



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES EN GERMINADOS
DE MAÍCES PIGMENTADOS (*Zea mays* L.).

TESIS

Qué como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

Carlos Vidal Carreño Carrillo

BAJO LA SUPERVISIÓN DE:

Dr. Clemente Villanueva Verduzco

Chapingo, Texcoco, Edo. De México, mayo del 2020.



APROBADA



Instituto de Horticultura

**METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES EN GERMINADOS
DE MAÍCES PIGMENTADOS (*Zea mays* L.).**

Tesis realizada por Carlos Vidal Carreño Carrillo bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTOR:



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

ASESOR:



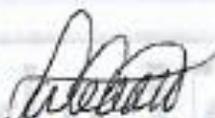
DR. ENRIQUE HERBERT PUCHETA

ASESOR:



DRA. EVERT VILLANUEVA SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	5
LISTA DE FIGURAS	7
AGRADECIMIENTOS	8
DATOS BIOGRÁFICOS	9
RESUMEN GENERAL	10
GENERAL ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
Planteamiento del problema.	13
Justificación	14
REVISIÓN DE LITERATURA	15
Radicales libres	15
Estrés oxidativo y su relación con enfermedades crónico-degenerativas	15
Sustancias bioactivas en las plantas y sus beneficios para la salud	17
Compuestos fenólicos en el maíz.....	17
Efecto de bajas temperaturas bajas en maíz	20
Genes involucrados en la síntesis de fenoles.....	20
Efecto de la luz y oscuridad en la síntesis de fenoles en germinados de maíz.....	21
Fenoles ligados y su biodisponibilidad en humanos	22
DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO Y PLATA COLOIDAL, EN EL CONTENIDO DE FENOLES DE MAÍZ ROJO Y AZUL	
RESUMEN.....	24
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUCCIÓN	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 Diseño experimental.....	26
Cuadro 1. Definición del diseño de tratamientos para la desinfección de semillas de maíz para germinados.....	27
2.2 Recolección del material vegetal y establecimiento del experimento	27
2.3 Lavado de semilla.....	27
2.4 Desinfección de semillas.....	28

2.5 Obtención de la harina	28
2.6 Extracción de fenoles	29
2.7 Cuantificación de fenoles libres	29
2.8 Germinación de semillas	30
2.9 Porcentaje de germinación	30
2.10 Porcentaje de incidencia de patógenos	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Porcentaje de germinación	32
3.2 Porcentaje de incidencia de patógenos	34
3.3 Cálculo de equivalentes de fenoles libres	36
3.4 Concentración de fenoles libres en germinados de maíz	37
4. CONCLUSIONES	40
5. LITERATURA CONSULTADA	42

TEMPERATURA Y TIEMPO DE GERMINACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES LIBRES EN GERMINADOS DE SEMILLA DE MAÍZ ROJO Y AZUL.

RESUMEN.....	44
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUCCIÓN	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.1 Diseño experimental	46
2.2 Análisis estadístico	47
2.3 Obtención del material vegetal y establecimiento del experimento	49
2.4 Lavado de semilla.....	49
2.5 Germinación de semillas	50
2.6 Liofilización de las muestras.....	50
2.7 Extracción de fenoles.....	50
2.8 Cuantificación de fenoles libres	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 Concentración de fenoles libres en germinados desarrollados a 25° y 30°C ...	53
3.2 Concentración de fenoles libres en germinados de maíz (10°C).....	56
4. CONCLUSIONES	60
5. LITERATURA CONSULTADA	61

METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES POR RMN EN GERMINADOS DE MAÍCES PIGMENTADOS

RESUMEN.....	62
ABSTRACT.....	62
1. INTRODUCCIÓN.....	63
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
2.1 Lavado de semillas.....	64
2.2 Germinación de semillas.....	64
2.3 Harinas de maíz.....	65
2.4. Extracción de compuestos fenólicos en metanol acuoso.....	65
2.5 Determinación de fenoles a dos valores de pH diferentes.....	65
2.6 Lectura de barrido UV-VIS espectrofotométrica.....	66
2.7 Resonancia magnética nuclear espectroscópica al estado líquido.....	66
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
3.1. Efecto del pH y temperatura sobre los cambios en A/ Δ A en los extractos de germinados de maíz azul y rojo.....	68
3.2. Perfil 1D - 1H NMR de germinados de maíz azul y rojo y dependencia de la solvatación al tiempo de brotación.....	71
3.3. 1D - { $^1H_{water_presat}$ NMR} perfiles de germinados de maíz azul y rojo.....	75
3.4. S/S ₀ =f (tiempo de germinación) como modelo para rastrear la producción fitoquímica durante la germinación.....	77
4. CONCLUSIONES.....	78
5. LITERATURA CONSULTADA.....	79
LITERATURA CONSULTADA GENERAL.....	81

LISTA DE CUADROS

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO Y PLATA COLOIDAL, EN EL CONTENIDO DE FENOLES DE MAÍZ ROJO Y AZUL

Cuadro 1. Definición del diseño de tratamientos para la desinfección de semillas de maíz para germinados.....	27
Cuadro 2. Composición de las reacciones para determinar fenoles en dos variedades de maíz.....	29

Cuadro 3. Concentraciones de ácido gálico usadas para elaborar la curva de calibración.....	30
Cuadro 4. Comparación de medias del porcentaje de germinación (PG), porcentaje de incidencia (PI) y concentración de fenoles libres (CFL) por color de grano de maíz. .	33
Cuadro 5. Comparación de medias entre tratamientos desinfectantes para PG y PI en germinados de maíz. .	35
Cuadro 6. Comparación de medias de la contenido de fenoles libres (CFL) en germinados de maíz para cada tratamiento desinfectante utilizado.....	38

TEMPERATURA Y TIEMPO DE GERMINACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES LIBRES EN GERMINADOS DE SEMILLA DE MAÍZ ROJO Y AZUL.

Cuadro 1. Definición de diseño de tratamientos con arreglo factorial.	47
Cuadro 2. Concentraciones de ácido gálico usadas para elaborar la curva de calibración.....	51
Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de fenoles libres (CFL). Modelo 1, para germinados a 25 y 30°C.....	53
Cuadro 4. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) por color de grano de maíz y temperatura de germinación.....	54
Cuadro 5. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para días a cosecha de germinados de maíz (para 25° y 30°C).....	55
Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de fenoles libres (CFL). Modelo 2, para germinados a 10°C.....	56
Cuadro 7. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para germinados de maíz rojo y azul a 10°C.....	56
Cuadro 8. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para días a cosecha de germinados de maíz (a 10°C).....	58
Cuadro 9. Máximos acumulados de concentración de fenoles libres (CFL) a los 49 días de germinación (10°C) y a los 7 días de germinación (promedio de 25 y 30°C) para maíz rojo y azul.....	59

METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES POR RMN EN GERMINADOS DE MAÍCES PIGMENTADOS

Cuadro 1. Ancho de banda de resonancia de agua a media altura.	73
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO Y PLATA COLOIDAL, EN EL CONTENIDO DE FENOLES DE MAÍZ ROJO Y AZUL

Figura 1. Calidad y cantidad de raíces y pelos radicales en germinados de maíz. ..	32
Figura 2. Presencia de patógenos en germinados de maíz.	32
Figura 3. Curva de calibración del ácido gálico.	36

TEMPERATURA Y TIEMPO DE GERMINACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES LIBRES EN GERMINADOS DE SEMILLA DE MAÍZ ROJO Y AZUL.

Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico.....	52
--	----

METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES POR RMN EN GERMINADOS DE MAÍCES PIGMENTADOS

Figura 1. Barrido de absorbancias desde 300-800 nm	69
Figura 2 Barrido de absorbancias de la primera derivada (ΔA) desde 350-800 nm. .	70
Figura 3. Espectros 1D- ^1H y $^1\text{H}_{\text{water_presat}}$ NMR estándar	72
Figura 4. Espectros unidimensionales $\{^1\text{H}_{\text{water_presat}}$ NMR}.....	74
Figura 5 Evolución de la integración de la señal de RMN de protón.	76

Instituto de Horticultura

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a mi alma mater la Universidad Autónoma Chapingo, institución de enorme calidad, que me brindó todo el apoyo durante mi estancia en el programa.

Asimismo, agradezco a mi director de tesis, el Dr. Clemente Villanueva Verduzco, por sus conocimientos invaluable que me brindo para llevar a cabo esta investigación, y sobre todo su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin.

Agradezco al Dr. Enrique Herbert Pucheta por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida.

Por su orientación y atención a mis consultas agradezco a la Dra. Evert Villanueva Sánchez y al Dr. Jaime Sahagún Castellanos miembros de mi comité, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo y por el tiempo que dedicaron, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.

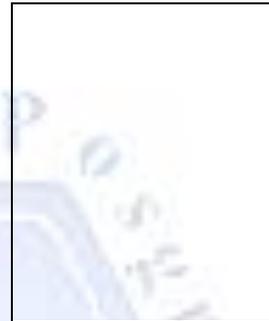
Gracias al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios Agroalimentarios y Forestales (LANISAF) por las atenciones y facilidades brindadas, así como la disposición y disponibilidad de espacios, material y equipos, en especial a la Dra. Rosa Elvira Sánchez Fernández por su asesoría, por su valiosa colaboración y aportación a este proyecto.

Sinceras gracias a la Dra. Erika Lagunes Fortiz y al M.C. Román Sánchez Carrillo del área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Fitotecnia por su disponibilidad, conocimientos y orientación, así como por el espacio y tiempo brindado.

Por último, agradezco profundamente a los profesores del programa de maestría que hacen posible el conocimiento en las aulas por su trato humano y su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudan a formarte como persona e investigador.

Instituto de Horticultura

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales:

Nombre: Carlos Vidal Carreño Carrillo
Fecha de nacimiento: 29 de octubre de 1993
Lugar de nacimiento: Texcoco de Mora, Estado de México, México.
No. de cartilla militar:
CURP: CACC931029HMCRRR06
Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia
Cédula Profesional: 11510388

Desarrollo Académico:

Preparatoria: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, UACH (2008-2011).
Licenciatura: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, UACH (2011-2015).

RESUMEN GENERAL

¹Metabólica de antioxidantes en germinados de maíces pigmentados (*Zea mays* L.).

La síntesis de fitoquímicos en plantas comienza durante la germinación de la semilla. Existe una correlación directa entre el consumo humano de alimentos con altas cantidades de compuestos fenólicos, con una reducción en el riesgo de padecer enfermedades crónicas y degenerativas, debido a su acción antioxidante. El maíz tiene una alta concentración de compuestos con actividad antioxidante. Sin embargo, estos compuestos bioactivos se encuentran ligados a pared celular ($\pm 85\%$), por lo que no todos son biodisponibles. Se analizó la metabólica de los fenoles libres acumulados durante la germinación en dos variedades nativas de maíz (grano rojo y azul) colectadas en Chilchotla, Puebla, México.

Con el propósito de encontrar las condiciones que promueven la mayor concentración de fenoles libres (CFL) en los germinados de maíz, primero se buscó un método de desinfección adecuado para la semilla, a base de hipoclorito de calcio (0.2% y 0.4%) y de plata coloidal (1.4 y 2.8 ppm) que eviten problemas de inocuidad en los germinados (incidencia de patógenos), no afecten la calidad fisiológica de la semilla ni la acumulación de fenoles libres. Luego, se cultivaron germinados en diferentes niveles de temperatura en su desarrollo (10°, 25° y 30°C), tiempo de siembra a cosecha (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días para 10°C, y 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días para 25° y 30°C) y variedades de maíz; y finalmente, se corrió el análisis metabólico a las muestras obtenidas del experimento factorial.

La plata coloidal a 1.4 ppm fue el mejor tratamiento de desinfección para maíz (PI=13.5%) sin afectar la calidad fisiológica de la semilla ni su metaboloma (PG=92.5% y CFL=246.905mg/100g de harina de germinado). La concentración de fenoles libres en los germinados de maíz azul (973.69 mg/100g de germinado) fue mayor que en los de maíz rojo (756.29 mg/100g de germinado), tras 7 días de crecimiento a una temperatura de 25°C.

Al seleccionar dos rangos de frecuencia de RMN conocidos asociados con fenoles y tocoferoles, hubo un sistemático incremento lineal (T=25°C) o modular (T=30°C) de S/SO en función de la temperatura y del tiempo después de la siembra (días), a su vez relacionado con una desintegración de LWHH inversa dependiente del tiempo de resonancia de agua que sugieren fuertemente la tasa y disponibilidad de producción de antioxidantes durante la producción de germinados.

PALABRAS CLAVE: Maíz, Fenoles, Tocoferoles, Antioxidantes, Biodisponible, Germinados, Huella dactilar metabólica, Resonancia Magnética Nuclear.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Carlos Vidal Carreño Carrillo

Director de tesis: Dr. Clemente Villanueva Verduzco

GENERAL ABSTRACT

1Metabolomics of antioxidants in pigmented corn sprouts (*Zea mays* L.).

Plant phytochemical synthesis begins during seed germination. There is a positive correlation between human consumption of food with high amounts of phenolic compounds, and reduction in the risk of chronic and degenerative diseases, due to its antioxidant action. Corn has a high concentration of compounds with antioxidant activity. However, these bioactive compounds are bounded to the cell wall (\pm 85%), so they are not all bioavailable. The metabolomics of free phenols accumulated during germination was analyzed in two native varieties of corn (red and blue grain) collected in Chilchotla, Puebla, Mexico.

In order to find the conditions that promote the highest concentration of free phenols (CFL) in corn sprouts, we first sought a suitable disinfection method for the seed, based on calcium hypochlorite (0.2% and 0.4%) and of colloidal silver (1.4 and 2.8 ppm) that avoid safety problems in sprouts (incidence of pathogens), do not affect the physiological quality of the seed or the accumulation of free phenols. Then, sprouts were grown at different temperature levels during their development (10°, 25° and 30°C), time from planting to harvest (7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days for 10 ° C, and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days for 25 ° and 30 ° C) and varieties of corn; and finally the metabolomic analysis was run on the samples obtained from the factorial experiment.

Colloidal silver at 1.4 ppm was the best disinfection treatment for corn (PI = 13.5%) without affecting the physiological quality of the seed neither its metabolome (PG=92.5% and CFL=246,905mg / 100g of sprouted flour). The concentration of free phenols in blue corn sprouts (973.69 mg / 100g of sprouts) was higher than in red corn (756.29 mg / 100g of sprouts), after 7 days of growth at 25°C.

When selecting two known NMR frequency ranges associated with phenols and tocopherols, there was a systematic linear (T = 25 ° C) or modular (T = 30 ° C) increase of S / SO as a function of temperature and time after sowing (days), this variable is in turn related to a reversal disintegration of inverse LWHH dependent on the water resonance time that strongly suggest the rate and availability of antioxidant production during sprout production.

KEY WORDS: Corn, Phenols, Tocopherols, Antioxidants, Bioavailable, Sprouts, Metabolic fingerprint, Nuclear Magnetic Resonance.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Carlos Vidal Carreño Carrillo

Director de tesis: Dr. Clemente Villanueva Verduzco

INTRODUCCIÓN GENERAL

La metabolómica es una disciplina que estudia los metabolitos presentes en un tejido, órgano u organismo particular en un momento del desarrollo concreto o bajo unas condiciones ambientales particulares, permitiendo de esta forma evaluar la contribución de los factores genéticos y/o ambientales a la modificación del metabolismo (Fiehn, 2001).

El fenotipo es el resultado de la suma del genotipo, del ambiente y de la interacción genotipo x ambiente. Los factores genéticos son inherentes a la especie del maíz, en este caso, y de cualquier otra planta. Por mejoramiento genético somos capaces de modificar el arreglo y contenido genético de las especies y mediante prácticas agrícolas y haciendo uso de siembras en diferentes localidades podemos alterar los factores ambientales (tipo, momento, localización y duración) durante el desarrollo de los cultivos para la producción de cosechas. La composición metabólica de una especie en cualquier momento de su ciclo de vida está directamente determinada por el fenotipo a nivel molecular.

A pesar de que el metabolismo vegetal es algo extremadamente complejo, estudios biológicos nos proporcionan información sobre qué factores modificar y en qué momento hacerlos para manipular la cantidad, composición y/o proporción de los metabolitos producidos por la planta para nuestra conveniencia.

En el caso del maíz, los compuestos que le confieren actividad antioxidante son los fenoles, los cuales son sintetizados en el metabolismo secundario, como parte de la ruta del fenilpropanoide, sin embargo, la planta los crea no solo con este propósito sino también como adaptación a cambios ambientales, de defensa contra agentes externos, como atrayentes de polinizadores o repelentes de plagas o incluso moléculas señalizadoras (Edreva et. al. 2008).

La temperatura, es un factor determinante en la ruta de formación de fenoles, ya que tiene efecto sobre la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima responsable de desaminar a la fenilalanina para formar ácido cinámico y poder integrarla a la ruta del fenilpropanoide.

El maíz es una planta con alto potencial antioxidante gracias a su alto aporte de fenoles y flavonoides, sin embargo, la mayoría de estos se encuentran ligados a otras moléculas como algunos sacáridos, principalmente en la pared celular, lo que no los hace biodisponibles para nosotros ya que no contamos con las enzimas necesarias capaces de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa, principales componentes de las paredes celulares, por esto es importante determinar el punto de mayor producción de fenoles libres en la planta.

Por otro lado, la germinación es un evento de gran actividad en el que inician un sinnúmero de procesos metabólicos y morfogenéticos donde el embrión produce todo lo necesario para poder desarrollarse correctamente; este proceso es muy dinámico ya que en cuestión de días ocurren procesos secuenciales y sincronizados de tal manera que los procesos anabólicos y catabólicos toman lugar de manera simultánea. (Coll et al., 1995).

Planteamiento del problema.

El estilo de vida actual puede promover inadecuados hábitos alimenticios, consumiendo alimentos altamente procesados y/o de baja calidad nutricional. Lamentablemente esto nos hace incluir en nuestra dieta comida rápida con alto contenido en grasas trans y saturadas, alimentos chatarra, enlatados, productos derivados de grasas hidrogenadas, bebidas con alto contenido de azúcar, jarabe de alta fructosa; los cuales en su mayoría contienen aditivos químicos como colorantes, conservadores, potenciadores de sabor, correctores o endulzantes; para los cuales hay estudios que han demostrado el daño potencial que pueden ocasionar a la salud.

Lo anterior está asociado a graves problemas de salud pública en la sociedad como la desnutrición y obesidad, así como el aumento de diversas enfermedades crónico-degenerativas, como consecuencia del estrés oxidativo provocado por el exceso de radicales libres en nuestro cuerpo.

Esto tiene un impacto socioeconómico en el país, por lo que es muy importante hacer conciencia de que un cambio en la dieta puede traer altos beneficios a la salud y economía.

