7 predomina la chalcona dando una coloración amarilla. (Figura 9).

Las antocianinas tienen su máxima expresión de color a valores de pH ácidos y su forma incolora se produce a pH neutros o alcalinos (González Cruz 2013).

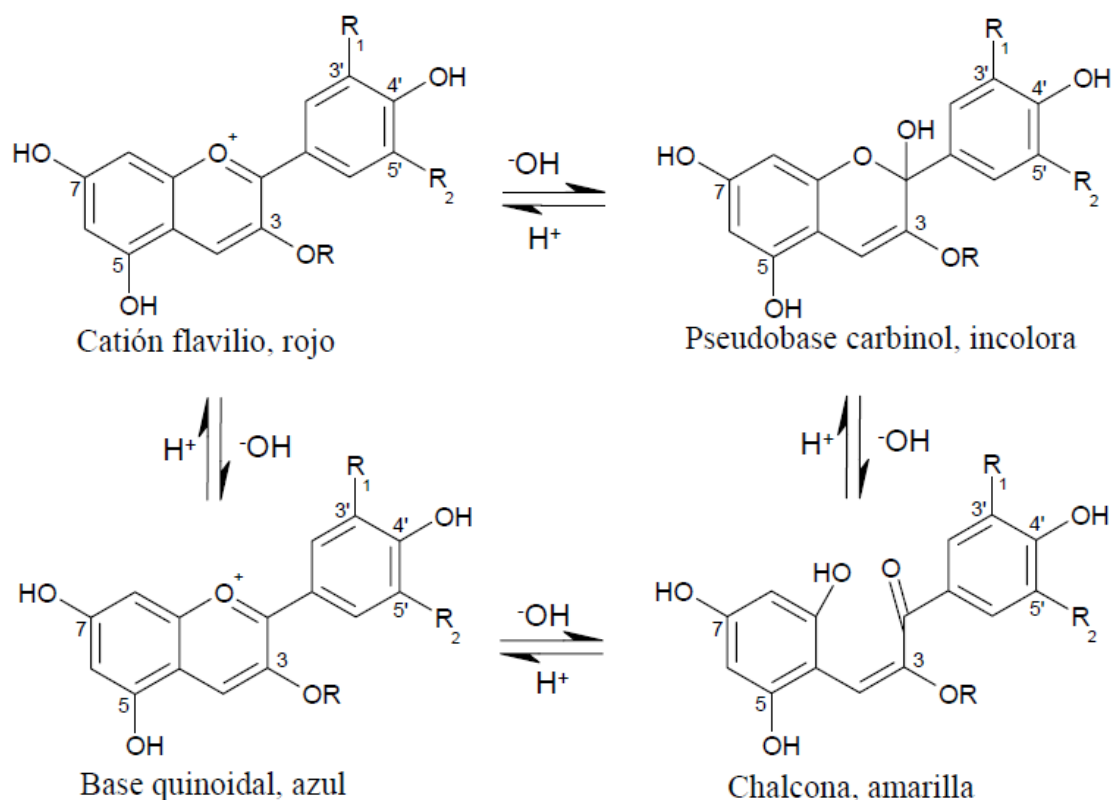


Figura 9. Estructura de las antocianinas en función del pH (Cuevas Montilla *et al.*, 2008).

Al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas (figura 10), a las cuales se les une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico. La estructura de la antocianina es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio. Las más comunes formas de antocianidinas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina.

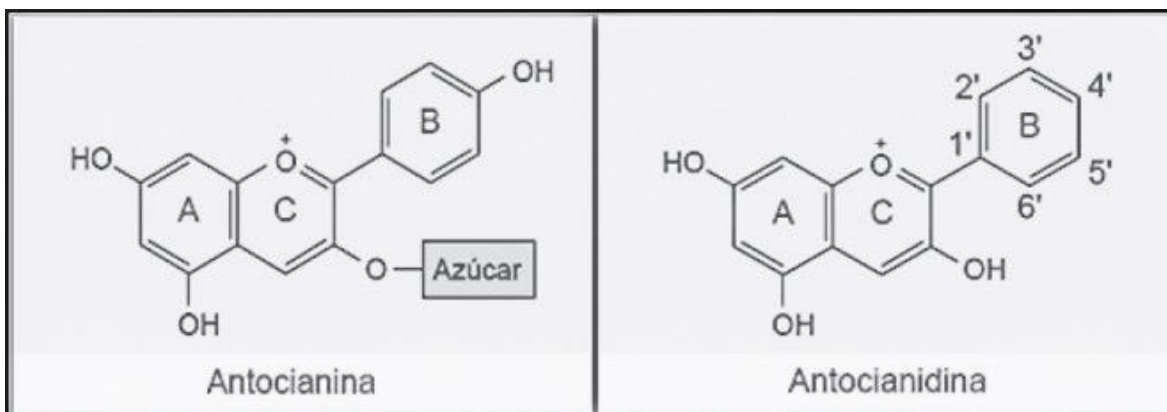


Figura 10. Estructura de la Antocianina y Antocianidina

Las clases comunes de glucósidos son: 3-monósido, 3-bióside y 3-trióside, así como también 3,5-diglicósido y más raramente el 3,7-diglicósido con glucosa, galactosa, arabinosa (es uno de los más frecuentes) y xilosa. Las antocianinas poseen uniones de azúcar en el anillo-B 3' y 5'-hidroxilos. Los dos tipos más importantes de glucósidos son: el 3-monósidos y el 3-4-diglicósido. Como regla el 3-hidroxil siempre tiene un azúcar, exceptuando 3-desoxipelargonidina, 3-desoxicianidina y 3-desoxidelfina.

Además de la glucosilación, la introducción de moléculas aciladas es un efecto que ocurre ampliamente. Los grupos comunes de acilo son los ácidos aromáticos de los cuales los más comúnmente encontrados son ácidos hidroxicinámicos: p-coumárico, cafeico y ferúlico, y más raramente el hidroxibenzoico. El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo. Todas las antocianinas son derivadas del catión flavilo básico. Se conocen más de 100, las diferencias entre ellas se debe al número de grupos hidróxilos, el grado de metoxilación de éstos grupos, así como la naturaleza y el número de los ácidos aromáticos y alifáticos presentes en la molécula. De todas las antocianinas existentes, sólo seis son de interés en los alimentos: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 11).

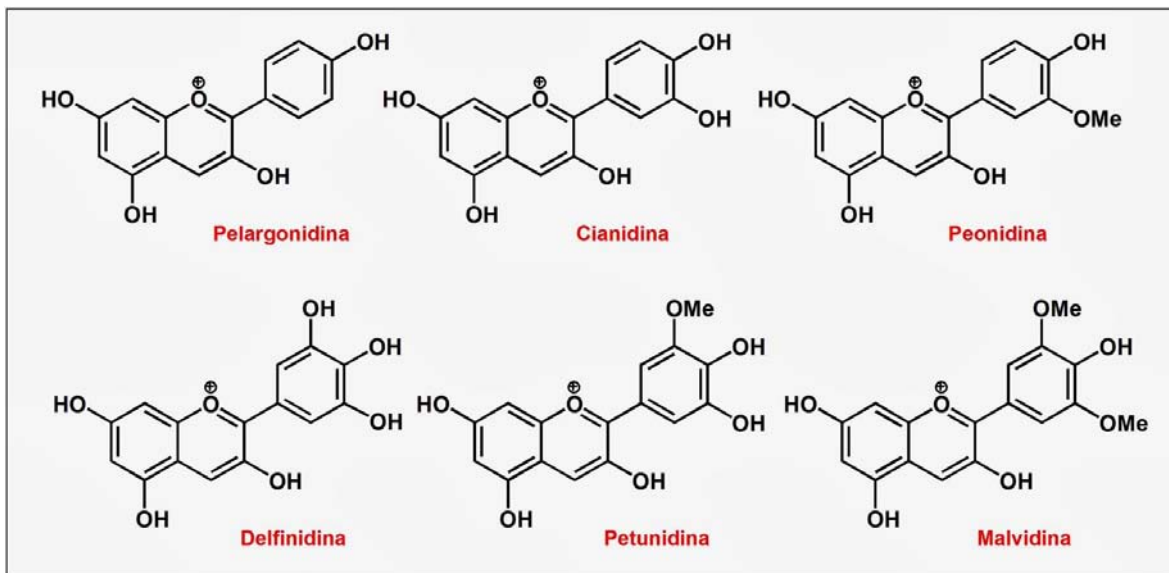


Figura 11. Antocianinas de interés en alimentos

Es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargonidina es la que produce el color rojo escarlata de algunas flores y de las fresas; la delfinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en col roja, higos, cerezas, ciruelas, y otros frutos (Cuevas Montilla *et al.*, 2008).

En maíz morado, la cianidina-3-glucósido, cianidina-3- (6''-malonilglucosido), y cianidina-3- (3'',6''-dimalonilglucosido) se han determinado como las principales antocianinas, siendo cianidina el principal aglicón (73-87%). Pequeñas cantidades de derivados pelargonidina y peonidina han sido también reportados en la planta. (Cuevas Montilla *et al.*, 2011)

En el maíz azul, cianidina y malvidina son las mayoritarias, mientras que en maíz rojo predomina una mezcla de pelargonidina, cianidina y malvidina (Adom y Liu, 2002).

Maíces rojos, azules y morados son ricos en antocianinas; que además del color que imparten, hay un interés intensificado en éstas debido a sus efectos beneficiosos para la salud. Exhiben importantes propiedades antioxidantes y propiedades bioactivas. Aunque estas se consideran como no nutritivas, las

antocianinas de maíz morado se han asociado con beneficios a la salud por su alto poder antioxidante y actividad antirradicales, entre muchos otros mecanismos, como antimutagenesis. Reducen la presión arterial sistólica de ratas hipertensas, previenen la obesidad y la diabetes en ratones (Cuevas Montilla *et al.*, 2011).

Existen múltiples estudios donde se reporta tanto el contenido total de antocianinas como el perfil de las mismas en muestras de maíz colorido. Dichos estudios se refieren tanto a muestras de maíces mexicanos como de variedades desarrolladas en otros países (Tabla 3).

Tipo de Maíz (color)	Concentración (mg C3G/ g. grano b. s.)	Referencia
Negros	0.76 – 1.20	(Lopez-Martinez <i>et al.</i> 2009)
Morados	0.93 – 8.50	
Rojos	0.62 – 8.52	
Azules	0.99	
Blanco	0.013 – 0.015	(Singh <i>et al.</i> ,g 2011)
Amarillo	0.005 – 0.702	
Rojo	0.097 – 0.852	
Azul	0.368 - .995	
Alto en caroteno	0.046	
Negro	0.762	
Morado	0.932	
Naranja	0.306	(Del Pozo-Insfran <i>et al.</i> 2006)
Azul Mexicano	0.30	
Azul Americano	0.30	(Harakotr <i>et al.</i> 2014)
Púrpura ceroso	0.75	
Azul de Chiapas	0.21 – 0.90	(Salinas Moreno <i>et al.</i> 2012)
Maices coloridos	0.30	(Ku <i>et al.</i> 2014)

Tabla 3. Contenido de Cianidia-3-glucósido (C3G) en diferentes muestras de granos de maíces coloridos.

5.5.1. Perfil de Antocianinas

De acuerdo con (Fernández Aulis 2014), la cromatografía por capa fina (CCF) nos presenta dos datos importantes para conocer de manera rápida el perfil de antocianinas en las muestras. La coloración (determinada por la antocianidina o núcleo base de la antocianina), la cianidina, malvidina y peonidina presentan una coloración rosa y morada, la pelargonidina roja y la delphinidina azul. Por otro lado, el RF o factor de retención indica si las antocianinas presentan acilación (0 a 0.5) o no (0.5 a 1).

Referente a la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) la acilación de las antocianinas aumenta su interacción con la fase estacionaria, lo que da como resultado que las antocianinas aciladas presenten los tiempos de retención más altos. La cianidina-3-(6''malonil)glucósido (C36G) es la primera antocianina acilada en eluir mientras que las antocianinas aciladas con ácidos hidroxycinámicos presentan un tiempo de retención mayor.

Con base en estos resultados se estableció la zona en la que se detectan las antocianinas aciladas partiendo del tiempo de retención de la C36G (14 min).

De esta forma, se identifican las principales antocianinas del grano de maíz morado de Ixtenco (Tlaxcala, México) (Figura 12): pico 1 cianidina-3-glucósido (C3G), el pico 2 pelargonidina-3-O-glucósido (Pg3G), pico 3 peonidina-3-O-glucósido (Pn3G), pico 4 cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (C36G), el pico 5 como peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pn36G) y el pico 6 como pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pg36G) (Fernández Aulis 2014).

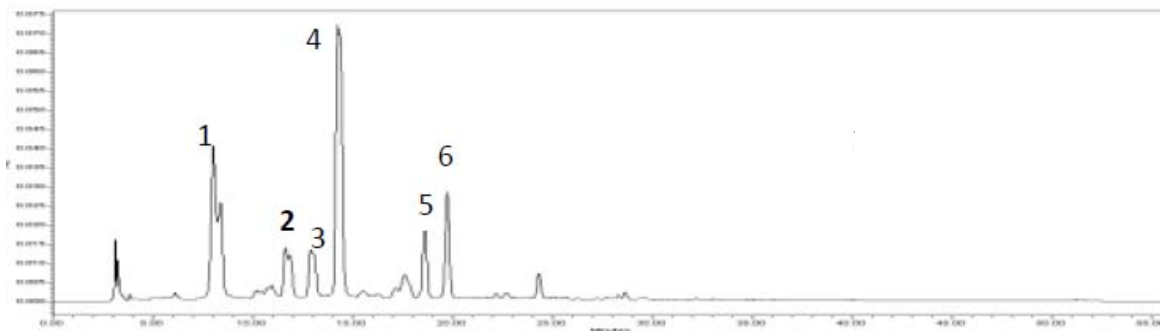


Figura 12. Principales antocianinas en Maíz morado de Ixtenco (Tlaxcala, México) (Fernández Aulis 2014).

Otros estudios acerca del perfil de antocianinas mediante el uso de la cromatografía de alta resolución reportan resultados similares (Tabla 4).

Tipo de Maíz (color)	Perfil de antocianinas	Referencia
Morado	C3G, P3G, Pn3G, C36G, Pn36G	(Yang Y Zhai 2010)
Azul	C3G, C36G	(Cuevas Montilla <i>et al.</i> , 2008)

Tabla 4. Perfil de antocianinas en maíces coloridos

5.6. Ácidos Hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, *p*-cumárico y sináptico) (Figura 13A) son componentes menores de la pared celular vegetal.

En las gramíneas, los monómeros de ferulato están unidos a los polímeros de hemicelulosa de la pared celular mediante enlaces tipo éster, a través de su grupo ácido carboxílico con el grupo hidroxilo del carbono 5 de las α -arabinosas en las cadenas de hemicelulosa (Figura 13B) (Barros-Ríos *et al.*, 2011).

