

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE MAÍZ

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY IN MAIZE KERNELS

Norma A. Ruiz Torres ^{*1}, Froylán Rincón Sánchez ², Víctor M. Hernández López ³, Juan de D. Figueroa Cárdenas ⁴ y Ma. Guadalupe F. Loarca Piña ⁵

¹ Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, ² Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". 25315, Buenavista, Saltillo, Coah. Tel. (844) 4110220
³ Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tam. ⁴ Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Querétaro, ⁵ Laboratorio de Toxicología Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

* Autor para correspondencia (nruiz@uaaan.mx)

RESUMEN

En este trabajo se determinaron los compuestos fenólicos totales, su actividad antioxidante y sus interrelaciones, y se analizó el componente genético en la expresión de estos compuestos químicos en cruza simples de maíz (*Zea mays* L.). Para el análisis químico se utilizaron muestras de grano de 38 materiales genéticos (33 cruza simples mas cinco testigos). Se computó un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorio, se obtuvieron correlaciones entre variables y se hizo un análisis genético con las cruza simples. Se encontraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.01$) entre cruza simples, testigos, así como en la comparación cruza vs. testigos, para los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos totales no estuvieron correlacionados de manera directa con la actividad antioxidante ni con el contenido de antocianinas. En la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas se encontró correlación positiva ($r = 0.72^*$). En el análisis genético las líneas hembras mostraron componentes de varianza genética superiores a las de los probadores, tanto en compuestos fenólicos como en actividad antioxidante. En los compuestos fenólicos la expresión fue determinada por los efectos de interacción de los dos progenitores, en tanto que la actividad antioxidante estuvo determinada principalmente por los efectos genéticos de las líneas hembra.

Palabras clave: *Zea mays*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, aptitud combinatoria.

SUMMARY

In this work we determined total phenolic compounds, their antioxidant activity and their relationship, as well as the genetic com-

ponents on the chemical compounds expression in single crosses of maize (*Zea mays* L.). Seed samples of 38 genetic materials (33 single crosses and five checks) were used for the chemical analysis. Analysis of variance was computed using a completely randomized design, and correlation among variables and a genetic analysis using the single crosses were made. Significant differences ($P \leq 0.01$) were found among crosses, checks, and between crosses vs. checks, as well as for the phenolic compounds and their antioxidant activity. The phenolic compounds were not directly correlated with the antioxidant activity or with the anthocyanin concentration. A positive and correlation was found between the antioxidant activity and the anthocyanin content ($r = 0.72^*$). The genetic analysis showed that the female lines had a genetic variance from components higher than in the testers, both in phenolic compounds and antioxidant activity. Phenolic compounds were influenced by the interaction effects of both parents, whereas the antioxidant activity was mainly determined by the female parental lines.

Index words: *Zea mays*, phenolic compounds, antioxidant activity, combining ability.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha dado a conocer que al contenido de pigmentos en los granos de maíz (*Zea mays* L.), que además de ser usados como colorantes naturales se les atribuyen funciones biológicas como antioxidantes (Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Adom y Liu, 2002). Un antioxidante es una sustancia que aun en concentraciones más bajas que el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación del sustrato (Halliwell *et al.*, 1995). Entre las sustancias antioxidantes están los polifenoles, antocianinas y flavonoides (Rao y Balachandran, 2002). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, de los que se han identificado más de 8000 que difieren en estructuras químicas y en actividad. La distribución de compuestos fenólicos en tejidos y células vegetales varía considerablemente entre compuestos (Dai *et al.*, 1995). En maíz se les ha encontrado principalmente en pericarpio, aleurona, endospermo y embrión (Nakatani *et al.*, 1979; Fossen *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2002; Jing y Giusti, 2005). Estos compuestos presentan interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana debido a las propiedades benéficas de su actividad antioxidante (Rao y Agarwal, 2000).

A pesar de que el maíz es parte importante de la dieta del mexicano, existe poca información científica respecto a su uso como una fuente natural de antioxidantes. Un análisis de los compuestos fenólicos del maíz puede ayudar a determinar la actividad antioxidante del grano y su potencial uso en la industria como alimento funcional. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar los compuestos fenólicos totales de granos de maíz, evaluar su actividad antioxidante y sus interrelaciones; otro objetivo fue analizar el componente genético de su expresión en cruza simples de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en los laboratorios de Toxicología y de Análisis de Materiales, el primero ubicado en la Universidad Autónoma de Querétaro y el segundo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Querétaro. Para el análisis químico se utilizaron muestras de grano de 38 materiales genéticos, de los cuales 33 corresponden a cruza simples y cinco se incluyeron como testigos (Cuadro 1). Los materiales genéticos fueron obtenidos en el ciclo Otoño-Invierno 2004-2005 en un campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (UAAAN) en Tepalcin-go, Mor.

