



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO CUMÁRICO A
PARTIR DE DESECHOS AGRÍCOLAS
DE MAÍZ**

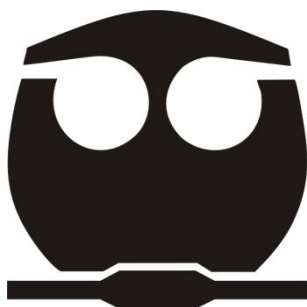
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

CARLOS DANIEL OLVERA SANTIBÁÑEZ



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Francisca Aida Iturbe Chiñas

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

1er SUPLENTE: Profesora: Gloria Díaz Ruíz

2° SUPLENTE: Profesora: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 321 Departamento de Alimentos y Biotecnología Conjunto E Facultad de Química UNAM

ASESOR DEL TEMA: Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez

SUSTENTANTE: Carlos Daniel Olvera Santibáñez

El presente trabajo fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF). Proyecto: PICS08-40-ICyTDF.

Agradecimientos.

A mi Padre por su gran apoyo, guía académica y por la experiencia compartida conmigo, sin duda el mejor y más querido maestro que tendré en toda mi vida.

A mi Madre por los regaños cuando los necesité, por las desveladas y los ánimos que me ha brindado desde mi fase más temprana de estudiante.

A mi hermano, mis abuelitas, abuelito y toda familia, quienes siempre estuvieron al tanto de mi formación académica y bienestar, gracias por todo.

A mi tía Rosalba por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

A Cristina, con quien aprendí sobre la química más allá del salón de clase, gracias por todos los momentos de risa, flojera y estudio, pero sobre todo por el apoyo brindado.

A Jorge, por enseñarme que la amistad no sólo se hace sentir con pláticas largas y profundas, gracias por todo el apoyo.

A mis amigos: Gollum, Juan Carlos, Polo, Rodrigo y Romina, quienes han permanecido cerca a pesar de la distancia, tiempo o situaciones adversas, gracias por su amistad.

A TODOS mis amigos y compañeros del laboratorio 321 por hacer de mi último año en la Facultad de Química uno de los mejores; por su apoyo en todo momento: alegrías, tristezas, decepciones y celebraciones, GRACIAS!

A Carlx que no tuvo “nada” que ver con este proyecto pero es la ondita.

A la UNAM, simplemente la mejor institución del mundo.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña, por todo su apoyo y tiempo invertido para la realización de este trabajo. Gracias por la asesoría y los consejos.

Al jurado asignado por el valioso tiempo invertido en la corrección del presente trabajo.

Al Dr. Daniel Méndez Iturbide por las muestras brindadas y su apoyo para la realización de este trabajo.

Al ICyTDF por el financiamiento brindado para la realización del presente proyecto.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Hipótesis.....	2
3. Objetivos generales.....	2
3.1. Objetivos particulares.....	3
4. Antecedentes.....	4
4.1. El maíz.....	4
4.1.1. Origen del maíz.....	5
4.1.2. Importancia del maíz en México.....	7
4.1.3. Producción de maíz en México.....	8
4.1.4. Subproductos de la planta de maíz.....	11
4.2. Pared celular.....	12
4.2.1. Pectina.....	14
4.2.2. Celulosa.....	17
4.2.3. Lignina.....	18
4.2.4. Hemicelulosa.....	19
4.3. Ácidos Hidroxicinámicos.....	20
4.4. Ácido <i>p</i> -cumárico.....	22
4.4.1. Biosíntesis del ácido <i>p</i> -cumárico.....	22
4.4.2. Función biológica del Ap-C y otros ácidos hidroxicinámicos en las plantas.....	24
4.4.3. Fuentes naturales de ácido <i>p</i> -cumárico.....	26
4.4.4. Obtención de los ácidos <i>p</i> -cumárico y ferúlico.....	29
4.4.5. Propiedades del ácido <i>p</i> -cumárico.....	31
4.4.5.1. Propiedades fisicoquímicas.....	31
4.4.6. Aplicaciones del ácido cumárico.....	32
4.5 Antioxidantes.....	35
5. Metodología.....	37
5.1. Primera parte.....	39
5.1.1. Recolección de muestras.....	40
5.1.2. Preparación de muestras.....	40
5.1.3. Identificación cualitativa.....	41
5.2. Segunda parte.....	43
5.2.1. Determinación de temperatura y concentración de álcali para la hidrólisis.....	44
5.2.2. Optimización del tiempo de hidrólisis.....	49
5.3. Tercera parte.....	51
5.3.1. Determinación del método de extracción de Ap-C.....	52
5.3.1.1. Adsorción.....	52
5.3.1.2. Desorción.....	54
5.3.2. Integración del método.....	55
5.4. Cuarta parte.....	57
5.4.1. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados de cuatro muestras de maíz.....	58
5.4.1.1. Cuantificación de Ap-C en hidrolizados (UV).....	59
5.4.1.2. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados (HPLC).....	59
5.4.2. Purificación de Ap-C.....	59
5.4.2.1. Recristalización.....	60
5.4.2.2. Cromatografía en columna.....	60
6. Resultados y discusión.....	62
6.1. Primera parte.....	62
6.1.1. Recolección de muestras.....	62

6.1.2. Preparación de muestras.....	64
6.1.3. Identificación cualitativa	64
6.2. Segunda parte.....	67
6.2.1. Determinación de temperatura y concentración de álcali para la hidrólisis.....	67
6.2.2. Optimización del tiempo de hidrólisis.....	74
6.3. Tercera parte.....	76
6.3.1. Determinación del método de extracción de Ap-C.....	76
6.3.1.1. Adsorción.....	77
6.3.1.3. Desorción.....	81
6.3.2. Integración del método.....	84
6.4. Cuarta parte.....	85
6.4.1. Cuantificación de Ap-C en cuatro muestras de maíz.....	85
6.4.1.1. Cuantificación de Ap-C en hidrolizados (UV).....	86
6.4.1.2. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados (HPLC).....	87
6.4.2. Purificación de Ap-C.....	91
6.4.2.1. Recristalización.....	92
6.4.2.2. Cromatografía en columna.....	93
8. Conclusiones.....	96
9. Referencias.....	97
Anexo: Cromatogramas.....	105

1. Resumen

Actualmente la mayor parte de los desechos generados a partir de la cosecha del cultivo más importante de México; el maíz, son utilizados como forraje, sin embargo, estos materiales podrían ser aprovechados como materia prima de bajo costo para la obtención de productos con actividad biológica.

El ácido *p*-cumárico (Ap-C) es un compuesto polifenólico que forma parte de la pared celular vegetal y se encuentra de manera abundante en estructuras rígidas como las que presenta la planta de maíz; para la mayoría de los compuestos polifenólicos se han asociado diferentes propiedades biológicas, como son: antioxidantes, antibacteriales, antiinflamatorias y anticancerígenas.

En el presente proyecto se desarrolló un método para la liberación de Ap-C por medio de hidrólisis alcalina a partir de material lignocelulósico, su cuantificación (espectrofotométrica) en los hidrolizados y recuperación por medio de una resina hidrofóbica; la cual permitió obtener extractos prepurificados con una pureza de hasta 41% de Ap-C.

Posteriormente se determinó por HPLC la cantidad recuperada de Ap-C en extractos prepurificados obtenidos a partir de hojas, raíces y tallos de maíz de distintas especies criollas y una híbrida provenientes del estado de Tlaxcala.

Se identificó al tallo y a la raíz como las estructuras con mayor cantidad de Ap-C por gramo de materia seca (M.S.), puesto que entre las especies criollas analizadas los resultados para raíz oscilan de: 1.8 g de Ap-C/ 100 g de M.S., hasta 3.5. En el caso del tallo se tienen datos desde 1.7 hasta 3.0. La especie

híbrida evaluada obtuvo valores menores, ya que sólo se tiene 1.0 para tallo y 1.7 para raíz. En el caso de las hojas, la cantidad recuperada de Ap-C en extractos prepurificados nunca superó el gramo de Ap-C/100 g de M.S., tanto en las especies criollas como en la híbrida.

Finalmente se desarrolló un método cromatográfico para la purificación de Ap-C a partir de los extractos prepurificados provenientes de la hidrólisis alcalina del material lignocelulósico utilizado, obteniéndose cristales de Ap-C con una pureza del 92.81% a partir de un extracto prepurificado de 33% de pureza.

2. Hipótesis

Debido al estrés físico, químico y biológico causado por las prácticas agrícolas a las que son sometidos los maíces criollos, se espera que estos presenten un mayor contenido de ácido *p*-cumárico ligado a la pared celular que los maíces híbridos.

3. Objetivos generales

- Desarrollar un método para la detección, cuantificación y obtención de ácido *p*-cumárico a partir de subproductos generados en la cosecha de distintas especies criollas y una híbrida de maíz, que sirva como propuesta para el aprovechamiento de estos residuos.

3.1. Objetivos particulares

- Determinar cualitativamente la presencia de ácido *p*-cumárico en subproductos de la cosecha de maíz por cromatografía en capa fina.
- Establecer un método de hidrólisis de material lignocelulósico que permita la liberación de ácido *p*-cumárico.
- Desarrollar un método espectrofotométrico para la detección de ácido *p*-cumárico en hidrolizados de material lignocelulósico.
- Determinar el mejor método de extracción de ácido *p*-cumárico a partir de los hidrolizados obtenidos para la obtención de extractos prepurificados.
- Cuantificar el ácido *p*-cumárico presente en los extractos prepurificados en diferentes partes de la planta de maíz (hojas raíz y tallo) de distintas especies criollas y una híbrida.
- Desarrollar un método de purificación de ácido *p*-cumárico a partir de los extractos obtenidos.

4. Antecedentes

El Ap-C pertenece a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, compuestos que forman parte de la estructura compleja de la pared celular de algunas plantas, en especial aquellas que presentan estructuras lignificadas, las cuales le dan soporte y rigidez a la planta, tal es el caso del maíz.

4.1. El Maíz

Nombre común: maíz. El nombre proviene de las Antillas, pero en México, los nahuas lo denominaron centli (a la mazorca) o tlaolli (al grano).

- Reino: Plantae.
- Subclase: Monocotiledónea.
- Familia: Gramíneas (Gramineae)
- Nombre científico (género y especie): *Zea mays*.
- Orden: cereales.
- Clase: Angiosperma.

Es una planta propia de tierras calientes y húmedas, requiere alrededor de 5 mm diarios de agua y la temperatura óptima para el crecimiento de la planta se encuentra entre los 20°C y 30°C, fuera de este intervalo se pueden registrar problemas de mala absorción de agua, nutrientes y minerales, sin embargo existen especies que se pueden adaptar a las malas condiciones ambientales. La planta se adapta a todo tipo de suelo, pero se instala mejor a suelos con pH de 6 a 7 (Infoagro, 2010).

El maíz es un cereal perteneciente a la familia de las gramíneas. La planta alcanza desde medio metro hasta seis metros de alto. Las hojas forman una larga vaina íntimamente enrollada al tallo y son de forma ancha y alargada. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy densas o mazorcas envueltas en espatas. En cada mazorca se ven las filas de granos, cuyo número puede variar de ocho a treinta. A cada grano le corresponde un hilo largo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca (Melchor, 2006).

El maíz es el cereal de los pueblos y culturas del continente americano, el cual tiene origen en la selección humana con fines alimentarios; es gracias a esta práctica por lo que en México existen alrededor de 55 especies de maíz.

4.1.1. Origen del maíz

Pruebas arqueológicas demuestran que el maíz existió en América desde hace 8000 años. Dos mil años después, el cereal desempeñaba un papel importante en el desarrollo de las civilizaciones mesoamericanas (Paredes, 2006).

Se cree que el maíz se originó en América durante el período de la invención de la agricultura (10 000 años antes de Cristo) a partir del teocintle (*Zea mays sp mexicana*). En forma empírica el mejoramiento genético del maíz se inicia con los indígenas de México, quienes del teocintle (*Zea mays sp mexicana*.) comenzaron a seleccionar plantas cuyos granos ofrecían características aprovechables con fines alimentarios.

Poco a poco se fue dando paso a la creación de la mazorca de maíz como hoy la conocemos, dicha transformación ha causado mucha polémica ya que los datos arqueológicos demuestran que ésta sucedió en un periodo de tan solo unos cientos de años.

Los siguientes datos apoyan la hipótesis del papel que el hombre tuvo en la domesticación del maíz (Paredes, 2006):

- El maíz es más joven que el teocintle
- Las características que separan al maíz del teocintle son de carácter agronómico más que de adaptación al ambiente.
- Los vestigios más antiguos de maíz son materiales domesticados, no silvestres.
- Antes de la aparición del maíz el teocintle pudo haber sido un alimento de uso común.
- Las relaciones de parentesco que han sido dilucidadas recientemente, gracias al estudio del ADN de ambas plantas.

Fueron los indígenas mexicanos quienes hicieron evolucionar al maíz y dieron origen a las variedades derivadas. Con la formación de las variedades obtenidas y con los cruzamientos interraciales se dio origen a las razas modernas, de las cuales se han obtenido los híbridos que ofrecen muy altos rendimientos gracias a las técnicas modernas de mejoramiento genético. En este punto, es claro que los cultivadores de las variedades criollas fueron los indígenas y sus sucesores: los campesinos (Márquez, 2008).

4.1.2. Importancia del maíz en México

El maíz es el cultivo más importante de México, ya que está presente en la elaboración de más de 4 mil productos (almidón, fructosa, aceites, cartón, chocolates, alimento animal, etc.), ocupa poco más de la mitad de la superficie sembrada del país y representa casi una tercera parte del valor de la producción agrícola; por esto, entre otras razones, México es el cuarto productor mundial de maíz después de Estados Unidos, China y Brasil (CEFP, 2007).

Desde tiempos ancestrales, el maíz ha sido un componente fundamental, tanto de la dieta del mexicano como de la cultura de los pueblos de toda Centroamérica. Tan solo dos mil años después de los primeros registros arqueológicos del maíz, este cereal ya desempeñaba un papel muy importante en el desarrollo de las grandes civilizaciones mesoamericanas, particularmente la maya y nahua.

La decisión de utilizar cal para cocer el grano, proceso conocido como nixtamalización, aumentó el aporte nutricional del maíz y facilitó la elaboración de ciertos productos como la tortilla. La tecnología utilizada en México y Centroamérica para la elaboración de la tortilla ha sido transmitida de generación en generación hasta nuestros días, fecha a la cual se continúa utilizando la misma técnica de los antiguos pobladores mesoamericanos:

El maíz es cocido con cal para producir el nixtamal, se deja remojar toda la noche, el grano es lavado para retirar el pericarpio, posteriormente el grano es molido en un metate para formar la masa y

finalmente se forman discos de aproximadamente 20 cm de diámetro que se cuecen en un comal.

La tortilla ha sido el principal alimento en la dieta del pueblo mexicano y ha sido base de su desarrollo y supervivencia por más de 3500 años, en la actualidad la tortilla representa alrededor del 65% de los alimentos consumidos en las zonas rurales (Paredes, 2006).

4.1.3. Producción de maíz en México

En nuestro país se hace mención a dos variedades de maíz por lo general: el maíz blanco y el maíz amarillo o forrajero, el maíz blanco es utilizado casi en su totalidad para consumo humano directo (elaboración de tortilla y otros subproductos) debido a su alto valor nutricional, en tanto que el maíz amarillo se destina a la alimentación animal y al procesamiento industrial (Miramontes, 2007)

La tabla 1 resume los principales tipos de maíz clasificados según sus usos industriales específicos.

Variedades y usos del maíz	
Variedad	Usos
Amarillo	Es el maíz con mayor producción a nivel mundial, tiene un alto contenido de pigmentos carotenoides en el endospermo. Es el maíz canalizado a la alimentación de los animales, tiene la preferencia de la industria refinadora del almidón.
Blanco	Maíz con bajo contenido de carotenoides en el endospermo. La gran mayoría es canalizado a la industria alimentaria productora de harinas, botanas y pan.
Azul y Morado	Maíz con endospermo blanco y suave que posee alta pigmentación en la capa de la aleurona que le da su apariencia azul/morada. Es utilizado para la fabricación de botanas y otros platillos típicos de la cocina mexicana.
Dentado	Es la clase más abundante a nivel mundial dada su alta productividad en el campo. Posee una hendidura en la corona de la cariósida y la característica forma dentada. La gran mayoría posee un endospermo amarillo y suave.
Cristalino	Maíz en forma esférica o lagrimal, no posee una hendidura en la corona, los granos son más pequeños y densos que los dentados, generalmente es de textura vítrea y de color blanco o amarillo.
Palomero	Maíz cristalino seleccionado por su poder de expansión, incluye variedades que producen cariósidas pequeñas con una textura de endospermo casi totalmente cristalino o vítreo. Además contiene un pericarpio grueso de color amarillo o blanco.
Ceroso o Cerero	Maíz generalmente dentado y amarillo, con bajo contenido de amilosa (0-5%), con una apariencia del endospermo cerosa, es utilizado por la industria refinadora del almidón. El almidón ceroso tiene propiedades funcionales contrastantes con el almidón procedente de endospermos normales.
*Alto en Amilosa	Mutantes de maíces que poseen hasta 50% de amilosa. Todavía no se siembran comercialmente. Son altamente resistentes al cocimiento y podrían ser utilizados en la producción de botanas y cereales para desayuno.
*Alto en Lisina	Mutantes desarrollados a partir del mutante opaco-2 que posee un endospermo suave con una menor proporción de prolaminas o zeínas. Contienen casi el doble de Lisina y Triptófano, primer y segundo aminoácido limitantes, que el maíz normal. Por consiguiente poseen un mejor valor nutritivo para humanos y animales domésticos monogástricos. Existen variedades e híbridos que están siendo sembradas comercialmente en diferentes partes del mundo. Se prevé que se sembrarán cada día más debido al desarrollo de variedades de híbridos altamente productivos con endospermo de textura intermedia
*Alto en aceite	Maíz desarrollado en Illinois, Estados Unidos para contener altas cantidades de aceite. No se siembra comercialmente.
Pozolero o cusco	Maíz que produce cariósidas grandes y dentadas, generalmente de color blanco, que poseen una textura de endospermo suave o harinoso. Es utilizado para la producción de botanas, pozole y otros platillos típicos de la gastronomía mexicana.

Tabla 1. Variedades de maíz comercializadas en México (Serna, 2001).

La producción de maíz blanco en 2008 para México fue de 24, 410,278.53 toneladas, 12, 794,819.83 toneladas de maíz forrajero, 1,954.20 de maíz palomero y se importó 25, 058,664 toneladas de Estados Unidos (SIAP, 2010).

Según la Cámara Nacional del Maíz Industrializado, alrededor del 38% de la demanda de maíz en México corresponde al consumo humano directo (tortillas y derivados tradicionales), el 10 % a la producción de botanas y cereales para desayuno, el 43 % se va al consumo animal y el porcentaje restante es destinado a la industria almidonera y a la elaboración de distintos productos de menor impacto (Miramontes, 2007).

En el mismo año (2008) la producción de maíz en Estados Unidos fue de 329,000,000 toneladas, de las cuales se destinó 52% a alimentación animal, el 37% a producción de etanol (combustible y bebidas) y el 11% a la industria alimentaria (Rose, 2010).

En México alrededor del 48 % de la producción de Maíz es destinada al consumo humano, ya sea vía la industria alimentaria o el consumo directo, contrastando con el 11% que destina el más grande productor del cereal en el mundo (EUA); lo cual nos habla de la gran presencia que tiene este producto en nuestra cultura, y de la razón por la que es el cultivo más importante de México desde el punto de vista económico y social.

4.1.4. Subproductos de la planta de maíz

El cultivo del maíz produce una gran cantidad de biomasa, de la cual el hombre cosecha cerca del 50% en forma de grano. El resto, corresponde a diversas estructuras de la planta tales como caña, y hojas, entre otros. La producción de biomasa residual que genera un cultivo de maíz de grano (cañas, hojas, y residuos proveniente de la mazorca), fluctúa entre 20 a 35 toneladas por hectárea y entre 16 a 25 toneladas por hectárea de rastrojo (hojas y tallos). La proporción entre los componentes del residuo depende principalmente de la variedad y las condiciones de cultivo (Manterola, 1999).

La proporción generalizada de las distintas estructuras que forman la planta de maíz se describe de la siguiente manera:

Componente	Porcentaje del peso seco del maíz
Olote	11.8
Caña	17.6
Grano	49.7
Hojas	20.9

Tabla 2. Proporción de los diferentes componentes de una planta de maíz (Manterola, 1999)

Este tipo de residuos es comúnmente destinado a alimentación animal. Cada una de estas estructuras posee características físico-químicas propias, lo que le confiere un valor nutritivo muy diferente. Los tallos presentan las estructuras más lignificadas y de menor contenido de proteína bruta (3.1%), las hojas contienen entre 4 y 7% de proteína (Rose, 2010).

Estudios recientes han determinado la composición del rastrojo de maíz, el cual está compuesto por el tallo y las hojas de la planta. Está constituido

principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; compuestos que forman parte de la estructura de la pared celular de la planta (Templeton, 2009).

En la tabla 3 se presenta la composición de distintas estructuras de la planta de maíz:

Estructura	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Rastrojo de maíz (Mosier, 2004)	37.5	22.4	17.6
Fibra de maíz (Mosier, 2004)	14.3	16.8	8.4
Olote de maíz (Ortíz, 2008)	36.0	23.0	17.0

Tabla 3. Composición porcentual en peso seco de distintas estructuras de la planta de maíz.