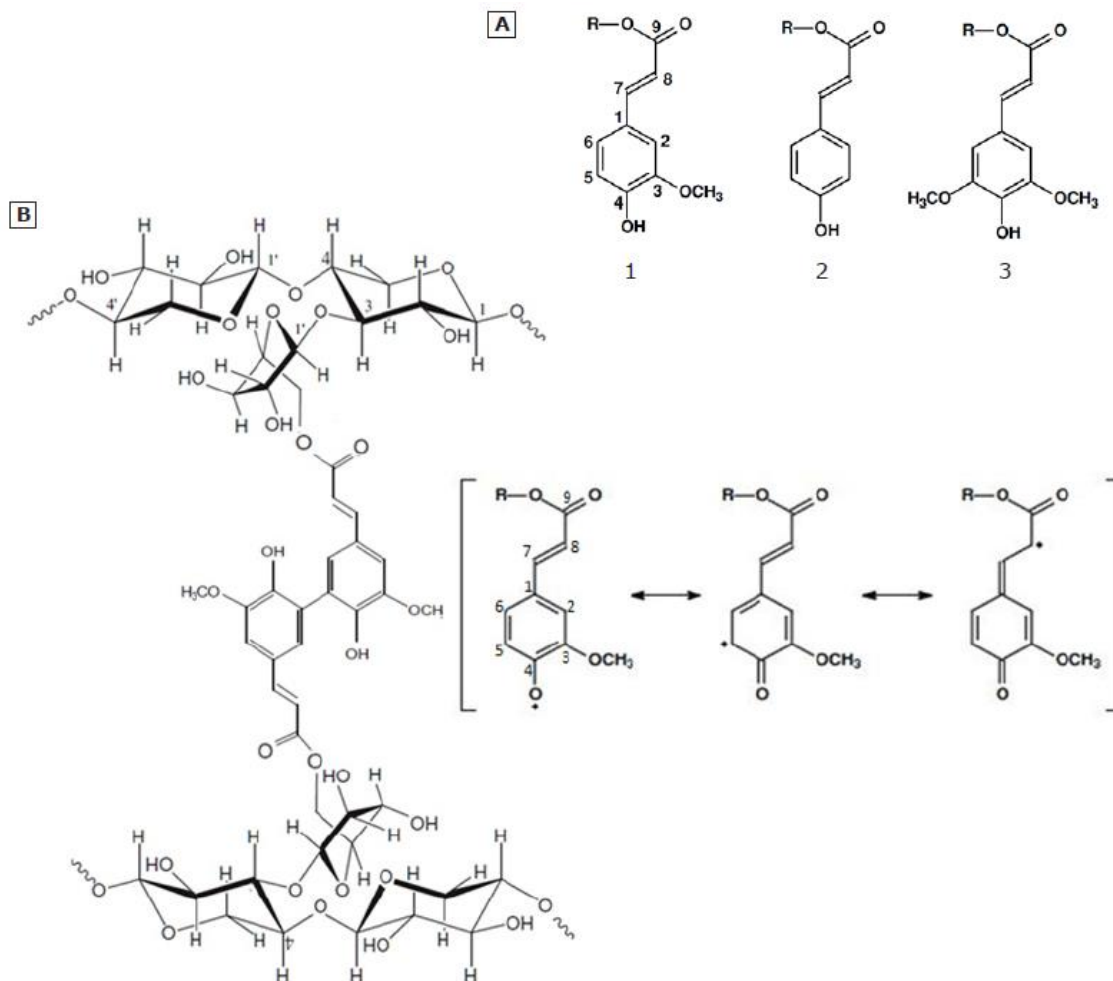


Figura 13. (A) Estructuras de los ácidos hidroxicinámicos en su configuración *trans*: 1. ácido ferúlico, 2. ácido *p*-cumárico y 3. Ácido sináptico. (B) Enlace entre dos cadenas arabinoxilanos de la pared celular mediados por el ácido diferúlico 5-5- y combinación de enlaces posibles entre diferulatos (Barros-Ríos et al., 2011).

5.6.1. Ácido Ferúlico

Ácido Ferúlico es el nombre común del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico. Aislado de plantas generalmente existe como el isómero *trans*; es soluble en etanol, acetato de etilo y agua caliente; moderadamente soluble en éter y ligeramente soluble en benceno y éter de petróleo.

Es un fuerte ácido dibásico; la disociación del primer protón produce el anión carboxilato, la del segundo protón genera el anión fenolato. El isómero *trans*

absorbe fuertemente en el UV a una longitud de onda de 248 nm y 307 nm en solución acuosa pH=6; también exhibe una fuerte fluorescencia.

Generalmente se encuentra como ésteres, covalentemente conjugado con mono y disacáridos, polisacáridos de la pared celular, glicoproteínas, lignina, betacianinas y otros carbohidratos y biopolímeros insolubles de la pared celular.

Es uno de los principales compuestos polifenólicos en el maíz y puede extraerse de diferentes maneras, las más conocidas son mediante el uso de resinas de absorción o por medio de hidrólisis alcalina, utilizando más comúnmente NaOH a concentraciones de 0.5 a 2.0 N y tiempos de hidrólisis de 6 a 1 o 2 horas respectivamente, sin embargo se debe ser muy cuidadoso con el tratamiento, ya que condiciones muy suaves pueden no separar del todo el ácido ferúlico de los componentes de la pared celular, pero condiciones muy severas pueden oxidarlo. Por tal motivo, se puede encontrar en el nejayote, residuo de la nixtamalización del maíz, en importantes cantidades (González Vázquez 2009).

Algunos estudios en maíces coloridos, efectúan mediciones del contenido de ácido ferúlico en los granos de estos (Tabla 5).

Tipo de Maíz (color)	Concentración (mg Ácido Ferúlico/ g. grano b. s.)	Referencia
Blanco	1.20 – 1.48	(Singh <i>et al.</i> ,g 2011)
Amarillo	1.02 – 1.40	
Rojo	1.30 – 1.53	
Azul	1.30 – 1.52	
Alto en caroteno	1.53	
Negro	1.51	
Morado	1.54	
Naranja	1.64	
Maíces coloridos	1.50	

Tabla 5. Contenido Ácido ferúlico en diferentes muestras de granos de maíces coloridos.

5.7. Xilano Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo material más abundante en las plantas después de la celulosa. Son polímeros ramificados de bajo peso molecular con un grado de polimerización de 80-200. Su fórmula general es $(C_5H_8O_4)_n$, y se llaman pentosanos y hexosanos, respectivamente. Las hemicelulosas están constituidas de un número de residuos de azúcar. Los principales son la D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ácido D-glucurónico, 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-galacturónico, y, en menor medida, L-ramnosa, L-fucosa, y azúcares neutros O-metilados. La hemicelulosa más abundante en plantas anuales es el arabinoxilano. Contiene una columna vertebral de D-xilopiranosil. (Peng *et al.* 2009)

A diferencia de la celulosa, los polisacáridos de hemicelulosa son sintetizados en el aparato de Golgi y secretados en vesículas a la pared. La composición de la hemicelulosa en el maíz contiene glucuronoarabinoxilanos (GAX) como principal polisacárido hemicelulósico. Los β -glucanos con enlaces mixtos son también polisacáridos hemicelulósicos y son los más abundantes en la pared celular del maíz.

La estructura base de los GAX (Figura 14) es una cadena lineal de residuos de xilosa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y sustituciones de α -L-arabinosa y α -D-ácido glucurónico. Los residuos de α -L-arabinosa están unidos al residuo de xilosa en la posición O-3, y los de α -D-ácido glucurónico en la posición O-2. La unidad de arabinosa puede ser sustituida con ácido ferúlico. La biosíntesis de GAX y las enzimas responsables de la inclusión de residuos de arabinosa en las cadenas de xilanos en maíz está siendo actualmente estudiada (Barros-Ríos *et al.*, 2011).

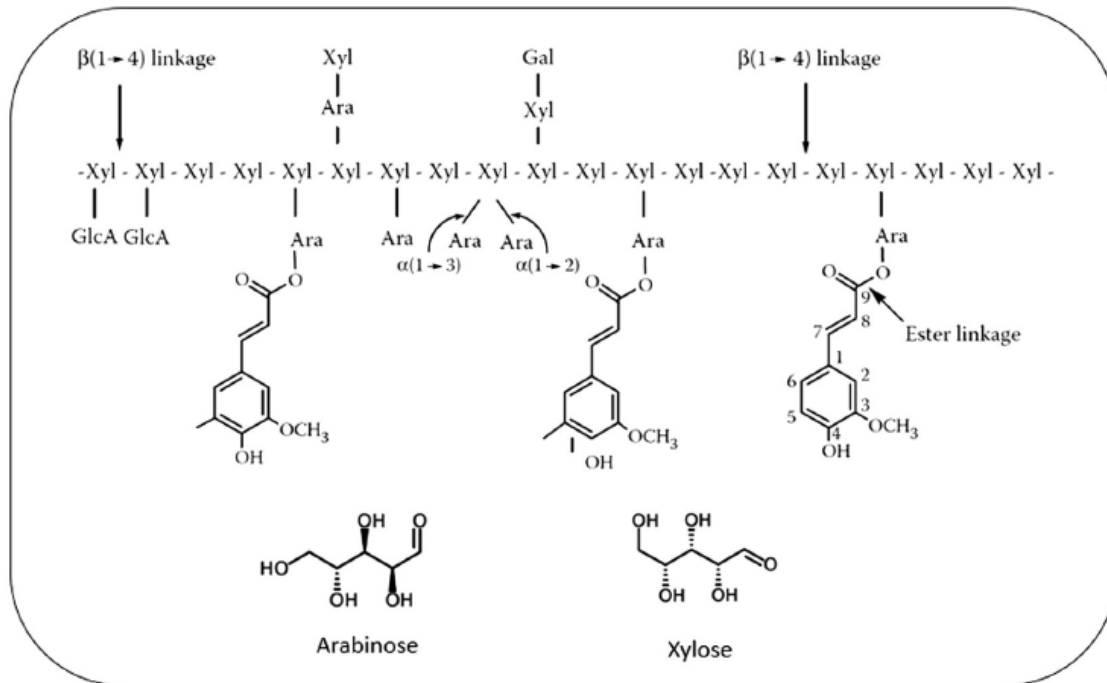


Figura 14. Estructura general de los AX (Barros-Ríos *et al.*, 2011).

Los Arabinoxilanos (AXs) son un grupo importante de hemicelulosas que se encuentran en las células del endospermo y paredes de los cereales.

Desde la década de 1980, los AXs son de interés para los químicos de cereales, ya que se ha determinado que tienen una influencia significativa en la calidad de la masa de pan. Además, como resultado de sus excelentes propiedades de retención de agua de alta viscosidad y, han sido utilizados como agentes espesantes y estabilizantes en alimentos.

El salvado de cereal es una fuente rentable de AXs, ya que es un subproducto del procesamiento de los mismos (Zhang *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS

Si se realiza un proceso de hibridación y mejoramiento en maíces coloridos, con el fin de obtener un producto de interés comercial, dicho proceso no debería afectar el contenido de compuestos bioactivos en los maíces coloridos.

OBJETIVOS

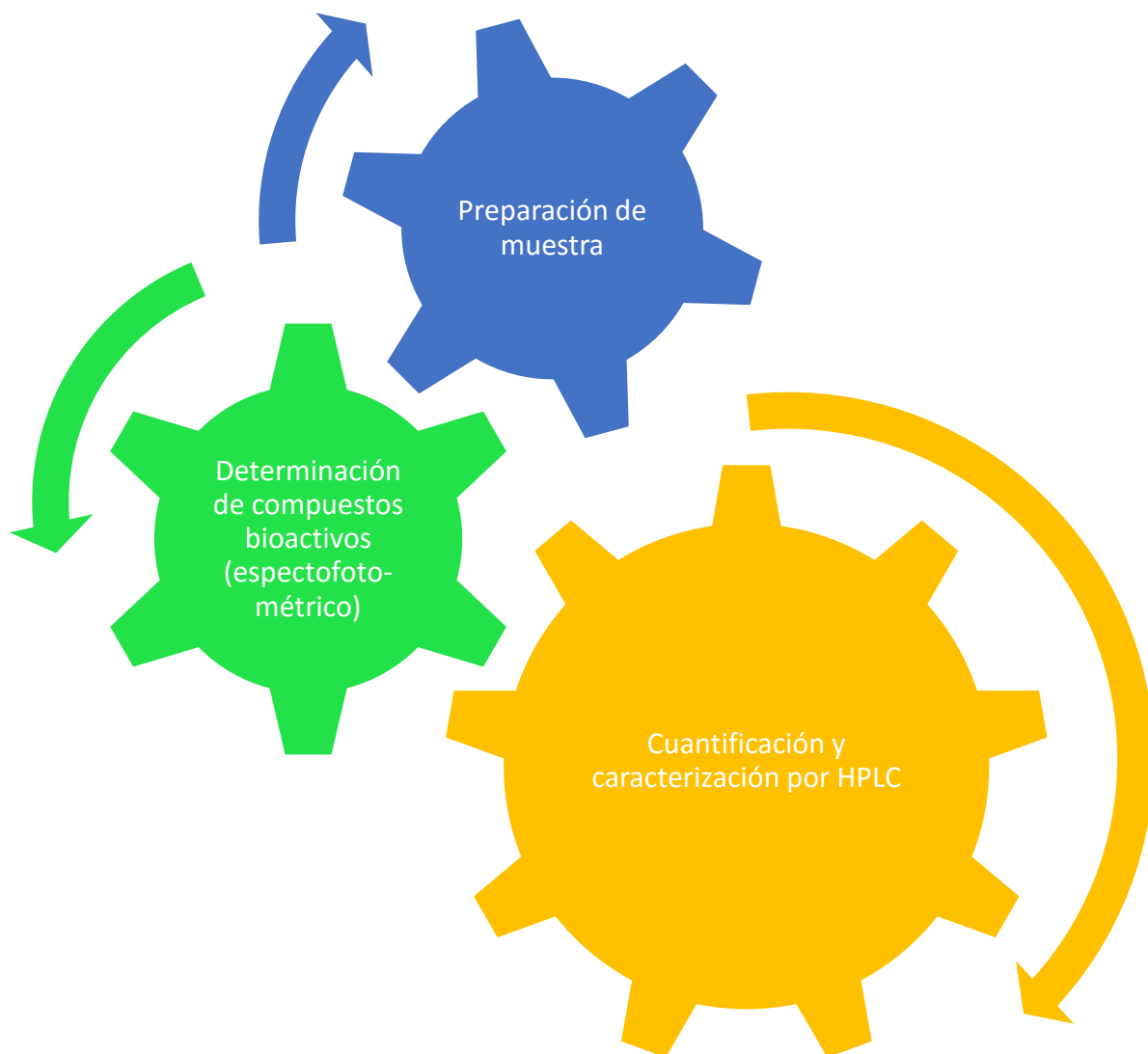
Objetivo General

Analizar y caracterizar moléculas de interés biológico y comercial (Antocianinas, Fenoles, Carotenos, ácidos hidroxicinámicos y xilanos) en una serie de 14 muestras de maíces azules tanto híbridos como criollos además de 8 muestras de maíces criollos como referencia, incrementar el acervo de conocimiento respecto a los maíces coloridos nativos de México.

