



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL,
UNIDAD OAXACA**



**Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos
Naturales
(Especialidad en Ingeniería)**

**Extracción y caracterización de las antocianinas de maíz VC-
42 para su evaluación antitumoral en líneas celulares MCF-7,
HeLa y SiHa.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

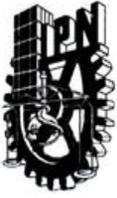
Q.F.B. Franco Antonio Antonio

Directora:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca

Junio, 2016



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de junio del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca** (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: "Extracción y caracterización de las antocianinas de maíz VC-42 para su evaluación antitumoral en líneas celulares MCF-7, HeLa y SiHa"

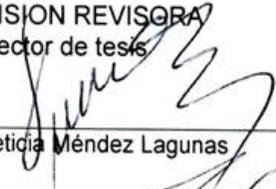
Presentado por el alumno:

Antonio Apellido paterno	Antonio materno	Franco nombre(s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>A</td><td>1</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>3</td></tr></table>			A	1	4	0	0	2	3
A	1	4	0	0	2	3			

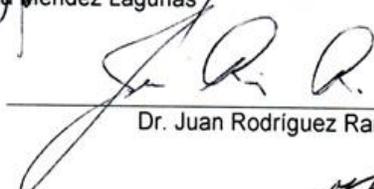
aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
Director de tesis


Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas


Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo.


Dr. Juan Rodríguez Ramírez


M. en C. Laura Aquino Gonzalez


Dra. Maria del Socorro Pina Canseco

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez
Director





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 23 del mes de junio del año 2016, el (la) que suscribe Antonio Antonio Franco, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A140027, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas y cede los derechos del trabajo titulado: “Extracción y caracterización de las antocianinas de maíz VC-42 para su evaluación antitumoral en líneas celulares MCF-7, HeLa y SiHa”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó qfbfrancoaa@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Antonio Antonio Franco



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

Extracción y caracterización de las antocianinas de maíz vc-42 para su evaluación antitumoral en líneas celulares MCF-7, HeLa y SiHa.

Lic. Q.F.B. Franco Antonio Antonio

R E S U M E N

Los maíces pigmentados contienen una gran cantidad de antocianinas las cuales le proveen de diversas tonalidades y características nutraceuticas. Se ha demostrado que el consumo de frutas y verduras que contienen antocianinas traen efectos benéficos en la salud y prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Por la gran riqueza que representan el consumo de maíces pigmentados en especial el maíz VC-42 se investigó sus posibles beneficios en la prevención y tratamiento en contra del crecimiento anormal de células (tumores).

Con el objetivo de extraer y caracterizar las moléculas de antocianinas en los granos de maíz azul VC-42 se empleó una mezcla de EtOH: H₃O⁺ (HCl 1 M, 0.1 %), 70:30, la separación se realizó mediante cromatografía de columna preparada (C18), la caracterización se realizó mediante espectroscopia UV-Vis, IR y TOF-MS. La evaluación antitumoral se realizó empleando modelos celulares con crecimiento anormal inducido probando con ello su capacidad antitumoral en líneas de cáncer cérvico uterino y de mama (CaCu y CM). Los extractos eluidos mediante columnas C18 mostraron espectros UV-Vis, IR y TOF-Masas características de las antocianinas.

Las antocianinas presentes en el extracto inhiben la proliferación celular de las líneas HeLa, SiHa y MCF-7 en un 18.5, 34 y 35 % respectivamente a una concentración de 150 µg/ml. Las antocianinas presentes en el maíz VC-42 al ser compuestos antioxidantes pueden prevenir y tratar padecimientos relacionados con el cáncer CaCu y CM. El maíz azul VC-42 es un alimento nutraceutico ya que el contenido de antocianinas proveen de un beneficio a la salud.

Palabras clave: Antocianinas, maíz VC-42, extracto antocianinico, evaluación antitumoral, líneas celulares cancerigenas.

Dirigido por:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas.

Extraction and characterization of vc-42 corn anthocyanins for antitumor evaluation
in cell lines MCF-7, HeLa and SiHa.

Lic. Q.F.B. Antonio Franco Antonio

A B S T R A C T

Pigmented corn contain a big quantity of anthocyanins which will provide different hues and nutraceutical characteristics. It has been shown that consumption of fruits and vegetables that contain anthocyanins bring beneficial effects on health and prevention of chronic degenerative diseases. Because of these benefits the consumption of pigmented corn especially corn VC-42 was investigated potential benefits in the prevention and treatment against the abnormal growth of cells (tumors).

In order to extract and characterize molecules of anthocyanins in blue corn grains of VC-42, a mixture of EtOH: H₃O⁺ (1 M HCl, 0.1%), 70:30 was employe. The separation was performed by a column chromatography (C18), the characterization was done by UV-Vis, IR and TOF-MS spectroscopy. The evaluation was performed using anti-tumor cell models with induced abnormal growth, thereby proving its antitumor capacity in cervical and breast cancer cell lines (CC and BC). The extracts showed eluted columns by C18 showing spectrum characteristics of anthocyanins by UV-Vis, IR and TOF-Mass.

Anthocyanins in the extract inhibit cell proliferation of the HeLa, SiHa and MCF-7 lines 18.5, 34 and 35% respectively at a concentration of 150 µg/ml. Anthocyanins presented in corn VC-42 to be antioxidant compounds can prevent and treat diseases related to cervical cancer and breast cancer. Blue VC-42 corn is a nutraceutical food since the content of anthocyanins provide a health benefit.

Keywords: Anthocyanins, corn VC-42, antocianinico extract, antitumor evaluation, cancer cell lines.

Directed by:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas.

DEDICATORIA

A mi madre Profra. Carmen Antonio Antonio con todo amor y cariño, por ser el pilar fundamental en mi vida, la fuerza que impulsa mi desarrolló, la fuente de sabiduría y enseñanza, gracias madre por haberme inculcado valores y principios que llevaré toda la vida, por tu inmenso amor y paciencia te estaré eternamente agradecido. Te amo madre.

A mi abuelo Francisco Antonio Antonio (†) por ser para mí un padre, gracias por amarme tanto, cuidar de mí y aconsejarme, gracias por forjar en mí la espiritualidad y el amor al prójimo. Dios te bendiga abuelo.

A mi abuela Sebastiana Antonio García (†) por cuidar de mí y amarme como a un hijo, por demostrarme que aún postrada en una cama no te doblegaste ante nada que fue más grande tu amor a la vida y más grande tu fortaleza ante la adversidad.

A mi hermana Reyna Isabel Santiago Antonio por cuidar de mí y ser mi segunda madre, gracias por tus palabras de motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Politécnico Nacional (IPN)** por la beca institucional para llevar a cabo mi estancia, congreso y demás actividades académicas.

Al **Programa de Becas Institucionales de Formación de Investigadores (BEIFI)** por la beca otorgada durante los períodos Enero-Diciembre 2015 y Enero-junio 2016.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A la Dra. En C. **Lilia Leticia Méndez Lagunas** que fungió como directora de tesis y además me instruyo y guio adecuadamente en mi camino para obtener grandes resultados.

Al Dr. **Samuel Siles Alvarado** por compartir su conocimiento y tiempo, le estoy muy agradecido ya que es un ejemplo a seguir.

ÍNDICE

CONTENIDO	PAG.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	2
2.1. Revisión de la literatura.....	2
2.1.1. Maíz (<i>Zea mays</i>).....	2
2.1.1.1. Maíces pigmentados.....	2
2.1.1.2. Maíz Azul VC-42.....	4
2.1.1.3. Maíces pigmentados: Beneficios para el consumidor.....	5
2.1.2. Antocianinas: Metabolitos secundarios.....	6
2.1.2.1. Biosíntesis.....	7
2.1.2.2. Estructura y propiedades químicas de las antocianinas.....	9
2.1.2.3. Métodos de extracción y caracterización de las antocianinas.....	11
2.1.2.4. Beneficios de las antocianinas en la salud.....	12
2.1.2.5. Biodisponibilidad de las antocianinas.....	14
2.1.3. Actividad tumoral.....	16
2.1.3.1. Cáncer Cervicouterino (CaCU).....	19
2.1.3.2. Cáncer de Mama.....	19
2.1.3.3. Líneas celulares cancerígenas.....	20
2.2. Antecedentes.....	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV. JUSTIFICACIÓN.....	25
V. HIPÓTESIS.....	25
VI. OBJETIVOS.....	26
6.1. Objetivo general.....	26
6.2. Objetivo específico.....	26
VII. METODOLOGIA.....	27
7.1. Colecta y selección de granos.....	28
7.1.1. Colecta de los granos de maíz azul VC-42.....	28
7.1.2. Selección de los granos de maíz azul VC-42.....	28
7.2. Estandarizaciones de laboratorio.....	29
7.2.1. Determinación de humedad en base a la norma NOM-116-SSA1-1994.....	29
7.2.2. Secado del maíz azul CV-42.....	29

7.3. Extracción y caracterización de las antocianinas.....	29
7.3.1. Extracto acu/etanolico acidificado.	30
7.3.2. Técnicas cromatografías.....	33
7.3.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	33
7.3.2.2. Cromatografía en Columna (C18).	33
7.3.2.3. Espectroscopia Infrarrojo.....	34
7.3.2.4. TOF-MS.....	34
7.4. Ensayos <i>in vitro</i>	35
7.4.1. Cultivos Celulares.....	35
VIII. RESULTADOS.....	37
IX. CONCLUSIONES.....	58
X. RECOMENDACIONES.....	59
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60
XII. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Título	Pág.
Figura 1.	Diversas tonalidades de los Maíces Pigmentados.....	3
Figura 2.	Crecimiento y desarrollo del maíz VC-42 a) Crecimiento a los 8 días de afloración b) Crecimiento a los 25 días de afloración c) Granos de maíz VC-42 obtenidos.....	5
Figura 3.	Los flavonoides se dividen en tres grupos: a) 2-fenilbezopiranos b) 3-benzopiranos (isoflavonoides), c) 4-benzopiranos (neoflavonoides).....	6
Figura 4.	Ruta general de biosíntesis de las antocianinas.....	8
Figura 5.	Estructura base de las moléculas de antocianinas.....	9
Figura 6.	Estructura química de la molécula de Cianidin-3-glucósido.....	10
Figura 7.	Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH..	11
Figura 8.	Mecanismos potenciales de absorción de las antocianinas	15
Figura 9.	Degradación química para la formación de ácido protocatecuico.....	16
Figura 10.	Diagrama del desarrollo experimental.....	27
Figura 11.	Diagrama de fases de extracción.....	31
Figura 12.	Diagrama de separación mediante pruebas químicas.....	32
Figura 13.	Diagrama de caracterización química.....	34
Figura 14.	Fases de experimentación de las pruebas <i>in vitro</i>	36
Figura 15.	a) Medio Ácido, b) Medio Neutro y c) Medio Básico.....	40
Figura 16.	Efectos por el cambio de pH en medio etanolico A) Extracto en medio neutro, B) Extracto en medio ácido y C) Extracto en medio básico.....	41
Figura 17.	Espectro ultravioleta de fracciones obtenidas mediante cromatografía de columna C18.....	44
Figura 18.	Espectro ultravioleta de fracción antocianinica.....	45
Figura 19.	Espectro infrarrojo de la fracción orgánica total.....	47

Figura 20.	Fragmentograma FOT-MS de la fracción obtenida mediante C18.....	49
Figura 21.	Estructura semi-desarrollada de la antocianina a) malvidina b) malvidina-O-glucósido.....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1.	Radicales de sustitución en las antocianinas.....	9
Tabla 2.	Características que confieren funcionalidad a un antioxidante.....	14
Tabla 3.	Diferencias entre tumores malignos y benignos.....	17
Tabla 4.	Estudios sobre contenido nutracéutico, análisis y extracción de antocianinas presentes en maíces pigmentados (<i>Zea mays</i> L.).....	23
Tabla 5.	Siembra en campo experimental.....	28
Tabla 6.	Prueba de solubilidad.....	19
Tabla 7.	Mezclas de solventes de elución en cromatografía en placa fina.....	42
Tabla 8.	Absorbancias de fracciones obtenidas mediante C18.	43
Tabla 9.	Grupos funcionales presentes en el extracto orgánico total 1 liofilizado.....	46

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
C18	Columna cromatografía alquisilicas de 18 carbonos.
CaCu	Cáncer cérvico-uterino.
CM	Cáncer de mama
CO₂	Dioxido de carbono
CoA	Acetil coenzima A
CV	Cristal Violeta
ESIQIE	Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas
EtOH	etanol
FAO	Organización de Agricultura y Alimentos
H₃O⁺	Agua acidificada
HCl	Ácido clorhídrico
HeLa	Línea Celular de cáncer cérvico-uterino (Henrietta Lacks).
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IR	Espectroscopia Infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama (Michigan Cáncer Foundation-7)
MeOH	Metanol
MS-LC	Cromatografía líquida acoplada a un espectro de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
pH	Potencial de hidrogeno
ROS	Especie Reactiva de Oxigenó
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SiHa	Línea Celular de cáncer cérvico-uterino
TLC	Cromatografía en Capa Fina
TOF-MS	Espectroscopia de masas “Tiempo de vuelo”
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible
VHS	Virus Herpes Simple
VPH	Virus del papiloma humano

ABREVIATURAS DE UNIDADES

cm	Centímetros
° C	Grados centígrados
g	Gramos
Kg	Kilogramos
λ	Longitud de onda
msnmr	Metros sobre nivel del mar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
μm	Mililitros
M	Molaridad
nm	Nanómetros
N	Normalidad
%	Porcentaje
hp	Potencia (caballos de fuerza)

I. INTRODUCCIÓN

El Maíz (*Zea mays*) es parte de la riqueza biológica y cultural del país. Gracias a su propagación, las culturas mesoamericanas florecieron y aún en nuestros días el maíz es fundamental de nuestra alimentación. En la actualidad se cultivan alrededor de doscientas sesenta razas de maíz, teniendo diferentes formas y tonalidades de grano; azules, negros, rojos y morados. Debido a la diversidad de tonalidades que presentan estos granos reciben el nombre de maíces pigmentados (Ramírez *et al.*, 2012).

Los maíces pigmentados poseen compuestos químicos llamados antocianinas que les dan colores vistosos, características nutraceuticas y antioxidantes. Se ha demostrado que el consumo de frutas y verduras que contienen antocianinas traen efectos benéficos en la salud y prevención de enfermedades (Peng *et al.*, 2006). En años recientes investigaciones realizadas muestran que los maíces pigmentados tienen un potencial como antioxidantes naturales (Cuevas *et al.*, 2008).

El Maíz pigmentado (*Zea mays L.*) tiene características que lo hacen más importante frente a los demás fenotipos, posee un alto contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, dotándole con ello de una gran actividad antioxidante. Estudios realizados por Hagiwara *et al.*, (2001) demostraron que las antocianinas inhiben la proliferación de células cancerígenas del colon, además de estas propiedades el maíz pigmentado posee otras características en pro de la salud, ya que ayudan a mantener los niveles de presión sanguínea, promueve la circulación de la sangre, es un antiinflamatorio, fomenta la regeneración de tejido conectivo, promueve la formación del colágeno. Se ha observado también que proveen de protección contra el estrés oxidativo de las células, previniendo así el envejecimiento celular y la aparición de enfermedades crónico degenerativas, superando el efecto antioxidante de la vitamina E (Ramírez *et al.*, 2012).

Por la gran riqueza que representa el consumo de maíces pigmentados (maíz azul VC-42) se investigó sus posibles beneficios en la prevención y tratamiento en contra del crecimiento anormal de células (tumores).

II. MARCO TEORICO

2.1. Revisión de la literatura

2.1.1. Maíz (*Zea mays*).

El maíz pertenece a la familia *Poaceae*, tribu *Maydeae* de la subtribu *Tripsacina* y taxonomía del género *Zea* (Sánchez, 2011). Es una planta anual que posee un sistema radicular fibroso. Se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote) y la masculina (espiga) se encuentran en distintos lugares de las plantas (Cuevas *et al.*, 2008).

La planta de maíz es un sistema metabólico cuyo producto final es un órgano especializado (los granos) el cual contiene fibras, carbohidratos, proteínas y grasas que han servido de alimento para la población desde hace miles de años, en la actualidad es una de las materias primas principales en la industria alimenticia (Ramírez *et al.*, 2012). Los granos se encuentran agrupados en órganos denominados elotes cuando aún son granos tiernos, posteriormente denominados mazorcas cuando son granos secos, en cada mazorca pueden haber de 200 a 400 granos aproximadamente los cuales pueden tener diversas tonalidades (Lim, 2013).

2.1.1.1. Maíces Pigmentados (*Zea mays L.*).

Se le denominan maíces pigmentados a la variedad de maíces que presentan coloraciones avivadas que van desde tonalidades amarillas, rojas, moradas, negras, azules, además son parte de un legado prehispánico y cultural. También reciben el nombre de maíces criollos.

Existen dos familias de biomoléculas que determinan la pigmentación del maíz, estos son los carotenoides y las antocianinas, estas biomoléculas poseen en común una estructura fenólica. Los maíces ricos en carotenoides se han difundido ampliamente y su siembra se puede realizar en cualquier terreno de cultivo, sin embargo, los maíces con alto contenido de antocianinas se siembran en áreas limitadas (García, Mora, Serna, & Gutiérrez, 2013).

A diferencia de los maíces blancos, los maíces pigmentados poseen una gama variada de compuestos fitoquímicos los cuales le confieren grandes propiedades nutraceuticas. El común denominador de la mayoría de los nutraceuticos es su capacidad antioxidante que contrarresta los radicales libres responsables de causar la oxidación en células (García *et al.*, 2013).

Las Antocianinas le confieren a los granos de maíz diversas tonalidades (Figura 1). Dependiendo de la intensidad de la tonalidad, estas biomoléculas, dotaran a los maíces pigmentados propiedades con alto valor nutraceutico. Los maíces pigmentados también poseen otros compuestos químicos de gran relevancia tales como fenoles, ácido felurico, luteína, zeaxantina, criptoxantina beta y carotenos entre otros, tal como menciona Ramírez *et al.*, (2012).

Los maíces pigmentados forman parte del patrimonio biológico y cultural del país, además poseen una gran diversidad genética y potencial para la producción de alimentos que ayudan en la nutrición de la población.



Figura 1. Diversas tonalidades de los Maíces Pigmentados.

Los maíces pigmentados (*Zea mays L.*) tienen su centro de origen y diversificación en México (Salinas Moreno *et al.*, 2013).

El tono del maíz y su matiz dependerán del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo el ión flavilio. La tonalidad morada en los granos de maíz se

produce por el incremento de grupos hidroxilo, mientras que un incremento de metoxilaciones produce colores rojos (Mendoza, 2012).

El pH tiene un cometido muy importante en la coloración del maíz, a pH 7 las antocianinas dan la coloración morada.

Aunque el color es atribuido directamente a las antocianinas existen otros factores que caracterizan las tonalidades de estas. Los factores de estrés (agua, temperatura, época de estiaje) en las que se desarrolló la planta condicionan la abundancia de metabolitos secundarios (Chludil *et al.*, 2007).

La importancia de los maíces pigmentados (*Zea mays L.*) a nivel local es demasiada, ya que estos son materia prima para la elaboración de diversos alimentos (tortillas, tlayudas, atoles, entre otras) que además generan un ingreso económico.

2.1.1.2. Maíz Azul VC-42.

Espinosa *et al.*, (2009) menciona que los granos mejorados se han obtenido a lo largo de años de trabajo, además son el fruto del cruzamiento y selección de razas los cuales dan mejores rendimientos en los campos, por ello muchas instituciones tales como la Universidad Autónoma de México (UNAM), Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), el Colegio de Posgraduados (CP), la Universidad de Guadalajara (U de G) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), han vertido esfuerzos para el desarrollo de nuevas variedades de maíz, estas variedades mejoradas representan la obtención de mejores cosechas.

El INIFAP ha logrado mejoras en 10 de las 50 razas nativas de maíz, las cuales son empleadas en los 15 macro ambientes que consideran grandes regiones agroclimáticas del país y las cuatro provincias agronómicas de la tierra de labor, algunos sembradíos en zonas con condiciones adversas como en la región Mixteca de Oaxaca, por citar un caso, se desarrolló un tipo de mejoramiento en el maíz (V-235 y V-236). Para el estado de Oaxaca se desarrollaron de manera *in situ* 18 variedades de maíz contando con la participación activa de los agricultores, logrando así promover el uso diferenciado y los precios atractivos para quienes los cultivan (Espinosa *et al.*, 2009).

