



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**QUÍMICA DEL ÁCIDO FERÚLICO: CUANTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN A
ESCALA PREPARATIVA A PARTIR DE NEJAYOTES DE MAÍCES
CRIOLLOS Y AMPLIACIÓN DE SU DIVERSIDAD ESTRUCTURAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

GUSTAVO RAMÍREZ SALINAS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Hermilo Leal Lara

VOCAL: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

SECRETARIO: Profesor: Héctor García Ortega

1er. SUPLENTE: Profesor: Gloria Díaz Ruíz

2° SUPLENTE: Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

LABORATORIO 321, CONJUNTO E. EDIFICIO DE ALIMENTOS Y QUÍMICA AMBIENTAL.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Dr. Arturo Navarro Ocaña

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

Gustavo Ramírez Salinas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Ácido Ferúlico	3
1.2. Aplicaciones del Ácido Ferúlico	4
1.2.1. Uso como antioxidante	4
1.2.2. Aplicaciones en alimentos	4
1.2.3. Obtención de Vainillina	5
1.2.4. Aplicaciones en farmacia	6
1.3. El Ácido Ferúlico en la naturaleza	7
1.4. Obtención del Ácido Ferúlico	9
1.4.1. Síntesis	9
1.4.2. Extracción a partir de fuentes naturales	10
1.5. Fuentes Naturales	10
1.5.1. Obtención del Ácido Ferúlico a partir de arroz	11
1.5.2. Obtención del Ácido Ferúlico a partir de desperdicios de la agroindustria	13
1.5.3. Obtención del Ácido Ferúlico a partir de maíz	13
1.6. Métodos de extracción del AF	14
1.6.1. Extracción líquido – líquido	14
1.6.2. Extracción con adsorbentes	16
1.6.3. Extracción sólido – líquido vs líquido – sólido	19
1.7. Cuantificación del Ácido Ferúlico	20
1.8. Derivados del Ácido Ferúlico	21
1.8.1. Dímeros del AF	21
1.8.2. Ésteres del AF	23
1.9. Enzimas utilizadas en biotransformaciones	25
1.9.1. Biotransformaciones en solventes orgánicos	25

1.9.2. Lipasas	27
1.9.2.1. Esterificación enzimática del AF	30
1.9.3. Peroxidasas	31
1.9.3.1. Acoplamiento oxidativo del AF	32
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Materiales	36
3.2.1. Procedimiento experimental	39
3.2.2. Identificación y cuantificación del Ácido Ferúlico en muestras de maíces	40
3.2.3. Obtención de extractos	41
3.2.4. Identificación por CCF	43
3.2.5. Cuantificación del AF por UV	43
3.2.6. Cuantificación del AF por HPLC	44
3.2.7. Cuantificación del AF por Colorimetría	45
3.2.8. Método <i>in situ</i> para la estimación del AF	46
3.2.9. Obtención del AF a escala preparativa a partir de nejayote	48
3.2.10. Purificación del AF	50
3.2.10.1. Purificación del AF mediante columna cromatográfica	51
3.2.10.2. Purificación del AF mediante cristalizaciones sucesivas	53
3.2.11. Diversificación estructural del AF	54
3.2.11.1. Esterificaciones	54
3.2.11.1.1. Ferulato de etilo	55
3.2.11.2. Transesterificaciones	56
3.2.11.2.1. Obtención de los ferulatos de butilo y de decilo	57
3.2.11.3. Dimerizaciones	58
3.2.11.3.1. Dimerización de los ferulatos de etilo y butilo	59
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1. Identificación del AF en extractos de nejayotes de diferentes variedades de maíces	60

4.2. Variación en el contenido de AF en extractos de nejayotes de diferentes variedades de maíces	62
4.3. Comparación de los métodos de determinación	68
4.4. Desarrollo del método visual para la estimación de la cantidad de AF <i>in situ</i> presente en nejayotes	70
4.5. Obtención del AF a escala preparativa	73
4.6. Purificación	73
4.7. Ampliación de la diversidad estructural del Ácido Ferúlico	78
4.7.1. Reacciones de esterificación	78
a) Obtención del ferulato de etilo	78
b) Obtención del ferulato de butilo	80
c) Obtención del ferulato de decilo	81
4.7.2. Reacciones de dimerización	83
4.7.2.1. Obtención del dímero del ferulato de etilo	83
4.7.2.2. Obtención del dímero del ferulato de butilo	84
5. CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	89
ANEXOS	91
BIBLIOGRAFÍA	99

AGRADECIMIENTOS

Al ICYTDF por el financiamiento al desarrollo de esta tesis. Proyecto: PICS08-40-ICYTDF

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el mejor lugar para mi formación profesional.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por todo el apoyo, la confianza y paciencia a lo largo de la realización de este trabajo.

A la Dra. Hilda Calderón por el apoyo en uso del HPLC y por la ayuda prestada durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y las importantes aportaciones que me permitieron mejorar el contenido del mismo.

DEDICATORIAS

A mis queridos padres: sin ustedes no hubiera sido posible que esto sucediera.

A mis amigos que me acompañaron a lo largo de la carrera.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio 321.

INTRODUCCIÓN

El ácido ferúlico (AF) es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia, principalmente por sus propiedades antioxidantes y cualidades como fotoprotector. Forma parte de los ácidos hidroxicinámicos, siendo este el más abundante de dichos compuestos en la naturaleza. Lo encontramos formando parte de las paredes celulares de plantas, unido mediante enlaces éter o éster. Las principales fuentes de las que se obtiene son cereales como el maíz, arroz y trigo, además del bagazo de caña. Puede extraerse de diferentes maneras, las más conocidas y utilizadas son las hidrólisis alcalinas y ácidas, incluso se han usado enzimas para optimizar su extracción.

El AF es uno de los principales compuestos fenólicos del maíz. Cuando el maíz se somete a un proceso de saponificación (nixtamalización) se libera AF a la solución, la cantidad que se libera depende del tipo de maíz y condiciones de nixtamalización. Gracias a diferentes estudios, se ha encontrado que el nejayote es una fuente potencial del mismo, un problema al que nos enfrentamos es, que no existe un método rápido para la determinación de la cantidad de AF, ya que actualmente su cuantificación implica el desplazamiento de la muestra a un laboratorio, de aquí se desprende uno de los objetivos del trabajo, encontrar un método sencillo y rápido de cuantificación.

Las propiedades antioxidantes del ácido ferúlico están íntimamente relacionadas con la forma en que la molécula es capaz de deslocalizar el electrón producido por los radicales libres estabilizándolo. Al ser el AF una molécula hidrofílica no se puede aplicar muy bien a sistemas oleosos que son los más susceptibles a la degradación por los radicales libres. Por ello, otro objetivo del presente trabajo es la síntesis de derivados del AF menos polares convirtiéndolo en una molécula anfifílica la cual podría ubicarse en la interfase agua/aceite aumentando la protección de un sistema oleoso. Una forma de lograr esto es por medio de reacciones de esterificación del AF con diferentes alcoholes alifáticos formando ésteres del mismo, y su posterior dimerización catalizada por la

peroxidasa de rábano, una vez terminadas las reacciones, los compuestos obtenidos se pueden identificar a través de CCF y analizarse por RMN.

1. ANTECEDENTES

1.1. ÁCIDO FERÚLICO

En 1866 Hlasiwetz y Barth en Innsbruck, Austria, aislaron el ácido protocatecuico y el resorcinol de una resina comercial de la planta conocida como *Ferula foetida*; al mismo tiempo, obtuvieron un precipitado ligeramente amarillo después de la adición de plomo divalente a una solución alcohólica de la resina, después de que la sal de plomo fue lavada con alcohol y reconstituido el ácido libre, se determinó su composición como $C_{10}H_{10}O_4$, lo nombraron ácido ferúlico (**Sohn Y. T. et al,2003**).

Poca investigación al respecto se realizó sobre éste recién descubierto ácido durante los siguientes 60 años; en 1925 fue sintetizado químicamente por la condensación de vainillina con ácido malónico catalizada con amina. Los isómeros cis y trans fueron separados en 1957 y la estereoquímica del ácido ferúlico fue revelada por RMN de carbono-13 y confirmada por cristalografía de rayos X en 1988. Otros nombres que se le dan al ácido ferúlico (**Figura 1**) son: ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-2-propenoico, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico, ácido cafeico 3-metil-éter y ácido conférico. La forma isomérica es llamada ácido isoferúlico (ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinámico) también es encontrada en ciertas plantas (**Faulds & Williamson, 1999**).

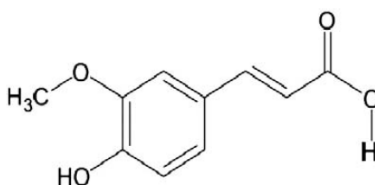


Figura 1. Ácido Ferúlico (AF)

Propiedades fisicoquímicas: Ácido Ferúlico es el nombre común del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico. Aislado de plantas, generalmente existe como el isómero trans; las agujas ortorrómbicas de este isómero pueden ser cristalizadas de agua caliente. Su masa molecular es de 194 y su punto de fusión de 174°C; es soluble en etanol,

acetato de etilo y agua caliente; moderadamente soluble en éter y ligeramente soluble en benceno y éter de petróleo. Es un ácido dibásico fuerte; la disociación del primer protón produce el anión carboxilato, la del segundo protón genera el anión fenolato. El isómero trans absorbe fuertemente en el UV a una longitud de onda de 248 nm y 307 nm en solución acuosa pH=6; también exhibe una fuerte fluorescencia. La vida media del ácido ferúlico en condiciones de almacenamiento es de 495 días a 25°C (Sohn *et al*,2003).

1.2. APLICACIONES DEL ÁCIDO FERÚLICO

1.2.1. Uso como antioxidante

La capacidad antioxidante del ácido ferúlico, deriva en su mayoría de su habilidad de estabilizar a los radicales libres, también puede actuar como antioxidante ya que disminuye los efectos de la radiación UV. Cualquier radical que se encuentre cercano al ácido ferúlico, fácilmente sustrae un átomo de hidrógeno para formar un radical fenoxi, el cual está altamente estabilizado por resonancia, dado que el electrón sin par puede localizarse en toda la molécula; una estabilización extra proviene de la conjugación en la cadena lateral insaturada. Por su elevado grado de insaturación conjugada, el ácido ferúlico también absorbe fuertemente la radiación UV, que inicia la formación del radical fenoxi que conduce a la isomerización cis-trans, esta absorción UV ha demostrado inhibir otras reacciones de radicales libres (Zhao *et. al.* 2008).

1.2.2. Aplicaciones en alimentos

El ácido ferúlico ha sido usado desde 1975 en Japón para proteger naranjas de ataques microbianos, evitando así que se pudran y prevenir la auto oxidación del aceite de linaza; desde entonces, se ha usado para estabilizar el aceite de soya. Un derivado sintético, el ferulato de tocoferol, ha demostrado tener incluso mejores propiedades

antioxidantes que el mismo ácido ferúlico. Mezclas de ácido ferúlico y aminoácidos o ácido ferúlico y dipéptidos (como glicina o alanina) tienen un efecto sinérgico en la inhibición de la oxidación del ácido linoléico. Es materia prima para la obtención de vainillina. Puede inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. El ácido ferúlico, en la naturaleza mantiene unidos los polisacáridos de la pared celular, por lo que puede ser usado para mejorar las propiedades de las biopelículas de proteína. Se ha reportado también que una concentración de 5.5 mmol/L, mejora marcadamente la estabilidad de la leche a 140°C. Por ser un potente antioxidante, se cree que estimula la hormona de la secreción, por lo que podría tener aplicaciones en alimentos para deportistas (**Zhao et. al. 2008**).

Un grupo de ésteres de ácido ferúlico forman el γ -orizanol, llamado así por ser un aceite que se extrae de la fibra del arroz (*Oryza sativa*). Las altas propiedades antioxidantes de este aceite han sido ampliamente reconocidas. Diversos estudios han mostrado varios roles fisiológicos relacionados al λ -orizanol. Se incluyen su habilidad para reducir el colesterol en el plasma, reducir la absorción del mismo, disminuir la aterosclerosis temprana, inhibir la agregación de plaquetas e incrementar la excreción de bilis fecal ácida. El λ -orizanol puede refinarse para aislarse del aceite de arroz; sin embargo, el aceite de arroz ya tiene sus aplicaciones en alimentos, por ejemplo, exhibe excelente desempeño en el freido y contribuye a dar un mejor sabor a la comida frita, puede ser almacenado porque es muy estable; puede adicionarse a la margarina por su facilidad de formar enlaces que permiten la cristalización, también, por su contenido de ácido palmítico, permite un buen balance entre la plasticidad y la cremosidad y untabilidad (**Taniguchi, 2006**).

1.2.3. Obtención de vainillina

A partir de este ácido, se puede obtener la vainillina, que es un aditivo muy importante para impartir aroma y sabor, por bioconversión, lo cual convierte a la vainillina en un aditivo natural, característica muy valorada en estos días. La síntesis de vainillina a

partir de ácido ferúlico se lleva a cabo utilizando cultivos de hongos filamentosos, por ejemplo el *Pycnoprus cinnabarinus*, que convierte el ácido ferúlico a vainillina a través de la reducción de la cadena de ácido propenoico vía oxidación que da como resultado el ácido vainílico, para posteriormente reducir este a vainillina. *Aspergillus niger* puede solamente llegar hasta la conversión de ácido ferúlico en ácido vainílico, ya que carece de las enzimas necesarias para llegar hasta vainillina. Otros hongos que pueden convertir el ácido ferúlico a vainillina son: la raíz roja de *Polyporus versicolor* y *Fomes fomentarius*. *E. Coli*, es una bacteria que puede convertir el ácido ferúlico en vainillina y a su vez ésta en ácido vainílico y éste en ácido protocatecuico. *Cornybacterium glutamicum* produce una mezcla de vainillina (10 – 15% de rendimiento) y ácido vainílico a partir del ácido ferúlico. Se ha encontrado también, que la conversión de ácido ferúlico a vainillina utilizando *C. glutamicum*, *Aspergillus niger* y *Pseudomonas putida* puede incrementarse de 10 a 100 veces añadiendo ditiotreitol al medio, aparentemente, porque este tiol aumenta la reducción del grupo aldehído en la vainillina por una aldehído oxidoreductasa (**González, 2009**).

1.2.4. Aplicaciones en farmacia

El ácido ferúlico puede ser absorbido y metabolizado fácilmente por el cuerpo humano. Muestra una gran cantidad de funciones biológicas, entre las que podemos mencionar la función como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, agente antitrombosis y anticancerígeno. También se ha demostrado que protege contra las enfermedades coronarias, disminuye los niveles de colesterol en hígado y suero, aumentando la viabilidad de los espermatozoides. Actualmente es usado en las industrias alimenticia y cosmética (**Ou, 2007**).

Se ha comprobado que tiene propiedades que pueden ayudar a combatir los efectos de los padecimientos relacionados con el estrés oxidativo, como el mal de Alzheimer, diabetes, cáncer, aterosclerosis e hipertensión; también se cree que puede tener efectos contra enfermedades inflamatorias. Por su excelente absorción de la radiación UV, ya es usado como ingrediente en las lociones fotoprotectoras. Se ha

sugerido que el ácido ferúlico sea usado como estimulante para la movilidad del espermatozoide en tratamientos de fertilidad o durante la fertilización in vitro, este efecto estimulante se debe al parecer, a la habilidad del ácido ferúlico de limpiar los compuestos reactivos al oxígeno que oxidan las membranas lipídicas de las células de los espermatozoides e impartirles movilidad. En 1997 otro estudio demostró que el derivado de ácido ferúlico O – tocoferol – succinil – O – etil ferulato reduce la replicación del virus del VIH, HIV – I en células infectadas in vitro en un 80%. Los efectos preventivos y terapéuticos del ácido ferúlico, son dependientes de sus concentraciones fisiológicas, que están dadas por sus propiedades farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y eliminación) **(Barone et al, 2008)**.

1.3. EL ÁCIDO FERÚLICO EN LA NATURALEZA

Las paredes celulares de plantas son estructuras tridimensionales formadas por una red de polisacáridos en las cuales las más importantes son la celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Se ha comprobado que contienen ácidos hidroxicinámicos covalentemente unidos a esos polisacáridos a través de enlaces éster. El ácido ferúlico está distribuido a lo largo de la pared celular primaria y secundaria de las plantas, y es particularmente abundante en la epidermis, vasos del xilema, vainas y la esclerénquima. Se ha encontrado que los ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico, el ácido sinápico, el ácido p-cumárico y el ácido caféico están unidos covalentemente a la pared celular de las plantas (Figura 2) y como formas solubles en el citoplasma **(Benoit, et al., 2006)**.

Función biológica en plantas: Se han propuesto diversos roles fisiológicos para el ácido ferúlico; en las cadenas de pentosas, arabinosilanos y hemicelulosas en la pared celular, lo cual incrementa la extensibilidad de la pared durante la elongación celular. En pastos, el ácido ferúlico acetila la cadena primaria C₅ – OH de las fracciones a – L – arabinosil de los arabinosilanos; en algunas dicotiledóneas el ácido ferúlico está ligado a las pectinas. También se piensa que tiene un rol defensivo en contra de los depredadores naturales de las plantas, protegiendo por ejemplo al maíz de la infestación del gorgojo.

Otro de sus papeles es promover la liberación reductiva del ion ferritina, lo cual puede representar un proceso importante en el metabolismo de los minerales; sin embargo, el mayor rol fisiológico parece ser su actividad antioxidante. El rol que juegan este tipo de compuestos es muy importante en la naturaleza, ya que las plantas los utilizan como protectores en contra de la radiación UV, como compuestos para enviar señales químicas, como pigmentos ayudando a atraer insectos que pueden polinizarlas y como parte fundamental en su estructura celular, un ejemplo de ello es la estructura tan rígida que le confieren a la caña de azúcar (**Figura 3**) (Lattanzio, 2006).

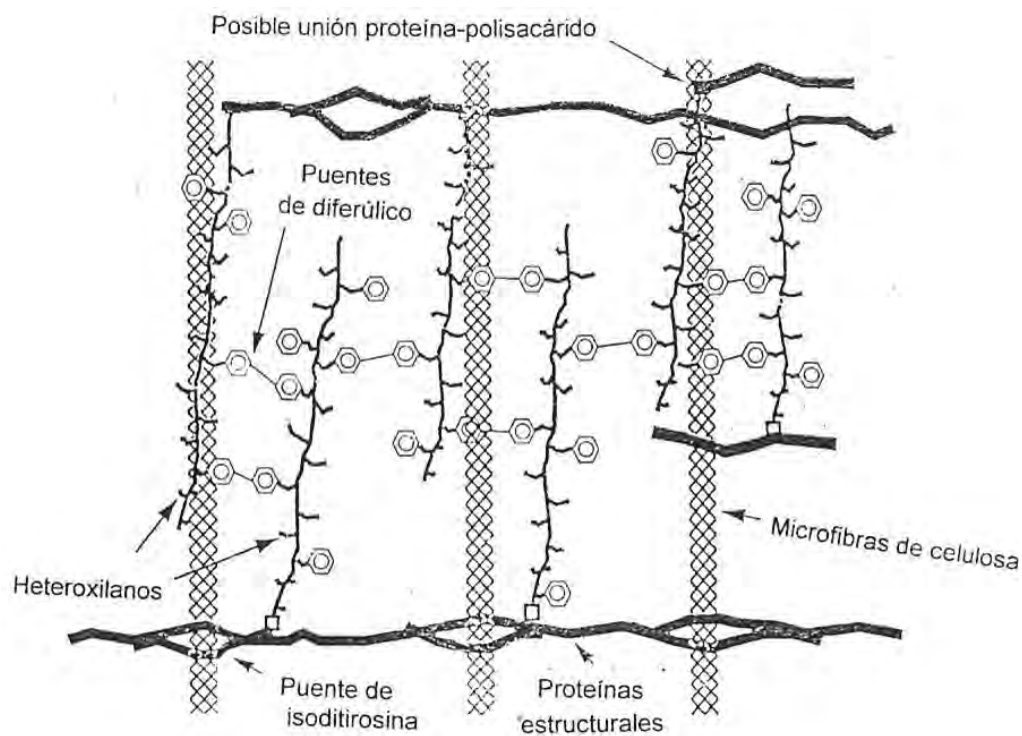


Figura 2. El ácido ferúlico en la pared celular del maíz (Modificado de Saulnier, 2001).

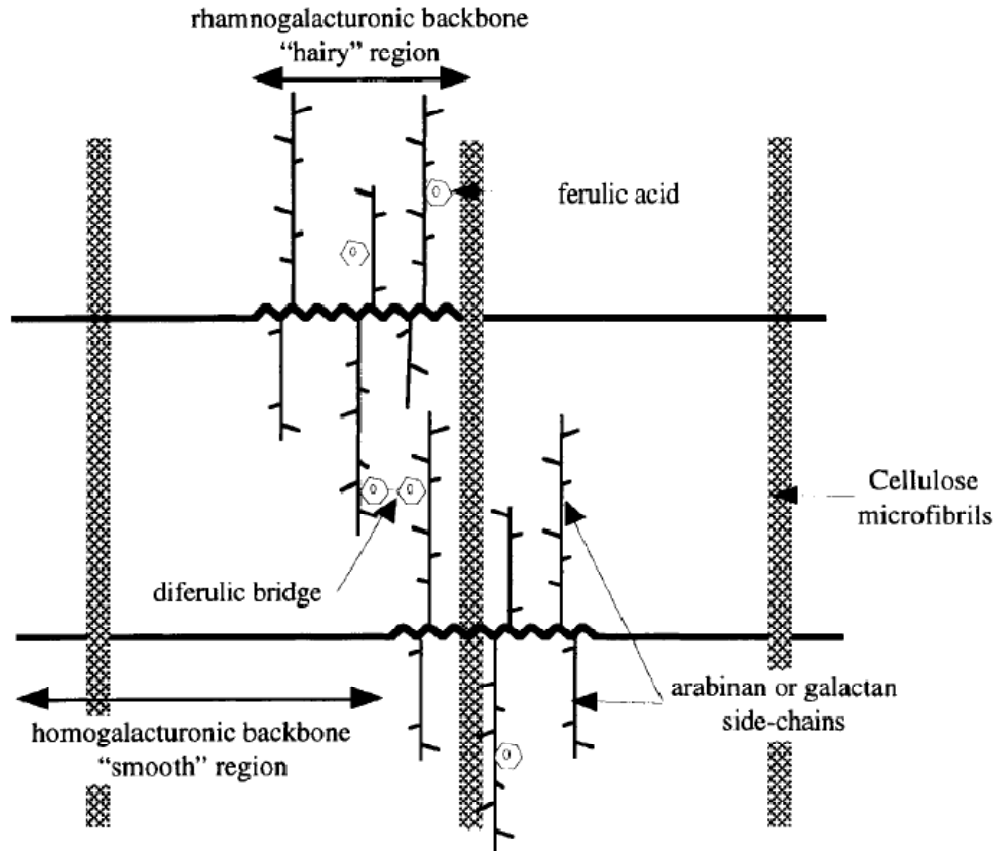


Figura 3. Modelo del pared celular de la caña de azúcar. Modificado de Saulnier & Thibault, 1999.

1.4. OBTENCIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

Existen diferentes maneras o rutas a través de las cuales se puede obtener al ácido ferúlico, éstas son la síntesis y la extracción de fuentes naturales ya sea por medio de hidrólisis ácida, básica o mediante el uso de enzimas (esterasas)(Sohn, 2003).

1.4.1. Síntesis

Para su síntesis química se utilizó la condensación de Knoevenagel. En 1932, se demostró que el ácido malónico se condensaba muy fácilmente con aldehídos aromáticos y alifáticos en presencia de pequeñas cantidades de piridina y piperidina. La condensación del ácido malónico con vainilla en presencia de quinolina a 80°C por 8 horas produce

ácido ferúlico con un rendimiento teórico de 50.3%. Vorsatz mejoró este rendimiento a 73% llevando a cabo la condensación a temperatura ambiente por 3 semanas. Otra vía de síntesis es la condensación de Perkin de vainillina con anhídrido acético; donde estos más acetato de sodio anhidro son calentados por 5 horas a 150 – 170°C. La reacción se detiene con agua fría, el precipitado es filtrado, extraído con éter y recristalizado de agua caliente(Chavarría, 2007).

1.4.2. Extracción de fuentes naturales

El ácido ferúlico puede extraerse de diferentes maneras, las más conocidas son mediante el uso de resinas de absorción o por medio de hidrólisis alcalina, utilizando más comúnmente NaOH a concentraciones de 0.5 a 2.0 N y tiempos de hidrólisis de 6 a 1 o 2 horas respectivamente, sin embargo se debe ser muy cuidadoso con el tratamiento, ya que condiciones muy suaves pueden no separar del todo el ácido ferúlico de los componentes de la pared celular pero condiciones muy severas pueden oxidarlo (Saulnier et al, 2001).

1.5. FUENTES NATURALES

El Ácido Ferúlico se encuentra presente en las paredes celulares de maíz, arroz, trigo, avena, sorgo, forraje, café tostado, tomate, espárragos, olivos, moras, chicharos, frutos cítricos y hojas, en las semillas generalmente se encuentra en la fracción de la fibra. En sus fuentes naturales es difícil encontrarlo en forma libre, generalmente se encuentra como ésteres, covalentemente conjugado con mono y disacáridos, polisacáridos de la pared celular, glicoproteínas, lignina, betacianinas y otros carbohidratos y biopolímeros insolubles de la pared celular. Ha sido identificado también como una fracción lipídica en la industria de procesamiento del aceite de arroz. Se reporta que en maíz entero el contenido de ácido ferúlico puede llegar a ser de 2.9% mientras que la cantidad de ácido

p-cumárico no rebasa el 0.3% y en la cascarilla o salvado de maíz está en un promedio del 5%; en caña de azúcar el valor es de 0.8% **(Saulnier & Thibault, 1999)**.

1.5.1. Obtención del AF a partir de arroz

La producción de arroz en el mundo es de alrededor de 560 millones de toneladas al año, Japón produce más de diez millones. Antes de ser consumido, el arroz es pulido y de dicho proceso se elimina alrededor del 10% del peso inicial el cual se descarta como cascarilla de arroz, cerca del 40% de esa descarga es usada para la producción de aceite de arroz, en su producción hay un desecho alcalino de color oscuro muy viscoso. Dicho desecho tiene una concentración de alrededor del 30% de γ -orizanol esterificado siempre al ácido ferúlico, que mediante una serie de pasos que incluyen el uso de metanol en condiciones alcalinas llevan a la extracción de casi el 100% del ácido ferúlico a precios muy bajos. Como se ilustra en la figura 4, este proceso es sustentable ya que se obtiene a partir de un recurso renovable como lo es el arroz y no de la industria del petróleo **(Taniguchi, 2006)**.

