

# COMPOSICIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS DE CINCO FENOTIPOS DE MAÍZ COLOREADO (*Zea mays* L.) DE LA REGIÓN CENTRAL COLOMBIANA<sup>a</sup>

## MONOMERIC ANTHOCYANIN COMPOSITION OF FIVE PHENOTYPES OF COLORED CORN (*Zea mays*) FROM CENTRAL REGION OF COLOMBIA

ROBERTO QUIÑONES<sup>b</sup>, ERICSSON COY-BARRERA<sup>a\*</sup>

Recibido 24-03-2015, aceptado 29-05-2015, versión final 08-06-2015.

Artículo Investigación

**RESUMEN:** Colombia cuenta con variedades nativas de maíz (*Zea mays* L.) que lentamente se han ido perdiendo, a pesar de su interés potencial para programas de mejoramiento genético y uso nutracéutico. En Colombia, el maíz coloreado es poco conocido y escasamente aprovechado, el cual si ha sido investigado en otros países. Como parte de nuestros estudios del aprovechamiento de materiales vegetales nativos, cinco accesiones locales de maíz coloreado, provenientes de la región cundiboyacense colombiana, fueron recuperadas y cultivadas en condiciones agroecológicas. Se caracterizaron los extractos metanólicos obtenidos de sus granos, evaluando el contenido de antocianinas totales y la capacidad captadora de radicales DPPH<sup>•</sup>, cuyos valores estuvieron entre 21-168 mg eq cianidina 3-glucósido/kg grano seco y 195-412  $\mu$ M Trolox/g grano seco, respectivamente. Se determinaron los perfiles de antocianinas de cada fenotipo mediante HPLC-DAD-MS. Se identificaron tentativamente nueve antocianinas, cuatro de ellas presentes en todos los fenotipos. Tales perfiles permitieron realizar una discriminación de los cinco fenotipos a partir de análisis multivariado. La información estructural se apoyó en el aislamiento y elucidación de cuatro de las antocianinas a partir del extracto enriquecido del fenotipo púrpura.

**PALABRAS CLAVE:** Antocianinas, captura de radicales libres, HPLC, maíz coloreado, *Zea mays*.

**ABSTRACT:** Colored corn is little known and poorly exploited in Colombia. Colombia has native corn varieties that are being slowly lost on spite of its relevance in breeding programs. As part of our research focused on native plants, five local landraces of colored corn from central Colombia were collected and cultivated under agroecological conditions. The grain were extracted with metanol and analyzed for total anthocyanins and DPPH<sup>•</sup> radical-scavenging capacity, whose values were between 21-168 mg eq C3G/kg dry grain and

<sup>a</sup>Quiñones, R. & Coy-Barrera, E. (2015). Composición de antocianinas monoméricas de cinco fenotipos de maíz coloreado (*Zea mays*) de la región central colombiana. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 4(1), 38–51. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v4n1.49822>

<sup>b</sup>Grupo InQuiBio, Laboratorio de Química Bioorgánica, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, AA49300.

\*[inquibio@unimilitar.edu.co](mailto:inquibio@unimilitar.edu.co)

195- 412  $\mu\text{M}$  Trolox/g dry grain, respectively. The anthocyanin profiles of the different accessions were determined by HPLC-DAD-MS on Amberlite-enriched fractions. Nine anthocyanins were tentatively identified in the samples. Four anthocyanins occurred in all phenotypes. The anthocyanin profiles allowed a preliminary discrimination of the five phenotypes by multivariate analysis. Structural information was supported on the isolation and elucidation of four anthocyanins from the purple phenotype-derived extract.

**KEYWORDS:** Anthocyanins, colored corn, HPLC, radical scavenging, *Zea mays*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son compuestos de origen natural presentes en una amplia variedad de plantas, frutas, hortalizas y cereales que son de un extenso interés para la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia. Este interés se debe principalmente a dos razones: 1) por las cualidades como colorantes (dada su interesante gama de colores que van desde el rojo hasta el azul), y 2) por sus propiedades antioxidantes debido a la presencia usual de unidades fenólicas (Garzón, 2008). Este tipo de metabolitos pertenecen al grupo de los flavonoides, por lo tanto poseen una estructura básica conjugada C6-C3-C6, la cual conforma una antocianidina (su forma aglicona), que consta principalmente de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo aromático, usualmente fenólico. Tal antocianidina a su vez se encuentra unida por enlaces glicosídicos a azúcares (mono-, di- o tri-sacáridos), especialmente en las posiciones 3 y 5 (Castañeda, 2009).

Una fuente importante e interesante de antocianinas son los fenotipos coloreados de la especie *Zea mays* L., los cuales han sido muy estudiados en los últimos años, especialmente aquellas variedades que presentan coloración púrpura. Estos estudios se han enfocado a la determinación del contenido antocianínico, la actividad antioxidante, la producción tecnificada de las variedades y el aprovechamiento de sus beneficios en el consumo humano, entre otros (He & Giusti, 2010). Países latinoamericanos como Perú, México y Bolivia ya presentan una apreciable trayectoria en el estudio y aprovechamiento de especies nativas coloreadas; y en otros países como China y Turquía, donde se ha introducido el maíz coloreado, también se han realizado varias investigaciones al respecto (Yang & Zhai, 2010; Cuevas, 2011).

