

## ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS EN MAÍCES DE GRANO AZUL Y ROJO PROVENIENTES DE CUATRO RAZAS

### ANTHOCYANIN ANALYSIS IN BLUE AND RED CORN GRAIN SAMPLES FROM FOUR RACES

Yolanda Salinas Moreno<sup>1</sup>, Marcos Soto Hernández<sup>2</sup>, Fernando Martínez Bustos<sup>4</sup>, Víctor González Hernández<sup>3</sup> y Rafael Ortega Paczka<sup>5</sup>

#### RESUMEN

El contenido de antocianina total en las muestras analizadas mostró un rango de 8.7 a 61.0 mg/100 g muestra observándose mayor variabilidad entre los maíces de grano rojo. En los maíces de grano azul se presentó efecto de raza sobre el tipo de derivado de antocianidina presente, mientras que en los de grano rojo, este efecto se manifestó tanto en el derivado como en la antocianidina. En los maíces de grano azul, las antocianinas presentes derivan de cianidina y malvidina, siendo predominantes los derivados de la primera, en tanto que en los maíces de grano rojo provinieron de pelargonidina, cianidina, malvidina y un aglicón no identificado.

#### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

*Zea mays*, color, aleurona, pericarpio, antocianidina.

#### SUMMARY

The total anthocyanin content in the analyzed samples showed a range between 8.7 to 61.0 mg /100 FW. In the red corns was observed more variability. In the blue corns was observed effect of strain over the kind of anthocyanidin, whereas in the red ones, this effect was observed both in anthocyanin as in anthocyanidin. In the blue grain corn the anthocyanins came from cianidin and malvidin, being a major amount the derivates of the first one whereas in the red grain corn came from pelargonidine, cianidine, malvidine and an anthocyanidin still unknown.

<sup>1,2,3</sup> Especialidad de Fisiología, Botánica y de Genética. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. C.P. 56230. Tel. y Fax: 01(595) 2-0200.

<sup>4</sup> CINVESTAV. Querétaro. Fac. de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario. Cerro de las Campanas S/N. 76016 Querétaro, Qro.

<sup>5</sup> Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. Tel. y Fax: 01(595) 2-1500

#### ADDITIONAL INDEX WORDS

*Zea mays*, colour, aleurone layer, pericarp, anthocyanidin

#### INTRODUCCIÓN

México es considerado como centro de origen del maíz (*Zea mays* L.), por lo que la diversidad genética encontrada en esta especie es una de las mayores en el mundo (Wellhausen *et al.*, 1951). En el país se ha descrito cerca de 35 razas de maíz, dentro de las cuales se encuentra maíces de grano pigmentado, con colores que van desde el negro hasta rosa, siendo los más comunes los azules y rojos.

Los pigmentos responsables de esta coloración son las antocianinas, que en el grano se concentran principalmente en el pericarpio, en la capa de aleurona o en ambas estructuras.

Las antocianinas presentes en maíz de grano azul se derivan comúnmente de la cianidina, en tanto que en los de grano rojo provienen de la pelargonidina (Straus, 1959; Harborne y Gabbazi, 1969), aunque otros autores mencionan también la presencia de peonidina y malvidina en maíces de grano rojo (Caldwell y Peterson, 1992), así como delfinidina, en maíces de grano azul (Bustillos, 1997).

En el trabajo sobre antocianinas en maíz realizado por Straus (1959) mediante técnicas cromatográficas de capa fina y papel, se señala la presencia de glucósidos de cianidina y pelar-

gonidina en la variedad de maíz "Negro mexicano dulce". Utilizando como eluyente BAW (Butanol-Acido acético-Agua), se separaron tres pigmentos con valores de  $R_f$  de 0.30, 0.36, y 0.47, de los cuales el más abundante fue el de  $R_f=0.36$ , seguido por el de 0.47, los que fueron identificados como cianidin 3-glucósido y pelargonidin 3-monoglucósido, respectivamente. El tercer pigmento que se halló en mínima cantidad, no fue identificado.

Los aspectos genéticos que rigen la síntesis de antocianinas en maíz están bien estudiados. Se sabe que al menos 15 diferentes *loci* están involucrados en la producción, modificación y distribución de estos pigmentos en la planta (Donner y Robbins, 1991). En la aleurona del grano de maíz, el par de alelos Pr-pr controla el nivel de hidroxilación del pigmento de antocianinas. El pigmento púrpura de la aleurona, en líneas Pr, se ha identificado como glucósido de cianidina, en tanto que en líneas pr, el rojo corresponde a glucósido de pelargonidina (Coe, 1955).

Harborne y Gavazzi (1969) indican que en tejidos como la aleurona, anteras, raíz y coleoptilo que provienen de plantas Pr, se presentan tres pigmentos de color rojo púrpura, mientras que en tejidos similares, pero derivados de plantas pr, los pigmentos encontrados son de color rojo-anaranjado y con valores de  $R_f$  mayores a los de las plantas Pr. Uno de los pigmentos de la aleurona del grano en plantas Pr se identificó como cianidin-3-glucósido; los otros dos pigmentos tuvieron mayores valores de  $R_f$  en BAW y But-HCl y por hidrólisis produjeron glucosa y cianidina, por lo que se asume que son derivados acilados. Un análisis similar en aleurona de plantas Pr, evidenció la presencia de pelargonidin-3 glucósido y dos derivados acilados de estructura similar a la de los encontrados en las plantas Pr.

