



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo
Integral Regional-Unidad Oaxaca**

**“Evaluación del efecto anticancerígeno y
antiinflamatorio de los ácidos fenólicos presentes en
nejayote derivado del maíz variedad Bolita”**

Tesis que para obtener el grado de:
**Maestra en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento
de Recursos Naturales**

Presenta:

Itandehui Arriaga González

Directores de tesis:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 26 de enero del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de CIIDIR-OAXACA en su Sesión (Unidad Académica)

ordinaria No. 10 celebrada el día 12 del mes NOVIEMBRE de 2018 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Arriaga	Apellido Materno:	González	Nombre (s):	Itandehui
-------------------	---------	-------------------	----------	-------------	-----------

Número de registro: B 1 8 0 9 9 8

del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Evaluación del efecto anticancerígeno y antiinflamatorio de los ácidos fenólicos presentes en nejayote derivado del maíz variedad Bolita

Objetivo general del trabajo de tesis:

Evaluar el efecto anticancerígeno de la fracción de compuestos fenólicos aislados del nejayote de maíz azul variedad Bolita en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de mama (MCF-7).

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas 2° Director: Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

Las instalaciones del CIIDIR-OAXACA (Laboratorio de tecnologías agroalimentarias)

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de tesis
Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

2° Director de tesis
Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal

Aspirante
Arriaga González Itandehui

Presidente del colegio
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL C.I.I.D.I.R. UNIDAD OAXACA I.P.N.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Santa Cruz Xoxocotlán siendo las 10 horas del día 26 del mes de enero del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca para examinar la tesis titulada:

Evaluación del efecto anticancerígeno y antiinflamatorio de los ácidos fenólicos presentes en nejayote derivado del maíz variedad Bolita de la alumna:

Apellido Paterno:	Arriaga	Apellido Materno:	González	Nombre (s):	Itandehui
--------------------------	----------------	--------------------------	-----------------	--------------------	------------------

Número de registro:

B 1 8 0 9 9 8

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software anti plagio turnitin, se encontró que el trabajo de tesis tiene 21% de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: (Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)

El mayor porcentaje de similitud se localizan en la parte del marco teórico, en donde el programa anti plagio ha identificado conceptos y palabras técnicas que son empleadas de manera amplia y común en este y otros trabajos de técnicos y de investigación en el área de productos naturales y la evaluación de su actividad biológica, para referirse a fenómenos biológicos, químicos y bioquímicos. Aquellos conceptos que derivan, como conclusiones de trabajos/proyectos de investigación son referenciados a sus respectivos autores/depositarios de los derechos intelectuales de manera correcta a través del texto. Los resultados y conclusiones plasmados en el manuscrito de tesis son resultados exclusivos y derivados del trabajo de investigación realizado por la C. Itandehui Arriaga González.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación anti plagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

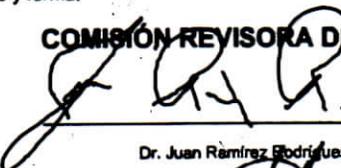
Los resultados y conclusiones plasmadas en esta tesis de posgrado son de carácter original, inéditos y derivados exclusivamente del trabajo de investigación realizado por la C. Itandehui Arriaga González.

Dicha información fue evaluada por la comisión revisora facultada para tal actividad; misma que hizo saber de las inconsistencias, errores y comentarios a la C. Itandehui Arriaga González, misma que realizó las correcciones/ajustes necesarios/solicitadas mismas que fueron aprobadas por la citada comisión en tiempo y forma.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS



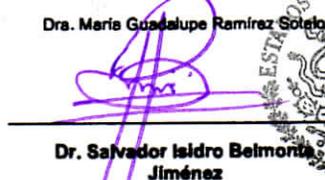
Director de Tesis
Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas



Dr. Juan Ramírez Rodríguez



Dra. Maris Guadalupe Ramírez Sotelo



Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



2° Director de Tesis (en su caso)
Dr. Luis Gerardo Berrada Bernal



Dr. Sadóth Barral Torres



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Oaxaca de Juárez**, el día **26** del mes de **enero** del año **2021** la que suscribe **Arriaga González Itandehui** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales** con número de registro **B180998** adscrito al **Centro de Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas** y el **Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal**, y cede los derechos del trabajo intitulado **“Evaluación del efecto anticancerígeno y antiinflamatorio de los ácidos fenólicos presentes en nejayote derivado del maíz variedad Bolita”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Hornos 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71230. Teléfonos: (951) 5170610**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Arriaga González Itandehui

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal por su apoyo incondicional como director de tesis y como amigo.

A la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas por su tiempo, paciencia y por el apoyo en el financiamiento de materiales durante la fase experimental del trabajo.

A la M. en C. Laura Victoria Aquino por su tiempo y sugerencias durante la elaboración de la tesis.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca por las facilidades prestadas para la realización de los estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de la maestría.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por proporcionar los granos caracterizados de maíz variedad bolita.

Índice

Índice	i
Lista de tablas	iv
Lista de figuras	iv
Lista de ecuaciones	v
CAPÍTULO I. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación	3
1.3. Antecedentes	4
1.4. Hipótesis	6
1.5. Objetivos	7
CAPÍTULO II. Marco teórico	8
2.1. Nixtamalización y nejayote	8
2.2. Principales compuestos fenólicos en maíces	9
2.2.1. Interacción entre la matriz vegetal y los compuestos fenólicos	10
2.3. Compuestos fenólicos	10
2.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos	12
2.3.2. Ácido ferúlico	13
2.3.3. Extracción de compuestos fenólicos	14
2.3.4. Purificación de compuestos fenólicos mediante procesos de adsorción	15
2.4. Técnicas cromatografías empleadas para separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	15
2.4.1. Separación de compuestos por cromatografía en columna	15
2.4.2. Cromatografía en capa fina	16
2.4.3. Cromatografía de líquidos HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia)	16

2.5.	Señalización celular en el proceso de apoptosis	17
2.5.1.	Transducción de Señales	17
2.5.2.	Comunicación Celular	18
2.5.3.	Mecanismos de señalización celular	21
2.5.4.	Apoptosis	22
2.5.5.	Cáncer	22
2.5.5.1.	Cascada metastásica	23
2.6.	Actividad antioxidante y antiinflamatoria de compuestos fenólicos	24
2.6.1.	Acción de compuestos fenólicos sobre células cancerígenas	25
2.6.2.	Inflamación	25
2.6.2.1.	Fases de la Inflamación	26
2.6.2.2.	Interleucinas	27
2.7.	Modelos celulares y bioensayos	28
2.7.1.	Cultivos y líneas celulares	28
2.7.2.	Línea celular de cáncer cervicouterino HeLa	30
2.7.3.	Línea celular de cáncer de mama MCF-7	31
2.7.4.	Método del MTT	31
2.7.4.1.	Interacción de las células durante el método de MTT	32
2.7.4.2.	IC 50 (concentración media máxima inhibitoria)	32
	Capítulo III. Metodología	33
3.1.	Material vegetal	33
3.2.	Pretratamiento (nixtamalización)	33
3.3.	Criterios de selección de la variedad de maíz para obtención de nejayote	33
3.4.	Cuantificación del ácido ferúlico por HPLC-UV	34
3.4.1.	Preparación de las muestras	34
3.4.2.	Cuantificación	35

3.5.	Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en el nejayote	35
3.5.1.	Separación de la fracción de compuestos fenólicos presentes en el nejayote por cromatografía preparativa	35
3.5.2.	Evaluación cualitativa de ácidos fenólicos por cromatografía en capa fina	36
3.6.	Purificación del nejayote con el uso de sistemas de adsorción/desorción	36
3.6.1.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocolteu	37
3.6.2.	Capítulo 2 Caracterización y cuantificación de ácido ferúlico mediante HPLC-UV	37
3.7.	Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH	38
3.8.	Evaluación de la citotoxicidad en modelos <i>in vitro</i>	39
3.8.1.	Cultivo de líneas celulares cancerígenas HeLa y MCF-7	39
3.8.2.	Tinción celular con 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolium (MTT)	39
3.8.3.	Inhibición celular (%)	40
3.8.4.	Dosis media inhibitoria IC50	40
	Diseño experimental	41
	Análisis de los datos	41
	Capítulo IV. Resultados	42
4.1.	Selección de la variedad de maíz para obtención de nejayote	42
4.2.	Concentración del ácido ferúlico en las fases recuperadas por cromatografía preparativa.	44

4.3. Perfil de compuestos fenólicos en el nejayote	45
4.4. Concentración de la fracción de compuestos fenólicos mediante sistemas de adsorción/desorción	45
4.5. Capacidad antioxidante	46
4.6. Citotoxicidad	47
4.6.1. Porcentaje de inhibición celular para HeLa y MCF-7	47
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Recomendaciones	51
Capítulo VI. Bibliografía	52
<hr/>	
ANEXO A. Método de extracción y concentración de ácido ferúlico presente en el nejayote derivado de maíz azul	60
ANEXO B. Curva de calibración de ácido ferúlico	61
ANEXO C. Identificación cualitativa de los compuestos fenólicos del nejayote por cromatografía en capa fina	62

Lista de Tablas

Tabla 1. Estructura de compuestos fenólicos	12
Tabla 2. Fases del proceso inflamatorio y mediadores	26
Tabla 3. Función de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias	27
Tabla 4. Fases móviles para obtención de fracciones en cromatografía en columna.	36
Tabla 5. Diseño experimental bioensayos	41

Tabla 6.	Concentraciones de ácido ferúlico en variedades de maíz	42
Tabla 7.	Presencia e identificación cualitativa de ácidos fenólicos en el nejayote	45

Lista de figuras

Figura 1.	Estructura del grano de maíz	9
Figura 2.	Interacción de los compuestos fenólicos dentro de la matriz vegetal	10
Figura 3.	Fenoles simples	12
Figura 4.	Ácidos hidroxibenzoicos	12
Figura 5.	Ácidos hidroxicinámicos	12
Figura 6.	Estructura del ácido ferúlico	13
Figura 7.	Transducción de señales	17
Figura 8.	Comunicación endocrina u hormonal	18
Figura 9.	Neurotransmisión	18
Figura 10.	Neuroendocrina	19
Figura 11.	Paracrina	19
Figura 12.	Yuxtacrina	20
Figura 13.	Autocrina	20
Figura 14.	Señalización celular	21
Figura 15.	Proceso carcinogénico y metastásico	23
Figura 16.	Actividad antioxidante	24
Figura 17.	Células HeLa	30
		31

Figura 18. Células MCF-7	34
Figura 19. Proceso de selección de la variedad de maíz para obtención del nejayote.	43
Figura 20. Ácido ferúlico presente en fenoles libres y ligados del nejayote	44
Figura 21. Desorción de ácido ferúlico mediante diversos	46
Figura 22. Efecto de los sistemas de adsorción/desorción sobre el porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos (ácido ferúlico) presentes en el extracto de maíz	47
Figura 23. Inhibición celular en línea de cáncer HeLa	48
Figura 24. Inhibición celular en línea de cáncer MCF-7	

Lista de ecuaciones

Ecuación 1 Capacidad antioxidante por el metodo del radical DPPH	38
Ecuación 2 Inhibición celular (%)	40

CAPÍTULO I. Introducción

El Estado de Oaxaca produce anualmente 532,187 toneladas de maíz; el 90% son maíces de variedades criollas como: bolita, cónico, tepecintle, zapalote chico y chalqueño, entre otros. A su vez, el consumo per cápita de maíz en el estado es de 220 kg anuales a través del consumo de productos mayormente obtenidos por el proceso de nixtamalización (tortillas y tostadas), de donde se deriva el maíz nixtamalizado tras el contacto de los granos con una solución alcalina de óxido de calcio. En donde el agua residual de la cocción alcalina tras extraer los granos es conocido popularmente como nejayote. Dicho subproducto de desecho en ocasiones es utilizado como pienso para ganado y en su mayoría vertido en el drenaje o el suelo causando la erosión del mismo, sin tomar en cuenta los compuestos derivados del proceso, particularmente ácidos fenólicos desprendidos de la aleurona, así como la posible actividad biológica de estos en el tratamiento de enfermedades degenerativas como esclerosis, diabetes y en diversos tipos de cáncer (Paredes *et al.*, 2009; Escalante *et al.*, 2013).

En México se presentan anualmente 148,000 nuevos casos de cáncer, de los cuales 82,400 corresponden a mujeres (IMSS, 2015); siendo el cáncer cervicouterino y de mama los de mayor prevalencia (INEGI, 2018).

Como tratamiento para la erradicación de células cancerígenas se emplean la radioterapia, quimioterapia y algunas terapias sistémicas (Poivetin *et al.*, 2016).

De igual forma, se ha investigado y evaluado el efecto anticancerígeno de tratamientos alternativos empleando metabolitos secundarios como los ácidos fenólicos aislados de especies vegetales como *Lippia graveolens*, *annona muricata* y *Phaseolus vulgaris* (Muñoz, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2007; Mercado *et al.*, 2018). Éstos compuestos son extraídos de tejidos vegetales y de subproductos como los residuos frutícolas (Escalante *et al.*, 2013).

Los ácidos fenólicos se han caracterizado por su actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana y antioxidante en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Muñoz *et al.*, 2007; Van *et al.*, 2012; Mercado *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se evaluará el efecto anticancerígeno de los ácidos fenólicos y la presencia del ácido ferúlico como principal compuesto extraído del nejayote derivado de la nixtamalización del maíz azul (*Zea mays*) variedad bolita en modelos *in vitro*.

1.1. Planteamiento del problema

México es el principal fabricante de productos de maíz derivados del proceso de nixtamalización, en donde los granos son sometidos a cocción con una solución alcalina de hidróxido de calcio que modifica la naturaleza de los almidones contenidos en los granos; y el efluente (nejayote) es desechado; sin considerar que en este se concentra la fracción proteica del grano, albúminas, algunas prolaminas en suspensión, compuestos fenólicos y antocianinas, así como la fibra soluble e insoluble (Paredes *et al.*, 2009).

En México la producción de este subproducto denominado nejayote asciende a más de 50 millones de metros cúbicos anuales (Scheel, 2016). Este suele utilizarse como pienso pecuario pero la mayor parte del subproducto es vertido en tuberías o ríos, generando un problema ambiental debido a sus características químicas (Suárez *et al.*, 2016).

Dentro de los diferentes compuestos con actividad biológica en el nejayote de maíces pigmentados, la investigación básica y aplicada se ha enfocado en la recuperación, identificación y evaluación de antocianinas (Ruíz *et al.*, 2008; Salinas *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013) en maíces de las variedades bolita, chalqueño, cónico y mixteco, dejando de lado otros compuestos de interés biológico como los ácidos fenólicos aromáticos; los cuales podrían ser empleados como antimicrobianos, procesos enzimáticos y en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, esclerosis y cáncer.