Colombia es uno de los pequeños productores de maíz a nivel mundial, cuya producción mayoritaria se basa en la forma tradicional y, en menor proporción, en forma tecnificada, centrándose especialmente en dos tipos de maíz, el blanco y el amarillo, del cual se encuentran diversas variedades dependiendo el lugar de cultivo (DANE, 2004). Sin embargo, aunque también se producen variedades de maíz coloreado, con pigmentación púrpura, roja, café y azul, éstas son muy poco conocidas por los consumidores y, por consiguiente, son excesivamente escasos los estudios referentes a las variedades de maíz coloreado en Colombia y, más aún, de aquellas variedades propias. Es tan así la situación que ni siquiera se cuenta con registros de estudios previos de maíz coloreado provenientes

de la región cundiboyacense.

Por lo tanto, este estudio está enfocado a contribuir a la caracterización química de cinco fenotipos de maíz coloreado cultivados y procesados en el altiplano cundiboyacense, con énfasis en la cuantificación de antocianinas totales, la caracterización preliminar de sus propiedades de captura de radicales y el análisis cromatográfico de su composición antociánica, con el ánimo de aportar a la divulgación de la existencia de tales fenotipos de maíz.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestreo y clasificación

Cinco muestras de granos de variedades locales de maíz (donados por pequeños agricultores de la región Sabana Centro) fueron cultivadas bajo gestión agroecológica (i.e., fertilización orgánica y sin el uso de pesticidas, fertilizantes químicos o el uso de productos agrícolas sintéticos, en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con dos repeticiones), en el predio de cultivo experimental del Campus de la Universidad Militar Nueva Granada. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Política Nacional de Gestión Integral de la Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos (SIAC, 2012). Las muestras de grano (*ca.* 50 granos) se recogieron de plantas individuales, entre el cuarto y séptimo día después de surgir, e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Luego las muestras se liofilizaron y se almacenaron a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. El muestreo se repitió el mismo día durante cuatro semanas (lunes, 10 a.m.), lo que quiere decir que se obtuvieron cuatro muestras por fenotipo. La Tabla 1 muestra las principales características de los fenotipos, como el tipo de grano, y el color del grano. De esta manera, estas cinco variedades locales de maíz fueron codificadas de acuerdo a sus características.

Tabla 1: Clasificación de los fenotipos de maíz coloreado cultivados

Código del fenotipo	Tipo de grano	Accesión	Color aparente del grano
FtZm-1	Harinoso	local	Rojo
FtZm-2	Harinoso	local	Rojo jaspeado
FtZm-3	Dentado	local	Púrpura
FtZm-4	Dentado	local	Púrpura jaspeado
FtZm-5	Dentado y duro	local	Púrpura punteado

### 2.2. Extracción

Se tomaron 50 granos secos de cada muestra (5 fenotipos, 4 muestreos, i.e.,  $n = 20$ ) y se molieron empleando un molino de cuchillas. Las muestras se almacenaron en frascos ámbar a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de ser usadas. De cada muestra fueron extraídos 5 g con ácido fórmico al 0.5% en metanol (30 mL)

en un erlenmeyer de 50 mL. La mezcla fue sometida a tres ciclos sucesivos de sonicación (10 mL del extractor, 5 minutos c/u) en un equipo Elmasonic S30H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemania). La mezcla resultante se concentró a presión reducida (a menos de 30°C) hasta sequedad, en un rotaevaporador IKA Digital 10.

### 2.3. Contenido de antocianinas totales (CAT)

Se determinó el contenido total de antocianinas (CAT) de cada uno de los 20 extractos crudos, empleando el método de pH diferencial (Lee et al, 2005). A una alícuota de 1500  $\mu\text{L}$  de cada extracto se adicionó 1500  $\mu\text{L}$  de buffer a pH 1 (0.025M de cloruro de potasio). Por otro lado, se tomaron 1500  $\mu\text{L}$  de cada extracto y se adicionaron 1500  $\mu\text{L}$  de buffer a pH 4.5 (0.4 M de acetato de sodio). Se midió la absorbancia a 520 y 700 nm para ambas mezclas resultantes. La absorbancia corregida (A) para antocianinas totales simples se obtuvo a partir de  $A = (A_{520} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5}$ . El contenido total de antocianinas (expresada como mg de cianidina 3-glucósido/kg grano seco) se determinó mediante:

$$CAT \left( \frac{mg}{kg} \right) = \left( \frac{A}{\epsilon L} \right) * (PM) * (D) * \left( \frac{V}{M} \right). \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia corregida,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar para cianidina 3-glucósido (26900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), L es la longitud de paso de la celda (1 cm), PM es el peso molecular de la antocianina (449.2 g/mol), D es el factor de dilución, V es el volumen final (L), y M es la masa del grano seco (kg).

### 2.4. Determinación de la capacidad captadora de radicales DPPH•

La capacidad captadora de radicales libres se determinó para cada extracto crudo siguiendo la metodología reportada por Bernal et al. (2013). Se preparó una disolución 0.1 mM de DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo) en etanol. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del extracto, con su apropiada dilución, y se adicionó a 1900  $\mu\text{L}$  de disolución de DPPH•. La decoloración se midió a 517 nm por triplicado después de 30 min de incubación en la oscuridad. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La capacidad antioxidante se expresó en  $\mu\text{M}$  Trolox/g grano seco.