La identificación de antocianinas del tipo aciladas en maíz fue realizada posteriormente por Harborne y Self (1987) mediante el uso de

técnicas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), confirmándose la presencia de dos antocianinas aciladas [cianidin 3 - (6"malonilglucósido) y cianidin 3 dimalonilglucósido y una simple (cianidin 3-glucósido), en hojas coloreadas de maíz.

Se ha observado que la presencia de grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad al pigmento ante condiciones extremas de pH y temperatura (Dougall *et al.*, 1997). Los trabajos recientes sobre antocianinas en maíz denotan en esta gramínea la presencia tanto de antocianinas simples como aciladas y no únicamente derivadas de cianidina y pelargonidina, sino que en la medida que se ha diversificado el origen de los materiales analizados, se han encontrado en el grano de maíz antocianinas del tipo peonidina y malvidina (Caldwell y Peterson, 1992), así como delfinidina (Bustillos, 1997), aunque sobre esta última, Holton y Cornish (1995) mencionan que el maíz es incapaz de producirla, ya que no posee el complejo enzimático necesario para sintetizarla.

Los estudios realizados sobre antocianinas en maíz han sido aislados, empleándose en cada uno materiales diferentes, por lo que la información generada hasta ahora no permite valorar con certidumbre cual es la variabilidad que sobre antocianinas existe en maíz, tampoco se sabe si el patrón de antocianinas se ve influenciado por la raza a la cual pertenecen los diferentes maíces de grano azul o rojo. En el presente trabajo se tuvo como objetivos identificar las principales antocianinas presentes en maíces pigmentados de cuatro razas distintas, así como observar el grado de asociación entre el patrón de antocianinas y el color del grano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se emplearon 10 muestras de maíz pigmentado que fueron colectadas en

Cuadro 1. Muestras de maíces usadas en el estudio

Estado donde se colectó las muestras	Raza a la que pertenecen <sup>1</sup>	Número de muestras estudiadas	
		Grano rojo	Grano azul
Puebla	Arrocillo	1	2
Oaxaca	Bolita	1	2
Chihuahua	Azul Chihuahua	1	1
Edo. de México	Ancho x Chalqueño	1	1

1: La clasificación de los maíces en cada una de las razas se realizó considerando las características físicas del grano y la mazorca, de acuerdo con lo descrito por Hernández y Alanís (1970).

Cuadro 2. Color de grano en los maíces estudiados<sup>1</sup>.

Muestra	Maíces de grano azul			Muestra	Maíces de grano rojo		
	L	a	b		L	a	b
Puebla: 6816 <sup>2</sup>	30.5	1.6	5.7	Puebla: 6820	13.1	6.6	1.4
6840	37.4	0.6	6.6				
Edo.de México. Azul Chalco	35.4	2.2	7.1	Edo. de México: Rojo Chalco	25.7	22.4	11.9
Oaxaca: 6869	41.0	4.2	9.3	Oaxaca: 6868	37.4	5.8	9.4
6866	24.6	1.2	7.9				
Chihuahua: Azul	38.5	0.8	8.7	Chihuahua: Rojo	37.2	11.2	12.6

1: Para leer el color en los maíces azules, el equipo se calibró con un mosaico negro cuyos valores de las variables fueron: L= 0.1; a=0.01; b=-0.01. En las muestras de grano rojo el mosaico fue rosa, y los valores de las variables fueron: L=74.48; a=25.8; b=12.58.

2: El número corresponde al de colecta con que se accedió la muestra en el Banco de Germoplasma.

cuatro Estados de la República Mexicana, las cuales están asociadas con diferentes razas de maíz (Cuadro 1).

### Variables evaluadas

**Color de grano.** Se evaluó por medio de un colorímetro Mini Scan (Hunter -Lab), obteniendo las lecturas de los parámetros **L, a y b.**

Para los análisis posteriores, las muestras se desgerminaron manualmente y se molieron en un molino. A partir de esta harina se realizaron todas las determinaciones.

### Antocianina total

Se pesaron 20 g de muestra a los que se añadieron 100 ml de disolvente (metanol-ácido acético-agua; 10:1:9 v/v), realizando tres extracciones sucesivas a temperatura ambiente y se agitaron, por 24 horas la primera y 8 horas las dos posteriores. Al inicio de cada extracción, la mezcla se ajustó a un pH de 3, empleando HCl concentrado. Al término de cada extracción, se separó el solvente de la harina, centrifugando el sobrenadante a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, para eliminar turbidez. Los valores de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro Metrolab 330, a 520 nm. Se corrió una curva de calibración usando como estándar pelargonidina clorada de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO), en concentraciones de 0 a 50 ppm.

### Valores de Rf<sub>s</sub>

La extracción del pigmento se realizó a partir de muestras de 5 g de harina, con metanol acidificado al 3% con ácido trifluoroacético, manteniéndolas bajo condiciones de refrigeración por 24 h. Al término de este tiempo, se filtraron y el extracto se concentró a sequedad en un Rotavapor a 40°C. El pigmento se redisolvió en suficiente metanol acidificado (0.01% de HCl), y se transfirió a viales.

Los valores de Rf<sub>s</sub> se obtuvieron empleando papel Whatman # 3 y los eluyentes usados fueron: BAW (n-butanol-ácido acético-agua; 4:1:5), ButHCl (n-butanol-ácido Clorhídrico 2N; 1:1), HCl 1% (ácido clorhídrico concentrado-agua; 3:97), y HOAc-HCl (agua-ácido acético glacial-ácido clorhídrico 12N; 82:15:3). Los valores de Rf<sub>s</sub> que se muestra provienen de al menos dos repeticiones.