Actualmente, diversas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte entre la población mexicana (INEGI 2017).

Los antioxidantes en los alimentos son abundantes, pero están conjugados en alta proporción (80%) y por lo tanto no disponibles, por lo que es conveniente buscar métodos para incrementar la proporción de fenoles libres disponibles, en nuestro caso, los fenoles del grano en germinados maíces de color.

Justificación

Una dieta basada en frutas y hortalizas rica en compuestos bioactivos como los antioxidantes pueden ayudar a reducir la incidencia de enfermedades degenerativas, gracias a que disminuyen el efecto del estrés oxidativo asociado a los radicales libres. Se ha demostrado que el maíz contiene una serie de compuestos fitoquímicos que tienen alta capacidad antioxidante, como los fenoles y flavonoides.

Algunos de estos compuestos antioxidantes pertenecientes a la familia de los flavonoides son las antocianinas, pigmentos naturales responsables de dar color al grano de diversas variedades de maíz.

México es centro de origen y domesticación del maíz, por lo tanto, existe una alta variabilidad de material genético en caracteres de planta y semilla correspondiente a diferentes condiciones ambientales, lo que aunado a la selección empírica por parte de los agricultores da como resultado diversidad de maíces que van desde tonos anaranjados, rojos, e incluso tonos escarlatas, hasta maíces azules, morados y negros; los cuales, en función del color e intensidad, contendrán mayor o menor cantidad de estos compuestos.

Durante la germinación ocurren procesos metabólicos simultáneos en un corto periodo de tiempo, lo que lleva a la planta a activar rutas metabólicas para la síntesis de compuestos necesarios. Durante este proceso la concentración de fenoles y flavonoides aumenta considerablemente (Guo et al. en 2012) quienes observaron un aumento de 450% en el contenido fenólico total durante en germinados de ocho días de frijol mungo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Radicales libres

Un radical libre es una molécula inestable que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por su vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas lo que provoca un mayor daño potencial (Pham-Huy, 2008).

Un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante su reacción en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno ERO o ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species (Valko 2007).

Los radicales libres se producen durante el metabolismo humano de forma natural, aunque también pueden ser producidos por contaminantes ambientales (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiación (ultravioleta, gamma, hertziana), por una inadecuada alimentación o por estrés físico y psicológico.

Estrés oxidativo y su relación con enfermedades crónico-degenerativas

El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre sobre esta, (Reyes et al, 2011).

En condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras moléculas reactivas con los mecanismos antioxidantes exógenos y endógenos. Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. La rotura del equilibrio puede ser asociado con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres (Quintanar *et al*, 2009).

Se han estudiado alrededor de 100 enfermedades y su relación con el desbalance del sistema oxidativo, siendo las cardiovasculares, cancerígenas, gástricas, respiratorias, neurológicas y del sistema endocrino principalmente (Núñez, 2011). Entre éstas las de tipo cardiovascular tienen amplia evidencia.

En el caso de la diabetes los posibles mecanismos de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, en particular la glucosa, de la cual también se modula su liberación por el hígado. Podrían también estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de esta y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en los tejidos blanco para la hormona. Respecto al cáncer se señala que si los radicales libres afectan el ADN pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas (Llancari *et al*. 2011).

Es posible que las enfermedades neurodegenerativas sean de las más estudiadas en el contexto del estrés oxidativo. Se ha advertido el aumento del deterioro de proteínas específicas por la presencia elevada de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Galano, 2015).

De igual manera en algunas zonas del cerebro ocurre la reducción de algunos metales de transición ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$) propias del efecto oxidativo, lo cual agrava la enfermedad. El metabolismo de glutatión, también se ve afectado asociándolo con enfermedades como Parkinson, Alzheimer u otras degenerativas del sistema neurológico (Núñez *et al*, 2011).

En el caso del cáncer el estrés oxidativo induce un desequilibrio redox celular que se ha encontrado presente en varios tipos de células de cáncer en comparación con las células normales; El desequilibrio redox puede estar relacionado con la estimulación oncogénica. La modificación permanente del material genético resultante de incidentes de "daño oxidativo" representa el primer paso involucrado en mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Valko, 2007).

Existen dos vías fundamentales para proteger al organismo de los radicales libres; enzimáticos y no enzimáticos o endógenos y exógenos y su interacción puede ser intracelular o extracelular (Zamora *et al.* 2007).

El estrés oxidativo es un factor importante involucrado en el envejecimiento, que está regulado por el factor de transcripción SKN-1 (Skinhead-1) en *C. elegans*, y el homólogo de SKN-1 en vertebrados es la proteína Nrf1 / Nrf2 (Govindan *et al.*, 2018)

Sustancias bioactivas en las plantas y sus beneficios para la salud

En diferentes especies vegetales podemos encontrar gran variedad de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, producto del metabolismo secundario, provenientes de la ruta del ácido shikímico, en la cual se sintetizan la mayoría de los fenoles a partir de la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL) que convierte la fenilalanina en ácido cinámico para su incorporación como sustrato; y la ruta del ácido malónico, que usa como sustrato el acetil CoA para formar flavonoides.

Compuestos fenólicos en el maíz

Desde hace algunos años con el auge en el consumo de compuestos bioactivos de origen vegetal debido a los beneficios que estos presentan en la salud humana, se han estudiado diversas especies vegetales con el fin de encontrar cuál de estas presentan un mayor aporte de estos compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y/o tocoferoles.

Afortunadamente como alternativa para promover el consumo de compuestos antioxidantes se han estudiado cereales de gran importancia mundial, por su elevado consumo.

Adom y Liu (2002) analizaron el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante en 4 granos de gran importancia mundial (maíz, trigo, avena y arroz). En sus resultados encontraron que el maíz es el cereal con mayor contenido fenólico total de los 4 granos analizados (maíz, trigo, avena y arroz), siendo de 15.55 μmol de ácido gálico/g de grano, superando casi al doble al trigo que es el grano que más se le acercaba con 7.99 μmol de ácido gálico/g de grano, sin embargo, esta investigación también demostró que del 100% de los fenoles totales contenidos en los granos, del 62 al 85% están ligados a la pared celular, siendo el maíz el que tenía la mayor proporción (85%) de sus fenoles ligados a la pared.

En el caso de los flavonoides podemos ver la misma tendencia que con los fenoles, donde el maíz, tiene los valores más altos de flavonoides totales (1.68 μmol de catequina/g de grano), en comparación con los otros tres granos (trigo, avena y arroz), sin embargo, el porcentaje de flavonoides ligados en el maíz es de 91%.

Cuando se comparó la capacidad antioxidante de los 4 granos (maíz, trigo, avena y arroz), ocurrió lo mismo que con las variables anteriores, el maíz fue el grano con los valores más altos, 181.42 μmol de vitamina C/g de grano, más del doble del trigo que era el grano que más se le acercaba con 76.7 μmol de vitamina C/g de grano.

En conclusión, Adom y Liu demostraron que de los granos evaluados el maíz era el que tenía mayor contenido de compuestos polifenólicos y por lo tanto mayor capacidad antioxidante, sin embargo, en promedio el 85% de estos compuestos no son solubles, es decir, se encuentran ligados a paredes celulares.

López Martínez, et al. (2009) analizaron 18 variedades de maíces mexicanos con el fin de determinar el contenido de compuestos fenólicos y en particular antocianinas. Determinaron que el contenido de estos compuestos entre las 18 variedades va de un rango de 215.8 a 3,400.1 mg de ácido gálico/ 100g de harina de grano entero y el contenido de antocianinas variaba de 1.54 a 850.9 mg de equivalentes de cianidina-glucósido/ 100g de harina de grano entero; concluyeron que la mayoría de estos compuestos están ligados a pared celular (alrededor del 85%), de manera similar a Adom y Liu (2002), mientras que prácticamente la totalidad de las antocianinas estaban en su forma libre.

Adicionalmente midieron la capacidad antioxidante de las variedades y encontraron que en particular las variedades: Veracruz 42 y AREQ516540TL, ambas de grano morado, fueron las que tuvieron mayor capacidad antioxidante y un mayor contenido de antocianinas, después le siguieron tanto en capacidad antioxidante como en contenido de antocianinas, variedades de colores rojas; por lo que en principio el color del grano de cada fenotipo está íntimamente relacionado con el contenido de antocianinas, además de que existe una correlación entre el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante del grano.

Cabrera et al. (2008) estudiaron el contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y la relación con sus propiedades físicas. Encontraron que un gran porcentaje de los fenoles insolubles se encuentran en el pericarpio, hasta 1092.7 mg g⁻¹ MS (más del 70%), determinaron que existe correlación positiva entre el contenido de fenoles totales, pero particularmente insolubles y la dureza del grano, demostrando así, que se constituyen la hemicelulosa de la pared celular, lo cual contribuiría a dar mayor resistencia a las paredes celulares del pericarpio y favorecería la tolerancia del grano a plagas y a algunos hongos.

Efecto de bajas temperaturas bajas en maíz

Bilska et al. (2018) estudiaron el efecto que tenían las temperaturas bajas (14°C por el día y 12°C por la noche), sobre plantas de *Miscanthus* y *Zea mays*, evaluaron cambios fisiológicos, anatómicos, y bioquímicos.

Parte de las variables bioquímicas evaluadas fue la concentración de fenoles ligados a la pared celular; Zm-T, una de las 3 líneas de maíz evaluadas, registro un incremento de hasta un 33% en la concentración total de fenoles ligados a la pared en los tratamientos donde se aplicaron temperaturas bajas por más de 28h y hasta 3 días. Al mantener temperaturas bajas para esta línea por más de 28hrs, incrementa la concentración de fenoles totales en la planta, tal vez debido a la estimulación de la Fenilalanina amonio liasa (PAL), ya que se ha visto como temperaturas cercanas a los 10°C, estimulan su actividad; y esta enzima es la responsable de transformar la fenilalanina en ácido cinámico para su incorporación en la ruta de síntesis del fenilpropanoide.

Genes involucrados en la síntesis de fenoles

Los investigadores han caracterizado los genes y la regulación de la biosíntesis de compuestos fenólicos. Se ha demostrado que el gen PAL media el primer paso de la ruta del fenilpropanoide y cataliza la transformación de fenilalanina en ácido cinámico (Han et al. 2019).

El ácido clorogénico se genera posteriormente sin enzimas sobre la base del ácido cinámico. Posteriormente, el ácido cinámico se transforma en ácido p-cumárico a través de la acción de la enzima codificada por el gen C4H, la cinamato-4-monooxigenasa (C4H).

De manera similar, 4-coumaroyl CoA es catalizada por 4-coumaroyl: CoA-ligase (4CL) que, a su vez, está codificada por el gen 4CL. PAL puede considerarse como un gen clave para la vía de síntesis fenólica (Wang et al., 2013).

Por lo tanto, la investigación sobre la expresión de los tres genes (PAL, C4H y 4CL) puede caracterizar inequívocamente los perfiles fenólicos durante la germinación de las semillas.

Efecto de la luz y oscuridad en la síntesis de fenoles en germinados de maíz

Xiang et al. (2017) estudiaron el efecto que tiene la luz o la ausencia de esta, durante la germinación en maíz. Encontraron que la luz es importante en la regulación de genes responsables de sintetizar diferentes compuestos como los fenoles; por ejemplo, mediante estudios de PCR encontraron que las semillas que germinaban en luz mostraban una estimulación en la expresión del gen zmPAL, responsable de comenzar con la ruta del fenilpropanoide.

También evaluaron el efecto de la germinación sobre el contenido de fenoles totales y descubrieron que aumenta el contenido de estos hasta en 2.5 veces sin importar si crecían con luz u oscuridad conforme la germinación iba avanzando, además la proporción de fenoles solubles también aumentaba en un 15% en promedio.

En general, este estudio demuestra que la germinación aumenta el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante y fenoles solubles, en ambas condiciones de germinación (luz y oscuridad), sin embargo, las semillas que germinaron con luz siempre mostraron mayores valores de las variables evaluadas en comparación con las que germinaron en oscuridad.

Por lo tanto, la luz es un factor importante en la producción de fenoles y flavonoides totales y solubles, así como de la capacidad antioxidante de los compuestos puesto

que estimula la expresión de genes (zmPAL) responsables de iniciar las rutas de biosíntesis de éstos.

Fenoles ligados y su biodisponibilidad en humanos

Los fenoles en las formas insolubles se unen covalentemente a los componentes estructurales de la pared celular tales como celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y proteínas estructurales en forma de barra (Wong, 2006).

Estos fitoquímicos desempeñan funciones importantes en la pared celular como proporcionar barreras físicas y químicas, protección contra la invasión de patógenos y astringencia que disuade el ataque de insectos y animales, funciones antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Liu, 2007).

Los ácidos fenólicos, forman enlaces éter con lignina a través de sus grupos hidroxilo en el anillo aromático y enlaces éster con carbohidratos estructurales y proteínas a través de su grupo carboxílico; sin embargo, las formas ligadas de compuestos fenólicos se pueden liberar y absorber. Por ejemplo, después del consumo de café, los niveles plasmáticos de ácido cafeico aumentaron debido a la liberación y absorción de ácido cafeico del ácido clorogénico en los complejos unidos (Acosta-Estrada et al., 2014)

Hay diferentes vías de absorción probadas para compuestos fenólicos ligados, en el tracto gastrointestinal donde los microorganismos, enzimas e incluso transportadores de glucosa están involucrados. La liberación parcial de fenoles por efecto de la digestión se lleva a cabo dentro del tracto gastrointestinal para ser absorbidos y metabolizados y puedan ejercer sus beneficios para la salud (Acosta-Estrada et al., 2014).

En humanos más del 95% de la liberación total de grupos de fenoles de la fibra de trigo tuvo lugar durante su fermentación en el colon, debido a la liberación

enzimática de la microflora existente. Sin embargo, la cantidad de fenoles liberados mediante tratamientos gástricos y del intestino delgado solo representa cerca del 3% de los fenoles totales.

Los fitoquímicos ligados insolubles sobreviven a la digestión estomacal e intestinal y alcanzan el colon ya que los materiales fibrosos de la pared celular son de difícil digestión (Adom y Liu, 2002).

Sin embargo, hervir los alimentos antes de consumirlos puede aumentar la concentración de compuestos fenólicos en hortalizas, una vez cocinados debido a la variación en el pH y la presencia de enzimas durante la digestión, la disponibilidad de los fenoles se incrementa (Moyo, et al. 2019).



Instituto de Horticultura

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO Y PLATA COLOIDAL, EN EL CONTENIDO DE FENOLES DE MAÍZ ROJO Y AZUL

DESINFECTATION WITH HYPOCHLORITE OF CALCIUM AND COLLOIDAL SILVER, IN THE CONTENT OF RED AND BLUE CORN PHENOLS

¹RESUMEN

La producción de germinados para la alimentación humana representa una opción saludable para combatir los efectos del estrés oxidativo, gracias a los compuestos bioactivos que se sintetizan durante la germinación. La inocuidad de los germinados es requisito indispensable. En este estudio se utilizó hipoclorito de calcio y plata coloidal como opciones que no alteren el contenido nutracéutico del maíz y eliminen patógenos peligrosos para el humano. Los tratamientos a base de hipoclorito de calcio en concentraciones altas (0.4%) fueron más eficientes para la inocuidad, pero con la desventaja de reducir el contenido de fenoles libres solo en maíz azul de 374.55 mg a 261.06 mg /100 g. La plata coloidal a dosis de 1.4 ppm, tiene un control de patógenos similar al hipoclorito de calcio sin reducir el contenido de fenoles libres incluso aumentándolo. El mejor tratamiento para tratar semillas de maíz destinadas a la producción de germinados es el de plata coloidal a 1.4 ppm.

PALABRAS CLAVE: germinados, estrés oxidativo, antioxidante, fenoles libres, patógenos.

ABSTRACT

The production of sprouts for human consumption represents a healthy option to combat the effects of oxidative stress, thanks to the bioactive compounds that are synthesized during germination. The safety of sprouts is an essential requirement. In this study, calcium hypochlorite and colloidal silver were used as options that do not alter the nutraceutical content of corn and eliminate dangerous pathogens for humans. Treatments based on calcium hypochlorite in high concentrations (0.4%) were more efficient for food safety, but with the disadvantage of reducing the content of free phenols in blue corn only from 374.55 mg to 261.06 mg / 100 g. Colloidal silver at a dose of 1.4 ppm, has a pathogen control similar to calcium hypochlorite without reducing the content of free phenols, even increasing it. The best treatment to treat corn seeds intended to produce sprouts is that of colloidal silver at 1.4 ppm.

KEY WORDS: sprouts, oxidative stress, antioxidant, free phenols, pathogens.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Carlos Vidal Carreño Carrillo

Director: Dr. Clemente Villanueva Verduzco

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad ha habido una tendencia en el aumento del consumo de geminados de diversas especies, por las propiedades nutraceúticas de estas, sin embargo, la gran mayoría de los sistemas de producción no tienen un control realmente eficiente o no logran una desinfección real de las semillas y de los germinados.

En los últimos años, en todo el mundo se da mucha importancia a la inocuidad de los alimentos, debido a los riesgos en la salud pública que pueden generar principalmente desde un punto de vista microbiológico, puesto que existen bacterias como *Salmonella* o *E. coli*, que pueden representar un severo problema. Informes han establecido que una gran parte de los brotes (*E. coli*) transmitidos por alimentos se atribuyen al consumo de frutas y verduras frescas. Casi la mitad (46%) de las enfermedades transmitidas por alimentos entre 1998 y 2008 en los Estados Unidos se atribuyeron a productos frescos (Amrutha et al. 2017).

Listeria monocytogenes, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* son las principales bacterias transmitidas por los alimentos implicadas en brotes de productos frescos (Harris et al., 2003).

Khalil y Gomma, (2016) mostraron un recuento máximo de *E. coli* en zanahoria (4,96 log UFC / g), pimiento verde (4,57 log UFC / g), pepino (4,38 log UFC / g) y calabacín (4,22 log UFC / g) en muestras de mercados callejeros de Egipto.

En países como Estados Unidos existen protocolos específicos por parte de agencias especializadas como la EPA, para tratar con este tipo de problemas, los cuales incluyen desinfección de los alimentos con el uso de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio (Suslow, 2010).

El uso de hipoclorito de calcio presenta la ventaja de ser barato si se usa a escala industrial, además presenta un espectro más amplio en el control de patógenos y el olor/sabor que deja en los alimentos es más aceptable y fácil de eliminar en comparación con el hipoclorito de sodio, sin mencionar que se necesita menor cantidad para tener un efecto similar (Mishra et al. 2018)

No obstante, solo existe información acerca de las concentraciones óptimas para desinfectar vegetales y frutas, no así para semillas en la producción de germinados.

