



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS ACUOSOS Y ETANÓLICOS DE
DIVERSAS VARIEDADES DE MAÍZ DEL ESTADO DE
MÉXICO, SOBRE ABTS^{•+} Y PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO COMO ESPECIE REACTIVA DE
OXÍGENO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:
BEATRIZ SUSANA JUAREZ BERNAL

ASESOR ACADÉMICO:
DRA. LETICIA XOCHITL LÓPEZ MARTÍNEZ

ASESOR ADJUNTO:
DR. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA



TOLUCA, MÉXICO

OCTUBRE 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3er. Oficio E.P./531/2014
11 de julio de 2014

P. Q. en A. BEATRIZ SUSANA JUÁREZ BERNAL
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad TESIS, estará formado por:

Dr. JUAN OROZCO VILLAFUERTE
PRESIDENTE

Dra. MARÍA DOLORES
HERNÁNDEZ NAVARRO
VOCAL

Dra. LETICIA XOCHITL LÓPEZ MARTÍNEZ
SECRETARIO

Dr. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN
SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



C.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

BEATRIZ SUSANA JUAREZ BERNAL

DEDICATORIAS

A Dios

Por darme la oportunidad de haber nacido y permitirme estar en el lugar correcto siempre.
Por todas las lecciones buenas y malas durante estos últimos años que me ayudaron a fortalecerme más como persona.
Por enseñarme cuan valiosa es la vida y la calidad humana.
Por enseñarme a continuar a pesar de todos los momentos difíciles y llevarme por el camino para aprender que si algo no es difícil es porque realmente no vale la pena.
Por permitir que mi mamá aún este a mi lado hoy para ver juntas nuestro triunfo.

A mi mamá Micaela

Por darme la fortaleza que tengo y enseñarme a luchar día a día a pesar de las adversidades.
Por cada uno de sus sacrificios, desvelos y fuerza de voluntad que tuvo durante todos estos años desde que llegue a su vida.
Porque siempre lucho y se mantuvo de pie con una sonrisa en el rostro.
Porque siempre eligió las mejores palabras para alentarme en mi camino.
Por darme la mejor herencia en mi vida "la educación". Porque este es ahora uno de sus mayores triunfos.
TE AMO CON TODO MI CORAZÓN MAMITA LINDA

A mi hermanita Sílvia

Por decirme las palabras correctas para darme fuerza y seguir adelante.
Por tú sonrisa y travesuras que me alegraban siempre el día.
Por cada uno de los momentos que hemos compartido juntas desde pequeñas y que nos ha ayudado a llegar hasta donde hoy estamos.
TE QUIERO MUCHO NIÑITA TRAVIESA

A Alfredo S. Dolores

Por haber llegado a mi vida y permanecer junto conmigo en todo momento.
Por compartir cada día de tú vida en mis alegrías y en las tristezas demostrándome siempre tú cariño.
Porque has sabido ayudarme en cualquier aspecto cuando más lo necesito y me has dado lo mejor de ti.
Porque has sabido comprenderme desde el primer instante en que nos conocimos.
Por soportarme tantos años juntos y tenerme tanta paciencia.

A mis amigas

Ilse, Leydi y Toñita que me apoyaron cuando más las necesitaba, por todos los momentos divertidos que pasamos en la Facultad de Química.
Por cada uno de los momentos en que me animaron para que juntas siguiéramos en esto hasta terminar. LAS EXTRAÑO NIÑAS.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Xochitl López porque a pesar de tener poco tiempo de conocerme siempre creyó en mí, me otorgo parte de su valioso tiempo y recursos, compartió conmigo su conocimiento y afino cada uno de los detalles para que este proyecto finalice siendo excelente.

Al Dr. Octavio Dublán por ser tan excelente profesor y persona, porque siempre otorgó parte de su tiempo a pesar de sus múltiples ocupaciones, por sus consejos y la orientación que me ofreció en mi trayectoria académica.

A la Mtra. Alicia Reyes porque más que una profesora me otorgó su amistad y me escuchó en los momentos difíciles, además de brindarme su apoyo durante toda mi formación académica en la Facultad de Química, por cada uno de sus consejos y palabras de aliento que me motivaron.

Al Dr. Juan Orozco por la confianza que me ofreció en todo momento durante la realización de la parte experimental de este trabajo y por la alegría que siempre contagia.

A la Dra. María Dolores Hernández Navarro por compartir su conocimiento conmigo y enriquecer este trabajo otorgando parte de su tiempo en la revisión.

Al COMECYT por el financiamiento otorgado para que este proyecto.

A todas las personas que de forma directa o indirecta pusieron su granito de arena para que este trabajo hoy sea una realidad.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Generalidades del maíz (<i>Zea mays</i> L.)	4
1.1.1 Estructura del grano de maíz	4
1.1.2 Composición química del grano de maíz	5
1.1.3 Panorama actual sobre producción y consumo de maíz	6
1.1.4 Producción de maíz en el Estado de México	8
1.1.5 Usos del maíz	8
1.1.6 Variedades de maíz	9
1.2 Compuestos fenólicos	11
1.2.1 Compuestos fenólicos y su clasificación	11
1.2.2 Propiedades de los compuestos fenólicos	14
1.2.3 Dieta y compuestos fenólicos	14
1.3 Antioxidantes	15
1.3.1 Definición de antioxidante y su clasificación	15
1.3.2 Determinación de la actividad antioxidante	15
1.3.2.1 Condiciones para la estandarización de la determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	15
1.3.2.2 Reacciones SET y reacciones HAT	18
1.3.2.3 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato))	20
1.4 Especies reactivas de oxígeno (EROS)	21
1.4.1 Definición de especies reactivas de oxígeno (EROS)	21
1.4.2 Formación de las especies reactivas de oxígeno	22
1.4.3 Efecto de las especies reactivas de oxígeno en biomoléculas	23
1.4.3.1 Carbohidratos	24
1.4.3.2 Proteínas	24
1.4.3.3 Lípidos	25
1.4.3.4 Ácidos nucleicos	28

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
2.1 Justificación	30
2.2 Hipótesis	31
2.3 Objetivos	32
2.3.1 Objetivo general	32
2.3.2 Objetivos específicos	32
3. MÉTODOS	33
3.1 Métodos	34
3.1.1 Selección de muestra	34
3.1.2 Preparación de los extractos acuosos	35
3.1.3 Preparación de extractos etanólicos	36
3.1.4 Determinación de compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos	36
3.1.5 Determinación de antocianinas totales	37
3.1.6 Determinación de actividad antioxidante total	37
3.1.7 Determinación de potencia total de reducción en medio acuoso	38
3.1.8 Inhibición de la actividad del peróxido de hidrógeno	39
3.1.9 Análisis estadístico	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos	41
4.2 Contenido de antocianinas totales	44
4.3 Actividad antioxidante	46
4.3.1 Actividad antioxidante total	46
4.3.1.1 Relación entre el contenido de compuestos fenólicos total y la actividad antioxidante	46
4.3.2 Potencia total de reducción en medio acuoso	48
4.3.3 Inhibición de la formación de peróxido de hidrógeno	49
4.3.3.1 Relación entre el contenido de compuestos fenólicos total y la capacidad de inhibir la formación de peróxido de hidrógeno	49
5. CONCLUSIONES	51
6. SUGERENCIAS	53
7. REFERENCIAS	55
8. ANEXOS	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cierre de la producción agrícola de maíz en el Estado de México	8
2	Origen y pigmentación de las diferentes variedades de maíz del Estado de México utilizadas en el estudio	41
3	Contenido de compuestos fenólicos y antocianinas totales en las diferentes variedades de maíz del Estado de México	42
4	Actividad antioxidante total de diferentes variedades de maíz del Estado de México	47
5	Potencia total de reducción de diferentes variedades de maíz del Estado de México	48
6	Inhibición de peróxido de hidrógeno de diferentes variedades de maíz del Estado de México	49
7	Datos para la realización de la curva de calibración en la determinación de compuestos fenólicos totales	63
8	Datos para la realización de la curva de calibración del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno	67
9	Datos para la realización del blanco en la curva de calibración del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno	67
10	Determinación del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno de las diferentes variedades de maíz	68
11	Determinación de blancos en el porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno de las diferentes variedades de maíz	68

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras que constituyen el grano de maíz	5
2	Principales países productores de maíz (1998-2008)	6
3	Principales estados productores de maíz (1998-2008)	7
4	Las antocianidinas más comunes en flores y frutos	10
5	Estructura de los compuestos fenólicos	13
6	Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular	23
7	Reacciones de la peroxidación lipídica	27
8	Granos de maíz de las diferentes variedades del Estado de México utilizados en el estudio	34
9	Muestras de harina de maíz del Estado de México. De izquierda a derecha blanco, amarillo, rojo y azul	35
10	Curva de calibración de contenido de fenoles	62
11	Curva de calibración para determinación de compuestos fenólicos	63
12	Curva de calibración para la determinación de la inhibición de los radicales libres de ABTS ^{•+}	65

RESUMEN

México es considerado como uno de los principales lugares de origen del maíz (*Zea mays* L.) por lo que posee una gran diversidad genética y se han clasificado al menos 59 razas con base en caracteres morfológicos. La gran diversidad de maíces pueden ser agrupados en blancos, amarillos y pigmentados. Recientemente se ha dado a conocer el contenido de pigmentos en los granos de maíz que además de ser usados como colorantes naturales se les atribuye funciones biológicas como antioxidantes.

El término compuestos fenólicos abarca alrededor de 8000 compuestos y la mejor propiedad que los describe es la capacidad antioxidante.

El TEAC se define como la concentración de una disolución TROLOX con un potencial antioxidante equivalente a una concentración de 1 mM del compuesto fenólico a estudiar y refleja la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar hidrógeno para secuestrar un radical libre y así detener la acción de un agente oxidante.

La distribución particular de electrones hace del oxígeno un excelente aceptor de electrones. En un sistema biológico ideal, la reducción de oxígeno a agua sucede secuencialmente, si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones se forman las especies reactivas de oxígeno. El término EROS se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos.

El objetivo del presente estudio fue estudiar la actividad antioxidante sobre ABTS^{•+} y peróxido de hidrógeno de compuestos fenólicos totales y antocianinas totales obtenidos de extractos acuosos y etanólicos del maíz blanco, amarillo, rojo y azul.

Las concentraciones de compuestos fenólicos totales están entre 110-206 para los extractos acuosos y de 177-249 para los extractos etanólicos expresados en mg de ácido gálico/100 g. En cuanto al contenido de antocianinas totales los valores van desde 0.47-70.44 mg de cianidina 3-glucósido/100 g. El maíz azul presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos totales en ambos tipos de extracción y de igual forma en el contenido de antocianinas totales. El disolvente que presentó mejor eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos fue el etanol al 96%.

Los porcentajes de actividad antioxidante total fueron 36.5-69.8 y 9.6-68.6; en potencia total de reducción 20.3-64.5 y 13.1-70.1 y por último en cuanto a la inhibición de peróxido de hidrógeno 11.4-51.3 y 6.6-61.0 para los extractos acuosos y etanólicos respectivamente en cada medición. Así pues no se observó una correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas sobre la inhibición de ABTS^{•+} y peróxido de hidrógeno.

Introducción

México es considerado como uno de los principales lugares de origen del maíz (*Zea mays* L.) por lo que posee una gran diversidad genética de esta especie (Salinas, 2010), debido a esto las distintas variedades de maíz no tienen la misma composición química, presentan diferencias en sus propiedades y en su utilización final (Méndez *et al.*, 2005). Existen variedades para casi cualquier necesidad específica; variedades de 1.5 a 5 metros de altura; diferentes grados de tolerancia al calor, al frío o ala sequía; adaptación a diferentes tipos de suelo, altitud y latitud (Flores, 2011). Dentro de esta diversidad se encuentran los maíces de grano pigmentado con colores que van del negro hasta el rojo. El color se debe a la presencia de las antocianinas, que son flavonoides caracterizados por sus propiedades y sus colores brillantes. Estas variedades son cultivadas por pequeños productores, quienes los consumen en forma de tortillas, tamales, pinole, atoles, tlacoyos, etc., o bien comercializan sus excedentes en mercados regionales en donde quienes los compran los destinan para elaborar básicamente los mismos productos. Sin embargo, el conocimiento actual sobre los beneficios que trae a la salud humana el consumo cotidiano de flavonoides, entre estos las antocianinas, anima a incorporarlos en otros alimentos como parte de los ingredientes que los componen.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del maíz (*Zea mays* L.)

1.1.1 Estructura del grano de maíz

El fruto de la planta del maíz es el grano, en la figura 1 se representan las estructuras que lo constituyen, botánicamente es un cariósipide y agrícolamente es una semilla. Ésta formado por:

Pericarpio: Cubierta del fruto, se reconoce como testa, hollejo o cáscara.

Aleurona: Capa cubierta de celulosa del endospermo, de naturaleza proteica.

Endospermo: Tejido de reserva de la semilla. Es la parte de mayor volumen dividida en dos partes bien diferenciables, el suave o harinoso y el duro o vítreo. La proporción depende de la variedad.

Escutelo o cotiledón: Parte del embrión.

Embrión o germen: Planta en miniatura con la estructura para originar una nueva planta, al germinar la semilla.

Capa terminal o cofia: Parte que se une al olote, con una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad.

Capa hilar: Se encuentra entre la capa terminal y la base del germen, la cual funciona como un mecanismo sellante durante la maduración del grano. La formación de la capa negra indica que el grano se encuentra maduro (Gruintal, 2007).

