



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

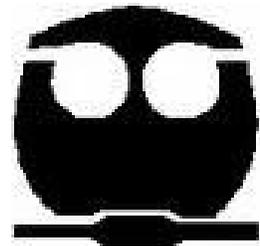
**DÍMEROS DE ÁCIDO FERÚLICO DE NEJAYOTE  
DE MAÍZ: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS  
EN DÍMEROS/HIDRODÍMEROS DE ÁCIDO  
FERÚLICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
CHAVARRIA CRUZ ESTHER**

MÉXICO, D.F.

2007





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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la mejor formación profesional como Química de Alimentos.

Al Departamento de Biotecnología y Alimentos de la UNAM por ofrecerme un espacio en sus laboratorios y brindarme materiales y equipo para el desarrollo de la tesis.

Al mi asesor el Doctor Arturo Navarro Ocaña quien compartió conmigo este proyecto de investigación y me brindo su apoyo, confianza y conocimientos para concluir satisfactoriamente mi tesis.

A la Doctora Hilda Calderón Villagomez mi asesora y supervisora técnica, por el tiempo que me dedico, sus observaciones y sugerencias a la redacción de tesis y su gran apoyo.

Al Doctor Francisco Ruiz Terán por su apoyo en la presentación de la tesis, por sus comentarios y por su disposición en todo momento.

A mis sinodales por su paciencia, invaluables sugerencias y acertadas observaciones que contribuyeron al buen término de este trabajo:

Presidente Prof.: Hermilo Leal Lara

Vocal Prof.: Hugo Rubén Carreño Ortiz

Secretario Profa.: Hilda E. Calderón Villagomez

1º Suplente Profa.: Luz Sandra Sánchez del Ángel

2º Suplente Profa.: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

## DEDICATORIAS

A mis padres Francisca Cruz y José Chavarría por brindarme lo mejor de si mismos, por su amor, comprensión, enseñanzas, apoyo incondicional y confianza que depositaron en mi para realizar uno de los anhelos mas grandes de mi vida, terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado mas grande que pudiera recibir y por lo cual viviré eternamente agradecida.

A mis hermanos Raquel, Sara, Luciano, Ruth y Angélica por que llenaron mi vida de felicidad, por ser mas que mis hermanos mis amigos con los que puedo contar en todo momento y por que son mi mejor ejemplo. A mis sobrinos por ser el motor de la familia y quererme tanto como yo los quiero.

A mis amigas de la preparatoria, mi prima Reyna y mis amigos de la Facultad de Química los cuales no terminaría de nombrar pero todos y cada uno de ellos me apoyaron en algún momento además de compartir bueno y malos momentos inolvidables.

A mis amigas y amigos del 321 y del edificio E Mayra, Verónica, Bertha, Lucia, Olivier, Ricardo, Minerva, Tere, Claudia, Alicia, Bere, Armando y Esau por su compañía, amistad y apoyo en la realización de mi tesis.

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>4</b>
<b>3. Antecedentes</b>	
3.1 Antioxidantes	5
3.1.1 Antioxidantes sintéticos	6
3.1.2 Antioxidantes naturales	7
3.2 Ácido ferúlico	10
3.2.1 Función biológica del ácido ferúlico	12
3.2.2 Aplicaciones del ácido ferúlico	12
3.2.3 Fuentes de ácido ferúlico	13
3.2.4 Obtención del ácido ferúlico	15
3.2.5 Derivados de ácido ferúlico	17
3.2.5.1 Ácido dihidroferúlico	19
3.2.5.2 Esteres de Ácido Ferúlico	20
3.3 Dímeros de Ácido Ferúlico	24
3.3.1 Función Biológica de los Dímeros de Ácido Ferúlico	26
3.3.2 Aplicaciones de los Dímeros de Ácido Ferúlico	28
3.3.3 Actividad Antioxidante de los Dímeros de Ácido Ferúlico	30
3.3.4 Fuentes de los Dímeros de Ácido Ferúlico	31
3.3.5 Obtención de los Dímeros de Ácido Ferúlico	34
3.4 Trímeros de Ácido Ferúlico	36

3.5 Métodos de Evaluación Antioxidante	37
3.5.1 Métodos de captación de radicales	38
3.5.2 Método de valoración del estado real de un aceite o una muestra de alimento	40
3.5.3 Métodos de seguimiento de los cambios provocados por la oxidación	41
3.5.4 Métodos predictivos	42

#### **4. Desarrollo Experimental**

4.1 Material y Equipo	43
4.2 Diagrama General	44
4.3 Metodología	45

##### ***Primera parte***

4.3.1 Obtención de un extracto enriquecido en DAFs a partir del nejayote (A)	45
4.3.2 Purificación del extracto enriquecido en DAFs, Cristalización del AF (B)	46
4.3.3 Separación de los dímeros de ácido ferúlico por Columna de separación (C)	46
4.3.4 Caracterización de los DAFs por cromatografía en capa fina (D)	47

##### **Segunda Parte**

4.3.5 Obtención de los Hidrodímeros de Ácido Ferúlico (E)	47
4.3.6 Esterificación de los DAFs (F)	48

##### **Tercera Parte**

4.3.7 Determinación de Fenoles Totales	48
4.3.8 Evaluación de la Actividad Antioxidante	48
4.4 Análisis Estadístico	51

## **5. Resultados y discusión**

### **Primera Parte**

5.1 Obtención de un extracto enriquecido en DAFs a partir del nejayote	52
5.2 Purificación del extracto enriquecido en DFAs, Cristalización del AF	54
5.3 Separación de los dímeros de ácido ferúlico por columna de separación	55
5.4 Caracterización de los DAFs por cromatografía en capa fina	57

### **Segunda Parte**

5.5 Obtención de los Hidrodímeros de Ácido Ferúlico	59
---	----

### **Tercera Parte**

5.6 Determinación de Fenoles Totales	60
5.7 Evaluación de la Actividad Antioxidante	62

<b>6. Conclusiones</b>	<b>69</b>
------------------------	-----------

<b>7. Anexo</b>	<b>73</b>
-----------------	-----------

<b>8. Bibliografía</b>	<b>76</b>
------------------------	-----------

---

## RESUMEN

Los dímeros de ácido ferúlico son compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los ácidos hidroxicinámicos y poseen propiedades antioxidantes pero no están disponibles comercialmente y su síntesis no es trivial. Son inhibidores más efectivos de la peroxidación lipídica que el ácido ferúlico, la habilidad de estos compuestos fenólicos para secuestrar los radicales como el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol)-6 sulfónico) en una fase acuosa parece estar influenciada por un sistema de conjugación lleno en la molécula.

Existen evidencias de que los dímeros de ácido ferúlico se encuentran covalentemente unidos a los polímeros de las paredes celulares en plantas y semillas (*como el maíz, arroz, trigo, cebada, avena*) y otras familias de monocotiledonias y dicotiledóneas junto con ácido ferúlico, ácido p-coumárico y ácido cinámico. El nejayote es considerado un subproducto de la nixtamalización y se obtiene de las aguas de lavado del maíz, por lo que se considera una fuente importante de ácido ferúlico y de los dímeros de ácido ferúlico, la cantidad de estos compuestos va a depender de la variedad de maíz del cual se obtuvo el nejayote.

El ácido ferúlico es utilizado como antioxidante natural en alimentos y es un ingrediente activo en lociones y cremas como protector solar además de ser usado como antitumoral, anticancerígeno, inhibidor de sabores amargos y precursor de la vainillina. Entre los derivados del ácido ferúlico están los dímeros de ácido ferúlico (DAFs), los cuales brindan estabilidad en la pared celular de la planta, impiden in vitro la degradación de la pared celular de la planta y poseen propiedades insecticidas y antioxidantes.

En este estudio se partió de tres muestras de nejayote de maíz nixtamalizadas, las cuales se acidificaron hasta pH 4. Posteriormente se realiza una adsorción del ácido ferúlico y sus dímeros, con carbón activado, amberlita y polivinilpirrolidona, los cuales

---

fueron extraídos con lavados sucesivos de cada uno de los adsorbentes con acetato de etilo.

Todos los extractos fueron colectados y concentrados en rotavapor. El concentrado de ácido ferúlico y sus dímeros se purificó por disolución y recristalización en metanol. Obteniendo así un extracto enriquecido de ácido ferúlico y dímeros de ácido ferúlico. El extracto obtenido se trató con *Saccharomyces cerevisiae* para saturar los enlaces de dímeros de ácido ferúlico contenidos en el extracto y formar los hidrodímeros de ácido ferúlico.

Para evaluar la actividad antioxidante de las muestras obtenidas, se aplicó una prueba cualitativa, la cromatografía en capa fina, usando como revelador DPPH, con la finalidad de comprobar la presencia de un compuesto antioxidante. Posteriormente se realizaron pruebas cuantitativas utilizando: Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), capacidad secuestrante sobre el radical, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol)-6 sulfónico (ABTS+) y actividad antioxidante por blanqueo con  $\beta$ -caroteno, como patrón de referencia se utilizó el Trolox.

Los resultados obtenidos nos permitieron evaluar el posible aprovechamiento de los dímeros e hidrodímeros de ácido ferúlico como antioxidantes para alimentos a partir de un subproducto de la industrialización del maíz, como lo es el nejayote.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro del campo de los aditivos de alimentos destacan los antioxidantes, estos pueden tener dos orígenes: sintéticos o bien naturales, los antioxidantes sintéticos han sido ampliamente usados en la industria de los alimentos por incrementar el tiempo de vida de los alimentos que son susceptibles a la oxidación lipídica, sin embargo, existen argumentos acerca de la seguridad y efectos adversos de los antioxidantes sintéticos como aditivos en alimentos. Mientras que los antioxidantes naturales juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis y varias enfermedades crónicas (3).

La sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes de origen natural nos brinda enormes beneficios debido a que contribuyen a mantener la salud. Dentro de los antioxidantes naturales existe un particular interés en el ácido ferúlico por sus propiedades biológicas, tales como antioxidante, anti-inflamatorio, antialérgico, antimicrobiano, antiviral, anticarcinogénico, propiedades de filtro UV y además de ser utilizado para la producción de vainillina (21). Este antioxidante natural pertenece al grupo de los ácidos hidroxicinámicos, se encuentra en los cereales, especialmente en el salvado de trigo, arroz, avena, cebada y maíz, y en las hojas de las plantas la cantidad presente de este ácido en cada una de estas fuentes varía de acuerdo a la variedad de cereal y otros factores ambientales. En el nejayote, el cual es considerado un subproducto de la nixtamalización que se obtiene de las aguas de lavado del maíz, el cual contiene 2.6% de ácido ferúlico y 1.3% de los dímeros de ácido ferúlico (27).

Estudios recientes muestran que los dímeros de ácido ferúlico poseen una mayor actividad antioxidante que los monómeros. Pero sabemos que estos dímeros no están comercialmente disponibles y su síntesis no es trivial además de presentar baja solubilidad y estabilidad en varios sistemas de disolventes. Tienen un carácter hidrofílico lo cual reduce su efectividad en la estabilización de grasas y aceites (6).

### 3. OBJETIVO

- ✓ Obtener y medir la actividad antioxidante de un extracto enriquecido en dímeros/hidrodímeros de ácido ferúlico a partir de nejayote.

#### *Objetivos Particulares*

- ✓ Extracción de ácido ferúlico y sus dímeros a partir del nejayote de maíz con tres diferentes adsorbentes y evaluar sus rendimientos.
- ✓ Obtener un extracto enriquecido en DAFs retirando la mayor cantidad de ácido ferúlico
- ✓ Tratar el extracto enriquecido en dímeros de ácido ferúlico con *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo la saturación del doble enlace de los dímeros de ácido ferúlico y obtener los correspondientes hidrodímeros de ácido ferúlico, evaluar los rendimientos.
- ✓ Verificar la AAO de los hidrodímeros de ácido ferúlico con tres métodos, DPPH, ABTS, y blanqueo con  $\beta$ -caroteno. Correlacionar la AAO con el contenido de fenoles totales.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Antioxidantes**

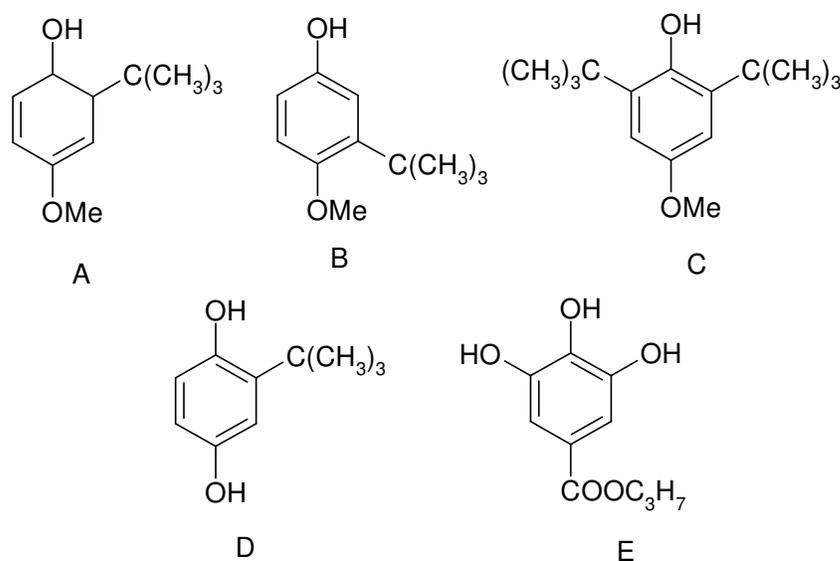
Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable (lípidos, proteínas, carbohidratos, DNA), significativamente retrasa y previene la oxidación de esa sustancia. Los antioxidantes son frecuentemente empleados para prevenir la oxidación lipídica en los alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, así como retardar la oxidación de grasas insaturadas y aceites y evitar la asociada formación de malos olores y sabores, preservando la calidad del alimento (29).

Los principales antioxidantes utilizados habitualmente en los alimentos son los fenoles mono o poli-hidroxilados con varias sustituciones en el anillo. Para que su eficacia sea máxima, a menudo los antioxidantes primarios se combinan con otros antioxidantes fenólicos o con agentes secuestrantes de metales. Los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada. Son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y además sus radicales intermediarios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular (36).

Los requerimientos para seleccionar el antioxidante más efectivo para un alimento son entender la verdadera propiedad protectora del antioxidante, identificar los sustratos que se comienzan a oxidar, la localización del antioxidante en el sistema y el efecto de otros componentes en la actividad del antioxidante. En los alimentos la eficiencia de un antioxidante depende de su estructura, volatibilidad, estabilidad al calor y sensibilidad al pH (29). Los antioxidantes pueden ser clasificados en naturales y sintéticos.

### 3.1..1 Antioxidantes sintéticos

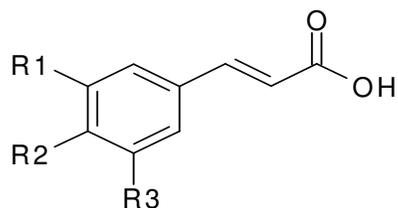
Los principales antioxidantes sintéticos empleados en los alimentos son el butil hidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT), el galato de propilo (GP) y la terbutil hidroxiquinona (TBHQ), estos antioxidantes son mono o poli fenoles sustituidos (Figura 1). Los antioxidantes sintéticos presentan algunas ventajas como su pureza, eficiencia, disponibilidad, relativamente baratos, no presentan efectos adversos en el sabor y son seguros toxicológicamente con una constante actividad y calidad garantizada. Pero también presentan algunas desventajas; solo algunas sustancias aprobadas están disponibles en el mercado como compuestos que pueden ser tóxicos en altas dosis y los consumidores los consideran como químicos y peligrosos para la salud humana (29). Desde el punto de vista práctico, los antioxidantes tienen que poseer las siguientes propiedades; deben ser inocuos, muy activos a concentraciones bajas (0.01-0.02%) y liposolubles para acumularse en la fase lipídica. En el caso de las emulsiones aceite/agua son adecuados los antioxidantes lipofílicos (BHA y BHT). Por el contrario, los antioxidantes fuertemente polares, (TBHQ) y galato de propilo, son especialmente activos en grasas y aceites por que se acumulan en la interfase grasa/aire (36).



**Figura 1.** Antioxidantes sintéticos. A y B (butil hidroxianisol , 2-HAB y 3-HAB) C (butil hidroxitolueno ), D (terbutil hidroxiquinona, TBHQ) y E (galato de propilo, GP) (1).

### 3.1.2 Antioxidantes naturales

Entre los antioxidantes naturales muchos son derivados principalmente de las plantas, por ejemplo los tocoferoles, los flavonoides, los aminoácidos, algunos de los productos de las reacciones de Maillard (reductonas) y los ácidos hidroxicinámicos como el clorogénico, el isoclorogénico, el caféico, el ferúlico, el p-coumárico, el sirínico, el vainílico y los ácidos hidroxibenzoicos.



R1=R2=R3=H	Ácido Cinámico
R1=H, R2=OH, R3=OMe	Ácido Ferúlico
R1=H, R2=OH, R3=H	Ácido Cumárico
R1=OMe, R2=OH, R3=OMe	Ácido Sinápico
R1=H, R2=R3=OH	Ácido Caféico

**Figura. 2.** Ácidos hidroxicinámicos. Estructura química de antioxidantes naturales (1).

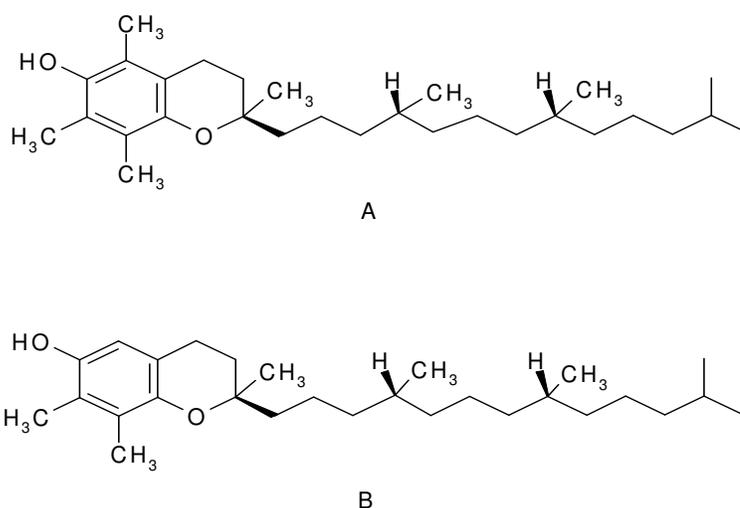
La importancia de los antioxidantes presentes en los alimentos radica en que son capaces de preservar a los alimentos que los contienen y proporcionar el aporte *in vivo* de antioxidantes esenciales (Figura 2). El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de varios antioxidantes que poseen diferentes funciones. Algunos son enzimas y proteínas y otros son pequeñas moléculas antioxidantes. Los alimentos son importantes fuentes de tales antioxidantes y elementos traza (37).

## Aminoácidos

Los aminoácidos, como la glicina o la  $\beta,\beta$ -dimetilcisteína, pueden actuar como antioxidantes reaccionando directamente con radicales libres o por efecto sinérgico, como ocurre con la mayoría. El efecto sinérgico de los aminoácidos con algunos antioxidantes fenólicos puede deberse en parte a la quelación de metales, aunque es posible que otros mecanismos, no conocidos aún, estén involucrados (38).

## Tocoferoles

Los tocoferoles son los antioxidantes más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los tocoferoles se encuentran en muchas formas, incluidas el isómero dextro rotatorio, la mezcla racémica, su acetato y su ester de ácido succinato. La forma alcohólica libre es fácilmente oxidable mientras los esteres son más estables. La vitamina E (Figura 3) es el  $\alpha$ -tocoferol, varios análogos del tocoferol como  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ - son usados como aditivos alimentarios y también están presentes en la naturaleza aunque su actividad esta por debajo de la vitamina E (64).

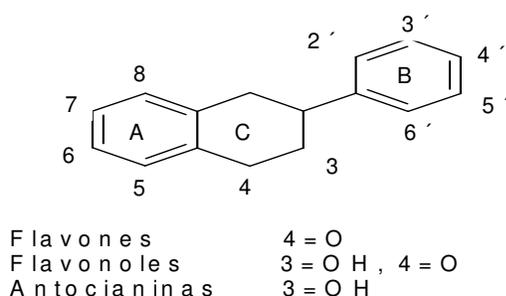


**Figura 3.** Estructura de  $\alpha$ -tocoferol (A) y  $\gamma$ -tocoferol (B) (64).

Los antioxidantes naturales más importantes que son comercialmente explotados son los tocoferoles, debido a su habilidad para inhibir la peroxidación lipídica atrapando los radicales peroxi, desafortunadamente los tocoferoles son menos efectivos que otros antioxidantes naturales. Los tocoferoles se encuentran ampliamente distribuidos en los aceites de las plantas, vegetales verdes, fibra, carne, las yemas de huevo y el aceite de germen (39). Varias formas del tocoferol, vitamina E y la forma esterificada de la vitamina inhiben el crecimiento *in vitro* de varios tipos de células incluidas células-retrovirus transformadas del tumor, neuroblastoma humano, neuroblastoma marino, neuroblastoma de ratas y células glioma y melanoma marino (64).

### Flavonoides

Los flavonoides son difenilpropanos que frecuentemente forman parte de las plantas y, por lo tanto, de la dieta de los humanos. Se consumen en cantidades relativamente altas con la alimentación diaria. La principal fuente de flavonoides son las verduras, frutas y bebidas populares como el vino, el te y la cerveza (37). Este grupo contiene más de 8000 compuestos conocidos y esta cifra crece constantemente debido a su gran presencia estructural de patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, que consisten en quince átomos de carbono arreglados en una configuración C6-C3-C6. La estructura consiste esencialmente de dos anillos aromáticos A y B, unidos por tres enlaces carbono, usualmente, en la forma de un anillo heterocíclico (Figura 4). Los principales subgrupos son los flavonoles, flavones, isoflavones, catequinas, proantocianidinas y antocianinas (39).



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides (39).