El objetivo de este estudio es encontrar la dosis óptima o una alternativa al uso de hipoclorito de calcio para la desinfección eficiente de semillas usadas para producción de germinados, sin comprometer la concentración o composición de compuestos bioactivos presentes en los germinados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial, el primer factor es color de la semilla, con dos niveles, semilla roja y azul, el segundo factor es desinfectante, con 5 niveles: solución de hipoclorito de calcio " $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ " al 0.2%, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 0.4%, plata coloidal 1.4 ppm, plata coloidal 2.8 ppm y testigo (agua); con un total de 10 tratamientos. La unidad experimental fueron 100g de semilla con 3 repeticiones.

A continuación, se muestran los tratamientos de desinfección a seguir y sus concentraciones a base de hipoclorito de calcio y plata coloidal en las dos variedades de maíz:

Cuadro 1. Definición del diseño de tratamientos para la desinfección de semillas de maíz para germinados.

Tratamiento	Color de semilla*	Desinfectante
1	Rojo	Ca(ClO) ₂ 0.2%
2		Ca(ClO) ₂ 0.4%
3		Plata coloidal 1.4 ppm
4		Plata coloidal 2.8 ppm
5		Testigo (agua)
6	Azul	Ca(ClO) ₂ 0.2%
7		Ca(ClO) ₂ 0.4%
8		Plata coloidal 1.4 ppm
9		Plata coloidal 2.8 ppm
10		Testigo (agua)

Ca(ClO)₂: hipoclorito de calcio. *: Maíz.

2.2 Recolección del material vegetal y establecimiento del experimento

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de fisiología vegetal (determinación de fenoles) y el laboratorio de semillas (prueba de germinación) del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicados en la carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco de Mora, Edo. de México. Las dos variedades criollas de maíz de semilla azul y roja con que se trabajó fueron recolectadas en el mercado municipal de la localidad de Chilchotla, Puebla (19°15'00"LN 97°11'00"LW) y a una altitud media de 2,200 msnm, una precipitación total anual de 941.6 mm y una temperatura media anual de 11.6°C.

2.3 Lavado de semilla

Todas las muestras de semillas antes de la aplicación de cada tratamiento se lavaron tres veces con agua destilada y detergente en polvo común (Roma^{MR}). Posteriormente se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril, hasta que el agua de los lavados dejó de salir turbia.

2.4 Desinfección de semillas

Los tratamientos donde se utilizó el hipoclorito de calcio como desinfectante, se usó $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 65% de la marca MEYER. Se pesaron 3.07g y 6.15g de hipoclorito de calcio con una balanza analítica y se disolvieron en un litro de agua destilada cada uno, para obtener los tratamientos con 0.2% y 0.4% de hipoclorito de calcio, respectivamente.

Los tratamientos donde se utilizó la plata coloidal como desinfectante, se utilizó MICRODYN^{MR} (con plata coloidal ionizada en una concentración de 0.35%) a concentraciones de 8 y 16 gotas $\cdot \text{L}^{-1}$, lo que equivale a 1.4 y 2.8 ppm de plata coloidal ionizada, respectivamente.

Se pesó una muestra de 100 g de semilla de maíz por repetición y se colocaron en un vaso de precipitado inmersas en 500 ml de la solución de cada tratamiento desinfectante durante 15 minutos (Cuadro 1).

Pasado el tiempo de desinfección, los 100g de semilla por repetición se dividieron en 2 partes iguales, 50 g fueron usados para obtener harina y determinar el contenido de fenoles después de cada tratamiento de desinfección y los 50 g restantes se sometieron a proceso de germinación y se determinó el porcentaje de germinación (PG) e incidencia de patógenos (PI).

2.5 Obtención de la harina

Pasado el tiempo de desinfección, las semillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, para eliminar residuos de la solución desinfectante y se tomaron 50 g de semilla por repetición para introducirlas en bolsas de papel y meterlas a una estufa de secado durante 12 h a 50°C (Cabrera, 2009) para su secado y obtener harina con un molino para café de la marca Hamilton Beach, la harina se almaceno en un desecador hasta su análisis para determinar concentración de fenoles.

2.6 Extracción de fenoles

El método de extracción para determinar el contenido fenoles en la harina de semillas de maíz fue adaptado de Bakan *et al.* (2003), con las siguientes modificaciones: se usó 1g de harina de maíz y se agregaron 15 ml de metanol en agua al 80 % (v/v), se homogenizo la muestra con un vortex y se sometieron a baño maría a 90°C durante 20 min, las muestras se dejaron reposar por 24 h en oscuridad y a 4-5°C, pasado ese tiempo los extractos fueron centrifugados durante 5 min a 5000 rpm, los sobrenadantes fueron recuperados para cuantificar fenoles libres.

2.7 Cuantificación de fenoles libres

La cuantificación de fenoles se hizo mediante el método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Bakan *et al.* (2003), las muestras correspondientes a los sobrenadantes recuperados de la centrifugación en el procedimiento de extracción de fenoles de las harinas se sometieron a una reacción de Folin (Cuadro 2) para cuantificar su contenido de fenoles libres mediante la lectura de su absorbancia en un espectrofotómetro a 765nm.

Se utilizaron celdas ópticas de vidrio para leer las absorbancias de cada muestra en el espectrofotómetro, durante el cambio de muestra y lectura de un dato nuevo se lavó la celda óptica con etanol al 80% en agua (v/v) y enjuagó con agua destilada.

Cuadro 2. Composición de las reacciones para determinar fenoles en dos variedades de maíz.

Maíz	Muestra (µl)	Agua destilada (µl)	Reactivo Folin (µl)	Na ₂ CO ₃ al 7.5% (µl)
Azul	100	900	250	1,250
Rojo	150	850	250	1,250

El contenido de fenoles libres de cada muestra se calculó con base a los datos individuales de absorbancia de las muestras y la fórmula de la curva de calibración para poder transformar estos datos de absorbancia a mg equivalentes de ácido gálico que sirven de referencia para el contenido de fenoles de una muestra.

Para preparar la curva de calibración se utilizó una solución madre de ácido gálico a 100 ppm. A partir de esta solución, se prepararon ocho reacciones de Folin para determinar la absorbancia de cada uno con respecto a sus concentraciones crecientes conocidas de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 µl.

Cuadro 3. Concentraciones de ácido gálico usadas para elaborar la curva de calibración.

Reactivos	Concentración (ppm) de la curva patrón de ácido gálico							
	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4
Ácido gálico (µl)	0	30	60	90	120	150	180	210
Agua destilada (µl)	1,000	970	940	910	880	850	820	790
Reactivo Folin (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250
Carbonato de sodio al 7.5% (µl)	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250

2.8 Germinación de semillas

Para determinar el porcentaje de germinación (PG) e incidencia de patógenos (PI) se tomaron los 50 g de semilla restantes por repetición de cada tratamiento y se germinaron. Se utilizaron cajas Petri de 150 X 15mm con una toalla húmeda de algodón en el fondo, en una cámara de germinación a 28°C durante 72 h.

2.9 Porcentaje de germinación

Pasadas 72 h se evaluó el porcentaje de germinación (PG) en ambas variedades (rojas y azules) para determinar si la desinfección no afectó la calidad fisiológica de la semilla. Se contabilizaron las semillas germinadas a las 72 h y se aplicó la siguiente fórmula:

$$PG = \frac{\text{No. de semillas germinadas}}{\text{Total de semillas sembradas}} \times 100$$

2.10 Porcentaje de incidencia de patógenos

Para determinar la eficiencia de los métodos de desinfección, se determinó la presencia de cualquier agente patógeno en el germinado, calculando el porcentaje de incidencia (presencia de infección, independientemente de la severidad), mediante la siguiente fórmula:

$$PI = \frac{\text{No. de germinados infectados}}{\text{Total de germinados}} \times 100$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación (PG) en semillas rojas (97.2%) es más alto en comparación con las semillas azules (92.4%). El ataque y presencia de enfermedades en ambas variedades de maíz (rojo y azul) es la misma (Cuadro 4).

Figura 1. Calidad y cantidad de raíces y pelos radicales en germinados de maíz.

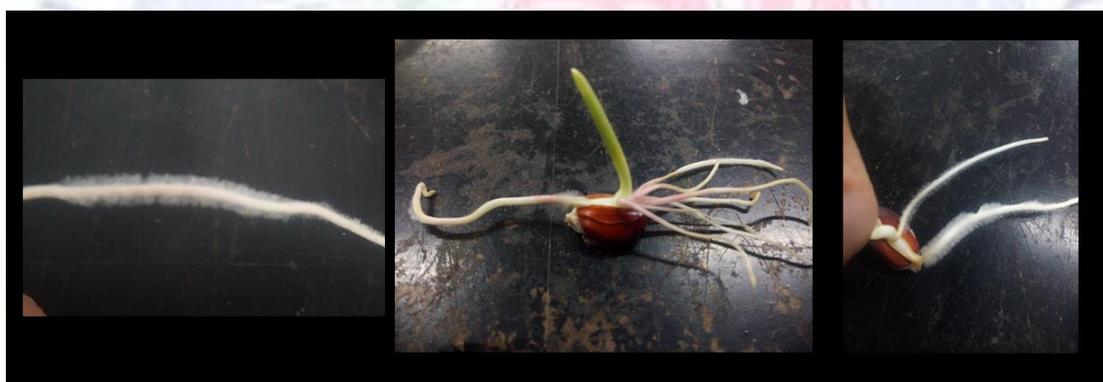


Figura 2. Presencia de patógenos en germinados de maíz.



Ninguno de los tratamientos desinfectantes que se utilizaron en este estudio, sin importar su constitución o concentración, afectó negativamente la actividad

biológica de la semilla (germinación), puesto que los porcentajes de germinación en ambas variedades de maíz (rojo y azul) no se ven alterados (Cuadro 5).

Sánchez Pérez et al. (2010) estudiaron los cambios fisicoquímicos durante la germinación del maíz y determinaron que la mayor parte de este proceso se lleva a cabo en rangos óptimos de pH de 4.8-6.9. A pesar de que no se tomó lectura del pH de las soluciones de desinfección, de acuerdo con Bernabel Yauri et al. (2013) una solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en agua al 1% (p/v) puede alcanzar rangos de pH de entre 9.5-11.5; esto sin duda afecta el proceso de germinación debido a la degradación de compuestos o inactivación enzimática, por lo tanto se hubiera esperado que los tratamientos donde se utilizó hipoclorito de calcio al 0.2 y 0.4% los PG hubiesen sido afectados, sin embargo, no fue así.

El PG del maíz rojo y azul no se vio afectado ya que, al contener antocianinas, compuestos bioactivos antioxidantes, y al estar expuestos en un tiempo relativamente corto (15 min), con la solución de hipoclorito de calcio la probable degradación por alcalinización fue lenta o simplemente no ocurrió por la acción protectora de los compuestos bioactivos.

Cuadro 4. Comparación de medias del porcentaje de germinación (PG), porcentaje de incidencia (PI) y concentración de fenoles libres (CFL) por color de grano de maíz.

Semilla	PG (%)	PI (%)	CFL (mg/100g de harina)
Roja	97.2 a	13.8 a	305.293 a
Azul	92.4 b	18 a	147.034 b
DMS	2.82	5.4	9.83

CFL: Concentración de fenoles libres, PG: Porcentaje de germinación, PI: Porcentaje de incidencia, DMS: Diferencia Mínima Significativa de Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

3.2 Porcentaje de incidencia de patógenos

A pesar de que las semillas fueron lavadas con agua y jabón común antes de la siembra, cuando no se utilizó algún tratamiento de hipoclorito de calcio o plata coloidal como desinfectante; el ataque y presencia de patógenos pasadas 72 h de germinación fue bastante notoria con PI=40% para maíz rojo y PI=34% para maíz azul (Cuadro 5).

La mayoría de los microorganismos causantes de enfermedades como los hongos o bacterias cuentan con mecanismos de protección y tienen la capacidad de formar cubiertas protectoras, en el caso de las bacterias, forman cápsulas constituidas por glicoproteínas y polisacáridos en su mayoría, las cuales le dan la capacidad de adherirse a superficies o su hospedero y protegerlas de la deshidratación, contra la depredación o de agentes antibacterianos (Beveridge 1988).

Por lo que es necesario el uso de compuestos biocidas con capacidad oxidante, que tengan la capacidad deteriorar estos mecanismo de protección naturales de los patógenos y poder reducir realmente las poblaciones nocivas en las semillas; evitando que baje la calidad del germinado o comprometa un lote completo en producción debido a una rápida diseminación de la enfermedad.

El hipoclorito de calcio y la plata coloidal demostraron ser efectivos para controlar el ataque de patógenos, puesto que redujeron el PI en ambas variedades con respecto a los testigos. En el caso de maíz rojo todos los tratamientos desinfectantes evaluados mostraron la misma eficiencia para reducir la incidencia de enfermedades, en maíz azul el hipoclorito de calcio en concentración de 0.4%, resulto ser el más efectivo al reducir en mayor medida la incidencia de enfermedades (PI=7%) (Cuadro 5).

En maíz azul, el hipoclorito de calcio al 0.4% redujo la incidencia de enfermedades de PI=34% a 7%, la plata coloidal redujo el PI=34% a PI=18% y

19% cuando se usó a concentraciones de 1.4 y 2.8 ppm respectivamente, no habiendo diferencia en cuanto a la concentración usada (cuadro 5). Esto probablemente se debió a la alta capacidad oxidante que tiene el $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, y por lo tanto biocida, en comparación con la plata coloidal, además, la plata coloidal, solo impide el desarrollo del patógeno a diferencia del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ el cual es un agente oxidante más agresivo y por ende mata al patógeno.

En México es ampliamente conocido el efecto bactericida de la plata coloidal por su acción oxidativa que impide su desarrollo, sobre todo a partir del brote de cólera en 1993, la plata coloidal presenta una potente acción contra enterobacterias como *E. coli* o *Salmonella spp* (Coutiño Rodríguez 2015).

La mayoría de las enfermedades que se presentaron en los germinados de ambas variedades (rojo y azul) fueron provocados por hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium*, probablemente debido a sus mecanismos de defensa resistieron mejor el efecto de la plata coloidal pero no la del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

Cuadro 5. Comparación de medias entre tratamientos desinfectantes para PG y PI en germinados de maíz.

Desinfectante	Maíz rojo		Maíz azul		Promedio	
	PG (%)	PI (%)	PG (%)	PI (%)	PG (%)	PI (%)
Ca(ClO)₂ 0.2%	99 a	5 b	95 a	12 bc	96 a	8.5 b
Ca(ClO)₂ 0.4%	96 a	4 b	89 a	7c	93 a	5.5 b
Plata coloidal 1.4 ppm	97 a	9 b	94 a	18 bc	92.5 a	13.5 b
Plata coloidal 2.8 ppm	98 a	11 b	95 a	19 b	97 a	15 b
Testigo (agua).	96 a	40 a	89 a	34 a	95.5 a	37 a
DMS	6.9	22.6	11.26	11.43	6.32	12.1

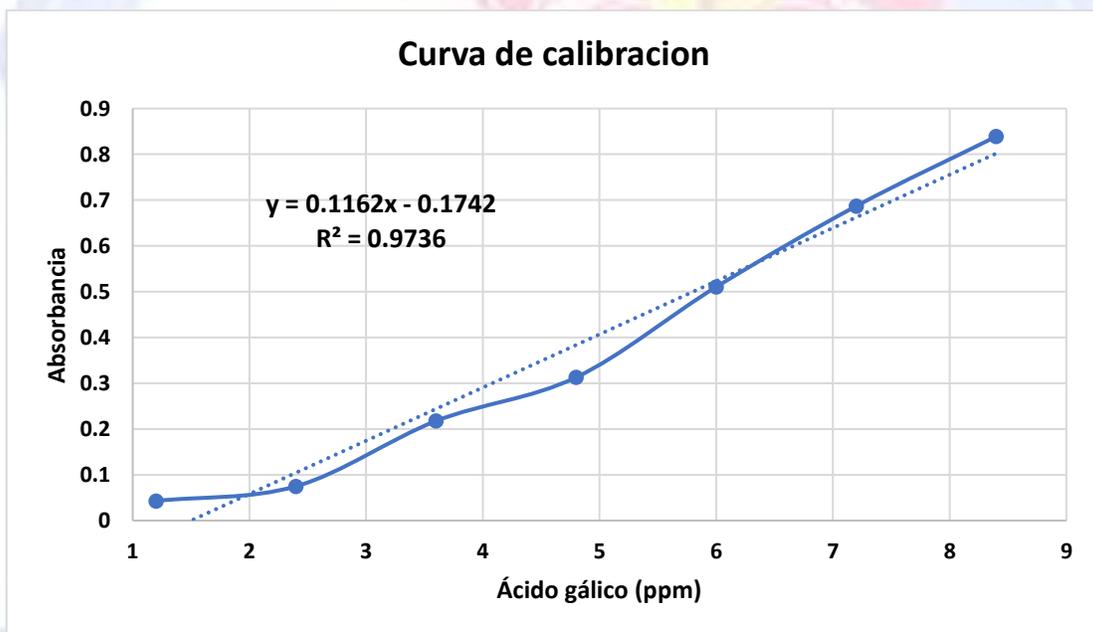
$\text{Ca}(\text{ClO})_2$: Hipoclorito de calcio. PG: Porcentaje de germinación, PI: Porcentaje de incidencia, DMS: Diferencia Mínima Significativa de Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

3.3 Cálculo de equivalentes de fenoles libres

Debido a que el ácido gálico pertenece a la familia de los polifenoles y al grupo de los taninos hidrolizables, además de ser de fácil obtención, puede usarse como referente en métodos cuantitativos para calcular la concentración de fenoles en una solución. Por lo tanto, la proporción de 1 mg de ácido gálico es equivalente a 1 mg de fenol.

La concentración de fenoles libres (ppm) de cada muestra se calculó a partir de su equivalencia con ácido gálico. El cálculo se hizo despejando de la fórmula de la recta que se originó en la curva de calibración (Figura 3) y sustituyendo el valor de absorbancia de cada muestra, dado por el espectrofotómetro.

Figura 3. Curva de calibración del ácido gálico.



Ecuación de la recta:

$$y = -0.1742 + 0.1162x$$

$y = \text{absorbancia}$

$x = \text{ácido gálico (ppm)}$

despeje:

$$x = \frac{y + 0.1742}{0.1162} \quad \rightarrow \quad \text{ácido gálico (ppm)} = \frac{(\text{absorbancia}) + 0.1742}{0.1162}$$

Obtenida la equivalencia de fenoles libres con el ácido gálico (ppm) correspondiente a cada muestra, el contenido de fenoles libres (FL) se reportó en: mg de ácido gálico/100 g de harina, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ácido gálico (ppm)} \times \frac{15\text{ml de metanol (solvente)}}{1\text{g de harina}} \times 100 = \frac{\text{mg de ácido gálico}}{100\text{g de harina}}$$

3.4 Concentración de fenoles libres en germinados de maíz

La concentración de fenoles libres (CFL) en la variedad de maíz azul (305.293 mg/100g de harina) es más del doble con respecto al maíz rojo (147.034 mg/100g de harina) (Cuadro 4).