### 2.5. Obtención de la fracción enriquecida en antocianinas (FEA) a partir de FtZm-3

Para cada uno de los 20 extractos crudos, 300 mg del extracto crudo seco fueron redissueltos en ácido fórmico al 0,5 % en metanol. La disolución se enriqueció en antocianinas mediante adsorción en una columna de amberlita XAD-7, eluyendo primero con ácido fórmico al 1 % en agua (para eliminar otros componentes) y luego ácido fórmico al 1 % en metanol (para eluir los pigmentos

retenidos en la resina). Esta segunda fracción, enriquecida en antocianinas (FEA), se concentró en rotaevaporador (30°C) y se almacenó a -18°C para su posterior análisis.

## 2.6. Análisis de antocianinas por CLAE-DAD-EM

El análisis cromatográfico se realizó para cada uno de los extractos enriquecidos en antocianinas en un sistema UFLC Shimadzu Prominence (Shimadzu Corp., Japón) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) y un detector de masas (DM) con analizador cuadrupolar. El análisis se realizó con una columna Shimadzu premier C-18 (150 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m). La detección de antocianinas se realizó a 520 nm a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. La temperatura de funcionamiento fue de 30 °C y el volumen de inyección de 5  $\mu$ L. La fuente de electrospray del DM fue operada en modo positivo (en scan en el rango de 100 - 1000 m/z). La temperatura de la CDL de 250°C y el voltaje del detector fue de 1.2 kV. El flujo de gas de nebulización fue de 1.5 L/min y el flujo del gas de secado fue de 9.0 L/min, obtenido a partir de un generador de nitrógeno. Para el desarrollo del método se utilizó como fase móvil A una disolución de acetonitrilo(ACN):ácido fórmico:agua 3:10:87(v/v/v), y como fase móvil B una disolución de acetonitrilo:ácido fórmico:agua 50:10:40 (v/v/v), en gradiente de elución (6-20 %B 0-15 min; 20-50 %B 15-25 min; 50-80 %B 25-30 min; 80-90 %B 30-32 min; 90-6 %B 32-40 min). La separación de antocianinas se llevó a cabo durante 40 min. La identificación tentativa de las antocianinas se realizó por el análisis de sus espectros de masas, sus espectros UV-Vis y los datos reportados en la literatura. Adicionalmente, el aislamiento de algunos de estos compuestos, permitió confirmar las estructuras propuestas.

## 2.7. Análisis estadístico

Los resultados de CAT y captura de radicales se compararon con sus réplicas utilizando las pruebas de ANOVA y TUKEY, para determinar si hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variables respuesta evaluadas. Se empleó el software estadístico R versión 2.15.2 (R-Project). Adicionalmente, los datos de los 20 perfiles cromatográficos se analizaron mediante estadística multivariada con fines de discriminación de los datos a través de Análisis de Componentes Principales, utilizando el software Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

## 2.8. Purificación de las antocianinas mayoritarias a partir de FtZm-3

200 mg del eluato en ácido fórmico al 1% en metanol, FEA (obtenido a partir del extracto de FtZm-3) se redisolvió en 2 mL de agua desionizada acidulada y se cargaron en una columna empacada con 425 g de Sephadex LH-20 (Sigma Chemical Co., EE.UU; 40 cm de largo x 4.0 cm de diámetro interno). La columna se eluyó con 400 mL de una mezcla de etanol al 25% y ácido fórmico al 1%, a un flujo de 1.2 mL/min. Las fracciones con similar perfil UV fueron reunidas obteniendo 3 fracciones, las cuales posteriormente se liofilizaron y se almacenaron a -18°C. Las antocianinas monoméricas mayoritarias fueron purificadas por HPLC a escala semi-preparativa (sistema UFLC

Prominence, Shimadzu Corp., Japón), utilizando una columna semi-preparativa Luna C18 (10.0 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m). 15 mg de las fracciones obtenidas por permeación en Sephadex LH-20 se disolvieron en ácido fórmico al 1% en agua para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Las muestras se pasaron a través de filtros de jeringa de teflón de 0.22  $\mu$ M, y el volumen de inyección varió de 0.5 mL a 2.0 mL, dependiendo de la fracción. La muestra se inyectó en la columna utilizando un automuestreador (SIL-10A) con un loop de 2 mL. Las condiciones optimizadas a escala semi-preparativa fueron adoptadas sobre la base de las condiciones a escala analítica. La fase móvil consistió de una disolución de acetonitrilo (ACN):ácido fórmico:agua 3:10:87 (v/v/v) (fase A), y una disolución de acetonitrilo:ácido fórmico:agua 50:10:40 (v/v/v) (fase B), en gradiente de elución (6-20 %B 0-15 min; 20-50 %B 15-25 min; 50-80 %B 25-30 min; 80-90 %B 30-32 min; 90-6 %B 32-40 min), a un flujo de 2 mL/min. La temperatura de la columna fue de 30°C y el análisis se monitoreó a una longitud de onda de 520 nm. Las fracciones colectadas fueron liofilizadas y almacenadas a -18°C para su posterior uso. De esta forma fueron purificadas las antocianinas 2 (5.3 mg), 3 (6.5 mg), 5 (2.8 mg) y 6 (2.1 mg), cuyas estructuras fueron confirmadas por el análisis de sus espectros RMN 1H y 13C (tomados en un espectrómetro Bruker Avance 500 (500 MHz 1H; 125 MHz 13C), en TFA-d/DMSO-d6 9:1, con TMS como referencia) y por comparación con datos reportados en la literatura.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas y capacidad captadora de radicales DPPH•

