

## COMPOSICIÓN FENÓLICA DE TEJIDO FOLIAR Y DE POLEN DE *Zea perennis*

Diana María Rivera-Rodríguez<sup>1</sup>, Alfonso Reyes-Martínez<sup>1</sup>, Gerardo Barriada-Bernal<sup>1</sup>, José de Jesús Sánchez-González<sup>2</sup>, Norma Almaraz-Abarca<sup>1</sup>, Elí Amanda Delgado-Alvarado<sup>1</sup>, Néstor Naranjo-Jiménez<sup>1</sup>, Yolanda Herrera-Arrieta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR-IPN Unidad Durango). Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Dgo. México, 34220

<sup>2</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) Universidad de Guadalajara Km. 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Predio las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco

### RESUMEN

La composición fenólica del tejido foliar y del polen en *Zea perennis* se determinó por HPLC/DAD. Veintisiete compuestos se detectaron en las hojas, siendo los derivados de ácidos fenólicos los más abundantes. En el polen se detectaron 11 compuestos, de los cuales sobresalen los glicósidos de quercetina. La abundancia y diversidad de compuestos fenólicos presentes en *Zea perennis* sugiere que esta especie es una fuente importante de fenoles, compuestos con espectro amplio de actividades biológicas e importantes quimiomarcadores.

**PALABRAS CLAVE:** *Zea perennis*, perfiles fenólicos foliares, polen.

### INTRODUCCIÓN

El género *Zea* pertenece a la familia Poaceae, la cual comprende más de 600 géneros (Rzedowski, 2001). *Zea* contiene cinco especies de México y Centroamérica: *Zea diploperennis* Iltis, Doebley y Guzmán; *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves & Mangelsdorf; *Zea luxurians* (Durieu y Ascherson) Bird; *Zea mays* Linnaeus (Doebley, 2003), y la descrita recientemente *Zea nicaranguensis*? Iltis & Benz (Mera, 2009a). *Zea mays*, es la especie que corresponde al maíz (única especie cultivada del género); las otras cuatro especies son conocidas colectivamente como “teocintle”.

El nombre de teocintle proviene del náhuatl *centil* que significa maíz y *teo* que significa de los dioses (Doebley, 2003). Los parientes silvestres del maíz o teocintles están representados por especies anuales y perennes diploides, y por una especie perenne tetraploide (Sánchez y Ruiz, 1996).

*Zea perennis* es la especie perenne tetraploide, con  $n=2x=20$ , que además posee otros atributos característicos como rizomas alargados y delgados, y 2 a 8 ramas erectas con espiga (Doebley, 2003). Esta especie posee resistencia a plagas y enfermedades de importancia economía y agronómica, por lo que podría ser una fuente de alelos valiosos para generar nuevas líneas genéticas de maíz. En la lista de especies y subespecies de la flora y fauna silvestre terrestre y acuática en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial de la Norma Oficial Mexicana SEMARNAT 2001, NOM-059-ECOL-1994 aparece *Zea perennis* como especie en peligro de extinción (Mera, 2009b).

La caracterización morfológica, química, bioquímica, y molecular de parientes silvestres de especies cultivadas, como *Zea perennis* lo es del maíz, es de relevancia porque se genera información que puede ser útil para la domesticación y aprovechamiento de los primeros y para realizar mejoramiento genético de las segundas.

La caracterización química de especies vegetales está basada en la determinación de la composición de compuestos secundarios. Éstos representan una gama muy amplia, que por no haberseles encontrado una participación directa en los procesos fundamentales de fotosíntesis,

respiración, desarrollo y crecimiento, se les llamó metabolitos secundarios (Kutchan, 2001). Aunque en la actualidad su apreciación ha cambiado y se les reconoce participaciones muy diversas e importantes en los procesos fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2008) y en las relaciones ecológicas de las plantas para asegurar su sobrevivencia como especie (Almaraz-Abarca y col., 1998; Hadacek, 2002), a esos compuestos se les sigue llamando secundarios.