En las cruza simples intervino un grupo de líneas endogámicas utilizadas como progenitores femeninos derivadas de una población enana (identificadas con los números 11, 13, 15, 16, 17, 18 y 19), provenientes del Instituto Mexicano del Maíz de la UAAAN, y otro grupo de líneas QPM (Quality Protein Maize) utilizadas como progenitores masculinos (identificadas con los números 41, 42, 52, 53 y 56), proporcionadas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Los dos grupos de líneas fueron seleccionadas con base en la evaluación agronómica de combinaciones entre grupos germoplásmicos de maíz (De León *et al.*, 2005).

Cuadro1. Lista de materiales genéticos utilizados en el estudio y atributos estudiados.

Materiales genéticos	Color de grano	Compuestos fenólicos (Eq. cat. mg g ⁻¹)	Actividad antioxidante (ARA)	Contenido de antocianinas (mg kg ⁻¹)
Cruzas simples				
11 x 41	Blanco	11.30	7.63	4.64
11 x 42	Blanco	12.46	5.40	4.29
11 x 52	Blanco	17.39	7.04	3.85
11 x 53	Blanco	16.81	5.67	4.71
11 x 56	Blanco	16.11	6.67	3.35
13 x 41	Blanco	13.94	9.11	5.12
13 x 52	Blanco	11.05	9.38	5.54
13 x 53	Blanco	10.25	9.90	4.98
13 x 56	Blanco	13.21	9.60	4.51
15 x 41	Blanco	18.22	3.57	2.26
15 x 42	Blanco	29.33	4.96	2.15
15 x 52	Blanco	21.46	4.83	2.68
15 x 53	Blanco	29.98	3.68	3.01
15 x 56	Blanco	23.27	5.09	3.59
16 x 41	Blanco	17.09	9.08	3.64
16 x 42	Blanco	20.82	6.46	4.52
16 x 52	Blanco	24.15	8.22	4.29
16 x 53	Blanco	21.98	8.27	3.16
17 x 41	Blanco	18.52	9.75	2.77
17 x 42	Blanco	18.38	9.33	5.26
17 x 52	Blanco	21.08	8.95	5.43
17 x 53	Blanco	17.95	9.68	4.97
17 x 56	Blanco	21.68	7.28	5.01
18 x 41	Blanco	12.27	2.70	3.49
18 x 42	Blanco	23.09	6.56	3.48
18 x 52	Blanco	18.75	5.51	2.46
18 x 53	Blanco	16.78	3.66	4.35
18 x 56	Blanco	18.62	7.04	4.37
19 x 41	Blanco	8.64	6.72	4.90
19 x 42	Blanco	8.45	9.26	4.51
19 x 52	Blanco	11.58	9.18	4.94
19 x 53	Blanco	9.54	8.68	5.56
19 x 56	Blanco	11.30	9.19	4.04
Testigos				
‘Cafime’	Blanco	20.07	12.34	6.24
‘Población tropical’	Amarillo	10.87	2.36	3.31
CML287	Amarillo	16.85	8.28	4.27
6221	Blanco	10.60	2.12	1.16
6222	Blanco	13.16	1.64	1.15
Media		16.761	6.968	3.999
Error estándar		0.624	0.314	0.195

Una muestra de grano de cada material se utilizó para determinar compuestos fenólicos, actividad antioxidante y concentración de antocianinas. En la determinación de compuestos fenólicos se utilizó el protocolo de extracción descrito por Cardador-Martínez *et al.* (2002), y la cuantificación se hizo mediante el ensayo de la vainillina (Deshpande y Cheryan, 1987) y los resultados se expresaron como equivalentes de (+) catequina (mg g^{-1}). La determinación de la actividad antioxidante se hizo con el método del DPPH; el método original de Brand-Williams *et al.* (1995) fue modificado por Fukumoto y Mazza (2000) y adaptado para su uso en microplaca. La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, con la ecuación propuesta por Burda y Oleszek (2001). El protocolo aplicado para la extracción y cuantificación de antocianinas fue el recomendado por Abdel-Aal y Hucl (1999).