El porcentaje restante que no se menciona en la tabla 3 para cada una de las estructuras pertenece a cenizas y proteínas, en el caso del rastrojo; según Templeton (2009), el 4.8% de su composición pertenece a cenizas y el 4.5% a proteínas.

4.2. Pared celular

La pared celular vegetal es un conglomerado complejo de varios polímeros de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, es una capa rígida que se encuentra alrededor de la membrana plasmática de la célula, la cual otorga rigidez y funge como mediadora de todas las relaciones de la célula con su entorno. Además de servir como soporte mecánico para la célula, en ella se depositan diferentes sustancias de importante valor metabólico para la célula (Taiz, 1991).

La pared celular vegetal está conformada por tres diferentes capas:

Pared celular primaria. Esta capa está compuesta por pectinas y microfibrillas de celulosa, las cuales a su vez se encuentran unidas por carbohidratos no fibrilares, denominados hemicelulosas (Figura 1), en el caso de las gramíneas, dichas hemicelulosas están compuestas mayoritariamente por arabinoxilanos, β -1, 3 y β -1, 4 glucano y en menor cantidad por proteínas estructurales. En esta zona de la pared celular las microfibrillas de celulosa se encuentran rodeadas de una matriz altamente hidratada (Brett, 1996).

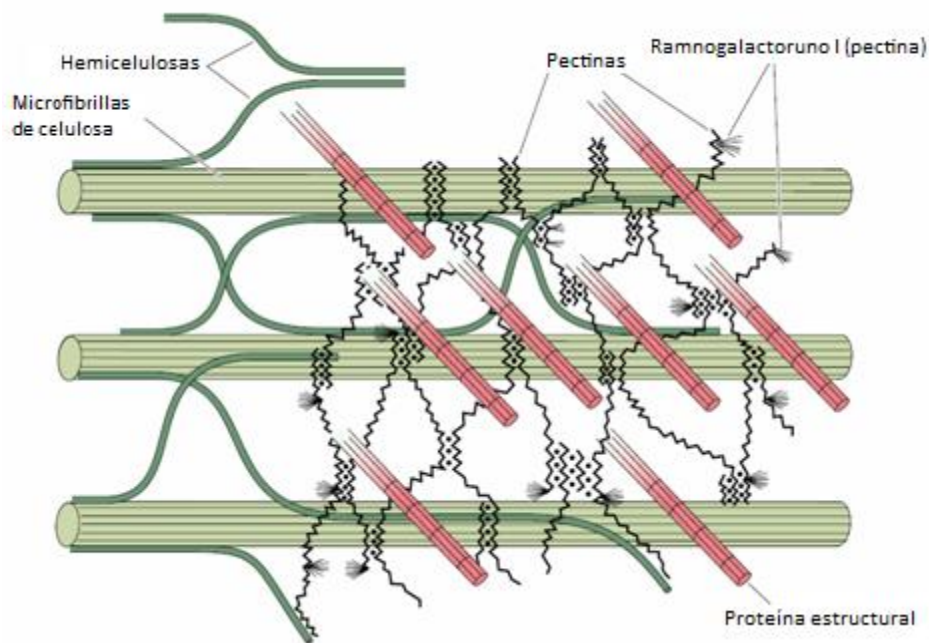


Figura 1. Estructura de la pared celular vegetal (Brett, 1996)

Pared celular secundaria. Puede o no existir, generalmente esta capa se asocia a estructuras rígidas como las que forman la madera. Es la capa más cercana a la membrana plasmática, dependiendo del tipo de planta puede estar compuesta generalmente por microfibrillas de celulosa, lignina y glucomanano o, 4-O-metil

glucoronoxilano, siendo éste último el que encontramos en la familia de las gramíneas (Brett, 1996).

Laminilla media. Se encarga de unir las paredes primarias de dos células contiguas, generalmente está compuesto por sustancias pécticas (Brett, 1996).

4.2.1. Pectina

Las pectinas son polisacáridos de alto peso molecular, el azúcar fundamental es el ácido galacturónico que se encuentra parcialmente metilado en su grupo carboxilo. En determinados puntos de la estructura de las pectinas, existe otro azúcar: la ramnosa.

La ramnosa provoca la formación de codos pécticos doblando el polímero de ácido galacturónico. Las zonas lisas corresponderán a las cadenas lineales de ácido galacturónico, que cada ciertos residuos se doblan en el codo péctico por la presencia de la ramnosa.

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. Determinan la porosidad de la pared, y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas implicadas en las modificaciones de la misma. Las pectinas también proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico.

Las pectinas tienen tres dominios principales: homogalacturonanos, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (Gunning, 2008).

Homogalacturonanos (HG).

Compuestos por residuos de ácido D-galacturónico unidos por un enlace α (1 \rightarrow 4). Los grupos carboxilo del C6 pueden estar metil-esterificados o permanecer libres. Los grupos carboxilo libres, si están disociados, dan lugar a enlaces de calcio entre las cadenas de homogalacturano vecinas, formando la denominada estructura de caja de huevo (Figura 2).

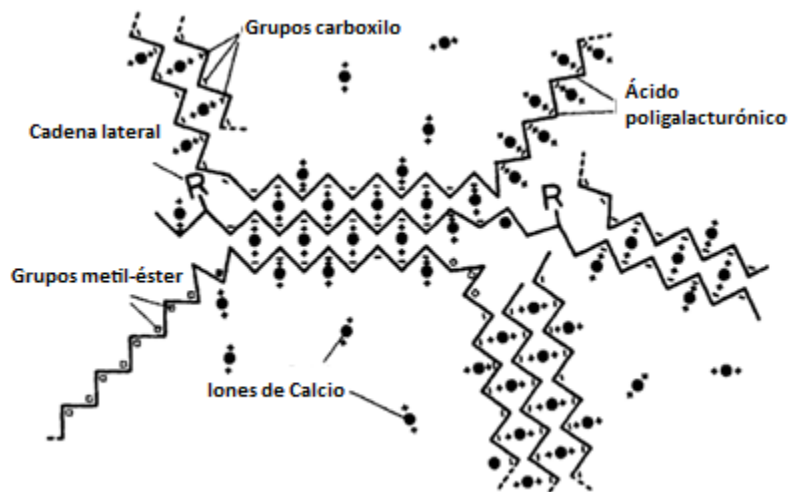


Figura 2. Modelo de la caja de huevo: enlaces de calcio entre homogalacturonanos (Brett, 1996)

Para que una región de homogalacturano sea selectiva al enlace de calcio son necesarias diez moléculas de ácido D-galacturónico sin esterificar, la formación de enlaces de este tipo está relacionada con la detención de la extensión de la pared celular y, por tanto, con el cese del crecimiento y el aumento de rigidez de la pared. El ácido D-galacturónico puede encontrarse acetilado en el oxígeno 2 o 3 (Gunning, 2008).

Ramnogalacturonano I (RGI).

Consta de ácido D-galacturónico enlazado en α (1-4) con restos de L-ramnosa intercalados con un enlace α (1-2). Estas moléculas de L-ramnosa son el anclaje de cadenas laterales, aproximadamente la mitad están unidas por el C-4 a cadenas de arabinanos, (formados por α -L-arabinosa enlazadas en α (1-5) como eje principal que pueden estar sustituidas con las cadenas Ara(1-2)- α -Ara(1-3) y/o Ara(1-3)- α -Ara(1-3); o Arabinogalactano I (cadenas de β -(1-4)-D-galactosa (Gal), con ramificaciones C6-Gal) (Gunning, 2008).

Ramnogalacturonano II (RGII).

Es un polisacárido pequeño de estructura muy compleja; formado por ácido D-galacturónico, ramnosa, arabinosa, galactosa y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como apiosa, o ácido acético. Las moléculas de Ramnosa pueden estar sustituidas en C-3, en C-3 y C-4, en C-2, C-3, y C4 o ser terminales. El arabinogalactano del RGII presenta ramificaciones en C-3 y C-6 de Galactosa y en C-3 y C-5 de Arabinosa. Las cadenas laterales contienen un alto número de residuos distintos unidos con diversos enlaces.

Arabinanos y galactanos del RGII pueden asociarse al ácido ferúlico (AF) mediante un enlace éster, lo que posibilita el enlace de varias cadenas por puentes diferuíl, mediante la acción de las peroxidasas (Gunning, 2008).

4.2.2. Celulosa

La celulosa es un polímero de la D-glucosa, es la sustancia orgánica más abundante en el planeta; la sintetizan las plantas como sustancia estructural, la cual da soporte a la planta.

La celulosa está formada por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos β -1-4', un enlace muy estable en el cual radica la rigidez de la celulosa. Las moléculas de celulosa largas denominadas microfibrillas se unen entre ellas mediante enlaces de hidrógeno, entre los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa.

La celulosa se obtiene de la madera, el algodón, el lino, el yute, el cáñamo, la paja, y de plantas de crecimiento rápido. En la madera y en otras estructuras rígidas de algunas plantas, como el tallo de la familia de las gramíneas, se encuentra combinada con otras sustancias, como la lignina.

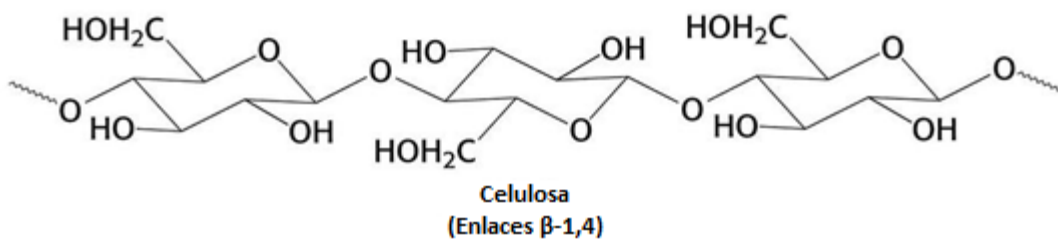


Figura 3. Estructura de la celulosa

4.2.3. Lignina

La molécula de lignina es una molécula con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos. El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a la estructura amorfa característica de la lignina.

La lignina se caracteriza por poseer una estructura amorfa, un peso molecular elevado, además de ser insoluble en cualquier solvente orgánico; le entrega rigidez y flexibilidad a los vegetales, se encuentra en los tejidos que llevan la savia. Es difícilmente atacable, por el hecho de que sus enlaces necesitan una alta energía de activación para la despolimerización en sus unidades. Esta última característica, junto a la notable diversidad de la lignina, son las dos razones que hacen que muy pocos microorganismos sean capaces de atravesarla.

En la figura 4, se muestra la estructura generalizada de la lignina, en la cual se puede observar la gran cantidad de compuestos polifenólicos que la conforman:

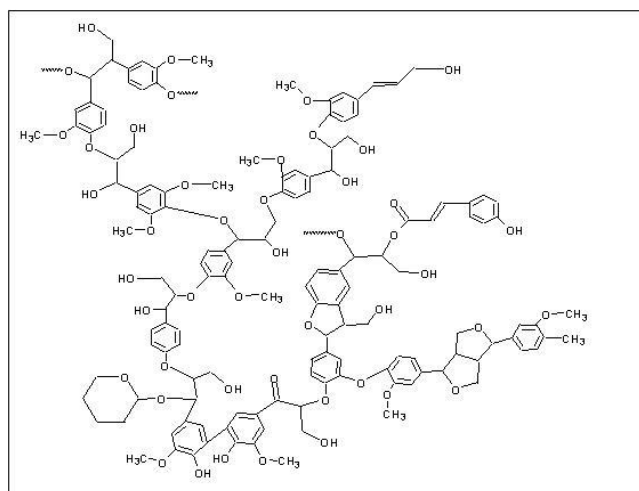


Figura 4. Estructura generalizada de la lignina (Marx, 2010)

La lignina está formada por la extracción irreversible del agua de los azúcares, creando de esta manera compuestos aromáticos.

4.2.4. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el polímero renovable más abundante del planeta, representa del 20 al 30 % de la biomasa lignocelulósica (Topakas, 2007).

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos cortos, en las cuales se agrupa una serie de moléculas formadas por polímeros de hexosas y/o pentosas, las cuales se hallan íntimamente ligadas a la celulosa. Entre los polímeros más conocidos se encuentran: los xiloglucanos, arabinogalactanos y ramnogalacturanos, cuyos monosacáridos principales son: xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido galacturónico.

En el caso de la planta de maíz, debido a su compleja estructura, la fracción hemicelulósica es comúnmente denominada un heteroxilano o bien, debido a su composición mayoritaria de unidades de arabinosa y xilosa es denominada un arabinoxilano. En el maíz, la estructura generalizada está compuesta principalmente por una columna vertebral de β -(1 \rightarrow 4)-xilopiranosil y cadenas laterales de α -L-arabinofuranosil, unidas a la cadena principal por enlaces (1 \rightarrow 2) ó (1 \rightarrow 4), existen también cadenas laterales compuestas por ácido D-glucurónico o algunos otros oligosacáridos (Rose, 2010).

La hemicelulosa de la caña de maíz contiene: 70 % de xilosa, 9% de arabinosa, 14.5 de glucosa y 5.9 de otros sacáridos (Silva, 2007).

4.3. Ácidos Hidroxicinámicos

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales; que se encuentran en frutas y verduras, principalmente, manzanas, cebollas, y en bebidas como té y vinos.

La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante (donador de hidrógeno o electrones, o atrapador de radicales libres). En estudios in vitro, muchos polifenoles naturales son mejores antioxidantes que las vitamina E y C. Además, su capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres.

Los polifenoles están relacionados con el metabolismo de aminoácidos aromáticos en plantas y se encuentran mayormente esterificados o glicosilados en la pared celular. Estos se dividen en tres grupos de acuerdo al número de anillos aromáticos que contiene su estructura. Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en el grupo de los polifenoles de un solo anillo aromático (Gutiérrez, 2002).

Los ácidos hidroxicinámicos son una gama de compuestos polifenólicos sintetizados por plantas y que forman parte de la pared celular de la mayoría de los vegetales. Los más comunes de estos compuestos son los ácidos: ferúlico, caféico, sinápico, cumárico y clorogénico.

Están formados básicamente por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados ácidos hidroxicinámicos por la sustitución del grupo -OH en el anillo aromático (posición 4) y porque son derivados del ácido cinámico; como se observa en la figura 5.

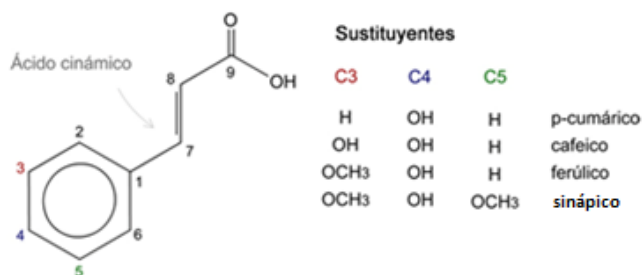


Figura 5. Familia de los ácidos Hidroxicinámicos

Usualmente se encuentran esterificados a algún azúcar, ácidos orgánicos y lípidos o bien dimerizados, como es el caso de la pared celular de algunos cereales.

La importancia de estos compuestos radica en su actividad antioxidante, teniendo aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos. Ayudando a prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer (Garrote, 2004).

Se ha estimado que aproximadamente un 2 % del oxígeno consumido por un organismo normal va a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) de las cuales varias son radicales libres. Cuando la generación de EROs sobrepasa las numerosas barreras de defensa antioxidante del organismo, se produce daño por lesión química de las estructuras biológicas y a este proceso se le denomina estrés oxidativo (Domínguez, 2006).

4.4. Ácido *p*-cumárico

El Ácido *p*-cumárico es producto del metabolismo de la fenilalanina y sirve como precursor de algunos flavonoides y ligninas, siendo su principal función la de proporcionar soporte y rigidez a la planta, es decir la formación de barreras físicas.

4.4.1. Biosíntesis del ácido cumárico

Los flavonoides son metabolitos polifenólicos exclusivos del reino vegetal, que confieren a las plantas rasgos fenotípicos que las hacen atractivas a la polinización como son el sabor, aroma y color, además de resistencia y protección contra plagas y enfermedades.

Todos los flavonoides se sintetizan a partir de flavononas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la vía fenilpropanoide. Dicha ruta es común con la síntesis de otros metabolitos secundarios vegetales como lignina, salicilatos, ácidos hidroxicinámicos y cumarinas.

La ruta fenilpropanoide (Figura 6) inicia en la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico por la PAL (fenilalanina-amonio liasa). El ácido cinámico es convertido en Ap-C por la 4-cinamato hidroxilasa (C4H). En algunas plantas la PAL tiene actividad de TAL (Tirosina-amonio liasa) sobre la tirosina para formar Ap-C. En el siguiente paso el Ap-C es transformado en 4-cumaroil-CoA por la 4CL (4 cumarato CoA ligasa) (Drago, 2006).

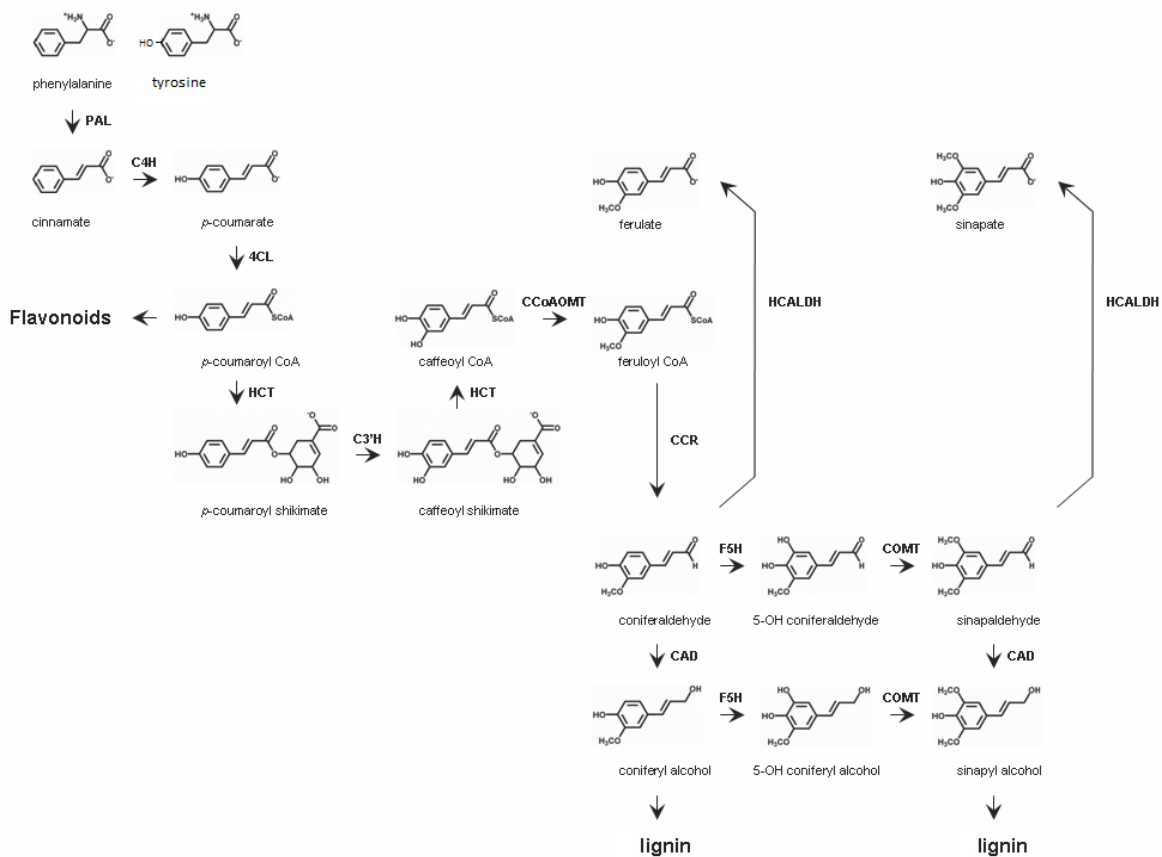


Figura 6. Ruta Fenilpropanoide (U.S. Department of energy, 2005)

4CL, 4-(hidroxi)cinamoil CoA ligasa; C3'H, p-coumaroil shikimato/quinato 3'-hidroxilasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; CAD, cinamil alcohol deshidrogenasa; CCoAOMT, cafeoil CoA O-metiltransferasa; CCR, cinamoil CoA reductasa; COMT, ácido caféico/ácido 5-hidroxiferúlico O-metiltransferasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa; HCALDH, hidroxicinamaldehído deshidrogenasa; HCT, hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoiltransferasa; PAL, fenilalanina amonio-liase.

4.4.2 Función biológica del ácido *p*-cumárico y otros ácidos hidroxicinámicos en las plantas

El Ap-C, así como el AF son los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en las paredes celulares de las plantas de la familia Gramineae, familia donde se encuentra el maíz. Se encuentran unidos covalentemente a algunos polisacáridos de la pared celular vía enlaces éster y a componentes de la lignina mayoritariamente vía enlaces éster en el caso del Ap-C o enlaces éter en el caso del AF (Xu, 2005).

El AF es uno de los principales responsables de la formación de complejos polisacárido-lignina. Durante la biosíntesis de la pared celular, dos unidades de AF pueden ser unidas vía peroxidasa para formar un enlace difenilo (Figura 7).