Como criterios de caracterización química con fines de diferenciación, los extractos metanólicos sin fraccionar fueron sometidos a cuantificación de antocianinas totales por el método de pH-diferencial y capacidad captadora de radicales DPPH• (Lee et al., 2005), cuyos resultados son mostrados en la Figura No 1. El fenotipo púrpura (FtZm-3) mostró los valores más altos de contenidos de antocianinas totales, mientras que el grano rojo (FtZm-1) fue el que exhibió la mayor capacidad de captura de radicales DPPH•. Esto concuerda con lo descrito en trabajos previos, donde se ha observado que el contenido de antocianinas en variedades moradas es mayor que en aquellas de color rojo (Mex-Alvarez et al., 2013). No obstante, el fenotipo rojo (cultivado en el presente trabajo) mostró una capacidad captadora de radicales significativamente más alta ( $p < 0.05$ ) que el fenotipo púrpura. Esto se debe a la presencia de otros componentes fenólicos que estarían aportando a esta capacidad (Žilić et al., 2012). Los fenotipos de color intenso (FtZm-1 y FtZm-3) mostraron valores significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) que aquellos fenotipos de coloración parcial (FtZm-2, FtZm-4 y FtZm-5). Así mismo, los granos de coloración parcial morada (FtZm-4 y FtZm-5), mostraron un comportamiento particular, pues sus contenidos de antocianinas fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Esto se debe a que el grano de tipo punteado (FtZm-5) presenta pigmentación también en el endospermo, a diferencia del jaspeado (FtZm-5) que solo lo presenta en el pericarpio.

En términos generales, los valores de CAT están en concordancia con estudios previos, así como los valores de capacidad captadora de radicales, cuando los granos fueron sometidos a extracción con metanol acidificado, como es el caso de las genotipos azules y rojos cultivados en Serbia, Brasil, Corea y China (Žilić et al., 2012; Kuhnen et al., 2011; Ku et al., 2014; Hu y Xu, 2011). En el cultivar de color morado de origen peruano, luego de varias condiciones de extracción realizadas sobre la coronta (tusa), se encontraron valores mucho mayores de CAT (entre 11.5-37.1 mg eq C3G/100 g de coronta seca) (Gorriti-Gutierrez et al., 2009). Aunque el trabajo se centró en la coronta y no en el grano, este estudio permite apreciar que el método de extracción es un parámetro que afecta sensiblemente el rendimiento en las antocianinas extraídas. Un ejemplo de tal caso es el estudio de las variedades nativas de coloración roja (chac chop) y morada (x malay), similares a los fenotipos FtZm-1 y -3, cultivados por campesinos locales del estado de Campeche, en México, donde se obtuvieron valores mayores de CAT (111 y 410 mg eq C3G/ 100 g de harina, respectivamente), cuando se realizó la extracción con etanol al 70 % (Mex-Alvarez et al., 2013), o los fenotipos Ver 42 (de color morado) y rojo de origen mexicano, que presentaron notables valores de CAT (325 y 82 mg eq C3G/ 100 g de material, respectivamente) bajo extracción con etanol al 96 % (Lopez-Martinez et al., 2001). Por tanto, el hecho de extraer con metanol acidulado puede explicar estas diferencias.