Los compuestos fenólicos, fenoles o polifenoles son un grupo muy diverso y ampliamente distribuido en el reino vegetal. Dentro los fenoles, los flavonoides son los elementos que se encuentran más ampliamente distribuidos dentro de ese reino, son los más abundantes, los más diversos (Markham, 1982), y los preferidos para estudios quimiotaxonómicos (Harbone y Turner, 1984; Campos, 1997; Almaraz-Abarca y col., 2006, Almaraz-Abarca y col., 2008). Algunas de las características de los perfiles fenólicos, principalmente de flavonoides, por los que son empleados en estudios quimiotaxonómicos, son las siguientes: su amplia distribución en todos los grupos de plantas; su gran variabilidad química; la relativa independencia de su síntesis y almacenamiento, con respecto a los factores ambientales; su relativa facilidad de análisis (Markham, 1982); y su determinación genética, que está dada, en el caso de algunos flavonoides, por un solo gen (Harbone y Turner, 1984). Los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides, tienen una gama muy amplia de actividad biológica (Campos, 1997; Almaraz-Abarca y col., 2004; Almaraz-Abarca y col., 2007), por lo que un gran número de trabajos se han enfocado a la búsqueda de fuentes naturales de estos compuestos (Veit y col., 1995; van Heerden y col., 2003; Campos y col., 2007).

En este trabajo se realizó la caracterización química, basada en perfiles fenólicos obtenidos por HPLC/DAD, de tejido foliar y de polen de *Zea perennis* para conocer la diversidad de esos compuestos en esa especie de teocintle.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Semillas de *Zea perennis* proveniente del Municipio de San Gabriel del estado de Jalisco, fue proporcionada por el Dr. Jesús Sánchez, del banco de germoplasma del IMARFI (Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos). Las semillas se germinaron en el invernadero del CIIDIR IPN Durango. Muestras de tejido foliar se colectaron en octubre de 2010, a los cinco meses de edad de las plantas, y de polen en el mes de noviembre del mismo año.

### **Preparación de extractos**

La preparación del extracto fenólico foliar se realizó a partir de cinco gramos de tejido seco y molido, por maceración en 15 mL de una solución acuosa de metanol al 60% (v/v), en obscuridad, a temperatura ambiente, y en agitación durante 24 hrs, de acuerdo a lo reportado por Almaraz-Abarca y col. (2008). El extracto se concentró hasta la mitad de su volumen y se fraccionó con cloroformo. La fracción acuosa se volvió a fraccionar con acetato de etilo. Esa última fracción orgánica se concentró a sequedad y se resuspendió en 3 mL de metanol. De esa solución se tomaron alícuotas para analizarse por HPLC/DAD para obtener los perfiles fenólicos.

El extracto fenólico de polen se obtuvo por sonicación de 200 mg de esas estructuras reproductivas en 1 mL de una solución acuosa de etanol al 50% (v/v), durante 60 min, en obscuridad y a temperatura ambiente, de acuerdo a Campos (1997). De ese extracto se tomaron alícuotas para el análisis de HPLC/DAD.

### **Perfiles fenólicos**

Los perfiles fenólicos de ambos tipos de tejido (foliar y polínico) se determinaron en un equipo HPLC marca Perkin Elmer Series 200, con un detector de arreglo de diodos de la misma marca, empleando el método descrito por Almaraz-Abarca y col. (2008), que es un método en gradiente que emplea agua acidificada y acetonitrilo como eluyentes. Se utilizó una columna Perkin Elmer

Analytical C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m). Se inyectaron alícuotas de 100  $\mu$ L. Los cromatogramas se registraron a 280 y 340 nm, y los espectros de absorción en el intervalo de 200 a 400 nm.

La identificación de los tipos de compuestos fenólicos resueltos en el HPLC se hizo por comparación directa de los tiempos de retención (TR) y los espectros UV de esos compuestos con los correspondientes a estándares, y por la información compilada de tiempos de retención (TR) y espectros UV de diferentes compuestos fenólicos, hecha por Mabry y col. (1970) y Campos y Markham (2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró un total de 27 compuestos en el tejido foliar y 11 compuestos en el tejido reproductivo de *Zea perennis*. En la Tabla 1 se muestran los TR y los datos espectrales de los compuestos detectados en el tejido foliar de *Zea perennis*. Los compuestos encontrados en el polen se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos fenólicos detectados en el tejido foliar de *Zea perennis*.