### Longitud de onda de máxima absorción de luz en UV-VIS ( $\lambda_{max}$ )

**Antocianinas.** Para este análisis se usó el cromatograma eluido con BAW, del cual se recortó cada una de las bandas separadas y se extrajo el pigmento con metanol acidificado. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Pye Unicam, modelo SP8-100, mediante un barrido desde 500 a 560 nm. Como blanco se usó metanol acidificado.

**Antocianidinas.** Se empleó el extracto del análisis anterior, el cual se ajustó a un pH de 1 con ayuda de ácido clorhídrico 2N, poniendo la muestras en baño maría (BM) a ebullición por una hora. Posteriormente la antocianidina se extrajo con 5 ml de alcohol isoamílico, usando un embudo de separación. El alcohol se evaporó a sequedad con BM y corriente de Nitrógeno. El pigmento se redisolvió en metanol acidificado y se efectuaron las lecturas bajo las mismas condiciones empleadas para antocianinas.

### Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para este análisis se usó la primera de las tres extracciones, por tener una mayor concentración de pigmento. El extracto metanólico se hizo pasar a través de una columna de vidrio empacada con resina amberlita XAD-7, que se usó como adsorbente polimérico. Antes de usar la resina, se preconditionó siguiendo las ins-

trucciones del fabricante (Sigma's bulletin, 1994).

Una vez empacada la columna, se enjuagó con ácido acético al 5%, para eliminar almidón, grasa y proteínas que causan interferencia durante el análisis.

Para hacer la separación en HPLC, con el extracto purificado se realizaron dos tipos de hidrólisis. Una a pH 3 y BM a ebullición por 10 minutos; otra a pH 1 y BM a ebullición por una hora. En cada caso, incluyendo la muestra sin hidrolizar, se filtró en membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

El equipo empleado en la caracterización de los pigmentos consta de un sistema cromatográfico de líquidos VARIAN 9012, equipado con un detector UV-VIS Star 9050, y una columna  $\text{C}_{18}$  (250 x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ). Los corrimientos para hacer la detección de las antocianinas y ácidos fenólicos se llevaron a cabo a una longitud de onda de 525 nm y 280 nm, respectivamente, bajo un sistema de gradientes en donde el disolvente A fue ácido fórmico-agua (1:99v/v) y el B metanol. La velocidad de flujo de disolventes fue de 0.9 ml/min a 30  $\pm$  1 C. Los disolventes usados fueron grado HPLC y antes de emplearse en el equipo se filtraron con ayuda de vacío y a través de una membrana Millipore (0.45 $\mu\text{m}$ ).

El perfil de elucidación fue lineal como a continuación se describe: 1-10 min. 83-17 % B; 10-12 min. 78-22% B; 12-20 min. 73-27 % B; 20-30 min. 69-31 % B; 44-46 min. 53-47 % B; 46-54 min. 40-60 % B; 54-60 min. 35-65 % B.

Los estándares usados para la identificación de antocianinas, y ácidos fenólicos fueron.

**Antocianinas:** de éstas se tuvo dos tipos de estándares: los obtenidos a partir de frutos como berenjena de la que se aisló la delfinidin 3,5 diglucósido; de manzana la cianidin 3-

glucósido y de mango la peonidin 3-galactósido, esto en base a lo informado por Macheix *et al.* (1990) en relación a la presencia de estas antocianinas en los frutos mencionados. El otro tipo de estándares fueron compuestos puros, como la pelargonidina clorada de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO.) y las antocianinas cianidin 3-glucósido, cianidin 3-galactósido y malvidin 3-glucósido, que fueron amablemente donadas por el Dr. Mazza (Pacific Agri-Food Research Centre. Summerland, B.C. Canada)

**Ácidos fenólicos:** ácido benzóico, ácido clorogénico, ácido hidroxicinámico, ácido hidroxicaféico, ácido ferúlico y vainillina, todos ellos de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO.)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Color de grano

De los maíces de grano azul evaluados, las muestras más oscuras fueron la 6866 y 6816, en tanto que la 6869 y azul de Chihuahua fueron las de grano más claro. Estas apreciaciones en base al valor mostrado por la variable L (Cuadro 2), que mide la reflectancia de la muestra, al ser ésta más oscura, el valor de L decrece.

Considerando los valores de a y b, que son parámetros asociados con el tinte de la muestra, el color de los maíces de grano azul está integrado por un tinte rojizo, dado por el valor positivo en a y por un tinte amarillento expresado por el valor positivo de b.

Con respecto a las muestras de grano rojo, la más oscura fue la 6820, con un valor de L=13.1, mientras que las muestras 6868 y rojo Chihuahua fueron las de grano más claro.

En los maíces azules el pigmento se presentó sólo en la capa de aleurona, en tanto que en los maíces de grano rojo se halló en pericarpio (muestras Rojo Chalco y Rojo Chihuahua), en

capa de aleurona (6868), o bien en ambas estructuras (6820). La variación en cuanto a los parámetros Hunter que definen el color de la muestra, fue mayor en los maíces de grano rojo, con respecto a los de grano azul.

### Antocianina total

El contenido de antocianina total mostró una amplia variación entre los maíces de grano rojo (8.7 – 61.0 mg/100 g de muestra) en relación a la observada en los maíces de grano azul (29.8 – 46.1 mg/100 g de muestra). Los valores obtenidos son parecidos a los informados por Bustillos (1997), quien señala un rango de 51.4 a 62.3 mg/100 g de muestra.

Los maíces con menor contenido de antocianinas fueron los que tuvieron el pigmento únicamente en pericarpio, mientras que el contenido más alto se presentó en la muestra con pigmento tanto en pericarpio como en capa de aleurona (Cuadro 3).