Un ejemplo de mejoramiento es el maíz azul VC-42 el cual fue generado en el Campo Experimental Valles de Oaxaca del INIFAP. Esta variedad se adapta en climas semicálidos y semisecos en altitudes de 1200 a 1800 metros sobre el nivel de mar (msnm). La raza a la cual pertenece el maíz azul VC-42 es Bolita, de una variedad VC-42, con una altura aproximada de 220 a 280 cm, con una afloración de 60 a 72 días y una cosecha aproximada de 110 a 135 días (Figura 2).

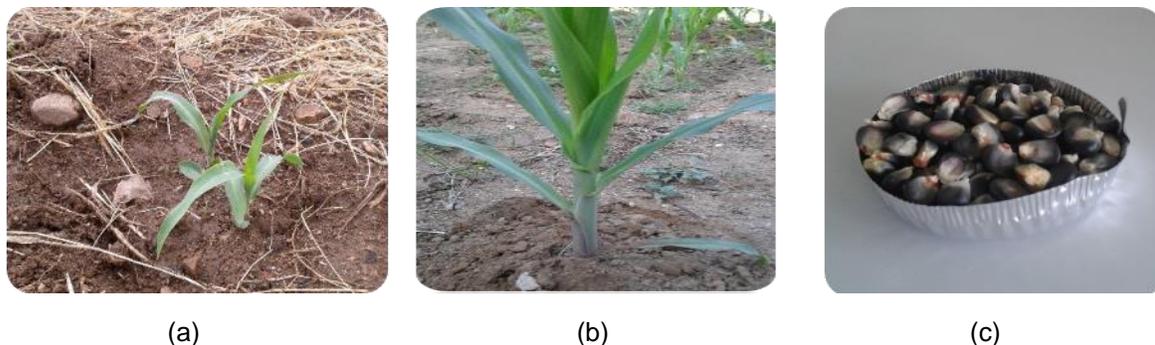


Figura 2. Crecimiento y desarrollo del maíz VC-42 a) Crecimiento a los 8 días de afloración b) Crecimiento a los 25 días de afloración c) Granos de maíz Cv-42 obtenidos.

2.1.1.3. Maíces pigmentados: Beneficios para el consumidor.

Muchas veces se ha segregado el consumo de los maíces pigmentados, sin embargo estos poseen una gran potencial nutraceutico ya que su consumo nos ayuda a mejorar nuestra nutrición y salud. Los maíces criollos han conservado importantes compuestos fitoquímicos los cuales aportan al organismo consumidor diversos componentes como; fibra dietética (soluble e insoluble), compuestos fenólicos, carotenoides, xantofilas, triglicéridos ricos en ácidos grasos omega 6, fitoesteroles, policosanoles y micronutrientes como tocoferoles y tocotrienoles, fosfolípidos que proveen colina e inositol, y vitaminas con propiedades nutraceuticas como el ácido fólico, tiamina y niacina (Salinas Moreno *et al.*, 2013). Todo este conjunto nutrimental ayuda en la prevención de enfermedades antiinflamatorias, antitumorales, antimicrobianas, protegen a los vasos sanguíneos del daño ocasionado por los altos niveles de azúcar en pacientes diabéticos, reducción significativa en los niveles de los triglicéridos y efectos positivos en algunas alteraciones provocadas por el síndrome metabólico asociado con el sobrepeso.

Las antocianinas al ser nutraceuticos proveen de beneficios a la salud, sin embargo, también son apreciados en la industria alimenticia ya que sirven como colorantes naturales, bebidas fermentadas, entre otras (Ramírez *et al.*, 2012; Castañeda *et al.*, 2009).

Todas estas características las confieren las biomoléculas presentes en los maíces pigmentados, sin embargo los maíces con coloraciones fuertes presenta mayor aporte nutrimental y mayores beneficios a la salud ya que estas tonalidades indica una concentración mayoritaria de antocianinas (Hosoda *et al.*, 2012).

2.1.2. Antocianinas: Metabolitos secundarios.

A través de millones de años las plantas han desarrollado rutas metabólicas complejas que le han servido en la adaptación y subsistencia. Con el desarrollo de estas rutas metabólicas se han obtenido un sinnúmero de estructuras complejas, denominados metabolitos secundarios. Dentro de las funciones principales destacan la protección vegetal, la atracción de agentes polinizadores y mimetizadores (Pascual-Teresa, Sanchez-Ballesta, & García-Viguera, 2013).

En los metabolitos secundarios existe un grupo importante denominado Flavonoide, el cual debe su nombre a la estructura fenilbenzopirano (Figura 3), estructurada en forma C6-C3-C6, divididos en tres grupos diferentes en base a la posición de la fracción del anillo aromático benzopirano (Lin & Weng, 2006).

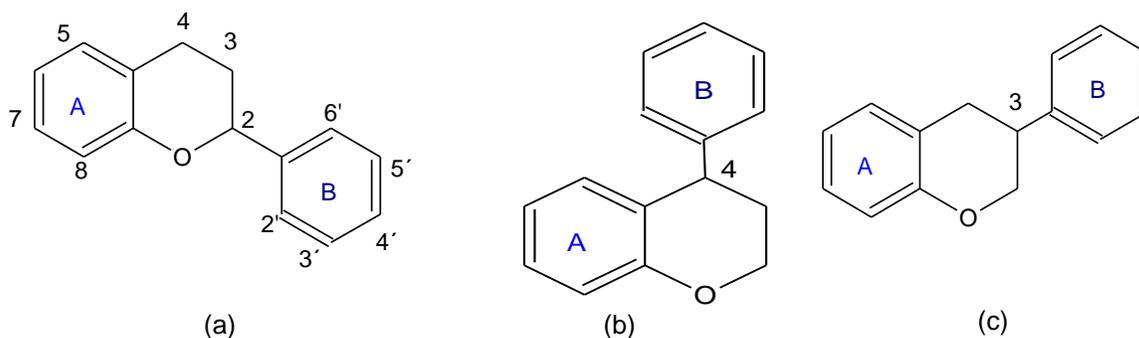


Figura 3. Los flavonoides se dividen en tres grupos: a) 2-fenilbenzopiranos b) 3-benzopiranos (isoflavonoides), c) 4-benzopiranos (neoflavonoides).

Los flavonoides son metabolitos secundarios con gran actividad nutraceutica, teniendo una gran actividad antioxidante. Se han descrito aproximadamente 2000

tipos de flavonoides (Lin & Weng, 2006) donde destacan por su gran capacidad antioxidante las antocianinas.

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) son considerados una clase de flavonoides del tipo 2-fenilbenzopirano (Motohashi & Sakagami, 2009), derivados del metabolismo secundario. Son moléculas no nitrogenadas, los cuales son responsables de una amplia gama de colores, responsables de pigmentar de forma natural a los tejidos que los producen. Son encontradas principalmente en frutas y flores (Badui, 2006) aunque a veces están presentes en camarones y peces (Motohashi & Sakagami, 2009). En las plantas juegan un papel muy importante ya que atraen a los animales encargados de la polinización y dispersión de semillas, así como de protección a la planta ante agentes bacterianos o en condiciones de estrés (Kong, Chia, Goh, Chia, & Brouillard, 2003). Las antocianinas son después de la clorofila el grupo de pigmentos visibles al ojo humano más importante (Mendoza, 2012).

2.1.2.1. Biosíntesis

Estos compuestos surgen de dos rutas de biosíntesis: la ruta del *ácido malónico* presente en hongos, bacterias y en algunas plantas superiores y la ruta del *ácido shikímico* presente en plantas superiores. Mediante síntesis orgánica y experimentación *in vitro* se han establecido mecanismos que muestran la biosíntesis de las antocianinas, la cual consiste en la síntesis del anillo A de las antocianinas a partir de la ruta del ácido malónico-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta del ácido shikímico. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonio liasa (PAL), y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido *p*-coumárico. El *p*-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (Figura 4). La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación

del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posterior posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Mendoza, 2012).

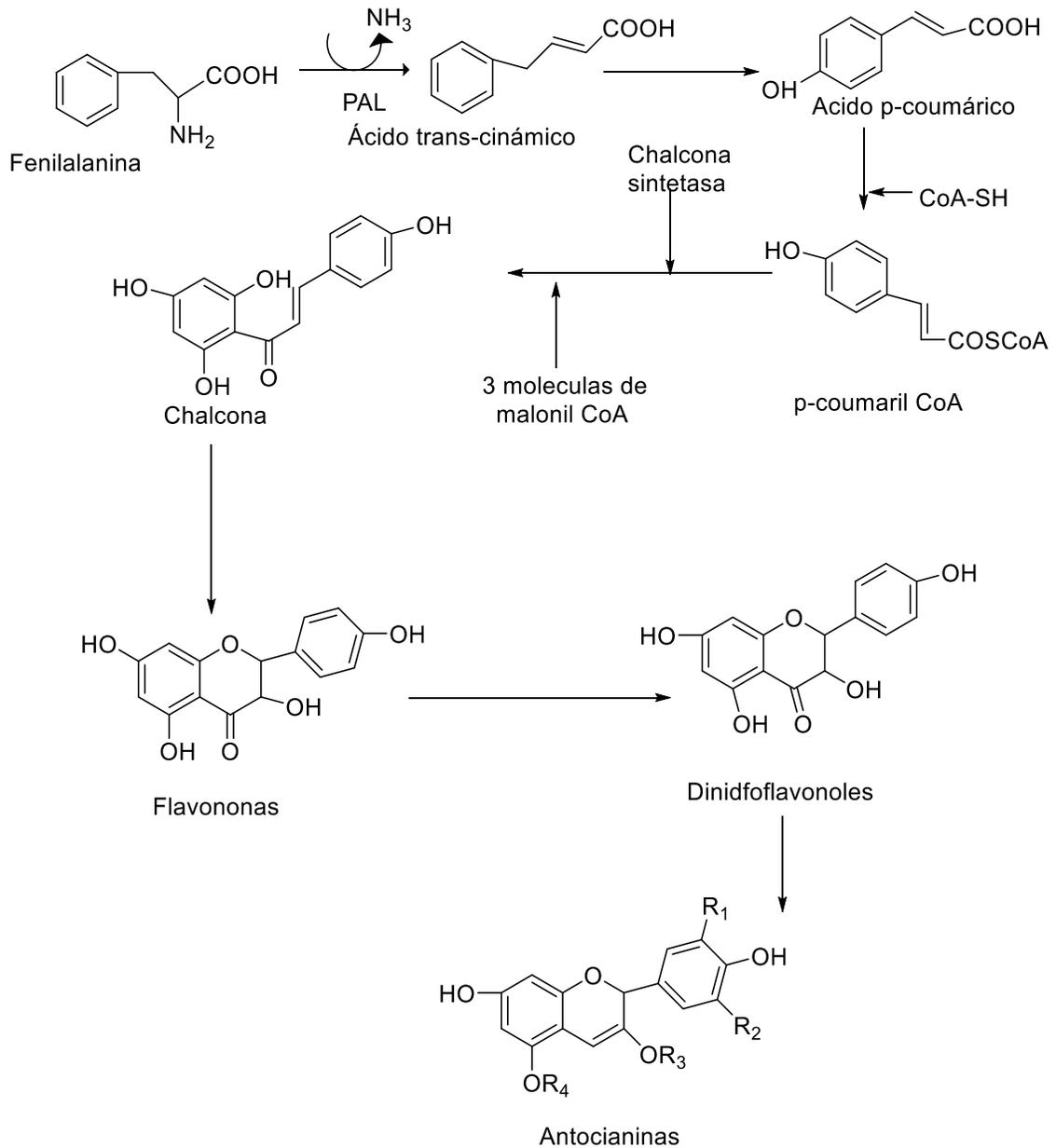


Figura 4. Ruta general de biosíntesis de las antocianinas (Mendoza, 2012).

2.1.2.2. Estructura y propiedades químicas de las antocianinas.

Está estructurada por un esqueleto de dos anillos bencénicos y uno heterocíclico con oxígeno (Figura 5). El núcleo central flavilo constituye la antocianidina, que unida a la fracción azúcar forma las antocianinas (Castañeda *et al.*, 2009). Se conocen alrededor de 20 antocianidinas de las cuales se derivan unas 300 antocianinas (Badui, 2006).

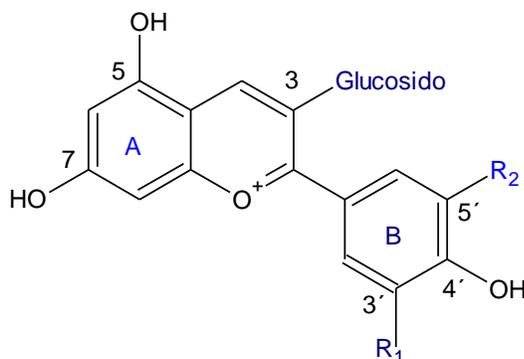


Figura. 5. Estructura base de las moléculas de antocianinas.

Tabla 1. Radicales de sustitución en las antocianinas (Vélez *et al.*, 2008).

Aglicona	3	5	7	3'	4'	5'
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
Cianidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H
Pelargonidin	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
Malvinidin	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃
Peonidin	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-H

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Las antocianinas presentan sustituciones glicosídicas en los carbonos 3 y 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad (Figura 6).

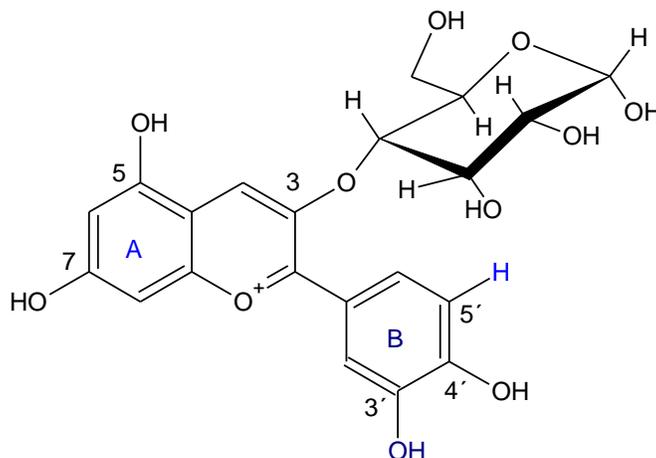


Figura 6. Estructura química de la molécula de Cianidin-3-glucósido.

Las moléculas de sacáridos glicosilantes que comúnmente se encuentran son la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Sin embargo puede existir otra variación, ocurriendo una acilación de los residuos de azúcar con ácidos orgánicos, estos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Kong *et al.*, 2003). Otros factores que determinan la estabilidad y el color de las antocianinas son:

- a) El efecto del pH; el pH tiene un efecto en la estabilidad y estructura de las antocianinas, aun pH ácido se ejerce un efecto protector en la molécula. En soluciones a pH 2 el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable como ion axonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. Cuando se va aumentando el pH ocurre una pérdida de protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables (Garzón, 2008). A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales (A, A-) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Figura 7).
- b) Efecto de la temperatura; Las antocianinas son moléculas termo sensibles, ya que aumentos en de temperatura resultan en la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura del anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).
- c) El efecto del oxígeno y el ácido ascórbico; Existe una alteración en la estabilidad de las antocianinas debido a la degradación del oxígeno y el ácido ascórbico.

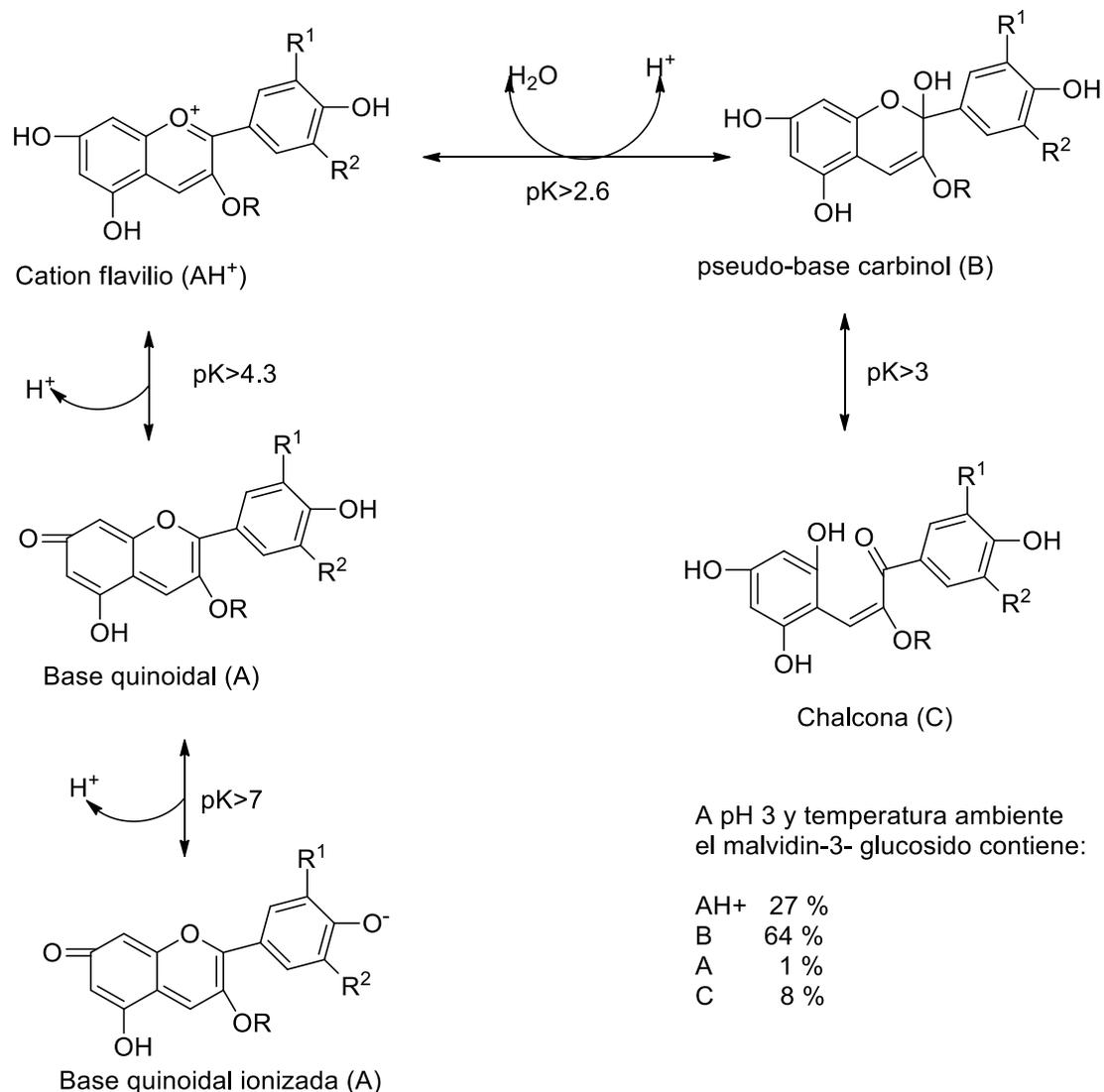


Figura 7. Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.

2.1.2.3. Métodos de extracción y caracterización de las antocianinas.

Para el análisis de las antocianinas se han desarrollado procesos, los cuales consisten en extracciones, separaciones y cuantificaciones, así como su detección e identificación.

Las extracciones de antocianinas son comúnmente llevadas a cabo con etanol acidificado (aproximadamente un 1% de HCl 1 M) con el objetivo de obtener la forma catiónica del ion flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido (Aguilera, Reza, Chew, & Mesa, 2011). Adicionalmente si los extractos contienen lípidos se le agrega un solvente orgánico (hexano).

Para las separaciones y la cuantificación de antocianinas se emplean técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectro de masas (HPLC-MS) puesto que permite la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos. Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm, la identificación de antocianinas está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta-visibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros. Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina puede proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación. Las antocianinas tienen un rango de absorción amplio al final de la luz azul del espectro visible con una absorción máxima observada en las regiones de 500-535 nm (Aguilera *et al.*, 2011).

La detección e identificación se realiza mediante técnicas espectrales logrando con ello una caracterización molecular. El análisis espectrométrico UV es la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas. El espectro de absorción de las antocianinas depende del pH. La absorción máxima a 520-540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas. Otra técnica que permite la elucidación de la molécula es espectrometría de masas. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es usada para confirmar la identidad de los compuestos de antocianinas en plantas y fluidos biológicos (Aguilera *et al.*, 2011).