Los flavonoides son los pigmentos responsables de los tonos amarillo, naranja y rojo en las flores de las plantas (Figura 5). También son importantes factores de crecimiento y de defensa de la planta (39).



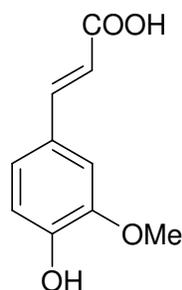
Figura 5. Pigmentos responsables del color en las flores (65)

Los flavonoides y otros polifenoles poseen acciones antitumorales, antialérgicas, antiagregantes, antiisquémicas, antiinflamatorias y antioxidantes. La actividad biológica de los flavonoides se debe principalmente a su propiedad antioxidante la cual se ve reflejada como antioxidantes primarios, quelantes y sequestradores de aniones superóxido. La presencia de grupos hidroxilo en la posición 3´,4´ y 5´ en el anillo B incrementa la actividad antioxidante comparado con un solo grupo hidroxilo (39).

### **3.2 Ácido ferúlico**

El ácido ferúlico ó ácido 4-hidroxi-3-metoxi-trans cinámico (Figura 6) del latín férula, planta gigante (54), se encuentra unido covalentemente a polisacáridos por medio de enlaces ester y a dos componentes de lignina unidos por enlaces ester o eter en las paredes celulares de las plantas de la familia *Graminaceae* y *Chenopodiaceae*.

La presencia de un doble enlace en la cadena lateral del ácido ferúlico (AF) permite la posible existencia de dos formas isoméricas: cis (Z) y trans (E). Los compuestos nativos son principalmente trans, a pesar de la ínterconversión en las dos formas puede conducir a respuestas fisiológicas seguras (44).



Ácido ferúlico

**Figura 6.** Estructura química del ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-trans cinámico) (12).

El coeficiente de partición en n-octanol/agua es de 0.375 y 0.489 a pH de 3 y 10 respectivamente. Un estudio de estabilidad acelerada indica que el valor  $t_{90}$  estimado es de 459 días a 25°C, el AF es inestable a una humedad relativa a más de 76% probablemente por su naturaleza higroscópica. Es incompatible con excipientes como Avicel (celulosa microcristalina), CMC (carboximetilcelulosa), PVP (polivinil pirrolidona) y almidón por lo que su manufactura con estos puede ser complicada. El tamaño de distribución de partícula está en un intervalo de 10-190  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de 61 $\mu\text{m}$  (12).

El AF es el compuesto fenólico predominante en el tejido del maíz y se encuentra principalmente enlazado a los polisacáridos de la pared celular como complejo FAXX (O-{5-O-[(E)-feruloil]- $\alpha$ -L-arabinofuranosil}-(1,3)-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilosa) (15).

Es el ácido hidroxicinámico más abundante presente en las paredes celulares de las plantas. El AF y sus dímeros son compuestos ubicuos de la pared celular primaria de las plantas (8).

La actividad antioxidante del AF se ve poco afectada por los cambios de pH en comparación con otros compuestos fenólicos. La actividad antioxidante de algunos esteres de AF es aun mayor que la del AF y esto se debe a que en los esteres de AF existe una cadena de alcohol (21). Las propiedades antioxidantes del AF y sus n-acil esteres son debido a su capacidad para formar secuestradores estabilizando altamente el radical-fenoxi por la extensa deslocalización sobre el núcleo aromático sustituido con dos grupos electrón-donador. Se ha demostrado que la actividad antioxidante del AF en los sistemas biológicos depende

también de la cadena ester, sugiriendo la importancia de esta modificación. Los dímeros de ácido ferúlico (DAFs) podrían ser antioxidantes más fuertes que el ácido por si mismo (29).

### **3.2.1 Función biológica del ácido ferúlico**

El ácido ferúlico desarrolla un papel muy importante en la pared celular de la planta manteniendo su integridad, su forma y la defensa contra el ingreso de patógenos. El entrecruzamiento de los polímeros de la pared celular, que se unen a través del AF, pueden modificar las propiedades como accesibilidad, extensibilidad, plasticidad, digestibilidad y adherencia. Cuando se completa la fase de extensión del crecimiento de la célula, las propiedades mecánicas de la pared celular cambian y ya no son capaces de recurrir a la relajación. En el punto final de la expansión se crean asociaciones permanentes entre los polímeros de la pared por la formación de enlaces. En las plantas el AF juega un papel fundamental en este proceso de enlace, el cual controla la organización de la pared celular y la integridad estructural. Estos eventos son cuidadosamente controlados por la planta en respuesta a su medio (44).

### **3.2.2 Aplicaciones del ácido ferúlico**

A nivel industrial es usado como antioxidante natural en alimentos y es ingrediente activo en lociones y cremas para la radiación solar ya que funciona como fotoprotector. También se le han asociado propiedades tales como: antihepatóxica, antitumoral, antiestrogénica, antimicótica y colesterolémia, inhibidor de sabores amargos, precursor de la vainillina en ensayos de biotransformación, previene de enfermedades como inflamación, cáncer y el envejecimiento causado por el desequilibrio oxidativo del tejido (9).

El AF es usado como droga antiinflamatoria en la medicina oriental Japonesa, es uno de los componentes bioactivos en *Carpobrotus edulis* (higo amargo) con actividad antibacterial en contra de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae* y ofrece diferentes beneficios al sistema cardiovascular. En el Japón el AF ha sido aprovechado como un aditivo alimentario y usado como antioxidante natural en los alimentos, las bebidas y los cosméticos (21).

El AF es un agente protector contra la radiación UV que induce daño en la piel, protege la goma guar y el almidón de la degradación térmica debido a la depolimerización por su habilidad para terminar la reacción en cadena del radical libre.

El AF es un buen sustrato para la producción de vainillina, molécula aromática mas usada en la industria de alimentos, farmacéuticas y de cosméticos. Un sabor de este tipo (sintetizado a partir del AF) podría colocarse entre los sabores extraídos de vainas de vainilla y la vainilla sintetizada químicamente en términos de calidad y precio. El AF también es usado como sustrato para la transformación biocatalítica de otras moléculas valiosas como polímeros, epoxidos, acilbenzenos, ácido protocatecoico relacionado con catecoles, guaiacol y catecol (20).

### **3.2.3 Fuentes de ácido ferúlico**

Los ácidos fenólicos como el AF y sus productos de la oxidación, los DAFs, ambos se encuentran en las paredes celulares de las plantas esterificados a polisacáridos (24).

En los tejidos de monocotiledonias como los cereales, *arroz, trigo, cebada, avena* (Figura 7) el AF se encuentra asociado con heteroxilanos (47).



**Figura 7.** Algunas fuentes del AF son los cereales tales como: arroz, maíz, avena, trigo, centeno (66).

En dicotiledonias el AF generalmente no esta en la pared celular, solo en muy pocas plantas de la familia de *Chenopodiaceae* y esta asociado con los polisacáridos pépticos en espinacas, remolacha de azúcar, quinoa y cirialera herbacea (47).

La mayoría de estos compuestos se localizan en el exterior de las capas de aleurona, en el salvado y en el germen de la semilla. La presencia, distribución y poder antioxidante de estos ácidos hidroxicinámicos es diferente de acuerdo a la variedad del grano, el medio y las condiciones de crecimiento, la molienda y el proceso de refinamiento del grano (43).

El contenido de monómeros *p*-AC (ácido *p*-coumarico), *E*-AF(ácido ferúlico trans) y *Z*-AF (ácido ferúlico cis) es significativamente diferente entre genotipos de maíz, de acuerdo con estudios previos el *E*-AF es la especie predominante de la pared celular en la mayoría de los genotipos de maíz. El estéreo isómero *Z*-AF es solo un constituyente menor (menos del 10% del AF total) y tal vez solo como resultado de una estéreo isomerización durante el proceso de extracción. Existen dos genotipos de maíz (C0433 y C0432) con diferentes antecedentes genéticos que exhiben altos niveles de DAFs y por consecuencia altos niveles de resistencia a insectos (15).

El AF y sus DAFs se encuentran en cantidades significativas en derivados agroindustriales de bajo costo y disponibilidad como por ejemplo el bagazo de la caña, la pulpa del café, las cascarillas de trigo y de arroz y para el caso de México el nejayote. Los residuos agroindustriales son una fuente potencial de valor agregado de ácidos fenólicos con aplicaciones en la industria alimentaría y farmacéutica. La remolacha de azúcar, principal subproducto de la industria del refinado del azúcar, contiene aproximadamente 1% de AF. Es posible extraer AF que contenga pectina de esta remolacha y con este se hacen geles (47). El AF es el ácido hidroxicinámico más abundante detectado en los granos de maíz, pero el ácido *p*-coumárico esta presente en cantidades significativas; juntos estos monómeros fenólicos son el 3% del grano (15).

### **3.2.4 Obtención del ácido ferúlico**

Existen formas de obtener AF, la primera es la síntesis química o enzimática y la otra es la extracción de AF de fuentes naturales.

El AF puede ser sintetizado químicamente por una reacción de condensación de la vainillina con ácido malónico, catalizado por piperidina. Este método produce una mezcla de cis- y tras AF, su rendimiento es alto pero toma tres semanas para completarse la reacción (41).

Enzimáticamente podemos obtener AF a partir de la conversión oxidativa enzimática del eugenol. El eugenol es un sustrato barato y natural que puede ser aislado del aceite esencial del árbol de clavo *Syzygium aromaticum*, en escala industrial, esta comercialmente disponible, su precio es aproximadamente de \$5/Kg. El eugenol puede ser convertido enzimáticamente a AF vía coniferil alcohol o coniferil aldehído. Células de *Escherichia coli* se crecen toda la noche a 30°C en 50 mL de medio TB que contiene tetraciclina y ampicilina, cuando el cultivo entra en su fase estacionaria de crecimiento se adiciona 25 µL de eugenol (0.05% v/v) cada hora durante 15 horas de fase de biotransformación, y la aparición de coniferil alcohol y coniferil aldehído y el AF en el sobrenadante es analizado por HPLC. Después de 15 horas la concentración de AF obtenida es 8.6 g/L, lo cual corresponde a un 90.8% de rendimiento con respecto a la cantidad de eugenol adicionada (57).

El AF también se obtiene de la extracción de fuentes naturales de varios cereales y plantas, entre ellos del maíz, el AF se encuentra unido a polisacáridos y su separación no es fácil. Afortunadamente existen dos tipos de métodos para romper este enlace y separarlo, el primero es enzimático usando esterasas de AF o en algunos casos polisacárido hidrolasas y otro método es por medio de la saponificación (25).

Los métodos enzimáticos para recuperar el AF de la biomasa, usando esterasas de AF, a pesar de la importancia de estas enzimas, solas no son suficientes para liberar el AF de la matriz de la biomasa. El uso sinérgico de las esterasas de AF y otras hemicelulasas, especialmente xilanasas y arabinofuranosas es necesario. *Neosartorya spinosa* fue

descubierta como un microorganismo capaz de producir enzimas extracelulares para liberar el AF del salvado de maíz y salvado de otras fibras. Las actividades enzimáticas de seis celulasas fueron descubiertas usando carboximetilcelulosa de sodio como sustrato, (hemicelulasas: xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, esterasas de AF,  $\alpha$ -arabinofuranocidasas y xilano acetilsterasa). Otra enzima fue también detectada a niveles menores, la  $\alpha$ -glucoronocidasa (45).

La hidrólisis alcalina o saponificación es el otro método, es una técnica áspera, la cual puede conducir a cambios químicos como la oxidación del compuesto y su purificación es difícil (23). Este método se puede llevar a cabo de la siguiente forma. Las muestras de grano de maíz congeladas y secadas se remojan toda la noche con agua a 4°C, posteriormente se separan las capas del pericarpio y aleurona del endospermo usando unas perlas como molino, este proceso es el más conveniente para una separación eficiente de las capas exteriores del endospermo y del germen que generalmente permanece unos 10 segundos después de la molienda. La muestra de pericarpio-aleurona se digiere con NaOH 2N por 3 horas en la oscuridad, se homogeniza la muestra cada hora por 15 segundos. Se acidifica a pH 2 con HCl concentrado (12N) y se mezcla vigorosamente finalmente la muestra se extrae dos o tres veces con acetato de etilo (15).

La extracción con solventes es frecuentemente usada para el aislamiento de antioxidantes y tanto el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante de los extractos depende fuertemente del disolvente debido a que los antioxidantes son compuestos con polaridades distintas (3).

Ralph (22) y sus colaboradores demostraron el uso de Cromatografía de gases para separar los compuestos fenólicos y espectroscopia de masa para su identificación, mientras que Waldron (22) y colaboradores usaron HPLC para separar compuestos fenólicos y un detector con arreglo de diodos para su identificación.

Actualmente el AF natural comercial es principalmente producido por  $\gamma$ -oryzanol en el aceite de arroz a pesar de que las paredes celulares de las plantas contienen más AF (41).

### **3.2.5 Derivados del ácido ferúlico**

Los derivados de AF son naturalmente encontrados en las plantas o pueden ser sintetizados químicamente y enzimáticamente. Los derivados de AF implican la formación de un enlace ester entre la función carboxílica del AF y uno de los grupos alcohólicos de un compuesto orgánico o un enlace incluyendo uno de los grupos fenólicos de la molécula. La diversidad de ácidos hidroxicinámicos y sus propiedades bioactivas resultantes derivan de la naturaleza de los enlaces y de la molécula(s) implicada(s) (54).

Naturalmente Feruloil-arabinosa se encuentra en el trigo y es precursor para la feruloilación de los arabinoxilanos, el 1-gliceril ferulato se encuentra en las papas. El hecho de que actualmente se coman estos compuestos sugiere que son seguros. Se ha reportado que algunos derivados de AF tienen actividad biológica. Por ejemplo, el esteril ferulato del salvado de trigo es efectivo como secuestrador de radicales DPPH. El 2-etil-1-hexil-ferulato y el 3,5-trimetil-1hexil ferulato son más efectivos en la inhibición superóxido y los compuestos amida del AF son más efectivos estimulando la secreción de insulina, comparados con el AF (44).

Recientemente se ha puesto mucha atención en la actividad antioxidante del AF y sus esteres n-acil debido a su capacidad para formar un alto sistema de estabilización del radical fenoxi por una extensa deslocalización del electrón en el núcleo aromático sustituido con dos grupos electro donadores. Los derivados de AF pueden ser antioxidantes más fuertes que el AF por si mismo. Se ha demostrado que la actividad antioxidante del AF en sistemas biológicos depende de la cadena ester, sugiriendo así la importancia de esta modificación.

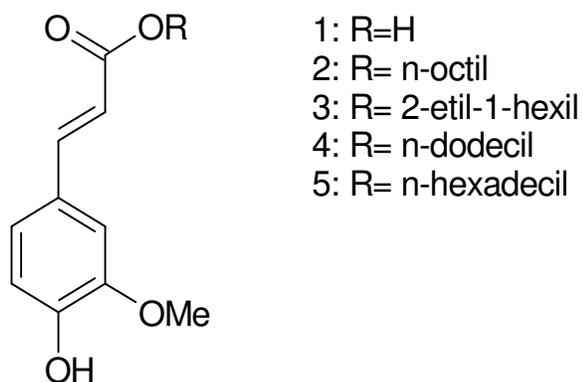
Algunos ejemplos de derivados de AF son (Figura 8):

- 2-etil-1-hexil-ferulato es estructuralmente relacionado a octal- metoxicinamato, uno de los más importantes filtros UV en el mercado farmacéutico y cosmético. ( n-octil ferulato es el compuesto de referencia con una cadena lineal).

- n-dodecil ferulato tiene una cadena que adopta una conformación principal doblada peculiarmente.

- El ester n-hexadecil, es un derivado de AF representado en gran parte en la naturaleza. (42)

- Etil 3-(4'-geraniloxi-3-metoxifenil)-2-propenato tiene más acción potencial que el AF, debido a su facilidad de absorción intestinal del compuesto debido a un aumento de la velocidad celular o a las interacciones hidrofóbicas con los sitios activos. (46)



**Figura 8.** Estructura del ácido ferúlico (1) y sus derivados: n-octil ferulato (2), 2-etil-1hexil ferulato (3), n-dodecil ferulato (4), n-hexadecil ferulato (5) (46).

Los derivados de AF con polioles, como los azúcares, pueden experimentar un incremento de su solubilidad en agua. La enzima pectinasa PL "Amano" preparada de *A. niger* tiene la habilidad para catalizar la esterificación del AF con polioles (44).

### 3.2.5.1 Ácido dihidroferúlico

Biotransformación del ácido ferúlico (Saturación del doble enlace)

Las transformaciones enzimáticas y microbianas son explotadas de materiales naturales renovables como medios para la generación de productos de valor agregado. Las transformaciones microbianas del AF por bacterias y hongos conducidas hasta ahora se han enfocado en gran parte a la identificación de rutas metabólicas y de degradación.

Un método de investigación de dos etapas fue empleado para identificar los cultivos capaces de llevar a cabo la biotransformación del AF en otros productos. Un total de 52 microorganismos fueron examinados y la cromatografía en capa fina reveló que solo 22 de del total de microorganismos son capaces de llevar a cabo la biotransformación del AF. El AF fue completamente metabolizado por *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y dos especies de *Rhodotorula*. El metabolito común fue 4-hidroxi-3-metoxiestireno (compuesto A), el cual se produjo dando altos rendimientos en 16 cultivos. La levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* es el único organismo que forma el ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilpropionico ó ácido dihidroferúlico (compuesto B) como metabolito, y solo cuando se le brinda una atmósfera de argón (Figura 9) (28).

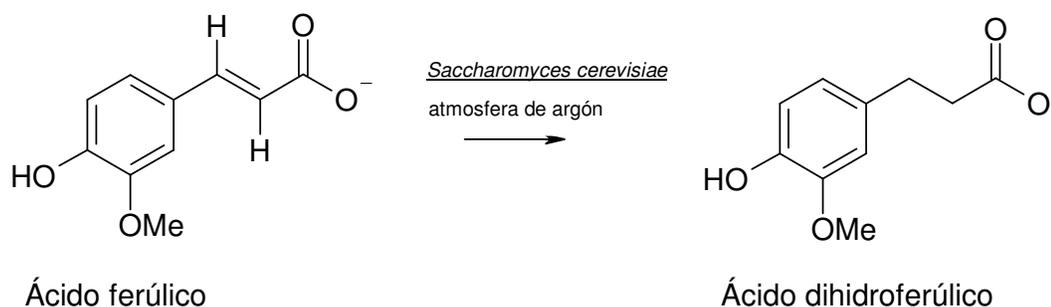


Figura 9. Reacción de saturación del doble enlace del ácido ferúlico (28).

La biotransformación del AF por *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones aeróbicas estándar, da rendimientos cuantitativos, llevándose a cabo la descarboxilación del AF para dar como resultado el 4-hidroxi-3-metoxiestireno en 48 horas. Bajo una atmósfera de argón, *Saccharomyces cerevisiae* lleva a cabo la saturación del doble enlace del AF y también la

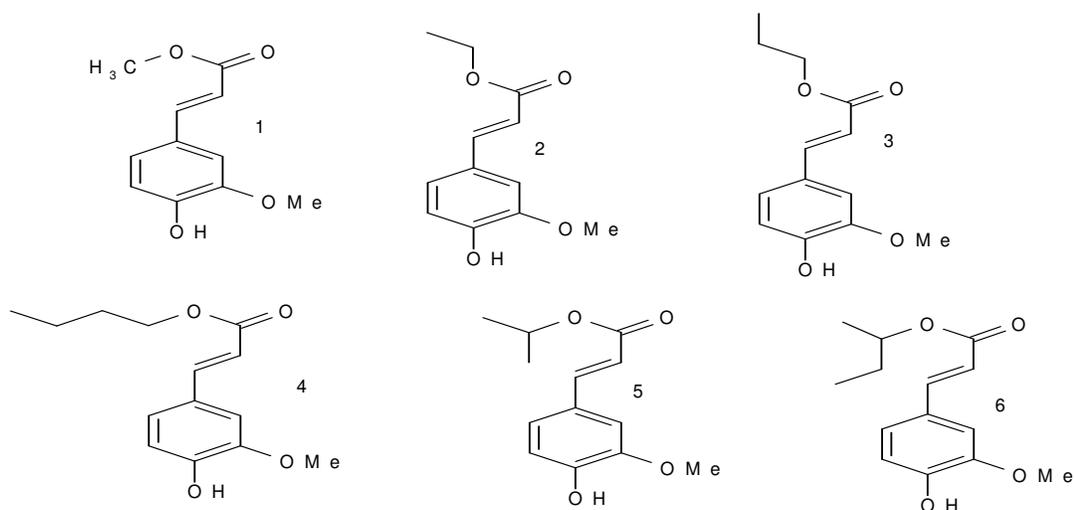
descarboxilación, por lo que se obtienen dos compuestos: el ácido dihidroferulico y el 4-hidroxi-3-metoxiestireno esencialmente en cantidades equivalentes. La reducción del AF en la cadena lateral se ha observado con las bacterias aisladas de, el lumen bovino, el lodo de aguas residuales y con el hongo blanco de la putrefacción *Phaerochaete chrysosporium*. El ácido dihidroferúlico junto con el 4-hidroxi-3-metoxiestireno son aislados por una extracción de la fase sólida, se ajusta la mezcla de reacción a pH 9 con NaOH (6N) y se extrae con acetato de etilo para obtener el 4-hidroxi-3-metoxiestireno. Después se acidifica a pH 2 con HCl (6N) para extraer el ácido dihidroferúlico (28).

### **3.2.5.2 Esteres de ácido ferúlico**

Los ester de AF se encuentran en la naturaleza por ejemplo esteril ester de AF se encuentra en la soya y en los cereales, los hexadecil y octadecil ferulatos se encuentran en la papa. Aunque también pueden ser sintetizados por vía química o enzimática (29).

Muchos de los ácidos fenólicos naturales tienen poca solubilidad y estabilidad en varios sistemas de solventes. Por ejemplo el carácter hidrofílico del AF reduce su efectividad antioxidante en la estabilización de grasas y aceites. Por ello es importante mejorar la solubilidad de este compuesto y así ampliar su uso como antioxidante de alimentos.