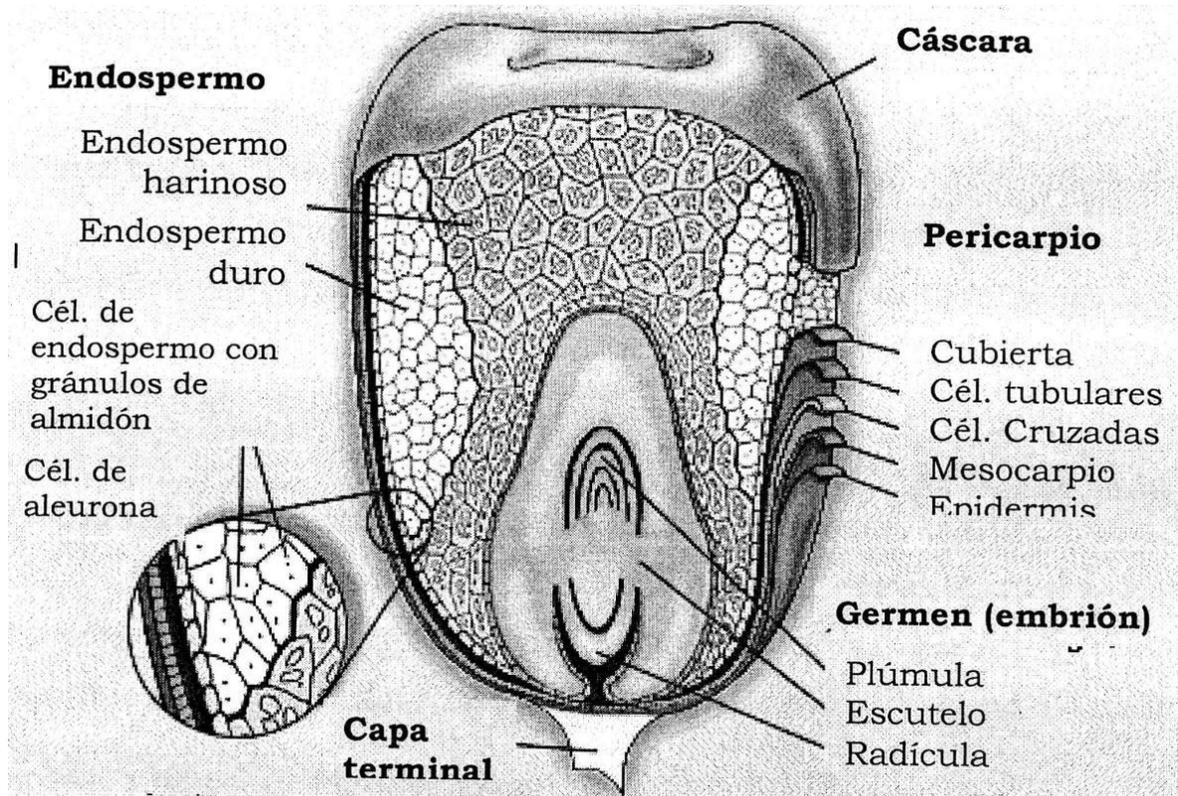


Figura 1. Estructuras que constituyen el grano de maíz (López, 2008).

1.1.2 Composición química del grano de maíz

El grano de maíz maduro tiene un peso promedio de 350 mg (González, 1995). Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasa crudas relativamente bajo. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33% por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (aproximadamente 20%) y minerales (Beltrán, 2006). Los principales componentes del maíz son: almidón, proteínas y lípidos, aunque contiene también en menores cantidades fibra cruda, azúcares, minerales y otras sustancias orgánicas como vitaminas, carotenoides y pigmentos. Sin embargo, la composición de los

granos de maíz varía de acuerdo a las condiciones climatológicas y edafológicas del lugar donde sea cultivado y también entre los distintos tipos de maíz (López, 2008).

1.1.3 Panorama actual sobre producción y consumo de maíz

El volumen de producción en cada ciclo agrícola se encuentra determinado por factores como la superficie destinada al cultivo, los rendimientos obtenidos, las expectativas de importaciones y exportaciones en el comercio internacional y los precios en el mercado.

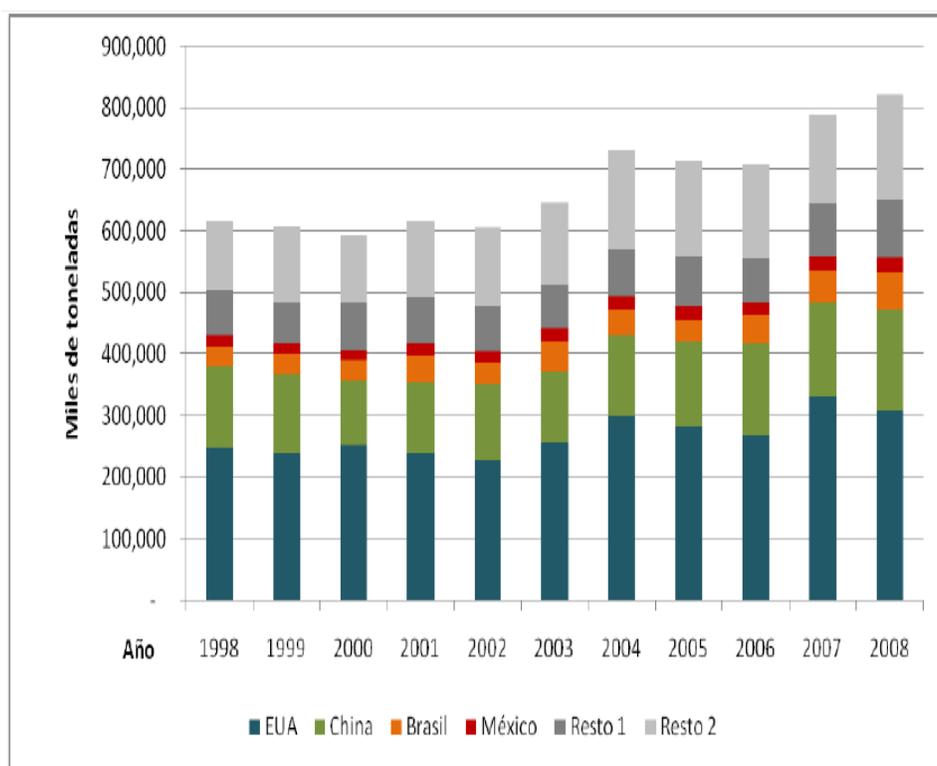


Figura 2. Principales países productores de maíz (1998-2008) (SIAP, 2010)

A nivel nacional el grano que más se produce es el maíz, esto debido a que constituye la principal fuente de energía para la dieta de los mexicanos y por otro lado se utiliza como forraje para el consumo animal.

La superficie cosechada de maíz a nivel mundial presentó un incremento de 138.8 a 161 millones de hectáreas de 1998 a 2008 respectivamente. Estados Unidos mantuvo el primer lugar con el 21%. Por su parte, México ocupó el 4° lugar en superficie cosechada de maíz con el 5% del total mundial (Figura 2) (SIAP, 2010).

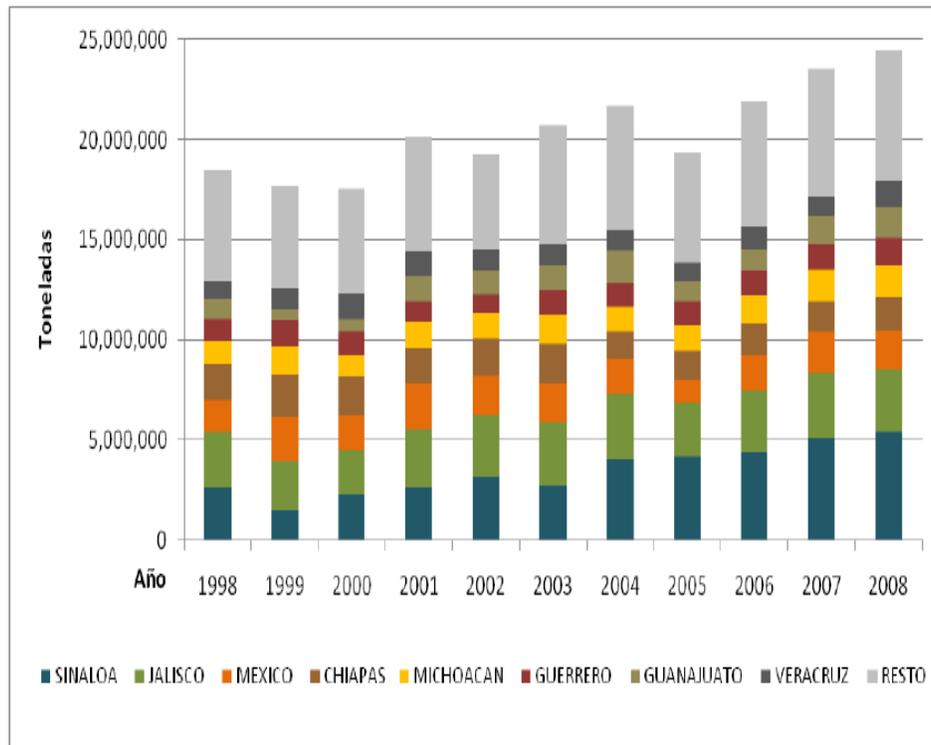


Figura 3. Principales estados productores de maíz (1998-2008) (SIAP, 2010)

Entre 1998 y 2008, aproximadamente el 70% del volumen de producción en México se obtuvo de ocho estados, entre los que destacan por el porcentaje de contribución, Sinaloa (16.9%), Jalisco (14.2%), Estado de México (9%) y Chiapas con el 8.4% (Figura 3) (SIAP, 2010).

En el 2009 las existencias iniciales de maíz blanco en México fueron de 2.4 millones de toneladas, y se cosecharon 23.7 millones de toneladas, de las cuales, 16 millones que representaron el 68% se convirtieron en producción comercializable, a éstas se sumaron 105 mil toneladas en importaciones y se descontaron 176.8 miles de toneladas destinadas a la exportación, quedando así 18.3 millones de toneladas disponibles para consumo nacional utilizándose 84% y quedando el 16% restante como existencias finales. Dentro del total, el 75.1% fue destinado a consumo humano, el 19.2% pecuario, el 1.3% se utilizó como semilla para siembra y 4.4% fueron mermas (SIAP, 2010).

1.1.4 Producción de maíz en el Estado de México

El maíz tiene una marcada influencia sobre el desarrollo social y económico de la población del Estado de México. La superficie territorial de la entidad comprende 22 499.95 km, de los cuales en el 18% se siembra el maíz. Por la superficie que ocupa, el maíz es el cultivo anual más importante de la entidad. El cultivo de maíz en la entidad se realiza principalmente en el ciclo primavera-verano (PV), con 98.5% de la superficie dedicada a este producto, el 1.5% restante se efectúa en el ciclo otoño-invierno (OI). Lo anterior significa que el mayor volumen de producción de maíz en la entidad se obtiene en el ciclo primavera-verano.

El Estado de México cuenta con una gran diversidad de maíces que pueden ser agrupados en blancos, pigmentados y amarillos (Salinas *et al.*, 2010). Los esfuerzos de la producción se enfocan en la obtención de maíz blanco como lo muestra datos reportados por el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) en el cierre de producción agrícola para el año agrícola OI+ PV 2010 en la tabla 1.

Tabla 1. Cierre de la producción agrícola de maíz en el Estado de México

Estado de México							
Ciclo: Año agrícola OI+ PV 2010							
Modalidad: Riego + Temporal							
Cultivo	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Superficie Siniestrada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Maíz Blanco	545,412	528,583	16,829	1,505,440	2.85	3,089	4,651,068
Maíz Amarillo	8,645	8,495	150	21,916	2.58	3,321	72,787
Maíz de color	5,728	4,568	1,160	12,699	2.78	3,535	44,898

Elaboración propia en base a información de SIAP

1.1.5 Usos del maíz

Todas las partes de la planta tienen una forma de uso: el grano para tortillas, tostadas, atole, tamales, totopos, pinole, pozole, pozol, etc.; el tallo para jugo; los tallos secos para

cercas o combustible, los olotes y raíces como combustible; hongos de la mazorca tierna como alimento; las hojas para envolver tamales, etc. (Flores, 2011).

El maíz se utiliza para la alimentación humana, así como la alimentación animal (Fox y Manley, 2009).

Su alto contenido de almidón ha sido de interés en el sector de fabricación de combustible (etanol), lo que resulta en el debate sobre el uso de cereales para alimentos contra combustibles.

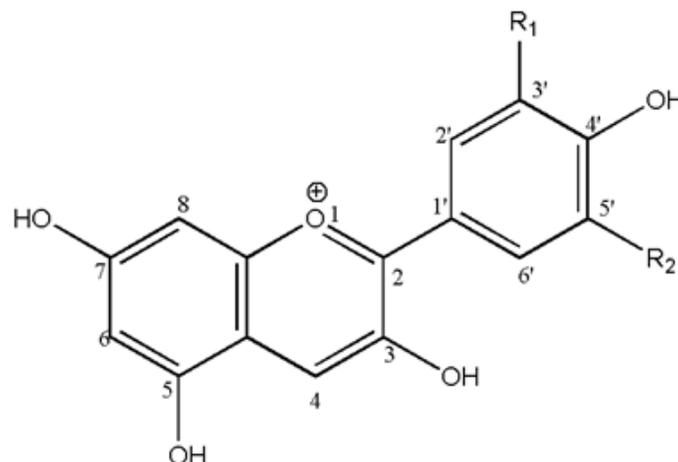
Una serie de alimentos procesados se producen a partir de maíz, incluyendo pan, tortillas, botanas de maíz, cereales de desayuno y barras. En los países más pobres desarrollados, donde el maíz es un alimento básico y producido por las prácticas agrícolas de subsistencia, su procesamiento es limitado. Para la producción comercial, el maíz puede someterse a cualquiera tipo de molienda, ya sea en seco o en húmedo para obtener productos finales específicos (Fox y Manley, 2009).

1.1.6 Variedades de maíz

En México se han clasificado al menos 59 razas con base en caracteres morfológicos. Dentro de las razas se tienen variantes en función de la coloración del grano, el cual se determina por la presencia de carotenoides, antocianinas y flobafenos. Uno de los componentes de la diversidad fenotípica es precisamente el color del grano (Salinas *et al.*, 2010).

Recientemente se ha dado a conocer que el contenido de pigmentos en los granos de maíz que además de ser usados como colorantes naturales se les atribuye funciones biológicas como antioxidantes (Ruiz *et al.*, 2008).