Objetivos particulares




- Cuantificar por medio de métodos espectrofotométricos las moléculas citadas en los objetivos generales para comparar el su contenido en las distintas muestras.
- Determinar el perfil de antocianinas por HPLC con el fin de establecer un panorama de referencia para maíces coloridos.
- Cuantificar ácidos hidroxicinámicos por HPLC con el fin de establecer un panorama de referencia para maíces coloridos.
- Identificar de las muestras analizadas, cuales podrían ser fuente importante de las moléculas.






ESTRATEGIA EXPERIMENTAL













Materiales y equipo

- Molino KRUPS GX4100
- Sonicador Branson 3510
- Rotovapor R215 con baño de calentamiento, controlador y bomba de vacío Büchi
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters con autoinyector (2707), bomba (1525) y detector UV (2478). Software Empower 2.
- Balanza analítica OHAUS AP1105
- Espectrofotómetro GBC-CINTRAL
- Centrífuga Ependorf (5000 rpm)

Nombre	Código	Tipo	Color	Imagen	Procedencia
Ahuatepec	Ahu	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
Atenco	Ate	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
Citlali	Cit	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP

Cocotitlan	Coc	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
Malitzi	Mal	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
Puebla	Pue	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
Sierra Negra	SN	Criollo mejorado	Azul		CEVAMEX INIFAP
H. Azul 10	10	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP

H. Azul 12	12	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP
H. Azul 14	14	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP
H. Azul 1107	1107	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP
H. Azul 1112	1112	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP
H. Azul 1114	1114	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP

H. Azul 1124	1124	Híbrido	Azul		CEVAMEX INIFAP
Chiapas	Chi	Criollo	Azul		Chiapas, México
Oaxaca	Oax	Criollo	Morado		Oaxaca, México
Peruano	Per	Criollo*	Morado		CEVAMEX INIFAP
Tehuacán	Teh	Criollo	Morado		Tehuacán, Puebla
Elotes Occidentales	Occ	Criollo	Morado		CEVAMEX INIFAP
San Gabriel 1	SG1	Criollo	Morado		San Gabriel Xilac, Puebla

San Gabriel 2	SG2	Criollo	Morado		San Gabriel Xilac, Puebla
Ixtenco	Ix	Criollo	Morado		Ixtenco, Tlaxcala

Tabla 6. Datos de muestras de maíces coloridos

Desarrollo experimental por etapas

La metodología experimental consistió en 3 etapas: 1) Recepción y preparación de las muestras; 2) Cuantificación de compuestos bioactivos por métodos espectrofotométricos; 3) Caracterización del perfil de antocianinas y cuantificación de ácidos hidroxicinámicos por HPLC y cuantificación de Xilanos.

Etapa 1. Preparación de las muestras

Las 22 muestras de maíces coloridos con las que se trabajó (Tabla 6), consistían en el material completo (Mazorca entera; olote, grano, totomoxtle) del cual solo se trabajó con el pericarpio del grano.

Para obtener el pericarpio seco, dichas muestras se secaron en estufa a una temperatura de 45-50°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a desgranar las mazorcas de maíz para obtener los granos, los cuales se molieron durante 2 min en un molino KRUPS®. La molienda obtenida se tamizó con una malla 60 separando el almidón del pericarpio (*Pericarpio1*). Se registra la proporción de pericarpio obtenida del grano entero para poder reportar los resultados tomando como referencia el grano entero.

Etapa 2. Cuantificación de compuestos bioactivos por métodos espectrofotométricos

a) Cuantificación de carotenos totales

- Se pesaron por triplicado 2.0g de *pericarpio1* y se adicionó 10mL de hexano/acetona/etanol (50:25:25 v/v).
- Se sonicó por 30min a 25°C.
- Se filtró con vacío utilizando papel filtro. Se conservó filtrado (*pericarpio2*)
- El sobrenadante se concentró en rotovapor evaporando el disolvente.
- El concentrado obtenido se llevó a un aforo de 25mL con hexano (*ExtractoC*).
- A partir de *ExtractoC* se cuantificó la concentración de carotenos totales por el método descrito en (Rodriguez-amaya 2001).

b) Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Antocianinas totales.

- Se secó *pericarpio2* durante 24 horas en estufa a 50°C. (*pericarpio3*)
- Se pesó por triplicado 1g de *pericarpio3* de cada una de las muestras y se adicionó 10mL de Metanol/agua/ácido acético (0.5%) (80:19:1 v/v).
- Se sonicó durante 30min a 25°C.
- Se filtró con vacío utilizando papel filtro. Se conserva filtrado (*pericarpio4*).
- El sobrenadante (*ExtractoP*) se utilizó para efectuar las mediciones de antocianinas por el método de pH diferencial descrito en (Lee, Durst, and Wrolstad 2005), fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau descrito en (Gasca Galvez 2013) y (García Romo, 2010) y flavonoides totales por el método descrito en (Moo-Huchin *et al.* 2014).

Etapa 3. Determinar el perfil de antocianinas y cuantificación de ácidos hidroxicinámicos por HPLC y cuantificación de Xilanos

a) Determinación de perfil de antocianinas

- Se realizaron lavados (extracciones liquido:liquido con embudo de separación) a *ExtractoP* con hexano (dos lavados en proporción 3:1 de hexano:Extracto) y Acetato de etilo (tres lavados en proporción 3:1 de Acetato de etilo:Extracto).
- El *ExtractoP* después de ser lavado se adsorbió en amberlita XAD-7HP y se desadsorbieron con metanol acidificado al 0.1% HCl.

- El *ExtractoP* se llevó a sequedad utilizando un rotovapor a 30°C. (*ExtractoA*).
- El *ExtractoA* se caracterizó en HPLC mediante la metodología descrita en (Fernández Aulis, 2012 y Ramírez Salinas, 2010);
- De manera conjunta se realizó una cromatografía de capa fina utilizando placa de sílica gel y como eluyente Butanol/ác. Acético/agua (3:2:1).

b) Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos

- Se pesaron 2g de *pericarpio4* y se hidrolizó con 40mL de Hidróxido de sodio 2N sonicando durante 45min a 25°C.
- Se llevó a pH 3 con HCl (36%)
- Se realizó la extracción líquido-líquido con 40mL acetato de etilo separando la fase acuosa (*ExtractoX*) de la orgánica (*ExtractoH*)
- El *extractoH* se concentró en rotovapor a 30°C y posteriormente se llevó a un volumen de 1.5mL con acetato de etilo. (*ExtractoH*)
- El *ExtractoH* fue utilizado para la cuantificación en HPLC de los ácidos hidroxicinámicos;
- De manera conjunta se realizó una cromatografía de capa fina utilizando placa de sílica gel y como eluyente Diclorometano:hexano (1:9).

c) Cuantificación de Xilano

- Al *ExtractoX* se le adicionó 40mL de acetona y se refrigeró durante 24 horas para precipitar los xilanos.
- Se filtró con vacío en malla de poliestireno y el residuo filtrado (*Xilano1*) se secó en estufa a 50°C durante 24 horas.
- Se pesaron 0.30g de *Xilano1* y se hidrolizó con 10mL de H₂SO₄ (6%) en reflujo durante 2 horas (*Xilano2*).
- Al producto hidrolizado (*xilano2*) se le determinó el contenido de xilosa mediante la prueba de DNS.

Métodos

A continuación, se describen las metodologías empleadas para la determinación de los compuestos bioactivos de las muestras estudiadas.

Cuantificación de Carotenos

Se tomó el *ExtractoC* y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

La concentración de carotenos se calculó con la siguiente fórmula y se expresa como µg de β-caroteno:

$$X(\mu\text{g}) = \frac{Abs_{450} * y(\text{mL}) * 10^6}{E * 100}$$

Donde:

X: concentración de β-Caroteno (µg)

y: volumen de aforo

E: coeficiente de extinción (2592)

Considerando el peso de la muestra, finalmente la concentración de caroteno se expresa en µg/g. grano.

(Rodriguez-Amaya 2001)

Cuantificación de Antocianinas

La cuantificación de antocianinas se efectuó por la metodología de pH diferencial (Lee *et al.*, 2005); se hace uso de dos buffers: pH1 (cloruro de potasio 0.025M) y pH4.5 (acetato de sodio 0.4M) así como de dos lecturas distintas en el espectrofotómetro, 510 y 700nm.

Las determinaciones se hicieron a partir de una dilución (1/10) del *ExtractoP* obtenido, puesto que una determinación directa se encontraba por encima del máximo de cuantificación. Del extracto diluido se tomaron 200µL y se mezclaron con 1800µL tanto del buffer de cloruros como de acetatos.

A ambos buffers se les midió la absorbancia a 510 y 700nm para finalmente obtener cuatro lecturas.

El contenido de antocianinas totales se expresa en mgCianidina-3-glucosido/L mediante la siguiente ecuación.

$$AT = \frac{\Delta A * PM * FD * 1000}{\epsilon * L}$$

Donde:

$$\Delta A = (abs_{510} - abs_{700})_{pH1} - (abs_{510} - abs_{700})_{pH4.5}$$

PM: 449.2 g/mol cianidina-3-glucosido

FD: 10

L: 1

ϵ : 26900

Considerando el volumen de disolvente en la extracción, el peso de la muestra y si se realizó alguna dilución, la concentración final se reporta en mgCianidia-3-glucosido/g grano.

Cuantificación de Fenoles

Para la determinación de Fenoles totales, se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu (Gasca Galvez, 2013), en la cual se toman 100 μ L del *ExtractoP* diluido (1:5) y se mezcló con 2ml de Na₂CO₃ al 2%. Después de 2min se agregaron 100 μ L de una solución del reactivo de Folin-Ciocalteu diluida con agua (1:1). Después de 30 min, se midió la absorbancia de la muestra a 750nm.

La concentración de fenoles totales se calculó usando una curva patrón de ácido tánico (Gráfico 4 en Anexo). Los resultados se expresan como mgÁcido Tanico/g grano.

Cuantificación de Flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó de acuerdo a la metodología descrita por (Moo-Huchin *et al.* 2014) en la cual se tomó 1ml del *ExtractoP* diluido (1/10) y se adicionó 1.4ml de agua destilada. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de NaNO₂ 5% y después de 5min, 300 μ L de AlCl₃ 10% y 2mL de NaOH 1M. Finalmente se

llevó a un volumen final de 10mL con agua destilada. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 415nm.

La concentración de flavonoides se calculó usando una curva patrón de catequina (Gráfico 5 en Anexo). Los resultados se expresan como mg Catequina/g grano

Cuantificación de Xilanos (DNS)

Para la determinación del contenido de Xilosa en los xilanos, se tomó una alícuota de 1mL de *Xilano2* y se adicionó 1mL del reactivo de DNS, se calentó la mezcla durante 5min en baño de agua hirviendo. Se dejó enfriar y se adicionaron 10mL de agua destilada y se leyó la absorbancia de la muestra a 540nm frente a un blanco de reactivos en el espectrofotómetro.

La concentración de Xilosa se calculó usando una curva patrón (Gráfico 6 en Anexo). Los resultados se expresan como mg Xilosa/g grano.

Determinación de perfil de Antocianinas

Para la caracterización del perfil de antocianinas se tomó el *Extracto A*. El sistema que se utilizó es el descrito por (Fernández Aulis, 2014) que se muestra en la Tabla 7.

Sistema			
Columna	ODS Hypersil Gold (250x4.5mm, 5µm)		
Detector	UV 520nm		
Fase móvil	A: H ₂ O/Acetonitrilo/Ácido fórmico (83:3:10) B: Acetonitrilo		
Volumen de inyección	20µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A	B
	0-45	97	3
	45-46	75	25
	46-47	70	30
	47-56	97	3

Tabla 7. Condiciones del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución para antocianinas.

Cuantificación de Ácidos Hidroxicinámicos

Para la cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos, se tomó el *ExtractoH* y se le realizó una dilución (1:2). El sistema utilizado se describe en la Tabla 8.

Sistema			
Columna	Symmetry C18 (3.9x150mm, 5µm)		
Detector	UV 280nm		
Fase móvil	A: Ácido acético 1% B: Metanol		
Volumen de inyección	10µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A	B
	0-10	80	20
	10-12.5	75	25
	12.5-15	70	30
	15-20	85	15
	20-23	90	10

Tabla 8. Condiciones del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución para ácidos hidroxicinámicos.

Previamente, se realizó una cromatografía de capa fina donde se compararon las muestras con estándares de ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, cumárico, caféico, cinámico) con el objetivo de determinar cuáles de estos estaban presentes; a su vez se realizó la inyección de los estándares en el HPLC.

La concentración de los ácidos presentes se calculó mediante una curva patrón (Gráfico 7 y 8 en Anexo) y el resultado se expresó como mg ácido/g grano.

Análisis estadístico

A todas las determinaciones por triplicado se le calculó la media de las réplicas, así como su desviación estándar.

Para el análisis de datos, se realizó el análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05 (ANOVA) de cada determinación y posteriormente se aplicó un

análisis de Diferencia Honestamente Significativa (DHS) de Turkey-Kramer para determinar si los resultados entre las diferentes muestras presentaban diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Preparación de las muestras

En la Tabla 9 se muestran las 22 muestras analizadas en tres grupos distintos (Maíces criollos azules mejorados, Maíces híbridos azules, Maíces criollos coloridos)

Grupos de Maíces		
Criollos azules mejorados	Híbridos azules	Criollos coloridos
Ahuatepec	H. Azul 10	Chiapas
Atenco	H. Azul 12	Oaxaca
Citlali	H. Azul 14	Peruano
Cocotitlan	H. Azul 1107	Tehuacán
Malitzi	H. Azul 1112	Elotes occidentales
Puebla	H. Azul 1114	San Gabriel 1
Sierra Negra	H. Azul 1124	San Gabriel 2
		Ixtenco

Tabla 9. Muestras de maíces por grupo

De las 22 muestras se tomaron los granos previamente secos, los cuales se molieron y tamizaron para obtener una fracción en la que su mayoría consiste en pericarpio y aleurona. No se trabajó con el grano molido entero debido a que el almidón del grano presentaba interferencias al momento de realizar las determinaciones espectrofotométricas; sin embargo, para fines comparativos con otros estudios los resultados reportados quedan referidos al grano entero al considerar la proporción de la muestra con la que se trabajó.