En las determinaciones de fenoles totales y actividad antioxidante se hicieron dos repeticiones, en tanto que para el contenido de antocianinas sólo fue posible hacer una repetición. Se calcularon los estadísticos descriptivos y se hizo un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorio. Además se hizo un análisis de correlación con los promedios de las tres variables, con el propósito de estudiar sus interrelaciones. Las cruza simples se utilizaron para hacer un análisis genético línea x probador (Singh y Chaudhary, 1985), con el propósito de calcular los efectos de las líneas de la población enana y las QPM, así como la interacción entre ellas. En las pruebas de hipótesis se consideró que las líneas representan una muestra aleatoria de las dos poblaciones. Los análisis estadísticos fueron realizados con los procedimientos del programa SAS (SAS Institute, 2004). Finalmente, se hizo un análisis de la interacción materiales genéticos x variables (probadores), mediante el modelo de dispersión gráfica "GGE Biplot" (Yan y Kang, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la amplitud de valores obtenidos a partir de los materiales genéticos (Cuadro 1) se deduce que es posible realizar selección dentro de ellos. En el análisis de varianza para compuestos fenólicos y actividad antioxidante, se desglosó la suma de cuadrados en Cruzas, Testigos y Cruzas vs. Testigos. En todos los casos se encontró significancia estadística ($P \leq 0.01$), que indica que tanto en los compuestos fenólicos como en la actividad antioxidante existen diferencias entre cruza simples, entre testigos, así como en la comparación cruza vs. testigos. Por tanto, las determinaciones de compuestos fenólicos, antocianinas y la actividad antioxidante permiten diferenciar a los materiales genéticos.

El análisis de correlación indicó que no existe una asociación directa entre compuestos fenólicos (FEN) con la actividad antioxidante (CAOX) y las determinaciones de antocianinas (ANTO), pues sus coeficientes de correlación fueron $r_{(FEN,CAOX)} = -0.094$ y $r_{(FEN,ANTO)} = -0.216$, respectivamente. Estos coeficientes difieren de los reportados por Wang y Lin (2000), quienes encontraron una relación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en frambuesa (*Rubus idaeus* L.) y zarzamora (*Rubus* sp). Emmons y Peterson (1999), al analizar cuatro variedades de avena (*Avena sativa* L.) encontraron que una variedad contenía mayor cantidad de compuestos fenólicos pero no mayor actividad antioxidante, debido a la naturaleza química diferente de los compuestos fenólicos encontrados en cada genotipo (Que *et al.*, 2006). En la actividad antioxidante y contenido de antocianinas se encontró una correlación significativa de $r_{(CAOX,ANTO)} = 0.722^{**}$, que indica que la concentración de antocianinas en el grano de maíz constituye una fuente importante de actividad antioxidante. Similarmente, Tsai *et al.* (2002) demostraron que las antocianinas de pétalos de *Hibiscus sabdariffa* L. aportaban de 24 a 52 % de la actividad antioxidante total.

La Figura 1 muestra gráficamente los resultados de la interacción entre los materiales genéticos y las variables en estudio. Los efectos de interacción se muestran a partir de los dos primeros componentes principales, que en conjunto explican 91 % de la variación total. Las variables están indicadas por un vector a partir del origen, y el ángulo que forman determina el grado de asociación entre ellos. Así, los compuestos fenólicos no están asociados con la actividad antioxidante ni con la concentración de antocianinas, dado que su relación forma una perpendicular. Esta relación coincide con los coeficientes de correlación no significativos obtenidos entre estas variables: $r_{(FEN,CAOX)} = -0.094$ y $r_{(FEN,ANTO)} = -0.216$. De igual manera, se corroboró que hay una relación positiva entre la actividad antioxidante y la concentración de antocianinas (Figura 1), como también lo indicó su respectivo coeficiente de correlación.

Al considerar la relación de los materiales genéticos con los compuestos químicos, los materiales testigos forman un gradiente asociado con la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas. La población 'Cafime' dio los valores mayores de estos compuestos (12.34 y 6.24, respectivamente), en tanto que las poblaciones 'Tropical', 6221 y 6222, dieron los menores índices (Cuadro 1). En los compuestos fenólicos también se notó una respuesta en las cruza, lo que dio lugar a que grupos de materiales resultaran asociados con valores positivos (15 x 53, 15 x 42) y otros con valores negativos (19 x 41, 19 x 42, 19 x 53). Las cruza donde intervienen las líneas 19 y 13

mostraron menores concentraciones de compuestos fenólicos, en tanto que las cruzas con la línea 15 dieron los mayores valores.

