



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS DEHIDRODIFERÚLICOS
MÁS ABUNDANTES DE NEJAYOTES DE DIFERENTES MAÍCES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
LUCÍA SALAS PÉREZ**



MEXICO, D. F.

2014



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: FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS**

VOCAL: **Profesor: HERMILO LEAL LARA**

SECRETARIO: **Profesor: ARTURO NAVARRO OCAÑA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: HIRAM FERNANDO RAMIREZ CAHERO**

2° SUPLENTE: **Profesor: MARIA ROSA GONZALEZ TEPALE**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUIMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM, MEXICO D.F.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUSTENTANTE :

LUCÍA SALAS PÉREZ

INDICE

	Página
Resumen	1
1. INTRODUCCION	2
2. OBJETIVOS	3
3. HIPOTESIS	4
4. ANTECEDENTES	
4.1 Compuestos Fenólicos	5
4.1.1 Síntesis de compuestos fenólicos	5
4.1.2 Función biológica de compuestos fenólicos	6
4.1.3 Fuentes de obtención de compuestos fenólicos	8
4.1.4 Métodos de análisis de obtención de compuestos fenólicos	9
4.1.5 Aplicación de compuestos fenólicos	10
4.1.6 Clasificación de compuestos fenólicos	10
4.2 Acido ferúlico (AF)	13
4.2.1 Propiedades Físicas	13
4.2.2 Síntesis del ácido ferúlico	14
4.2.3 Función biológica del ácido ferúlico	15
4.2.4 Fuentes de obtención del ácido ferúlico	16
4.2.5 Métodos de análisis de obtención del ácido ferúlico	17
4.2.6 Aplicación del ácido ferúlico	18
4.2.7 Derivados del ácido ferúlico	19
4.3 Ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	22
4.3.1 Síntesis de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	24
4.3.2 Función biológica de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	25
4.3.3 Fuentes de obtención de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	26
4.3.4 Métodos de análisis de obtención de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	27
4.3.5 Aplicación de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	28
4.3.6 Clasificación de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	29

4.4 Maíz	29
4.4.1 Características del maíz	29
4.4.2 Variedades de granos de maíz	31
4.4.3 Estructura y composición del maíz	33
4.4.4 Compuestos bioactivos en el maíz	34
4.4.5 ADF presentes en el maíz	35
4.4.6 Proceso de nixtamalización del maíz	36
5. Desarrollo Experimental	39
5.1 Materia prima	39
5.2 Material y Equipo	39
5.3 Diagrama General de Trabajo	40
5.4 Metodología Experimental	41
5.4.1 Primera etapa: Selección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	41
5.4.1.1 Pruebas con diferentes adsorbentes para la recuperación más eficiente de compuestos ADF y AF	41
5.4.2 Segunda Etapa: Recuperación del extracto rico en compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	42
5.4.2.1 Recuperación y des-adsorción de los compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	42
5.4.2.2 Identificación de 2 ADF y AF mediante cromatografía en capa fina	42
5.4.2.3 Separación del AF de los ADF (Cristalización del ácido ferúlico)	43
5.4.2.4 Separación de 2 ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) más abundantes utilizando una columna empacada de sílice	43
5.4.2.5 Identificación y Caracterización de 2 ADF purificados	44
5.4.2.6 Recuperación a gran escala de 2 ADF y AF más abundantes (90L)	44
5.4.2.7 Purificación de 2 ADF más abundantes mediante una Placa Semipreparativa (90 L)	45

5.4.3 Tercera etapa: Cuantificación de 2 ADF, AF y polifenoles totales en tres nejayotes diferentes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	45
5.4.3.1 Maíces utilizados	45
5.4.3.2 Proceso de nixtamalización	46
5.4.3.3 Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la identificación y cuantificación de dos ADF y del AF en tres nejayotes diferentes	46
5.4.3.4 Curvas estándar de 2 ADF y AF por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	47
5.4.3.5 Preparación de muestras para la cuantificación de 2 ADF y AF en tres nejayotes de diferentes maíces	47
5.4.3.6 Determinación de Polifenoles totales de tres nejayotes de diferentes maíces, mediante el Método de Matthaus (2002)	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1 Primera etapa: Selección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	50
6.1.1 Elección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF	50
6.2 Segunda Etapa: Recuperación del extracto rico en compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	52
6.2.1 Recuperación de los compuestos ADF y AF a partir de un nejayote de maíz	52
6.2.2 Identificación de dos ADF presentes en el nejayote mediante cromatografía de capa fina	53
6.2.3 Separación del AF de los ADF (Cristalización del ácido ferúlico AF)	55
6.2.4 Separación de dos ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) utilizando una Columna Empacada de sílice	56
6.2.5 Purificación de dos ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)	58
6.2.6 Identificación y Caracterización de dos ADF puros utilizando pruebas cualitativas	59
6.2.7 Recuperación y Purificación a gran escala de dos ADF más abundantes mediante una Placa Semipreparativa	60

6.3 Tercera etapa: Cuantificación de dos ADF, AF y polifenoles totales en tres nejayotes diferentes mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	61
6.3.1 Obtención de tres nejayotes diferentes a partir de tres maíces nixtamalizados	61
6.3.2 Obtención de curvas estándar de 2 ADF y AF mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	61
6.3.3 Análisis de los tres nejayotes diferentes en HPLC	63
6.3.4 Cuantificación de dos ADF y AF en tres nejayotes diferentes	63
6.3.5 Cuantificación de Polifenoles totales de tres nejayotes diferentes, mediante el método de Matthaus (2002)	65
7. CONCLUSIONES	68
8. ANEXOS	70
9. BIBLIOGRAFÍA	72

Resumen

Los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) son compuestos derivados del ácido ferúlico (AF) que pertenecen al grupo de compuestos fenólicos, específicamente a la familia de los ácidos p-hidroxicinámicos. Los ADF son compuestos importantes en el proceso de lignificación influyendo físicamente en la textura de plantas, brindan estabilidad en la pared celular, dan rigidez y fragilidad a los alimentos después de la cocción, presentan potentes cualidades *in vitro* de actividad antioxidante, son inhibidores más efectivos de la peroxidación lipídica que el ácido ferúlico, poseen propiedades insecticidas, tienen aplicaciones de interés como conservadores y estabilizantes en alimentos y aportan beneficios potenciales a la salud aplicándose en el sector farmacéutico.

Se tiene evidencia que los ADF se encuentran unidos entre sí a través de enlaces covalentes tipo éster y unidos a lignina por enlaces tipo éter, principalmente en las paredes celulares de las plantas, de cereales como el maíz, trigo, arroz, cebada, avena y en la cáscara de las frutas, estando presente en mayor cantidad junto con el ácido ferúlico, el ácido p-cumárico y el ácido cinámico en el pericarpio de gramíneas monocotiledóneas y dicotiledóneas, pero no están disponibles de manera comercial y su síntesis no es de fácil obtención, por lo que se busca recuperar y obtener los ADF a partir de las fuentes naturales que los contienen, para su potencial aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica.

En este estudio se llevó a cabo la recuperación y cuantificación de dos ADF más abundantes presentes a partir de las aguas residuales conocidas como “nejayote” obtenidas de la nixtamalización de diferentes maíces. Primera etapa, se eligió el adsorbente más eficiente para la recuperación de ADF y AF a partir de un “nejayote” de maíz. Segunda etapa, se hizo la recuperación de los compuestos ADF y AF con el adsorbente seleccionado a partir de 50 y 90 litros de nejayote, separando, purificando y caracterizando los dos ADF más abundantes presentes. Tercera etapa, se cuantificaron los dos ADF identificados, AF y los compuestos fenólicos totales presentes en tres nejayotes de diferentes maíces, comparando cuantitativamente la relación que existe entre éstos en cada nejayote.

Se obtuvieron resultados satisfactorios en el aprovechamiento de las aguas residuales de la nixtamalización del maíz “nejayote”, para la obtención de compuestos estándar de ADF y su cuantificación, para su potencial aplicación en la industria de alimentos y farmacia, aportando a su vez un valor agregado al “nejayote” como subproducto agroindustrial.

1. INTRODUCCION

La exigencia de conservar las propiedades fisiológicas, fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, alargando su tiempo de vida útil, es prioritario en la industria alimentaria. Entre los compuestos naturales más utilizados para la prevención y deterioro de alimentos, plantas y organismos vivos, se encuentran los compuestos fenólicos, por ser compuestos bioactivos que están estrechamente asociados con la calidad sensorial, frescura, estabilización, procesamiento y conservación de los alimentos a nivel industrial, éstos poseen propiedades antioxidantes, actúan en la prevención de enfermedades cardiovasculares, carcinogénicas y enfermedades crónicas **(69)**, presentan efectos biológicos en el metabolismo y desarrollo de las plantas, propiedades organolépticas y nutritivas en frutos y vegetales para su conservación, además favorecen su aplicación en el alimento, estabilidad, conservación y son de fácil obtención.

Los compuestos fenólicos se encuentran libres y/o unidos a la pared celular de plantas, frutas y cereales, abarcan una amplia gama de compuestos, un ejemplo de éstos son los ácidos hidroxicinámicos los cuales generalmente actúan como antioxidantes, entre los más representativos se menciona el ácido ferúlico que posee propiedades potenciales biológicas como antioxidante, anti-inflamatorio, anticancerígeno **(42)** y como precursor en la producción de vainillina **(27)**. El ácido ferúlico y sus dímeros se encuentran en las paredes celulares de frutas, en tallos, hojas y raíces de plantas y en cereales como salvado de trigo, arroz, avena, cebada y maíz. La cantidad presente del ácido ferúlico y sus dímeros varía de acuerdo a la variedad de cereal y factores ambientales como clima, humedad y tipo de suelo **(9)**.

Los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) son dímeros del ácido ferúlico y se sabe que poseen mayor actividad antioxidante que el ácido ferúlico, aportan rigidez, estabilidad térmica, lignificación y otros procesos biológicos en las plantas. Los ADF no están disponibles comercialmente y su síntesis no es de fácil obtención. Uno de los cereales que contiene mayor cantidad de ácido ferúlico y ácidos dehidrodiferúlicos en su pericarpio del grano, es el maíz **(15)**, y se pueden obtener mediante hidrólisis alcalina, ácida y enzimática y eventualmente a partir de las aguas residuales del proceso de "nixtamalización" del maíz conocidas como "nejayote", lo que representa una fuente natural disponible y de bajo costo para la extracción de compuestos conservadores-estabilizantes como son los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF).

2. OBJETIVOS

➤ **General:**

- Recuperar y obtener los compuestos estándar de dos ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) más abundantes presentes en el nejayote de maíz y cuantificar éstos ADF en tres nejayotes diferentes, para comparar los ADF presentes entre los distintos maíces y tener una fuente más eficiente para su recuperación y aplicación potencial en la industria de alimentos y farmacia.

➤ **Particulares:**

- Seleccionar el adsorbente más eficiente para la recuperación de los compuestos ADF y AF a partir del nejayote de maíz nixtamalizado
- Recuperar un extracto rico de ADF y AF a partir de 50 y 90 litros nejayote de maíz, utilizando el adsorbente más eficiente
- Cristalizar el AF para obtener un extracto rico en ADF, para separar y purificar los dos ADF más abundantes presentes, mediante una columna empacada de sílice y una placa semipreparativa de sílice
- Identificar y caracterizar los dos ADF purificados obtenidos, mediante diferentes pruebas: cromatografía de capa fina (CCF), punto de fusión, pruebas de solubilidad y espectrometría de masas
- Cuantificar los dos ADF estándar obtenidos y el AF presente en tres nejayotes de diferentes maíces, nixtamalizados a nivel laboratorio, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Cuantificar la cantidad presente de compuestos fenólicos totales de tres nejayotes de diferentes maíces, relacionando ésta cantidad con la presencia de ADF y AF.

3. HIPOTESIS

El pericarpio del grano de maíz, contiene como parte de su composición ácido ferúlico (AF) y ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) y éstos compuestos se pueden recuperar mediante una hidrólisis ya sea alcalina, acida ó enzimática del cereal.

Si el proceso de nixtamalización del maíz, que es un proceso térmico, que en presencia de una sustancia básica, separa el pericarpio del grano, liberando los compuestos presentes en éste en las aguas residuales conocidas como "nejayote", entonces, se podrán recuperar, obtener y cuantificar los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) más abundantes presentes en tres nejayotes de diferentes maíces y la cantidad presente obtenida de ADF dependerá del tipo de maiz a utilizar.

4. ANTECEDENTES

4.1 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy amplio de compuestos orgánicos presentes en la naturaleza, integrado por metabolitos de plantas, cuya estructura molecular presenta un grupo fenólico, núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, que los hace en su mayoría, potentes antioxidantes (donador de H⁺ ó electrones) necesarios para el funcionamiento de las células vegetales, éstos se encuentran libres y/o unidos a la pared celular de plantas, frutas y cereales, por ejemplo en manzanas, cebollas, bebidas como té y vinos **(33)**. A través de estudios de microscopia fluorescente se ha reportado que se encuentran en mayor cantidad en el pericarpio de cereales (la parte externa de la cubierta del grano), que en el endospermo **(9)**.

4.1.1 Síntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico que da origen a los ácidos cinámicos y todos sus derivados como son las cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano, estilbenos, taninos, antocianinas, fenilalanina y tirosina.

En la **fig. 1** se observa que a partir del ácido dehidroshikímico, se obtiene el ácido shikímico que origina el ácido corísmico y éste da origen al ácido p-fenílico, del cual se originan dos compuestos: el ácido p-hidroxifenilpirúvico y el ácido p-hidroxifenilpirúvico que originan una serie de compuestos como es el ácido p-hidroxicinámico, que da origen a un extenso grupo de compuestos fenólicos como son el ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico y las unidades de flavonas, entre otros.

La otra ruta es la del ácido malónico, una importante fuente de fenoles que origina quinonas, xantonas y orcinoles en bacterias y hongos.

Algunos compuestos fenólicos se originan a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetato, como es el caso de los flavonoides, o que surgen a través de la combinación de una vía del mevalonato, origen de los compuestos terpenicos, con una vía del shikimato (furano y piranocumarinas).

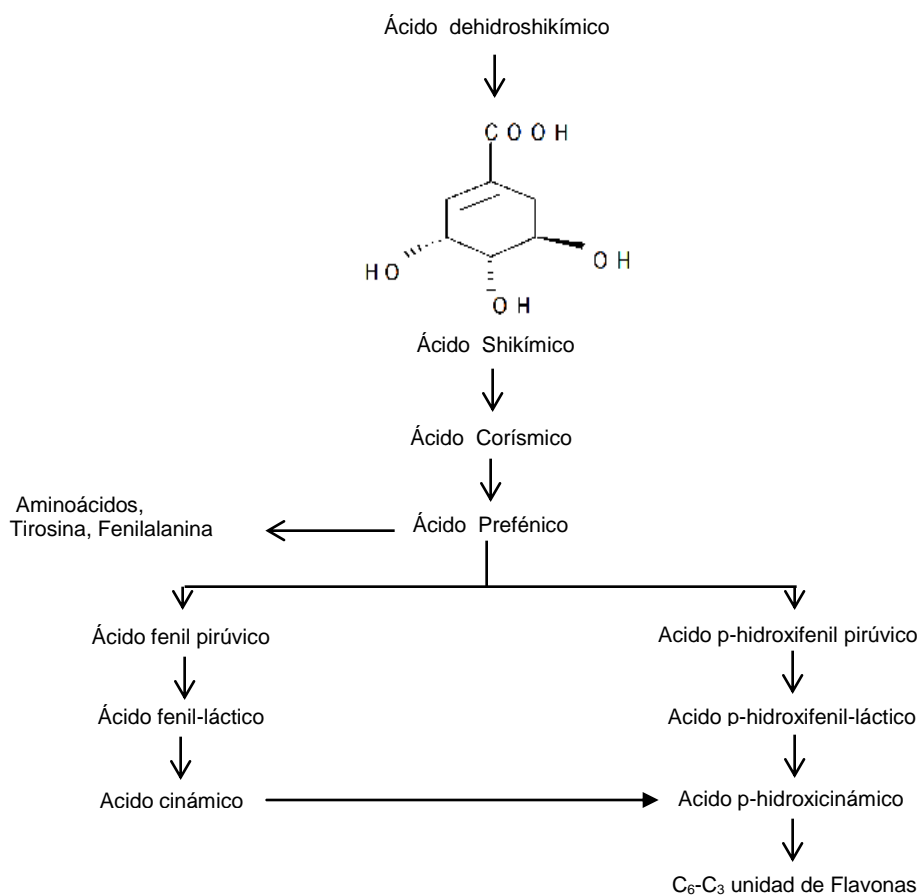


Fig. 1. Ruta biosintética para la formación de ácidos hidroxicinámicos y derivados.

4.1.2 Función biológica de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados para proteger a la planta de estrés fotosintético, son especies reactivas de oxígeno actuando como antioxidantes. Algunos estudios señalan que la actividad antioxidante de compuestos fenólicos enlazados a la lignina o arabinosilanos, son más fuertes sus uniones entre éstos, por lo que protegen mayormente a los cereales y plantas, que los compuestos fenólicos libres **(35)**. La actividad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos depende del número de grupos hidroxilo y de la posición en que se encuentren en la molécula, siendo muy abundantes en la naturaleza.

Los compuestos fenólicos son responsables de los colores, sabores y aromas de frutas y verduras, protegen a las plantas del ataque de herbívoros, con múltiples efectos biológicos en el metabolismo, desarrollo y aspectos nutrimentales y de conservación de frutos, vegetales, semillas, cereales, germen, pepitas y bayas **(48)**.

Los compuestos fenólicos son constituyentes principales de forraje en la alimentación de ruminantes, estos compuestos son liberados de las paredes celulares de las plantas durante la degradación ruminal y son inhibidores del crecimiento de algunos microorganismos ruminales *in vitro* **(1)**.

A nivel fisiológico en el ser humano, diversos estudios han demostrado que algunos subgrupos de los compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante con beneficios a la salud (como son los polifenoles del té), que actúan contra tumores, cáncer, hipertensión, artritis, úlceras, mutaciones y carcinogénesis. También los compuestos fenólicos actúan como anti-estrógenos, anti-inflamatorios, anti-micóticos, anti-bacteriales, anti-virales, anti-metástasis, anti-hepatóxicos, con efectos vasodilatadores sobre el sistema vascular e inhibiendo distintos sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad de los vasos (hialuronidasa, catecol-O-metiltransferasa, fosfodiesterasa-AMPc, PKC. Tal es el caso de los ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos y derivados hidroxilados), flavonoides, lignanos y estilbenos **(12)**.

A nivel sanguíneo los compuestos fenólicos presentan actividad anti-trombótica al inhibir la agregación plaquetaria y el incremento de la presión sanguínea, previniendo enfermedades cardiovasculares **(55)**. Los compuestos fenólicos operan como factores vitamínicos P (aumentando la permeabilidad y disminución de la resistencia de los vasos capilares sanguíneos) como por ejemplo el rutósido o los citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género *Citrus*.

Se ha estudiado que con la ingestión del vino rojo o la ingestión de compuestos fenólicos extraídos del vino, ha mostrado una mejora en el estado antioxidante de plasma en humanos. Otros estudios demuestran que la concentración de los compuestos fenólicos especialmente el camferol presentan una buena correlación con la prevención de enfermedades, debido a las características únicas que éstos le confieren de efecto vasodilatador **(44)**.

En varios estudios de pacientes con diabetes, se observó que al consumir una cantidad moderada diaria de compuestos fenólicos hubo una reducción significativa de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación, mejorando la función cardíaca después de haber sufrido un primer infarto al miocardio, mejorando la resistencia a la insulina **(50)**.

Investigaciones indican que al consumir una dieta rica de compuestos polifenólicos se disminuye el

riesgo de enfermedades crónicas como enfermedades coronarias, diabetes, hipertensión y algunos tipos de cáncer.

4.1.3 Fuentes de obtención de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran en una diversidad de plantas comestibles y no comestibles, encontrándose en diferentes partes de las plantas (hojas, tallos, raíces, bagazo, follajes), en árboles como pinos, abedules y álamos (partes leñosas como troncos y corteza) y en tejidos de flores **(51)**. Entre las fuentes comestibles los compuestos fenólicos se encuentran en una gran cantidad de frutas: fresas, ciruelas, uvas; en vegetales como cebolla, papa, tomate, pimentón, jengibre, ajo, romero, leguminosas, habas, semillas, café, cacao, aceite de olivo, en la cáscara de cereales, en té verde y negro, en una amplia variedad de vinos, así como también en algas marinas.

Los fenoles simples, que incluyen a los monofenoles tales como p-cresol han sido aislados de varias frutas como frambuesas y zarzamoras. El 3 etilfenol y el 3,4 dimetilfenol son los responsables de la nota ahumada de granos de cacao. Los ácidos fenólicos están presentes en ciruela pasa (0.9%), moras azules en 0.2%, manzanas en 0.1%, peras en 0.2%, cáscara de papa dulce en 1%, uvas en 0.2%; en aceite de soya y avena es seguro encontrar ácido clorogénico, ácido caféico y ácido ferúlico.

El **ácido caféico** extraído principalmente de manzana, albaricoque, duraznos, espinacas, col, alfalfa y trigo; el **ácido cinámico** presente en uva, frambuesa, frutas cítricas, espinacas, col, alfalfa, en cereales como el trigo contienen un 30% más de enlaces éster de ácido cinámico en su cáscara que en el grano mismo y también contiene aproximadamente igual cantidad de ácido ferúlico y ácido p-cumárico **(56)**. El **ácido clorogénico** y sus isómeros se encuentran en un 4% en peso en semillas de café y en promedio una taza de café contiene 0.19 g de éste compuesto; también lo encontramos en manzana, pera, ciruela y albaricoque principalmente. El **ácido p-cumárico** está presente en la manzana, durazno, espinacas, espárragos, trigo y otros cereales. El **ácido ferúlico** está presente en la manzana, durazno, espinacas, col, zanahorias y remolacha de azúcar con un 0.8 %. En el pericarpio de cereales el AF se encuentra en el centeno, avena, trigo con un 0.66% de peso seco, cebada con 0.14% en peso seco, en la pared celular del arroz con 0.9%, en el pericarpio del maíz con un 2% a 6% en peso seco, siendo uno de los cereales más potenciales para su obtención.

4.1.4 Métodos de análisis de obtención de compuestos fenólicos

Los fenoles libres o solubles son de peso molecular bajo o intermedio y pueden ser extraídos con diferentes tipos de solventes, mientras que los fenoles no solubles o enlazados son principalmente taninos condensados de alto peso molecular, donde se requieren de la combinación de varios métodos para su obtención y cuantificación.

Los métodos más comunes para la identificación, separación y cuantificación de compuestos fenólicos, son los métodos cromatográficos como son la cromatografía de capa fina, cromatografía de fase líquida de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography) (36), cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar y la espectroscopia de Masas, ya que son métodos efectivos y probados para la cuantificación de éstos y otros compuestos (10).

Mediante la Cromatografía de fase líquida de alta resolución (HPLC) se han detectado y cuantificado bajo condiciones de fase reversa utilizando las columnas C₁₆ y C₁₈ con detector de arreglo de diodos y pretatamiento isotacoforético (57) un gran número de compuestos fenólicos como son el ácido galico, epicatequina, ácido ferúlico, quercitina, ácido caféico, ácido cumárico, entre otros (8).