Etapa 2. Cuantificación de compuestos bioactivos por métodos espectrofotométricos

Durante esta segunda etapa del desarrollo experimental se realizaron las mediciones de los compuestos bioactivos.

Cuantificación de Carotenos.

En el caso de carotenos (Tabla 10), el contenido en los maíces analizados presentan una amplia variación; se tienen valores de entre 0.22 ± 0.01 y 4.50 ± 0.74 $\mu\text{g/g}$ para el caso de las muestras de maíces híbridos y mejorados, mientras que en los criollos los resultados varían entre 0.22 ± 0.01 y 0.82 ± 0.04 $\mu\text{g/g}$. Los maíces que presentaron la mayor concentración son: Cocotitlan, Puebla y Ahuatepec.

En contraste, analizando las Tablas 10 y 13 de manera conjunta, es de destacar una tendencia de disminución en el contenido de carotenos a medida que el grano presenta una mayor concentración de antocianinas.

Criollos mejorados		Híbridos		Criollos Coloridos	
Muestra	$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g grano}$	Muestra	$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g grano}$	Muestra	$\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g grano}$
Ahu	3.44 ± 0.24	10	2.51 ± 0.54	Chi	0.36 ± 0.04
Ate	2.38 ± 0.59	12	1.46 ± 0.52	Oax	0.82 ± 0.04
Cit	1.78 ± 0.47	14	1.08 ± 0.08	Per	0.56 ± 0.13
Coc	4.50 ± 0.74	1107	3.13 ± 0.73	Teh	0.69 ± 0.07
Mal	1.12 ± 0.73	1112	1.99 ± 0.11	Occ	0.27 ± 0.01
Pue	4.06 ± 0.50	1114	2.14 ± 0.46	SG1	0.68 ± 0.17
SN	3.05 ± 0.74	1124	2.31 ± 0.52	SG2	0.22 ± 0.01
				Ix	0.77 ± 0.11

Tabla 10. Contenido de carotenos totales en muestras de maíces coloridos.

De acuerdo con lo reportado en otros estudios, donde para maíces coloridos en general el promedio es de 1.35 $\mu\text{g/g}$ (Ku *et al.*, 2014) las muestras moradas están por debajo de esta cifra; sin embargo en el caso de los azules se reportan concentraciones de 0.22 $\mu\text{g/g}$ (Singh *et al.*, 2011).

En este caso en particular, el mejoramiento e hibridación de los maíces presenta una clara mejora en el contenido de carotenos.

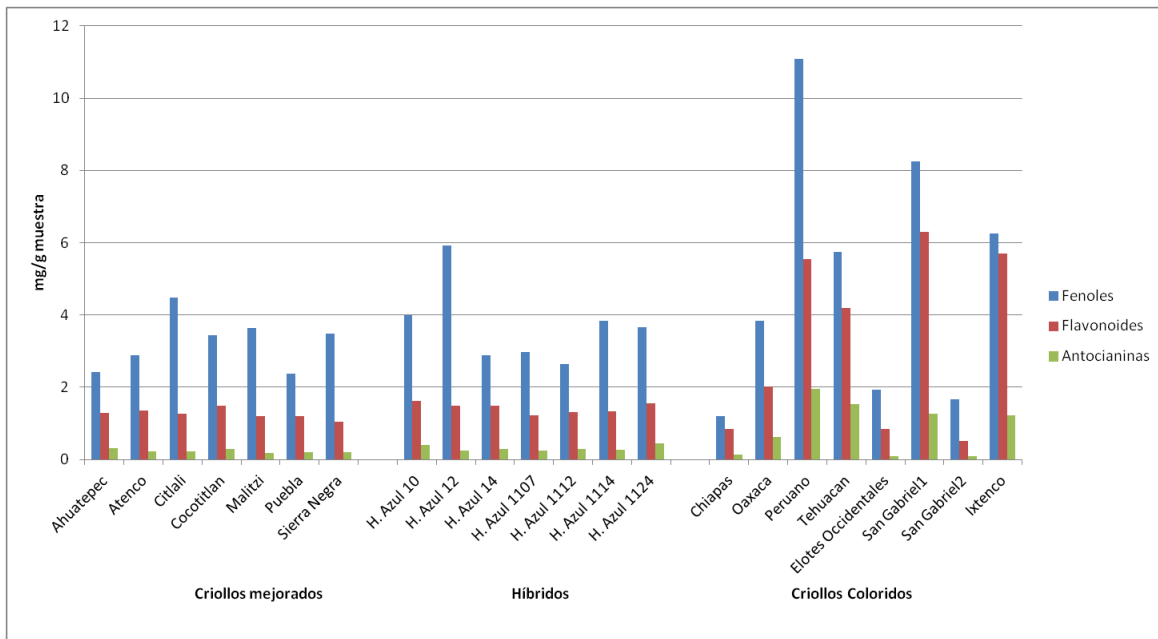
Aunque los coarotenos son de interés debido a que forman parte de los precursores de la vitamina A y a su vez esta es de importancia en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la vista, el contenido presente en las muestras no

representa una fuente apreciable para la obtención de los mismos (Rodríguez-Amaya, 2001); sin embargo, la parte del proceso llevada a cabo para su extracción (desengrasado de la muestra) facilita las subsecuentes extracciones.

Fenoles, Flavonoides y Antocianinas totales

Se sabe que las antocianinas son un tipo de flavonoide y estos a su vez pertenecen a un grupo más grande de compuestos que son los fenólicos (González Vázquez, 2009). Si bien las antocianinas encontradas no son los únicos flavonoides presentes (Fernández Aulis, 2012) y de igual manera no representan el total de fenoles, se espera la siguiente tendencia en el contenido de dichos compuestos: antocianinas < flavonoides < fenoles. De no ser así, significaría un error en las determinaciones.

De acuerdo con el gráfico 1 se muestra la tendencia antes citada en cada una de las muestras, donde los fenoles representan la mayor concentración seguida por los flavonoides y por último las antocianinas. Lo anterior es un indicador de que no existe tal error en el momento de haber llevado a cabo dichas determinaciones.



Gráfica 1. Comparativo de los contenidos de los Compuestos Fenólicos

Continuando con el análisis del Gráfico 1, destaca lo siguiente: entre las muestras de maíces azules (Criollos e Híbridos) no existe diferencia significativa dentro del contenido, tanto de flavonoides como de antocianinas. Esta tendencia a ser uniformes, puede deberse a que dichas muestras presentan características físicas similares y son de una misma variedad, contrario a los maíces morados donde las muestras son menos homogéneas y existe diferencia significativa entra cada una.

Fenoles totales

Para el análisis de fenoles totales, la Tabla 11 muestra la concentración de este compuesto, donde podemos observar que los maíces azules no presentan una amplia variación teniendo un intervalo de 2.43 ± 0.13 a 5.91 ± 0.51 mg/g destacando al híbrido 12 con la máxima concentración.

Por otro lado, en los morados el intervalo de concentraciones se amplía, teniendo valores desde 1.20 ± 0.19 a 11.08 ± 0.58 mg/g. Son de destacar los contenidos de tres de estos; Peruano, San Gabriel e Ixtenco.

Criollos mejorados		Híbridos		Criollos Coloridos	
Muestra	mg Ac. Tánico/g grano	Muestra	mg Ac. Tánico/g grano	Muestra	mg Ac. Tánico/g grano
Ahu	2.43 ± 0.13	10	3.99 ± 0.42	Chi	1.20 ± 0.19
Ate	2.88 ± 0.35	12	5.91 ± 0.51	Oax	3.83 ± 0.16
Cit	4.47 ± 0.08	14	2.88 ± 0.58	Per	11.08 ± 0.58
Coc	3.44 ± 0.58	1107	2.97 ± 0.27	Teh	5.75 ± 0.49
Mal	3.64 ± 0.13	1112	2.65 ± 0.19	Occ	1.94 ± 0.34
Pue	2.38 ± 0.42	1114	3.83 ± 0.54	SG1	8.25 ± 0.80
SN	3.48 ± 0.15	1124	3.66 ± 0.16	SG2	1.66 ± 0.35
				Ix	6.25 ± 0.46

Tabla 11. Contenido de fenoles totales en muestras de maíces coloridos.

Existen numerosos estudios reportes del contenido de fenoles en maíces coloridos sin embargo los valores más altos encontrados en la literatura provienen de maíces morados de la zona de Bolivia y Perú con un contenido de alrededor de 10mg/g

muestra (Zilić *et al.*, 2012); lo cual concuerda con la muestra de maíz peruano evaluada en este trabajo.

De manera general, el promedio de fenoles totales en maíces coloridos se encuentra dentro de 4mg/g, similar al de las muestras azules aquí presentadas, por lo que el mejoramiento e hibridación no afectó el contenido de este grupo de compuestos.

En relación con otros cereales como trigo, arroz y avena, el maíz contiene más fenoles totales y esto se ve reflejado en el poder antioxidante (Adom y Liu, 2002).

También se ha planteado la existencia de una relación entre el contenido de fenoles y el contenido de antocianinas (Gasca Galvez, 2013), sin embargo dentro de las muestras analizadas no se encontró un patrón definido.

Flavonoides totales

Los resultados obtenidos (Tabla 12) muestran concentraciones entre 0.84 ± 0.11 y 6.29 ± 0.11 mg/g muestra.

De la misma manera que en el contenido de fenoles, en flavonoides la mayor concentración se presentó en las muestras de Maíz Ixtenco, Tehuacan, Peruano y San Gabriel; este último es un caso particular ya que se contó con dos distintas muestras de la misma región aunque de distinto agricultor y presentan una variación bastante amplia.

Otro punto a destacar, como se había mencionado con anterioridad, es que el contenido de flavonoides en las muestras azules no presenta diferencias significativas entre ellos.

Criollos mejorados		Híbridos		Criollos Coloridos	
Muestra	mg Quercitina/g grano	Muestra	mg Quercitina/g grano	Muestra	mg Quercitina/g grano
Ahu	1.28±0.15	10	1.62±0.16	Chi	0.84±0.11
Ate	1.36±0.19	12	1.48±0.05	Oax	2.01±0.30
Cit	1.27±0.13	14	1.49±0.04	Per	5.54±0.30
Coc	1.48±0.16	1107	1.21±0.20	Teh	4.19±0.94
Mal	1.19±0.17	1112	1.31±0.15	Occ	0.85±0.35
Pue	1.20±0.22	1114	1.33±0.07	SG1	6.29±0.11
SN	1.03±0.15	1124	1.54±0.04	SG2	0.50±0.11
				Ix	5.69±0.35

Tabla 12. Contenido de flavonoides totales en muestras de maíces coloridos.

En comparación con lo reportado en la literatura, el promedio es de 2.70mg/g (Ku *et al.*, 2014), se tiene que las variedades azules se encuentran por debajo del promedio, sin embargo la diferencia no es tan amplia.

Además, existe un fenómeno de copigmentación entre los flavonoides y las antocianinas lo cual está relacionado una mayor estabilidad de las antocianinas (Fernández Aulis, 2012). Dicho esto, se esperaría que el contenido de antocianinas fuese mayor en las muestras que presentaron un mayor contenido de flavonoides.

Antocianinas totales

Después de tener como marco de referencia las determinaciones de fenoles y flavonoides, la cuantificación de antocianinas se centra en un grupo de compuestos en particular.

Ahora bien, con anterioridad se había mencionado a cuatro de las muestras analizadas, las cuales presentaron la concentración más alta de fenoles y flavonoides totales. De igual manera sucede con el contenido de antocianinas, como se observa en la Tabla 13. Peruano, Tehuacán, San Gabriel 1 e Ixtenco son dichas muestras.

Criollos mejorados		Híbridos		Criollos Coloridos	
Muestra	mg Cianidina/g grano	Muestra	mg Cianidina/g grano	Muestra	mg Cianidina/g grano
Ahu	0.31±0.04	10	0.41±0.03	Chi	0.13±0.02
Ate	0.22±0.02	12	0.25±0.02	Oax	0.61±0.04
Cit	0.22±0.02	14	0.28±0.02	Per	1.95±0.24
Coc	0.30±0.03	1107	0.25±0.01	The	1.54±0.28
Mal	0.19±0.01	1112	0.30±0.04	Occ	0.09±0.03
Pue	0.19±0.03	1114	0.26±0.02	SG1	1.27±0.34
SN	0.19±0.03	1124	0.45±0.01	SG2	0.09±0.01
				Ix	1.21±0.24

Tabla 13. Contenido de antocianinas totales en muestras de maíces coloridos.

La concentración máxima reportada en la literatura para maíces coloridos corresponde a valores de 1mg/g. Si bien solo cuatro de las muestras destacan por estar sobre el valor máximo reportado, el resto de las muestras en lo que a los maíces azules respecta, se encuentra dentro del promedio reportado en otros estudios.

Durante esta segunda etapa del proceso experimental se compararon los análisis de este estudio contra lo descrito en la bibliografía consultada; Sin embargo se debe considerar la existencia de factores que varían de un estudio a otro, como la metodología de extracción de antocianinas, preparación de la muestra y el contenido de almidón (variedad del Maíz) (Gasca Galvez, 2013).

Por otro lado, se mencionó anteriormente una posible relación en el contenido de fenoles y antocianinas. Dicha relación no se presentó dentro de las muestras que fueron objeto de estudio.

Una vez teniendo un panorama de la concentración de antocianinas, se procedió al análisis del perfil de estas (Etapa 3).

Etapa 3

Esta tercera etapa estuvo dedicada a determinar el perfil de antocianinas.