1.2. Justificación

Las investigaciones actuales se han enfocado en el aislamiento y evaluación de compuestos con actividad biológica (particularmente compuestos fenólicos) para el tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer. Estos compuestos pueden ser sintetizados por vía química o ser aislados de fuentes vegetales y también pueden derivarse de procesos industriales (Valderrama *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2016), tales como producción de destilados (bagazo de agave); productos de fermentación (orujo de vino y semillas); cascarillas de cereales como el arroz (*Oryza sativa*) y también pueden obtenerse de subproductos de desecho de procesos como la nixtamalización (González *et al.*, 2005; Paladino *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2016; Téllez *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2018). Estos compuestos pueden ser empleados como tratamientos alternativos complementarios contra enfermedades crónico degenerativas como el cáncer (Páez Aguirre, 2011).

Los compuestos fenólicos han mostrado tener actividad antioxidante y citotóxica en modelos *in vitro* e *in vivo* (Badary *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2010). El aislamiento y/o síntesis de estos compuestos resulta un proceso costoso, por ello en el presente trabajo se evaluó el potencial farmacológico de los ácidos fenólicos presentes presentes en el nejayote en eventos neoplásicos en etapa temprana donde la esperanza de remisión y supervivencia es alta (Montero *et al.*, 2005; Bianchi, 2011; Páez Aguirre, 2011).

1.3. Antecedentes

Se ha descrito la estructura y composición química de más de 8000 compuestos fenólicos presentes en diversos frutos, verduras, semillas y cereales como arroz, avena y maíz (Manson, 2003).

Entre los principales ácidos fenólicos encontrados en dichos cereales están los ácidos cafeico, vanílico, siríntrico y ácido p-cumárico, entre otros. Entre los principales compuestos encontrados en el maíz se encuentran el ácido clorogénico, vanílico, siríntrico, cafeico y ácido ferúlico (Milbury *et al.*, 2004).

El ácido ferúlico ha sido el compuesto de mayor concentración encontrado en el pericarpio de granos y cereales. Encontrado como éster de ácidos cinámicos unido a cadenas de arabinosilanos de hemicelulosa (Slavin *et al.*, 2000; Adom *et al.*, 2002; Slavin *et al.*, 2004).

Salinas *et al.*, (2012) identificaron diversos compuestos fenólicos en granos de maíz crudo (*Zea mays*) de las variedades chalqueño, cónico y bolita; las cuales mostraron un alto contenido de antocianinas y de compuestos fenólicos aromáticos. Moreno *et al.*, (2007) identificaron tres ácidos fenólicos en maíz azul nixtamalizado; p-cumárico, ferúlico y sináptico; donde el ácido ferúlico mostró la mayor actividad biológica: antiinflamatoria, anticancerígena, antimicrobiana y citotóxica (Altamirano, 1997; Kanno *et al.*, 2005; Madeiros *et al.*, 2008).

En la actualidad, se pretende aprovechar los excedentes agrícolas y frutícolas así como los subproductos de desecho como fuentes comerciales de compuestos de interés biológico. Por ejemplo, Ballesteros *et al.*, (2015) evaluaron el efecto citotóxico de los compuestos fenólicos de residuos frutícolas (pericarpio) en líneas de cáncer MDa-MB-231 (adenocarcinoma de mama); obteniendo una citotoxicidad del 60% de las células cancerígenas a una concentración de 0.125 mg/g_{bs}.

Otro subproducto de desecho sin aprovechamiento y con poca investigación es el nejayote (líquido obtenido tras la cocción alcalina de los granos de maíz), del cual no se ha evaluado la actividad biológica de los compuestos fenólicos que contiene.

Herrera *et al.*, (2017) evaluaron el efecto citotóxico de extractos de maíz azul crudo y de la tortilla de maíz azul en líneas tumorales HeLa (cáncer cervicouterino), obteniendo valores de citotoxicidad del 68% en una concentración de 1.00 mg/g_{bs} y del 61.04% a

una concentración de 0.25-0.50 mg/g_{bs} respectivamente.

Sotero *et al.*, (2017) probaron extractos y tortilla elaborada con maíz azul de la variedad mixteco 1.00 mg/g_{bs} en células de cáncer de próstata (LNCaP) en concentraciones de 1.00 mg/g obteniendo una citotoxicidad celular del 50% y del 66% respectivamente.

Xuan *et al.*, (2014) evaluaron el efecto anticancerígeno del ácido ferúlico en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, obteniendo un efecto citotóxico del 68% para ambas líneas celulares a una concentración de 0.001 mg/g_{bs}.

1.4. Hipótesis

La fracción de compuestos fenólicos del nejayote derivado de maíz azul variedad bolita tienen actividad, citotóxica sobre modelos *in vitro* en células tumorales de cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de mama (MCF-7).

1.5. Objetivos

General

Evaluar el efecto anticancerígeno de de la fracción de compuestos fenólicos aislados del nejayote de maíz azul variedad bolita en líneas celulares de cáncer cervico uterino (HeLa) y cáncer de mama (MCF-7).

Específicos

- Evaluar un sistema de adsorción/desorción por afinidad electroestática.
- Evaluar la capacidad antioxidante y la concentración de fenoles totales en el nejayote derivado del maíz azul variedad bolita.
- Evaluar la citotoxicidad de los compuestos fenólicos aromáticos en el nejayote sobre líneas celulares HeLa y MCF-7.

Capítulo II. Marco teórico

Actualmente, se incursiona en la obtención de nuevas sustancias con actividad terapéutica; mediante el uso de metabolitos secundarios generados por especies vegetales (Galbis, 2004). Por consiguiente, se ha evaluado la actividad biológica de compuestos fenólicos como flavonoides, flavonoles, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos fenólicos cinámicos. Mismos que han exhibido actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria e hipoglucémica (Kinsella *et al.*, 1993). Algunos de estos compuestos fenólicos han sido aislados de subproductos de desecho frutícola, encontrándose en estos un alto contenido de compuestos con actividad biológica. Otro subproducto de desecho con posible potencial biológico es el nejayote debido a su contenido de compuestos fenólicos, minerales y sólidos suspendidos.

2.1. Nixtamalización y nejayote

En México desde hace más de 500 años se realiza el proceso de nixtamalización; el cual consiste en someter granos de maíz a una cocción alcalina con hidróxido de calcio durante determinado tiempo y temperatura. Esto principalmente, para desprender el pericarpio del maíz mediante la hidrólisis de la hemicelulosa y lograr así la gelatinización parcial o total del almidón degradando y solubilizando los componentes de las paredes celulares del pericarpio y produciendo ablandamiento e hinchamiento del endospermo y el germen (Iturriaga, 2015). Finalmente, tras extraer los granos por filtración en dicho proceso, es generado un subproducto denominado nejayote (sobrenadante), el cual aproximadamente asciende a una producción mensual de 4.2 millones de metros cúbicos (Salmerón *et al.*, 2003). Este efluente es arrojado en sistemas de drenaje o directamente al entorno, lo cual lo convierte en un desecho altamente contaminante para el medio ambiente, debido a su alcalinidad y alta demanda bioquímica de oxígeno 7,000 a 10,000 mg/L (Bartolomé *et al.*, 1997; Carvajal, 2007).

En la actualidad, mediante estudios físicoquímicos se han identificado compuestos biológicos importantes en el nejayote, tales como: ácidos, vitaminas, fibra soluble e insoluble y minerales (Romero *et al.*, 2013). Particularmente, los compuestos fenólicos

son liberados de la matriz vegetal cuando las estructuras poliméricas son afectadas por la temperatura y el medio alcalino rompiendo enlaces de tipo éster liberando fenoles en el agua de cocción alcalina, quedando estos compuestos de forma libre en el medio acuoso (Paredes *et al.*, 2006). Algunos estudios proponen el uso del nejayote como pienso para animales, obtención de bio-plásticos, medio de crecimiento para probióticos, conservador de alimentos, coadyuvante en procesos inflamatorios y como posible agente anticancerígeno (Domínguez, 2012).

2.2. Principales compuestos fenólicos en maíces

La estructura del maíz está constituida porcentualmente según la (FAO, 1993), por el pericarpio (05-06%); endospermo (80-85%); germen (10-12%) y la aleurona (02-03%), la cual se muestra en la [figura 1](#).

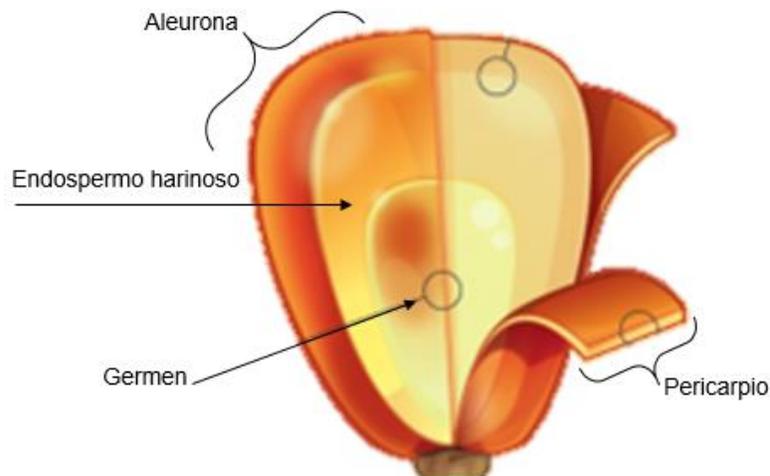


Figura 1. Estructura del grano de maíz.

Se han identificado compuestos fenólicos en las variedades de maíz morado y azul, tales como: antocianinas, ácido p-cumárico, vanílico, procatequico, ferúlico, ácido hidroxibenzoico, cafeico, siríngico y algunos flavonoides como kaempferol, naringenina y quercetina (Ramos., 2012; Hernández *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2018). De los cuales prevalece el ácido ferúlico por encontrarse en mayor cantidad, ubicándose particularmente en la aleurona y el pericarpio del grano en forma libre y ligada mediante enlaces éster a heteroxilanas y arabinoxilanas (Valenciaga *et al.*, 2004).

2.2.1. Interacción entre la matriz vegetal y los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están presentes en frutos y vegetales, estos se encuentran de forma libre o ligada dentro de la matriz vegetal (Lincoln *et al.*, 2006). Los fenoles dentro del grano de maíz pueden ser solubles (fenoles libres, glucosilados y esterificados) e insolubles (ligados) (Yu *et al.*, 2002). Estos pueden formar uniones con polisacáridos y algunas proteínas, debido a la interacción por puentes de hidrógeno, y entre los átomos de oxígeno de los enlaces glicosídicos (Heredia *et al.*, 2002) polisacáridos como hemicelulosa y pectina interaccionan con los grupos carboxilo de los compuestos fenólicos (figura 2). Estas interacciones dependen de la porosidad y el tamaño de partícula que penetra dicha matriz vegetal (Calixto, 2010).

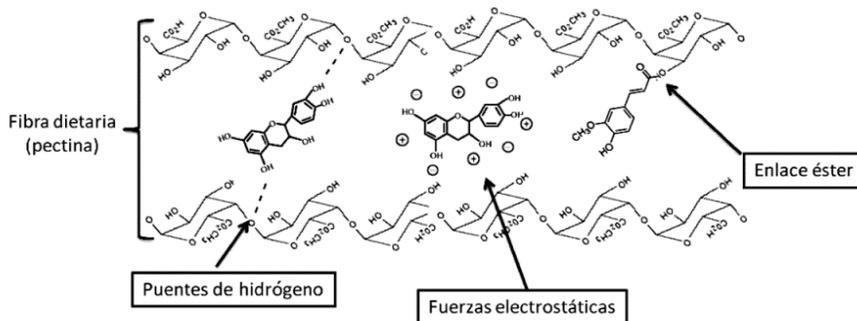


Figura 2. Interacción de los compuestos fenólicos dentro de la matriz vegetal.

2.3. Compuestos fenólicos

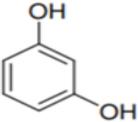
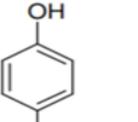
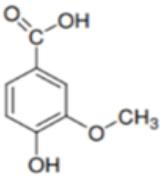
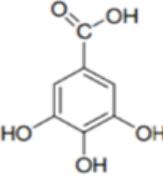
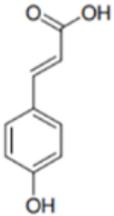
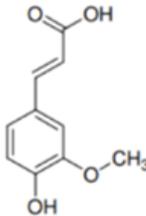
De manera general los ácidos fenólicos son clasificados ácidos hidroxycinámicos e hidroxibenzoicos; su principal función en la célula vegetal es actuar como metabolito secundario en el crecimiento, reproducción y como agente protector contra algunos patógenos (Anaya *et al.*, 2001). Estos compuestos abarcan desde moléculas simples como el ácido fenólico hasta compuestos más complejos como taninos y flavonoides. Estos compuestos también son responsables del color en las plantas (Taiz *et al.*, 2006). Diversas investigaciones han evaluado la actividad biológica de los compuestos fenólicos, así como la capacidad antioxidante de estos compuestos frente a los radicales libres, causantes del envejecimiento (oxidación celular), así como el daño celular (Prieto *et al.*, 2011). En muchos casos el efecto de los estos compuestos contra

el cáncer es atribuido a mecanismos bioquímicos como la apoptosis (muerte celular programada), la intervención o irrupción algunas de las fases del ciclo de la célula, la inhibición de la síntesis de ADN y la modulación y alteración de la expresión vías de transducción de señales por algunas enzimas (ciclooxigenasas y las proteínas quinasas) (Yang *et al.*, 2001).

2.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

En la [Tabla 1](#) se muestran las estructuras químicas de los principales ácidos fenólicos encontrados en maíces (*Zea mays*):

Tabla 1. Estructura de compuestos fenólicos.

Estructura química	Compuestos fenólicos
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Resorcinol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Hidroquinona</p> </div> </div> <p><i>Figura 3. Fenoles simples</i></p>	<p>Fenoles simples</p> <p>Estos compuestos contiene dos o tres grupos hidroxilo en el anillo aromático (Figura 3).</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido vanílico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido gálico</p> </div> </div> <p><i>Figura 4. Ácidos hidroxibenzoicos.</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido <i>p</i>-cumárico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido ferúlico</p> </div> </div> <p><i>Figura 5. Ácidos hidroxicinámicos.</i></p>	<p>Fenoles ácidos</p> <p>Pueden dividirse en: hidroxibenzoico e hidroxicinámicos.</p> <p>a) <i>ácidos hidroxibenzoicos</i></p> <p>Compuestos con un grupo carboxílico (grupo ácido) y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático (Figura 4).</p> <p>b) <i>ácidos hidroxicinámicos</i></p> <p>Esta clase de ácidos fenólicos se caracteriza por la presencia del grupo CH=CH-COOH en remplazo del grupo COOH presente en los ácido hidroxibenzoico.</p> <p>El doble enlace carbono (C=C) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces π estabilizando los radicales libres e incrementando la capacidad antioxidante de la molécula (Figura 5).</p>

Dentro de la matriz vegetal del maíz los principales compuestos fenólicos son el ácido vanílico, cumárico, clorogénico, gálico y el ácido ferúlico en mayor concentración, mismo que ha mostrado tener actividad biológica sobre eventos neoplásicos, antiinflamatorios y enfermedades del corazón, mediante la inhibición de oxidación de lipoproteínas tras la neutralización de radicales libres (Shimada., 2002).