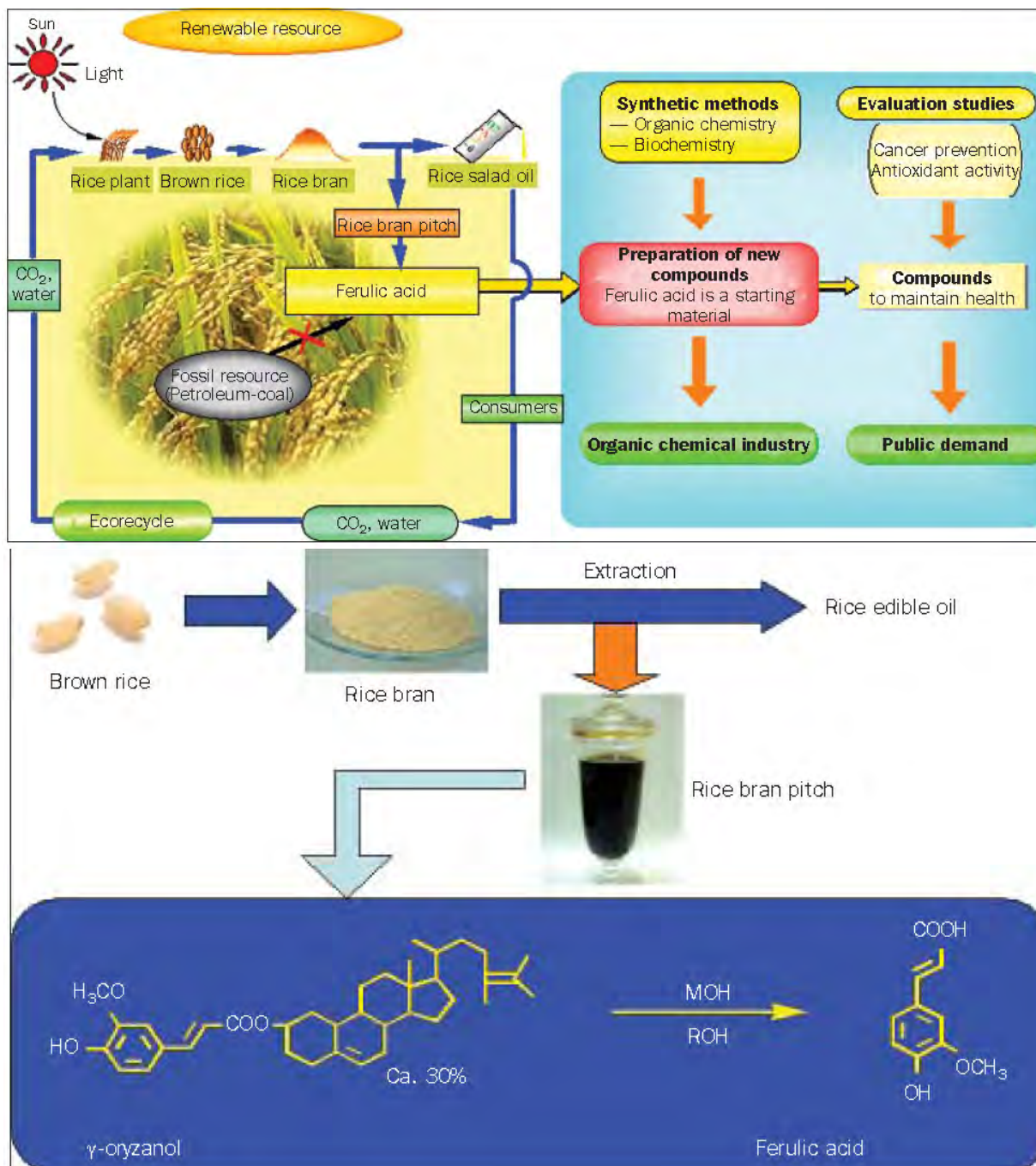


Figura 4. Obtención del AF a partir de un desperdicio de la industria del arroz. Modificado de Taniguchi, 2006.

1.5.2. Obtención de ácido ferúlico a partir de desperdicios de la agroindustria

El ácido ferúlico es muy abundante en cascarilla de trigo en una proporción de 0.5%, pulpa de la caña de azúcar 0.8% y cascarilla de maíz en promedio 3%. Está unido a diferentes posiciones de la arabinosa de la caña de azúcar y de cascarilla o salvado de trigo.

Se han reportado otras fuentes como los cítricos, café, peras, papa y manzanas.



Figura 5. Fuentes naturales del ácido ferúlico

1.5.3. Obtención del ácido ferúlico a partir de maíz

El maíz es la base de la alimentación de millones de personas en el mundo. Se ha estimado que tan sólo en México el consumo anual por persona es de 186kg. En México, Centroamérica y en algunos lugares de los Estados Unidos la forma más común de

procesar el maíz para el consumo humano es la nixtamalización, un viejo y tradicional proceso de cocción alcalina del grano (**Dombrink-Kurtzman et al, 2000**).

En maíz el ácido ferúlico se encuentra principalmente en los tejidos fibrosos de la planta como son el zacate y la caña, en menor proporción en las hojas que cubren la mazorca, y en cascarilla del grano se ha reportado en valores del 3%. La nixtamalización provee al grano propiedades organolépticas y nutricionales diferentes, ya que aumenta el contenido de calcio, hace mayormente disponible la niacina, el almidón y la proteína. Además desnaturaliza el pericarpio favoreciendo la gelatinización del almidón. Esta cocción alcalina saponifica los enlaces éster que unen a los ácidos hidroxicinámicos con la lignina, celulosa y hemicelulosa del pericarpio haciéndolos más disponibles para su extracción. **Chavarría en 2007**, reportó que en nejayote se encontraba un aproximado de 2.61% de AF y 1.33% de dímeros del mismo.

1.6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

La purificación de compuestos fenólicos de fuentes naturales siempre presenta el problema y gran reto de la obtención a partir de licores muy complejos de colores cafés. A lo largo del tiempo se han estudiado diferentes procesos para su obtención, como por ejemplo, la extracción líquido – líquido con solventes inmiscibles en agua (hexano, acetato de etilo, cloruro de metilo, etc.) y la extracción mediante matrices en las cuales estos puedan adsorberse (extracción sólido – líquido) (**Buranov, et al., 2009**).

1.6.1. Extracción líquido – líquido

La importancia que tienen los métodos de separación usados en Química para purificar sustancias o aislarlas de otras con las que se hallan mezcladas, tanto a efectos preparativos como analíticos, es enorme. En aplicaciones industriales, el fin último es precisamente aislar un producto de pureza definida. A pesar de la diferencia de escalas

entre la industria y el laboratorio, los métodos de separación se basan en ambos casos en los mismos principios. Como consecuencia de las leyes que gobiernan los equilibrios químicos, una separación no llega a ser nunca teóricamente completa, y para la mayoría de los métodos de separación se puede definir un factor de eficiencia o de recuperación: $RA = Q_{Alíq}/Q_{Am}$, siendo $Q_{Alíq}$ la cantidad del componente A en el líquido extractante después de la separación y Q_{Am} la cantidad de dicho componente en la muestra problema antes de la extracción. El factor de eficiencia exigido será distinto según la finalidad que tenga la separación. Con fines analíticos las exigencias son máximas, y así, un método de separación se considera en este aspecto aceptable cuando el factor de separación no difiere de la unidad en una cantidad mayor del 0,1%, es decir, se debe cumplir que $RA > 0,999$. Los procedimientos separativos se basan en los distintos parámetros de las sustancias respecto a determinadas propiedades físicas y químicas. Por otra parte, el hecho más común a todos los métodos de separación es la existencia de dos fases. La sustancia que se pretende separar o aislar se reparte o distribuye de una manera determinada, de tal forma que la relación de concentraciones de la sustancia en las dos fases es constante y distinta para cada sustancia. El valor de esta constante se llama coeficiente de reparto, partición o distribución. Se desprende de ello que cuando se trata de separar dos componentes que tengan coeficientes de distribución parecidos, se necesitan muchos pasos sucesivos para llegar a una separación aceptable; y estos procesos que requieren una operación escalonada y larga se llaman fraccionamientos **(Mendoza, 1991)**.

De acuerdo con las técnicas utilizadas y la naturaleza de las bases teóricas en que se fundamentan, los métodos de separación se pueden clasificar de muy variadas formas; nosotros haremos una descripción de los más importantes y señalaremos su utilidad en la práctica de la química experimental y de la tecnología. En la extracción líquido-líquido el ejemplo más sencillo es una extracción discontinua simple en la que dos líquidos inmiscibles se agitan vigorosamente entre las dos fases líquidas según una relación bien definida. Esta relación, para cada soluto, viene determinada por su solubilidad en los dos

disolventes y su expresión matemática es la conocida ley de Nernst: $K=C/C$, siendo C y C las concentraciones del soluto en las dos fases y K una constante que recibe el nombre de coeficiente de distribución o de reparto. Generalmente, uno de los disolventes es el agua y el otro un disolvente orgánico no miscible con el agua, dando lugar en la operación a una fase acuosa y a una fase orgánica, que se separan según su densidad. La mezcla que se pretende separar puede estar formada de líquidos solamente a contener sólidos solubles y a su vez el disolvente puede ser único o ser una mezcla. Actualmente se tiende cada vez más a emplear disolventes mezclados, con lo que es posible mejorar las propiedades selectivas de uno de ellos (**Mendoza, 1991**).

1.6.2. Extracción con adsorbentes (sólido – líquido)

La percolación es una operación de extracción que se produce al pasar un líquido a través de columnas de adsorción (ABSORCIÓN Y ADSORCIÓN), normalmente columnas cromatográficas o de intercambio iónico, y al paso del líquido, que normalmente pasa por gravedad a través de la columna, va disolviendo los productos que se quieren extraer y que anteriormente se habían fijado a la fase adsorbente (Figura 6). El lavado es una operación sencillísima de extracción sólido-líquido, pero de una gran importancia e imprescindible en la purificación de cualquier tipo de compuesto. En todas las extracciones o determinaciones gravimétricas, es preciso eliminar totalmente el líquido madre en el seno del cual se desea extraer el compuesto y en el que quedan disueltas aquellas sustancias contaminantes no adsorbidas, por medio de lavados con disolventes capaces de ir extrayendo, en sucesivas operaciones, todos los productos extraños al compuesto a purificar. A escala industrial, el punto más importante en la operación de lavado es poder determinar la velocidad del proceso, es decir, conocer el tiempo que tardará el líquido lavador en pasar a través de la columna y determinar la cantidad de líquido que será precisa para que el lavado sea efectivo. Intervienen en estos cálculos principalmente la naturaleza o contextura física de las partículas que forman el adsorbente, del método de lavado y del tipo de filtro sobre el cual se realiza la operación.



Figura 6. Resina sintética. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/Ion-exchange_resin.

La adsorción es un fenómeno de gran interés que tiene lugar en la superficie de separación de dos fases, una sólida y otra líquida. Hay varias teorías para explicar el fenómeno de la adsorción y elucidar la naturaleza de las fuerzas que se ponen en juego en el proceso, y aunque no se ha llegado a conclusiones definitivas se cree que son fuerzas de la misma naturaleza que las que se establecen entre los átomos y moléculas, es decir, de naturaleza electrostática (Figura 7). A la materia sólida, normalmente fija, se la llama adsorbente y en general son sólidos porosos, de gran superficie y, los más activos, amorfos. Ejemplos de ellos son ciertos carbones vegetales o animales (carbón activo, negro de humo o negro animal), las tierras adsorbentes (bentonitas, tierras de diatomeas), o geles inorgánicos, como los de sílice o alúmina. Los adsorbentes actúan concentrando y fijando gases, vapores, sólidos gasificados (humos), líquidos, solutos o cualquier otro tipo de «adsorbato» disperso en mezclas de muchos tipos. Ejemplos de procesos en los que se utilice la adsorción como método de separación son una buena parte de las purificaciones de disolventes, separaciones de gases, separación de fracciones de destilación del petróleo, decoloración y clasificación de líquidos, purificación de gases industriales, etc. **(Mendoza, 1991).**

Resinas de intercambio iónico: Una resina de intercambio iónico o polímero de intercambio iónico es una matriz insoluble (o estructura de soporte), normalmente en forma de esferas pequeñas (1-2mm de diámetro), generalmente de color blanco o

amarillento, fabricado de un sustrato de polímero orgánico. El material tiene una estructura muy compleja de poros en la superficie en los cuales se localizan los sitios activos que con facilidad atrapan o liberan iones o moléculas. La captura de iones se lleva a cabo sólo con la liberación simultánea de otros iones, por lo que el proceso se llama intercambio iónico. En muchos casos, las resinas de intercambio iónico, se introdujeron en los procesos como una alternativa más flexible a la utilización de los recursos naturales o artificiales. La mayoría de las resinas de intercambio iónico se basan en un sistema reticulado de poliestireno. Los grupos activos necesarios pueden ser introducidos después de la polimerización. Hay cuatro tipos principales que difieren en sus grupos funcionales: Fuertemente ácido (por lo general, grupos de ácido sulfónico, por ejemplo, poliestireno sulfonato de sodio o poly AMPS). Fuertemente básico, (grupos cuaternarios de amonio, por ejemplo, grupos de trimetilamonio o poly APTAC). Ligeramente ácido (en su mayoría, grupos de ácidos carboxílicos). Débilmente básica (grupos de amino primarios, secundarios y/o terciarios, por ejemplo, aminas de polietileno). También hay tipos especializados: resinas quelantes (ácido iminodiacético , tiourea y muchos otros)(Mendoza, 1991).

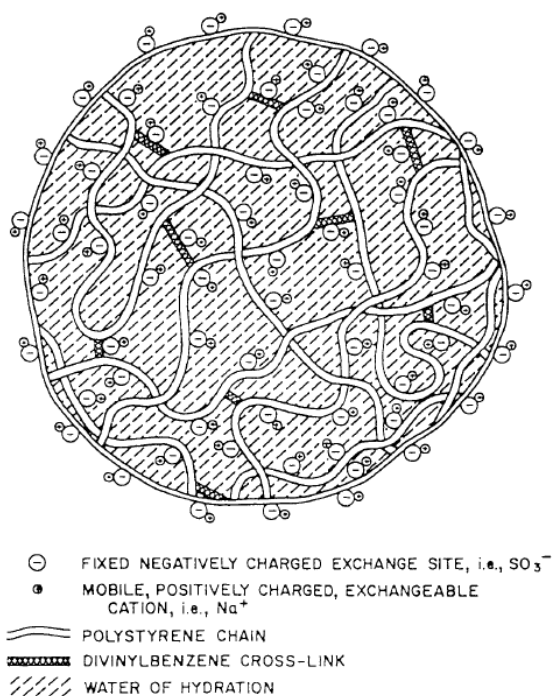


Figura 7. Vista extendida de una perla de resina adsorbente. Modificado de Mendoza 1991.

1.6.3. Extracción sólido – líquido vs líquido – líquido

En el siguiente cuadro se muestran las ventajas y desventajas de las extracciones líquido – líquido y sólido – líquido:

	Extracción líquido – líquido	Extracción sólido – líquido
Ventajas	<ul style="list-style-type: none">- Proceso de extracción simple- El solvente es reutilizado posterior a una destilación- Si el compuesto es muy afín al solvente extractante la separación es muy efectiva.	<ul style="list-style-type: none">- No se forman emulsiones- El material adsorbente se utiliza en muchos ciclos (regeneración)- El proceso se puede realizar en continuo- El solvente es reutilizado después de ser destilado
Desventajas	<ul style="list-style-type: none">- Formación de emulsiones- El tiempo de separación de las fases puede llegar incluso a horas- Sólo se puede realizar entre dos líquidos inmiscibles- El proceso se realiza en fases- Uso de una gran cantidad de solvente	<ul style="list-style-type: none">- Alto costo de las resinas sintéticas- Después de una cantidad determinada de ciclos de uso la resina tiene que ser renovada- La resina tiene que ser regenerada- Muchas veces la resina adsorbe muy fuertemente los compuestos- Depende de la ionización de los compuestos a extraer

1.7. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

El ácido ferúlico puede ser cuantificado mediante métodos espectroscópicos y métodos cromatográficos. Tiene que notarse que la cuantificación por métodos espectroscópicos puede ser interferida por otros compuestos fenólicos, mientras que los métodos cromatográficos al hacer una separación previa de la mezcla pueden cuantificar exclusivamente a ese compuesto (**Barberousse, et al., 2008**).

Métodos espectroscópicos: Los ácidos fenólicos muestran un máximo de absorción en la región del ultravioleta, lo cual hace de la espectroscopia de UV un método confiable para su cuantificación. Sin embargo, los métodos de UV son afectados por la naturaleza del solvente empleado y por el pH de la solución. Por ejemplo, el ácido ferúlico en solución acuosa presenta dos bandas de absorción a los 290nm y 310nm, mientras que en buffer de glicina (pH 10) sólo muestran un máximo de absorción a 345nm, el cual corresponde a la formación del ferulato de sodio. Lamentablemente pueden existir interferencias por otras sustancias que pueden absorber en esta región del espectro como otros fenólicos, proteínas, aminoácidos o ácidos nucleicos. Recientemente se ha usado la microespectrofotometría para estudiar compuestos aromáticos como el ácido ferúlico en paredes celulares de ciertos granos como el trigo y el maíz (**Barberousse, et al., 2008**).

Métodos cromatográficos: La cromatografía en capa fina es principalmente usada para determinación preliminar y purificación de extractos y frecuentemente descrita como prueba piloto del HPLC. Todavía sigue en desarrollo la tecnología para hacer cuantitativo este método, y de lograrse sería un método fácil y rápido para la determinación y cuantificación. En CCF varios sistemas cromatográficos han sido probados, pero el más usado y que mejores resultados presenta es cloroformo:metanol:ácido fórmico (85:15:1). Durante mucho tiempo debido a la limitada volatilidad de los fenoles se restringió la aplicación de la cromatografía de gases para su cuantificación. Pero, con una adecuada derivatización (como por ejemplo la trimetilsililación), los compuestos fenólicos dan respuestas muy buenas en el análisis por

CG. La determinación por HPLC se presenta actualmente como la técnica más popular y rentable para el análisis del ácido ferúlico. Este ácido en particular es fácilmente detectable en extractos de cereales usando la cromatografía en fase reversa, la cual comprende una columna de C18 como fase estacionaria, generalmente acoplada a un detector con arreglo de diodos o un detector UV. Muchos más métodos han sido probados, a continuación se enlistan los más usados: espectroscopía en la región del visible, UV, espectroscopía de fluorescencia, análisis de quimioluminiscencia, espectroscopía de infrarrojo cercano, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, cromatografía planar y electroforesis capilar, sólo por mencionar algunos **(Barberousse, et al., 2008)**.

1.8. DERIVADOS DEL ÁCIDO FERÚLICO

1.8.1. DÍMEROS DEL ÁCIDO FERÚLICO

El ácido ferúlico puede encontrarse en plantas en su forma de dímeros, el primero en ser identificado fue el ácido 5,5' – diferúlico (5,5' – DiFA). Fue aislado de la pared celular de pasto por saponificación, después se demostró que enlaza arabinosilanos en bambú; este enlace provee un mecanismo bioquímico para controlar las propiedades mecánicas de la pared celular, ya sea al final o después de la fase de extensión. El alto contenido de ácido ferúlico en las paredes celulares de tallos de plantas también se ha asociado con una reducción de la facilidad de digestión de tejido en rumiantes.

En plantas, han sido identificados mayoritariamente los dímeros 8 - O – 4 – DiFA, 8 – 5 – benzofuran- DiFA, 5 – 5 – DiFA, 8 – 8 – aril – DiFA y el 8 – 8 – diFA; siendo el primero generalmente el más abundante **(Figura 8)**.

Los dímeros de ácido ferúlico en las plantas también se encuentran en su forma esterificada a los polisacáridos de la pared celular, lo cual puede influenciar el comportamiento fisicoquímico de la fibra dietética y sus propiedades fisiológicas **(Saulnier, et. al, 2001)**.

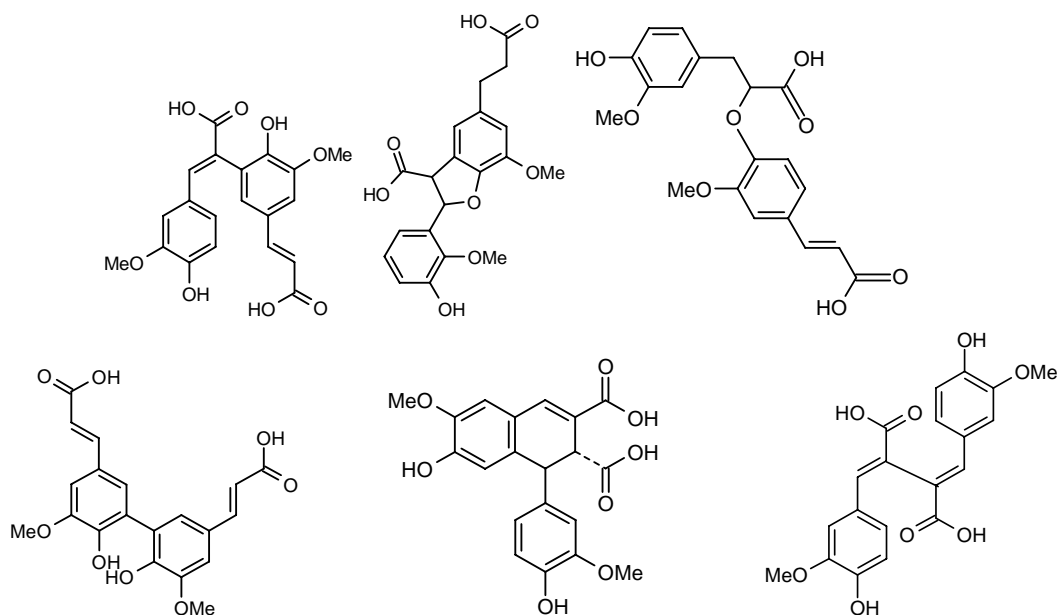


Figura 8. Dímeros de ácido ferúlico; de izquierda a derecha 8 - 5 - diFA; 8 - 5 - benzofurano - diFA; 8 - O - 4 - diFA; 5 - 5 - diFA; 8 - 8 - aril - diFA; 8 - 8 diFA

Síntesis de dímeros de ácido ferúlico: La formación de los dímeros de ácido ferúlico tiene dos vías; la primera es el acoplamiento oxidativo que puede ser llevado a cabo por varios sistemas, como el de las peroxidasas – peróxido de hidrógeno o el de polifenol oxidasa (incluidas las lacasas). El otro mecanismo es un ciclo de adición fotoinducida entre los carbonos de etileno de dos ácidos fenólicos conduciendo a la formación de dímeros de tipo de ciclobutano como los ácidos truxílico y truxínico. Se sabe, por ejemplo, que el uso de sales cuaternarias de amonio o surfactantes amino N – óxido pueden controlar la fotodimerización de ácidos cinámicos; estos surfactantes forman micelas en soluciones acuosas con la parte iónica en la superficie del agua, en presencia de estos agregados, los ácidos carboxílicos se organizan alrededor de ellas con la parte ácida hacia adentro. De este modo, se sintetizaron en diferentes condiciones algunos dímeros de ácido ferúlico, obteniéndolos en diversos rendimientos, concluyendo que la dimerización de los ácidos hidroxicinámicos en general depende tanto de la naturaleza geométrica como de la electrónica de un agente controlados, pero el uso de compuestos surfactantes parece ser una forma de síntesis de dímeros sólo a escala preparativa (Micard, *et al*, 1994).

1.8.2. ÉSTERES DEL ÁCIDO FERÚLICO

Se ha demostrado que el ácido ferúlico puede contrarrestar los efectos de ciertos radicales que atacan las células cerebrales formando estructuras de resonancia que estabilizan dichos radicales. Lamentablemente el ácido ferúlico posee baja solubilidad en medios hidrofóbicos lo cual reduce sus efectos antioxidantes en las reacciones de oxidación de grasas y aceites. La estrategia de esterificación del ácido ferúlico con moléculas lipofílicas como alcoholes alifáticos puede ser empleada para alterar su solubilidad en medios hidrofóbicos. Se ha encontrado mediante una gran cantidad de experimentos que derivados llamados alquil – ferulatos tienen la misma actividad que el ácido ferúlico para la prevención de la oxidación del ácido linoléico. Por la poca solubilidad de los ácidos fenólicos en medios no polares, las aplicaciones de los mismos se ve limitada en productos cosméticos y sistemas alimenticios cuya base sea oleosa. La hidrofobicidad de estos compuestos puede aumentarse por esterificación del grupo funcional carboxilo con un alcohol para obtener una molécula anfifílica que mantenga las propiedades de la original (potencial antioxidante principalmente). El ahora éster fenólico se podría acumular en una interface aceite – agua donde ocurre la oxidación incrementando la protección del aceite o sistema oleoso(Li, 2009).

Ésteres de compuestos fenólicos: La síntesis de ésteres fenólicos se puede lograr por vía química o enzimática. La síntesis química es complicada debido a lo fácil que los ácidos fenólicos se oxidan en medios alcalinos; además, la reacción química no es selectiva lo cual generalmente lleva a reacciones secundarias no deseadas, involucran muchas etapas intermedias y generan productos de desecho extras en la purificación del producto deseado. Las reacciones enzimáticas, en cambio, se pueden llevar a cabo en condiciones de temperatura y pH menos severas, se minimizan las etapas intermedias y por lo tanto la obtención de productos secundarios, son específicas, las enzimas tienen una amplia variedad de sustratos que pueden utilizar, hay pocos pasos de purificación y por lo tanto generan menor cantidad de residuos. Esto hace a este tipo de reacciones amigables con el medio ambiente. El ácido acético se ha esterificado con alcoholes monoterpénicos como

geraniol y citronelol utilizando la lipasa de *Candida antarctica*; el ácido propiónico se ha esterificado con etanol utilizando la lipasa de *Candida cylindraceae*; los ésteres de ácidos butíricos con geraniol, n – butanol y glicidol se sintetizaron utilizando lipasas de *M. miehei* y páncreas de cerdo. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* se ha utilizado para sintetizar los ésteres de ácido oleico con azúcares; por transesterificación se han formado ésteres de citronelol y geraniol a partir de triacil glicerol. También, se han obtenido octil ésteres del ácido hidroxicinámico y del ácido p - hidroxicinámico utilizando las lipasas de *C. antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosay* Liposima. Los derivados hidrofóbicos del ácido ferúlico, los alquil ferulatos, tienen una actividad antioxidante más grande que el ácido ferúlico en la prevención de la oxidación del ácido linoléico en un sistema voluminoso **(Yoshida, et. al., 2006)**.

La reacción de esterificación del ácido ferúlico con algún sustrato alcohólico da un rendimiento muy bajo debido a que el ácido ferúlico tiene una conjugación de un grupo carboxilo con una reacción no carboxílica que es muy voluminosa. Algunas maneras de aumentar el rendimiento de estas reacciones son: utilizar alcoholes lineales con cadenas de hasta 12 carbonos que son líquidos a temperatura ambiente, ya que la misma condensación del sustrato es una manera de acelerar la reacción por la alta concentración de sustrato. Otra manera es aumentar la temperatura de la reacción, pero altas temperaturas pueden desnaturalizar la enzima. Los resultados de esterificación de ácido ferúlico que se han reportado hasta el momento, todos con diferentes condiciones de temperatura, alcohol, tiempo y enzima, muestran rendimientos diversos, que van desde el 11 hasta el 60 % de rendimiento, dependiendo por supuesto de las condiciones **(Torre et al, 2008)**.

1.9. ENZIMAS UTILIZADAS EN BIOTRANSFORMACIONES

Se denomina biotransformación a todo aquel proceso en el que se utiliza comocatalizador un microorganismo o bien una enzima aislada para la conversión de un sustrato en un producto. El estado físico de estos biocatalizadores, así como la elección acerca de utilizar enzimas aisladas (más o menos purificadas) o microorganismos va a depender del tipo de reacción a realizar, de la necesidad o no de cofactores y de la escala en que se va a desarrollar la biotransformación. En la actualidad, se conocen más de 3000 enzimas, pero esta cantidad representa un porcentaje muy pequeño de los que existen en la naturaleza. Alrededor de unas 300 enzimas han sido investigadas y son accesibles comercialmente, lo que da idea del grado de desarrollo que aún es posible en este campo. Las enzimas se clasifican generalmente en seis categorías según el tipo de reacción que catalizan. El grupo de biocatalizadores más utilizado en síntesis orgánica y en procesos industriales son las hidrolasas. Se estima que más de un 70% de las enzimas empleadas en la industria (sobre todo en la alimentaria y en la preparación de detergentes) pertenecen a esta familia. Las hidrolasas catalizan la hidrólisis selectiva de enlaces del tipo C-O, C-N e incluso de enlaces tipo P-O. Son enzimas fácilmente accesibles, que no requieren cofactor y que presentan una gran versatilidad catalítica, puesto que pueden adoptar diversas conformaciones que les permite acomodar en su centro activo una amplia variedad de sustratos. Dentro de este grupo de enzimas, destacan las amidasas, esterasas, proteasas, nitrilasas y especialmente las lipasas, que catalizan la hidrólisis de amidas, ésteres, péptidos, nitrilos y triglicéridos, respectivamente **(De Gonzalo, 2003)**.