2.1.2.4. Beneficios de las antocianinas en la salud.

Muchas actividades biológicas le han sido atribuidas a las antocianinas, los primeros estudios que se realizaron evaluaban la capacidad antioxidante de las dietas ricas en antocianinas y su mejora en la salud cardiovascular. Sin embargo hoy en día se conocen más beneficios gracias a estudios más avanzados. Las antocianinas son capaces de prevenir el daño oxidativo del ADN, proteínas, lípidos, y otras macromoléculas causadas por especies reactivas de oxígeno (ROS). Las antocianinas tienen una acción sistémica, ya que se absorben y circulan en la sangre, y es en esta se distribuyen para una mejor biodisponibilidad actuando sobre

diferentes tejidos diana en el cuerpo humano (Pascual-Teresa *et al.*, 2013). Las antocianinas también pueden actuar a nivel local, en el intestino, si no son absorbidos por la mucosa intestinal. También pueden actuar como agentes tópicos, por ejemplo, mediante la protección de la piel de la radiación ultravioleta.

Como antioxidantes naturales son benéficas a la salud porque cumplen con la función de neutralizar radicales libres que puedan afectar a las moléculas biológicas. Dado que los radicales libres son inestables y altamente reactivas ya que remueven un electrón de su alrededor para alcanzar su estabilidad. Por esta alteración a su entorno es que provoca una cadena que daña muchas células y pueden ser indefinidos si los antioxidantes no intervienen. Los antioxidantes son capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, ya que estos liberan electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres logrando así su estabilidad sin provocar una alteración en su entorno (Vélez, *et al.*, 2008). La deficiencia natural de electrones de las antocianinas las hace compuestos particularmente reactivos como antioxidantes que protegen al DNA, incluyen la regulación de enzimas importantes en el metabolismo de xenobioticos y carcinogénicos, la modulación de receptores nucleares, la expresión génica y las de proliferación, angiogénesis y apoptosis de la señalización subcelular.

Las antocianinas extraen un oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxido [$O_2^{\cdot-}$], radicales hidroxilos [$\cdot OH$], peróxidos lipídicos o hidroperóxidos [$ROO\cdot$]. De esta manera, bloquean la acción tóxica de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (Konigsberg Fainstein, 2008). Es por ello que tienen inferencia directa en la prevención de algunas enfermedades tales como la formación de tumores, cánceres, enfermedades degenerativas y estrés oxidativo (Tabla 2).

Tabla 2. Características que confieren funcionalidad a un antioxidante (Konigsberg Fainstein, 2008).

	El mayor número de grupos hidroxilos puede incrementar la actividad antioxidante.
	La ortodihidroxiestructura en el anillo B confiere estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización electrónica.
Funcionalidad de los antioxidantes	La hidroxilación en las posiciones 3', 4' del anillo B juegan un papel importante en la función de la actividad antioxidante.
	La glucosilación puede reducir su actividad comparada con su correspondiente aglicon
	Los grupos 3 y 5 hidroxilos confuncion 4- oxo en los anillos A y C dan maximo poder inhibidor de radicales libres.
	Presentan una reacción de transferencia de electrones y forman un intermediario estable que los ayuda a unirse a los radicales libres, rompen la reacción en cadena de peroxidación de radicales libres de ácidos grasos insaturados.

2.1.2.5. Biodisponibilidad de las antocianinas

La biodisponibilidad de las antocianinas depende en gran parte de la naturaleza del glicósido y también por la estructura de la aglicona. Las antocianinas pueden ser absorbidos como glucósidos en el estómago e intestinos (Wang, Carmella, Keyes, Kuo, Huang, Hecht & Stoner 2012).

Las antocianinas al presentar una unión con un glúcido (monosacárido mayoritariamente). Esta unión influirá en sus propiedades químicas y biológicas ya que volverá más polar a la molécula, teniendo un efecto en los coeficientes de partición. Las agliconas al ser de carácter hidrófobo pueden difundirse a través de las membranas pasivamente. La unión con un glúcido provoca el aumento en su carácter hidrofílico, provocando que su paso hacia el interior de una célula sea por

un mecanismo de transporte activo específico o una hidrólisis del β -glicosido antes de la absorción (Marczylo, Cooke, Brown, Steward, W., & Gescher, 2009).

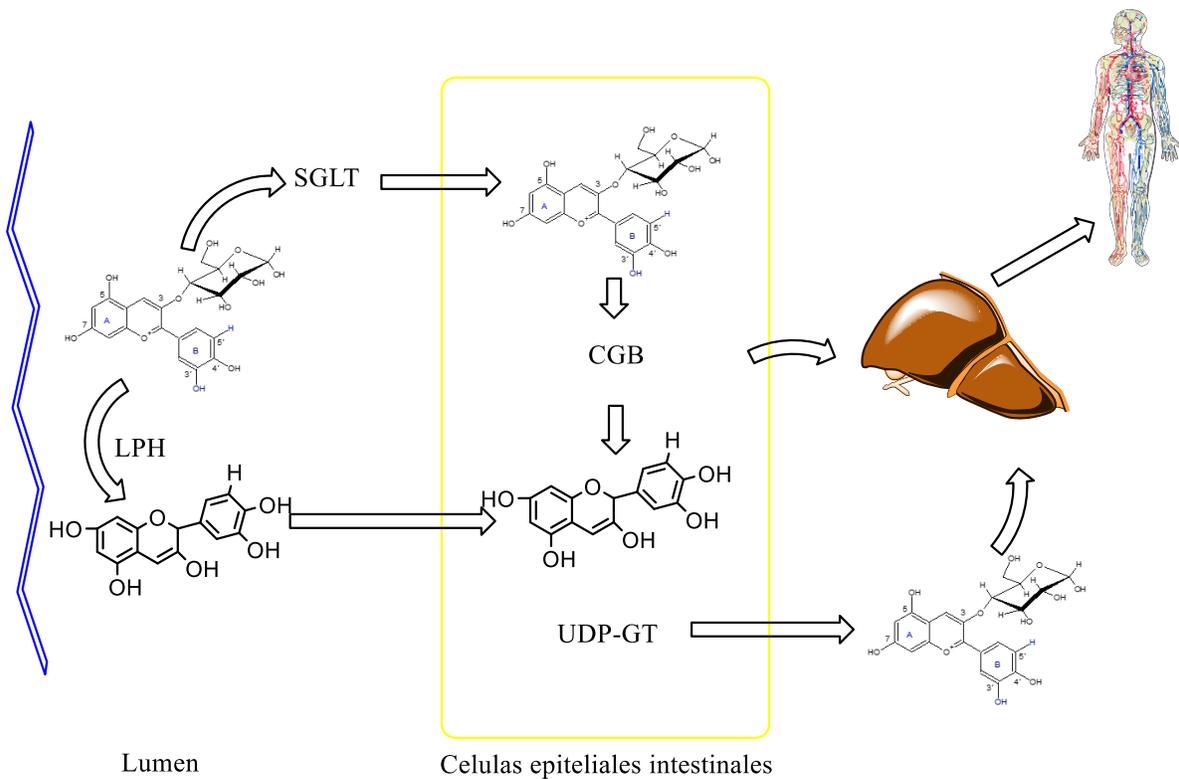


Figura 8. Mecanismos potenciales de absorción de las antocianinas (Adaptado de Wang *et al.*, 2012)

La absorción según evidencias experimentales ocurre en el intestino delgado (Wang *et al.*, 2012; Marczylo *et al.*, 2009), sin embargo no se ha logrado determinar completamente como ocurre dicho mecanismo. Aun se desconoce como se incorpora la antocianina glicosilada al enterocito. Existen dos mecanismos propuestos para el transporte de antocianinas al sistema circulatorio (Figura 8), el primero propone que el transporte del glicosido queda intacto con ayuda de un co-transportador de Sodio-Glucosa, la segunda vía propone una hidrólisis celular del glicosido a través del lactato florizina hidrolasa en el borde estriado o membrana de borde en cepillo continuando con una difusión pasiva de la aglicona (Wang *et al.*, 2012; Marczylo *et al.*, 2009). Algunas proporciones de antocianinas son absorbidas en el intestino grueso donde se metabolizan por enzimas bacterianas o se degradan por la inestabilidad del pH (Wang *et al.*, 2012) dando como resultado dos principales metabolitos, ácido protocatecuico y ácido homoprotocatecuico (Figura 9), estos dos

ácidos también juegan un papel importante en los efectos quimiopreventivos de las antocianinas. Evidencias experimentales han demostrado que las dos vías están implicadas en la absorción de las antocianinas.

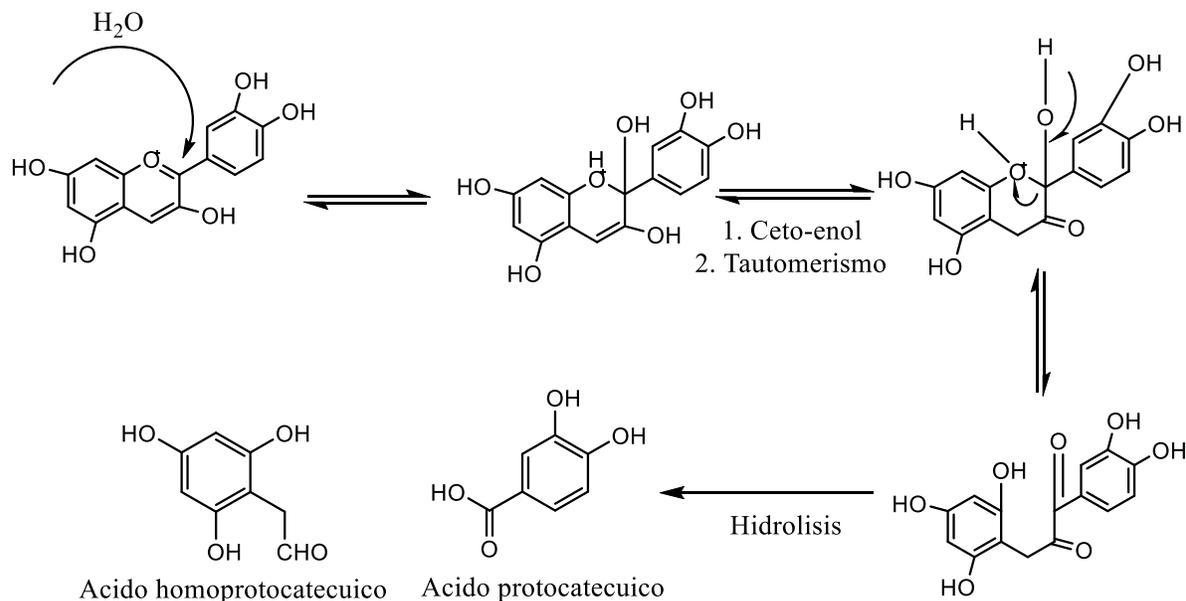


Figura 9. Degradación química para la formación de ácido protocatecuico (Adaptado Keppler *et al.*, 2005)

Las antocianinas son metabolizadas a través de la metilación, la glucoronidación y sulfoconjugación, esto ha quedado demostrado por pruebas análisis experimentales realizados en orina. La eliminación ocurre por la orina, heces fecales, excreción mediante la exhalación de CO₂ o una nueva reabsorción de estos (Wang *et al.*, 2012).

2.1.3. Actividad tumoral.

La actividad tumoral (neoplasma) o ambiguamente llamado cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades, que pueden afectar cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o benignos.

El cáncer o tumor maligno es propiciado por el incontrolable crecimiento de la progenie de una célula transformada es decir puede ser debida a una alteración en la secuencia del ADN o solo una modificación en la pauta de expresión genética sin que exista ningún cambio en la secuencia del ADN (cambio epigenético). Durante este proceso las células tumorales acumulan mutaciones que pueden llevar a

cambios en las proteínas o pueden expresar proteínas extrañas de virus oncogénicos. Estos cambios pueden ser detectados por el sistema inmune sin embargo la mayor parte de los tumores son ignorados por el sistema inmune (Regueiro & López, 2002; Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, & Watson, 2010).

La diferencia de los tumores malignos de los benignos se puede apreciar en la tabla 3. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Cuanto más ampliamente produzca metástasis un cáncer, más difícil de erradicar resulta (Alberts *et al.*, 2010).

Tabla 3. Diferencias entre tumores malignos y benignos.

TUMORES MALIGNOS	TUMORES BENIGNOS
Algunos son de crecimiento lento pero con frecuencia son de crecimiento muy rápido.	Son de crecimiento lento
Crece de manera progresiva e invasiva.	Sólo crecen hasta determinado tamaño.
Destruyen células, tejidos y órganos.	No destruyen células normales.
Crecen de manera desordenada.	Crecen de manera ordenada.
Se propagan a los tejidos de otros órganos del cuerpo como metástasis.	No se propagan a otros tejidos.
Normalmente no producen efectos secundarios graves. Si no se controla su crecimiento ocasionan la muerte.	Normalmente no producen efectos secundarios graves.

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a escala mundial. Se le atribuyen 7.6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008 (OMS, 2013). Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar (1.37 millones de defunciones); gástrico (736 000 defunciones); hepático (695 000 defunciones); colon rectal (608 000 defunciones); mamario (458 000 defunciones); cervico uterino (275 000 defunciones).

Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13.1 millones en 2030 (OMS, 2013).

Fuentes estadísticas del INEGI (2014) muestran que en el año 2013 el cáncer ocupó la tercera causa de muerte en México y se estima que se detectan cada año 128 mil casos nuevos a nivel mundial. En 2012, la principal causa de muertes por neoplasmas malignos fue en órganos digestivos (33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años o más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil).

Para averiguar la “estatificación” de un cáncer hay que tener en cuenta que cada cáncer manifiesta las etapas de forma diferente. Sin embargo, de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer, en general se puede considerar la descripción de las etapas de la siguiente manera:

- Etapa 0: *Carcinomain situ*, que quiere decir que el cáncer se encuentra todavía concentrado en su lugar original y aún no se ha esparcido a otros órganos.
- Etapa I, Etapa II y Etapa III: Entre más alto sea el número de la etapa quiere decir que el cáncer se ha extendido más, ya sea porque el tumor ha crecido o porque ha invadido órganos vecinos.
- Etapa IV: Cuando el cáncer se ha esparcido haciendo metástasis en otros órganos, es decir, ha formado nuevos tumores en otras partes del cuerpo.

Existen diversas causas por las que inicia una proliferación anormal en las células. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber:

- I. Carcinógenos físicos: como las radiaciones ultravioleta e ionizantes.

- II. Carcinógenos químicos: como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida).
- III. Carcinógenos biológicos: como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (Go *et al*, 2012).

2.1.3.1. Cáncer Cervicouterino (CaCU).

El cáncer cervical (CaCU) es el segundo cáncer más común en mujeres de todo el mundo (Schiffman, Castle, Jeronimo, Rodriguez, & Wacholder, 2007), es una enfermedad la cual consiste en la invasión de células cancerosas en los tejidos del cuello uterino, esta invasión puede ser intraepitelial, pre-invasivo o invasor. La etiología que presenta el CaCu es compleja, sin embargo, la presencia de alguno de los 15 genotipos de virus del papiloma humano carcinogénico (VPH) en un 99% es desencadenante de esta incidencia (Schiffman *et al.*, 2007). Existen otros factores de riesgo como la iniciación sexual a corta edad, embarazos múltiples, infecciones concomitantes (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, VHS 2- virus del herpes simple) del tracto genital, SIDA, tratamiento inmunosupresor, el tabaquismo, entre otros (López, 2013). La enfermedad en etapa temprana puede ser asintomática. Su diagnóstico requiere de una biopsia para su examen histopatológico el cual indicara y seleccionara la modalidad del tratamiento adecuado (Kyrgiou & Shafi, 2010).

La Organización Panamericana para la Salud (2013) refiere que cada 270 000 mujeres mueren de cáncer cervicouterino y más del 85% de estas defunciones se registran en países de bajos y medianos ingresos. En Oaxaca 18 de cada 100 mujeres que padecen cáncer en un rango de edad de 15 años o más presentan cáncer del tipo cervicouterino (INEGI, 2014)

2.1.3.2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es un crecimiento anormal de los tejidos del pecho. El tipo de tumor más frecuente se da en las glándulas productoras de leche. El cáncer de mama tiene una etiología compleja que incluye factores genéticos, biológicos, conductuales, ambientales y sociales. El cáncer de mama se clasifica en 3

categorías: histopatológico, biológico y molecular. La clasificación histopatológica se subdividen a su vez en cáncer invasivo y no invasivo. La clasificación biológica es la expresión de los receptores hormonales (tales como estrógeno y progesterona). Los tres subtipos moleculares principales son tipo luminal (el subtipo A y B), HER2 amplificado, basal y todos tienen un distintivo biológico y fisiológico (McLare & Ng, 2014). Este tipo de padecimientos crónico degenerativos, se pueden tratar desde diferentes perspectivas farmacoterapéuticas, dependiendo del estadio de la enfermedad. Los tratamientos para el cáncer de mama, son múltiples y difieren en seguridad, eficacia y costos (Gómez, Altagracia, Kravzov, Cárdenas & Poo, 2008).

Durante el 2012, el cáncer de mama fue la cuarta causa de muerte entre las mujeres con cáncer de 20 años y más edad, mientras que a nivel nacional ocupa el segundo lugar (INEGI, 2014).

2.1.3.3. Líneas celulares cancerígenas

Las líneas celulares son un grupo de células individuales que son idénticos genéticamente como resultado de divisiones mitóticas de una sola célula progenitora, existe dos tipos principales:

1. Continua, las que son de un solo tipo de célula, diploide de aproximadamente 50 generaciones.
2. Continua establecida, es un tipo celular, aneuploide teóricamente de infinitas generaciones (Pina & López, 2015).

Estas líneas celulares surgen de un cultivo primario el cual proviene de un órgano o tejido que presente células cancerígenas, conservando con ello el cariotipo característico del organismo que dio origen (Pina *et al*, 2015).

2.2. Antecedentes

En la actualidad se han realizado investigaciones acerca de beneficios que conllevan el consumo y uso de los flavonoides, en especial de los compuestos antocianinicos ya que investigaciones han demostrado que poseen una gran capacidad antioxidante.

Tsuda *et al.* (2003) publicaron resultados de los efectos de maíz morado en la prevención de la obesidad y la mejora de la resistencia a la insulina en ratones, los cuales fueron alimentados durante 12 semanas por una dieta alta de cianidina-3-glucosido de maíz morado y una dieta alta en grasas y una dieta de ambas, la dieta alta en antocianinas suprimió significativamente a los efectos de la dieta de alta en grasas que indujo un incremento en la ganancia de peso y especialmente del eso del tejido adiposo, indujo hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, la cual se normalizo en los ratones alimentados con la dieta mixta.

Miyazawa *et al.*, (1999) indicó que durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo en los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos, que incluyen la reducción de enfermedades coronarias, efectos anticarcinógenico, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además de la mejora de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo, todos estos efectos están relacionados con la actividad antioxidante de las antocianinas.

Wang y Jiao (2000) demostraron que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrogeno, contra radicales peróxido, superóxido, hidroxilo y oxígeno singulete.

Hagiwara *et al.* (2002) demostró que el suministro de col morada (alimento con alto contenido antocinanic) a ratas de laboratorio causa la supresión de tumores.

Koide *et al* (1997) reportaron efectos antitumorales al usar extractos de soya roja que contienen cianidina conjugada con glucosa y ramnosa.

Tristan *et al.* (2005) realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Trsitán *et al.* (2008), demostraron que las antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos mostraban actividad hipoglicémicas.

Se ha demostrado que la fracción del vino rojo que contiene antocianinas es capaz de suprimir la proliferación de células HCT-15 de cáncer colon humano y células de adenocarcinoma gástrico (Pascual-Teresa *et al.*, 2013).

Hagiwara *et al.* (2001) demostró que la administración de maíz morado, con un alto contenido de antocianinas, a ratas disminuye la incidencia y la multiplicidad de los adenomas y carcinomas colorrectales inducidos por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo (4,5- β) piridina (PhIP).

Marko *et al.* (2004) reportó un efecto inhibitorio del grupo de las antocianinas (delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina, y malvidina) sobre la proliferación celular de carcinoma en la vulva de humanos (A431) y células humanas de carcinoma de colon (HT29).