También se ha recuperado y cuantificado un gran número de compuestos fenólicos como son: el ácido ferúlico, ácido caféico, ácido cumárico y trans-resveratrol, mediante una extracción sólida utilizando HPLC y empleando solventes orgánicos (36).

Para la cuantificación de compuestos polifenoles totales, se utiliza frecuentemente el método de **Folin-Ciocalteu** utilizando el reactivo (F-C). Este método se fundamenta en una reacción colorimétrica de oxidación/reducción. El reactivo F-C presenta carácter reductor, ya que se trata de una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico, que en un medio básico se reducen, al oxidar los compuestos fenólicos presentes en una muestra, originando óxidos azules de wolframio (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃). La absorbancia del color azul originado se mide a una λ de 750 nm. (37). La concentración de polifenoles totales se calcula usando ácido gálico como estándar, llevando a cabo la siguiente relación:

Polifenoles totales en muestra = mg de ácido gálico presente / g de muestra utilizada.

4.1.5 Aplicación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen una amplia gama de aplicación en la industria de alimentos y farmacia, utilizándose principalmente como antioxidantes en los alimentos. Los ácidos fenólicos como el ácido caféico, clorogénico, ferúlico, sinápico y p-cumárico, demuestran ser los que presentan mayor actividad antioxidante en comparación con los compuestos hidroxilos derivados del ácido benzoico como es el caso de p-hidroxibenzoico vainillico, por lo que la obtención de ácidos fenólicos, ya sea por síntesis artificial o mediante la extracción de fuentes natural es de gran importancia para su aplicación.

En la industria farmacéutica se utilizan como anti-inflamatorios, anti-alérgicos, anti-trombóticos, anti-aterogénicos, anti-microbianos, anti-hepatóxicos, anti-tumorales, anti-estrógenos, anti-mutagénicos, anti-carcinogénicos, anti-micóticos, anti-bacteriales, anti-virales, anti-metástasis; también se utilizan contra la hipertensión, artritis, úlceras, y cáncer **(33)**.

Se aplican como agentes quimiopreventivos por la acción de inhibir la generación de radicales libres, oxidación de lipoproteínas de baja densidad y la agregación plaquetaria, actuando contra el desarrollo de cáncer, enfermedades del corazón, motivo por el cual son compuestos importantes en la salud del ser humano, teniendo gran aplicación en la industria farmacéutica.

4.1.6 Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono que integren la base de la molécula, entre los más representativos se encuentran: los fenoles simples como: benzoquinonas, los ácidos fenólicos como: compuestos benzoicos, cinámicos y los derivados hidroxilados (ácidos hidroxicinámicos); cumarinas, xantonas, flavonoides, lignanos, ligninas y taninos **(24)**.

A continuación se muestran de manera general algunos ejemplos de compuestos fenólicos como son: la quercetina, ácido ferúlico, antocianidina, kaemferol, ácido clorogénico y flavonoides, que se muestran en la **fig.2**.

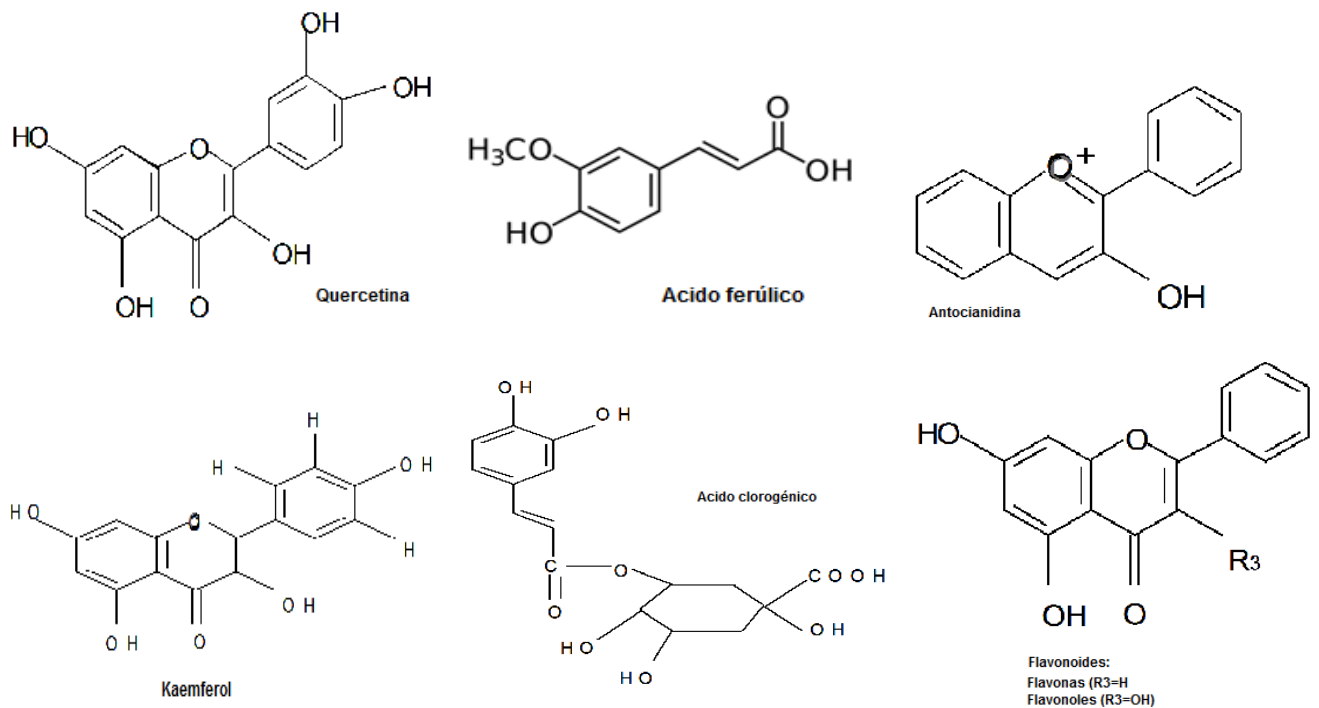


Fig. 2. Ejemplo de compuestos fenólicos: quercetina, ácido ferúlico, antocianidina, kaemferol, ácido clorogénico, flavonoides.

Los ácidos fenólicos son un grupo muy importante por la abundancia con la que se presentan en alimentos y plantas. Este grupo se caracteriza por presentar en su estructura química: un anillo aromático, el grupo hidroxilo común a los compuestos fenólicos y una parte carboxílica. Está integrado por dos subgrupos: ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos presentan comúnmente la estructura C_6H_4 se encuentran casi siempre esterificados con azúcares y alcoholes alifáticos, entre otros metabolitos secundarios. Lo integran aldehídos, combinados en formas heterosídicas, siendo la unidad básica estructural el ácido gálico de los taninos gálicos o hidrolizables, como ejemplo se mencionan el p-hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido salicílico, gentísico, vainillico y gálico **fig. 3**, se encuentran principalmente en frutos como fresas, uvas, naranjas, toronjas y limones **(62)**.

A continuación se muestran algunos ejemplos de compuestos ácidos hidroxibenzoicos de manera general, como son el ácido protocatequico, el ácido vanílico, el ácido siríngico y el ácido gálico.

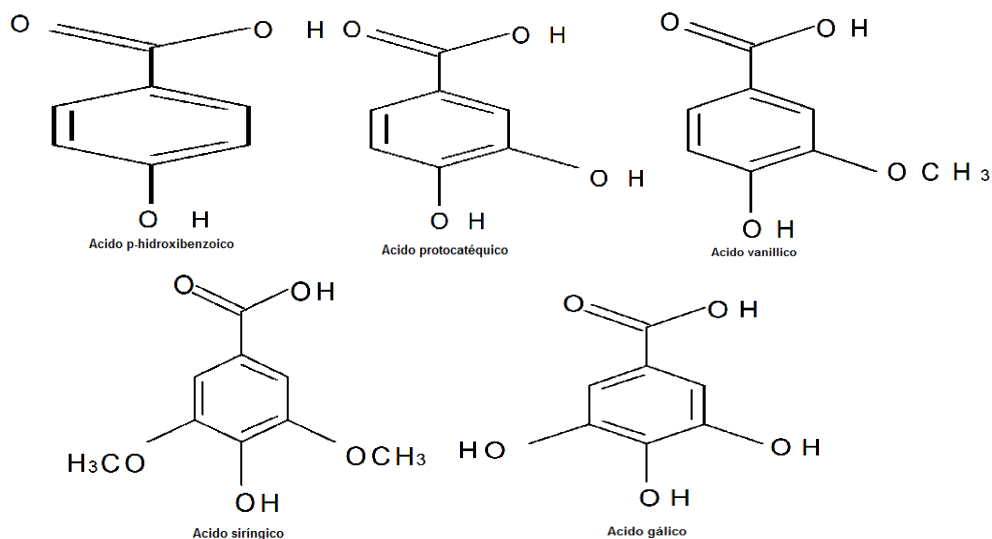


Fig. 3 Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos: ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatequico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido gálico

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos aromáticos con una cadena de tres átomos de carbono (C_6-C_3), son conocidos principalmente por su actividad antioxidante, ejemplo de éstos son los derivados del ácido cinámico siendo los principales: ácido caféico (ácido (3-3,4 dihidroxifenil) propenoico) que se encuentra principalmente conjugado en forma de ácido clorogénico; el ácido cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2 propenoico) que se encuentra en formas orto, meta y para; y el ácido ferúlico (ácido 3-(4-hidroxil-3-metoxi-fenil) 2-propenoico) uno de los más abundantes de los ácidos hidroxicinámicos, ver **fig. 4**.

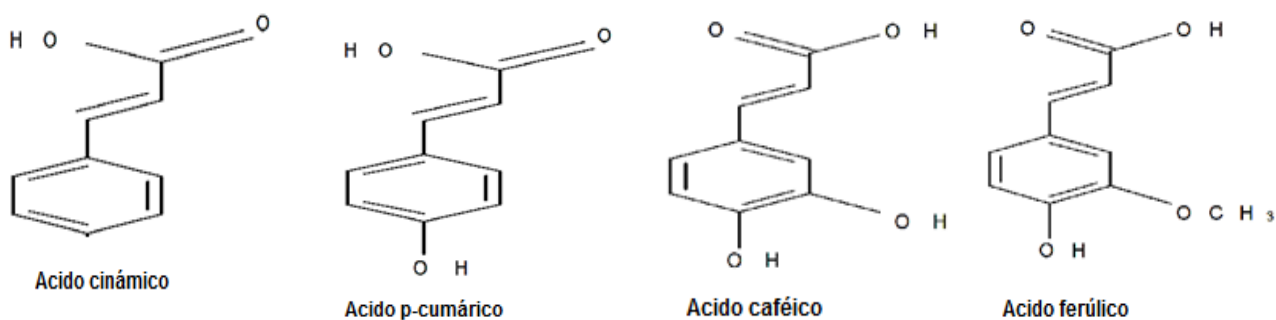


Fig. 4 Ejemplo de ácidos hidroxicinámicos: ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico.

Los ácidos hidroxicinámicos también se combinan con glicerol, monoalcoholes de cadena larga, hidroxiácidos y dioles, formando compuestos derivados como el ac. clorogénico que es un éster de cafeato y la curcumina formada por dos moléculas de ácido ferúlico unidas por un metileno.

4.2 Acido Ferúlico (AF)

El ácido ferúlico (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico **fig.5**, es el ácido más abundantes de los ácidos hidroxicinámicos que se encuentra en la mayoría de las plantas y cereales (incluye las familias *Graminaceae*, *Solanaceae* y *Chenopodiaceae*) formando parte de la pared celular, unido covalentemente a polisacáridos con enlaces éster (conjugados glicosídicos) estando presente en forma monomérica o dimérica, y unidos a lignina por enlaces éster o éter. El ácido ferúlico presenta un doble enlace en la cadena lateral que permite la posible existencia de dos formas isoméricas: cis (Z) y trans (E), aislado en plantas se presenta principalmente en isómeros trans.

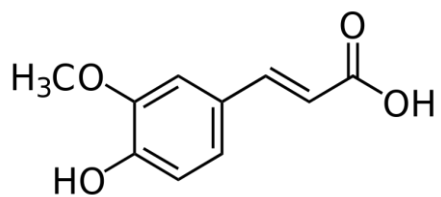


Fig.5 Estructura química del ácido ferúlico (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico

En dicotiledóneas el ácido ferúlico se encuentra en grandes cantidades en la pulpa de remolacha de azúcar y pared celular de espinacas, castañas de agua china, pinos, zanahorias y está ligado con los polisacáridos pecticos **(56)**. El ácido ferúlico y sus dímeros son compuestos ubicuos de la pared celular primaria de las plantas, predominando en el tejido del maíz y trigo, principalmente enlazados a grupos polisacáridos **(13)**.

4.2.1 Propiedades físicas del ácido ferúlico

El ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico conocido como ácido ferúlico (AF), es un fuerte ácido dibásico, presenta físicamente formas ortorrómbicas, su color es blanco-amarillo muy claro, la disociación del primer protón produce el anión carboxilato, la del segundo protón genera el anión fenolato, puede ser cristalizado con agua caliente, su masa molecular es de 194 g/mol, su punto de fusión es de 174 °C, es soluble en etanol, metanol, acetato de etilo y agua caliente, moderadamente soluble en éter de petróleo y ligeramente soluble en benceno. El AF absorbe fuertemente en el UV a una longitud de onda de 248 nm y 307 nm en una solución acuosa pH=6, también exhibe una fuerte fluorescencia. Su tamaño de partícula presenta un intervalo de 10-190 µm con un tamaño promedio de 61 µm **(61)**.

En algunos estudios de estabilidad acelerada indica que el valor t_{90} estimado es de 459 días a 25°C, el AF es inestable a una humedad relativa a más de 76% probablemente por su naturaleza higroscópica. Es incompatible con excipientes como carboximetilcelulosa (CMC), polivinilpirrolidona (PVP) y almidón.

4.2.2 Síntesis del ácido ferúlico

El ácido ferúlico puede ser sintetizado químicamente por una reacción de condensación de Knoevenagel, en el que el ácido malónico se condensa muy fácilmente con aldehídos aromáticos y alifáticos catalizado por pequeñas cantidades de piridina y piperidina. La condensación del ácido malónico con vainillina en presencia de quinolina a 80°C por 8 horas produce ácido ferúlico con un rendimiento teórico de 50.3%, ésta síntesis produce una mezcla de cis y trans del AF, llevándose a cabo la reacción en el transcurso de tres semanas con un rendimiento alto **(42)**.

Otra vía de síntesis del AF es la condensación de Perkin de vainillina con anhídrido acético, donde éstos 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 **(20)**.

A nivel enzimático se puede obtener AF a partir de la conversión oxidativa enzimática del eugenol, que es un sustrato natural y barato que puede ser aislado del aceite esencial del árbol de clavo *Syzyglum aromaticum*, en escala industrial es comercialmente disponible. El eugenol puede ser convertido enzimáticamente a AF vía coniferil alcohol o coniferil aldehído. Las células de *Escherichia coli* crecen toda la noche a 30°C en 50 ml de un medio que contiene tetraciclina y ampicilina, cuando el cultivo entra en su fase estacionaria de crecimiento se adicionan 25 µL de eugenol cada hora durante 15 horas de fase de biotransformación, y la aparición de coniferil alcohol y coniferil aldehído y el AF en el sobrenadante es analizado por HPLC. Después de 15 horas la concentración de AF obtenida es 8.6 g/l, lo cual corresponde a un 90.8% de rendimiento con respecto a la cantidad de eugenol adicionada **(43)**, observando que este método involucra un tiempo prolongado y el rendimiento obtenido no es tan bueno para llevarlo a cabo.

4.2.3 Función biológica del ácido ferúlico

Funcionalmente interactúa con cadenas de pentosas, arabinosilanos y hemicelulosas, incrementa la extensibilidad de la pared celular durante su elongación y su forma en plantas, en la cascarilla de frutas y cereales como es el caso de oligosacáridos feruloilados aislados de la pared celular de *Graminaea* que muestra que el ácido ferúlico está unido al grupo hidroxilo en el C5 de algunos residuos arabinopiranos de los arabinosilanos **fig. 6**.

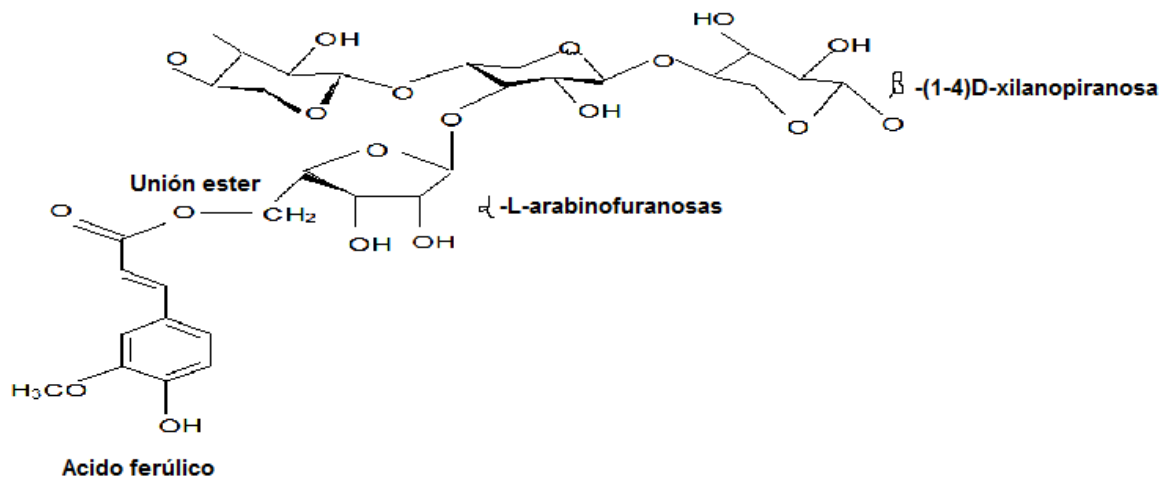


Fig.6 Estructura química de una fracción de arabinosilanos ferulados identificados en cereales.

Una de sus principales funciones es aportar rigidez, extensibilidad, plasticidad, digestibilidad, adherencia e integridad estructural de la pared celular de las plantas y semillas, también es defensivo contra el ingreso de patógenos, depredadores o plagas naturales en las plantas, siendo precursor de compuestos antimicrobianos y antimicóticos, aporta resistencia ante climas adversos y a la degradación enzimática, como es el caso de la pared celular del grano de maíz que es muy resistente debido probablemente al alto carácter de ramificación de los heterosilanos, altos niveles de enlaces cruzados y del ácido ferúlico esterificado presente que restringe la accesibilidad de la enzima **(23)**. Otra función importante en el metabolismo de los minerales es promover la liberación reductiva del ion ferritina.

Disminuye los efectos de la radiación ultravioleta, actuando como protector en las plantas en contra de la radiación UV, también actúa como compuesto para enviar señales químicas ó pigmentos ayudando a atraer insectos que pueden polinizarlas.

En el ser humano una de las funciones fisiológicas más destacadas del ácido ferúlico, es su actividad antioxidante por su habilidad de estabilizar a los radicales libres; se ha investigado que ésta actividad antioxidante en los sistemas biológicos depende de la cadena éster, lo que sugiere que los dímeros del ácido ferúlico podrían ser antioxidantes más fuertes que éste, así como algunos de sus esteres, que contienen una cadena de alcohol y tienen la capacidad para formar secuestradores estabilizando altamente el radical fenoxi por la deslocalización sobre el núcleo aromático sustituido con dos grupos electrón-donador.

Un grupo de esteres de ácido ferúlico forman el γ -orizanol, aceite que se extrae de la fibra del arroz (*Oryza sativa*), y presenta propiedades antioxidantes ampliamente reconocidas, que incluye su habilidad para reducir el colesterol en el plasma, aminorar la absorción del mismo, disminuye la aterosclerosis temprana, inhibe la degradación de plaquetas e incrementa la excreción de bilis fecal ácida (42).

Se ha comprobado que el ácido ferúlico presenta propiedades terapéuticas, que pueden ayudar a combatir padecimientos relacionados con el estrés oxidativo, como el Alzheimer, diabetes, cáncer, aterosclerosis e hipertensión. También se le atribuyen propiedades preventivas actuando como antihepatóxico, antitumoral, antiestrogénica, antimicótica y colesterolémica, con actividad antibacterial contra *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*.

4.2.4 Fuentes de obtención del ácido ferúlico

El ácido ferúlico está unido covalentemente a la pared celular de las plantas y en forma soluble en el citoplasma, abundante en la epidermis, vasos del xilema, vainas, esclerénquima y corteza. Se encuentra presente en maíz, arroz, trigo, avena, centeno, sorgo, forraje, café tostado, tomate, espárragos, olivos, moras, chicharos, frutos cítricos, hojas y en semillas, entre otras frutas y verduras, fig.7.

En sus fuentes naturales es difícil encontrarlo en forma libre, generalmente se encuentra como ésteres, covalentemente enlazado con monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, glicoproteínas, lignina, betacianinas y biopolímeros insolubles de la pared celular vegetal (51). El ácido ferúlico se encuentra esterificado a los glucuronoarabinosilanos en la pared celular de verduras y frutas como las piñas (59).

La azúcar de remolacha, contiene aproximadamente 1% de AF; la pulpa de café, las cascarillas de trigo, arroz, maíz y otros residuos agroindustriales de cereales, frutas y verduras son una fuente potencial de cantidades significativas de ácido ferúlico, lo que revela la importancia de éstas fuentes naturales para la obtención de éste compuesto a gran escala a nivel agroindustrial.



Fig. 7. Algunas fuentes de obtención del ácido ferúlico: hortalizas, cereales, frutos, caña de azúcar.

4.2.5 Métodos de análisis de obtención del ácido ferúlico

El ácido ferúlico puede obtenerse de diferentes maneras, una es la síntesis química o enzimática **fig.8**, y la otra es por extracción a partir de fuentes naturales de cereales y plantas mediante métodos de separación o rompimiento de enlaces de AF- polisacáridos y AF-lignina y puede ser a nivel enzimático usando esterasas ó hidrolasas de AF y mediante la saponificación o hidrólisis alcalina o ácida de los enlaces éster para su separación de la lignina y de los polisacáridos **(14)**, se utiliza comúnmente NaOH y a una concentración que puede variar desde 0.5 a 2.0 N con un tiempo promedio de hidrolisis de 2 horas.

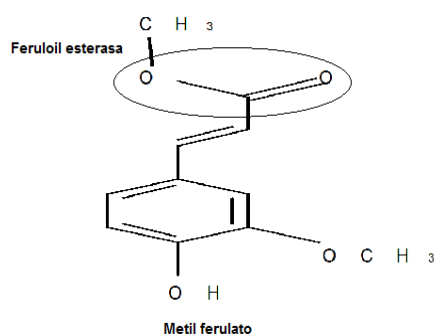


Fig.8 El círculo muestra el sitio activo de la enzima, el enlace éster, es el que se hidroliza para liberar el ácido ferúlico.