Perfil de antocianinas

El análisis del perfil de antocianinas constó de dos partes; primeramente, la cromatografía de capa fina y posteriormente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Cromatografía de capa fina. (CCF)

La figura 15 presenta las 8 muestras de maíces morados, la cual se ha partido con una línea punteada. Por debajo de esta línea se encuentran las antocianinas aciladas y sobre de esta aquellas que no lo están. Tomando esto en cuenta y lo mencionado por (Fernández Aulis, 2014) sobre el color de las antocianidinas, se tiene que:

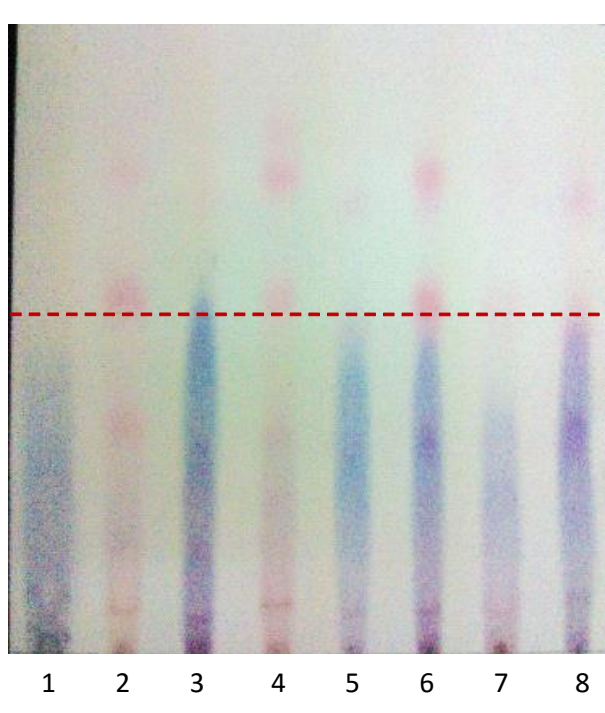


Figura 15. CCF de maíces morados: 1 Chiapas, 2 E. Occ, 3 Peruano, 4 Tehuacan, 5 Oaxaca, 6 San Gabriel 1, 7 San Gabriel 2, 8 Ixtenco

Todas las muestras presentan antocianinas aciladas y probablemente las muestras Chiapas y Peruano no contienen no aciladas. En cuanto a las antocianidinas todas

tienen derivados de Cianidina, Peonidina o Malvidina (rosa, morado) y solo las muestras Chiapas, Peruano y Oaxaca podrían presentar derivados de Delfinidina (azul). No se descarta la existencia de derivados de Pelargonidina (rojo) pues debido a la coloración puede confundirse con el color rosa.

En un análisis similar, la figura 16 presenta la CCF de los maíces azules donde:

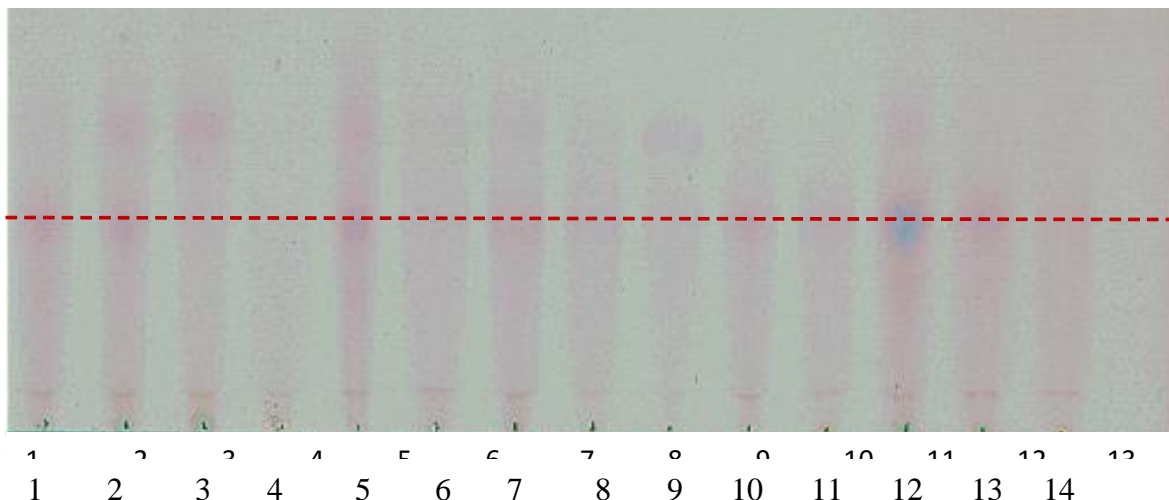


Figura 16. CCF de maíces azules: 1 Ahuatepec, 2 Atenco, 3 Citlali, 4 Cocotitlán, 5 Malitzi, 6 Puebla, 7 Sierra Negra, 8 H10, 9 H12, 10 H14, 11 H1107, 12 H1112, 13 H1114, 14 H1124

Todas las muestras presentan una coloración rosa y no es evidente cuantas antocianinas se presentan. Por la coloración como anteriormente se mencionó solo se descartan los derivados de la Delfinidina pues no se presenta coloración azul excepto en la muestra H. Azul 1112.

Debido a que la cromatografía de capa fina muestra un panorama general, para poder presentar el perfil de antocianinas, se continuó el estudio con la metodología por HPLC presentada a continuación.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Durante la cromatografía de capa fina se obtiene un panorama general del perfil de antocianinas. Con el análisis de los cromatogramas obtenidos por HPLC se puede comparar con la literatura, (Fernández Aulis, 2014)(Cuevas Montilla *et al.*, 2011) haciendo uso del tiempo de retención, dos puntos importantes. Primeramente, al

igual que se realizó en la CCF, se logra diferenciar entre las antocianinas aciladas de las que no lo están. Por otro lado, comparando cromatogramas se puede decir de manera tentativa cuales antocianinas están presentes y de estas cual se encuentra en mayor proporción.

Cabe señalar que la comparación de cromatogramas y tiempos de retención se hizo directamente con el reportado por (Fernández Aulis, 2014) debido a que ambos estudios fueron realizados bajo la misma metodología y equipo.

De manera específica se reporta el maíz morado de Ixtenco, muestra que se encuentra en la Tabla 14 y los tiempos de retención corresponden a las siguientes antocianinas: pico 1 cianidina-3-glucósido (C3G), el pico 2 pelargonidina-3-O-glucósido (Pg3G), pico 3 peonidina-3-O-glucósido (Pn3G), pico 4 cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (C36G), el pico 5 como peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pn36G) y el pico 6 como pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pg36G).

Tomando en cuenta la información citada en el párrafo anterior, todas las muestras de maíces morados (Tabla 14) contienen C3G y C36G exceptuando la muestra de Tehuacan y E. Occ. Además, sabiendo que la C36G es la antocianina acilada más simple que se encuentra podemos tomar su tiempo de retención para dividir el cromatograma en dos secciones (antociainas aciladas y no aciladas); de esta forma se puede decir que dentro de los maíces morados la distribución entre antocianinas con acilación o sin esta en proporción 1:1, es decir, alrededor del 50% del total de antocianinas no cuenta con acilación mientras que el otro 50% restante sí.

Los casos de antocianinas de las muestras de Tehuacan y E. Occ, con la información que se posee no es posible emitir un juicio acerca de que antocianinas puedan contener debido a que los tiempos de retención de las señales detectadas no pudieron ser comparadas con la literatura.

En las siguientes 4 muestras; Chiapas, Oaxaca, Peruano e Ixtenco, la C3G y C36G son las mayoritarias con 30 y 40% del total. Por otro lado, en las dos muestras de San Gabriel el perfil de antocianinas se encuentra distribuido entre 4 de estas (C3G, Pg3G, C36G, Pn36G) teniendo cada una alrededor de un 20% del total.

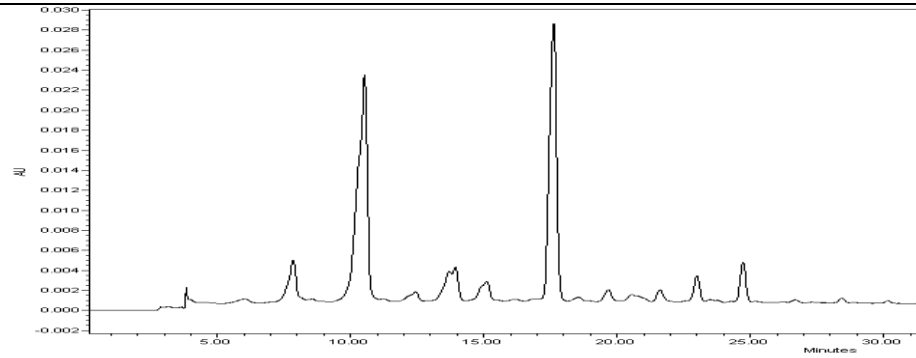
Aunque sólo se mencionan las antocianinas mayoritarias, esto no significa que no contengan en menor medida otro tipo de antocianinas.

Tabla 14. Cromatogramas de maíces morados.

TR; (%)	Cromatograma
Chiapas	
8.361 (40.85%) 14.565 (40.38%)	<p>The chromatogram for Chiapas shows a baseline with several peaks. The most prominent peaks are at 8.361 minutes (40.85%) and 14.565 minutes (40.38%). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents AU (Absorbance Units) from 0.0000 to 0.0075, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>
Oaxaca	
8.296 (37.27%) 11.883 (10.27%) 13.095 (9.29%) 14.610 (24.86%) 18.905 (7.43%) 19.963 (6.61%)	<p>The chromatogram for Oaxaca shows a baseline with several peaks. The most prominent peak is at 8.296 minutes (37.27%). Other significant peaks are at 14.610 minutes (24.86%), 11.883 minutes (10.27%), 13.095 minutes (9.29%), 18.905 minutes (7.43%), and 19.963 minutes (6.61%). There are also smaller peaks at approximately 3.5, 15, 17, and 21 minutes. The y-axis represents AU from 0.000 to 0.065, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>
Peruano	
7.964 (45.97%) 14.076 (28.61%)	<p>The chromatogram for Peruano shows a baseline with several peaks. The most prominent peaks are at 7.964 minutes (45.97%) and 14.076 minutes (28.61%). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents AU from -0.010 to 0.120, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>

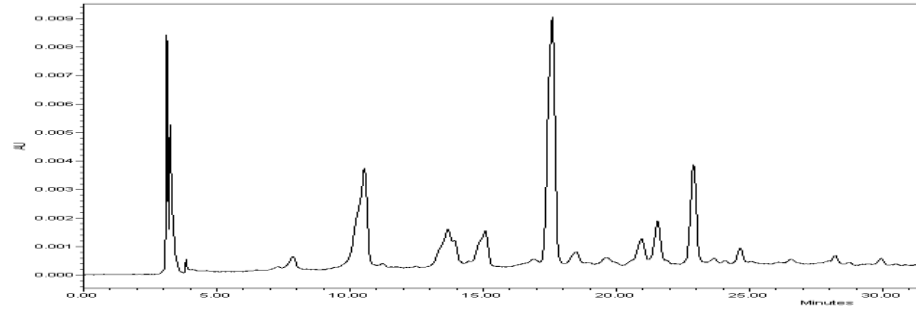
Tehuacan

10.525 (38.97%)
17.624 (37.50%)



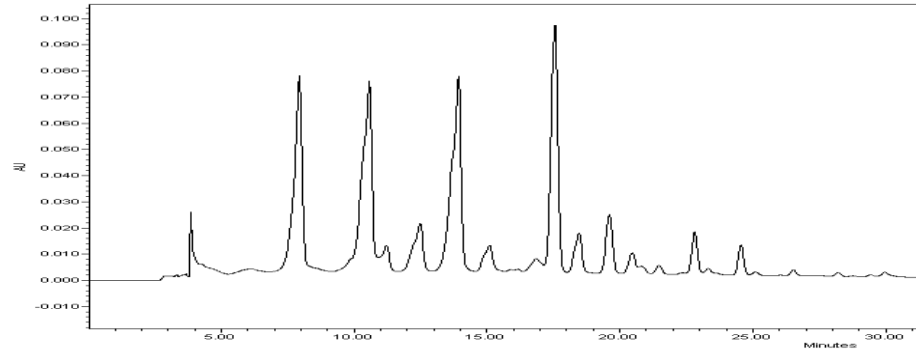
E. Occidentales

10.543 (21.72%)
17.592 (46.20%)
22.894 (14.73%)



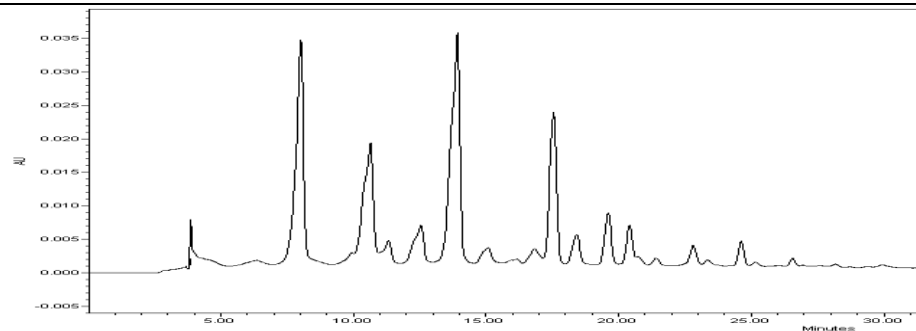
San Gabriel 1

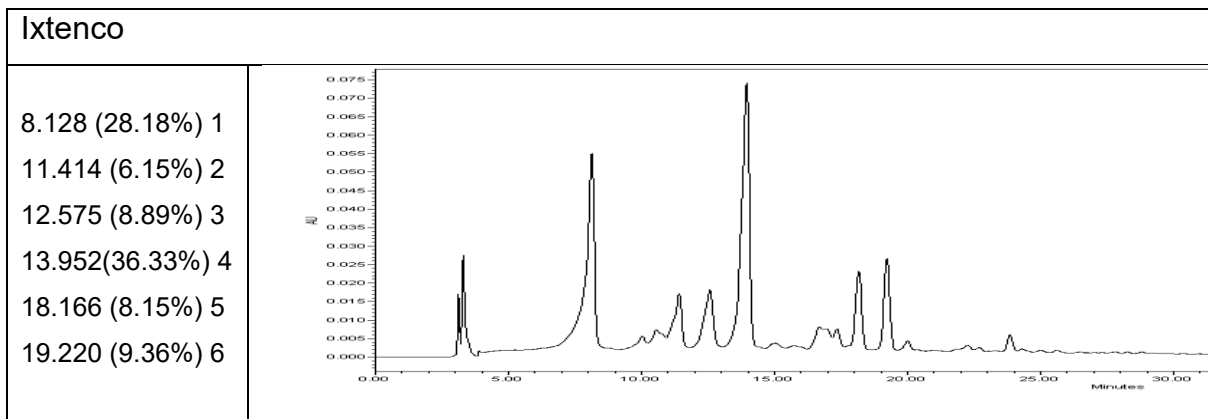
7.933 (17.21%)
10.567 (21.57%)
13.923 (20.36%)
17.558 (19.57%)



San Gabriel 2

8.015 (21.54%)
10.647 (15.36%)
13.918 (27.31%)
17.548 (14.17%)