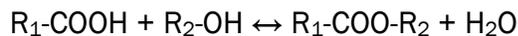
La modificación del AF vía esterificación con alcoholes alifáticos (Figura 10) puede ser usada como una herramienta para alterar la solubilidad en formulas y emulsiones basados en aceites (19).



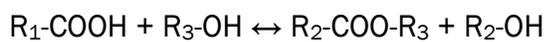
**Figura 10** Esteres de Ácido Ferúlico. 1)metil ferulato, 2) etil ferulato, 3) n- propil ferulato, 4) n-butil ferulato, 5) iso-propil ferulato y 6) 2-butil ferulato (19).

Las reacciones de síntesis de ester es son útiles por que estas pueden producir compuestos esterificados con características nuevas. Se sabe que las lipasas catalizan esterificaciones (Ecuación 1) o transesterificaciones (Ecuación 2) en solventes no acuoso o poco polares.

Reacción de esterificación 1



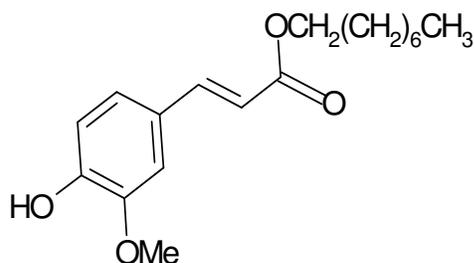
Reacción de transesterificación 2



Las reacciones de esterificación son mas practicas para una aplicación industrial que las reacciones de transesterificación debido a que el AF puede ser usado directamente como el donador feruloil en las reacciones de formación. Las reacciones de transesterificación son más caras por que requieren de la preparación de ester es de AF, como metil ferulato, para su uso como sustratos (44). Para llevar a cabo la esterificación es posible el uso de lipasas en medios con poca agua para esterificar un alcohol de cadena larga al compuesto fenólico, pero también son utilizadas feruloil ester asas, tanasas y cutinasas. La síntesis enzimática de los ester es presenta algunas ventajas como tener condiciones de reacción del medio agradables, minimización de reacciones laterales y formación de subproductos, una especificidad selectiva, pocos intermediarios y pocos pasos de purificación (29).

La esterificación de AF solo es posible con alcoholes que poseen más de ocho carbonos (Figura 11), pero da bajos rendimientos, y después de 15 días de reacción los rendimientos máximos a obtener son 13% con octanol, 10% con dodecanol y 14% con 9-octadeceno-1-ol. H. Satamatis y colaboradores (19) llevaron a cabo la esterificación enzimática de varios ácidos fenólicos con un exceso de octanol como sustrato y disolvente y sin la presencia de otro disolvente. La esterificación de ácido cinámico, ferúlico y *p*-coumarico fue catalizada por las lipasas de *C. antartica*, *R. miehei*, y *C. rugosa*. Todas las enzimas utilizadas pueden catalizar la esterificación del ácido cinámico con velocidades altas relativamente. La lipasa de *C. antartica* pudo catalizar la esterificación de ácidos aromáticos con una gran velocidad de reacción y altos rendimientos, mientras que la velocidad de reacción para la esterificación de los derivados de ácidos cinámicos metoxilados (AF) o hidroxilados es muy baja, y esta relativa baja velocidad de reacción y la limitación de la baja solubilidad del AF en 1-octanol hacen difícil y extensivo el estudio cinético de la reacción de esterificación.

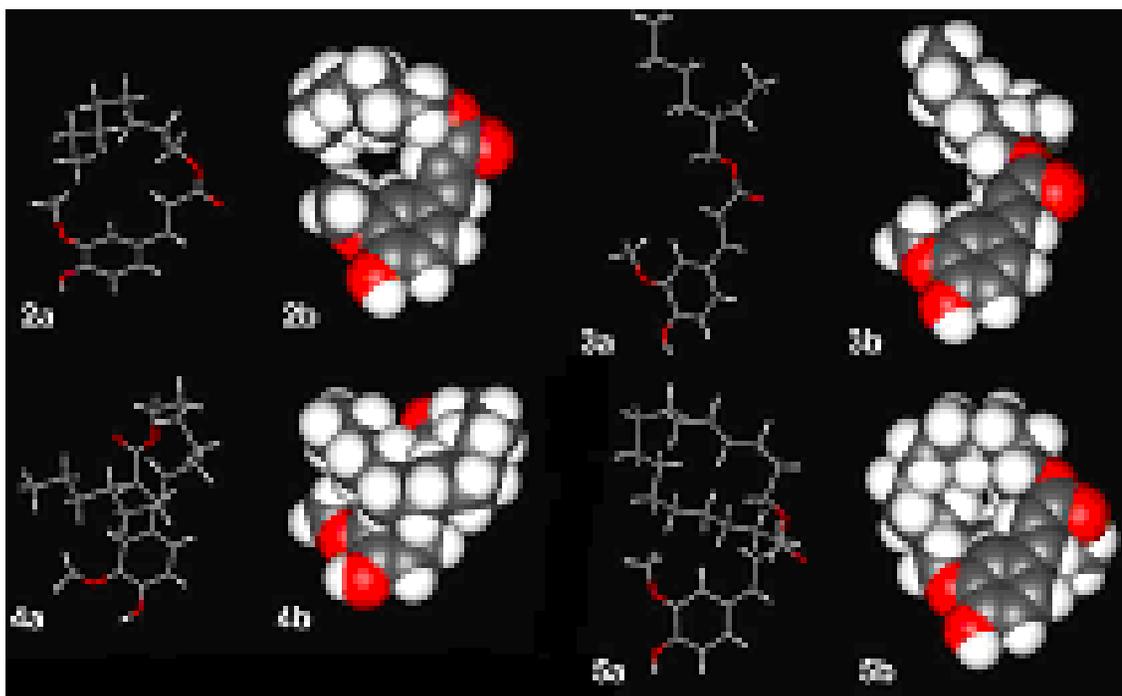
Un efecto inhibitorio similar en el AF se observó con las otras enzimas usadas. La lipasa de *R. miehei* cataliza la acilación del AF relativamente con una gran velocidad de reacción y alto rendimiento (30% de conversión después de 12 días de reacción). El efecto inhibitorio de los derivados de AF también han sido reportados en otros estudios y esto puede ser atribuido al efecto electrónico y estérico. Se ha propuesto que el efecto donador electrónico desactiva el núcleo electrofílico del grupo carboxílico para el ataque nucleofílico del alcohol (19).



**Figura 11.** Estructura de octyl ester de AF, sintetizado enzimáticamente (19).

A pesar de la poca disponibilidad y dificultad para sintetizarlos, los ésteres de AF muestran, analizados en un sistema de membranas, marcadas diferencias en su potencial antioxidante. El derivado *n*-C<sub>12</sub> (*n*-dodecil, 4a y 4b) es el más potente ó con mayor poder

antioxidante, seguido de n-C<sub>8</sub>(n- octil, 2a y 2b), n-C<sub>16</sub>(n-hexadecil, 5a y 5b), el ramificado C<sub>8</sub> (2-etil-1-hexil, 3a y 3b) y al final el AF (Figura 12). Un estudio conformacional realizado por RMN y modelos moleculares, indica que la diferente actividad antioxidante de los ferulatos en modelos de membrana es debido a las diferentes conformaciones espaciales y al arreglo de la cadena lateral de molécula que gobierna el acceso de la capa fosfolipidica, la modalidad de la orientación del núcleo secuestrador/quelante (grupo fenol) y por lo tanto la potencia antioxidante total del derivado (42).



**Figura 12.** Conformaciones más probables de los derivados de AF deducidas por experimentos de RMN y modelos moleculares 2a y 2b: n- octil, 3a y 3b: 2-etil-1-hexil, 4a y 4b: n-dodecil y 5a, 5b: n-hexadecil (42).

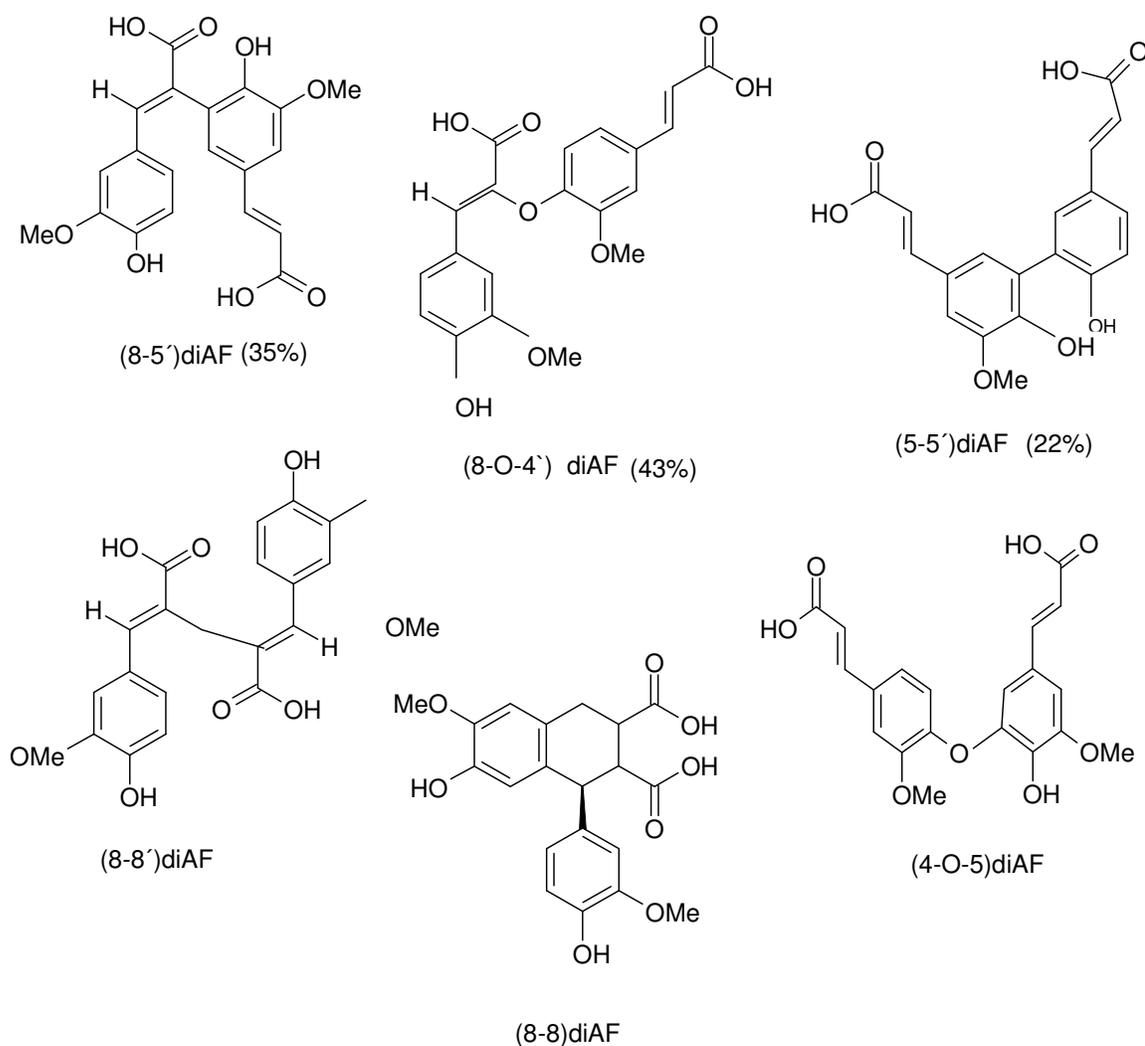
La síntesis química es difícil debido a la sensibilidad al calor y a la susceptibilidad de oxidación en medios alcalinos. Las reacciones químicas son no selectivas, resultan reacciones en cadena no deseadas, involucran varias etapas intermediarias y pasos de purificación para quitar los subproductos y residuos catalíticos, generan residuos que no sirven. Taniguchi (29) produjo químicamente acil ferulatos, haciendo reaccionar AF con un alcohol (2-etil-1-hexanol) catalizado por la presencia de un ácido (ácido p-toluensulfónico) en un disolvente orgánico (tolueno).

### **3.3 Dímeros de ácido ferúlico**

Los dímeros de ácido ferúlico (DAFs), son compuestos fenólicos derivados del AF, son antioxidantes naturales y se encuentran covalentemente unidos a los polímeros de las paredes celulares en las plantas, teniendo influencia en las propiedades químicas y mecánicas de la pared celular de la planta y contribuyendo a su indigestibilidad, posiblemente porque estos DAFs limitan la accesibilidad de las enzimas a los polisacáridos estructurales (2).

El primer dímero de ácido ferúlico obtenido *in vitro* de la pared celular de *Triticum aestivum* fue el 5-5-diAF y lo nombraron comúnmente como ácido diferúlico. Este dímero ha sido aislado de varias paredes celulares de monocotiledonias y dicotiledonias principalmente en la configuración trans, solo o esterificado a un azúcar (14).

Aproximadamente ocho formas de dímeros de ácido ferúlico han sido descubiertas, desde el primer isómero el 5-5´ (15). Los DAFs (Figura 13) pueden mostrar los siguientes arreglos: 8-O-4´ diAF ácido [(Z)-β-{4-[(E)-2-carboxivinil]-2-metoxifenoxi}-4-hidroxi-3-metoxi cinámico], 8-5´ BenDi [ácido trans-5-[(E)-2-carboxivinil]-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-2-3-dihidrobenzofurano-3-carboxílico], 5-5´ diAF [ácido (E,E)-4-4´-dihidroxi-5-5´-dimetoxi-3-3´-bicinámico], 8-5´ diAF [ácido (E,E)-4-4´-dihidroxi-3,5´-dimetoxi-β, 3´-bicinámico], 8-8´ AryID [ácido trans- 7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metoxi-1,2-dihidronaftaleno-2,3-dicarboxílico] (20).



**Figura 13.** Dímeros de ácido ferúlico 8,5'-diAF [ácido(E,E)-4-4'-dihidroxi-3,5'-dimetoxi-β, 3'-bicinámico], 8-O-4'-diAF [(Z)-β-4-{(E)-2-carboxivinil}-2-metoxifenoxi]-4-hidroxi-3-metoxi cinámico], 5,5'-diAF [ácido (E,E)-4-4'-dihidroxi-5-5'-dimetoxi-3-3'-bicinámico], 8,8'-diAF no cíclico, 8,8'-diAF cíclico [ácido trans-7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metoxi-1,2-dihidronaftaleno-2,3-dicarboxílico] y 4-O-5-diAF (30).

El DAFs mas abundante en el nejayote de maíz es el 8-O-4'- diAF (43% del total de DAFs detectados), en menor cantidad se encuentran el 8,5'-diAF (35%) y 5,5' diAF (22%). En total en el nejayote de maíz hay aproximadamente 1.3% (w/w) de DAFs (27).

### **3.3.1 Función biológica de los dímeros de ácido ferúlico**

Los roles estructurales y funcionales de las paredes celulares de la planta están controlados por la composición y organización de los compuestos de la pared celular (entre otros los DAFs), los enlaces de estos compuestos tienen una notable influencia sobre numerosas propiedades de la pared celular como: accesibilidad, extensibilidad, plasticidad, digestibilidad y adherencia (10,16).

La naturaleza química de los enlaces entre DAFs puede alterar la conformación de la cadena de los polisacáridos, haciendo algunas áreas más accesibles para la de-esterificación por la feruloil estearasa y otras inaccesibles debido al impedimento estérico por lo menos sobre un enlace ester (44). Los DAFs reducen la biodegradabilidad de los polisacáridos de la pared celular por bacterias y enzimas de hongos. Los DAFs han sido comparados a remaches moleculares, ensamblando cadenas de polisacáridos juntas en la pared, así alargando la longitud de polímeros particulares, análogos a una cadena de papel y determinando la estructura y función de la pared celular (54).

Los DAFs son los únicos elementos bifuncionales los cuales pueden estar enlazados a los polímeros de la pared celular y han sido identificados y cuantificados en varios tejidos de plantas (27). Los DAFs estabilizan la pared celular en un etapa temprana del desarrollo de la planta, también impiden *in vitro* la degradación de la pared celular por hidrolasas de hongos como *Aspergillus estearasa*. Han estado implicados en mecanismos de resistencia de la planta, como por ejemplo la resistencia del maíz a insectos como el gorgojo. El Chapalote, una antigua variedad criolla Mexicana, es rico en DAFs y tienen altos niveles de resistencia a insecticidas (15).

Análisis de los ácidos fenólicos enlazados a la pared celular de una planta nativa de china cuyo nombre científico es *Eleocharis dulcis* (*Chinese water chestnuts*) demostraron que el AF y los DAFs fueron liberados por la acción alcalina, antes de que el tejido perdiera su fuerza. La pérdida de la fuerza del tejido de la planta coincidió con la pérdida del 8-8'-aryltetralin formado del 8-8'-diAF, un mínimo componente comparado con las formas más

abundantes de DAFs en las paredes celulares, y este dímero el 8-8´DAF esta usualmente concentrado en los bordes de la superficie de la célula. Estos estudios sugieren que el 8-8´-DAF es un factor importante en la cohesión de la célula, cerrando las paredes celulares y dando una estructura más robusta para el crecimiento de la planta (54).

La Figura 14 muestra la posible asociación de los polisacáridos en las paredes celulares del salvado de maíz. Los heteroxilanos, los cuales están altamente reticulados por los puentes diferulícos, constituyen una red en la cual las microfibrillas celulosicas pueden estar encajadas. Probablemente existen otros enlaces en la pared celular. Las proteínas estructurales de la pared. Las cuales están presentes en el pericarpio del maíz, pueden estar reticuladas juntas por puentes de isoditrosine y con heteroxilanos ferulados, formando así una red insoluble (47).

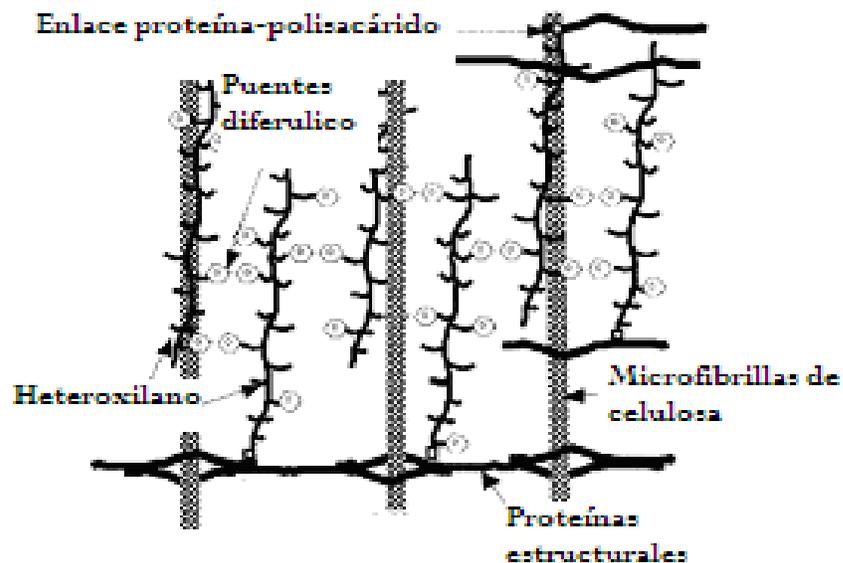


Figura 14. Modelo para las membranas celulares del salvado de maíz (47).

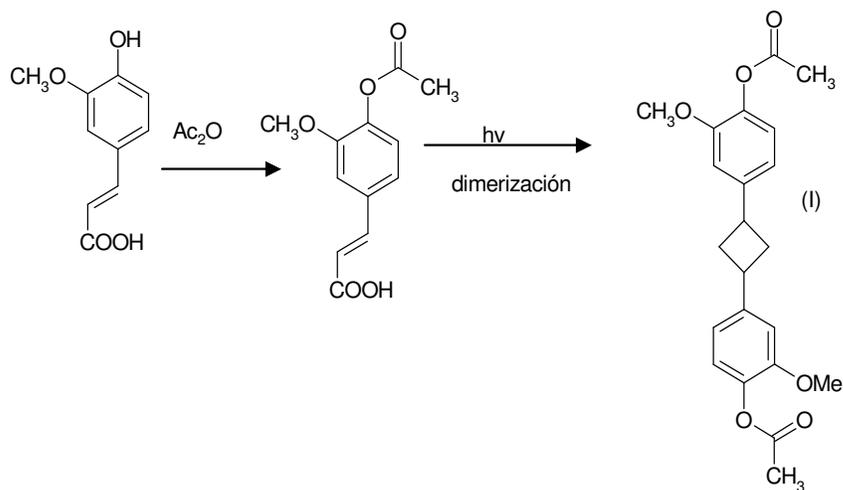
### **3.3.2 Aplicaciones de los dímeros de ácido ferúlico**

Los DAFs pueden contribuir con efectos benéficos en una dieta rica en salvado de cereales. Por ejemplo un producto que contenga 10g de salvado de trigo o salvado de centeno puede contribuir con 10mg de DAFs al ser ingerido. La contribución potencial a la salud a través de la dieta y los mecanismos por los cuales la protección ocurre *in vivo* se desconocen. Los beneficios a la salud que proporcionan los DAFs y el AF han sido relacionados sobre todo a su actividad antioxidante efectiva, protegen a las lipoproteínas de baja densidad de modificaciones oxidativas y reducen arterogenesis. Estos también tienen efectos inhibitorios sobre la promoción de los tumores y pueden bloquear la formación de compuestos mutagénicos como la nitrosaminas. La extensa proporción de estos ácidos hidroxicinámicos presentes en la dieta, los cuales están acoplados con un enlace ester a los polímeros de la pared celular de la planta, no pueden ser absorbidos a través del moco del tracto gastrointestinal de esta forma. La actividad de una esterasa es necesaria para romper los enlaces ester y liberar los ácidos dentro del lumen del intestino y entonces ya disponibles para la absorción a la sangre o el futuro metabolismo. Muy probablemente el colon es el sitio donde se liberan los DAFs. Las esterasas son capaces de liberar los DAFs, de fuentes dietéticas por ejemplo el salvado de cereales, y están presentes en el tracto gastrointestinal de mamíferos incluyendo a los humanos, los DAFs pueden ser absorbidos a través de la barrera gastrointestinal y entrar a la circulación periferal de los mamíferos. El 8-O-4 diAF es el dímero que se hidroliza mas eficientemente en el intestino de ratas, en particular por la esterasa de la mucosa duodenal y por el contenido del intestino largo, además este dímero inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad más eficientemente que el AF. Se ha propuesto que los DAFs pueden funcionar a través de interacciones con receptores de la pared celular de una manera similar a ligninas relacionadas estructuralmente, dando un mecanismo para sus efectos propuestos, previniendo y retrasando el progreso de enfermedades degenerativas de largo plazo (52).