Para recuperar el AF enzimáticamente se utilizan esterasas, las cuales no liberan completamente el AF de la matriz de la biomasa, por lo que se aplican de forma sinergista hemicelulasas especialmente xilanasas y arabinofuranosas. Las actividades enzimáticas de seis celulasas fueron

descubiertas para la recuperación de AF usando carboximetilcelulosa de sodio como sustrato, éstas son: xilanasas, β -xilosidasas, esterases, α -arabinofuranocidasas, xilano acetilesterasa y α -glucoronocidasa, ésta última enzima detectada a niveles menores **(54)**, conduciendo a más rutas de recuperación del AF por vía enzimática.

La saponificación ó hidrolisis alcalina es otro método que puede conducir a cambios químicos como la oxidación del compuesto y su purificación es difícil **(32)**. La muestra de pericarpio–aleurona se digiere con NaOH 2N por tres horas en la oscuridad, se homogeniza la muestra cada hora por 15 segundos, se acidifica a pH 2 con HCl concentrado mezclando vigorosamente, se extrae finalmente dos o tres veces con acetato de etilo **(11)**.

Este método se puede aplicar en granos de cereales como el maíz, llevándose a cabo de la siguiente forma: los granos de cereal una vez congelados y secos se remojan toda una noche con agua a 4°C, posteriormente se separan las capas del pericarpio y aleurona del endospermo siendo un proceso muy eficiente para la separación de las capas exteriores del endospermo y del germen que permanece unos 10 segundos después de la molienda.

Este método separa eficientemente el pericarpio del grano del maíz, por lo que es una opción prometedora para recuperar los compuestos contenidos en éste, como son el ácido ferúlico y los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF).

4.2.6 Aplicación del ácido ferúlico

El ácido ferúlico es usado como antioxidante natural por su habilidad de estabilizar a los radicales libres en alimentos. Cualquier radical que se encuentre cercano al ácido ferúlico, fácilmente atrae a un átomo de hidrógeno para formar un radical fenoxilo, el cual está altamente estabilizado por resonancia, dado que el electrón libre puede deslocalizarse en toda la molécula. Una estabilización extra proviene de la conjugación en la cadena lateral insaturada **(28)**.

En la industria de alimentos el ácido ferúlico se utiliza como antibacterial y antimicótico, inhibiendo el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. También se utiliza en bases de grasas y aceites, aplicándose de manera modificada, por ejemplo en forma esterificada, ya que es hidrofílico. La esterificación del AF con alcoholes alifáticos es usado para alterar la solubilidad en emulsiones y fórmulas basadas en aceites **(60)** actuando como solubilizante en alimentos grasos.

El ácido ferúlico también se aplica como inhibidor de sabores amargos en alimentos, es usado como tensoactivo para mejorar las propiedades de las biopelículas de proteína, también se utiliza para obtener geles cuando se mezcla con la pectina **(52)**.

A partir del ácido ferúlico se puede obtener por bioconversión la vainillina (componente esencial de la vainilla), que es un aditivo muy utilizado para impartir aroma y sabor, lo cual convierte a la vainillina en un aditivo natural ampliamente utilizado en la industria alimenticia. La síntesis de vainillina a partir del AF se puede llevar a cabo utilizando diferentes cepas de hongos como por ejemplo: *Pseudomonas sp*, *Pycnoprus cinnabarinus*, *Polyporus versicolor*, *Fomes fomentarius*, *E. coli*, y *Cornybacterium glutamicum*.

El ácido ferúlico también es usado como sustrato para la transformación biocatalítica de otras moléculas valiosas como polímeros, epóxidos, acilbencenos, ácido protocatecoico relacionado con catecoles, guayacol y catecol **(56)**.

En la industria farmacéutica, es ingrediente activo en lociones y cremas como fotoprotector para la radiación solar, ya que absorbe fuertemente la radiación UV. Se utiliza como anti-inflamatorio en la medicina oriental; éstos efectos son dependientes de sus concentraciones fisiológicas, que están dadas por sus propiedades farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y eliminación).

4.2.7 Derivados del ácido ferúlico

Los derivados del ácido ferúlico son compuestos que están presentes en las plantas en cantidades significativas y se sabe que contribuyen en el enlazamiento de la pared celular, participando en el mecanismo bioquímico para controlar las propiedades mecánicas de la pared celular en la fase de extensión y pueden ser sintetizados químicamente o enzimáticamente.

Los compuestos derivados del AF se forman a partir de un enlace éster entre la función carboxílica del AF y uno de los grupos alcohólicos de un compuesto orgánico ó un enlace incluyendo uno de los grupos fenólicos de la molécula.

Pueden entrelazar diferentes cadenas de polisacáridos y en algunos casos polisacáridos con lignina, como es el caso del feruloil-arabinosa que es precursor para la feruloilación de los arabinoxilanos que se encuentra en el trigo.

Los derivados de AF con polioles, como los azúcares, pueden experimentar un incremento de su solubilidad en agua. La enzima pectinasa PL "Amano" preparada de *A. niger* tiene la habilidad para catalizar la esterificación del AF con polioles **(38)**.

Algunos ejemplos de compuestos derivados de AF son:

- 2-etil-1-hexil-ferulato, está relacionado estructuralmente con el octal-metoxicinamato, uno de los más importantes filtros UV en la industria farmacéutica y cosmética, que junto con el 3,5-trimetil-1-hexil ferulato son más efectivos en la inhibición superóxido y los compuestos amida del AF son más efectivos estimulando la secreción de insulina comparados con el AF **(38)**.
- Etil 3-(4-geraniloxi-3-metoxifenil)-2-propionato, se ha investigado que presenta más absorbancia intestinal del compuesto debido a un aumento de velocidad celular o a las interacciones hidrofóbicas con los sitios activos **(16)**.
- Esteres del AF como el esteril, n-hexadecil y octadecil ferulatos, se encuentran en gran parte en la naturaleza **(4)** y también pueden ser sintetizados por vía química o enzimática utilizando lipasas, feruloil esterasas, tanasas y cutinasas, en medios con poca agua para esterificar un alcohol de cadena larga al compuesto fenólico **fig.9**. Se ha encontrado que éstos compuestos presentan mejores condiciones de uso en medios poco acuosos, con mayor facilidad de interaccionar en medios de agua-aceite **(19)**.

En general se ha encontrado que los compuestos derivados del ácido ferúlico son inhibidores más efectivos de la peroxidación lipídica que el AF ya que tienen la habilidad de secuestrar radicales en una fase acuosa por un sistema de conjugación en las moléculas, siendo de gran interés su obtención para su aplicación en alimentos.

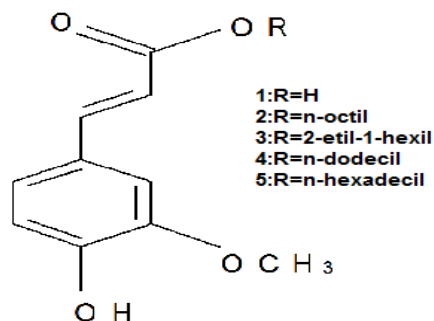


Fig.9. Estructura del ácido ferúlico (1) y sus derivados: n-octil-ferulato(2), 2-etil-1-hexil ferulato(3), n-dodecil ferulato(4), n-hexadecil ferulato (5)

Las biotransformaciones del AF (saturación del doble enlace), pueden ser enzimáticas y microbianas por bacterias y hongos teniendo como resultado metabolitos como el 4-hidroxi-3-metoxiestireno (compuesto A), y ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilpropiónico o ácido dihidrodiferúlico (compuesto B) formado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, bajo una atmosfera de argón, **fig 10.**

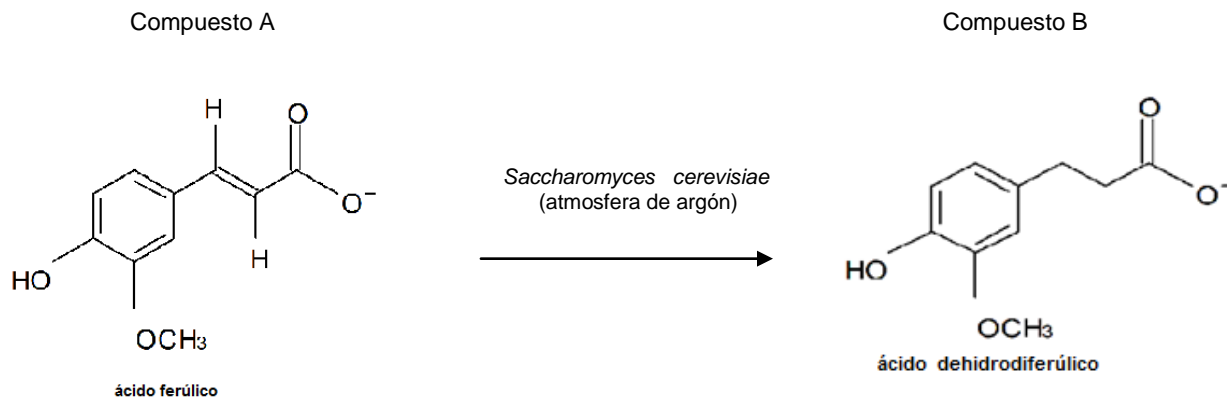


Fig.10. Formación de ácido dehidrodiferúlico

La biotransformación del AF por *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones aeróbicas estándar da rendimientos cuantitativos, llevándose a cabo la descarboxilación del AF para dar como resultado el 4-hidroxi-3-metoxiestireno y el ácido dehidrodiferúlico en 48 horas, ambos compuestos son aislados por una extracción de la fase sólida, en la que se ajusta la mezcla de reacción a pH 9 con NaOH (6N) para extraer con acetato de etilo el 4-hidroxi-3-metoxiestireno, y después acidificando a pH 2 con HCl (6N) para extraer el ácido dehidrodiferúlico **(30)**.

Existen otros compuestos derivados del ácido ferúlico que se forman a partir de trímeros de éste compuesto, que se encuentran unidos a polisacáridos enlazados covalentemente, lo cual los hace estables a la temperatura y no exhiben sinéresis después de un largo tiempo de almacenamiento **(17)**.

Los ácidos dehidrotriferúlicos (ATF) y productos más grandes hacen la principal contribución de enlaces en los polisacáridos de la pared celular en las células del maíz, se han identificado cuatro diferentes ATF, ejemplo de éstos son: el 5-5',8'-O-4''ATF y el 8'-O-4,8-5' ATF. Ver **fig.11**.

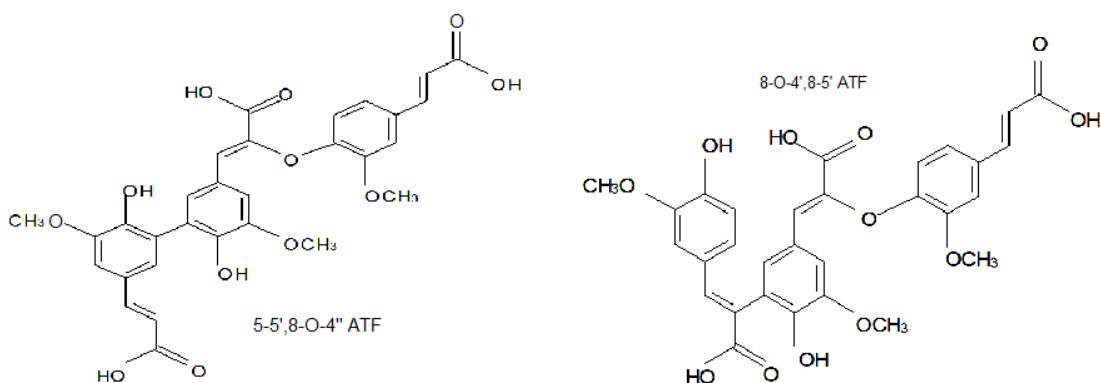


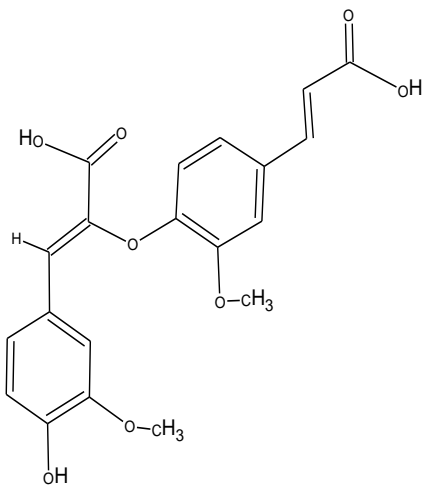
Fig.11. Ejemplo de ácidos dehidrotriferúlicos: 5-5',8-O-4 ATF, 8-O-4,8-5' ATF

4.3 Ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

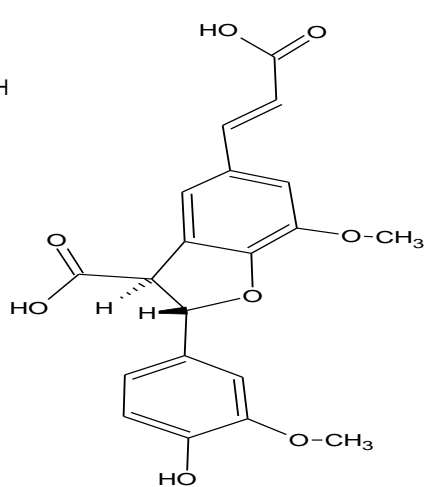
Los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) también conocidos como ácidos diferúlicos, naturalmente pertenecen a la familia de los ácidos p-hidroxicinámicos, los cuales se encuentran ligados covalentemente a polisacáridos (arabinoxilanos, xiloglucanos y pectinas) en la pared celular de plantas, en el pericarpio del grupo de *Caryophyllaceae* dicotiledóneas, monocotiledóneas, pericarpio de cereales y cáscara de frutas.

El primer ADF identificado fue el 5-5' ADF el cual fue nombrado como ácido diferúlico, ha sido aislado de la pared celular de varias monocotiledóneas y dicotiledóneas después de una hidrólisis alcalina ó esterificado a un azúcar (49). Recientemente se han encontrado en el tejido de plantas, castañas de agua china, grano de maíz, trigo, salvado, remolacha de azúcar, centeno, cebada, zanahoria y bambú por mencionar algunas.

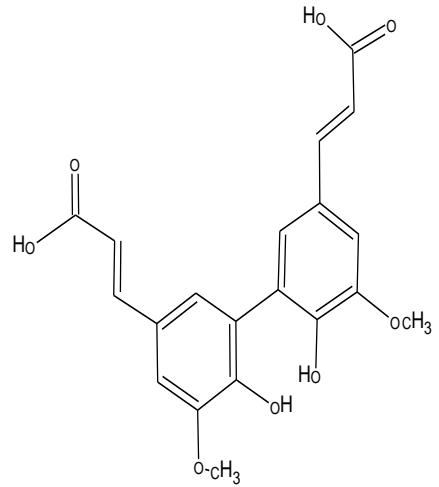
Se han identificado 8 compuestos de ADF en plantas y cereales: siendo el **8-O-4' ADF** ácido [(Z)-β-4-[(E)-2-carboxivinil]-2-metoxifenoxi}-4-hidroxi-3-metoxi cinámico] el más abundante encontrado en varios cereales, le sigue el **8-5' ADF** (forma benzofurano) BenDi [ácido trans-5-[(E)-2-carboxivinil]-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-2-3-dihidrobenzofurano-3-carboxílico], **5-5' ADF** [ácido (E,E)-4-4'-dihidroxi-5-5'-dimetoxi-3,3'-bicinámico], **8-5' ADF** [(E,E)-4-4'-dihidroxi-3,5'-dimetoxi-β-3'-bicinámico], **8-8' ADF** AryID [ácido trans-7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metoxi-1,2-dihidronaftaleno-2,3-dicarboxílico], **8-8' ADF** (forma cíclica), **8-5' ADF** (forma descarboxilada) y **4-O-5 ADF** que se encuentra en menores cantidades, ver **fig 12**.



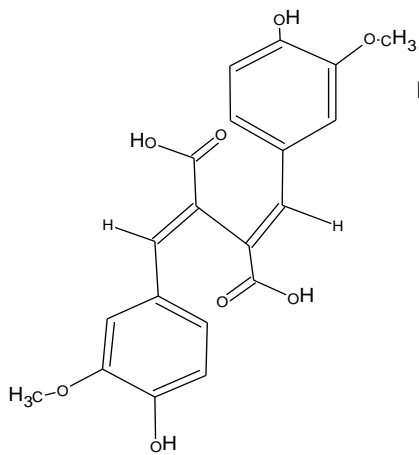
A. 8-O-4' ácido dehidrodiferúlico



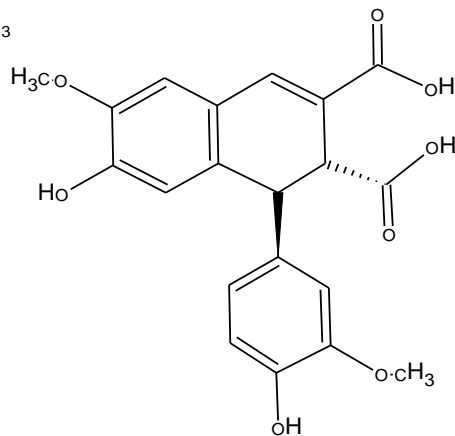
B. 8-5' ácido dehidrodiferúlico (forma benzofurano)



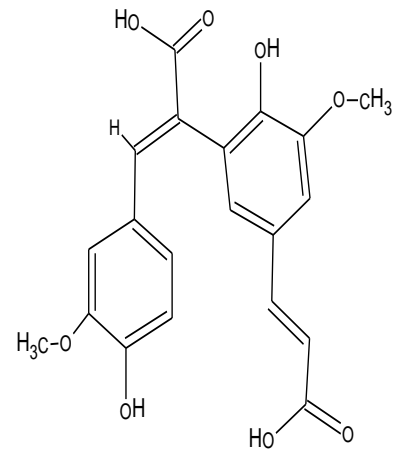
C. 5-5' ácido dehidrodiferúlico



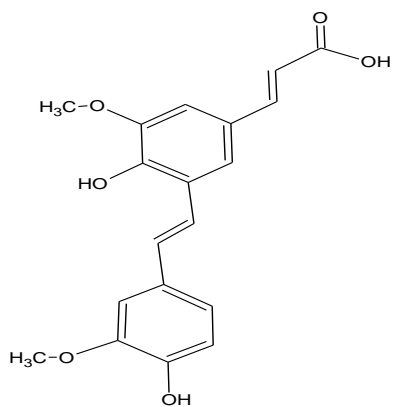
D. 8-8' ácido dehidrodiferúlico (forma abierta)



E. 8-8' ácido dehidrodiferúlico (forma cíclica)



F. 8-5' ácido dehidrodiferúlico (forma abierta)



G. 8-5' ácido dehidrodiferúlico (forma decarboxilada)

Figura 12. Estructuras de compuestos ADF más representativos en plantas y cereales.

4.3.1 Síntesis de ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

Los ADF se forman *in vivo* bajo acoplamiento del AF para formar ésteres de ferulato por medio de una reacción de dimerización, ésta reacción proporciona una ruta para enlazar las cadenas de polisacáridos, que genera la formación de complejos ferulatos-polisacáridos-lignina durante el desarrollo de la pared celular **(56)**.

Se han descrito dos mecanismos para la dimerización: la ciclodimerización inducida [2+2] la cual es un mecanismo predominante; y el acoplamiento oxidativo vía peroxidasa del ácido ferúlico para producir los ADF **(47)**. La dimerización es posible por reacciones fotoquímicas ó cicloadición fotoinducida entre los carbonos de etileno de dos ácidos fenólicos que conducen la formación de dímeros tipo ciclobutanos como el truxílico.

El AF se dimeriza de manera general, por acoplamiento oxidativo y puede ser catalizado por varios sistemas como la peroxidasa y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), polifenol oxidasa y lacasas para la formación de los compuestos ADF.

Los ADF no son comercialmente disponibles y su síntesis química es de difícil obtención, un ejemplo de ello es el compuesto ADF 5-5' el cual para su síntesis se utilizan reactivos peligrosos y se lleva a cabo el procedimiento en 4 pasos y ésta síntesis no es frecuentemente reproducible.

Para la formación del ADF 8-O-4 se llevan a cabo 9 pasos **(15)**, los cuales son procedimientos lentos y de difícil obtención. Generalmente los métodos de obtención no pueden ser usados para preparar una cantidad sustancial de ADF, es decir, no son métodos recomendables para su formación a gran escala, haciendo más complicada y costosa la obtención de compuestos ADF por síntesis química.

Los ADF están presentes en extractos saponificables de una gran variedad de plantas, frutas, cereales y leguminosas. Como ejemplo están los residuos agroindustriales, ya que éstos compuestos fenólicos son retenidos en el pericarpio de cereales, en los tallos de plantas y vegetales, en la cáscara, pulpa y jugos de frutas, entre otros. Pudiendo recuperar y obtener los ADF a partir de residuos naturales **(21)**, aportando a éstas fuentes, un valor adicional con uso potencial y de mejor aprovechamiento a partir de métodos de extracción de bajo costo.

4.3.2 Función biológica de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

Los compuestos ADF son precursores de compuestos antimicrobianos, moléculas receptoras de señales y fitoalexinas las cuales tienen un papel importante en las respuestas de defensa de la planta, es decir, actúan como fungistáticos que implican resistencia ante las plagas, ya que la degradación de polisacáridos por mezcla de enzimas fúngicas es significativamente influenciado por diferulatos **(31)**.

Los ADF del ácido ferúlico en las plantas también se encuentran en su forma esterificada, lo que afecta en el comportamiento fisicoquímico de la fibra dietética insoluble por incremento de peso molecular de los arabinoxilanos **(15)** influyendo en las propiedades fisiológicas de las plantas como son tamaño, fermentabilidad y capacidad de absorción de éstos.

Los ADF actúan como reguladores del crecimiento y desarrollo en plantas, promueven la unión célula-célula, teniendo importantes funciones como el grado de enlaces cruzados de ácidos dehidrodiferúlicos entre polisacáridos pécticos, formando complejos ferulatos-polisacáridos-lignina **(46)**. Actuando como sitios de nucleación para la síntesis de lignina durante el desarrollo de la pared celular dando como resultado un decremento en la extensibilidad y mayor rigidez a ésta **(56)**, aportando mantenimiento en la textura del tejido y dureza de los vegetales después del cocimiento. Los ADF glicosidados derivan de polisacáridos ferúlicos que han mostrado inhibición en el crecimiento de elongación inducido por auxina o giberelinas **(50)**.

Los ADF son sintetizados naturalmente en las plantas como protección del estrés fotosintético (especies reactivas de oxígeno), también limitan la degradabilidad de plantas de forraje, evitan el oscurecimiento del tejido al ser expuesto a la luz **(66)**. Los ADF están ligados a la cesación de crecimiento en coleotiles y a la restricción de invasión de patógenos en plantas y cereales como es el caso de la avena **(7)**. Retardan la captura de iones y la síntesis de proteínas en plantas, retardando el crecimiento de una variedad de organismos comprendidos en el ciclo del nitrógeno **(63)**.

Los ADF formados por el acoplamiento oxidativo de AF se han estudiado que son antioxidantes más efectivos que el AF **(67)** y presentan propiedades antioxidantes potenciales que podrían contribuir a efectos benéficos en los alimentos ricos en lípidos **(15)**.