No se observó una relación clara entre la intensidad de color de grano y el contenido de antocianina total, ya que maíces como el 6866 y 6816 con los valores más bajos en L, indicativo de un color azul intenso, presentaron un contenido de antocianina total de bajo a intermedio.

Cuadro 3. Antocianina total en las muestras estudiadas

Maíces	Antocianina total (mg de antocianina 100 g de muestra)
<b>Azules:</b>	
6816 (Puebla)	35.08
6840 (Puebla)	32.10
Azul Chalco (Edo. de México)	46.10
6869 (Oaxaca)	41.70
6866 (Oaxaca)	29.8
Azul Chihuahua	45.8
<b>Rojos:</b>	
6820 (Puebla)	60.96
Rojo Chalco (Edo. de México)	8.70
6867 (Oaxaca)	22.40
Rojo Chihuahua	9.20

### Valores de Rf<sub>s</sub>

En el Cuadro 4 se muestra los valores de Rf<sub>s</sub> obtenidos con los diferentes eluyentes, en las muestras de grano azul estudiadas, así como los valores de  $\lambda_{\max}$  para la antocianina y su aglicón (antocianidina). De los eluyentes empleados, el que mayor separación de pigmentos permitió fue BAW, con el que se obtuvieron dos y hasta tres bandas por muestra con diferente movilidad, pero de color muy parecido, sobre todo las de valores de Rf<sub>s</sub> entre 44-46 y 65-67, que presentaron un color rojo intenso con algunos tonos rosáceos.

En la muestra azul Chalco se observaron además de las bandas referidas, una adicional de mayor polaridad y con un Rf=31 misma que mostró color rosa violáceo, y que fue diferente al resto de las muestras.

Todas las muestras de maíz azul presentaron una banda común con valor de Rf entre 44 y 46, en tanto que la banda con Rf de 65-67 se observó solo en las muestras 6816 (Puebla), azul Chalco (Edo. de México) y 6869 (Oaxaca), en tanto que una banda con valor de Rf = 70 se presentó en el resto de las muestras.

Con base a los Rf<sub>s</sub> obtenidos en los cuatro eluyentes empleados, ha sido difícil identificar alguna de las bandas mediante la comparación de estos valores con los publicados por Harborne, (1967) para diferentes antocianinas, pues los Rf<sub>s</sub> observados en BAW y But-HCl en el presente trabajo, son más elevados, en tanto que son muy bajos en HCl 1%. Estos valores de Rf alterados se presentan cuando la antocianina se halla unida no sólo a azúcares, sino también a grupos acilo (Harborne, 1967; Strack y Wray, 1989).

En relación a los valores de  $\lambda_{\max}$  obtenidos para las antocianinas, éstos fueron de 530 y 532 nm que no coinciden con ninguno de los valores informados por Harborne (1967) para dife-

Cuadro 4. Valores de Rf y  $\lambda_{\max}$  de las antocianinas presentes en muestras de maíces con grano azul.

Muestras	Valores de RF(x 100) en				$\lambda^1_{\max}$ (nm)	$\lambda^2_{\max}$ (nm)
	BAW	But-HCl	HCl 1%	HAOc-HCl		
Puebla:						
6816	46	73	08	32	530	542
	67				532	535
6840	46	75	08	33	532	542
	70				532	535
Estado de México	31	74	08	33	532	542
Azul Chalco	46				530	542
	65				532	535
Oaxaca	45	75	08	34	532	542
6859	65				530	535
6866	46	75	07	33	532	535
Chihuahua	44	75	08	39	532	535
Azul	70	82			530	535
Estándares:	38	26	07	33	531	535
<sup>a</sup> Cy-3 glucósido						
<sup>b</sup> Pn-3 galactósido	49	28		33	530	532
<sup>c</sup> Dp-3.5 diglucósido	11	03	09	38	542	546

1: El valor corresponde a la antocianina

2: El valor corresponde al aglicón o antocianidina

Cuadro 5. Valores de Rf y  $\lambda_{\max}$  de las antocianinas presentes en muestras de maíces con grano rojo.

Muestras	Valores de Rf (x100)				$\lambda^1_{\max}$ (nm)	$\lambda^2_{\max}$ (nm)
	BAW	But-HCl	HCl 1%	HAOc-HCl		
Puebla:						
6820						
Pericarpio	38	24	10	36	531	535
	58		17	49	528	530
	64	33			520	
Aleurona	38	25	09	34	530	535
	69				526	530
Edo. de México:						
Rojos Chalco						
Oaxaca						
6868	51	75	12	42	516	525
Chihuahua:	42	28	06	33	532	542
Azul	71					
Cy3-glucósido	38	26	07	33	531	535
Pn 3-glucósido	49	28		33	530	532
Dp 3.5-diglucósido	11	03	09	38	542	546

1: El valor corresponde a la antocianina

2: El valor corresponde al aglicón o antocianidina

rentes antocianinas. Los valores de este parámetro en el aglicón fueron mayores, pero nuevamente sólo se presentaron dos valores: 535 y 542 nm que corresponden a cianidina y malvidina, respectivamente (Harborne, 1984).

Los derivados de cianidina son muy comunes en maíz (*Zea mays* L.). Los glucósidos de este pigmento han sido reportados por diversos investigadores (Coe, 1955; Straus, 1959; Harborne y Gavazzi, 1969), lo mismo que derivados de tipo acilado (Harborne y Self, 1987). En trabajos recientes también se ha informado sobre derivados acilados de malvidina y peonidina (Caldwell y Peterson, 1992), así como delfinidina (Bustillos, 1997), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con lo informado en la literatura en lo que se refiere al tipo de antocianidina presente, excepto que no se detectó ningún derivado de delfinidina en las muestras estudiadas, acorde con lo descrito por Holton y Cornish (1995), quienes mencionan que el maíz no posee el complejo enzimático requerido para sintetizar este tipo de antocianidina.