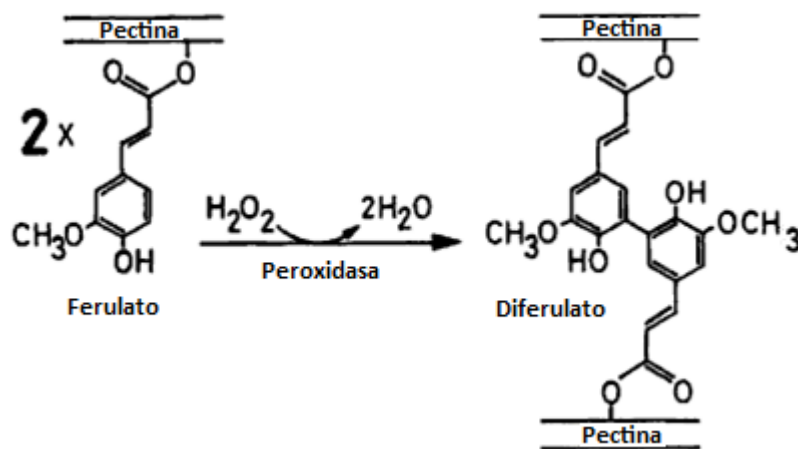


Figura 7. Formación de enlaces Difenilo (Brett, 1996).

En la pared celular primaria dichas unidades de AF se encuentran esterificadas a la arabinosa y galactosa de la pectina, al formarse el enlace difenilo, se da origen a los enlaces entrecruzados entre dos unidades de pectina.

En la pared celular secundaria el AF se encuentra esterificado a los arabinoxilanos que forman las hemicelulosas y este a su vez también forma parte de la lignina, es de esta manera (vía enlaces diferulato) como se forman los enlaces entrecruzados de los complejos polisacárido-lignina. También existen enlaces éster con otros monolignoles (unidades fenólicas que forman la lignina).

Se ha calculado que cada molécula de Heteroxilano contiene alrededor de 15 puentes diferulato (Rose, 2003).

En una fase primaria del desarrollo de la pared celular, el Ap-C se encuentra esterificado a los arabinoxilanos en una proporción igual al AF, sin embargo en fases posteriores del desarrollo la cantidad de Ap-C esterificada a los polisacáridos de la pared celular disminuye, pero aumenta considerablemente en la lignina, sobre todo en las plantas de la familia gramineae (Xu, 2005).

La lignina se encuentra íntimamente ligada a las hemicelulosas, formando una capa alrededor de las microfibrillas de celulosa, de esta manera se genera un ambiente hidrofóbico que aumenta la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre las unidades de polisacáridos y por lo tanto la integridad estructural de la planta (Rose, 2003), como se puede observar en la figura 8.

Los enlaces entrecruzados vía ácidos hidroxicinámicos le confieren ciertas características a la pared celular: disminuye su extensibilidad, plasticidad y adherencia, contribuye para dar la forma de red característica de la pared celular y afecta la digestibilidad de la planta (Taiz, 1991).

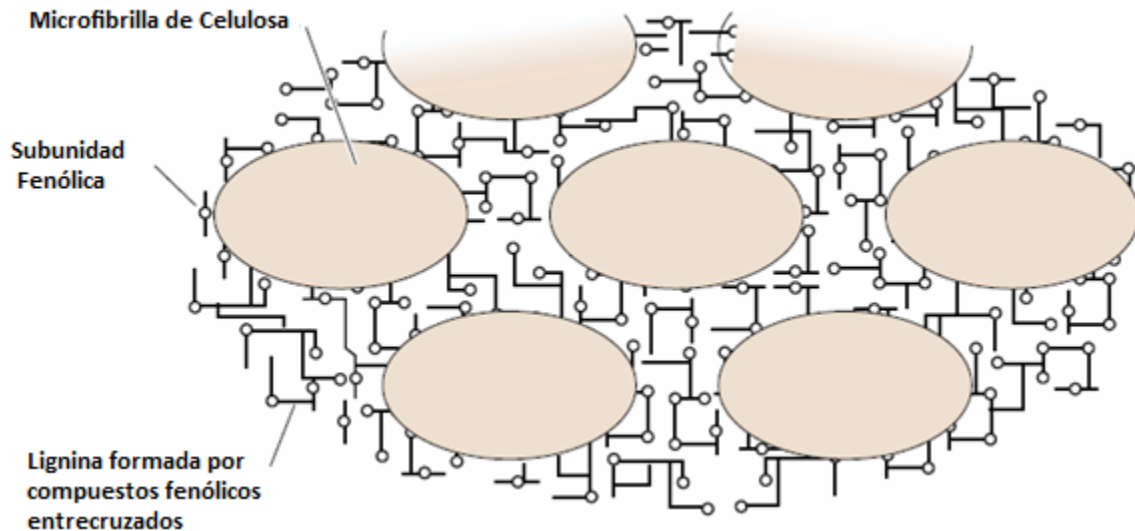


Figura 8. Enlaces entrecruzados entre lignina y microfibrillas de celulosa (Taiz, 1991)

4.4.3 Fuentes naturales de ácido *p*-cumárico

Numerosos estudios han determinado que existe una cantidad considerable de ácidos hidroxicinámicos (especialmente Ap-C y AF) esterificados a la pared celular, siendo aún más abundante en las plantas de la familia Gramineae, donde se encuentra el maíz, en las plantas de dicha familia se han encontrado proporciones que van desde 0.1 a 1.8 g de AF y 0.05 a 0.065 g de Ap-C en 100 g. de materia seca de la planta (Panagiotou, 2007).

En algunos estudios se ha determinado que el Ap-C se encuentra en mayor proporción esterificado a la lignina, es por eso que se espera encontrar mayor cantidad del compuesto en estudio en la parte más rígida de la planta, el tallo.

En algunos cereales y plantas de la familia Gramineae como lo son: el bambú, caña de azúcar, trigo y maíz, podemos encontrar ácidos hidroxicinámicos, los

más abundantes son el AF principalmente y el Ap-C que usualmente se encuentran esterificados en la posición O-5 a cadenas laterales de L-arabinofuranosil en los arabinoxilanos, en la posición O-6 de residuos de β -D-galactopiranosil en el ramnogalacturano péctico y en la posición O-4 a residuos de α -D-xilanopiranosil en xiloglucanos (Topakas, 2007). Debido a la estructura amorfa de la lignina no es posible determinar con exactitud cómo se encuentran esterificados en dicha molécula los ácidos hidroxicinámicos.

La figura 9 muestra de manera generalizada la formación de enlaces entrecruzados por medio de Ap-C y AF que unen a la lignina con los polisacáridos que forman parte de la pared celular:

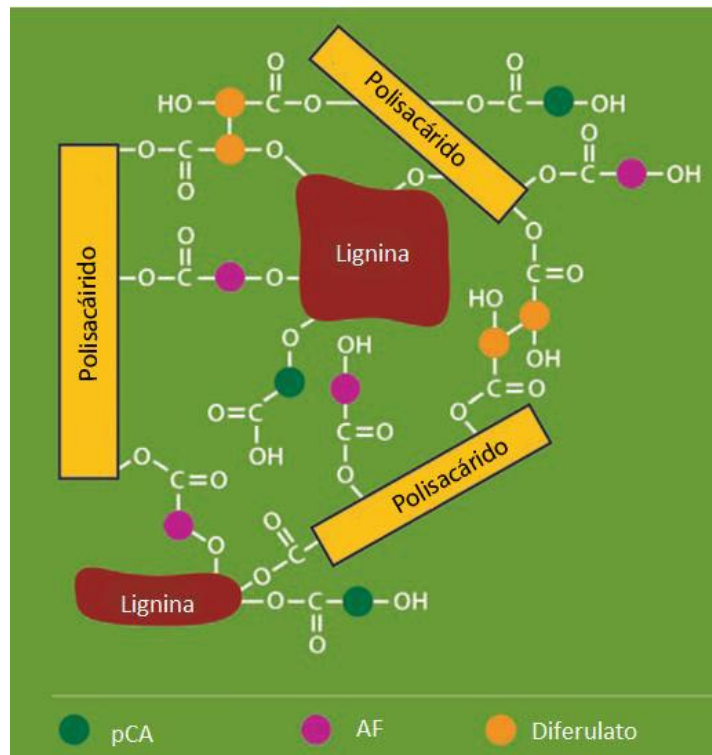


Figura 9. Enlaces entrecruzados por medio de AF, Ap-C y diferulatos en la pared celular
(U.S. Department of energy, 2005)

En la tabla 4 se muestra algunas de las fuentes naturales de Ap-C y AF pertenecientes a la familia de las gramíneas, en algunas estructuras de la planta de maíz, como lo es el tallo y las hojas, es mayor la cantidad de Ap-C que la de AF. Para otros cereales como la avena y la cebada todavía no existen datos acerca de la cantidad de Ap-C presente en algunas de sus estructuras.

Fuente	Ap-C (%)	AF (%)
Salvado de trigo (Topakas, 2007)	S/D*	0.66
Rastrojo de trigo (Topakas, 2007)	0.66	1.24
Salvado de maíz (Topakas, 2007)	0.33	3.1
Tallo de maíz (Goto, 1994)	4.19	0.46
Hojas de la planta de maíz (Goto, 1994)	0.77	0.37
Endospermo de arroz (Topakas, 2007)	S/D*	0.9
Granos de cebada (Topakas, 2007)	S/D*	0.14
Cascarilla de cebada (Topakas, 2007)	S/D*	1.4
Cascarilla de avena (Topakas, 2007)	S/D*	2.2-3.8
Bagazo de caña de azúcar (Xu, 2005)	1.76	1.29

Tabla 4. Cantidad de Ap-C y AF (% w/w), en distintas estructuras de plantas de la familia Gramineae. * S/D, no se tienen datos reportados

En la familia de las dicotiledóneas, como la espinaca y la remolacha, el AF se encuentra esterificado en la posición O-2 a los residuos de α -L-arabinofuranosil y en la posición O-6 a los residuos de β -galactopiranosil en los ramnogalacturanos pécticos. La cantidad de AF en la pulpa de remolacha se encuentra alrededor de 0.87% (Topakas, 2007), no se tienen datos sobre la cantidad de Ap-C presente en este tipo de plantas.

4.4.4 Obtención de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico

Actualmente existen diversos métodos para la obtención de Ap-C y AF industrialmente, sin embargo la comunidad científica se ha preocupado más por desarrollar métodos para el aislamiento del AF, tanto por sus aplicaciones en la industria como por la cantidad en la que se encuentra en materiales lignocelulósicos (en la mayoría de los casos mayor al Ap-C). De esta manera existen menos métodos para la obtención de Ap-C; sin embargo algunos de los métodos para la obtención de AF podrían aplicarse para la obtención de Ap-C, debido a la similitud en algunas de sus propiedades, a las fuentes naturales donde podemos encontrar a ambos y a que los dos comparten una misma ruta biosintética.

A continuación se presentan algunos de los métodos más comunes para la obtención de AF y Ap-C:

Comercialmente es posible la síntesis de AF a partir de vainillina y ácido malónico catalizado por piperidina, sin embargo, el costo es demasiado alto y el impacto ambiental es considerable, es por eso que la mejor opción es que este sea aislado de alguna fuente natural (Rose, 2010).

Según Topakas, es posible la obtención mayoritaria de AF a partir de materiales lignocelulósicos utilizando enzimas microbianas denominadas feruloil esterases, las cuales son capaces de liberar AF y Ap-C de hemicelulosas y pectinas, donde se encuentran esterificados naturalmente.

La producción de feruloil esterasas fue detectada inicialmente en *Streptomyces olivochromogenes*, sin embargo últimamente se tienen datos de diversas especies capaces de producir dichas enzimas, entre ellas *Aspergillus flavipes* y *Aspergillus niger*, dos de las cepas que ofrecen rendimientos mayores en cuanto a la producción de feruloil esterasas (Topakas, 2010).

Diversos autores han logrado liberar ácidos hidroxicinámicos de material lignocelulósico como lo es el bagazo de caña de azúcar, salvado de maíz y bagazo de malta utilizando álcalis para romper los ésteres de ácidos hidroxicinámicos mediante una saponificación.

Según Arni (2007) las condiciones para obtener un mayor rendimiento al recuperar AF y Ap-C a partir de bagazo de caña con NaOH son las siguientes: Utilización de Hidróxido de sodio 4M para la solubilización del material lignocelulósico a 121°C durante una hora con una proporción sólido líquido de bagazo de caña y NaOH de 1:50 (g/g). También fue posible la liberación de otros compuestos fenólicos como lo es el ácido siringico y la vainillina utilizando estas condiciones.

Para la recuperación de ácidos Hidroxicinámicos se han empleado distintas matrices, Ou, en el 2005, utilizó carbón activado granulado y en polvo en batch a 120 r.p.m para la recuperación de AF de Hidrolizados de caña de maíz. El carbón activado resultó más eficiente que una resina de intercambio iónico utilizada en el estudio.

Tilay en el 2008 logró obtener extractos con una pureza superior al 50% de AF utilizando Amberlita, una matriz polimérica hidrofóbica que interacciona con el anillo aromático del AF, en el estudio se reporta que dicha matriz es muy selectiva para el asilamiento de AF a partir de hidrolizados de desechos agrícolas.

4.4.5. Propiedades del ácido *p*-cumárico

Nombre IUPAC: (*E*)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoico.

Sinónimos: ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxicinámico, ácido 4-cumárico.

Estructura:

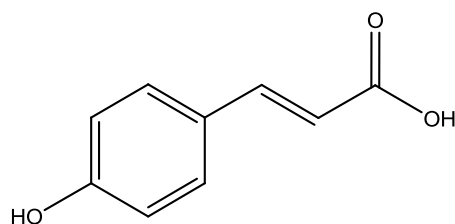


Figura 10. Estructura del ácido *p*-Cumárico

Existen 3 isómeros comunes: orto, meta y para, dependiendo de la posición del grupo hidroxilo, sin embargo el Ap-C es el más abundante en la naturaleza (O'Neil, 2001).

4.4.5.1. Propiedades fisicoquímicas

Apariencia: polvo de color beige claro.

Peso molecular: 164.16 UMA.

P.F: 214°C.

Solubilidad: ligeramente soluble en agua y muy soluble en etanol caliente y dietil éter.

Reactividad: es una sustancia estable. Produce dióxido y monóxido de carbono en presencia de fuego.

UV Max (95% etanol). 223,256 nm (O'Neil, 2001).

Pka1 = 4.9, pka2= 9.35 (Figura 11).

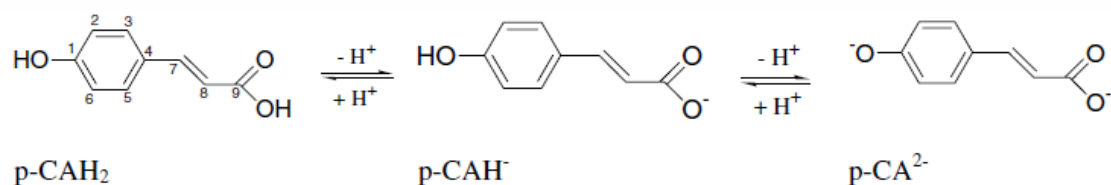


Figura 11. Estructura de los tres niveles de protonación de Ap-C (Putschogl, 2008).

Contacto con la piel: causa irritación. Lavar con jabón y agua abundante

Contacto con los ojos: causa irritación. Lavar con agua abundante por al menos 15 minutos.

Inhalación: causa irritación de las mucosas y el tracto respiratorio.

Ingestión: Se debe lavar con abundante agua la boca (O'Neil, 2001).

4.4.6. Aplicaciones del ácido *p*-cumárico

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante, además de ser útiles en el tratamiento contra el cáncer, todo esto debido a su capacidad de formar radicales estables y de quelar metales.

La presencia del sustituyente $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$, facilita la estabilización de radicales.

Debido a que algunos antioxidantes sintéticos son altamente inestables bajo las condiciones de trabajo y en ciertos casos ocasionan efectos adversos sobre la salud de animales de experimentación, se ha intentado encontrar sustancias estables, eficaces y/o menos tóxicas para su uso en alimentos. De esta manera el Ap-C podría ser utilizado como aditivo alimentario para el control de la autoxidación de las grasas, de manera sinérgica con otros antioxidantes de origen natural o sintético.

Estudios recientes han asociado específicamente al Ap-C como un agente importante contra el cáncer puesto que se ha detectado (en ratas) que es eficaz contra la producción de radicales libres, producto del metabolismo de la Doxirrubicina, un anticancerígeno que se ha visto limitado en su uso debido a la cardiotoxicidad que la producción de estos radicales representa (Abdel-Walhab, 2003).

El Ap-C actúa como inhibidor de la tirosinasa, enzima ligada a la generación de melanoma cuando se encuentra en exceso (Kubo, 2004).

La tirosinasa es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en plantas y animales. La tirosinasa es una enzima cuprífera presente en tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos derivados de la tirosina por oxidación, por lo tanto un agente capaz de inhibir su producción podría tener aplicaciones dentro de la industria cosmética, como agente blanqueador de la piel (Won Choi, 2007).

Según Won Choi la hidroxilación o metoxilación de ácidos Hidroxicinámicos podría traer como consecuencia un aumento en la actividad inhibitoria de la tirosinasa.

Según Garrote (2004), los fenoles afectan la permeabilidad de la membrana disminuyendo el transporte de electrones, la absorción de nutrientes y probablemente interfieran con la síntesis de macromoléculas y ácidos nucleicos en células bacterianas. Además de inhibir el desarrollo de esporas debido a su permeabilidad en el recubrimiento de estas.

En dicho estudio se habla de que tanto el AF como el Ap-C pueden llegar a tener efectos comparables o superiores a las mezclas de ácido benzoico y ácido sórbico como agentes antimicrobianos además de otorgar un sabor agradable en bebidas.

En la tabla 5 se muestra la concentración mínima inhibitoria de Ap-C para diferentes microorganismos:

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria (MIC)
<i>A. flavus</i>	0.3 mg/ml
<i>A. parasiticus</i>	0.3 mg/ml
<i>B. cereus</i>	0.4 mg/ml
<i>E. coli</i>	0.4 mg/ml
<i>K. pneumoniae</i>	0.4 mg/ml);
<i>L. mesenteroides</i>	Sin datos
<i>P. aeruginosa</i>	Sin datos
<i>S. aureus</i>	>0.6 mg/ml
<i>S. epidermidis</i>	Sin datos
<i>S. typhimurium</i>	0.4 mg/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0 mg/ml
<i>V. vulnificus</i>	Sin datos

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de Ap-C para diferentes microorganismos

(Garrote, 2004)

4.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que retardan o inhiben la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas (Vásquez, 2007).

En el campo de los alimentos existen varios tipos de antioxidantes según su mecanismo de acción.

Algunos inhiben la formación de radicales libres en la fase de iniciación de la reacción de autoxidación y otros inhiben la fase de propagación de radicales libres.

Para inhibir la reacción de autoxidación desde la fase de iniciación, se pueden utilizar agentes descomponedores del peróxido de Hidrógeno, moléculas capaces de quelar metales o inhibidores del Oxígeno singulete.

Debido a que es difícil la eliminación de trazas de peróxidos o metales iniciadores, últimamente se ha optado por usar compuestos capaces de captar radicales libres, como lo son los compuestos polifenólicos (Rose, 2003).

Los compuestos fenólicos o polifenólicos son compuestos utilizados con frecuencia como antioxidantes, ya que debido a su estructura son excelentes donadores de electrones o de Hidrógeno, además de que sus intermediarios radicales son muy estables debido a la capacidad de la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones atacables por el oxígeno singulete (Fennema, 1996).

En la figura 12 se muestra el posible mecanismo de acción de uno de los compuestos polifenólicos más simples, la Hidroquinona en la presencia de radicales libres.

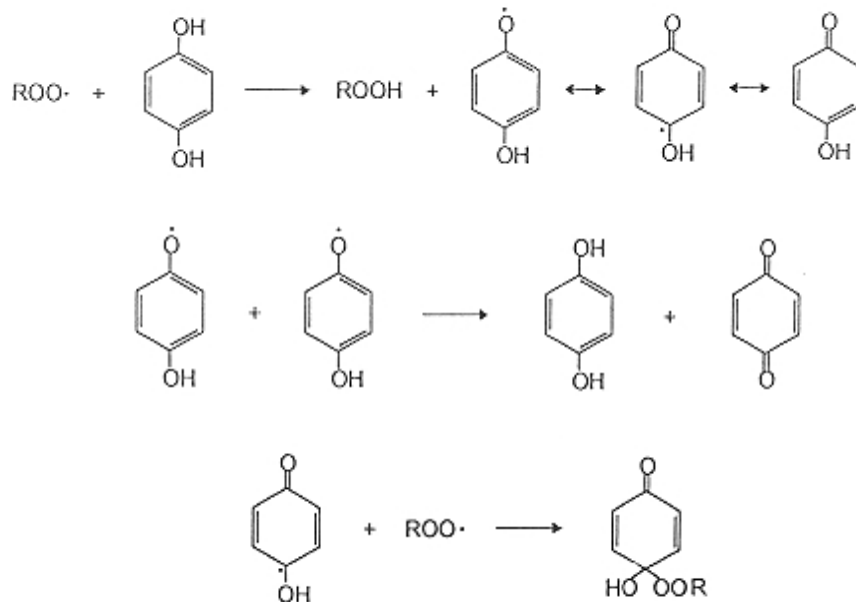


Figura 12: posible mecanismo de acción de la hidroquinona frente radicales libres, donde se puede observar la formación de moléculas estables (Fennema, 1996)

En el campo de la medicina, como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger a las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras en un organismo (Gutiérrez, 2008).