Los ADF al poseer actividad antioxidante actúan como compuestos químicos intermediarios benéficos para la salud ya que poseen propiedades anticancerígenas y anti-inflamatorias, pues son generalmente no genotóxicos presentando efectos de inhibición en mutagénesis, carcinogénesis, actúan como antitumorales, antimicóticos, inhiben la nitrosación de aminas por reducción de nitrito a óxido nítrico, bloqueando la hepatotoxicidad, actúan juntos con otros compuestos fenólicos como compuestos antioxidantes por su acción de reacción con radicales libres **(26)**, lo cual implica un mayor beneficio contra el cáncer, arterosclerosis y cataratas.

4.3.3 Fuentes de obtención de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

Los ADF al ser parte de la familia de los ácidos fenólicos, se encuentran en la cáscara, tallos y raíces de las plantas, frutas y cereales principalmente. Los cereales que contienen ADF en mayores cantidades son: maíz, trigo, arroz, avena, centeno, cebada, sorgo y mijo del país. También se han identificado mayoritariamente los ADF en sorgo de África Key Yahume y Watiche, en trigo de Alemania y arroz de India y África principalmente **(10)**.

Altas cantidades de enlaces éster y éter de ADF son estimados en mijo seguidos por el maíz. El contenido de ADF en trigo, centeno y cebada es cerca de dos a tres veces menos que en el mijo pero dos veces más que en la avena y arroz **(52)**. Se han identificado en la fibra dietética insoluble de éstos cereales la presencia predominante de los ácidos dehidrodiferúlicos 8-O-4', 8-5', 5-5' y 8-8', en su forma esterificada y más del 60% del total de enlaces de los ADF son enlaces éter.

Los ADF junto con otros ac. hidroxicinámicos (ácido clorogénico y ácido caféico) se han encontrado en la pared celular de varias hortalizas, vegetales, frutas y cereales como son las espinacas, castañas chinas, zanahorias, pinos, frambuesas, fresas, peras, uvas, manzanas en un 0.1%, moras en un 0.2 %, ciruela pasa con un 0.19 %, en cáscara de papa en 1%, pulpa de café y plantas medicinales chinas como "*Angelica sinensis*" **(29)**.

Algunas investigaciones reportan que las cantidades relativas de los ADF varían en diferentes tejidos y partes de las plantas **(52)**, observando que en la azúcar de remolacha contiene 1.7 g/Kg aproximadamente y por el grado de enlaces cruzados de AF y ADF es mucho mayor la presencia en raíces que en la espiga con un 3-8 % y siendo mayor todavía en el fermento de 4% a 15% (AF + ADF), en las hojas el más abundante es el 8-8' ADF, mientras que el 8-O-4' ADF es el más abundante en el resto de la planta, también están presentes el 5-5' ADF y 8-5' ADF.

Los ADF se encuentran en cantidades significativas en derivados agroindustriales de bajo costo y disponibilidad como por ejemplo el bagazo de la caña, la pulpa del café, las cascarillas de trigo y arroz y en el nejayote del maíz, que es un subproducto del proceso de nixtamalización del grano.

4.3.4 Métodos de análisis de obtención de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

La extracción y el aislamiento de los ADF se ha investigado y en 1995 se notó que microsomas preparados del maíz son capaces de acoplar grupos ferúlicos por un mecanismo oxidativo, indicando que los ácidos hidroxicinámicos podrían ser adicionados a polisacáridos y enlaces cruzados en el sistema principal de endomembrana exportado a la pared celular. Investigaciones han mostrado lo contrario, ya que los ácidos dehidrodiferúlicos extraíbles de microsomas (preparados de suspensión de células de maíz) son derivados de la ruptura de polímeros de la pared celular, posterior a la creciente dimerización oxidativa en la pared celular y síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi, antes de exportar los ácidos hidroxicinámicos.

El aislamiento de ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) se ha reportado en el bambú a través de una hidrólisis enzimática entre los compuestos ADF y carbohidratos enlazados, obteniéndose el 5-5 ADF sacárido. En el maíz mediante una hidrólisis ácida y alcalina del pericarpio del grano, se han obtenido unidades de sacáridos y aislado también el 5-5 ADF sacárido. A partir de raíces de caña de azúcar se pueden extraer pectinas usando ácido caliente diluido, éstas pectinas incrementan la viscosidad cuando se trata con agentes oxidativos tales como peroxidasa, peróxido de hidrogeno o persulfato de amonio, formando geles bajo ciertas condiciones.

Se han aislado oligosacáridos de Gramináceas con una mezcla de enzimas hidrolizando polisacáridos, utilizando por ejemplo la hidrolasa Driselase **(31)**. Uno de los oligómeros mayores incluye: 3-O-(5-O transferuloil- α -L-arabinofuranosil) D-xilosa.

Debido al arreglo molecular que presentan los ADF en las paredes celulares de las plantas, se lleva a cabo su extracción principalmente por medio de tres tipos de hidrólisis de los enlaces ésteres: ácida, alcalina y/o enzimática (por hidrolasas) para la primer separación de la lignina de los polisacáridos, seguida de la separación del ácido ferúlico de los compuestos ADF.

En la hidrólisis alcalina ó ácida, se somete el grano del cereal con una sustancia básica ó ácida según sea el caso, agitando la mezcla del grano para remover el pericarpio del cereal, esto con el fin de separar la cáscara del grano, éste se filtra y se obtienen aguas residuales, las cuales se acidifican para extraer con un adsorbente adecuado el AF y los ADF, recolectando y evaporando el disolvente para obtener dichos compuestos **(39)**. El rendimiento de éstas técnicas es de 37 a 416 µg /g, del ácido ferúlico, separando la mezcla de ADF.

En el caso de **hidrolisis enzimática**, se adiciona al grano una suspensión enzimática, la cual se incuba y se centrifuga, esto con la finalidad de romper los enlaces cruzados entre los compuestos presentes en el cereal, para después separar, extraer y concentrar los ADF y AF; cabe mencionar que el rendimiento de esta técnica es de 37 a 416 µg /g, del ácido ferúlico y separándolo la mezcla de ADF **(18)**.

Los ADF se han estudiado y analizado en sus diferentes formas isoméricas, los cuales han sido extraídos por hidrólisis alcalina y ácida principalmente, analizados y cuantificados por cromatografía de gases (CG), espectrometría de masas y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4.3.5 Aplicación de los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF)

Algunas investigaciones afirman que los ADF presentan mayor potencial como antioxidante de los alimentos por su conformación y estructura química **(15)** utilizándose como fotoprotectores del cuerpo de radicales libres y especies reactivas del oxígeno.

En la industria de los alimentos los ADF glicosidados se pueden utilizar para la formación de geles, debido a sus propiedades de gelación inducido por enlaces cruzados **(31)**. El ácido ferúlico así como los ADF son utilizados en suplementos alimenticios, tales como los complejos vitamínicos y productos naturistas, presentando propiedades nutrimentales con gran aplicación botánica en la industria alimenticia.

Los esteres y ADF del ácido ferúlico previene enfermedades como: cáncer y envejecimiento, por lo que se utilizan como compuestos antioxidantes en una gran cantidad en suplementos alimenticios, complejos vitamínicos y productos naturistas **(32)**.

4.3.6 Clasificación de los ácidos dehidrodiferúlicos ADF

Los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) se pueden clasificar en dos grandes grupos:

Los ácidos dehidrodiferúlicos “libres” que son aquellos que no están ligados a otros compuestos polisacáridos en las plantas, cereales y frutas.

Los ácidos dehidrodiferúlicos glicosidados, son aquellos ADF que se encuentran ligados a polisacáridos u otros compuestos, como ejemplo están los arabinoxilanos que contienen un enlace β -1, 4-xilanopiranosil sustituido con residuo α -L-arabinofuranosil, enlazado a C-3 ó C-2 de la unidad xilosil. La separación del oligosacárido de la pared celular de las gramíneas muestra que el ácido ferúlico es atacado en el C-5 del grupo hidroxilo de algunos residuos de arabinoxilanos.

El aislamiento de estos oligosacáridos feruloilados han mostrado un mejor conocimiento de la estructura de la pared celular de las plantas. Evidencia de los enlaces cruzados de polisacáridos vía dehidrodiferulatos son aislados e identificados por fragmentos de sacáridos feruloilatos **(31)**. La feruloilación de polisacáridos ocurre intracelularmente en la membrana del aparato de Golgi donde es sintetizada la pared de polisacáridos. El ácido ferúlico se acopla en una variedad de dímeros sugiriendo que los entrecruzamientos de las cadenas laterales de arabinos y/o arabinogalactanos ocurre en la pared celular **(52)**.

4.4 EI MAIZ

El maíz es una planta originaria de América que se extendió por todo el mundo, es uno de los granos más importantes a nivel mundial. Desde el punto de vista alimentario, económico y social es el cultivo y alimento básico más importante de México, ya que es y forma parte de la alimentación, cultura y cosmovisión de la zona Mesoamericana, ocupando en el periodo de 1996 al 2006 el 51 % de la superficie sembrada y cosechada en promedio anual, en el territorio nacional.

4.4.1 Características del maíz

El maíz pertenece a la familia Poaceae o de las gramíneas (plantas herbáceas, raramente leñosas y que integra a la mayoría de los granos de consumo humano y animal); el género *Zea* (que pertenece a la familia Poaceae) comprende a cinco especies de México y Centroamérica, las cuales son *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* y *Zea mays L.*

La especie *Zea mays*, a su vez, agrupa cuatro subespecies: *Zea mays L. ssp. Huehuetenangensis*, distribuida principalmente en las zonas altas de Guatemala; *Zea mays L. ssp. Mexicana*, que se ubica principalmente en la zona centro de México; *Zea mays L. ssp. Parviglumis*, ubicada en la Cuenca del Balsas y la Sierra Madre del Sur, distribuida desde Oaxaca hasta Nayarit.

Finalmente la *Zea mays L. ssp. mays*, es el maíz que se cultiva y que se ubica en todo el territorio nacional **(5)**, éste maíz cultivado consiste de una sola especie y subespecie botánica, cercanamente emparentada con varias especies de maíces silvestres llamadas teocintles. La variación dentro de la subespecie cultivada se describe sin recurrir a la clasificación botánica formal. Se distinguen dos niveles principalmente. Las razas abarcan muchas formas locales y se distinguen por características morfológicas (como puede ser número de hileras y forma de la mazorca), agronómicas (como longitud del ciclo) y ecológicas (ambiente en el que se desarrollan), pero todavía existe mucha variación dentro de cada una de ellas (tipo y color del grano, adaptaciones a diferentes condiciones agronómicas).

Dentro de las razas existen las variedades cultivadas (o cultivares) que pueden ser de origen tradicional o de mejoramiento científico. La mayoría de los cultivares tradicionales se pueden asignar a alguna de las razas, aunque también existen cultivares de origen híbrido entre razas. Por ejemplo dentro de la raza del maíz piramidal se reconocen variantes de color blanco, amarillo, negro, rojo, así como de grano-arrocillo, que es más duro y cacahuancintle, que tiene granos harinosos, así como algunas variantes agronómicas.

Aproximadamente el 90% de la producción mundial de maíz se muele y se utiliza como pienso, además los tallos y hojas se emplean como forraje para el ganado vacuno, sobre un 7% se destina a la fabricación de almidón, semolina, jarabe, harina de maíz, alcohol, copos de maíz para desayunos y aceite de maíz, el 3% restante es el maíz dulce que es consumido por las personas como hortaliza. El 68% de maíz en México producido internamente se utiliza para consumo humano, siendo a su vez, el segundo país en consumo anual per cápita de este cereal después de Malawi.

En el país existen siete tipos de industrias que utilizan el maíz para las tortillas, molienda de nixtamal, fabricación de harina de maíz, almidones, féculas, levaduras y productos similares, frituras de maíz, hojuelas de maíz y para alimentos balanceados.

4.4.2 Variedades de granos de maíz

En el territorio nacional se podrían hacer dos grandes distinciones de variedades cultivadas de grano: en primer lugar los maíces “nativos” cultivados y usados por campesinos de manera tradicional, ya sea para el autoconsumo, la venta en los mercados o para el uso ceremonial, éstos maíces son mejorados por los propios campesinos mediante la selección cuidadosa, cruza de especies o de manera natural gracias a la evolución.

En segundo lugar los maíces “híbridos” que son variedades de semillas cultivadas en las grandes plantaciones maiceras, son de una semilla mejorada por instituciones públicas o empresas privadas que adaptan el suelo al que se va a plantar por lo que es más resistente al clima y algunas plagas, el cual es demasiado costoso para la mayor parte del país. En ambos métodos de cultivo, México cuenta con una gran variedad de cultivares, sobre todo criollos, cada una tiene su relevancia y particularidad.

El maíz criollo o nativo presenta ventajas como adaptabilidad a diversas condiciones ambientales y agronómicas que existen en la agricultura tradicional; aplicaciones diversas como forraje, en el sector industrial, en la gastronomía; en el rendimiento son superiores al de otros maíces, soportan sequías, temperaturas extremas, plagas y ciertas enfermedades, y el mejoramiento continuo, al seguir evolucionando aumentando su resistencia a factores diversos como plagas y rendimiento.

El maíz comercial se clasifica por las características de sus granos. Los tipos más importantes son duros, dentados, reventones, dulces, harinosos, cerosos y tunicados.

Maíz Duro: los granos de este maíz son redondos, duros y suaves al tacto. El maíz duro germina particularmente en suelos húmedos y fríos, es por lo general de madurez temprana y se seca más rápido una vez que haya alcanzado la madurez fisiológica. Está menos sujeto a daño de insectos y mohos en el campo y almacenamiento. Los maíces duros rinden por lo general menos que los maíces dentados, éstos son utilizados para alimento humano y para hacer fécula de maíz y gran parte de éstos maíces son cosechadas para ser consumidos como elotes o como alimento animal.

Maíz Dentado: es el grano de maíz más cultivado para consumo y ensilaje, ya que los granos son de color blanco o amarillos. Este maíz es de mayor rendimiento que otros maíces pero es más susceptible a hongos e insectos en el campo y en almacenamiento. Demora en secar en comparación con los maíces duros.

Maíz Harinoso: este maíz está compuesto casi exclusivamente de un almidón muy blando, que se cosecha pronto, aun cuando el grano no esté maduro. El maíz harinoso es predominante en las zonas altas de la región andina y de algunas partes de México. Las razas de estos maíces presentan una gran variedad de colores. Estos granos presentan almidón blando, por lo que el endospermo es altamente susceptible a la pudrición, gusanos e insectos.

Maíz Ceroso: estos maíces son cultivados en áreas muy limitadas, su nombre se debe a que su endospermo tiene un aspecto opaco y ceroso. Este maíz es cultivado solo para fines específicos y en algunas partes de Asia oriental es usado para hacer comidas típicas y para asar las mazorcas con los granos en estado de masa. El maíz ceroso obtiene buenos precios en algunos mercados industriales, es especial para obtener un almidón similar a la tapioca.

Maíz Dulce: este tipo de maíz se cultiva principalmente para consumir elotes ya sea hervidos o asados. Los granos tienen un alto contenido de azúcar, siendo de sabor dulce, ya que en el momento de la cosecha el grano tiene cerca de 70 % de humedad y no ha comenzado el proceso de endurecimiento. Los granos de maíz son susceptibles a plagas y son comparativamente de menor rendimiento que los maíces duros o dentados.

Maíz Reventón: es una forma de maíz duro con endospermo rígido que ocupa la mayor parte del grano y una pequeña cantidad de almidón blando en la parte asal del mismo. Cuando el grano se calienta, revienta y el endospermo sale.

Maíz tunicado: Es un tipo de maíz muy raro que se distingue por tener sus granos envueltos en una especie de hojas (brácteas), es considerado como una forma antigua del maíz y es cultivado para fines ceremoniales.

Maíz Baby: antes de la polinización, las mazorcas jóvenes son cosechadas y utilizadas como una hortaliza, consumidas frescas o envasadas. Estos granos tienen un buen potencial como alimento para el ganado.

Maíz con Proteínas de Calidad (MPC): este tipo de maíz tiene un gen mutante recesivo 02 que contiene cerca del doble de dos aminoácidos esenciales, lisina y triptófano, en su endospermo. Esto mejora sensiblemente la calidad de las proteínas del maíz, no variando la cantidad presente.

Económicamente los tipos más importantes de maíz cultivados para grano en forraje o ensilaje son las categorías: duro, dentado y harinoso. Los tipos de maíz de menor importancia comparativa son aquellos usados como alimento o forraje especial, pero con un significativo valor económico agregado como son: maíz reventón, maíz dulce y algunos tipos de maíz ceroso.

El maíz más utilizado para la elaboración de tortillas, tamales y subproductos es el maíz dentado y duro, los cuales pueden ser blancos y amarillos, seguido de los demás tipos de maíces, excepto el maíz palomero.

4.4.3 Estructura y Composición del maíz

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la adsorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina. Esta estructura puede contener de 300 a 1000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca.

El grano de maíz se denomina en botánica cariósipide o cariopsis, cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla como se observa en la **fig. 13**, también se muestra las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara o salvado, el endospermo, el germen o embrión; y la piloriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo).

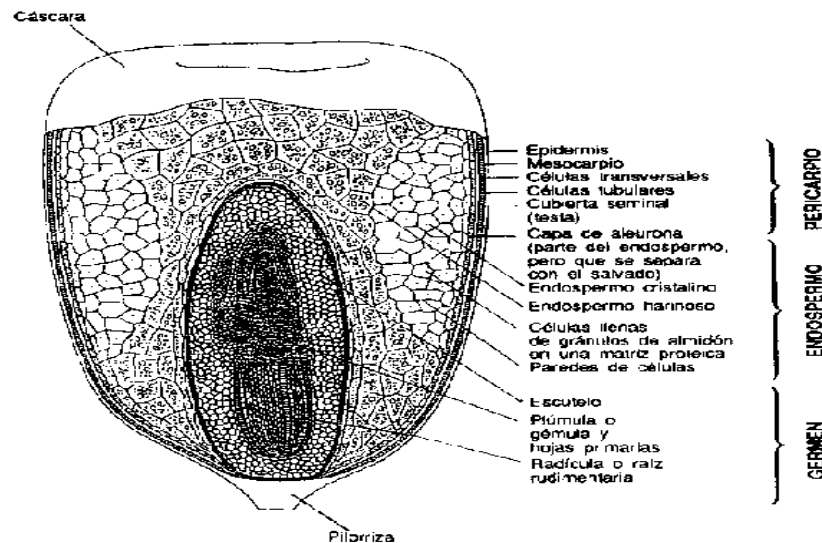


Figura 13. Morfología del grano de maíz

La cubierta seminal o pericarpio, es la estructura externa del grano de maíz y está compuesto principalmente de hemicelulosa 67%, celulosa 23% y lignina 0.1%, ésta le confiere dureza al grano y propiedades semipermeables **(2)** se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87 %.

El endospermo contiene un nivel elevado de almidón 87%, aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas totales. El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas totales 33% por término medio, contiene también un nivel de proteínas próximo al 20% y minerales. La capa de aleurona contiene una cantidad elevada de proteínas aproximadamente el 19% de fibra cruda.

La distribución principal de las distintas partes del grano son:

El endospermo corresponde a la parte de mayor tamaño con un 83% de peso del grano, en tanto que el germen equivale por término medio al 11% y el pericarpio al 5%. El resto está constituido por la piloriza, estructura cónica que junto con el pedicelo une el grano a la espiga **(22)**, ver **tabla 1**.

Estructura	% de distribución Ponderal
Pericarpio	5 - 6
Aleurona	2 - 3
Endospermo	80 - 85
Germen	10 - 12

Salvado. Es un subproducto obtenido del procesamiento de cereales por vía seca, luego de tamizar la harina producto de la molienda. El salvado corresponde a las capas externas del grano ó pericarpio, con sus tres subcapas: epicarpio, metacarpio y endocarpio (ricas en fibras y minerales), la testa (rica en vitaminas y enzimas) y la capa de aleurona (rica en proteínas y grasas).

4.4.4 Compuestos bioactivos en el maíz

Con base a la composición del maíz, la fibra dietética es el componente químico que se halla en cantidades mayores en el salvado. Los hidratos de carbono complejos del grano de maíz se encuentran en el pericarpio y la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y en menor medida en las del germen.

Algunos estudios que se han realizado sobre el maíz y la resistencia de algunas poblaciones ante plagas está en relación a la concentración de los ácidos fenólicos en el pericarpio, encontrándose ADF y AF en mayor cantidad en los maíces que no son tan susceptibles a las plagas, existiendo una estrecha relación de éstos compuestos con la resistencia ante plagas. **(39)**.

El extracto de maíz morado es rico en antocianinas y en compuestos bioactivos tipo fenol, las antocianinas se utilizan como colorantes aprobados en Japón y en la lista "Existing Food Additives List", usadas para bebidas, jaleas y dulces, también las antocianinas presentan actividades biológicas como antioxidante, anti-mutagénica, anti-diabético y actividades anti-cancerígenas.

El contenido vitamínico del maíz, depende de factores intrínsecos (especie y variedad) y extrínsecos (tipo de suelos y procesado de la materia prima). Las vitaminas hidrosolubles se encuentran fundamentalmente en la capa de aleurona y en menor medida en el germen y en el endospermo. El salvado es rico en vitaminas del grupo B y su importancia radica en la transformación de grasas, proteínas e hidratos de carbono en energía vital. Entre las vitaminas que contiene son: Vitamina B1 Tiamina o aneurina, vitamina B2 Riboflavina, Lactoflavina u Ovoflavina, Niacina nicotinamida o vitamina PP y Ácido fólico.

El maíz también contiene minerales esenciales, la concentración de cenizas es aproximadamente del 1.3%. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio de 11%, por lo que el salvado de maíz contiene una baja cantidad de minerales, sin embargo se puede encontrar algunos de ellos como son el Fosforo, Magnesio, Potasio y Calcio **(22)**.

El contenido de proteínas puede oscilar entre el 8 y 11% del peso del grano, en su mayor parte se encuentran en el endospermo, encontrándose un 35 % aproximadamente en el salvado.

4.4.5 ADF presentes en el maíz

Los ADF presentes en el pericarpio del maíz, pertenecen al grupo de Gramináceas monocotiledóneas y se presentan esterificados en carbono 5 del grupo hidroxilo de algunos residuos de arabinosas **(18)**.

Existen genotipos de maíz con antecedentes genéticos que exhiben altos niveles de ADF y por consecuencia altos niveles de resistencia a plagas, insectos y estabilidad en la planta **(11)**. Los principales genotipos de maíz con mayor cantidad de ac. ferúlico y ADF, son los maíces: Sinaloa 35 de México, maíz Yucatán 7, Maíz 87535, que pertenecen a los maíces de tipo duro, dentado y duro respectivamente.

En el maíz, el ácido ferúlico es uno de los principales compuestos polifenólicos, éste puede encontrarse en forma de dímeros o ácidos dehidrodiferúlicos (ADF), ésteres o dímeros esterificados y su contenido de ácidos ferúlico trans y cis (Z), es significativamente diferente entre genotipos de maíz. Con base a algunos estudios, el ácido ferúlico (E) es la especie predominante de la pared celular en la mayoría de los genotipos de maíz, el estereoisómero (Z) constituye menos del 10 % del AF total.