Tomando en cuenta los valores de  $\lambda_{\max}$  para los aglicones presentes en cada una de las muestras de grano azul estudiadas, cuyos valores fueron de 535 y 542 nm para cianidina y malvidina, en ese orden, se puede decir que al menos para los maíces estudiados, la raza a la cual pertenece cada maíz no influye en el tipo de aglicón presente. Posiblemente esto explique en parte la uniformidad en cuanto a color observada entre los maíces de grano azul, pues cada aglicón se relaciona con un color característico; así la cianidina presenta un color rojo intenso, en tanto que la malvidina exhibe un color morado (Harborne, 1984).

Los valores de Rfs obtenidos para los maíces de grano rojo se muestran en el Cuadro 5. Como la muestra 6820 presentó pigmento en capa de aleurona y en pericarpio, se analizó por separado cada estructura. En ambas se encontró una banda de color rojo intenso, de baja movi-

lidad y cuyos valores de Rfs en los cuatro eluyentes considerados son similares a los informados por Harborne, (1967) para la antocianina cianidina 3-glucósido. La presencia de este compuesto se comprobó comparando los valores de Rfs con los del estándar aislado a partir de cáscara de manzana (Cuadro 5).

Del pericarpio de la muestra 6820 se obtuvieron dos bandas más de menor polaridad que la cianidina 3-glucósido, con valores de  $\lambda_{\max}$  inferiores a ésta última. Una de estas bandas presentó un máximo de absorción para el aglicón de 530 nm, valor muy similar al que presenta la peonidina, que es de 532 (Harborne, 1984). En la capa de aleurona también se presentó una banda cuyo valor de  $\lambda_{\max}$  para el aglicón fue de 530 nm.

En lo que se refiere al maíz rojo de Chalco, mediante la cromatografía en papel no fue posible lograr una separación del pigmento, aplicando la técnica usada en el resto de las materiales. En principio la extracción del pigmento fue muy pobre y al realizar la cromatografía empleando como eluyente BAW, sólo se obtuvo una banda extendida desde el punto de aplicación hasta el frente del disolvente; al sacar el cromatograma de la cuba de corrimiento la banda mostraba un color anaranjado rojizo, que al secar se volvió de color café.

La muestra 6868 presentó únicamente una banda bien definida de color anaranjado rojizo, la cual mantuvo el color al secarse el papel, con bajos valores de  $\lambda_{\max}$  para la antocianina y el aglicón. En el caso de este último, el valor es parecido al que se informa para la pelargonidina, que es de 520 nm (Harborne, 1984), por lo que la antocianina detectada podría ser un derivado de esta antocianidina.

El maíz rojo de Chihuahua presentó dos bandas cuando el desarrollo del cromatograma se efectuó con BAW, y sólo una en el resto de los eluyentes usados. La antocianina de mayor

polaridad mostró valores de Rfs parecidos a los de la cianidina 3-glucósido, sin embargo el valor de  $\lambda_{\text{mas}}$  del aglicón no corresponde a la cianidina, sino a la malvidina.

**Tiempos de retención, porcentaje relativo de áreas, y número de antocianinas presentes en las muestras analizadas**

En los maíces de grano azul estudiados se observaron diferencias notables en cuanto al número de picos obtenidos en los maíces de Oaxaca (6866 y 6869), en relación al resto de los materiales. La muestra 6866 presentó 12 picos, en tanto que la 6869 mostró 18 (Figura 1). En los datos del Cuadro 6, sobre tiempos de retención (Tr), sólo se presentan las cuatro antocianinas más representativas, que suman 84% de las antocianinas totales para la muestra 6866, y 74% para la 6869. En el resto de los maíces el número de picos varió entre 4 y 5, como se aprecia en la Figura 2 en la cual se muestran los cromatogramas de las muestras azul Chalco y azul Chihuahua en la muestra cruda y completamente hidrolizada.

Para los maíces de Puebla (6816 y 6840) y Edo. de México (azul Chalco), los compuestos dominantes fueron los de Tr cercanos a 43 y 50 minutos. Este último compuesto constituyó alrededor del 42 % de las antocianinas presentes en estos maíces, y fue importante también en los maíces de Oaxaca, aunque con una presencia menor al porcentaje antes citado.

En el maíz azul de Chihuahua, las antocianinas más representativas presentaron tiempos de retención de 41.1 y 45.1 minutos, que son diferentes a los observados en los demás maíces.

El análisis de la muestra después de una hidrólisis completa permitió detectar los diferentes aglicones, que en los maíces de grano azul fueron únicamente dos, uno de los cuales por su valor de Tr podría corresponder a la cianidina,

cuyo estándar mostró un Tr de 48.7 min. Los derivados de este aglicón fueron dominantes en todos los maíces de grano azul, pues representó más del 70% de las antocianinas totales. El otro aglicón detectado tuvo un Tr aproximado de 50 minutos y una menor participación en cuanto al porcentaje de derivados presentes en las muestras.

En los maíces de Puebla y Edo. de México, el compuesto con menor tiempo de retención podría corresponder a la cianidina 3-glucósido, cuyo estándar mostró un Tr de 27.6 minutos. La presencia de la cianidina 3-glucósido en grano de maíz pigmentado ha sido previamente informado por otros investigadores (Straus, 1959; Harborne y Gabazzi, 1969; Harborne y Self, 1987), y es una de las antocianinas más comunes en maíz.