Los descubrimientos han permitido también nuevas aplicaciones de los DAFs, por ejemplo la remolacha de caña de azúcar, rica en DAFs y en la cual se han podido manipular los niveles de AF y DAFs; enlazados a polisacáridos. Tratando la pulpa con peroxidasa y peróxido

de hidrogeno y cambiando así sus propiedades de gelificación en varias fracciones de pulpa. Ampliando así los usos en alimentos (59).

El ácido O-acetilferulico bajo fotodimerización en estado cristalino, da el dímero: ácido c-2, t-4-di(4-acetoxy-3-metoxifenil) r-1, t-3-ciclobutanedicarboxílico (I) con altos rendimientos, este nuevo dímero I (Figura 15) se utiliza como intermediario para nuevos materiales foto funcionales y medicinas sedantes. El dímero I se convierte con calor en polifenil ester por condensación, eliminando dos moléculas de ácido acético y dando como resultado un polímero y finalmente una poliamida con un anillo de ciclobutano (56).



**Figura 15.** Reacción de obtención del dímero I utilizado para la polimerización (56).

Los enlaces de los DAFs juegan un papel importante en la adhesión célula-célula por lo que tienen efectos significativos en la textura de los alimentos derivados de plantas y en mantener la textura durante la cocción y también tienen propiedades antioxidantes (16).

### **3.3.3 Actividad antioxidante de los dímeros de ácido ferúlico**

Como algunos antioxidantes sintéticos pueden exhibir toxicidad, requieren de altos costos de manufactura y muestran menor eficiencia que los antioxidantes naturales, existe una necesidad para identificar antioxidantes naturales posiblemente más económicos y efectivos con potencial para ser incorporados en la industria de los alimentos (3).

Los DAFs son antioxidantes naturales y son inhibidores más efectivos de la peroxidación lipídica que el ácido ferúlico en una base molar. La habilidad de estos compuestos fenólicos para secuestrar los radicales como el ABTS en una fase acuosa parece estar relacionada con la existencia de una molécula con un sistema de conjugación lleno (6).

La dimerización del ácido ferúlico afecta la capacidad antioxidante siendo esta dependiente de la posición del enlace entre los monómeros. Así la actividad antioxidante que se presenta al formarse el dímero dependerá de la terminación de la cadena alifática, el número total de grupos hidroxilo fenólicos y del número de sitios disponibles en los que se puede acomodar un electrón desapareado. La capacidad antioxidante se incrementa con más grupos hidroxilo libres y una gran conjugación no interrumpida en la molécula, aunque existen sus excepciones; la mayoría de los DAFs son más efectivos en la fase lipídica que el AF (5).

El dímero 8-8' de AF es el mejor antioxidante en la fase acuosa. Este dímero tiene dos grupos hidroxilo y dos anillos completos de AF lo cual explica su alta actividad antioxidante, su alto grado de conjugación permite una gran deslocalización del electrón desapareado. El 8-5' di AF solo tiene un grupo hidroxilo y un sistema de conjugación interrumpido por un anillo  $\beta$ -O-4, por lo que entre los DAFs su capacidad antioxidante es baja en la fase acuosa (6).

Los dímeros de ácido ferúlico pueden inhibir la oxidación de proteínas de baja densidad (low density lipoproteins, por sus siglas en inglés LDL) por diferentes mecanismos como: actividad secuestrante de un radical libre, quelación metálica, regeneración de los antioxidantes LDL endógenos (4).

La medición de la capacidad antioxidante de los dímeros de ácido ferúlico en sistemas acuosos, por secuestro del radical ABTS, muestran que el 8-O-4diAF es mejor antioxidante que el 8-5benzofuran-diAF y 5-5diAF. Si las estructuras químicas de estos tres compuestos es analizada se esperaría que el 5-5diAF fuera el mejor antioxidante debido a que tiene dos grupos hidroxilo libres en su molécula comparado con un solo grupo hidroxilo libre por molécula que tiene el 8-O-4diFA y el 8-5benzofurano-diFA (5).

### **3.3.4 Fuentes de los dímeros de ácido ferúlico**

La pared celular de plantas y cereales de familias de monocotiledonias y dicotiledonias contienen AF, ácido hidroxicinámico junto con cantidades pequeñas de ácido p-coumarico y DAFs (7).

Investigaciones de la fibra dietética insoluble (FDI) de trigo, centeno, cebada, avena, maíz, arroz y mijo permitieron la identificación de nuevos DAFs. En la forma esterificada 8-8´-aril DAF y 5-5´ DAF predominan en la FDI de estos cereales con 46-60% de la suma de DAFs. Más del 60% de total de los enlaces de DAFs son enlaces eter. Se estima gran cantidad de DAFs esterificados así como eterificados en el mijo, seguido del maíz. El contenido de DAFs en el trigo, centeno y cebada es cerca de dos o tres veces menor que en el mijo pero cerca de dos veces mayor que en la avena y el arroz. La FDI (fibra dietética insoluble) del mijo y el trigo contienen grandes cantidades de AF esterificado 15mg /g seguido del maíz con 10mg/g. Por otro lado las cantidades de AF en la FDI del arroz o avena son cinco veces menores (3 mg/g) (Tabla 1). El centeno y la cebada están a la mitad de estos extremos con una cantidad de 6-7 mg/g de AF esterificado (48).

**Tabla. 1** Cantidad de AF y DAFs después de un tratamiento alcalino con NaOH 1 M y temperatura ambiente (48).

	Cebada	Maíz	Avena	Arroz	Centeno	Mijo	Trigo
Ácido coumarico (µg/g)	151	502	503	310	665	4219	283
AF (µg/g)	6401	10318	3328	3046	7183	18573	15224
DAF (µg/g)	367	677	153	-----	222	954	288

En la remolacha de azúcar las cantidades de DAFs varían en los diferentes tejidos en la misma planta: en las hojas el 8-8 diAF es el más abundante, mientras que el 8-0-4´ diAF predomina en el resto de la planta. Aun no se conocen las causas de estas variaciones del grado de enlaces y de la naturaleza de enlaces formados. De todas formas el grado y la naturaleza de enlace afectan las reacciones entre los DAFs. En la remolacha de caña de azúcar se ha demostrado la presencia de DAFs, pero no ciclodímeros, los principales cuatro DAFs encontrados son 5-5´, 8-0-4´, 8-5´ y 8-8´, el más abundante es el 8-5´. La suma de los DAFs representa el 0.1% de la pared. Por lo que podemos concluir que el AF se acopla en una variedad de dímeros sugiriendo que los entrecruzamientos de las cadenas laterales de arabinanos y/o arabinogalactanos ocurre en la pared celular (47).

Entre los subproductos agrícolas, los cuales son fuentes potenciales de AF, el maíz es una de las más prometedoras. El AF constituye cerca de 0.14% en granos de cebada, 0.66% en trigo, 0.8% en remolacha de azúcar, 0.5% en la pared celular del endospermo de arroz y 3.1% en el maíz (20).

El nejayote (Figura 16), un subproducto de la industria del maíz, es una fuente rica en AF y DAFs y se compone principalmente de pared celular secundaria de tejidos del pericarpio; esta contiene celulosa (22% ), pero el mayor polisacárido (50%) es un heteroxilano compuesto principalmente de arabinosa y xilosa con pequeñas cantidades de galactosa, ácido glucoronico y fenólico. Se estima que en el nejayote de maíz hay aproximadamente 2.61 % de AF y 1.33% de DAFs. Se calcula que por cada molécula de heteroxilano hay 15 moléculas de DAFs (27).

La nixtamalización es un proceso indígena de las culturas Mesoamericanas, conocido desde tiempos prehispánicos, consiste de un cocimiento alcalino del maíz en una solución de cal ó hidróxido de calcio. Este proceso es responsable de importantes características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales de los productos del maíz incluidos el retiro del pericarpio, la incorporación del calcio dentro del núcleo, mejorar la biodisponibilidad de la niacina y la formación de compuestos de sabor y color que imparten características organolépticas típicas al producto final (52).



**Figura 16.** Proceso de Nixtamalización del maíz (67).

### **3.3.5 Obtención de los dímeros de ácido ferúlico**

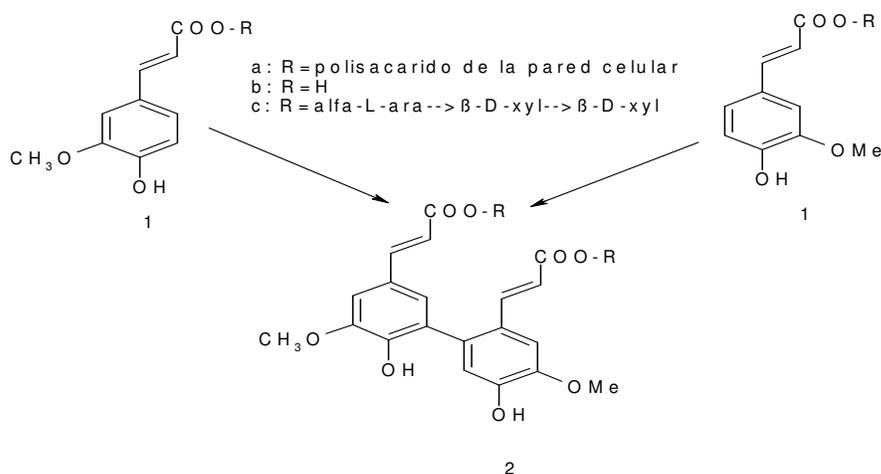
Los DAFs no están comercialmente disponibles y su síntesis química no es fácil. Especialmente la síntesis del 8-8´ diAF y el 8-0-4´ diAF es una tarea agotadora, la síntesis del 8-0-4 se lleva a cabo en 9 pasos (32).

La formación del ácido 5,5´-diAF comprende reacciones en condiciones difíciles y la utilización de reactivos peligrosos. Richitzenhain (13) ha reportado la primera síntesis de este dímero en 4 pasos, pero el método no es frecuentemente reproducible y no puede ser usado para preparar una cantidad sustancial del dímero, uno de los principales obstáculos es el acoplamiento de vainillina a di-vainillina en un sistema acuoso, el cual contiene peroxidasa y peróxido de hidrógeno. Esta reacción no es recomendable para un experimento a gran escala, debido a la pobre solubilidad de la vainillina en agua y dificultad para controlar la reacción.

El 8-5 DAF puede ser preparado por un método relativamente simple, utilizando óxido de plata, como oxidante, pero la separación de los productos no es trivial. El método de óxido de plata y probablemente otros métodos, dan rendimientos de 30%, pero el compuesto sintetizado está contaminado por otros componentes y su separación no es fácil (53).

Los DAFs son evidentes en extractos saponificables de una gran variedad de plantas y cereales. Por lo que otra forma de obtenerlos es a partir de la extracción de fuentes naturales en donde se forman por acoplamientos del AF para formar ésteres de ferulato por medio de una reacción de dimerización. La dimerización de tales ésteres de ferulato proporcionan una ruta para enlazar las cadenas de polisacáridos. Dos mecanismos diferentes para la dimerización han sido descritos: la ciclodimerización inducida [2+2] la cual es el mecanismo predominante y el acoplamiento oxidativo vía peroxidasa para producir los DAFs (58). La dimerización es posible por acoplamiento fotoquímico o cicloadición fotoinducida entre los carbonos de etileno de dos ácidos fenólicos que conduce a la formación de dímeros tipo ciclobutanos como el truxílico. El AF también es capaz de experimentar la dimerización por acoplamiento oxidativo a radicales el cual puede ser catalizado por varios sistemas como peroxidasa/peróxido de hidrógeno (mediado por la

peroxidasa y usando como cofactor el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )), polifenol oxidasa y lacasas para conducir a la formación de DAFs (Figura 17) los cuales van a estar enlazados a la matriz de polisacáridos (31,10). Estos enlaces ocurren en la pared celular o intracelularmente durante la biosíntesis de la pared celular (15).



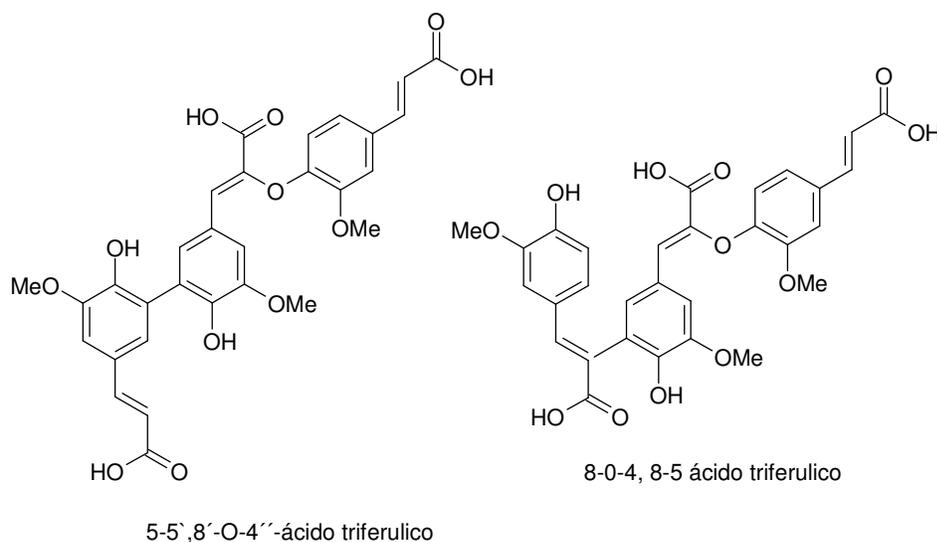
**Figura 17.** Mecanismo propuesto para la formación de los enlaces químicos en la pared celular de las plantas. Saponificación alcalina o digestión de los a) ésteres de polisacáridos de la pared celular b) ácidos libres o c) ésteres de oligosacáridos, respectivamente. El 1 (AF) que es esterificado a polímeros de la pared celular es de vital importancia ya que forma enlaces entre sí para producir 2 (DAFs) en este caso el 5-5 diAF (13).

Lignin peroxidasa (LIP) es considerada como un de las enzimas más importantes del sistema de degradación lignina extracelular, secretada por el hongo blanco de la putrefacción *Phanerochaete chrysosporium*. La LIP puede oxidar una amplia gama de sustratos y por lo tanto tener aplicaciones potenciales, inadecuadas para peroxidasa menos potentes. Los compuestos fenólicos son oxidados para generar radicales fenoxi, los cuales se acoplan con otros sustratos para formar productos dimericos, oligomericos y poliméricos. Este fenómeno puede ser explotado para la producción biocatalítica de oligómeros y polímeros útiles, así como el tratamiento de aguas residuales con compuestos fenólicos tóxicos. La peroxidasa cataliza la oxidación del AF esterificándolo a los polisacáridos de la pared celular primaria de las plantas dando como resultado la formación de DAFs y como consecuencia el incremento de la rigidez y fuerza de la pared celular. Los

DAFs formados por el acoplamiento oxidativo de AF son antioxidantes más efectivos que el AF solo (60). La asociación oxidativa vía esterificación del AF de las paredes celulares de las plantas por acción de las peroxidasas produce muchos regio-isómeros diferulícos (6,11).

### **3.4 Trímeros de ácido ferúlico**

Debido a la naturaleza reactiva del AF y a las reacciones de polimerización de las peroxidasas de la pared celular, es más probable que los trímeros y los compuestos poliméricos largos sean formados por el acoplamiento radical del AF de la planta. Por la naturaleza química de la polimerización radical generada, el grado de acoplamiento puede continuar hasta que la reacción es limitada por el agotamiento del sustrato o por la naturaleza física de la pared celular, controlando el movimiento y la flexibilidad de los polisacáridos ferulados. Se ha postulado que los arabinoxilanos ferulados solubles en la pasta del pan intervienen con la formación de la red de proteínas del gluten por acoplamiento oxidativo con el AF libre. Los triferulícos (Figura 18) y productos más grandes hacen la principal contribución de enlaces en los polisacáridos de la pared en las células del maíz. Cuatro diferentes triferulícos de AF se han identificado recientemente en el maíz. La cantidad de triferulícos de AF en el salvado de maíz corresponde a 0.05%, 0.01% y 0.0075% en peso seco de las paredes celulares del maíz, en comparación con el 1.3% del total de niveles de DAFs y 2.6 % de AF monomérico en el salvado de maíz (54). Recientemente se ha reportado la formación de trímeros de ácido ferúlico que se encuentran unidos a polisacáridos los cuales tienen un interés tecnológico debido a que se encuentran enlazados covalentemente, lo cual los hace estables a la temperatura y no exhiben sinéresis después de largos tiempos de almacenamiento (40).



**Figura 18. Ácidos dehidrotriferulícos.** Estructuras de (8-0-4/8-5 (no cíclico)- ácido dehidrotriferulíco) y (5-5/8-0-4 (H<sub>2</sub>O) ácido dehidrotriferulíco (26,59).

### **3.5 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante**

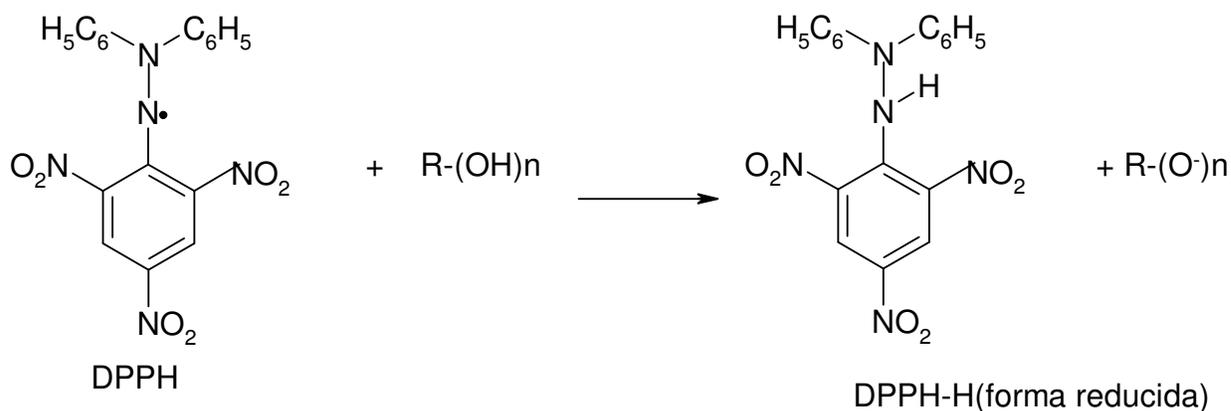
Los antioxidantes se usan en una gran cantidad de productos alimentarios. Su actividad está influida por la temperatura, la composición del alimento, la estructura del alimento y la disponibilidad de oxígeno, también varían los constituyentes de los alimentos como el agua las proteínas, los carbohidratos, las vitaminas, los minerales y otros componentes, así como la estructura física del alimento. La suma de todos estos factores puede provocar grandes cambios en la actividad antioxidante en los diferentes alimentos (37). Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para determinar la actividad antioxidante, de compuestos tanto naturales como sintéticos, que consisten en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de antioxidantes. Estos métodos pueden ser clasificados de acuerdo a la estrategia de detección y de cuantificación.

### **3.5.1 Métodos de captación de radicales**

La captación de radicales es el principal mecanismo de acción de los antioxidantes en los alimentos. Se han desarrollado muchos métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la captación de radicales libres sintéticos en disolventes orgánicos polares, por ejemplo metanol, temperatura ambiente. Los radicales usados son del tipo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) (ABTS).