Número de compuesto	Tipo de compuesto	TR (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)
1	Acido Fenólico	17.912	260, 279
2	Acido Fenólico	23.764	249, 285
3	Compuesto no Identificado	26.858	292, 324
4	Compuesto no Identificado	29.45	272, 285inf, 305inf, 335
5	Flavona	31.508	266, 288inf, 33
6	Flavona	31.889	270, 282inf, 346
7	Acido Fenólico	32.476	261, 279
8	Flavona	34.382	272, 289inf, 324
9	Flavona	35.116	271, 335
10	Acido Fenólico	36.802	268, 289
11	Flavona	37.844	275inf, 288, 353
12	Flavona	35.38	255inf, 270, 346
13	Acido Fenólico	35.908	272, 286inf, 325
14	Flavonol glicósido	39.002	272inf, 888, 350
15	Compuesto no Identificado	39.633	272, 287inf, 350
16	Derivado glicósido de Canferol	41.305	272, 346
17	Derivado glicósido de Canferol	42.200	274, 343
18	Acido Fenólico	42.904	277
19	Derivado glicósido de Canferol	44.913	270, 340
20	Acido Fenólico	48.682	315
21	Acido Fenólico	49.694	297inf, 324
22	Compuesto no Identificado	50.692	270, 286inf, 352
23	Derivado glicósido de Canferol	51.176	270, 343
24	Derivado glicósido de Canferol	52.701	272, 327
25	Acido Fenólico	53.332	300inf, 315
26	Acido Fenólico	53.816	295inf, 320
27	Acido Fenólico	62.014	278

inf = inflexión

Tabla 2. Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos fenólicos detectados en el polen de *Zea perennis*.

Número de compuesto	Tipo de compuesto	TR (min)	$\lambda_{\text{max}}$ . (nm)
1	Flavona	25.45	253, 270inf, 323
2	Flavonol glicósido	29.44	253inf, 264, 346
3	Flavonol glicósido	31.361	252inf, 265, 344
4	Flavona	31.845	247, 266inf, 326
5	Flavonol glicósido	32.241	350, 266inf, 331
6	Derivado glicósido de Quercetina	33.253	254, 266inf, 354
7	Derivado glicósido de Quercetina	35.6	253, 266inf, 351
8	Derivado glicósido de Quercetina	36.656	255, 264inf, 360
9	Derivado glicósido de Quercetina	38.342	254, 267inf, 355
10	Flavonol glicósido	38.958	255inf, 265, 351
11	Derivado glicósido de Isoramnetina	46.35	255, 370

De los 27 compuestos detectados en el tejido foliar de *Zea perennis*, seis fueron identificados como derivados glicósidos de canferol (flavonoides de la clase de los flavonoles), seis fueron flavonas (también un tipo de flavonoides), 11 derivados de ácidos fenólicos, y cuatro compuestos no identificados. Las Figuras 1 y 2 muestran los cromatogramas y los espectros UV de los principales compuestos (de acuerdo a su mayor concentración) detectados en el tejido foliar de *Zea pennensis*; éstos fueron dos ácidos fenólicos (compuestos **7** y **25**) y un flavonol glicósido (compuesto**14**). Esa riqueza de compuestos es similar a la reportada para el tejido foliar de *Agave durangensis*, otra especie de monocotiledonea, para la que se detectaron 23 compuestos fenólicos (Almaraz-Abarca y col., 2009); sin embargo, el tipo de compuestos en una y otra especie fue muy diferente, predominando en la última los derivados glicósidos de canferol. Los perfiles fenólicos foliares han sido empleados como marcadores quimiotaxonómicos en varios grupos de plantas (Slimestad, 2003; Sosa y col., 2005; Almaraz-Abarca y col., 2006); esto y la riqueza de fenoles encontrada en *Zea perennis* sugiere que el análisis de la variabilidad de los perfiles fenólicos de las otras especies de *Zea* podría contribuir a resolver la problemática taxonómica de delimitación específica dentro de ese género (Doebley, 1990). Hasta donde fue posible investigar para la realización del presente trabajo, no existen reportes sobre la composición fenólica foliar del género *Zea*, por lo que este sería el primer reporte al respecto.