1.9.1. Biotransformaciones en solventes orgánicos

A pesar de que el agua es el medio natural donde transcurren las biotransformaciones, las enzimas tienen la capacidad de trabajar en mezclas miscibles agua-disolvente orgánico, en sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico inmiscible, en sistemas micelares reversos o en medios orgánicos "secos". Todas las enzimas que se emplean en disolventes orgánicos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, no están rodeadas

por el propio disolvente, sino por agua. Las proteínas presentan alrededor una capa esencial de agua, que es fundamental para su actividad catalítica. Debido a las diferentes solubilidades en agua de los distintos disolventes orgánicos, se requieren diferentes cantidades de agua para mantener la actividad catalítica de cada enzima, ya que la actividad de los procesos enzimáticos depende en gran medida de esta capa esencial de agua **(De Gonzalo, 2003)**.

En el caso de emplear un enzima en forma sólida (liofilizado o adsorbido sobre un soporte inerte) en disolvente orgánico, va a producirse un proceso de catálisis heterogénea en el que aparecen dos fases: una líquida formada por el disolvente orgánico y los reactivos en él disueltos y otra sólida, constituida por el enzima con su capa esencial de agua. Las ventajas sintéticas de llevar a cabo procesos biocatalizados en disolventes orgánicos son las siguientes:

- Catálisis de un gran número de reacciones que serían desfavorables en agua.
- Ausencia de reacciones laterales no deseadas que suelen suceder en medios acuosos.
- Solubilización de sustratos hidrofóbicos.
- Facilidad de recuperación de ciertos productos insolubles y del propio catalizador, con lo cual el trabajo de estas reacciones es mucho más sencillo que en agua.
- Incremento de la estabilidad térmica de las enzimas, especialmente a bajos niveles de agua.
- Posibilidad de producir cambios importantes en la selectividad de los biocatalizadores.

La actividad de las enzimas en medios orgánicos depende de manera muy importante de factores como la cantidad de agua, la solvatación de los sustratos, el control del pH, el estado físico de la enzima y la naturaleza del disolvente **(De Gonzalo, 2003)**.

1.9.2. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas con la subsiguiente formación de ácidos grasos libres, digliceroles, monogliceroles y glicerol. Estos biocatalizadores se distribuyen en animales, plantas y microorganismos como enzimas digestivas que facilitan el transporte, la deposición y la movilización de las grasas. Además, juegan un papel fundamental en el metabolismo intracelular de lípidos y en el funcionamiento de membranas biológicas. Las lipasas son utilizadas como fármacos en desórdenes digestivos y enfermedades del páncreas. Se emplean también como aditivos de detergentes y como catalizadores en la industria oleoquímica y alimentaria, sin olvidar su función como catalizadores en síntesis orgánica. Presentan un elevado potencial sintético en contraste con otras enzimas, ya que no requieren de cofactor y son capaces de aceptar una amplia variedad de sustratos. Así, las lipasas pueden ayudar a formar ésteres alifáticos, aromáticos, bicíclicos e incluso ésteres de compuestos organometálicos tipo "emparedado". También se ha descrito el empleo de tioésteres y aminas activadas como sustratos para las lipasas. Una gran variedad de estos biocatalizadores son producidos por bacterias y hongos y son excretados como enzimas extracelulares, por lo que su producción a gran escala es un proceso relativamente sencillo. La mayoría de las lipasas existen en los organismos en forma de 2 isoenzimas (A y B), que generalmente presentan la misma enantioselectividad, pero cuyas ligeras diferencias estructurales provocan variaciones en la enantioselectividad de las reacciones que catalizan. Las preparaciones de lipasas crudas contienen las 2 isoenzimas, salvo en el caso de la lipasa de *Candida antarctica*, donde se han conseguido separar a través de procesos de ingeniería genética (González, 2009). Sólo unas pocas lipasas han conseguido aislarse de mamíferos. Una característica fundamental de las lipasas, que las diferencia de otras hidrolasas y las convierte en los enzimas con mayor potencial sintético, es la interacción que presentan con los sustratos. Al contrario que las esterasas, las cuales muestran una mayor actividad a mayor concentración de sustrato hasta llegar a la saturación, la catálisis en medio acuoso con lipasas presenta muy baja actividad con

sustratos hidrosolubles, pero cuando la concentración del sustrato es tan alta que sobrepasa el límite de solubilidad formando una segunda fase lipofílica, se produce un gran incremento en la actividad de la lipasa. Esta propiedad se conoce como activación interfacial. El hecho de que las lipasas durante la catálisis estén expuestas a una fase lipídica demuestra que son capaces de trabajar en entornos hidrofóbicos manteniendo su actividad. Por ello, es posible reemplazar el nucleófilo natural de las lipasas (agua) por una gran variedad de nucleófilos orgánicos como alcoholes, aminas, amoníaco, tioles, peróxidos, hidrazinas, etc. Las lipasas son capaces de catalizar la esterificación selectiva entre ácidos y alcoholes (**Figura 9**). También intervienen en reacciones de transesterificación, procesos en los que se produce un intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (transesterificación) o un éster y un alcohol (alcoholólisis) (**De Gonzalo, 2003**).

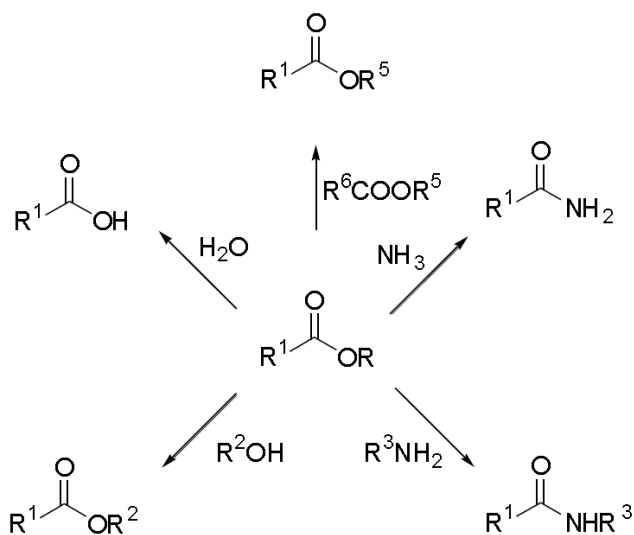


Figura 9. Principales reacciones catalizadas por las lipasas. De Gonzalo, 2003.

Dentro de los diferentes mecanismos de reacción que se postulan para las hidrolasas, en las lipasas la actividad catalítica se produce a través del mecanismo de las proteasas serínicas, también presente en esterasas y ciertas proteasas. En primer lugar, se produce la formación del complejo enzima-sustrato (complejo de Michaelis). Este complejo orienta al sustrato dentro del centro activo de la enzima. La función de la tríada

catalítica es la siguiente: el ácido aspártico polariza el grupo imidazol de la histidina, lo que facilita la transferencia de protones a través de puentes de hidrógeno y finalmente, el protón hidroxílico de la serina se une a la histidina. Ahora, la serina activada es capaz de atacar al compuesto carbonílico, con lo que se forma el primer intermedio tetraédrico (IT1), en el que el oxianión del sustrato se estabiliza por interacciones con la cadena proteínica. Se produce posteriormente la transferencia de un protón de la serina al residuo de histidina, que ésta transfiere al átomo de oxígeno del grupo saliente del sustrato. Esta transferencia provoca la descomposición del intermedio tetraédrico 1 para generar el complejo acil-enzima. A continuación, tiene lugar el ataque del nucleófilo correspondiente (el natural es el agua, aunque ya se ha comentado que son aceptados otros muchos) con lo cual se genera un segundo intermedio tetraédrico (IT2), que colapsa en el producto de reacción y regenera la serina, para comenzar un nuevo ciclo catalítico (Figura 10). La enzima posee un ambiente quiral específico dentro de su centro activo que es responsable de su selectividad. Esta selectividad puede manifestarse bien durante la formación del complejo acil-enzima, durante el posterior ataque del nucleófilo o bien durante ambos (De Gonzalo, 2003).

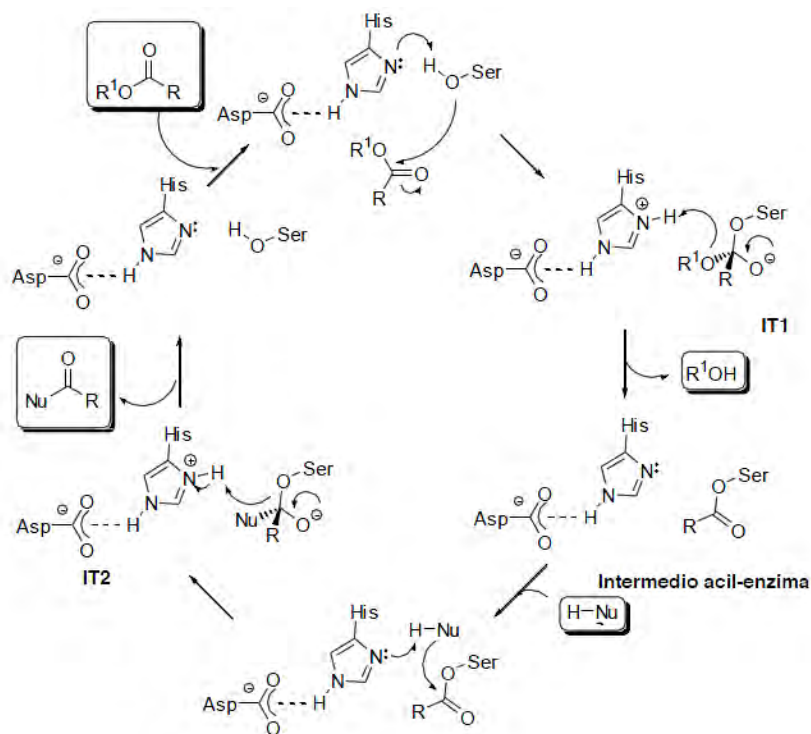


Figura 10. Mecanismo de las hidrolasas serínicas. De Gonzalo, 2003.

La lipasa de *Candida antarctica* es una de las lipasas más versátiles empleadas en el campo de las biotransformaciones. Este biocatalizador fue aislado en la Antártida cuando se examinaban enzimas capaces de trabajar en condiciones extremas. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la forma B, que presentan ciertas diferencias. La lipasa A es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que el componente B es menos termotolerante e independiente de metales para su actividad. Su especificidad de sustrato presenta grandes diferencias, ya que la CAL-B es muy activa frente a una gran variedad de sustratos no naturales, mientras que la CAL-A tiene una menor versatilidad. Ambas isoenzimas han sido obtenidas en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryzae*. Para aplicaciones preparativas, el componente B ha sido mucho más utilizado. La estructura tridimensional de la CAL-B libre y asociada a diversos inhibidores ha sido resuelta mediante difracción de rayos X. La enzima está formada por 317 aminoácidos, con un peso molecular de 33 KDa. Tiene la estructura de pliegues de α/β hidrolasas, no presenta activación interfacial (o ésta es muy escasa) y es muy poco activa frente a triglicéridos de cadena larga. Como la mayoría de las lipasas, su mecanismo de actuación es el de las hidrolasas serínicas. La secuencia de aminoácidos alrededor de la serina difiere de otras lipasas, ya que presenta un resto de treonina en lugar de una glicina. En este cambio se cree que está la explicación de la menor estabilidad térmica de esta lipasa, puesto que al sustituir la treonina por un resto de glicina, se consigue una variedad de CAL-B que presenta mucha mayor termoestabilidad, aunque su actividad disminuye considerablemente frente a la variedad nativa. La CAL-B se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora la enzima (De Gonzalo, 2003).

1.9.2.1. Esterificación enzimática del ácido ferúlico

Los ésteres alquílicos del ácido ferúlico como el ferulato de octilo han demostrado tener altas propiedades antioxidantes que la misma molécula del AF comparable como el BHT. La biocatálisis ha demostrado que puede llevar a cabo modificaciones selectivas de varios azúcares y derivados funcionales de los esteroides con ácido ferúlico, principalmente con lipasas de *Candida antarctica* y *Candida rugosa*. La isoforma B de la

lipasa de *Candida antarctica*, es una lipasa que ha provado su gran regio - y estéreo - selectividad en la hidrólisis o síntesis de compuestos. Esta enzima ha sido utilizada en una gran cantidad de trabajos para acilar una amplia variedad de sustratos incluyendo fitocompuestos (compuestos fenólicos) (**Chigorimbo-Murefua, et. al 2009**).

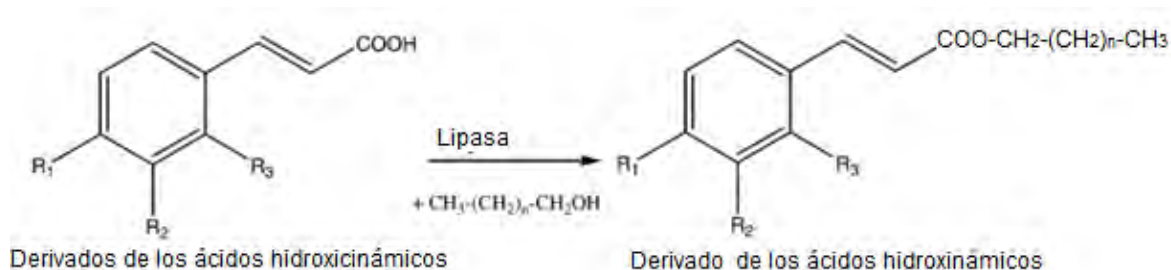


Figura 11. Reacción general para la obtención de ésteres de compuestos fenólicos. Villeneuve, 2007.

Se han encontrado que la esterificación del ácido ferúlico con butanol y octanol da grandes rendimientos, virtualmente superiores a 80%. Curiosamente la esterificación del ácido ferúlico es posible únicamente usando alcoholes de cadena igual o superior a 8 carbonos (**Villeneuve, 2007**).

1.9.3. Peroxidasas

Las reacciones de oxidoreducción en la naturaleza son catalizadas por enzimas redox, clasificadas como oxidoreductasas y divididas en cuatro categorías con respecto al oxidante que utilizan y las reacciones que catalizan:

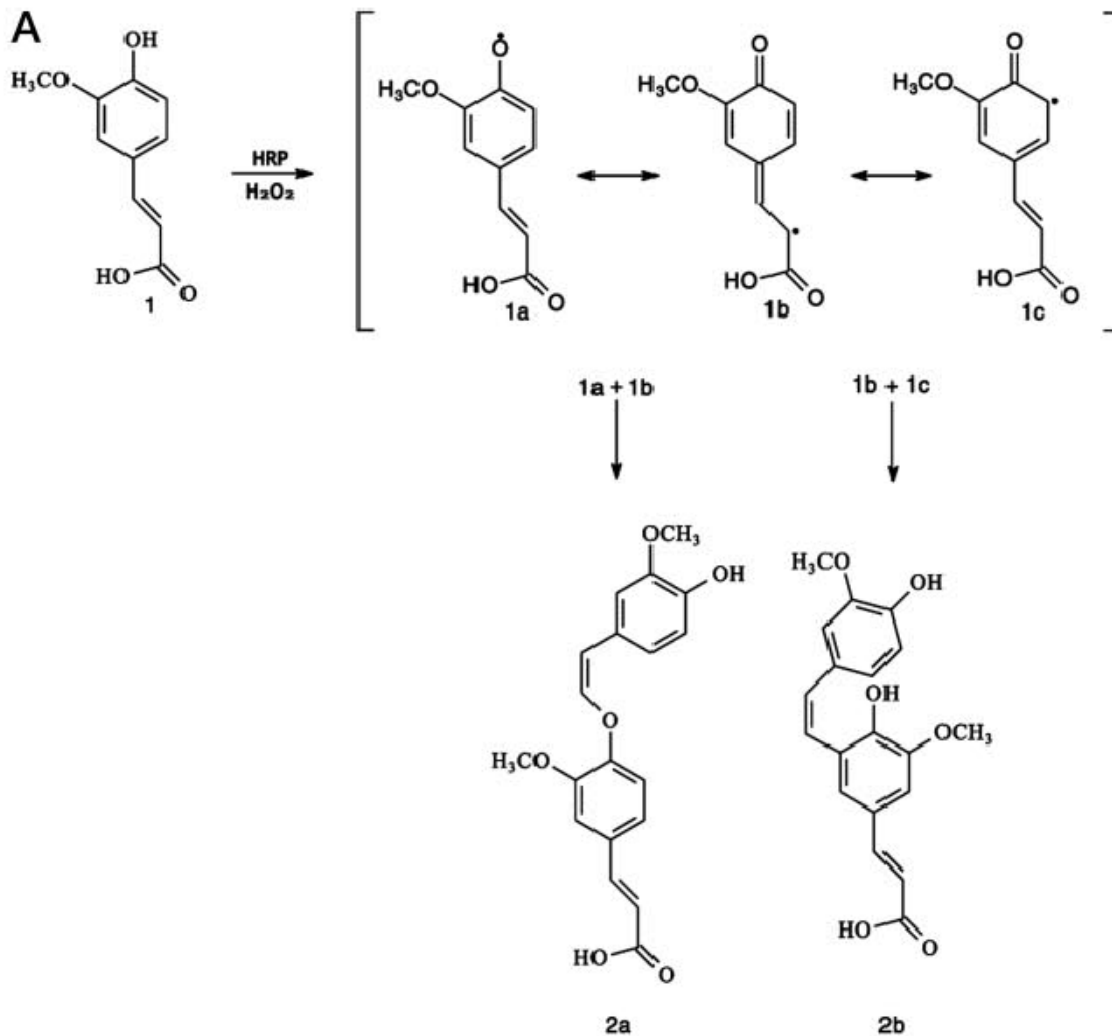
- Deshidrogenasas (reductasas)
- Oxidasas
- Oxigenasas (desoxigenasas y monooxigenasas)
- Peroxidasas

Las peroxidasas han cobrado importancia en años recientes debido a sus aplicaciones sintéticas ya que, catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, además de la oxidación de compuestos con heteroátomos, epoxidan y reducen enantioselectivamente los hidroperóxidos racémicos. Las peroxidasas se encuentran comúnmente en plantas, microorganismos y animales; son nombradas ya sea por su fuente o de acuerdo a su sustrato. La mayoría de las peroxidasas estudiadas hasta ahora son hemo enzimas con protoporfirina férrica IX (protohemo) como grupo prostético. Sin embargo, los centros activos de algunas peroxidasas también contienen selenio (glutatión peroxidasa), vanadio (bromo peroxidasa), manganeso (manganeso peroxidasa) y flavina (flavin peroxidasa) **(González, 2009)**.

Las peroxidasas en plantas están involucradas en la biosíntesis de complejos de la pared celular como la lignina y suberina. El ácido ferúlico es frecuentemente encontrado esterificado a estructuras de la pared celular, por lo cual es un buen sustrato para este tipo de enzimas **(Oudgenoeg, 2002)**.

1.9.3.1. Acoplamiento oxidativo del Ácido Ferúlico:

El acoplamiento oxidativo de los fenoles mediado por las peroxidasas es una de las reacciones más estudiadas por la bioquímica. Muchos estudios en la oxidación de fenoles se han reportado desde la década de los 50's, en los cuales sólo compuestos diméricos eran obtenidos. El acoplamiento oxidativo de fenoles es una reacción que está envuelta en muchas áreas de la bioquímica como por ejemplo la formación de melanina o lignina. Gracias a estudios de rayos X, se ha encontrado que el complejo activado que forman el AF y la peroxidasa de rábano se ha encontrado que el paso inicial es la substracción del hidrógeno del grupo hidroxilo vía oxidación de un electrón y subsecuente desprotonación del catión, resultando en un radical del ácido ferúlico (Figura 12) **(Oudgenoeg, 2002)**.



Dependiendo de las condiciones de reacción, la vía general que se sigue para el acoplamiento o polimerización oxidativa del ácido ferúlico es mediante el ataque de radicales al enlace vinílico del dímero descarboxilado del ácido ferúlico (**Figura 12**). **Ward en 2001** comprobó que la cinética de oxidación del ácido ferúlico sigue una cinética de reacción tipo Michaelis – Menten, en la que la velocidad de reacción depende de la concentración de H₂O₂. También probó que los resultados de la oxidación del ácido ferúlico llevan a tres dehidrodímeros y dos trímeros. Los tres dehidrodímeros incluyen a un benzofurano el cual se ha encontrado en gran cantidad de plantas (**Figura 13**).

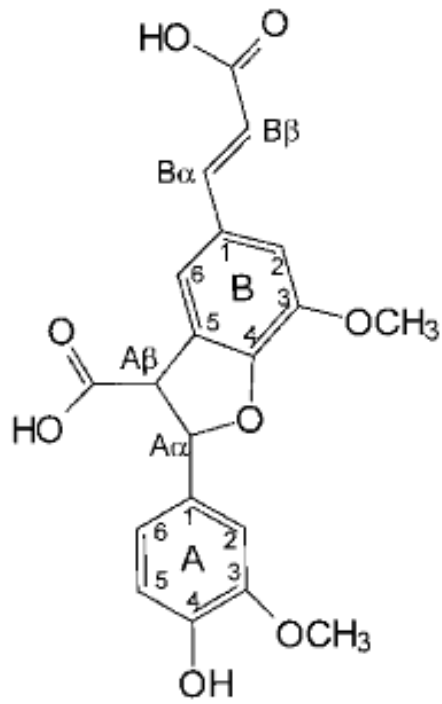


Figura 13. Dímero del AF. en forma de benzofurano. Ward, 2001.

2. OBJETIVOS

GENERALES:

- Determinar la cantidad de AF en nejayotes obtenidos a partir de maíces criollos.
- Desarrollar un método para la obtención de Ácido Ferúlico a escala preparativa con purezas superiores a 95%.
- Encontrar un método para la determinación del ácido ferúlico *in – situ*.
- Ampliar la diversidad estructural del ácido ferúlico acoplándolo a dos alcoholes alifáticos para una posterior dimerización biocatalizada por peroxidasas.

PARTICULARES:

- Comparar el contenido de ácido ferúlico en 9 variedades de maíces criollos y 3 híbridos.
- Evaluar dos métodos de cuantificación de fenoles y relacionarlos con la cantidad de ácido ferúlico determinada por HPLC, para determinar si estos sirven como métodos rápidos de estimación.
- Comparar los métodos cromatografía en columna contra cristalizaciones sucesivas como métodos para la purificación del AF.
- Obtener vía síntesis química el éster etílico del AF.
- Obtener el éster butílico del AF por biocatalisis con la Lipasa de *C. antarctica isoforma B*.
- Obtener el éster decílico del AF por biocatalisis con la Lipasa de *C. antarctica isoforma B*.
- Dimerizar los ésteres etílico y butílico del AF en una reacción catalizada por la peroxidasa de rábano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Material biológico:

Se recolectaron 9 muestras de maíces criollos y 3 muestras de maíces híbridos, se nixtamalizaron y se obtuvo el nejayote de cada uno de ellos. La tabla 1 muestra las claves que se les dieron a las 12 muestras de nejayotes estudiados:

MAÍZ	Clave
CRIOLLO AMARILLO TULYEHUALCO	CATL
CRIOLLO AZUL TULYEHUALCO	CAZTL
CRIOLLO AZUL TLAXCALA	CAZTX
CRIOLLO AZUL MILPA ALTA	CAZMA
CRIOLLO APASEO AZUL	CAZAP
CRIOLLO APASEO MORADO	CMORAP
CRIOLLO ROJO TLAXCALA	CRTX
CRIOLLO ROJO MILPA ALTA	CRMA
CRIOLLO BLANCO TLAXCALA	CBTX
HIBRIDO AMARILLO SINALOA	HASIN
HIBRIDO BLANCO TLAXCALA	HBTX
MEZCLA CRIOLLO HIBRIDO BLANCOS TLAXCALA	MXCHBTX

Tabla 1. Muestras de maíces estudiados

Reactivos:

Ácido Ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$) grado HPLC (Sigma – Aldrich), Ácido p-Cumárico ($C_9H_8O_3$) grado HPLC (Sigma – Aldrich), Ácido Clorhídrico (HCl) concentrado, Hidróxido de Calcio ($Ca(OH)_2$), Tetracloruro de titanio al 20% en HCl conc. ($TiCl_4$), Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), Ácido acético glacial (CH_3COOH).

Solventes:

Agua destilada, Agua desionizada, Metanol (MetOH) grado HPLC (Fermont), Acetato de etilo, Acetona, Diclorometano, Hexano, Alcohol etílico absoluto (J. T. Baker), Tolueno, n-butanol, n-decanol.

Adsorbentes:

Amberlita Amberlite XAD7HD (Sigma – Aldrich), Celulosa microcristalina, Gel de sílice, Malla molecular.

Enzimas:

Peroxidasa de rábano ((EC 1.11.1.7, type II, 150-200units/mg,)), Lipasa de *Candida antartica* isoforma B (Sigma – Aldrich).

Reveladores para cromatografía en capa fina:

Sulfato cérico, solución metanólica de DPPH.

APARATOS**ESPECTROFOTÓMETRO:**

Cintra 101 GBC

Modelo: cintra doublé beam UV – visible spectrometer

Software: cintral.

HPLC:

Cromatógrafo de líquidos

Waters 1525, Bynary HPLC Pump.

Detector: Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector.

Column: Waters Symmetry[®] C18 5 μ m (3.9 x 150mm)

Software: Breeze.

SONICADOR:

Marca: Branson

Modelo: 1510

3.2.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

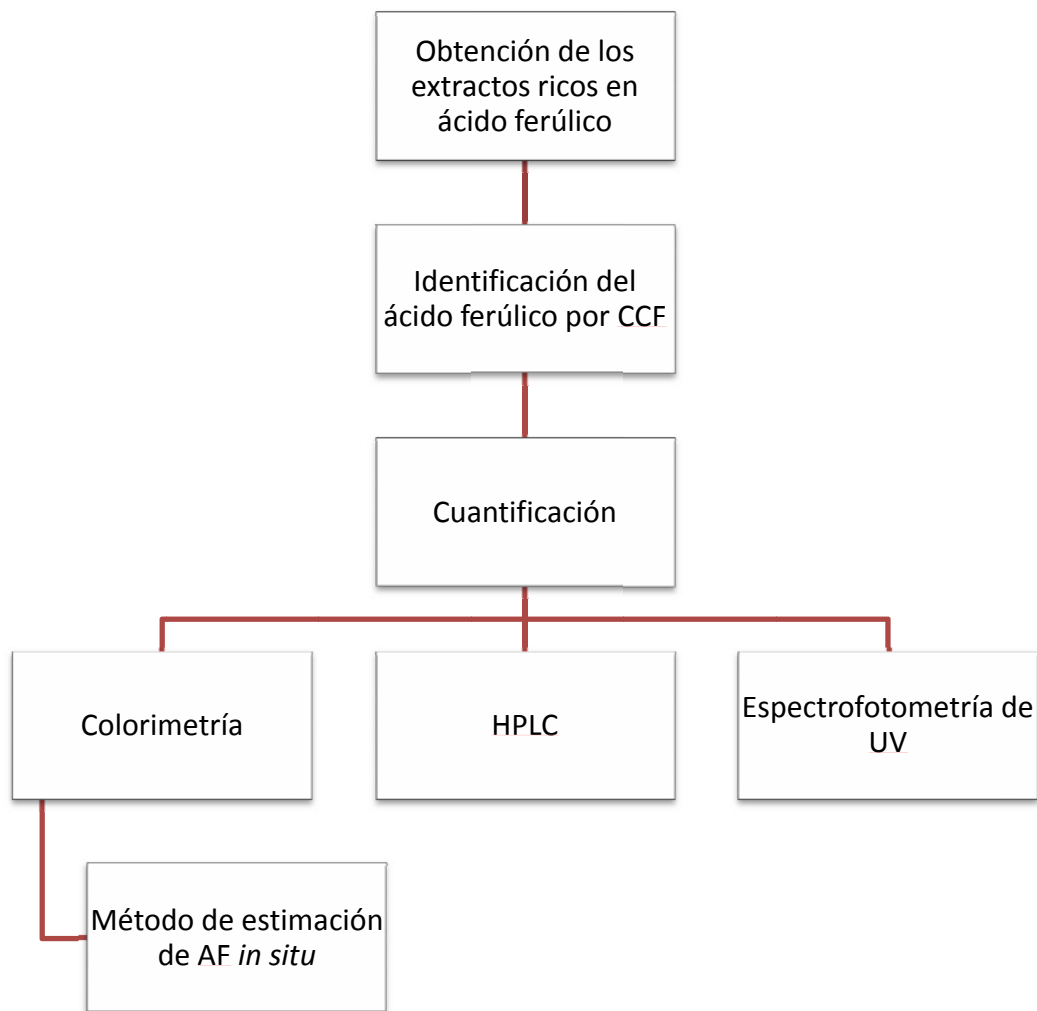
DIAGRAMA GENERAL

Para el desarrollo del presente estudio se siguió el diagrama general que a continuación se presenta, comenzando con la comparación de tres métodos para la cuantificación del ácido ferúlico, continuando con el desarrollo de un método de estimación del AF *in situ*, la obtención del ácido ferúlico a escala preparativa con pureza mayor al 95% y finalmente la ampliación de la diversidad estructural del ácido ferúlico mediante reacciones de esterificación con alcoholes alifáticos y reacciones de dimerización con la ayuda de lipasas.