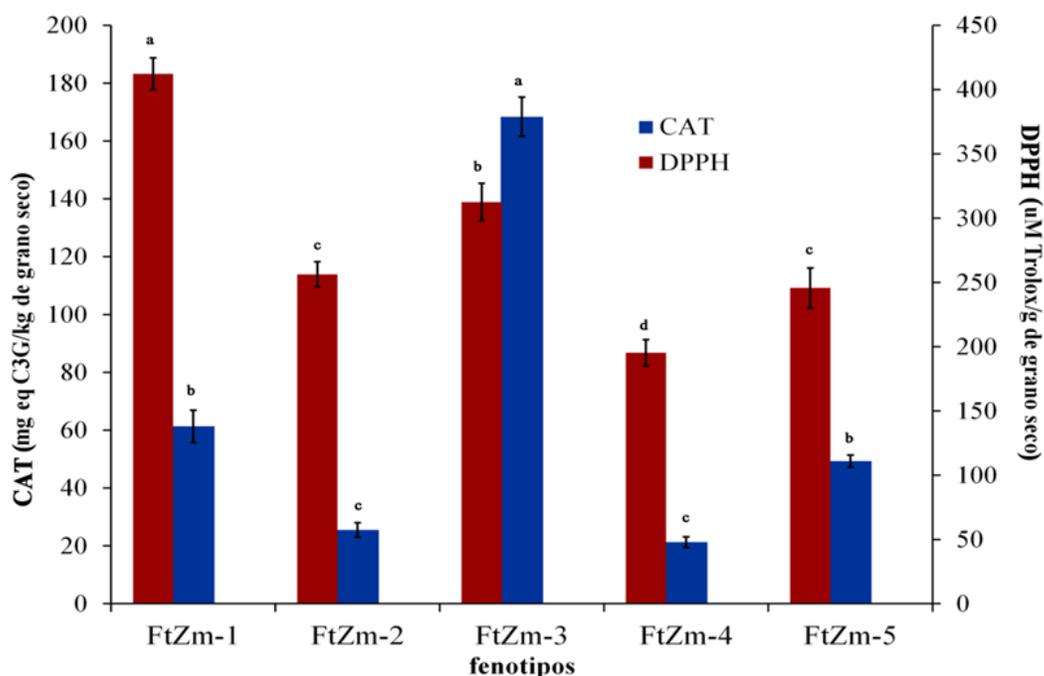


Figura 1: Contenido de antocianinas totales, CAT, (expresados como mg equivalentes a cianidina 3-glucósido (C3G) por kg de grano seco) y capacidad captadora de radicales DPPH\* (expresados como  $\mu\text{M}$  de Trolox por gramo de grano seco) para los extractos sin fraccionar provenientes de los cinco fenotipos de maíz coloreado (FtZm-1 a -5). Valores expresados como el promedio de tres réplicas  $\pm$  intervalo de confianza. Para cada variable, los valores con la misma letra indica que no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

### 3.2. Perfiles cromatográficos de las fracciones enriquecidas en antocianinas

Una vez fraccionados los extractos a través de la columna empacada con la resina Amberlita XAD-7, las fracciones enriquecidas en antocianinas fueron analizadas por HPLC-DAD-ESI-MS, cuyos perfiles cromatográficos (detección a 520 nm) se presentan en la Figura 2. El enriquecimiento de antocianinas con la resina permitió una refinación importante en las fracciones resultantes, dado que los compuestos presentes corresponden únicamente a antocianinas (detectados a 520 nm), ya que bajo monitoreo a otras longitudes de onda, no se observaron otros compuestos (datos no mostrados). Los perfiles de las cinco variedades presentaron sensibles diferencias entre sí, sobretodo, y como era de esperarse, entre las variedades rojas y púrpuras. Los compuestos mayoritarios (1-9), identificados tentativamente por medio del análisis de sus espectros de masas ( $M^+$ ) y UV-Vis, son mostrados en la Tabla 2.

Los compuestos identificados en estos fenotipos cultivados coinciden con los informados en trabajos previos realizados sobre maíces coloreados (Žilić et al., 2012; Pascual-Teresa et al., 2002; Liu et al., 2012; Salinas-Moreno et al., 2005), cuyas agliconas se basaron en las antocianidinas peonidina, pelargonidina y cianidina. La antocianina cianidina 3-(6"-malonil)-glucósido (3) fue el pigmento mayoritario en todas las fracciones como ha sido reportado en otros trabajos con maíz coloreado (Salinas-Moreno et al., 2005). No obstante, en otros trabajos se ha encontrado que la antocianina cianidina 3-glucósido (1) también puede presentarse como el componente mayoritario en los granos de maíz coloreado, especialmente aquel de color morado (Pascual-Teresa et al., 2002). En el presente trabajo, el compuesto 1 se encontró también presente en todos los extractos enriquecidos, sin ser el mayoritario.

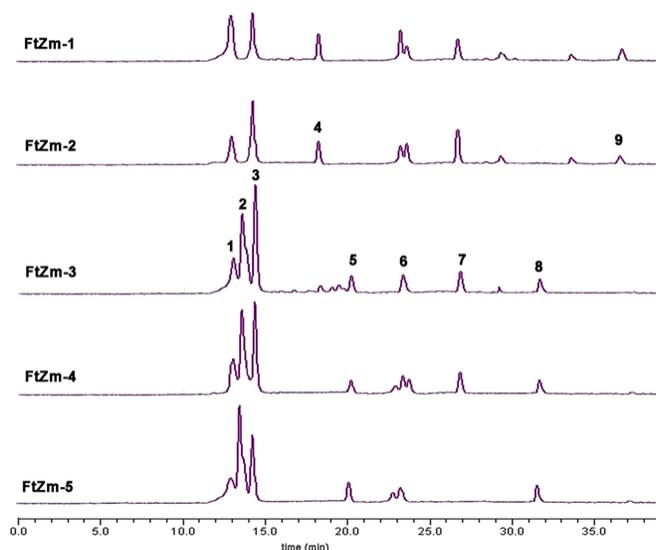


Figura 2: Perfiles cromatográficos (monitoreados a 520 nm) de los extractos enriquecidos en antocianinas monoméricas (fracción enriquecida en Amberlita XAD-7) de los cinco fenotipos de maíz coloreado de Colombia. Los números corresponden a las antocianinas identificadas (ver Tabla 2).