5. Metodología

Con base en los objetivos planteados se desarrolló el proyecto en cuatro etapas que se muestran en el diagrama 1.

En la primera fase se obtuvieron cuatro muestras de diferentes especies de maíz; una híbrida y tres criollas de una misma región, las plantas se separaron por estructuras, se molieron, se tamizaron y se determinó cualitativamente la presencia de Ap-C en las cuatro variedades.

En la segunda fase se desarrolló un método de liberación de Ap-C a partir de material lignocelulósico por medio de una hidrólisis alcalina. Se evaluaron diferentes condiciones de hidrólisis utilizadas en estudios anteriores hasta encontrar la que ofrece mejores rendimientos para la liberación de Ap-C.

En una tercera etapa se desarrolló una metodología para la recuperación de Ap-C a partir de hidrolizados de material lignocelulósico.

Una vez implementado el método general de extracción de Ap-C, se determinó la cantidad de Ap-C en los extractos parcialmente purificados (gramos de Ap-C/100 gramos de materia seca) de las muestras seleccionadas. De esta manera se identificará si existe diferencia en la cantidad de Ap-C entre especies mejoradas genéticamente y las criollas adaptadas a la región.

Finalmente se obtuvieron cristales de Ap-C por cromatografía en columna y recristalización a partir de uno de los extractos obtenidos.

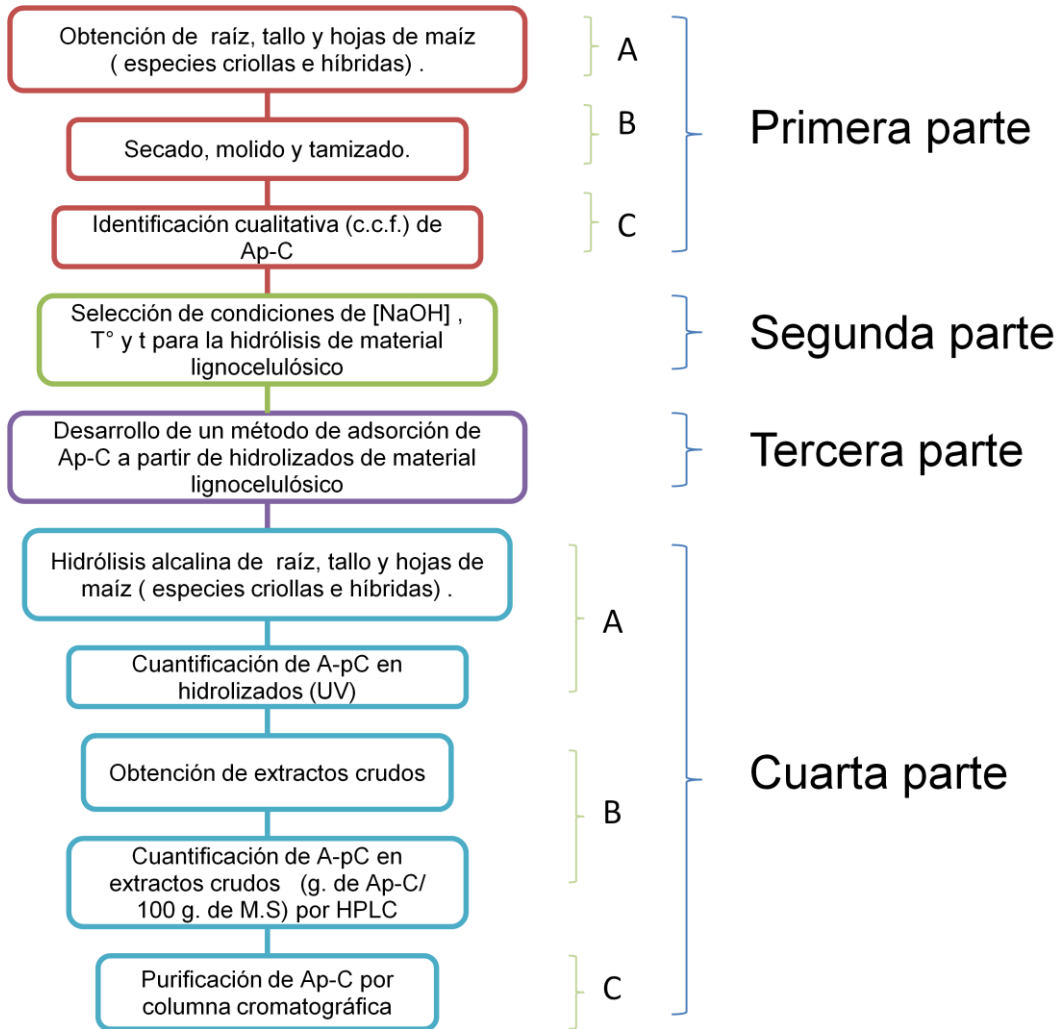


Diagrama 1. Diagrama de flujo general del proyecto

5.1. Primera parte. Obtención de muestras

La recolección de muestras e identificación de Ap-C en distintas variedades de maíz se realizó de la siguiente manera:

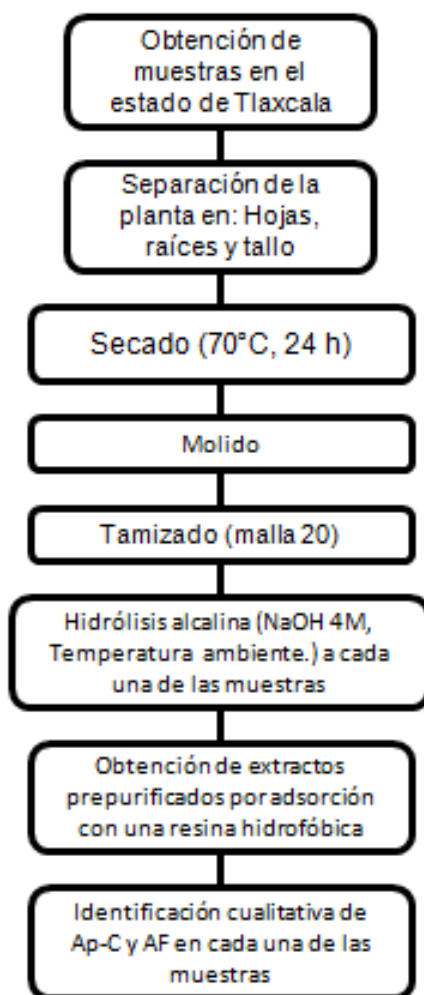


Diagrama 2. Diagrama de flujo de la primera parte del proyecto

5.1.1 Recolección de muestras

Se recolectaron plantas de cuatro diferentes especies de maíz el día 23 de agosto del 2009, en el pueblo de Guadalupe Victoria, Tlaxcala. Las especies recolectadas fueron: tres especies criollas (azul, rojo y blanco) y una especie híbrida (Pioneer 32 OD). Las cuales fueron sembradas durante el mes de febrero del 2009. Se obtuvo la planta entera (desde la raíz) y se dejó secar a temperatura ambiente.

5.1.2. Preparación de muestras

Las plantas se separaron de la siguiente manera: hojas, raíces y tallos; de esta manera se podrá identificar qué partes de la planta del maíz consideradas como desechos se pueden aprovechar para la obtención de Ap-C con base en los rendimientos obtenidos al final de la extracción.

La materia prima se trató de la siguiente manera:

Hojas: una vez separadas del resto de la planta se secaron en un horno a 70°C por 24 h., posteriormente se molieron en una licuadora doméstica; finalmente se tamizó (malla # 20) y almacenó en un recipiente hermético hasta su uso.

Raíz: se lavó con agua corriente con el fin de eliminar restos de tierra, posteriormente se secó a 70° C por 24 h; Después se molió, tamizó y almaceno hasta su uso.

Tallos: se separó el material con alto grado de lignificación (parte exterior) de la celulosa (parte interior), la parte exterior se secó en un horno a 70°C por 24 h. Posteriormente se molió, tamizó y se almacenó hasta su uso.

5.1.3. Identificación cualitativa

Se colocó un gramo de hojas, raíz y tallo de cada una de las cuatro variedades de maíz en matraces Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se agregó 20 mL de NaOH 4M (proporción s/l = 1/20) a cada uno de los matraces; las muestras se sometieron a hidrólisis alcalina a temperatura ambiente y con agitación constante (180 r.p.m.) por 24 horas.

Al terminar la hidrólisis se filtró el bagazo al vacío en un matraz kitasato de 250 mL acondicionado con un embudo Büchner para cada muestra; durante la filtración se lavó el bagazo con agua destilada hasta que el agua de lavado no presentó coloración.

A los hidrolizados (NaOH y agua de lavado) se les agregó gota a gota HCl concentrado hasta llegar a un pH de 3, el cual se determinó utilizando tiras indicadoras de pH; al lograr el pH deseado se transfirieron los hidrolizados a una probeta de 100 mL cada uno, donde se agregó agua destilada hasta la marca de 100 mL.

Para la extracción del Ap-C se transfirieron los hidrolizados a matraces Erlenmeyer de 250 mL y se les agregó 5 gramos de la resina hidrofóbica

“Amberlite XAD7HP” (proporción s/l =1/20) y se sometieron a agitación (180 r.p.m. por 24 horas).

Al terminar la adsorción se filtró la resina al vacío utilizando matraces kitasato de 250 mL y un embudo Büchner.

Se transfirió la resina proveniente de la adsorción de cada una de las muestras a matraces Erlenmeyer de 250 mL, donde se lavó cinco veces con porciones de 100 mL de Acetato de etilo caliente (entre cada lavado se separó el disolvente de la resina por decantación).

Una vez obtenidos los 500 mL de disolvente, se transfirieron a matraces bola con boca esmerilada de 1000 mL y se evaporó el disolvente en rotavapor.

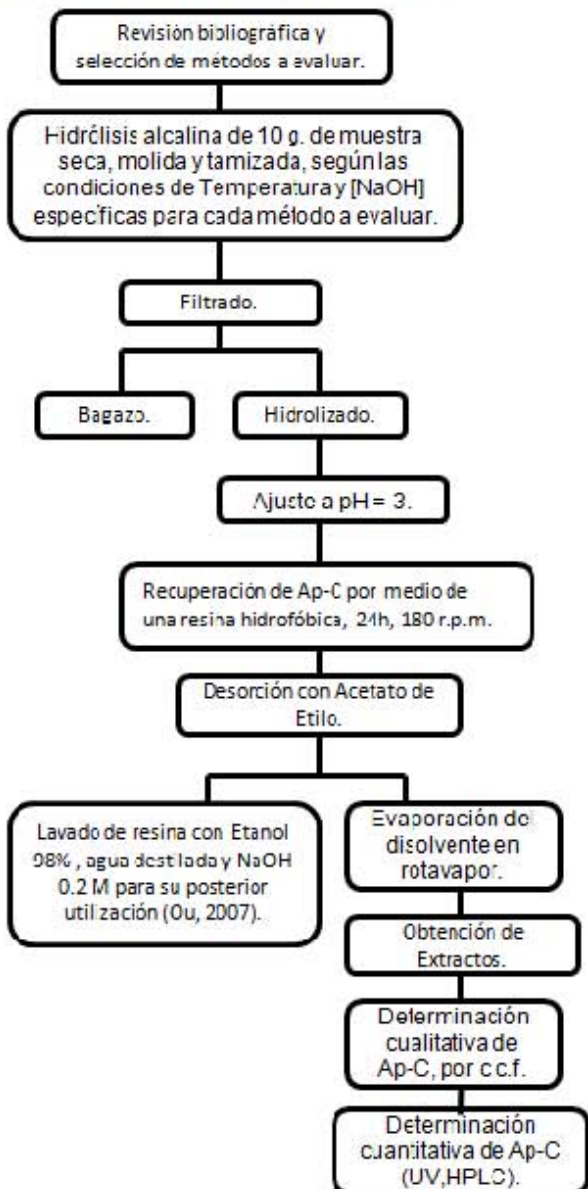
El sólido se recuperó en los matraces disolviendo con 2 mL de acetona, los cuales se almacenaron en viales de 5 mL.

A partir de los extractos contenidos en cada vial se realizó la identificación cualitativa de Ap-C por cromatografía en capa fina (c.c.f.) Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica y como fase móvil una mezcla de Cloroformo/Metano/Ácido Acético (90/9/1) y se reveló utilizando sulfato cérico

5.2. Segunda parte: determinación de las condiciones de hidrólisis

La evaluación del método de hidrólisis para la liberación de Ap-C de material lignocelulósico proveniente del maíz se realizó de la siguiente manera:

Selección de condiciones de Temperatura y [NaOH]



Optimización del tiempo de hidrólisis

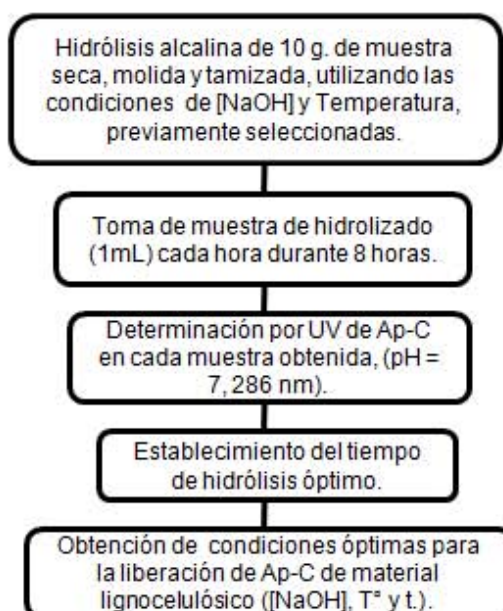


Diagrama 3. Diagrama de la segunda parte del proyecto

5.2.1. Determinación de temperatura y concentración de álcali para la hidrólisis

Se revisaron diferentes procedimientos para la hidrólisis de material lignocelulósico con el fin de obtener ácidos hidroxicinámicos libres; a continuación se muestran las condiciones utilizadas en las publicaciones revisadas:

Referencia	Concentración de NaOH	Proporción M.S./álcali	Temperatura	Tiempo	Agitación	Comentarios
Torre (2008)	2M	1:11	Ambiente	6 h.	No.	Después de 6 h hubo oxidación
Max (2009)	3N	1:10	35°C	24 h.	200 rpm	Se utilizó también KOH y NH ₄ OH
Butstat (2009)	2M	No se especificó	Ambiente	1h.	Sí	Atmósfera de nitrógeno, previa extracción con metanol a 37°C, 150 rpm
Xu (2005)	1M	1:25	40°C	18h.	No	A 35 °C se obtuvieron resultados similares
Mussato (2006)	2M	1:20	120°C	90 min	No	Baño de aceite para calentamiento, pretratamiento ácido
Ou (2005)	0.5 M	1:10	50°C	4 h	160 rpm	NaHSO ₃ para prevenir oxidación.
Goto (1994)	1M	-----	Ambiente	24 h.		-----
Tilay (2008)	0.64, 2.00, 4.00, 6.00 y 7.36 M	1:30	Ambiente, 25, 30, 35 y 58 °C	10, 16, 24, 32, 37 y 44 h.	180 rpm	Uso de sulfito de sodio para evitar oxidación. Mejores resultados con NaOH 4M, 21.6 °C por 24 h.
Fry (1982)	0.1 M		20°C	16h.	No	Atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad, previa hidrólisis enzimática
Al Arni (2007)	0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0M	1:20, 1:33, 1:50 y 1:100	121°C	1 h.	No	Estudio muy amplio de condiciones de hidrólisis, los mejores resultados se obtuvieron en proporción: 1:50 con NaOH 4M

Tabla 6. Revisión de las condiciones de hidrólisis de material lignocelulósico en 10 artículos

A partir de la tabla 6 se generaron cuatro métodos basados en las publicaciones que reportan rendimientos mayores.

La descripción general de los cuatro métodos se presenta en la tabla 7, los cuales se evaluaron por triplicado.

Clave de Muestra	Temperatura	Tiempo	Proporción (sólido/líquido)	Concentración de NaOH
TA2	Ambiente	24 h	1:20	2 M
TA4	Ambiente	24 h	1:20	4M
AU2	121 °C	1 h	1:20	2M
AU4	121 °C	1 h	1:20	4M

Tabla 7. Condiciones de hidrólisis elegidas para ser evaluadas

La muestra utilizada para las hidrólisis fue tallo de maíz blanco criollo; para cada uno de los ensayos se pesó 10 gramos de muestra en un matraz de 250 mL y se sometió a hidrólisis alcalina como se describe en la sección 5.1.3 utilizando las condiciones de temperatura, tiempo de hidrólisis y concentración de NaOH descritas en la tabla 7 según corresponda para cada uno de los cuatro métodos.

Para la recuperación del Ap-C se utilizó la resina hidrofóbica: Amberlite XAD7HP (Tilay, 2008), como se describe en la sección 5.1.3.

El peso de los extractos obtenidos se obtuvo por diferencia de peso del matraz que los contiene.

Determinación cualitativa:

La determinación cualitativa de Ap-C se realizó por medio de cromatografía en capa fina. Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica y como fase móvil una mezcla de Cloroformo/Metanol/Ácido Acético (90/9/1).

Una vez hecha la determinación cualitativa se llevaron a sequedad los viales que contienen los extractos en un desecador con conexión al vacío Finalmente se realizó la determinación cuantitativa para cada extracto por espectrofotometría UV y cuantificación por HPLC

Cuantificación de Ap-C por espectrofotometría UV:

Se realizó una curva patrón utilizando una solución alcohólica (EtOH 98%) de Ap-C. Se pesaron 0.1000 gramos de Ap-C marca Fluka (pureza $\geq 98\%$) en un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con Etanol al 98 % de pureza; de la solución madre obtenida (1g de Ap-C/L) se transfirió con una micropipeta de 100 mL a un matraz aforado de 25 mL la cantidad necesaria para obtener las siguientes soluciones (g de Ap-C/L): 8×10^{-4} , 1.2×10^{-3} , 1.6×10^{-3} , 2×10^{-3} , 2.4×10^{-3} y 2.8×10^{-3} y se llevó al aforo con Etanol al 98%.

Posteriormente se realizó un espectro de absorción utilizando la solución con una concentración de 1.2×10^{-3} g de Ap-C/L en un espectrofotómetro UV-VIS modelo: "GBC Cintra 101", con el fin de determinar la longitud de onda donde se presenta el pico máximo de absorción (310 nm).

Se tomo la lectura de absorbancia de las soluciones de la curva patrón por triplicado a 310 nm. Finalmente se construyó una curva de calibración con las lecturas obtenidas.

Para la lectura de los tratamientos a evaluar se pesaron 0.005 gramos del extracto seco en un matraz aforado de 50 mL, posteriormente se llevó al aforo con Etanol 98%, se tomó 1 mL de esta solución y se transfirió a otro matraz aforado de 50

mL, el cual se aforó con Etanol 98%, de esta solución se realizaron las lecturas espectrofotométricas a 310 nm por triplicado y se obtuvo la concentración interpolando en la curva patrón.

Cuantificación de Ap-C por HPLC:

Se inyectaron muestras de Ap-C y AF para construir una curva patrón; para esto se utilizó un estándar marca Fluka de Ap-C con una pureza $\geq 98\%$ y un estándar de AF obtenido en el laboratorio 321 del Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM.

Se pesaron 0.0500 gramos del estándar de Ap-C en un matraz aforado de 10 mL y se llevó al aforo con metanol grado HPLC para obtener una solución madre de 5 mg/mL. Posteriormente se pesó 0.0100 gramos del estándar de AF en un matraz aforado de 5 mL y después se llevó al aforo con metanol grado HPLC, de esta manera se obtuvo una solución madre de 2 mg/mL. Con una micropipeta de 100 o 1000 microlitros según sea el caso, se tomó la cantidad necesaria de cada solución madre y se llevó al aforo en un tubo aforado de 1 mL con metanol grado HPLC para obtener las siguientes soluciones:

- AF (mg/mL): 0.05, 0.10, 0.25, 0.40, 0.50 y 0.60
- Ap-C (mg/mL): 0.10, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 y 2.00

Finalmente se inyectó cada solución en el equipo, se registraron los tiempos de retención para cada compuesto y las áreas correspondientes para cada

concentración; de esta manera se construyó una curva patrón para AF y otra para Ap-C.

Condiciones utilizadas para la cuantificación por HPLC:

- Equipo: Waters 1525, Binary HPLC pump, Waters 2707 Autosampler y Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector.
- Columna: Symmetry, C18, 5 μ m, 3.9 x 150 mm, Temperatura ambiente.
- Fase A: Ácido acético 1%.
- Fase B: Metanol.
- Tiempo de corrida 23 minutos.
- Detector: UV, 280 nm.
- Tipo de elución: en gradiente, como se muestra en la tabla 8.

Tiempo	Flujo	Ácido acético	MeOH
0	0.9	90	10
5	0.9	85	15
10	0.9	80	20
12.5	0.9	75	25
15	0.9	70	30
20	0.9	70	30
21	0.9	85	15
23	0.9	90	10

Tabla 8. Fase móvil en gradiente utilizada para la separación e identificación de Ap-C y AF

Para la lectura de los tratamientos; se pesaron 0.001 gramos de cada extracto en tubos aforados de 1 mL, posteriormente se llevaron al aforo con Metanol “grado HPLC”, las soluciones resultantes se transfirieron a viales nuevos de 4 mL, para la finalizar con la inyección de las muestras en el equipo.