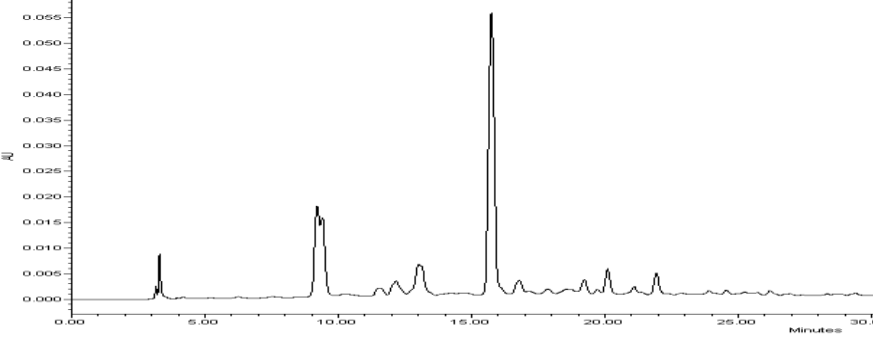
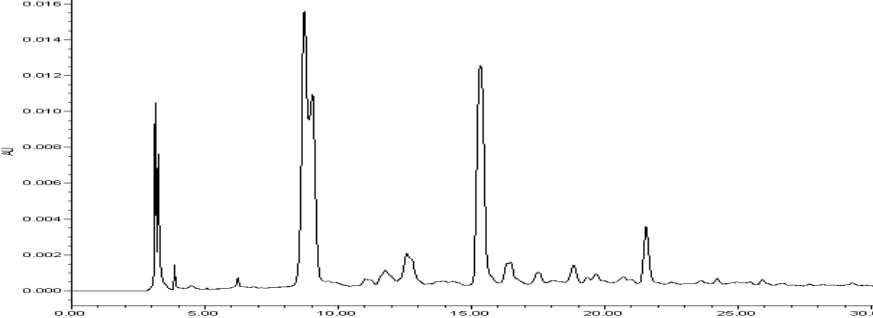
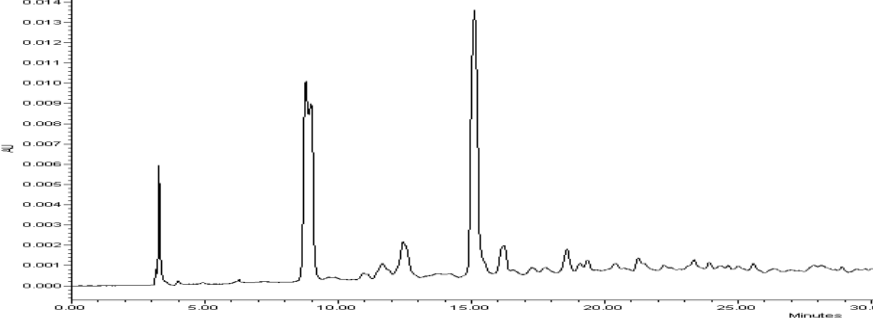
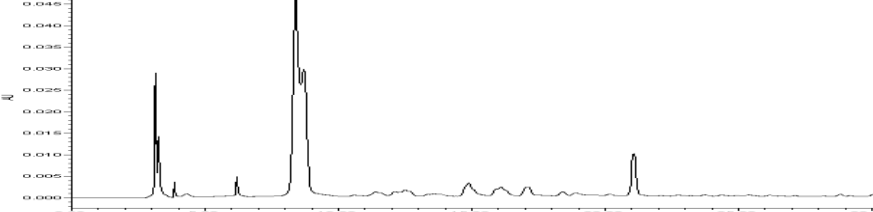


En cuanto a los maíces azules (tabla 15) se puede destacar inicialmente dos hechos; se puede dividir en criollos e híbridos pues los maíces criollos al igual que en el caso anterior de los morados cuentan con dos antocianinas mayoritarias (C3G y C36G) con un porcentaje similar; salvo casos particulares (Cocotitlan) donde sólo una antocianina es la mayoritaria.

Por otro lado, al observar los cromatogramas de los maíces híbridos podemos notar que la antocianina mayoritaria es la C36G con un porcentaje del 60%.

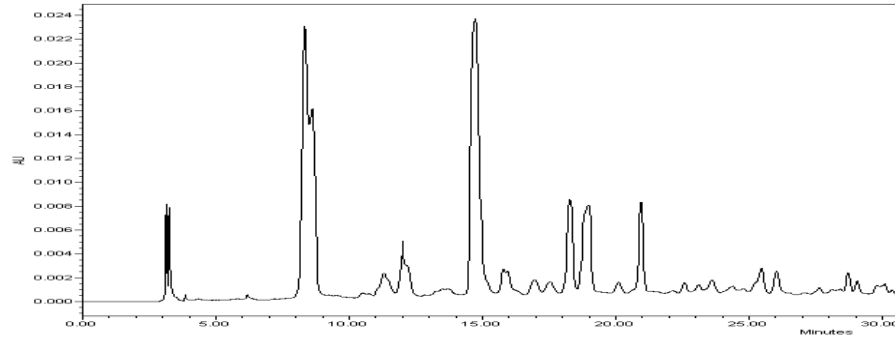
Como se mencionó anteriormente, la muestra Cocotitlan es un caso particular y de especial atención debido a que la antocianina mayoritaria es la C3G con 83% del total. Esto indica que podría ser una fuente para obtener un estándar de dicha antocianina.

Tabla 15. Cromatogramas de maíces azules

TR; (%)	Cromatograma
Ahuatepec	
9.205 (26.39%) 15.747 (55.13%)	 <p>The chromatogram for Ahuatepec shows a baseline with several peaks. The most prominent peaks are at 9.205 minutes (26.39% relative area) and 15.747 minutes (55.13% relative area). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 10, 13, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents relative intensity from 0.000 to 0.055, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>
Atenco	
8.730 (54.98%) 15.339 (31.03%)	 <p>The chromatogram for Atenco shows a baseline with several peaks. The most prominent peaks are at 8.730 minutes (54.98% relative area) and 15.339 minutes (31.03% relative area). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 10, 13, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents relative intensity from 0.000 to 0.016, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>
Citlali	
8.783 (46.47%) 15.339 (31.03%)	 <p>The chromatogram for Citlali shows a baseline with several peaks. The most prominent peaks are at 8.783 minutes (46.47% relative area) and 15.339 minutes (31.03% relative area). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 10, 13, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents relative intensity from 0.000 to 0.014, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>
Cocotitlan	
8.396 (83.34%)	 <p>The chromatogram for Cocotitlan shows a baseline with several peaks. The most prominent peak is at 8.396 minutes (83.34% relative area). Other smaller peaks are visible at approximately 3.5, 10, 13, 17, 19, and 21 minutes. The y-axis represents relative intensity from 0.000 to 0.045, and the x-axis represents time in minutes from 0.00 to 30.00.</p>

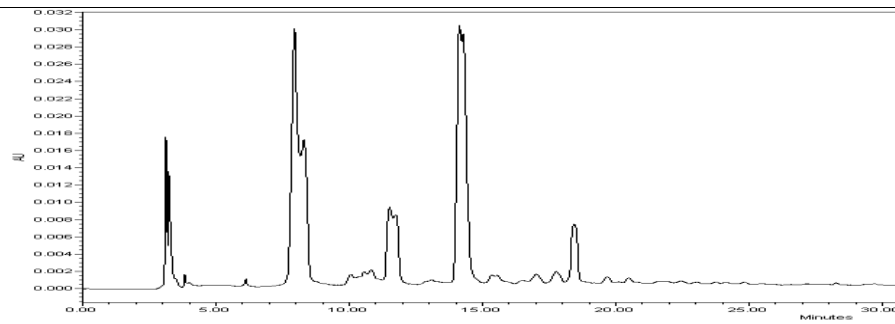
Malitzi

8.333 (39.09%)
14.731 (34.75%)
18.280 (8.07%)
18.974 (10.57%)



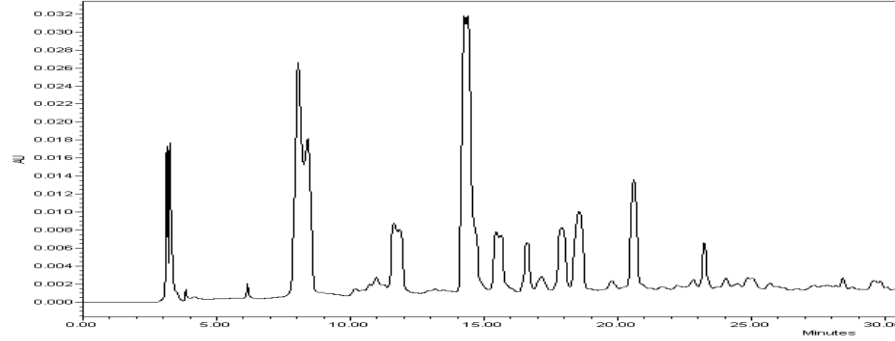
Puebla

8.407 (30.95%)
14.383 (31.24%)



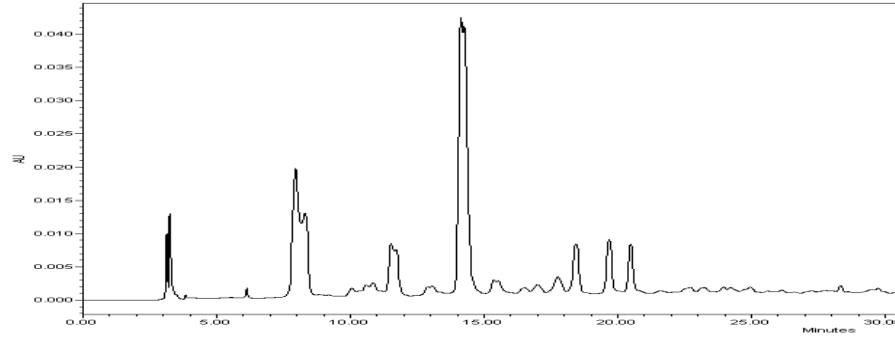
Sierra Negra

7.946 (42.14%)
14.275 (39.36%)



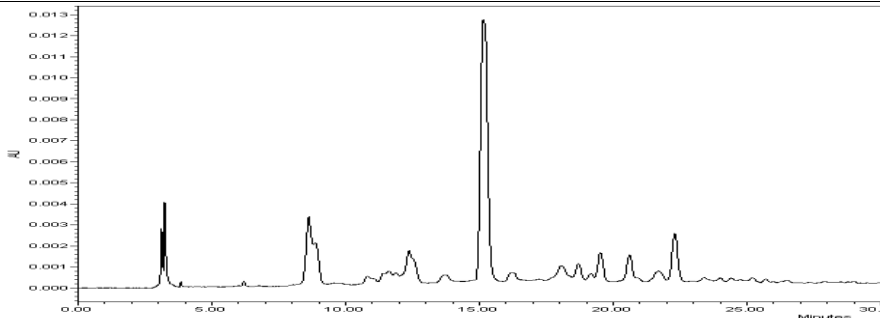
10

8.304 (27.79%)
14.260 (48.09%)



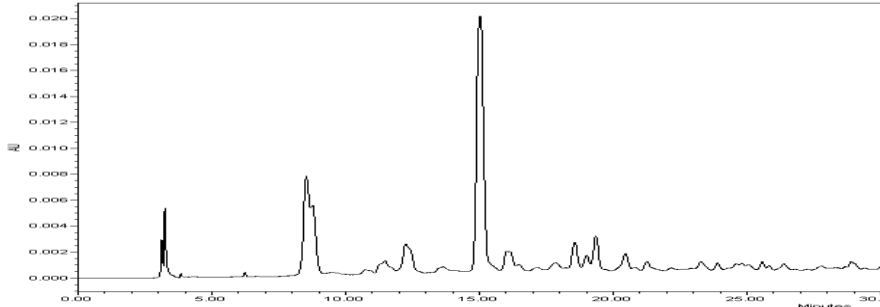
12

15.156 (71.93%)



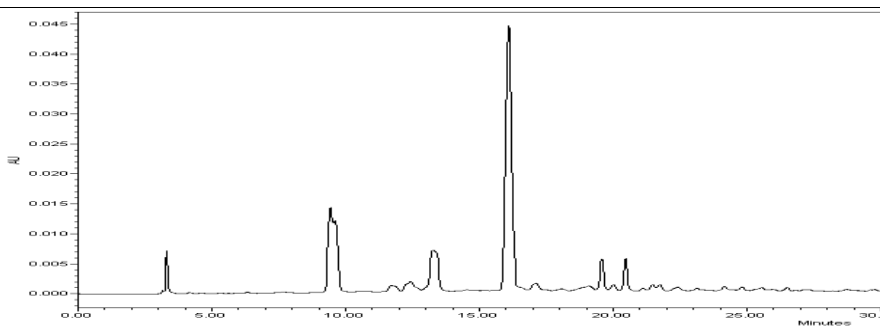
14

8.535 (30.52%)
15.024 (57.88%)



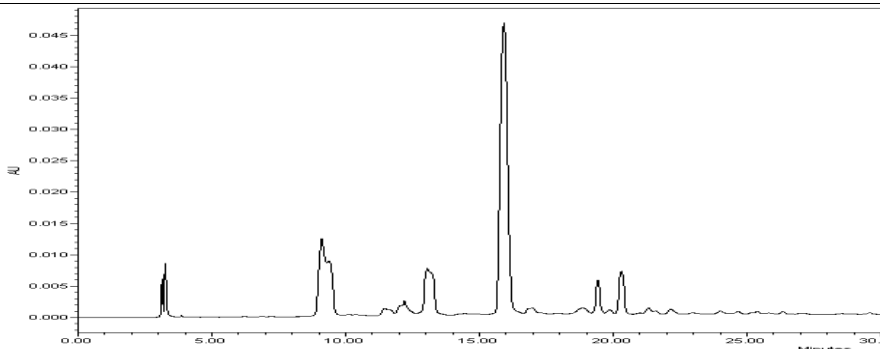
1107

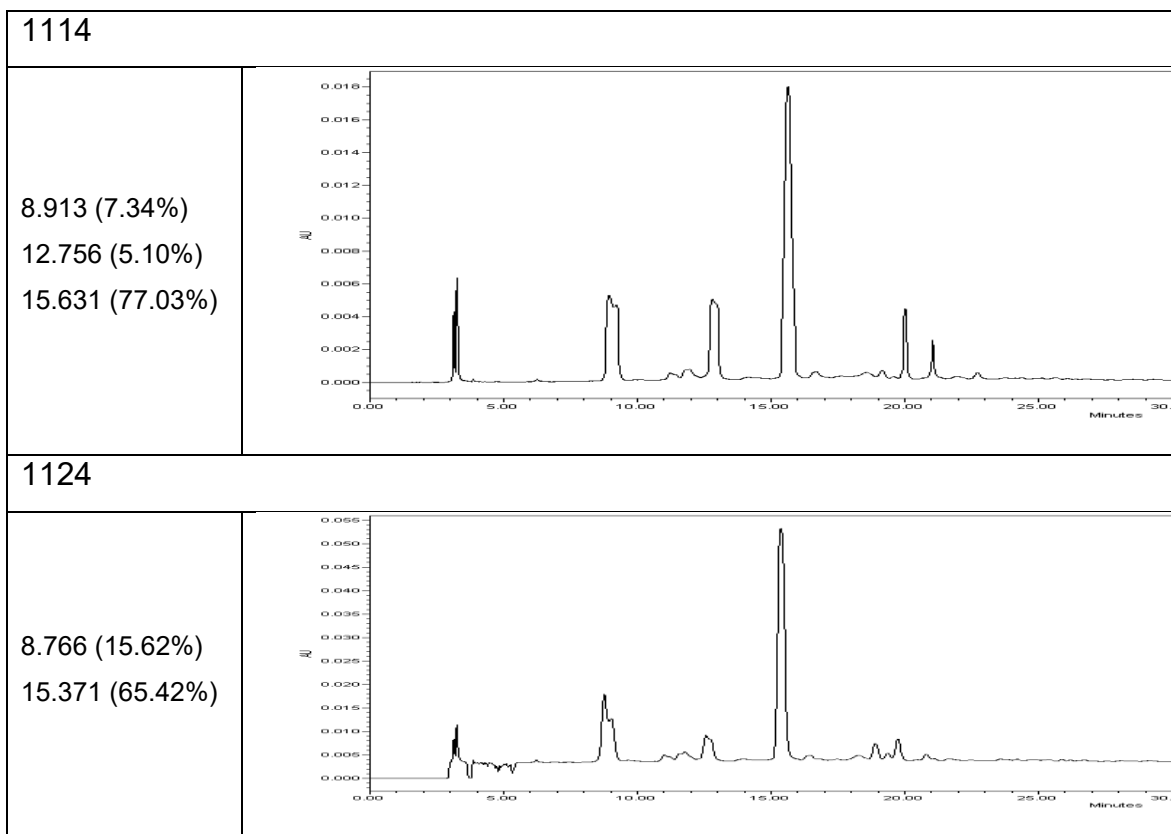
9.432 (24.87%)
16.097 (55.77%)