Entre los fenotipos de color rojo (FtZm-1 y FtZm-2) y de color púrpura (FtZm-3, FtZm-4 y FtZm-5) se encontró que los compuestos 1, 3, y 6-7 eran comunes para todos, mientras que los compuestos 2, 5 y 8 fueron exclusivos de los fenotipos púrpura y los compuestos 4 y 9 se presentaron únicamente en los rojos. Estas diferencias se basaron principalmente en el tipo de aglicona, ya que los compuestos preferentes en los fenotipos rojos mostraron la presencia de antocianinas con aglicona tipo peonidina (4,9) y los púrpura la presencia de pelargonidina (5,8), excepto el compuesto 6, que estuvo presente en todos los fenotipos. Los demás compuestos exhibieron la cianidina como la aglicona común en las fracciones enriquecidas en antocianinas de maíz coloreado (Liu et al., 2012).

Con el fin de discriminar los fenotipos a partir de la composición en las fracciones enriquecidas en antocianinas, los 20 perfiles cromatográficos obtenidos (con detección a 520 nm) fueron exportados a formato ASCII, para ser utilizados como variables de entrada para realizar un análisis multivariado por componentes principales. Con la información de los perfiles de las cinco variedades con sus cuatro réplicas en el tiempo, se construyó una matriz de dos vías (20 x 4052). El análisis se realizó en el programa Minitab® 16.0 (Minitab Inc.) con el algoritmo para Análisis de Componentes Principales (ACP) incluido en el software. El diagrama de dispersión CP1 (primer componente) vs CP2 (segundo componente) es mostrado en la Figura 3. Estos dos primeros componentes explicaron el 92.1% de los datos, por lo que no se hizo necesario utilizar componentes adicionales.

Tabla 2: Antocianinas monoméricas identificadas tentativamente en las fracciones enriquecidas de los fenotipos de maíz

N°	Antocianina	$\lambda_{\max}$ (nm)	$t_R$ (min)	$[M]^+$ (m/z)	Fragmentos (m/z)
1	cianidina 3-glucósido	518, 282	13.03	449	287
2 <sup>a</sup>	cianidina 3-rutinósido	518, 281	14.47	595	287
3 <sup>a</sup>	cianidina 3-(6"-malonil)-glucósido	517, 281	13.60	535	287, 449
4	peonidina 3-glucósido	518, 282	17.12	463	301
5 <sup>a</sup>	pelargonidina 3-(6"-malonil)-glucósido	502, 440, 278	23.44	519	271, 433
6 <sup>a</sup>	peonidina 3-(6"-malonil)-glucósido	518, 281	20.33	549	301, 463
7	cianidina 3-(6"-etilmalonil)-glucósido	518, 282	26.90	563	287, 449
8	pelargonidina 3-(6"-etilmalonil)-glucósido	502, 441, 278	31.77	547	271, 433
9	peonidina 3-(6"-etilmalonil)-glucósido	518, 281	36.71	577	301, 463

<sup>a</sup>Estructuras confirmadas por análisis de RMN a partir de sus aislados.

Dada la distribución de las observaciones en el diagrama de dispersión es posible apreciar que los dos componentes principales influyen en la separación de las 20 muestras, pues una dirección internodal se observa desde el cuadrante IV hacia el II, partiendo del fenotipo FtZm-3 hasta los fenotipos rojos (FtZm-1 y -2), discriminándolos en 3 grupos. En este análisis no se encontró discriminación entre las repeticiones de cada fenotipo, lo que indicó dos escenarios: 1) que no

hubo una variación apreciable en la composición de antocianinas entre las muestras colectadas cada semana y, 2) que el proceso de enriquecimiento en antocianinas con Amberlita XAD-7 fue realizado adecuadamente. Esta discriminación también permitió agrupar los fenotipos rojos en el grupo 1, los fenotipos parcialmente morados en el segundo y el fenotipo morado como el grupo 3. Lo anterior indica que la composición de las fracciones enriquecidas en antocianinas podría servir como un parámetro importante de distinción de fenotipos de maíz coloreado. En un estudio previo realizado con genotipos de maíz coloreados y no coloreados provenientes de Corea, se encontró una muy buena discriminación de los extractos al correlacionar variables de cuantificación (fenoles, antocianinas, flavonoides y carotenoides totales) y de capacidad antioxidante (ABTS<sup>+</sup> y FRAP), separando los genotipos no coloreados de los coloreados a partir del diagrama de los tres primeros componentes. Sin embargo, la discriminación, aunque fue razonable, no fue del todo certera por tratarse de variables globales y no holísticas como lo es un perfil cromatográfico.