Los tratamientos con hipoclorito de calcio, independientemente de su concentración, no afectaron la CFL en maíz rojo. Cuando se aplicó el tratamiento con plata coloidal (1.4 ppm) la CFL (147.39 mg/100g de harina) no se vio alterada en la variedad de maíz rojo evaluada si se compara con el testigo (144.349 mg/100g de harina). No obstante, cuando se aplicó el tratamiento de plata coloidal (2.8 ppm) la CFL aumenta (168.96 mg/100g de harina) (Cuadro 6).

En un estudio con plantas adultas de *L. gibba* se encontró que al aplicar una solución de 1 mg/L (1 ppm) de plata coloidal la concentración de fenoles totales incrementaba 156% con respecto al testigo (Varga et al., 2018).

Las dosis de los tratamientos con plata coloidal usadas en este estudio fueron de 1.4 y 2.8 ppm. Por lo tanto, la similitud en el efecto del tratamiento con plata coloidal sobre la concentración de fenoles muestra que la plata coloidal además de ser un buen tratamiento para sanitizar la semilla de maíz (rojo y azul) durante la germinación; promueven un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de fenoles en el tejido vegetal cuando la semilla es tratada con este compuesto con dosis altas (2.8 ppm). Sin embargo, no se tiene claro el mecanismo de acción a través del cual la plata coloidal promueve este aumento en los FL en el caso del maíz rojo evaluado.

En el maíz azul todos los tratamientos desinfectantes evaluados redujeron la CFL con respecto al testigo, sin embargo, en caso de los tratamientos con hipoclorito de calcio (0.2% y 0.4%) hubo una mayor reducción significativa ($p < 0.05$) en la CFL. De 374.55 mg/100g de harina en el testigo a 275.37 y 261.06 mg/100g de harina en los tratamientos de 0.2 y 0.4% respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias de la contenido de fenoles libres (CFL) en germinados de maíz para cada tratamiento desinfectante utilizado.

Desinfectante	CFL (mg/100g de harina)		
	Maíz rojo	Maíz azul	Promedio
Ca(ClO) ₂ 0.2%	138.439 b	275.37 c	214.54 b
Ca(ClO) ₂ 0.4%	136.03 b	261.06 c	198.544 b
Plata coloidal 1.4 ppm	147.39 ab	290.64 b	246.905 a
Plata coloidal 2.8 ppm	168.962 a	324.85 b	211.378 b
Testigo (agua).	144.349 b	374.55 a	259.449 a
DMS	22.42	40.19	21.96

Ca(ClO)₂: Hipoclorito de calcio. CFL= concentración de fenoles libres. DMS= Diferencia mínima significativa Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

El pH tiene efecto sobre la estructura, estabilidad y coloración de las antocianinas, dando pigmentaciones rojas en medios ácidos ($\text{pH} \pm 2$) y cambiando poco a poco a tonalidades azules-moradas conforme los niveles de pH aumentan ($\text{pH} \pm 7$), comenzando a degradarse por arriba de pH 7 (Astrid Garzón, 2008).

En el caso de los maíces azules gracias a los compuestos que le otorgan sus tonalidades su pH está cercano a la neutralidad y si tomamos en cuenta que soluciones de hipoclorito de calcio al 1% pueden alcanzar pH de 9.5-11.5 (Bernabel Yauri et al. 2013), la degradación de los fenoles se vería acelerada en comparación con la variedad de maíz rojo.

Estos resultados ponen a consideración las propuestas establecidas por la EPA (Environmental Protection Agency) y CDFA (California Department Food and Agriculture), las cuales recomiendan como tratamiento para desinfectar semillas destinadas a la producción de germinados para alimentación humana y reducir el riesgo de contraer enfermedades virales, bacterianas y/o fungosas (principalmente *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*), sin dañar la integridad o afectar el contenido nutracéutico de las semillas, una solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 20,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Suslow, 2010). Es decir, una solución al 2% de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ lo que equivale a 5 y 10 veces más concentradas que las evaluadas en este estudio. Por lo tanto, la CFL en maíz (rojo y azul) se vería reducida en mayor medida y llegar al punto de dañar la calidad fisiológica de la semilla, reduciendo su capacidad de germinación.

Fett (2002), determinó que para reducir poblaciones de *Escherichia coli* a niveles aceptables ($4-5 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) en frijol mungo se podían realizar tratamientos con soluciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ de 1,900 mg/L , es decir, 0.19% durante 15 min, sin afectar negativamente la germinación, lo que resulta más acorde a lo encontrado en este estudio.

4. CONCLUSIONES

Desinfección e inocuidad

Ninguno de los tratamientos de desinfección de semilla de siembra de germinados de maíz utilizado, afecta negativamente la calidad fisiológica de la semilla ni su capacidad de germinación.

Cuando no se utiliza tratamientos de desinfección en la semilla de siembra de germinados, la incidencia de patógenos en el germoplasma usado es de 40% para maíz rojo y 34% para maíz azul.

En la variedad del maíz rojo todos los tratamientos de desinfección usados mantienen la misma eficiencia para controlar la incidencia de patógenos durante las primeras 72 h de germinación y crecimiento de los germinados.

En maíz azul el tratamiento de desinfección de semilla con hipoclorito de calcio al 0.4% es el más efectivo para controlar y reducir la incidencia de patógenos durante la germinación.

Desinfección y contenido de fenoles

En maíz rojo los tratamientos de desinfección de semilla con hipoclorito de calcio, independientemente de su concentración, no afectan la concentración de fenoles libres.

En maíz azul todos los tratamientos evaluados de desinfección de semilla reducen el contenido de fenoles libres con respecto al testigo. Sin embargo, los tratamientos con plata coloidal lo reducen en menor proporción.

Comparado con el testigo, el tratamiento con plata coloidal a 1.4 ppm no cambia la concentración de fenoles libres, sin embargo, el tratamiento con 2.8 ppm de plata coloidal aumenta en 17% la concentración de fenoles libres.

En germinados de maíz azul, independientemente del tratamiento de desinfección, la concentración de fenoles libres es más del doble con respecto a los germinados de maíz rojo (305.293 y 147.034 mg/100g de germinado, respectivamente).

El tratamiento recomendable para la desinfección de semillas destinadas a la producción de germinados de maíz rojo y azul para la alimentación humana; que no afecta la capacidad de germinación de la semilla, disminuye la incidencia de patógenos y no reduce la concentración de fenoles libres, es el tratamiento con plata coloidal a una concentración de 1.4 ppm.



Instituto de Horticultura

5. LITERATURA CONSULTADA

Arriagada, V. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Universidad Católica de Chile. Bogotá, Colombia. El Semillero.

Astrid Garzón G. 2008. Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No. 3, 2008 27 - 36

Bakan, B., A. C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault-Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2826-2831.

Beveridge J.T. 1988. The bacterial surface: general considerations towards design and function. *Can. J. Microbiol.* 34: 363-372.

Bernabel Yauri H. O., Quispe Ureta M. S. 2013. Efecto del PH y dosis de Hipoclorito de Calcio, en la degradación oxidativa de efluentes líquidos cianurados y su aplicación en la remoción de metales pesados (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería. Lima Perú.

Coutiño Rodriguez E. M. R. 2015. Plata Coloidal: Xenobiótico, antígeno y disruptor hormonal. *Rev. educ. bioquím* vol.34 no.1 México mar. 2015

Fett, W.F., 2002. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on laboratory-inoculated mung bean seed by chlorine treatment. *J. Food Prot.* 65, 848–852.

García J. C., Hernández C. A., Acebo Y., Rives N. 2008. Obtención de un nuevo método de desinfección de semillas de arroz. *Cultivos Tropicales*, 29(4), 55-59.

Makkar H. P. S., Bluemmel M., Borowy N. K., Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161-165.

Mishra V., Abrol G. S., Dubey N. 2018. Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* Chapter 14. pp 253-272.

Moyo S. M., Serem J.C., Bester M.J., Mavumengwana V., Kayitesi E. 2019. Influence of boiling and subsequent phases of digestion on the phenolic content, bioaccessibility, and bioactivity of *Bidens pilosa* (Blackjack) leafy vegetable. *Food Chemistry* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126023>

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H. & Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78- 141.

Khalil, R.K.S., & Gomma, M.A.E. (2016). Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in fruits and vegetables sold at local street markets in Alexandria, Egypt. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 199-210.

Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* vol. 4 no. 2 June 2008

Ricco R. A., Agudelo I. J, Wagner M. L., Wagner R. A., Agudelo M. L. 2015. Métodos empleados en el análisis de polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52 (2): 161–174, 2015.

Sánchez Pérez M.I., Muñoz Mejía C. Y., Quiroz Velásquez J. C., Mayek Pérez N., Hernández Mendoza J. L. 2010. Cambios fisicoquímicos durante la germinación del maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.1 Núm.1 1 de enero-31 de marzo, 2010 p. 89-93

Suslow T. 2010. Chlorination in the production and postharvest handling of fresh fruits and vegetables. Extension Specialist Postharvest Pathology, Transportation & Distribution University of California – Davis.

Varga M., Horvatic J., Barisic L., Loncaric Z., Sikiric M. D., Erceg I., Kocic A., Camagajevac I. S., 2018. Physiological and biochemical effect of silver on the aquatic plant *Lemna gibba* L.: evaluation of commercially available product containing colloidal silver. *Aquatic Toxicology* AQTOX 5072. S0166-445X (18)30864-6
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.018>

Instituto de Horticultura

TEMPERATURA Y TIEMPO DE GERMINACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES LIBRES EN GERMINADOS DE SEMILLA DE MAÍZ ROJO Y AZUL.

TEMPERATURE AND GERMINATION TIME ON THE CONTENT OF FREE PHENOLS IN GERMINATED OF RED AND BLUE CORN SEED.

¹RESUMEN

La incorporación de germinados de maíz en la dieta humana por su contenido de compuestos bioactivos representa una opción viable para combatir el efecto negativo del estrés oxidativo. Durante la germinación se sintetizan y concentran una gran cantidad de compuestos fenólicos en las paredes celulares ($\pm 85\%$), al ser insolubles no están biodisponibles para nuestro organismo. En este estudio se utilizaron 2 variedades de maíces (rojo y azul), 3 temperaturas de germinación (10° , 25° y 30°C) y 7 puntos de cosecha para determinar qué condiciones promovían una mayor producción de fenoles libres. En promedio e independientemente de los días de siembra a cosecha, los germinados procedente de maíz azul contienen una mayor concentración de fenoles libres comparados con los germinados de maíz rojo (491.05 y 449.56 mg /100g harina de germinado respectivamente). En ambas variedades de maíz (rojo y azul) el tiempo de siembra a cosecha de los germinados (días) es clave para la acumulación progresiva de fenoles libres en las estructuras vegetales alcanzando su máximo valor en el día 7 (756.29 y 973.69 mg/100g de harina de germinado para maíz rojo y azul respectivamente). Las condiciones óptimas para la producción germinados con alto contenido de fenoles libres fueron al usar la variedad de maíz azul y someterla a proceso de germinación con una temperatura estable de 25°C durante 7 días.

PALABRAS CLAVE: estrés oxidativo, fenoles libres, compuestos fenólicos, germinados, pared celular.

ABSTRACT

The incorporation of corn sprouts in the human diet due to its content of bioactive compounds represents a viable option to combat the negative effect of oxidative stress. During germination, many phenolic compounds are synthesized and concentrated in the cell walls ($\pm 85\%$), as they are insoluble and are not bioavailable to our body. In this study, 2 varieties of corn (red and blue), 3 germination temperatures (10° , 25° and 30°C) and 7 harvest points were used to determine which conditions promoted a greater production of free phenols. On average and regardless of the days from sowing to harvest, sprouts from blue corn contain a higher concentration of free phenols compared to sprouts from red corn (491.05 and 449.56 mg / 100g sprouted flour respectively). In both varieties of corn (red and blue), the time from sowing to harvest of the sprouts (days) is key for the progressive accumulation of free phenols in the plant structures, reaching its maximum value on day 7 (756.29 and 973.69 mg / 100g of sprout flour for red and blue corn respectively). The optimal conditions to produce sprouts with a high content of free phenols were when the blue corn variety was used and subjected to a germination process with a stable temperature of 25°C for 7 days.

KEY WORDS: oxidative stress, free phenols, phenolic compounds, sprouts, cell wall.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Carlos Vidal Carreño Carrillo

Director de tesis: Dr. Clemente Villanueva Verduzco

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es un problema de salud pública que afecta a gran parte de la población en México y provoca diversas enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, gástricas, respiratorias, neurológicas y del sistema endocrino principalmente (Núñez, 2011). Este estrés es provocado por un desbalance entre la producción de radicales libres y los antioxidantes exógenos o endógenos, este desequilibrio puede ser asociado con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres (Quintanar et al, 2009).

En México y el mundo el maíz es un cereal ampliamente consumido en diversas formas, además, tiene un mayor contenido de compuestos bioactivos que funcionan como antioxidantes (fenoles) en comparación con otros granos de gran importancia mundial (trigo, arroz y avena) siendo de 15.55 μmol de ácido gálico/g de grano, superando casi al doble al trigo que es el grano que más se le acercaba con 7.99 μmol de ácido gálico/g de grano, sin embargo, la mayoría de estos fenoles en el maíz (85%) se encuentran ligados a distintos compuestos de la pared celular por lo que son insolubles y por lo tanto, no biodisponibles para el organismo humano (Adom y Liu 2002).

Durante la germinación ocurren diversos procesos metabólicos y cambios fisiológicos, a través de los cuales se producen diferentes sustancias que la planta necesita y que pueden ser aprovechadas para una dieta humana balanceada y rica en compuestos bioactivos que ayuden a mitigar los efectos del estrés oxidativo.

La enzima responsable para iniciar la producción de fenoles es la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) la cual media el primer paso de la ruta del fenilpropanoide y cataliza la transformación de fenilalanina en ácido cinámico (Han et al. 2019). Algunos de los factores que estimulan la acción de la PAL son temperaturas bajas (10°C) (Bilska et al. 2018).

El objetivo de este estudio es establecer la temperatura y el tiempo en días de siembra a cosecha óptimos para aumentar la concentración de fenoles libres en germinados de semillas de maíz rojo y azul, así como determinar el contenido de fenoles libres en germinados de maíz de semilla roja y azul a través del tiempo en días de siembra a cosecha.

La hipótesis es que mediante un experimento factorial con niveles de temperatura, tiempo de crecimiento y variedades de maíz con semilla de color, es posible obtener una buena aproximación al manejo de sistemas controlados de producción de germinados que maximicen la acumulación de fenoles libres en germinados de maíz ricos en antioxidantes para el consumo humano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial, el primer factor es el color de semilla, con dos niveles: semilla roja y azul; el segundo factor es temperatura de germinación, con 3 niveles: 10°C, 25°C y 30°C y el tercer factor son días a cosecha, con 7 niveles: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días después de la siembra para los tratamientos a 25 y 30°C y 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días para los tratamientos a 10°C; dando un total de 42 tratamientos, con 3 repeticiones. La unidad experimental fueron cajas de Petri de 150 X 15 mm con una toalla húmeda de algodón en el fondo y 50 semillas.

Instituto de Horticultura

Cuadro 1. Definición de diseño de tratamientos con arreglo factorial.

Tratamiento	Color de semilla	Temperatura (°C)	Días a la cosecha	Tratamiento	Color de semilla	Temperatura(°C)	Días a la cosecha
1			7	22			7
2			14	23			14
3			21	24			21
4		10	28	25		10	28
5			35	26			35
6			42	27			42
7			49	28			49
8			1	29			1
9			2	30			2
10			3	31			3
11	Azul	25	4	32	Rojo	25	4
12			5	33			5
13			6	34			6
14			7	35			7
15			1	36			1
16			2	37			2
17			3	38			3
18		30	4	39		30	4
19			5	40			5
20			6	41			6
21			7	42			7

2.2 Análisis estadístico

Se realizaron dos análisis estadísticos por separado, debido a que los tratamientos donde la temperatura de germinación fue baja (10°C) el proceso de germinación fue lento provocado por una reducción en la tasa metabólica, es por eso que los días a cosecha para los tratamientos sometidos a estas temperaturas

corresponden a 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días, mientras que los días a cosecha para los tratamientos sometidos a temperaturas de 25 y 30°C fueron de: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días.

El modelo 1 corresponde a los germinados que crecieron bajo condiciones de 25 y 30°C y es el siguiente:

$$y = \mu + C_i + T_j + D_k + CT_{ij} + CD_{ik} + TD_{jk} + CTD_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

y = concentración de fenoles $i = 1, 2$ (i – ésimo color de semilla)
 μ = media general del experimento $j = 25, 30$ (j – ésima temperatura)
 C_i = Color de la semilla $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ (k – ésimo día)
 T_j = Temperatura de germinación
 D_k = Días a cosecha
 ϵ_{ijk} = Error asociado a la observación ijk

El modelo 2 corresponde al análisis que se realizó a los germinados que crecieron a una temperatura de 10°C y es el siguiente:

$$y = \mu + C_i + D_j + CD_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

y = concentración de fenoles $i = 1, 2$ (i – ésimo color de semilla)
 μ = media general del experimento $j = 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49$ (j – ésimo día)
 C_i = Color de la semilla
 D_j = Días a cosecha
 ϵ_{ij} = Error asociado a la observación ij

2.3 Obtención del material vegetal y establecimiento del experimento

Las dos variedades de maíz de semilla azul y roja con que se trabajó fueron recolectadas en el mercado municipal de la localidad de Chilchotla, Puebla (19°15'00"LN 97°11'00"LW) a una altitud media de 2,200 msnm, una precipitación total anual de 941.6 mm y una temperatura media anual de 11.6°C.

La primera parte del experimento fue la obtención de los germinados (maíz rojo y azul) a diferentes temperaturas (10°C, 25°C y 30°C) y con distintos tiempos de germinación (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días para 25° y 30°C y 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días para 10°C). Para los tratamientos a 25°C y 30°C se utilizaron dos cámaras germinadoras marca LAB-TECH y para los tratamientos a 10°C un refrigerador marca MABE del laboratorio de semillas del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el km 38.5 de la carretera México- Texcoco, Texcoco de Mora, Edo. de México.

La segunda parte fue la determinación de fenoles se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) de la Universidad Autónoma Chapingo en la misma ubicación.