En el polen de *Zea perennis* se detectaron 11 compuestos, de los cuales dos fueron flavonas y nueve flavonoles. De estos últimos cuatro fueron derivados glicósidos de quercetina y uno derivado glicósido de isoramnetina. La usencia de ácidos fenólicos en el polen de esta especie de *Zea* es semejante a la ausencia de esos compuestos en el polen de *Zea mays* (Almaraz-Abarca y col., 2004). Los compuestos con mayor concentración en el polen de *Zea perennis* fueron dos flavonoles glicósidos (compuestos **2** y **3**), un flavonol no identificado (compuesto **5**), y un derivado glicósido de quercetina (compuesto **7**). La diversidad fenólica de *Zea perennis* reportada en el presente trabajo es mayor que la encontrada para *Zea mays* por Almaraz-Abarca y col (2004), utilizando el mismo método analítico. Una diferencia importante es un mayor número de glicósidos de quercetina (5, incluido el derivado de isoramnetina, que tiene la estructura básica de

la quercetina) en el polen de *Zea perennis*, que en la única especie cultivada de *Zea*, para la cual esos mismos autores sólo reportaron tres.

Estudios fitoquímicos que incluyan un número mayor de especies y poblaciones de *Zea* permitirían establecer el valor de los perfiles fenólicos como marcadores quimiotaxonómicos específicos para ese género.

Figura 1. Cromatograma obtenido por HPLC/DAD del tejido foliar de *Zea perennis*, donde se puede observar los compuestos más abundantes.

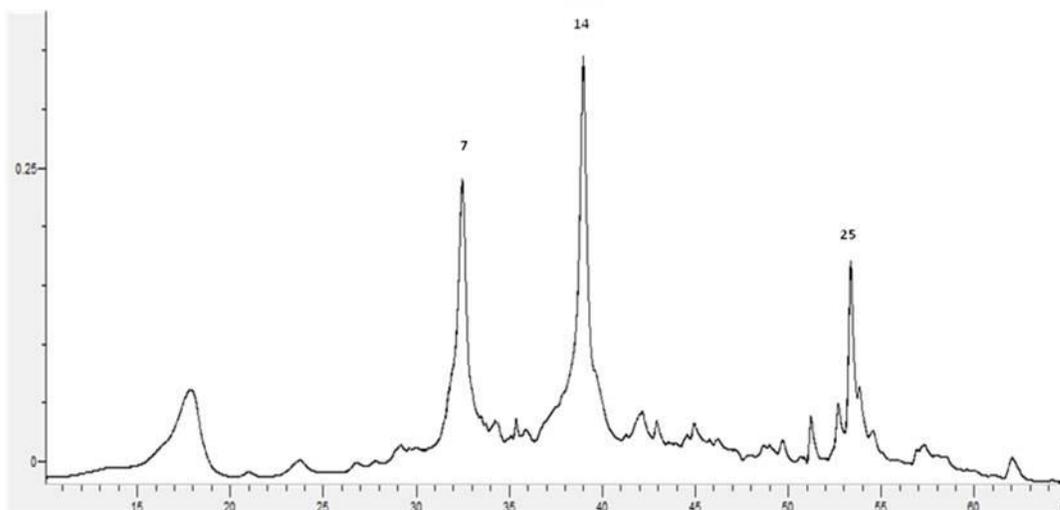


Figura 2. Espectros UV de los compuestos más abundantes en tejido foliar de *Zea perennis*