2.3.2. Ácido ferúlico

El ácido ferúlico o 4-hidroxi-3-metoxicinámico, forma parte de los ácidos hidroxicinámicos. Denominados así debido a la sustitución del grupo–OH en el anillo aromático. Su peso molecular es de 194.186 g/mol, con un punto de fusión de 169-72°C (Figura 2).

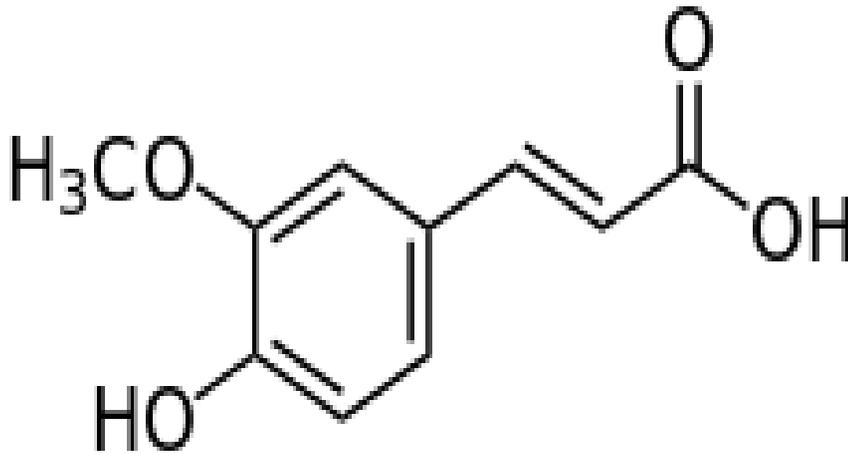


Figura 6. Estructura del ácido ferúlico.

Este ácido fenólico se encuentra en las paredes vegetales, unido por enlaces covalentes a polisacáridos. Su función dentro de la matriz vegetal es brindar rigidez y resistencia contra los microorganismos. Este es producido mediante la metabolización de la fenilalanina y tirosina por la ruta de biosíntesis del ácido shikímico (Srinivasan *et al.*, 2007).

El ácido ferúlico se puede obtener a partir del γ -orizanol, como subproducto industrial de la cascarilla de arroz, también de los efluentes industriales de la nixtamalización del maíz y de la planta *Ferula asafoetida* (Assafat *et al.*, 2003).

Los mayores contenidos de ácido ferúlico han sido encontrados en cereales como: maíz en concentraciones de 64.6 a 175 mg/100g_{bs} y en arroz con 29 mg/100g_{bs} (Adom *et al.*, 2002).

El estudio de dicho ácido se ha enfocado para la producción de vainillina, ya que el ácido ferúlico puede ser utilizado como precursor de dicho compuesto (Morales *et al.*, 2013). Otros estudios también investigan su efecto antiinflamatorio, antioxidante, y antimicrobiano (Wang *et al.*, 2005).

2.3.3. Extracción de compuestos fenólicos

Para realizar una óptima y completa extracción de los compuestos de interés, en este caso ácidos fenólicos libres y ligados dentro de la matriz vegetal, se pueden emplear procesos de extracción: sólido-líquido y líquido-líquido. De igual forma, para lograr la extracción mediante la ruptura de la matriz vegetal se puede realizar una hidrólisis en medio ácido o alcalino, así como el uso de enzimas (Fontanals *et al.*, 2010).

a) Extracción líquido-líquido: Aplica para licores, efluentes y materiales líquidos. Los solventes a seleccionar deben tener poca miscibilidad con la muestra a tratar, tal como acetato de etilo y/o éter etílico.

b) Extracción sólido-líquido: Aplicada para separar compuestos de residuos sólidos. Regularmente se usan solventes de mediana a muy alta polaridad, tal como: agua acidificada, etanol, MeOH o acetona.

c) Hidrólisis para extracción de compuestos fenólicos

Para extraer compuestos de interés dentro de una matriz vegetal o polisacáridos como la lignina, celulosa y hemicelulosa, es necesario hidrolizar estos compuestos para así finalmente dejar libres los compuestos fenólicos. La hidrólisis puede realizarse con agua, vapor y algunos solventes como HCl y H₂SO₄ (Trejo *et al.*, 2016).

2.3.3.1. Proceso de hidrólisis

Durante este proceso, los protones del agua catalizan la hidrólisis de los polisacáridos, incidiendo principalmente en los grupos cetilo presentes en la hemicelulosa y rompiendo los enlaces ésteres de estos. A su vez, liberando los compuestos contenidos en la matriz vegetal (compuestos fenólicos ligados) y convirtiendo la hemicelulosa en azúcares.

2.3.4. Purificación de compuestos fenólicos mediante procesos de adsorción

Uno de los métodos más empleados para la purificación de compuestos fenólicos, son los procesos de adsorción química o física, en donde se extrae materia de una fase y esta es concentrada sobre la superficie de otra, éste proceso se puede originar por a) naturaleza química, b) por fuerzas de Van der Waals o bien y c) de tipo electrostático. Por consiguiente, los sorbatos a utilizar pueden ser resinas poliméricas, sílica y comúnmente el carbón activado (Soto *et al.*, 2011).

Algunos adsorbentes como las resinas poliméricas han mostrado mayor capacidad de adsorción de compuestos, debido a que se han incorporado grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, metoxilo, aminas, etc.) dentro de la matriz polimérica y esto a su vez, ha permitido mayores rendimientos en el aislamiento de compuestos de interés (Shen *et al.*, 2007). Se han empleado resinas de poliestireno divinilbenceno durante la extracción y purificación de compuestos fenólicos (Ku *et al.*, 2000; Kuen *et al.*, 2010).

Factores como las fuerzas iónicas y el pH intervienen en la adsorción de compuestos fenólicos, en particular un pH ácido mejora la adsorción de estos compuestos ya que no se disociarán en el medio (Pompeu *et al.*, 2010).

2.4. Técnicas cromatografías empleadas para separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

2.4.1. Separación de compuestos por cromatografía en columna

Entre los métodos mayormente empleados para la obtención de fracciones ricas en ácidos fenólicos, se emplea la cromatografía de exclusión en columna, mediante el uso de una fase estacionaria que actúa como un tamiz molecular: sílica o sílice (materiales polares), la cual retendrá el analito de interés basada en la polaridad de la partícula, la cual puede o no ser arrastrada por una fase móvil o eluyente (solventes con distinta polaridad o afinidad). El solvente se dejará eluir a través de la columna y se tomarán alícuotas de este cada determinado tiempo (Fuentes *et al.*, 1997).

2.4.2. Cromatografía en capa fina

La identificación de compuestos por cromatografía puede ser de tipo cualitativa y cuantitativa empleando una fase estacionaria y una móvil. En esta técnica se utiliza un adsorbente cromatográfico, es decir, una lámina rígida de materiales afines al analito empleado (sílica gel, alúmina, y otras) colocada sobre soporte o cubeta para cromatografía, misma que deberá mantenerse herméticamente cerrada para evitar que la fase móvil (solvente) se volatilice. Posteriormente, se coloca la fase móvil y se impregna el ambiente (cubeta de cromatografía). La muestra a analizar se coloca (inyecta) sobre la placa de cromatografía y esta a su vez, se introduce verticalmente dentro de la cubeta de cromatografía. La muestra comenzará a subir por capilaridad sobre la placa, y también por afinidad con la fase móvil (Sharapin *et al.*, 2000).

2.4.3. Cromatografía de líquidos HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia)

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica empleada en la separación de sustancias, debido a la sensibilidad y a la adecuación para cuantificar distintos analitos (proteínas, carbohidratos, fenoles, y sustancias orgánicas). El equipo empleado es un cromatógrafo, el cual consta de una bomba, inyector de muestra, algunos detectores y finalmente una columna de cromatografía, la cual se elige basado en la afinidad del analito a estudiar. La separación puede realizarse por polaridad o carga eléctrica de la molécula, así como tamaño de la misma.

Por otra parte, también debe elegirse el modo de elución durante la corrida; este puede ser de forma isocrática o continua (escalonada) para separación de componentes y en gradiente el cual aplica para compuestos con amplio rango de polaridad. Mediante esta elución se aumenta la eficacia de separación (Harris, 2007).

2.5. Señalización celular en el proceso de apoptosis

2.5.1. Transducción de Señales

Durante este proceso, la célula convierte un tipo de señal o estímulo a uno diferente. La mayoría de los procesos de transducción de señales requieren reacciones bioquímicas secuenciales en el interior de la célula (Jiménez *et al.*, 2003). En la [figura 7](#) se puede visualizar la transducción de una señal.

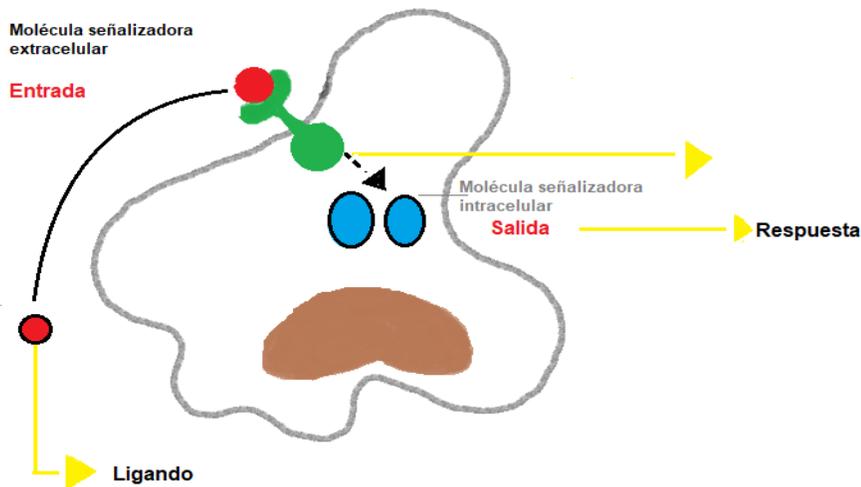


Figura 7. Transducción de señales.

- a) **Señal:** Molécula que transmite información específica para coordinar una respuesta a otras células o moléculas. La señal puede ser grande (proteína) o pequeña (neurotransmisor), hidrofílica (proteína, amino ácido) o hidrofóbica (hormonas esteroidales, retinoides) (Jiménez *et al.*, 2003).
- b) **Receptor:** Es una proteína intra o extracelular de la célula blanco que se une a la molécula señal (ligando). Una célula responderá ante una señal si cuenta con receptores para ello (Taleisnik *et al.*, 2006).
- c) **Cascada de señalización:** El ligando se une al receptor e induce la activación de enzimas, que dan origen a reacciones intracelulares. Ejemplos: activación de proteínas quinasas, proteínas fosfatasa, proteínas que se unen a guanidín nucleótidos (proteínas G) y proteínas que se unen a promotores en la secuencia de ADN (Lodish *et al.*, 2006). La señal es regularmente transitoria. Una vez que la señal produce una respuesta celular esta es destruida.

2.5.2. Comunicación Celular

Esta se produce a través de diversos mecanismos, los cuales se muestran en las Figuras 8-13.

- a) **Endocrina u hormonal:** Mediante la interacción de hormonas glandulares, las cuales son liberadas dentro del torrente sanguíneo, a su vez actuando en diversos tejidos y órganos.

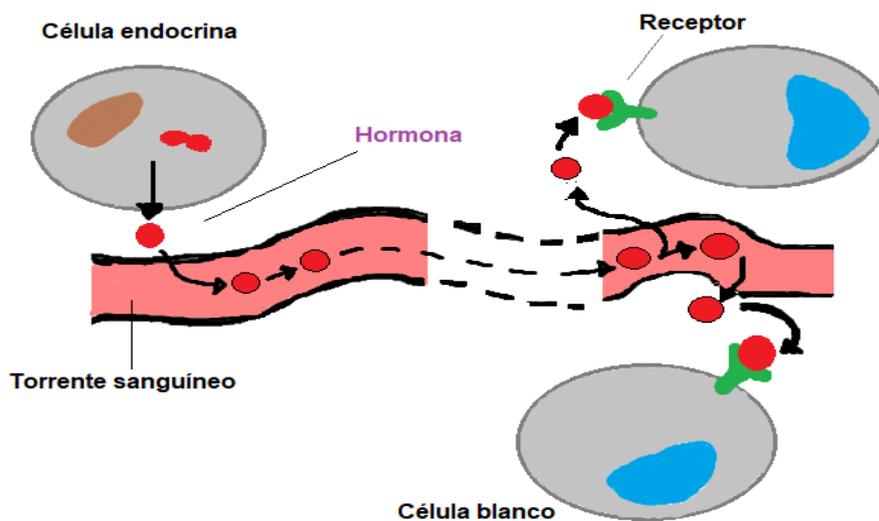


Figura 8. Comunicación endocrina u hormonal.

- b) **Neurotransmisión:** Durante el proceso se transmiten impulsos de neurona a neurona en la denominada sinapsis por intervención de neurotransmisores.

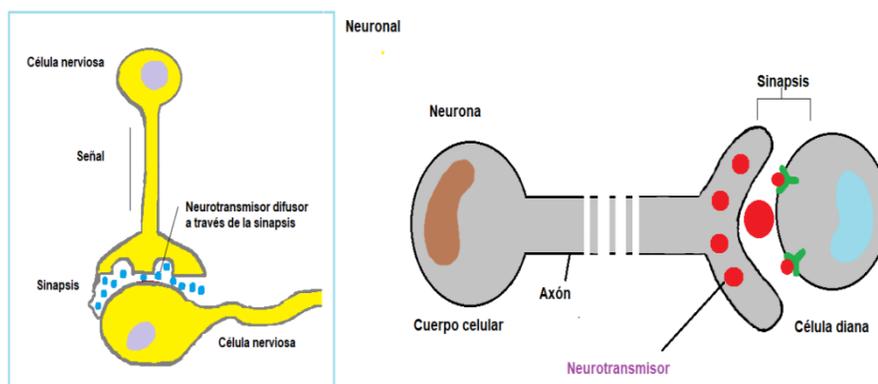


Figura 9. Neurotransmisión

c) **Neuroendocrina:** Se liberan señales por el torrente sanguíneo mediante impulsos nerviosos hasta encontrar la célula blanco.