Aunque se han descrito 12 diferentes antocianidinas, las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 4). Las tres primeras son más frecuentes en frutos, en tanto que el resto lo son en flores (Salinas *et al.*, 2010).



Pelargonidina: $R_1=H$, $R_2=H$

Cianidina: $R_1=OH$, $R_2=H$

Delfinidina: $R_1=OH$, $R_2=OH$

Peonidina: $R_1=OCH_3$, $R_2=H$

Petunidina: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$

Malvidina: $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$

Figura 4. Las antocianidinas más comunes en flores y frutos (Salinas *et al.*, 2010).

En base al número de azúcares presentes en su estructura, las antocianinas se clasifican en: monoglucósidos (un azúcar); diglucósidos (dos azúcares), y triglucósidos (tres azúcares). En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glicosilada; esto es, unidas a algún azúcar, y en cuyo caso se denominan antocianinas. El azúcar presente en la molécula les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7 (Salinas *et al.*, 2010).

En algunos casos los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p -cumárico, caféico, ferúlico o sinápico). Se ha observado que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura, cuando en la molécula de antocianina se encuentran únicamente azúcares, se denominan no aciladas; si además de los azúcares están presentes uno o varios radicales acilo, se catalogan como aciladas (Salinas *et al.*, 2010).

Las antocianinas del grano de maíz se concentran en el pericarpio, capa de aleurona, o en ambas estructuras, de acuerdo a esta localización se pueden determinar los diferentes usos del grano. Cuando se presentan en el pericarpio y en la capa de aleurona, los maíces tienen potencial para la extracción de pigmentos; esta condición la cumplen los maíces de color púrpura o rojo intenso. Si se localiza en la capa de aleurona son adecuados para elaborar productos nixtamalizados. Los maíces con estas características son de color morado, azul o negro. Los granos con pigmento en el pericarpio no son adecuados para la nixtamalización porque con las condiciones de pH alcalino y temperatura elevada que caracterizan este proceso, las antocianinas son degradadas, y adquieren un color café pardo.

Las antocianinas simples reportadas para maíz son: cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido, la primera es común en los maíces de grano azul y morado y las dos restantes en maíces de grano rojo (Salinas *et al.*, 2010).

1.2 Compuestos fenólicos

1.2.1 Compuestos fenólicos y su clasificación

El término compuestos fenólicos abarca alrededor de 8000 compuestos, todos poseen un rasgo estructural común, un fenol (un anillo aromático que contenga al menos un sustituyente hidroxilo) (Leopoldiniet *al.*, 2011).

Una clasificación los divide en fenoles simples y polifenoles, dependiendo del número de subunidades de fenol. Los primeros incluyen los ácidos fenólicos y poseen un ácido carboxílico como grupo funcional. Contienen dos carbonos constitutivos que distinguen sus estructuras: las estructuras hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos y consisten principalmente de los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Figura 5).

Los segundos poseen al menos dos subunidades, incluyen los flavonoides, estilbenos, y aquellos compuestos que poseen tres o más subunidades se conocen como taninos. Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante, e incluye a más de 5000 compuestos bien identificados (Gutiérrez, 2002).

Los flavonoides consisten en un gran grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular, derivados del benzo- γ -pirano (Figura 5). La característica estructural básica de todos es el núcleo flavane (2-fenil-benzo- γ -pirano), un sistema de dos anillos de benceno (A y B) unidos por un oxígeno que contiene el anillo pirano (C). De acuerdo con el grado de oxidación del anillo C, el patrón de hidroxilación del núcleo, y el sustituyente en el carbono 3, se pueden clasificar en las subclases flavonas, isoflavonas, los flavanoles (catequinas), flavonoles, flavanonas, antocianinas y proantocianidinas. Los flavonoles difieren de flavanonas por un grupo hidroxilo en la posición C3, y por un doble enlace C2-C3. Las antocianidinas difieren de los otros flavonoides por poseer un átomo de oxígeno cargado en el anillo C. El anillo C está abierto en las chalconas. Muchos flavonoides poseen de forma natural los glúcidos, y la sustitución de los hidratos de carbono son la D-glucosa, L-ramnosa, glucoramina, galactosa y arabinosa. La familia de los estilbenos incluye varios compuestos entre los que el resveratrol, pterostilbeno, y el piceatannol son los más representativos, caracterizados por un doble enlace de conexión de los anillos fenólicos (Figura 5). Los compuestos poliméricos, llamados taninos, se dividen en condensados e hidrolizables. Los condensados son polímeros de flavonoides y los hidrolizables contienen ácido gálico, o compuestos similares, esterificados con un carbohidrato (Leopoldini *et al.*, 2011).

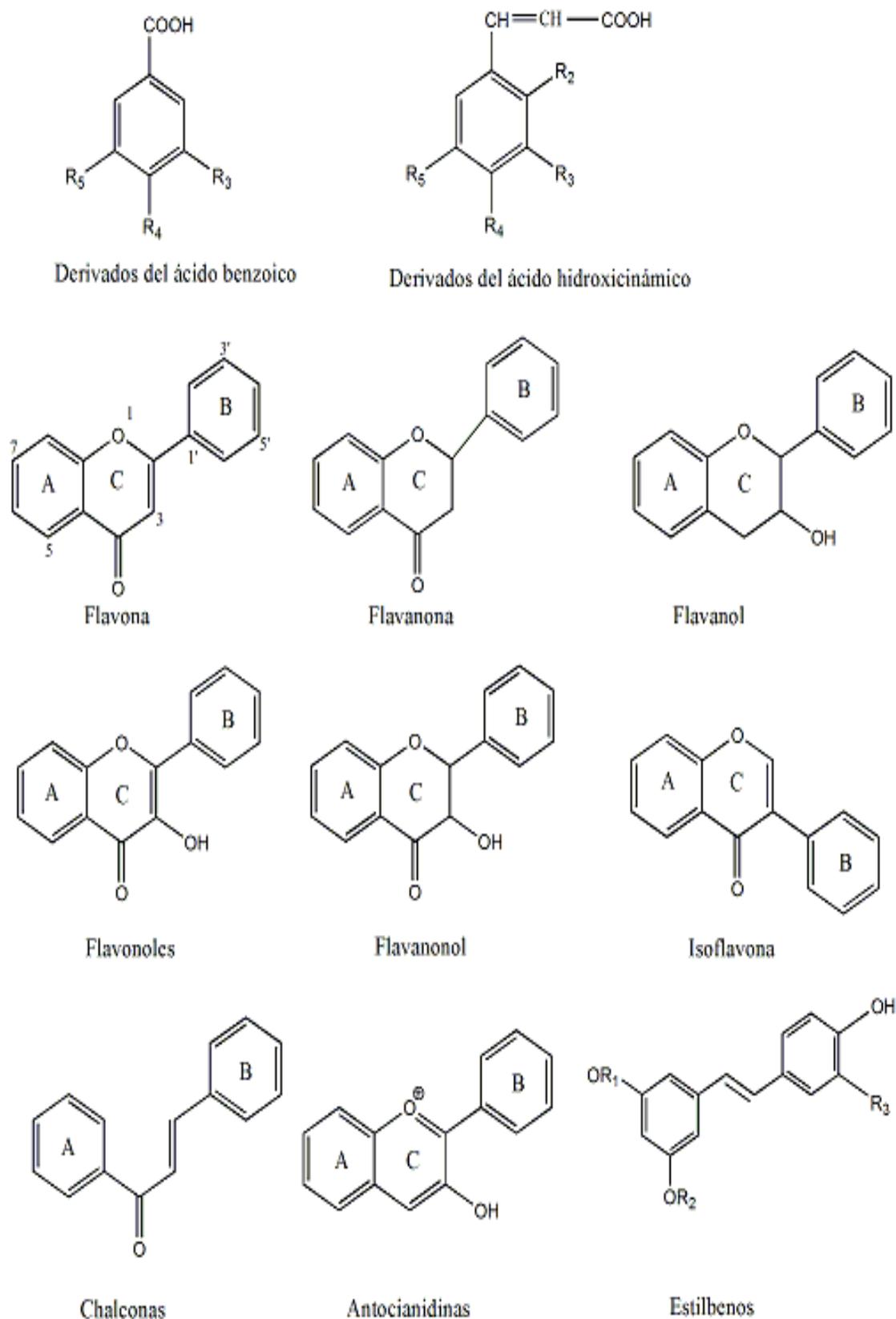


Figura 5. Estructura de los compuestos fenólicos (Fuente: Leopoldiniet *al.*, 2011).

1.2.2 Propiedades de los compuestos fenólicos

Las propiedades farmacológicas, medicinales y bioquímicas de los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiadas. Se han reportado con efectos antioxidantes, vasodilatadores, anticancerígenos, antiinflamatorios, estimulantes del sistema inmune, antialérgicos, antivirales, y estrógenicos y las actividades de la inhibición en contra de las enzimas fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa.

La mejor propiedad que se describe de los compuestos fenólicos es la capacidad antioxidante frente a radicales libres que normalmente se producen por el metabolismo de las células o en respuesta a factores externos. Los radicales libres pueden dañar biomoléculas tales como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, causando peroxidación en las membranas celulares (Leopoldini *et al.*, 2011).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve influenciada por varios factores como la posición y el grado de hidroxilación, la polaridad, la solubilidad y la estabilidad de los radicales (fenoxi). La estructura de los compuestos fenólicos, en particular, la posición y el grado de hidroxilación, es de primordial importancia en la determinación de su actividad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2005). Las disposiciones estructurales que imparten la mayor actividad antioxidante son la sustitución 3' 4' orto dihidroxi en el anillo B, las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7, el doble enlace entre los carbonos 2 y en combinación con los grupos 4 ceto y 3 hidroxilo; sin embargo, la sustitución de grupos hidroxilo por glicosilación disminuye la actividad antioxidante. Los grupos ortodihidroxi estructuralmente son los más importantes por presentar una alta actividad antioxidante; por otro lado se ha examinado el efecto de los elementos estructurales del anillo C, sobre los radicales libres, que resalta la actividad de estos compuestos (Muñoz y Escudero, 2007).

1.2.3 Dieta y compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos no poseen las características de las vitaminas, no son amidas y conforman otro grupo químico, pero por su actividad protectora e imposibilidad del

organismo humano en producirlos, merecen ser incorporados a través de la dieta junto con los nutrientes esenciales. Los hábitos de alimentación son muy diversos en diferentes zonas del mundo; el valor medio de flavonoides se calcula como 23 mg/día (Muñoz y Escudero, 2007).

Cantidades significativas de sustancias fenólicas activas están presentes en la dieta humana.

1.3 Antioxidantes

1.3.1 Definición de antioxidante y su clasificación

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o de la propagación de la oxidación de las reacciones en cadena. Existen antioxidantes sintéticos y naturales. Los antioxidantes sintéticos son compuestos fenólicos con estructuras de varios grados de la sustitución de alquilo, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, los aminoácidos y aminos), carotenoides y el ácido ascórbico. El interés en los antioxidantes naturales ha aumentado considerablemente. La capacidad de algunos compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes se ha demostrado en la literatura (Velioglu *et al.*, 1998).

1.3.2 Determinación de la actividad antioxidante

1.3.2.1 Condiciones para la estandarización de la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Se han planteado una serie de condiciones para la estandarización de la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*:

- (i) evaluar reacciones de transferencia de electrones y del átomo de hidrógeno
- (ii) especificar el sustrato de oxidación

- (iii) asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo
- (iv) tener un mecanismo y un punto final definido
- (v) una buena repetibilidad y reproducibilidad
- (vi) ser adaptable para medir antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos
- (vii) usar distintas fuentes de radicales
- (viii) ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala y
- (ix) la utilización de moléculas biológicas pertinentes (Kuskoskiet *al.*, 2005; Segundo *et al.*, 2008).

Sin embargo, la realidad es que no existe ningún método en la actualidad que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, en vez de por la combinación de varios, como se hace en la actualidad. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes y en un mismo alimento pueden existir mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento.

Además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de alimentos, las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes (Pérez, 2007).

El conocimiento de los principios de la química de las metodologías disponibles es de suma importancia para seleccionar la técnica adecuada. Generalmente, los métodos *in vitro* de análisis para la determinación de la capacidad antioxidante se basan en dos enfoques diferentes, denominados como régimen competitivo o no competitivo.

En el esquema competitivo, las especies objetivo, definido aquí como un compuesto que representa una biomolécula que puede ser atacado *in vivo*, y los compuestos antioxidantes que compiten por las especies reactivas (radicales o no radicales). La evaluación de la capacidad antioxidante se basa en la cuantificación de un compuesto que facilita la medición analítica. En la mayoría de los ensayos competitivos, el compuesto que facilita la medición es la especie objetivo o su forma oxidada. No obstante, el compuesto que facilita la medición también puede ser un compuesto añadido después de la reacción antes mencionada que permite la cuantificación de las especies restantes reactivos o moléculas objetivo. En estos ensayos, la capacidad antioxidante de los compuestos ensayados depende de:

- i) la velocidad de reacción entre ellos y las especies reactivas
- ii) la velocidad de reacción entre la molécula objetivo y las especies reactivas
- iii) la relación de la concentración entre los antioxidantes y el objetivo

Entre los requisitos para este tipo de ensayos, se destaca:

- a) el objetivo deberá reaccionar con los oxidantes a baja concentración.
- b) debe haber un cambio espectroscópico dramático entre la sonda, nativo y oxidado (para maximizar la sensibilidad),
- c) ninguna reacción en cadena de radicales más allá de la oxidación de objetivo/sonda debe producirse
- d) el antioxidante no debe reaccionar con las especies objetivo.

En los ensayos no competitivos, los compuestos antioxidantes interactúan con especies reactivas sin la presencia de cualquier otra molécula objetivo competitiva. De esta manera, estos ensayos implican dos componentes en la mezcla de reacción inicial: el compuesto antioxidante y las especies reactivas. Por el contrario, las especies reactivas

restantes pueden medirse después de la adición de algún reactivo derivado (Segundo *et al.*, 2008).

No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoskiet *al.*, 2005).

En cualquier caso, todos los ensayos *in vitro* sobre capacidad antioxidante de extractos de alimentos, deben completarse con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante.