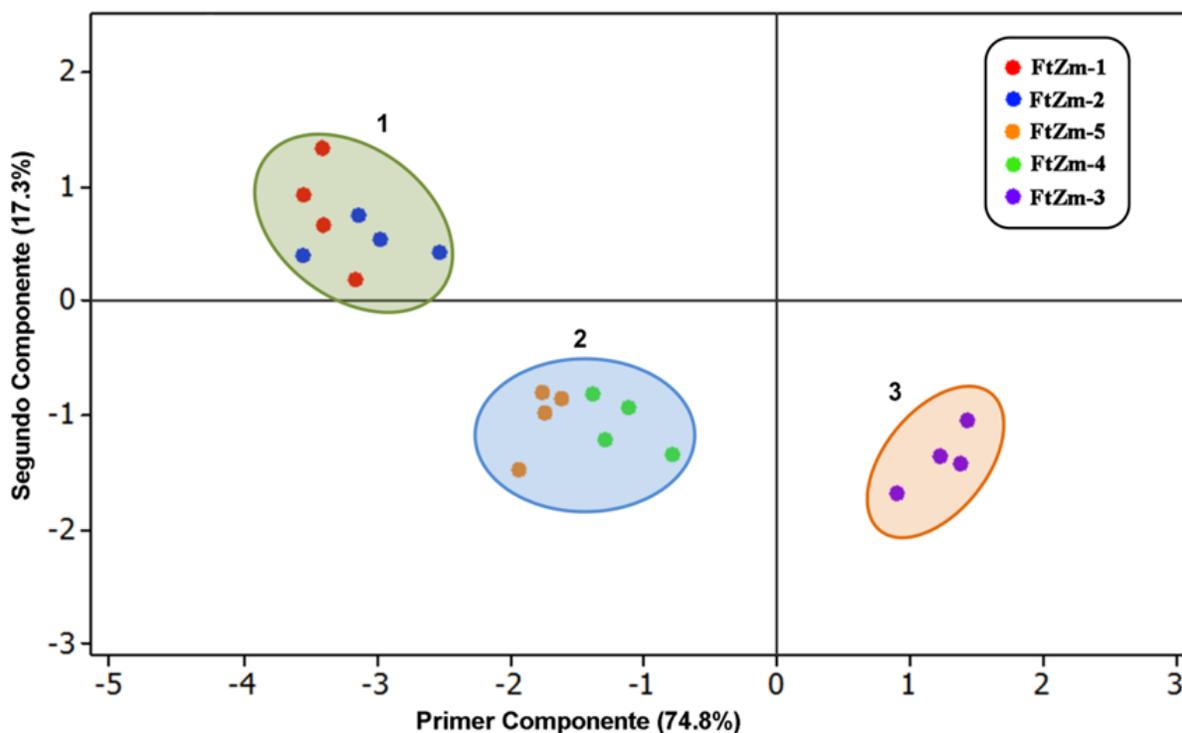


Figura 3: Diagrama de dispersión CP1 vs CP2 sobre los datos de los perfiles cromatográficos (520 nm) para las veinte muestras de maíz coloreados (5 fenotipos, cada uno con cuatro réplicas).

### 3.3. Antocianinas monoméricas aisladas a partir del grano del fenotipo FtZm-3

Teniendo en cuenta que la fracción enriquecida en antocianinas provenientes del extracto del fenotipo púrpura presentó el mayor contenido de antocianinas y un perfil con el mayor número de antocianinas, éste se enriqueció en antocianinas por cromatografía de permeación en Sephadex LH-20 y se purificó posteriormente por cromatografía líquida en fase reversa a escala semipreparativa. Bajo las condiciones de purificación por HPLC, las antocianinas 2, 3, 5 y 6 fueron aisladas, cuyas estructuras son mostradas en la Figura 4. La identificación estructural fue corroborada por RMN ( $H^1$ ) y ( $C^{13}$ ) bajo comparación con datos reportados en literatura. Los compuestos fueron identificados como cianidina 3-O-rutinósido (2) (Tulio et al., 2008); cianidina 3-O-(6''-O-malonil)-glucopiranosido (3) (Bridle et al., 1984), pelargonidina 3-O-(6''-O-malonil)-glucopiranosido (5) (Toki et al., 1995), y peonidina 3-O-(6''-O-malonil)-glucopiranosido (6) (Fossen et al., 2001). Aunque ya ha sido identificada en un trabajo previo (Žilić et al., 2012), esta es la primera vez que la antocianina cianidina 3-O-rutinósido es aislada de granos de maíz de color púrpura, mientras que las demás antocianinas ya han sido aisladas de otras fuentes de maíz.

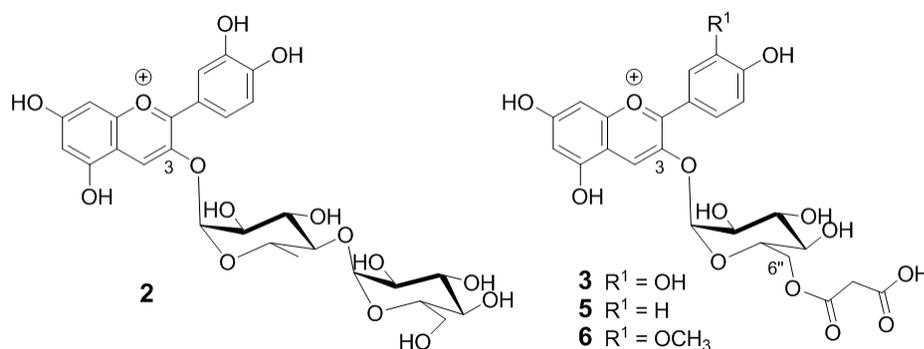


Figura 4: Estructura de las antocianinas aisladas de granos del fenotipo FtZm-3 de *Zea mays* cultivado en Colombia.