La angiogénesis juega un papel crítico en el desarrollo del cáncer, Liu *et al.* (2005) encontró que las antocianinas de frambuesas negro puede reducir el desarrollo de tumores al inhibir la angiogénesis.

Investigaciones recientes indican que las antocianinas y sus metabolitos de degradación pueden proporcionar en parte un efecto protector contra la aterosclerosis que es multi-causal e involucra diferentes vías bioquímicas (Hidalgo *et al.*, 2012).

En un estudio realizado Prior *et al.* (2004) en humanos, se demostró que la máxima absorción de antocianinas fue de 350 μ mol de antocianinas, tanto aciladas como no aciladas, sugiriendo que existe una saturación del mecanismo de absorción; esta investigación también concluyó que la ingesta ideal diaria de antocianinas debe de ser de 100 mg.

Urías- Lugo *et al.*, realizaron una comparación entre el maíz azul híbrido y el nativo, para demostrar la inhibición de celular anormal (inhibición tumoral) en líneas celulares MCF7, HepG2, CaCo2, HT29 y PC3, mostrando una mejor inhibición en las MCF-7, HepG2, CaCo2 y PC3. También se logró caracterizar la molécula de cianidin-malonil-glucosido como compuesto mayoritario (Urias-Lugo *et al.*, 2015).

Diversas investigaciones dan cuenta de las propiedades nutraceuticas y antioxidantes que poseen las antocianinas, sin embargo son escasas las investigaciones realizadas con maíces azules y más granos provenientes del estado de Oaxaca.

Tabla 4. Estudios sobre contenido nutraceutico, análisis y extracción de antocianinas presentes en maíces pigmentados (*Zea mays L.*).

Nombre	Estudio	Resultados	Autores
Análisis y caracterización de Antocianinas en diferentes variedades de Maíz (<i>Zea Mays</i>) boliviano.	Se recolectaron 6 variedades de maíces morados a los cuales se les extrajo la mayor cantidad de antocianinas presentes y con HPLC se determinó y caracterizó la molécula de antocianina.	Se identificaron dos antocianinas mayoritarias en todas la variedades de maíz morado cianidina-3-glucosido (42.5%) y cianidina -3-(6´malonil)-glucósido (30-7%). Las antocianinas son del tipo simple y no aciladas. Presentan gran potencial como antioxidantes.	Cuevas E., Antezana A. & Winterhalter P. (2008).
Cuantificación de antocianinas en el maíz morado (<i>Zea Mays L.</i>), tratados con ultrasonido.	Se cuantificó el contenido de antocianinas en el extracto acuoso de maíz morado sometido a diferentes valores de pH y tiempo de sonicado.	El pH influye de manera significativa en el contenido de antocianinas, en el intervalo de pH 4.0 – 4.5, se encontró mayor concentración con un tiempo ultrasónico del 7 min, influenciados por la energía cinética que adquieren las moléculas, a consecuencia del tratamiento con ultrasonido.	Vélez, P., Villanueva, J. & Leandro, C.
Potencial nutraceutico de los Maíces Pigmentados	Se evaluaron las características nutraceuticas de los maíces pigmentados así como sus beneficios en la salud.	Los maíces pigmentados poseen son antioxidantes y nutraceuticos por ello su consumo provee de beneficios en la prevención de enfermedades, además que son una gran alternativa en el mundo comercial.	Ramirez G., Moran B., Rico D. & Jiménez C. (2012).
Propiedades nutraceuticas de la harina y tortillas hechas con nixtamalización ecológica.	Se evaluó el proceso de nixtamalización tradicional con un nuevo modelo de nixtamalización ecológico.	El modelo de nixtamalización presento ventajas sobre el modelo tradicional ya que conservo propiedades en la harina y tortillas.	Rodríguez L., Figueroa J., Ramos M., & Méndez L. (2013).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El índice de personas con padecimientos crónicos degenerativos han aumentado en el país y con ellos también los costos. Por ello se han buscado alternativas que logren prevenir, tratar y erradicar estos padecimientos así como aminorar costos. Investigaciones demostraron que las moléculas denominadas Antocianinas que son las causantes de las tonalidades en diversos frutos y plantas poseen propiedades nutraceuticas y antioxidantes, es decir que el consumo de estas nos ayudan a mantener nuestra salud y además previenen la aparición de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer, síndrome metabólico, entre otras.

En estado de Oaxaca hay un índice alto en el número de incidencia de enfermedades crónico degenerativas, según reportes de la Secretaria de Salud (2013), existen 6 enfermedades crónico degenerativas de mayor latencia en el estado; cáncer de mamá, hipertensión, diabetes, cáncer cérvico uterino, obesidad y artritis reumatoide.

El Maíz VC-42 (*Zea Mays L.*) al poseer Antocianinas representa una alternativa potencial en la prevención de las enfermedades crónico degenerativas. El maíz VC-42 representa una fuente importante de nutraceuticos los cuales ya proporciona un beneficio a la salud por ello puede ser un complemento alimenticio tal y como lo demuestran diversas investigaciones

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a altos índices de personas con padecimientos crónico degenerativos y a los altos costos que generan los tratamientos se han buscado alternativas que logren prevenir, tratar y erradicar estos padecimientos por ello se plantea el uso de las antocianinas provenientes del Maíz Azul VC-42 (*Zea mays L.*) como una alternativa a estos padecimientos ya que investigaciones demuestran que pueden prevenir e inhibir líneas celulares de cáncer colon, son antiinflamatorios, antihipertensores, fomentan la regeneración de los tejidos entre otras. Por ello esta investigación va encaminada a generar conocimiento que sienten las bases para el aprovechamiento integral de este grano, así como incentivar la realización de mayor investigación para potenciar el uso de este y así lograr que estos alimentos se han mejor aceptados y con ello buscar mejorar también su calidad.

V. HIPOTESIS

Las antocianinas presentes en el extracto de maíz azul VC-42 poseen actividad antitumoral ya que inhiben el crecimiento celular anormal en ensayos *in vitro*.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antitumoral del extracto de antocianinas del maíz azul VC-42 en modelos *in vitro*.

6.2. Objetivos Específicos

- a. Extraer y evaluar el contenido de antocianinas presentes en el maíz azul VC-42.
- b. Caracterizar el contenido de antocianinas presentes en los extractos acetanólicos.
- c. Obtener por cromatografía en columna las fracciones de los extractos de maíz azul VC-42.
- d. Caracterizar el contenido de antocianinas presentes en las fracciones de maíz azul VC-42.
- e. Evaluar la actividad anti-tumoral *in vitro* mediante ensayos de proliferación celular (MTT) y viabilidad celular (CV).

VII. METODOLOGIA

La presente investigación se desarrolló en cuatro etapas las cuales son a) Colecta y selección de los granos, b) estandarizaciones de laboratorio, c) extracción y caracterización de las antocianinas, y d) ensayos biológicos las cuales emplearon las siguientes metodologías (Figura 10).

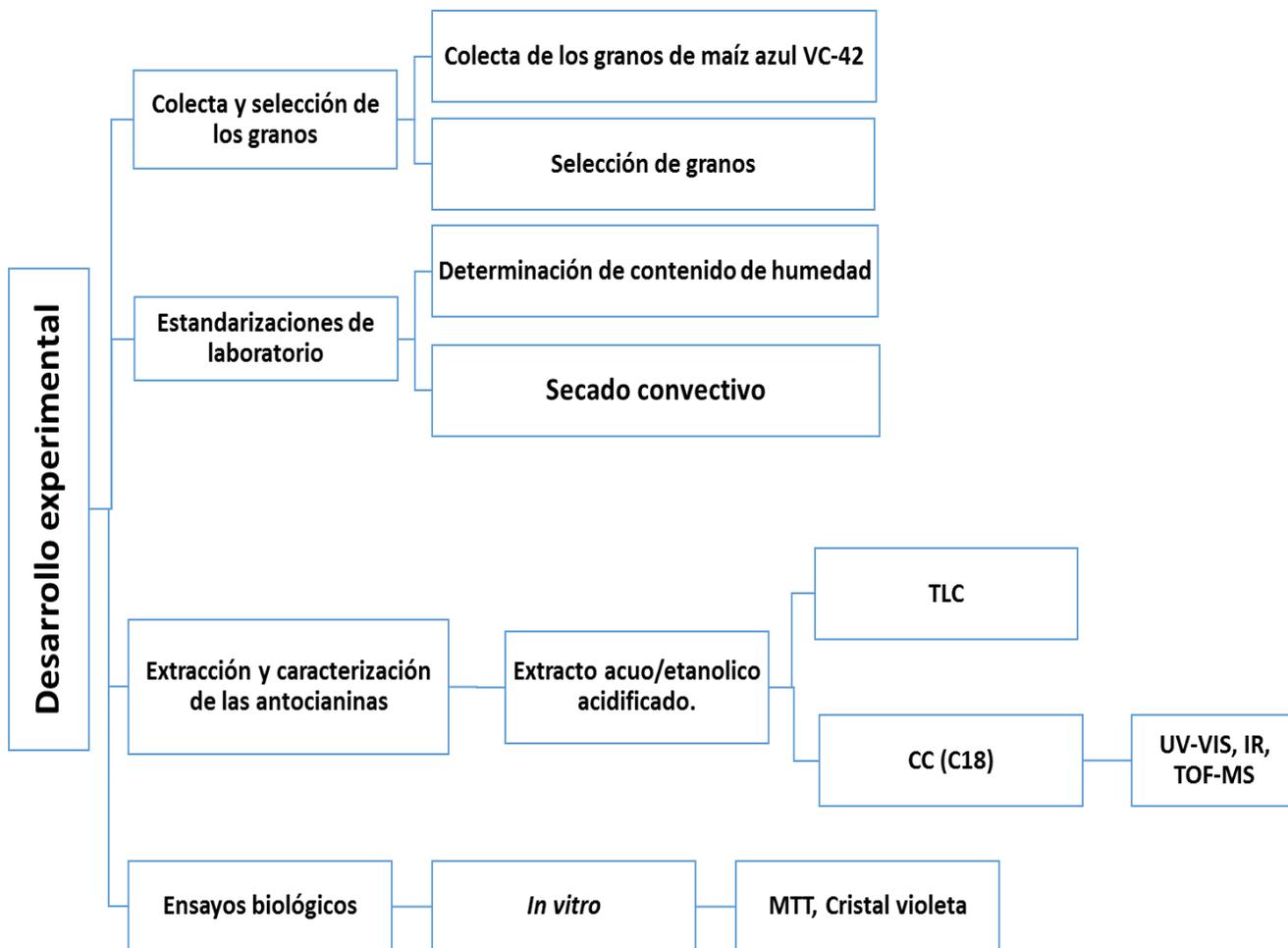


Figura 10. Diagrama del desarrollo experimental.

7.1. Colecta y selección de los granos

La colecta y selección de los granos de Maíz Azul VC-42 se realizó en comunidades que sembraron y cosecharon este grano por primera vez. Personal especializado del INIFAP encargados de su propagación fueron los que realizaron la primera colecta de este maíz mejorado y fue quien proporciono este material experimental al laboratorio de Tecnología Agroalimentaria del CIIDIR-Unidad Oaxaca para su segunda propagación.

7.1.1. Colecta de los granos de maíz VC-42.

La colecta de los granos fue realizada en comunidades de los Valles Centrales pertenecientes al estado de Oaxaca, México, a cargo del M. en C. Flavio Aragón Cuevas el cual proporcionó 0.5 kg de muestra del maíz azul VC-42 al laboratorio de Tecnología Agroalimentaria, para su propagación con fines experimentales.

7.1.2. Siembra y cosecha del maíz azul VC-42

La siembra y propagación del maíz VC-42 se realizó en 2 campos experimentales (Hornos y San Jacinto), la siembra fue del tipo temporal, ya que se esperó hasta el mes de julio para realizar la siembra y la recolección de mazorcas (anexo A y B) se realizó en un tiempo aproximado de 125 días (tabla 5).

Tabla 5. Siembra en campo experimental

<i>Campo experimental</i>	<i>Siembra (DD/MM/AA)</i>	<i>Cosecha (DD/MM/AA)</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Condiciones</i>
<i>Hornos</i>	15-07-2014	17-11-2014	17° 1'42.64"N 96° 43'23.48"O	Temporal
<i>San Jacinto</i>	21-07-2014	24-11-2014	17° 5'20.44"N 96° 45'3.11"O	Temporal

7.1.2. Selección de los granos de maíz VC-42.

Obtenidas las mazorcas después de 120 días se realizó el desgranado de las mazorca (Anexo C y D) para obtener los granos del maíz, posterior a esto, se realizó la selección de los granos ocupando la Norma del CODEX alimenticio para el maíz (CODEX STAN 153-1985) la cual menciona que el maíz deberá ser inocuo y apropiado para el consumo humano, deberá estar exento de sabores y olores extraños, además de insectos vivos, no debe presentar suciedad en cantidades que puedan representar un peligro para la salud. Por ello se empleó un método de cribado e inspección visual.

7.2. Estandarizaciones de laboratorio.

La estandarización de los granos se realizó en el laboratorio de Tecnologías Agroalimentarias del CIIDIR-Unidad Oaxaca, donde se determinó el porcentaje de humedad y se realizó el secado de los granos en un secador de charolas.

7.2.1. Determinación de humedad en base a la norma oficial NOM-116-SSA1-1994.

De los granos de maíz azul VC-42 previamente seleccionados se tomó una muestra ≥ 1.000 g en cápsulas de porcelana a peso constante (por triplicado) empleando el método de determinación de humedad de la NOM-116-SSA-1994, posteriormente estas cápsulas fueron llevadas a una estufa y se secaron durante 24 horas a una temperatura aproximada de $100^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. Posteriormente se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador para alcanzar la temperatura ambiente y estas pudieran ser pesadas. Obtenido el peso se calculó el porcentaje de humedad.

7.2.2. Secado del maíz azul VC-42.

Los granos de maíz VC-42 fueron secados mediante un método convectivo en una estufa de charolas el cual tuvo como fin principal la conservación de los granos de maíz VC-42 y lograr un mejor acondicionamiento al momento de realizar la extracción. Para ello se emplearon 2.337 Kg de granos de maíz VC-42 distribuidas en 5 charolas de plásticos por un tiempo de 240 minutos a una temperatura de 35° C.

7.3. Extracción y caracterización de las antocianinas.

La extracción se realizó con una solución acuosa/etanolica acidificada al 0.1% con ácido clorhídrico (EtOH/H₃O⁺ 0.1% HCl) en una proporción 1:4 (fase solida/ fase liquida).

7.3.1 Extracto acuoso/etanolico acidificado.

Extracción.

Para la realización del extracto se pesaron 50.0 g de maíz azul VC-42 y se molieron para obtener polvo de maíz (E-VC-42-1A). La extracción de los pigmentos se realizó en una mezcla H₃O⁺ (HCl≈1 M): EtOH (70:30) en un sistema sólido-líquido (1:4) en un baño de ultrasonidos por 90 minutos obteniéndose dos fracciones un residuo sólido 1 (RE.S1) y fracción acuosa 1 (F.A. EtOH/H₃O⁺1), la extracción se repitió por 5 veces mas hasta que no se observó coloración en la fase sólida (maíz azul VC-42). Posteriormente las 5 fracciones acuosas se mezclaron obteniéndose una fase acuosa total 1 (F.A.T-1 EtOH/H₃O⁺1) la cual se filtro al vacío con papel filtro de poro fino para obtener un extracto acuoso total 2 (F.A.T-2 EtOH/H₃O⁺ 1) libre de materia orgánica el cual fue almacenado en un recipiente de vidrio y envuelto con papel aluminio para evitar que los compuestos fotosensibles se degradaran con la luz. Obtenido el extracto se concentró con un rotavapor a 35° C a vacío constante (Figura 11). Al final se obtuvo un concentrado de color rojo.

Obtenido el concentrado F.A.T-2 EtOH/H₃O⁺ 1 se congeló la muestra a -70° C con nitrógeno líquido para realizar el proceso de liofilización empleando un equipo de vidrio acoplado a una bomba de vacío Gast con motor de 1/4 hp, el cual se realizó en el laboratorio de Química Analítica de la Escuela Superior de Ingeniería Química del Instituto Politécnico Nacional (ESIQIE-IPN), obteniéndose un extracto orgánico total 1 (E.O.T.1), el cual fue sometido a pruebas de solubilidad.

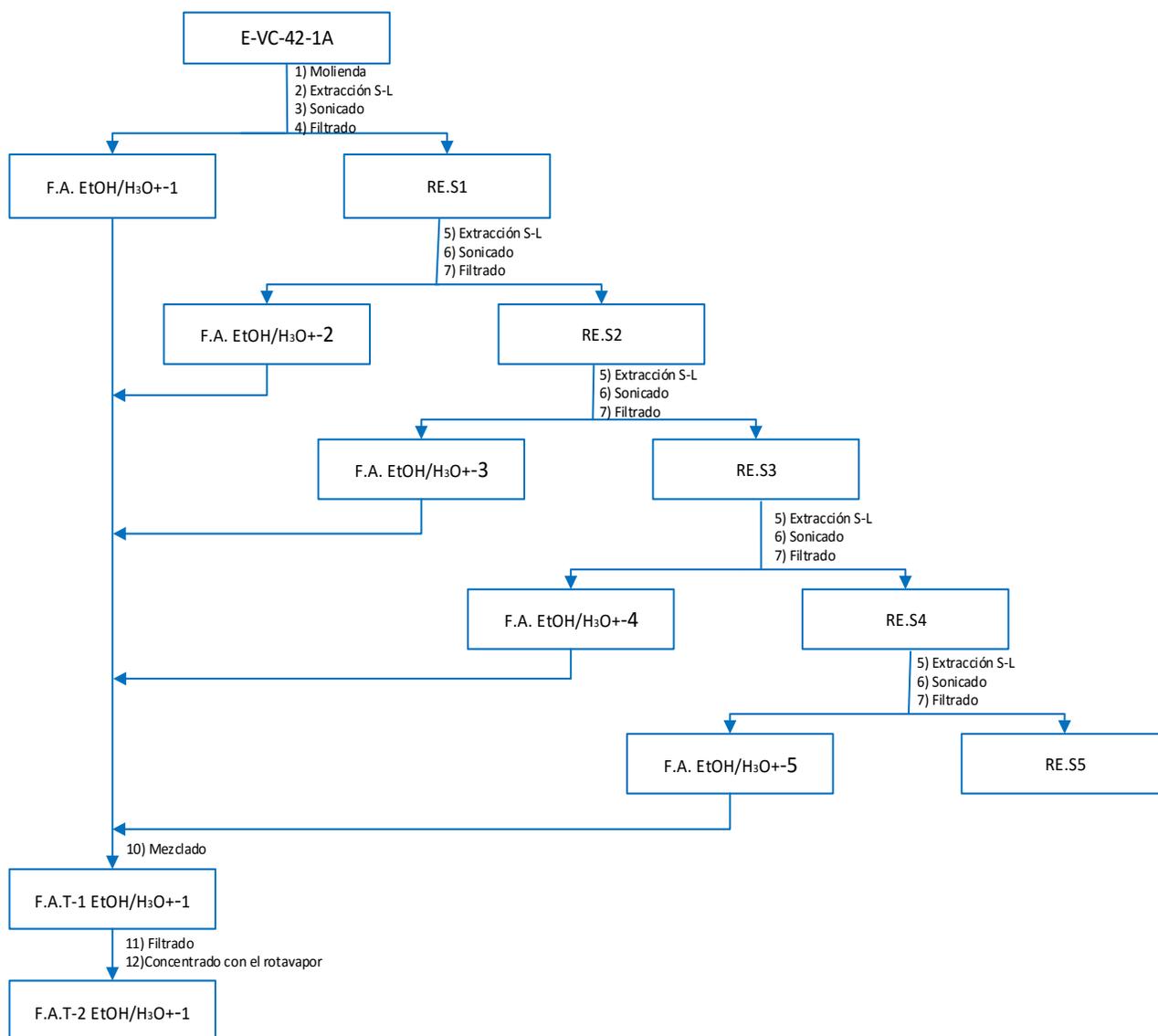


Figura 11. Diagrama de fases de extracción.

Solubilidad.