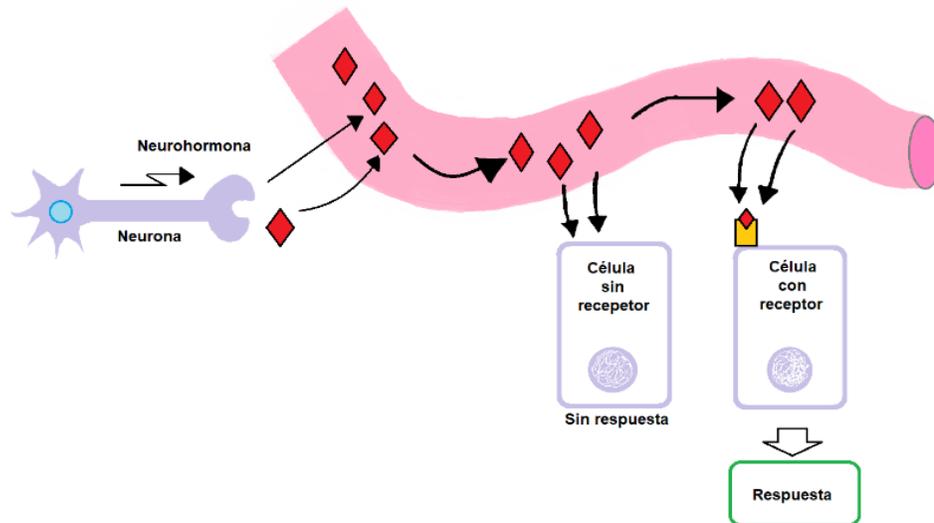


Figura 10. Neuroendocrina.

d) **Paracrina:** Es la comunicación a través de la liberación de mensajeros químicos (ligandos) en el espacio entre células. Esta comunicación permite que entre células cercanas o aledañas exista comunicación y coordinen actividades.

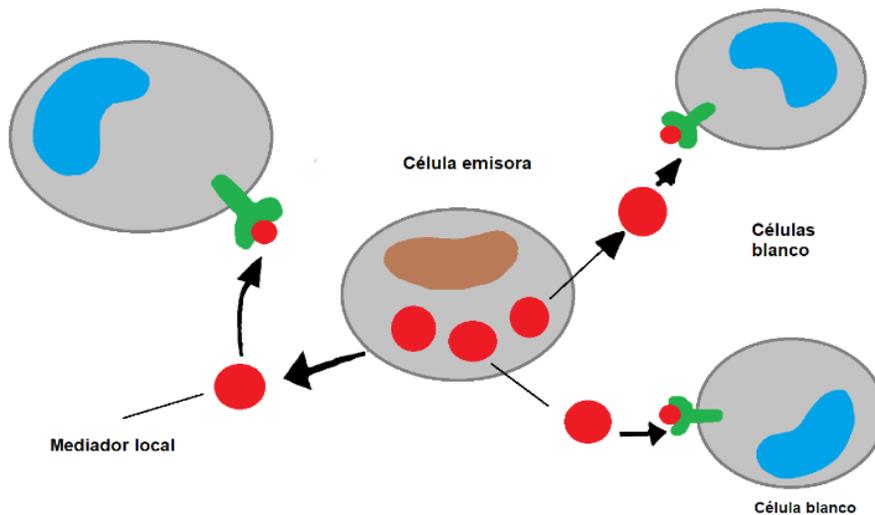


Figura 11. Paracrina.

- e) **Directa o yuxtacrina:** Existe comunicación entre células o con la matriz a través de moléculas de adhesión celular (por medio de uniones celulares).

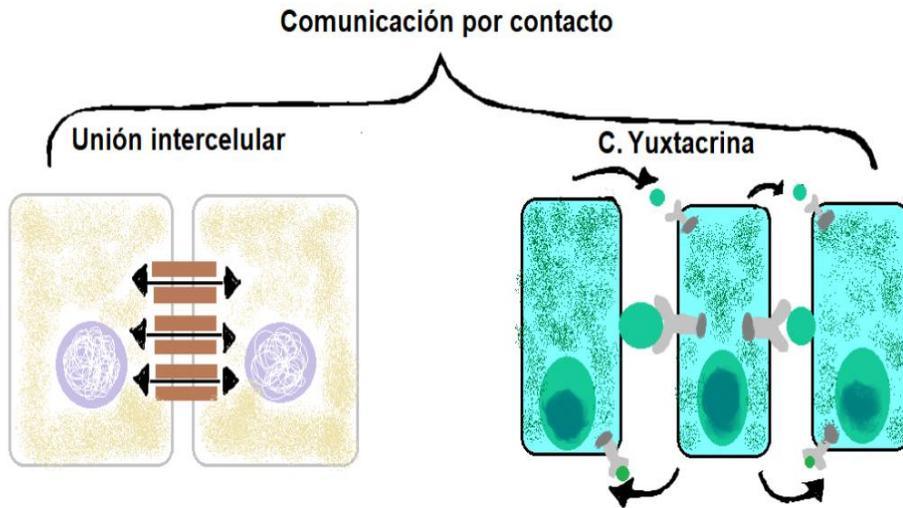


Figura 12. Yuxtacrina.

- f) **Autocrina:** La propia célula se auto envía señales liberando ligandos que se unirán a su propia superficie para regular su actividad metabólica.

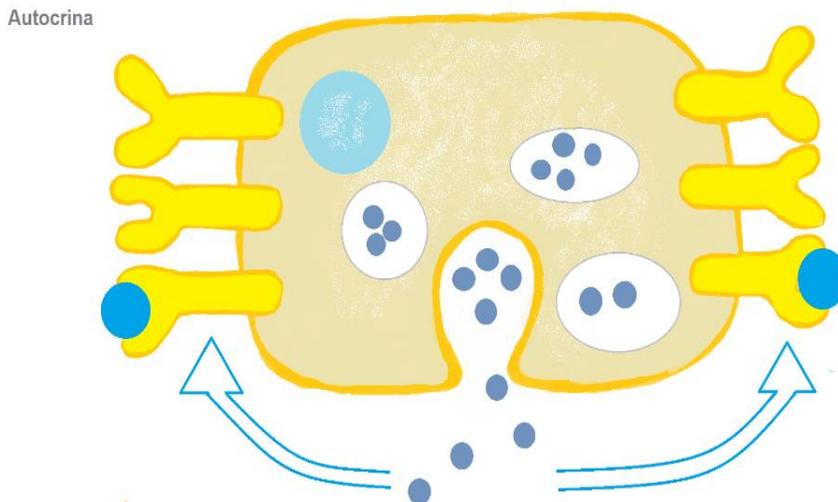


Figura 13. Autocrina.

2.5.3. Mecanismos de señalización celular

Las reacciones de transducción de señales se realizan por enzimas que producen segundos mensajeros y que en una vía han sido activadas por los segundos mensajeros de enzimas previas. Los procesos enzimáticos actúan como una cascada de señales, aumentando el número de moléculas participantes, lo que sirve como amplificador de la señal, justo en ese momento es emitida una señal que la respuesta celular (Taleisnik, 2006).

Estos procesos tan rápidos que pueden tardar milisegundos, en donde se apertura un canal y entran iones que producen una cascada de quinasas activadas por péptidos, proteínas o lípidos. El proceso también puede tardar horas o días activando algunos receptores nucleares como se puede apreciar en la [figura 14](#).

Su impacto puede ser medirse en diferentes niveles de la célula:

- Membrana citoesqueleto
- Núcleo (velocidad de transducción)

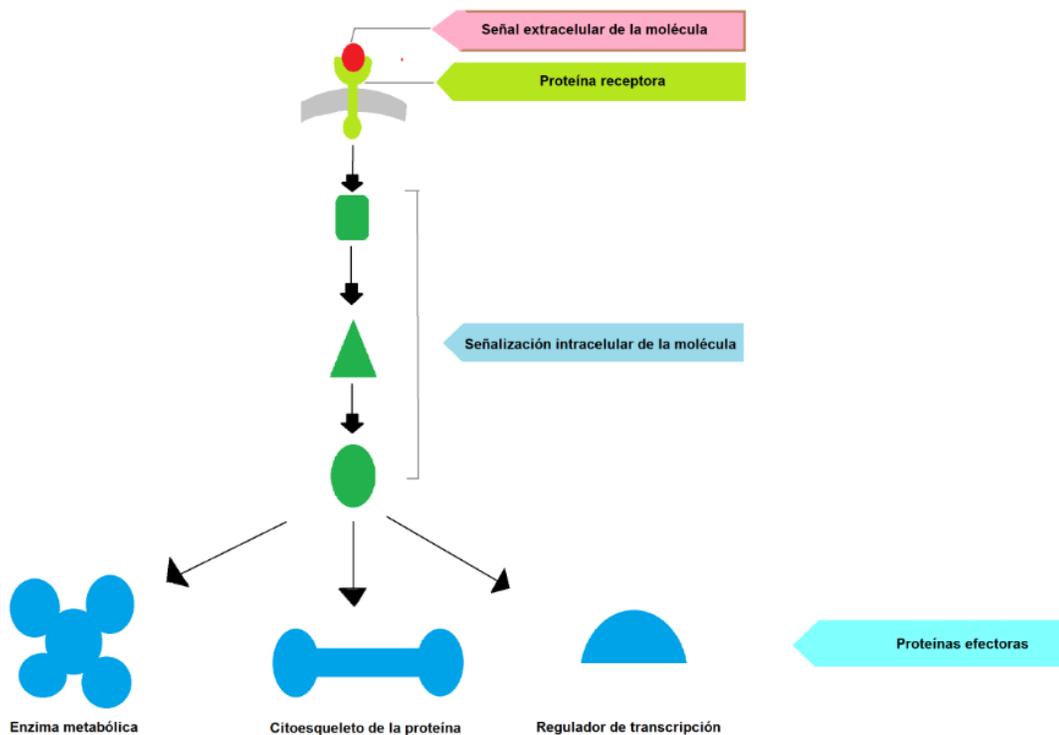


Figura 14. Señalización celular.

2.5.4. Apoptosis

Durante el ciclo celular en las etapas de producción, proliferación y muerte celular debe existir un equilibrio. Si se altera podría ser la causa de replicación celular excesiva generando enfermedades degenerativas como el cáncer (Jordán *et al.*, 2001). El control de las mutaciones acumuladas en las células, así como el ciclo celular, reparación de ADN y la eliminación de células con daño se realiza mediante el mismo proceso de apoptosis. El cual es un proceso de muerte celular programada (totalmente coordinada), este evento celular es caracterizado por la condensación de cromatina (encongimientto celular) y la formación de cuerpos apoptóticos. A diferencia del proceso de necrosis celular, en este la membrana celular se mantiene intacta y no hay presencia de inflamación. Dicho proceso protector es realizado para eliminar células dañadas o desconocidas para el sistema inmune y para evitar la replicación de estas (Widowati *et al.*, 2013).

El proceso de apoptosis se puede determinar observando la morfología celular (simetría de la célula), pruebas de electroforesis, por microscopia (tinciones), ensayos inmunoenzimáticos y por citometría de flujo (Moreno *et al.*, 2000).

Por otra parte, este proceso es distinto a la necrosis celular, en donde la degeneración celular y muerte celular surge por consecuencia de un daño severo por distintos agentes. Durante éste proceso la célula pierde la regulación y función del proceso osmótico, presenta lisis de la membrana y el contenido intracelular es liberado, afectando así a las células aledañas. A su vez, la célula necrótica presenta inflamación debido al daño celular (Baynes *et al.*, 2019; Marí *et al.*, 2019).

2.5.5. Cáncer

El cáncer es un trastorno genético caracterizado por la proliferación excesiva y descontrolada de células que invaden tejidos y órganos (Muñoz *et al.*, 1997). Este es el resultado de procesos como el crecimiento y proliferación de células cancerígenas denominadas tumores o neoplasias, por lo cual, se produce la metástasis, en donde las células migran a tejidos circundantes tras penetrar el sistema circulatorio sanguíneo.

Logrando como resultado la pérdida de control de un proceso básico celular como es la capacidad de duplicar su contenido en ADN y otros componentes dando lugar a otras células cancerígenas.

Por lo tanto, un tumor puede formarse a partir de una célula con alteraciones genéticas a través de determinado tiempo (Kufe *et al.*, 2003; Nussbaum *et al.*, 2016). Es decir, durante el ciclo celular al replicarse una célula con mutaciones da lugar a oncogenes (codificadores de proteínas que intervienen en el ciclo y promueve la proliferación celular) o en dado caso inactivan algunos genes que supresores (codificadores de proteínas que detienen el ciclo). Finalmente, el equilibrio entre la proliferación de células sanas y su apoptosis se rompe y se reproducen de forma descontrolada células dañadas que siguen mutando e invaden el organismo haciéndose extensivas (Burgués *et al.*, 2005).

2.5.5.1. Cascada metastásica

Las células neoplásicas tienden a incrementar su metabolismo y por ende requieren mayor cantidad de oxígeno; existen genes que codifican factores que a su vez, estimulan la angiogénesis tumoral, lo cual es indispensable para iniciar la cascada metastásica en donde la célula cancerígena navega por el espacio intercelular y atraviesa la membrana basal, introduciéndose en el vaso sanguíneo o linfático y sobreviviendo a la respuesta inmunológica y anidando en los tejidos (Tiwari, 2012) El proceso cancerígeno y metastásico se ilustra en la [Figura 15](#).

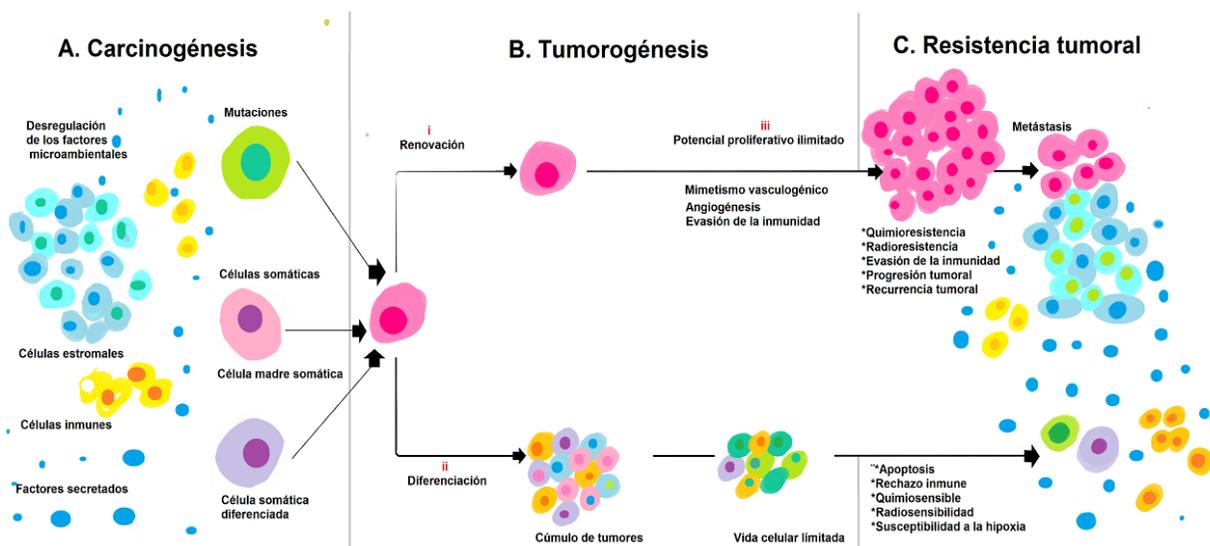


Figura 15. Proceso carcinogénico y metastásico.