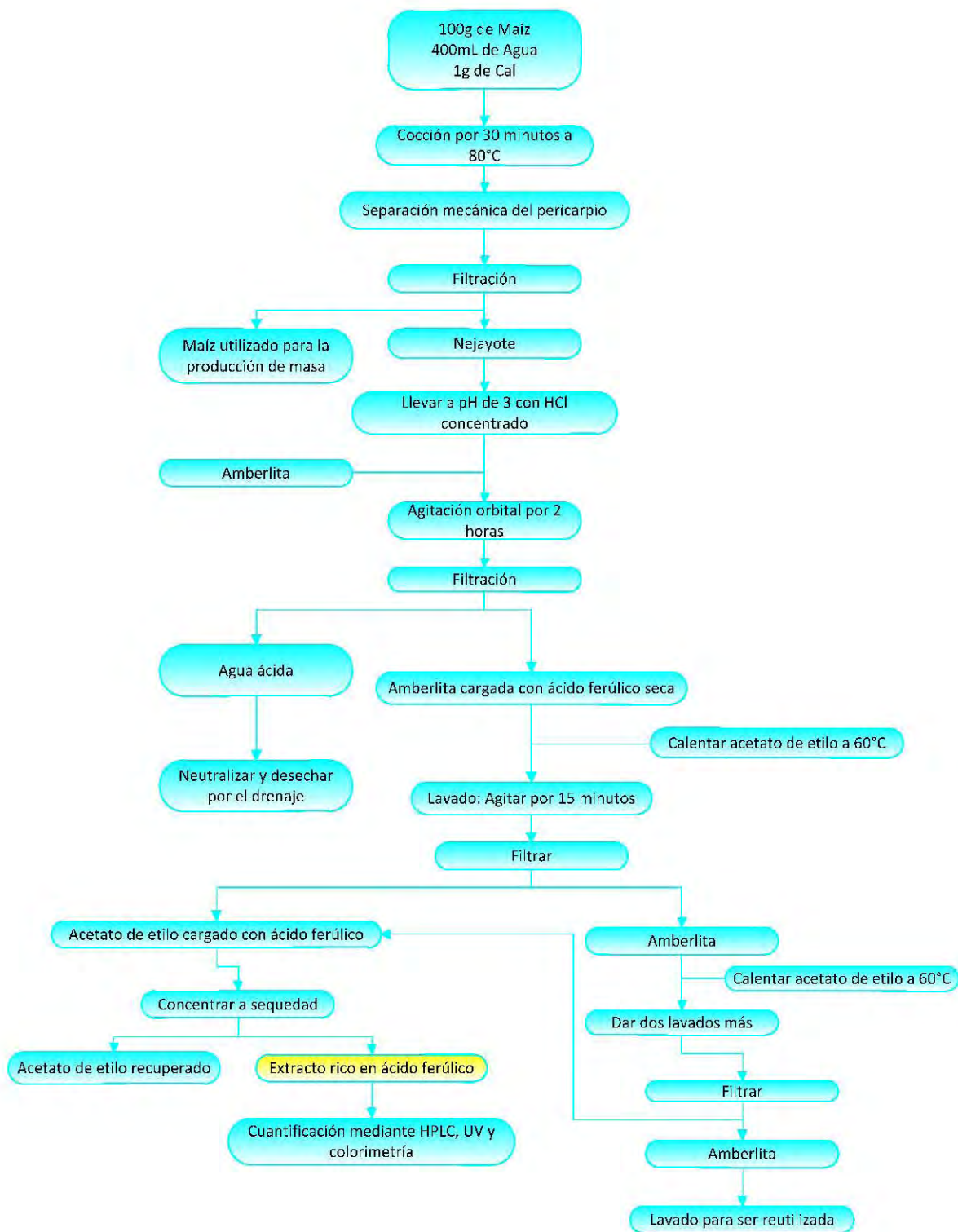


3.2.2. Identificación y Cuantificación del ácido ferúlico en diferentes maíces criollos

Muchas metodologías se han desarrollado para la cuantificación del ácido ferúlico, en el presente estudio se eligieron 3 con el objetivo final de desarrollar un método sencillo para la estimación de este compuesto.



3.2.3. Obtención de los extractos de ácido ferúlico a partir de maíces criollos



OBTENCIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE NEJAYOTES DE MAÍCES CRIOLLOS

Los maíces seleccionados para el presente estudio fueron: criollos de las localidades de Tulyehualco, Milpa Alta, Apaseo y Tlaxcala, además de dos variedades híbridas, una de maíz blanco proveniente de Tlaxcala y la otra la variedad de maíz híbrido utilizada en la mayoría de los molinos de nixtamal de la Ciudad de México, Maíz Sinaloa.

Nixtamalización: En un matraz Erlenmeyer de 1L colocar 100g de Maíz previamente seleccionado, 400mL de agua destilada y 1g de cal. Cocer por 30 minutos a 80°C, una vez frío el nixtamal, retirar el pericarpio manualmente y filtrar a través de una manta de cielo.

Checar el pH del nejayote (alrededor de 10) y llevarlo a 3 con ácido clorhídrico concentrado (10mL por cada 1L), al matraz Erlenmeyer con el nejayote adicionar 8g de resina Amberlite XAD7HD (Sigma – Aldrich) someter a agitación orbital por dos horas a 200rpm.

Filtrar al vacío, neutralizar la solución ácida y desechar por el drenaje.

Transferir la resina seca a un matraz Erlenmeyer de 250mL, agregar 100mL de acetato de etilo y calentar a baño maría hasta 60°C con agitación constante por 10 minutos, filtrar y repetir esta operación 3 veces más.

Concentrar a sequedad el acetato de etilo cargado con el ácido ferúlico a presión reducida a no más de 40°C para obtener los extractos.

Una vez que se cuenta con los extractos de AF, se procede a la cuantificación por los tres métodos (HPLC, espectrometría de UV y colorimetría).

3.2.4. Identificación por cromatografía en capa fina del AF

Disolver en un vial aproximadamente 50mg de cada extracto rico en ácido ferúlico en 2mL de acetato de etilo. En una placa de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria se aplican los extractos con ayuda de un capilar para ser comparados con la referencia (estándar de AF).

Para el caso de los extractos la fase móvil utilizada es cloroformo:metanol (9:1) con una gota de ácido acético para mejorar la resolución en las placas.

Los reveladores utilizados son sulfato cérico y DPPH, los cuales son esparcidos sobre las placas y al final éstas secadas.

3.2.5. Cuantificación de ácido ferúlico mediante espectrofotometría de UV.

El primer método estudiado para la cuantificación del ácido ferúlico está basado en la capacidad del que tiene este compuesto para absorber en la región UV.

Construcción de la curva patrón: pesar en matraces con aforo de 50mL las siguientes cantidades del estándar de ácido ferúlico: 56.00mg, 36.00mg, 28.75mg, 23.00mg, 18.40mg, 14.70mg, 11.75mg, 9.35mg y 7.50mg, diluirlas en agua desionizada y aforar, sonicar por 5 minutos, tomar lecturas de absorbancia a 320nm contra un blanco de agua desionizada, todo lo anterior por triplicado, sacar los promedios y trazar la gráfica de concentración contra absorbancia (Anexo 1).

Preparación de la muestra: En matraces con aforo de 50mL diluir aproximadamente 50mg de cada extracto obtenido de las muestras de nejayotes, aforar con agua desionizada y sonicar por 5 minutos, al cabo de ese tiempo tomar la absorbancia de cada una de ellas contra el blanco de agua desionizada, interpolar en la curva patrón para obtener la concentración.

3.2.6. HPLC

Construcción de la curva patrón: la curva fue construida diluyendo ácido ferúlico grado HPLC en Metanol grado HPLC, en concentraciones de 0.2mg/mL, 1mg/mL, 3mg/mL, 5mg/mL y 7mg/mL, cada una por separado y aforando a 1mL, se sonicaron por 5 minutos y cada una se inyectó por triplicado.

Se sacó el promedio de cada área bajo la curva dada por el programa Breeze de cada punto y se graficó en contra de la concentración. Se obtiene la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación (Anexo 2).

Adicionalmente a la cuantificación del ácido ferúlico se pudo cuantificar también el ácido p-cumárico presente en las muestras, para lo cual se construyó la curva patrón con las concentraciones: 0.06mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL, 1.5mg/mL y 2.0mg/mL (Anexo 3).

Preparación de la muestra:Una vez con los extractos secos pesar alrededor de 5mg de cada uno, aforar a 1mL con metanol grado HPLC, sonicar por 5 minutos e inyectar por triplicado en las condiciones cromatográficas abajo descritas.

Condiciones cromatográficas:

Fase Móvil:

A: Ácido acético 1%

B: Metanol

Gradiente:

Flujo 0.9mL/min

Tiempo (min)	%A	%B
0	90	10
5	85	15
10	80	20
12.5	75	25
15	70	30
20	70	30

Volumen de muestra inyectado: 20 μ L.

Detector de UV: 290nm

Se midió el área bajo la curva del ácido ferúlico y del ácido p-cumárico, se interpoló en la curva respectiva y se determinaron las concentraciones de cada compuesto en cada muestra.

3.2.7. COLORIMETRÍA

El método colorimétrico está basado en la formación de un complejo colorido entre los fenoles y el titanio (Eskin, 1978).

Construcción de la curva patrón: Una serie de soluciones del estándar fueron preparadas con pesos de **4mg, 3mg, 2mg, 1.5mg y 1mg**, cada una de ellas fueron transferidas cuantitativamente a viales de 10mL y se les agregaron 0.5mL del agente de tetracloruro de titanio al 20% y 2.5mL de HCl concentrado, agitadas en vortex por alrededor de 15 segundos, la solución se calienta a 40°C

por dos minutos y vuelta a mezclar otros 15 segundos. La absorbancia fue medida a 480nm en contra de un blanco que contenía sólo el agente de titanio en HCl.

Preparación de la muestra: Del extracto seco de cada muestra se toman 4mg y se transfieren cuantitativamente a un vial de 10mL, se agregan 0.5mL del tetracloruro de titanio y 2.5mL de HCl concentrado, se agitan con ayuda de un vortex por 15 segundos y a continuación se calientan por 2 minutos a 40°C, se agitan por 15 segundos más y se lee la absorbancia contra un blanco de titanio y HCl a 480nm, se interpola el valor de absorbancia en la curva patrón y se determina la cantidad de ácido ferúlico presente en la muestra.

3.2.8. MÉTODO *IN-SITU* PARA LA ESTIMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO:

Muchas pruebas con ácido ferúlico puro y con extractos ricos en ácido ferúlico nos llevaron a que la mejor opción para la construcción de este screening era usar el extracto con una concentración conocida del ácido: se utilizó el extracto obtenido a partir de la muestra HASIN con una pureza de 33.34%.

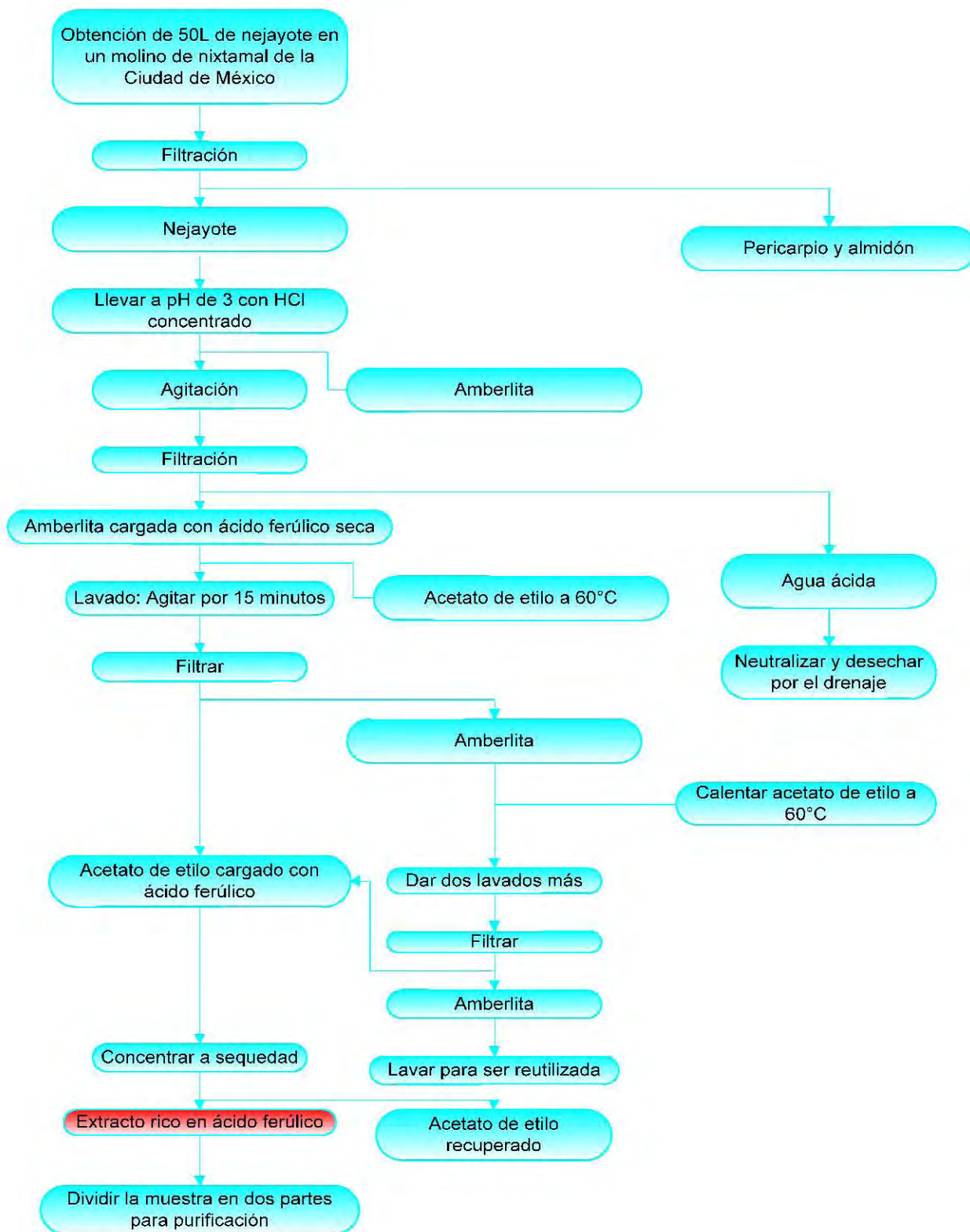
Cuando se realizaron las extracciones de las diferentes muestras de nejayote se obtuvo un rango que va de 2g hasta 4.5g de extracto por cada litro de nejayote. Se estableció que las muestras que se debían tomar para la estimación serían de 100mL y que se realizarían con un lavado inicial de 50mL y dos finales de 25mL y a partir de ahí se tomaría una alícuota de 5mL. Por lo tanto, se decidió construir el screening que abarcara un poco más ese rango.

En viales con capacidad para 10mL se pesaron 0.0014g, 0.004g, 0.015g, 0.022g, 0.030g, 0.037g, 0.045g, 0.060g y 0.075g del extracto con pureza de 33.34%, se disolvieron en 5mL de acetato de etilo y se agregó 1mL del reactivo tetracloruro de titanio, los viales son cerrados y agitados vigorosamente. Los viales fueron etiquetados entonces con la cantidad de AF presente en un litro de nejayote 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8, 2.5 y 3.0mg/L nejayote.

Estimación visual del contenido de ácido ferúlico: En un embudo de separación de 250mL se transfieren 100mL del nejayote a analizar, se acidifica la solución con 10mL de HCl conc., se realiza la extracción directa con 50mL de acetato de etilo, separar la fase

orgánica, y a la fase acuosa se le hacen dos lavados más con 25mL de acetato de etilo cada una, se juntan las fracciones y posteriormente se toma una alícuota de 5mL del solvente en un vial de 10mL, se agrega 1mL del reactivo de tetracloruro de titanio agitamos vigorosamente por alrededor de un minutos y comparamos contra el screening.

3.2.9. Obtención del ácido ferúlico a escala preparativa a partir de Nejayote



Obtención de ácido ferúlico a escala preparativa (Modificado de González, 2009).

Colocar 40L de nejayote en un recipiente con la capacidad adecuada, se procede a acidificar con ácido clorhídrico concentrado, la proporción a usar es de 10mL de ácido por cada litro de nejayote (400mL de HCl conc. en este caso), la solución pasa de un color amarillo intenso a una solución casi incolora.

Adicionar 20g de resina Amberlite XAD7HD (Sigma – Aldrich) por cada litro de nejayote (800g). La agitación en este caso se lleva a cabo manualmente por dos horas.

Filtrar la resina mediante manta de cielo y con ayuda del vacío, dejar por un tiempo en el embudo de filtración para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

La solución ácida se neutraliza con hidróxido de sodio y se desecha por el drenaje.

Se divide en cuatro partes la cantidad de resina total (400g c/u), se coloca en matraces de un litro.

Por otra parte se calienta acetato de etilo a 60°C (600mL), agregar a cada matraz con la resina y agitar por 30 minutos en una agitadora orbital.

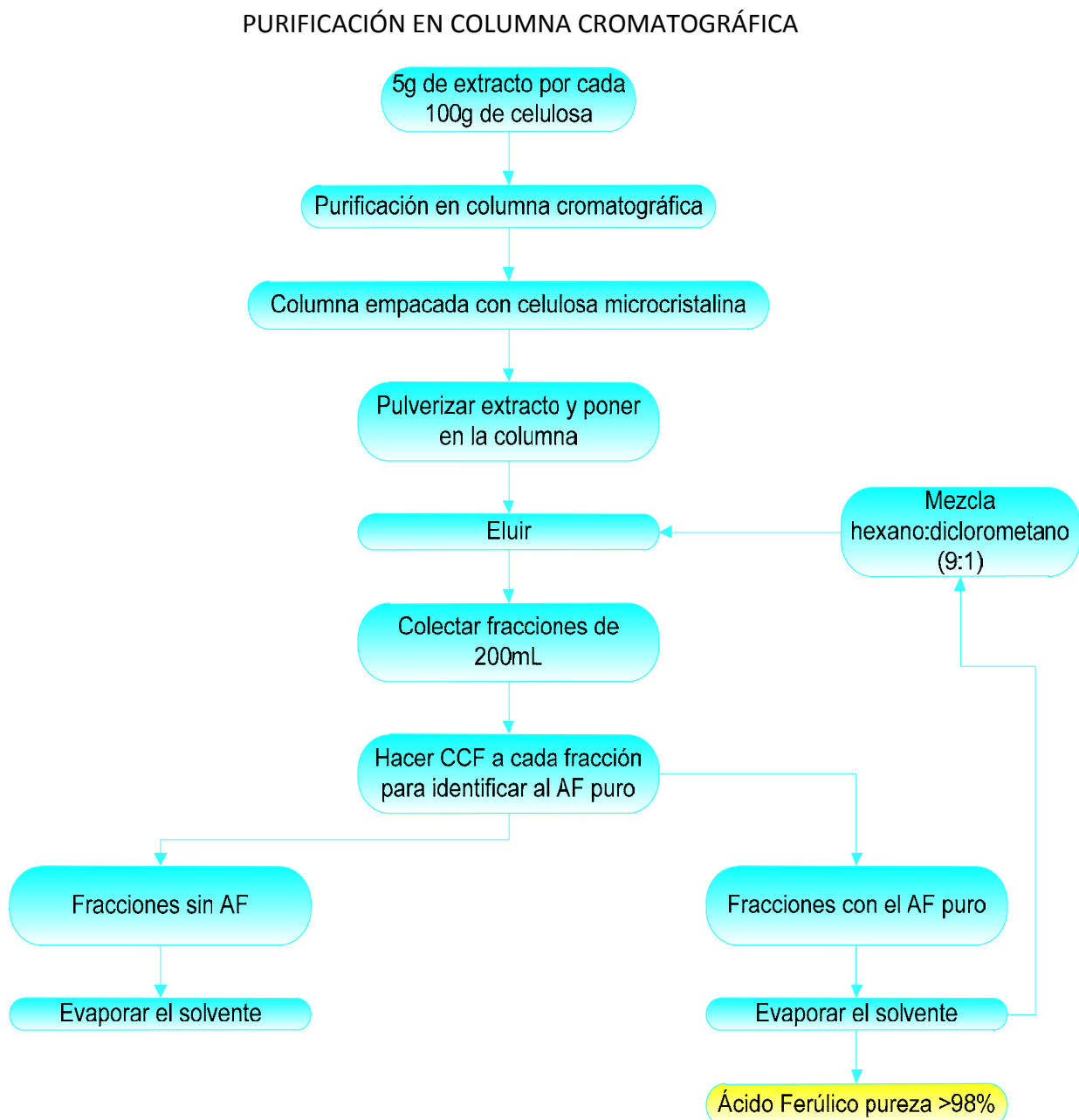
Filtrar para separar el solvente cargado de la resina, devolver la resina a los matraces y realizar la misma operación dos veces más, en total se juntará un volumen final de acetato de etilo de 7200mL.

Una vez lavada la resina con acetato de etilo se puede recuperar haciendo lavados con etanol caliente, sosa y posteriormente agua destilada, nuevamente etanol y dejar secar.

El acetato de etilo cargado entonces es destilado al vacío con ayuda de un rotavapor a no más de 40°C, el acetato de etilo recuperado se pasa a través de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y se puede reutilizar en el mismo proceso. El extracto seco entonces, puede ser purificado.

3.2.10. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

La purificación del extracto obtenido en el paso anterior se llevó a cabo mediante dos metodologías, purificación en columna cromatográfica y recristalizaciones sucesivas por cambio de polaridad en la solución.



3.2.10.1. Purificación del ácido ferúlico mediante columna cromatográfica

Se tomó la decisión de escoger a la celulosa microcristalina como fase estacionaria, ya que la mayoría de los compuestos que contaminan al extracto son de naturaleza polar según se observa en las placas de cromatografía, que al provenir de un material vegetal hidrolizado, estos, son subproductos de los carbohidratos de la pared celular, es decir, celulosa y lignina principalmente, por lo tanto serán más afines a ella (fase estacionaria) y otros compuestos menos polares podrán eluir por la columna de manera más libre.

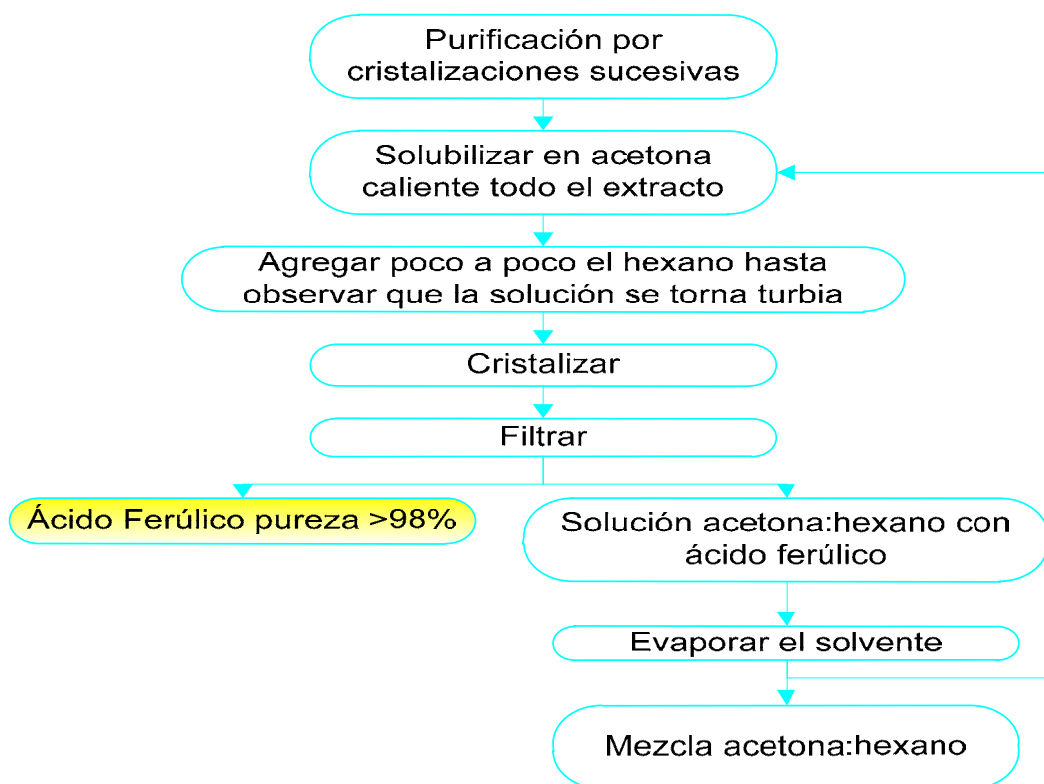
Para escoger la fase móvil más adecuada se hicieron varias placas cromatográficas de celulosa, aplicando el extracto crudo y eluyendo con diferentes mezclas de solventes para encontrar alguna que nos diera una buena resolución (separación) de los componentes presentes en el extracto. La mezcla de solventes ideal en este caso fue:

Diclorometano:Hexano (1:9).

- Empacar la columna: Poner en la punta de la columna (50cm de larga y 5cm de diámetro) un pedazo de algodón empapado en diclorometano o hexano lo suficientemente grande para cubrirla toda y evitar que el polvo de celulosa se escape. Agregar poco a poco y constantemente, la cantidad total de celulosa a utilizar (100g de fase estacionaria por cada 5g de extracto crudo). Hacer pasar por esta 1L de la fase móvil, recolectar en un matraz kitazato, si la elución es muy lenta el uso del vacío es buena opción.
- Muestra: Homogeneizar la muestra con 5g de celulosa microcristalina a fin de obtener un polvo fino, colocarlo en la parte superior de la columna.
- Elución: Llenar la columna con la fase móvil, agitar y eluir con ayuda del vacío. Se recolectan fracciones de 200mL luego de recolectar una inicial de 1L.