#### ***Método radical DPPH***

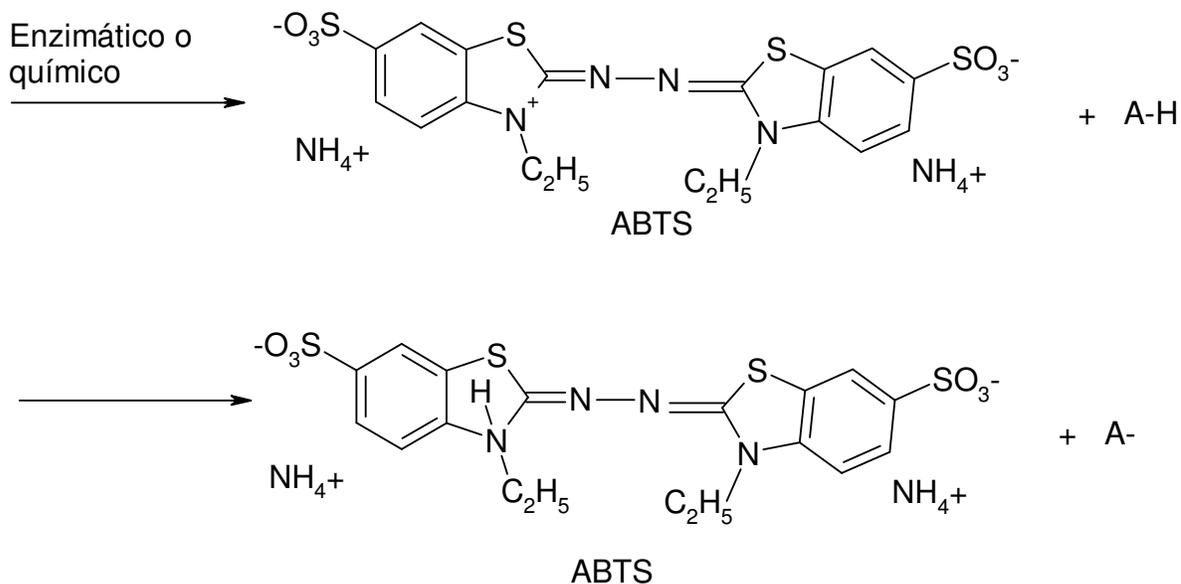
Este método es representativo de los métodos que utilizan radicales para la evaluación de la actividad antioxidante y es uno de los más utilizados debido a la rapidez, sensibilidad, excelente estabilidad del radical, reproducibilidad y bajo costo del ensayo. El DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo) es un radical cromóforo, que al reaccionar con un agente donador de electrones AH, es reducido a su forma DPPH-H (Figura 19). Un cambio en el color, púrpura (forma oxidada) a amarillo (forma reducida), indica que tan activo es el antioxidante que se está evaluando. Este ensayo puede utilizarse cualitativamente utilizando cromatografía en capa fina, en donde después de eluir el compuesto que se está probando, la cromatoplaque de gel de sílice roseada con una solución alcohólica de radical DPPH; la aparición de una coloración amarilla en el fondo púrpura indica una prueba positiva. La prueba cuantitativa consiste en hacer reaccionar una solución  $3 \times 10^{-5}$  M de radical DPPH con una solución del antioxidante a concentraciones conocidas y monitorear el cambio de color en un tiempo determinado midiendo la absorbancia de la mezcla a 517nm. Algunas desventajas de este método son que el DPPH únicamente puede ser disuelto en medios orgánicos, especialmente en medios alcohólicos, no acuosos, lo que representa una limitación importante del método cuando se miden actividades de antioxidantes de naturaleza hidrofílica, además presenta poca correlación entre resultados de otros métodos (68).



**Figura 19.** Reacción del Radical DPPH con un antioxidante (68)

### Método radical ABTS

En este método, el radical ABTS debe ser generado por oxidación del ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). Esta reacción de oxidación puede ser generada químicamente utilizando agentes oxidantes como persulfato de potasio o dióxido de manganeso o enzimáticamente empleando enzimas como mioglobina o peroxidasa tipo II (HRP) (Figura 20). La reacción entre el persulfato de potasio y el ABTS tiene una estequiometría 1:0.5, lo que provoca una oxidación incompleta del ABTS para formar el radical ABTS; esta reacción dura 24 horas (68).



**Figura 20.** Reacción del radical ABTS con un antioxidante (68).

### **3.5.2 Métodos de valoración del estado real de un aceite o una muestra de alimento**

Se pueden aplicar varios métodos para valorar el estado de un aceite o una muestra de alimento. Para que pueda ser aplicado con este fin, es necesario diseñar experimentos en los que el antioxidante venga incorporado en el alimento y éste se almacene en condiciones controladas.

#### ***Análisis sensorial***

Para la industria alimentaria la detección de sabores y olores inadecuados a través del gusto y el olfato es el principal método para deducir cuando un alimento con base lipídica no es apto para el consumo por más tiempo. En consecuencia, cualquier antioxidante usado en alimentos se valora finalmente por su capacidad para alargar el periodo previo a la detección de sabores y olores inadecuados. El uso de paneles de catadores entrenados en la detección de sabores y olores oxidativos inadecuados permite la detección de deterioro oxidativo en un estadio temprano, aunque su principal problema sea que los diferentes individuos varían en su sensibilidad a estos sabores y olores dependiendo de su estado de salud y otras variables (37).

#### ***Índice de peróxidos (IP)***

El índice de peróxidos es el método químico más frecuentemente utilizado para la medición del deterioro oxidativo de los aceites. Los métodos tradicionales de determinación del IP suponen la titulación de un aceite que contiene yoduro potásico, en una mezcla de cloroformo ácido acético. Los hidroperóxidos oxidan el yoduro a yodo el cual es medido por titulación con tiosulfato de sodio (37).

### Método de blanqueo con $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

En esta prueba se utiliza el  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico, en donde se forman radicales libres por oxidación del ácido linoleico que atacan al  $\beta$ -caroteno y provocan una disminución en el color amarillo característico de este compuesto. El antioxidante se pone en contacto con esta emulsión y se monitorea la pérdida del color midiendo la absorbancia de la solución a 470 nm, un antioxidante eficaz evitara una disminución mayor en la absorbancia (Figura 21). El blanqueo con  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico es ampliamente utilizado debido a su sensibilidad, bajo costo de los reactivos y poco tratamiento a la muestra. Algunas de las desventajas que presenta el método son: la preparación de la emulsión debe darse bajo las mismas condiciones en cada ensayo, ya que puede afectar la reproducibilidad de los resultados (68).

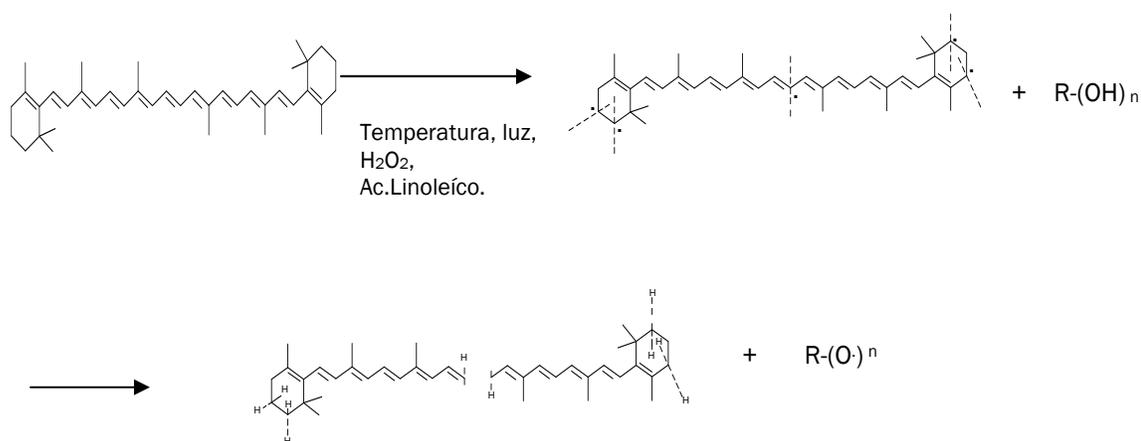


Figura 21. Reacción con  $\beta$ -caroteno (68).

### 3.5.3 Métodos de seguimiento de los cambios provocados por la oxidación

#### Ganancia de peso

Los aceites comestibles incrementan su peso durante las etapas iniciales de la oxidación de lípidos, ya que los ácidos grasos se combinan con el oxígeno durante la formación de los hidroperóxidos. El aumento de masa de una muestra calentada durante su almacenamiento

puede usarse para determinar el tiempo de inducción de la grasa. Tras el período de inducciones produce una rápida ganancia de masa, por lo que se puede cuantificar el tiempo necesario para que se produzca una determinada ganancia. Sin embargo, la descomposición de los hidroperóxidos conduce a una reducción de peso a pesar de que la grasa esta fuertemente oxidada al final del período de inducción (37).

#### **3.5.4 Métodos predictivos**

Son aquellos en los cuales las muestras son controladas de forma continua en condiciones de oxidación acelerada.

##### ***Oxipres***

El Oxipres fabricado por Mikrolab Aarhus (37), es un método que permite el examen de la estabilidad oxidativa de productos heterogéneos tales como las papas fritas, la margarina o la mayonesa. La oxidación se acelera por calentamiento y por el uso de oxígeno a presión. Se mide la caída de presión que se produce en un vaso de presión de vidrio que contiene la muestra y que esta relleno con oxígeno a una presión máxima de 10 bares. El instrumento consiste en una unidad de presión, un bloque calefactor que puede calentar dos muestras hasta los 150 °C y una bomba que permite la introducción de la muestra hasta el vaso de vidrio. La presión de la bomba se mide electrónicamente y se transfiere a una PC (37).

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Material y Equipo

#### *Materia prima*

El AF y los DAFs se obtuvieron del nejayote recolectado de dos molinos de nixtamal distintos, ubicados en la zona sur del área metropolitana del D.F. y de una nixtamalización llevada a cabo en el laboratorio.

#### *Disolventes y Reactivos*

Ácido Ferúlico (Ec. No. 214-490-0), ácido cumárico, ácido galico (Aldric Chemical Company), como referencias. Trolox,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico ABTS, DPPH (SIGMA-CHEM).

Metanol, etanol, butanol, octanol, dodecanol, acetato de etilo, ácido acético, cloroformo, éter de petróleo, éter etílico, hexano, diclorometano, acetona, HCL (J. T. BAKER).

Carbón activado, amberlita XDA7 (SIGMA). Polivinilpirrolidona (ALDRICH).

Saccharomyces cerevisiae, Glucosa, Peptona (Bioxon).

Peroxidasa (Donor hydrogenperoxide oxidoreductase; Ec. 1.11.1.7, 50000 unidades, p-8250, SIGMA). Lipasa de Candida antartica fracción B, L1 Chirazime (Boehringer Mannheim), Lipasa páncreas porcino (SIGMA), Lipozime RM 1 (Novozymes).

#### *Equipo*

Rotavapor, BUCHI R-205, OAKTON, modelo WP-25

Bomba de vacío, OAKTON, modelo WP-25

Espectrofotómetro CARY 50Bio, UV-visible

Sonicador BRANSON 1510

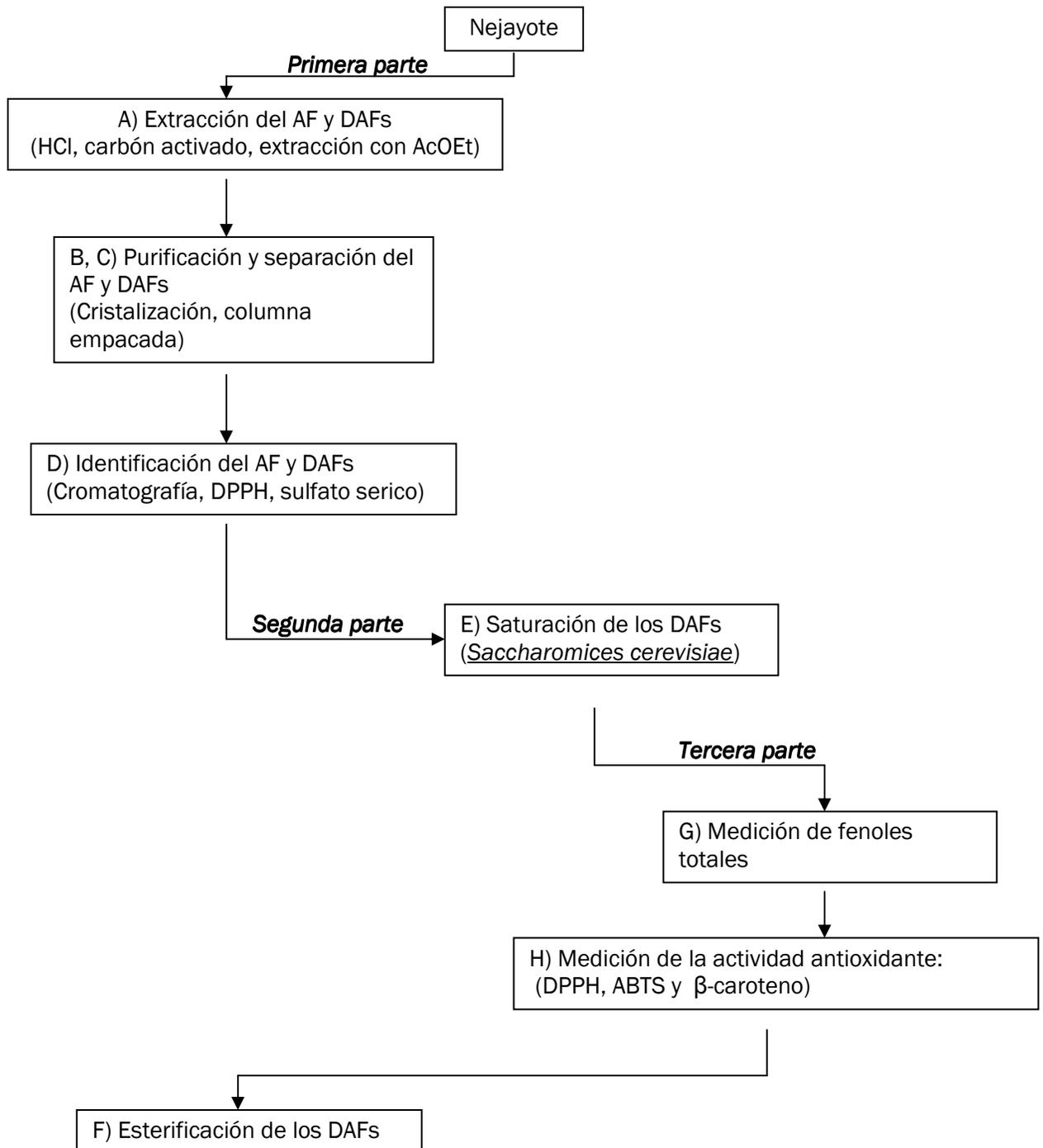
Incubadora agitadora, TERMOLYNE, modelo 3531

Autoclave, HIRAYAMA modelo HA-240MLL

Cámara de UV, CAMAG

Electrothermal MEL-TEMP, 120 VAC, 50/60 Hz

## 4.2 Diagrama General



### **4.3 Metodología**

#### **PRIMERA PARTE**

##### **4.3.1 Obtención de un extracto enriquecido en DAFs a partir del nejayote (A)**

Se recolectaron dos muestras de nejayote de diferentes molinos de maíz y se llevo a cabo una nixtamalización en el laboratorio para obtener otra muestra de nejayote.

Para llevar a cabo la nixtamalización en el laboratorio se colocaron por cada 100g de grano de maíz amarillo 0.7g de cal y 200 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, todo se pone a fuego lento durante 30 minutos, cuidando la temperatura, manteniéndola en menos de 85°C. Transcurrido ese tiempo se talla el maíz tratando de quitar la mayor parte de pericarpio, posteriormente se separa el grano de maíz de las aguas residuales para posteriormente ser tratadas.

Las muestras de los tres diferentes nejayotes se tratan de la misma forma para la extracción de AF y sus dímeros. La extracción para cada nejayote se realiza por triplicado para comparar los rendimientos entre ellos.

Los nejayotes no requieren de una hidrólisis alcalina previa, ya que este forma parte de las aguas residuales de la nixtamalización del maíz y en este proceso se llevo a cabo la saponificación. Todos los nejayotes presentan un pH de 12, se colocan en recipientes adecuados y se les adiciona HCl concentrado hasta obtener un pH de 4 y facilitar la liberación de los compuestos fenólicos. La mezcla anterior se filtra para retirar las cascarillas y la biomasa proveniente de la hidrólisis del maíz durante la nixtamalización. Se adiciona carbón activado (6 g/L de nejayote) y se mantiene en agitación constante durante 1 hora. Después se centrifuga a 1500 rpm durante 15 min a 20 °C para recuperar el carbón activado, o bien se puede dejar en reposo hasta que el carbón activado se precipite en el fondo del recipiente y por decantación lo separemos del nejayote. El carbón activado recuperado se deja secar a temperatura ambiente y el sobrenadante se neutraliza para ser desechado. Se lleva a cabo la extracción del AF y sus dímeros colocando el carbón activado

seco en un matraz y se le adiciona acetato de etilo caliente para facilitar la solubilidad del AF y sus dímeros, manteniéndose en agitación constante durante 15min. Se lava el carbón activado 2 o 3 veces, hasta que el acetato de etilo ya no presente coloración amarilla, las fracciones de los lavados de cada nejayote por separado se juntan para posteriormente concentrarlas hasta sequedad, evaporando el acetato de etilo en un rotavapor a 30 °C y finalmente se pesan.

Una vez que se calculan los rendimientos de cada nejayote, los extractos obtenidos se juntan para obtener una mayor cantidad de DAFs. Además se lleva a cabo la extracción de DAFs y AF a partir de 25 L de nejayote.

Con la finalidad de hacer esta metodología más rápida y eficiente, ya que la filtración del carbón activado es muy lenta, se probó la extracción del ácido ferúlico y sus dímeros con dos nuevos materiales amberlita y polivinilpirrolidona, siguiendo los mismos pasos que se llevaron a cabo para la extracción con carbón activado.

#### **4.3.2 Purificación del extracto enriquecido en DAFs: Cristalización del AF (B)**

El extracto obtenido, el cual tiene ácido ferúlico y dímeros de ácido ferúlico, se disuelve en la mínima cantidad de agua caliente, para ayudar a disolver se adicionan algunas gotas de acetona hasta total disolución del extracto y se continúa evaporando agua hasta eliminar 1/3 del agua que se agregó al inicio. Se deja enfriar lentamente, a temperatura ambiente; los cristales son recuperados por filtración a vacío y las aguas madres son concentradas en el rotavapor a 35-40 °C.

#### **4.3.3 Separación de los dímeros de ácido ferúlico mediante una cromatografía en columna empacada (C)**

Se empacó una columna de vidrio con celulosa. Se colocó la muestra enriquecida de dímeros en la columna y se eluyeron con 500 mL de las siguientes mezclas de disolventes: diclorometano/hexano 3:7, diclorometano/hexano 5:5, diclorometano/ácido acético 9.5:0.5, diclorometano/AcOEt 9:1, diclorometano/AcOEt 1:1, AcOEt/ ácido acético 9.5:0.5,

MeOH/ AcOEt 1:1, MeOH, MeOH/ agua 1:1, cada fracción obtenida fue concentrada y analizada por CCF.

#### **4.3.4 Caracterización de los dímeros e hidrodímeros de ácido ferúlico por cromatografía en capa fina (D)**

El extracto resultante es un polvo amarillo claro el cual se disuelve en acetato de etilo (0.5g muestra / 5 mL de AcOEt.) a su vez se prepara un patrón de AF (0.1g de AF/ 3 mL de AcOEt) y en una placa cromatográfica de gel de sílice se aplican todas las muestras preparadas con una micropipeta pasteur en las mismas proporciones, la placa preparada se introduce en una cámara de elusión empleando como eluyente una mezcla de disolventes (cloroformo/ácido acético, 9:1). Una vez que se corrió toda la placa se observa en una cámara de UV-Visible y posteriormente se revela con una solución de DPPH.

### **SEGUNDA PARTE**

#### **4.3.5 Obtención de los hidrodímeros de ácido ferúlico (E)**

Se activan las levaduras (2 g) en agua (20mL) y se ponen en agitación durante 30min. Posteriormente se agregan las levaduras activadas (1 mL) en el caldo YM (50 mL) y se incuban 60 h a 259 rpm y 30 °C. Transcurrido ese tiempo se toma el 10% de la mezcla y se coloca en un matraz con caldo YM (25 mL) para dejarlo incubando por 24 horas más. Se adiciona a la mezcla de reacción el extracto enriquecido en DAFs (25mg de muestra / 0.1mL de NN-dimetilformamida, para favorecer su disolución) y se deja incubando por 48 horas bajo las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se ajusta el pH a 2 con HCl (6N) y se realizan de 2 a 3 extracciones con 200 mL de acetato de etilo. Finalmente se juntan las fracciones y se llevan a sequedad en un rotavapor a 30 °C.

#### **4.3.6 Esterificación de los DAFs (F)**

Se disuelven 5 mmol de DAFs en 5 mL de tolueno y se colocan en un matraz de reacción, se adiciona la enzima lipasa a este matraz y se deja en incubación a una temperatura de 30 °C y agitación constante por 12 a 24 para dar tiempo a que reaccione todo el sustrato. Se enfría la mezcla de reacción a 3 °C. La mezcla de reacción se extrae tres veces con 10 mL de una solución de bicarbonato de sodio saturada, se le agrega carbón activado y se filtra al vacío sobre tierra de diatomeas, al filtrado se le adiciona sulfato de sodio anhidro para secar y posteriormente se concentra a sequedad.

### **TERCERA PARTE**

#### **4.3.7 Determinación de fenoles totales (G)**

La cantidad de Polifenoles totales se determina con el método descrito por Mattheus (70). Se tomaron 2 mL de la solución del extracto alcohólico del concentrado y se llevaron a un volumen de 5 mL con HCl 0.3%. Se tomo una alícuota de 100 µL de la solución resultante y se colocan en 2 mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2% después de dos minutos se adicionaron 100 µL del reactivo folin-ciocalteau (diluido con agua 1:1). Transcurridos 30 minutos se mide la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro. La concentración de polifenoles se calcula usando ácido gálico como estándar (Anexo) y los resultados se expresan como mg de ácido gálico por g de muestra.

#### **4.3.8 Evaluación de la Actividad Antioxidante (H)**

##### **Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)**

La determinación de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH es un método para evaluar la actividad antioxidante de los extractos en un corto tiempo. Con este método es posible poder determinar el poder antirradical de un antioxidante midiendo el decremento en la absorbancia del DPPH a 517 nm. La absorbancia disminuye como resultado de un

cambio de color de púrpura a amarillo, cuando el radical DPPH es secuestrado por un antioxidante a través de la donación de un hidrogeno para formar una molécula diamagnética estable.

El efecto de los extractos sobre el radical DPPH se estimó de acuerdo al procedimiento descrito por Siddhuraju (69). Se adicionaron 2 mL de una solución metanólica de DPPH  $3.6 \times 10^{-5}$  M a 50  $\mu$ L del extracto (200 ppm). El decremento en la absorbancia a 517 nm se registró continuamente durante 20 min a temperatura ambiente. El efecto secuestrante (decremento en absorbancia a 517 nm) se graficó en función del tiempo.

El porcentaje de la capacidad secuestrante (%CS) sobre el radical DPPH se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%CS_{DPPH} = \frac{\text{absorbancia}_{t=0} - \text{absorbancia}_{t \text{ final}}}{\text{absorbancia}_{t=0}} \times 100$$

El valor  $IC_{50}$ , representa la concentración de extracto que causa el 50% de la inhibición de radicales DPPH, fue determinado por análisis de regresión lineal de los valores obtenidos de la capacidad secuestrante de los radicales libres a diferentes concentraciones (5, 50, 100, 150, 200 y 300 ppm).