La cantidad total de ADF presentes en el maíz puede variar desde 0.2% a 0.6% de ADF y de 2.0% a 6.0% de ácido ferúlico. Se sabe que la cantidad de ADF+AF es mayor que el ácido p-cumárico en diferentes tipos de maíz y depende del método utilizado de extracción, separación y cuantificación de éstos compuestos **(10)**. También se ha reportado que el contenido de ADF totales en el maíz es de 2.5 g/Kg de cereal.

Las fuentes estudiadas reportan la extracción de ADF a partir del maíz por su mayor contenido de éstos compuestos **(32)**. En la pared celular del maíz existe cerca del 45% de ADF acoplados por enlaces 8-5, mientras que el 8-O-4', 8-8' y 5-5' de ADF se encuentran acoplados en un 10-25 % del total de ADF, esto puede variar dependiendo del tipo de maíz y condiciones geográficas.

En la pared celular del maíz los ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) más abundantes encontrados son: **8-O-4' ADF** [(Z)-β-{4-[(E)-2-carboxivinil]-2-metoxifenoxi}-4-hidroxi-3-ácido metoxicinnámico], le sigue **8-5'** [trans-5-[(E)-2-carboxivinil]-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-2-3-dihidrobenzofurano-3-ácido carboxílico], **5-5' ADF** [(E, E) -4-4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi -3,3'-ácido bicinnámico], **8,5' ADF** [(E, E) -4-4'-dihidroxi-3,5'-dimetoxi-β,3'-ácido bicinnámico] y por último **8-8'** [trans-7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metoxi-1,2-dihidronaftaleno-2,3-ácido dicarboxílico], después del ácido ferúlico **(15)**, le siguen los ADF glicosidados que se encuentran unidos con oligosacáridos.

4.4.6 Proceso de nixtamalización del maíz

La Nixtamalización es un proceso artesanal, herencia de las culturas mesoamericanas, que se lleva a cabo mediante un proceso térmico alcalino del maíz para poder hacerlo masa y preparar alimentos como tortillas, atole y tamales principalmente. La palabra Nixtamalización deriva de la palabra Nixtamal del náhuatl cuyo significado es “*nextli*” que significa cenizas de cal y “*tamalli*” que significa masa de maíz. En el sentido químico la nixtamalización es gelatinizar parcialmente el almidón, hidrolizar parcialmente la hemicelulosa del pericarpio y liberar la niacina **(64)**.

La finalidad de la nixtamalización es cocer el grano para ablandarlo e hincharlo y así facilitar su molienda. El proceso general de nixtamalización consiste en mezclar el grano de maíz con el doble del equivalente de su peso en agua y agregar cal en una concentración del 1-2% con respecto al peso del maíz, la mezcla se cocina a 80° C de 20 a 45 minutos, se deja reposar hasta el día siguiente (12-18 horas). Al finalizar el pericarpio está parcialmente separado y el endospermo hinchado, la mezcla se filtra y al grano de maíz se le hacen varios lavados para eliminar totalmente el pericarpio del cereal, obteniendo así el agua residual conocida como “nejayote” y los granos de maíz con cal conocido como “nixtamal” el cual se muele para producir masa (34).

Se ha observado que las condiciones del procesamiento para obtener “nixtamal”, varían dependiendo de la producción, de la forma de consumo, de los hábitos regionales, del molino y de la variedad del grano (25). Ver **fig.14**.



Fig. 14 Ejemplo del proceso de nixtamalización del maíz

Durante la cocción del maíz, la cantidad de almidón que se gelifica es relativamente pequeña. La temperatura es suficientemente alta, pero la cantidad de agua es limitada. El grano de maíz es muy duro y denso, por esto es necesario un periodo de tiempo bastante largo para que el centro del grano llegue a empaparse de agua por lo que el tiempo de cocción puede variar según el tipo de maíz y está relacionado aparentemente con la velocidad de penetración del agua, ya que es necesario que todo el grano se hidrate por igual. El hidróxido de calcio se añade principalmente para suavizar el pericarpio del maíz. El pericarpio y el agua de cocción que se genera después de la cocción y los lavados del grano se eliminan para obtener sólo el maíz limpio.

El proceso de nixtamalización es responsable de la obtención de una variedad de subproductos a partir de la masa del grano, aportando importantes características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales a éstos subproductos, originando además, el retiro del pericarpio debido a la incorporación del calcio dentro del núcleo, mejorando la biodisponibilidad de niacina y la formación de compuestos de sabor y color que imparten características organolépticas típicas de los productos finales **(3)**. Además de que se puede recuperar a partir del agua residual “nejayote” compuestos fenólicos como el AF y ADF.

La industria de la molienda húmeda tiene exigencias de calidad diferentes a los de la molienda seca, inclinándose por los tipos de maíz dentado, ya que exigen menor tiempo de maceración. En el proceso de extracción se requieren maíces con elevado contenido de almidón, proteína o aceite. **(6)**. La calidad tecnológica de un grano varía según el destino de la producción, y está relacionada con la técnica de transformación y los procesos de fabricación industrial.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Materia prima:

Nejayote de maíz criollo amarillo recolectado de un molino ubicado en la zona Sur de la zona metropolitana del D.F.

Tres diferentes maíces de las regiones: Guanajuato, Jalisco y Estado de México.

5.2 Material y Equipo:

▪ Disolventes y Reactivos:

Estándares: ácido ferúlico (Ec.No.214-490-0), ácido cumárico, ácido gálico (Aldrich Chemical Company), sulfato cérico DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) (SIGMA-CHEM), indicador fluorescente.

Reactivos: HCl concentrado, metanol grado HPLC, acetato de etilo, ácido acético glacial, cloroformo, hexano, diclorometano, acetona (J.T.Baker), agua grado HPLC, Ca(OH)₂ sólido, Na₂CO₃ al 2%, solución Folin-Ciocalteau.

Carbón activado, Amberlita XDA7 (SIGMA), Polivinilpirrolidona (ALDRICH), placas cromatográficas Macherey-Nagel de sílica gel 60, con dimensiones de 20 cm x 20 cm y 2 .0 mm de espesor y de 0.2 mm de espesor.

▪ Equipos:

Rotavapor Buchi Heating Bath B-490

Espectrofotómetro CARY 50Bio, UV-Visible

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) serie 250, con bomba isocrática LC 250 y un loop de 20µL, depósito de columna Perkin-Elmer LC Oven 101, con detector programable UV a 330 nm, Waters 2487, con integrador personal modelo 10205.

Columna C-18 Prodigy 50 DS, dimensiones: 250 x 4.60 mm y 5 micrones.

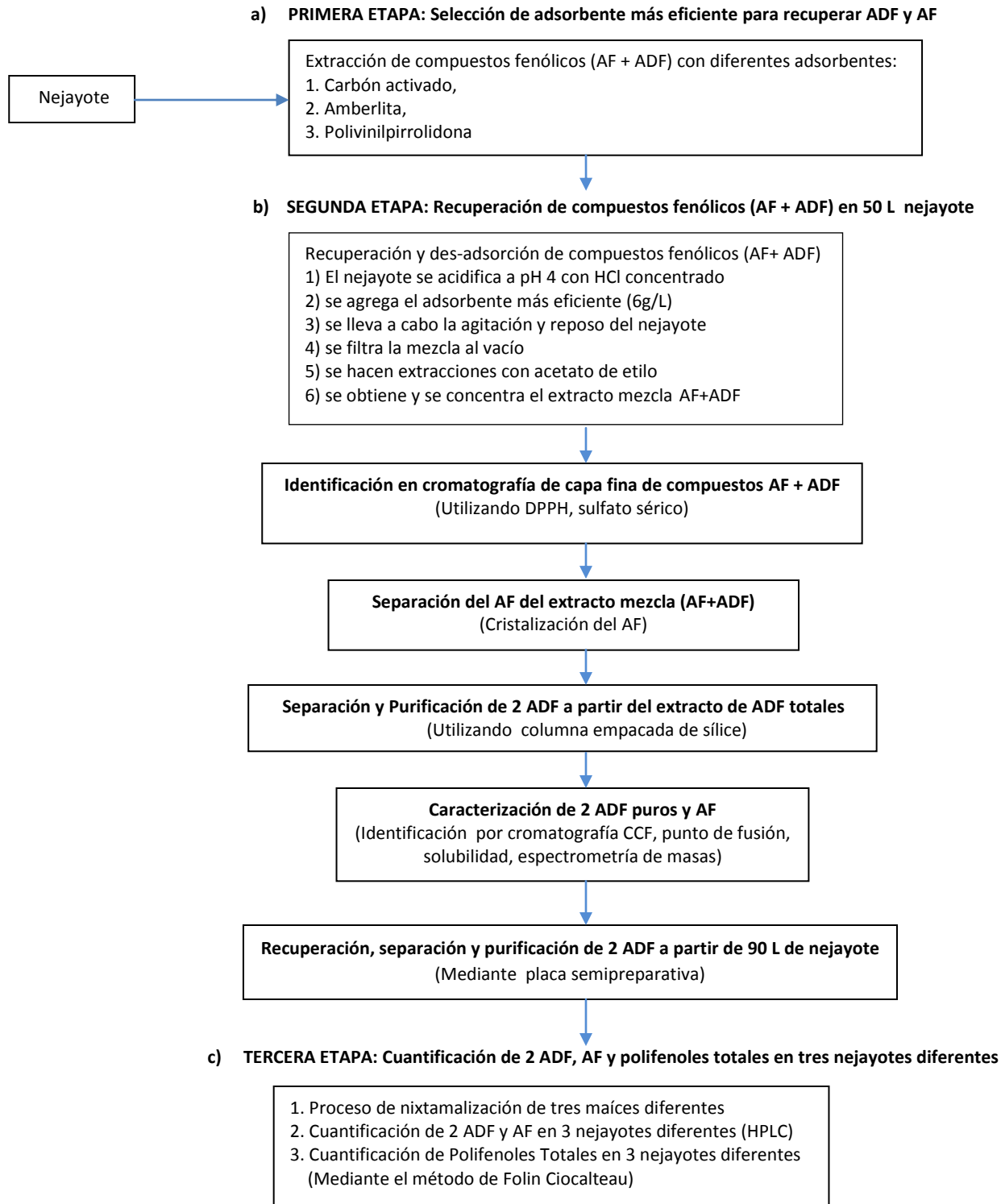
Filtro Millipore para soluciones en HPLC, con membrana de 0.45 micras de acetato de celulosa

Sonicador Brasonic Ultrasónico Cleaners Modelo 2210

5.3 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

Se llevan a cabo tres importantes etapas:

- a) Selección del adsorbente para la recuperación de los compuestos fenólicos (ADF y AF)
- b) Recuperación de los compuestos ADF y AF a partir de 50 L de nejayote para la separación, purificación y caracterización de 2 ADF, para después recuperar y purificar 2 ADF a partir de 90 L de nejayote
- c) Cuantificación de 2 ADF, AF y polifenoles totales en tres diferentes nejayotes.



5.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.4.1 Primera etapa. Selección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF a partir de nejayote de maiz

5.4.1.1 Pruebas con diferentes adsorbentes para la recuperación más eficiente de compuestos ADF y AF

A partir de un mismo tipo de nejayote de maiz recolectado de un molino comercial ubicado en la zona Sur de la Ciudad de México, se llevaron a cabo pruebas de recuperación de los compuestos fenólicos ADF y AF utilizando 3 diferentes adsorbentes, para conocer el adsorbente más eficiente de recuperación de éstos compuestos.

Se utilizó un litro de nejayote por cada adsorbente diferente, bajo las mismas condiciones controladas de recuperación. Los adsorbentes probados fueron: Carbón activado, Amberlita y Polivinilpirrolidona, llevándose a cabo las pruebas de recuperación por triplicado para cada uno de ellos, mediante el siguiente procedimiento:

Cada litro de nejayote se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta tener un pH final de 4 y se filtró a través de un equipo al vacío, colocando en el embudo Buchner un papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste, haciendo pasar el nejayote para eliminar la cascarilla presente. A cada litro de nejayote se le agregó un adsorbente diferente utilizando la misma proporción: 6 gramos de adsorbente/L de nejayote, mezclando y agitando durante 15 minutos, dejando reposar la mezcla durante 3 horas. La mezcla nejayote-adsorbente se hizo pasar por un equipo de filtrado al vacío colocando papel filtro, dejando secar el adsorbente en el papel, una vez seco, se llevó a cabo 5 veces la recuperación ó des-adsorción de los compuestos fenólicos (entre ellos ADF y AF) que se adsorbieron en el adsorbente, utilizando acetato de etilo (proporción 3:1). Finalmente se concentró la fase orgánica obtenida a través de un rotavapor Buchi Heating Bath B-490 con una temperatura de baño de 60° C a 130 rpm obteniendo un extracto rico en compuestos fenólicos, ADF y AF.

Se llevó a cabo la selección del adsorbente más eficiente para la recuperación de los compuestos fenólicos (ADF y AF) con base a la mayor cantidad de extracto recuperado ó mayor rendimiento recuperado, obteniendo un promedio de recuperación por cada adsorbente, llevándose a cabo una desviación estándar que nos indicó la variabilidad de resultados por adsorbente.

5.4.2 Segunda etapa. Recuperación de los compuestos ADF y AF a partir de nejayote de maíz a partir de 50 L de nejayote

5.4.2.1 Recuperación y des-adsorción de los compuestos ADF y AF a partir del nejayote de maíz

Una vez identificado el adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos fenólicos: ADF y AF, se llevó a cabo la recuperación de éstos compuestos, a partir de 50 litros del mismo tipo de nejayote de maíz obtenido del mismo molino, ubicado en la zona sur de la Ciudad de México, llevando a cabo el siguiente procedimiento bajo las mismas condiciones controladas:

El nejayote de maíz se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta tener un pH final de 4 (aproximadamente 6 ml de HCl/L nejayote). Se filtró al vacío a través de un equipo Buchner, colocando papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste, haciendo pasar el nejayote para eliminar la cascarilla presente. Se mezcló y agitó con el adsorbente (6 g adsorbente /1L de nejayote) durante 15 minutos, se dejó reposar toda una noche, después se filtró y se dejó secar el adsorbente. Una vez seco el adsorbente, se llevó a cabo 6 veces la recuperación de los compuestos fenólicos: ADF y AF con acetato de etilo (3:1) para finalmente concentrar la fase orgánica obtenida a través del rotavapor, a una temperatura de baño de 60°C a 130 rpm obteniendo el extracto rico de compuestos fenólicos como ADF y AF.

5.4.2.2 Identificación de 2 ADF y AF mediante Cromatografía de capa fina

El extracto obtenido se pesó y se tomó una mínima cantidad de éste para la identificación de ADF y AF en cromatografía de capa fina, llevando a cabo varias pruebas con diferentes disolventes para su mejor elusión en C.C.F. Las placas cromatográficas se aspersaron con DPPH (2,2-difenil picrilhidrazil) y/o sulfato cérico, para hacer visible la presencia de todos los compuestos presentes como son el AF y ADF totales.

5.4.2.3 Separación del AF de los ADF

Para la separación de los compuestos ADF del AF, se llevó a cabo la cristalización del ácido ferúlico, tomando en cuenta la solubilidad que presenta el AF con el agua, en donde se agregó al extracto obtenido, una cantidad necesaria de agua caliente (aprox. 5 ml/0.5g). Una vez disuelto el extracto en el agua, se continúa calentando lentamente hasta la evaporación del agua (no sobrepasando los 40°C) agregando paulatinamente unas gotas de acetona hasta evaporar la mitad

de volumen de agua, agitando lentamente observando la formación de cristales al irse enfriando y agitando. Se dejó reposar 24 horas el extracto con cristales, para posteriormente separar los cristales del ácido ferúlico. Se llevó a cabo 3 veces la cristalización del AF a partir del mismo extracto, para obtener una mezcla enriquecida de compuestos ADF totales con una mínima cantidad de trazas de AF. Se pesó la cantidad total de cristales de AF obtenidos y el extracto de ADF.

5.4.2.4 Separación de 2 ADF más abundantes utilizando una Columna empacada de sílice

Del extracto obtenido de mezcla de ADF totales se identifican y se separan 2 ADF más abundantes con ayuda de cromatografía en columna (utilizando una fase fija y una fase móvil). Primero se llevaron a cabo pruebas con diferentes eluyentes para la elección de la fase móvil a utilizar en la columna de separación. Se preparó la columna cromatográfica empacada de sílice 60, utilizando una proporción de 10 g gel de sílice por cada 0.5 g de extracto rico de ADF que a su vez, se homogenizó con una mínima cantidad de celita para colocarlo en la columna. Con ayuda de la cromatografía de capa fina C.C.F. se identificó la separación de compuestos con los diferentes eluyentes utilizados en la columna.

Una vez identificada la mezcla de elusión más efectiva para la separación de los compuestos ADF en la columna empacada de sílice, se pesó 3 g de extracto de ADF mezclando con celita y se colocó en una columna de sílice previamente limpia. Se llevó a cabo la elusión con la fase móvil elegida, obteniendo más de 20 fracciones de separación con un volumen de 150 ml cada una.

Cada fracción fue colectada en el rotavapor a una temperatura del baño de 60°C y 130 rpm, eliminando los diluyentes, para identificar por cromatografía en capa fina (C.C.F.) las fracciones que contienen compuestos similares (ADF). Se obtuvieron 7 fracciones representativas con compuestos similares que fueron pesadas.

A partir de éstas fracciones se identificó la presencia de 2 compuestos ADF más abundantes observados en C.C.F., tomando tres fracciones con la presencia de éstos compuestos similares. Se concentró cada fracción y se pesó 0.2 de muestra para colocarla en la columna de sílice, para separar y obtener los dos ADF más abundantes y AF presente en el nejayote de maíz.

5.4.2.5 Identificación y Caracterización de 2 ADF obtenidos

Una vez obtenido las muestras puras de 2 ADF más abundantes, se pesaron e identificaron cada ADF, determinando el punto de fusión, solubilidad, cromatografía de capa fina (C.C.F.) y espectrometría de masas, comparando los resultados de análisis con lo que indica la literatura de los compuestos ADF para su caracterización (7).

5.4.2.6 Recuperación de 2 ADF a partir de 90 L de nejayote (gran escala)

Se llevó a cabo la recuperación de ADF y AF a gran escala a partir de 90 litros de nejayote obtenido de un molino ubicado en la zona sur de la ciudad de México. Se llevó a cabo el mismo procedimiento antes citado, bajo las mismas condiciones de recuperación y obtención de 2 ADF más abundantes, cambiando sólo la etapa de purificación de los 2 ADF más abundantes mediante cromatografía de placa semipreparativa.

El procedimiento fue el siguiente: se acidificó el nejayote con ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta tener un pH final de 4 (aproximadamente 6ml ácido/L nejayote), se filtró los 90 litros de nejayote con una malla de algodón para eliminar la cascarilla presente y se le agregó el adsorbente más eficiente (6g /L nejayote), mezclando y agitando durante 30 minutos dejando reposar toda una noche. Se filtró por decantación y al vacío para recuperar sólo el adsorbente.

Una vez seco el adsorbente se llevó a cabo 8 veces la recuperación ó des-adsorción de los compuestos presentes (ADF y AF) con acetato de etilo, en una proporción adsorbente/disolvente (3:1), para una mejor eficiencia y recuperación total de los compuestos fenólicos. Finalmente se concentró la fase orgánica obtenida a través de un rotavapor a una temperatura de baño de 60° C a 130 rpm obteniendo el extracto rico de compuestos fenólicos: ADF y AF.

Se llevó a cabo la separación del ácido ferúlico, cristalizando y recrystalizando varias veces el extracto obtenido, mediante el mismo procedimiento utilizado para 50 litros de nejayote, obteniendo un extracto rico en ADF totales. Los ADF más abundantes se separaron colocando 3 g de muestra extracto en una columna empacada de sílice, se identificaron y concentraron las fracciones ricas de 2 ADF más abundantes. Por último se purificaron las fracciones que presentaron los dos ADF más abundantes y se pesaron.

5.4.2.7 Purificación de 2 ADF más abundantes mediante una Placa Semipreparativa

Se purificaron los dos ADF más abundantes, utilizando una placa semipreparativa de sílica gel de 20 cm x 20 cm. Esta purificación se llevó a cabo por triplicado utilizando las 3 fracciones concentradas que presentaron los 2 ADF mayoritarios, llevando a cabo los siguientes pasos:

Paso 1. Se colocó cada fracción concentrada en la placa Semipreparativa siendo el peso total por muestra en placa de 0.210 g, con el par de eluyentes seleccionados por su mejor separación **[cloroformo: ácido acético (relación 9:1)]** y en una cámara de cromatografía durante dos horas.

Paso 2. Se observó e identificó los 2 ADF mayoritarios en la placa Semipreparativa, con luz UV-visible y se separaron físicamente las fracciones de elusión de sílica gel de los 2 ADF más abundantes y AF presente.

Paso 3. A cada fracción de sílica gel se le agregó 20 ml de acetato de etilo, sometiendo a agitación constante por 20 minutos, para después filtrar la sílica gel con un sistema de filtrado al vacío. Se concentró finalmente cada fracción obtenida mediante un rotavapor a una temperatura de baño de 60° C a 130 rpm obteniendo los extractos puros de 2 ADF y AF que se identificaron por C.C.F, punto de fusión y pruebas de solubilidad.

5.4.3 Tercera etapa: Cuantificación de dos ADF y AF en tres nejayotes de diferentes maíces por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5.4.3.1 Maíces utilizados

Se lleva a cabo la cuantificación de 2 ADF y AF de tres nejayotes de diferentes granos de maíz, obtenidos de diferentes regiones del país y para el mismo uso de consumo (elaboración de tortillas). Los maíces utilizados fueron los siguientes, **tabla 2**:

MAIZ	ORIGEN	MARCA	CANTIDAD	SIEMBRA/COSECHA	CARACTERISTICAS
1	GUANAJUATO	PIONNER 30G88	1 Kg	18-abril-05 / 22-nov-05	Limpio, color extra blanco, suave, alto peso específico, dentado, especialmente seleccionado para la industria de la masa y la tortilla.
2	JALISCO	DEKALB 20-20	1 Kg	16-abril-05 / 14-nov-05	Limpio de color amarillo, duro, alto peso específico, dentado, seleccionado para la industria de la masa y la tortilla
3	ESTADO DE MEXICO	EDO DE MEXICO	1 Kg	16-abril-05 / 14-nov-05	Limpio de color amarillo oscuro, duro y de alto peso específico, dentado, seleccionado para la industria de la masa y la tortilla

Como primer paso, se llevó a cabo el proceso de nixtamalización en el laboratorio bajo condiciones controladas a cada uno de los maíces, para después preparar las 3 muestras diferentes de nejayotes para su cuantificación por triplicado de los 2 ADF y AF.

5.4.3.2 Proceso de nixtamalización

El proceso de nixtamalización para los tres tipos de maíces fue el siguiente:

Se limpió cada kilo de grano eliminando materia extraña que pudiera presentar, una vez limpio el grano se mezcló con el doble del equivalente de su peso en agua en un contenedor, se agregó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en una concentración del 1-2% con respecto al peso del maíz, la mezcla se calentó en una olla a 80 °C durante 45 minutos, moviendo continuamente el grano para un cocimiento uniforme del grano. Se dejó reposar hasta el día siguiente (18 horas), al finalizar el pericarpio está parcialmente separado y el endospermo hinchado, se separa por decantación el grano de maíz del agua residual conocida como “nejayote” para su utilización en la obtención de los 2 ADF y AF.