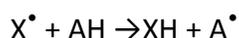
Otro aspecto a considerar en la determinación de capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden existir cambios en la manipulación, en la temperatura del ensayo, en la variación de la muestra o sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (por ejemplo, tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos), en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: disolvente, entre otros). Asimismo, el hecho de que en el sistema a analizar haya una alta o una baja actividad de agua es también importante, ya que este factor afecta a la migración de compuestos, puede producir fenómenos de cristalización, coalescencia, complejación, colapsos de estructuras, por mencionar algunos. Además, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Pérez, 2007).

1.3.2.2 Reacciones SET y reacciones HAT

Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes de los alimentos pueden ejercer su acción, entre aquellos compuestos que reaccionan directamente con los radicales libres, como pueden ser los polifenoles,

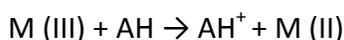
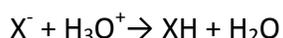
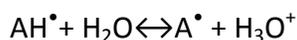
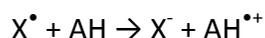
deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar varios métodos de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo X[•] el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo X[•] el radical libre y AH el antioxidante:



En principio, estas reacciones dependen mucho más del disolvente que las HAT; sin embargo, se ha visto que el disolvente puede ejercer una influencia clara en el ABTS^{••}, a pesar de ser métodos HAT.

Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden

interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados.

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto de baja entalpía facilitaría la abstracción del átomo de H. Asimismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización (Pérez, 2007).

1.3.2.3 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azinobis - (3 – etilbenzotiazolin - 6 – sulfonato))

Se han desarrollado muchos métodos para la medición de la actividad antioxidante y son esencialmente métodos de inhibición: se generan especies de radicales libres y las muestras inhiben esta generación. Estos métodos varían, así como el radical libre que generan.

El ensayo para medir la actividad antioxidante total expresada en equivalente TROLOX (TEAC) constituye uno de los métodos más citados en la bibliografía científica para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. El TEAC se define como la concentración de una disolución TROLOX con un potencial antioxidante equivalente a una concentración de 1 mM del compuesto fenólico a estudiar y refleja la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar hidrógeno para secuestrar un radical libre y así detener la acción de un agente oxidante (López, 2008).

El ensayo TEAC se trata de una reacción SET, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar al radical catiónico ABTS^{••+} (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), captura que produce un descenso en la absorbancia a 734 nm. El descenso producido por el TROLOX es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando al mismo tiempo (Pérez, 2007).

El radical se puede generar enzimáticamente con mioglobina o peroxidasa de rábano; químicamente con dióxido de manganeso (MnO_2), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) o ABAP [2,2'-azobis-(2- amidinopropeno) HCl]; o electroquímicamente. Una vez generado presenta nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm (Kuskoskiet *al.*, 2004; Pérez, 2007)

La base de este método es la generación de un cromóforo radical catión $ABTS^{\bullet+}$ y la relativa capacidad de los antioxidantes de blanquear el radical libre en relación al TROLOX como patrón, sustancia que se caracteriza por ser un análogo hidrosoluble de la vitamina E (López- Martínez *et al.*, 2009).

Actualmente el método ABTS ha sido ampliamente utilizado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde y es químicamente estable (Kuskoskiet *al.*, 2004).

La capacidad antioxidante de $ABTS^{\bullet+}$ pueden ser evaluados sobre un amplio intervalo de pH, lo que lo hace útil para estudiar el efecto del pH sobre los mecanismos antioxidantes. Además, el radical $ABTS^{\bullet+}$ es soluble en agua y en disolventes orgánicos, lo que permite la determinación de la capacidad antioxidante en compuestos o muestras hidrofílicos o lipofílicos; sin embargo, como los resultados obtenidos para las muestras se relacionan con un compuesto antioxidante estándar que muestra el comportamiento cinético diferente, los resultados proporcionados por este ensayo son dependientes del tiempo de análisis

Termodinámicamente, cualquier compuesto que tiene un potencial redox menor que el $ABTS^{\bullet+}$ puede reaccionar con el radical (Segundo *et al.*, 2008).

1.4 Especies reactivas de oxígeno (EROS)

1.4.1 Definición de especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos, un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Asimismo, los radicales libres también pueden formarse cuando un

enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen, por tanto, una vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Cayuela, 1998).

La distribución particular de electrones hace del oxígeno un excelente aceptor de electrones, cada molécula de oxígeno diatómico puede aceptar cuatro electrones y cuatro protones, produciendo dos moléculas de agua. En un sistema biológico ideal, la reducción de oxígeno a agua sucede secuencialmente, si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones se forman las especies reactivas de oxígeno. El término EROS se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos (Camarena, 2006).

1.4.2 Formación de las especies reactivas de oxígeno

Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esta es una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación. Si son dos los electrones que se incorporan a la molécula de oxígeno se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este compuesto es peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). La reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al radical hidroxilo, es una de las más reactivas que se conocen y presenta una vida muy corta. Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular origina una molécula de agua (figura 6) (Cayuela, 1998).

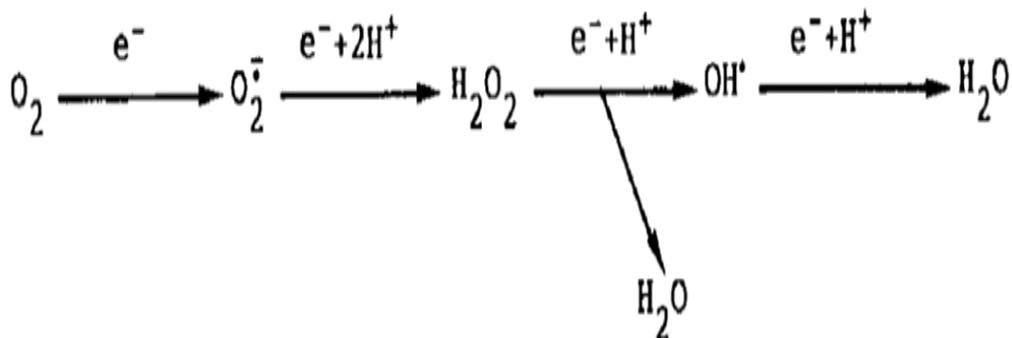


Figura 6. Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular.

En un inicio la cadena de reacciones requiere de energía y los pasos posteriores que son exotérmicos suceden de manera espontánea, con la participación de enzimas. El peróxido de hidrógeno es una molécula moderadamente reactiva y puede difundir a alguna distancia desde el punto de producción. El H_2O_2 puede inactivar enzimas oxidando los grupos tiol; por ejemplo, las enzimas del ciclo de Calvin, la Cu-Zn superóxidodismutasa y la Fe-superóxidodismutasa pueden inhibirse por el H_2O_2 . El radical hidroxilo que se forma a partir de H_2O_2 es el más reactivo. Debido a que las células no tienen mecanismo enzimático para eliminarlos, los radicales hidroxilos pueden reaccionar con todas las biomoléculas y el exceso de su producción lleva a la muerte celular (Camarena, 2006).

1.4.3 Efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre las biomoléculas

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen un período de vida media muy corto, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundo. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos. Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres (Cayuela, 1998).

El consumo de oxígeno inherente al metabolismo celular produce especies reactivas del oxígeno (Gülçinet *al.*, 2010).

1.4.3.1 Carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH^\bullet para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones (Cayuela, 1998).

A pesar de que los radicales libres son especies extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos. De hecho los radicales libres se están produciendo continuamente en el organismo, el problema sólo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes están debilitados (Cayuela, 1998).

1.4.3.2 Proteínas

Las proteínas son modificadas de diferente manera por las especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Otrahemoproteína citoplasmática importante, la catalasa, es inhibida por el $\text{O}_2^{\bullet-}$, que la convierte en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo. Por último, el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, también puede reducir el Cu^{2+} de la superóxidodismutasaCuZn a Cu^{1+} , reaccionando después con él y generando

radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica.

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoacídicas mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxidodismutasa, que dependen todas ellas de estos aminoácidos para presentar actividad, se inhiben en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfurointra e intermoleculares.

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido.

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación del triptófano hasta H_2O_2 y N-formilkinurenina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamientos entre proteínas y/o lípidos (Cayuela, 1998).

1.4.3.3 Lípidos

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo y el oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para rendir un radical libre lipídico (L^{\bullet}). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H

metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose undieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperoxido (figura 7). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperoxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por lo tanto, su funcionabilidad se ve alterada.

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Cayuela, 1998).

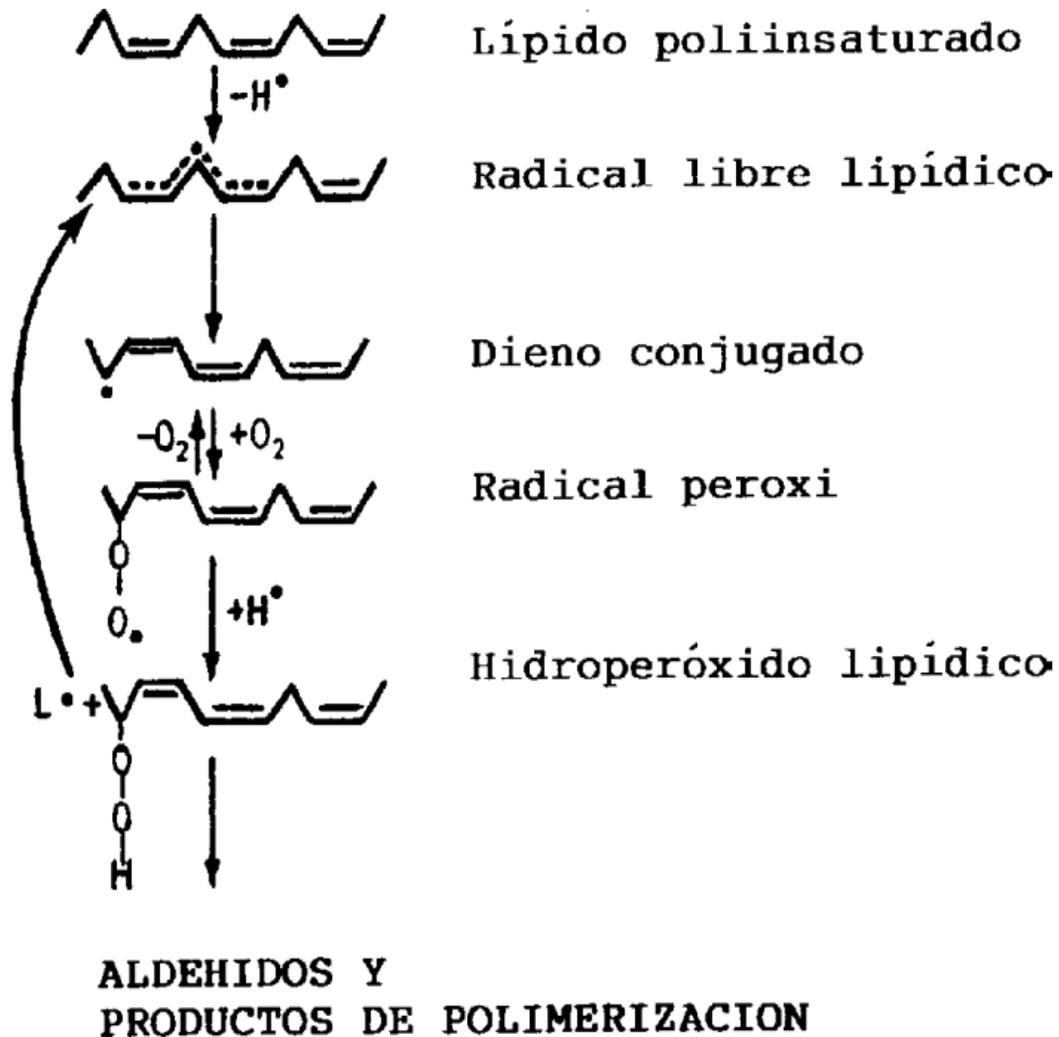


Figura 7. Reacciones de la peroxidación lipídica. (Fuente: Cayuela, 1998)

Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos.

El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más dañadas (Cayuela, 1998).

1.4.3.4 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el OH[·]. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la célula muere. Se ha comprobado, por ejemplo, que la ruptura del ADN que ocurre durante la explosión respiratoria producida por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes (Cayuela, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

México posee una diversidad en variedades de maíz en donde se encuentran los maíces de grano pigmentado con colores que van del negro hasta el rojo. El color se debe a la presencia de compuestos como las antocianinas, carotenoides y betacarotenos por mencionar algunos. Los maíces son cultivados por pequeños productores, quienes los consumen o bien comercializan sus excedentes en mercados regionales. El conocimiento actual sobre los beneficios que trae a la salud humana el consumo cotidiano de los compuestos fenólicos y las antocianinas anima a incorporarlos en otros alimentos como parte de los ingredientes que los componen. Es razón por la cual es importante incentivar la siembra de cultivos de maíces pigmentados de tal forma que sea posible explotar al máximo los beneficios que nos ofrecen y con ello permitir la conservación de las diferentes variedades de maíz. De ahí la importancia de investigaciones como esta en la que se busca comprobar y dar un fundamento científico sobre los efectos que tienen los compuestos fenólicos y antocianinas que se encuentran en este cereal que forma parte indispensable en la alimentación básica mexicana.

2.2 Hipótesis

Las variedades que presenten un mayor contenido de compuestos fenólicos serán las que tendrán mayor capacidad antioxidante y un mejor efecto en la acción del peróxido de hidrógeno como especie reactiva de oxígeno.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Estudiar la actividad antioxidante sobre ABTS^{•+} y peróxido de hidrógeno de compuestos fenólicos totales y antocianinas totales obtenidos de extractos acuosos y etanólicos de diferentes variedades de maíz.

2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos y etanólicos de diferentes variedades de maíz.
- Valorar la capacidad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos de diferentes variedades de maíz sobre el ABTS^{•+}.
- Analizar el efecto de extractos acuosos y etanólicos de diferentes variedades de maíz sobre la formación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno.