2.6. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de compuestos fenólicos

Los radicales libres son sustancias inestables y reactivas con un electrón desapareado, estos captan electrones de moléculas estables dentro del organismo y logran el equilibrio, entonces se produce una reacción en cadena en donde la molécula que ha donado el electrón para el apareamiento queda inestable y se convierte en un radical libre (Avello *et al.*, 2006). Por lo tanto, los compuestos antioxidantes juegan un papel primordial en la absorción, neutralización de radicales libres (Halliwell, 1990).

El estrés oxidativo causado por radicales libres es uno de los factores importantes durante la progresión de la carcinogénesis asociada a la inflamación. Las células inflamadas producen radicales libres de oxígeno y nitrógeno que causan daño a los ácidos nucleicos y las proteínas, induciendo la peroxidación lipídica de la parte hidrofóbica en la membrana celular y por lo tanto generando hidroperóxidos cíclicos tóxicos, causantes de graves perturbaciones en la membrana de la célula e incluso mutaciones en el ADN (Pehlivan *et al.*, 2016). La inhibición de radicales libres se muestra en la [Figura 16](#).

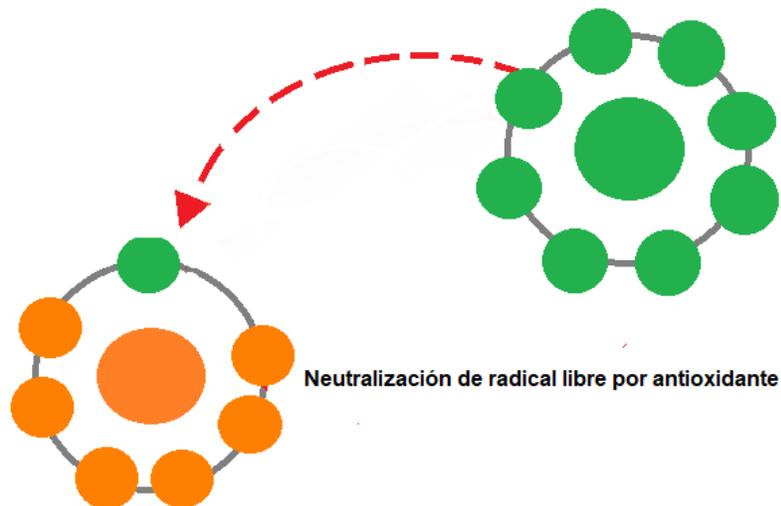


Figura 16. Actividad antioxidante.

2.6.1. Acción de compuestos fenólicos sobre células cancerígenas

El potencial antioxidante de los ácidos fenólicos se encuentra estrechamente vinculado con el efecto quimiopreventivo y anticancerígeno. Esto, debido a que el mecanismo de estos influye directamente sobre la regulación del ciclo celular, principalmente en la producción de aniones superóxido, adhesión celular y migración celular (Nasr *et al.*, 2015).

Los ácidos fenólicos también actúan sobre la transcripción celular y la fosforilación de proteínas, lo cual conduce a la apoptosis y detención del ciclo de las células (Jeong *et al.*, 2017). Regularmente, hay un equilibrio entre la proliferación de células y la apoptosis (muerte celular programada).

2.6.2. Inflamación

La inflamación es un proceso tisular (en los tejidos de órganos) constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas químicas o biológicas causadas a las células del organismo (González *et al.*, 2015), en donde la respuesta inflamatoria contribuye al daño tisular a través de radicales libres de N_2 y O_2 pudiendo contribuir así a la mutagénesis de las células durante la regeneración del tejido afectado. Este proceso permite la aparición de clones resistentes a la muerte celular o con mayor capacidad proliferativa, lo que marca el inicio del cáncer (Houghton *et al.*, 2004).

La respuesta celular ante agentes dañinos se caracteriza por la expresión local de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, las cuales regulan el reclutamiento secuencial de leucocitos y estimulan a fibroblastos y células endoteliales para dividirse y producir componentes de remodelación de tejido y neovascularización. Siendo el principal regulador el factor proteico de transcripción de ADN NG-kB (factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), que activa la transcripción de factores de crecimiento, proteínas como COX2, el factor antiapoptótico sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), citocinas proinflamatorias, y quimiocinas (Li *et al.*, 2002).

2.6.2.1. Fases de la Inflamación

Clásicamente, la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso; calor, rubor, tumor y dolor, debiendo el calor y rubor a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco de la inflamación. El tumor se produce por edema y cúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor (Vinay *et al.*, 2013). Las fases de la inflamación se muestran a continuación en la [Tabla 2](#):

Tabla 2. Fases del proceso inflamatorio y mediadores.

Fase	Proceso
a) Liberación de mediadores	Son moléculas, las mayores partes de ellas, de estructura elemental, mismas que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
b) Efecto de los mediadores	Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Procediendo en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
c) Regulación del proceso inflamatorio	Como en la mayor parte de las respuestas inmunes, el proceso inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
d) Reparación	Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

2.6.2.2. Interlucinas

Se denominan interlucinas a las citocinas producidas por leucocitos, estas regulan el crecimiento y activación de otros leucocitos. Las interlucinas son proteínas y glucoproteínas que actúan en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Algunas citocinas incluyen al grupo de las interlucinas (IL), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y las quimocinas (Fragoso *et al.*, 2009).

Las citocinas modulan la actividad de otros mediadores de respuesta celular; mediante su interacción con algunos receptores de membrana específicos de la célula diana (Brasó *et al.*, 2003).

A continuación en la [Tabla 3](#) se describen algunas citocinas importantes dentro del proceso inflamatorio.

Tabla 3. Función de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

Citocinas	Acción	Lugar de síntesis	Acciones más importantes
IL-1	Proinflamatoria	Células mononucleares	Pirógeno
IL-2	Antiinflamatoria	Linfocito Th	Factores de crecimiento de células T induciendo a la proliferación de todos los tipos de células linfocitarias. A su vez, estimula la síntesis de interferón de IL-1TNF- α . Una excesiva producción de IL-2 exhibe una excesiva activación linfocitaria.
IL-4	Antiinflamatoria	Linfocitos Th, mastocitos y basófilos monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos	Bloquea la síntesis de citocinas, inhibe la síntesis de ON pirógeno, síntesis de inmunoglobulinas. Pueden ser producidas por algunas células tumorales.
IL-6	Proinflamatoria Antiinflamatoria	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.	
IL-8	Proinflamatoria		Activación de la síntesis de proteínas de fase aguda. Factor quimiotáctico y activador de neutrófilos.

2.7. Modelos celulares y bioensayos

2.7.1. Cultivos y líneas celulares

Las líneas celulares son células de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en cultivo, poseen capacidad de proliferación ilimitada, debido a que han sufrido un proceso de transformación, que puede ocurrir espontáneamente, ser inducido por compuestos químicos, radiaciones o virus, esto implica la alteración de las características de crecimiento (Freshney, 2000). Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: adherentes (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto tienen que desprenderse de esa superficie antes de utilizarlas. Y las células no adherentes (células en suspensión) que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo (Morgan *et al.*, 1995).

La muestra de que las células y los tumores sólidos humanos pueden dar origen a líneas celulares continuas fomentó su empleo en investigaciones sobre cáncer, e incrementó su uso como método complementario de tamizaje previo a los ensayos *in vivo* en el grupo de desarrollo de fármacos del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (Cordero, 2002).

La propagación de líneas celulares requiere que el número de células aumente continuamente, las condiciones de cultivo se seleccionan para favorecer al máximo la proliferación celular. Estas condiciones son: baja densidad celular, baja concentración de Ca^{2+} y la presencia de factores de crecimiento. Dentro de los requerimientos generales de un cultivo de líneas celulares están: el medio de cultivo nutritivo, condiciones de pH, temperatura 37°C y ambiente controlado (5% de CO_2 y el 95% de humedad relativa) (Beltrán *et al.*, 2016). El medio nutritivo básicamente debe ser un medio líquido que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimiento aportados por el suero fetal bovino (FBS) con el que generalmente se suplementa el medio. Adicionalmente, los medios de cultivo celular contienen rojo de fenol como indicador de pH, para permitir un constante monitoreo de esta variable (Freshney, 2000).

Después de preparar el medio básico deben ser añadidos otros suplementos, de modo

que pueda utilizarse en el cultivo celular, como por ejemplo antibiótico para disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos y suero que proporciona una serie de nutrientes importantes para las células (Alvarado *et al.*, 2002).

Algunas ventajas de las líneas celulares mencionadas por Morgan *et al.*, (1995) son que estas permiten el fácil manejo a diferencia de las células primarias que crecen continuamente y por lo tanto, pueden obtenerse un mayor número de células. Además, existe amplia información sobre ellas (Arango *et al.*, 2012).

Entre los principales usos y experimentos con líneas celulares están: la evaluación de la toxicidad de compuestos químicos, basados fundamentalmente en dos pilares: el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material generalmente orgánico (vivo o no), sobre el cual se aplica *in vitro* el xenobiótico (compuesto del cual se evaluará la citotoxicidad). Dicha citotoxicidad se valora mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo (Repetto, 1995).

Según Cragg *et al.*, (2003) en la década de los noventa el descubrimiento de agentes antitumorales de origen natural se basó en ensayos de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer, usando modelos *in vitro* e *in vivo* (Monks *et al.*, 1991).

Por ejemplo, el Instituto Nacional de Cáncer de los E.U. ha implementado nuevas investigaciones en modelos *in vitro* para el descubrimiento de nuevas drogas contra el cáncer. Fresney *et al.*, (2000) menciona que los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia; los primeros se emplean para determinar la proporción de células que se mantienen intactas inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático y los segundos permiten evaluar la capacidad de las células para proliferar y formar colonias tras ser tratadas con agentes citotóxicos y a su vez determinar las concentraciones letales de dichos agentes (IC₅₀) (Repetto, 2002).

2.7.2. Línea celular de cáncer cervicouterino HeLa

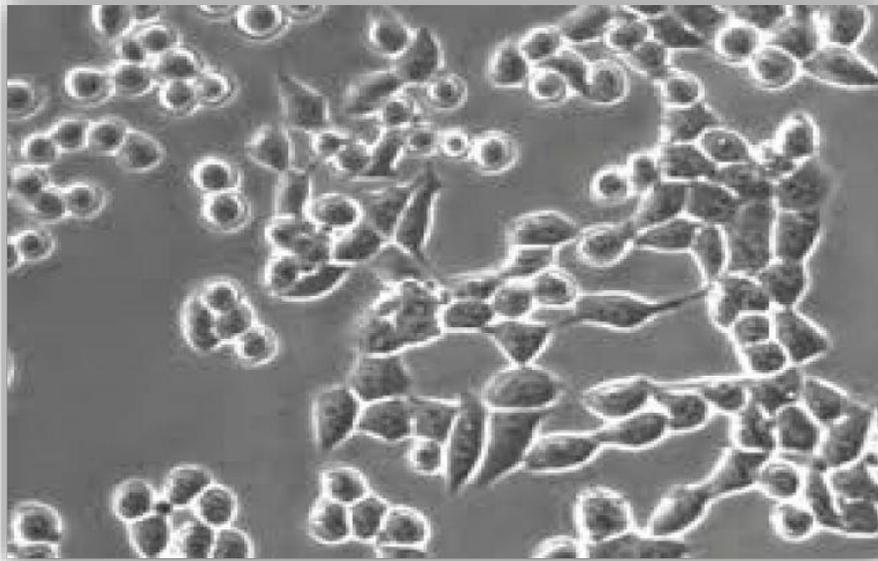


Figura 17. Células HeLa

Las células HeLa son células cancerosas de cérvix tienen un tamaño de 20 μm de diámetro con un núcleo de 10 micrones (figura 17). Tanto su cariotipo como su genoma son inusuales; los genes están llenos de errores y poseen copias adicionales de algunos cromosomas, presentando entre 76 y 80 cromosomas totales (Flores *et al.*, 2003).

La línea celular HeLa está infectada por el virus de papiloma humano, principal causante del cáncer en cuello uterino, esto hace que algunos cromosomas de las células HeLa presenten mutaciones. HeLa presenta una versión activa de una proteína llamada telomerasa durante la división celular. Esta evita que las células HeLa alcancen el límite Hayflick, el cual indica el número de replicaciones que podría tener una célula antes de la senescencia (Beltrán, 2016). En las células eucariotas (incluyendo las HeLa), el ciclo consta de 2 fases: interfase, donde las células se desarrollan, duplican el material genético y orgánulos y una fase mitótica, en donde surge la separación de dicho material, divide el citoplasma y da origen a otra célula (Mejías *et al.*, 2017). Las células HeLa realizan un ciclo de división celular cada 20 horas. Dentro de este ciclo la interfase dura 19 horas y la fase mitótica 1 hora. Las células normales (no cancerígenas) pueden dividirse en un número finito de ocasiones, mientras que las células HeLa pueden repetir el ciclo en infinidad de ocasiones.

2.7.3. Línea celular de cáncer de mama MCF-7

MCF-7 es una línea celular aislada por primera vez en 1970 del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años. Esta proviene del tejido de adenocarcinoma de mama con características de epitelio mamario diferenciado.

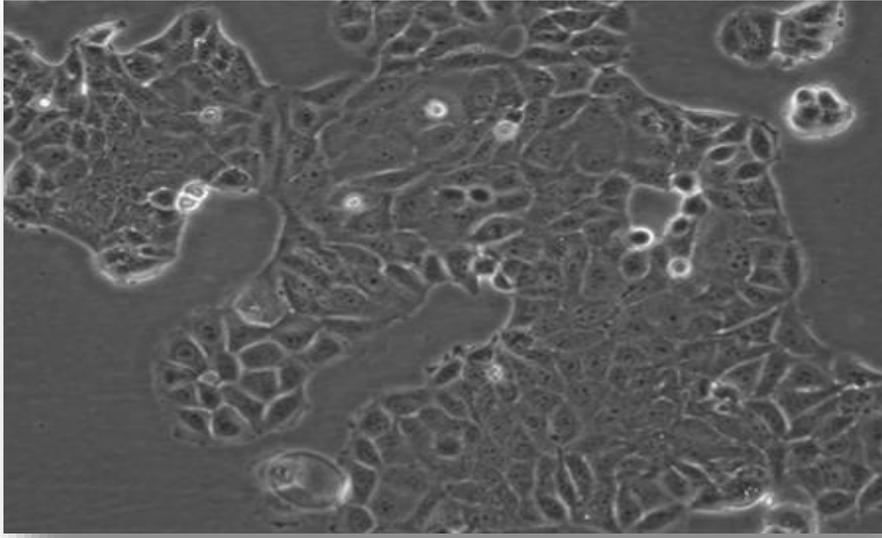


Figura 18. Células MCF-7.