- Identificación: Correr placas (placas de gel de sílice eluidas con una mezcla de cloroformo:metanol 9.5:0.5) a cada fracción con el fin de detectar la fracción inicial y la fracción final en la encontramos al ácido ferúlico puro.
- Obtención del ácido ferúlico puro: Juntar las fracciones en las que el ácido ferúlico aparezca puro, concentrar a sequedad, cuantificar por HPLC y determinar el rendimiento y pureza.
- Las fracciones impuras se pueden juntar para ser purificadas posteriormente.

PURIFICACIÓN MEDIANTE CRISTALIZACIONES SUCESIVAS



3.2.10.2. Purificación del ácido ferúlico mediante cristalizaciones sucesivas

Este método se basa en el cambio de polaridad de una solución (solución polar a una solución no polar), permitiendo que las sustancias más polares, en este caso el ácido ferúlico, comiencen a cristalizar y luego de un tiempo la mayoría de éste haya cristalizado.

Solubilizar 5g del extracto crudo en 50mL de acetona a ebullición, enfriar la solución a 25°C. Agregar 5mL de hexano poco a poco, hasta notar la turbidez de la solución, dejar cristalizar por 30 minutos, al cabo de este tiempo los cristales formados se pueden filtrar al vacío.

La solución todavía contiene un poco de ácido ferúlico, por lo que se puede evaporar un poco de acetona y repetir el mismo procedimiento con el hexano.

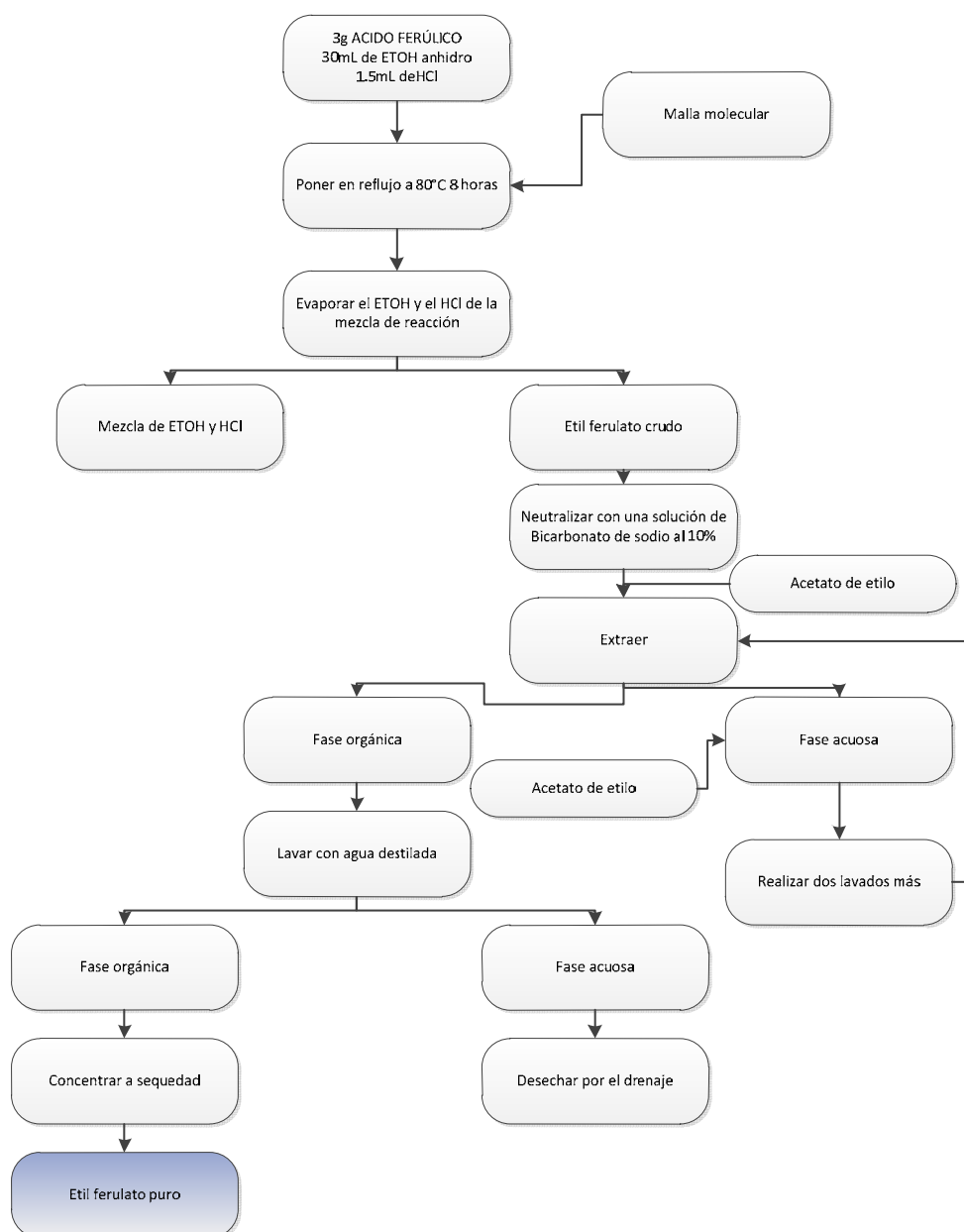
Pesar, determinar pureza por HPLC y rendimiento.

3.2.11. Diversificación estructural del ácido ferúlico

Para obtener diversos ésteres del ácido ferúlico, se han desarrollado varias metodologías, las que aquí se proponen parten del ácido ferúlico esterificado con etanol y posteriormente, al ser el etanol un buen grupo saliente transesterificar el AF con alcoholes alifáticos de cadena más larga.

3.2.11.1. Esterificaciones

3.2.11.1.1. Obtención química del ferulato de etilo



Esterificación de ácido ferúlico con etanol (obtención del ferulato de etilo)

Colocar 3g de ácido ferúlico puro en un matraz bola, agregar 30mL de etanol absoluto anhidro y 1.5 mL de HCl conc., montar el equipo para reflujo y calentar hasta 80°C, mantener en reflujo durante 8 horas.

Retirar del reflujo, evaporar el etanol y el HCl que no reaccionaron.

Para la purificación preparar una solución de bicarbonato de sodio al 10%.

Lavar la resina que se formó después de la evaporación con la solución anterior, el punto final es cuando se deja de producir gas.

Agregar acetato de etilo y extraer.

Lavar finalmente la fase orgánica con agua destilada dos veces más, agregar sulfato de sodio anhidro y concentrar a sequedad en rotavapor a no más de 40°C.

Correr una placa cromatográfica para observar cualitativamente la pureza. Placas de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo (70: 30), revelar con sulfato cérico, además de mandar a RMN una parte para su análisis.

3.2.11.2. Transesterificaciones

Obtención de los ferulatos de butilo y decilo



3.2.11.2.1. Obtención de los ferulatos de butilo y de decilo mediante reacciones catalizadas con enzimas (lipasa de *Candida antartica*) (Modificado de González, 2009)

Colocar en un matraz 100mg de ferulato de etilo puro, disolverlo con 50mL de tolueno, adicionar el alcohol aceptor (butanol o decanol) en una proporción de 2:1 con respecto a los moles de ferulato de etilo; 150 mg de la lipasa de *Candida antartica* isoforma B. y 20mg/mL de malla molecular para controlar el agua en la reacción.

Las condiciones de reacción son: incubación a 60°C con agitación orbital a 200rpm. Se monitoreó por CCF cada 12 horas por 4 días en placas de sílica gel, se eluyeron las placas con una mezcla de hexano: acetato de etilo (50: 50) y se revelaron con sulfato cérico.

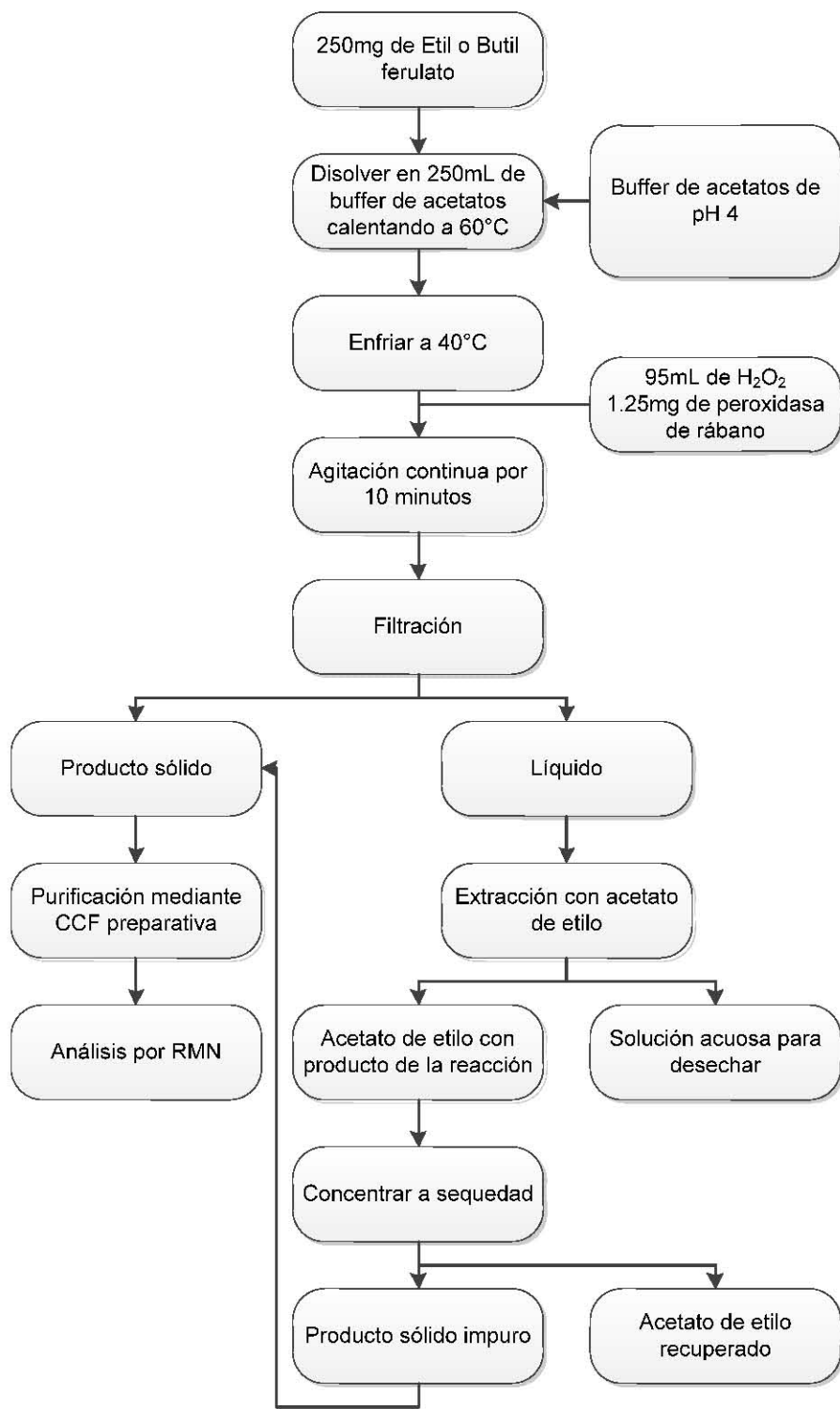
Al cabo de 4 días, filtrar para retirar la enzima y la malla molecular, eliminar el tolueno por evaporación en rotavapor a no más de 60°C.

El ferulato de decilo fue purificado mediante una placa de cromatografía en capa fina preparativa, eluída con hexano:acetato de etilo (9:1), mientras que el ferulato de butilo fue purificado en una columna de gel de sílice eluida con hexano : acetato de etilo (8:2).

Los productos se enviaron a RMN para su análisis.

3.2.11.3. Dimerizaciones

Dimerización de los ésteres del ácido ferúlico



3.2.11.3.1. Dimerización de los ferulatos de etilo y butilo con peroxidasa de rábano
(Modificado de Ralph et. al., 1998)

Disolver 250mg de ferulato de etilo o butilo 250mL de buffer de acetatos de pH 4 a 60°C, enfriar a 40°C una vez disuelto, adicionar 95mL de H₂O₂, después 1.25mg de peroxidasa de rábano disuelta en 0.25 ml de buffer de fosfatos pH 7.

Después de 10 minutos, el producto asentado en el fondo del matraz se filtra al vacío; la mezcla de reacción restante fue extraída con acetato de etilo para obtener la mayor cantidad de producto posible; el acetato de etilo se evaporó y junto con el polvo secado al vacío se purificó por medio de cromatografía de capa fina en placas preparativas de sílica gel de 20 x 20 cm y 2 mm de ancho; se corrieron las placas 2 veces en cámaras de vidrio con una mezcla de elución hexano: acetato de etilo (1:1). El producto purificado fue enviado a RMN para su análisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO EN EXTRACTOS DE NEJAYOTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE MAÍCES

Después de la obtención de cada extracto de nejayote con acetato de etilo, se procedió a la toma de placas cromatográficas para la identificación del compuesto, ya que la CCF en este caso fue usada como método de identificación rápida, lo cual ayuda a saber si el nejayote presenta este compuesto o no. En la siguiente figura se presenta una de las placas obtenidas a partir de dos muestras de nejayotes (amarillo híbrido Sinaloa y Criollo Rojo Tlaxcala, carril dos y tres respectivamente) comparadas con el estándar de ácido ferúlico (carril 1), la placa se eluyó con una mezcla de cloroformo:metanol (9.5:0.5) con una gota de ácido acético y revelada con sulfato cérico.

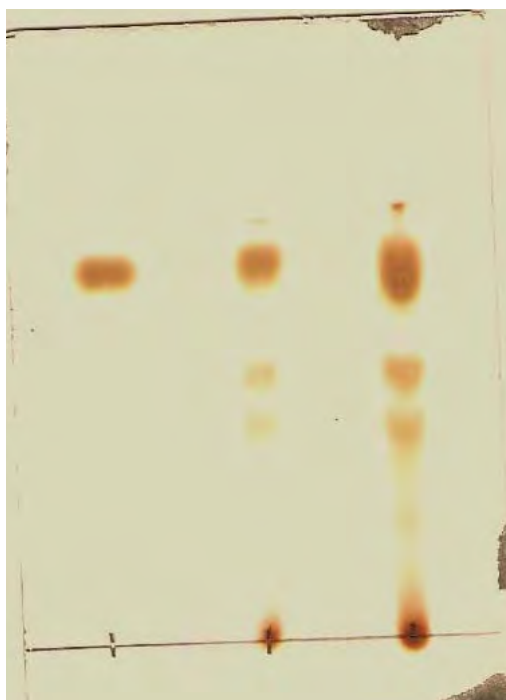


Figura 14. CROMATOPLACA REVELADA CON SULFATO CÉRICO QUE MUESTRA DOS EXTRACTOS DE NEJAYOTE EN LOS CARRILES 2 Y 3, COMPARADOS CON EL ESTÁNDAR DE ÁCIDO FERÚLICO EN EL 1.

Las cromatoplasmas 2 y 3 muestran que todos los extractos de las muestras tratadas contienen ácido ferúlico (carril 1), la placa número dos fue revelada con sulfato cérico mientras que la número 3 se reveló con DPPH, lo cual demuestra que estos extractos poseen actividades antioxidantes, las placas de CCF pueden ayudar a saber cualitativamente que extracto es más impuro o cual tiene mayor cantidad de AF pero no es concluyente ni exacta.

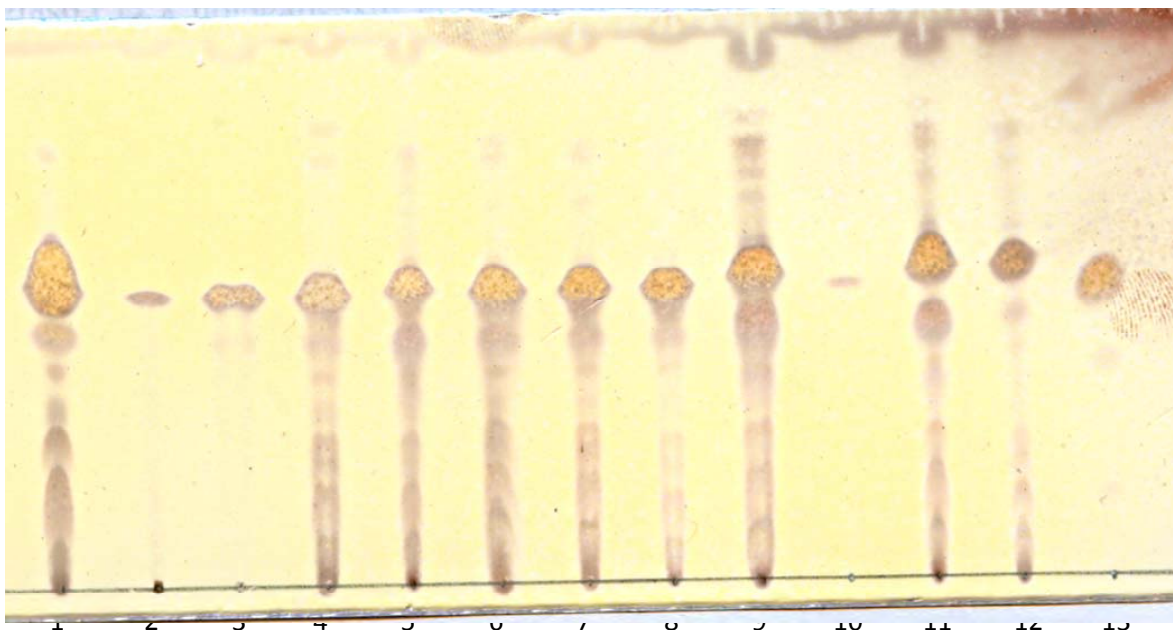


Figura 15. Cromatoplasma 2 revelada con sulfato cérico: 1. CATL, 2. CAZTL, 3. CAZTX, 4. CAZMA, 5. CAZAP, 6. CMORAP, 7. CRTX, 8. CRMA, 9. CBTX, 10. HASIN, 11. BHTX, 12. MXCHBTX, 13. ESTÁNDAR DE ÁCIDO FERÚLICO

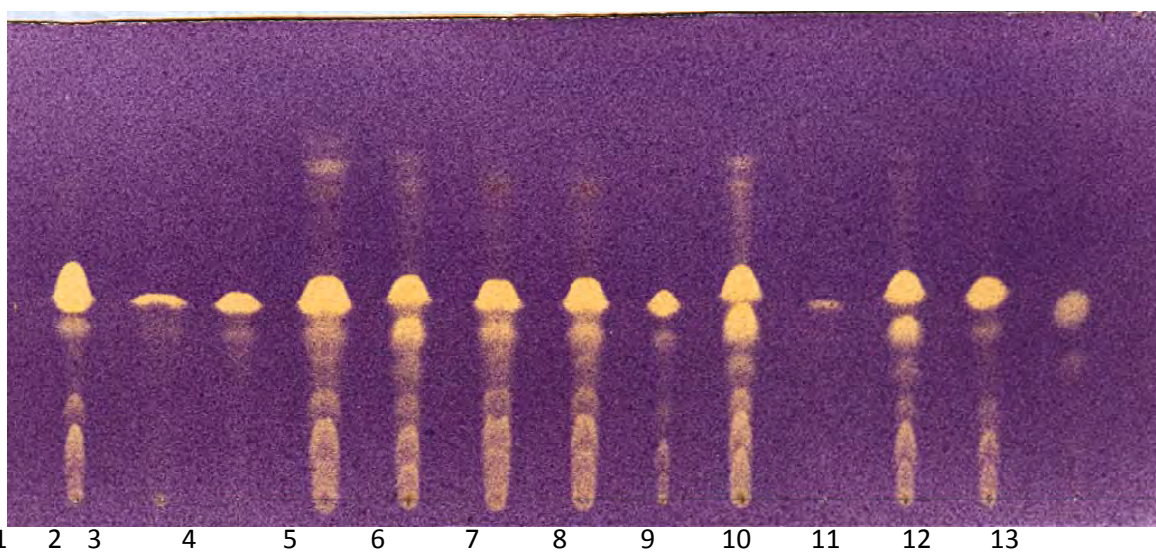


Figura 16. Cromatoplasma 2 revelada con DPPH: 1. CATL, 2. CAZTL, 3. CAZTX, 4. CAZMA, 5. CAZAP, 6. CMORAP, 7. CRTX, 8. CRMA, 9. CBTX, 10. HASIN, 11. BHTX, 12. MXCHBTX, 13. ESTÁNDAR DE ÁCIDO FERÚLICO

4.2. VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO FERÚLICO EN EXTRACTOS DE NEJAYOTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE MAÍCES

Cuantificación del ácido ferúlico mediante HPLC

La cantidad de Ácido Ferúlico presente en los extractos obtenidos de las trece muestras de los nejayotes problema determinada mediante la técnica de HPLC ofrece resultados confiables, esto es debido a que esta técnica cuantifica solamente a este compuesto separándolo de los demás compuestos fenólicos.

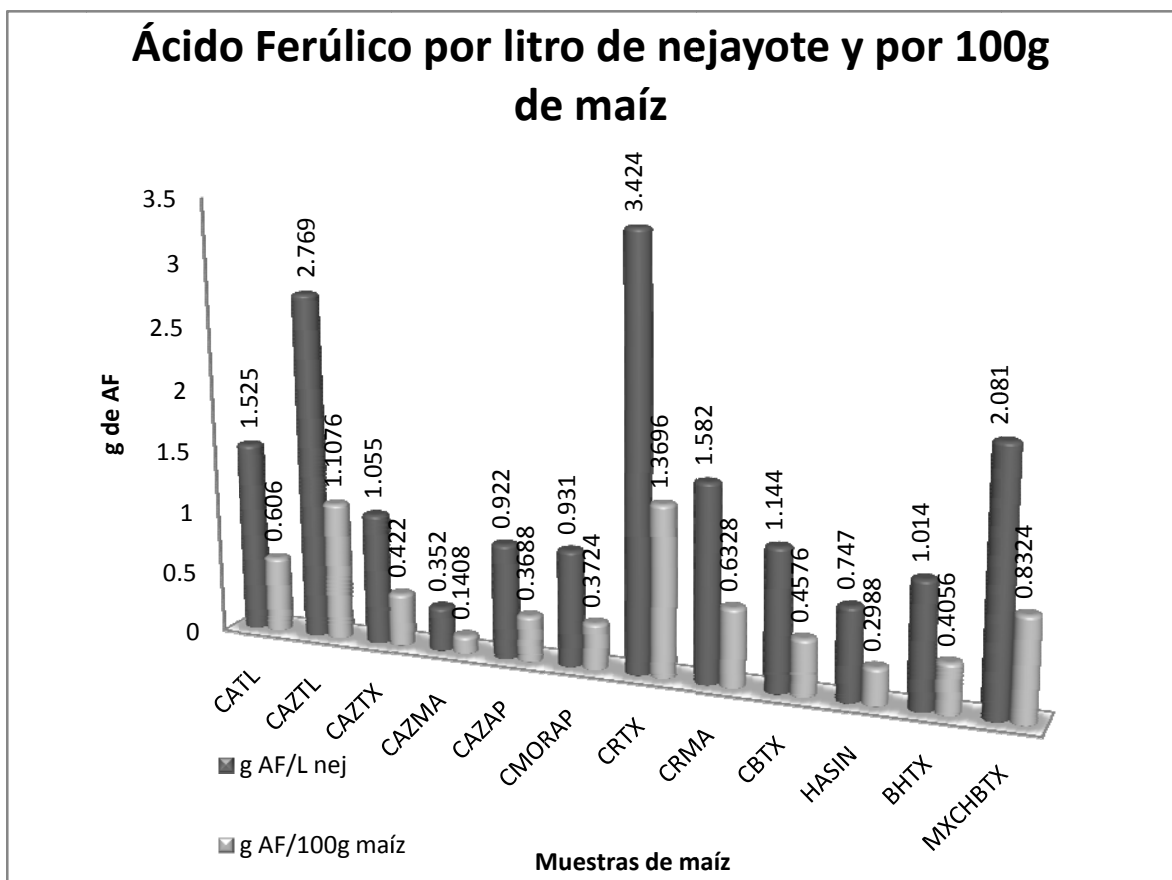
En la siguiente tabla se muestra la cantidad de AF que se puede obtener por litro de nejayote en cada caso. En la misma tabla se anexan además la cantidad de extracto que se obtuvo por litro de nejayote y la pureza de cada uno.

Un dato que es muy importante saber es cuanto ácido ferúlico en 100g de maíz se puede obtener, esto se hace sabiendo que por cada 100g se ocupan 400mL de agua.

MAÍZ	g ext/1L nejayote	g ext/100g maíz	Pureza %	g AF/L nej	g AF/100g maíz
CATL	4.20	1.68	36.31	1.525±0.35	0.606±0.35
CAZTL	4.22	1.688	65.62	2.769±0.89	1.1076±0.89
CAZTX	4.21	1.684	25.05	1.055±0.15	0.422±0.15
CAZMA	2.80	1.120	12.56	0.352±0.05	0.1408±0.05
CAZAP	2.00	0.800	46.10	0.922±0.02	0.3688±0.02
CMORAP	2.10	0.840	44.32	0.931±0.06	0.3724±0.06
CRTX	4.30	1.720	79.62	3.424±0.02	1.3696±0.02
CRMA	2.12	0.848	74.63	1.582±0.05	0.6328±0.05
CBTX	4.50	1.800	25.42	1.144±0.07	0.4576±0.07
HASIN	2.24	0.896	33.34	0.747±0.02	0.2988±0.02
BHTX	4.21	1.684	24.08	1.014±0.01	0.4056±0.01
MXCHBTX	4.00	1.600	52.02	2.081±0.20	0.8324±0.20

Se puede observar claramente en la **gráfica 1** que hay una gran variabilidad en la cantidad de ácido ferúlico obtenido a partir de nejayotes de trece muestras diferentes de maíz. La mayoría de los valores se encuentran en un rango que va desde 0.5 – 1.5g AF/L nejayote. Sobresalen únicamente 3 muestras: **CAZTL, CRTX y MXCHBTX**, cuyos valores respectivamente son 2.769, 3.424 y 2.081g AF/L nejayote. Aunque en efecto, estas tres muestras son de maíces criollos, no se puede afirmar que los maíces criollos son los que presentan mayor cantidad de AF con respecto a los híbridos, debido a que otras muestras de maíces criollos presentan valores más bajos que los híbridos.