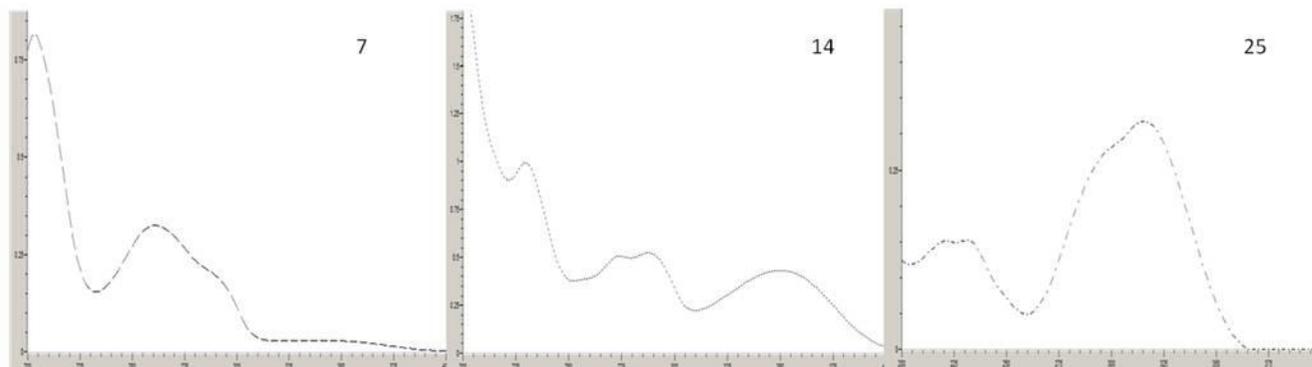


Figura 3. Cromatograma obtenido por HPLC/DAD de polen de *Zea perennis*, donde se puede observar los compuestos más abundantes.

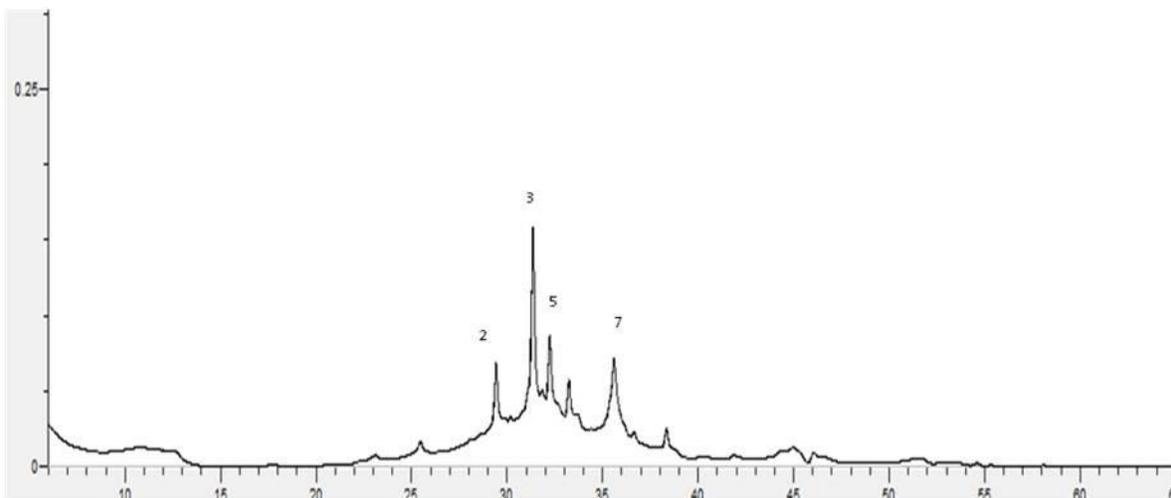
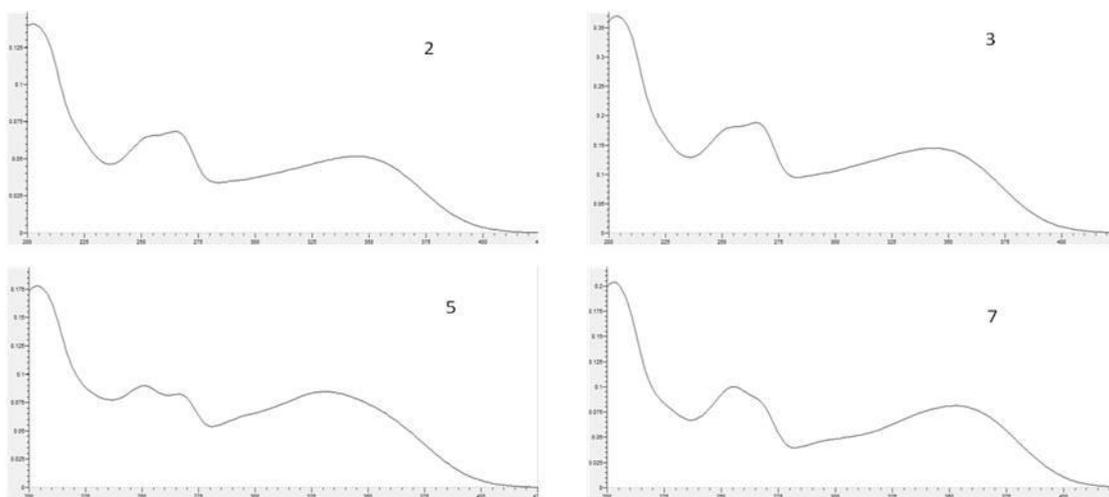