La prueba de solubilidad se efectuó utilizando aproximadamente 1 mg del extracto E.O.T 1B y un 1 ml de cada uno de los siguientes disolventes; Agua (H₂O), Etanol (EtOH), Metanol (MeOH), Tolueno (Ph-CH₃) y Acetato de etilo (AcOEt). En tubos de ensayo de 100 x 10 mm se disolvió E.O.T 1B con los solventes antes mencionados empleando un sonicador por 10 minutos a temperatura ambiente para lograr una mejor disolución. Obtenido el solvente en el cual se logró una mayor disolución, se realizó la disolución del E.O.T.1 en agua acidificada H₃O⁺ empleando

el sonicador por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se llevó acabo el fraccionamiento del E.O:T.1A empleando una técnica de cromatografía en columna C18 (figura 12).

Efecto del pH.

Obtenido el extracto E.O.T.1 una fracción se disolvió en 10 ml de EtOH para poder realizar pruebas del efecto del pH. En tres tubos de ensayo de 100 x 10 mm se colocaron aproximadamente 3 ml de la disolución etanol/extracto orgánico total 1B (EtOH/E.O.T.1B), el tubo 1 solo contenía EtOH/E.O.T.1B, al tubo 2 se le agregó 0.5 mililitros de agua acidificada al 0.01 % con ácido clorhídrico (H_3O^+ 0.01 % HCl), disminuyendo el pH de la solución lo cual se observó al lograr un cambio de color en la solución (EtOH/ E.O.T.1B/ H_3O^+ 0.01 % HCl), en el tubo 3 se agregó 0.5 mililitros de Hidroxido de sodio al 0.05 Normal (NaOH 0.05 N) el cual incremento el pH de la solución EtOH/ E.O.T.1B/ NaOH 0.05 N y la coloración tornó distinta.

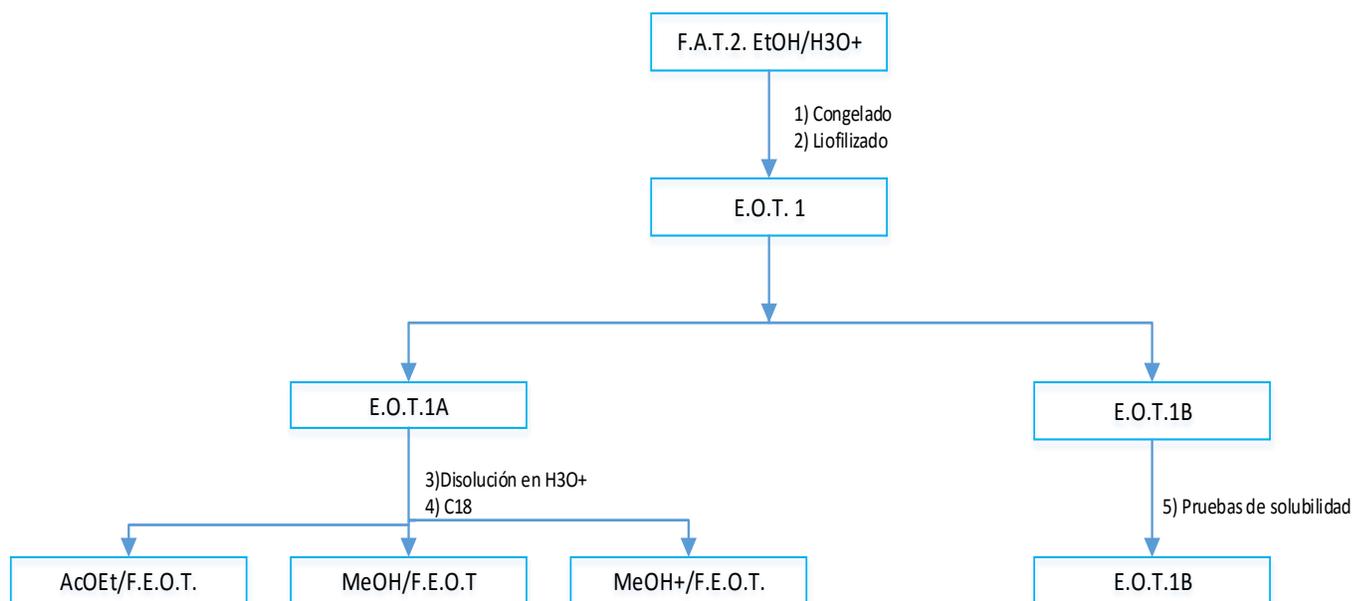


Figura 12. Diagrama de separación mediante pruebas químicas.

7.3.2. Técnicas cromatografías

La cromatografía funciona con el mismo principio que la extracción, pero en este caso una fase se mantiene fija y la otra se mueve a través de ella. En cromatografía la fase móvil (el disolvente) puede ser un líquido o un gas, la fase estacionaria (la que se encuentra inmóvil) es normal entre un líquido viscoso o un sólido adherido a las paredes del interior de un tubo capilar o una placa (Harris, 2012).

7.3.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC).

Después de la extracción se realizaron pruebas de cromatografía en capa delgada (TLC) empleando placas de sílica gel con base de aluminio. Las dimensiones de las placas deben de ser de 6.0 x 2.5 cm. Las fases móviles que se utilizaron en la experimentación fueron las siguientes:

1. Pentanol/propanol/ Ácido acético/Agua (3:2:2:1).
2. N-butanol/Ácido acético/Agua (4:2:1).
3. Ácido fórmico/Ácido clorhídrico/ Agua (10:1:3).
4. Alcohol amílico/Ácido acético/Agua (2:1:1).
5. Butanol-Acetona-Agua-Acido acetico (6:8:5:1)
6. Ácido acético/Agua (3:2).
7. Propanol/Etanoato de etilo (3:1).

En cada una de las placas de sílica gel se le colocaron 3 spots del extracto orgánico total 1A (E.O.T1A) y fueron eluidos con las mezclas de solventes. Posteriormente se evaluaron sus índices de frente (RF) así como la separación que el extracto presentó.

7.3.2.2. Cromatografía en Columna (C18).

Para la separación y purificación del E.O.T.1A utilizamos columnas cromatografías Bakerbond de octadecyl (C18) de polaridad media en un sistema Respret® de 12 puertos colectores SPE, las cuales nos ayudaron a fraccionar el extracto E.O.T.1A ya que se removieron azúcares, poli fenoles y demás compuestos secundarios. El orden de elución empleado fue de polaridad creciente, iniciando con 5 ml de acetato de etilo (AcOEt), 5 ml de metanol (MeOH) y 5 ml de metanol

acidificado al 0.1 % con ácido clorhídrico (MeOH⁺0.1% HCl). Obtenida la última fracción de extracto orgánico total (MeOH⁺/F.E.T.O) se realizó una lectura de la absorbancia (barrido) UV-VIS (Cintra 4040 GBC Scientific Equipment Serie UV4175GBC) en una longitud de onda de 220 y 700 nm logrando con ello dar certeza que la fracción que se separó fuera la de contenido de antocianinas (Figura 13).

7.3.2.3. Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (IR) se empleó para realizar una prospección adecuada de los grupos funcionales presentes en la fracción del extracto orgánico total (MeOH⁺/F.E.O.T.), la técnica que se empleó fue mediante la elaboración de pastillas de Bromuro de potasio (KBr) utilizando un equipo Infrarrojo FTIR&IR L1280044-Perkin Elmer (Lozada, Soria, Jaramillo 2013).

7.3.2.4. TOF-MS

Mediante el uso del analizador de masas “tiempo de vuelo” (TOF-MS) de la marca Agilent se determinó la presencia de las antocianinas contenidas en la fracción final obtenida mediante cromatografía de cartucho C18 (MeOH⁺/F.E.O.T.). La ventaja de este equipo es su precisión en la masa atómica con 4 decimales. La muestra fue procesada en el laboratorio de Química Orgánica del CINVESTAV- Unidad Zacatenco (Figura 13).

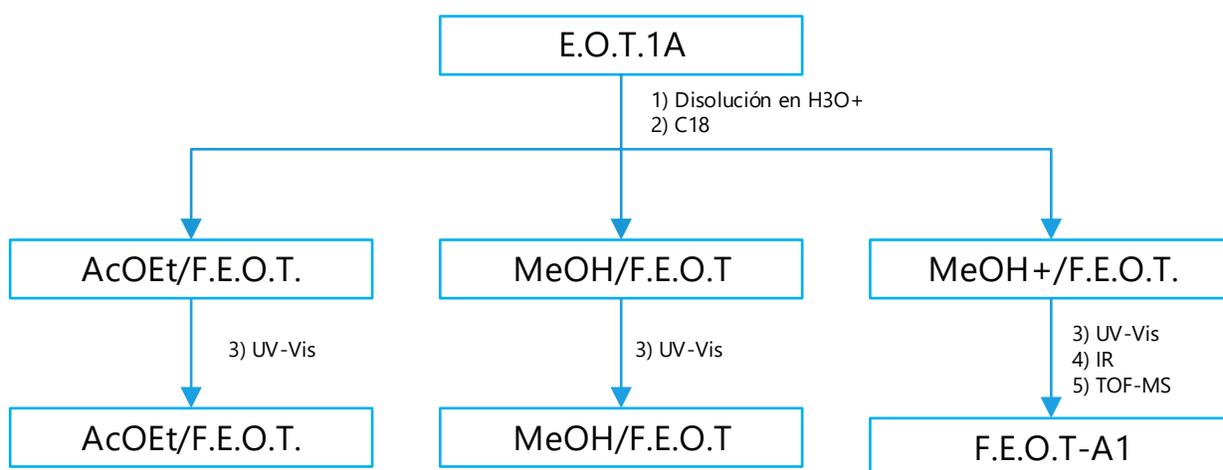


Figura 13. Diagrama de caracterización química.

7.4. Ensayos *in vitro*.

Obtenido la fracción mayoritaria de antocianinas se evaluó la efectividad de este principio activo en líneas celulares de cáncer de mama (CM) y cáncer cervicouterino (CaCU). Las líneas celulares de cáncer cérvico uterino fueron del tipo Hela (PVH 18), SiHa (PVH 16) mientras que las líneas de cáncer de mama fueron del tipo MCF-7.

7.4.1. Cultivos celulares.

En los ensayos experimentales se emplearon líneas celulares HeLa y SiHa que son provenientes de células de adenocarcinomas positivas a VPH 18 y positivas a PVH 18 respectivamente; procedentes de *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular MCF-7 proviene de un carcinoma ductal de mama invasivo.

El cultivo de las líneas celulares se realizó en frascos *Cellgro Corning®* de 25 cm² con 8 ml de medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), suplementado con bencilpenicilina y L-glutamina, 5% de suero bovino fetal previamente desactivado (Mediatech, USA). Los cultivos se incubaron en una cámara de CO₂ marca Binder modelo C 170, a 37° C, al 6 % de CO₂ y una atmósfera a saturación de humedad durante 24, 48, 72, 96 horas para realizar ensayos futuros.

Para realizar la experimentación *in vitro* se realizaron dos ensayos biológicos a 24, 48, 72, 96 horas ocupando cinco concentraciones del extracto F.E.O.T-A1 a 150 microgramos/mililitro (µg/ml), 125 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, así como las células blanco (células sin extracto F.E.O.T-A1 y solvente) y células con disolvente (Etanol al 70 %).

1.- Las pruebas de proliferación celular con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), nos permitieron saber si el principio activo (p.a.) no afecta la proliferación celular tumoral. La prueba de MTT consistió en una incubación de células SiHa, HeLa y MCF-7 por 24, 48, 72 y 96 horas con 20 µl del extracto F.E.O.T-A1 a diferentes concentraciones en placas para ensayos de inmuno-absorción (ELISA) añadiendo a cada uno de los pozos 20 µl de MTT para una posterior incubación por 4 horas, al término de este se eliminó el medio mediante decantación

y por último se agregó isopropanol acidificado a cada pozo, posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm.

2.- El ensayo de cristal violeta se realizó agregando a cada pozo de la placa de incubación 50 µl de glutaraldehído al 1.1% e incubó por 10 minutos, después se decantó la placa de glutaraldehído al 1.1% y se lavó con agua, posteriormente agregamos 50 µl cristal violeta al 0.1 % en solución amortiguadora de ácido fórmico e incubamos 20 minutos más, lavando nuevamente la placa con agua corriente, agregándole por último 50 µl ácido acético al 10% y leyendo su absorbancia a 595 nm (Figura 14).

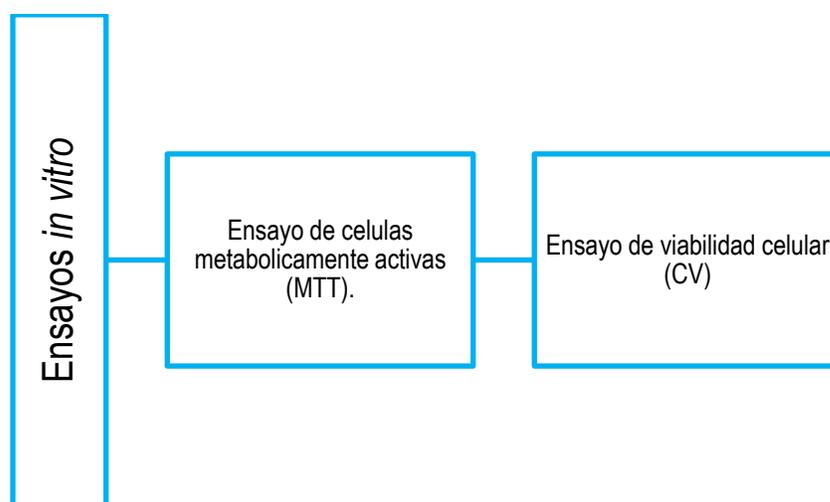


Figura 14. Fases de experimentación de las pruebas *in vitro*.

VIII. RESULTADOS

Colecta y selección de los granos

La colecta de los granos fue realizada en comunidades de los Valles Centrales pertenecientes al estado de Oaxaca, México, a cargo del M. en C. Flavio Aragón Cuevas el cual proporcionó 0.5 kg de muestra del maíz azul VC-42 al laboratorio de Tecnologías Agroalimenticias del CIIDIR-Unidad Oaxaca para su propagación con fines experimentales. Este maíz pertenece a la raza Bolita, Variedad VC-42, el cual creció y se adaptó al clima semi-cálido y a una altitud aproximada de 1556 msnm (INIFAP, 2014), con siembra del tipo temporal en los dos campos experimentales (Hornos y San Jacinto) ya que se esperó hasta el mes de julio para realizar la siembra, condiciones que fueron las idóneas para el crecimiento y desarrollo de estos granos mejorados (Espinosa *et al*, 2009), estas condiciones también propiciaron la abundancia de metabolitos secundarios tal como reporta Chudil *et al.*, (2007) ya que factores de estrés en las plantas (temperaturas elevadas y estiaje) propician un incremento en estos. La intensa coloración azul de los granos de maíz VC-42 fue indicativo de una abundancia de metabolitos secundarios, principalmente antocianinas (Castañeda *et al.*, 2009). La afloración se dio en los días 65 después de la siembra y la recolección de mazorcas se realizó en el día 125, lo cual concuerda con lo reportado por el INIFAP (2014) y Espinosa *et al* (2009). El rendimiento obtenido fue de aproximadamente 30 Kg de granos de maíz VC-42 a partir de 0.5 kilogramos (Anexo D).

Los granos obtenidos al final cumplieron con la Norma del CODEX alimenticio para el maíz (CODEX STAN 153-1985) ya que estos eran inocuos y apropiados para el consumo humano, exentos de sabores, olores extraños, insectos vivos y suciedad los cuales pudieran representar un peligro para la salud o afectaran la experimentación.

Estandarizaciones de laboratorio.

La estandarización de los granos se realizó en el laboratorio de Tecnologías Agroalimentarias del CIIDIR-Unidad Oaxaca, donde se determinó un porcentaje de humedad en los granos de maíz azul VC-42 del 14.5%, este resultado nos indica que aproximadamente a una temperatura de 25 °C el maíz VC-42 se conserva aproximadamente cincuenta días según lo reportado por la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO, 1993) por ello se decidió secar los granos de maíz VC-42, además al tener una materia prima seca (maíz VC-42) cuando el solvente interactúa con las células vegetales del maíz VC-42 estas se reconstituyeron (Sharapin, 2000).

3.700 kilogramos de granos de maíz VC-42 fueron secados mediante un método convectivo en una estufa de charolas. El contenido de humedad final fue de 10.40%, posteriormente se empaquetó al vacío para su conservación y su posterior uso. Este contenido de humedad y empaquetado al vacío nos garantizó la estabilidad de los granos por más de 125 días a 25 °C, además al ser empacados al vacío se retiró todo contenido de oxígeno el cual es necesario para el desarrollo de microorganismos que pudieran facilitar la descomposición de los granos (FAO, 1993).

Extracción y caracterización de antocianinas.

El extracto obtenido (F.A.T EtOH/H₃O⁺-1A) a partir de la mezcla de las 5 fases de F.A.EtOH/H₃O⁺ fue de aproximadamente 230 ml, el cual tenía una coloración roja. Para obtener este extracto el solvente penetró en el interior de la célula vegetal expeliendo el aire contenido en su citoplasma iniciando con ello el proceso extractivo, formando un momento dipolar entre las moléculas del solvente y los compuestos que fueron extraídos (Sharapin, 2000). Posteriormente el extracto F.A.T-1 EtOH/H₃O⁺-1 se concentró y liofilizó obteniendo un polvo de color rojo (E.O:-T1B) con un peso de 345.60 mg.

Solubilidad

Para las pruebas de solubilidad se empleó aproximadamente 1 mg del extracto orgánico total 1B (E.O-T1B) y 1 ml de disolvente (H₂O, EtOH, MeOH, AcOEt y Tolueno) donde se observó que en solventes polares tales como H₂O, EtOH y MeOH el extracto se disolvió completamente tornando las soluciones a un color rojizo, esto nos indico que el extracto E.O-T1B es polar ya que cumplió con el principio fundamental de la solubilidad, el cual menciona que lo semejante disuelve lo semejante, expresión que significa que las fuerzas intermoleculares son del mismo tipo y magnitud (Chang, 2014). El solvente de mediana polaridad presento una disolución parcial entendiendo con ello que algunos componentes presentes en el extracto E.O-T1B poseen características medianamente polares. El solvente de nula polaridad no presento disolución alguna, dada las características polares que presento el extracto E.O-T1B (tabla 6).

Tabla 6. Prueba de solubilidad

Fracción	Solvente	Resultado
E.O-T1B	H ₂ O	(++)
E.O-T1B	EtOH	(++)
E.O-T1B	MeOH	(++)
E.O-T1B	AcOEt	(+)
E.O-T1B	Tolueno	(-)

Simbología (++) Muy disuelto, (+) Disolvió, (-) No disolvió

La primera extracción cumplió con el objetivo de remover metabolitos secundarios polares en especial antocianinas de la matriz vegetal (maíz VC-42), sin embargo al ser una mezcla de solventes muy polar también se extrajo azúcares, ácidos orgánicos y algunas proteínas (Castañeda *et al.*, 2009) por ello se requirió un método subsecuente de separación (cromatografía en columna C18).

Efecto del pH.

Obtenida la solución en la cual se disolvió el extracto concentrado se optó por disolver en etanol la muestra para realizar las pruebas de pH, haciendo variaciones en medio ácido, básico y neutro. Los resultados obtenidos revelaron cambios de coloraciones acordes a los colorantes principalmente a las antocianinas y desplazamientos batocromicos (Figura 15). Teniendo en cuenta que el medio neutro fue Etanol/F.O.T1B la coloración que se presentó fue un rojo moderado (Figura 16 A) sin embargo cuando se le agregó H_3O^+ (0.01% HCl) se obtuvo un pH de 4 (Figura 16 B), la coloración cambió a un rojo intenso presentándose un efecto hipercromico debido a la introducción de un auxocromo y también por la introducción de H^+ al medio y con ello logra una mayor estabilidad para la molécula.

En la prueba para el cambio básico al agregarle hidróxido de sodio (NaOH, 0.05 N) la coloración fue de color rojo a verde azulado (Figura 16 C), en esta se presentó un cambio batocromico debido a la introducción de un agente cromoforo (-OH) y con ello la apertura del heterociclo seguida de un la formación de una chalcona (Figura 15 y 16).