2.4 Lavado de semilla

Las semillas se lavaron con agua destilada y detergente en polvo común (Roma^{MR}), posteriormente se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril hasta que el agua dejara de salir turbia, para después dejarlas inmersas durante 15 minutos en 1L de una solución de plata coloidal ionizada a una concentración de 1.4 ppm (8 gotas de MICRODYN^{MR} · L⁻¹ de agua), pasado ese tiempo se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril para retirar residuos de la solución desinfectante.

2.5 Germinación de semillas

Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri plásticas estériles de 100 X 15 mm sin divisiones. Se colocó una base de algodón en cada caja y de manera preventiva para evitar la proliferación de hongos se humedeció por única ocasión con una solución de plata coloidal ionizada a una concentración de 0.175 ppm (1 gota de MICRODYN^{MR}. L⁻¹ de agua). Posteriormente se colocaron 50 semillas por caja y se agregaron 50 ml de agua destilada estéril, retirando cualquier exceso de agua. Los riegos posteriores fueron con 20 ml de agua destilada estéril cada dos días.

Una vez preparadas las cajas Petri se introdujeron a una cámara germinadora calibrada a 25°C y 30°C, según fuera el caso del tratamiento y a una humedad relativa (HR) de 80% para ambas. En el caso de los tratamientos a 10°C, se usó un refrigerador de tipo doméstico al cual se adaptó una lámpara de 100W, en todos los casos la germinación se llevó a cabo en presencia de luz.

2.6 Liofilización de las muestras

Cumplido el tiempo de desarrollo del germinado (de acuerdo con cada tratamiento), las muestras se congelaron a -80°C para someterlas a un proceso de liofilización durante 72 h, una vez eliminado el contenido de agua las muestras se trituraron con un molino para café de la marca Hamilton Beach y se almacenaron en un desecador hasta su análisis.

2.7 Extracción de fenoles

Se utilizó el método de extracción de Folin-Ciocalteu con las siguientes modificaciones (Bakan *et al.* 2003); se usó 1 g de harina de maíz y se agregó el metanol en agua (15 ml) al 80% (v/v), la muestra fue homogenizada con un vortex y puesta en baño maría a 90°C durante 20 min, se dejó reposar la muestra en oscuridad por 24 h a 4-5°C. Pasado este tiempo, los extractos fueron centrifugados

durante 5 min a 3500 rpm, los sobrenadantes fueron recuperados para cuantificar fenoles libres.

2.8 Cuantificación de fenoles libres

La cuantificación de fenoles se hizo mediante el método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Ling Xiao *et al.* (2014). Fueron tomados 20µl del extracto y se colocaron en tubos Eppendorf de 1 ml, les fueron agregados 280 µl de agua destilada, 50 µl del reactivo de Folin y 250 µl de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 7.5% (p/v) y se dejaron reaccionar durante 40 min en oscuridad y a 4°C antes de las lecturas. Todo se realizó por triplicado.

A diferentes condiciones de temperatura en un espectrómetro lector de microplacas (Varioskan Flash Spectral Lector multimodo de escaneo, Thermo Scientific) en placas de 96 pozos donde se colocaron 200 µl de cada muestra por pozo, se realizó una lectura de absorbancia de UV-VIS a 756 nm en todos los extractos metanólicos tratados con solución de Folin-Ciocalteu/carbonato.

Una solución madre de ácido gálico a 100 ppm se utilizó para hacer la curva de calibración. A partir de esta solución, se prepararon diez reacciones de Folin con concentraciones crecientes conocidas de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 ppm de ácido gálico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de ácido gálico usadas para elaborar la curva de calibración.

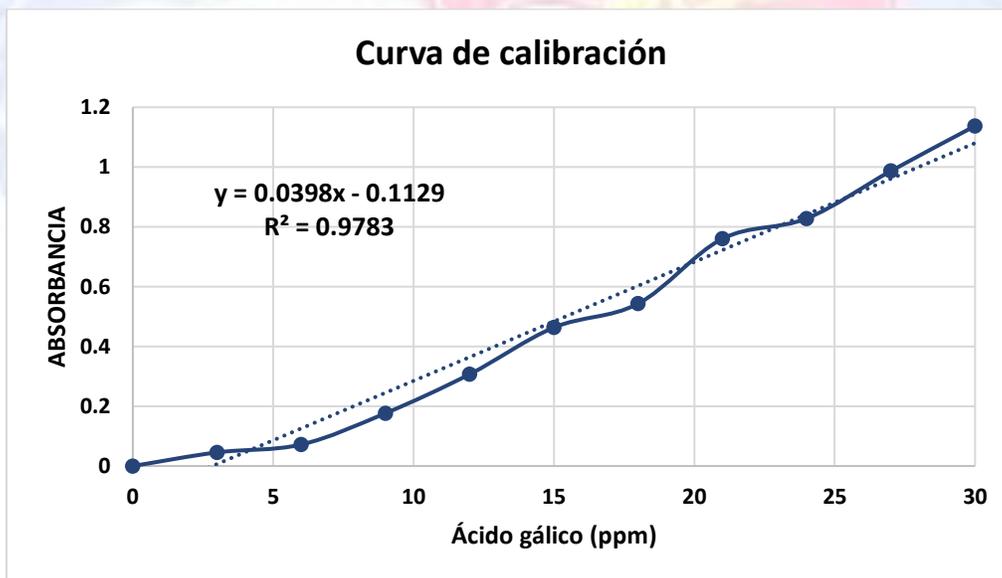
Reactivos	Concentraciones (ppm) de ácido gálico de la curva estándar									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Ácido gálico (µl)	18	36	54	72	90	108	126	144	162	180
Agua (µl)	282	264	246	228	210	192	174	156	138	120
Reactivo Folin (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Carbonato de sodio (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que el ácido gálico pertenece a la familia de los polifenoles y al grupo de los taninos hidrolizables, además de ser de fácil obtención, puede usarse como referente en métodos cuantitativos para calcular la concentración de fenoles en una solución. Por lo tanto, la proporción de 1 mg de ácido gálico es equivalente a 1 mg de fenol.

La concentración de fenoles libres (ppm) de cada muestra se calculó a partir de su equivalencia con ácido gálico, el cálculo se hizo despejando la ecuación de la recta que se originó en la curva de calibración (Figura 1) y sustituyendo el valor de absorbancia de cada muestra, dado por el espectrofotómetro.

Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico.



Ecuación de la recta:

$$y = -0.1129 + 0.0398x$$

$y = \text{absorbancia}$

$x = \text{ácido gálico (ppm)}$

Despeje:

$$x = \frac{y + 0.1129}{0.0398} \quad \rightarrow \quad \text{ácido gálico (ppm)} = \frac{(\text{absorbancia}) + 0.1129}{0.0398}$$

Obtenida la equivalencia de fenoles libres con el ácido gálico (ppm) correspondiente a cada muestra, el contenido de fenoles libres (FL) se reportó en: mg de ácido gálico/100 g de harina, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ácido gálico (ppm)} \times \frac{15\text{ml de metanol (solvente)}}{1\text{g de harina}} \times 100 = \frac{\text{mg de ácido gálico}}{100\text{g de harina}}$$

3.1 Concentración de fenoles libres en germinados desarrollados a 25° y 30°C

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de fenoles libres (CFL). Modelo 1, para germinados a 25 y 30°C.

FV	GL	CFL
Modelo	25	130597.25**
C	1	32,570**
T	1	40,182**
D	6	478,851.646**
CxT	1	230.122
CxD	6	32,690.75**
TxD	6	11,515.57*
CxTxD	4	13,400.13*
Error	52	4,191
Total	77	45,232.4
R²	-	0.93
CV	-	13.75

CFL=Concentración de fenoles libres, C=color de semilla, T= temperatura de germinación, D=días a cosecha, * p<0.05, ** p<0.01.

De acuerdo con el análisis de varianza ($p < 0.01$) se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias para cada uno de los tres factores evaluados (C= color de semilla, T= temperatura de germinación y D= días a cosecha).

Las interacciones de CxD (Color de semilla/Días a cosecha), TxD (Temperatura de germinación/Días a cosecha) y la triple interacción CxTxD (Color de semilla/Temperatura de germinación/Días a cosecha), mostraron significancia lo que implica que estas interacciones influyen directamente en la concentración de fenoles libres. A diferencia de la interacción CxT (Color de semilla/Temperatura de germinación) que no mostró significancia por lo que no influye directamente en la variable respuesta.

Cuadro 4. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) por color de grano de maíz y temperatura de germinación.

Semilla	CFL (mg/100g de harina)	Temperatura (°C)	CFL (mg/100g de harina)
Azul	491.05 a	25	491.67 a
Rojo	450.18 b	30	449.56 b
DMS	29.42	DMS	29.42

CFL= concentración de fenoles libres. DMS= Diferencia significativa mínima de Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

La concentración de fenoles libres (CFL) fue significativamente mayor en la variedad de maíz de semilla azul (491.05 mg/100 g de harina de germinado) con respecto a la variedad de semilla roja (450.18 mg/100 g de harina de germinado). La temperatura a la que se obtuvo una concentración significativamente mayor de fenoles libres (491.67 mg/100 g de harina de germinado) fue a los 25°C (Cuadro 4).

Cuadro 5. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para días a cosecha de germinados de maíz (para 25° y 30°C)

CFL (mg/100g de harina)			
Días a cosecha	Maíz rojo	Maíz azul	Promedio
7	756.29 a	973.69 a	828.75 a
6	686.53 a	655.22 b	670.87 b
5	490.55 b	565.83 bc	528.19 c
4	453.76 b	479.34 cd	470.81 c
3	415.77 bc	342.08 ed	378.92 d
2	343.43 cd	228.77 ef	286.10 e
1	272.37 d	168.09 f	220.23 e
DMS	103.26	147.77	10.95

CFL= concentración de fenoles libres. DMS= Diferencia mínima significativa Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

Los germinados que se desarrollaron en condiciones de 25° o 30°C tuvieron un incremento en la CFL directamente progresivo con el tiempo en días de siembra a cosecha y se incrementó a través de los días alcanzando su máximo valor a los 7 días de cosecha (756.29 mg/100g de harina de germinado en el caso de maíz rojo y 973.69 mg/100g de harina de germinado en el caso de maíz azul) (Cuadro 5).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Xiang y colaboradores en 2017, quienes analizaron el efecto de la luz y la oscuridad en la biosíntesis de compuestos fenólicos durante la germinación de maíces dulces y encontraron que los valores de ácido gálico correspondientes al contenido de fenoles libres no aumentaron durante la germinación, en cambio, eran los valores de ácido gálico correspondientes a fenoles asociados los que aumentaban de 23.92% a 43.88%. Lo cual indica que para incrementar el contenido de fenoles libres en germinados es mejor atender el control de la temperatura (alta) de germinación y desarrollo de los germinados que la oscuridad o la luz.

3.2 Concentración de fenoles libres en germinados de maíz (10°C)

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de fenoles libres (CFL). Modelo 2, para germinados a 10°C.

F.V.	G.L.	CFL
Modelo	13	12,856.08**
C	1	17,178.91**
D	6	20,739.34**
CxD	6	4,252.35**
Error	28	868.61
Total	41	4,669.52
R²	-	0.87
CV	-	9.66

CFL=Concentración de fenoles libres, C=color de semilla, D= días a cosecha, *p<0.05, **p<0.01.

Cuando la temperatura de germinación fue de 10°C, la variedad de maíz azul concentró una cantidad significativamente mayor de fenoles libres (325.04 mg/100g de harina de germinado) con respecto a la variedad de maíz rojo (284.59 mg/100g de harina de germinado) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para germinados de maíz rojo y azul a 10°C.

Maíz	CFL (mg/100g de harina)
Azul	325.04 a
Rojo	284.59 b
DMS	18.6

CFL= Concentración de fenoles libres. DMS= Diferencia mínima significativa. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

En maíz rojo la CFL se mantiene igual durante los primeros 21 días de germinación (251.88 mg/100g de harina de germinado). Durante el día 28 de germinación hubo un incremento significativo del 66% en la CFL, pasando de

251.88 a 418.27 mg/ 100g de harina de germinado y manteniéndose estadísticamente igual hasta el día 49 de germinación (Cuadro 8).

En los germinados de maíz rojo crecidos en temperaturas de 10°C la concentración de fenoles libres se mantiene igual durante los primeros 21 días de germinación y en el caso del maíz azul durante los primeros 28 días de germinación (251.88 y 273.4 mg/100g de harina de germinado para maíz rojo y azul respectivamente). Posteriormente, a los 28 días de germinación en el caso del maíz rojo y 35 días de germinación en el maíz azul alcanzan el máximo valor en las concentraciones de fenoles libres (418.27 y 314.17 mg/100g de harina de germinado para maíz rojo y azul respectivamente).

Bilska y colaboradores (2018) analizaron el efecto de temperaturas bajas (14°C por el día y 12°C por la noche), en plantas de *Miscanthus* y *Zea mays*; ellos encontraron cambios fisiológicos, anatómicos, y bioquímicos en ambas especies atribuidos a este factor. Una de las variables evaluadas fue la concentración de fenoles ligados a la pared celular del maíz. La línea de maíz evaluada registró un incremento de 33% en la concentración de fenoles ligados a la pared en los tratamientos donde se aplicaron temperaturas bajas por más de 28h y hasta 3 días.

Lo anterior podría explicar en parte el comportamiento de las variedades de maíz evaluadas (rojo y azul) puesto que al ser sometidas a temperaturas bajas (10°C) durante un tiempo prolongado (hasta 49 días) al igual que la líneas de maíz evaluadas por Bilska y colaboradores (2018) los niveles de fenoles ligados se incrementaron, sin embargo, ese cambio fue imperceptible en este estudio ya que solo se analizaron fenoles libres.

Uno de los factores que estimulan la acción de la Fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima responsable de iniciar la ruta del fenilpropanoide, son las temperaturas bajas cercanas a los 10°C (Uratani y Asahi, 1980); esta enzima es la responsable de transformar la fenilalanina en ácido cinámico para su incorporación en la ruta

de síntesis del fenilpropanoide e incrementar la formación de fenoles totales dentro de la planta.

Cuadro 8. Comparaciones de medias de la concentración de fenoles libres (CFL) para días a cosecha de germinados de maíz (a 10°C).

CFL (mg/100g de harina)			
Días a cosecha	Maíz rojo	Maíz azul	Promedio
49	363.28 a	342.44 ab	352.86 a
42	367.16 a	359.38 a	363.27 a
35	368.68 a	314.17 ab	341.43 a
28	418.27 a	273.4 bc	345.84 a
21	251.88 b	277.94 bc	264.91 b
14	250.4 b	213.76 c	232.08 b
7	255.62 b	211.06 c	233.34 b
DMS	79.65	84.6	53.97

CFL= concentración de fenoles libres. DMS= Diferencia mínima significativa Tukey. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

El estrés por germinación y crecimiento de los germinados en frío (10°C) y en altas temperaturas (25° y 35°C) induce formación de fenoles libres.

En maíz rojo la concentración de fenoles llega al máximo a los 28 días (418.27 mg/100g de harina de germinado); mientras que en maíz azul el notable incremento en la CFL ocurre a los 35 días (pasa de 273.4 a 314.17 mg/100g de harina de germinado).

Al comparar los cuadros 5 y 8 se observa que con la germinación y crecimiento de los germinados a alta temperatura (en promedio de 25° y 30°C la acumulación fenoles libres es más eficiente que a baja temperatura (10°C), tanto en maíz de color rojo como en azul, por dos hechos principales:

1) La cantidad final acumulada mucho más alta. El maíz rojo a 10°C acumula 363.28 mg/100g de harina de germinado en 49 días de germinación, mientras en promedio de 25° y 35°C acumula 756.29 mg/100g de harina de germinado a los 7 de germinación (cuadros 5 y 8). En tanto que el maíz azul a 10°C acumula 342.44 mg/100g de harina de germinado a los 49 días de germinación y en promedio de 25° y 35°C acumula 973.69 mg/100g de harina de germinado a los 7 días de germinación y

2) por el tiempo mucho más corto para lograr la acumulación. El germinado de maíz rojo a 10°C, acumula 363.28 mg/100g de harina de germinado a los 49 días de germinación a cosecha; en contraste, en promedio de 25° y 30°C acumula 756.29 mg/100g de harina de germinado (un incremento de 108.18%) a los 7 días después de la siembra; lo que en términos de tiempo homologado, llevando el sistema de alta temperatura a los 49 días que dura el germinado para cosecharse cuando se maneja a 10°C, representa una superioridad de 757.26% en la CFL cuando el germinado se maneja en alta temperatura (Cuadro 9).

Cuadro 9. Máximos acumulados de concentración de fenoles libres (CFL) a los 49 días de germinación (10°C) y a los 7 días de germinación (promedio de 25 y 30°C) para maíz rojo y azul.

Días a cosecha	Maíz rojo		Maíz azul	
	CFL	% de incremento ¹	CFL	% de incremento ²
49	3,114.15	757.23	4,761.18	1,290.37
42	2,721.25	649.08	4,129.92	1,106.03
35	2,328.26	540.9	3,498.67	921.69
28	1,935.26	432.72	2,867.42	737.35
21	1,542.26	324.54	2,236.16	553.01
14	1,149.27	216.36	1,604.91	368.67
7	756.29	108.18	973.69	184.33

CFL: concentración de fenoles libres (mg/100g de harina). ¹: Con respecto a la CFL en maíz rojo a los 49 días de germinación a 10°C (363.28 mg/100g de harina). ²: Con respecto a la CFL en maíz azul a los 49 días de germinación a 10°C (342.44 mg/100g de harina).

Equivalentemente, el germinado de maíz azul a 10°C acumula 342.44 mg/100g de harina de germinado a los 49 días después de la siembra; en contraste, a temperatura alta (en promedio de 25° y 30°C) acumula 973.69 mg/100g de harina de germinado (un incremento de 184.33%) a los 7 días de la siembra; lo que de tiempo homologado es una superioridad de 1,290.31% en la CFL, llevando el sistema de alta temperatura a los mismos 49 días que dura el germinado para cosecharse manejado a 10°C (Cuadro 9).

4. CONCLUSIONES

La concentración de fenoles libres es estadísticamente mayor en la variedad de maíz azul (491.05 mg/100 g de harina de germinado) que en la de semilla roja (450.18 mg/100 g de harina de germinado), independientemente de la temperatura en que se desarrollan los germinados.

La temperatura a la que se obtiene la mayor concentración de fenoles libres en el germinado de semilla de maíz roja y azul es a los 25°C.

Los germinados de maíz rojo y azul desarrollados a temperaturas de 25° y 30°C, tienen un crecimiento progresivo en la concentración de fenoles libres, con un salto notable en el contenido, entre los 21 y 28 días después de la siembra.