### **Capacidad secuestrante sobre el radical, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol)-6 sulfónico (ABTS<sup>+</sup>)**

El radical ABTS a diferencia del radical DPPH debe ser generado por una reacción enzimática (peroxidasa, lacasas y mioglobina) o química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio). En este caso el radical se generó vía una reacción enzimática, ya que es mucho más rápida, hay menos interferencias y se utiliza una menor cantidad de muestra.

En este método se monitorea la disminución de la absorbancia a 730 nm por el cambio de color verde (ABTS forma oxidada) a amarillo (ABTS forma reducida), que corresponde a la reacción del radical y el antioxidante.

En una celda se colocan 0.5 mL de  $H_2O_2$  15  $\mu$ M, 0.5 mL de ABTS 2 mM y 0.5 mL de peroxidasa (1 mg/mL en un buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5), se mezclan y se registra la absorbancia a 730 nm cada minuto durante 3 minutos, transcurrido este tiempo

se adicionan 0.5 mL del extracto del antioxidante a la mezcla de reacción y se registra el decremento en la absorbancia hasta que el cambio sea mínimo. El porcentaje de la capacidad secuestrante (%CS) sobre el radical ABTS se calcula con la fórmula:

$$\%CS_{ABTS} = \frac{\text{absorbancia}_{t=0} - \text{absorbancia}_{tfinal}}{\text{absorbancia}_{t=0}} \times 100$$

#### **Actividad Antioxidante determinada por el blanqueo con $\beta$ -caroteno**

En este método se mide el decremento en la absorbancia a 470 nm del  $\beta$ -caroteno en un sistema de  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico. Se basa en que el radical libre del ácido linoléico formado por la sustracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metilo ataca a la molécula de  $\beta$ -caroteno, la cual pierde sus dobles enlaces y, en consecuencia, su característico color naranja. Los radicales libres que se forman son muy reactivos como los peroxi y alcoxi, similares a los que se generan en un sistema alimenticio que contiene ácidos grasos.

Se satura agua desionizada con aire por 15 minutos, y se prepara una solución de  $\beta$ -caroteno (2 mg/10 mL diclorometano). Se adiciona 1 mL de esta solución en un frasco oscuro el cual contiene previamente 20 mg de ácido linoléico y 200 mg de tween 80, el cloroformo se elimina en un rotavapor a 40°C y se adicionan 50 mL de agua destilada aireada para preparar la emulsión. En un tubo de ensayo que contiene 0.2 mL del extracto (200 ppm) se adicionan 5 mL de la mezcla anterior, inmediatamente se lee la absorbancia a 470 nm (tiempo cero), la mezcla se mantiene en un baño maría a 50°C durante 2 h, transcurrido este tiempo se lee de nuevo la absorbancia (tiempo final). De manera paralela se corre un ensayo control adicionando 0.2 mL de etanol a la solución de  $\beta$ -caroteno con agua aireada. Como blanco usar 0.2 mL de etanol en 5 mL de agua destilada. El porcentaje de actividad antioxidante (% AA) se expresa como:

$$\%AA = \frac{(\text{abs extracto}_{t=\text{final}} - \text{abs control}_{t=\text{final}})}{(\text{abs control}_{t=0} - \text{abs control}_{t=\text{final}})} \times 100$$

#### **4.4 Análisis estadístico**

Los resultados para fenoles totales fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar. Las comparaciones estadísticas entre los métodos y entre las muestras fueron realizadas con un análisis de varianza (ANOVA). La diferencia entre las muestras y entre los métodos fue considerada significativa con un  $\alpha=0.05$ . Una vez que se ha determinado que existe diferencia significativa, es necesario evaluar cuales son diferentes. Con la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (DMS).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### PRIMERA PARTE

La primera parte de este estudio presenta los resultados de la obtención por medio de una extracción con carbón activado a partir de nejayote, purificación de los DAFs cristalizando el AF para retirarlo, columna empacada de celulosa para separar los DAFs y finalmente la caracterización de la materia prima, es decir los DAFs.

#### **5.1 Obtención de un extracto enriquecido en DAFs a partir del nejayote**

Los resultados obtenidos de la cantidad en g de AF y DAFs de cada extracción de nejayote, muestran que efectivamente el nejayote es una fuente rica en DAFs y AF.

De las tres muestras de nejayote (cada una por triplicado), dos provenientes de molinos de nixtamal ubicados al sur de la ZMCM y una de la nixtamalización realizada en el laboratorio. Se obtuvo un extracto que contiene AF + DAFs de cada nejayote, los resultados se muestran en la tabla 2. Como se observa el rendimiento de cada nejayote es diferente, esto se debe a las diferentes condiciones de nixtamalización (grano de maíz, cal y agua) para cada nejayote, así como la variedad de maíz.

**Tabla 2.** Cantidad de AF y DAF de la extracción con carbón activado de diferentes nejayotes.

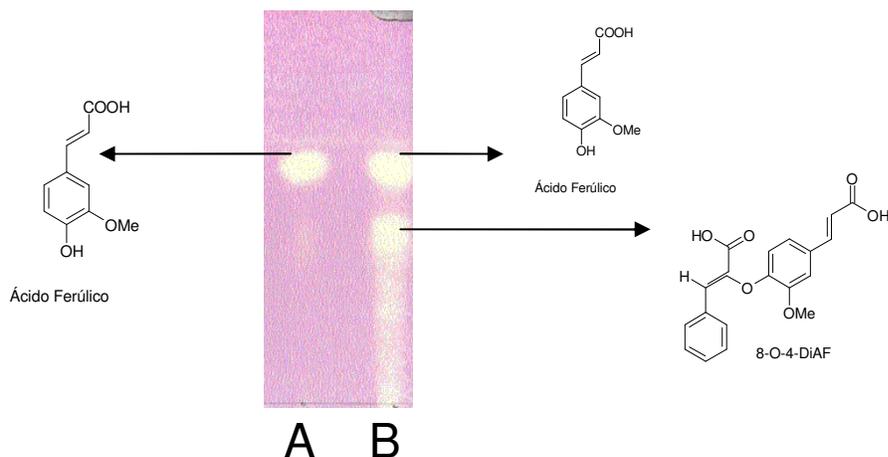
Muestra	g AF y DAFs (mezcla)/L de nejayote
Nejayote 1*	2.05 ± 0.31
Nejayote 2*	1.02 ± 0.03
Nejayote 3*	0.87 ± 0.08

\*Cada muestra de nejayote se trabajó por triplicado

El nejayote 1 pertenece al recolectado después de que se llevo a cabo la nixtamalización en el laboratorio, este es el que presenta mayor cantidad de compuestos debido a que se tuvo el cuidado de separar la mayor parte de pericarpio del maíz. El nejayote 2 y 3 son muestras recolectadas de los molinos de nixtamal y poseen menor cantidad de AF y sus dímeros. Por lo tanto el nejayote 1 tiene un mejor rendimiento que los nejayotes 2 y 3.

En este estudio el mayor rendimiento obtenido es de 2.05 g de AF + DAFs/L de nejayote. Mientras que en la literatura se reporta que con hidrólisis alcalina se obtienen en promedio 2.61% de AF y 1.33% de DAFs en el salvado de maíz, cabe mencionar que estos porcentajes son diferentes dependiendo de la variedad de maíz con que se trabaje (27), y realizando la extracción con un tratamiento enzimático se obtiene 3.18% de AF.

El extracto crudo que se obtuvo fue analizado por cromatografía en capa fina y se muestra a continuación en la figura 22. En el carril A se colocó un patrón de referencia de AF, en el carril B se colocó el extracto crudo, el cual como se observa contiene AF y sus dímeros, de los DFAs se observa el dímero más abundante, el 8-O-4 diAF.



**Figura. 22** Cromatografía revelada con DPPH. A) ácido ferúlico puro, B) extracto crudo obtenido.

En la figura 22 también podemos observar que tanto el AF como los DAFs tienen propiedades antioxidantes. Esto se observa por un cambio de color de púrpura a amarillo, debido a que cuando el radical DPPH es secuestrado por un antioxidante a través de la donación de un hidrógeno para formar una molécula diamagnética estable se produce un cambio de color.

Se probó la extracción de AF y DAFs con dos nuevos materiales amberlita y polivinilpirrolidona. Los resultados de la extracción con tres diferentes materiales se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Mezcla de DAFs + AF obtenida a partir de tres materiales diferentes. (La extracción se realizó por triplicado con cada material).

Material	g DAFs + AF (mezcla)/ L de nejayote
Carbón activado*	2.05 ± 0.31
Amberlita*	0.95 ± 0.06
Polivinilpirrolidona*	0.80 ± 0.01

\*Cada una de las muestras de nejayote se trabajó por triplicado.

La extracción con carbón activado es la que da el rendimiento más alto, sin embargo su manipulación es más difícil, puesto que para separar el carbón activado del nejayote se tienen que filtrar ó centrifugar, la filtración es muy lenta y la centrifugación no es muy eficiente además de que implica mayores costos. Por otra parte, la extracción con amberlita da mejores rendimientos que con polivinilpirrolidona y su recuperación es más rápida y fácil. Con la polivinilpirrolidona se obtuvo el menor rendimiento y su manejo no es tan sencillo. Así que la extracción con amberlita, puede ser otra opción para la extracción de AF y sus dímeros. No hay datos reportados en la literatura de extracción de AF y DAFs con estos materiales, Amberlita y Polivinilpirrolidona.

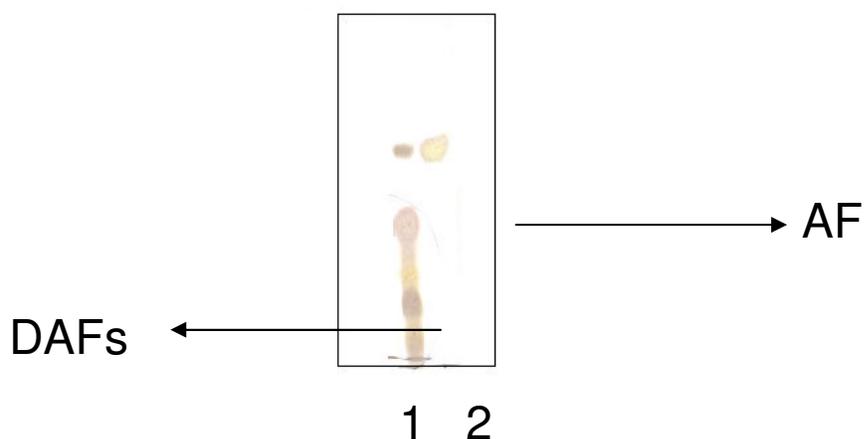
## **5.2 Purificación del extracto enriquecido en DAFs por cristalización del AF**

Una vez que se realizó la extracción del AF y sus DAFs a partir del nejayote, se busca conseguir la separación del AF de los DAFs y así tener un extracto de DAFs o un extracto enriquecido en DAFs y poder llevar a cabo la reacción de saturación del doble enlace.

Se llevó a cabo la cristalización del AF, la cual es muy lenta, aproximadamente 24 horas, sus cristales son agujas muy finas y de color blanco. Una vez se realizó la cristalización del AF en las aguas madres queda un aceite amarillo que contiene a los DAFs, pero debido a la gran cantidad de AF en comparación con los DAFs, en las aguas madre además de los DAFs quedan residuos de AF. Para retirar la mayor parte de AF se cristalizó de 2 a 3 veces. Las

aguas madres fueron concentradas para obtener un extracto enriquecido en DAFs el cual es de color amarillo con trazas de AF.

Después de llevarse a cabo la cristalización del ácido ferúlico se realizó una CCF (Figura 23), con la finalidad de corroborar una pérdida notable de AF. En el carril 1 se colocó el extracto enriquecido en dímeros de ácido ferúlico y en el carril 2 esta el patrón de AF, la placa se reveló con sulfato sérico y muestra que en el extracto enriquecido en DAFs aun existen trazas de AF.



**Figura 23.** 1) Extracto enriquecido en DAFs con residuos de AF, 2) Patrón de AF.

Como se observa en la figura 23, (carril 1) a partir de la cristalización del AF se obtuvo una muestra enriquecida en DAFs, pero no libre de ácido ferúlico.

### **5.3 Separación de los dímeros de ácido ferúlico por columna de separación**

La separación de los dímeros se llevo a cabo en una columna empacada de celulosa. Se colocaron 5g de la mezcla de AF y dímeros, se utilizaron los siguientes eluyentes:

1. Diclorometano/hexano 3:7
2. Diclorometano/hexano 5:5
3. Diclorometano/ac. Acético 9:1

4. Diclorometano/AcOEt 9:1
5. Diclorometano/AcOEt 1:1
6. AcOEt/ ac. Acético 9.5:0.5
7. MeOH/ AcOEt 1:1
8. MeOH
9. MeOH/ agua 1:1
- 10.MeOH/ Ac. Acético 9.5:0.5

Se eluyeron 500ml de cada par de disolventes en la columna de celulosa y se recolectaron por separado las fracciones para posteriormente ser concentradas y analizadas por CCF. Con las fracciones recolectadas del 1 al 7 se obtuvieron compuestos de interés, en las fracciones 8 al 10 solo se limpio la columna. Los resultados de los compuestos obtenidos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Cantidades AF, DAFs y oligosacaridos obtenidas de los 5g de muestra que se colocaron al inicio y se eluyeron por la columna de separación empacada con celulosa.

Fracciones recolectadas (par de disolventes)	g de muestra	compuesto
1. Diclorometano/hexano 3:7	0.7311	AF + DAFs
2. Diclorometano/ac. Acético 9:1	0.167	8-5 di AF
3. Diclorometano/AcOEt 9:1	0.433	8-0-4 di AF
4. Diclorometano/AcOEt 1:1	0.049	Oligosacaridos
5. AcOEt/ 0.5 ac. Acético	0.1632	Oligosacaridos
6. MeOH/ AcOEt 1:1	0.1361	Oligosacaridos
7. MeOH	0.0255	8-5 di AF

Como se muestra en la figura 24 la primera fracción corresponde al AF puro, en la fracción 2 se recolecto el 8-5 di AF, que a pesar de que es mas polar que el 8-0-4 diAF se eluyó primero, (Figura 24, carriles 2-8) con trazas de AF. La fracción 3 nos proporcionó el 8-0-4 diAF también con trazas de AF (Figura 24, carriles 10-14) y una mezcla de los otros dímeros que se encuentran en menor cantidad, con las fracciones 4, 5 y 6 se colectaron los oligosacaridos (Figura 24, carriles 19-21). En la fracción 7 se colectó otra pequeña cantidad del 8-5 diAF.

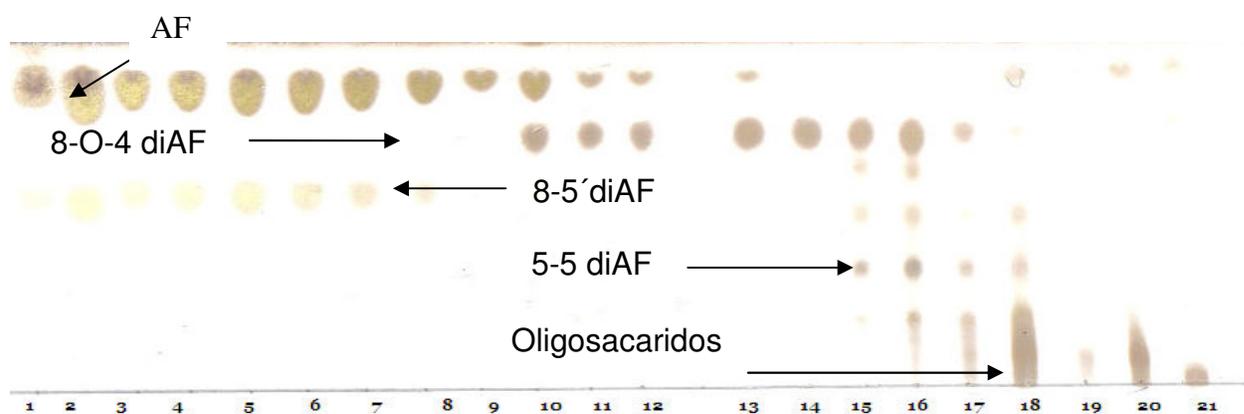


Figura 24. Fracciones recolectadas de la columna de celulosa.

#### 5.4 Caracterización de los DAFs por cromatografía en capa fina

Para verificar los compuestos obtenidos en la extracción anterior se emplea la cromatografía en capa fina (CCF), la CCF es una técnica para la separación rápida y análisis cualitativo de pequeñas cantidades de muestra. La muestra a analizar se comparó con un patrón de referencia de AF puro (SIGMA, Ec. N° 214-490-0). Se obtuvo el frente de referencia (Rf) del AF y de los DAFs y se compararon con los reportados en la literatura (50), se midió el punto de fusión como otro patrón de comparación (Tabla 5).

**Tabla 5.** Punto de fusión y Rf de AF, 8-O-4 diAF y 8-5 diAF obtenidos experimentalmente de los extractos de nejayote.

Compuesto	Punto de Fusión (°C)	Rf (Cloroformo/Acido acetico 9:1)
Ácido Ferúlico	193	0.88
8-O-4 diAF	187	0.71
8-5 diAF	208	0.61

Una vez que se llevó a cabo la separación por cromatografía en capa fina para identificar cada uno de los compuestos se requiere revelar las placas. Se utilizaron tres métodos para revelar las placas, primero se dejan secar y se colocan en la cámara de UV, ya que muchos compuestos presentan fluorescencia bajo luz UV. En este método se observaron al AF y a sus DAFs, claramente. También se revelaron las placas con una solución alcohólica de DPPH (1µmol), con este revelador se puede identificar los compuestos que tienen actividad antioxidante ya que el DPPH es un radical cromóforo que al reaccionar con un agente donador de electrones AH, en este caso los compuestos, se reduce a su forma DPPH-H y se observa un cambio de color de púrpura a amarillo (Figura 22). Por último se revelaron con una solución de sulfato sérico, para poder observar todos los compuestos presentes, que fueron el AF, sus dímeros y oligosacaridos (Figura 23).

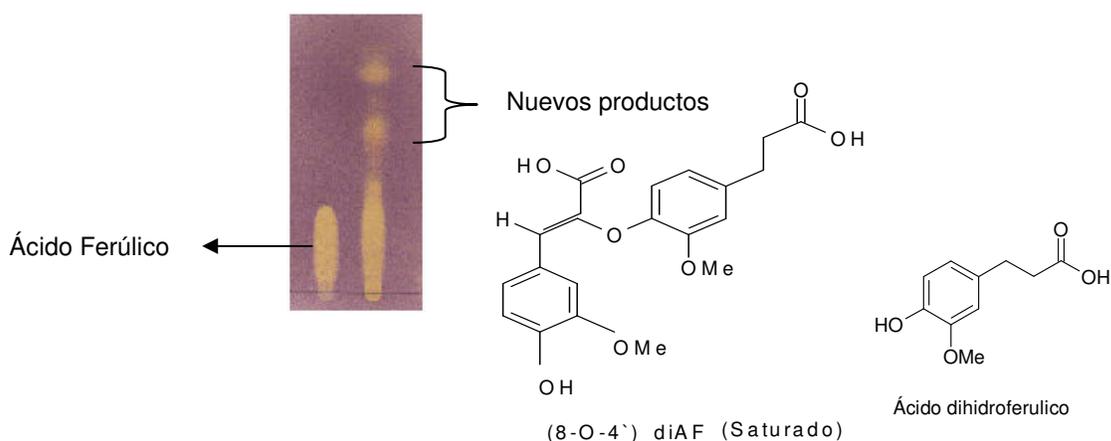
## SEGUNDA PARTE

Al no estar completamente pura la fracción de DAFs, pero si con una notable disminución de la cantidad de AF inicial, se decidió llevar a cabo la saturación del doble enlace tomando en cuenta que reaccionan con mayor facilidad los DAFs que el AF, de acuerdo a lo reportado en la literatura, ya que los DAFs presentan una mayor deslocalización del electrón lo que los hace más viables a la reacción.

### 5.5 Obtención de los hidrodímeros de ácido ferúlico

Para llevar a cabo la saturación con *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron modificaciones al método reportado por XHIAN y colaboradores (28). Las modificaciones realizadas son: cambio de medio de cultivo por el caldo YM y en lugar de llevarse a cabo bajo atmósfera de argón se llevo a cabo en una atmósfera de hidrogeno.

Se llevo a cabo la saturación de los DAFs con *Saccharomyces cerevisiae* en un medio YM, primero se activan las levaduras con agua destilada, se toma un inculo y se incuba en un medio YM a 259 rpm y 30 °C., cuando están en la fase de crecimiento se adiciona el sustrato (los DAFs) al medio. La reacción después de adicionar el sustrato a las levaduras se monitorea durante 48 horas, realizando CCF cada dos horas y se observó la disminución de los DAFs y aparición de dos nuevos productos, al término de las 48 horas se detuvo la reacción, bajando la temperatura a 4°C. Los nuevos productos se obtuvieron después de que la mezcla de reacción fue centrifugada y filtrada para retirar las células muertas, a las aguas madres se les disminuye el pH a 2 y se hace una extracción con acetato de etilo. Los nuevos productos fueron caracterizados por cromatografía en capa fina y se evaluó posteriormente su actividad antioxidante (Figura 25). Se observó la disminución de los DAFs pero no la de AF y la obtención de dos nuevos productos.



**Figura 25.** Compuestos obtenidos después de tratar el extracto enriquecido en DAFs con *Saccharomices cerevisiae*

En la figura 25 se observan los dos nuevos compuestos, por un lado obtenemos los DAFs metilados y por el otro los DAFs saturados, ambos siguen conservando sus propiedades antioxidantes ya que se observa el cambio de color púrpura a amarillo y ambos son menos polares que los DAFs. Después de la acidificación se recuperaron 78mg del ácido dihidroferúlico, lo que corresponde a un rendimiento de 77.8%, el cual es mayor al reportado con AF 54% (28).