3. MÉTODOS

3.1 Métodos

3.1.1 Selección de muestra

Se emplearon muestras de cuatro diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.): maíz blanco, maíz amarillo y maíz azul proporcionadas de manera directa por productores de las localidades de Santiago Tlacotepec y maíz rojo adquirido en el mercado local de San Pablo Autopan todos en el Estado de México (Figura 8).



Figura 8. Granos de maíz de las diferentes variedades del Estado de México utilizados en el estudio

Se seleccionaron los granos de maíz de tamaño uniforme y sin daños; con ausencia de hongos, insectos y materia extraña. Se molieron hasta obtener una harina (Figura 9) y se almacenaron en bolsas de plástico a 4 °C hasta el momento del análisis.



Figura 9. Muestras de harina de maíz del Estado de México. De izquierda a derecha blanco, amarillo, rojo y azul.

3.1.2 Preparación de extractos acuosos

Se pesaron cuatro gramos de harina de maíz y se mezclaron con 20 mL de agua destilada dejándose en agitación constante por 24 horas a temperatura de 25 °C y en ausencia de luz. Después de este tiempo se centrifugó la muestra a 2250 xg durante 15 minutos en una centrifuga (Micro CL 17 Centrifuge ThermoScientific). El sobrenadante fue recolectado y almacenado a 4 °C en ausencia de luz hasta el momento del análisis.

3.1.3 Preparación de extractos etanólicos

Se pesaron cuatro gramos de harina de maíz y se mezclaron con 20 mL de etanol (96%) la mezcla se agitó constantemente durante 24 horas a temperatura de 25°C y en ausencia de luz. Después de este tiempo se centrifugó la muestra a 2250 xg durante 15 minutos. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a 4 °C en ausencia de luz hasta el momento del análisis.

3.1.4 Determinación de compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos

Los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante el método espectrofotométrico adaptado de Gutiérrez y col. 2008, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se tomaron 500 µL de los extractos y se aforó en un matraz a un volumen de 25 mL con agua destilada, en el caso de los extractos etanólicos se tomaron 50 µL y de igual manera se aforó en un matraz a un volumen de 25 mL con agua destilada. Posteriormente se tomó 1 mL de esta disolución y se mezcló con 1.5 mL de reactivo de Folin- Ciocalteu (1N) dejando en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se agregó 1.5 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó suavemente y se le permitió reposar durante 90 minutos a 25 °C y en ausencia de luz. Después de este tiempo se volvió a agitar manualmente y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20 ThermoSpectronic). Este procedimiento se realizó con cada uno de los extractos por triplicado. La cantidad total de compuestos fenólicos totales fue expresada como mg de ácido gálico por cada 100 gramos de harina de maíz.

3.1.5 Determinación de antocianinas totales

Para el análisis de las antocianinas totales se adaptó la técnica espectrofotométrica de Abdel-Aaal y Hucl (1999). Se pesaron cuatro gramos de harina de maíz y se mezclaron con 20 mL de unadisolución ácida de etanol dejándose en agitación constante durante 24 horas a 25 °Cy en ausencia de luz. Una vez concluído este tiempo se centrifugó la muestra en una centrifuga eppendorf a 3,000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue recolectado y almacenado en refrigeración a aproximadamente 4°C en ausencia de luz hasta el momento del análisis. Posteriormente, sólo en el caso del extracto correspondiente a la muestra de maíz rojo y azul se realizó una dilución tomándose 300 µL del extracto en 4 mL de ladisolución ácida de etanol. Se determinó la absorbancia a 535 y 700 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados como miligramos de cianidina 3-glucósido por cada 100 g de harina de maíz utilizando como coeficiente de extinción $25,965 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y peso molecular 449.2 g/mol.

3.1.6 Determinación de actividad antioxidante total

Este ensayo se realizó mediante el método reportado por López(2008). Este método se basa en la inhibición por los antioxidantes de la absorbancia del radical catión ABTS^{•+} que es formado por la interacción de ABTS con radicales de la ferrilmioglobina, los cuales son generados por la activación de metamioglobina con peróxido de hidrógeno. Los antioxidantes suprimen la absorbancia del radical catión ABTS^{•+}, dependiendo de la capacidad de la sustancia investigada. Todos los reactivos fueron preparados en un amortiguador salino de fosfato 10 mM (PBS pH 7.4). Los extractos fueron probados a una concentración 0.1 mM de compuestos fenólicos totales, utilizando TROLOX como testigo. La disolución de ABTS, metamioglobina y la muestra se mezclan iniciando la reacción al adicionar el peróxido de hidrógeno. Se midió la absorbancia a 734 nm por espacios de 30 segundos durante 10 minutos. El procedimiento se realizó por triplicado y el porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{testigo}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{testigo}}} \times 100$$

Donde:

Absorbancia del testigo= Absorbancia en ausencia de los estándares o de los extractos.

Absorbancia de la muestra= Absorbancia en presencia de los estándares y/o de los extractos.

3.1.7 Determinación de potencia total de reducción en medio acuoso

El ensayo de la potencia total de reducción se realizó a partir del método reportado por López (2008) el cual está basado en la generación de un cromóforo del radical ABTS⁺ y de la capacidad de los antioxidantes para blanquear este radical utilizando como testigo al trolox. Se preparó una disolución de ABTS mezclando 5mL de una disolución 7 mM de ABTS y 88 µL de una disolución 140 mM de persulfato de potasio, se dejó la mezcla reposar por 12 horas en ausencia de luz hasta que desarrollará un color verde oscuro. La disolución obtenida fue diluida con metanol hasta una absorbancia de 0.7 a 734 nm. Los extractos fueron probados a una concentración de 0.1 mM de compuestos fenólicos. Se transfirieron 190 µL de metanol a una celda de cuarzo, y el ensayo se inició cuando se le adicionó 1 mL de la disolución de ABTS preformado, se utilizó trolox 0.02 mM, se determinó la absorbancia a 734 nm después de 10 minutos de reacción. El procedimiento se realizó por triplicado y el porcentaje de reducción de ABTS (radical catión) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} \times 100$$

Donde:

Absorbancia inicial= Absorbancia en ausencia de los estándares o de los extractos.

Absorbancia final= Absorbancia en presencia de los estándares y/o de los extractos.

3.1.8 Inhibición de la actividad del peróxido de hidrógeno

Se tomaron 200 μL del extracto y disolvieron en 3.4 mL de amortiguador de fosfatos a pH 7.4, se mezclaron con 600 μL de una disolución de peróxido de hidrógeno 43mM preparado en el mismo amortiguador. Después de 10 min se midió la absorbancia a 230 nm. Se realizó el mismo procedimiento pero sin adicionar la disolución de peróxido de hidrógeno. Los resultados se calcularon mediante la fórmula descrita y se expresaron en porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno. (Wettasingheet *al.*, 2000; Balasundramet *al.*, 2005; Gill *et al.*, 2011).

$$\% \text{ Inhibición } \text{H}_2\text{O}_2 = 100 \times \left(\frac{\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \right)$$

Donde:

Absorbancia del control= Absorbancia en ausencia de los estándares o de los extractos.

Absorbancia de la muestra= Absorbancia en presencia de los estándares y/o de los extractos.

Todos los análisis fueron realizados por triplicado

3.1.9 Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS 8.0 para llevar a cabo un análisis factorial (ANOVA) de 4 x 2 comparando cuatro diferentes variedades de maíz (maíz blanco, maíz amarillo, maíz rojo y maíz azul) y dos tipos de disolventes (agua y etanol al 96%). La diferencia fue considerada a un nivel de significancia de $p < 0.05$. La correlación entre los ocho tratamientos fue establecida mediante un análisis de regresión y una prueba de Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos

Se obtuvieron cuatro variedades de maíz para el presente estudio. El origen y la respectiva pigmentación aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Origen y pigmentación de las diferentes variedades de maíz del Estado de México utilizadas en el estudio

Variedad	Origen	Pigmentación
Maíz blanco	Santiago Tlacotepec, Toluca, Estado de México	Blanco
Maíz amarillo	Santiago Tlacotepec, Toluca, Estado de México	Amarillo
Maíz rojo	San Pablo Autopan, Toluca, Estado de México	Rojo
Maíz azul	Santiago Tlacotepec, Toluca, Estado de México	Azul

La eficiencia en el proceso de extracción es un factor importante cuando se compara la actividad antioxidante de diferentes productos. Sin embargo, los compuestos antioxidantes son difíciles de extraer debido a su diferencia en solubilidad. Estudios previos han reportado mayores eficiencias de extracción de compuestos fenólicos totales en granos al utilizar metanol en comparación con otros disolventes como n-hexano, acetato de etilo, acetona y agua (Okiet *al.*, 2002; Sosulskiet *al.*, 2000). De acuerdo a Cook y Samman, (1996) y Ayyat y Youssef, (1997), los compuestos fenólicos como catequinas, flavanonas, glicósidos de flavonoides, antocianidinas, flavanones y compuestos que poseen un gran número de grupos hidroxilo instituidos o azúcares, son altamente polares y son más fácilmente extraíbles por disolventes como metanol, etanol y agua. Por otro lado las agliconas menos polares, como las isoflavonas, flavanonas y procianidinas, tienden a ser más solubles en disolventes como éteres, cloroformo o acetonitrilo. En estudios realizados por Francis (1999), se encontró la presencia de pelargonidinas, cianidinas, peonidinas y sus derivados malonil glucósidos en diferentes variedades de maíz pigmentado. Aokiet *al.* (2001) aislaron en maíz morado glucósidos de cianidina, pelargonidina, peonidna, y derivados de cianidinas, ácido gálico y kaemferol. Vinsonet *al.*

(1998) detectaron catequina, kaemferol y ácido gálico de maíz amarillo. Todos ellos son compuestos polares que son extraídos por medio de mezclas metánolicas o etánolicas.

Diversos estudios han determinado que los compuestos polifenólicos presentes en granos, vegetales y frutas, son uno de los componentes antioxidantes más efectivos, por lo que es importante cuantificar estos compuestos en diversas variedades de extractos (Velioglu *et al.*, 1998).

Para el análisis se utilizaron como disolventes agua destilada y etanol al 96%.

Las concentraciones de compuestos fenólicos totales, expresados como mg de ácido gálico por cada 100 gramos de harina de maíz de las variedades estudiadas se muestran en la tabla 3.

Las concentraciones que se encontraron fueron de 128, 166, 110 y 206 mg para el extracto acuoso y 221, 177, 229 y 249 mg para el extracto etanólico en maíz blanco, amarillo, rojo y azul respectivamente. El maíz azul presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos totales en ambos tipos de extracción. Por otra parte en base al resultado de compuestos fenólicos totales podemos observar que el mejor disolvente fue etanol al 96% (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos y antocianinas totales en las diferentes variedades de maíz del Estado de México

Variedad	Compuestos fenólicos totales		^q Antocianinas totales	% Antocianinas totales
	^p Extracto acuoso	^p Extracto etanólico		
Maíz blanco	128 ± 1.57 ^a	221 ± 3.5 ^a	0.47 ± 0.01	0.22
Maíz amarillo	166 ± 2.49 ^b	177 ± 2.44 ^b	0.34 ± 0.01	0.19
Maíz rojo	110 ± 0.81 ^c	229 ± 2.21 ^c	27.71 ± 0.03	12.08
Maíz azul	206 ± 1.98 ^d	249 ± 1.47 ^d	70.44 ± 0.02	28.24

T^{a-d} Las medias con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente (p>0.05).

^p Concentración de compuestos fenólicos totales expresada en mg de ácido gálico/ 100 g de harina de maíz.

^q Concentración de antocianinas totales expresada en mg de cianidina 3-glucósido / 100 g de harina de maíz.

López-Martínez *et al.* (2009) encontraron para los extractos acuosos concentraciones de compuestos fenólicos totales 177, 216, 266 y 235 mg por 100 g de harina de maíz, en tanto que para los extractos etanólicos 164, 348, 365 y 274 mg de ácido gálico por 100 g de harina de maíz blanco, amarillo, rojo y azul respectivamente. En donde los resultados de este estudio para los compuestos fenólicos totales de los extractos tanto acuosos como etanólicos son menores a los obtenidos en este estudio a excepción del extracto etanólico del maíz blanco en donde ocurre lo contrario.

Mora-Rochinet *al.* (2010) obtuvieron 167.4, 137.7, 140.7 y 142.1 mg de ácido gálico por 100 g de maíz de compuestos fenólicos totales estos datos son un poco menores a los generados en el presente estudio. Del Pozo- Insfranet *al.* (2006) reportaron haber utilizado maíz blanco (3430 mg de ácido gálico por cada 100 g de harina de maíz) de Nuevo León, México y maíz azul (410 mg de ácido gálico por cada 100 g de harina de maíz) de la ciudad de Toluca, México. La ciudad de origen de la muestra de maíz azul es la misma. El resultado obtenido de compuestos fenólicos totales para el maíz blanco en este estudio (221 mg de ácido gálico por cada 100 g de harina de maíz) representa el sólo 6% comparado con el Del Pozo- Insfranet *al.* (2006). Cabe destacar que el contenido de compuestos fenólicos totales de maíz azul (249 mg de ácido gálico por cada 100 g de maíz) también es menor representando un 61% respecto al reportado por Del Pozo- Insfranet *al.* (2006).

Es posible que estas diferencias con respecto a cada autor citado se presenten debido a la diferencia de técnicas mediante las cuales se llevó a cabo el análisis, además de las muestras provienen de lugares en los que las condiciones ambientales, estacionales y geográficas son diferentes.

Las diferencias encontradas dependiendo del medio de extracción refleja la relativa polaridad de los compuestos fenólicos del grano y además el hecho de que algunos de ellos se encuentren esterificados o glicosilados.

Por otra parte el análisis estadístico revela que si hay diferencia significativa entre los resultados de los compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos respecto a cada variedad, lo mismo ocurre para los extractos etanólicos

4.2 Contenido de antocianinas totales

El color amarillo del grano de maíz está relacionado con la biosíntesis de carotenoides, pero el rojo cereza, el azul y el negro-púrpura, con sus tonalidades intermedias, son producidos por las antocianinas; mientras que el blanco resulta de la ausencia de estos pigmentos.