Se obtuvo la concentración de AF y Ap-C en las muestras problema interpolando en la curva patrón correspondiente.

5.2.2. Optimización del tiempo de hidrólisis

Una vez seleccionadas las condiciones de hidrólisis, se repitió el procedimiento utilizando una muestra de tallo de maíz blanco criollo como, se describe en la sección 5.1.3 utilizando las siguientes condiciones:

- Cantidad de muestra: 10 g de materia seca
- Concentración de NaOH: 2M
- Temperatura de Hidrólisis: ambiente
- Proporción (material lignocelulósico/álcali): 1:20
- Tiempo de hidrólisis: 24 horas.

Se midió espectrofotométricamente la cantidad de Ap-C liberado cada hora durante las ocho primeras horas directo del hidrolizado.

Para la construcción de la curva patrón se pesó 0.0540 gramos de un estándar de Ap-C marca fluka con una pureza $\geq 98\%$ en un matraz aforado de 100 mL, se llevó al aforo con agua destilada, se tomó un mL de esta solución y se aforó nuevamente a 100 mL, para obtener una solución de 5.4×10^{-3} g/L. de Ap-C; de esta solución se tomó la cantidad necesaria con una pipeta volumétrica y se transfirió a un matraz de 25 mL conteniendo 5 mL de buffer de fosfatos para obtener soluciones con las siguientes concentraciones (g/L): 1.6×10^{-3} , 1.4×10^{-3} , 1.296×10^{-3} , 1.08×10^{-3} , 8.64×10^{-4} , 6.48×10^{-4} , 4.32×10^{-4} y 2.16×10^{-4} y finalmente

se llevó al aforo con agua destilada. Se llevó a cabo la lectura espectrofotométrica en un espectrofotómetro UV-VIS "GBC Cintra 101" y se construyó la curva patrón.

Para la lectura espectrofotométrica de la muestra se detuvo la agitación del matraz, después se tomó una muestra de 1 mL con una pipeta volumétrica y se aforó a 100 mL con agua destilada, se tomó 1 mL de esta solución y se transfirió a un matraz de 25 mL, al cual se le agregó 5 mL de buffer de fosfatos a $\text{pH} = 7$, finalmente se llevó al aforo con agua destilada y se tomó la lectura de absorbancia a 286 nm. Una vez terminada la lectura se continuó la agitación del matraz hasta la siguiente lectura.

La concentración de las muestras problema se obtuvieron interpolando en la curva patrón.

5.3. Tercera parte: Determinación del método de extracción de Ap-C

La evaluación del método de adsorción de Ap-C a partir de los hidrolizados de material lignocelulósico proveniente de la planta de maíz se realizó de la siguiente manera:

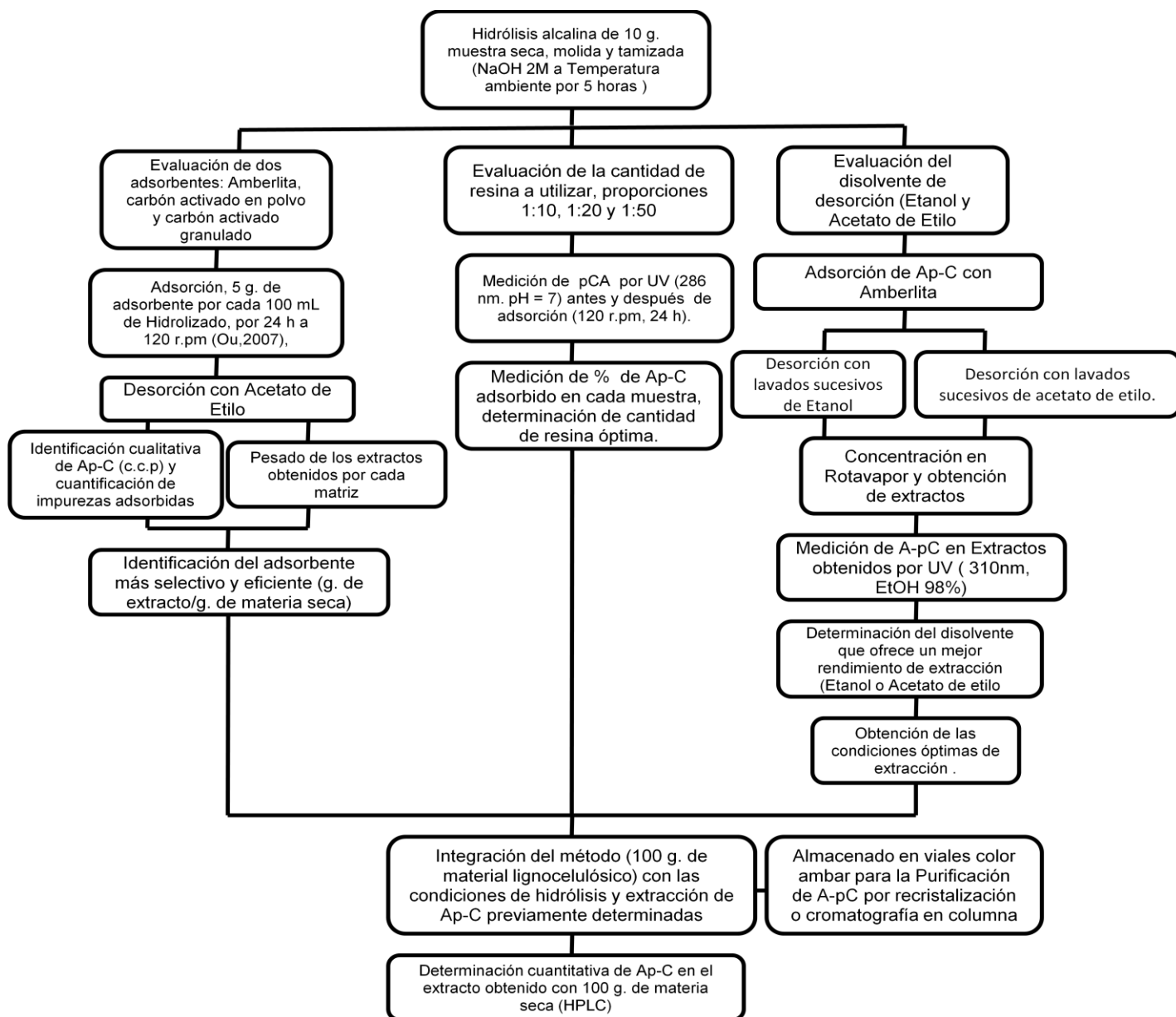


Diagrama 4. Diagrama de flujo de la tercera parte del proyecto

5.3.1. Determinación del método de extracción de Ap-C

Se evaluaron distintas condiciones para la recuperación de Ap-C a partir de los hidrolizados obtenidos mediante el método desarrollado en la segunda parte del trabajo, tales como son: la matriz en la que se adsorberá el compuesto, la proporción de dicha matriz y el disolvente adecuado para la desorción de Ap-C.

5.3.1.1. Adsorción

Selección del adsorbente:

Adicionalmente de resinas hidrofóbicas, la literatura sugiere la utilización de carbón activado para la adsorción de ácidos hidroxicinámicos ⁶ por lo que se comparó la efectividad de la resina hidrofóbica utilizada hasta esta etapa del proyecto con carbón activado en polvo y granulado.

Se colocaron 10 gramos de una muestra de tallo de maíz blanco criollo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se realizó una hidrólisis alcalina como se describe en la sección 5.1 por triplicado y utilizando las siguientes condiciones:

- Concentración de NaOH: 2M
- Temperatura de Hidrólisis: ambiente
- Proporción (material lignocelulósico/álcali): 1:20
- Tiempo de hidrólisis: 5 horas

Posteriormente se llevó a cabo la adsorción de Ap-C; se pesaron 5 gramos de la resina hidrofóbica, carbón activado en polvo y carbón activado granulado en

matraces de 250 mL y se realizó la extracción de Ap-C con cada uno de los materiales como se describe en la sección 5.1.3.

Se calculó la cantidad de extracto obtenida por diferencia de peso del matraz que lo contenía y se identificó por c.c.p la cantidad de impurezas presentes en el extracto tal como se hizo en la sección 5.1.3.

Evaluación del pH de adsorción:

Se determinó la cantidad adsorbida en dos diferentes condiciones de extracción: pH alcalino (pH =12, pH original del hidrolizado) y pH ácido (pH=3).

Se utilizó una muestra de 10 gramos de tallo de maíz criollo blanco para realizar una hidrólisis alcalina como se describe en la sección 5.1.3 aplicando las condiciones especificadas al principio de esta sección.

Para la extracción se utilizó la resina hidrofóbica Amberlite XAD7HP, en una proporción sólido/líquido de 1:10 (resina/hidrolizado) de la misma manera como se describe en la sección 5.1.3.

Se midió la cantidad extraída de Ap-C espectrofotométricamente (286 nm, pH = 7), directamente de los hidrolizados, como se describe en la sección 5.2.1 antes y después de la extracción con la resina.

La cantidad de Ap-C presente en los hidrolizados, se calculó por medio del método de la curva patrón (std. Ap-C 99%, Marca Fluka).

Determinación de la proporción (Adsorbente: Hidrolizado) para la extracción:

Se realizó una hidrólisis alcalina de 10 gramos de maíz blanco criollo por triplicado como se describe en la sección 5.1.3, utilizando las condiciones utilizadas durante la selección del adsorbente, al principio de esta sección

La extracción se llevó a cabo como se describe en la sección 5.1.3 utilizando tres diferentes proporciones de Amberlite XAD7HP/hidrolizado para la extracción de Ap-C. Las proporciones a evaluar fueron las siguientes: 1:10, 1:20 y 1:50 (gramos de resina: mL de Hidrolizado).

Se detectó la cantidad de Ap-C presente en los hidrolizados antes y después de la adsorción con la resina por medio de espectrofotometría UV (pH = 7, 280 nm), como se describe en la sección 5.2.1.

5.3.1.2. Desorción

Se determinó el disolvente óptimo para la desorción de la resina; los disolventes evaluados fueron el Etanol y el Acetato de etilo, los dos disolventes en los cuales es muy soluble el Ap-C (O'Neil, 2001).

Se realizó una hidrólisis alcalina como se describe en la sección 5.1.3 por duplicado y utilizando las condiciones especificadas en la sección 5.2.3.1.

La extracción se llevó a cabo de la misma manera como se hizo en la sección 5.1.3 y la desorción se realizó mediante cinco lavados sucesivos de 100 mL de etanol y acetato de etilo según corresponda a cada tratamiento.

Posteriormente se concentró el extracto obtenido en rotavapor, se hizo una identificación cualitativa por cromatografía en capa fina (sección 5.1.3.) y finalmente se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad recuperada por cada disolvente como se describe en la sección 5.2.1. La pureza de los extractos se obtuvo por el método de la curva patrón.

5.3.2. Integración del método

Se unificó y escaló el método seleccionado (hidrólisis y extracción) a 100 gramos de muestra.

En un vaso de precipitados de 1 L se pesaron 100 gramos de una muestra de tallo de maíz blanco criollo, después se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 5 L, se realizó una hidrólisis alcalina y una extracción de Ap-C como se describe en la sección 5.1.3., utilizando las condiciones seleccionadas a lo largo del estudio, las cuales son:

- Concentración de NaOH: 2M
- Temperatura de Hidrólisis: ambiente
- Proporción (material lignocelulósico/álcali): 1:20
- Tiempo de hidrólisis: 5 horas

Para la extracción del Ap-C, las siguientes condiciones:

- Matriz adsorbente: Amberlita XAD7HP
- Proporción (Adsorbente/hidrolizado): 1:10

- pH de adsorción: 3
- Disolvente de extracción: Acetato de Etilo

Una vez obtenido el extracto prepurificado, se determinó por medio de HPLC la cantidad de AF y Ap-C recuperada a partir de 100 gramos de materia seca y la cantidad de AF y Ap-C contenida en el extracto prepurificado.

La cuantificación por medio de HPLC se realizó utilizando el método descrito en la en la sección 5.2.1.

5.4. Cuarta parte: obtención de Ap-C a partir de desechos de cuatro variedades de maíz

En esta etapa se realizó la cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados provenientes de la hidrólisis de material lignocelulósico de diferentes variedades de maíz y se desarrolló un método de purificación de Ap-C a partir de extractos prepurificados:

Cuantificación de Ap-C en las 4 variedades seleccionadas de maíz

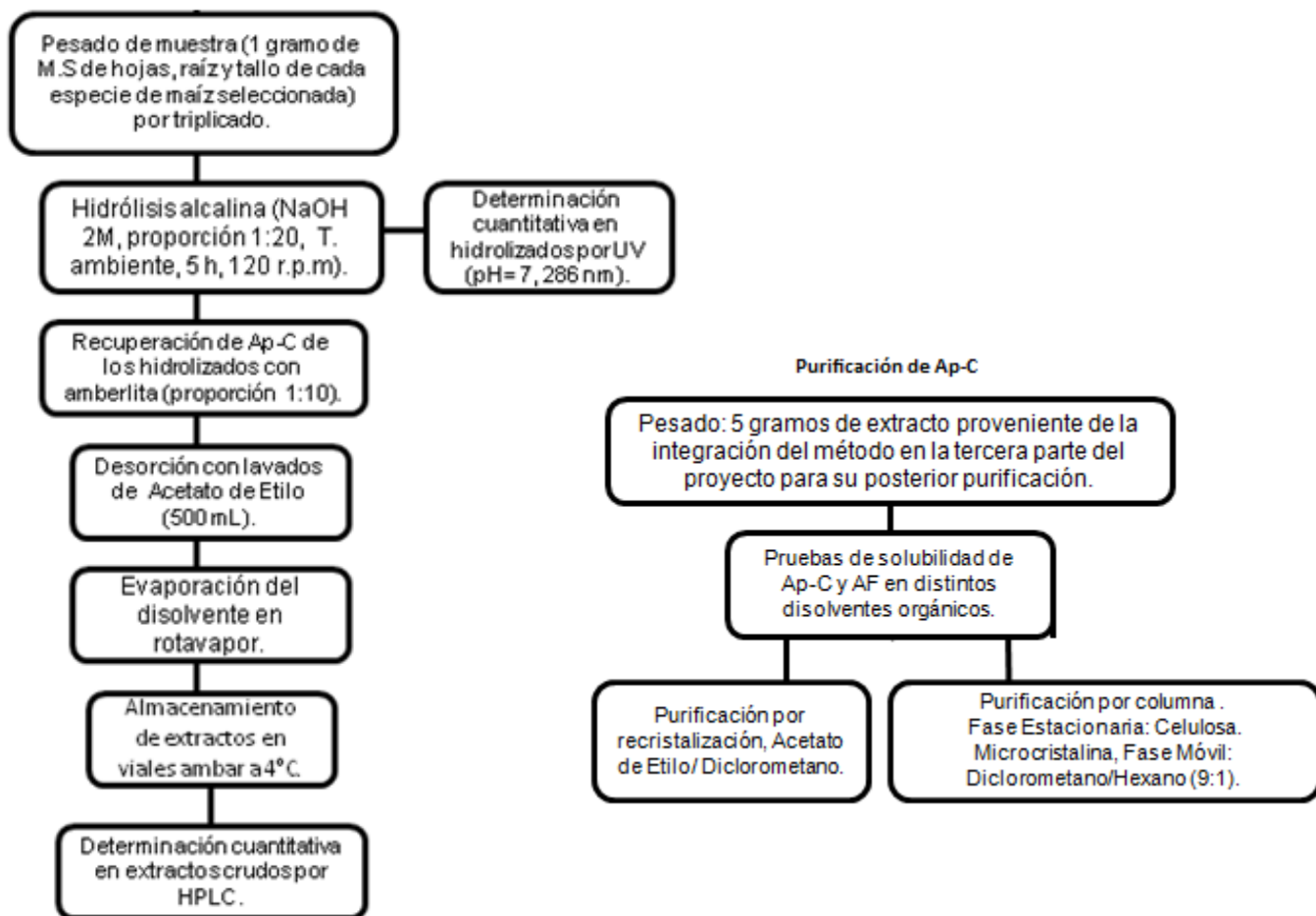


Diagrama 5. Diagrama de flujo de la cuarta parte del proyecto

5.4.1. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados de cuatro muestras de maíz

Se evaluaron cuatro especies de maíz, obtenidas en el pueblo de Guadalupe Victoria, Tlaxcala, en el mes de agosto del 2009. Las tres diferentes especies son: maíz criollo azul, maíz criollo rojo, maíz criollo blanco y maíz híbrido blanco.

Se realizó una hidrólisis alcalina de dos gramos de raíz, tallo y hojas de las cuatro especies diferentes en matraces de 250 mL como se especifica en la sección 5.1.3., y utilizando las condiciones descritas en la sección 5.2.4.

Una vez finalizada la hidrólisis de material lignocelulósico por medio del método seleccionado en la segunda parte del proyecto; se cuantificó la cantidad de Ap-C en los hidrolizados por medio de espectrofotometría UV.

Posteriormente se extrajo el Ap-C a partir de los hidrolizados como se describe en la sección 5.1.3., y utilizando las condiciones descritas en la sección 5.2.4, finalmente se cuantificó por medio de HPLC la cantidad de Ap-C presente en los extractos prepurificados.

5.4.1.1. Cuantificación de Ap-C en hidrolizados por espectrofotometría UV

Como se describe en la sección 5.2.2 se realizó una curva patrón de Ap-C y se determinó la cantidad de Ap-C en los hidrolizados de hojas, raíz y tallo de cuatro variedades de maíz diferente: maíz criollo azul, maíz criollo rojo, maíz criollo blanco y maíz híbrido blanco. La cantidad de Ap-C presente en los hidrolizados se calculó por medio del método de la curva patrón.

5.4.1.2. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados por HPLC

Se pesaron 0.002 gramos de cada extracto en un tubo aforado de 1 mL y se aforó con Metanol “grado HPLC”, posteriormente se transfirió la solución a viales nuevos de 4 mL para finalizar con la inyección de la muestra en el equipo utilizando las condiciones especificadas en la sección 5.2.1.

Se construyó una curva patrón como se describe en la sección 5.2.1.

La concentración de las muestras analizadas se obtuvo por medio de la interpolación en la curva patrón.

5.4.2. Purificación de Ap-C

Se aplicaron dos métodos de purificación de los extractos: recristalización y purificación por columna cromatográfica.

5.4.2.1. Recristalización

Se tomó una porción pequeña con la punta de una espátula de los estándares de Ap-C y AF utilizados en el presente estudio y se transfirieron a siete diferentes tubos de ensayo a los cuales se les agregó 3 mL de los siguientes disolventes respectivamente: Acetato de etilo, Acetona, Agua, Diclorometano, Etanol, Éter de petróleo, Hexano y Metanol.

Se realizaron pruebas de solubilidad en caliente (hasta llegar al punto de ebullición de cada disolvente) y en frío (temperatura ambiente).

Posteriormente se realizó una recristalización con base en los resultados obtenidos de las pruebas de solubilidad, utilizando un extracto parcialmente purificado obtenido en la integración del método (sección 5.2.4).

Se pesó 0.0360 g. de extracto prepurificado en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se agregó acetona hasta la completa disolución del extracto y posteriormente se agregó diclorometano gota a gota hasta obtener cristales color blanco.

Finalmente se realizó una cromatografía en capa fina como se describe en la sección 5.1.3.

5.4.2.2. Cromatografía en columna

Se purificó por cromatografía en columna 5 g. del extracto obtenido mediante el escalamiento a 100 g. de muestra.

Fase estacionaria: se utilizó celulosa microcristalina.

Fase móvil: se realizaron c.c.f. de la muestra a purificar en placas de celulosa, probándose diferentes mezclas de elución hasta encontrar la que ofreció una mejor separación de los compuestos presentes en la muestra; en este caso fue la mezcla de Diclorometano/Hexano (9:1).

Separación de compuestos:

Se empacó una columna de 5 cm de ancho por 50 cm de largo. Se agregó poco a poco la celulosa (100 g. de celulosa por cada 5 g. de muestra) a la columna, una vez agregada toda la fase estacionaria se dejó eluir libremente la fase móvil hasta que la columna de celulosa presentó una estructura homogénea (sin fisuras o burbujas).

En un vaso de precipitados de 100 mL se mezclaron 5g de celulosa microcristalina con 5 g. de la muestra a purificar, posteriormente se transfirió la mezcla a la parte superior de la columna de celulosa.

Se eluyó la columna con la fase móvil recolectando fracciones de 200 mL cada una y se determinó por c.c.f. las porciones que contenían mayor cantidad Ap-C.

Las fracciones que presentan mayor contenido del compuesto en estudio se juntaron en un matraz bola de 500 mL y se eliminó el disolvente en rotavapor.

6. Resultados y Discusión

Aplicando la metodología desarrollada se obtuvieron extractos ricos en Ap-C a partir de hidrolizados provenientes del tallo, hojas y raíz de cuatro distintas variedades de maíz y se cuantificó el Ap-C y AF presente en dichas muestras. Finalmente se obtuvieron cristales de Ap-C a partir de un extracto prepurificado proveniente de la hidrólisis de tallo de maíz blanco criollo.

En esta sección se exponen las razones del por qué se seleccionaron cada una de las condiciones de hidrólisis y extracción de Ap-C, la efectividad del método espectrofotométrico para cuantificar Ap-C en hidrolizados y extractos prepurificados, el análisis de la cantidad de Ap-C obtenida en cada estructura de la planta de maíz, Las variedades que son más viables para la obtención de Ap-C (híbrida o criollas) y el método de purificación que ofrece un mejor rendimiento.