Para corroborar que se llevo a cabo la saturación de los DAFs se llevó a cabo una prueba para la muestra recuperada con los nuevos productos, colocando yodo en cloroformo en dos vasos de precipitado, a uno se le adiciona una solución del hidrodímero de AF y al otro una solución del extracto enriquecido sin saturar. En el vaso de precipitado que contienen el extracto enriquecido en DAFs sin saturar se observa una decoloración del yodo y en el otro vaso que contienen el hidrodímero de AF no se observa la decoloración del yodo.

### **TERCERA PARTE**

La reacción de saturación del doble enlace de los DAFs con *Saccharomyces cerevisiae* se llevó a cabo con un alto rendimiento y lo que sigue es conocer las propiedades antioxidantes de este nuevo compuesto y compararlas con los extractos originales, para lo cual se mide el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante (AAO) con tres métodos.

#### **5.6 Determinación de fenoles totales**

La concentración de compuestos fenólicos fue determinada de acuerdo al método descrito por Matthäus (70), la cual esta basada en la reacción de polifenoles con el reactivo Folin-Ciocalteau. El contenido de fenoles totales de cada extracto fue determinado usando una curva estándar de ácido gálico. Se evaluó el contenido de fenoles totales, del extracto crudo que contiene DAFs y AF, del extracto enriquecido en DAFs, del AF, de los hidrodímeros de ácido ferúlico obtenidos por saturación y del TROLOX como patrón de referencia.

La importancia de evaluar la concertación de compuestos fenólicos radica en conocer, entre las muestras obtenidas, cual es la que tiene mayor cantidad de estos compuestos fenólicos ya que en algunas ocasiones la relación de fenoles totales coincide con la actividad antioxidante. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en mg de ácido gálico / g de muestra.

**Tabla 6.** Contenido de fenoles totales en las muestras obtenidas a partir del nejayote de maíz (mg ácido galico/g muestra)

Muestra	mg ácido galico/g muestra
DAFs + AF	652.9 ± 19.4
AF	640.9± 8.1
DAFs	544.0± 8.5
Hidrodímeros	460.2± 0.3
Trolox	333.2± 2.5

Se muestra el contenido de fenoles totales (Tabla 6) de la muestras analizadas, los datos siguen el siguiente orden DAFs + AF > AF > DAFs > hidrodímeros > Trolox. La mezcla de DAFs + AF es la que presenta el mayor contenido de Fenoles Totales. Estos valores son de los extractos del nejayote y con respecto al maíz muestran valores superiores. Los valores reportados en la literatura sobre el contenido de fenoles totales para el maíz va de 2937.5 a 758.8 mg catequina/ 100g de muestra seca dependiendo de la variedad de maíz. Los valores obtenidos son altos debido a que la mayor parte de compuestos fenólicos, se encuentra en el pericarpio del maíz y por lo tanto en el nejayote. El contenido de fenoles totales de las muestras analizadas coincide con su actividad antioxidante. No es lo mismo para el Trolox, que a pesar de tener el menor contenido de fenoles totales posee mayor actividad antioxidante (AAO) que cualquier extracto.

### **5.7 Evaluación de la actividad antioxidante (AAO)**

Ningún antioxidante en particular puede ejercer todos los mecanismos antioxidantes posibles para combatir la oxidación. Por lo tanto en la determinación de su utilidad se evalúan los tipos de reacciones vía radicales libres que pueden ser neutralizadas por un antioxidante (61). En este estudio se evaluó la AAO con tres métodos distintos ya que cada método nos brinda información diferente acerca de la actividad secuestrante antirradical. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Resultados de la AAO de las muestras analizadas por tres métodos diferentes.

Muestra	Actividad Secuestrante DPPH (%)	Actividad secuestrante ABTS (%)	Actividad Antioxidante Blanqueo con B-caroteno (%)
DAFs + AF	66.10	87.55	43.12
AF	61.23	91.96	41.28
DAFs	47.88	82.38	46.79
Hidrodímeros	34.30	81.70	42.20
Trolox	89.75	91.53	84.78

Como se muestra en la tabla 7 las muestras pueden exhibir diferentes valores de AAO dependiendo del parámetro medido. Una posible razón puede ser la diferente afinidad hacia los radicales libres.

#### **Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH**

Los radicales libres están implicados en la propagación de la oxidación lipídica, y muchas especies radicales de diferente reactividad son formadas. Son preferidos frecuentemente radicales relativamente estables (DPPH, ABTS), en la evaluación de actividad secuestrante radical. El radical estable DPPH ha sido ampliamente usado en estudios de AAO de compuestos simples, extractos de plantas y alimentos. El método se basa en la reducción de la solución alcohólica de DPPH a 517nm en presencia de un antioxidante donador de H para dar la formación de la forma no radical DPPH-H (forma reducida).

El DPPH restante medido después de 40 minutos corresponde inversamente a la actividad secuestrante radical. Cada antioxidante se evaluó a 200ppm. Todos los ensayos realizados

se compararon con la actividad antioxidante del Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil). Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en % de actividad secuestrante.

Este método fue aplicado para conocer la actividad antioxidante de cuatro muestras y un patrón de referencia (Trolox). En la figura 26 y en la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos. Al comparar la capacidad secuestrante del Trolox (89.75%), las muestras obtenidas presentan cierta AAO a 200ppm aunque menor que la del Trolox. Entre las muestras obtenidas la que presenta mayor AAO es la mezcla AF + DAFs (66.10%) y el AF puro (61.23%). Las muestras de DAFs (47.88%) e hidrodímeros (34.30%) presentan menor actividad antioxidante, posiblemente se deba a que estas muestras fueron tratadas con más procesos debido a su purificación y reacciones enzimáticas los cuales probablemente afectaron su AAO.

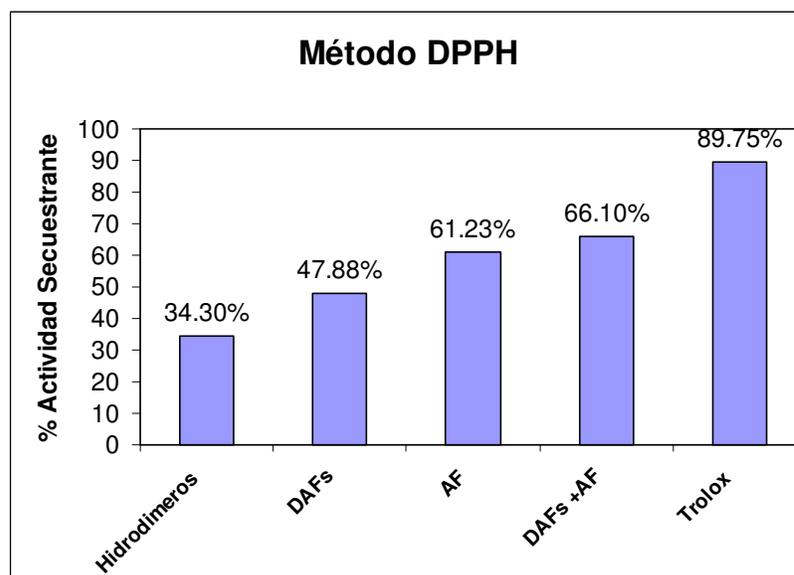


Figura 26. Actividad Total Secuestrante de los diferentes antioxidantes obtenidos.

En esta reacción las muestras de antioxidantes analizadas reaccionaron con el DPPH· para reducirlo a su forma DPPH-H. El grado de decoloración indicó el potencial secuestrante de los antioxidantes. La evolución de la cinética de reacción nos indica la rapidez en que actúa un antioxidante ante la presencia del radical DPPH, esta dependerá de la naturaleza del antioxidante para donar fácilmente su hidrógeno. En la figura 27 podemos observar el

comportamiento de los diferentes antioxidantes frente al radical DPPH. Se observa que los DAFs reaccionan con mayor rapidez ante el DPPH debido a que poseen mayor número de grupos hidroxilo que el AF, además los DAFs pueden estabilizar al electrón por su gran resonancia. Algunos antioxidantes son más lentos en reaccionar y esto se observa en el caso de los hidrodímeros y la mezcla de DAFs con AF, en estos dos casos vemos que su cinética de reacción tarda más tiempo en ser constante, esto quiere decir que toman más tiempo en reaccionar con el radical DPPH posiblemente por que poseen menor cantidad de grupos hidroxilo.

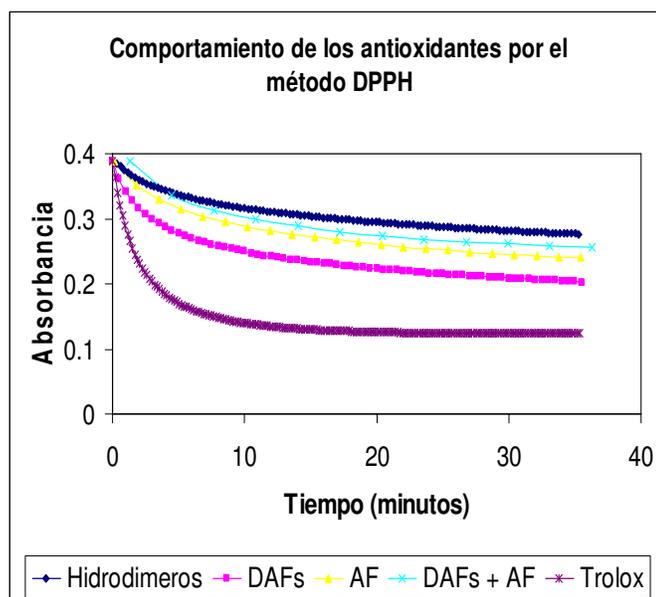


Figura 27. Comportamiento de los diferentes antioxidantes obtenidos frente al radical DPPH.

### Evaluación de la AAO por el Método de ABTS

El radical ABTS se generó enzimáticamente y posteriormente se adiciona el antioxidante a utilizar al medio de reacción. Este resultado es la desaparición del radical ABTS, la cual es medida por un decremento en la absorbancia a 730nm. Este método patentado es fácil y rápido para realizarse, presenta numerosas ventajas puesto que evita reacciones no deseadas, no se requieren de altas temperaturas para generar el radical libre y la AAO puede ser estudiada en un amplio intervalo de valores de pH. Este método también tiene la ventaja de evitar la interferencia, debido a la actividad de la peroxidasa endógena en las

muestras, por lo que la determinación de la actividad antioxidante hidrofílica en plantas y otros extractos es más exacta y rigurosa (62).

Este ensayo colorimétrico genera el radical ABTS por el sistema peróxido de hidrógeno/peroxidasa. El ABTS es un sustrato de la peroxidasa y cuando es oxidado por esta en presencia de  $H_2O_2$  genera un radical metaestable con un espectro de absorción característico de 400 a 750nm. Para dar tiempo a la generación de este radical se tomaron en cuenta los valores de absorbancia después de tres minutos cuando estos valores se estabilizan y más tarde viene un decremento en la absorbancia dependiendo de la AAO de la muestra.

Los resultados obtenidos (Figura 28 y Tabla 7) muestran que las cuatro muestras analizadas, mezcla AF + DAFs (87.55%), AF (91.96%), DAFs (82.38%) e hidrodímeros (81.70%), tienen una alta AAO incluso sin diferencia significativa con el Trolox (91.53%) a 200ppm.

Esto se debe a la polaridad de las cuatro muestras analizadas, a una posible mayor afinidad por el radical ABTS que el DPPH y al uso de un disolvente más polar en este método (etanol) que el utilizado en el método de DPPH (metanol).

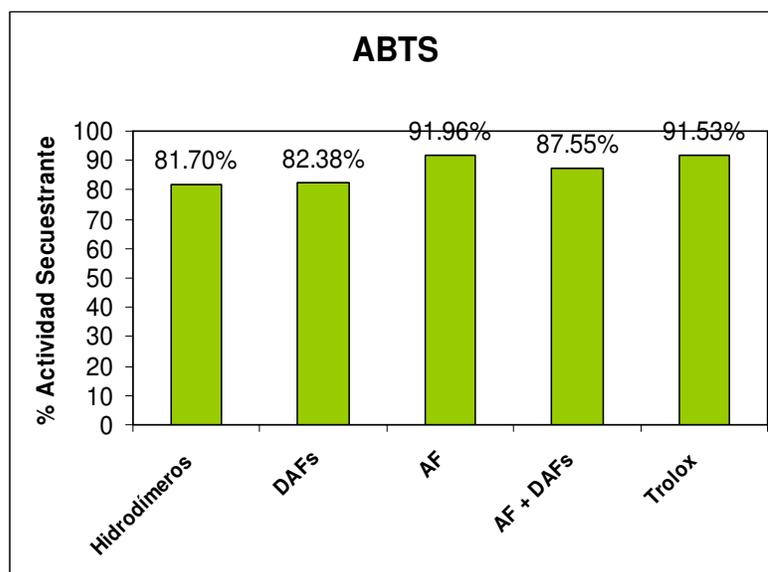


Figura 28. Actividad secuestrante de los antioxidantes con el radical ABTS

Los resultados experimentales demostraron que la reacción con el radical ABTS se completa en 3 min. El comportamiento que sigue la reacción entre los diferentes

antioxidantes y el radical ABTS, figura 29, nos brinda una idea de que tan rápido reacciona el antioxidante con el ABTS, dependiendo de la afinidad del antioxidante con el radical ABTS. En la figura 29 se puede apreciar un decremento rápido para todos los extractos lo cual indica un alto potencial de los antioxidantes para donar hidrógenos al radical ABTS.

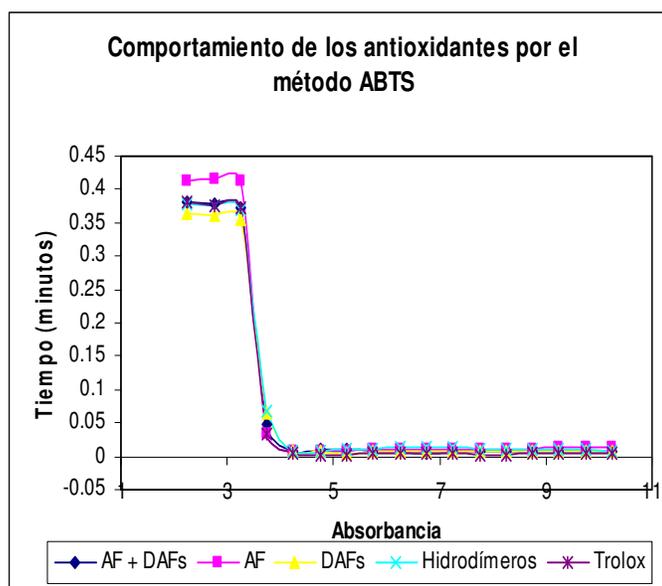


Figura 29. Comportamiento de la reacción del radical ABTS con los diferentes antioxidantes

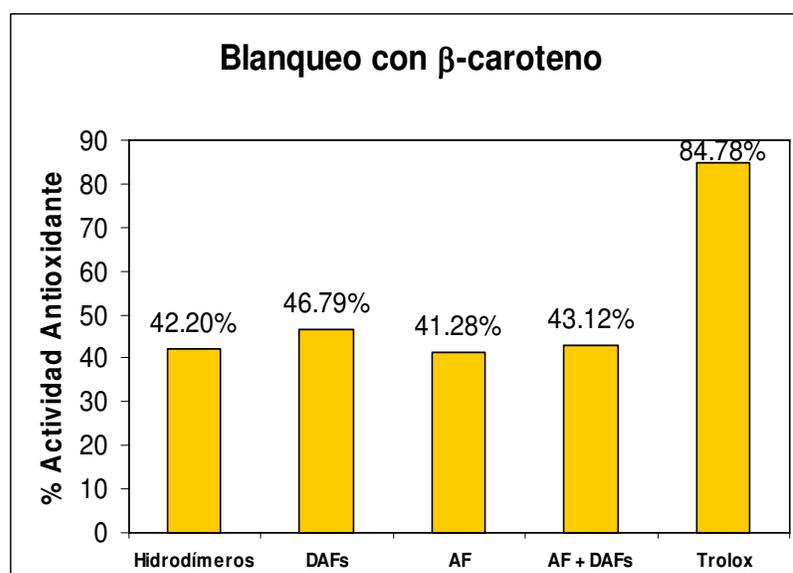
### Evaluación antioxidante por el método de $\beta$ -caroteno

Este método se basa en la pérdida del color amarillo del  $\beta$ -caroteno debido a su reacción con radicales, los cuales son formados por la oxidación del ácido linoleico en una emulsión. El blanqueo con  $\beta$ -caroteno se mide por el decremento de la absorbancia inicial a 470nm, este decremento es más lento en presencia de un antioxidante. Este método es ampliamente utilizado en la evaluación de AAO de muestras como: compuestos simples, extractos de plantas, granos, frutas vegetales y alimentos. La polaridad de la muestra es importante para la actividad presentada por este método (63).

Cuando el antioxidante se pone en contacto con la emulsión se evita que los radicales libres del ácido linoléico ataquen el  $\beta$ -caroteno, entre mayor sea la actividad del antioxidante, el  $\beta$ -caroteno estará más protegido y esto se vera reflejado en una menor disminución de la absorbancia.

Con este método, a diferencia de ABTS y DPPH, podemos evaluar la actividad antioxidante directamente en un sistema, que bien podría representar a un sistema alimentario, y así conocer la capacidad que tiene el antioxidante a evaluar para proteger a los radicales peroxi y alcoxi.

En la figura 30 y la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de las cuatro muestras analizadas y el Trolox a una concentración de 200 ppm. Lo resultados se expresan en porcentaje de  $\beta$ -caroteno residual después de la incubación a 40 °C, durante 120min.



**Figura 30.** Actividad Antioxidantes de las muestras por blanqueo con  $\beta$ -caroteno

Las muestras analizadas presentan una menor actividad que el Trolox (84.78%). Los valores obtenidos son: mezcla de AF + DAFs (43.12%), el AF (41.28%), los DAFs (46.79%), e hidrodímeros (42.20%). Sin embargo no hay diferencia significativa entre las muestras (anexo), pero el valor más alto de AAO pertenece al extracto enriquecido en DAFs (46.79%) y esto puede deberse a que los DAFs poseen más grupos hidroxilo y un mayor grado de resonancia para estabilizarse por lo que mas fácilmente pueden donar un H.

Los inhibidores más activos de blanqueo con  $\beta$ -caroteno son principalmente extractos apolares. La mayoría de extractos polares exhiben baja AAO. A pesar de que en algunos casos las características estructurales del antioxidante son más importantes que la polaridad. Esto explica la baja AAO presentada por las muestras analizadas en comparación con los métodos DPPH y ABTS, ya que estas muestras son polares. Otra posibilidad es la interacción del antioxidante con el emulsificante. En la literatura reportan que el ácido cafeico, el cual es muy similar al AF, exhibe baja AAO en una emulsión a pesar de estar principalmente en fase lipídica. Interacciones específicas entre el ácido y emulsificante, como puentes de hidrógeno bloquean los grupos con AAO (63).

La AAO del Trolox (un análogo de la vitamina E, usado como patrón de referencia) fue igual en los tres métodos usados debido a que este se puede disolver en un medio acuoso (como sal) o en un medio orgánico (como ácido) (62).

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ El contenido de compuestos fenólicos (AF y DAFs) es diferente para cada tipo de nejayote.
- ✓ El carbón activado es el mejor adsorbente para la extracción de AF y DAFs. La amberlita da menores rendimientos pero su manejo es más fácil.
- ✓ Con la separación en columna empacada de celulosa del AF de los DAFs (5g) podemos obtener cantidades pequeñas del 8-5diAF (25.5mg) y 8-O-4 diAF (73.11 mg).
- ✓ Se llevo a cabo la reacción de saturación del doble enlace de los DAFs, principalmente del 8-O-4 diAF que es el que se presenta en mayor concentración dando un rendimiento de 77.8%.
- ✓ El hidrodímero de AF presenta menor polaridad que los DAFs e incluso que el AF manteniendo la misma actividad antioxidante que las muestras analizadas.
- ✓ La cantidad de fenoles totales en las cuatro muestras no es significativamente diferente entre ellas y se relaciona con la AAO medida por los tres métodos usados.
- ✓ Se estableció con el método de DPPH y ABTS que la capacidad secuestrante de los DAFs y el AF es alta. Obteniendo mayores valores por el método de ABTS debido a que las muestras analizadas presentan carácter hidrofílico.
- ✓ La AAO medida por el método de blanqueo con  $\beta$ -caroteno se ve inhibida debido a la polaridad de las muestras analizadas. Dando así menores valores de AAO que los obtenidos por los métodos ABTS y DPPH.
- ✓ El contenido de compuestos fenólicos (AF y DAFs) en el nejayote depende de las condiciones de nixtamalización.

## PERSPECTIVAS

El nejayote de maíz es una fuente rica en DAFs y AF, estos compuestos pueden ofrecer diferentes beneficios funcionales si son aplicados en la industria de alimentos y en la industria farmacéutica.

El extracto enriquecido en DAFs presenta una elevada AAO, por lo que se sugiere su uso en la preservación de alimentos además de que puede tener un alto impacto en la salud humana por lo que se requeriría hacer un análisis del este extracto *in vivo*.

La AAO de los dihidrodímeros de AF es similar a la de los DAFs pero los primeros poseen menor polaridad por lo que pueden ser aprovechados en la estabilización de alimentos menos polares, posiblemente grasas y aceites. Los dihidrodímeros de AF también pueden ser una opción para llevar a cabo la esterificación de los DAFs con alcoholes alifáticos con mayor rapidez y posiblemente mejores rendimientos.

La esterificación de los DAFs es una buena alternativa para disminuir aun más su polaridad dependiendo los carbonos del alcohol, como se observo hay una gran posibilidad de que la reacción se lleva a cabo con mayor facilidad y rapidez que para el caso del AF. Al llevarse a cabo la reacción de esterificación de los DAFs con butanol utilizando lipasas y tolueno como disolvente da un rendimiento (53.5%) mayor al reportado en la literatura de la esterificación de AF y en un menor tiempo. El compuesto obtenido debe de ser caracterizado además de medir la actividad antioxidante de este nuevo compuesto. Cabe mencionar que se están llevando a cabo estudios de reacciones enzimáticas para la esterificación de los DAFs con alcoholes alifáticos y también con azúcares.