1112

9.105 (15.20%)
15.917 (62.80%)





De acuerdo con lo reportado en la literatura en estudios previos en el maíz morado; además del pigmento principal cianidina-3-glucósido, se han encontrado en variedades de maíz morado: pelargonidina-3- glucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-maloilglucósido, pelargonidina-3-malonilglucósido, y peonidina-3-malonilglucósido. (Cuevas Montilla *et al.*, 2008). Lo cual está en completa concordancia con lo que se ha encontrado en este trabajo.

Otro punto que se reporta es el hecho de que no se presenta derivados de peonidina en maíces azules que de igual manera no se encontraron en las muestras aquí analizadas o están en concentraciones no apreciables.

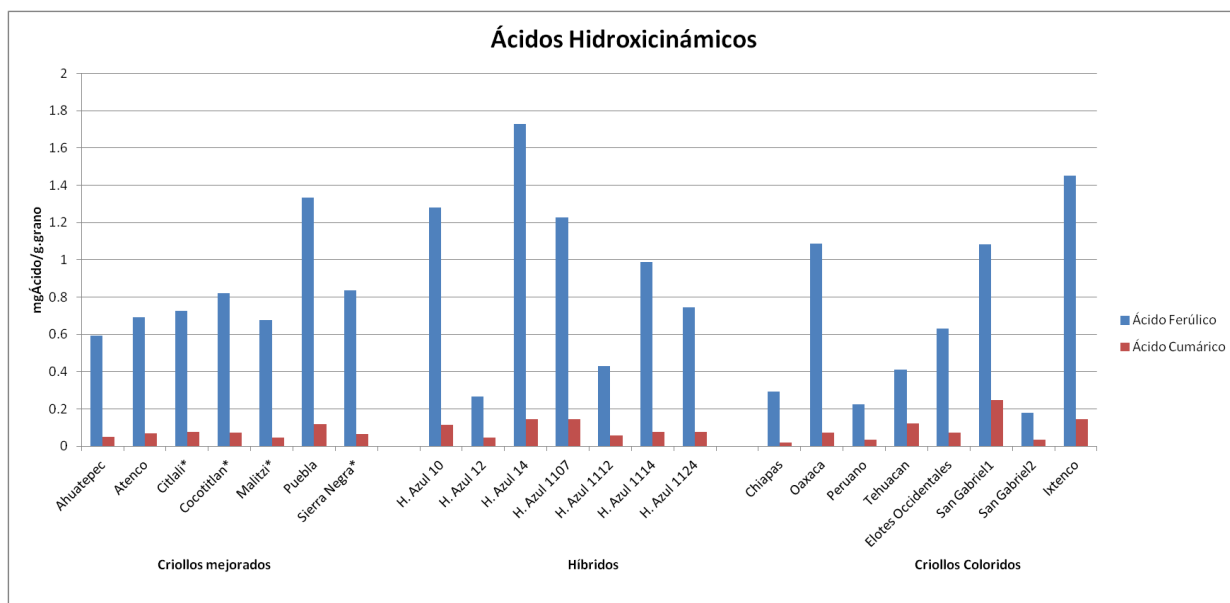
La importancia de conocer el perfil de Antocianinas del maíz morado es debido a que son más estables que la Encocianina de la uva, a la luz, al calor y principalmente a los cambios de pH. Las Antocianinas del maíz Morado a un pH entre 3 y 3.5

permanecen de un color rojo amarillento, mientras que la Enocianina se torna azulada en esa condición (Cuevas Montilla *et al.*, 2008).

Ácidos Hidroxicinámicos

Se sabe que los ácidos hidroxicinámicos se encuentran principalmente en el pericarpio del maíz y están unidos a la pared celular por lo que no se encuentran libres en grandes concentraciones. Por lo cual para la determinación de estos se procedió a realizar una hidrólisis alcalina de la muestra.

Debido a que para la cuantificación se requerirían estándares de cada ácido encontrado, primero se realizó una CCF con estándares de los principales ácidos; se encontró que solo el Ácido Ferúlico estaba presente; sin embargo, posteriormente con el análisis por HPLC también se determinó la presencia de ácido cumárico. Debido a que su concentración es relativamente baja (0.1mg/g muestra) pudo ser factor principal de que no se observara al realizar la CCF.



Gráfica 2. Contenido de Ácidos hidroxicinámicos en maíces coloridos.

Si observamos el gráfico 2 lo primero que se puede destacar es que la concentración de ácido cumárico con respecto a la del ferúlico no es apreciable por

lo que desde este punto se puede decir que ninguna de las muestras podría ser fuente importante de este compuesto.

Comparado con estudios anteriores donde se han obtenido máximos de 13.6mg/g muestra (Ramírez Salinas, 2010), las concentraciones obtenidas de dicho ácido son apreciablemente menores en las muestras analizadas teniendo como máximo el maíz azul H. 14 con 1.73mg/g muestra.

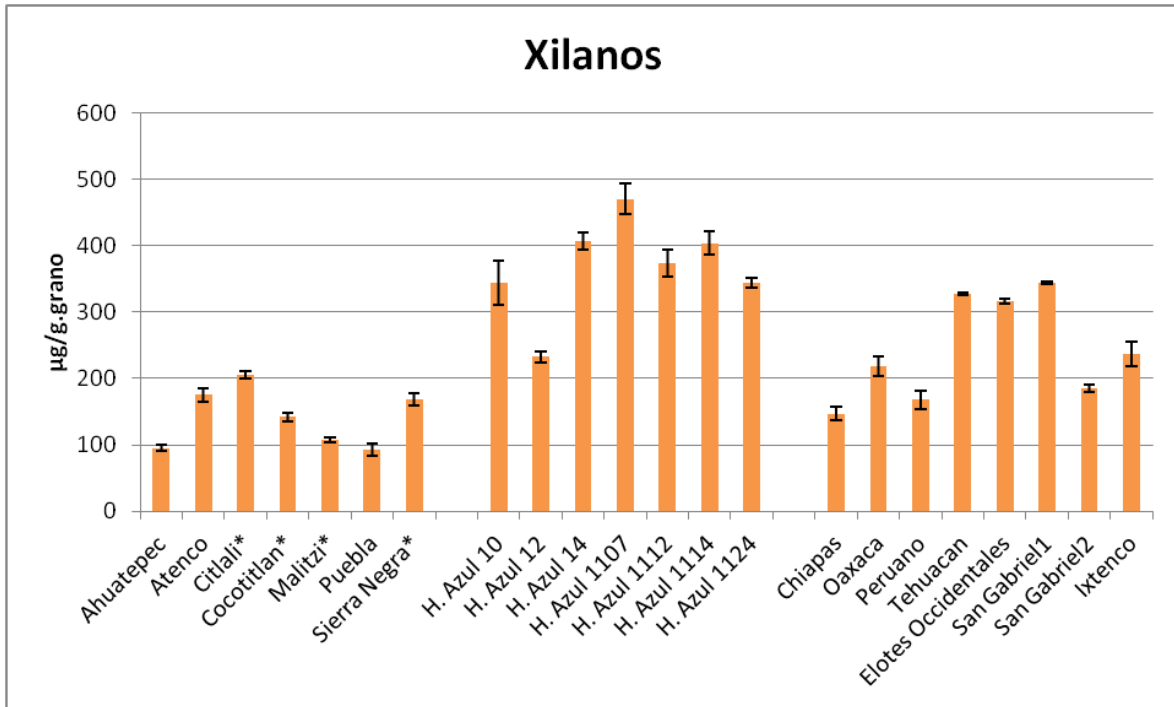
Sin embargo, existen múltiples factores por lo cual se han obtenido concentraciones menores a lo reportado en la bibliografía; el principal podría radicar en la fuente de obtención: mientras que en este trabajo se obtuvo a partir del pericarpio hidrolizado, el almidón residual al realizar la hidrólisis se gelatinizaba lo cual presenta un problema pues podría estar evitando la extracción del ácido. La mayoría de los estudios lo obtienen a partir del nejayote generado durante la nixtamalización.

Existen dos puntos de importancia en dicho compuesto; el primero radica en el cultivo del propio Maíz, ya que este al encontrarse en el pericarpio, su contenido muestra de manera indirecta la dureza de los granos y esto se ve reflejado en la resistencia a algunas plagas; el otro punto es el de su uso comercial por las diversas funciones para las que puede ser utilizado.

Xilanos

Como parte de la extracción de los ácidos hidroxicinámicos producto del hidrólisis del pericarpio del Maíz, se puede obtener a partir del hidrolizado los xilanos mediante su precipitación. De esta forma se logra aprovechar el producto de desecho de la obtención de otro compuesto.

En la gráfica 3 se observa el contenido de xilanos en la serie de muestras de maíces coloridos donde destacan el grupo de maíces azules híbridos, seguidos del grupo de muestras de pigmentados y al final con la concentración menor, los criollos azules.



Gráfica 3. Contenido de Xilanos en maíces coloridos

En la literatura se encuentran expresadas dichas concentraciones en términos de porcentaje respecto al pericarpio del Maíz. Múltiples estudios realizan la extracción de estos a partir del olote y no del pericarpio ya que este es un desecho y puede ser obtenido fácilmente. Debido a la importancia de estos compuestos para la creación de biopelículas, el hecho de utilizar materiales de desecho aporta un valor agregado.

Conclusiones

Finalmente, se presentan las conclusiones del estudio realizado. Para esto se seguirá el orden en que se presentaron los resultados.

Se generó un marco de referencia acerca de los compuestos bioactivos en maíces coloridos nativos de México al determinar la concentración de estos en 22 muestras de maíces. Además, se estableció el perfil de antocianinas de las mismas, así como la distribución de antocianinas aciladas y no aciladas.

Para el caso de carotenos totales se determinó que a pesar de que dentro de las muestras se observaron concentraciones por encima del promedio en relación con otros maíces, en la naturaleza existen otros materiales que son fuente de mayor abundancia de dicho compuesto. La importancia de haber realizado la extracción de los carotenos es la de evitar interferencia en las mediciones de antocianinas.

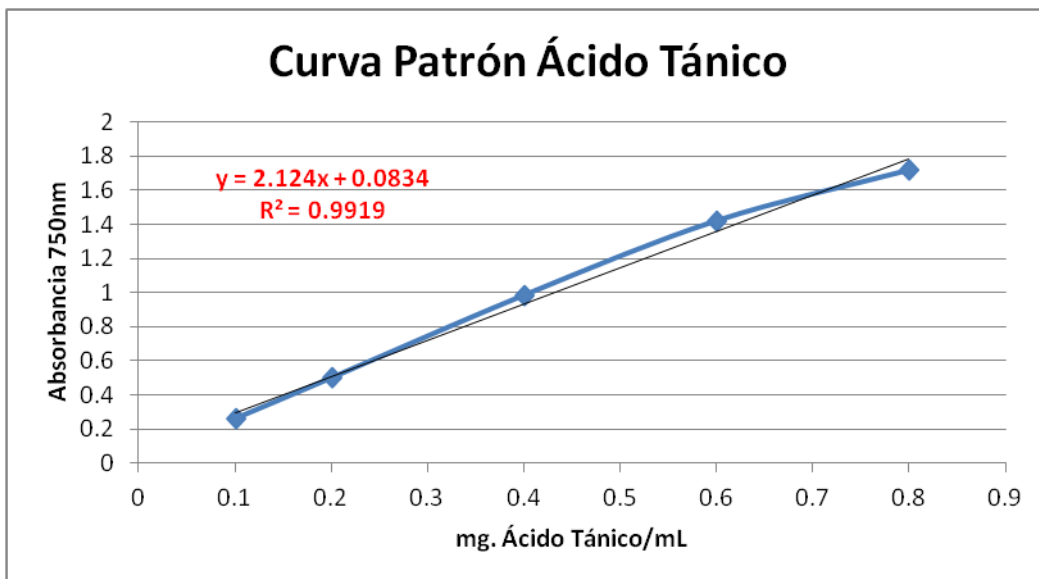
Dentro de las antocianinas, se determinó que la concentración mayor se encuentra en las variedades moradas las cuales poseen un perfil de antocianinas más complejo en relación con las variedades azules.

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos destaca el contenido de ácido Ferúlico, teniendo tres muestras con los mayores contenidos (puebla, 14 e Ixtenco).