El contenido de antocianinas totales fue de 0.48, 0.34, 27.71 y 70.44 mg de cianidina 3-glucósido/100 g de harina de maíz blanco, amarillo, rojo y azul respectivamente. No obstante, los resultados de antocianinas en maíz blanco y amarillo obtenidos en este estudio no se atribuyen a estos compuestos.

Espinoza (2008) menciona que durante el proceso de extracción de antocianinas también obtuvo algún tipo de proteínas, similares a la zeína, solubles en soluciones ácidas y en alcohol. Se sabe que los granos de color amarillo y blanco no tienen la capacidad de biosintetizar y acumular antocianinas; sin embargo, algunos análisis bioquímicos del grano de maíz blanco y amarillo, mediante espectrofotometría, indican la presencia de antocianinas en el extracto, lo cual no es posible atribuir esos valores a la presencia de estos pigmentos, sino más bien podrían ser otros compuestos que están interfiriendo en las lecturas obtenidas.

En estudios realizados por De la Parra *et al.* (2007), se determinó el contenido de antocianinas totales en variedades de color blanco, amarillo, rojo y azul, encontrando concentraciones de estos compuestos de 1.33, 0.57, 9.75 y 36.87 mg/100 g de harina de maíz. En otro estudio llevado al cabo por Del Pozo-Insfranet *al.* (2006) encontraron, en variedades de maíz azul mexicano y azul americano, concentraciones de antocianinas de 34.22 y 26.0 mg/100 g de harina de maíz (274 mg /100 g de harina de maíz en el maíz azul del presente estudio). Los autores utilizaron la misma técnica de extracción por lo que las diferencias en los resultados pueden deberse a la variabilidad genética y al origen de cada

una de las variedades utilizadas en cada estudio, al igual que en el caso de los compuestos fenólicos totales (las antocianinas son parte de estos).

El contenido total de antocianinas se encuentra relacionado con el color de grano, de tal forma que los granos más oscuros presentan mayor concentración de estos pigmentos que es el caso de los granos de maíz azules.

La concentración de antocianinas totales en el maíz rojo y azul fue de 27.71 y 70.44 mg/100 g de harina de maíz en tanto que en estudios realizados por López *et al.* (2011) en granos de maíz obtenidos de un mercado local de la Ciudad de México fue de 82.3 y 63.1 respectivamente.

Mora-Rochinet *al.* (2010) reporta un contenido de 0.99 y 30.69/ 100 g en maíz rojo y azul de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa en México, ambos valores son bajos respecto a lo obtenido en este estudio.

Otro estudio realizado por Del Pozo- Insfranet *al.* (2006) expresa un contenido de 34.22 mg / 100 g en maíz azul mexicano que es un valor al menos 2 veces menor al derivado de este estudio (70.44 mg /100 g). Cabe destacar que la muestra de maíz azul fue recolectada del mismo municipio que reporta Pozo *et al.* (2007).

Debido a que los compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides y antocianinas, poseen actividades biológicas relacionadas con la promoción de la salud, las pruebas de actividad antioxidante fueron conducidas en niveles estandarizados de compuestos fenólicos. Tanto los compuestos fenólicos como las antocianinas de maíz y otros pigmentos azules-rojos exhiben diversas actividades antioxidantes (Del Pozo-Insfranet *al.*, 2006, López-Martínez *et al.*, 2009)

4.3 Actividad antioxidante

4.3.1 Actividad antioxidante total

4.3.1.1 Relación entre el contenido de compuestos fenólicos total y la actividad antioxidante

Al llevar a cabo un análisis estadístico ANOVA de las cuatro variedades de maíz utilizadas en el estudio, se observó que si existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las muestras para el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas, actividad antioxidante, la potencia total de reducción y de inhibición de peróxido de hidrógeno tanto en los extractos acuosos como en los extractos etanólicos.

Los porcentajes obtenidos de actividad inhibidora sobre ABTS^{•+} de los extractos acuosos son 67.5%, 36.5%, 69.8% y 68.0 %. En tanto que los extractos etanólicos son 9.6%, 68.6%, 56.1% y 53.2% respectivamente para maíz blanco, amarillo, rojo y azul (tabla 4).

A pesar de que la prueba Tukey (Anexo 7) demuestra que hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre todas las muestras de maíz en el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos acuosos esta misma prueba revela que no existe diferencia entre el maíz blanco, maíz rojo y maíz azul respecto al porcentaje de actividad antioxidante. Sin embargo, el maíz amarillo es el que presenta el porcentaje más bajo de actividad antioxidante y es diferente significativamente ($P < 0.05$) respecto a los demás variedades.

Por otra parte en los extractos etanólicos los compuestos fenólicos de las diferentes variedades de maíz fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$) y ello se refleja de igual forma en el porcentaje de actividad antioxidante presentando una mejor inhibición el maíz amarillo contrario al extracto acuoso.

Tabla 4. Actividad antioxidante total de diferentes variedades de maíz del Estado de México

Variedad	% Actividad antioxidante total	
	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Maíz blanco	67.5 ± 0.15 ^a	9.6 ± 0.21 ^a
Maíz amarillo	36.5 ± 0.12 ^b	68.6 ± 0.15 ^b
Maíz rojo	69.8 ± 0.15 ^a	56.1 ± 0.25 ^c
Maíz azul	68.0 ± 2.04 ^a	53.2 ± 0.7 ^d

T^{a-d} Las medias con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente (p>0.05)

Mora-Rochinet *al.* (2010) mencionan que las capacidades antioxidantes del maíz blanco, rojo y maíz amarillo fueron significativamente mayores (p < 0,01) en comparación con el maíz azul. La diferencia fue inesperada debido a que el maíz azul contenía la mayor cantidad de antocianinas que se consideran como potentes antioxidantes. Así pues Mora-Rochinet *al.* (2010) indican que la inesperada menor capacidad antioxidante observada en el maíz azul puede ser explicada por la baja concentración de ácido ferúlico total (30 % menor en comparación con los otros genotipos de su estudio) en donde es bien sabido que el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante y promotor de la actividad antioxidante en el maíz. La interacción entre los otros fitoquímicos que se encuentran en maíz azul, también puede tener un impacto en los niveles de capacidad antioxidante. López- Martínez *et al.* (2009) reporta valores de 148, 140, 153 y 152 mg de ácido ferúlico/100 g de muestra en maíz blanco, amarillo, rojo y azul.

A pesar de que la cantidad de antocianinas en el maíz azul fue un poco elevada respecto a lo reportado por otros autores y no se obtuvo el resultado esperado, la diferencia puede ser atribuible a la baja cantidad de compuestos fenólicos obtenidos en el presente. En un estudio realizado para diferentes variedades de maíz con y sin coloración presente, López 2008 menciona que generalmente las variedades que muestran mayor capacidad para inhibir la generación de radicales libres son las mismas que poseen mayor capacidad de inhibir la acción de los radicales libres ya formados en el medio y las variedades con altas concentraciones de antocianinas estuvieron asociadas con mayores actividades

antioxidantes. Sin embargo en el presente estudio no se observa esa tendencia en las variedades coloreadas (maíz rojo y maíz azul) puesto que en los extractos acuosos y etanólicos el valor más alto de compuesto fenólicos totales y antocianinas lo presenta el maíz azul y este no es el que tuvo la mejor actividad antioxidante. Esta situación puede explicarse debido a que la composición polifenólica particular de cada variedad además del papel que juegan componentes como el ácido ferúlico y la presencia de antocianinas específicas, así como la interacción entre sus componentes, es un factor que probablemente impacta en sus niveles de capacidad antioxidante y la eficiencia general de un compuesto antioxidante es dependiente de la interacción con otros constituyentes de la matriz, la polaridad del sistema de pruebas, la naturaleza del radical y el tipo de sustrato protegido por el antioxidante (Del Pozo - Insfranet *al.*, 2006; López- Martínez *et al.*, 2009).

4.3.2 Potencia total de reducción en medio acuoso

Al realizar la prueba de Tukey se obtiene que entre los extractos acuosos de las diferentes variedades hay diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de potencia total de reducción sobre ABTS** y se presenta la misma situación para los extractos etanólicos.

Tabla 5. Potencia total de reducción de diferentes variedades de maíz del Estado de México

Variedad	% Potencia total de reducción	
	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Maíz blanco	25.8 ± 0.15 ^a	13.1 ± 0.21 ^a
Maíz amarillo	64.5 ± 0.00 ^b	70.1 ± 0.15 ^b
Maíz rojo	20.3 ± 0.30 ^c	68.7 ± 0.15 ^c
Maíz azul	23.1 ± 0.15 ^d	50.6 ± 0.06 ^d

T^{a-d} Las medias con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente ($p > 0.05$)

En base al tipo de extracto analizado los que presentaron un mejor desempeño fueron los extractos etanólicos, a excepción del caso de la variedad de maíz blanco (tabla 5).

En esta ocasión para ambos extractos el maíz amarillo tuvo un mayor porcentaje de potencia total de reducción. Contrario a lo que reportan otros autores respecto a un

mejor desempeño del maíz azul debido a la presencia de antocianinas. Nuevamente esta situación puede explicarse debido a que la composición polifenólica particular de cada variedad.

4.3.3 Inhibición de la formación de peróxido de hidrógeno

4.3.3.1 Relación entre el contenido de compuestos fenólicos total y la capacidad de inhibir la formación de peróxido de hidrógeno

Los antioxidantes reducen el daño oxidativo a biomoléculas por la modulación de los efectos de los reactivos oxidantes. Por lo tanto ha sido recomendado el aumento del consumo de frutas y verduras que contienen altos niveles de antioxidantes. Se ha documentado la importancia y beneficios para la salud del consumo de granos en la prevención de enfermedades. Sin embargo, ha sido poca la atención que se presta al consumo de cereales en comparación a las frutas y hortalizas (Kwami y Hai, 2002).

Los cereales contienen fitoquímicos únicos que complementan las frutas y verduras cuando se consumen juntos. Por ejemplo, diversas clases de compuestos fenólicos en los granos incluyen derivados de ácidos benzoico y cinámico, antocianidinas, quinonas, flavonoles, chalconas, flavanonas, flavonas y betalainas(Kwami y Hai, 2002). Los resultados del presente estudio respecto al porcentaje de inhibición del peróxido de hidrógeno en los extractos acuosos son 47.3%, 28.7%, 51.3% y 11.4% en tanto que en los extractos etanólicos son 61.0%, 58.8%, 32.2% y 6.6% para el maíz blanco, amarillo, rojo y azul respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Inhibición de peróxido de hidrógeno de diferentes variedades de maíz del Estado de México

Variedad	% Inhibición peróxido de hidrógeno	
	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Maíz blanco	47.3 ± 2.97 ^a	61.0 ± 2.35 ^a
Maíz amarillo	28.7 ± 1.47 ^b	58.8 ± 6.47 ^b
Maíz rojo	51.3 ± 0.82 ^a	32.2 ± 2.82 ^c
Maíz azul	11.4 ± 0.32 ^c	6.6 ± 1.19 ^d

T^{a-d} Las medias con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente (p>0.05)

Al realizar la prueba Tukey en los extractos acuosos se observa que no hay diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de inhibición del peróxido de hidrógeno entre el maíz blanco y el maíz rojo pero estos valores si difieren significativamente ($P < 0.05$) de los obtenidos entre el maíz amarillo y azul.

Por otro lado al efectuar la prueba Tukey en extractos etanólicos resulta que el porcentaje de inhibición del peróxido de hidrógeno es diferente significativamente ($P < 0.05$) entre las cuatro variedades. Así pues al efectuar la prueba t de student (Anexo 8) observamos que hay diferencia significativa entre realizar un extracto con agua o etanol al 96%. Por lo tanto en base a los resultados obtenidos se puede afirmar que el extracto etanólico del maíz blanco tuvo un mejor efecto de inhibición del peróxido de hidrógeno con el 61%. Por lo tanto no es posible dar por hecho que un alto contenido de compuestos fenólicos resultara en un alto porcentaje de inhibición del peróxido de hidrógeno

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve influenciada por varios factores, por ejemplo, la posición y el grado de hidroxilación, la polaridad, solubilidad, reduciendo el potencial de reducción y la estabilidad de los radicales fenoxi. La estructura de los compuestos fenólicos, en particular, la posición y el grado de hidroxilación, es de primordial importancia en la determinación de su actividad antioxidante (Balasundram *et al* 2006).

Se obtendría una mejor comparación entre las actividades anti-radicales de los extractos de estas variedades de maíz mediante aislamientos de compuestos específicos.

Por otra parte, se conocen los factores tales como la polaridad del sistema de ensayo, la naturaleza de los radicales y el tipo de sustrato para influir en la eficacia global de un antioxidante (López, 2008).

5. CONCLUSIONES

1. La mayor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos totales en las diferentes variedades de maíz fue la efectuada con etanol.
2. La variedad de maíz que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos totales tanto en los extractos acuosos como en los etanólicos fue el maíz azul, de igual manera esta variedad tuvo la mayor cantidad de antocianinas; sin embargo no posee el mejor desempeño en actividad antioxidante, potencia total de reducción e inhibición de peróxido de hidrógeno.
3. No se observó una correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas sobre la inhibición de ABTS^{•+} y peróxido de hidrógeno.
4. Cabe destacar que la eficiencia general de un compuesto antioxidante es dependiente de la interacción con otros constituyentes de la matriz, la polaridad del sistema de pruebas, la naturaleza radical y el tipo de sustrato protegido por el antioxidante.

6. SUGERENCIAS

Se recomienda en estudios posteriores realizar la determinación del ácido ferúlico total para llegar a establecer una posible interrelación entre compuestos fenólicos totales y antocianinas totales sobre la inhibición de ABTS^{•+} y peróxido de hidrógeno.