Entre los maíces de grano rojo estudiados se tuvo una amplia variación en relación al número de picos importantes en cada una de las muestras. Así en la muestra 6820 de Puebla se tuvieron cinco picos, en la 6868 de Oaxaca dos y en la rojo Chalco del Edo. de México se presentó sólo uno.

En el maíz rojo de Oaxaca únicamente se tuvieron dos antocianinas, de las que la predominante fue la de Tr =48 minutos. Se presentó solamente un aglicón, del que provienen los dos compuestos observados, y fue identificado como pelargonidina, en base al Tr de éste y el estándar.

Para la muestra 6820 los compuestos más representativos fueron los de Tr de 26.8 y 44.0 minutos. El primero de estos compuestos corresponde a la cianidina 3-glucósido y la abundancia de este pigmento en la muestra obedece a que se presentó tanto en el pericarpio como en la capa de aleurona del grano, según lo muestran los resultados de la cromatografía en papel (Cuadro 5). El análisis de la muestra totalmente hidrolizada denotó la presencia de tres aglicones con tiempos de retención de 48.7,

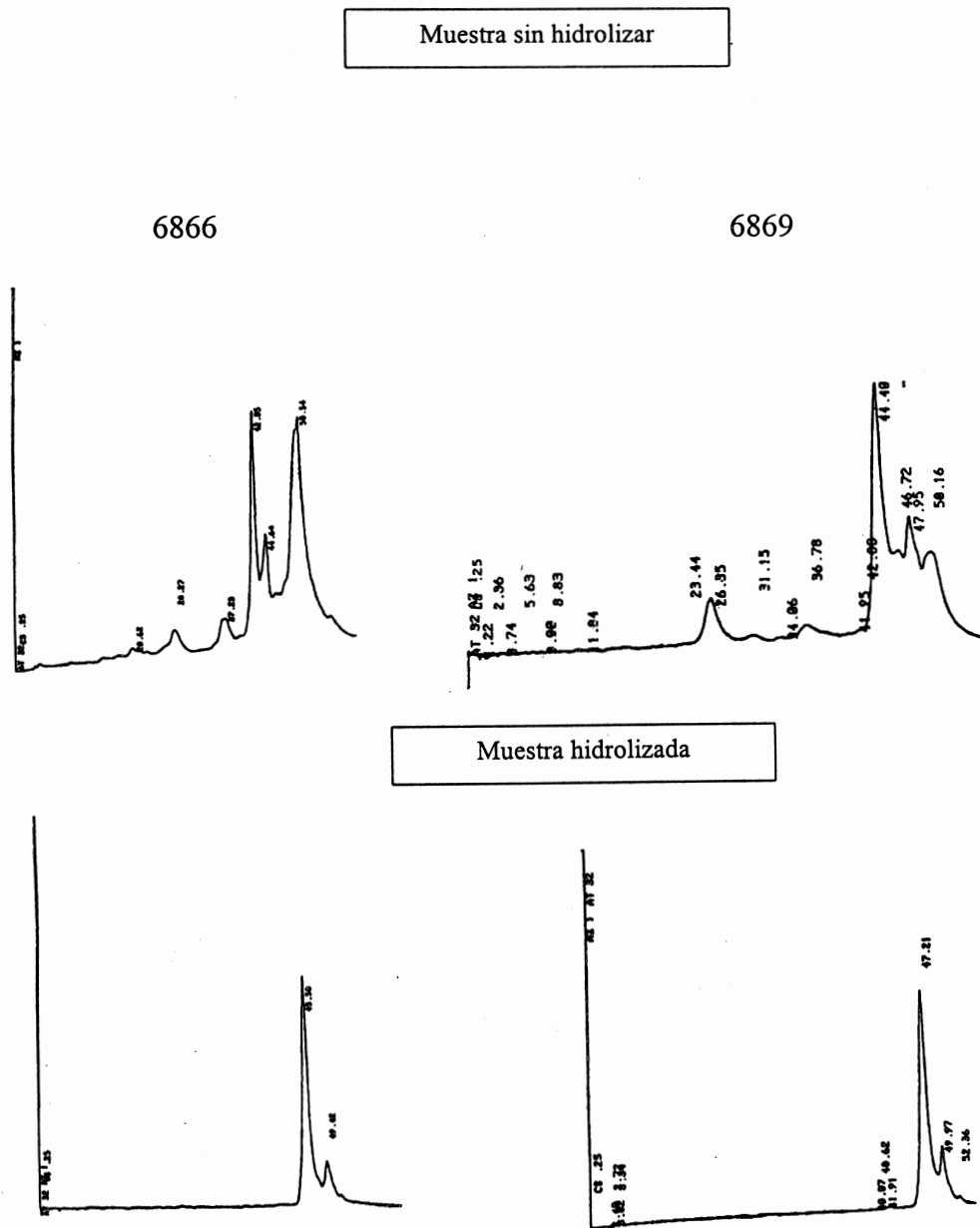


Figura 1. Cromatogramas de dos de los maíces azules de Oaxaca considerados en el estudio que muestran una gran cantidad de picos en el análisis de la muestra sin hidrolizar.