A 25°C el máximo valor en el contenido de fenoles libres se alcanza con 7 días de siembra a cosecha del germinado, tanto en maíz rojo (756.29 mg/100g de harina de germinado) como en el maíz azul (973.69 mg/100g de harina de germinado).

La mejor combinación de factores para maximizar la concentración de fenoles libres en germinados de semilla de maíz para la alimentación humana es usar la variedad de maíz azul y dejarla en crecimiento durante 7 días a una temperatura constante de 25°C.

5. LITERATURA CONSULTADA

Adom K. F., Liu R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182 – 87.

Bakan, B., A. C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault- Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2826-2831.

Bilska-Kos A, Panek P, Szulc-Głaz A, Ochodzki P, Cisło A, Zebrowski J. 2018. Chilling-induced physiological, anatomical and biochemical responses in the leaves of *Miscanthus x giganteus* and maize (*Zea mays* L.), *Journal of Plant Physiology* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.012>

Han, C.; Li, J.; Jin, P.; Li, X.; Wang, L.; Zheng, Y. The effect of temperature on phenolic content in wounded carrots. *Food Chem.* 2017, 215, 116–123.

Lingxiao Yang, Hui Zhang, Lilin Cheng, Zhonghua Gu, Dan Hua, Xiguang Qi, Haifeng Qian, Li Wang. 2014. Effect of Extrusion on the Hydrophilic Antioxidant Capacity of Four Whole Grains. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, Vol. 2, No. 2, 80-87

Núñez, A. 2011. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública.* 2011; 37 (supl.): 644-60.

Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* vol. 4 no. 2 June 2008.

Quintanar, M., Calderón, J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Rev Educación Bioq.* 2009; 28 (3):89-101.

Ricco R. A. Wagner M. L., Agudelo I. J., 2015. Métodos empleados en el análisis de polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52 (2): 161–174, 2015.

Sánchez Pérez M.I., Muñoz Mejía C. Y., Quiroz Velásquez J. C., Mayek Pérez N., Hernández Mendoza J. L. 2010. Cambios fisicoquímicos durante la germinación del maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.1 Núm.1 1 de enero-31 de marzo, 2010 p. 89-93

Uritani I. Asahi T. 1980. Respiration and related metabolic activity in wounded and infected tissues. *The biochemistry of plants*, Vol. 2 pp 463-485.

METABOLÓMICA DE ANTIOXIDANTES POR RMN EN GERMINADOS DE MAÍCES PIGMENTADOS

1 RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) representa uno de los cereales más cultivados y el más consumido en México. Este alimento comprende compuestos de alto valor nutricional con beneficios comprobados para la salud, como propiedades antioxidantes y bioactivas. Los compuestos clave que proporcionan dichos beneficios incluyen fenoles libres y ligados y fitoquímicos como el tocoferol, que se sintetizan dinámicamente desde la germinación de los granos. Los métodos clásicos para la detección de fenoles libres y ligados, flavonoides, antocianinas o vitaminas, comprenden una serie de complejos conjuntos de preparación de muestras, extracciones, reacciones químicas, lecturas de absorbancia y separaciones por HPLC. Este estudio presenta la huella digital de metabolitos a través de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de dos variedades de *Zea mays* L., desarrollada en un esquema de germinación específico, a tres temperaturas diferentes (10°C, 25°C y 30°C). El modelo propuesto comprende la racionalización de la dinámica del metabolismo fenólico y del tocoferol en función del tiempo de germinación y la temperatura, que pueden identificarse mediante la modulación de la intensidad de la señal de RMN-H1, respectivamente a cambios de frecuencia de 8.6-6.1 ppm y 1.1-0.95 ppm. Se informa una clara correlación inversa entre los anchos de la línea de agua a media altura y la modulación de intensidad de los sitios relevantes, lo que sugiere un mecanismo de cómo el disolvente participa dentro de la formación de la matriz metabólica compleja durante la germinación. Dichas modulaciones de ancho de línea y señal de RMN dependientes del tiempo de brotación se compararon ortogonalmente con un conjunto de análisis de absorbancia UV-VIS y de absorbancia, mientras que las diferentes longitudes de onda clave: 275, 426 y 756 nm corresponden a puntos de inflexión necesario para desenredar una huella digital de absorbancia sistemática dependiente del germinado, ortogonal a los observables de RMN.

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes, fenoles libres y ligados, tocoferol, germinación, absorbancia, metabolitos, Resonancia Magnética Nuclear, dinámica del metabolismo

METABOLOMICS OF ANTIOXIDANTS BY NMR IN SPROUTED PIGMENTED CORN

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) represents one of the most cultivated and most consumed cereals in Mexico. This food includes compounds of high nutritional value with proven health benefits, such as antioxidant and bioactive properties. Key compounds that provide such benefits include free and bound phenols and phytochemicals such as tocopherol, which are dynamically synthesized from seed germination. The classic methods for the detection of free and bound phenols, flavonoids, anthocyanins or vitamins, comprise a series of complex sets of sample preparation, extractions, chemical reactions, absorbance readings and separations by HPLC, this study presents the fingerprint of metabolites through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of two varieties of *Zea mays* L., developed in a specific germination scheme, at three different temperatures (10°C, 25°C y 30°C). The proposed model includes the rationalization of the dynamics of phenolic and tocopherol metabolism as a function of germination time and temperature, which can be identified by modulating the intensity of the H1-NMR signal, respectively at frequency changes of 8.6- 6.1 ppm and 1.1-0.95 ppm. A clear inverse correlation is reported between the widths of the mid-height water line and the intensity modulation of the relevant sites, suggesting a mechanism for how the solvent participates within the formation of the complex metabolic matrix during germination. Said time-dependent NMR signal and line width modulations were compared orthogonally with a set of UV-VIS absorbance and absorbance analyzes, while the different key wavelengths: 275, 426 and 756 nm correspond to inflection points necessary to untangle a sprout-dependent systematic absorbance fingerprint orthogonal to observable NMR.

Key words: Antioxidants, free and bound phenols, tocopherol, germination, absorbance, metabolites, Nuclear Magnetic Resonance, metabolism dynamics.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Carlos Vidal Carreño Carrillo

Director de tesis: Dr. Clemente Villanueva Verduzco

1. INTRODUCCIÓN

Los fenoles en el maíz son bien conocidos por exhibir actividad antioxidante y prebiótica, así como propiedades quimiopreventivas relevantes (Fresco et al., 2006). Sin embargo, diferentes fenotipos de maíz presentan diferentes bioactivos, debido a sus diferentes perfiles fenólicos y de flavonoides. Por ejemplo, el maíz morado, azul y rojo inhiben la carcinogénesis colorrectal en ratas (Hagiwara et al., 2001).

En cuanto a las variedades mexicanas, la actividad antioxidante de *Zea mays* L. azul y blanco mexicano-estadounidense ha sido reportada (Del Pozo-Insfran et al., 2007) y ampliamente estudiada para dieciocho variedades de maíz mexicano nativo (López-Martínez et al., 2009) mientras que la actividad antioxidante está fuertemente correlacionada con el contenido de fenoles libres y ligados, estos últimos representan aproximadamente el 85% del contenido fenólico total (TPC) no solo para el maíz, sino también para el trigo, la cebada, el arroz, la avena y el maíz (Adom y Liu, 2002).

Esas proporciones pueden ser altamente moduladas durante la germinación (Guo et al., 2012), en donde, por un lado, un proceso de germinación de siete días aumenta el TPC y el contenido total de flavonoides (TFC) en el trigo sarraceno (Ren et al., 2014) y, por otro lado, la germinación puede disminuir ambos niveles de TPC y TFC en frijoles (Dueñas et al., 2015), que muestra que los mecanismos de desarrollo fitoquímico durante la germinación varían entre las especies de plantas. Como consecuencia, los beneficios potenciales para la salud de los germinados de semillas han obtenido una gran atención (Swieca et al., 2015).

El objetivo de este estudio es proponer un método analítico novedosos en tiempo real, a través de RMN- ^1H , para rastrear la maquinaria bioquímica durante la germinación que podría arrojar luz sobre estrategias para optimizar condiciones de germinación precisas para maximizar la producción de antioxidantes naturales, de una manera fácil y directa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lavado de semillas

Se recolectaron semillas de maíz pigmentadas en azul y rojo del municipio de Chilchotla, Puebla, México. Todas las semillas se lavaron con jabón y después se enjuagaron con agua destilada antes de sumergirse en una solución coloidal de plata de 1,4 ppm (al 65% p/v, número CAS 7440-22-4) durante 15 min. El procedimiento de lavado termina con un último enjuague con agua destilada para la eliminación total de plata.

2.2 Germinación de semillas

Un conjunto de cincuenta semillas de maíz se colocaron en una placa de Petri de 100 mm x 15 mm de superficie, en función del muestreo seleccionado: dos variedades (maíz azul y rojo), tres temperaturas diferentes (10°C, 25°C y 30°C), siete días de germinación (D+1, D+2, D+3, D+4, D+5, D+6 y D+7) para muestras germinadas a 25°C y 30°C; D+7, D+14, D+21, D+28, D+35, D+42 y D+49 para muestras germinadas a 10°C. Cada placa de Petri tenía una base de algodón que a su vez se humedeció con una solución de 0,175 ppm de plata coloidal al 65% p/v.

Las semillas se colocaron sobre la cama de algodón y se regaron con agua destilada cada 48 h. Se controló la humedad relativa dentro de la germinadora para estar alrededor del 80%. Los ensayos de germinación a 25°C y 30°C se realizaron en una cámara de germinación, y los ensayos de 10°C se realizaron en un refrigerador controlado. En todos los casos, la germinación se realizó en condiciones de luz con lámparas led.

2.3 Harinas de maíz

Una vez que se recogieron los brotes después de terminar cada día de germinación asignado, las muestras se congelaron inmediatamente a -80°C durante 24 h y luego se liofilizaron durante 72 h en el laboratorio de LANISAF. Después de la deshidratación, las muestras se molieron en un molino para café y las harinas obtenidas se almacenaron en un desecador hasta su uso.

2.4. Extracción de compuestos fenólicos en metanol acuoso.

La extracción fenólica se adaptó de (Bakan, 2003) con las siguientes modificaciones: se suspendió 1 g de harina de maíz en 15 ml de metanol acuoso (80% v/v), se homogeneizó la mezcla con agitación exhaustiva con el uso de un vortex. Una vez que la solución se homogeneizó, se aplicó un baño de agua maría a 90°C con agitación manual durante 20 min. Al final se dejaron reposar 24h a $4-5^{\circ}\text{C}$ en oscuridad hasta su uso.

2.5 Determinación de fenoles a dos valores de pH diferentes.

El método Folin-Ciocalteu se adaptó de (Yang, 2014) de la siguiente manera: se agregaron 20 μL del extracto fenólico preparado 24 h antes a una solución que contenía 50 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), 250 μL de una solución de Na_2CO_3 al 7.5% p/v (Sigma Aldrich) y 280 μL de agua destilada y se dejaron reaccionar durante 40 min en oscuridad y a 4°C antes de las lecturas, todo se realizó por triplicado.

El procedimiento anterior se duplicó para tener dos soluciones de Folin-Ciocalteu a diferentes pH (1.0 y 3.0), adicionándole 20 μL de soluciones tampón que permitieron retener el pH como se deseaba.

La curva de calibración se hizo con una solución que contiene una concentración variable pero conocida de ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, número CAS 149-91-7) que iba de 3 a 30 ppm más 50 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 250 μL de Na_2CO_3 (7,5% p/v) y 280 μL de agua destilada.

Se usó la absorbancia a 756 nm para determinar los fenoles totales como miligramos de equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por 100 g de peso seco de la muestra.

2.6 Lectura de barrido UV-VIS espectrofotométrica

Se realizó una lectura de barrido de absorbancia de UV-VIS que abarcó de 200 a 800 nm de todos los extractos metanólicos tratados con solución de Folin-Ciocalteu/carbonato a diferentes condiciones de pH y temperatura en un espectrómetro lector de microplacas de 96 placas (Varioskan Flash Spectral Lector multimodo de escaneo, Thermo Scientific), con un incremento de 2 nm por escaneo.

Los espectros de absorción sin procesar (A) y de primera derivada (ΔA) se procesaron y analizaron con el software Skanlt (V 2.4.5, Thermo Scientific). Los datos de absorbancia relevantes para las cuantificaciones se dedujeron del análisis $A/\Delta A$.

2.7 Resonancia magnética nuclear espectroscópica al estado líquido

La espectroscopía de RMN en estado líquido se realizó con un espectrómetro de RMN a 14,1 T de campo magnético (equivalente a 600 MHz de frecuencia de protones).

La preparación de la muestra comprendía una mezcla de 600 μL de cada extracto fenólico (un conjunto de 21 muestras por variedad de maíz, un total de 42 muestras de RMN), con 75 μL de d_4 -metanol deuterado (Cambridge Isotope Labs).

Se adquirieron los siguientes esquemas de RMN para el conjunto completo de muestras de brotes de maíz azul y rojo:

- a) Se adquirieron experimentos de RMN unidimensional de protón de excitación directa estándar {1D-1H-NMR} con 64 transitorios de puntos complejos de 36K, con retrasos de reciclado de 4s y tiempo de adquisición de 2,3 segundos, que produjeron a su vez tiempos experimentales por muestra de 6'28 ". No se aplicó la función de apodización durante la Transformada de Fourier.
- b) {1Hwater_presat NMR}: experimento NOESY de pulso simple 1D con una presaturación de agua de pulso conformado casera aplicada durante el retardo de relajación (4 segundos) y los tiempos de mezcla (100 ms), con una irradiación de nivel de potencia de 36.3E-5 W (Vázquez- Leyva et al., 2019), se adquirieron para todas las muestras en las siguientes condiciones: se recogieron un total de 64 transitorios en 36 puntos de datos complejos, con un ancho espectral de 7812,5 Hz y tiempos de adquisición de 2,31 segundos, produjeron tiempos experimentales de 6 '26 ".

Para el análisis de la región comprendida entre 10-5.5 ppm (ver figura 4), los espectros se procesaron posteriormente con el uso de una apodización exponencial (con una ampliación de línea de 5Hz durante la Transformada de Fourier). En contraste, todos los análisis llevados a cabo dentro de la región a frecuencias entre 1.4-0.8 ppm (figura 4) se realizaron con espectros sin ninguna función de apodización.

Instituto de Horticultura

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto del pH y temperatura sobre los cambios en $A/\Delta A$ en los extractos de germinados de maíz azul y rojo

Las figuras 1 y 2 presentan respectivamente los espectros de absorbancia de UV-VIS sin procesar y de la primera derivada a diferente pH de los extractos metanólicos de germinados azules (arriba) y rojos (abajo) producidos a diferentes temperaturas, tratados con solución de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido de fenoles.

Las bandas relevantes se resaltan en cada condición:

- i) 275 nm: máximo de todos los espectros de Absorbancia (datos no mostrados para fines de visualización)
- ii) Punto de inflexión dentro de tramos de absorción localizados a 426nm
- iii) Máximo local en espectros de absorbancia a 756nm.
- iv) Dos puntos de cruce por cero dentro de los espectros ΔA ubicados a 426 y 756 nm.

Curiosamente, las pendientes desde estos puntos de cruce cero aumentan con respecto al tiempo de germinación para los brotes obtenidos de D+1 a D+7 a 25 y 30°C. Los datos $A/\Delta A$ de brotes de 10°C revelan dificultades para activar rutas metabólicas clave para obtener fenoles y, por lo tanto, antioxidantes potenciales en tales condiciones termodinámicas, independientemente de los largos períodos seleccionados para la germinación (hasta 49 días).