Las células MCF-7 son células adherentes con un tamaño de célula de 20µm a 25 µm (figura 18). El medio recomendado es EMEM que contiene L-glutamina 2 mM, 0,01 mg/mL de insulina bovina (90%), suero bovino fetal (10%) y BSS de Earle que contiene 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 1 piruvato sódico mM (Beltrán, 2016).

2.7.4. Método del MTT

Para medir la inhibición y proliferación de las células se desarrolló un ensayo colorimétrico cuantitativo, basado en el uso de una sal de tetrazolio MTT (metiltiazol tetrazolio) ó (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro), en donde se cuantifican sólo células sobrevivientes y pueden medirse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540–570 nm (Mosmann, 1983).

2.7.4.1. Interacción de las células durante el método de MTT

El MTT (sal de tetrazolio amarilla) es empleado para medir la actividad y viabilidad de las células mediante el rompimiento causado por la reducción (aceptación de un H⁺) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de deshidrogenasas mitocondriales: succinato-deshidrogenasas, para formar cristales azules de formazan insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO).

La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en solución (Ángel, 1999). Este método está basado en la capacidad de las enzimas mitocondriales de las células viables para transformar la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazan. Este método regularmente es empleado para evaluar la sensibilidad de células humanas ante agentes quimioterapéuticos (Ferrari *et al.*, 1990).

2.7.4.2. IC 50 (concentración media máxima inhibitoria)

La IC₅₀ es la concentración de la sustancia o muestra a evaluar que causa la muerte del 50% de la población celular evaluada después de algún tratamiento (Cordero *et al.*, 2002). Ensayos de citotoxicidad como los de viabilidad se basan en la capacidad que tienen las células para excluir sustancias a las que son impermeables, estas muestran una interpretación instantánea. Dichos ensayos de viabilidad son empleados para medir la tasa de supervivencia directamente. En el caso de tinción con cristal violeta, las células que al ser expuestas al colorante no se tiñen se consideran viables y son de particular importancia para evaluar agentes tóxicos, los cuales ejercen sus efectos sobre la integridad de la membrana celular (Freshney, 1995).

Capítulo 3. Metodología

3.1. Material vegetal

Se evaluaron granos de tres diferentes variedades de maíz bolita y una de la variedad zapalote. Estos fueron donados e indentificados por el Centro de Investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con sede en el Estado de Oaxaca, México.

3.2. Pretratamiento (nixtamalización)

Los granos secos de maiz (*Zea mays*) de las cuatro variedades empleadas para las pruebas selección del material vegetal y obtención de nejayote fueron extraídos mecánicamente (desgranado) y sometidos a limpieza con una solución de hipoclorito de sodio al 2%.

Los granos de maíz fueron tratados según la metodología de Valderrama *et al.*, (2012) Estos fueron sometidos a un tratamiento térmico alcalino (con una solución de hidroxido de calcio al 1%; p/v) con un reposo de 16 h. Obteniendo los granos de maíz nixtamalizados y el efluente conocido como nejayote.

Los granos de maíz nixtamalizados (almidónes modificados) y la solución alcalina fueron separados mecánicamente; almacenando únicamente la solución (conocida como nejayote) en refrigeración a -20°C hasta su posterior análisis. A partir de esta sección, a esta solución se le denominara como nejayote.

3.3. Criterio de selección de la variedad de maíz para obtención de nejayote

El proceso para seleccionar la variedad de maíz para obtener el nejayote a trabajar se basó en las recomendaciones de Valderrama *et al.*, (2012); en donde el contenido del ácido fenólico predominante fue determinante. En el nejayote, el ácido ferúlico es el de mayor presencia, por lo cual se empleó el método de cromatografía por HPLC-UV para medir la concentración, [Figura 19](#).

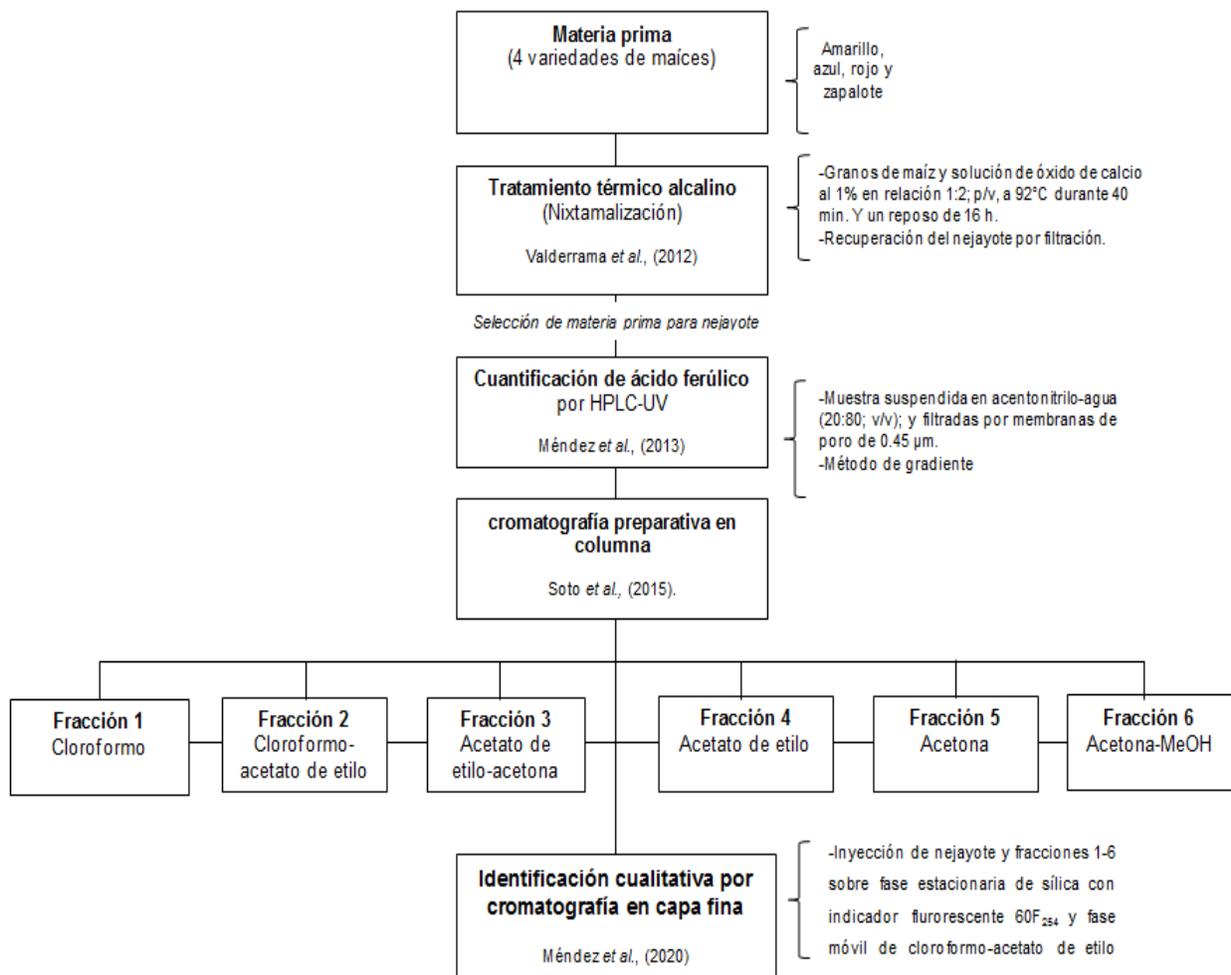


Figura 19. Proceso de selección de la variedad de maíz para obtención de nejayote.

3.3.1. Cuantificación del ácido ferúlico por HPLC-UV

Esta determinación se aplicó en muestras del nejayote de cuatro variedades de maíz, y en el nejayote purificado.

3.3.1.1. Preparación de las muestras

Se tomaron alícuotas de las muestras y fueron llevadas a sequedad por corriente de nitrógeno, protegidas de la luz solar y a temperatura ambiente. Estas fueron suspendidas en 2 mL de una solución acentonitrilo-agua (20:80; v/v); y filtradas por membranas de poro de 0.45 µm. Para la inyección cromatográfica se tomaron alícuotas de 20 µL de la muestra.

3.3.1.2. Cuantificación

Se realizó de acuerdo a la metodología de Méndez *et al.*, (2013) por cromatografía de líquidos acoplada a detector ultravioleta (Perkin Elmer, Flexar) .

Se empleó un método cromatográfico en gradiente. Como fase estacionaria se empleó una columna Thermo Fisher RP-Amida (15 cm x 4.6 mm x 5 µm). Las fases móviles consistieron en una solución de ácido ortofosfórico (0.85%; p/v) como fase A; y acetonitrilo como fase B. La separación de compuestos se realizó empleando un gradiente del disolvente lineal durante 20 min: 1min. A (85%), B (15%) ; 10 min. A(65%), B (35%) ; 10 min. A (15%), B (85%) ; y 3 min. Para equilibrar el sistema.

La absorbancia fue cuantificada a una longitud de onda de 310 nm.

Para la cuantificación del ácido ferúlico se empleó un modelo de regresión en un rango dinámico de 30 a 150 ppm; empleando el ácido ferúlico como estándar de referencia.

El contenido de ácido ferúlico se expresó como miligramos de equivalentes de ácido ferúlico por kilogramo de maíz en base seca (mgAF/g muestrabs).

3.4. Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en el nejayote

3.4.1. Separación de la fracción de compuestos fenólicos presentes en el nejayote por cromatografía preparativa.

Para la obtención de la fracción de compuestos fenólicos presentes en el nejayote purificado mediante cromatografía preparativa, se empleó la metodología propuesta por Torres *et al.*, (1994).

Se emplearon 15 gramos de sílica cromatográfica de 60 µm como fase estacionaria y como fase elutora se emplearon solventes con polaridad creciente, [Tabla 4](#).

Se emplearon como volúmenes de elución 15mL, y cada volumen de elución fue recuperado y almacenado a -20 °C en oscuridad para su posterior análisis.

Tabla 4. Fases móviles para obtención de fracciones en cromatografía en columna.

	Fase móvil	Indice de polaridad (Debyes)
1	Cloroformo	4.10
2	Cloroformo-Acetato de etilo	4.25
3	Acetato de etilo	4.40
4	Acetato de etilo-acetona	4.75
5	Acetona	5.10
6	Acetona-MeOH	5.10

3.5. Evaluación cualitativa de ácidos fenólicos por cromatografía en capa fina

Según la metodología de Méndez *et al.*, (2020) se empleó una fase estacionaria de sílica con revelador con indicador fluorescente 60F₂₅₄ y como fase móvil se empleó una solución de cloroformo-acetato de etilo (50:50; v/v).

Se obtuvo información acerca de la relación de frentes (RF) obtenida del nejayote purificado, así como de las relaciones de frente cuantificadas para los ácidos hidroxibenzoico, cumárico, ferúlico, vanílico, clorogénico y gálico, empleados como estándares de referencia. Las referencias de frente (REF) de las placas se compararon con la información recopilada en los manuales de Merk.

3.6. Purificación del nejayote con el uso de sistemas de adsorción/desorción.

La concentración de compuestos fenólicos del nejayote se realizó de acuerdo a la metodología de Soto *et al.*, (2015). Se evaluaron cuatro tipos de sistemas de adsorción/desorción mediante afinidad electroestática: i) sistemas aniónicos, ii) sistemas catiónico, y iii) sistemas aniónico-catiónico (relación 50:50, p/p).

El sistema de adsorción fue acondicionado antes de su uso con dos eluciones de 50 mL de agua desionizada. Y la activación del adsorbente se realizó con una elución de 50 mL de MeOH. El sistema de adsorción y el nejayote fueron mezclados en un tanque de agitación en una relación de 3:25 (p/v) por un tiempo de 3 h a 25 °C.

La desorción de la fracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a la metodología modificada de Méndez *et al.* (2013), usándose MeOH como fase elutora en una relación 5:25 (v/v).

La cama adsorbente y el nejayote empobrecido en compuestos fenólicos fueron separados por decantación mecánica. A la cama de adsorción se le adicionó MeOH y se permitió la desorción de los compuestos fenólicos por un lapso de 3 h a 25 °C. Se separaron por decantación la cama de desorción (perlas o resinas) y la solución desorbida rica en compuestos fenólicos. La cual de ahora en adelante se denominará como nejayote purificado. El cual se resguardó a -20 °C hasta su empleo.

3.6.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu

Se empleó la metodología modificada de Beltran *et al.*, 2013; tomando 100 µL de muestra más 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Posteriormente se adicionaron 750 µL de Na₂CO₃ al 20% (p/v; g/mL) incubándose la mezcla en obscuridad durante 1 h. Se midió la absorbancia a 760 nm. Se construyó un modelo de regresión lineal en un intervalo de con soluciones de ácido gálico en una concentración de 100 a 600 mg GAE/mL. Los fenoles totales se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por kilogramo de maíz azul en base seca (mgGAE/g de muestra_{abs.}).

3.6.2. Caracterización y cuantificación de ácido ferúlico mediante HPLC-UV

La metodología empleada fue de acuerdo a Méndez *et al.*, (2013). En donde alícuotas de las fracciones del nejayote fueron llevadas a sequedad mediante corriente de nitrógeno, protegidas de la luz solar y a temperatura ambiente. Estas fueron suspendidas en 2 mL de una solución acetonitrilo-agua (20:80; v/v); y filtradas mediante membranas de poro de 0.45 µm.

Se evaluaron alícuotas de 20 µL de las fracciones del nejayote previamente filtradas. Se empleó un método cromatográfico en gradiente. Como fase estacionaria se empleó una columna Thermo Fisher RP-Amida (15 cm x 4.6 mm x 5 µm). Las fases móviles consistieron en una solución de ácido ortofosfórico (0.85%; p/v) como fase A; y acetonitrilo como fase B. La separación de compuestos se realizó empleando un gradiente del disolvente lineal durante 20 min: 1min. A (85%), B (15%) ; 10 min. A(65%), B (35%) ; 10 min. A (15%), B (85%) ; y 3 min. Para equilibrar el sistema.

La absorbancia fue cuantificada a una longitud de onda de 310 nm.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se empleó un modelo de regresión en un rango dinámico de 30 a 150 ppm; empleando el ácido ferúlico como estándar de referencia.