La dispersión de materiales genéticos (Cruzas y Testigos) en la Figura 1, y su relación con las variables indica la expresión diferencial en las concentraciones de los compuestos químicos. Al analizar harinas de tres genotipos de maíz (blanco, azul mexicano y azul americano), Pozo-Insfran *et al.* (2006) encontraron que el genotipo blanco contenía la mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguido por el tipo azul americano y por último el azul mexicano (4899, 451 y 1310 mg de compuestos fenólicos por kilogramo de grano).

El análisis genético líneas Enanas x Líneas QPM detectó diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre líneas para los compuestos fenólicos y actividad antioxidante, en tanto que entre los probadores no se encontraron diferencias en estos dos caracteres. En la interacción Líneas x Probador sólo se encontraron diferencias ($P \leq 0.01$) en los compuestos fenólicos (datos no presentados). Lo anterior puede corroborarse al analizar los componentes de la varianza genética estimada, donde las líneas Enanas obtuvieron componentes de varianza genética superiores a la varianza de los Probadores, tanto en compuestos fenólicos como en actividad antioxidante (Cuadro 2). Asimismo, sólo en los compuestos fenólicos los componentes de va-

rianza de la interacción líneas Enanas x Líneas QPM son de magnitud considerable, lo cual sugiere que en los compuestos fenólicos la expresión está determinada por los efectos genéticos de las líneas en los dos grupos.

En un estudio sobre la concentración de carotenoides y tocoferoles en maíz, Egesel *et al.* (2003) concluyeron que éstos están determinados principalmente por efectos genéticos aditivos. De acuerdo con las estimaciones de la varianza genética (Cuadro 2), la contribución a la expresión de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante está determinada principalmente por los efectos genéticos de las líneas hembra, lo que puede servir de base para determinar el orden de las cruzas. También se identificaron diferencias significativas en los efectos de aptitud combinatoria dentro de líneas en ambos grupos, lo cual explica la proporción de la variación genética en cada caso. Sin embargo, esto depende del compuesto ya que en los fenólicos existe una interacción ($P \leq 0.01$) entre líneas Enanas x líneas QPM. Lo anterior sugiere que la identificación de líneas con alta actividad antioxidante puede contribuir a la obtención de híbridos con niveles sobresalientes de esta actividad. En los compuestos fenólicos se deben analizar las combinaciones específicas debido a la fuerte interacción entre los grupos de líneas, así como a la magnitud e importancia de los efectos de la aptitud combinatoria general en dichos grupos.

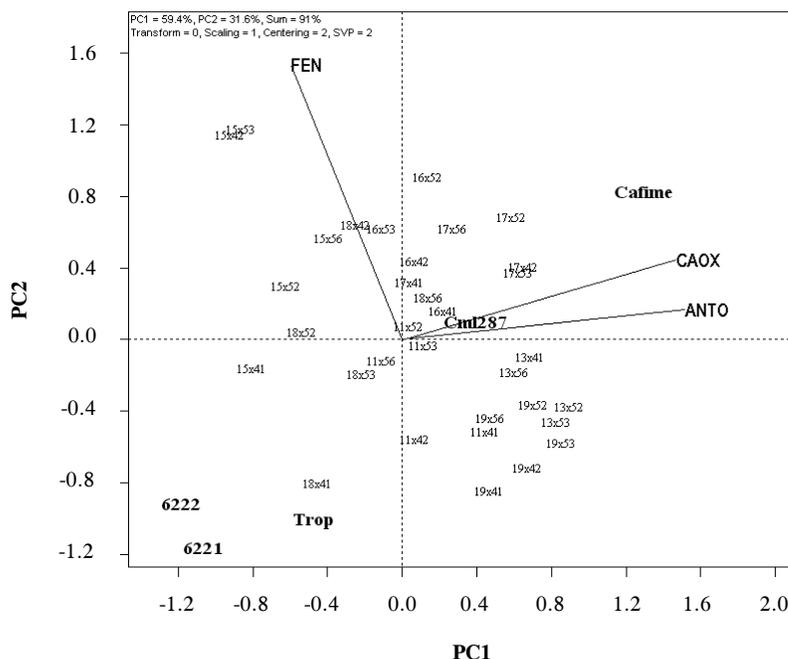


Figura 1. Representación gráfica de la asociación entre las cruzas simples, los testigos y los parámetros en estudio (FEN, compuestos fenólicos; CAOX, actividad antioxidante; y ANTO, contenido de antocianinas).