5.4.3.3 Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizado para la identificación y cuantificación de 2 ADF y AF

Para la identificación y cuantificación de los 2 ADF y AF en tres nejayotes diferentes, se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) serie 250, con bomba isocrática LC 250 y un loop de 20 μL , depósito de columna Perkin-Elmer LC Oven 101, con detector programable UV a 330 nm, Waters 2487, con integrador personal modelo 10205 y Columna C-18 Prodigy 50 DS, dimensiones: 250 x 4.60 mm y 5 micrones.

Con base a estudios de cuantificación de ADF y AF, se llevó a cabo la implementación del método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para la obtención de curvas estándar de 2 ADF y AF, llevando a cabo pruebas de inyección para conocer la fase móvil o eluyente grado HPLC, revisando la solubilidad que presenta cada uno, utilizando como fase móvil inicialmente: AGUA : METANOL en una proporción 90:10, cambiando a los 10 minutos a una proporción 60:40, siendo éste sistema binario el más eficaz para la separación de los 2 ADF y AF en la misma corrida de inyección **(15)**.

El agua utilizada fue filtrada y acidificada a 1% con ácido acético glacial, después se ajustó a un pH 4 con NaOH al 10% filtrando nuevamente a través de un sistema de filtración Millipore con membrana de 0.45 micras de acetato de celulosa. La fase móvil se desgasificó en un Sonicador

Brasonic Ultrasónico Cleaners Modelo 2210 durante 20 minutos. El flujo fué de 1.0 ml/min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 μ L. La columna utilizada fue una C-18 que fue calentada con una mantilla eléctrica hasta alcanzar una temperatura de 45 °C y una presión en el cromatógrafo entre 2600-2700 psi. Al inicio y final de las inyecciones, la columna se lavó con la fase móvil durante 10 minutos.

5.4.3.4 Curvas estándar de 2 ADF y AF por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se realizaron las curvas estándar de los dos compuestos ADF puros obtenidos (café- amarillo), y el ácido ferúlico (cristales amarillos), bajo las condiciones de cromatografía antes mencionadas. Se pesó cada muestra seca y se disolvió con metanol grado HPLC de manera independiente. Se manejaron 5 concentraciones para cada compuesto inyectándose cada concentración por triplicado, conociendo el tiempo de retención de cada compuesto.

Para el ácido ferúlico, se pesó de una muestra patrón pura y seca 0.5 mg y se disolvió en 1 ml de metanol grado HPLC, para obtener una concentración inicial de 0.5 mg/ml y llevar a cabo las concentraciones de la curva estándar, volumen inyectado= 20 μ l.

Para el ADF 1, se pesó 1 mg de extracto seco y puro del ADF1 y se disolvió en 5 ml de metanol grado HPLC para obtener una concentración inicial de 0.2 mg/ml y llevar a cabo las concentraciones, volumen inyectado = 20 μ l.

Para el ADF 2, se pesó 2 mg del extracto seco y puro de ADF2 y se disolvió en 10 ml de metanol grado HPLC para obtener una concentración inicial de 0.2 mg/ml, volumen inyectado = 20 μ l.

5.4.3.5 Preparación de los tres diferentes nejayotes para su cuantificación por HPLC

Se acidifican los tres diferentes nejayotes con ácido clorhídrico concentrado hasta un pH 4, posterior a esto, se filtran a través de un equipo de filtrado al vacío, colocando papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste, haciendo pasar el nejayote para eliminar la cascarilla presente.

Muestra de Inyección para cuantificar los 2 ADF más abundantes

Se toma de cada nejayote una alícuota de 0.5 ml y se afora a 1 ml con metanol grado HPLC, inyectando por triplicado cada nejayote a partir de la solución aforada, para la cuantificación de cada ADF. El volumen inyectado fue de 20 μ L. Se incluyó en la última inyección el patrón interno de los ADF con la finalidad de rectificar el tiempo de retención de cada compuesto en los 3 nejayotes.

Muestra de Inyección para cuantificar ácido ferúlico (AF)

Se toma de cada nejayote acidificado 0.1 ml y se aforó a 1 ml con metanol grado HPLC. El volumen inyectado fue de 20 μ L. Se llevó a cabo por triplicado la medición y se corroboró el tiempo de retención del ácido ferúlico para el caso de los tres nejayotes.

Una vez que se obtuvieron los tiempos de retención para cada compuesto, se determinaron las áreas correspondientes y a través de la ecuación de la curva estándar para cada compuesto, se extrapolaron las áreas, obteniendo una concentración, multiplicando después por los factores de dilución para obtener la concentración real de cada compuesto en cada nejayote.

Caber recordar que las tres muestras inyectadas de nejayote se obtuvieron con el mismo proceso de nixtamalización y se sometió a las mismas condiciones controladas de las muestras estándar.

5.4.3.6 Determinación de Polifenoles totales de tres nejayotes de diferentes maíces, mediante el Método de Matthaus (2002)

Se determinó la cantidad de compuestos polifenoles totales en los tres nejayotes de diferentes maíces para conocer la relación cuantitativa que existe con los ADF y AF, ya que al pertenecer a la familia de compuestos fenólicos se pueden relacionar las cantidades presentes en cada nejayote, además de que presentan propiedades antioxidantes.

Para determinar la cantidad total de Polifenoles totales se llevó a cabo el Método de Matthaus (2002) por triplicado para cada nejayote. Se tomó 2 ml de cada nejayote y se llevó a un volumen de 5 ml de HCl al 0.3 %. Se tomó una alícuota de 100 μ l de la solución resultante en 2 ml de Na₂CO₃ al 2% y se dejó reposar 2 minutos. Se adicionó 100 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido con agua 1:1).

Se dejó reposar 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro. La cantidad de Polifenoles totales presentes en cada nejayote, se calculó tomando como base la curva estándar del ácido gálico, **ver anexo 2**, tomando como base la siguiente relación: Polifenoles totales = mg de ácido gálico/ g de muestra

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Primera etapa. Selección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF a partir de nejayote de maíz

6.1.1 Elección del adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF y AF en el nejayote de maíz

La recuperación de los compuestos ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) y ácido ferúlico (AF) se hizo a partir del nejayote de un mismo tipo de maíz: **criollo amarillo** recolectado de un molino comercial. Los adsorbentes utilizados fueron: ACTIVADO, AMBERLITA Y POLIVINILPIRROLIDONA.

El nejayote se acidificó a pH 4, ya que con base a la bibliografía consultada que es el pH en el que se encuentran presentes y se pueden recuperan los compuestos dehidrodiferúlicos (ADF) en el nejayote de maíz **(7)**, ver resultados en **tabla 3**:

* Adsorbente utilizado	Peso de compuestos obtenidos (ADF+AF) g/l de nejayote de maíz (\bar{X})	Peso de compuestos obtenidos (ADF+AF) g/kg de maíz (intervalo de nejayote)
carbón activado	1.80 +/- 0.20	1.08 a 1.26
polivinilpirrolidona	0.89 +/- 0.30	0.48 a 0.56
amberlita	0.93 +/- 0.26	0.53 a 0.62

* Cada adsorbente se trabajó por triplicado

A partir de un kilo de maíz nixtamalizado, se obtiene de 600 a 700 ml de nejayote sin hacer ningún lavado al grano, esto puede variar dependiendo del tipo de maíz y de los lavados que se realicen posteriores a la nixtamalización del maíz.

La adsorción refiere a procesos donde las moléculas de muestra son ligeramente retenidas en la superficie sólida del adsorbente por débiles fuerzas electrostáticas, de manera que el material es fácilmente regenerado.

La literatura reporta que se obtiene 3.94 g de extracto total de ADF y AF a partir de un litro de nejayote de maíz, con base a esto y tomando en cuenta que el extracto obtenido sean sólo los compuestos ADF+AF, el Carbón Activado presenta un 45.69% de obtención, seguido de la Amberlita con 23.60% y la Polivinilpirrolidona con un 22.59 % de obtención.

El carbón activado es un adsorbente de mayor cuidado en su manipulación en comparación con los otros adsorbentes, ya que para separar el nejayote del carbón la filtración es lenta, pudiendo tener pérdidas de obtención. Observando que si se maneja con atención, la desviación estándar del Carbón Activado puede ser menor, como en este caso, con respecto a otros adsorbentes.

La Amberlita presenta un mejor rendimiento y menor variación de resultados, en comparación con la polivinilpirrolidona. La ventaja de utilizar éste adsorbente es que el proceso de recuperación es más rápido, y es más sencillo separar el adsorbente de la muestra, sólo con el inconveniente que su costo es más elevado que el carbón activado y esto a nivel industrial repercute notablemente en el costo del proceso de extracción. **(58)**.

La polivinilpirrolidona presentó menor rendimiento de obtención, con una mayor variación de extracción. El manejo de éste adsorbente es de cuidado, por lo que la recuperación de compuestos no es tan sencillo, siendo su costo ligeramente más elevado que el carbón activado, por lo que su uso no es muy conveniente.

El carbón activado es un compuesto no polar, por lo que al tomar muestras con humedad relativa alta no presenta problemas como la sílica gel, éste método de extracción-adsorción alcanza una eficiencia de remoción entre 95 y 98%. El carbón activado es el adsorbente más usado para extraer, concentrar y almacenar el ácido ferúlico y compuestos fenólicos en general, así como para concentrar y almacenar vapores orgánicos. **(45)**. Se ha comprobado que el carbón activado es más eficiente cuando es empaquetado en columna, ya que permite una mejor adsorción de compuestos como el ácido ferúlico y reduce las pérdidas que puedan generarse al estar suelto. Con base a los resultados y la literatura consultada, se elige al Carbón Activado como el adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos ADF totales.

6.2 Segunda Etapa: Recuperación de ADF y AF a partir del nejayote de maíz nixtamalizado (50L)

6.2.1 Recuperación y des-adsorción de ADF y AF a partir de nejayote de maíz

Se llevó a cabo la recuperación de los compuestos ADF+AF usando Carbón Activado como adsorbente, a partir de 50 litros de nejayote de maíz criollo amarillo, llevándose a cabo por triplicado dicho proceso..

La muestra recuperada después de llevar a cabo la des-adsorción de compuestos del adsorbente con acetato de etilo, separando y concentrando el extracto obtenido, es de color amarillo fuerte ligeramente viscoso. La cantidad obtenida es de 2.03 g por cada litro de nejayote. La literatura reporta que en una hidrólisis alcalina, se obtienen en promedio 2.61% de AF y 1.33% de ADF en el salvado de maíz, si se compara este dato con el resultado obtenido y sugerimos que la muestra sólo contiene ADF+AF/L de nejayote, se obtiene un 51.52 % de recuperación por litro de nejayote. Cabe mencionar que esta cantidades pueden variar dependiendo de la variedad de maíz con que se trabaje **(52)**.

Se ha estudiado que el “nejayote” residuo líquido del proceso de nixtamalización del maíz, se genera en grandes cantidades diariamente. Estadísticamente en el año 2012 México produjo el 2.7% de maíz en el mundo (23 millones de toneladas), siendo el 4° productor a nivel global, después de Estados Unidos, China y Brasil. El rendimiento promedio por hectárea en México es de 3.2 toneladas (lugar 78 de 164 países que producen este grano en el mundo). El promedio mundial es de 5.2 ton/ha, lo que hace al maíz un cereal con gran aplicación a nivel artesanal e industrial generando grandes cantidades de subproductos de uso interno y de exportación.

Informes de SAGARPA indican que cada mexicano consume en promedio 123 kg de maíz anualmente, cifra muy superior al promedio mundial (16.8 kg per cápita). Según información de los Censos Económicos del INEGI, muestra que en 2010 el valor de la producción de masa y tortilla alcanzó los 62,763 millones de pesos, decreciendo 1% respecto al 2009 pero ya en 2011 mostró una recuperación de 2.1% en el periodo enero-mayo respecto al mismo periodo de 2010, variando mínimamente en el valor de producción por año.

La industria de la masa y la tortilla se encuentra dispersa por todo el país con 78,852 establecimientos a nivel nacional entre molinos y tortillerías o ambas modalidades. Se reporta que por cada kilo de maíz se produce 1.40 kg de tortilla y se genera de 600 a 700 mililitros de agua residual (nejayote) sin hacer ningún lavado posterior. En México en el año 2011, el consumo de tortillas de maíz fue de 6.9 millones de toneladas, lo que indica que se generó aproximadamente 3 450 millones de litros de nejayote **(53)**.

Revisando éstas cifras, se concluye que el nejayote es un subproducto potencial del proceso de nixtamalización del maíz, para la recuperación y obtención de compuestos fenólicos como son los ADF y AF.

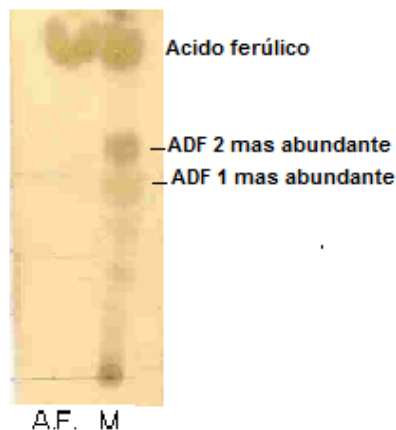
6.2.2 Identificación de 2 ADF y AF presentes en el nejayote de maíz por cromatografía de capa fina

Después de hacer varias pruebas de eluyentes para la mejor identificación de los compuestos ADF y AF en cromatografía de capa fina, **ver tabla 4**, se observó que el CLOROFORMO: ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL (9:1) es el eluyente de mejor separación de ADF y AF para su identificación.

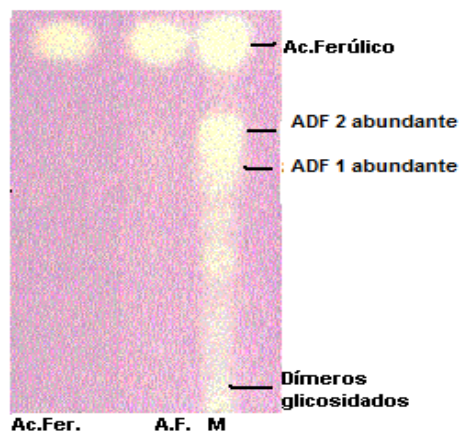
Mezcla	Eluyente 1 + Eluyente 2
1	alcohol etílico + ácido acético glacial (9:1)
2	hexano + ácido acético glacial (9:1)
3	cloroformo + Hexano (9:1)
4	acetato de etilo + ácido acético glacial (9:1)
5	cloroformo + ácido acético glacial (9:1)
6	Hexano 100 %
7	Alcohol etílico 100%
8	Cloroformo 100 %

Se colocó una aplicación del extracto obtenido de 50 litros de nejayote y una muestra estándar del ácido ferúlico en una placa cromatográfica de capa fina (C.C.F.) de 4 x 8 cm, para lo cual se tomó una mínima cantidad de extracto y de muestra estándar de ácido ferúlico en 2 ml de acetona, cuyo eluyente fue CLOROFORMO-ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL (9:1). Una vez completada la elusión se observaron las placas en una cámara con lámpara UV-visible, **ver placas 1 y 2**.

Las placas también se asperjaron con sulfato cérico y DPPH, observando la presencia de los compuestos ADF y AF a diferentes Rf's. Se consultó la bibliografía para la identificación de los compuestos ADF presentes (68).



Placa 1.
AF= ácido ferúlico
M = muestra seca (ADF+AF)



Placa 2.
Ac.Fer.= ácido ferúlico
M = muestra seca (ADF+AF)

Separación con eluyente: $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{COOH}$ (9:1) **Placa 1.** Revelador sulfato cérico, **Placa 2.** revelador DPPH

En las dos placas se puede observar la presencia del ácido ferúlico, seguido de 2 posibles ADF presentes con mayor abundancia y de manera descendente otros ADF con mayor polaridad en el sistema de cromatografía.

En primera instancia se observa que los dos ADF más abundantes presentes en las placas cromatográficas pueden referirse al 8-O-4 ácido dehidrodiferúlico y al 8-5' ácido dehidrodiferúlico, esto con base a la literatura y estudios acerca de los ADF reportados con mayor abundancia en el maíz y a su Rf, ver **tabla 5.**

Tabla 5. Distancia de Rf obtenidos experimentalmente de los dos ADF más abundantes en la C.C.F.	
Compuesto	Rf (cloroformo/ ácido acético 9:1)
ácido ferúlico	0.88
posible 8-0-4' ADF	0.71
posible 8-5' ADF	0.61

También se revisa en la literatura que los otros compuestos ADF presentes en la parte inferior de las placas cromatográficas, con Rf menores, son más polares y pertenecen al grupo de compuestos conocidos como dímeros glicosidados ó ADF glicosidados.

En la placa 2, se aspersó con DPPH (2,2-difenil picrilhidrazil) que es un radical cromóforo, que al reaccionar con un agente donador de electrones es reducido a su forma DPPH-H, observando un cambio de color purpura (forma oxidada) a amarillo (forma reducida), indicando que tan activo es el compuesto como antioxidante, confirmando que el AF como los compuestos ADF poseen propiedades antioxidantes, al cambiar de color purpura a amarillo.

6.2.3 Separación del AF (Cristalización del ácido ferúlico)

A partir del extracto obtenido, se llevó a cabo la cristalización del ácido ferúlico. Esta cristalización fue muy lenta, dejando reposar aproximadamente 24 horas para la formación total de cristales de agujas muy finas de color blanco.

Se separaron los cristales de AF del extracto total y se obtuvo una muestra de aguas madres (mezcla de ADF) con aspecto viscoso de color café claro. Para eliminar las trazas de AF presentes en esta muestra, se recrystalizó 3 veces la mezcla de ADF, obteniendo un extracto rico de mezcla de ADF.

Se pesaron las muestras obtenidas, recuperándose de ácido ferúlico 1.40 g/L de nejayote y de 0.84 a 0.98 g /Kg de maíz. De la mezcla de ADF se recuperó un 0.47 g/ L de nejayote y de 0.28 a 0.33 g/kg de maíz. La cantidad total de ácido ferúlico obtenido en promedio es de 0.91 g/kg de maíz y de ADF totales es de 0.31 g/kg de maíz, presentando un rendimiento de extracción (%) a partir de 50 L de nejayote, ver **tabla 6**.

Tabla 6. Rendimiento de obtención de AF y ADF a partir de 50 L nejayote de maíz criollo amarillo		
Extracto (g/l nejayote) (AF + ADF)	Extracto (g/l nejayote) (ácido ferúlico)	Extracto (g/l nejayote) (mezcla de ADF totales)
1.87	1.40	0.47
100 %	74.87 %	25.13 %

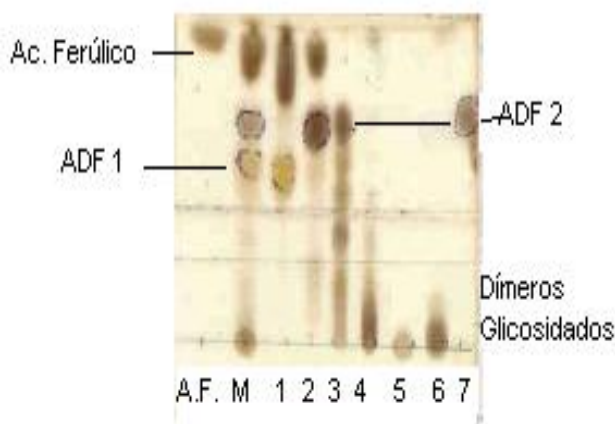
Se puede observar que el rendimiento para el ácido ferúlico fue de 74.87% y para la mezcla de ADF totales fue de 25.13% a partir de la muestra total recuperada. Las cantidades obtenidas se cotejaron con literatura consultada que señala el porcentaje de extracción del ácido ferúlico y los ADF a partir de un proceso alcalino, observando que se obtuvo una mejor recuperación de ácido ferúlico que de ADF presentes **(15)**.

6.2.4 Separación de 2 ADF más abundantes utilizando Columna empacada de sílice

De la mezcla viscosa obtenida de ADF totales, se procedió a separar e identificar los 2 ADF más abundantes presentes a través de una columna empacada de sílice. Primero se hicieron pruebas con diferentes eluyentes para conocer la fase móvil más efectiva para la separación de compuestos de ADF en la columna empacada de sílice, ver **tabla 7**.

Fase móvil	Eluyente 1 + Eluyente 2
1	Diclorometano + Hexano (3:7)
2	Diclorometano + Acetato de etilo (1:1)
3	Acetato de etilo + Ácido acético glacial (1: 0.5)
4	Hexano + Acetato de etilo (6:4)
5	Acetato de etilo+ Metanol (1:1)
6	Metanol + agua (1:1)

Después de hacer varias pruebas de elusión con una mínima cantidad de muestra de ADF, se observó que el eluyente: HEXANO/ACETATO DE ETILO (60:40) es el más efectivo para la separación de éstos compuestos. Se llevó a cabo la elusión de 3 g de muestra de ADF, obteniendo más de 20 fracciones de 150 ml, que se observaron en C.C.F. Estas fracciones se concentraron en 7 fracciones similares de compuestos de ADF, ver **placa 3**:



Placa 3. AF= ac. ferúlico std, M= muestra total (ADF+ AF) y 7 fracciones de cromatografía en columna ADF1= ac.dehidrodiferulico más abundante 1, ADF2= ac.dehidrodiferulico más abundante 2. Revelador sulfato cérico, Eluyente cloroformo: ac. acético (9:1)

En la placa 3 se observa presencia de ácido ferúlico en las fracciones 1 y 2, es decir que se puede recristalizar nuevamente el extracto obtenido para una mejor purificación y mayor rendimiento de éste compuesto. En las fracciones 1,2, 3 y 7 se observan notoriamente dos compuestos ADF abundantes, que se visualizan también en la muestra (M)= ADF+AF. Le llamamos ADF1 al primer compuesto mayoritario presente con menor Rf en la cromatoplaque y ADF2 al siguiente compuesto mayoritario que se observa en la cromatoplaque, siendo el ácido ferúlico el valor más alto de Rf. En las fracciones 4,5 y 6 se observan los compuestos ADF con una distancia de Rf mínima que refiere a los ADF glicosidados. Estos compuestos son más solubles en acetona, alcoholes y cloroformo, por lo que es más sencillo separar los ADF más polares de los que no lo son. Los compuestos ADF glicosidados eluyen en la columna empacada después del AF y de los ADF mas abundantes.

Se pesaron las muestras obtenidas de cada fracción y se obtuvo lo siguiente, ver **tabla 8**:

Fracción	Compuestos Identificados	Peso (g) de extracto ADF totales / en 3g	Rendimiento obtenido %
1	ácido ferúlico + ADF1 abundante	0.433	14.43
2	ácido ferúlico (mínima cantidad) + ADF2 abundante	0.167	5.57
3	mezcla de ADF	0.7311	24.37
4,5,6	dímeros ADF glicosidados	0.3483	11.61
7	dímero ADF2 abundante	0.0255	0.85

La cantidad total resultante de las 7 fracciones a partir de 3 g de muestra de ADF en la columna de separación fue de 1.70 g, presentando un rendimiento total de recuperación del 56.83 %. El resto de muestra pudo quedarse como trazas de compuestos en la columna de sílice. Por lo que es importante al utilizar una columna empacada para la separación de compuestos, llevar a cabo un mayor número de eluciones para una mejor separación y recuperación de compuestos.