6.1. Primera parte. Obtención de muestras

En la primera etapa se obtuvieron y prepararon las muestras para su uso durante el estudio y se confirmó la presencia de Ap-C y AF en hojas, raíz y tallo de las variedades seleccionadas.

6.1.1. Recolección de muestras

Se recolectaron tres variedades criollas (azul, rojo y blanco) y una variedad híbrida (pioneer 32 OD) de maíz; se obtuvo la planta entera (desde la raíz) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las plantas pertenecientes a las variedades de maíz criollo rojo, maíz criollo azul y maíz híbrido tienen tamaños que varían entre los dos y dos metros y medio,

mientras que las plantas de la variedad criolla blanca miden hasta tres metros de alto.

Las variedades seleccionadas son las más utilizadas en México para el consumo humano directo o para la preparación de platillos típicos y por lo tanto las que producen mayor cantidad de desechos en el campo (Figura 13).



Figura 13. Recolección de muestras en el estado de Tlaxcala

En México se siembran diversas variedades híbridas, sin embargo, la mayoría se han desarrollado para soportar situaciones adversas (climatológicas, plagas y enfermedades) por lo que generalmente presentan estructuras más rígidas.

Según el productor de la especie híbrida, las fortalezas que ofrece dicha especie sobre otras especies sembradas en la región son: buenos tallos y raíces, y una tolerancia superior a enfermedades foliares.

Dado que el Ap-C forma parte de la lignina, la cual está directamente relacionada con la rigidez de las estructuras en las que está presente, es de esperarse encontrar una cantidad mayor del compuesto en la especie híbrida que en algunas o todas las especies criollas analizadas.

6.1.2. Preparación de muestras

Las plantas se separaron de la siguiente manera: hojas, raíces, tallos y mazorcas.

Las muestras de hojas presentan un color verde, el cual es constante entre las cuatro variedades, las muestras presentan un olor dulce y a hierba.

Las muestras de tallo una vez secas y molidas varían entre un polvo café oscuro para las variedades roja y azul hasta beige claro para el caso del maíz criollo blanco y el maíz híbrido; el olor de las muestras es dulce.

Las muestras de raíz una vez secas y molidas tienen una apariencia de polvo color café oscuro para todas las variedades. Se percibe un olor a humedad y a hierba en las muestras.

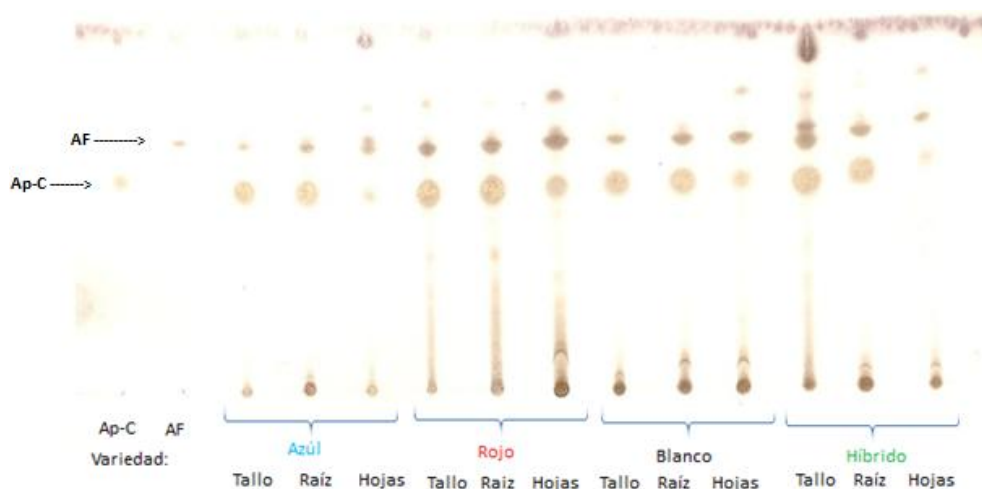
Las características físicas de las muestras al final del tratamiento al que fueron sometidas son aceptables y características de la planta de maíz.

El olor a humedad en las muestras de raíz puede sugerir la presencia de hongos, sin embargo se inspeccionaron visualmente las muestras antes y después de ser molidas y no presentaron signos de contaminación, por lo que el olor a humedad era el característico de la estructura.

6.1.3. Identificación cualitativa

Se realizó la identificación de Ap-C por medio de c.c.f. en extractos prepurificados obtenidos a partir de las muestras de hojas, tallo y raíz de maíz blanco criollo, maíz rojo criollo, maíz azul criollo y maíz híbrido blanco.

En la placa 1 se observa en este orden lo siguiente: std Ap-C, Std AF, tallo de maíz azul, raíz de maíz azul, hojas de de maíz azul, tallo de maíz rojo, raíz de maíz rojo, hojas de de maíz rojo, tallo de maíz criollo blanco, raíz de maíz criollo blanco, hojas de maíz criollo blanco, tallo de maíz blanco híbrido, raíz de maíz blanco híbrido, hojas de maíz blanco híbrido.



Placa 1. Identificación cualitativa de las cuatro especies de maíz evaluadas (hojas raíz y tallo), de izquierda a derecha: std Ap-C, std AF, tallo, raíz y hojas de maíz azul, tallo, raíz y hojas de maíz rojo, tallo, raíz y hojas de maíz blanco y tallo, raíz y hojas de maíz híbrido

En todas las muestras se observa la presencia de Ap-C y AF, en el caso de las muestras de tallo, raíz y hojas de la variedad azul se observa una menor cantidad de impurezas en comparación de las otras muestras.

En la mayoría de las muestras la señal correspondiente al Ap-C es más intensa que la de AF, es decir se tiene una mayor cantidad de Ap-C que de AF. En las muestras provenientes de las hojas, la diferencia no es evidente.

Para la adsorción con la resina se llevaron los hidrolizados a pH 3, esto último con el fin de que el Ap-C liberado se encuentre en su forma protonada y sea capaz de

ser adsorbida por la matriz hidrofóbica que se utilizó para la obtención de extractos ricos en Ap-C.

Algunas muestras presentan impurezas no identificadas: las tres muestras de maíz rojo presentan mayor cantidad de sustancias no identificadas formando parte de los extractos, probablemente se deba a compuestos responsables del color (carriles 6-9 de la placa 1).

La muestra con mayor cantidad de impurezas es la de tallo de la especie híbrida (carriles 12 -15 de la placa 1), probablemente se deba a compuestos provenientes de la degradación de la lignina, esta especie fue desarrollada con el fin de tener una mayor resistencia al medio, probablemente la proporción de algunos componentes fenólicos de la lignina fueron alterados y como consecuencia liberados por la hidrólisis alcalina y adsorbidos por la resina.

Todas las muestras de hoja presentan una impureza que se encuentra en un Rf por arriba del AF, es decir más polares, por lo tanto es un compuesto común en las hojas de maíz. Las especies con menor cantidad de impurezas, a parte del AF, son las especies de maíz criollo azul (carriles 3-5 de la placa 1) y blanco (carriles 9-11 de la placa 1).

Las impurezas son compuestos con propiedades o estructura similar al Ap-C, puesto que la obtención de los extractos fue selectiva, por lo que podrían complicar una fase posterior de purificación de Ap-C.

6.2. Segunda parte. Determinación de las condiciones de hidrólisis

En la segunda etapa se determinaron las condiciones de tiempo, temperatura y concentración de hidróxido de sodio (NaOH) mediante las cuales se obtuvo una mayor cantidad de Ap-C a partir de material lignocelulósico (maíz criollo blanco).

En esta sección se analizan las causas de la selección de las condiciones de hidrólisis y se comparan los datos obtenidos durante la cuantificación de Ap-C en hidrolizados por medio de un método espectrofotométrico y en los extractos prepurificados por medio de HPLC.

6.2.1. Determinación de temperatura y concentración de álcali para la hidrólisis

Para la liberación del Ap-C se optó por la saponificación del éster del ácido *p*-cumárico presente en la planta, utilizando NaOH, puesto que el método enzimático libera únicamente ácidos hidroxicinámicos esterificados a sacáridos (pectinas y hemicelulosas).

Se evaluaron cuatro métodos generados a partir de una revisión bibliográfica (descritos en la tabla 7), dos se realizaron a temperatura ambiente, como lo sugieren: Goto (1994), Torre (2008), Tilay (2008) y Butstat (2009) los dos restantes a 121 °C, como lo hizo Arni (2007), esto con el fin de evaluar los efectos de la temperatura sobre la estabilidad del Ap-C.

La otra variable a evaluar fue la concentración de NaOH; se utilizó NaOH 2M en dos de los cuatro métodos generados (Tabla 7) como lo sugieren cuatro artículos

de los diez revisados en la tabla 6 (Mussato (2006), Tilay (2008) Torre (2008) y Butstat (2009)) y en los dos restantes se utilizó NaOH 4M como lo hicieron Arni¹⁰ en el 2007 y Tilay en el 2008; esto con el fin de evaluar el efecto de la concentración de NaOH sobre la liberación del Ap-C, así como la estabilidad del compuesto frente a altas concentraciones de NaOH.

Se obtuvieron extractos prepurificados ricos en Ap-C por cada uno de los cuatro diferentes métodos de hidrólisis a evaluar, por medio de la adsorción en una resina hidrofóbica.

Determinación cualitativa:

La determinación cualitativa se realizó por medio de cromatografía en capa fina, los resultados se muestran en la placa 2.



Placa 2. Extractos obtenidos mediante los cuatro métodos evaluados

(De izquierda a derecha: estándar de AF, estándar de Ap-C, Tratamiento a 121°C y NaOH 4 M, Tratamiento a temperatura ambiente y NaOH 2M, Tratamiento a 121°C y NaOH 4M, Tratamiento a temperatura ambiente y NaOH y NaOH 4M).

En la placa 2 se observa que en cada uno de los extractos obtenidos por los cuatro métodos hay presencia de Ap-C y AF.

Todos los métodos son capaces de liberar Ap-C del material lignocelulósico y como consecuencia de la similitud de sus propiedades con el AF, éste último también es liberado por cada uno de los métodos, sin embargo la señal perteneciente al AF es menos intensa que la de Ap-C, lo cual indica que se ha liberado una mayor cantidad de Ap-C.

Determinación cuantitativa:

Se determinó la cantidad (g.) de extracto prepurificado obtenido por cada método, así como la cantidad de Ap-C obtenida por 100 gramos de materia seca por medio de espectrofotometría UV y la cantidades de Ap-C y AF obtenidas por 100 gramos de materia seca por medio de HPLC.

Clave de muestra	g. de extracto/100g. Materia seca
TA2	4.719±0.1395
AU2	4.598±0.8896
TA4	4.704±0.1958
AU4	6.231±1.0635

Tabla 9. Cantidad de extracto prepurificado obtenida a partir de 100 g. de maíz blanco criollo, seco y molido en cada uno de los cuatro métodos de hidrólisis evaluados

En la tabla 9 no se aprecia gran diferencia entre los métodos evaluados, con excepción del método realizado a 121°C con NaOH 4M (AU4), mediante el cual se obtuvo un rendimiento mayor (30% más que el promedio de los tres métodos restantes).

Lo anterior nos indica que el grado de degradación de lignina, y por lo tanto de liberación de compuestos polifenólicos fue mayor en dichas condiciones.

Según Salameh (2008), debido a la corta duración del tratamiento a 121°C (1h.), es probable que el Ap-C liberado no haya sufrido un daño considerable debido a la temperatura. En dicho trabajo se realizó una prueba de termorresistencia del Ap-C, mostrándonos que a 75°C, sólo es posible observar un decremento en la concentración de Ap-C después de cinco horas de tratamiento y comenzando a ser considerable a partir de las 15 horas.

Cuantificación de Ap-C por espectrofotometría UV:

La tabla 10 muestra la cantidad de Ap-C recuperada (en los extractos) por 100 gramos de materia seca utilizada, determinada espectrofotométricamente:

Clave de muestra	g. de AC/ 100 g de materia seca (UV)
TA2	3.0288±0.2229
AU2	1.9756±0.2345
TA4	3.6444±1.3354
AU4	3.9851±0.623

Tabla 10. Cantidad de Ap-C obtenida en los extractos prepurificados a partir de 100 g. de maíz blanco criollo, seco y molido (UV)

Es sabido que los ácidos hidroxicinámicos pueden ser detectados espectrofotométricamente en la región del UV, debido al efecto de resonancia de su anillo fenólico y los dobles enlaces que presenta su estructura (Salameh, 2008).

Se realizó la cuantificación de Ap-C por espectrofotometría UV de manera conjunta con la determinación con HPLC.

Se puede observar en la lectura hecha por espectrofotometría UV (Tabla 10), que la cantidad de Ap-C determinada por este método es mayor a la determinada por HPLC (Tabla 11) en todos los tratamientos. Lo anterior nos indica que en la determinación por espectrofotometría UV se sobrevaloró la cantidad de Ap-C, puesto que tanto el AF como el Ap-C absorben en una longitud de onda muy cercana; esto se hace evidente si tomamos en cuenta que los datos del método AU4 mostrados en la tabla 9 (UV: 3.9851 g. Ap-C/ 100 g. M.S) son los más altos; sin embargo, los mismos datos mediante la cuantificación por HPLC (Tabla 11) son de los más bajos (1.5570 g. Ap-C/ 100 g. M.S), siendo que los datos de AF (Tabla 11) en el método AU4 son los mayores (HPLC: 0.5697 g. AF/ 100 g. M.S), por lo que se concluye que la gran cantidad de AF presente en la muestra hizo que durante la cuantificación por UV pareciera que la muestra AU4 era la que contenía una mayor cantidad de Ap-C

Al observar los resultados de Ap-C por 100 gramos de materia seca obtenidos por ambos métodos (Tablas 10 y 11), se hace notar que la cantidad estimada de Ap-C en los extractos analizados se sobreestimó, en parte debido a la presencia de AF; sin embargo, la sumatoria de AF y Ap-C determinados por HPLC no da como resultado el total de la cantidad de Ap-C determinada por espectrofotometría UV, este sobrante que va del 15 al 30 %, dependiendo del tratamiento, podría deberse a la presencia de otros compuestos polifenólicos presentes en la muestra en menor cantidad, provenientes de la degradación de la lignina.

Cuantificación de Ap-C por HPLC:

La tabla 11 muestra la cantidad de Ap-C y AF recuperados (en los extractos) por 100 gramos de materia seca utilizada, ambos determinados por medio de HPLC:

Clave de muestra	g de AC/ 100 g de materia seca (HPLC)	g de AF/100 g de materia seca (HPLC)
TA2	1.8996±0.2837	0.4562±0.0764
AU2	1.3762±0.1999	0.3397±0.0222
TA4	1.9013±0.7301	0.5005±0.1544
AU4	1.5570±0.7355	0.5697±0.1624

Tabla 11. Cantidad de Ap-C y AF obtenida por 100 gramos de materia (HPLC).

Los tiempos de retención obtenidos al inyectar soluciones estándar de Ap-C y AF son: Ap-C: 17 minutos, AF: 19 minutos.

En el Anexo del presente trabajo se muestran algunos cromatogramas de la lectura de estándares y muestras con el fin de ejemplificar los resultados obtenidos por HPLC durante el estudio.

Los valores obtenidos en HPLC (Tabla 11) muestran que el método mediante el cual se pudo obtener una menor cantidad de Ap-C fue el realizado a 121°C con NaOH 2M (AU2), por lo tanto es probable que si haya sufrido cierta degradación el Ap-C liberado, ya que si lo comparamos con su contraparte a temperatura ambiente (TA2), se encuentra arriba por más de medio gramo (18 % más).

De la misma manera, en los ensayos realizados con NaOH 4M, la temperatura también afectó considerablemente a la cantidad de Ap-C liberada, obteniéndose una mayor cantidad en el método realizado a temperatura ambiente (TA4).

En teoría si aumentamos la concentración de álcali, la cantidad de Ap-C liberada debería ser mayor, sin embargo, si comparamos los métodos tratados a temperatura ambiente pero con diferente concentración de NaOH (TA2 y TA4), la diferencia entre ambos métodos es mínima, de la misma manera la diferencia entre los métodos tratados a 121°C (AU2 y AU4), a pesar de ser más evidente, también es poco relevante. Una posible causa es que la concentración 2M de NaOH, sea suficiente para liberar la mayor cantidad de Ap-C posible o que el exceso de la base está causando la oxidación del Ap-C, lo cual explicaría que a pesar de obtener una mayor cantidad de extracto prepurificado mediante el método AU4 (Tabla 9), la cantidad de Ap-C liberada no es mayor en una misma proporción a los otros tres métodos.

Según Arni (2007) y Tilay (2008), la concentración de NaOH en la cual se logra extraer la mayor cantidad de AF a partir de bagazo de caña de azúcar es 4M, a 121°C y a temperatura ambiente respectivamente, los resultados mostrados en la tabla 11 de AF liberado por gramo de materia seca indican que en los métodos en los cuales se utilizó NaOH 4M (AU4 y TA4) se logró liberar una mayor cantidad de AF con respecto a los métodos en los que se utilizó NaOH 2M (TA2 y AU2) tal como lo sugieren los autores previamente citados; sin embargo los datos para Ap-C mostrados en la misma tabla no siguen el mismo patrón, siendo prácticamente igual la cantidad liberada entre los métodos realizados a temperatura ambiente (TA2 y TA4) y en el caso de las metodologías realizadas a 121°C, se obtuvo una mayor de Ap-C utilizando NaOH 2M.

Lo cual nos indica que el Ap-C puede ser más susceptible que el AF a la oxidación por un exceso de álcali.

En el presente estudio; en los métodos en los cuales se utilizó NaOH 4M, los resultados entre repeticiones son muy variables, lo cual se puede corroborar con la desviación estándar obtenida en los métodos TA4 (temperatura ambiente, NaOH 4M) y AU4 (121°C, NaOH 4M), es probable que la fuente de la poca repetibilidad también se deba a la oxidación de Ap-C por el exceso de NaOH, lo cual se podría evitar con la utilización de Sulfito de Sodio como sugiere Ou (2005).

Los métodos realizados a temperatura ambiente arrojaron los mayores rendimientos, sin embargo la repetibilidad es mayor en el método TA2 y la concentración excesiva de NaOH en AU4 podría estar dañando al compuesto en estudio.

Es por lo anterior que el método seleccionado para la continuación del presente estudio, es el método donde se utiliza temperatura ambiente y NaOH 2M (TA2), el cual conlleva un menor gasto de recursos y una mayor repetibilidad.

6.2.2. Optimización del tiempo de hidrólisis

Se determinó el tiempo en el cual se deja de liberar Ap-C por medio de hidrólisis alcalina. Se cuantificaron los gramos liberados de Ap-C en los hidrolizados cada hora durante ocho y horas y finalmente a las 24 horas de haber comenzado la hidrólisis (Tabla 12).

Tiempo (h)	Gramos de Ap-C liberados /L de hidrolizado
1	0.5880
2	0.6043
3	0.6149
4	0.6223
5	0.6763
6	0.6685
7	0.6700
8	0.6688
24	0.6614

Tabla 12. Gramos de Ap-C liberado en función del tiempo

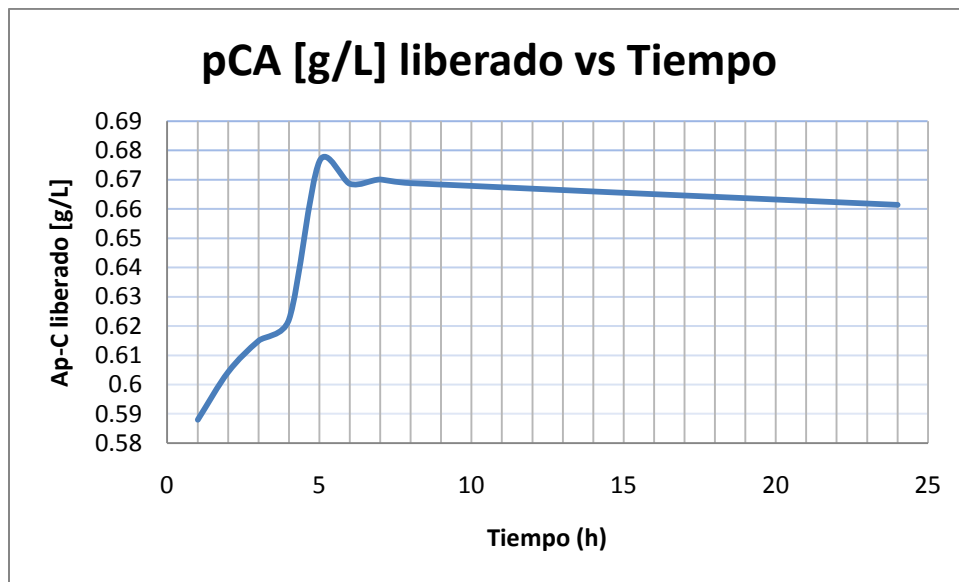


Gráfico 1. Gramos de Ap-C liberado en función del tiempo

De acuerdo al gráfico 1 el tiempo óptimo de hidrólisis es de cinco horas, puesto que a las condiciones trabajadas la cantidad de Ap-C liberada ya no aumenta con respecto al tiempo.