7. REFERENCIAS

1. Balasundram N., Ai. T. Y., Sambanthamurthi, R., Sundram, K. y Samman, S. 2005. Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, 4 (4), p.p. 319.
2. Beltrán O. 2006. Estudio para la obtención de almidón de maíz por molienda seca y extracción de las proteínas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. p.p. 5, 6, 19, 20.
3. Camarena G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo*. Vol. 12. Núm. 001. Universidad Autónoma Chapingo. México. p.p. 28.
4. Cayuela M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. Vol. 39. No. 1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. España. p.p. 5-9.
5. Del Pozo- Insfran, D., Brenes, C. H., Serna Saldivar, Talcott, S. T. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*, 39(6), p.p. 696- 703.
6. Espinoza E. 2008. Algunos aspectos genéticos y bioquímicos de las antocianinas en poblaciones criollas de maíz de granos pigmentados. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. México. p.p. 8, 46, 125
7. Flores V. 2011. Rendimiento de grano y contenido de antocianinas en poblaciones de maíz de la región de Huaquechula, Puebla. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. p.p. 4, 6.
8. Fox, G., y Manley, M. 2009. Hardness methods for testing maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (13), p.p. 5647- 5657.
9. Gill, N. S., Bajwa, J., Dhiman K., Sharma P., Sood S., Sharma, P. D., Shing, B. y Bali, M. 2011. Evaluation of therapeutic potential of traditionally consumed *Cucumis melo* seeds. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10 (1), p.p. 86-91.
10. González U. 1995. El maíz y su conservación. Editorial Trillas. México. p.p. 30,37.
11. González U. 2009. El Maíz y los productos de su industrialización. Editorial Trillas. México. p.p. 13.

12. Gruital M. 2007. Modelos matemáticos de la cinética de hidratación-deshidratación del grano de maíz durante el cocimiento alcalino. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. p.p. 21.
13. Gülçin, I., Elmastaş, M. y Aboul-Enein, H. Y. 2012. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 5 (4), p.p. 489-499.
14. Gutiérrez A. 2002. Té: Polifenoles y protección a la salud. *Revista Medicentro*. Vol. 6. No. 4. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruíz de Zárate Ruíz". Cuba. p.p. 2.
15. Gutiérrez A. 2002. Vino, polifenoles y protección a la salud. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*. Vol. 12. No. 2. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruíz de Zárate Ruíz". Cuba. p.p. 135,136.
16. Gutiérrez D. Avella, Ortiz C. y Mendoza A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Memorias del Simposio de Metrología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro.
17. Kuskoski M., Asuero A., Troncoso A., Mancini-Filho J., y Fett R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. Vol. 24. No. 4. p.p. 692.
18. Kuskoski M., Asuero A., Troncoso A., Mancini-Filho J., y Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. Vol. 24. No. 4. p.p. 727.
19. Leopodini, M., Russo, N. y Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125 (2), p.p. 288-306.
20. López-Martínez, L. X. 2008. Inmovilización de papaína sobre un soporte inerte para la síntesis de péptidos de lisina y triptófano. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. México.

21. López-Martínez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L. y García, 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.
22. López- Martínez, L. X., Parkin, K. L. y García, H. S. 2011. Phase II- inducing, polyphenols content and antioxidant capacity of corn (*Zea mays* L.) from phenotypes of white, blue, red and purple colors processed into masa and tortillas. *Plant Foods Human Nutrition*, 66 (1), p.p. 41-47.
23. Magalhães L., Segundo M., Salette R. y Lima J. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Revista AnalyticaChimica Acta*. 613. Portugal. p.p. 2, 6, 14.
24. Méndez G., Solorza J., Velazquéz M., Gómez N., Paredes O. y Bello L. 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia*. Vol. 39. No. 003. Colegio de Postgraduados. México. p.p. 267.
25. Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Uribe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C. y Milán-Carrillo, J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortilla produced from pigmented maize processed by conventionalnixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52 (3), p.p. 502-508.
26. Muñoz A. y Escudero R. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*. Vol. 7. Núm 1. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la FMH-USMP. Universidad de San Martín de Porres. Perú. p.p. 26, 29, 30.
27. Ortiz C., Gutiérrez D. y Olmos A. 2005. Cuantificación de fenoles totales en *amaranthushybridus*, *cosmos bipinnatus* y *cynodondactylon* plantas malezas del Estado de Querétaro. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. p.p. 1-5.

28. Pérez J. 2007. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. España. p.p. 19-22, 24,25.
29. Ruíz N., Rincón F., Hernández V., Figueroa J. y Loarca M. 2008. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 31. Número 3. Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. p.p. 29.
30. Salinas Y. 2010. Maíces con pigmento tipo antociano: Usos actuales y potenciales. Primera Reunión Nacional de Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. México. p.p. 19.
31. Salinas Y., Soria J. y Espinoza E. 2010. Aprovechamiento y distribución de maíz azul en el Estado de México. INIFAP. México. p.p. 5, 6, 8, 18, 21-24, 41.
32. Turkmen, N., Sari, F. y Velioglu, Y. S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99(4), p.p. 835-841.
33. Velioglu Y., Mazza G., Gao L. y Oomah B. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46. Canada. p.p. 4113.
34. Wettasinghe M. y Shahidi F. 2000. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. FoodChemistry. 70. p.p. 17-26.

Direcciones electrónicas

1. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2010) Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional [En línea] Disponible en: www.siap.gob.mx (Acceso el 07 de Septiembre de 2011)

8. ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales por el Método de Folin-Ciocalteu (Gutiérrez *et al.*, 2008)

Preparación de reactivos:

-Disolución patrón de ácido gálico: Pesar 25 mg de ácido gálico y colocar en un matraz aforado llevando a un volumen de 25 mL con agua destilada. Enseguida preparar una dilución 1:10 con agua destilada (siempre se utiliza una disolución recién preparada).

-Disolución 1N del reactivo Folin-Ciocalteu: Por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2N) en agua destilada; proteger de la luz y colocar en refrigeración hasta su uso.

-Disolución de carbonato de sodio al 20%: Pesar 5 g de carbonato de sodio, colocar en un matraz aforado de 25 mL, inicialmente disolver en 15 mL de agua grado HPLC y llevar a ultrasonido hasta su completa disolución, finalmente llevar a su volumen de aforo con agua.

Curva de calibración:

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, hacer las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Tomar respectivamente 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL y 100 µL de la disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L en viales ámbar de 3 mL, luego adicionar a cada vial, 250 µL de reactivo de FolinCiocalteu 1N, agitar durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente adicionar 1 250 µL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada vial, llevar a un volumen final de 2 ml con agua destilada y dejar reposar por 2 h. También preparar un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Leer la absorbancia a 760 nm en el espectrómetro

Curva de calibración para fenoles totales

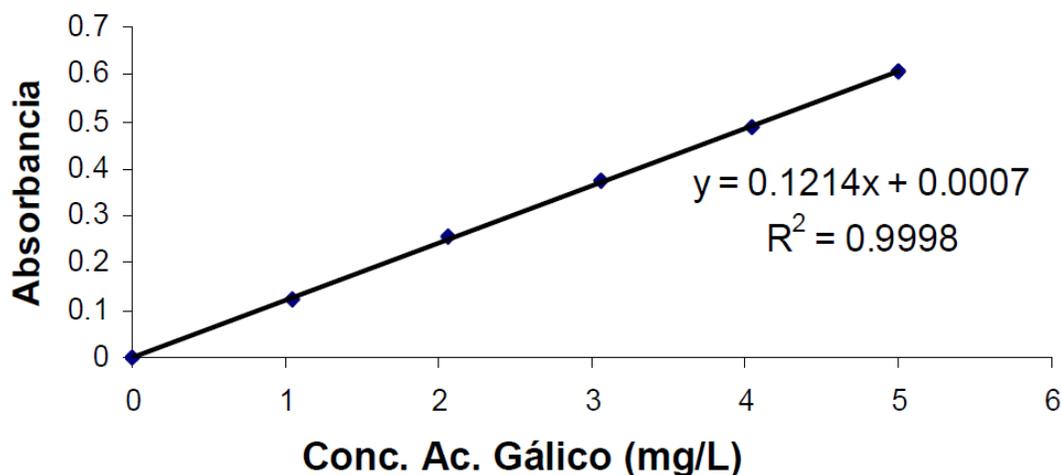


Figura 10. Curva de calibración de contenido de fenoles (Fuente: Gutiérrez *et al.*, 2008)

Muestras:

Tomar 2 mg de cada extracto liofilizado, colocar en un matraz erlenmeyer y se les agregar 50 mL de agua destilada y agitar. Enseguida tomar 0,5 mL de cada una de estas soluciones y mezclar con 0,75 mL de reactivo de Folin- Ciocalteu dejar en reposo a temperatura ambiente por 5 min después agregar 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Agitar fuertemente, dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo medir la absorbancia a 760 nm.

Anexo 2. Curva de calibración obtenida para la determinación de compuestos fenólicos totales por el Método de Folin-Ciocalteu

Para la realización de la curva de calibración en la determinación de compuestos fenólicos se adicionaron las cantidades de los reactivos que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Datos para la realización de la curva de calibración en la determinación de compuestos fenólicos totales

No	Disolución de ácido gálico (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo de Folin-Ciocalteu (μL)	Disolución Na_2CO_3 al 20% (μL)
1	0	1000	500	2500
2	40	800	500	2500
3	80	800	500	2500
4	120	800	500	2500
5	160	800	500	2500
6	200	800	500	2500
7	240	800	500	2500
8	280	800	500	2500
9	320	800	500	2500

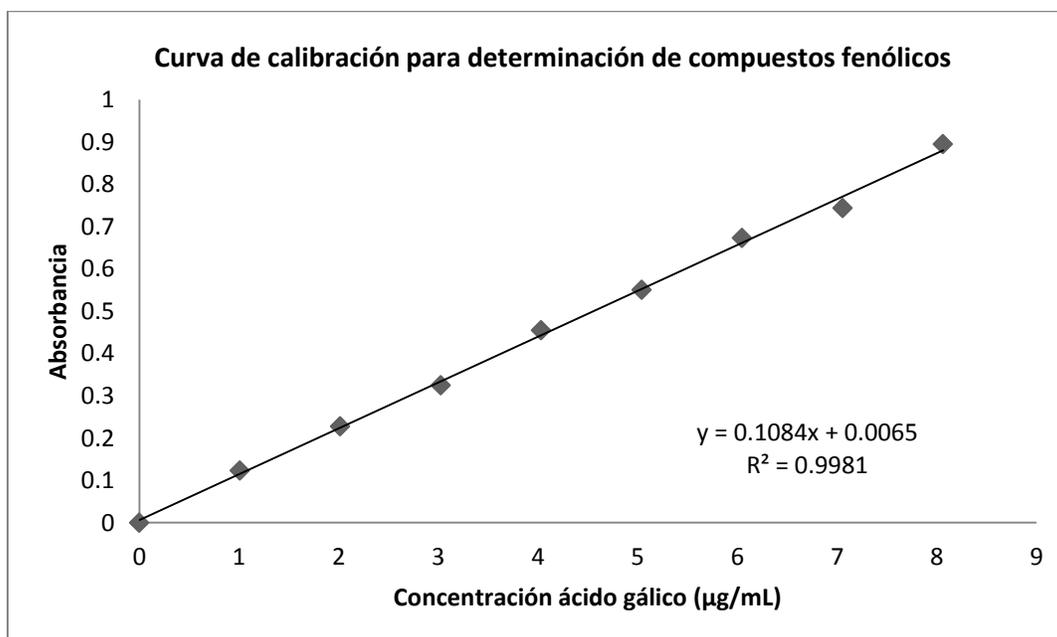


Figura 11. Curva de calibración para determinación de compuestos fenólicos

Anexo 3. Determinación de antocianinas totales (AbdelAal y Hucl, 1999) reportada por López (2008)

Preparación de reactivos:

Disolución etanólica a pH 1: Disolver 12 mL de HCl concentrado en 500 mL de una disolución de etanol al 95%

Procedimiento:

Un gramo de maíz se homogenizó con la disolución etanólica. Mantener por 12 horas en agitación constante a 4°C. Centrifugar el extracto. Colectar el sobrenadante. Leer en el espectrofotómetro a 535 nm y a 700 nm. Restar la lectura 700 nm a la de 535 en los casos en que la muestra se presente turbia.

Para el cálculo de las antocianinas totales utilizar el coeficiente de extinción de 25965 M⁻¹cm⁻¹ y un peso molecular de 449 g/mol.

Anexo 4. Determinación de actividad antioxidante total (Rice-Evans, 1994) reportada por López (2008)

Preparación de reactivos:

- Trolox: Disuelva 0.15641 g de Trolox en 250 mL de fosfato de potasio salino 2.5 mM pH 7.4

- Disolución A:

Peróxido de hidrógeno 500 mM.: Si la disolución es al 30% diluir 515 µL de peróxido de hidrógeno en 10 mL de buffer de fosfato salino

-Disolver 0.02743 g de ABTS y disolver en 10 mL de buffer de fosfato salino

-Pesar 0.0752 gramos de metamioglobina y disolver en 10 mL de buffer de fosfato salino y almacenarlo a -18 °C hasta el momento de ser utilizado.