La cromatografía en columna empacada de sílice es un procedimiento clave en la separación de los compuestos, ya que éstos presentan estructuras químicas muy similares como es el caso de los compuestos ADF. La elección del eluyente a utilizar debe ser afín al ácido ferúlico para la separación de éste y ligeramente afín a los ADF.

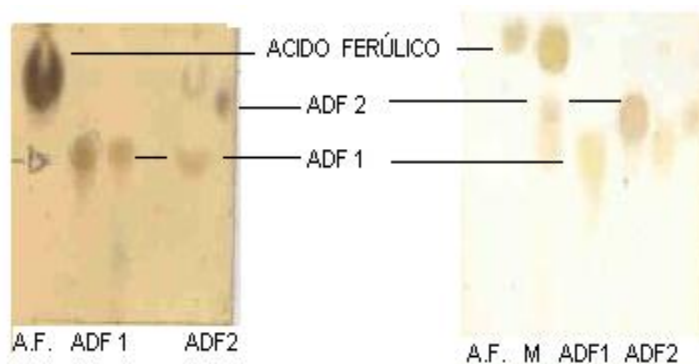
La polaridad los compuestos es muy importante en la elusión de la columna, como es el caso de los dímeros glicosidados que al ser más polares se retienen más a la columna de sílice y su elusión es más lenta. Observando que en la C.C.F. el valor Rf de ADF glicosidados es pequeño por el eluyente utilizado.

6.2.5 Purificación de los dos ADF más abundantes

Se identifica que los compuestos ADF más abundantes están presentes en las fracciones 1, 2 y 7. Estas fracciones se juntan para hacer nuevamente la separación por cromatografía en columna, llevando a cabo tres aplicaciones de 0.2 g de muestra por cada separación. Se obtuvieron 10 fracciones de 100 ml por cada muestra eluida, resultando tres fracciones totales que se pesaron e identificaron por C.C.F., ver **tabla 9 y Placas 4 y 5**.

TABLA 9. Cantidad obtenida de 2 ADF y AF			
Fracción	Compuesto	Peso (mg / 0.2 g de extracto ADF)	Rendimiento obtenido %
1	ácido ferúlico	110.40	55.20
2	dímero ADF1	31.10	15.55
3	dímero ADF2	36.80	18.40

Placas 4 y 5. Purificación de dos ADF más abundantes. Eluyente: CHCl₃:CH₃COOH (9:1)



Placa 4. Revelador DPPH

Placa 5. Revelador sulfato cérico

Con base al rendimiento y peso obtenido, se observa que aún está presente el ácido ferúlico en las muestras purificadas, aun cuando ya se había separado por cristalización de la mezcla de ADF, le sigue con menor valor de Rf el compuestos ADF2 y por último el ADF1 con menor valor de Rf el ADF1. Se recuperó mayor cantidad del compuesto ADF2 que del ADF1 confirmando que el ADF2 se encuentra presente en mayor abundancia con respecto al ADF1.

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica rápida para la separación e identificación de compuestos. La muestra analizada se comparó con los patrones de referencia reportados en la literatura de AF puro (SIGMA) y con los Rf de los compuestos ADF (7).

6.2.6 Identificación y Caracterización de 2 ADF purificados

Una vez que se tienen los extractos puros de los 2 ADF y del ácido ferúlico, se llevaron a cabo pruebas de solubilidad para cada compuesto y se midió el punto de fusión de cada uno.

Los resultados se observan en la **Tabla 10**:

TABLA 10. Resultados experimentales de los compuestos AF, ADF1, ADF2			
MUESTRAS	P.M. (g/mol)	PUNTO FUSION (°C)	SOLUBILIDAD
ADF1 (C ₂₀ H ₁₈ O ₈)	386	187	En H ₂ O tibia, acetona, acetato de etilo, metanol, etanol y otros alcoholes, ligeramente solubles en éter y benceno
ADF2 (C ₂₀ H ₁₈ O ₈)	386	208	En H ₂ O tibia, acetona, acetato de etilo, metanol, etanol y otros alcoholes, ligeramente solubles en éter y benceno
ÁCIDO FERÚLICO (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)	194.18	174	En H ₂ O caliente, acetato de etilo, metanol, etanol, moderadamente en éter y benceno

Al analizar los resultados se observa que el punto de fusión del ADF2 es mayor que el ADF1 siendo el de menor punto de fusión el ácido ferúlico. Se hace una comparación del punto de fusión de éstos compuestos con la literatura y se observa que el punto de fusión del ADF2 corresponde al 8-O-4'ácido dehidrodiferúlico, mientras que el punto de fusión del ADF1 es muy cercano al valor del 8-5' ácido dehidrodiferúlico.

La solubilidad que presenta el ácido ferúlico con respecto a los ADF es ligeramente diferente siendo la temperatura un factor importante. Los ADF al presentar diferente conformación química suelen ser ligeramente más polares que el ácido ferúlico, ya que presentan 3 a 4 grupos OH más que el ácido ferúlico. La solubilidad de compuestos de ADF son muy similares, ya que presentan mayor grado de solubilidad con disolventes polares como son los alcoholes y agua, siendo ligeramente solubles en éter y benceno pues éstos presentan una constante dieléctrica baja con respecto a los disolventes polares, ésta es una característica que presentan los ADF y que puede ser considerada para su aplicación en diferentes medios poco solubles. Esta es una propiedad peculiar que presentan los ADF para su aplicación en diferentes medios ricos en lípidos (poco solubles) con la facilidad de mezclarse en medios polares.

De esta manera se comprueba que los dos compuestos purificados e identificados seguidos del AF corresponden a los ADF más abundantes: 8-O-4' ADF y 5-5' ADF, llevando a cabo también la espectrometría de masas de cada compuesto purificado para su confirmación y comparación con el estándar en bibliografía.

6.2.7 Recuperación y purificación a gran escala de 2 ADF mas abundantes mediante una Placa Semipreparativa (90L)

Se llevó a cabo la recuperación de compuestos ADF a partir de 90 litros de nejayote, utilizando como adsorbente Carbón Activado, bajo las mismas condiciones de recuperación, cristalización de ácido ferúlico y separación de compuestos ADF por columna empacada. Una vez recuperados y separados los compuestos ADF del AF, se obtuvieron los siguientes extractos totales, ver **tabla 11**:

Nejayote de maíz criollo amarillo	Peso obtenido (g /L de nejayote)	Peso obtenido (g /kg de maíz)
Total de extracto (ADF+AF)	2.45	1.47 – 1.72
Ácido ferúlico	1.7	1.02 – 1.19
Mezcla de ADF	0.6067	0.36 – 0.42

Se llevó a cabo la separación de los 2 ADF más abundantes mediante una columna de separación a partir de 3 g de muestra de ADF totales. Se obtuvieron 20 fracciones de 100 ml cada una que se concentraron e identificaron por C.C.F. para purificar únicamente las fracciones que presentaron los dos ADF más abundantes. La purificación de los dos ADF se hizo a través de una **Placa Semipreparativa** tomando 210 mg de muestra total para la purificación de cada ADF. Se pesó cada uno de los compuestos purificados, resultando lo siguiente, ver **tabla 12**:

Fracción	Compuesto	Peso (mg/ 0.2 g de extracto ADF)	Rendimiento de obtención %
1	ácido ferúlico	155.40 +/- 0.110	77.5
2	dímero ADF1	52.10 +/- 0.127	26.0
3	dímero ADF2	68.80 +/- 0.131	34.0

En la tabla se observa que existe una menor variación de purificación en el ácido ferúlico, ya que su RF es diferente a los ADF abundantes identificados, siendo más precisa su separación e identificación la Placa semipreparativa; mientras que la purificación de los dos ADF recuperados tuvieron una mayor variación que el AF. Esto se puede deber a la similitud de elusión (Rf) que presentan los ADF, por lo que deberá ser muy precisa la separación de compuestos en la placa semipreparativa.

Se identificó cada compuesto ADF y el AF mediante cromatografía en capa fina (CCF), punto de fusión y pruebas de solubilidad, confirmando que los compuestos recuperados y purificados corresponden el ADF1 al 8-5' ácido dehidridiferúlico y el ADF2 al 8-O-4' ácido dehidridiferúlico.

6.3 Tercera Etapa. Cuantificación de 2 ADF, AF y polifenoles totales en 3 nejayotes de diferentes maíces

6.3.1 Obtención de tres nejayotes diferentes a partir de tres maíces nixtamalizados

Se lleva a cabo bajo condiciones controladas la nixtamalización de los 3 diferentes granos de maíz, obteniendo 3 nejayotes, con las siguientes características, **tabla 13**:

Tipo de maíz	Aspecto de Nejayote
Guanajuato	Color amarillo canario con olor característico de maíz, debido a que el grano es de color blanco amarillo.
Jalisco	Color amarillo intenso con olor característico de maíz.
Estado de México	Color amarillo intenso oscuro, con olor característico de maíz.

El maíz dentado utilizado en los tres casos, se caracteriza por una depresión o “diente” en la corona de la semilla y posee endospermo córneo o duro a los lados y detrás del grano y la porción harinosa se encuentra en la zona central y en la corona del grano. Una vez hecha la nixtamalización del maíz, la cascarilla fué fácilmente eliminada.

6.3.2 Curvas Estándar de los 2 ADF y AF utilizando HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución)

Inyección y obtención de curvas estándar de 2 ADF y AF

La muestra de los tres compuestos separados y purificados se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando como fase móvil AGUA:METANOL (90:10) respectivamente al inicio de la corrida, cambiando a los 10 minutos la proporción a 60:40, ya que a ésta proporción los tres compuestos (2 ADF y AF) se separan perfectamente para su cuantificación.

(15). Las curvas estándar de cada compuesto: ADF1, ADF2 y ácido ferúlico se muestran en las **gráficas 1 y 2**. También se mide el tiempo de retención de cada compuesto en cada inyección de HPLC, ver **tabla 14**:

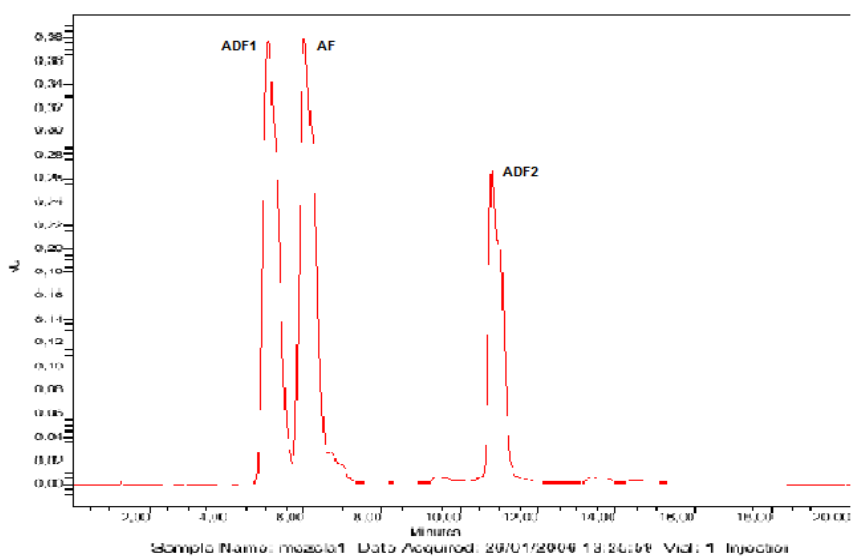


Gráfico 1. Inyección en HPLC. Compuestos de izquierda a derecha, ADF1, Acido Ferúlico, ADF2, Fase móvil: agua/metanol

Tabla 14. Tiempos de retención de los compuestos ferúlicos por HPLC	
Compuesto	Tiempo retención HPLC (minutos)
ADF1 (8-5')	4.7
ácido ferúlico	5.9
ADF2 (8-O-4)	10.8

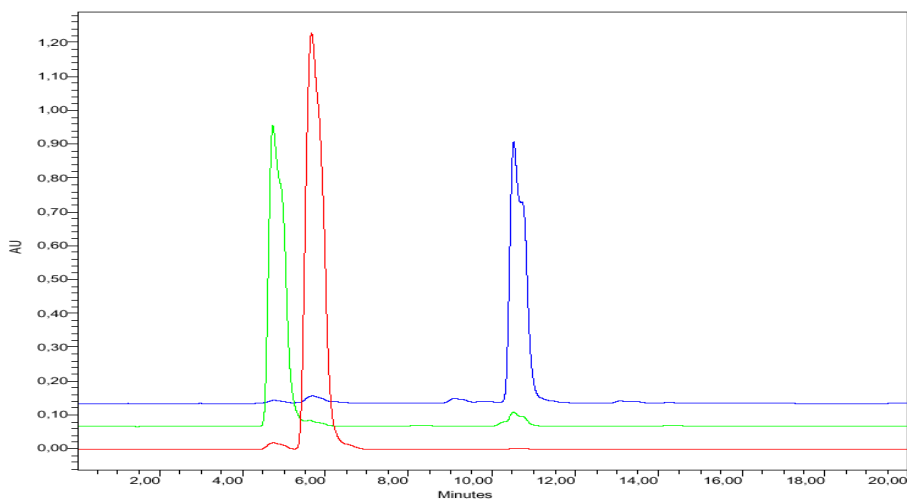


Gráfico 2. Tiempos de retención de cada compuesto. Rojo= ácido ferúlico, Verde= ADF1, Azul= ADF2

6.3.3 Análisis de los 3 nejayotes diferentes en HPLC

Una vez acidificados los nejayotes a pH 4, filtrados y preparados para su inyección en HPLC, se inyectó cada uno, **gráfico 3**, con una concentración conocida para la cuantificación de los 2 ADF y el ácido ferúlico:

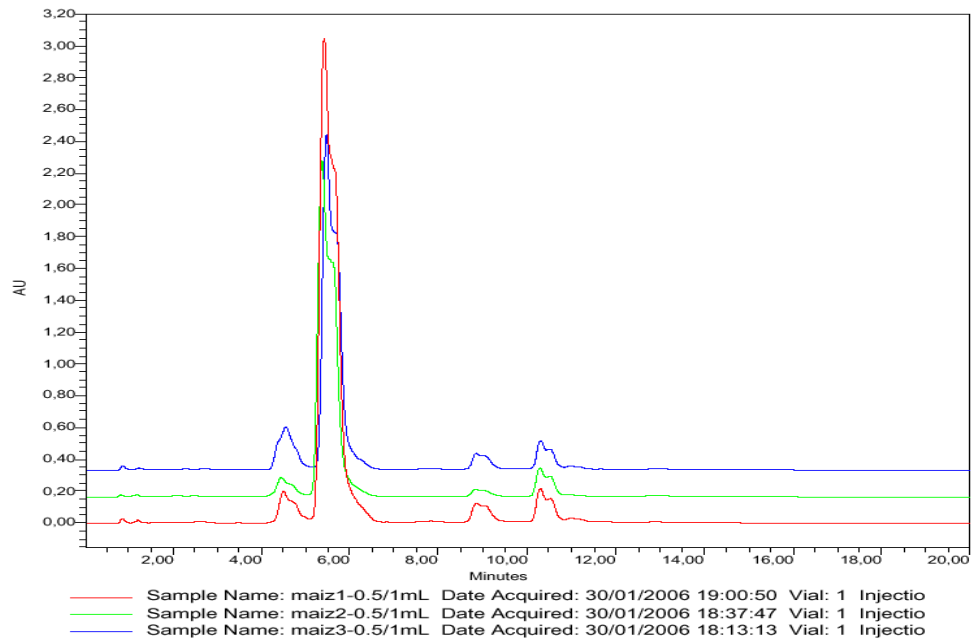


Gráfico 3. Inyección de los tres nejayotes de diferentes maíces
 Rojo = maíz Guanajuato, Verde =maíz Jalisco, Azul = maíz Estado de México

Se observa la presencia de los compuestos AF, ADF1 y ADF2 con base a sus tiempos de retención en HPLC, notando también otro pico que puede referir a otro compuesto fenólico ADF.

6.3.4 Cuantificación de dos ADF Y AF por HPLC

Una vez que se tienen las curvas estándar de cada ADF y AF, se cuantifica cada uno de estos compuestos por triplicado para cada tipo de maíz, se obtuvieron los siguientes resultados, **tabla 15**:

Tabla 15. Cuantificación de los ADF presentes en cada nejayote (mg/ml)			
Nejayote	ácido ferúlico	ADF1 (8-5')	ADF2 (8-O-4)
1 (Guanajuato)	2.049 +/- 0.006	0.194 +/- 0.006	0.116 +/- 0.007
2 (Jalisco)	2.483 +/- 0.005	0.129 +/- 0.005	0.111 +/- 0.006
3 (Estado de México)	1.117 +/- 0.007	0.213 +/- 0.008	0.137 +/- 0.009

En la tabla 23 se observa que los tres nejayotes presentan las mismas proporciones de abundancia, siendo el mayoritario el AF, le sigue el ADF1 y por último el ADF2. El maíz con menor variación de recuperación de compuestos fue el nejayote de Jalisco, seguido del nejayote de Guanajuato, presentando mayor variación de compuestos el nejayote del Estado de México.

Revisando la desviación estándar que presentan los tres maíces por compuesto, se puede observar que existen diferencias considerables principalmente en el ácido ferúlico, ya que presenta una mayor variabilidad (desviación estándar de 0.70), el ADF1 y ADF2 presentan una mínima variación de 0.1 y 0.03 respectivamente.

Estas diferencias entre los nejayotes existen debido a que cada maíz presenta características particulares de contenido químico, físico y morfológico, debido a que se cultivan en diferentes regiones, en donde el clima, altura, humedad y precipitaciones influye en las características de cada maíz ya sea dentado ó duro. No se sabe específicamente en que zona de cada estado se cultivó cada maíz, por lo que sólo se mencionan las características generales de cada región por maíz.

El maíz del estado de México (híbrido amarillo), crece en un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperaturas extremas y en promedio bajas. **(6)**. En general el clima en Estado de México es más extremo que en Jalisco y Guanajuato, observándose mayor cantidad de compuestos de resistencia biológica como son los ADF y AF, por tal motivo éste maíz es una buena elección para la extracción y obtención de ADF. Cabe mencionar que éste maíz además de contener mayor ADF que los otros maíces, también contiene una gran cantidad de almidón y por lo tanto es empleado en la elaboración de platillos típicos de la región.

El maíz de Jalisco (híbrido amarillo claro) crece en condiciones parecidas al maíz de Guanajuato, solo que la temperatura de la región y humedad son ligeramente más altas y junto con el maíz del Estado de México en general cumplen con las especificaciones para su nixtamalización **(40) NMX-FF-034/1-SCFI-2002** Este maíz posee mayor cantidad de ácido ferúlico que los otros dos maíces, posiblemente por su temperatura alta de la región, sin embargo presenta menor cantidad de ADF1 y de ADF2 con respecto a los otros dos nejayotes, esto se debe al tipo de maíz y a las condiciones de clima y estrés en que se cultiva. Este maíz se caracteriza por presentar un buen valor de remoción del pericarpio, obteniendo un mejor rendimiento para la extracción de AF.

El maíz de Guanajuato (híbrido blanco), también crece en climas templados y subhúmedos pero con temperaturas cálidas durante gran parte del día, por lo que no se somete a temperaturas tan extremas como los otros maíces. Este maíz presenta una mayor cantidad de ácido ferúlico que el maíz del Estado de México. Se sabe que es de buena calidad para el proceso de nixtamalización,

por su eficiente separación del pericarpio del grano, siendo el grano más suave para su molienda, obteniendo una cantidad considerable de productos residuales, en este caso AF y ADF.

Con estos datos podemos deducir que el contenido de ácido ferúlico está relacionado con la cantidad de ADF presentes y viceversa en cada maíz, como se observa en el maíz del Estado de México, ya que presenta **menor** cantidad de ácido ferúlico con una **mayor** cantidad de ADF y el maíz de Jalisco presenta **mayor** cantidad de ácido ferúlico con una **menor** cantidad de ADF. Esto se debe a la formación de AF y su conformación de dímeros que presenta cada maíz y el proceso de adsorción y recuperación que se utilizó para obtener éstos compuestos.

Cada maíz por lo tanto presenta diferentes cantidades de ADF y AF y se puede seleccionar el tipo de maíz según la extracción de compuestos que se requieran.

El método por HPLC presenta un coeficiente de correlación en las curvas estándar promedio de 0.9936, esto sugiere que éste método puede ser utilizado para la estimación rápida en laboratorio de la cantidad de ácido ferúlico, ADF1 y ADF2, presente en cualquier nejayote

6.3.5 Cuantificación de polifenoles totales de tres nejayotes diferentes mediante el Método de Matthaus (2002)

Para la medición de Polifenoles Totales en los tres nejayotes diferentes se llevó a cabo primero la curva estándar de ácido gálico, ver **anexo 1**, y se determinó la cantidad de Polifenoles totales mediante el procedimiento de Matthaus (2002) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu con los tres nejayotes frescos, obteniendo lo siguiente, ver **tabla 16**:

Tabla 16. Cantidad calculada de Polifenoles totales				
Nejayote	Concentración de polifenoles totales (mg de ac. gálico/ 100 g nejayote)	* Acido ferúlico (mg/100 ml)	* ADF1 (8-5') (mg/100 ml)	* ADF2 (8-O-4) (mg/100 ml)
1-Guanajuato	4070 +/- 12	204.9	19.40	11.60
2-Jalisco	2670 +/- 14	248.3	12.90	11.10
3-Estado de México	2130 +/- 19	111.7	21.30	13.70

*Datos obtenidos anteriormente de cada maíz

Los 3 nejayotes presentan diferencias en las cantidades de polifenoles totales, esto se debe al tipo de maíz, ya que presentan diferentes características fisiológicas, anatómicas y químicas como se observa en los resultados. También se observa mayor variación de resultados en el nejayote de maíz del Estado de México, contrario al nejayote de Guanajuato que presentón una desviación estándar menor que los otros nejayotes.

Existen diferencias entre los métodos de cuantificación HPLC y el método de colorimetría de Folin-Ciocalteau, ya que éste último método cuantifica los fenoles totales presentes en la muestra y en la cuantificación por HPLC sólo se midió AF y ADF, notándose un valor mayor de polifenoles con respecto a los ADF y AF en los tres nejayotes..

El maíz de Guanajuato (nejayote 1) contiene **mayor** cantidad de polifenoles totales con 4070 mg/100 g muestra, ya que al cultivarse en un clima cálido con poca precipitación pluvial, requiere generar más cantidad de compuestos de defensa contra las sequías y plagas.

El maíz de Jalisco (nejayote 2) es el maíz que contiene un **valor promedio** en cantidad de polifenoles con respecto los otros dos maíces, aun cuando la temperatura es ligeramente alta, las características de clima, altitud y humedad son equilibradas con respecto a las características de los otros dos maíces.