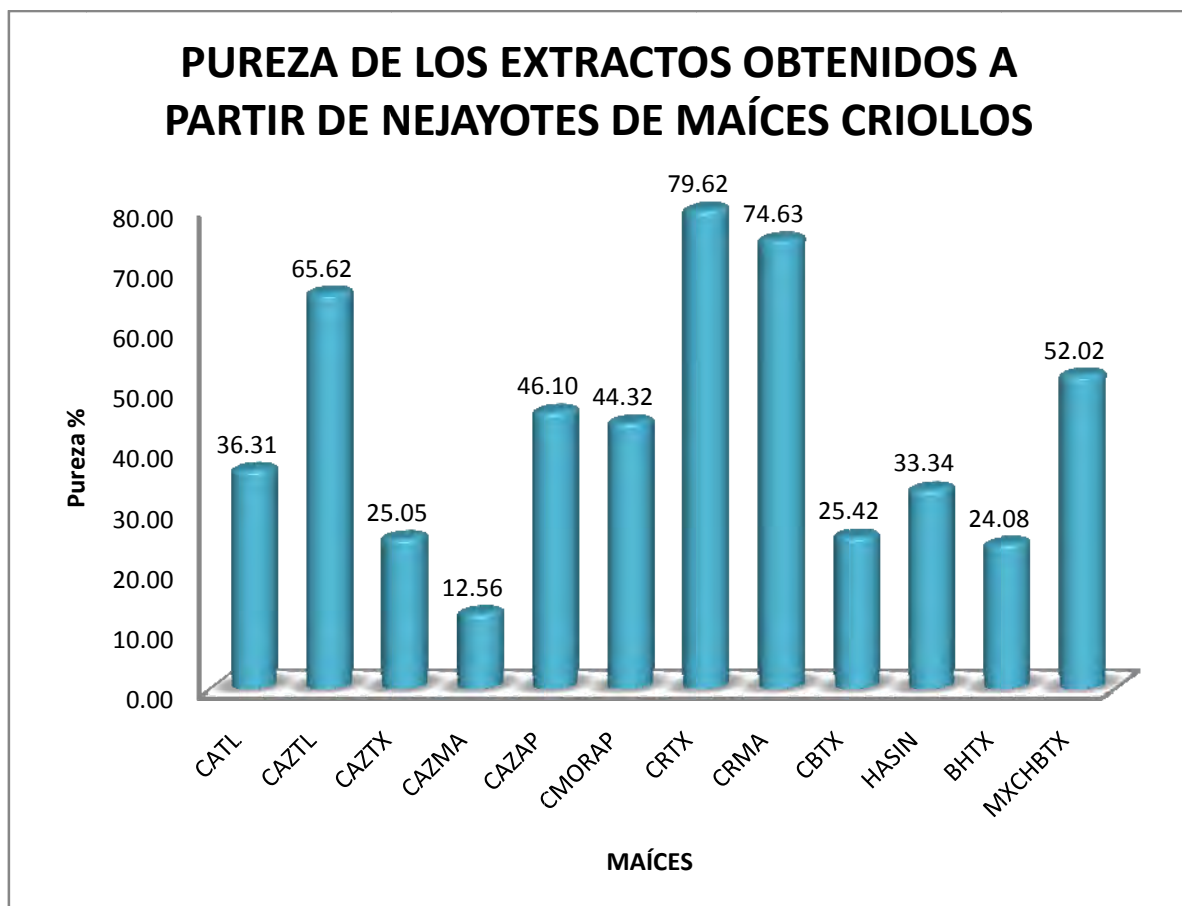
Según **Chavarría, 2007**, las cantidades reportadas de AF por L de nejayote en promedio son de 2.5g, comparadas con las obtenidas en el presente trabajo no muestran gran diferencia e incluso dos muestras dan valores más altos, pero en promedio es similar a ese valor.



Gráfica 1. Cantidad de Ácido Ferúlico presente en las trece muestras de maíces criollos e híbridos.

En la **gráfica 2** se presentan las purezas obtenidas en los extractos para cada muestra de nejayote. Aunque la mayoría se encuentra en el rango de 25% a 30%, dependiendo de la muestra se pueden alcanzar purezas de hasta 79%, mientras que maíces como el azul de Milpa Alta y el azul de Tlaxcala muestran valores de no más del 25% de pureza en los extractos obtenidos. Al ser tan variables las purezas se puede decir con seguridad que importa mucho la fuente de la cual proviene el nejayote y que no todas las clases de maíces son iguales.

Este valor ayuda para saber qué tan fácil resultará la purificación ya que siempre extractos más impuros son más difíciles de refinar.



Gráfica 2. Pureza de los extractos.

Al realizar la cuantificación mediante HPLC se pudo observar que había un pico que aparecía antes del tiempo de retención del ácido ferúlico perteneciente presumiblemente al ácido p-cumárico, por lo que se decidió primero, inyectar un estándar del mismo para saber si era él y una vez que se corroboró se procedió a cuantificarlo construyendo una curva patrón (sección de anexos) de la misma manera que para el ácido ferúlico, para que a su vez se pudiera determinar la cantidad de este otro ácido hidroxicinámico presente en los nejayotes.

El cromatograma que a continuación se presenta muestra que para el ácido p-cumárico el tiempo de retención en promedio fue de 16.5 minutos, mientras que para el ácido ferúlico es de 18.3 minutos.

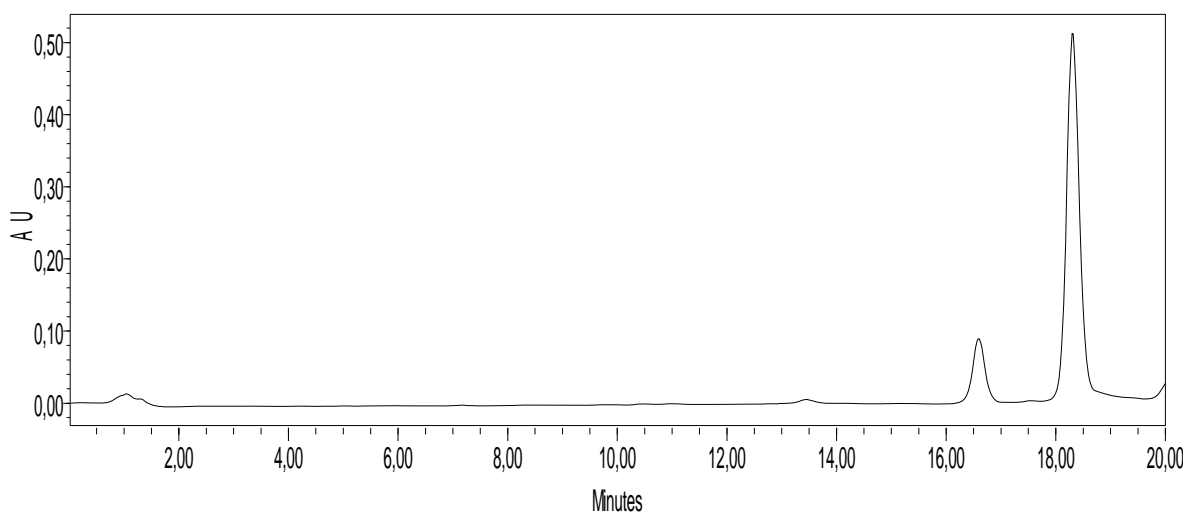


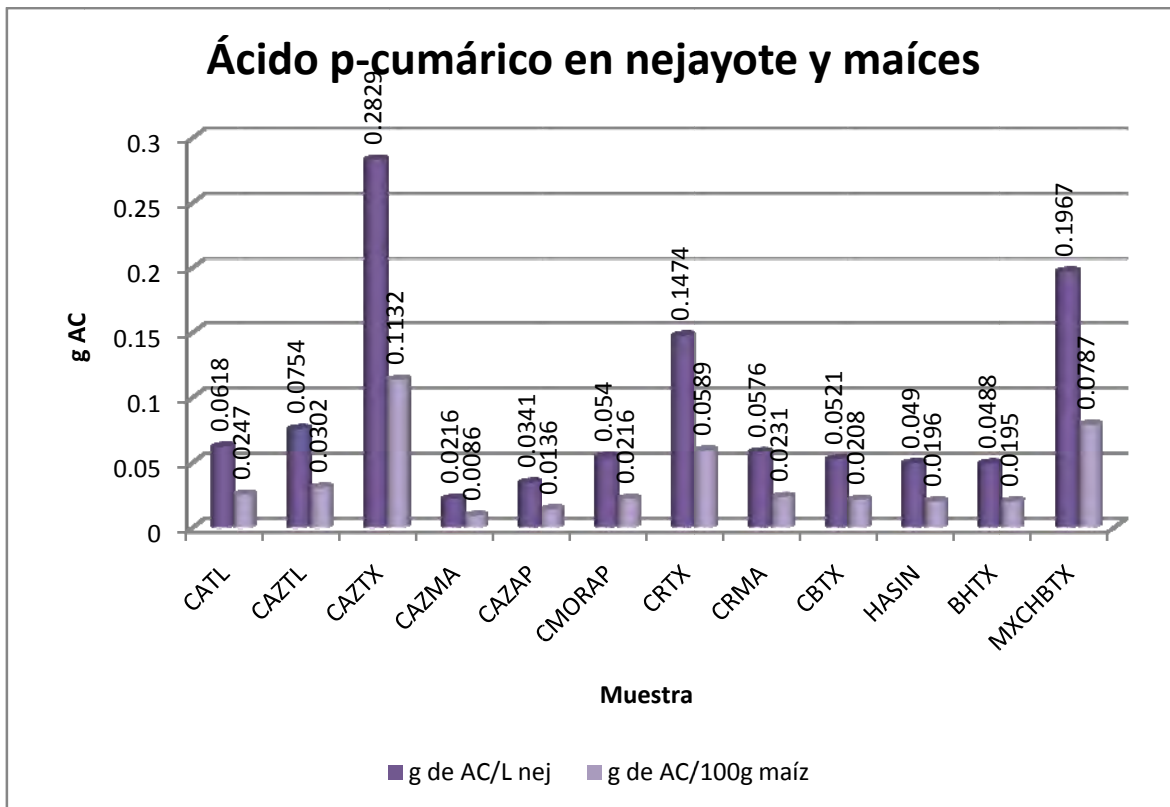
FIGURA 17. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA DE MAÍZ CRIOLLO CAZTL 5mg extr/mL

Los resultados de la cuantificación del ácido p-cumárico se muestran en la siguiente tabla:

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CUMÁRICO EN NEJAYOTES DE MAÍCES CRIOLLOS

Clave	g ext/1L nejayote	g ext/100g maíz	Pureza %	g AC/Lnej	gAC/100g maíz
CATL	4.20	1.680	1.471	0.0618	0.0247
CAZTL	4.22	1.688	1.787	0.0754	0.0302
CAZTX	4.21	1.684	6.720	0.2829	0.1132
CAZMA	2.80	1.120	0.772	0.0216	0.0086
CAZAP	2.00	0.800	1.704	0.0341	0.0136
CMORAP	2.10	0.840	2.571	0.0540	0.0216
CRTX	4.30	1.720	3.427	0.1474	0.0589
CRMA	2.12	0.848	2.719	0.0576	0.0231
CBTX	4.50	1.800	1.157	0.0521	0.0208
HASIN	2.24	0.896	2.187	0.0490	0.0196
BHTX	4.21	1.684	1.159	0.0488	0.0195
MXCHBTX	4.00	1.600	4.918	0.1967	0.0787

Para el caso del ácido p-cumárico se observa claramente que la mayoría de las muestras presentan menos de 0.1 gramos del ácido por litro de nejayote, a diferencia de 3 CAZTX, CRTX y MXCHBTX. Al igual que para el ácido ferúlico, para el cumárico se pueden calcular los valores de cantidad por litro de nejayote y por 100g de maíz.



Ambos valores, AF y Ap-C, son muy inferiores a los reportados en la literatura, ya que siempre se encuentran en concentraciones por arriba de 3% llegando hasta 5%, por lo cual se puede considerar que hay pérdida ya sea en el proceso de nixtamalización o en que el proceso de extracción falta hacerse más eficiente.

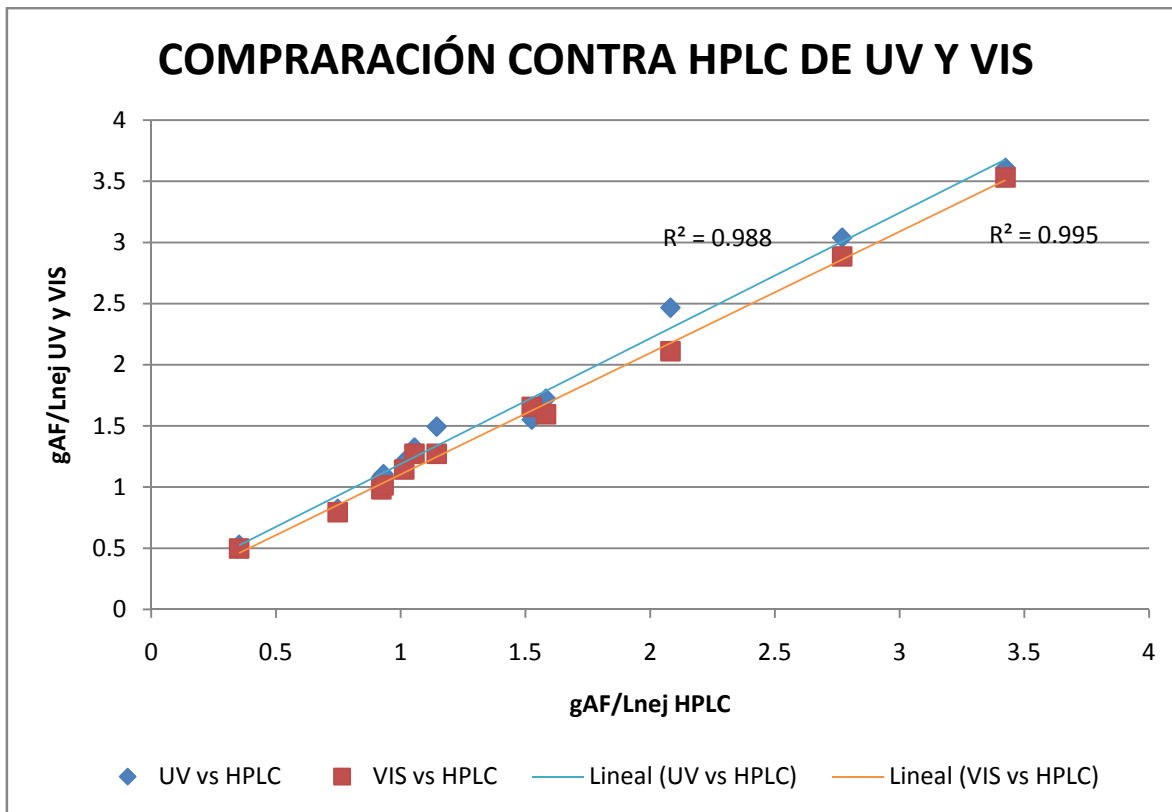
4.3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

El ácido ferúlico de 12 diferentes muestras de nejayotes de maíces (9 criollos y 3 híbridos) fue determinado mediante HPLC y comparado con dos métodos espectrofotométricos (UV a 320nm y VIS a 480nm). El método de HPLC mide exactamente la concentración de ácido ferúlico presente en las muestras, mientras que los métodos de UV y VIS determinan el contenido de fenólicos totales.

Se pudo observar que las diferencias entre el contenido de AF y el de fenoles totales para cada una de las muestras fueron consistentes entre cada una de las técnicas de determinación.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos para la cuantificación del AF mediante las técnicas de UV y VIS comparadas con los valores que se obtuvieron con la determinación en HPLC, en todos los casos los valores se sobreestiman, lo cual apoya el hecho que estas dos técnicas cuantifican fenoles totales.

gAF/Lnej			
	UV 320nm	VIS 480nm	HPLC
CATL	1.552	1.656	1.525
CAZTL	3.039	2.886	2.769
CAZTX	1.323	1.272	1.055
CAZMA	0.528	0.497	0.352
CAZAP	1.083	0.981	0.922
CMORAP	1.106	1.014	0.931
CRTX	3.61	3.532	3.424
CRMA	1.723	1.595	1.582
CBTX	1.495	1.272	1.144
HASIN	0.823	0.794	0.747
BHTX	1.209	1.143	1.014
MXCHBTX	2.467	2.111	2.081



Los valores obtenidos por los métodos espectrofotométricos son significativamente relacionados con los valores que se obtienen por HPLC, aunque en este caso el del VIS fue de 0.9959, comparado con el del UV que fue de sólo 0.9880, la precisión de cada uno de los métodos es relativamente alta, esto sugiere que cualquiera de los dos métodos puede ser utilizado para la estimación rápida en laboratorio de la cantidad de ácido ferúlico presente en cualquier nejayote, y el coeficiente de correlación que se obtuvo da fe ello.

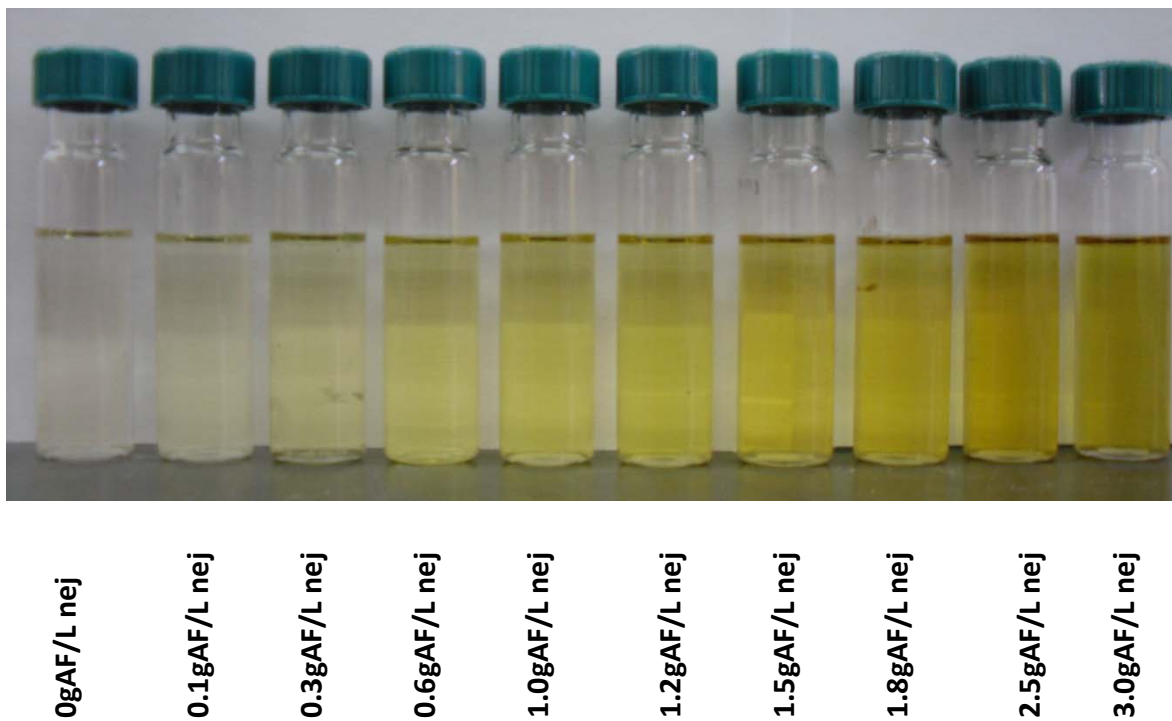
Existe diferencia entre los métodos de cuantificación, ya que UV y colorimetría sobreestiman el valor debido a que mediante ellos se pueden cuantificar fenoles totales y no sólo AF, por lo que si se usan los otros dos se debe de tomar en cuenta que los valores serán mayores.

4.4. DESARROLLO DEL MÉTODO VISUAL (SCREENING) PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE ÁCIDO FERÚLICO *IN-SITU* PRESENTE EN NEJAYOTES

Una vez que se contó con los datos que arrojan que el método espectrofotométrico tiene una gran correlación con el método HPLC se procedió a construir un screening que mediante la valoración visual podría estimar la cantidad de ácido ferúlico rápidamente. Ya que cambios en el contenido del ácido ferúlico resultan en cambios de color al reaccionar con el reactivo de Tetracloruro de titanio.

El método fue primero realizado con ácido ferúlico puro, pero al darnos cuenta que el nejayote podría contener otros compuestos que interferirían se decidió hacer con un extracto rico en ácido ferúlico del cual se conociera su concentración de AF.

La figura que se muestra a continuación presenta el screening que se utilizó para estimar el ácido ferúlico presente en los diferentes nejayotes.



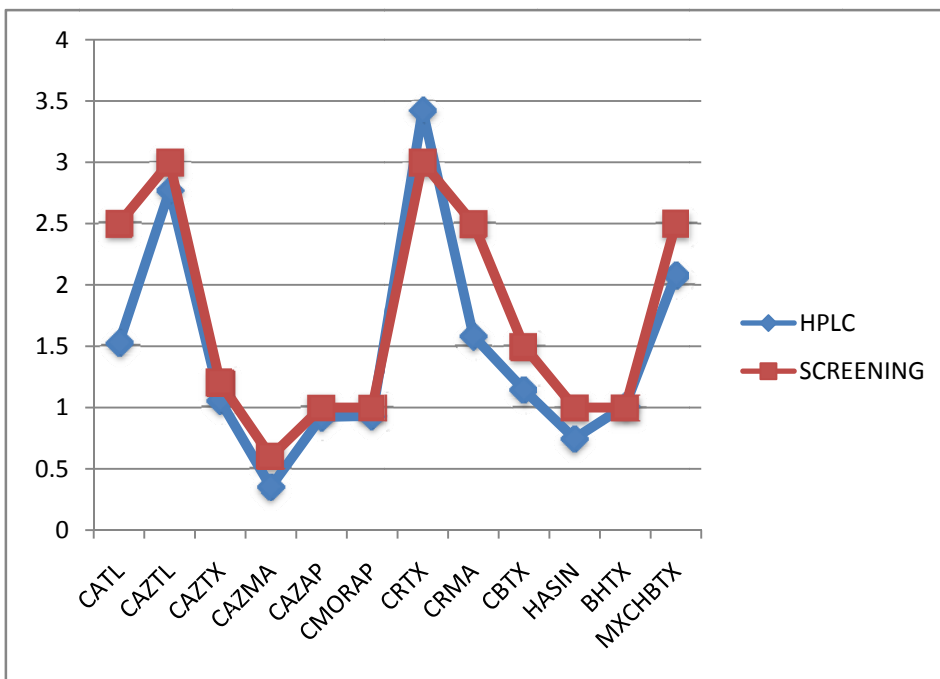
VALORES DE AF OBTENIDOS AL COMPARAR CON EL SCREENING CADA UNO DE LOS NEJAYOTES

Una vez obtenidos los nejayotes de cada una de las muestras de maíces se procedió a aplicar el protocolo de estimación de AF como se indica en la sección de materiales y métodos, y se comparó el color de cada una de las muestras con el screening, los valores que se obtuvieron se presentan en la siguiente tabla comparados con los valores obtenidos por HPLC.

gAF/Lnej		
	HPLC	SCREENING
CATL	1.525	2.5
CAZTL	2.769	3.0
CAZTX	1.055	1.2
CAZMA	0.352	0.6
CAZAP	0.922	1.0
CMORAP	0.931	1.0
CRTX	3.424	3.0
CRMA	1.582	2.5
CBTX	1.144	1.5
HASIN	0.747	1.0
BHTX	1.014	1.0
MXCHBTX	2.081	2.5

El gráfico en el que se comparan el screening contra las mediciones reales mediante el HPLC muestra que siempre está por arriba del valor real, pero además se puede ver que en la mayoría de los casos este valor no es más que 0.3g, por lo tanto si

esto se toma en cuenta, entonces podría utilizarse como un método rápido que estima de manera muy cercana el valor del AF.



4.5. OBTENCIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO A ESCALA PREPARATIVA

Para la poder obtener el ácido ferúlico a escala preparativa (antes del escalamiento a planta piloto) se utilizó el nejayote recolectado de un molino del sur de la Ciudad de México. Después de realizar la extracción tal y como se describe en la sección de materiales y métodos se obtiene lo siguiente: Por cada litro de nejayote se recuperan: **1.1575g de extracto.**

Comparado con los resultados obtenidos en tesis anteriores en las que se utilizaron nejayotes de molinos de la Ciudad de México se ve que este valor está en el rango de lo esperado:

0.68g/L de nejayote (**González, 2009**)

1.00g/L de nejayote (**Chavarría, 2007**)

La cantidad que se reporta en la mayoría de los artículos es de 3g por cada 100g de maíz, al hacer el cálculo con base a la cantidad de maíz utilizado en la nixtamalización se tienen **0.2988g** lo cual es solamente un **9.96%** del total esperado, este valor se podría deber a que la hidrólisis alcalina que se lleva a cabo puede ser muy agresiva lo cual hace que se degrade.

La pureza obtenida en el extracto es de 33.34% por lo cual de cada litro de nejayote se esperan 0.3859g de ácido ferúlico. En este caso al haber utilizado 40L de nejayote se obtuvieron 46.30g de extracto con pureza la pureza arriba señalada.

4.6. PURIFICACIÓN

Para la purificación se probaron dos metodologías, las cuales son usadas en la purificación de otros compuestos naturales, la cromatografía en columna y las cristalizaciones sucesivas, en ambos casos las purezas alcanzadas son muy buenas al igual que los rendimientos de purificación.

- **Purificación de ácido ferúlico mediante cromatografía en columna:**

Para la purificación se utilizaron muestras de 5g de extracto, obtenido a partir de 40L de nejayote. Se empacó la columna de tal forma que esta no tuviera grietas y fue lavada inicialmente con un litro de la mezcla de elución. Los 5g de extracto se homogeneizaron con celulosa microcristalina y se colocó en la parte inicial de la columna, se siguió con el proceso de elución y de colección de fracciones según el proceso descrito en la sección de materiales y métodos, cada una de las fracciones se monitoreó por CCF.

De un extracto de 5g el cual contenía 1.667g de AF, se comenzaron a recolectar fracciones a las cuales se les sacaba una placa para la identificación del compuesto, la primera placa que se muestra nos indica que las fracciones iniciales todavía están demasiado contaminadas.

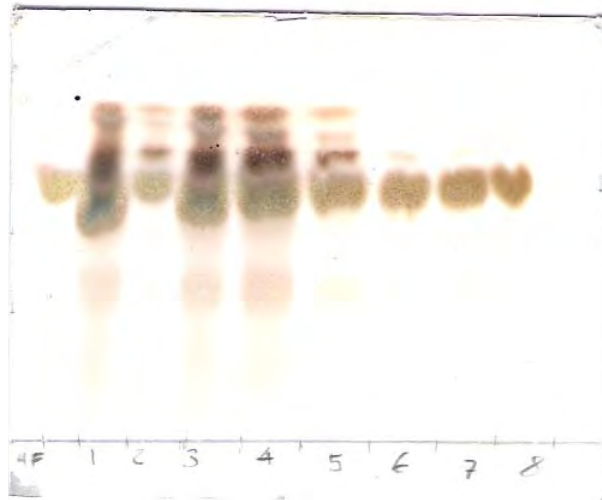


Figura 18. Placa con las fracciones iniciales

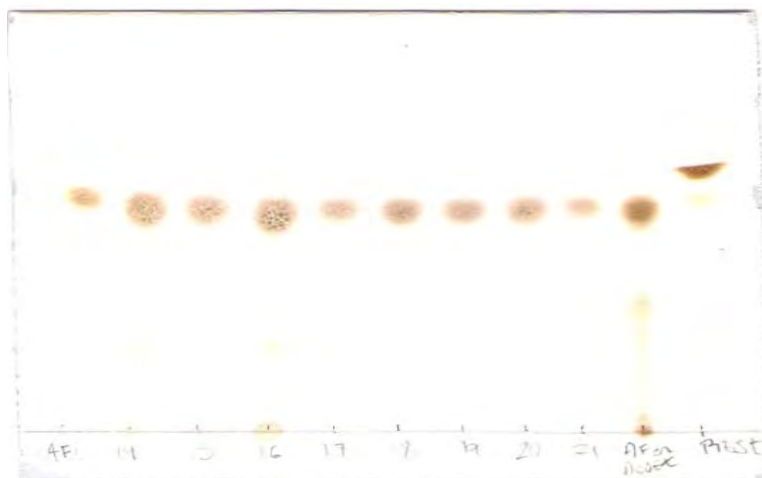


Figura 19. Fracciones limpias.

Después juntar todas las fracciones y de evaporación del solvente se puede decir que de un extracto de 5g se recuperaron **1.5g de ácido ferúlico con pureza de 97.32% determinada por HPLC**. Por lo tanto se puede decir que el **rendimiento de la purificación** fue de **89.98%**.

- **Cristalizaciones sucesivas:**

Este tipo de purificación de compuestos orgánicos se basa en la precipitación de los mismos debido al cambio de polaridad de una solución, ya que al ser un compuesto polar el AF puede disolverse con facilidad en acetona y a medida que vamos haciendo menos polar la solución, en este caso con hexano, el ácido ferúlico comienza a cristalizar, al final se enfría la solución y podemos separar los cristales, como todavía hay ferúlico en solución se evapora un poco de los dos solventes y se repite la operación.

Al igual que en la purificación mediante columna, se tomó una muestra de igual peso con la misma pureza: 5g, conteniendo 1.667g de AF. Y luego de realizar el proceso de purificación descrito en la sección de materiales y métodos se tomaron placas de CCF para

identificar de forma preliminar si el AF aparecía puro. Al final se determina su pureza mediante HPLC.