Instituto de Horticultura

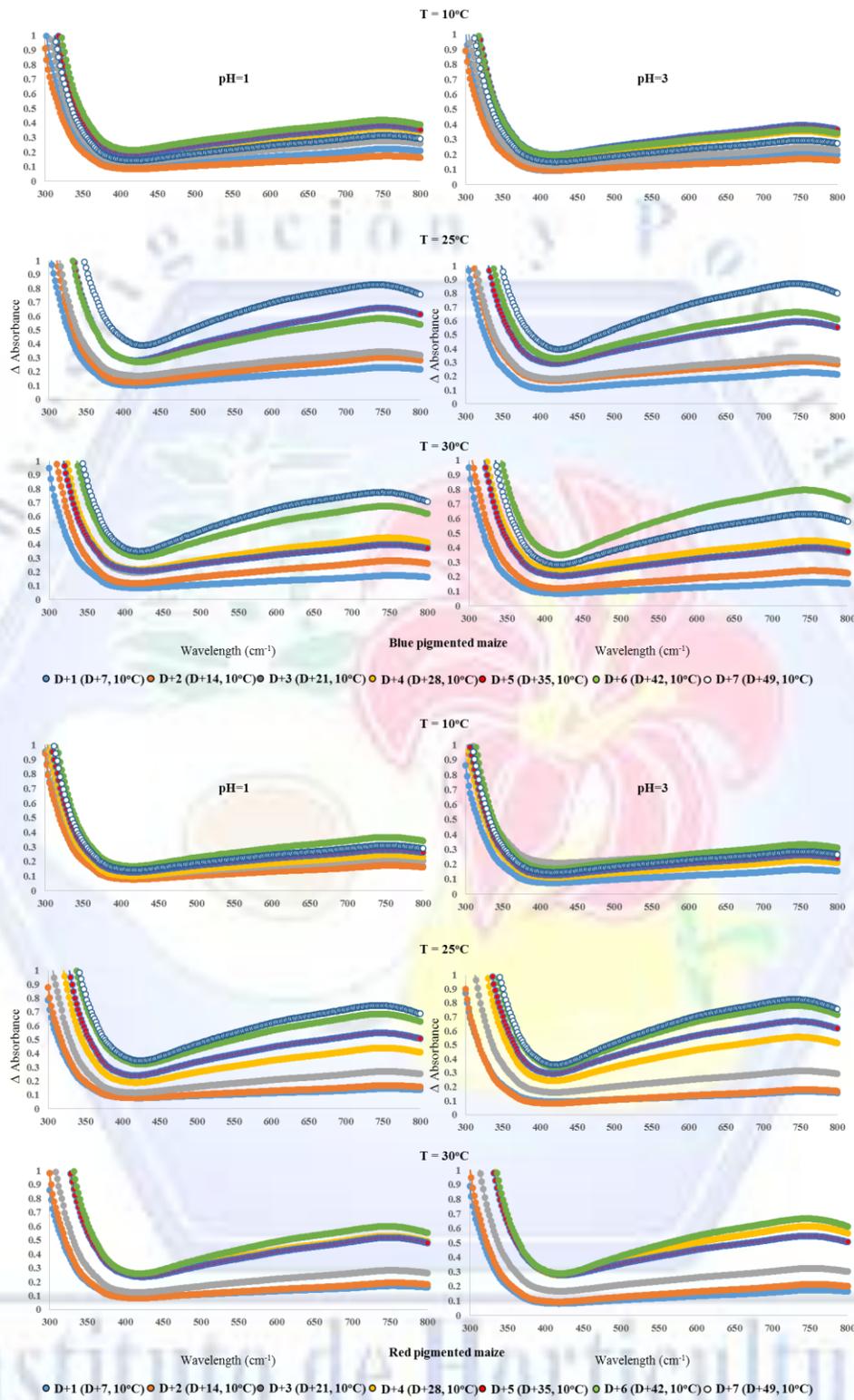
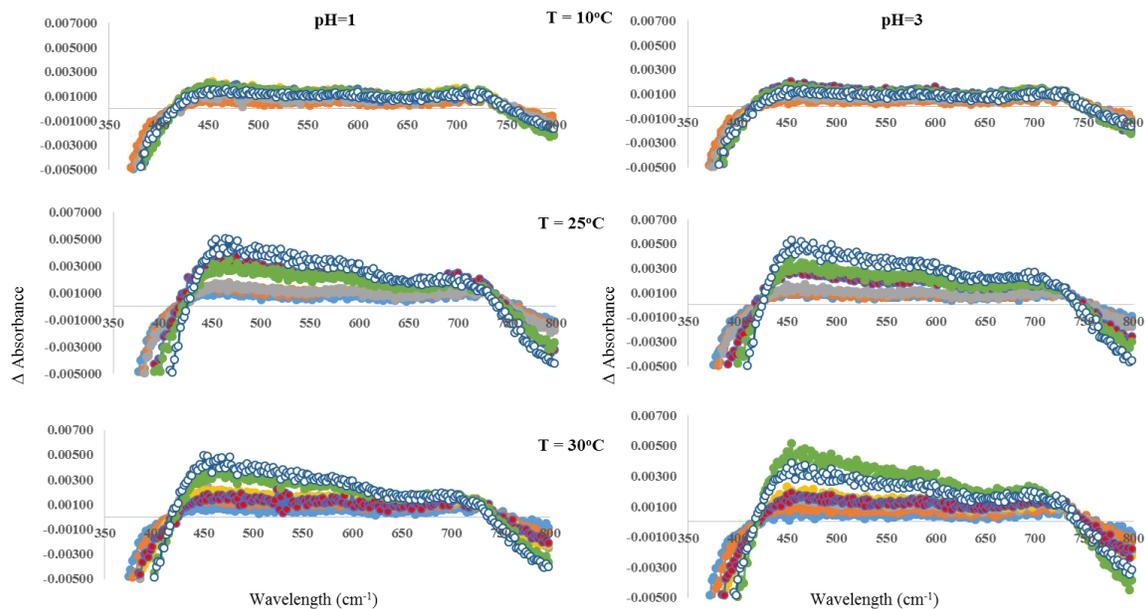
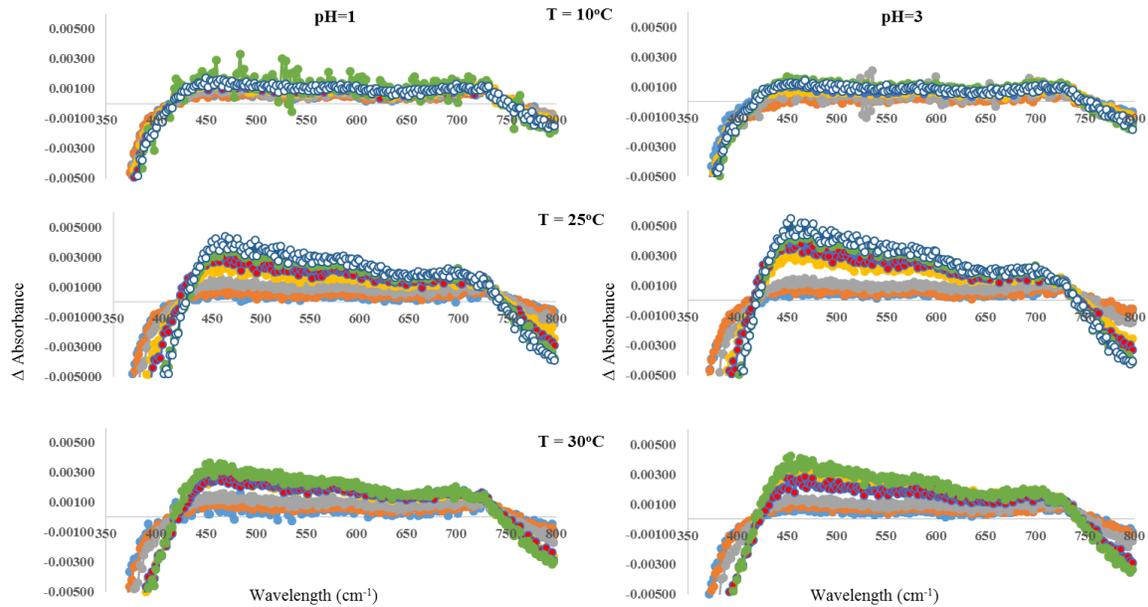


Figura 1. Barrido de absorbancias desde 300-800 nm de germinados de maíz azul (arriba) y rojo (abajo) a diferentes pH y temperaturas de germinación. Para ensayos de 10°C, la germinación se extiende desde D+7 hasta D+49 en periodos de 7 días entre germinado. En contraste, los ensayos de 25°C y 30°C se llevaron a cabo desde D+1 hasta D+7, con un día entre germinado.



Blue pigmented maize

● D+1 (D+7, 10°C) ● D+2 (D+14, 10°C) ● D+3 (D+21, 10°C) ● D+4 (D+28, 10°C) ● D+5 (D+35, 10°C) ● D+6 (D+42, 10°C) ○ D+7 (D+49, 10°C)



Red pigmented maize

● D+1 (D+7, 10°C) ● D+2 (D+14, 10°C) ● D+3 (D+21, 10°C) ● D+4 (D+28, 10°C) ● D+5 (D+35, 10°C) ● D+6 (D+42, 10°C) ○ D+7 (D+49, 10°C)

Figura 2. Barrido de absorbancias de la primera derivada (ΔA) desde 350-800 nm de germinados de maíz azul (arriba) y rojo (abajo) a diferentes temperaturas de pH y germinación. Para ensayos de 10°C, la germinación se extiende desde D+7 hasta D+49 en periodos de 7 días entre germinado. En contraste, los ensayos de 25°C y 30°C se llevaron a cabo desde D+1 hasta D+7, con un día entre cada germinado.

Mientras que los escaneos de absorbancia de brotes obtenidos a 10°C resaltan un perfil típico (pero menos pronunciado) con A máxima a 275 y 756nm, los intervalos de ΔA a 10°C solo muestran los puntos de inflexión de 426 y 756 nm, pero no los incrementos de pendiente dependientes del tiempo de germinación. La dependencia del pH para los incrementos de las pendientes desde los puntos de inflexión en función del brote muestra una ligera mejora de dicha dependencia a un pH=3.

3.2. Perfil 1D - 1H NMR de germinados de maíz azul y rojo y dependencia de la solvatación al tiempo de brotación

Los espectros de RMN de protones unidimensionales estándar representados en la Figura 3 (izquierda) arrojan las siguientes observaciones:

Cuando no se aplica una secuencia de pulso especial para el conjunto completo de soluciones metanólicas de germinados de maíz rojo y azul, sus componentes principales comprenden 3.36 ppm y 4.85 ppm observados de resonancias de metanol y agua respectivamente. La frecuencia a 3.36ppm no sufre ningún cambio significativo en función de la matriz compleja formada durante la germinación o temperatura de germinación para ambas variedades de *Zea mays*.

Sin embargo, se puede hacer un análisis lineal interesante para las resonancias de agua de 4.85 ppm en cada condición seleccionada (Cuadro 1). Para los germinados tratados a 10°C, los anchos de la línea de agua a media altura (LW_{HH}) se mantienen constantes a alrededor de 200-250 Hz, con una señal de doblete para soluciones metanólicas que comprende ambas variedades germinadas durante los primeros 21 días.

Instituto de Horticultura

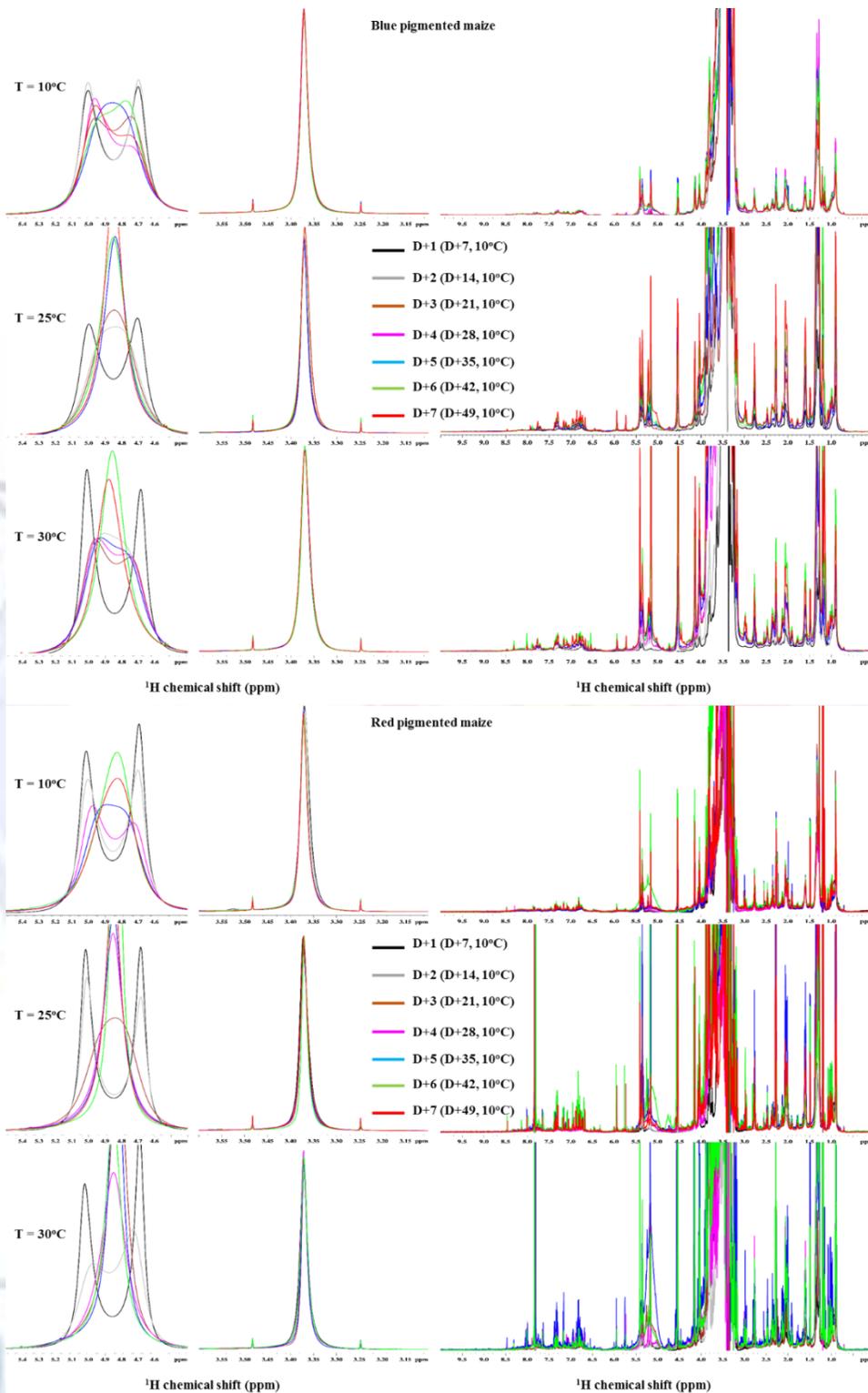


Figura 3. Espectros 1D- ^1H (izquierda) y $^1\text{H}_{\text{water_presat}}$ NMR estándar (derecha) de soluciones de germinados de maíz azul (arriba) y rojo (abajo) en función del tiempo de germinación (expresado con el código de color representado en la figura) y temperatura. Todos los espectros se trazaron en condiciones idénticas en términos de intensidad de señal.

Cuadro 1. Ancho de banda de resonancia de agua ^1H (4,85 ppm) a media altura (LWHH) de las soluciones metanólicas de maíz azul y rojo, en función del tiempo de germinación (en días) y temperatura (en $^{\circ}\text{C}$).

Tiempo de germinación (días)	H ₂ O Ancho de banda a media altura (Hz), en maíz azul.	H ₂ O Ancho de banda a media altura (Hz), en maíz rojo.
T= 10°C		
D+7	248.94	242.1
D+14	248.64	248.06
D+21	240.06	-
D+28	206.10	240.12
D+35	198.19	210.22
D+42	214.40	145.67
D+49	221.71	169.47
T= 25°C		
D+1	248.01	242.0
D+2	199.72	242.83
D+3	170.02	192.27
D+4	-	88.70
D+5	94.32	78.43
D+6	108.49	37.07
D+7	80.46	67.44
T= 30°C		
D+1	241.48	235.41
D+2	209.07	228.55
D+3	232.61	70.41
D+4	225.59	104.74
D+5	216.22	51.86
D+6	103.20	71.53
D+7	113.97	-

Se observa una importante disminución de LWHH debido a una modificación de la señal de agua en forma de línea de doblete a singlete en la solución del germinado de maíz azul D+28 y, además, se observó un comportamiento LWHH dependiente del tiempo similar para la variedad pigmentada roja correspondiente a la Solución de brote D+42 (Ver figura 1). Se observó una disminución más drástica de LWHH en función del tiempo de germinación para ambas variedades de maíz, 25 y 30 $^{\circ}\text{C}$.

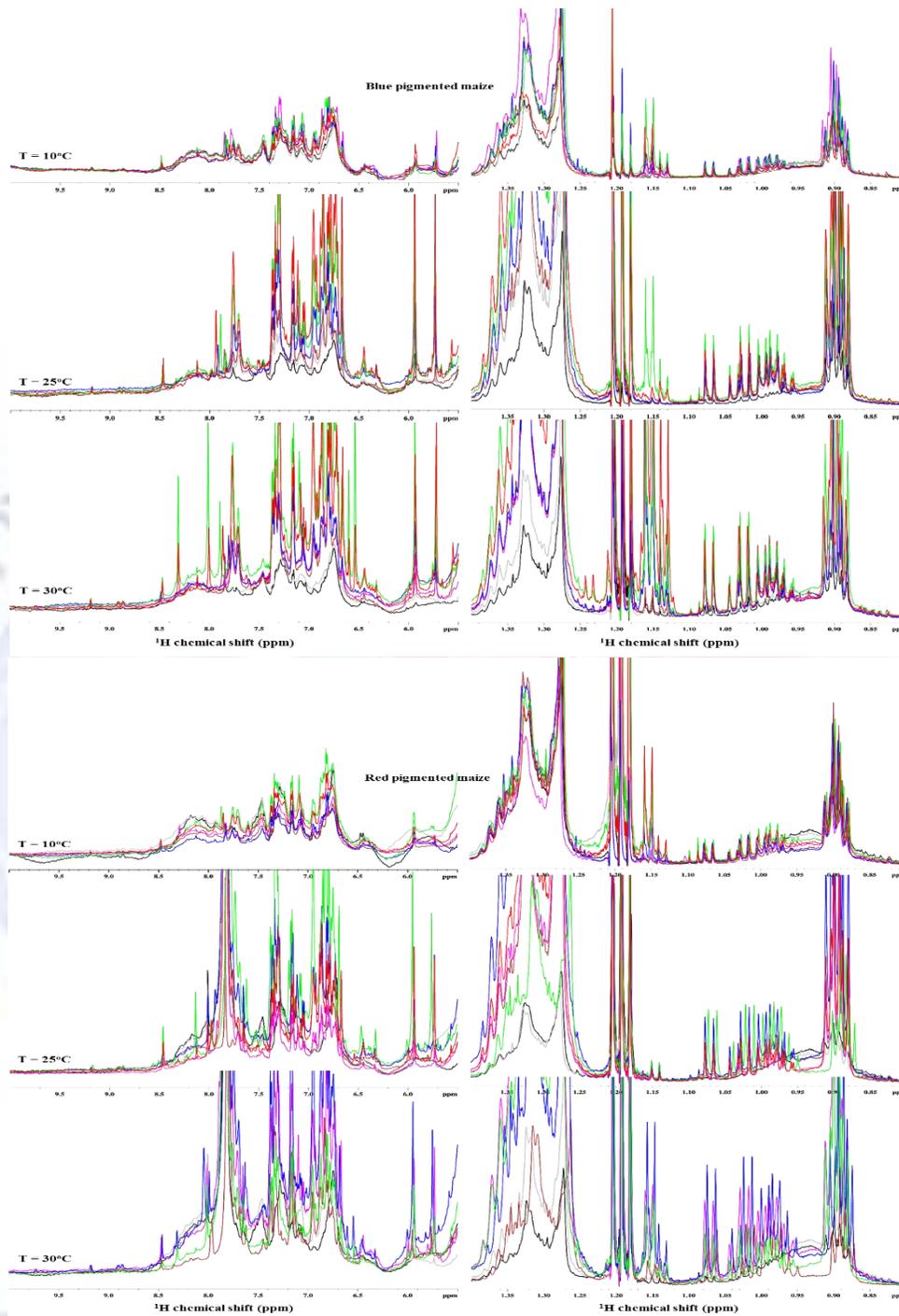


Figura 4. Espectros unidimensionales $\{^1\text{H}_{\text{water_presat}} \text{NMR}\}$ de soluciones de germinados de maíz azul (arriba) y rojo (abajo) en función del tiempo de germinación (expresado con el código de color representado en la figura) y la temperatura. Izquierda: ventana espectral entre 10-5.5 ppm, que comprende a su vez la región asociada a las resonancias fenólicas (8.6-6.1 ppm). El postprocesamiento se realizó con una función de apodización exponencial suave (5Hz de ampliación de línea). Derecha: Ventana espectral entre 1.4-0.8ppm, que comprende a su vez la región asociada a las resonancias clave de tocoferol (1.11-0.94 ppm). No se realizó ninguna función de apodización para esta región. Todos los espectros se trazaron en condiciones idénticas en términos de intensidad de señal.

A 30°C, una disminución exponencial de LWHH con mínimos locales en el día 3 para maíz rojo ($LWHH_{\min}=70.41$ Hz); día 6 para maíz azul ($LWHH_{\min}=103.2$ Hz) y puntos de subida (maíz rojo, $LWHH_{\text{saddle_point}}=104.74$ Hz en D+4 y maíz azul, $LWHH_{\text{saddle_point}}=113.97$ Hz en D+7) describen la modificación del doblete al singlete en las señales de agua en las soluciones metanólicas de germinados (ver figura 3 y figura 1).