Figura 4. Espectros UV de los compuestos más abundantes en el polen de *Zea perennis*



## BIBLIOGRAFÍA

- Almaraz- Abarca, N., J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez, L.S. González-Valdéz, R. González-Laredo. 1998. The feeding deterrent effect of a flavonol and a flavonone on the mexican vean beetle (*Epilachnia varivestis* mulsant). *Ubamari. Revista Hispanoamericana de Ciencia y Tecnología* 44: 33-42.
- Almaraz-Abarca, N., M.G. Campos, J A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L.S. Gonzales-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origen. *Inetrceiencia* 29: 574-585
- Almaraz-Abarca, N., M.S. González-Elizondo, J.A. Tena-Flores, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washintong* 119: 426-439.
- Almaraz-Abarca, N., M.G. Campos, J A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L.S. Gonzales-Valdez. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 119-124.

- Almaraz-Abarca, N., M.G. Campos, E.A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez, N. Naranjo-Jiménez, C. Frigerio, A.F. Tomatas, A.J. Almeida, A. Vieira, J.N. Uribe-Soto. 2008. Pollen flavonoid/ phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 534- 543.
- Almaraz-Abarca, N., E.A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J.A. Ávila-Reyes, R. Muñiz-Martínez. 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Asteraceae). *American Journal of Applied Sciences* 6: 1076-1085.
- Campos, M.G. 1997. Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor. Universidade de Coimbra, Portugal.
- Campos, M.G., K.R. Markham. 2007. Structure information from HPLC and online measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids. Coimbra University Press. Portugal.
- Campos, M.G., M.P. Matos, M.T. Câmara, M.M. Cunha. 2007. The variability of isoflavones in soy seeds and the possibility of obtaining extracts for the counter tablet preparation that can be standardized. *Industrial Crops and Products* 26: 85-92.
- Doebley, J. 1990. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience* 40: 443-448.
- Doebley, J.F. 2003. The taxonomy of *Zea*. Laboratory of Genetics. University of Wisconsin, Madison.
- Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21: 273-322.
- Harborne, W., L. Tuner. 1984. Plant chemosystematics. Academic Press. London.
- Kutchan, T.M. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125: 58-60.
- Mabry, T.J., K.R. Markham., M.B. Thomas. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- Mera, O.L.M. 2009a. El Maíz. Aspectos biológicos. En: Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica (Eds: Kato, Y.T.A., S.C. Mapes, O.L.M. Mera, H. J.A. Serratos, B.R.A. Bye). Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp: 19-28.
- Mera, O.L.M. 2009b. Diversificación y distribución reciente del maíz en México. En: Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica (Eds: Kato, Y.T.A., S.C. Mapes, O.L.M. Mera, H. J.A. Serratos, B.R.A. Bye). Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp: 69-81.
- Rzedowski, G. C., J. Rzedowski. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.
- Sánchez G.J.J., A.C. Ruíz. 1996. Distribución del teocintle en México. Campo Experimental Centro de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), México.
- Slimestad, R. 2003. Flavonoids in buds and young needles of *Picea*, *Pinus* and *Abies*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 1247-1255.
- Sosa, T., J.C. Alías, J.C. Escudero, N. Chaves. 2005. Interpopulation variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudates. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 353-364.
- Taiz, L., E. Zeiger. 2008. Plant Physiology. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Van Heerden, F.R., B.E. van Wyk, A.M. Viljoen, P.A. Steenkamp. 2003. Phenolic variation in wild populations of *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 885-895.

Veit, M., C. Beckert, C. Höhne, K. Bauer, H. Geiger. 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38: 881-891.