Las soluciones de ABTS, metamioglobina y la muestra se mezclan y se inicia la reacción adicionando la disolución A

Se mide la absorbancia a 734 nm a espacios de 30 segundos durante 10 minutos

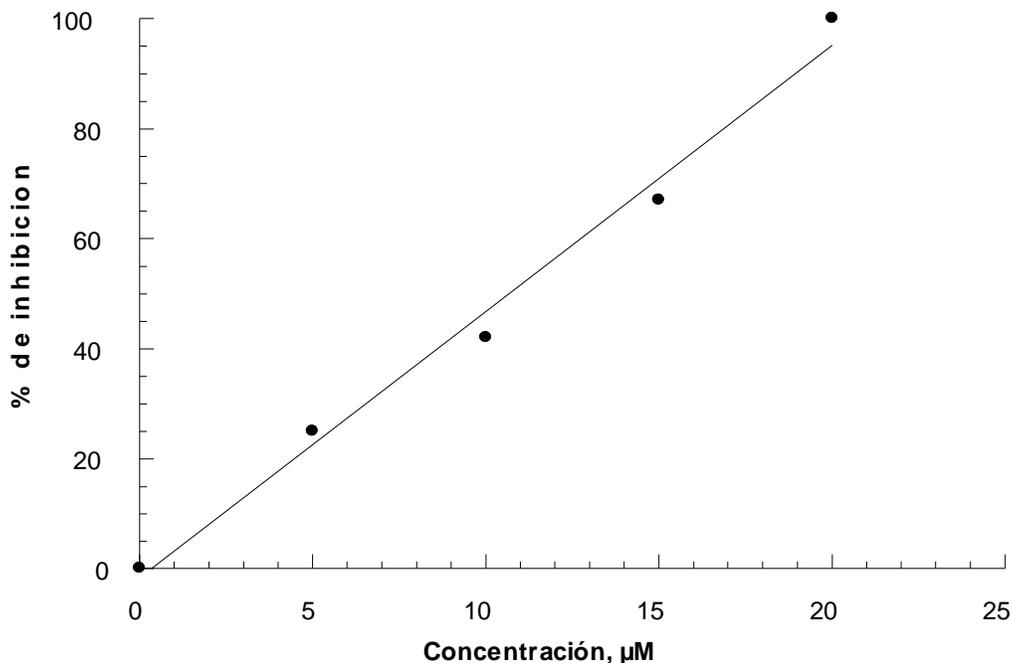


Figura 12. Curva de calibración para la determinación de la inhibición de los radicales libres de ABTS^{•+}

Anexo 5. Determinación de potencia total de reducción (Pellegrini, 1999) reportada por López (2008)

Preparación de soluciones

Disolución A:

- 5 mL de una disolución acuosa de ABTS 5 mM

Disolución B:

- 88 μL de persulfato de sodio 140 Mm

Disolución C:

- Mezcla A y B e incubar a temperatura ambiente por 12 horas

-Diluir C con etanol hasta una absorbancia de 0.70

- Trolox: Disuelva 0.15641 gramos de Trolox en 250 mL de fosfato de potasio salino 2.5 mM pH 7.4

1 mL de la disolución C es mezclada con alícuotas de la muestra

Mezclar por 30 segundos

Leer absorbancia a 734 nm durante 30 minutos cada minuto.

Anexo 6. Ensayo con peróxido de hidrógeno

Preparación de reactivos:

-Buffer de fosfatos 0.1 M a pH=7.4

Disolución A: Pesar 1.42 g de Na_2HPO_4 y disolver en 100 mL de agua destilada.

Disolución B: Pesar 13.799 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y disolver en 100 mL de agua destilada.

A la disolución A agregarle poco a poco la disolución B midiendo el pH hasta llegar a 7.4.

-Disolución de peróxido de hidrógeno 43 mM en buffer de fosfatos 0.1 M de pH=7.4

Adicionar 110.8 μL de peróxido de hidrógeno en 25 mL de buffer de fosfatos 0.1 M de pH=7.4.

Curva de calibración:

Tomar 1 mL de disolución estándar (disolución de ácido gálico) a una concentración de 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 140 mg/L, 160 mg/L, 180 mg/L y 200 mg/L. Disolver en 3.4 mL de 0.1 M de buffer de fosfatos a pH=7.4. Mezclar con 600 μL de una disolución de 43 mM de H_2O_2 preparado en el mismo buffer. Medir absorbancia a 230 nm a 0 min y 10 min (Tabla 8). Realizar el mismo procedimiento pero sin adicionar la disolución de peróxido de hidrógeno (Tabla 9).

Tabla 8. Datos para la realización de la curva de calibración del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno

No	Concentración disolución ácido gálico (mg/L)	mL de disolución de ácido gálico	mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH=7.4	µL disolución 43 mM H ₂ O ₂	Absorbancia a 230 nm	
					Tiempo	
					0 min	10 min
1	0	0	3.4	600		
2	20	1	3.4	600		
3	40	1	3.4	600		
4	60	1	3.4	600		
5	80	1	3.4	600		
6	100	1	3.4	600		
7	120	1	3.4	600		
8	140	1	3.4	600		
9	160	1	3.4	600		
10	180	1	3.4	600		
11	200	1	3.4	600		

Tabla 9. Datos para la realización del blanco en la curva de calibración del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno

No	Concentración disolución ácido gálico (mg/L)	mL de disolución de ácido gálico	mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH=7.4	µL disolución 43 mM H ₂ O ₂
1	0	0	3.4	0
2	20	1	3.4	0
3	40	1	3.4	0
4	60	1	3.4	0
5	80	1	3.4	0
6	100	1	3.4	0
7	120	1	3.4	0
8	140	1	3.4	0
9	160	1	3.4	0
10	180	1	3.4	0
11	200	1	3.4	0

Muestras:

Tomar 200 μL del extracto y disolver en 3.4 mL de 0.1 M de buffer de fosfatos a $\text{pH}=7.4$. Mezclar con 600 μL de una disolución de 43 mM de H_2O_2 preparado en el mismo buffer. Medir absorbancia a 230 nm transcurridos 10 min (Tabla 10). Realizar el mismo procedimiento pero sin adicionar la disolución de peróxido de hidrógeno (Tabla 11).

Tabla 10. Determinación del porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno de las diferentes variedades de maíz

No	Coloración	Tipo de extracto	μL extracto	mL de buffer de fosfatos 0.1 M $\text{pH}=7.4$	μL disolución 43 mM H_2O_2
1	Azul	Acuoso	200	3.4	600
2	Rojo	Acuoso	200	3.4	600
3	Amarillo	Acuoso	200	3.4	600
4	Blanco	Acuoso	200	3.4	600
5	Azul	Etanólico	200	3.4	600
6	Rojo	Etanólico	200	3.4	600
7	Amarillo	Etanólico	200	3.4	600
8	Blanco	Etanólico	200	3.4	600

Tabla 11. Determinación de blancos en el porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno de las diferentes variedades de maíz

No	Coloración	Tipo de extracto	μL extracto	mL de buffer de fosfatos 0.1 M $\text{pH}=7.4$	μL disolución 43 mM H_2O_2
1	Azul	Acuoso	200	3.4	0
2	Rojo	Acuoso	200	3.4	0
3	Amarillo	Acuoso	200	3.4	0
4	Blanco	Acuoso	200	3.4	0
5	Azul	Etanólico	200	3.4	0
6	Rojo	Etanólico	200	3.4	0
7	Amarillo	Etanólico	200	3.4	0
8	Blanco	Etanólico	200	3.4	0

Anexo 7. Comparación de medias (Prueba Tukey $\alpha= 0.05$)

7.1 Compuestos fenólicos totales de extractos acuosos

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	3	109,5433			
	1		127,8533		
	2			165,5967	
	4				206,2333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.2 Compuestos fenólicos totales extractos etanólicos

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	2	177,0933			
	1		221,2367		
	3			229,3567	
	4				249,4067
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.3 Antocianinas totales

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey ^a	2	3	,3400			
	1	3		,4833		
	3	3			27,7133	
	4	3				70,4400
Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.4 Actividad antioxidante de extractos acuosos mediante ABTS

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	2	3	36,4667	
	1	3		67,5333
	4	3		67,9667
	3	3		69,7667
Sig.			1,000	,107

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.5 Actividad antioxidante de extractos etanólicos mediante ABTS

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey ^a	1	3	9,6333			
	4	3		53,2000		
	3	3			56,0667	
	2	3				68,6333
Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.6 Potencial de reducción de extractos acuosos mediante ABTS %

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey ^a	3	3	20,3000			
	4	3		23,1333		
	1	3			25,8333	
	2	3				64,5000
Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.7 Potencial de reducción de extractos etanólicos mediante ABTS

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey ^a	1	3	13,1333			
	4	3		50,5667		
	3	3			68,6667	
	2	3				70,0667
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.8 Peróxido de hidrógeno de extractos acuosos %

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey ^a	4	3	11,4333			
	2	3		28,6667		
	1	3			47,2667	
	3	3			51,3000	
	Sig.		1,000	1,000	,079	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

7.9 Peróxido de hidrogeno de extractos etanólicos %

Variedad	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	4	3	6,5667	
	3	3		32,2000
	2	3		58,8333
	1	3		61,0333
Sig.			1,000	1,000
				,888

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

Anexo 8. Prueba t de student del maíz blanco, amarillo, rojo y azul en extractos acuosos y etanólicos respecto a actividad antioxidante, potencia total de reducción e inhibición peróxido de hidrógeno

8.1 Maíz blanco

8.1.1 Comparación entre actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Antiox.ac	3	67,5333	,15275	,08819
Antiox.et	3	9,6333	,20817	,12019

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Antiox.ac	765,75	2	,000	67,53333	67,1539	67,9128
	6					
Antiox.et	80,154	2	,000	9,63333	9,1162	10,1504

8.1.2 Comparación entre potencia total de reducción de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
P.ac	3	25,8333	,15275	,08819
P.et	3	13,1333	,20817	,12019

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
P.ac	292,922	2	,000	25,83333	25,4539	26,2128
P.et	109,276	2	,000	13,13333	12,6162	13,6504

8.1.3 Comparación de ensayo con peróxido de hidrógeno de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
H2O2.ac	3	47,2667	2,97041	1,71497
H2O2.et	3	61,0333	2,34592	1,35442

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
H2O2.ac	27,561	2	,001	47,26667	39,8878	54,6456
H2O2.et	45,062	2	,000	61,03333	55,2057	66,8609

8.2 Maíz amarillo

8.2.1 Comparación entre actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Antiox.ac	3	36,4667	,11547	,06667
Antiox.et	3	68,6333	,15275	,08819

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Antiox.ac	547,00 0	2	,000	36,46667	36,1798	36,7535
Antiox.et	778,22 9	2	,000	68,63333	68,2539	69,0128

8.2.2 Comparación entre potencia total de reducción de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
P.ac	3	64,5000	,00000 ^a	,00000
P.et	3	70,0667	,15275	,08819

a. No puede calcularse T porque la desviación típica es 0.

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
P.et	794,481	2	,000	70,06667	69,6872	70,4461

8.2.3 Comparación de ensayo con peróxido de hidrógeno de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
H2O2.ac	3	28,6667	1,47422	,85114
H2O2.et	3	58,8333	6,46632	3,73333

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
H2O2.ac	33,680	2	,001	28,66667	25,0045	32,3288
H2O2.et	15,759	2	,004	58,83333	42,7701	74,8966

8.3 Maíz rojo

8.3.1 Comparación entre actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Antiox.ac	3	69,7667	,15275	,08819
Antiox.et	3	56,0667	,25166	,14530

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Antiox.ac	791,080	2	,000	69,76667	69,3872	70,1461
Antiox.et	385,877	2	,000	56,06667	55,4415	56,6918

8.3.2 Comparación entre potencia total de reducción de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
P.ac	3	20,3000	,30000	,17321
P.et	3	68,6667	,15275	,08819

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
P.ac	117,202	2	,000	20,30000	19,5548	21,0452
P.et	778,607	2	,000	68,66667	68,2872	69,0461

8.3.3 Comparación de ensayo con peróxido de hidrógeno de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
H2O2.ac	3	51,3000	,81854	,47258
H2O2.et	3	32,2000	2,82135	1,62891

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
H2O2.ac	108,553	2	,000	51,30000	49,2666	53,3334
H2O2.et	19,768	2	,003	32,20000	25,1914	39,2086

8.4 Maíz azul

8.4.1 Comparación entre actividad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Antiox.ac	3	67,9667	2,04042	1,17804
Antiox.et	3	53,2000	,70000	,40415

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Antiox.ac	57,695	2	,000	67,96667	62,8980	73,0354
Antiox.et	131,63 6	2	,000	53,20000	51,4611	54,9389

8.4.2 Comparación entre potencia total de reducción de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
P.ac	3	23,1333	,15275	,08819
P.et	3	50,5667	,05774	,03333

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
P.ac	262,307	2	,000	23,13333	22,7539	23,5128
P.et	1517,000	2	,000	50,56667	50,4232	50,7101

8.4.3 Comparación de ensayo con peróxido de hidrógeno de extractos acuosos y etanólicos

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
H2O2.ac	3	11,4333	,32146	,18559
H2O2.et	3	6,5667	1,19304	,68880

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
H2O2.ac	61,605	2	,000	11,43333	10,6348	12,2319
H2O2.et	9,533	2	,011	6,56667	3,6030	9,5303

Anexo 9. Análisis de varianza de maíz del maíz blanco, amarillo, rojo y azul en extractos acuosos y etanólicos respecto a compuestos fenólicos totales, antocianinas, actividad antioxidante, potencia total de reducción e inhibición peróxido de hidrógeno

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Compuestos fenólicos ex.ac	Inter-grupos	16534,133	3	5511,378	1670,439	,000
	Intra-grupos	26,395	8	3,299		
	Total	16560,528	11			
Compuestos fenólicos ex.et	Inter-grupos	8378,095	3	2792,698	442,339	,000
	Intra-grupos	50,508	8	6,313		
	Total	8428,603	11			
Antocianinas	Inter-grupos	9843,230	3	3281,077	1,036 E7	,000
	Intra-grupos	,003	8	,000		
	Total	9843,232	11			
%Actividad antioxidante ex.ac	Inter-grupos	2306,020	3	768,673	728,025	,000
	Intra-grupos	8,447	8	1,056		
	Total	2314,467	11			
%Actividad antioxidante ex.et	Inter-grupos	5954,577	3	1984,859	12805,541	,000
	Intra-grupos	1,240	8	,155		
	Total	5955,817	11			
%Potencia total de reducción ex.ac	Inter-grupos	3904,416	3	1301,472	38091,862	,000
	Intra-grupos	,273	8	,034		
	Total	3904,689	11			
%Potencia total de reducción ex.et	Inter-grupos	6327,322	3	2109,107	90390,321	,000
	Intra-grupos	,187	8	,023		
	Total	6327,509	11			
% Inhibición peróxido de hidrógeno ex.ac	Inter-grupos	3033,647	3	1011,216	343,659	,000
	Intra-grupos	23,540	8	2,943		
	Total	3057,187	11			
% Inhibición Peróxido de hidrógeno ex.et	Inter-grupos	5925,769	3	1975,256	139,348	,000
	Intra-grupos	113,400	8	14,175		
	Total	6039,169	11			