Figura 20. Cromatoplaque que muestra las tres cristalizaciones realizadas al extracto.

De tal forma que mediante este proceso de purificación a partir de **5g de extracto** se recuperaron **1.57g de AF** con una **pureza de 95.02%**. Por lo que el rendimiento de la purificación es de **94.18%**.

Podemos observar que ambos métodos nos ofrecen buenas purezas y porcentajes de recuperación por arriba del 90%.

Lo único en lo que se podría diferenciar ambos métodos es en el tipo de solventes usados (cromatografía: hexano/acetato de etilo y cristalizaciones: acetona y hexano), además del tiempo, ya que una columna depende de que tan rápido se eluya mientras que en las cristalizaciones sucesivas aunque los cristales comienzan a aparecer casi de

inmediato al contacto con el hexano se tiene que enfriar la solución para poder filtrar y posteriormente la evaporación del solvente.

El en el cuadro siguiente se muestran las características observadas en ambos métodos de purificación:

	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	CRISTALIZACIONES SUCESIVAS
SOPORTE	Celulosa microcristalina	Ninguno
SOLVENTES USADOS	Acetato de etilo Hexano	Acetona Hexano
PUREZA OBTENIDA	97.32%	95.02%
RENDIMIENTO	89.98%	94.18%
VENTAJAS	El proceso se puede hacer en continuo. El solvente es reutilizado.	La cristalización es inmediata. Los solventes son reutilizados.
DESVENTAJAS	Gasto de energía para generar vacío en la elución. El tiempo de elución es generalmente por más de 3 horas.	Gasto de energía para bajar la temperatura en la cristalización. El solvente tiene que ser destilado para recuperar cada uno por separado.

Por supuesto, estas observaciones sólo son las obtenidas en este trabajo, se deben de hacer más trabajos de experimentación para hacerlos más eficientes o para modificar el tipo de solvente a usar.

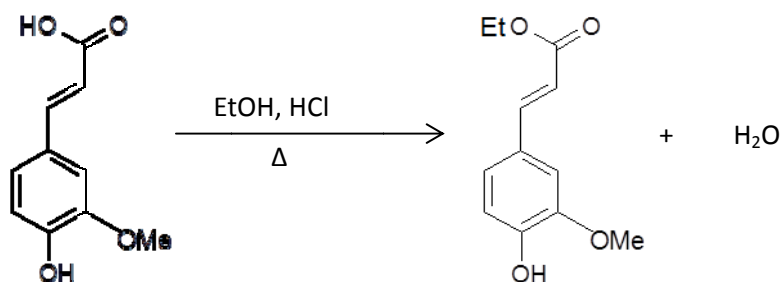
4.7. AMPLIACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO FERÚLICO

La ampliación estructural que se planteó en el presente trabajo tuvo como finalidad hacer a la molécula del AF más anfifílica, para esto se esterificó primero de forma química con un alcohol de cadena corta (etanol), y posteriormente con el uso de lipasa de *Candida antarctica* isoforma B, que catalizará la transesterificación con alcoholes de cadena más larga (butanol y decanol).

4.7.1. REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN

Obtención química del etil ferulato:

a) OBTENCIÓN DEL FERULATO DE ETILO



	Ácido ferúlico usado	Ferulato de etilo esperado	Ferulato de etilo obtenido	Rendimiento
Prueba 1	3.0g	3.42g	3.30g	96.47%
Prueba 2	3.0g	3.42g	3.23g	94.44%
Prueba 3	3.0g	3.42g	3.18g	92.98%
Promedio			3.23g±0.52g	94.63%

Comparado con el rendimiento obtenido por **González en 2009** que fue de 84.90%, podemos decir que la metodología aplicada en la purificación del compuesto final funciona eficientemente, ya que en la placa de identificación el compuesto aparece prácticamente puro y esto se verifica con el análisis en RMN.

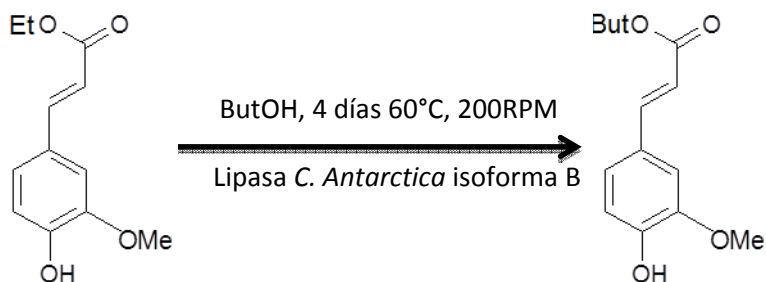
Identificación del avance de la reacción: La siguiente cromatoplaca fue tomada después de 4 días de reacción para la obtención del ferulato de etilo, eluida con hexano:acetato de etilo (1:1) y revelada con sulfato cérico, como se puede observar sólo existen trazas del ácido ferúlico y sólo se observa un producto.



Figura 21. Obtención química del ferulato de etilo. Carril 1 ácido ferúlico, carril 2 mezcla de reacción

REACCIONES DE TRANS-ESTERIFICACIÓN

a) OBTENCIÓN DEL FERULATO DE BUTILO



	Ferulato de etilo usado	Ferulato de butilo esperado	Ferulato de butilo obtenido	Rendimiento
Prueba 1	0.5g	0.563g	0.199g	35.34%
Prueba 2	0.5g	0.563g	0.169g	30.01%
Prueba 3	0.5g	0.563g	0.178g	31.61%
Promedio			0.18g±0.01g	32.32%

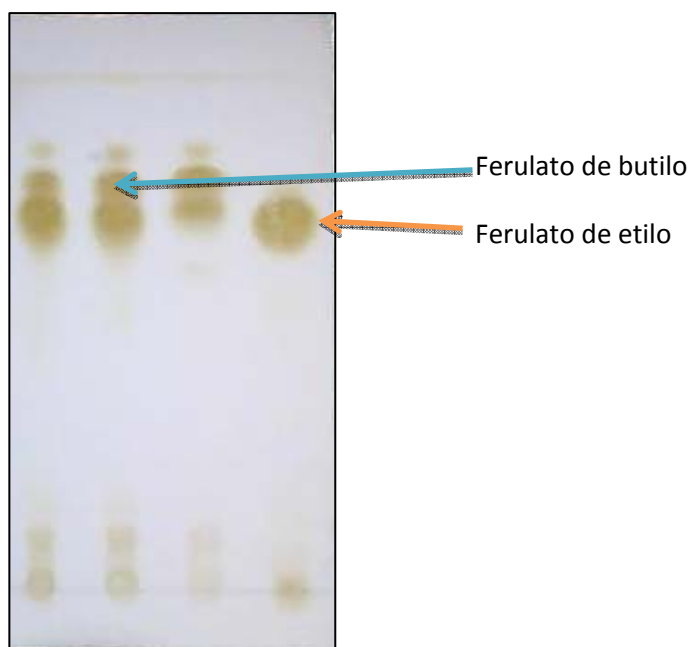
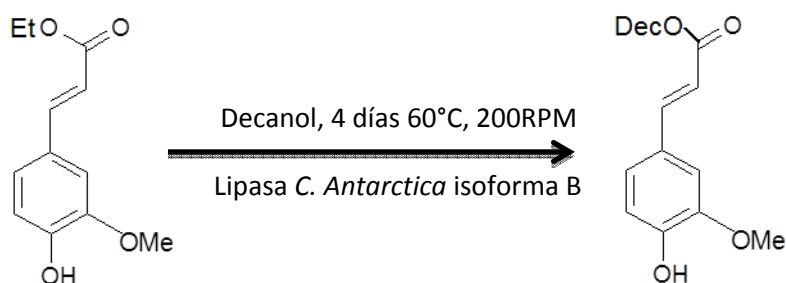


Figura 22. Cromatoplaaca avance de reacción obtención del ferulato de butilo. Carriles 1, 2 y 3 son pruebas 1, 2 y 3 respectivamente. Carril 4 ferulato de etilo.

El rendimiento promedio de la reacción después de purificar el extracto por cromatografía en capa fina preparativa fue de 32.32%, ya que existen otros compuestos que se generan, tal vez de degradación del ferulato de etilo u otros productos diferentes al esperado, el compuesto se analizó por RMN.

b) OBTENCIÓN DEL FERULATO DE DECILO



	Ferulato de etilo usado	Ferulato de decilo esperado	Ferulato de decilo obtenido	Rendimiento
Prueba 1	1g	1.7199g	0.7674g	44.62%
Prueba 2	1g	1.7199g	NO	NO
Prueba 3	1g	1.7199g	NO	NO
Promedio			0.7674g	44.62%

NO: No obtenido

Identificación del avance de reacción:

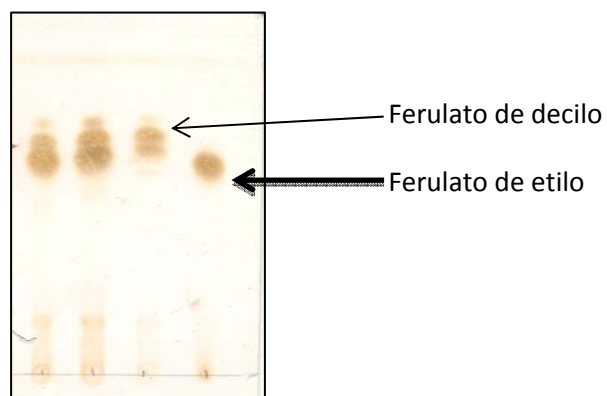


Figura 23. Cromatoplaqa obtención del ferulato de decilo, eluída con Hex:AcoEt 1:1, revelada con sulfato cérico

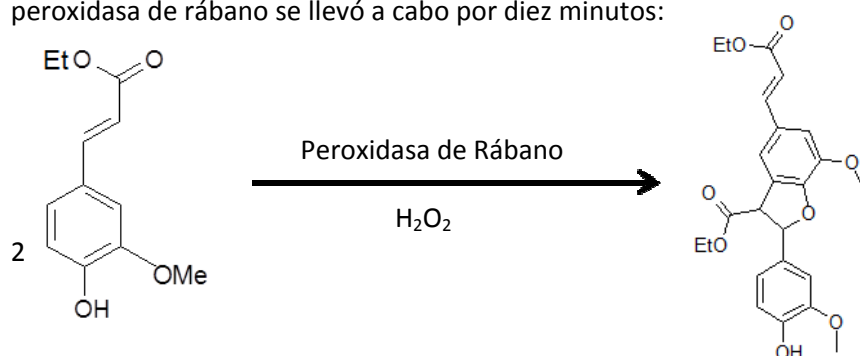
Se obtiene un mejor rendimiento de la esterificación con decanol a diferencia de la esterificación con butanol, aunque no se pudo determinar el rendimiento promedio debido a que en las dos pruebas finales se dificultó la eliminación del decanol del medio de reacción debido a su alto punto de ebullición. En la tesis que Gonzáles publicó en el 2009 para esta reacción obtuvo un porcentaje de transformación del decanol de casi el 100% aunque no se reporta el rendimiento de reacción, observando las placas se ve que todavía existe una cantidad considerable del ferulato de etilo sin reaccionar, en este caso sólo se llegó a obtener sólo un producto, que con análisis de RMN se comprueba que es el ferulato de decilo.

4.7.2. REACCIONES DE DIMERIZACIÓN

Se llevaron a cabo dos dimerizaciones de dos ferulatos de alquilo catalizadas por la peroxidasa de rábano en presencia de H_2O_2 , la dimerización del ferulato de etilo y la del ferulato de butilo, cumpliéndose con el objetivo de demostrar que se puede obtener enzimáticamente ambos compuestos, ya que **González en 2009** demostró que la posterior transesterificación del dímero del ferulato de butilo con butanol no ofrecía un producto. Como se sabe la enzima peroxidasa cataliza la dimerización vía formación de radicales, los cuales reaccionan fácilmente con los enlaces dobles y el grupo hidroxilo de los fenoles.

c) OBTENCIÓN DEL DIMERO DEL FERULATO DE ETILO

El acoplamiento oxidativo de las dos moléculas del ferulato de etilo catalizado por la peroxidasa de rábano se llevó a cabo por diez minutos:



	Ferulato de etilo usado	Dimero del ferulato de etilo esperado	Dimero del ferulato de etilo obtenido	Rendimiento
Prueba 1	250mg	248mg	117mg	47.17%
Prueba 2	250mg	248mg	113mg	45.56%
Prueba 3	250mg	248mg	118mg	47.58%
Promedio			116mg±2.64mg	46.77 %

Dimerización de etil ferulato: A partir del ferulato de etilo purificado se sintetizó el dímero del mismo por medio de una reacción catalizada por la enzima peroxidasa de rábano; utilizando para ello el método descrito por Ralph en 1998 que obtuvo rendimientos de no más del 50%, se puede decir que esto se comprueba ya que en este

estudio sólo se llegó al 46.77%, y además el análisis por RMN del compuesto purificado mediante CCF preparativa lo demuestra.

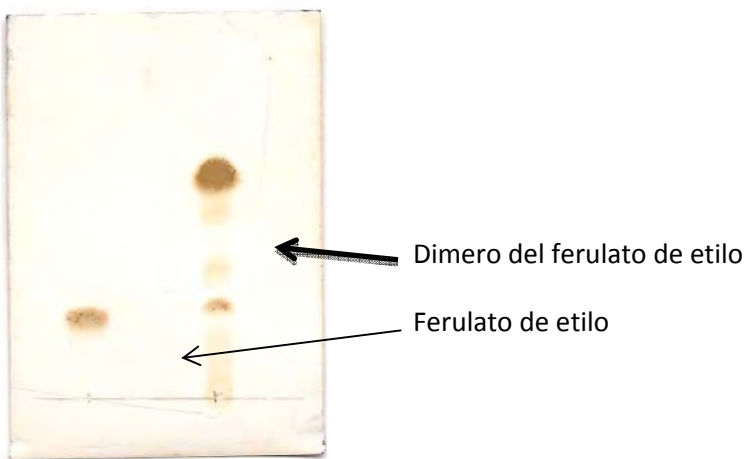
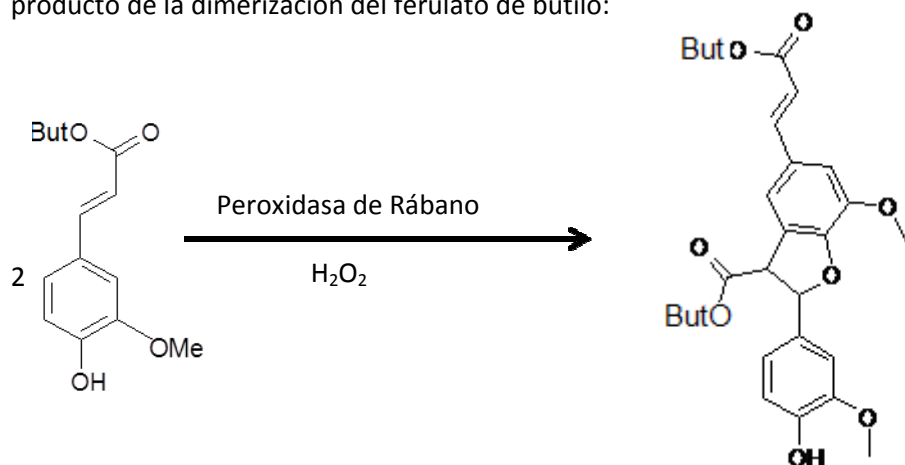


Figura 24. Cromatoplaqa avance de reacción de dimerización del ferulato de etilo

d) OBTENCIÓN DEL DIMERO DEL FERULATO DE BUTILO

Se espera que mediante el mismo mecanismo de acoplamiento oxidativo se obtenga el producto de la dimerización del ferulato de butilo:



	Ferulato de butilo usado	Dimero del ferulato de butilo esperado	Dimero del ferulato de butilo obtenido	Rendimiento
Prueba 1	300mg	296.4mg	97.35mg	32.90%
Prueba 2	300mg	296.4mg	109.66mg	37.00%
Prueba 3	300g	296.4mg	117.19mg	39.54%
Promedio			108.07mg±8.17mg	36.48%

González en su tesis del año 2009 no encontró producto alguno al momento de obtener el dímero del ferulato de butilo al momento de transesterificar el dímero del ferulato de etilo con butanol, tal vez debido al gran impedimento estérico por el tamaño de la molécula, por lo tanto la enzima no podía actuar sobre el enlace éster y meter el grupo butilo en ese lugar. En este estudio se decidió formar primero el éster butílico del ácido ferúlico para que una vez teniendo la molécula pura la peroxidasa de rábano pudiera dimerizarla. Como se observa los rendimientos no son muy altos (36.48% en promedio) aunque gracias al análisis por RMN después de la purificación por CCF preparativa podemos decir que se obtuvo el producto de dicha reacción (dímero del ferulato de butilo).

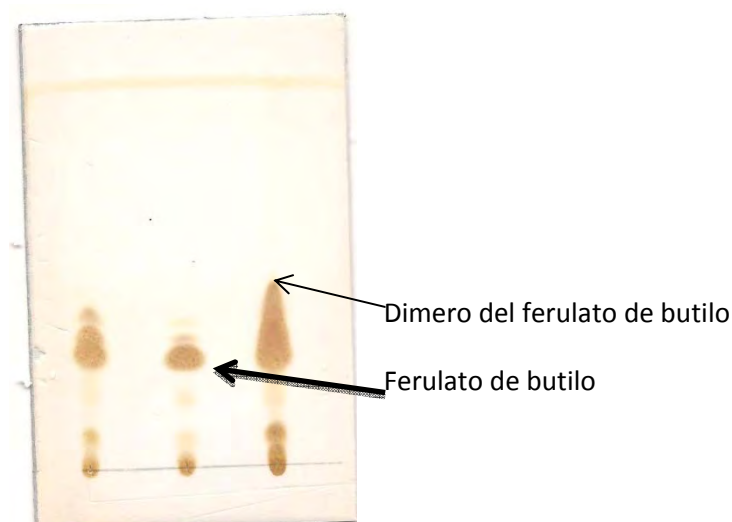


Figura 25. Cromatoplaca de avance de reacción de obtención del dímero del ferulato de butilo

El poder sintetizar ésteres de ácido ferúlico es de gran importancia por el número de aplicaciones potenciales que tienen, existen un gran número de patentes en las que utilizan este tipo de ésteres como bloqueadores solares. La manera más fácil de obtener estos ésteres es utilizando alcoholes de cadena lineal, sin embargo, en otros trabajos se han sintetizado ésteres donde el grupo carboxilo es sustituido por compuestos no lineales.

Todos los espectros de RMN se presentan en la sección de anexos, fueron comparados con los reportados en la literatura y concuerdan.

5. CONCLUSIONES

La cuantificación de AF en nejayotes de trece muestras de maíces criollos mediante HPLC nos lleva a la conclusión de que diferentes factores influyen en la cantidad de AF presente en los nejayotes, siendo el principal el tipo de maíz.

Se encontró que la muestra de maíz criollo CRTX es la que provee un nejayote con mayor cantidad de ácido ferúlico, 3.424g de AF por litro y que el extracto que se obtiene de este es de una pureza alta, 79.62%.

Los métodos para la cuantificación del ácido ferúlico basados en la absorbancia que el AF presenta en la región del UV no son específicos (espectroscopia de UV y colorimetría), sobreestiman la cantidad presente en los extractos obtenidos, esto principalmente debido a que no sólo se encuentra el AF, sino que, hay otros compuestos fenólicos que contribuyen a la absorbancia de la muestra. Se corroboró lo anterior al momento de la cuantificación por HPLC, ya que hay varios picos que no son identificados como AF. En este trabajo, incluso se pudo cuantificar el ácido p-cumárico presente, por lo tanto, este método de HPLC también puede usarse para tal fin.

Se consiguió el desarrollo de un método visual (basado en el colorimétrico) que estima la cantidad de AF presente en cualquier nejayote.

Sabiendo la gran cantidad de maíz que se procesa por día ya no en todo el país sino tan sólo en la Ciudad de México para la producción de maíz nixtamalizado, se concluye que el nejayote es una gran fuente de AF que extraído y purificado por los métodos propuestos aquí, le daría un valor agregado a este desecho.

Los dos métodos de purificación de AF aquí estudiados (cromatografía en columna y cristalizaciones sucesivas) en un extracto de nejayote obtenido de un molino del DF con una concentración de 0.747g de AF/L nejayote con una pureza de 33.34%, proporcionan ácido ferúlico con una pureza final superior al 95%. En ambos casos los solventes usados son destilados y reutilizados, por lo que podría decirse que es una tecnología sustentable. Otro punto importante que se consiguió al final del proceso de recuperación del ácido

ferúlico a escala preparativa es que todos los solventes utilizados se pueden reutilizar al igual que los adsorbentes, a fin de hacer un proceso en el que no se deseche casi nada y sea sustentable no sólo económicamente sino también ecológicamente.

Se logró sintetizar el éster butílico y decílico del AF con ayuda de la lipasa de *Candida antarctica* y dímero del ferulato de etilo mediante una reacción bioquímica catalizada por la peroxidasa de rábano, con rendimientos considerablemente buenos para una reacción de este tipo 46.77%, incluso se llegó a obtener el dímero de un compuesto mucho más grande que el ferulato de etilo (ferulato de butilo) con rendimiento de 36.48% mediante el acoplamiento oxidativo catalizado por una peroxidasa. En la síntesis de estos compuestos lo más complicado es la purificación de cada uno de ellos, ya que se generan otros productos o derivados de la degradación de los mismos, por lo cual no se obtienen rendimientos superiores al 50%.

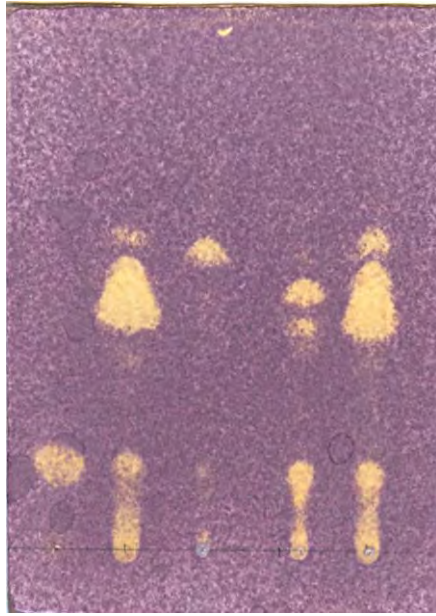
PERSPECTIVAS

Método colorimétrico: Este método puede ser utilizado como un kit de uso cotidiano en los molinos que ayudará a decidir en el momento si el nejayote contiene una cantidad apreciable de AF y es factible de ser procesado o no. Aunque por supuesto, este “kit” todavía tiene que ser mejorado y validado por otros laboratorios antes de decir que funciona correctamente ya que además depende de la apreciación del analista.

Recuperación del AF: Debido a la gran cantidad de nejayote producido en el país debido a la industria de la tortilla, el nejayote se presenta como una fuente potencial para la obtención de este fitocompuesto que debido a los usos que se han encontrado en las industrias farmacéutica y de alimentos le daría un valor agregado muy fuerte a un efluente de desperdicio y contaminación.

Ampliación de la diversidad estructural del AF: Se debe seguir explorando el campo de las enzimas para poder obtener los derivados del AF biocatalíticamente lo cual le daría el rango de naturales a sus derivados y podrían ser más aceptados, ya que como se ha publicado en gran cantidad de artículos los derivados esterificados del AF poseen una actividad antioxidante potenciada a la de la molécula sola, además que pueden ser aplicados ya a sistemas oleosos.

El estudio de las propiedades antioxidantes de los derivados del AF es de gran importancia porque se han encontrado que esta propiedad aumenta. En la siguiente placa se prueba que los productos de esterificación ferulato de butilo y de decilo siguen conservando sus propiedades antioxidantes, ya que reaccionan al momento de ser reveladas con el radical DPPH, sólo faltaría probar sus propiedades antioxidantes mediante metodologías ya establecidas.



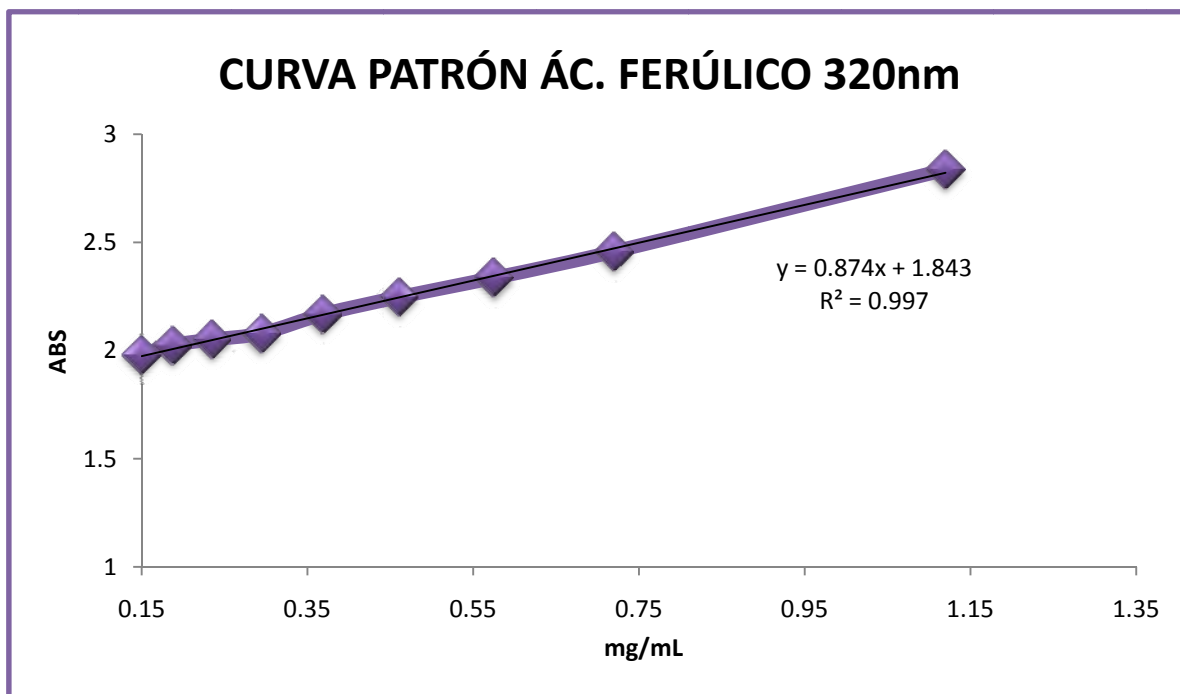
Placa revelada con DPPH. Carril 1: ácido ferúlico. Carril 2: mezcla de reacción del ferulato de decilo. Carril 3: ferulato de decilo. Carril 4 ferulato de butilo. Carril 5: Mezcla de reacción ferulato de butilo

ANEXOS.