Debido a que la esterificación de AF solo es posible con alcoholes que posean más de ocho carbonos, se obtienen bajos rendimientos (10%-14%) y los tiempos de reacción son muy largos (15 días de reacción). Se decidió llevar a cabo una reacción de esterificación con los DAFs, ya que estos compuestos poseen mayor actividad antioxidante, algunos tienen más de dos grupos hidroxilo y tienen un mayor sistema de deslocalización del electrón. La esterificación de los DAFs por medio de lipasas con alcoholes alifáticos en un medio no acuoso, es una herramienta útil, para lograr disminuir su polaridad y poder aplicarlos a sistemas no polares y así tengan más aplicaciones en la industria de los alimentos especialmente en la estabilización de grasas y aceites.

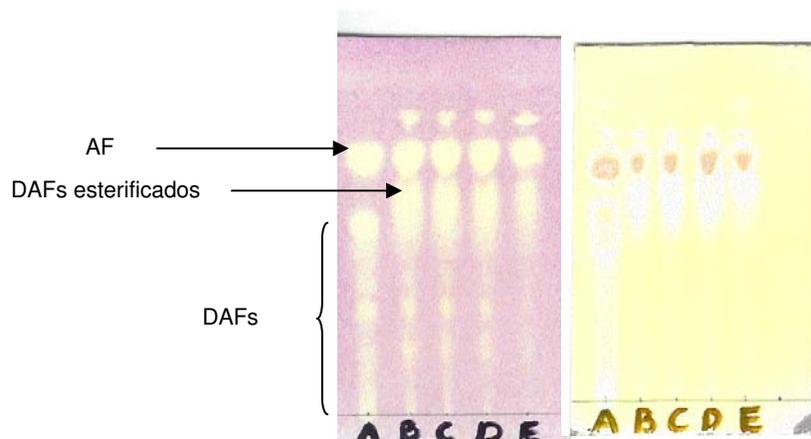
Se llevó a cabo una esterificación enzimática (con lipasas) de los DAFs con butanol en tolueno como disolvente. Se probaron cuatro tipos de lipasas diferentes (Lipasa de *Candida antarctica* fracción B, L1 Chirazime, Lipasa páncreas porcino, Lipozime RM 1). Se colocó un ensayo sin lipasa para que sirviera de control.

Después de 24 horas de reacción se realizó una CCF para observar si se llevó a cabo la esterificación de los DAFs. Los resultados se muestran en la figura 31. El carril A contiene el control, es decir mezcla de reactivos sin lipasa, el B la reacción llevada a cabo con lipasa de *Candida antarctica* fracción B, el carril C con L1 Chirazime, el carril D lipasa de páncreas porcino y el carril E con Lipozime RM 1. Como se puede observar (Figura 31) en el carril A se ven claramente los DAFs y el AF sin reaccionar y en los carriles B, C, D, E, en todos por igual se logra apreciar la desaparición de los DAFs y la aparición de nuevos productos menos polares que los DAFs, conservándose el AF casi intacto.

En la placa revelada con DPPH podemos observar que los nuevos productos obtenidos tienen propiedades antioxidantes.

Se obtuvieron 47.4mg de DAFs con lo que el rendimiento de la reacción es 53.5% en 24 horas mayor que el rendimiento de la esterificación del AF con butanol y en menor tiempo.

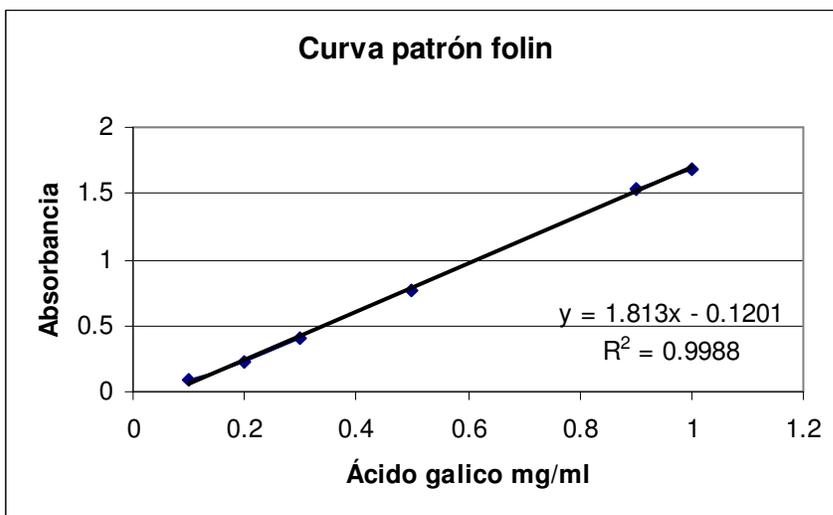
Para comprobar que se llevo a cabo la reacción de esterificación es necesario analizar la muestra para poder caracterizar el compuesto y conocer la posición de esterificación.



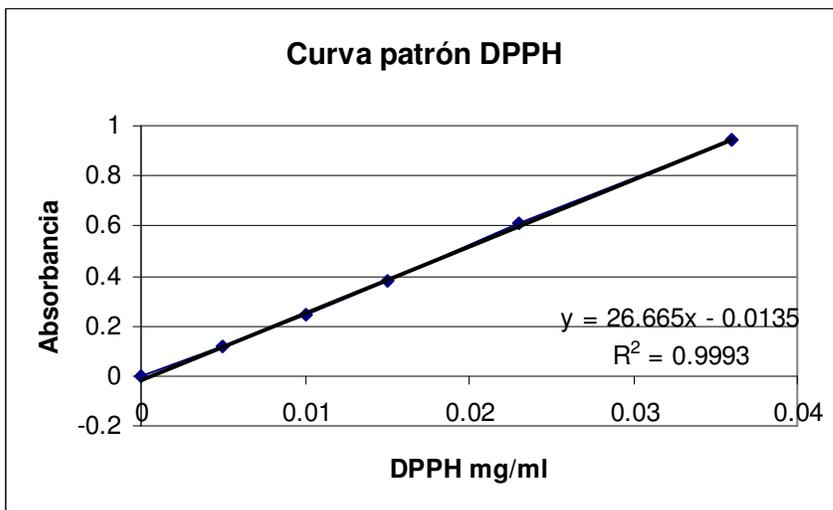
**Figura 31.** Cromatografía en silica gel revelada con DPPH (color púrpura) y Cromatografía en silica gel revelada con sulfato serico (color amarillo). Los carriles tienen: A) control, mezcla de AF + DAFs, B) mezcla de reacción del ensayo con lipasa de *Candida antartica* fracción B, C) mezcla de reacción del ensayo con L1 Chirazime D) mezcla de reacción del ensayo con lipasa de páncreas porcino E) mezcla de reacción de la lipasa Lipozime RM 1.

## 8. ANEXO

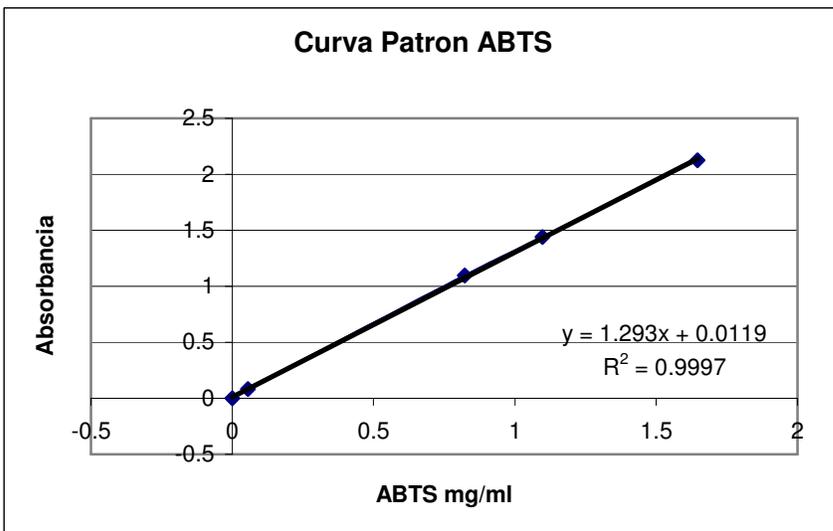
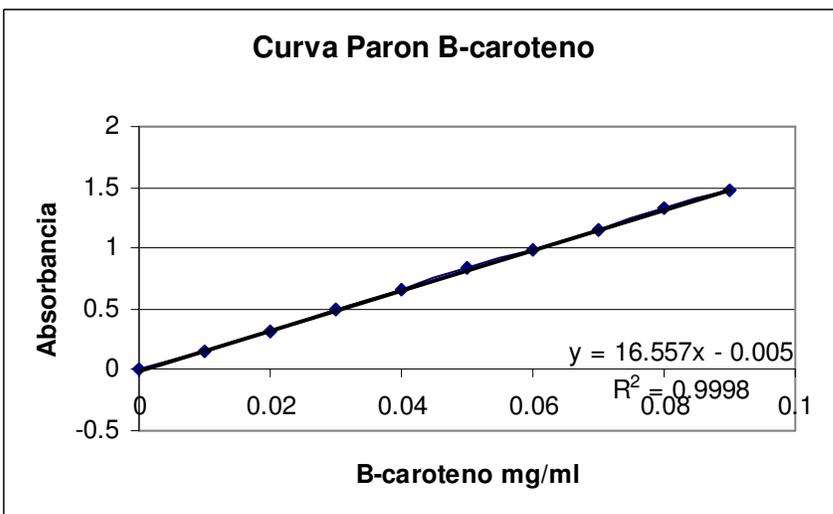
Curva patrón de Ácido Galico



Curva patrón de DPPH



## Curva Patrón de ABTS

Curva patrón de  $\beta$ -caroteno

## Cuadro de Análisis de Varianza

Fuente de Variación	g.l.	SC	CM	F (calculada)	F (tablas)	Existe Diferencia
Muestras	4	2213.72	553.43	5.51	3.84	Si
Método	2	3430.51	1715.26	17.08	4.46	Si
Error	8	803.01	100.38			
Total	14					

Diferencia mínima significativa de Fisher

Trolox                      AF + DAFs                      AF                      DAFs                      Hidrodimeros

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alatorre S.S.A., Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales, Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F., 2001, pag.17,18,36,37
- [2] M. T. Garcia-Conesa, P. A. Kroon, J. Ralph, F. A. Mellon, I. J. Colquhoun, L. Saulnier, J. F. Thibault and G. Williamson. 1999. A cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids. *European Journal of Biochemistry*, 266:644-652.
- [3] Y. Y. Soong and P. J. Barrlow. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88:411-417.
- [4] M. F. Andreasen, A. K. Landbo, L. P. Christensen, A. Hansen and A. S. Meyer. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chem*, 49: 4090-4096.
- [5] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama and H. Taniguchi. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:2161-2168.
- [6] M. T. García-Conesa, P. D. Wilson and G. W. Plumb. 1999. Antioxidant properties of 4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- $\beta,\beta'$ -bicycinnamic acid (8,8'-diferulic acid, non-cyclic form). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:379-384
- [7] L. R. Ferguson, I. Fong-Lim, A. E. Pearson, J. Ralph and P. Harris. 2003. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutation Research*, 542:49-58.
- [8] L. C. Bourne and C. Rice-Evans. 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253:22-227.
- [9] M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandolfi, D. Daffonchio and F. Molinari. 2004. Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 34:3-9.
- [10] R. D. Hatfiel, J. Ralph and J. H. Grabber. 1999. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:403-407.

- [11] M. Sanchez, M. J. Peña, G. Revilla and I. Zarra. 1996. Changes in dehydrodiferulic acid and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell wall during growth of *Pinus panaster* hypocotyl. *Plant Physiology*, 111:941-946.
- [12] Y. Taek and J. Hee-Oh. 2003. Characterization of physicochemical properties of ferulic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 26:1002-1008.
- [13] H. Yamamoto, T. Hoshino and T. Uchiyama. 1999. Convenient preparation and quantification of 5,5'-diferulic acid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63:390-394.
- [14] V. Micard, J. H. Grabber, J. Ralph, C. M. G. C. Renard and J. F. Thibault. 1997. Dehydroferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*, 44 :1365-1368.
- [15] A. C. Bily, L. M. Reid, J.H. Taylor, D. Johnston, C. Malouin and B. J. R. Philogene. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Genetics and Resistance*, 93:712-719.
- [16] G. Wende, K. W. Waldron, A. C. Smith and C. T. Brett. 1999. Developmental changes in cell-wall ferulate and dehydrodiferulates in sugar beet. *Phytochemistry*, 52:819-827.
- [17] M. Bunzel, J. Ralph, J. M. Marita, R. D. Hatfield and H. Steinhart. 2001. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:653-660.
- [18] J. H. Grabber, R. D. Hatfield and J. Ralph. 1998. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77:193-200.
- [19] H. Stamatis, V. Sereti and F.N. Kolisis. 2001. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of molecular catalysis*, 11:323-328.
- [20] S. Mathew and E. Abraham. 2004. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24:59-74.
- [21] S. Ou and K. C. Kwok. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 :1261-1269.

- [22] A. C. Bily, A. J. Burt, A. I. Ramputh, J. Livesey, C. Regnault-Roger, B. R. Philogene and J.T. Arnason. 2002. HPLC-PAD-APCI/MS assay of phenylpropanoids in cereals. *Phytochemistry Analysis*, 15:9-15.
- [23] P. A. Kroon and G. Williamson. 1999. Hydroxynnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:355-361.
- [24] J. G. Yang and T. Uchiyama. 2000. Hydroxycinnamic acids and their dimers involved in the cessation of cell elongation in *Mentha* suspension culture. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64:1572-1579.
- [25] M. Bunzel, J. Ralph, C. Funk and H. Steinhart. 2003. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology*, 217:128-133.
- [26] C. Funk, J. Ralph, H. Steinhart and M. Bunzel. 2005. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O4 and 8-8/8-O-4 coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry*, 66:363-371.
- [27] L. Salnier, M. J. Crépeau, M. Lahaye, P. A. Kroon and G. Williamson. 1999. Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research*, 320:82-92.
- [28] Z. Huang, L. Dostal and J. P. N. Rosazza. 1993. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2244-2250.
- [29] M. Cruz, F. Espinoza and P. Villeneuve. 2005. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2779-2787.
- [30] M. Bunzel, J. Ralph and H. Steinhart. 2004. Phenolic compounds as cross-links of plant derived polysaccharides. *Czech Journal of Food Science*, 22:64-67.
- [31] E. Larsen, M. F. Andreasen and L. P. Christensen. 2001. Regioselective dimerization of ferulic acid in a micellar solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:3471-3475.
- [32] M. Bunzel, C. Funk and H. Steinhart. 2004. Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *Journal of Separation Science*, 27:1080-1086.

- [33] X. Liu, S. Ardo, M. Bunning, J. Parry, K. Zhou, C. Stushnoff, F. Stoniker, L. Yu and P. Kendall. 2007. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce grown in Colorado. *Swiss Society of Food and Technology*, 40:552-557.
- [34] W. B. Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology*, 28:25-30.
- [35] J. McMurry, Química Orgánica, México: Editorial Internacional Thomson, 5ª edición, 2000, 855-857.
- [36] O. R. Fennema, Química de los Alimentos, Zaragoza España: Editorial Acribia S.A., segunda edición, 1993, 223-229.
- [37] J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon, Antioxidantes de los Alimentos Aplicaciones Practicas, Zaragoza España, Editorial Acribia S.A., 2004, 141-148.
- [38] Ribera Trueba Leonardo J., Síntesis de nuevos antioxidantes a partir de la amina del ácido dehidroabiético y el ácido ferúlico, 2004, pag 8.
- [39] D. L. Madhavi, S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe, Food antioxidant, United States of America, Editorial Board, 1996, pag. 76-80, 242-246.
- [40] E. Carvajal-Millan, A. Rascón-Chu, J. A. Márquez-Escalante, V. Micard, N. Ponce de León and A. Gardea. 2007. Maize brand gum: extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, 69:280-285.
- [41] S. Ou, Y. Luo, F. Xue, C. Huang, N. Zhang and Z. Liu. 2006. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane by activated charcoal adsorption/anion macroporus resin exchange chromatography. *Journal of Food Engineering*, 78:1298-1304.
- [42] C. Anselmi, M. Centeni, M. Andreassi, A. Buonocore, C. La Rosa, R. Maffei Facino, A. Segal and F. Tsuno. 2004. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models" *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 35:1241-1249.
- [43] I. Benoit, D. Navarro, N. Marnet, N. Rakotomanomana, L. Lesage-Meessen, J. C. Sigoillot, M. Asther and M. Asther. 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by products. *Carbohydrate Research*, 341:1820-1827.

- [44] M. Tsuchiyama, T. Sakamoto, T. Fujita, S. Murata and H. Kawasaki. 2006. Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:1071-1079.
- [45] H. D. Shin, S. McClendon, T. Le, F. Taylor, R. Ruizhen-Chen. 2006. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185. *Biotechnology and Bioengineering*, 95:1109-1114.
- [46] B. Seok-Han, C. Beom-Park, N. Takasuka, A. Naito, K. Sekine, E. Nomura, H. Taniguchi, T. Tsuno and H. Tsuda. 2001. A ferulic acid derivate, ethyl 3-(4'-geranloxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoate, as a new candidate chemopreventive agen for colon carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92:404-409.
- [47] L. Saulnier and J. F. Thibaul. 1999. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-bee pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79:396-402.
- [48] A. Renger and H. Steinhar. 2000. Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *European Food Research and Technology*, 211:422-428.
- [49] J. J. Beck, J. H. Kim, B. C. Cambell and S. C. Chou. 2007. Fungicidal activities of dihydroferulic acid alkyl ester analoges. *Journal of Natural Products*, 70:779-782.
- [50] E. A-H. Baydoun, N. Pavlencheva, C. M. Cumming, K. W. Waldron and C. T. Brett. 2004. Control of dehydrodiferulate cross-linking in pectins from sugar-beet tissues. *Phytochemistry*, 65:1107-1115.
- [51] D. Del Pozo-Insfran, C. H. Brenes, S. O. Serna-Saldivar and S. T. Talcote. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of withe and blue corn (*Zea Mays* L.) products. *Food Research International*, 39:696-703.
- [52] M. F. Andreasen, P. A. Kroon, G. Williamson and M. T. Garcia-Conesa. 2001. Intestinal release and uptakeof phenolic antioxidant diferulic acid. *Free Radical and Medicine*, 31:304-314.
- [53] J. Ralph, M. T. Garcia-Conesa and G. Williamson. 1998. Simple preparation of 8-5 coupled diferulate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:2531-2532.
- [54] C. B. Faulds and P. A. Kroon. Hydroxycinnamic acids in plant cell wall. 2006. *Polyphenols Actualites*, 24:15-23.

- [55] C. Gallardo, L. Jiménez, M. T. García-Conesa. 2006. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of seleg grain fractions. *Food Chemistry*, 99:455-463.
- [56] E. A. Castillo, H. Miura, M. Hasegawa and T. Ogawa. 2004. Synthesis of the novel polyamides starting from ferulic acid dimer derivate. *Designed Monomers and Polymers*, 7:711-725.
- [57] J. Overhage, A. Steinbüchel and H. Priefert. 2003. Highly efficient biotransformacion of eugenol to ferulic acid and further conversion to vainillin in recombinant strains of *Escherichia coli*". *Applied and Enviromental Microbiology*, 69:6569-6576.
- [58] J. Ralph, S. Quideau, J. H. Grabber and R. D. Hatfield. 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell wall. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 1:3485-3498.
- [59] J. Ralph, M. Bunzel, J. M. Marita, R. D. Hatfield, F. Lu, H. Kim, P. F. Schatz, J. H. Grabber and H. Steinhart. 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 3:79-96.
- [60] G. Ward, Y. Hadar, I. Bilkis, L. Konstantinovskiy and C. G. Dosoretz. 2001. Initial steps of ferulic acid polymerization by ligning peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:18734-18741.
- [61] S. K. W. Subhashinee, Siriwardhana and F. Shahidi. 2002. Antirradical activity of extracts of almond and its by-products. *Journal of the American Oil Chemists´ Society*, 79:903-908.
- [62] M. B. Arnao, A. Cano and M. Acosta. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73:239-244.
- [63] I. I. Koleva, T. A. Van-Beek, J. P. H. Lissen, A. de Groot and L. N. Evstatieva. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis*, 13:8-17.
- [64] C. T. Ho, M. T. Huang and T. Ferraro, Phenolic Compounds in Food, New Jersey, New Brunswick, Editorial American Chemical Society, 1992, 2-21.
- [65] Colaboradores de Shaly. 2003. [en línea]. Imagen No. 25. [fecha de consulta: 17 de octubre del 2007]. Disponible en: <http://www.parques.mendoza.gov.ar/fotos/galeria2/images/flores%2003.jpg>

- [66] Colaboradores de Mailxmal S. L. 2002. [en línea]. Imagen No. 0053. [fecha de consulta: 17 de octubre del 2007]. Disponible en: [http://www.fotoimagenes.com/foto\\_galeria/54\\_Zbozee.jpg](http://www.fotoimagenes.com/foto_galeria/54_Zbozee.jpg).
- [67] Esther Chavarría. Proceso de Nixtamalización. 2007
- [68] V. Cadena Santos. Nopal (*Opuntia spp.*): estudio para valorar la utilización de residuos de cladodio como fuente de fibra dietética y antioxidantes. (Tesis UNAM, 2005) 54-57.
- [69] A. Siddhuraju, S. Hohan and K. Beckera. 2002. Studies on the antioxidant activity of indian Laburnum (*Cassi fistula L.*): a preliminary assessment of rude extracs from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79:61-67.
- [70] B. Matthaus. 2002. Antioxidant activity of extracs obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:3444-3452.