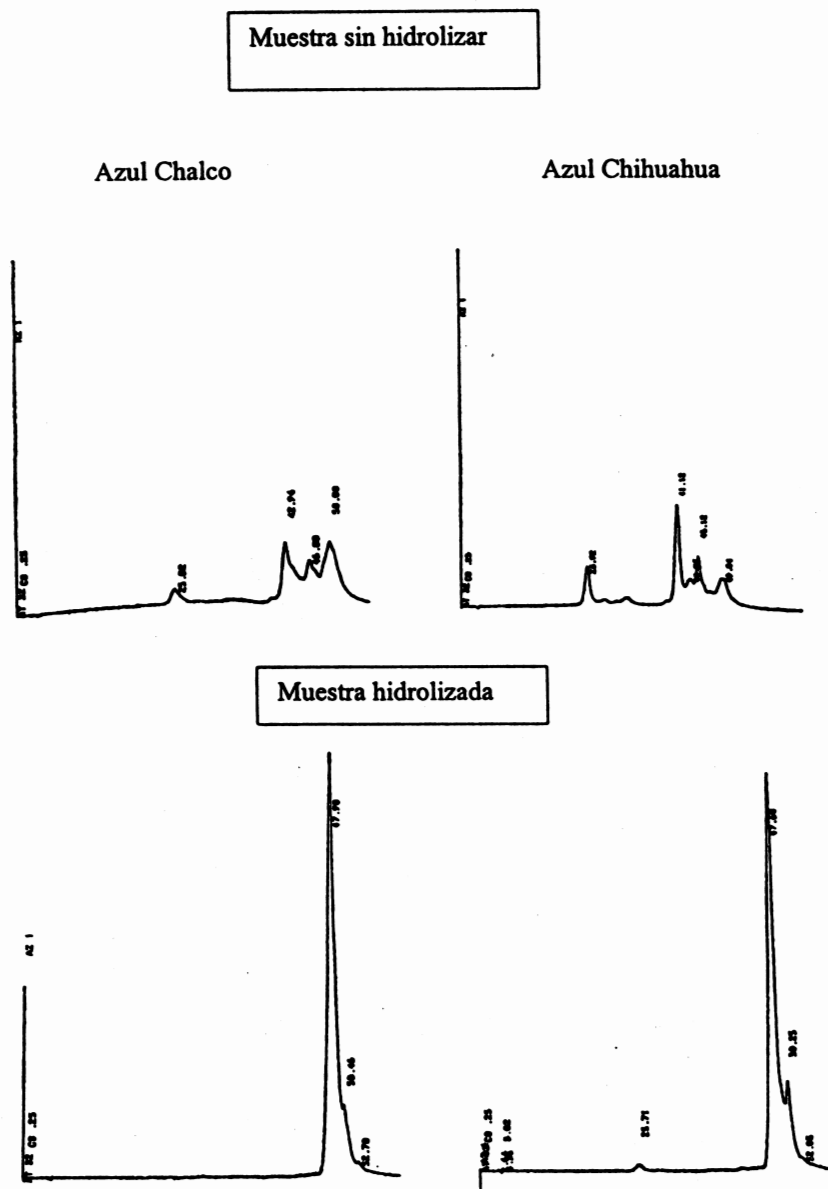


Figura 2. Cromatogramas de las muestras azul Chalco y azul Chihuahua que muestran gran similitud en los patrones de antocianinas (muestra sin hidrolizar) y aglicones (muestra hidrolizada).

Cuadro 6. Tiempos de retención para las antocianinas presentes en las muestras analizadas.

Maíces	Antocianina (Tr)	Antocianidina (Tr)	Porcentaje relativo
Azules:			
6816	26.5; 43.1; 46.7; 49.8	47.4; 49.7	85.8; 12.4
6840	25.9; 43.0; 46.5; 49.8	47.8; 50.0	72.4; 10.5
Azul Chalco:	25.0; 42.9; 46.8; 50.1	48.0; 50.5	87.3; 11.5
6869	26.3 44.4; 47.9; 50.2	50.7; 52.2	79.8; 16.4
6866	24.7 41.8; 45.6; 49.7	47.2; 50.0	77.4; 19.0
Azul Chihuahua	23.9; 41.1; 45.1; 49.8	47.6; 50.2	80.7; 16.5
Rojos:			
6820	26.8; 44.0; 46.2; 47.4; 49.2	48.7; 50.9; 51.3	59.5; 22; 16.4
6868	44.6; 48.9	49.7	93.9
Rojo Chalco	49.0	49.6	
Rojo Chihuahua			
Estandares:			
Cianidina		48.7	
Malvidina		51.4	
Pelargonidina		49.1	
Cy 3- glucósido	27.6		
Cy 3 -galactósido	22.2		
Mv 3 -glucósido	38.8		

50.9, y 51.3. El primero corresponde a la cianidina, de la cual derivan el 59.5% de las antocianinas presentes; el segundo no fue identificado, y de él derivan el 22% de las antocianinas presentes; finalmente el tercero corresponde a la malvidina y contribuye con el 16.4% de los derivados en la muestra.

Los derivados de esta antocianidina muestran coloraciones rojizo-anaranjadas (Harborne, 1984). Este color se observó en el pigmento separado mediante cromatografía en papel.

Para el maíz rojo de Chalco se tuvo únicamente un pico, que fue muy pequeño, indicando una presencia muy pobre de la antocianina. Al igual que en el maíz 6868, el análisis de la muestra hidrolizada mostró solamente un aglicón, que correspondió a la pelargonidina.

La constitución genética de las plantas de maíz determina el tipo de pigmento que se sintetiza; el par de alelos *Prpr* controla el nivel de hidroxilación en el anillo "B" de la estructura del pigmento. Cuando en las plantas el alelo *Pr* es dominante, el pigmento se deposita en la capa de aleurona del grano y se tienen principalmente derivados de cianidina. Si por el contrario, el alelo dominante es *pr*, se sintetizan predominantemente derivados de pelargonidina (Coe, 1955; Harborne y Gabazzi, 1969; Styles y Ceska, 1972).