Para estandarizar las condiciones de los hidrolizados a lo largo del tiempo, se utilizó un buffer de fosfatos a pH =7, de esta manera nos aseguramos de identificar a la misma especie de Ap-C, en este caso parcialmente protonada,

la cual tiene su pico máximo de absorción a una longitud de onda de 286 nm (Putschogl, 2008).

El gráfico 1 demuestra que después de cinco horas de hidrólisis utilizando las condiciones óptimas de temperatura y concentración de álcali, la liberación de Ap-C y posiblemente otros compuestos polifenólicos ya no se lleva a cabo, pues la concentración de dichos compuestos disminuye ligeramente en los hidrolizados después de este tiempo; dicha disminución podría deberse a la oxidación de los compuestos detectados por el equipo

6.3. Tercera parte. Determinación del método de extracción de Ap-C

Se obtuvo la cantidad de extracto adsorbida por dos diferentes tipos de matriz, así como la pureza de los extractos obtenidos por cada una de ellas, la proporción adecuada de hidrolizado/adsorbente para obtener el rendimiento de adsorción más alto y el disolvente mediante el cual se obtiene un extracto con un mayor grado de pureza a partir de la matriz adsorbente; de esta manera se seleccionó el mejor método de extracción de Ap-C a partir de hidrolizados de material lignocelulósico provenientes de la planta de maíz. Finalmente se aplicó el método de hidrólisis y extracción a una sola muestra de 100 g.

6.3.1. Determinación del método de extracción de Ap-C

Se evaluaron distintos parámetros para la extracción de Ap-C a partir de los hidrolizados, los cuales son: matriz en la cual va a ser recuperado el compuesto,

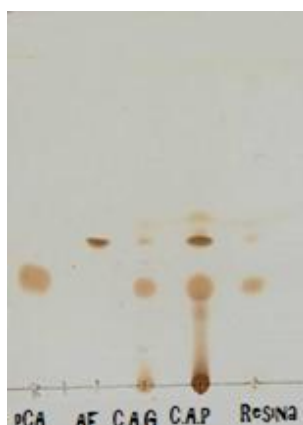
el pH, disolvente utilizado para la desorción y cantidad de adsorbente por mL de hidrolizado.

En esta sección se analiza mediante la cantidad de extracto obtenida y la pureza de estos mismos la matriz adsorbente más adecuada para la adsorción de Ap-C y las razones de por qué se eligió al Acetato de etilo para la recuperación de Ap-C a partir de la matriz adsorbente.

6.3.1.1. Adsorción

Selección del adsorbente:

Se realizó una hidrólisis alcalina de tallo de maíz blanco criollo seco, molido y tamizado, posteriormente se utilizó una resina hidrofóbica, carbón activado granulado y carbón activado en polvo para la adsorción y obtención de extractos prepurificados. Se pesó la cantidad de extracto obtenida y se identificó por c.c.p. la cantidad de impurezas presentes en la muestra.



Placa 3. Extractos obtenidos mediante carbón activado granulado, carbón activado en polvo y una resina hidrofóbica de adsorción. De izquierda a derecha: std. Ap-C, std. AF, Carbón activado granulado, carbón activado en polvo y Amberlita

En la imagen de la placa no es posible observar la cantidad de impurezas totales debido a la resolución de la imagen, sobre todo aquellas impurezas que presentan un R_f mayor, es decir, impurezas más polares que los dos ácidos Hidroxicinámicos identificados, sin embargo se puede apreciar que el extracto obtenido con Amberlita (cuarto carril), presenta menos impurezas que los otros dos. En la tabla 13 se resume lo observado a simple vista en la placa cromatográfica y la cantidad de extracto obtenida por cada adsorbente.

Adsorbente	Amberlita	Carbón activado granulado	Carbón activado en polvo
Cantidad de extracto obtenida (g)	3.24	1.278	8.0175
Presencia de Ap-C	Sí	Sí	Sí
Presencia de AF	Si	Sí	Sí
# impurezas c.c.p.	0	4	4

Tabla 13. Evaluación del método utilizando etanol para la desorción en carbón activado granulado, en polvo y Amberlita

La mayor cantidad de extracto se obtuvo con el carbón activado en polvo como se muestra en la tabla 13, sin embargo, gran parte del extracto obtenido mediante este adsorbente era un compuesto blanco cristalino, el cual era soluble en agua y no lo era en ningún disolvente orgánico.

El carbón activado en polvo resulta complicado de manejar, puesto que dificulta la filtración, la extracción con disolventes y el secado del material, debido al tamaño de partícula tan pequeño.

Debido a que la resina hidrofóbica es más selectiva que el carbón activado y a la facilidad de manejo del material se optó por el empleo de Amberlita para la obtención de extractos ricos en Ap-C a lo largo del estudio.

Evaluación del pH de adsorción:

Se realizó una hidrólisis alcalina de tallo de maíz seco, molido y tamizado, posteriormente se obtuvieron extractos prepurificados por medio de una resina hidrofóbica. Se adsorbió el Ap-C a dos pH diferentes, al pH del hidrolizado (pH=12), y a pH ácido (pH= 3), de esta manera se determinó si es necesaria la acidificación del hidrolizado:

% Absorbido	
pH alcalino	pH ácido
28.6819	87.1616

Tabla 14. Cantidad adsorbida por la resina en dos condiciones de pH diferentes

Como se muestra en la tabla 14; la cantidad adsorbida aumenta considerablemente a pH =3, puesto que a este pH tenemos la especie totalmente protonada del Ap-C, la cual presenta mayor afinidad por la resina hidrofóbica, por lo que a lo largo del estudio se realizarán las extracciones a pH ácido (pH = 3).

Determinación de la proporción (Adsorbente: Hidrolizado) para la extracción:

Se realizó una hidrólisis alcalina de tallo de maíz seco, molido y tamizado, y para la adsorción se evaluaron diferentes proporciones de resina: 1:50, 1:20, y 1:10 (resina: hidrolizado).

Se cuantificó el Ap-C en el hidrolizado antes de la desorción y después de ésta por medio de espectrofotometría UV:

Proporción (gramos de resina: mL de Hidrolizado)	g. Ap-C/mL Hidrolizado antes de la adsorción	g. AC/mL Hidrolizado después de la adsorción	% adsorbido
(1:50)	3.1359	2.0192	35.6118
(1:20)	3.0322	1.6527	45.4959
(1:10)	3.4091	1.3622	87.1616

Tabla 15. Cantidad de Ap-C adsorbido en diferentes proporciones de resina/hidrolizado

Se obtuvo la mayor cantidad de Ap-C utilizando la mayor proporción (1:10), por lo que se utilizará esta proporción en etapas posteriores del estudio.

En la tabla 15, se muestra que conforme aumenta la cantidad de resina con respecto a la cantidad de hidrolizado, aumenta el porcentaje de Ap-C adsorbido.

Según los datos obtenidos; la tendencia de adsorción de la resina va en aumento, sin embargo se estableció como límite la proporción 1:10, puesto que una mayor proporción significaría un exceso de resina, que dificultaría la agitación del matraz y disminuiría la rentabilidad del proceso al utilizar más resina para rescatar únicamente el 13 % restante de la cantidad total liberada por la hidrólisis.

Se estableció la cantidad de 1:10 (gramos de resina: mL de hidrolizado) para la continuación del presente estudio.

6.3.1.2. Desorción

Evaluación del disolvente de desorción:

Se realizó una hidrólisis alcalina de tallo de maíz seco, molido y tamizado, posteriormente se utilizó una resina hidrofóbica para la adsorción y para la desorción se evaluaron dos disolventes diferentes: Etanol y Acetato de etilo, en los que el Ap-C es más soluble.

Una vez obtenidos los extractos prepurificados se realizó una identificación cualitativa de Ap-C y AF, de esta manera se determinó si alguno de ellos es selectivo para la recuperación del Ap-C, pues también se determinó la presencia de AF.

Desorción con Acetato de etilo:



Placa 4. Determinación cualitativa de Ap-C y AF en extractos obtenidos con Acetato de etilo, de izquierda a derecha: estándar de Ap-C, estándar de AF y muestra

Desorción con Etanol:



Placa 5. Determinación cualitativa de Ap-C y AF en extractos obtenidos con Etanol, de izquierda a derecha: estándar de Ap-C, estándar de AF y muestra

Finalmente se determinó por medio de espectrofotometría UV la pureza de los extractos prepurificados obtenidos con ambos disolventes; los resultados se muestran la tabla 16.

Disolvente	Cantidad de Extracto obtenido. A partir de 10 g de M.S	Cantidad de Ap-C total extraído	Cantidad de Ap-C recuperada/ 100 g de Materia seca	Cantidad recuperada de los hidrolizados (%)	Cantidad recuperada corregida (%) (Contemplando que la resina adsorbe sólo el 87.2%)
Acetato de Etilo	0.7042	0.3982	4.1215	54.8771	68.8021
Etanol	0.4568	0.2206	2.1192	39.7201	45.2310

Tabla 16. Análisis de la extracción con Acetato de Etilo y Etanol

Una de las grandes limitantes para el uso de Etanol para la desorción de la resina además del rendimiento, es que debido a la mayor polaridad del disolvente éste es capaz de arrastrar ciertos compuestos de mayor polaridad con respecto al Ap-C. (Lo cual se puede observar en la placa 5, donde la muestra obtenida mediante lavados de etanol presenta una impureza con un Rf muy similar al del AF).

Algunos compuestos obtenidos mediante la desorción con Etanol sólo son solubles en agua y parcialmente en Etanol, dichos compuestos podrían tratarse de sal proveniente de la reacción de neutralización, algún polímero liberado por la degradación de la hemicelulosa (arabinosilanos) o algún polímero proveniente de la degradación de la lignina, lo que podría dificultar la purificación de Ap-C a partir de estos extractos prepurificados

En la determinación cualitativa (placa 5), se observa una impureza en el extracto obtenido mediante la desorción con Etanol, mientras que en la desorción con Acetato de Etilo (placa 4), se puede observar únicamente al Ap-C y al AF, indicándonos que el Acetato de Etilo es más selectivo para la recuperación de Ap-C.

Los rendimientos obtenidos para la recuperación de Ap-C (Tabla 16) fueron mayores para Acetato de etilo (68%), mientras que para Etanol, la cantidad recuperada con respecto a la cantidad total adsorbida por la resina fue menor al 50 %.

Dado que el Acetato de etilo ofrece un porcentaje de desorción mayor y es más selectivo que el Etanol, se seleccionó al Acetato de etilo como disolvente de desorción en la continuación de éste estudio.

6.3.2. Integración del método

Ya que se obtuvieron las condiciones óptimas de hidrólisis y adsorción se unificó el método utilizando 100 gramos de material lignocelulósico y la cantidad de extracto prepurificado obtenido fue de 6.2510 g.

Se determinó vía HPLC la cantidad de AF y Ap-C obtenida por 100 gramos de materia seca utilizada así como la pureza de los extractos prepurificados obtenidos (g de Ap-C o AF/100 g de extracto).

	g de Ap-C/100 g de MS	g de AF/100 g de MS	g de Ap-C/100 g de extracto	g de AF/100 g extracto
Cantidad	2.2192±0.7560	0.6892±0.1722	35.5015±2.7425	11.0254±2.7551

Tabla 17. Cantidad de Ap-C y AF recuperada en los extractos partir de 100 gramos de materia seca y cantidad presente en 100 gramos de extracto

Al utilizar 100 gramos de materia seca se logró recuperar 6.2510 g de extracto prepurificado, del cual el 35 % es Ap-C y el 11% es AF (Tabla 17).

Del total de la materia seca, se tiene un rendimiento de 2.22 % para Ap-C y 0.69% para AF (Tabla 17).

No existen reportes acerca de la recuperación de Ap-C a partir de material lignocelulósico, sin embargo si los hay para AF, según Tilay (2008), es posible la obtención de extractos prepurificados con un porcentaje de hasta 57.98 % de AF provenientes de desechos agrícolas utilizando resinas de adsorción.

Tomando en cuenta el dato anterior y que el AF es más abundante que el Ap-C en el material lignocelulósico, el método de recuperación de Ap-C desarrollado en el presente estudio resulta una opción viable para el aprovechamiento de desechos provenientes de la cosecha del maíz.

6.4. Cuarta parte. Obtención de Ap-C a partir de desechos de cuatro variedades de maíz

En la cuarta etapa se cuantificó la cantidad liberada de Ap-C en los hidrolizados de cada una de las muestras evaluadas por medio de espectrofotometría UV y por HPLC la cantidad de Ap-C y AF en los extractos prepurificados.

Finalmente se elevó la pureza de uno de los extractos por medio de cromatografía en columna.

6.4.1. Cuantificación de Ap-C en cuatro muestras de maíz

Se aplicó el método desarrollado en las fases anteriores (hidrólisis y adsorción) para determinar la cantidad de Ap-C liberado en cada muestra seleccionada, las determinaciones se hicieron en los hidrolizados y en los extractos prepurificados obtenidos al final del proceso. Se analiza qué tan viable es la utilización de un método espectrofotométrico para la cuantificación de Ap-C en hidrolizados y de esta manera aproximar en una fase temprana de la extracción el rendimiento de una variedad determinada.

6.4.1.1. Cuantificación de Ap-C en hidrolizados por espectrofotometría UV

Se cuantificó la cantidad de Ap-C en los hidrolizados de cada una de las muestras, las determinaciones se hicieron espectrofotométricamente. Se construyó una curva a pH = 7 y a 280 nm (Gráfico 2).

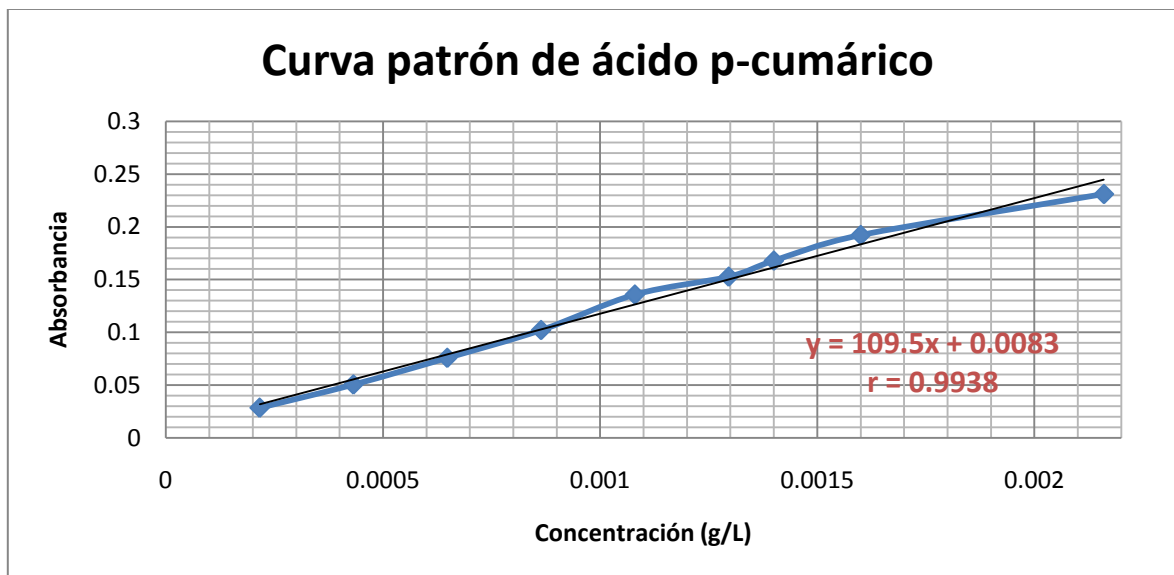


Gráfico 2. Curva patrón de Ap-C (lectura espectrofotométrica, 280 nm)

La siguiente tabla muestra la cantidad de Ap-C liberada en los hidrolizados por 100 gramos de materia seca utilizada:

	Gramos de Ap-C /100 g de materia seca (UV)			
	Maíz híbrido	Maíz criollo	Maíz azul criollo	Maíz rojo criollo
Hojas	2.2940±0.20	2.1990±0.70	1.9674±0.30	2.2380±0.05
Raíz	3.8210±0.23	3.753±1.30	4.8599±0.60	4.1589±0.10
Tallo	3.9003±0.25	2.6929±0.76	5.1606±0.42	2.9602±0.26

Tabla 18. Cantidad de Ap-C liberada en los hidrolizados en cuatro especies de maíz (UV)

Debido a las condiciones de la muestra en esta fase (hidrólisis), es decir: baja concentración de Ap-C, pH y el disolvente (agua), una identificación cualitativa (c.c.f.) o identificación por HPLC es difícil de realizar.

Una identificación espectrofotométrica preliminar es más fácil de hacer y económica en comparación con HPLC y nos indica qué especie o especies son más factibles para llevarlas a una segunda fase, es decir la adsorción.

Como se muestra en la tabla 18; las estructuras con menor cantidad de Ap-C son las hojas, puesto que no es un material con alto contenido de lignina, la especie de maíz azul es la que contiene mayor cantidad de Ap-C para raíz y tallo y la especie de maíz blanco criollo es la que tiene menor cantidad.

De esta manera se podría concluir en una fase temprana que la recuperación de Ap-C a partir de hojas sería poco rentable y que la especie criolla azul nos podría ofrecer rendimientos mayores.

6.4.1.2. Cuantificación de Ap-C en extractos prepurificados por HPLC

Una vez obtenidos los extractos prepurificados se determinó la cantidad de Ap-C y AF presente en estos. Los resultados se muestran en gramos del compuesto por 100 gramos de materia seca utilizada y gramos de compuesto por 100 gramos de extracto (pureza de los extractos prepurificados) (Tabla 19).

	Gramos de Ap-C /100 g de materia seca			
	Maíz híbrido	Maíz blanco criollo	Maíz azul criollo	Maíz rojo criollo
Hojas	0.1695±0.1473	0.2753±0.03882	0.197312±0.1273	0.1450±0.0891
Raíz	1.0794±0.0760	1.8492±0.1486	3.5039±1.372	2.4064±0.3780
Tallo	1.7094±0.275	2.1584±0.1888	3.0347±0.6911	1.6851±0.1318

Tabla 19. Cantidad de Ap-C liberada en los hidrolizados en 4 especies de maíz (HPLC)

	Gramos de AF/100 g de materia seca			
	Maíz híbrido	Maíz blanco criollo	Maíz azul criollo	Maíz rojo criollo
Hojas	0.6043±0.07924	0.5914±0.1542	0.4395±0.1587	0.6126±0.0811
Raíz	0.6828±0.0888	0.9240±0.0337	0.8619±0.2583	1.0501±0.1163
Tallo	0.7828±0.0054	0.7777±0.092	0.6911±0.1587	0.6615± 0.0421

Tabla 20. Cantidad de AF liberada en los hidrolizados en 4 especies de maíz

Pureza de los extractos obtenidos:

	Gramos de Ap-C /100 g. de extracto prepurificado			
	Maíz híbrido	Maíz blanco criollo	Maíz azul criollo	Maíz rojo criollo
Hojas	2.0705±1.7475	3.4171±1.2373	2.5083±1.4204	1.7989±1.1048
Raíz	14.8111±1.7082	21.2349±1.1723	31.1322±3.6243	27.0787±5.1188
Tallo	11.0768±7.7044	26.9000±5.2367	30.7743±9.5586	29.9872±2.4510

Tabla 21. Cantidad de Ap-C presente en un gramo de extracto prepurificado en cuatro especies de maíz (HPLC)

	Gramos de AF /100 g de extracto prepurificado			
	Maíz híbrido	Maíz blanco criollo	Maíz azul criollo	Maíz rojo criollo
Hojas	7.3804±0.7460	7.5010±3.4522	5.5219±1.0621	7.6685±1.2542
Raíz	9.3288±0.9948	10.6306±0.6246	7.8237±1.1750	11.8335±2.0430
Tallo	4.9747±2.7957	9.7503±2.3835	7.3616±2.2221	11.7798±0.9690

Tabla 22. Cantidad de AF presente en un gramo de extracto prepurificado en cuatro especies de maíz (HPLC)

Una vez obtenidos los extractos prepurificados por medio de las condiciones determinadas en la tercera parte del proyecto, se cuantificó por HPLC la cantidad de Ap-C y AF en cada uno de los extractos.

Los resultados de Ap-C liberados por 100 gramos de materia seca en los extractos prepurificados obtenidos mediante HPLC (Tabla 19) son menores que los identificados espectrofotométricamente en los hidrolizados (Tabla 18), puesto que al momento de utilizar la resina, esta adsorbe el 87 % del Ap-C liberado, además de que el método espectrofotométrico sobrevalora la cantidad de Ap-C presente por la presencia de otros compuestos polifenólicos en el medio, como lo es el AF (sección 6.2.1).

Después de la adsorción se corroboró, según los datos expuestos en la tabla 19, que se obtuvo una mayor cantidad de Ap-C por gramo de materia seca a partir del maíz azul criollo y que las hojas ofrecen el menor rendimiento de las tres estructuras seleccionadas. La especie que ofrece los rendimientos más bajos es la especie híbrida: para raíz obtuvo la menor cantidad y para tallo un resultado muy similar a la especie criolla roja, sin embargo ambos son superados por las dos especies criollas restantes (Tabla 19).