El maíz del Estado de México (nejayote 3), presentó **menor** cantidad de polifenoles totales y también de ácido ferúlico, a pesar de que éste maíz se cultiva en un clima extremoso de humedad y temperatura, éste se equilibra durante el día.

Los valores reportados en la literatura sobre el contenido de fenoles totales en el maíz es de 2937.5 a 758.8 mg/100 g de muestra dependiendo de la variedad de maíz. Los valores obtenidos son altos en los tres nejayotes, debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos se encuentran en el pericarpio del maíz y por lo tanto en el nejayote.

Comparando la cantidad de polifenoles totales que presenta el nejayote de maíz con respecto a otros cereales y hortalizas, contiene mayor cantidad de polifenoles totales, ya que el germen de trigo contiene 349 mg/100 g muestra, la papa contiene 437 mg/100 g muestra, el camote contiene 781 mg/100g muestra. Las frutas cereza y mora azul contienen 4180 mg/100g muestra y 2098 mg/100 g muestra respectivamente. **(65)**.

La relación entre la cantidad de polifenoles totales y la actividad antioxidante que presentan frutas, cereales y plantas en general es discutida por algunos científicos, mencionando que existe un incremento paralelo entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante durante la germinación de algunos cereales. Otro caso es el incremento en la actividad antioxidante en residuos cítricos con la presencia de compuestos fenólicos, péptidos, aminoácidos y fosfolípidos en jugos de frutas y vinos de frutas y en extractos de plantas.

7. CONCLUSIONES

Se confirma que a partir del nejayote o aguas residuales obtenidas del proceso de nixtamalización del maíz, se puede recuperar compuestos fenólicos como el AF y ADF abundantes presentes en el pericarpio del maíz, ya que se recuperaron y compararon los compuestos obtenidos: ADF1 y ADF2 con la literatura.

El adsorbente más eficiente para la recuperación de compuestos AF y ADF totales, fué el Carbón activado con respecto a los otros adsorbentes Amberlita y Polivinilpirrolidona, ya que se extrajo una mayor cantidad de éstos compuestos, con una recuperación del doble en comparación con los otros adsorbentes.

El método de cristalización del AF y el adsorbente utilizado para la recuperación de AF y ADF totales a partir de 50 L de nejayote, dió como resultado una concentración de AF de 1.40 g/l de nejayote y de ADF totales de 0.47 g/l de nejayote, recuperándose un porcentaje menor reportado en la literatura, por lo que la re-cristalización de la muestra debe hacerse mayor número de veces para su mejor rendimiento.

A partir de 90 L de nejayote se obtuvo de AF 1.7 g/l de nejayote y de ADF totales 0.6067 g/l de nejayote, observando que a mayor cantidad de muestra a utilizar, se obtiene un porcentaje mayor de recuperación de compuestos.

Los métodos de cromatografía en columna con sílice, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), son métodos eficientes para la separación y cuantificación de compuestos. Se obtuvo una recuperación a partir de 50 L de nejayote, un porcentaje de rendimiento para el AF del 55.20 % , del ADF1 un 15.55% y del ADF2 un 18.40% de obtención. Por lo tanto al utilizar éstos métodos será necesario llevar a cabo mayor número de separaciones para eficientar la purificación y obtención de dichos compuestos.

Para el caso de la purificación de ADF mediante Placa Semipreparativa, a partir de 90 L de nejayote, se obtuvo una mayor cantidad de compuestos recuperados con respecto a la purificación en columna empacada, presentando un mejor rendimiento de compuestos: AF con 77.50% , del ADF1 un 26% y del ADF2 un 34% de recuperación. Por lo tanto es más efectiva la separación física utilizando una Placa Semipreparativa , si se tienen los eluyentes efectivos de separación.

Se identifica con ayuda de los métodos cualitativos, los 2 ADF más abundantes presentes en el maíz, revisando y cotejando con la literatura el punto de fusión, solubilidad, distancia Rf en cromatografía de capa fina y espectrometría de masas de cada compuesto, concluyendo que el compuesto ADF1 refiere al 8-5' ácido dehidrodiferúlico y el ADF2 refiere al 8-O-4 ácido dehidrodiferúlico.

La cantidad de los 2 ADF más abundantes y AF presentes en nejayotes de tres diferentes maíces es diferente en cada uno, debido al tipo de maíz al que pertenecen ya sean duros o dentados y a las características de región de cultivo, clima, humedad, altura y precipitaciones.

El maíz con mayor contenido de Polifenoles Totales es el maíz de Guanajuato y éste presenta una tendencia proporcional con respecto a la cantidad de los 2 ADF más abundantes y AF, mientras que el maíz del Estado de México, contiene menor cantidad de compuestos fenoles totales y también de AF, notando una relación de ADF con la cantidad de polifenoles totales presente en cada maíz.

Un punto importante es que se consigue al final del proceso de recuperación de los ADF y AF, la recuperación y reutilización de solventes, a fin de hacer este proceso sustentable, no sólo económico sino también ecológico, ya que a nivel laboratorio se recuperó y reutilizaron los adsorbentes y disolventes utilizados con base a su destilación.

De esta manera se le atribuye al nejayote de maíz alto potencial para obtener compuestos estabilizantes y conservadores como son los compuestos como AF y ácidos dehidrodiferúlicos (ADF) para ser utilizados en la industria de alimentos y farmacia.

8. ANEXOS:

Anexo 1. Curvas estándar de 2 ADF y AF por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se llevó a cabo por triplicado la obtención de la ecuación de la curva y se lleva a cabo la regresión lineal con su constante de correlación para cada compuesto (Tabla 17, 18 y 19).

Tabla 17. Curva Patrón de Ac. Ferúlico

Tabla 17 ACIDO FERULICO	
CONCENTRACION (mg/mL)	AREA (promedio)
0.025	1875980
0.05	3534704
0.1	6597089
0.2	15388983
0.4	26941791.5

Gráfica 4. Gráfica del Ácido Ferúlico

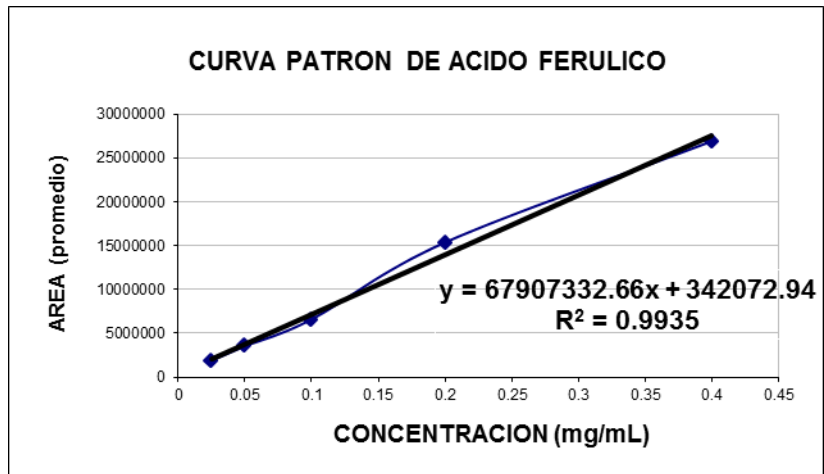


Tabla 18. Curva Patrón de ADF 1

Tabla 18 ADF1 MAS ABUNDANTE	
CONCENTRACION (mg/mL)	AREA (promedio)
0.0125	714884.5
0.025	1112591.3
0.05	2124984
0.1	4984019.6
0.2	11319757.6

Gráfica 5. Grafica de ADF 1

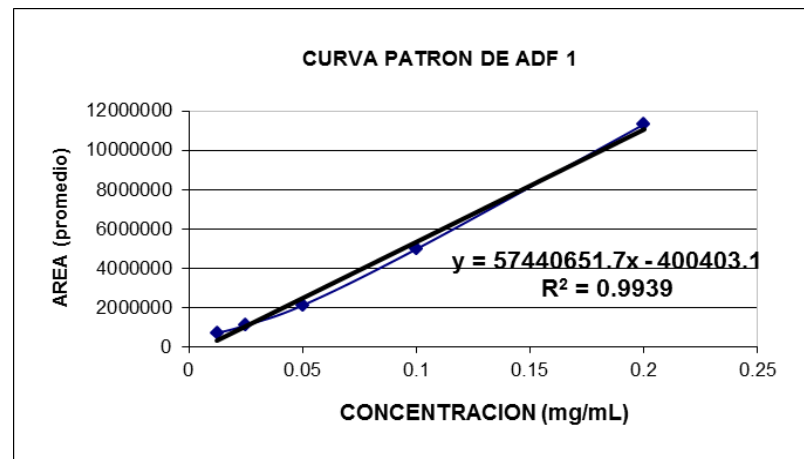
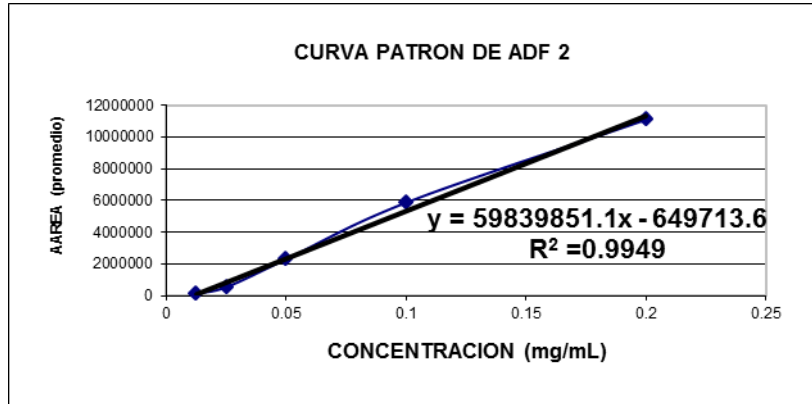


Tabla 19. Curva Patrón de ADF 2

Gráfica 6. Grafica de ADF 2

Tabla 19 ADF2 MAS ABUNDANTE	
CONCENTRACION	AREA
(mg/mL)	(PROMEDIO)
0.0125	126444
0.025	544908.5
0.05	2304152
0.1	5866068
0.2	11097802



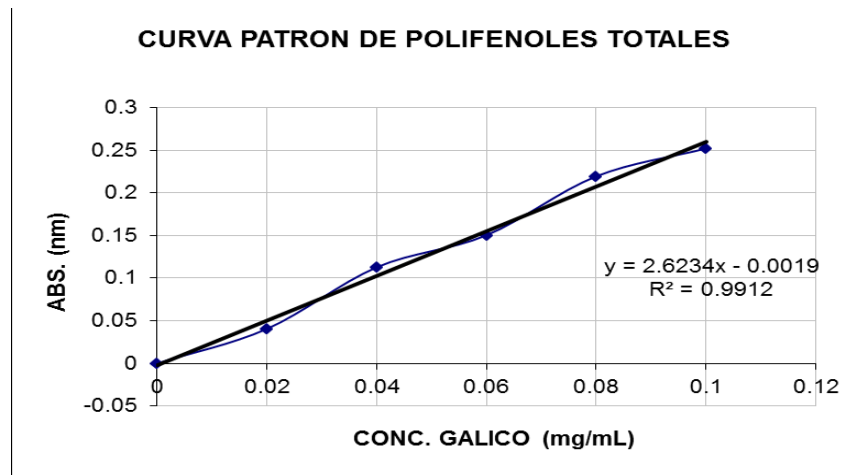
Anexo 2. Curva estándar de ácido gálico

Se llevó a cabo por triplicado la curva estándar de polifenoles totales a partir de una solución original de ácido gálico de 0.1 mg/ml con un volumen de 100 µL. La medición en el Espectrofotómetro se hizo a 750 nm, ver **tabla 20 y 21**:

Tabla 20. Preparación de Curva de ácido gálico a partir de solución (0.1 mg/ml)				
Concentración (ácido Gálico) (mg/mL)	Solución (ácido gálico) (µL)	H2O (µL)	Reactivo de Folin Ciocalteu (µL)	Na2CO3 (ml)
0	0	100	100	2
0.02	20	80	100	2
0.04	40	60	100	2
0.06	60	40	100	2
0.08	80	20	100	2
0.1	100	0	100	2

Gráfica 7. Curva estándar para la medición de Polifenoles totales

Tabla 21. Curva de ácido gálico	
Concentración (Ácido Gálico) (mg/mL)	Absorbancia (750 nm)
0	0
0.02	0.0405
0.04	0.1128
0.06	0.1504
0.08	0.2196
0.1	0.2523



9. BIBLIOGRAFIA

1. **Akin D. E. and Rigsby L.** 1993. P-coumaroyl and feruloyl arabinoxylans from plant cell walls as substrates for ruminal bacteria. *Applications Environmental Microbiology*. 59: 644-652.
2. **Anchondo E. L.** Tesis Licenciatura. 1998. Estudio sobre la retrogradación del almidón de tortilla de maíz mediante calorimetría diferencial de barrido. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
3. **Andreasen F., Kroon A., Williamson G. and García T.** 2001. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acid. *Free Radical and Medicine*. 31: 304-314.
4. **Anselmi C., Centeni M., Andreassi M., Buonocore A., La Rosa C., Segá A. and Tsuno F.** 2004. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivate in membrane models. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 35: 1241-1249.
5. **Aoki Hiromitsu, Kuze N. and Y. Kato.** 2002. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays L.*) *Foods and Food Ingredients. Journal Japan*. 199: 41-43.
6. **Barrera Ana and Herrera Rocío.** Tesis Licenciatura. 2003. Caracterización de maíces criollos para determinar su aplicación industrial. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
7. **Baydoun Elias.** 2004. Control of dehydrodiferulate cross-linking in pectins from sugar-beet tissues. *Phytochemistry*. 65: 1107-1115.
8. **Belitz H.D. and Grash W.** 1992. *Química de Alimentos*. Editorial Acribia. 6º Edición Zaragoza. 212-231.
9. **Benoit I., Navarro D., Marnet N., Lesage L., Sigoillot J. 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.
10. **Bily C. and J. Andrew.** 2004. HPLC-PAD-APCI/MS Assay of Phenylpropanoids in cereals. *Phytochemical Analysis*. 15: 9-15.
11. **Bily C., Reid M., J. Taylor, Johnston D., Malouin C. and Philogene B.** 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Genetics and Resistance*. 93: 712-719.
12. **Birch C., Dacombe C., Humphrey P. and P. Martin.** 2001. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49: 5340-5347.
13. **Bourne L. and Rice-Evans C.** 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253: 222-227.

14. **Bunzel M., Ralph J., C. Funk and Steinhart H.** 2003. Isolation and Identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology*. 217: 128-133.
15. **Bunzel Mirko, Funk Carola and Steinhart Hans.** 2004. Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standards substances from maize bran. *Journal Separation Science*. 27: 1080-1086.
16. **B. Seok Han, Beom Park C., Takasuka N., Nomura E., Taniguchi H., T. Tsuno and H. Tsuda.** 2001. A ferulic acid derivate, ethyl 3-(4-geranloxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoate, as a new candidate chemopreventive agent for colon carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research*. 92: 404-409.
17. **Carvajal Millan, Rascón-Chu A., Marquez Escalante, Micard V. and Gardea A.** 2007. Maize brand gum: extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*. 69: 280-285.
18. **Classen D., Arnason J., Serratos J., Lambert J., Nozzolillo C. and Philogene B. J.** 1990. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the Maize Weevil. Cimmyt's Collections. *Journal of Chemical Ecology*. 16 (2): 301-315.
19. **Cruz M., Espinoza F. and Villanueva P.** 2005. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2779-2787.
20. **Chavarria E.** Tesis Licenciatura. 2007. Dímeros de ácido ferúlico del nejayote de maíz: evaluación de la actividad antioxidante de extractos enriquecidos en dímeros/hidrodímeros de ácido ferúlico. Facultad de Química. UNAM. México. D.F.
21. **Ewald C. and Modig Fjelkner.** 1999. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chemistry*. 64: 231-235.
22. **FAO.** 1993. El maíz en la nutrición humana. *Alimentación y Nutrición*. 3.
23. **Faulds, C., Kroon P., Saulnier L., Thibault J. F. and Williamson G.** 1995. Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydrate Polymers*. 27: 187-190.
24. **Fennema Owen R.** 1993. *Química de Alimentos*. Editorial Acribia. 5^o Edición. Zaragoza. 213-230, 725-727.
25. **Fonseca. P. M.** 1991. El maíz y su entorno histórico, económico e industrial en México. *Universidad Iberoamericana*. 35-56.
26. **Gasson M. and W. Kitamura.** 1998. Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273-277, 4163-4170.

- 27. González V. K.** Tesis Licenciatura. 2009. Obtención y esterificación de dímeros de ácido ferúlico. Facultad de Química. UNAM. México. D.F.
- 28. Hagerman A. E. and Riedly K. M.** 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1887-1892.
- 29. Hartley R. D., Morrison W. and Borneman W.S.** 1990. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry*. 29: 3705-3709.
- 30. Huang Z., L. Dostal and J. Rosazza,** 1993. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2244-2250.
- 31. Ishii T.** 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*. 127: 111-127.
- 32. Kroon P. A. and Williamson G.** 1999. Hidroxycinnamates in plants and food: currents and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 355-361.
- 33. Leighton F. and Urquiaga I.** 2001. Polifenoles del vino y salud humana, antioxidantes y calidad de Vid. *Revista antioxidantes y Calidad de Vida*. 7: 5-13.
- 34. Lopez. B. M.** Tesis Licenciatura. 1986. Cinética de difusión acuosa y reacción de gelatinización en la nixtamalización del maíz. Facultad de Química. UNAM. Mexico. D.F.
- 35. Maillard M. N. and Berset C.** 1995. Evolution of antioxidant activity during linking, role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 1789-1793.
- 36. Malovaná S., García F., Pérez J. and Rodriguez M.** 2001. Optimization of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytical Chemical*. 428: 245-253.
- 37. Matthaus B.** 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. 50.12:3444-3452.
- 38. M. Tsuchiyama, T. Sakamoto, T. Fujita, S. Murata and H. Kawasaki.** 2006. Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Biophysical*. 1760: 1071-1079.
- 39. Miyamoto K., Ueda J. and Takeda.** 1994. Light- induce increase in the contents of ferulic and diferulic acids in cell-walls of Avena coleoptiles-its relationship to growth inhibition by light. *Physiology Plantarum*. 92: 350-355.

- 40. Norma Mexicana. NMX-FF-034/1-SCFI-2002.** Productos alimenticios no industrializados para consumo humano- cereales-parte 1: Maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado- especificaciones y métodos de prueba.
- 41. Norma Oficial Mexicana. NOM-FF-34-1982.** Productos alimenticios no Industrializados para uso humano-cereales-maiz (*Zea mays*) Especificaciones.
- 42. Ou S., Luo Y., Xue F., Huang C., and Zhang Liu** 2007. Separation and purification of ferulic acid in alkaline–hydrolyzate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *Journal of Food Engineering*. 78: 1298-1304.
- 43. Overhage J., Steinbuchel A. and Priefert H.** 2003. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vainillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6569-6576.
- 44. Padilla E., Ruiz E., Redondo S., Gordillo Moscoso A., and T. Tejerina.** 2005. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content 01 Spanish wines. *Europe Journal Pharmacology*. 517: 84-91.
- 45. Poblete Marcos.** Tesis Licenciatura. 2013. Curvas de ruptura en carbón activado a partir de la adsorción de compuestos orgánicos volátiles emitidos en refinerías. Facultad de Química. UNAM. México. D.F.
- 46. Ralph J., Bunzel M., J. Marita, Hatfield R. D. and H. Steinhart.** 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*. 3: 79-96.
- 47. Ralph J., Quideau S., Grabber J. H. and Hatfield R.D.** 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell wall. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*. 1: 3485-3498.
- 48. Rastija V., Srećnik G. and Saric M.** 2009. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*. 115: 54-60.
- 49. Renger A. and Steinhart Hans.** 2000. Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *Europe Food Research Technology*. 211: 422-428.
- 50. Sánchez M. and Peña M. J.** 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyls. *Plant Physiology*. 111: 941-946.
- 51. Saulnier L., Morat C., Elgorriaga M., Bonni E. and Thibault J.F.** 2001. Thermal and enzymatic treatments for the release of ferulic of free ferulic acid from maize bran. *Carbohydrate Polymers*. 45: 269-275.

- 52. Saulnier L. and Thibault J.F.** 1999. Ferulic acid and diferúlico acids as components of sugar-bee pectins and mize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 79: 396-402.
- 53. Secretaria de Economía.** 2012. Análisis de la cadena de Valor Maiz-tortilla. *Situación actual y factores de competencia Local*. 225-239.
- 54. Shin H.D., S. McClendon, F. Taylor and R. Ruizher-Chen.** 2006. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185. *Biotechnology and Bioengineering*. 95: 1109-1114.
- 55. Silva L., Andrade P., Valentao P., Trujillo M. and Velázquez E.** 2005. Analysis of non-coloured phenolics in red wine. Effect of Dekkera bruxellensis yeast. *Food Chemistry*. 89: 185-189.
- 56. Sindhu M. and T. Abraham.** 2004. Ferulic Acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloil esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 24 (2-3): 59-83.
- 57. Sladkovsky R., Solich P. and Urbánek M.** 2004. High-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine using off-line isotachophoretic pretreatment. *Journal of Chromatography*. 1040: 179-184.
- 58. Sigma Aldrich.** 2013. Catálogo de productos, reactivos y materiales para laboratorio.
- 59. Smith B. G. and Harris P. J.** 2001. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry*. 56: 513-519.
- 60. Stamatis H., Sereti V. and Kolisis F.N.** 2001. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of molecular catalysis*. 11: 323-328.
- 61. Taek Y. and J. Hee-Oh.** 2003. Characterization of physicochemical properties of ferúlic acid. *Archives of Pharmacal Research*. 26: 1002-1008.
- 62. T. B. and F. Liu.** 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science*. 66: 709-723.
- 63. Turner J. A. and Rice E. L.** 1975. Microbial decomposition of ferulic acid in soil. *Journal of Chemical Ecology*. 1: 41-58.
- 64. Valenzuela B. and Nieto K.** 1996. Grasas y aceites. *Ministerio de Educación y Ciencia*. 47(3): 186-196.

- 65. Velioglu Y. S., G. Mazza L. and B. D. Omaha.** 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46: 4113-4117.
- 66. Waldron K. W.** 1996. Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochemical Analysis*. 7: 305-31.
- 67. Ward G., Y. Hadar, I. Bilkis, L. Konstantinovsky and C. Dosoretz.** 2001. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 18734-18741.
- 68. Wende G., Waldron K. W.** 1999. Developmental changes in cell-wall ferulate and dehydrodiferulates in sugar beet. *Phytochemistry*. 52: 819-827.
- 69. Z. Zhao and Moghadasian M. H.** 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid. *Food Chemistry*. 109: 691-702.

Referencias electrónicas:

1. [http:// www.fao.org.mx](http://www.fao.org.mx)
2. [http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
3. [http:// www.botanical-online.com/salvado.htm](http://www.botanical-online.com/salvado.htm) Información del 25 de septiembre de 2012.
4. [http:// www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm](http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm) Información del 20 de febrero de 2012.
5. [http:// www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx)
6. [http:// www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/1996a2012.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/1996a2012.pdf)

(Ultimo acceso el 23 de agosto de 2012).