La evolución de la señal de resonancia de agua de 4,85 ppm tiene que contrastarse con los perfiles metabólicos de los germinados de maíz azul y rojo dependientes de temperatura y tiempo, obtenidos con el esquema solvente de RMN multi-presaturación $\{^1H_{\text{water_presat}}\}$ (ancho espectral completo trazado con una intensidad de señal equivalente para el conjunto completo de muestras se esquematiza en la Figura 3, derecha).

Las regiones interesantes a tener en cuenta son las regiones fenólicas de 8.5-6.4 ppm, así como la región de tocoferol comprendida entre 1.11-0.94 ppm, mientras que la modulación de la señal de dichas regiones en función del tiempo de germinación y temperatura podría arrojar información sobre el proceso de formación de antioxidantes durante la germinación de ambas variedades de maíz (Figura 4).

3.3. 1D - $\{^1H_{\text{water_presat}} \text{ NMR}\}$ perfiles de germinados de maíz azul y rojo

La síntesis de fitoquímicos con actividad antioxidante como los compuestos fenólicos y los tocoferoles en las variedades de Zea Mays ha ganado una atracción importante, principalmente durante la germinación de semillas de plantas (Del Pozo-Insfran et al. 2006)

La determinación de dichos antioxidantes se ha llevado a cabo principalmente mediante enfoques colorimétricos y/o cromatográficos, mientras que a pesar de su robustez presentan cierta complejidad en términos de preparación de muestras y manipulaciones químicas que pueden llevar mucho tiempo, ser laborioso y costoso.

Debido a esto, es factible proponer un conjunto de técnicas de vanguardia para determinar y cuantificar los antioxidantes durante la germinación de una manera fácil y directa, principalmente cuando un número importante de variables juegan un papel importante durante la germinación, como la temperatura o variedad, como en el presente estudio.

Los esquemas de RMN unidimensional de protones con un módulo de multipresaturación para la eliminación de señales intensas de solventes altamente reproducibles que permiten una ganancia importante en la relación señal/ruido de los metabolitos producidos durante la germinación, parecen una alternativa atractiva para dilucidar la biosíntesis dependiente del tiempo y la temperatura de antioxidantes en dichas condiciones.

En la figura 4 se ven dos NMR fingerprinting de antioxidantes; fenoles a 8.6-6.1 ppm y tocoferoles a 1.1-0.95 ppm. La modulación de la señal observada de ambas regiones en función del tiempo de germinación se racionaliza mediante el cálculo de la integración de la señal relativa (S/S_0 , en unidades arbitrarias) de dichos cambios de frecuencia para ambas variedades de maíz, en todas las condiciones específicas.

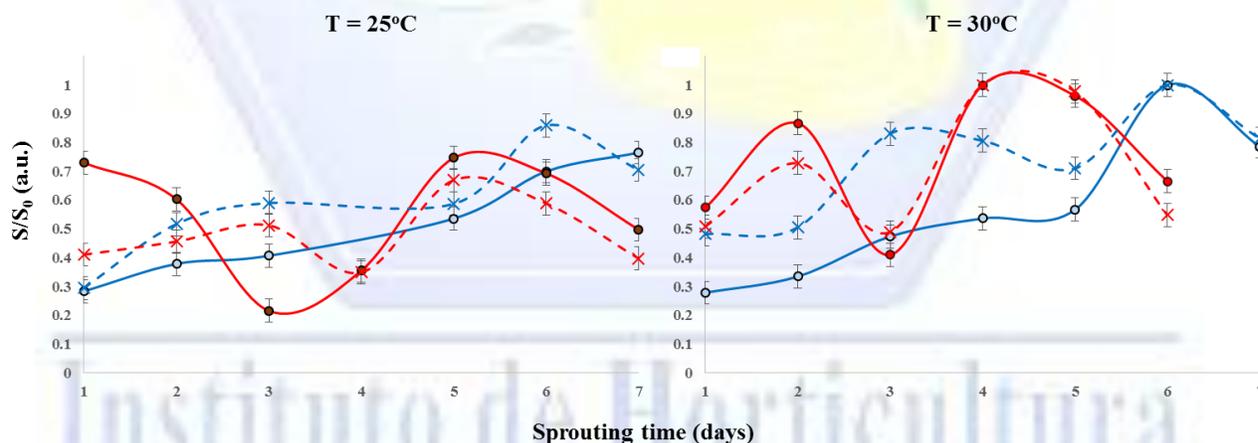


Figura 5. Evolución de la integración de la señal de RMN de protón (S/S_0 , en unidades arbitrarias) que comprende las regiones de frecuencia asociadas a compuestos fenólicos (8.6-6.1 ppm, mostrados en la figura con una línea continua) y tocoferoles (1.1-0.95 ppm, mostrados en la figura con una línea punteada), en función del tiempo de germinación (en días), de semillas de maíz pigmentadas azul y rojo (representadas por líneas de estos mismos colores), realizadas a dos temperaturas diferentes: $T = 25^\circ\text{C}$ (izquierda) y 30°C (Derecha).

3.4. $S/S_0=f$ (tiempo de germinación) como modelo para rastrear la producción fitoquímica durante la germinación

La Figura 5 resume la modulación de integrales de señal dependientes del tiempo ($S/S_0=f$ (tiempo de germinación)) de las regiones fenólicas y de tocoferol, potencialmente asociadas a la producción de antioxidantes durante la germinación de 7 días en condiciones templadas ($T = 25$ y 30°C) de variedades de maíz azul y rojo.

En cuanto a los germinados de maíz azul, tienen un incremento más o menos lineal y concomitante de ambos tipos de antioxidantes a 25°C . Sin embargo, se observa una concomitancia más compleja para la producción de ambos antioxidantes a $T=30^\circ\text{C}$. Curiosamente a ambas temperaturas, la producción de tocoferol se realiza a una velocidad más rápida con respecto a los fenoles, pero tiene una producción máxima equivalente a los 7 y 6 días de brotación, respectivamente a $T=25^\circ\text{C}$ y 30°C .

Los germinados de maíz rojo presentan las siguientes tendencias de producción de antioxidantes:

El análisis $S/S_0=f$ (tiempo de germinación) sugiere fuertemente una huella metabólica de producción de antioxidantes en particular.

Tanto los fenoles como los tocoferoles se producen a una velocidad altamente armonizada después del D+4 (25°C) y D+3 (30°C), evidenciado por el pico observado seguido de una disminución sistemática de la producción de ambos antioxidantes durante los últimos días de germinación. Además, tanto la producción de tocoferoles como de fenoles presentan una tasa mínima de producción a D+3 (30°C), al igual que los fenoles a $T=25^\circ\text{C}$.

Lo más sobresaliente es el hecho de que las curvas $S/S_0=f$ (tiempo de germinación) como modelo para describir la formación de antioxidantes durante los primeros 7 días de germinación en condiciones de temperatura controlada, permanecen consistentes entre las variedades.

4. CONCLUSIONES

Se propone un conjunto de enfoques espectroscópicos novedosos para analizar la producción fitoquímica relevante durante la germinación de variedades de maíz mexicanas azules y rojas.

Las muestras se sometieron a un esquema de germinación específico, incluyendo variaciones de temperatura y, una vez inactivas, se prepararon soluciones para análisis espectroscópico con una mezcla acuosa metanólica simple.

Al seleccionar dos rangos de frecuencia de RMN conocidos asociados con fenoles y tocoferoles, hay un incremento lineal ($T=25^{\circ}\text{C}$) o modular ($T=30^{\circ}\text{C}$) de S/S_0 sistemático en función del tiempo de germinación, a su vez relacionado con una desintegración de LWHH inversa dependiente del tiempo de resonancia de agua sugieren fuertemente la tasa y disponibilidad de producción de antioxidantes durante la germinación.

Finalmente, el análisis Raw y la primera derivada $A/\Delta A$ se extiende confirmando las observaciones de resonancia magnética para proponer RMN como un método analítico simple y directo para optimizar los procedimientos de germinación, beneficioso para la salud humana.

Instituto de Horticultura

5. LITERATURA CONSULTADA

Adom, K. K.; Liu, R. H.; Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50(21), 6182-6187.

Bakan, B. A.; Bily, A. C.; Melcion, D.; Cahagnier, B.; Regnault-Roger, C.; Philogene, B. J. R.; Richard-Molard, D. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium gramineum* strains on different fractions of maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2826-2831.

Christen, S.; Woodall, A. A.; Shingenaga, M. K.; Southwell-Keely, P.; Duncan, M. W.; Ames, B. N. γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: Physiological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94(7), 3217-3222.

Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H.; Serna, S.; Talcott, S. T.; Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea Mays* L.) products. *Food Res. Int.* 2006, 39(6), 696-703.

Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H.; Serna, S.; Talcott, S. T.; Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. *Cereal Chem.* 2007, 84(2), 162-168.

Dueñas, M.; Martínez-Villaluenga, C.; Limón, R. I.; Penas, E.; Frías, J. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Res. Int.* 2015, 70, 55-63.

Fresco, P.; Borges, F.; Diniz, C.; Marques, M. P. M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.* 2006, 26(6), 747-766.

Guo, X.; Li, T.; Tang, K.; Liu, R.H. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 11050-11055.

Hagiwara, A.; Miyashita, K.; Nakanishi, K.; Sano, M.; Tamano, S.; Kadota, T. et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5b]-pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 2001, 171, 17-25.

Herbert-Pucheta, J.E.; Padilla-Maya, G.; Milmo-Brittingham, D.; Lojero, D.; Gilmore, A.M.; Raventos-Llopart, L.; Hernández-Pulido, K.; Zepeda-Vallejo, L.G. Multivariate spectroscopy for targeting phenolic choreography in wine with A-TEEMTM and NMR crosscheck non-targeted metabolomics. *Bio web Conf.* 2019, 15, 02006.

Human Metabolome Database, HMDB0001893.

Kanski, J.; Aksenova, M.; Stoyanova, A.; Butterfield, D. A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13(5), 273-281.

Kurilich, A.C.; Juvik, J. A. Quantification of carotenoids and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1948-1955.

López-Morales, C. A.; Vázquez- Leyva, S.; Vallejo-Castillo, L.; Carballo-Uicab, G.; Muñoz-García, L.; Herbert-Pucheta, J. E.; Zepeda-Vallejo, L. G.; Velasco- Velázquez, M.; Pavón, Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* 2004, 134, 3979S-3485S.

López-Martínez, L. X.; Oliart-Ros, R. M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C-H.; Parkin, K. L.; García, H. S. Antioxidant activity, phenolic compounds, and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Sci. Technol.* 2009, 42, 1187-1192.

Pérez-Tapia L., Medina-Rivero S. M, Determination of Peptide Profile Consistency and Safety of Collagen Hydrolysates as Quality Attributes. *J. Food Sci.* 2019, 84 (3) 430–439.

Pientaweeratch, S.; Panapisal, V.; Tansirikongkol, A.; Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharma. Biol.* 2016, 54, 1865-1872.

Ren, S.-C.; Sun, J.-T. Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination. *J. Funct. Foods.* 2014, 7, 298-304.

Swieca, M.; Dżiki, D. Improvement in sprouted wheat flour functionally: Effect of time, temperature and elicitation. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 2015, 50, 2135-2142.

Vázquez- Leyva, S.; Vallejo-Castillo, L.; López-Morales, C. A.; Herbert-Pucheta, J. E.; Zepeda-Vallejo, L. G.; Velasco- Velázquez, M.; Pavón, L.; Pérez-Tapia, S. M.; Medina-Rivero, E. Identity profiling of complex mixtures of peptide products by structural and mass mobility orthogonal analysis. *Anal. Chem.* 2019, 91(22), 14392-14400.

Xiang, N.; Guo, X.; Liu, F.; Li, Q.; Hu, J.; Brennan, S. Effect of light- and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles and antioxidant activities in sweet corn (*Zea mays* L.) sprouts. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1246.

Yang, L.; Zhang, H.; Cheng, L.; Gu, Z.; Hua, D.; Qi, X.; Qian, H.; Wang, L. Effect of extrusion on the hydrophilic antioxidant capacity of four whole grains. *J. Food Nutr. Res.* 2014, 2(2), 80-87.

Instituto de Horticultura

LITERATURA CONSULTADA GENERAL

Acosta-Estrada B. A., Gutierrez-Uribe J. A., Serna-Saldivar S. O., 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152 (2014) 46-55.

Adom K. F., Liu R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182 – 87.

Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI. 2006. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet J. Med. Update*. 2006; 1: 1-17.

Bilska-Kos A, Panek P, Szulc-Glaz A, Ochodzki P, Cisko A, Zebrowski J. 2018. Chilling-induced physiological, anatomical and biochemical responses in the leaves of *Miscanthus x giganteus* and maize (*Zea mays* L.), *Journal of Plant Physiology* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.012>

Bo Pan, Hao Li, Di Lang, Baoshan Xing. 2009. Environmentally persistent free radicals: Occurrence, formation mechanisms and implications, *Environmental Pollution* (2019), doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.032

Cabrera-Soto M. L., Salinas-Moreno Y., Velázquez-Cardelas G. A., Espinosa Trujillo E. 2008. Content of Soluble and Insoluble Phenols in The Structures of Corn Grain and Their Relationship with Physical Properties. *Agrociencia* 43: 827-839. 2009.

Coll, J. B.; G. N. Rodrigo, B. S. García and R. S. Tamés. 1995. *Fisiología vegetal*. Madrid. Ediciones Pirámide. 662 p.

Cunningham, D., Vannozi, S., Turk, R., Roderick, R., O'shea, E., Brilliant, K. 2005. Constituyentes fitoquímicos del arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*) y sus beneficios para la salud. *Rev Fitoterapia*. 2005; 5 (1): 5-16.

Dixon, R.A., Gang, O.R., Charlton, A.J., Fiehn, O., Kuiper, H.A., Reynolds, T.L., Seiber, J.N. 2006. Applications of metabolomics in agriculture. *J Agric. Food Chem.* 54, 8984-94

Drago, M., López, M., Saíenz, T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 2006; 37 (4): 58-68.

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Oagnon, S., Gesheva, E. 2008. Stress-protective role on secondary metabolites: diversity functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 34, 67-78.

Escamilla, Ch., Cuevas, E., Guevara, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med. UNAM*. 2009; 52 (2): 73-5.

Fiehn, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genom.* 2, 155- 68

Galano, A. 2015. Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational Chemistry Based Protocols. *Journal of the Mexican Chemical Society* 2015, 59 (4), 231-262.

Galland m. Boutet-mercey s. Et al. 2014. Compartmentation and Dynamics of flavone metabolism in dry and germinated rice seeds. *Plant cell physiology* 55(9) pp. 1646-1659.

Gan, R.Y.; Lui, W.Y.; Wu, K.; Corke, H. 2016. Thermal treatments affect the polyphenol profile and increase antioxidant capacity in five varieties of edible bean milks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2016, 51, 954–961.

García M, Fernández S. Fuentes L. 2010. Determinación de polifenoles totales por el método Folin Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia. ETSIAMN.

Govindan, S., Amirthalingam, M., Duraisamy, K., Govindhan, T., Sundararaj, N., & Palanisamy, S. (2018). Phytochemicals-induced hormesis protects, *Caenorhabditis elegans*, against α -synuclein protein aggregation and stress through modulating HSF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 812–822.

Gutiérrez, A., Ledesma, L., García, I., Grajales, O. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev Cubana Salud Pública.* 2007; 33 (1): 1-7.

Guo, X.; Li, T.; Tang, K.; Liu, R.H. 2012. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 11050–11055.

Han, C.; Li, J.; Jin, P.; Li, X.; Wang, L.; Zheng, Y. The effect of temperature on phenolic content in wounded carrots. *Food Chem.* 2017, 215, 116–123.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford, UK: Clarendon Press. 2007.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H. & Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78- 141.

Khalil, R.K.S., & Gomma, M.A.E. (2016). Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in fruits and vegetables sold at local street markets in Alexandria, Egypt. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 199-210.

Liu, R. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.

Llancari, A., Matos, A. 2011. Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima, 2-4 noviembre, 2011.

López-Martínez L. X., Oliart-Ros R. M., Valerio-Alfaro G., Lee C. H., Parkin K. L., García H. S. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Science and Technology*, 42, (2009) 1187–1192.

Mao h. Liu j. Ren f. Et al. 2015. Characterization of cyp71z18 indicates a Role in maize zealexin biosynthesis. *Phytochemistry* 121 (2016) pp. 4-10.

Marnett, L. J. 1987. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8 (10) pp. 1365-1373.

Moyo S. M., Serem J.C., Bester M.J., Mavumengwana V., Kayitesi E. 2019. Influence of boiling and subsequent phases of digestion on the phenolic content, bioaccessibility, and bioactivity of *Bidens pilosa* (Blackjack) leafy vegetable. *Food Chemistry* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126023>

Núñez, A. 2011. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*. 2011; 37 (suppl.): 644-60.

Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4 (2) June 2008. 89-96.

Peña-Bautista, C.; Baquero M.; Vento M.; Cháfer-Pericás C. 2019. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta* 491 (2019). 85-90.

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*. 2012; 27 (1): 76-89.

Revilla P. Rodríguez v. M. Soengas p. Ordás a. 2013. Compuestos Antioxidantes en el maíz. *Revista misión biológica de Galicia* pp 219-221.

Reyes, A., Galicia, M., Carrillo, M. 2011. Antioxidantes: la magia de lo natural. *Rev Tlatemoani*. 2011; (8): 1-16.

Sayre, L. M.; Perry, G.; Smith, M. A. 2007. Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol*. 21 (1) 172-188.

Stanner, S., Hughes, J., Kelly, C., Buttriss, J. A. 2004. review of the epidemiological evidence for the “antioxidant hypothesis”. *Public Health Nutr*. 2004; 7 (3): 407-22.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.D.; Mazur, M.; Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007). 44–84.

Wang, L.; Li, X.; Niu, M.; Wang, R.; Chen, Z. Effect of additives on flavonoids, D-chiro-Inositol and trypsin inhibitor during the germination of tartary buckwheat seeds. *J. Cereal Sci*. 2013, 58, 348–354.

Wong, D. W. S. 2006. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133(2), 87-112.

Xiang n. Gou x. Liu f. Et al. 2017. Effect of light- and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles, and antioxidant activities in sweet corn (Zea mays L.) Sprouts. International journal mol. Sci. (ij ms) 2017, 18, pp 1246-1258.

Zamora, J. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. Rev Chil Nutr. 2007; 34 (1): 17-26.



Instituto de Horticultura