## 4. CONCLUSIONES

El presente estudio corresponde al primer trabajo en Colombia dirigido a determinar la composición de antocianinas de cinco fenotipos de maíz coloreado. Tales fenotipos fueron cultivados a partir de semillas de variedades nativas con el fin de promover y dar a conocer estas variedades en nuestro país. Así mismo, como parámetro quimioprospectivo enfocado a proporcionar información sobre valor agregado a estos materiales, el análisis de la composición de antocianinas monoméricas y de capacidad captadora de radicales de 20 extractos crudos de los cinco fenotipos permitió su adecuada caracterización química y diferenciación. Los maíces de color homogéneo fueron aquellos

con mejores valores cuantitativos, lo cual es correlacionable con su pigmentación. Así mismo, el protocolo utilizado para el fraccionamiento de los extractos permitió obtener perfiles antociánicos definidos, razonablemente depurados y diferenciables estadísticamente, por lo que podrían tomarse como huellas digitales para propósitos de futuras evaluaciones de calidad. Esta depuración sirvió además de base para el aislamiento de cuatro antocianinas conocidas como base de confirmación de la identificación de los compuestos. Por lo tanto, el protocolo aquí presentado podría ser utilizado en futuros estudios de caracterización de variedades nativas adicionales, las cuales requieren de pronta divulgación con miras a su protección en planes de conservación de germoplasma.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación. Producto derivado del proyecto *CIAS-939* financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la UMNG - Vigencia 2012.

## Referencias

- Bernal, F.; Cuca, L.; Yamaguchi, L. & Coy, E. (2013), LC-DAD-UV and LC-ESI-MS-based analyses, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of a polar fraction from *Iryanthera ulei* Leaves. *Records of Natural Products*, 7, 152-156.
- Bridle, P.; Loeffler, R.S.T.; Timberlake, C.F. & Self, R. (1984), Cyanidin 3-malonylglucoside in *Cichorium intybus*. *A review. Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Castañeda, A.; Pacheco, M.; Páez M.; Rodríguez, J. & Galán, C. (2009), Chemical studies of anthocyanins. *Phytochemistry*, 23, 2968-2969.
- Cuevas, E.; Hillebrand, S.; Antezana, A. & Winterhalter, P. (2011), Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7068-7074.
- DANE.(2004), Documento Maíz Tecnificado en Colombia. [En línea]. 1-13. [Consultada en Enero de 2015]. Disponible en: [http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/maiz\\_tecnificado.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/maiz_tecnificado.pdf).
- Fossen, T.; Slimestad, R. & Andersen, O.M. (2001), Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *A Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2318-2321.
- Garzón G. (2008), Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.

- Gorriti-Gutiérrez, A.; Arroyo-Acevedo, J.; Negron-Ballarte, L.; Jurado-Teixeira, B.; Purizaca-Llajaruna, H.; Santiago-Aquise, I.; Taype-Espinoza, E. & Quispe-Jacobo, F. (2009), Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 509-518.
- He, J. & Giusti, M.M. (2010), Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-87.
- Hu, Q.P. & Xu, J.G. (2011), Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2026-2033.
- Ku, K.M.; Kim, H.S.; Kim, S.K. & Kang, Y.H. (2014), Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1548-1553.
- Kuhnen, S.; Lemos, P.M.M.; Campestrini, L.H.; Ogliari, J.B.; Dias, P.F. & Maraschin, M. (2011), Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2026-2033.
- Lee, J.; Durst, R. & Wrolstad, R. (2005), Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 88, 1269-1278.
- Liu, G.-L.; Guo, H.-H. & Sun, Y.-M. (2012), Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and identification of anthocyanins in the extract using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6292-6302.
- Lopez-Martinez, L.X.; Parkin, K.L. & Garcia, H.S. (2001), 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 for Human Nutrition*, 66, 41-47.
- Mex-Alvarez, R.M.J.; Bolívar-Fernández, N.J.; Garma-Quen, P.M.; Tut-Heredia, J.A. & Romero-Guillén, K.I. (2013), Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12, 558-571.
- Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2002), LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1003-1006.

- Salinas-Moreno, Y.; Salas-Sánchez, G.; Rubio-Hernández, D. & Ramos-Lobato, N. (2005), Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 483-487.
- SIAC. (2012), Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos. [En línea]. 1-134. [Consultada en Marzo de 2015]. Disponible en: [https://www.siac.gov.co/documentos/DOC\\_Portal/DOC\\_Biodiversidad/010812\\_PNGIBSE\\_2012.pdf](https://www.siac.gov.co/documentos/DOC_Portal/DOC_Biodiversidad/010812_PNGIBSE_2012.pdf)
- Toki, K.; Saito, N.; Kuwano, H.; Shigihara, A. & Honda, T. (1995), *Acylated pelargonidin 3,7-glycosides from pink flowers of Senecio cruentus*. *Phytochemistry*, 38, 1509-1512.
- Tulio, A.Z.; Reese, R.N.; Wyzgoski, F.J.; Rinaldi, P.L.; Fu, R.; Scheerens, J.C. & Miller, AR. (2008), Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1880-1888.
- Yang, Z. & Zhai, W. (2010), Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 11, 169-176.
- Žilić, S.; Serpen, A.; Akilloğılı, G.; Gökmen, V. & Vančetović, J. (2012), Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1224-1231.