CURVAS PATRÓN

ANEXO 1. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA EN UV (320nm).

mg AF/mL	ABS
1.12	2.8367
0.72	2.4574
0.575	2.3362
0.46	2.2465
0.368	2.1668
0.294	2.0792
0.235	2.0517
0.187	2.0245
0.15	1.9809

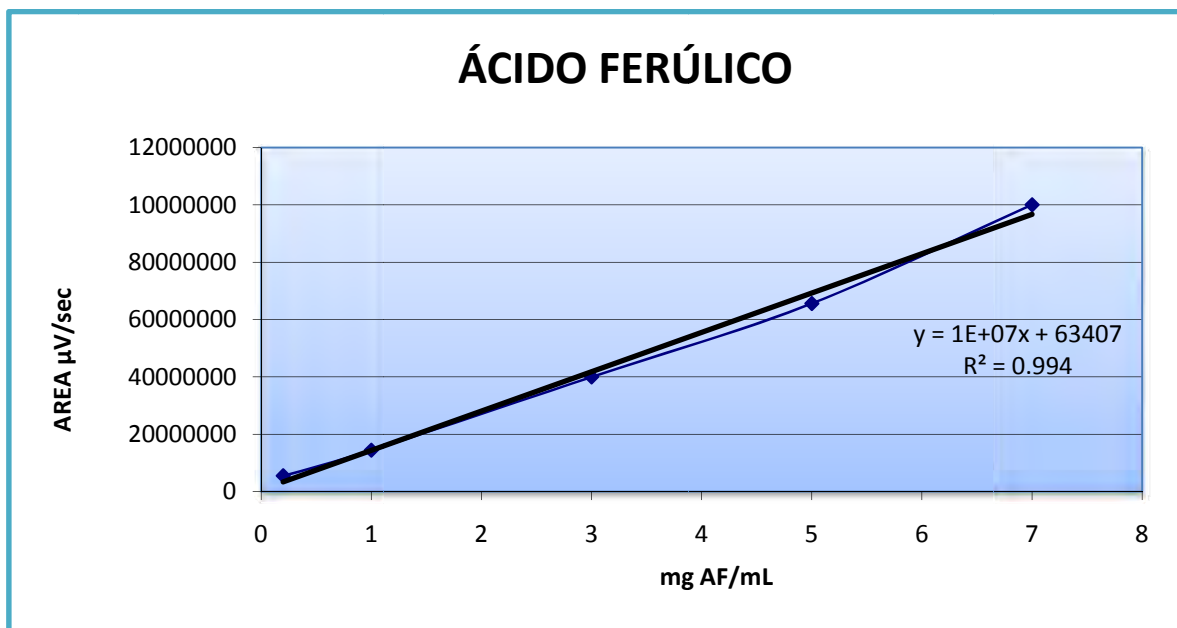


HPLC

ANEXO 2. CURVA PATRÓN PARA ÁCIDO FERÚLICO

Datos de origen:

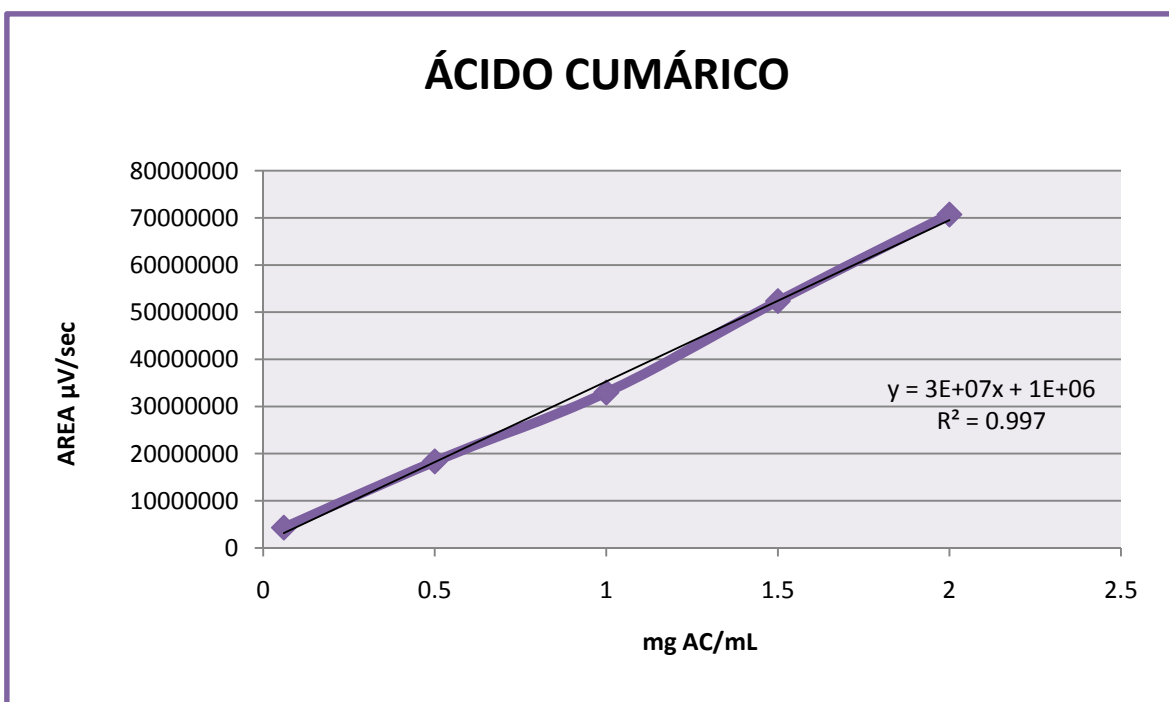
mg AF/mL	área $\mu\text{V}/\text{sec}$
0.2	5491111.31
1	14412173.04
3	39975115.29
5	65599944.14
7	100051551.2



ANEXO 3. CURVA PATRÓN PARA ÁCIDO CUMÁRICO

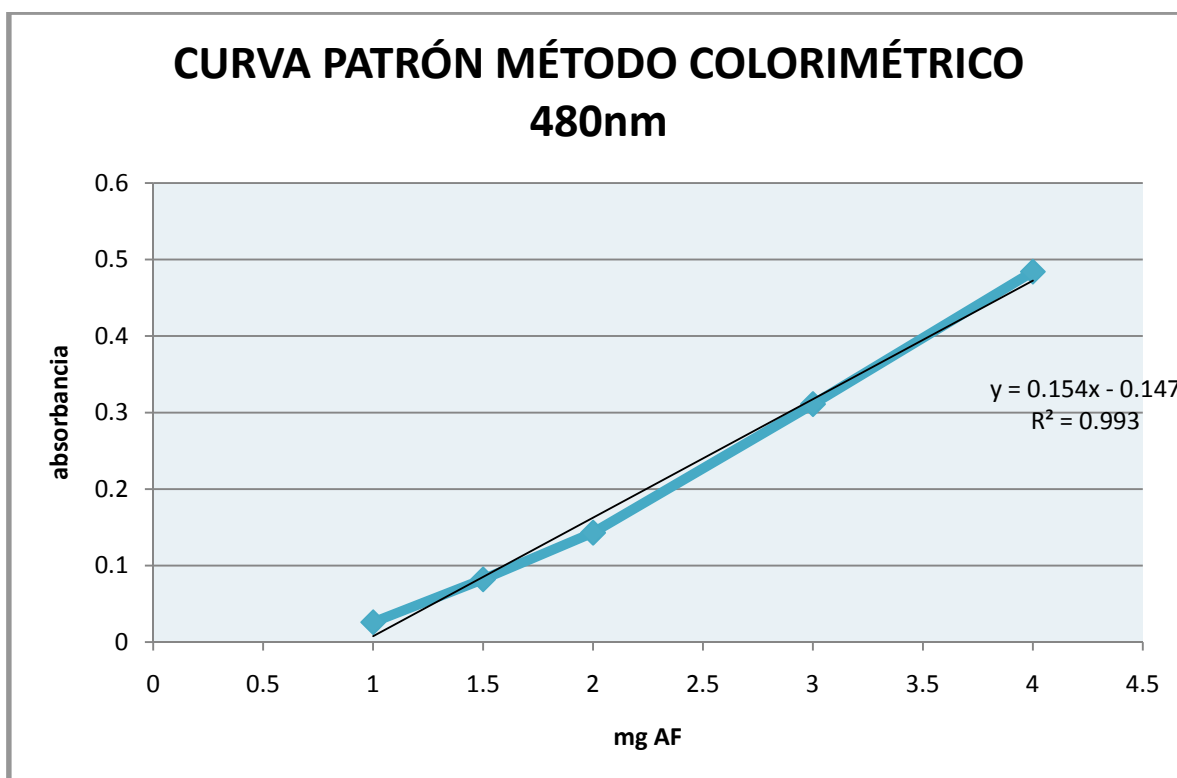
Datos de origen:

mg AC/mL	AREA μ V/sec
0.06	4305580.693
0.5	18346028.76
1	32963873.47
1.5	52346851.47
2	70705190.04



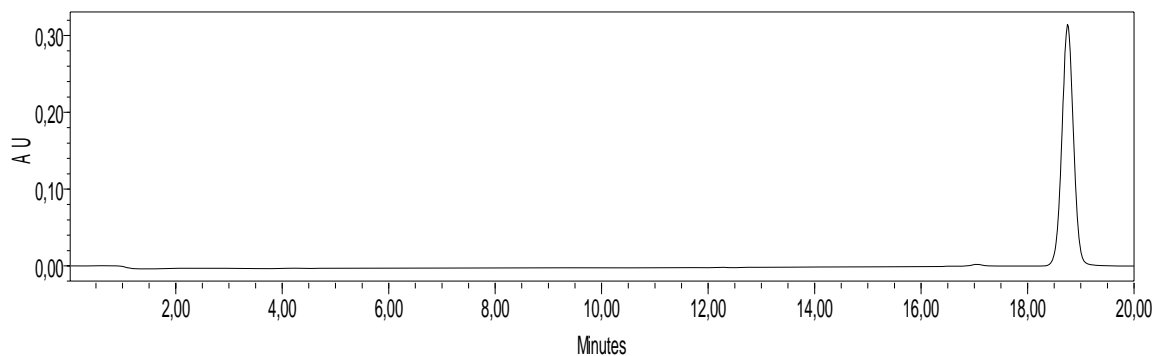
ANEXO 4. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA A 480nm

	ABS
4	0.484
3	0.311
2	0.143
1.5	0.082
1	0.026



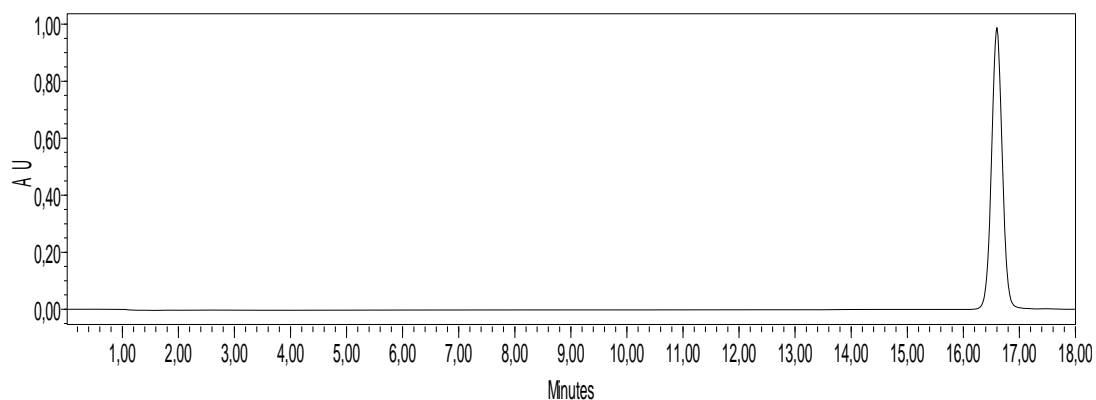
ANEXO 5. HPLC

CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DEL PATRÓN DE ÁCIDO FERÚLICO USADO EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA PATRÓN.



El tiempo de retención promedio para el ácido ferúlico con las mismas condiciones que para la cuantificación de ácido cumárico es de 18.3 minutos, el cromatograma corresponde al punto de la curva de 0.2mg/mL.

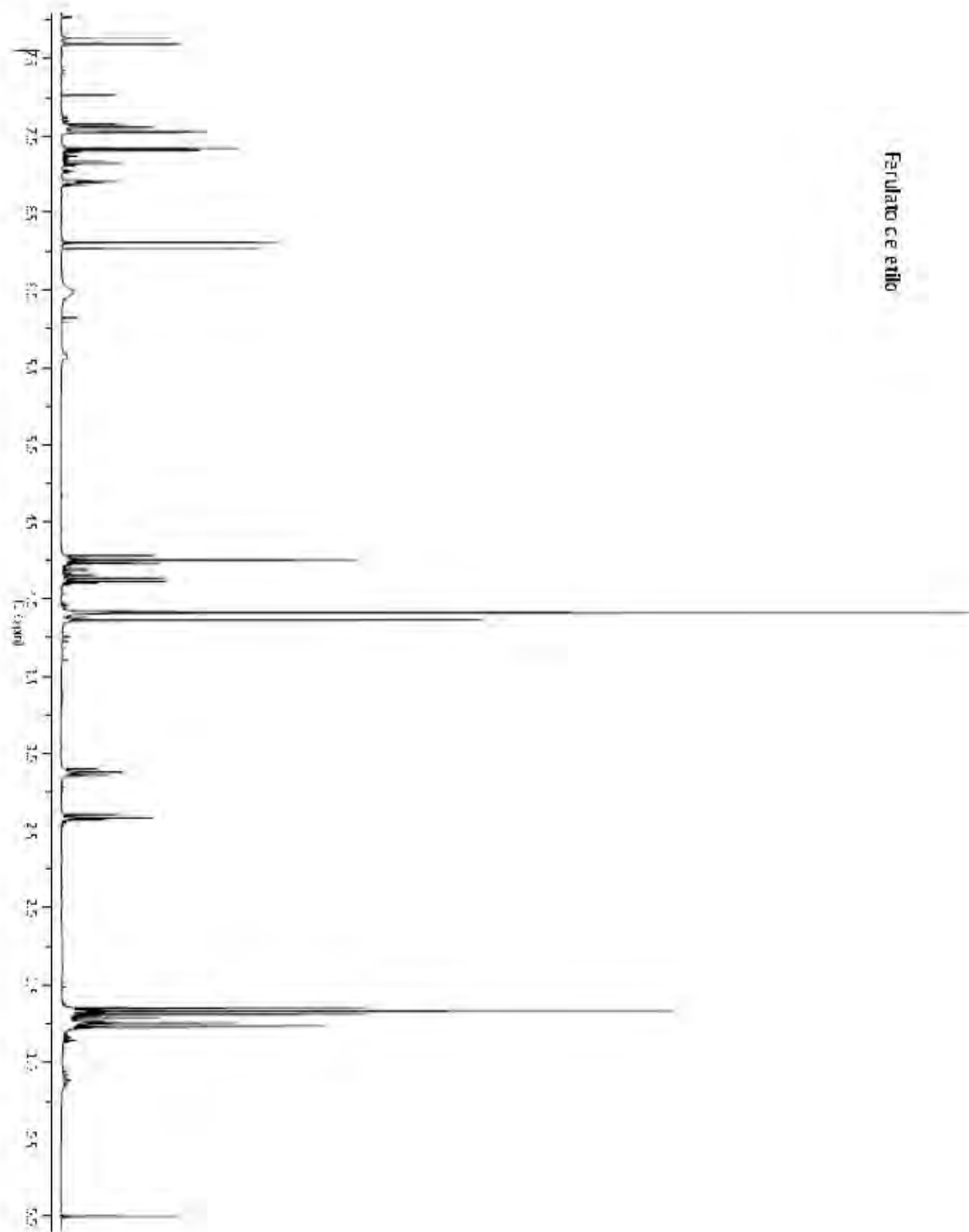
CROMATOGRAMA USADO EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE ÁCIDO CUMÁRICO.



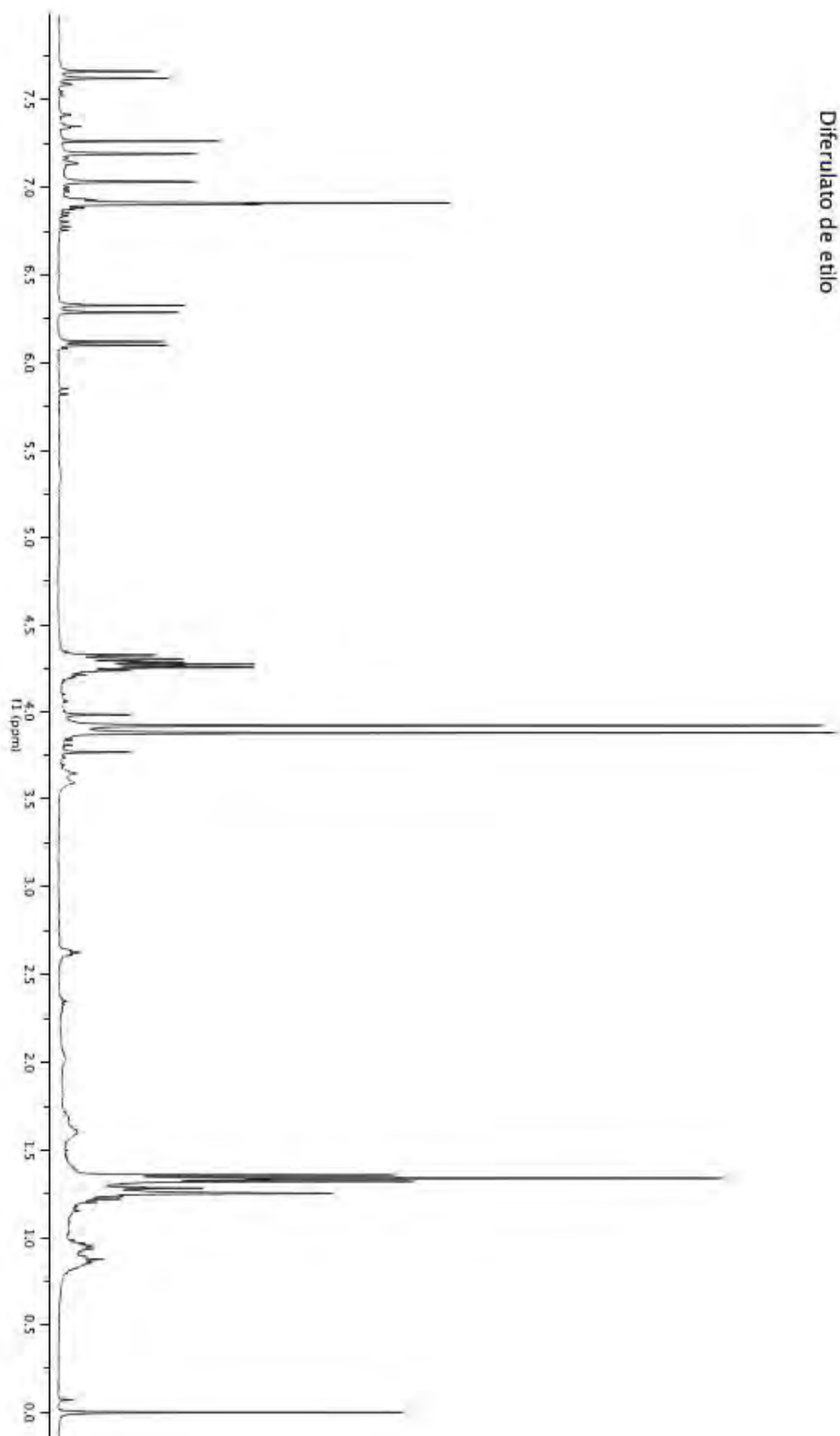
El tiempo de retención para el ácido cumárico en promedio es de 16.5 minutos, el cromatograma corresponde al punto de la curva de 0.06mg/mL.

ANEXO 6. ESPECTROS DE RMN

Ferulato de etilo



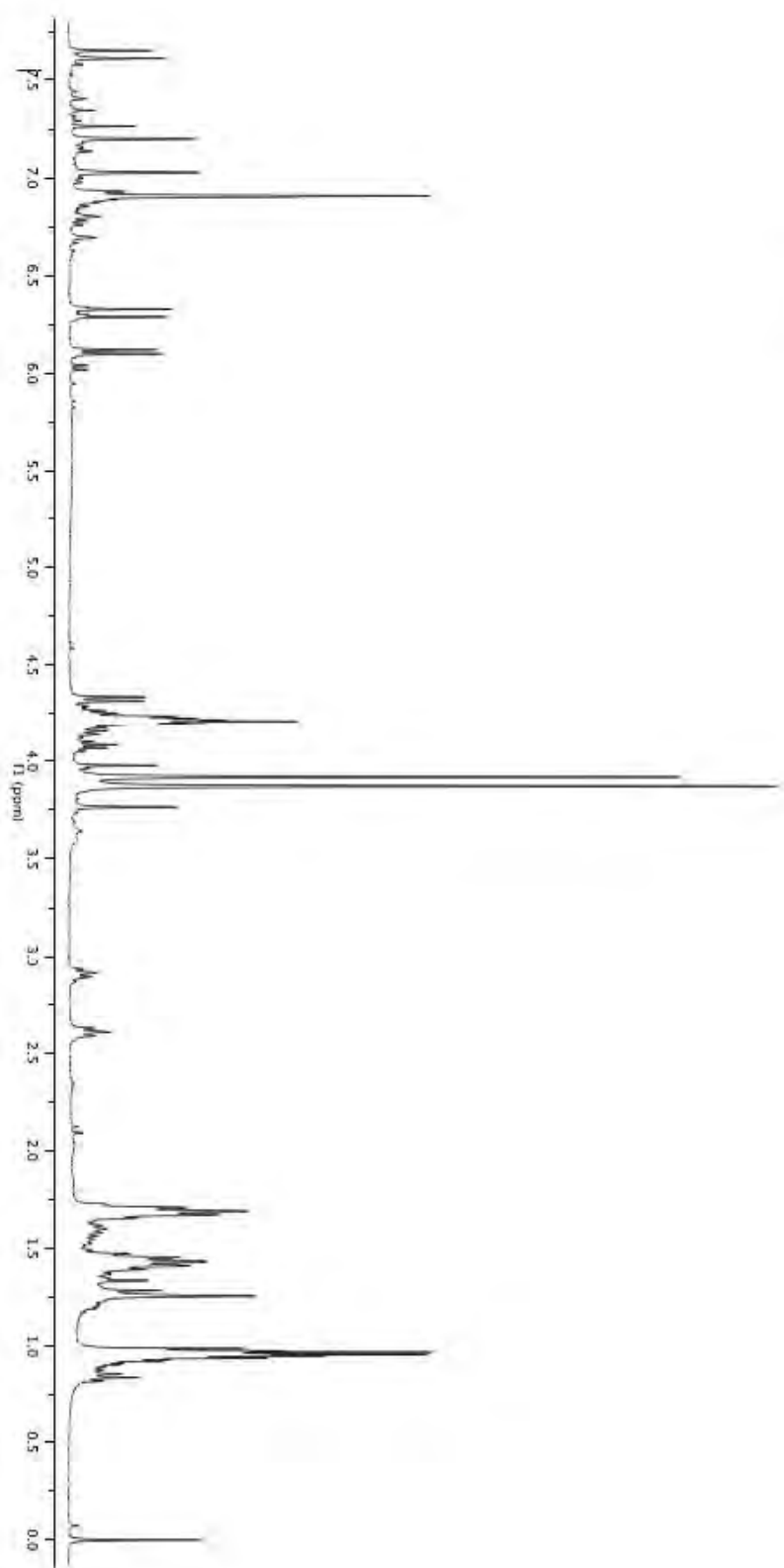
Dímero del ferulato de etilo



Diferulato de etilo

Dímero del ferulato de butilo

Diferulato de butilo



BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aal E.-S. M., Hucl P., Sosulski F. W., Graf R., Gillott C. and Pietrzak L. 2001. Screening Spring Wheat for Midge Resistance in Relation to Ferulic Acid Content. *J. Agric. Food Chem.* 49 (8): 3559–3566.

Barone E., Calíbrese V. & Mancuso C. 2008. Ferulic Acid and Its Therapeutic Potencial as a Hormetin For Age – Related Diseases. *J Clin Biochem Nutr.* 40: 92–100.

Barberousse, H., Roiseux, O., Robert, Ch. Paquot, M., Deroanne C. and Blecker Ch. 2008. Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *J. Sci. Food Agric.* 88: 1494 – 1511.

Beonit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., Asther, M. and Asther, M. 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro – industrial by – products. *Carbohydrate Research.* 341: 1820 – 1827.

Buranov, A. U, Mazza, G. 2009. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry.* 115: 1542 – 1548.

Chavarría, C. E. 2007. *Dímeros de ácido ferúlico de nejayote de maíz: evaluación de la actividad antioxidante de extractos enriquecidos en dímeros/hidrodímeros de ácido ferúlico.* Tesis Licenciatura (Químico de Alimentos)-UNAM, Facultad de Química. México, D. F.

Chigorimbo-Murefua, N. T. L., Rivab, S. & Burtona, S. G. 2009. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 56: 277 – 282.

Dombrink-Kurtzman, M. A., Dvorak, T. J., Barron, M. E. and Rooney, L. W. 2000. Effect of Nixtamalization (Alkaline Cooking) on Fumonisin-Contaminated Corn for Production of Masa and Tortillas. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5781-5786

De Gonzalo, C. G. 2003. Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico. *Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, España.* 220pp.

Eskin, M. A.; Hoehn, E.; Frenkel, C. 1978. A simple and rapid quantitative method for total phenols. *J. Agric. Food Chem.* 26, 973-975.

Faulds, C. & Williamson, G. 1999. Review: The role of hydroxycinnamates in the plant cell Wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:393-395.

González, V. K. 2009. Obtención y esterificación de dímeros de ácido ferúlico. Tesis Licenciatura (Químico de Alimentos)-UNAM, Facultad de Química. México, D. F.

Lattanzio, V. 2006. Some physiological and Ecological Role of Plant Phenolics. *Polyphénols Actualités.* 24: 5 – 9.

Li, N. G., Shi, Z. H., Tang, Y. P., Li, B. Q. and Duan, J. A. 2009. Highly Efficient Esterification of Ferulic Acid Under Microwave Irradiation. *Molecules.* 14: 2118 – 2126.

MENDOZA O. C. 1991. Separación de mezclas. *Edición digital de la Gran Enciclopedia Rialp*, http://www.canalsocial.net/ger/ficha_GER.asp?id=10468&cat=quimica.

MICARD V., RENARD C. M. & THIBAUT J.-F. 1994. Studies on enzymic release of ferulic acid from sugar-beet pulp. *Lebensmittel – Wissenschaft und – Technologie.* 27: 59 – 66.

Ou, S., Luo, Y., Xue, F., Huang, C. Zhang, N. and Liu Z. 2007. Separation and purification of ferulic acid in alkaline – hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *Journal of Food Engineering.* 78: 1298 – 1304.

Oudgenoeg, G., Dirksen, E., Ingemann, S., Hilhorst, R., Gruppen, H., Boeriu, C. G., Piersma, S. R., Van Berkel, W. J. H., Colja Laane and Voragen, A. G. J. 2002. Horseradish Peroxidase-catalyzed Oligomerization of Ferulic Acid on a Template of a Tyrosine-containing Tripeptide. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277. 24: 21332 – 21340.

Ralph, J., Garcia, M. & Williamson, G. 1998. Simple Preparation of 8-5-Coupled Diferulate. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2531-2532.

Saulnier L., and Thibault J. -F. 1999. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric*. 79: 396 – 402.

Saulnier L., Marot C., Elgorriaga M., Bonnin E. and Thibault J. -F. 2001. Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. *Carbohydrate Polymers*. 45: 269-275.

Sohn Y. T. and Oh J. H. 2003. Characterization of Physicochemical Properties of Ferulic Acid. *Arch Pharm Res*. 26: 1002-1008.

Taniguchi, H., Nomura, E. and Hosoda, A. 2006. Advanced application technology of rice bran: preparation of ferulic acid and its applications. *Rice is Life*. Session 10: 301 – 304.

Tilay A., Bule M., Kishenkumar J. and Annapure U. 2008. Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. *J. Agric. Food Chem.* 56 (17): 7644–7648.

Torre P., Aliakbarian B., Rivas B., Domínguez J. M. & Converti A. 2008. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 40: 500 – 506.

Villeneuve, P. 2007. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. 25: 515–536.

Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, Y., Konstantinovskiy, L. and Dosoretz, C. G. 2001. Initial Steps of Ferulic Acid Polymerization by Lignin Peroxidase. *Journal of biological chemistry*. Vol. 276, No. 22, 18734–18741.

Zhao Z. & Moghadasian M. H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*. 109: 691 – 702.