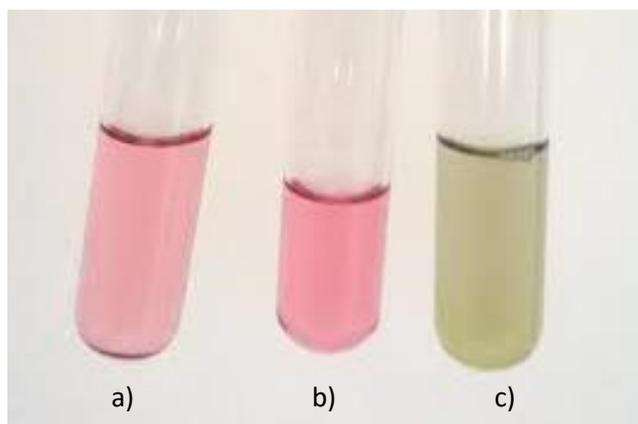


Figura 15. a) Medio Ácido, b) Medio Neutro y c) Medio Básico

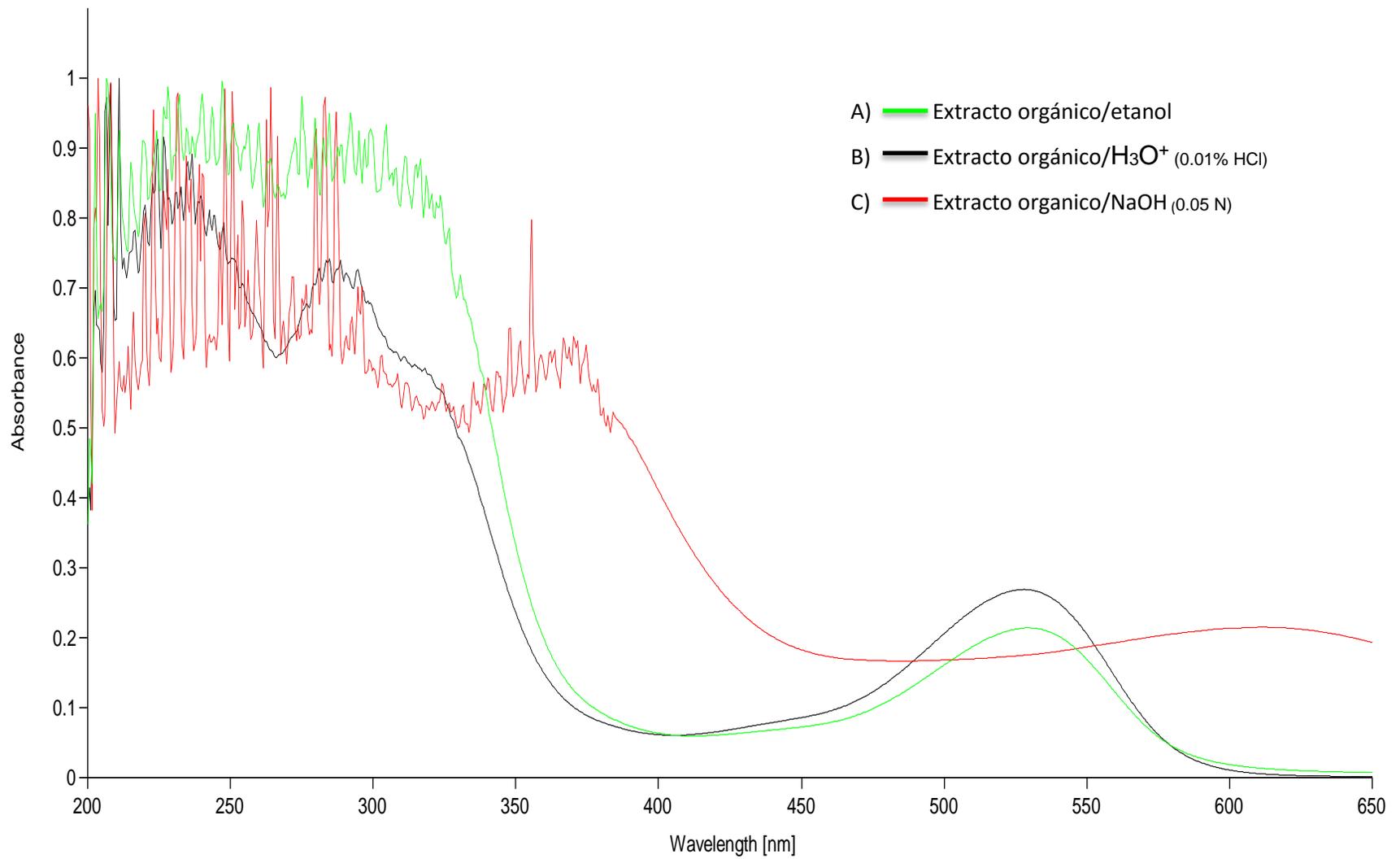


Figura 16. Efectos por el cambio de pH en medio etanólico A) Extracto en medio neutro, B) Extracto en medio ácido y C) Extracto en medio básico.

Cromatografía en capa fina

Se realizaron 2 tipos de cromatografía, en capa fina (TLC) y cromatografía en cartucho empacado (CC18). Las placas con muestra fueron eluidas con diversas mezclas de solventes para obtener una prospección química sobre las propiedades del compuesto como su la polaridad y el orden de elución para su fraccionamiento. Las placas de silica gel empleadas al ser polares retuvieron mayoritariamente a compuestos polares (tabla 7).

Tabla 7.

Mezclas de solventes de elución en cromatografía en placa fina.

<i>Mezcla de elución</i>	<i>Constante dielectrica (ϵ) a 25 °C</i>	<i>Rf</i>
Pentanol/propanol/ Ácido acético/Agua (3:2:2:1).	21.8	0.0
N-butanol/Ácido acético/Agua (4:2:1).	25.6	0.67
Ácido fórmico/Ácido clorhídrico/ Agua (10:1:3).	59.0	0.9
Alcohol amílico/Ácido acético/Agua (2:1:1).	28.5	0.68
Butanol-Acetona-Agua-Acido acetico (6:8:5:1)	21.9	0.61
Ácido acético/Agua (3:2).	35.8	0.71
Propanol/Etanoato de etilo (3:1).	15.0	0.0

Cromatografía en Columna (C18).

La columna empleada para la purificación fue de octadecil C18 de polaridad media la cual nos ayudo a fraccionar el extracto obtenido. El orden de elución empleado en la fragmentación fue acorde a las características de solubilidad presentado por el extracto así como por la prospección obtenida con la cromatografía en capa fina ya que todas estas nos indicaron que los compuestos del extracto eran de medianamente polares a compuestos polares (antocininas) Se obtuvieron 3 fracciones las cuales fueron analizadas mediante absorbancia UV-Vis, mediante un barrido de 220 y 700 nm (Figura 17).

Como se puede observar en la grafica de la figura 17 la fraccion eluida con acetato de etilo removi6 azucares y dem6s polifenoles afines al eluyente, obteniendose con ello gran cantidad de absorbancias, la eluci6n con metanol removio otros compuestos tales como betacarotenos o afines, mientras que la fracci6n final, la cual empleo metanol acidificado logr6 obtener absorbancias caracteristicas de las antocianinas (Rodriguez *et al*, 2001) con una variaci6n permitida de ± 5 nm seg6n las reglas de Woodward-Fieser (tabla 8).

Tabla 8. Absorbancias de fracciones obtenidas mediante C18.

<i>Fracci6n Organica Total 1A C18</i>	<i>λ max (nm)</i>					
AcOEt	200	210	235	242	286	531
MeOH	-	-	232	-	268	-
MeOH ⁺	204	-	-	-	273	527

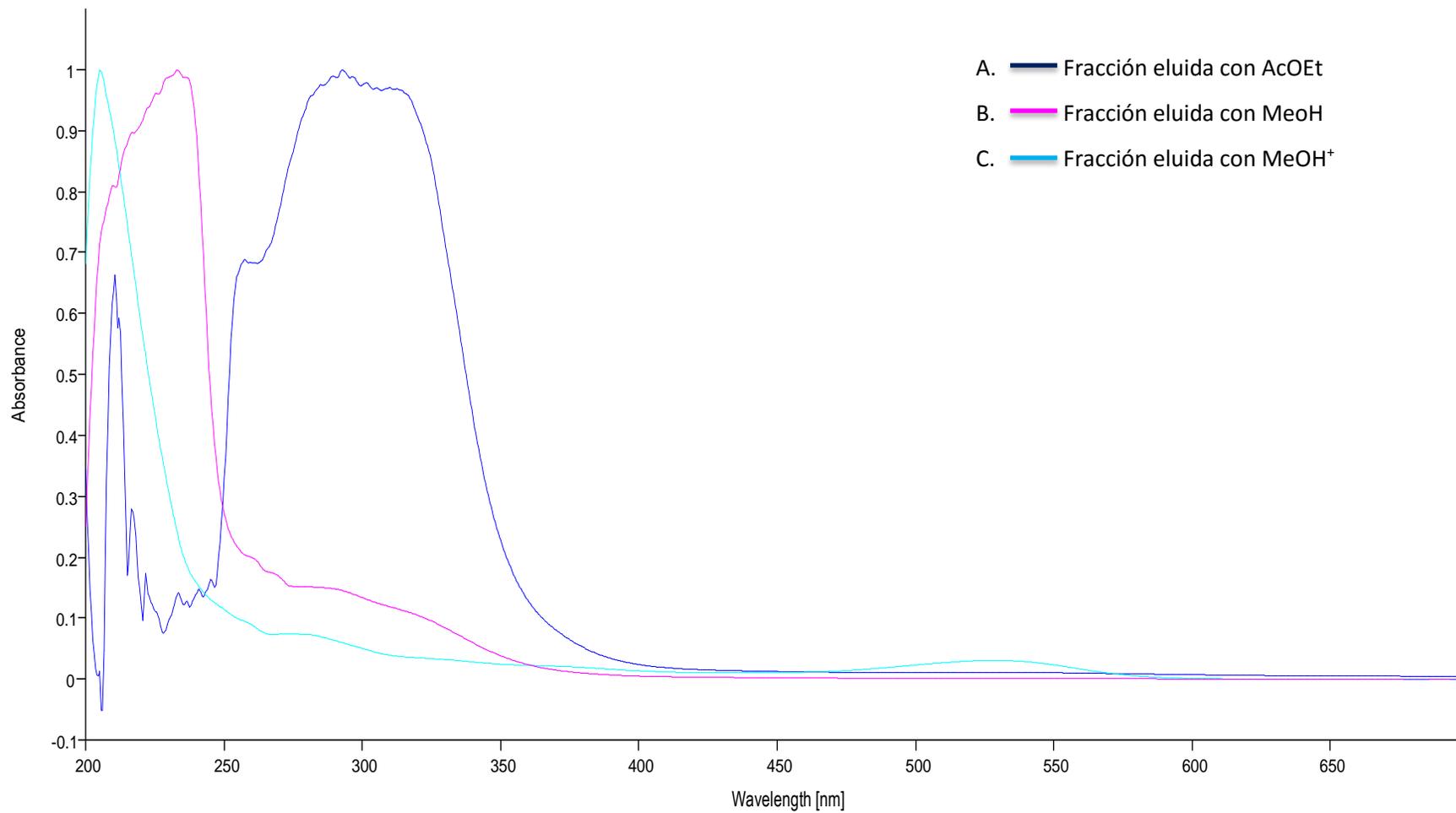


Figura 17. Espectro ultravioleta de fracciones obtenidas mediante cromatografía en columnas C18.

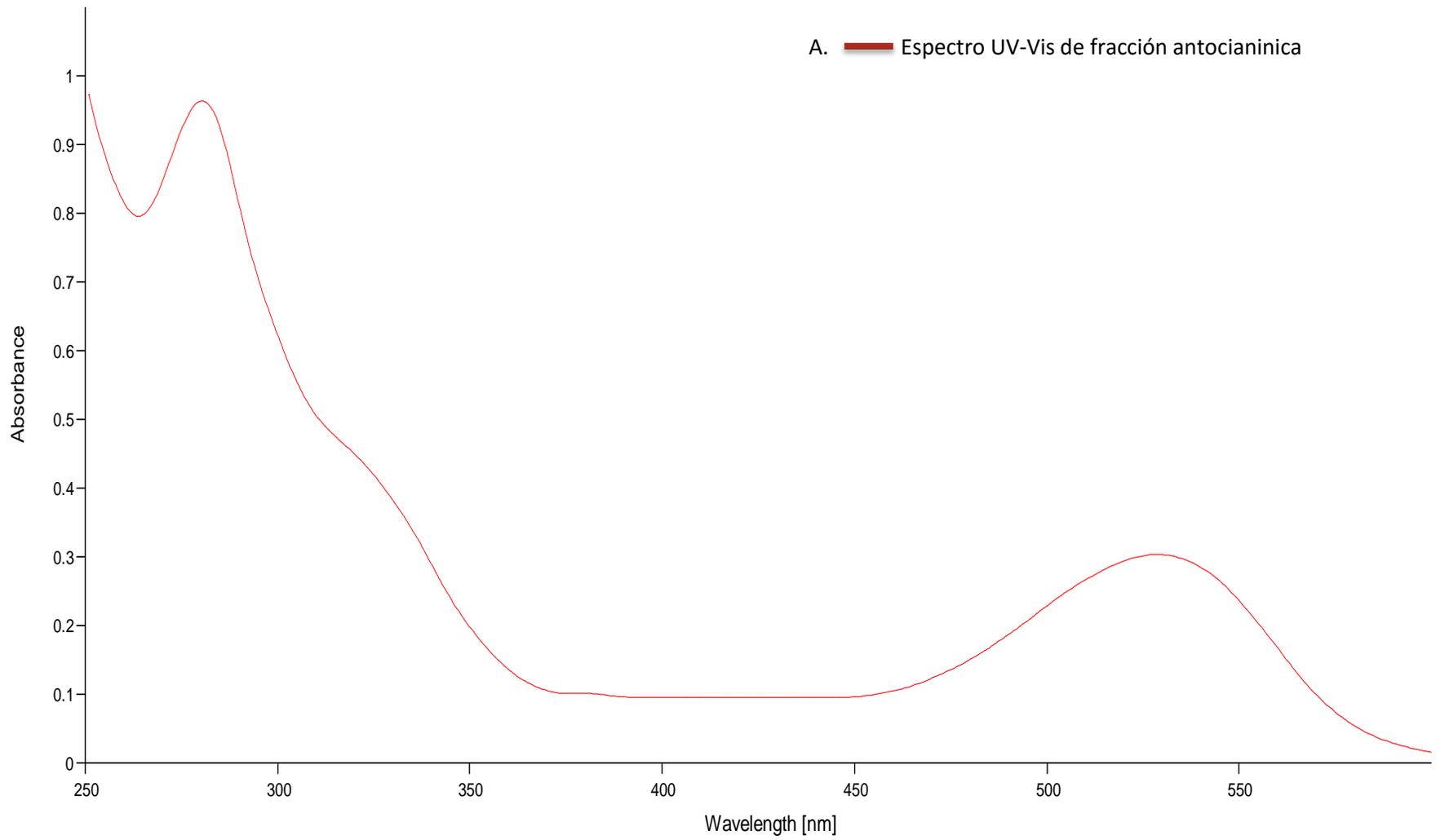


Figura 18. Espectro ultravioleta de fracción antocianinica

Espectroscopia infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (IR) se empleó para la prospección de grupos funcionales característicos de las antocianinas (figura 19), la técnica empleada fue mediante el uso de pastillas de Bromuro de potasio (KBr).

Los grupos funcionales caracterizados mediante espectroscopia infrarrojo -OH, C=O, C=C, C-O-C, los cuales pueden ser corroborados mediante técnicas de mapeo con tablas de número de onda sobre centímetro en espectroscopia de infrarrojo.

En la región de los grupos funcionales las bandas características obtenidas en el espectro infrarrojo a 3278 cm^{-1} se observó una banda amplia correspondiente a los grupos hidroxilos acoplados a anillos aromáticos en una vibración de valencia con estiramientos simétricos. En la región de 3278 cm^{-1} existe una banda característica de las vibraciones de valencia y estiramientos simétricos correspondientes a las uniones C-H (Lozada *et al.*, 2013; Yadav L. D. S., 2005).

Tabla 9. Grupos funcionales presentes en el extracto orgánico total 1 liofilizado.

<i>Longitud de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Grupo funcional correspondiente</i>	<i>Tipo de vibración</i>
3276	- OH Aromáticos	Valencia • Estiramiento simétrico
2905	- CH	Valencia • Estiramiento
1743	C=O	Valencia • Estiramiento
1729	C=C	Valencia • Estiramiento
1700	C=C	Valencia • Estiramiento
1033	-C-O-C	Deformación

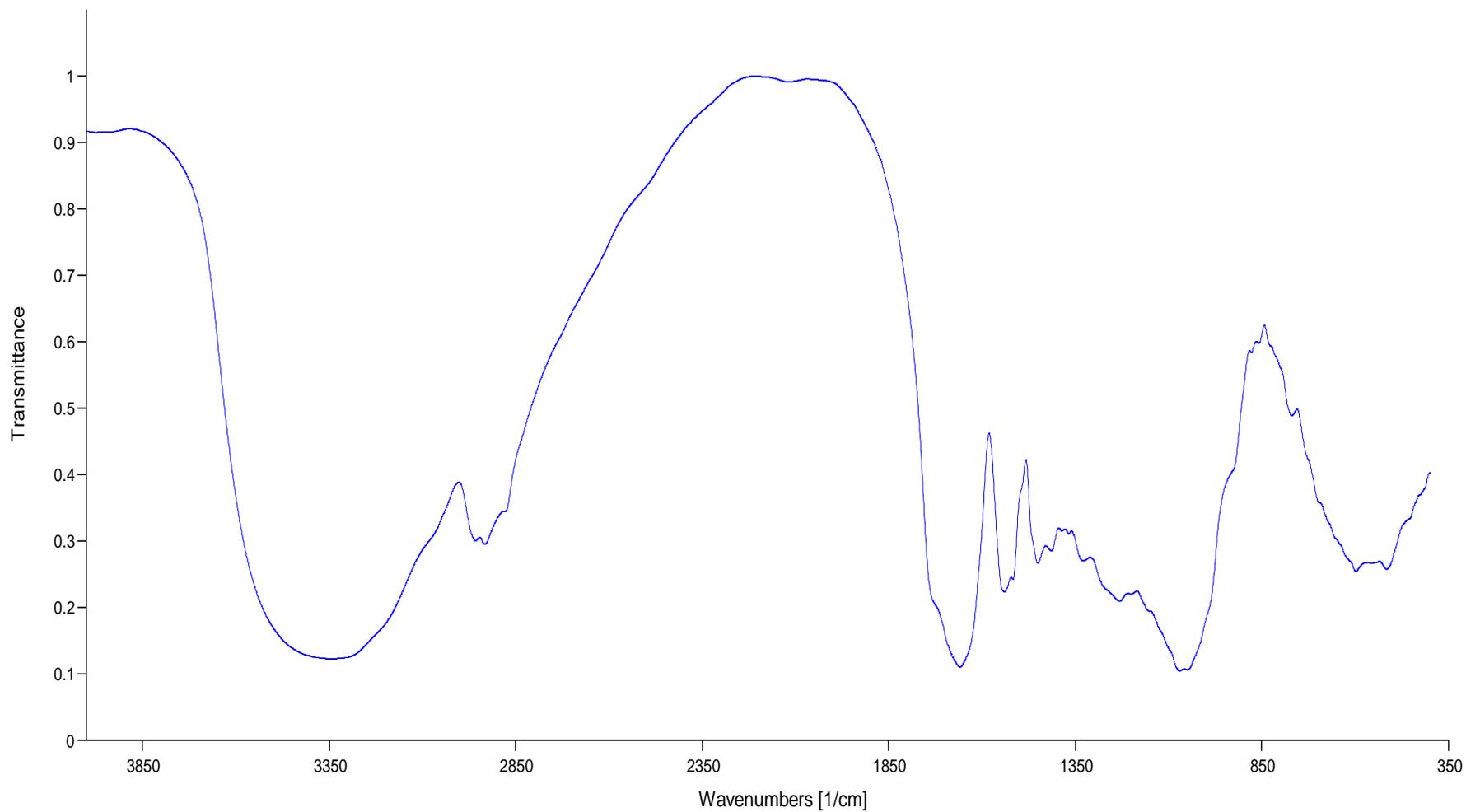


Figura 19. Espectrograma de IR de fracción orgánica total.

TOF-MS

Mediante el uso del analizador de masas “tiempo de vuelo” (TOF-MS) de la marca Agilent se determinó la presencia de las antocianinas contenidas en la fracción final obtenida mediante cromatografía de cartucho C18. La ventaja de este equipo es su precisión en la masa atómica con 4 decimales. La muestra fue procesada en el laboratorio de Química Orgánica del CINVESTAV-Unidad Zacatenco.