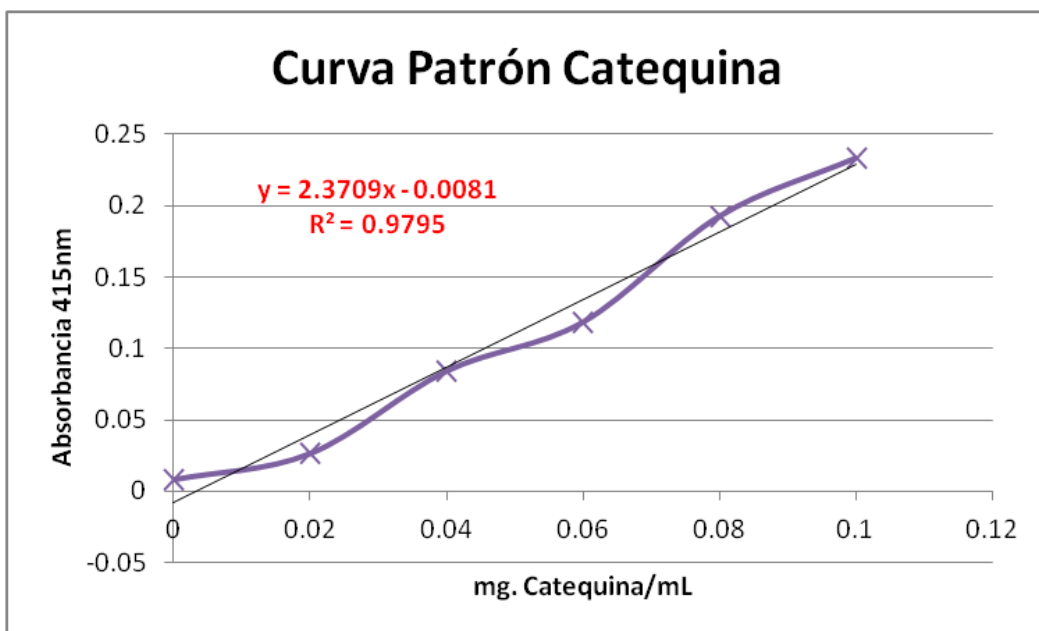
Finalmente, los mayores contenidos de xilanos se encuentran en el grupo de maíces híbridos sin embargo el pericarpio no es la mejor fuente para obtenerlos en lo que se refiere a abundancia; en el olote es más abundante.

Otro logro importante del proyecto presentado es la conjunción de la extracción de 4 grupos de compuestos (Carotenoides, Antocianinas, Ácidos Hidroxicinámicos, Xilanos) bajo una sola metodología puesto que otros estudios se han limitado a tan solo uno o dos de los grupos de compuestos.

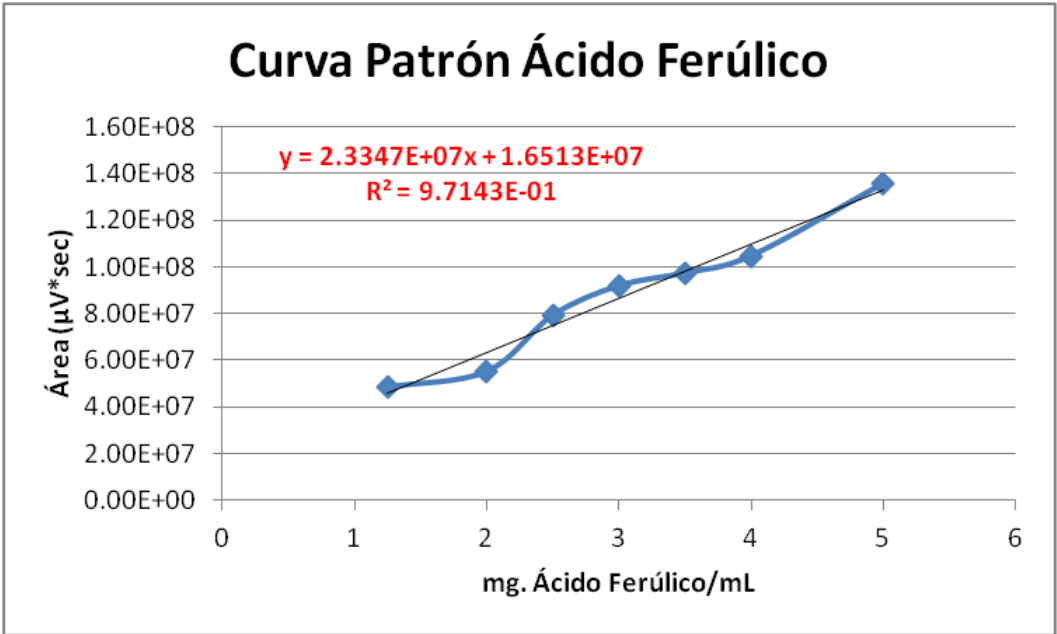
ANEXO



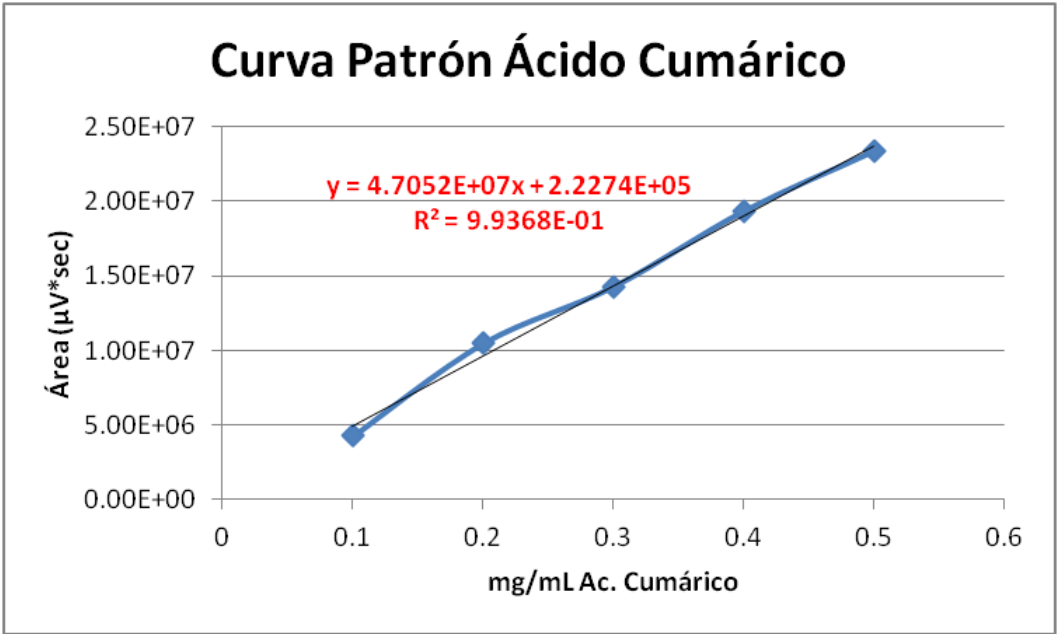
Gráfica 4.



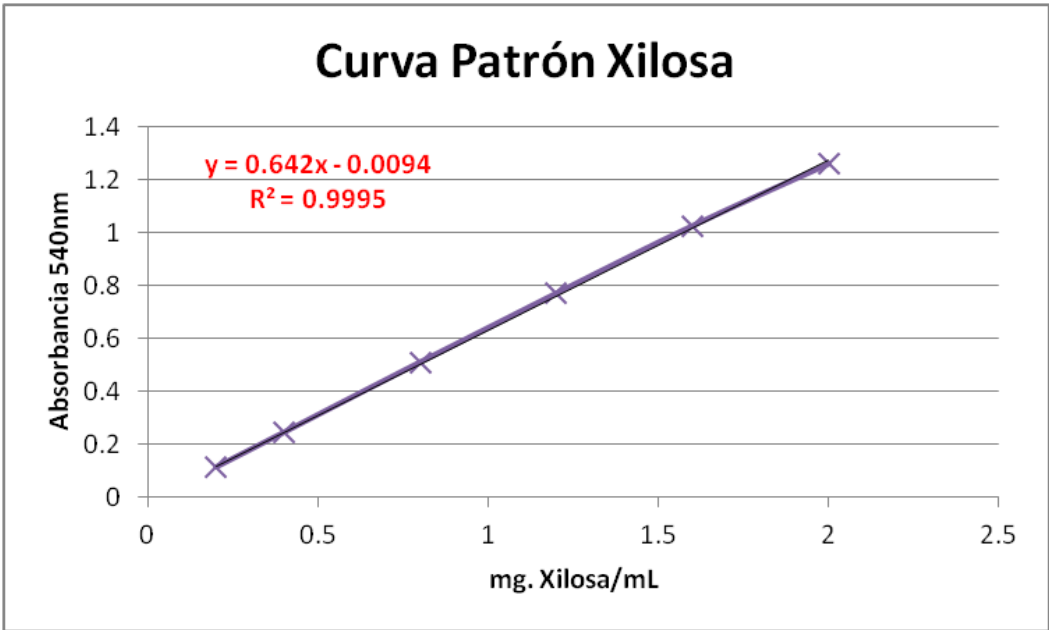
Gráfica 5.



Gráfica 6.



Gráfica 7.



Gráfica 8.

Bibliografía

- Adom, K K, & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 618-6187
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, a., Sahena, F., ... Omar, a. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Barber, S.A. (1979). Corn residue management and soil organic matter. *Agron. Journal.*, 71: 625627.
- Barros-Ríos, J., Malvar, R. A., & Santiago, R. (2011). Funcion de la Pared Celular del Maíz (*Zea Mayz L.*) como Mecanismo de Defensa Frente a la Plaga del Taladro (*Ostina Nubia;lalis Hüb. y Sesamia Nonagrioides Lef.*). *Misión Biológica de Galicia (CSIC)*, 30(4), 132–142.
- Bernhoft, A., (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.
- Cartaya, O., E., Reynaldo Inés. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. 22. No 2. 5-14.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., (2000). Natural products (secondary metabolites). Buchanan, B., Grisseem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1250–1318.
- Cuevas Montilla, E., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2008). Análisis y Caracterización de Antocianinas en Diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays*) Boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech*. Cartagena: Red-Alfa Lagrotech.
- Cuevas Montilla, E., Hillebrand, S., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2011). Soluble and Bound Phenolic Compounds in Different Bolivian Purple Corn (*Zea mays L.*) Cultivars. *Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7068–7074.
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Serna Saldivar, S. O., & Talcott, S. T. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays L.*) products. *Food Research International*, 39(6), 696–703. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.014

- Dudareva, N., Pichersky, E., (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scent. *Plant Physiology* 122 (3), 627–633.
- Durst, R., Wrolstad, R.E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. Pp. 33-45. Nueva Jersey, NJ, EEUU.
- FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=juiga.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001467>
- Fernández Aulis, M. F. (2012). *Aplicación de tecnologías emergentes para extracción óptima de antocianinas del totemoxtle y olote de maíz criollo morado*. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Fernández Aulis, M. F. (2014). *Identificación y cuantificación de antocianinas aciladas de plantas endémicas de México (maíces y salvias)*. UNAM.
- Galinat, W.C. (1977). The origin of corn. En G.F. Sprague, ed. *Corn and corn improvement*, p. 1-47. Madison, Wis., EE.UU., American Society of Agronomy.
- Gasca Galvez, A. (2013). *Extracción y estabilización de antocianinas del salvado de maíz morado, criollo (Zea mays L.) para su aplicación en alimentos*. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- García Romo, M. E. (2010). *Biocolorantes de maíz criollo del estado de tlaxcala. Perfil de antocianinas*. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- González Cruz, K. P. (2013). *Antocianinas en Maíz Azul, Evaluación del Efecto de la Adición de Cal y Calor a una Antocianina, La Pelargonidina*. UNAM.
- González Vázquez, K. E. (2009). *Obtención y Esterificación de Dímeros de Ácido Ferúlico*. UNAM.
- Gracia Nava, M. A. (n.d.). *Cuantificación de Fenoles y Flavonoides en Extractos Naturales*. Queretaro, México.
- Guzmán Máximo, R. (2015). *Productividad de híbridos varietales de maíz de grano amarillo pra condiciones de mediana productividad en Valles Altos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Harakotr, B., Suriharn, B., Tangwongchai, R., Scott, M. P., & Lertrat, K. (2014). Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as

affected by traditional cooking. *Food Chemistry*, 164, 510–7. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.069

Huerta Acosta, A., Rodríguez Jorge, Y., Valencia López, I. Q., & Villegas Villegas, O. (2013). Obtención de ácido ferúlico por hidrólisis del maíz. México, D.F.

Ku, K. M., Kim, H. S., Kim, S. K., & Kang, Y.-H. (2014). Correlation Analysis Between Antioxidant Activity and Phytochemicals in Korean Colored Corns Using Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural Science*, 6(4), 1–9. doi:10.5539/jas.v6n4p1

Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385975>

Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1187–1192. doi:10.1016/j.lwt.2008.10.010

Martin, J.F., Demain, A.L., (1978). The filamentous fungi. In: Smith, J.E., Berry, D.R. (Eds.), *Developmental Mycology*, vol. 3. Edward Arnold, London.

Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas y Vargas, M. D. L., ... Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–15. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.013

Ndolo, V. U., Beta, T., & Fulcher, R. G. (2013). Ferulic acid fluorescence intensity profiles and concentration measured by HPLC in pigmented and non-pigmented cereals. *Food Research International*, 52(1), 109–118. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.031

Pérez, V. S., Merino, F. C. G., Zavala, J. J. G., Ferreira, J. B., Varela, A. S., Rojas, N. P., & Tiessen, A. (2012). QTLs asociados al contenido de carotenos en hojas de maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia*, 46, 333–345.

Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., & Sun, R.-C. (2009). Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6305–17. doi:10.1021/jf900986b

- Ramírez Salinas, G. (2010). *Química del ácido ferúlico: cuantificación a escala preparativa a partir de nejayotes de maíces criollos y ampliación de su diversidad estructural* (p. 102). México, D.F.: Facultad de Química, UNAM.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to Carotenoid analysis in food. Campinas, SP., Brasil.
- Salinas Moreno, Y., Aragón Cuevas, F., Moncada, Ybarra, C., Aguilar Villarreal, J., Altunar, B., & Sosa, E. (2013). Caracterización Física y Composición Química de Razas de Maíz de Grano Azul/Morado de las Regiones Tropicales y Subtropicales de Oaxaca. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 23–31.
- Salinas Moreno, Y., Chávez Cruz, F. J., Díaz Ortiz, S. A., & Castillo González, F. (2012). Granos de Maíces Pigmentado de Chiapas, Características Físicas, Contenido de Antocianinas y Valor Nutracéutico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 33–41.
- Shiyi, O., Kwork, K. (2004) Review, Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of science of food agriculture*. 84: 1261 – 1269.
- Singh, N., Singh, S., & Shevkani, K. (2011). Maize: Composition, Bioactive Constituents, and Unleavened Bread. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (pp. 89–99). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-380886-8.10009-1
- Tanaka, A. y Yamaguchi, I. (1972). Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. *Fac. Agric. Hakkaido Univ.* 57: 71 - 132.
- Tiaz, L., Zeiger, E., (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*, 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 283–308 (Chapter 13).
- Yang, Z., & Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 470–476. doi:10.1016/j.ifset.2010.03.003
- Zhang, Z., Smith, C., & Li, W. (2014). Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. *Food Research International*, 65, 423–436. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.068
- Zilić, S., Serpen, A., Akillioğlu, G., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1224–31. doi:10.1021/jf204367z