El contenido de compuesto fenólicos se expresó como miligramos de equivalentes de ácido ferúlico por kilogramo de maíz en base seca (mgAF/g muestra_{bs}).

3.7. Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras a evaluar se realizó mediante el método de estabilización del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH*), de acuerdo a la metodología modificada de Álvarez *et al.*, (2013).

La mezcla de reacción consistió en diferentes diluciones del nejayote purificado (0–600 µL) en metanol a las que se les adicionó 600 µL de una solución metanólica de DPPH* (600 µg/mL de DPPH) manteniendo un volumen final de reacción de 1.2 mL. Se adicionaron 3.9 mL de MeOH para tener un volumen final de 5.1 mL.

Se dejó reaccionar la mezcla durante 30 min en obscuridad. La cuantificación de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 523 nm.

La inhibición porcentual del radical DPPH* (I) se evaluó de acuerdo la [Ecuación 1](#):

(Ecuación 1)

$$I = \frac{[(A_{\text{ref}} - A_{\text{m}})]}{A_{\text{ref}}} 100$$

Donde:

A_{ref} es la absorbancia de la solución de DPPH* (600 µg mL⁻¹)

A_{m} es la absorbancia de la fracción no polar.

3.8. Evaluación de la citotoxicidad en modelos *in vitro*

3.8.1. Cultivo de líneas celulares cancerígenas HeLa y MCF-7.

Alícuotas de las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 300 mg/L de L-glutamina, suero fetal bovino al 10% (v/v) y una solución comercial de gentamicina – ampicilina al 1% (v/v).

Las líneas celulares se mantuvieron en incubadora en condiciones del 5% de dióxido de carbono (CO₂), 95% humedad, 37°C durante 24 h.

3.8.2. Tinción celular con 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolium (MTT).

Se determinó la densidad de la población celular mediante la tinción con azul de tripano en la cámara de New Bauer y se sembraron células HeLa y MCF-7 en placas de 96 pocillos, a una densidad de 5000 células por pocillo y se incubaron durante 3 h. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo RPMI y se estimularon las células colocando el nejayote en cuatro concentraciones (previamente resuspendido en agua), y se completó agregando medio fresco a cada pocillo manteniendo un volumen final de 100 µL. Se agregó en cada pocillo 20µL de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio, MTT (5 mg mL⁻¹) y se permitió la difusión intracelular del colorante durante un periodo de 24 h en atmósfera de 5% CO₂, 95% humedad y 37°C. Al terminar el proceso de tinción, se adicionaron 50 µL de alcohol isopropílico acidificado al 10% (v/v) a cada pocillo para disolver los cristales de formazan.

Como control positivo de muerte celular se emplearon 50 µL de una solución de DMSO (dimetil sulfóxido) al 10%.

El grupo control negativo para monitorear el efecto del solvente de resuspensión sobre las células se trató de la misma manera pero sustituyendo los volúmenes del nejayote purificado por el solvente (agua grado HPLC).

Se midieron las absorbancias de las placas en un lector de Elisa a una longitud de onda de 570 nm.

3.8.3. Inhibición celular (%)

Se determinó el porcentaje de inhibición celular (%) mediante la [Ecuación 2](#).

$$\text{Inhibición celular (\%)} = \frac{\text{Células tratadas}}{\text{Células control (sin tratamiento)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

Células tratadas: absorbancia registrada en las líneas celulares HeLa y MCF-7 adicionadas con el nejayote purificado.

Células control: absorbancia registrada en líneas celulares no tratadas con el nejayote purificado.

3.8.4. Dosis media inhibitoria IC50

La inhibición celular causada por el nejayote purificado se expresó como la concentración media causante de la muerte del 50% de la población celular (IC50), se emplearon controles negativo (0% de muerte celular en presencia de agua) y positivo (100% de muerte celular en presencia de DMSO).

3.9. Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial completo de 4x2x2, completamente al azar (Tabla 5). Los factores del diseño experimental son las concentraciones de la fracciones fenólicas evaluadas con cuatro niveles, la línea celular con dos niveles HeLa y MCF-7 y también se incluyó el tiempo de incubación con dos niveles a 24 y 48 h de tratamiento. El experimento se realizó con tres repeticiones por cada nivel del factor concentración de fenoles totales y como variable respuesta se medirá la inhibición celular (%).

Tabla 5. Diseño experimental bioensayos

Concentraciones de fenoles totales en nejayote purificado [mg GAE/g nejayote _{bs}]	Células (B)			
	HeLa		MCF-7	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1	Inhibición celular (%)			
2				
3				
4				

3.9.1. Análisis de los datos

Para la evaluar si existen diferencias significativas entre las concentraciones del ácido ferúlico en cuatro variedades de maíz se empleó una prueba de ANOVA y de Tukey para comparar las medias entre grupos con un 95% de confianza.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Selección de la variedad de maíz para obtención del nejayote

Con base a la metodología de Vega *et al.*, (2014), se eligió a la variedad de maíz por la alta concentración de ácido ferúlico encontrada en el nejayote (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de ácido ferúlico en el nejayote de variedades de maíces.

Variedades de maíces	Concentración de ácido ferúlico (mg AF/g de nejayote _{bs})
Amarillo	14.25±0.10 ^a
Azul	22.31±0.01 ^b
Rojo	21.72±0.07 ^b
Zapalote	12.64±0.01 ^c

† Superíndices distintos muestran diferencias significativas en contenido de ácido ferúlico según la prueba de Tukey (P<0.05)

Las concentraciones de todas las variedades de maíz evaluadas son mayores a las reportadas por De la Parra *et al.*, (2007) y Del Pozo-Insran *et al.*, (2006) quienes reportaron concentraciones de ácido ferúlico de 10 mgAF/g_{bs} para extractos de maíz crudo de la variedad bolita azul y 20.40 mg AF/g_{bs} en maíz de la raza bolita negra.

La concentración de ácido ferúlico en el nejayote parece estar influida por diversos factores como: la alcalinidad y la temperatura de la solución de cocción, el tiempo de cocción, factores genéticos relacionados con la variedad de maíz y efectos de almacenamiento de los granos de maíz.

En el nejayote de la variedad bolita azul, la mayor concentración de fenoles se encontró la mayor concentración de ácido ferúlico en fracción de fenoles libres [Figura 20](#). El ácido ferúlico en esta fracción representa el 79%.

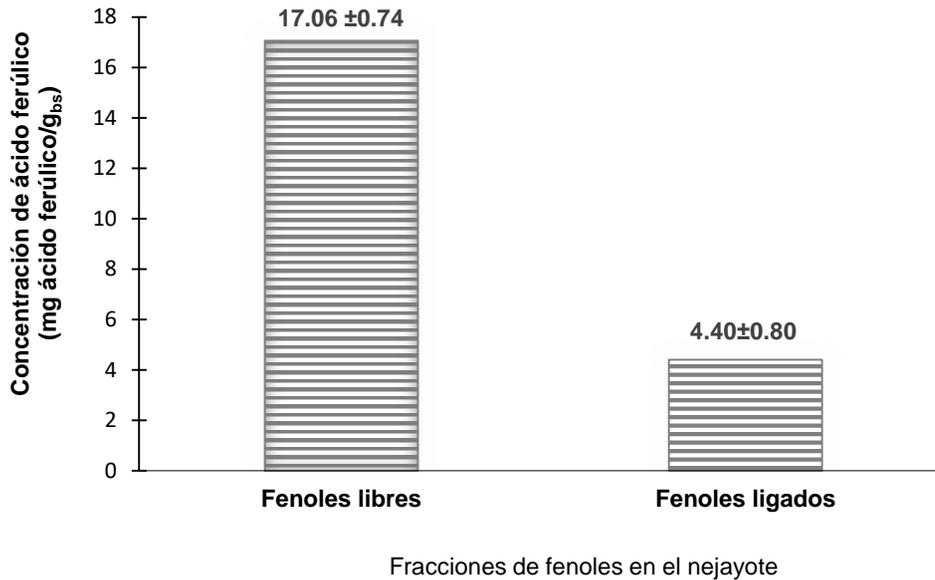


Figura 20. Ácido ferúlico presente en fenoles libres y ligados del nejayote.

En el caso del nejayote Saldivar *et al.*, (2013) mencionan que aunque existen fenoles ligados en los sólidos remanentes en la solución (nejayote), el tratamiento térmico-alcalino (nixtamalización) es un proceso eficiente para lograr la liberación de la mayoría de los compuestos fenólicos ligados en el material celular de los granos de maíz y quedan libres en el medio acuoso. Por ejemplo, Huamán *et al.*, (2016) reportan ausencia de ácido ferúlico en la fracción libre de maíz crudo no tratado, pero sí lo encontró ácido ferúlico en la fracción de ligada en una concentración de 13.20±13.70 mg de ácido ferúlico/g_{bs} en la fracción ligada , a diferencia de Méndez *et al.*,(2020) quienes reportaron la mayor presencia de ácido ferúlico en la fracción libre del nejayote de maíz azul y ausencia en la fracción ligada debido al tratamiento de los granos de maíz, proceso que favoreció la liberación de los ácidos fenólicos presentes en el maíz.

4.3. Concentración del ácido ferúlico en las fases recuperadas por cromatografía preparativa.

Los porcentajes de recuperación de ácido ferúlico proveniente de las diversas fases elutoras evaluadas en el proceso cromatográfico se muestra en la [Figura 21](#). La fase elutora compuesta de MeOH fue la que permitió recuperar la mayor cantidad de ácido ferúlico 19.55 mg AF/g_{bs} alrededor del 87.67% respecto al 100% de ácido ferúlico contenido en el nejayote (22.31 ± 0.08 mg de ácido ferúlico/g_{bs}).

El comportamiento observado con la fase elutora de metanol puede atribuirse a una mayor afinidad entre los grupos hidroxilos estéricamente disponibles de los compuestos fenólicos y las moléculas de hidrógeno del metanol.

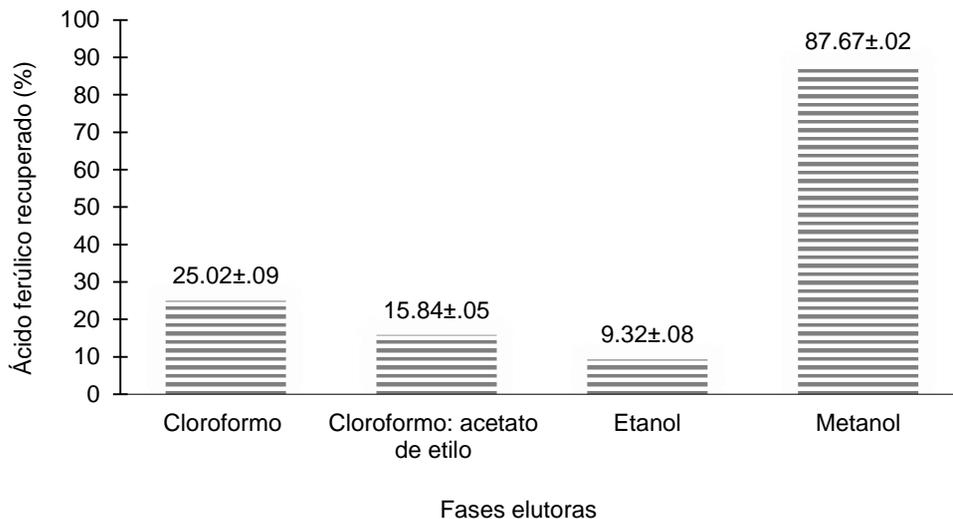


Figura 21. Desorción de ácido ferúlico mediante diversos

4.2. Perfil de compuestos fenólicos en el nejayote

El perfil de compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina, evidenció la presencia de al menos 6 ácidos fenólicos presentes en el nejayote y presencia del ácido ferúlico del ácido ferúlico únicamente en la fase de cloroformo-acetato de etilo (Tabla 7). Se evaluó la presencia estándares de ácidos fenólicos, encontrándose al ácido ferúlico en todas ellas. La presencia de ácidos fenólicos se representa con (+) y la ausencia con (-).

Tabla 7. Presencia e identificación cualitativa de ácidos fenólicos en el nejayote

Ácidos fenólicos	Nejayote	Fracciones obtenidas por columna cromatográfica					
		Cloroformo	Cloroformo acetato de etilo	Acetato de etilo-acetona	Acetato de etilo	Acetona	Acetona MeOH
Hidroxibenzoico	+	-	-	-	+	+	-
Cumárico	+	+	-	-	+	+	-
Ferúlico	+	+	+	+	+	+	+
Vanílico	+	-	-	+	+	+	-
Clorogénico	+	-	-	+	-	-	-
Gálico	+	-	-	-	-	-	+

4.4. Concentración de la fracción de compuestos fenólicos mediante sistemas de adsorción.

La cuantificación de fenoles totales en el nejayote fue de 147.22 ± 0.05 mgEAG/g_{bs} y de 84 ± 0.06 mgEAG/g_{bs} en nejayote purificado.

El contenido de ácido ferúlico en el nejayote fue de 22.31 ± 0.01 mgAF/g_{bs}, mientras que en el nejayote purificado fue de 7.3 ± 0.04 mgAF/g_{bs}.

La mayor recuperación de ácido ferúlico se obtuvo con el sistema catiónico, recuperándose un $87.67 \pm 0.02\%$ del ácido ferúlico presente originalmente en el nejayote con 22.31 ± 0.08 mgAF/g_{bs} (Figura 22). El sistema aniónico exhibió la menor recuperación del ácido ferúlico presente originalmente en el nejayote con 4.00 mgAF/g_{bs}.

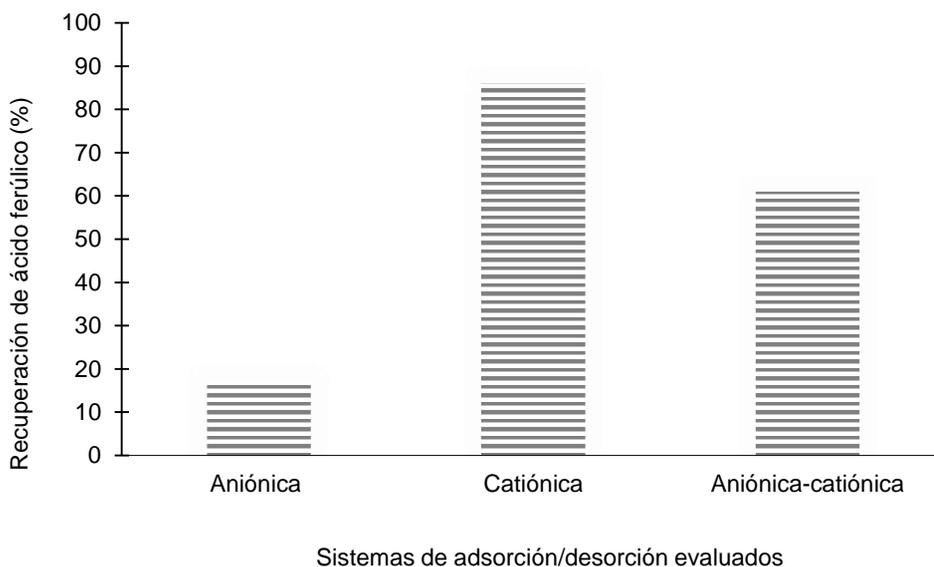


Figura 22. Efecto de los sistemas de adsorción/desorción sobre el porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos (ácido ferúlico) presentes en el nejayote.