El fragmentograma obtenido mostró la presencia de la antocianina malvidina ya que se obtuvo una masa molecular exacta de 331.285149, la cual da una coloración azul/roja en los maíces pigmentados o alimentos que los contenga (Motohashi *et al.*, 2009; Winefield, Davies & Gould, 2009).

La malvidina es una antocianina de fórmula empírica $C_{17}H_{15}O_7$, generalmente enlazada con un glúcido en la posición del carbono 3, además presenta sustituciones con grupos metoxilos ($-OCH_3$) en los carbonos 3' y 5', transformándola en una molécula de mediana polaridad (Cooke, Steward, Gescher & Marczylo, 2005; Castañeda *et al.*, 2009), es también ligeramente soluble en agua (Guerra & Ortega, 2006; Castañeda *et al.*, 2009). La malvidina (figura 21) disuelta en etanol a 25° C tiene un porcentaje de degradación en un periodo de 7 días de 23 % (Duthie, Gardner, Kyle, & McPhail, 2004), mientras que las antocianinas glicosiladas son más estables.

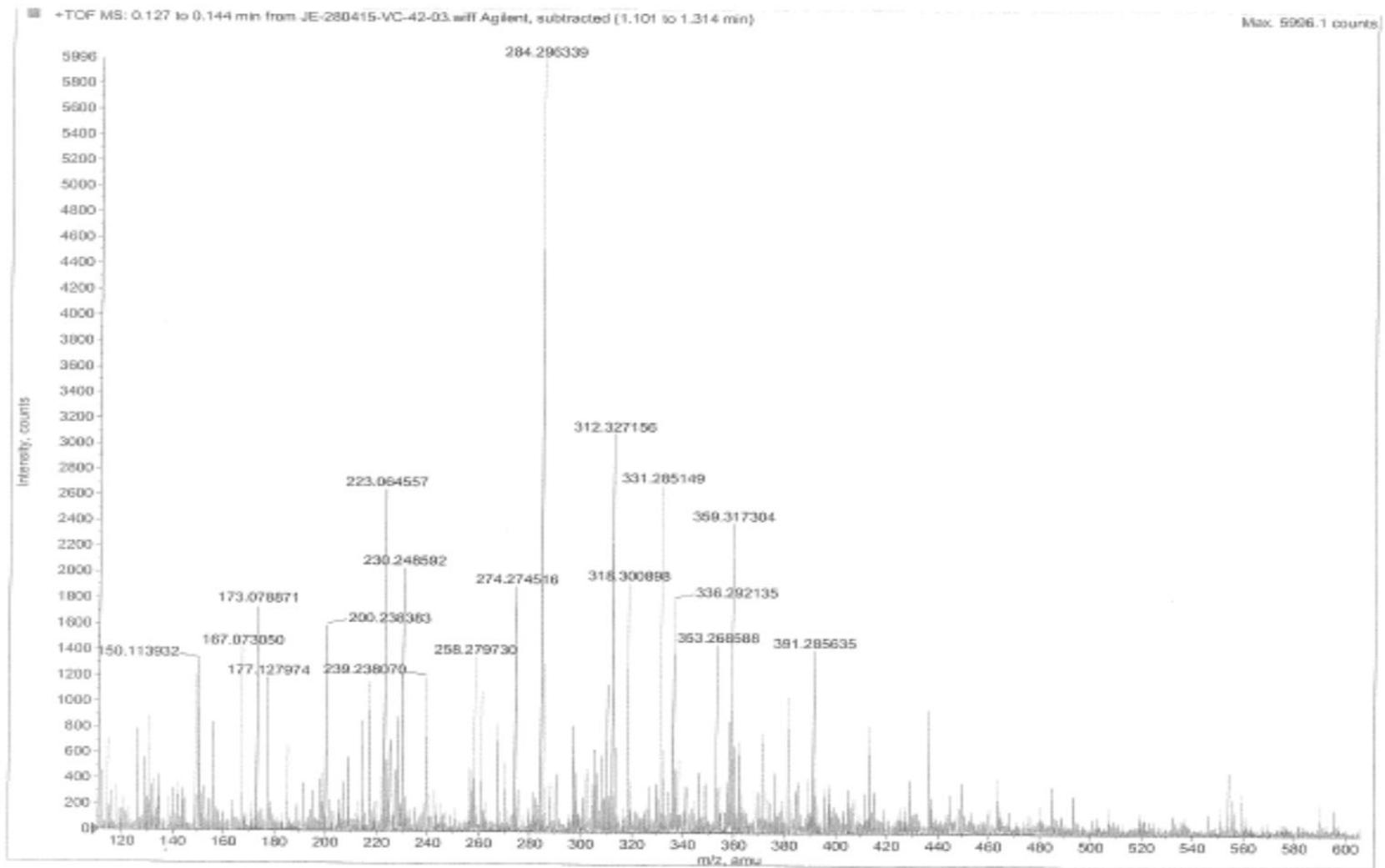


Figura 20. Fragmentograma FOT-MS de la fracción obtenida mediante C18.

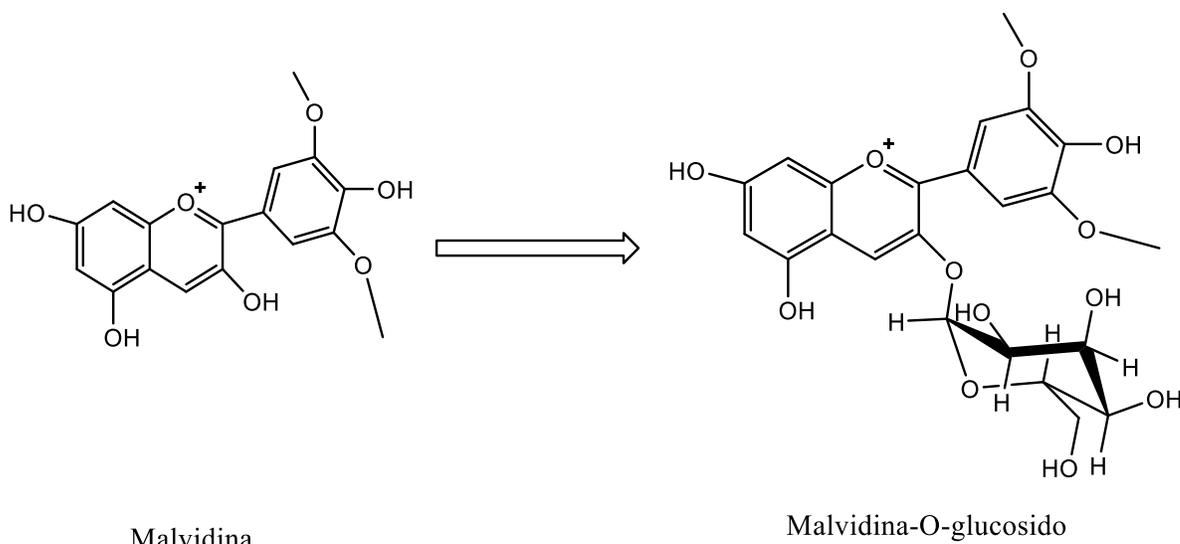


Figura 21. Estructura semi-desarrollada de la antocianina a) malvidina b) malvidina-O-glucósido.

Ensayos *in vitro*.

La experimentación biológica se realizó en la Facultad de Medicina de la UABJO, en el laboratorio de Biología Celular y Agregación Plaquetaria. Se realizó crecimiento celular de líneas de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa), preparación de medios de cultivo y las siembras en placas donde se realizaron las técnicas de MTT y CV.

La proliferación de células cancerígenas de cáncer cérvico uterino en la línea celular HeLa mostro una inhibición máxima a 150 $\mu\text{g/ml}$ del 18.5 % a las 48 horas, mientras que a 24 horas a esa misma concentración del extracto solo pudo inhibir un 7 %. Caso contrario a 48 y 96 horas donde no hubo un efecto favorable para la inhibición de la proliferación celular. A una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ el efecto anti proliferativo se presentó en un 3.1 % a 24 horas, a un 4.1 % en 72 horas y 7.1 % en 92 horas sin embargo a 48 y 72 horas la proliferación no disminuyo. A una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ el efecto anti proliferativo se presentó a 72 y 92 horas con un 12.5 %y 6.5 respectivamente, a 24 y 48 horas no hubo un efecto anti proliferativo. La concentración de 75 y 50 $\mu\text{g/ml}$ del extracto no presentaron efectos anti proliferativos, excepto a las 72 horas a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ (figura 22). Los efectos presentados en la línea celular HeLa con respecto a la inhibición de

la proliferación celular fueron consecuencia de las concentraciones empleadas y del tiempo en el cual se incubaron las células con el extracto de antocianinas, también influyo el tipo de línea celular ya que la línea tumoral HeLa al provenir de un cáncer cérvico uterino causado por un virus del papiloma humano 18 (VPH 18) es muy invasivo y de una gran proliferación.

La proliferación de células cancerígenas en la línea celular SiHa mostro una inhibición máxima a 150 µg/ml del extracto antocianinico del 34 % a las 96 horas, mientras que esa misma concentración del extracto pero a diferentes horas, 24 y 48 horas solo pudo inhibir la proliferación en un 6.4 y 10% caso contrario a 72 horas donde no presento un efecto favorable para la inhibición de la proliferación celular. A una concentración de 125 µg/ml el efecto anti proliferativo se presentó en un 20.3 % a 24 horas, a un 4.8 % en 48 horas, 16.5 % a 72 horas y 29.3 % en 92 horas. A una concentración de 100 µg/ml el efecto anti proliferativo se presentó a 24, 72 y 92 horas con un 9.4, 7.3 y 24.3 % respectivamente, a 48 horas no hubo un efecto anti proliferativo. La concentración de 50 µg/ml del extracto antocianinico no presento efectos anti proliferativos, excepto a las 48 horas a una concentración de 125 µg/ml con un 1.9% (figura 23). Los efectos presentados en la línea celular SiHa con respecto a la inhibición de la proliferación celular fueron consecuencia de las concentraciones empleadas y del tiempo en el cual se incubaron las células con el extracto de antocianinas ya que el efecto anti proliferativo aumento a 72 horas, también influyo el tipo de línea celular ya que la línea tumoral SiHa al provenir de un cáncer cérvico uterino causado por un virus del papiloma humano 16 (VPH 16) es invasivo y de gran proliferación, sin embargo los resultados obtenidos representan una alternativa para la prevención de esta enfermedad causada por un factor viral.

La proliferación de células cancerígenas provenientes de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) mostro una inhibición máxima a 150 µg/ml del extracto antocianinico del 35 % a las 24 horas, mientras que a 48, 72 y 96 horas a esa misma concentración del extracto solo pudo inhibir un 32, 30.9 y 19.5 % respectivamente. A una concentración de 125 µg/ml el efecto anti proliferativo se presentó en un 14.3 % a 24 horas, a un 7.3 % en 48 horas, en un 22.6 % a 72 horas y 7.1 % en 96 horas. A una concentración de 100 µg/ml el efecto anti proliferativo se presentó a 24, 48, 72

y 96 horas con un 10.5, 9.4, 9 y 6,5 % respectivamente. La concentración de 75 µg/ml del extracto presentó un porcentaje de inhibición celular a 24, 48 y 72 horas de 8.5, 6.6 y 12.2 %, sin embargo a 96 horas no presentaron efectos anti proliferativos. A una concentración de 50 µg/ml no hubo ningún efecto anti proliferativo (figura 21). Los efectos presentados en la línea celular MCF-7 con respecto a la inhibición de la proliferación celular fueron consecuencia de las concentraciones empleadas y del tiempo en el cual se incubaron las células con el extracto de antocianinas. A mayores concentraciones del extracto de antocianinas hubo un mayor porcentaje de anti proliferación celular, este efecto también se constató con respecto al tiempo ya que a las primeras 24 horas se presentó el efecto máximo de un 35 % de anti proliferación celular.

Estos resultados muestran la eficacia de las antocianinas como agentes nutracéuticos ya que como menciona Windan (2000) un nutracéutico es aquella fracción, derivado o un metabolito del alimento que produce un bienestar alimentario y mejoras en la promoción y protección de la salud. Como fitofármaco cumple con sus funciones sin embargo necesariamente requerirá una modificación en su estructura para lograr una mejora en su absorción (Kong, *et al*, 2003).

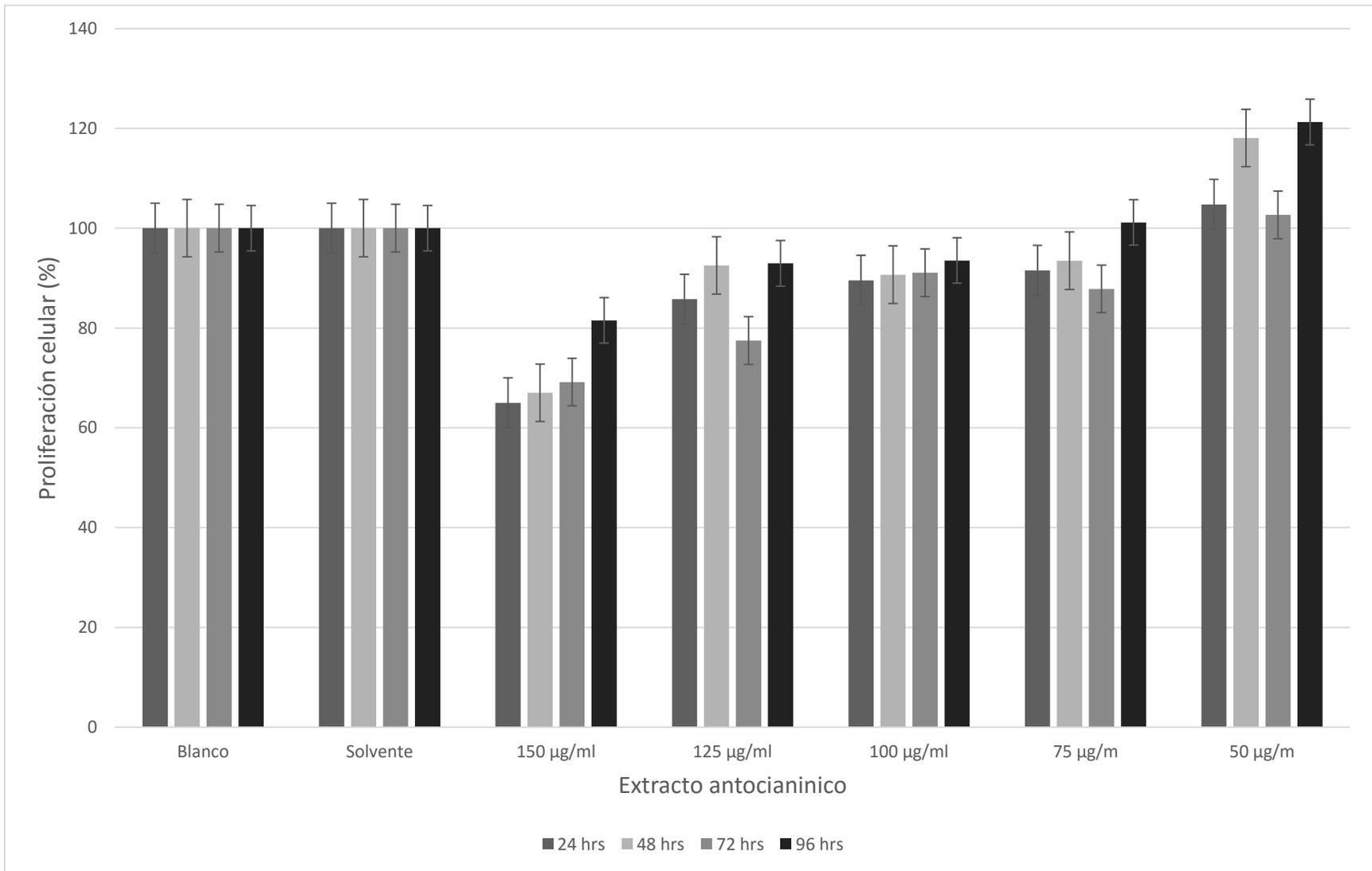


Figura 21. Proliferación celular (%) en el ensayo de MTT en la línea MCF-7 a 24, 48, 72 y 94 horas.

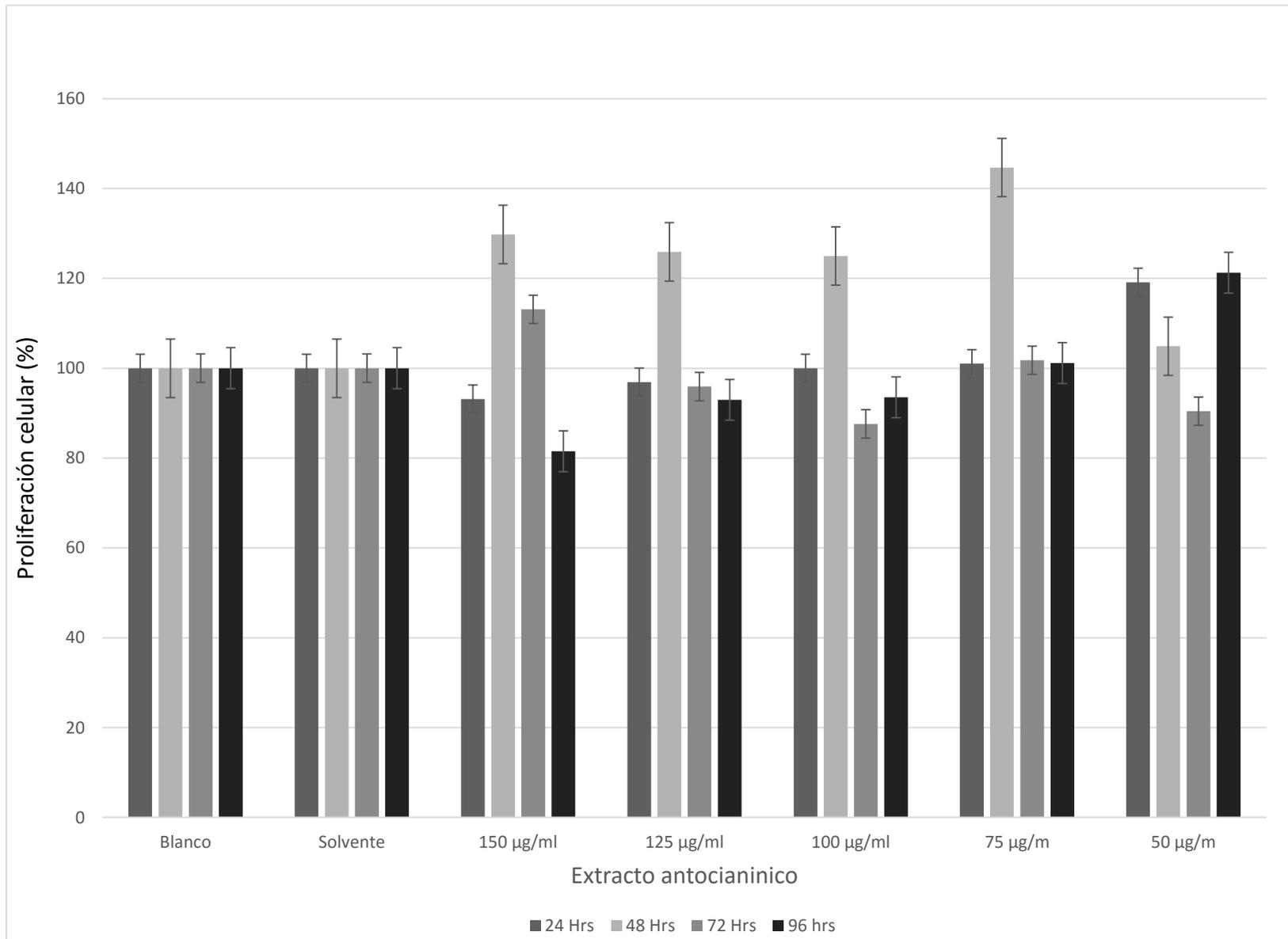


Figura 22. Proliferación celular (%) en el ensayo de MTT en la línea HeLa a 24, 48, 72 y 94 horas.