La especie con mayor contenido de AF en tallo, fue la especie híbrida, según los datos mostrados en la tabla 20, lo cual nos explica por qué fue sobrevalorado su resultado en la determinación espectrofotométrica, además de la presencia de las impurezas no identificadas en la determinación cualitativa. La mayor cantidad de AF presente en el tallo híbrido nos sugiere una mayor cantidad de enlaces

diferulato (Tabla 20), es decir una mayor cantidad de enlaces entrecruzados en la pared celular, esta podría ser la clave de la mayor resistencia al medio que ofrece esta especie; sin embargo, el aumento de AF pudo haber propiciado la disminución de Ap-C en la pared celular, disminuyendo la cantidad recuperable de Ap-C a partir del tallo.

Dependiendo de la especie analizada, la raíz o el tallo son las estructuras con mayor cantidad de Ap-C, ambas siempre superan la cifra de 1 % de Ap-C recuperado con respecto a la materia seca utilizada, contrario a las hojas, que su resultado es menor al 1% en todas las especies (Tabla 19). La raíz y el tallo son las estructuras más viables para la recuperación de Ap-C.

En cuanto a la pureza de Ap-C en los extractos obtenidos (Tabla 21): los valores más bajos se obtuvieron a partir de la especie híbrida (15 y 11 % para raíz y tallo respectivamente) y los más altos para la especie criolla azul (31 y 30% para raíz y tallo respectivamente) y en todos los casos las hojas presentan purezas menores al 4 %.

Debido a que se obtienen extractos con purezas de hasta tres veces mayores en especies criollas que en una híbrida sembrada en la misma región, es más viable la recuperación de Ap-C a partir de especies criollas.

El método espectrofotométrico para la identificación preliminar de Ap-C en los hidrolizados nos da un panorama acerca de que tan viable puede ser la recuperación de Ap-C en una especie determinada, sin embargo siempre hay que

tomar en cuenta que los resultados se sobrevaloran por la presencia de otros compuestos polifenólicos.

6.4.2. Purificación de Ap-C

Se desarrolló un método de purificación de Ap-C a partir de los extractos prepurificados obtenidos, primero se realizaron pruebas de solubilidad de los compuestos mayoritarios (Ap-C y AF), después se purificó por recristalización y por columna cromatográfica.

Se realizaron pruebas de solubilidad tanto para AF como para Ap-C (Tabla 23).

Disolvente	AF			Ap-C		
	Solubilidad en frío	Solubilidad en caliente	Comentarios	Solubilidad en frío	Solubilidad en caliente	Comentarios
Éter de petróleo	No	No	Totalmente Insoluble	No	No	Disolvente un poco turbio en frío
Diclorometano	Parcial	Sí	Se solubiliza en frío, pero tarda	No	No	Totalmente insoluble, Disolvente traslúcido
Hexano	No	No	Se enturbió ligeramente el disolvente	No	No	Disolvente ligeramente turbio
Acetato de Etilo	Sí	Sí	Muy soluble	Sí	Sí	Muy soluble
Metanol	Sí	Sí	Muy soluble	Sí	Sí	Muy soluble
Etanol	Sí	Sí	Tardó más en disolverse que en MeOH y AE	Sí	Sí	Muy soluble
Agua	No	No	Totalmente Insoluble	No	Parcial	Se solubiliza parcialmente en caliente

Tabla 23. Pruebas de solubilidad utilizando diferentes disolventes orgánicos para AF y Ap-C

6.4.2.1. Recristalización

Se realizó una recristalización con base en los resultados obtenidos en la tabla 23.

Se recristalizó por par de disolventes: Acetona/Diclorometano: Se pesó 0.0360 g. de extracto prepurificado, se disolvió en acetona y posteriormente se agregó diclorometano hasta obtener cristales, al hacer placa de dichos cristales se observa que contienen muy poca cantidad de Ap-C, nada de AF e impurezas polares.

Los cristales obtenidos presentaron un color no característico de los cristales de Ap-C (color café oscuro) y la cantidad de cristales obtenida fue mínima, de tal manera que el pesado se dificulta.

Aunque se seleccionó el único disolvente en el que el AF es soluble y el Ap-C no (Diclorometano, tabla 23), no se logró completar la cristalización, probablemente debido a la gran afinidad que presentan estos compuestos entre ellos, pues presentan estructuras muy similares.

Debido a la dificultad para separar ambos compuestos, en el presente estudio se optó por la cromatografía en columna; sin embargo podría hacerse uso de recristalizaciones sucesivas para obtener Ap-C con un mayor grado de pureza en estudios posteriores.

6.4.2.2. Cromatografía en columna

Se utilizó celulosa microcristalina debido a que gran parte de las impurezas provienen de la degradación de carbohidratos que forman parte de la pared celular, los cuales son de naturaleza polar y por lo tanto tendrán una mayor afinidad por la fase estacionaria; el Ap-C, que tiene una polaridad menor, podrá eluir de manera más libre por la columna.

Aunque el Ap-C no es soluble en diclorometano, se seleccionó dicha fase móvil (diclorometano/hexano) puesto, que esta mezcla de elución es la que ofrece una mejor separación en c.c.f. (utilizando placas de celulosa) de AF, Ap-C y otras impurezas polares presentes en los extractos.

Se obtuvieron cinco fracciones, en todas se observa la presencia de Ap-C y AF. Las fracciones 4 y 5 contienen menor cantidad de AF con respecto a la de Ap-C.

Se observó que en los matraces donde se recolectaron las fracciones 4 y 5 se formaron cristales blancos, identificados posteriormente como Ap-C por medio de c.c.f.

Se juntaron las fracciones 4 y 5 en un matraz de 500 mL y los cristales formados en dichas fracciones en un vial de 5 mL.



Placa 6. Disolvente y cristales precipitados en las fracciones 4 y 5 de la elución de la columna

En la placa 6 se tiene el estándar de Ap-C en el primer carril, el estándar de AF en el segundo, en el tercer carril el disolvente de las fracciones 4 y 5; en el cuarto carril los cristales blancos que se formaron en los matraces de las fracciones 4 y 5.

Finalmente se pesaron los cristales blancos obtenidos en las fracciones 4 y 5, cuyo peso resultó ser de 0.5046 g, y se determinó la pureza por medio de HPLC, la cual fue de 92.81 %, el restante 7.19% es AF.

Al terminar la elución con la fase móvil se lavó la columna con Acetato de etilo; el disolvente recolectado de dichos lavados presenta una cantidad predominante de Ap-C y no contienen AF, pero si otro tipo de impureza más polar. La cantidad obtenida de estos cristales fue de 0.5991 g.

Debido a la afinidad que presentan el AF y Ap-C, es posible que ambos compuestos hayan sido eluidos de manera simultánea y una vez separados de

otras impurezas polares en los matraces de recolección, el Ap-C cristalizó debido a su poca afinidad por el diclorometano.

Se demostró que es posible la obtención de Ap-C con una pureza del 92.81%, Este proyecto podría ser la base para que estudios posteriores optimicen el proceso de purificación y en determinado momento logren obtener cristales con purezas mayores al 98%, ya que no existen datos en la literatura acerca de la recuperación de Ap-C a partir de materiales lignocelulósicos.

7. Conclusiones

- Se implementó una metodología para la identificación de Ap-C y AF en tallo, hojas y raíz de cuatro variedades de maíz por cromatografía en capa fina.
- Se montó un método para la liberación de Ap-C por medio de la hidrólisis de material lignocelulósico.
- En la cuantificación espectrofotométrica; la presencia de Ap-C en hidrolizados de material lignocelulósico es sobreestimada por el AF y otras impurezas contenidas en la muestra.
- Se desarrolló un método para la obtención de extractos prepurificados con un rendimiento de hasta 6.25 g de extracto/100 gramos de materia seca, con un contenido de hasta 30% de Ap-C a partir de hidrolizados de tallos y raíces de maíces criollos.
- El maíz híbrido contiene menor cantidad de Ap-C en las estructuras lignificadas que los maíces criollos cultivados en una misma región del estado de Tlaxcala y las estructuras de la planta con un menor contenido de Ap-C son las hojas.
- Es posible la obtención de cristales de Ap-C a partir de extractos prepurificados de desechos de la planta de maíz con una pureza mínima del 92.81%, por medio de cromatografía en columna.

8. Referencias

- Abdel-Walhab, M.H., El.Mahdy M.A., Abd-Ellah, M.F., Helal, G.K., Khalifa, F. y Hamada, F.M. (2003) Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*. **48**, 461- 465.
- Al Arni, S., Zilli, M. y Converti A. (2007) Solubilization of lignin components of food concert from sugarcane bagasse by Alkaline hydrolysis. *Ciencia y tecnología alimentaria*. **5**, 271-277.
- Brett, C.T. (1996.). *Physiology and Biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hall. Segunda edición., Gran Bretaña. **4-64**.
- Butstat, S., Weerapreeyakul N. y Siriamornpun, S. (2009). Changes in Phenolic Acids and Antioxidant Activity in Thai Rice Husk at Five Growth Stages during Grain Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 4566 – 4571.
- Centro de Estudios de las finanzas públicas (CEFP). (2007). México: El mercado del Maíz y de la tortilla. Documento disponible en: www.cefp.gob.mx.
- Davies, D.D., Giovanelli, J. y Ap Reese, T. *Botanical Monographs*. Volume 3: Plant Biochemistry. Blacwell Scientific Publications. Oxford. **397- 399**, 1964.
- Domínguez, A. Modificación de la superóxidodismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas. (2006). *Biotecnología aplicada*. **23**, 11 -16.

- Drago Serrano M.L. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*. **38**, 42-47.
- Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry. Marcel Dekker Inc. Tercera edición. E.U.A. **255-277**.
- Fry, S. C. (1982). Phenolic components of the primary cell wall. *Biochemical Journal*. **203**, 493 – 504.
- Garrote, J.M. Cruz, A. Moure, H. Domínguez J.C. Parajo (2004). Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*. **15**, 191 – 200.
- Goto, M., Matsuoka, J., Sato, T., Ehara, H. y Morita, O. (1994). Brown midrib mutant maize with reduced levels of phenolic acids ether-linked to the cell walls. *Animal feed science and technology*. **48**. 27 – 38.
- Gunning, A.P., Bongaerts, J.M. y Morris, V.J. (2008). Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *The Journal of the Federation of the American Societies for Experimental Biology*. **23**, 415-424.
- Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, C.A. y Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología, Santiago de Querétaro, México, 22 al 24 de Octubre del 2008*. Disponible en: www.cenam.mx.

- Gutiérrez Maydata, B.A. Chocolates, Polifenoles y Protección a la Salud. (2002). *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **21**, 149 – 152.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. y Kanner, J. (1993). Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology*, **47**, 85-89.
- Kubo, I., Nihei K. y Tsujimoto, K. (2004) Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **12**, 5349 – 5354.
- Manterola, Héctor. (1999). Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes. Fundación para la Innovación Agraria del Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. **222-223**.
- Mantzavinos, D., Hellenbrand, Rolf., Metcalfe, I.S. y Livingston, A.G. (1996) Partial wet oxidation of p-coumaric acid: oxidation intermediates, reaction pathways and implications for wastewater treatment. *Water Research*. **30**, 2969 – 2976.
- Márquez Sánchez, F. (2008). De las variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) a los híbridos Transgénicos I: Recolección de germoplasma y variedades mejoradas. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. **5**, 151 – 166.
- Marx, D.E. (2010). Oxidant Activators: Green bleaching agents for paper manufacturing. Scranton Green Chemistry. Documento disponible en: <http://academic.uofs.edu/faculty/CANNM1/inorganic/inorganicmodule.html>. Fecha de consulta: 31 de Septiembre del 2010.

- Max, B., Torrado A.M., Moldes A.B., Converti, A. y Domínguez J.M.(2009). Ferulic acid and p-coumaric acid solubilization by alkaline hydrolysis of the solid residue obtained after acid prehydrolysis of vine shoot prunings: Effect of the hydroxide and pH. *Biochemical Engineering Journal*. **43**, 129-134.
- Melchor Orta, G., García García, L., Pino, O. y Bulnes Goicochea, C.(2006). Toxicidad Aguda oral del extracto de *Zea mays*. *Revista de toxicología en línea*, **10**, 48 – 58. Disponible en: <http://www.sertox.com>
- Miramontes Piña, C.U. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. (2007). Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Documento disponible en: www.siap.gob.mx.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. y Ladisch, M. (2004). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*.**96**, 673 - 686.
- Mussato. S.I., Dragone. G. y Roberto, I.C. (2006) Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial crops and products*. **25**, 231 – 237.
- O'Neil, M.J. (2001). The Merck Index. Merck & Co.,INC. Treceava edición. Whitehouse Station NJ. **2585**.
- Ortíz López, A.A. (2008). Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles: Aspectos técnicos y económicos. Universidad Autónoma Metropolitana. Documento

disponible en: <http://www.icq.uia.mx/webicq/pdf/irmene.pdf>. Fecha de consulta: 10 de Octubre del 2010.

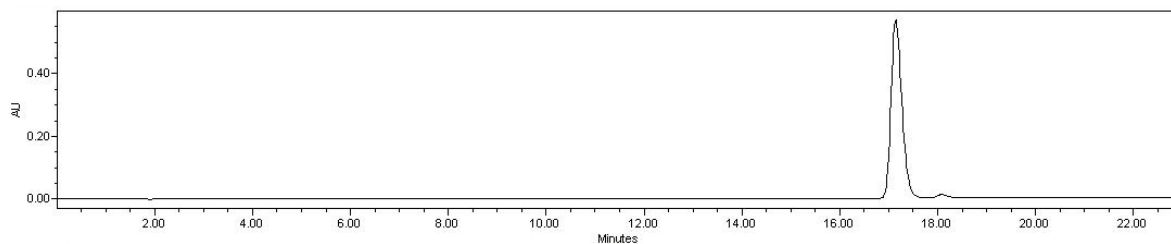
- Ou, S., Luo., Y., Xue F., Huang. C., Zhang, N. y Liu. Z. (2005). Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporus resin exchange chromatography. *Journal of food Engineering*. **78**, **1298 – 1304**.
- Panagiotou, G.P., Olavarria R. y Olsson Li. (2007). *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *Journal of Biotechnology*. **130**, **219 - 228**.
- Paredes López Octavio, Los Alimentos Mágicos De Las Culturas Indígenas Mesoamericanas. Fondo de Cultura Económica. Primera Edición., México D.F. **16-34**, 2006.
- Putschogl, M., Zirak, P. y Penzkofer A. (2008). Absorption and emission behaviour of trans-p-coumaric acid in aqueous solutions and some organic solvents. *Chemical Physics*. **343**, **107 – 120**.
- Rose, D.J., Inglett, G.E. y Liu, S.X. (2010). Utilization of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **90**, **915 – 924**.
- Rose, J. K.C. (2003). The plant cell wall. Blackwell Publishing LTD. Primera Edición., E.UA. **65-87**.

- Salameh, D., Brandam, C., Medawar, R.L. y Strehaiano, P. (2008). Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry*. **107**, 1661 – 1667.
- Serna Saldívar, Sergio. (2001). Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT editor S.A. Primera edición., México D.F. **89 – 93**.
- Silva Montoya, D.A. (2007). Documentación y estandarización de la técnica para la determinación de fibra en productos alimenticios para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. Documento disponible en: <http://biblioteca.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/6413S586d.pdf>
- Taiz, Lincoln. (1991) Plant Physiology. Benjamin/Cummings Pub. Co. Cuarta Edición., E.U.A. **313 – 338**.
- Templeton, D.W., Sluiter, A.D., Hayward, T.K., Hames, B.R. y Thomas, S.R. (2009). Assesing corn stover and sources of variability via NIRS. *Cellulose*. **16**, 621 – 639.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J. y Annapure, U. (2008). Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. *Agricultural and Food Chemistry*. **56**. 7644 – 7648.
- Topakas E., Vafialdi, C. y Christakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*. **42**, 497 – 509.

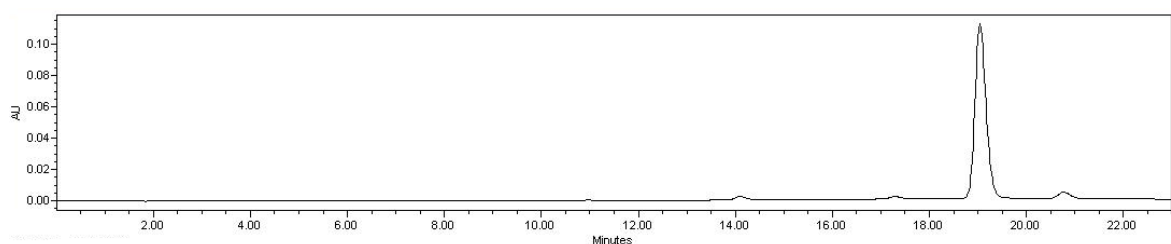
- Torre, P., Aliakbarian, B., Rivas, B., Domínguez, J.M., y Converti A. (2008). Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. **40**, 500 – 506.
- U.S. Department of energy. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: A joint research agenda. (2005). DOE/SC-0095. Rockville, Maryland. Documento disponible en: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/b2bworkshop.shtml>.
- Vásquez Cardeño, A., Cala Molina, M., Miranda, I., Tafurt García, G., Martínez Morales, J. y Stashenko, E.E. (2007). Actividad Antioxidante y contenido total de Fenoles de los Extractos Etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. **33**, 205 – 207.
- Won Choi, S.W., Lee, S.K., Kim, E.O., Oh, J.H., Yoon, K.S., Hicks, N.P. y Moreau, R.A. (2007). Antioxidant and Antimelanogenic Activities of Polyamine Conjugates from Corn Bran and Related Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**, 3920 – 3925.
- Wrigstedt, P., Killy, P., Pitkänen, L., Nousiainen, P., Tenkanen, M., Sipilä, J. (2010) Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxycinnamic Acid Xylan Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**, 6937-6943.
- Xu, F., Sun, J. X., Liu, C.F., Sun, R.C. y He. B.H. (2005). Determination of cell wall ferulic and p- coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chimica acta*. **552**, 207 – 217.

- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, Y. (1998) HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of food by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal*. **62, 1201-1204.**
- <http://www.infoagro.com> Fecha de consulta: 31 de Septiembre del 2010.
- <http://www.siap.gob.mx> Fecha de consulta: 15 de Julio del 2010.

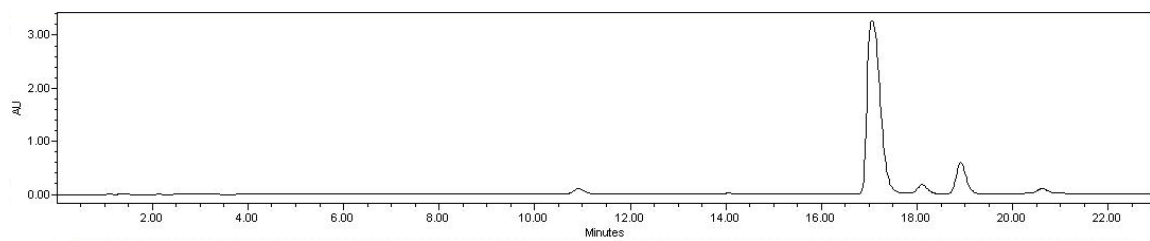
Anexo: Cromatogramas.



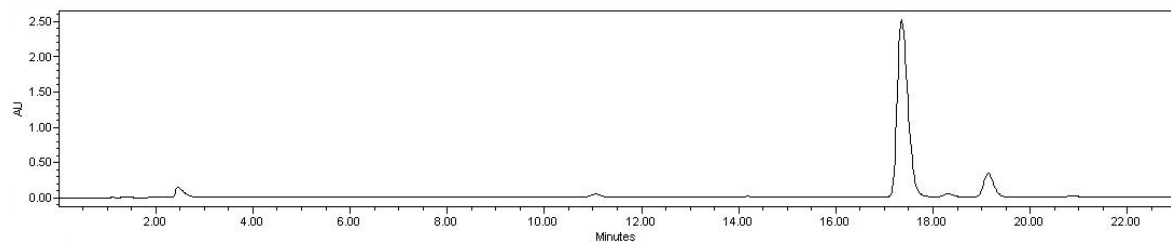
Cromatograma 1. Estándar Ap-C (0.1 mg/mL)



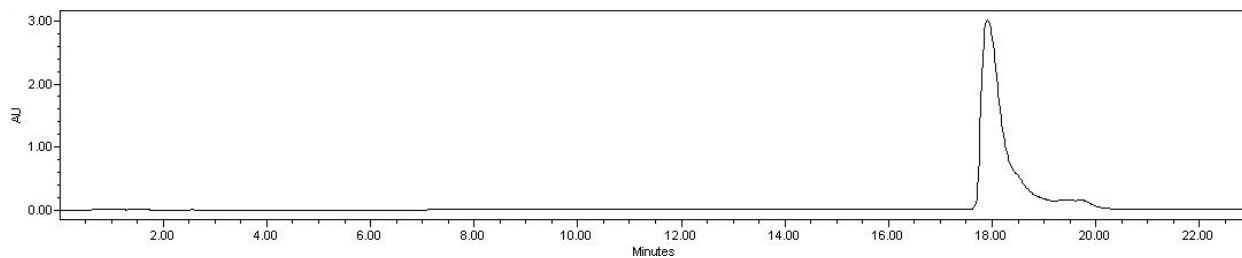
Cromatograma 2. Estándar de AF (0.1 mg/mL)



Cromatograma 3. Unificación del método de hidrólisis y extracción de Ap-C (100 g. de muestra)



Cromatograma 4. Tallo de maíz criollo blanco (97.3 mg de extracto/ml)



Cromatograma 5. Muestra purificada, 92.81% de Ap-C y 7.19% de AF, (19 mg/mL)