Con base en lo anterior, en los maíces de grano azul analizados, el pigmento se encontró sólo en la capa de aleurona y los derivados predominantes fueron los de cianidina, por lo que es posible que en estos maíces el alelo *Pr* sea dominante.

En los maíces de grano rojo la información sobre la dominancia del alelo *pr* no encaja bien, ya que habría que precisar el tono de rojo en los que es válida, pues la muestra 6820 presenta un grano de color rojo intenso, casi guinda, y el pigmento se acumula tanto en pericarpio como en capa de aleurona, además de que los deriva-

dos de cianidina están presentes en ambas estructuras y son predominantes sobre los demás derivados, lo que sugiere que en la constitución genética de este material el alelo dominante podría ser *Pr*.

De los residuos ácidos identificados en antocianinas de maíz, los más frecuentes son los derivados del ácido hidroxicinámico, dentro de los que se incluye el ferúlico, cafeíco y p-coumárico (Harborne, 1967), así como derivados de ácidos alifáticos dicarboxílicos del tipo málico, malónico y succínico (Harborne y Self, 1987). El análisis a 280 nm de la muestra hidrolizada no evidenció la presencia de alguno de los ácidos incluidos como estándares en el presente trabajo. Aunque el ácido ferúlico es uno de los grupos acilo más frecuentemente observado en antocianinas aciladas, en las antocianinas presentes en las muestras analizadas no se identificó este radical acilo.

## CONCLUSIONES

El color del grano en los maíces de grano azul fue más uniforme que lo observado en los de grano rojo. Las muestras de maíz azul presentaron un contenido de antocianina total más homogéneo que lo observado en los maíces de grano rojo. En los primeros, el rango varió de 29.8 a 46.1 mg /100 g muestra, en tanto que en los rojos éste se situó entre 8.7 y 60.96 mg /100 g muestra

En los maíces azules analizados, los de Puebla, Edo. de México y Chihuahua, relacionados con las razas de maíz Arrocillo, Ancho x Chalqueño y Azul de Chihuahua, presentaron un patrón de antocianinas muy parecido y distinto al observado para los maíces de Oaxaca, asociados con la raza Bolita, sin embargo en todos los casos estas antocianinas derivan sólo de cianidina, y un aglicón desconocido, siendo predominantes los derivados de la primera.

En los maíces de grano rojo se halló una mayor variabilidad en cuanto a las antocianinas y antocianidinas presentes en relación a lo observado para los de grano azul. En dos de los tres maíces analizados se presentaron sólo derivados de pelargonidina, en tanto que en el tercero los derivados provinieron de cianidina, malvidina, y un aglicón desconocido.

El color de grano, evaluado mediante los parámetros "Hunter", mostró que tanto en los maíces de grano azul como en los rojos están presentes los tintes rojo y amarillo. Sin embargo, el rojo es dominante en estos últimos, en los que se presentan derivados de pelargonidina, mismos que no están presentes en los maíces de grano azul.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bustillos E., P. 1997.** Cuantificación y elucidación estructural de compuestos pigmentados presentes en maíces criollos azul y rojo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua., México. 101 p.
- Caldwell, E.E.O. and P. A. Peterson. 1992.** HPLC Identification of anthocyanins in maize endosperm. Maize Genetics Cooperation New Letters 66:2
- Coe, E. H. 1955.** Anthocyanin synthesis in maize, the interaction of  $A_2$  and Pr in leucoanthocyanin accumulation. Genetics 40:568 (Abstracts)
- Dooner, H.K. and T.P. Robbins. 1991.** Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. Annu. Rev. Genet. 25:173-199
- Dougall, D.K., D.C. Baker, E. Gakh, and M. Redus. 1997.** Biosynthesis and stability of monoacylated anthocyanins. Food Technology 15(11):69-71
- Harborne, J.B. 1967.** The Anthocyanin pigments. In: Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press. New York, London. 383 p.
- Harborne, J.B. and G. Gabazzi. 1969.** Effect of Pr and alleles on anthocyanin biosynthesis in *Zea mays L.* Phytochemistry. 8:99-101.
- Harborne, J.B. 1984.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Ed. Chapman and Hall. 285 p.
- Harborne, J.B., and R. Self. 1987.** Malonated cyanidin 3-glucosides in *Zea mays* and other grasses. Phytochemistry, 26(8):2417-2418
- Hernández X., E. y Alanís, F.G. 1970.** Estudio morfológico de cinco nuevas razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México. Implicaciones fitogenéticas y fitogeográficas. Agrociencia 5 (1):3-30
- Holton, T.A. and E.C. Cornish. 1995.** Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7:1071-1083
- Strack, D. and V. Wray. 1989.** Anthocyanins. En: Methods in plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics. H.B. Harborne (ed.) Academic Press. pp:325-356
- Straus, J. 1959.** Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue culture I: Identity of the pigments and general factors. Plant Physiology. pp. 536-540.
- Styles, E.D. and O. Ceska. 1972.** Flavonoid pigments in genetic strains of maize. Phytochemistry. 11:3019-3021.
- Wellhausen, E.J., L.M. Roberts., E. Hernández X. y P.C. Mangelsdorf. 1951.** Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. En: Xolocotzia. Obras de Efraím Hernández Xolocotzi. Revista de Geografía Agrícola. Tomo II. Universidad Autónoma Chapingo. 356 p.