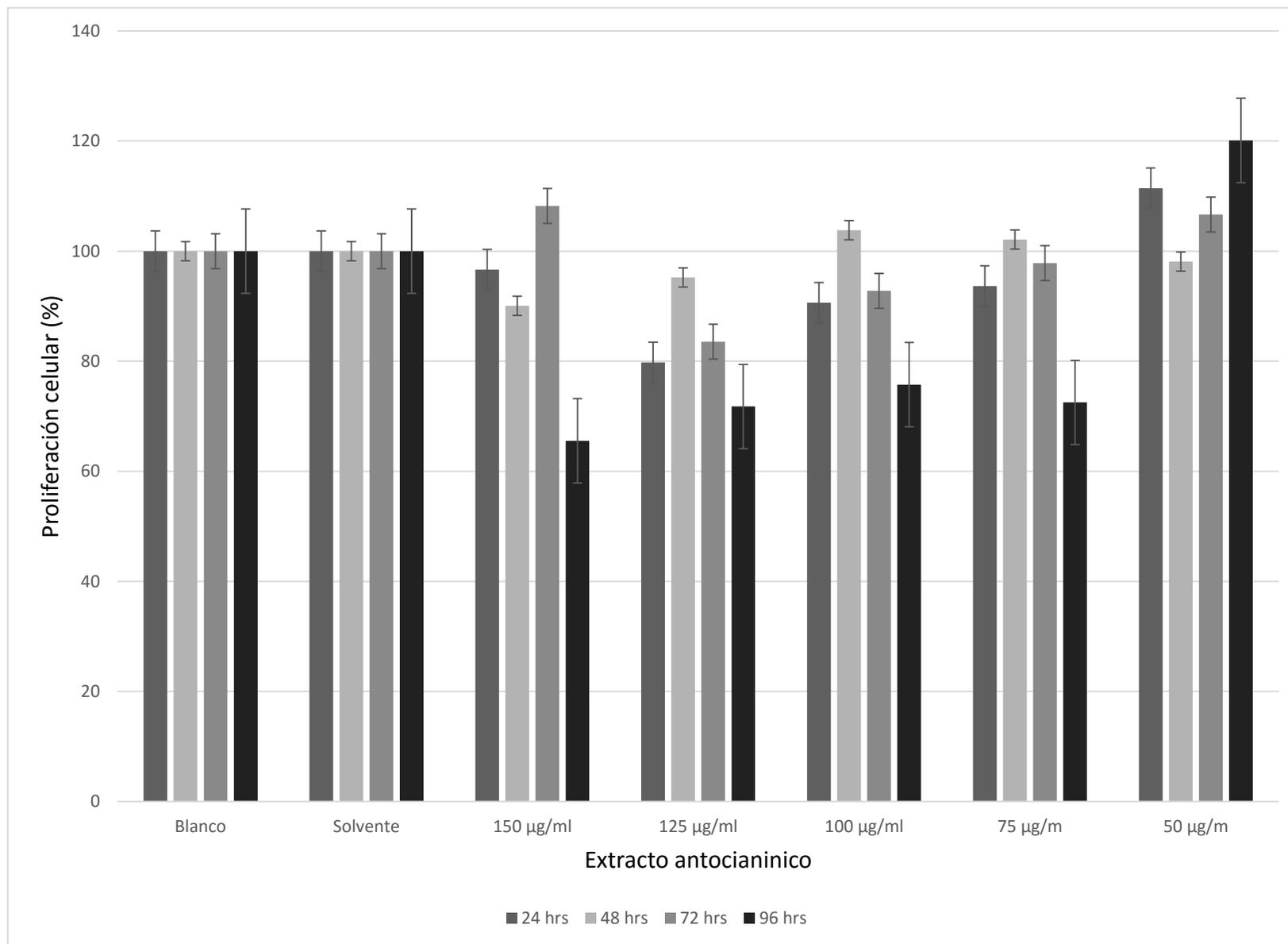


Figura 23. Proliferación celular (%) en el ensayo de MTT en la línea SiHa a 24, 48, 72 y 94 horas.

El porcentaje de células metabólicamente activas cancerígenas de origen cérvico uterino y de mama presentaron un efecto por la concentración del extracto, el resultado se presentó por la disminución de células metabólicamente activas, estos resultados muestran la eficacia de las antocianinas como agentes inhibidores del metabolismo inmerso en el crecimiento y propagación de las células cancerígenas, ya que sin este no se puede llevar a cabo sus funciones vitales.

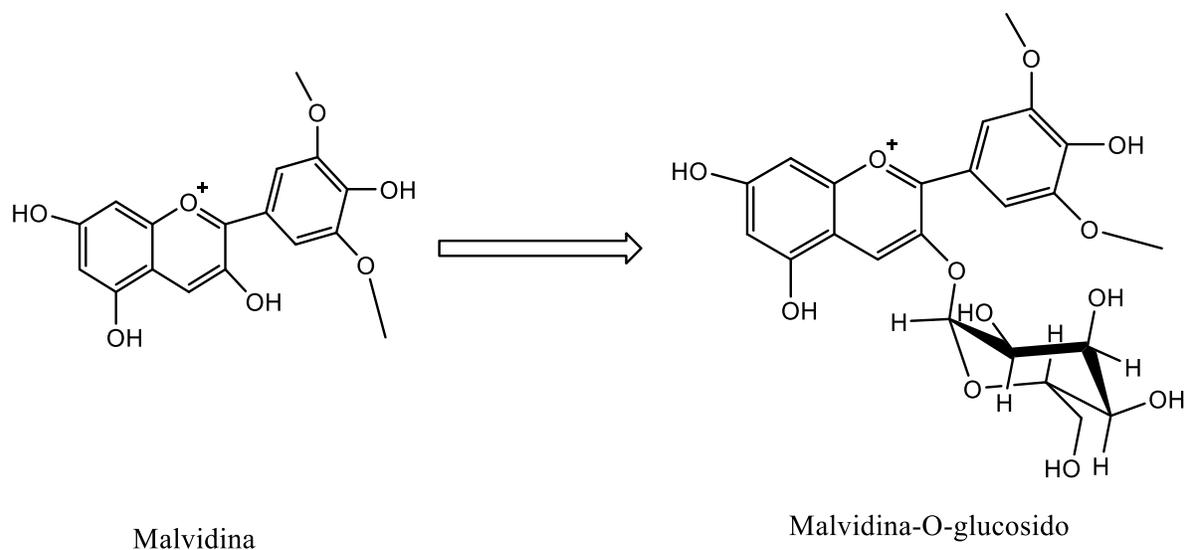


Figura 24. Proceso de O-glucosilación de las antocianinas

La actividad inhibitoria máxima obtenida en los ensayos *in vitro* de las líneas celulares SiHa y MCF-7 fue de un 35 y 34 % respectivamente, esta actividad se debió al número de grupos hidroxilos presentes en las antocianinas del extracto (figura 24), la presencia de estos grupos funcionales fue revelada por los espectros UV-Vis, IR y el espectrograma TOF-MS obtenidos de la fracción purificada por cromatografía de Columna C18. La ortodihidroxiestructura en el anillo B de las antocianinas le confiere estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización electrónica por ello la actividad antioxidante puede inhibir la proliferación celular. Al no presentar hidroxilación en las posiciones 3', 4' del anillo B los cuales juegan un papel importante en la función de la actividad antioxidante, esta se vio disminuida, sin embargo esto también se puede atribuir a la concentración ya que como reporto Guiste *et al* (2013) la Malvidina 3-glucosido inhibió un 70 % células tumorales MCF-7 con 407 μM (Guiste, 2013). La difusión de las antocianinas a través de las

membranas celulares fue afectada por la glucosilación ya que se redujo su actividad comparada con su correspondiente aglicon tal como reporto Marczylo *et al* (2009). Conforme a la estructura mayoritaria presentada en la fracción que se empleó, los grupos 3 y 5 hidroxilos con función 4- oxo en los anillos A y B dan máximo poder inhibidor de radicales libres, las cuales deberían conferir un efecto inhibidor mayor, la reacción de transferencia de electrones que forman un intermediario estable que los ayuda a unirse a los radicales libres, rompen la reacción en cadena de peroxidación de radicales libres de ácidos grasos insaturados lo cual tendría un efecto en los radicales libres que se forman en el crecimiento anormal inducido, dependiendo de la sustitución en el anillo B, las antocianinas pueden interferir en la cascada de señalización la cual está envuelta en el crecimiento celular anormal (Pascual Teresa *et al* 2013). Los extractos de antocianinas con un numero grande de moléculas de hidroxilos (cianidin-3-glucosido) induce apoptosis la cual es una programación de la muerte celular, es decir las antocianinas presentes en el extracto influyeron en el proceso apoptotico (Duthie, Gardner, Kyle, & McPhail, 2004). La Malvidina y los demás conglomerados de antocianinas activan la apoptosis con ello se logra una disminución en el crecimiento celular dando un efecto inhibidor.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El maíz VC-42 es una fuente rica de antocianinas ya que la caracterización química de extractos provenientes de este grano fue acorde con los rangos de absorción en espectroscopia UV-Vis, IR y TOF-MS.

El fraccionamiento mediante una columna cromatografía de mediana polaridad empleando un gradiente de elución de mediana polaridad a mayor polaridad indica que las antocianinas son moléculas polares debido a sus grupos hidroxilos presentes en su estructura aglicona y en los glucosidos unidos a estos.

El maíz azul VC-42 es un alimento nutracéutico ya que el contenido de antocianinas proveen de un beneficio a la salud.

Las antocianinas presentes en el extracto inhiben el crecimiento celular de las líneas SiHa y MCF-7, sin embargo su inhibición es poca debido a la concentración empleada, esta inhibición se debe también a la estructura que poseen las antocianinas presentes mayoritariamente en el extracto final.

La presencia de grupos hidroxilos que ponen de manifiesto los espectros de UV-Vis e IR presentaron un poder inhibidor de radicales libres por ello hubo un efecto anti proliferativo de las líneas celulares de cáncer.

Las antocianinas influyen en el proceso de proliferación celular en las líneas SiHa, HiLa y MC-7 por ello representan una alternativa de origen natural en la prevención de cáncer cérvico uterino y cáncer de mama.

Los efectos anti proliferativos de las antocianinas en la línea celular MCF-7 son directamente proporcionales a la concentración empleada y al tiempo de contacto con el principio activo.

Las antocianinas presentes en el maíz VC-42 al ser compuestos antioxidantes pueden prevenir y tratar padecimientos relacionados con el cáncer cérvico uterino y de mama (CaCu y CM), por ello su propagación y consumo debe ser en mayor proporción.

RECOMENDACIONES

Realizar una identificación de contenido antocianínico presente en el extracto final empleando un equipo HPLC-MS y un equipo de análisis elemental.

Emplear concentraciones mayores del extracto de antocianinas para obtener un efecto anti proliferativo mayor en la línea celular MCF-7, SiHa y HeLa.

Realizar ensayos *in vitro* en otras líneas celulares de diversos tipos de cáncer para ver el efecto anti proliferativo.

Realizar un ensayo de caspasa-3-activa para determinar el efecto que tienen las antocianinas en la muerte celular programada.

Realizar ensayos de fragmentación del ADN por medio de la técnica de TUNEL para evaluar la activación de la endonucleasa endógena.

Agregar un recubrimiento al extracto antocianínico para efectuar una liberación prolongada del principio activo y evaluar su actividad anti proliferativa.

Difundir la información obtenida en esta investigación ya que este alimento como nutracéutico proveerá de beneficios a la salud.

Potencializar el uso y consumo de estos granos mediante la difusión de la información obtenida.

Capacitar a los productores de este maíz sobre los beneficios de este para lograr con ello un producto con valor agregado.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilera, M., Reza, M. d. C., Chew, R., & Meza, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13, 16-22.
- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, D. (2010). *Biología Molecular de la célula* (5° ed.). Barcelona: Omega, pp 1345-1350.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (4° ed.). México: Pearson Educación, pp 420-426.
- Castañeda, A., Pacheco, M. L., Páez, M.L., Rodríguez, J. A. & Galán C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* (113), pp 859-871.
- Chang, R. (1999). *Química* (11° ed.). Editorial Mc Graw Hill. México.
- Chludil, H., Corbino, G. B., & Leicach, R. (2007). Nutracéuticos en malezas comestibles: quínoa blanca. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Vol. 6, num. 5, pp. 240-249.
- Córdoba, J. A., Borriguete, J., Lara, A., Barquera, S., Rosas, M., Hernández, M., Lean, M. E. & Aguilar, C. A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmitidas en México: Sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública Mexicana*. Vol. 5, No. 5.
- Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczylo, T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41(13), 1931-1940. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.009>
- Cuevas, E., Antezana, A. & Winterhalter, P. (2008). Análisis y caracterización de Antocianinas en diferentes variedades de Maíz (*Zea Mays*) boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech*. Colombia, Cartagena, pp 79-95.
- Duthie, G., Gardner, P., Kyle, J., & McPhail, D. (2004). Antioxidant activity of anthocyanins in vitro and in vivo. *ACS symposium series*, 871, 90-102.

- Espinosa, A., Tadeo, M., Turrent, A., & Gómez, N. (2009). El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz. *Revista Ciencias de la UNAM*, 92-93, 118–125.
- García, S., Mora, S., Serna S. O., & Gutiérrez, J. A. (2013). Potencial nutraceutico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Revista fitotecnica de México*, 36, 295-304
- Garzón, G. A., (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 13 No. 3, pp 27-36.
- Guerra, M. & Ortega, G. (2006). Separación y caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químicos-físicos. Parte 1. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XL, 35-44.
- Go, V., Harris, D., & Srihari, P. (2012). Global Overview of the Role of Nutraceuticals in Cancer. In F. H. Sarkar (Ed.), *Nutraceuticals and Cancer SE - 1* (pp. 1–10). Springer Netherlands. Doi: 10.1007/978-94-007-2630-7_1.
- Gómez, J. A., Altagracia, M., Kravzov, J., Cárdenas, R., & Poo, C. R. (2008). Cáncer de mama y las actuales alternativas de tratamiento. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 58–70.
- Harris, C. (2012). *Análisis químico cuantitativo*. Edit. Reverte.
- Wang, L. S., Carmella, S., Keyes, R., Kuo, C.T., Huang, Y. W., Hecht, S., & Stoner, G. (2012). Anthocyanins and Cancer Prevention. In F. H. Sarkar (Ed.), *Nutraceuticals and Cancer* (pp. 201-229): Springer Netherlands.
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Shirai, T. (2001). Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, 171(1), 17–25. Doi: 10.1016/S0304-3835(01)00510-9

- Hagiwara, A., Yoshino, H., Ichihara, T., Kawabe, M., & Tamano, S. (2002). Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27(1), 57–68. doi:10.2131/jts.27.57
- Hosoda, K., Miyaji, M., Matsuyama, H., Haga, S., Ishizaki, H., & Nonaka, K. (2012). Effect of supplementation of purple pigment from anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.) on blood antioxidant activity and oxidation resistance in sheep. *Livestock Science*, 145(1–3), 266-270.
- INEGI, 2014. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (datos nacionales)*. Obtenido el 1 de noviembre del 2014 de: www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa.com
- Kraft, T. F. B., Schmidt, B. M., Yousef, G. G., Knight, C. T. G., Cuendet, M., Kang, Y.-H., Lila, M. A. (2005). Chemopreventive Potential of Wild Lowbush Blueberry Fruits in Multiple Stages of Carcinogenesis. *Journal of Food Science*, 70(3), S159-S166. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07151.x.
- Kraft, T. F. B., Dey, M., Rogers, R. B., Ribnicky, D. M., Gipp, D. M., Cefalu, W. T., Lila, M. A. (2008). Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries Traditionally Used by Native North Americans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 654-660. doi: 10.1021/jf071999d.
- Koide, T., Hashimoto, U., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Terabe, K. (1997). Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 12(4), 277-280.

- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2).
- Konigsberg Fainstein, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo : aplicaciones médicas*. México, D.F. El Manual Moderno.
- Liu, Z., Schwimer, J., Liu, D., Greenway, F. L., Anthony, C. T., Woltering, E. A. (2005) Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3909.
- Lim, T. K. (2013). Zea mays *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* (pp. 416-447): Springer Netherlands.
- Lozada, M. C., Arteché, O. & Jaramillo, Y. L. (2013). *Espectroscopia de infrarrojo. Conceptos y problemas*. Mexico, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Marczylo, T., Cooke, D., Brown, K., Steward, W., & Gescher, A. (2009). Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(6), 1261-1268. doi:10.1007/s00280-009-0996-7
- Marko, D., Puppel, N., Tjaden, Z. (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular Nutrition & Food Research*, Res 48:318–332.
- McLaren, A., & Ng, V. (2014). Education: Clinical Review - *Breast cancer*. GP, 61. Obtenido el 1 de noviembre del 2014 de: <http://go.galegroup.com.etechnology.idm.oclc.org/ps/i.do?action=interpret&id=GALE%7CA240864067&v=2.1&u=pu&it=r&p=AONE&sw=w&authCount=1>
- Mendoza, C. G. (2012). *Las antocianinas del maíz: su distribución en la planta y producción*. Tesis publicada. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México, pp 23-25.

- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999). Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3,5-diglucoside, into Rats and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1083-1091. doi: 10.1021/jf9809582.
- Motohashi, N., & Sakagami, H. (2009). Anthocyanins as Functional Food Colors. In N. Motohashi (Ed.), *Bioactive Heterocycles VII* (Vol. 16, pp. 1-40): Springer Berlin Heidelberg.
- Organización Mundial de la Salud (2013). *Prevención de las enfermedades crónicas*. Obtenido el 1 de noviembre del 2013 de: www.who.int/chp/chronic-disease-report/post/es/
- Pina, S. & López, R. (2015). Introducción al cultivo celular. *Manual de técnicas*. UNAM-CICIMEBIO.
- Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M., & García-Viguera, C. (2013). Anthocyanins. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 1803-1819): Springer Berlin Heidelberg.
- Peng, S., Peng, L., & William, J. H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, pp 775-783.
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028.
- Ramírez, G., Moran, B., Rico D. & Jiménez, C. (2012). *Potencial nutracéutico de los Maíces Pigmentados*. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Reguerio, J. R. & Lopez, C (2002). *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune* (pp. 179,180): Panamericana Madrid.
- Rodríguez, L., Figueroa, J., Ramos, M., & Méndez, L. (2013). Nutraceutical properties of flour and tortillas made with an ecological nixtamalization process. *Journal of Food Science*. Doi: 10.1111/1750-3841.12241.

- Rodríguez, L. E., Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. pp F1.1.1.-F1.1.11.
- Salinas Moreno, Y., Aragón Cuevas, F., Ybarra Moncada, C., Aguilar Villareal, J., Altunar López, B., & Sosa Montes, E. (2013). Caracterización física y composición química de razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. *Revista fitotecnia mexicana*, 36, 23-31.
- Sánchez, G.J. (2011). *Diversidad del Maíz y el Teocintle. Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F., pp 03-04.
- San Juan, H. L. (2013). Efecto citotóxico de hojas, corteza y tallos de guanábana (*Annona Muricata*) en 6 líneas celulares humanas. *Revista Latinoamericana de Química*. Vol. 1. No. 9.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78). Convenio Andrés Bello.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, 133(7), 2125-2130.
- Urias-Lugo, D. A., Heredia, J. B., Muy-Rangel, M. D., Valdez-Torres, J. B., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2015). Anthocyanins and Phenolic Acids of Hybrid and Native Blue Maize (*Zea mays* L.) Extracts and Their Antiproliferative Activity in Mammary (MCF7), Liver (HepG2), Colon (Caco2 and HT29) and Prostate (PC3) Cancer Cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 193-199. doi: 10.1007/s11130-015-0479-4
- Vélez, P., Villanueva, J. & Leandro, C. (2008). Cuantificación de antocianinas en el maíz morado (*Zea mays* L.), tratados con ultrasonido. *Memorias de congreso*, UTPL, Congreso de alimentos. Bogotá, Colombia, 2008.

- Wang, S. Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677-5684. Doi: 10.1021/jf000766i.
- Winfield, C., Davies, K., & Gould, K. (2009). *Anthocyanins; Biosynthesis, functions and applications*. Nueva York: Springer-Verlag.
- Yasad, L. D. S. (2005). Infrared (IR) spectroscopy. *Organic spectroscopy*. Nueva York: Springer-Verlag

Anexos



Anexo A. Siembra de maíz VC-42 campo experimental Hornos.



Anexo B. Milpas de maíz VC-42, campo San Jacinto.



Anexo C. Mazorca de maíz azul VC-42



Anexo D. Desgranado de maíz azul VC-42.



Anexo D. Extracto liofilizado de Maíz VC-42.