Cuadro 2. Medias y efectos de aptitud combinatoria general (ACG) de líneas y probadores de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en maíz.

Materiales genéticos	Compuestos fenólicos		Actividad antioxidante	
	(Eq. cat. mg g ⁻¹)	ACG	(ARA)	ACG
Líneas enanas				
11	14.81	-2.32	6.48	-0.73
13	12.11	-5.02	9.50**†	2.29**†
15	24.45**†	7.32**†	4.43	-2.79
16	21.01**	3.88**	8.01*	0.79*
17	19.52*	2.39**	8.99**	1.79**
18	17.90	0.77**	5.09	-2.12
19	9.90	-7.23	8.61**	1.39**
Media	17.10		7.30	
Error estándar	1.39		0.50	
s_{ENANAS}^2	24.55		3.70	
Líneas QPM				
41	14.28	-2.85	6.94	-0.28
42	18.75	1.62**	6.99	-0.22
52	17.91	0.79**	7.59	0.37
53	17.61	0.48**	7.08	-0.14
56	17.36	0.23	7.48	0.27
Media	17.19		7.22	
Error estándar	2.07		0.75	
s_{QPM}^2	1.49		1.21	
s_{Lxp}^2	7.83		0.4314	

†*,** Mayor que $\mu + (1 \text{ y } 2 \times \text{error estándar})$; †*,** Diferentes de cero a 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad; s_{ENANAS}^2 , s_{QPM}^2 y s_{Lxp}^2 , componentes de la varianza genética de líneas enanas, QPM y líneas x probadores, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado al proyecto de investigación 41264 para realizar el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Aal E S M, P Hucl (1999)** A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Adom K K, R H Liu (2002)** Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50:6182-6187.
- Brand Williams W, M E Cuvelier, C Berset (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28:25-30.
- Burda S, W Oleszek (2001)** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49:2774-2779.
- Cardador-Martínez A, G Loarca-Piña, B D Oomah (2002)** Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975-6980.
- Dai G H, C Andary, L Mondolot-Cosson, D Boubals (1995)** Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Europ. J. Plant Pathol.* 101:541-547.
- De León C H, F Rincón S, H Reyes V, D Sámano G, G Martínez Z, R Cabazos C, J D Figueroa C (2005)** Potencial de rendimiento y estabilidad de combinaciones germoplasmicas formadas entre grupos de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:135-143.
- Deshpande S S, M Cheryan (1987)** Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* 52:332-334.
- Egesel C O, J C Wong, R J Lambert, T R Rocheford (2003)** Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Sci.* 43:818-823.
- Emmons C L, D M Peterson (1999)** Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem.* 76:902-906.
- Fossen T, R Slimestad, M O Andersen (2001)** Anthocyanins from maize (*Zea mays* L.) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* 49:2318-2321.
- Fukumoto L R, G Mazza (2000)** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48:3597-3604.
- Halliwell B, M A Murcia, S Chirico, O I Aruoma (1995)** Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:7-20.
- Jing P, M N Giusti (2005)** Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corn cobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *J. Agric. Food Chem.* 53:8775-8781.
- Nakatani N, H Fukuda, H Fuwa (1979)** Studies on naturally occurring pigments: major anthocyanin of Bolivian purple corn (*Zea mays* L.). *Agric. Biol. Chem.* 43:389-391.
- Pascual T S, B C Santos, G J C Rivas (2002)** LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* 82:1003-1006.
- Pozo-Insfran D, C H Brenes, S O S Saldivar, S T Talcote (2006)** Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Res. Internat.* 39:696-703.

- Que F, L Mao, X Pan (2006)** Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res. Internatl.* 39:581-587.
- Rao A V, S Agarwal (2000)** Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 19:563-9.
- Rao A V, B Balachandran (2002)** Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr. Neurosci.* 5:291-309.
- SAS Institute Inc. (2004)** SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 5121 p.
- Singh R K, B D Chaudhary (1985)** Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis. Revised Edition. Kalyani Publishers. Ludhiana, New Delhi. 318 p.
- Tsai P J, J McIntosh, P Pearce, B Camden, B R Jordan (2002)** Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Internatl.* 35:351-356.
- Wang S Y, H S Lin (2000)** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48:140-146.
- Yan W, M S Kang (2003)** GGE Biplot analysis. A Graphical Tool for Breeders, Geneticists, and Agronomists. CRC Press LLC, New York. 271 p.