La adsorción preferente en sistemas catiónicos puede deberse a una afinidad electrostática entre la resina y la molécula fenólica con carga negativa (derivada de la desprotonación de los grupo hidroxilo en la solución).

Soto *et al.*, (2015) reportaron porcentajes de recuperación de 64 al 78% de los ácidos fenólicos presentes originalmente en extractos de granos de maíz empleando sistemas de adsorción/desorción catiónicos y aniónicos respectivamente. Tilay *et al.*, (2018) obtuvieron porcentajes menores de recuperación del ácido ferúlico con el 57.97%, empleando sistemas aniónicos en extractos fenólicos provenientes de salvado de maíz, trigo y arroz

4.5. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del nejayote fue de 1.43 ± 0.06 $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{bs}}$ y de 2.50 ± 0.08 $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{bs}}$ en el nejayote purificado.

Mora-Rochín *et al.*, (2010) reportan una capacidad antioxidante de 3.78 $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{bs}}$ en extractos de maíz nixtamalizado de la variedad mixteco. Pozo-Insfran *et al.*, (2006) reportan capacidades antioxidantes de 7.63 - 8.85 $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{bs}}$ en extractos de maíces de las variedades chalqueño azul.

4.6. Citotoxicidad

4.6.1. Porcentaje de inhibición (%) celular para HeLa y MCF-7

La evaluación del efecto citotóxico del nejayote purificado sobre la línea tumoral HeLa a 24 h y 48 h mostró una IC50 de 0.91 mgAF/g_{bs}. El 93.72±.05% de inhibición celular se obtuvo empleando la máxima concentración de ácido ferúlico 1.71±02 mgAF/g_{bs} que fue la máxima concentración encontrada en el nejayote purificado con 1.71±02 mgAF/g_{bs} (Figura 23).

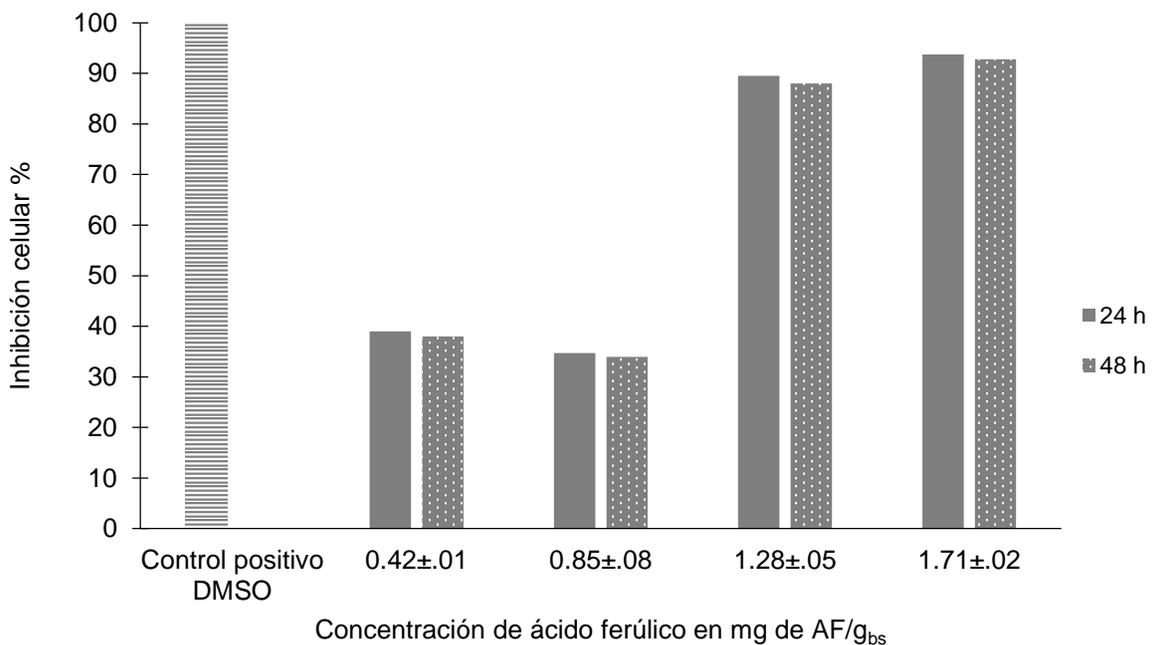


Figura 23. Inhibición celular (%) en línea de cáncer HeLa.

Herrera *et al.*, (2017) Obtuvieron una IC50 de 1.00 mg/g_{bs} con el extracto de fenoles a partir de maíz azul crudo y de tortilla de maíz azul de la raza mixteco en la línea celular HeLa a una concentración de 283.7 mg/g_{bs} y 70 mg/g_{bs} respectivamente, obteniendo en el primer caso, porcentajes de inhibición celular cancerígena del 68% y del extracto de tortilla la inhibición celular fue del 61% a concentraciones de 0.25-0.50 mg/g_{bs}.

El efecto citotóxico del nejayote purificado puede relacionarse con el papel de los compuestos fenólicos para actuar como sustrato enzimático de las peroxidasas y otras

enzimas oxidantes que tienen resultado sobre el patrimonio genético de la célula (Hernández *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2019).

Algunos compuestos fenólicos impiden la transducción del gen XIAP (regulador de la apoptosis celular) a la proteína 3 y 4, las cuales a su vez son proteínas que inhiben la apoptosis y detienen el proceso de muerte celular apoptótica (Dynek *et al.*, 2013; Radogna *et al.*, 2015).

El porcentaje de citotoxicidad del nejayote purificado sobre MCF-7 a 24 h y 48 h fue del 61.52% con una IC50 de 1.38 mgAF/g_{bs} a una concentración máxima de 1.71±02 mgAF/g_{bs} (Figura 24).

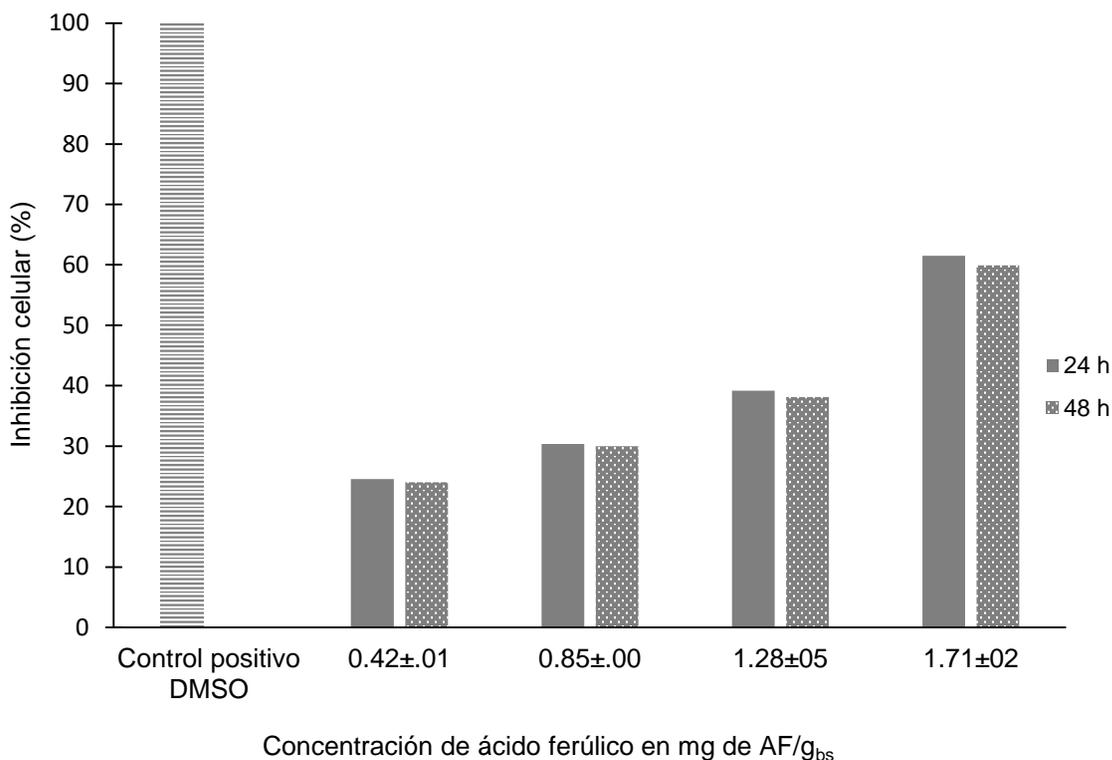


Figura 24 .Inhibición celular (%) en línea de cáncer MCF-7.

Herrera *et al.*, (2017) probaron el extracto de maíz y de tortillas de maíz azul de la variedad mixteco en la línea celular MCF-7; obteniendo un porcentaje de inhibición celular del 32% y 30% respectivamente a concentraciones de 1.00 mg/g_{bs}, a diferencia de Xuan *et al.*, (2014) que obtuvo un 68% de inhibición celular mediante el empleo de un ácido fenólico (ácido ferúlico con pureza del 99.9%) a una concentración de 0.001

mgAF/100 μ L de medio de cultivo.

Por otra parte, Sotero *et al.*, (2017) probaron extractos y tortilla elaborada con maíz azul de la variedad mixteco 1.00 mg/g_{bs} en células de cáncer de próstata (LNCaP) en concentraciones de 1.00 mg/g_{bs} obteniendo una citotoxicidad celular del 50% y del 66% respectivamente para cada extracto.

En el caso de las líneas celulares HeLa y MCF-7 la citotoxicidad del nejayote purificado (concentrado fenólico) puede estar relacionado con el papel de los fenoles para actuar como sustrato y así promover la producción de peroxidasas y enzimas que producen moléculas prooxidantes produciendo daño celular oxidativo en el ADN (Hernández *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2019).

Respecto a los posibles mecanismos de acción anticancerígena del ácido ferúlico, uno de ellos esto podría atribuirse a su capacidad antioxidante e inhibidor de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, produciendo lipoperoxidación por producción de oxígeno reactivo y generando cambios en la membrana mitocondrial (causando colapso mitocondrial) y con esto causando daños en el ADN (Rajendra *et al.*, 2011). Otro mecanismo podría actuar mediante el éster fenólico del ácido ferúlico induciendo a la apoptosis activando FAS (receptor unido a la membrana celular que induce a la apoptosis celular (Lukacs *et al.*, 2013).

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El nejayote purificado de maíz azul de la variedad bolita (concentrado fenólico) sí mostró tener efecto anticancerígeno en las líneas HeLa y MCF-7, este efecto citotóxico fue mayor al reportado por otros autores que emplearon ácidos fenólicos sintetizados por vía química de manera individual contra células tumorales. Dicho efecto es posiblemente atribuido a la sinergia de todos los compuestos fenólicos presentes en el nejayote purificado.

Hasta el momento no hay evidencia bibliográfica que reporte el empleo y evaluación citotóxica del nejayote. Algunos autores han evaluado el efecto citotóxico únicamente de extractos de maíz sin purificación y obteniendo valores de acción anticancerígena menores a los reportados en el presente trabajo con el empleo del nejayote purificado mediante sistemas de adsorción/desorción sobre las líneas tumorales HeLa y MCF-7.

El tratamiento del nejayote y su purificación para la obtención de compuestos de interés (compuestos fenólicos) con actividad biológica podría representar una alternativa más económica a diferencia de los obtenidos por síntesis química. Cabe mencionar que también representaría una alternativa de aprovechamiento y eliminación de este subproducto y su impacto en el ambiente debido a su alta demanda química de oxígeno.

5.2. Recomendaciones

- ✓ El efecto citotóxico del extracto fenólico podría evaluarse en modelos murinos para comprobar si tiene mantiene la misma efectividad *in vivo e in vitro*.
- ✓ Para comprobar el efecto citotóxico individual del ácido ferúlico podría realizarse una comparación empleando ácido ferúlico sintetizado por vía química.
- ✓ Se podrían evaluar otros métodos y condiciones distintos para la eliminación del solvente (MeOH) del extracto fenólico y así evitar la pérdida de la capacidad antioxidante inicial del extracto de maíz y del extracto fenólico. Se podría hacer uso de un evaporador rotativo con el objetivo de controlar condiciones como la temperatura y presión y así disminuir la oxidación de los compuestos.

Bibliografía

- Abayomi, a., Solomon, U., Benneth, B.-A., Bulus, A., & Olusegun, A. (2017). Toxicity and protective effect of phenolic-enriched ethylacetate fraction of *Ocimum gratissimum* (Linn.) leaf against acute inflammation and oxidative stress in rats. *Drug Development Research*, 78(1): 3-4.
- Ardiansyah, Ohsaki, Shiwakawa, H., Koseki, T., & Komai, M. (2008). Effects og a single administration of ferulic acid regulation of blood presure and the hepatic lipid metabolic profilie in stroke-prone spontaneously hypertensive. *Journal Agriculture Food and Chemical*, 56(1): 2825-2830.
- Ballesteros, D. (2015). Estudio comparativo sobre la obtención de extractos con actividad citotóxica a partir de residuos frutícolas. bogotá, Colombia: Universidad Nacional de colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
- Bedolla, S., & Rooney, L. (1984). Cooking maize for masa production. *Cereal Foods World*,1(3): 219-221.
- Bello, A., Gustavo, C., Agama , E., & Utrilla, R. (2016). Aspectos nutracéuticos de los maíces pigmentados: digestibilidad de los carbohidratos y antocianinas. *Agrociencia*, 50(8): 1041-1063.
- Berdowska, I., Zielinski, B., Fecka, I., Kulbaka, J., Saczko, J., & Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from *Lamiaceae* species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 141(2): 1313-1321.
- Calixto, S. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49
- Carlsen, H., Myhrstad, M., Thoresen, M., Moskuag, J., & Blomhoff, R. (2003). *Berry intake* increases the activity of the g-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenicreporter mice. *The Journal of Nutrition*, 133(7): 2137-2140
- Carvajal, E. (2007). Una alternativa para convertir un residuo. *Tecnociencia*, 1(2): 4-8.
- Casado, M., & González, R. (1999). Los retos de la genética en el siglo XXI: Genética y bioética. Barcelona, España: Universitat de Barcelona.

- De la Parra, C., Serna, C., & Liu, R. (2008). Effect of processing on phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10): 4177-4183.
- Díaz, E., Castro, r., & Yañez, J. (2016). Exploración de la nixtamalización, nejayote: Un panorama. México.
- Díaz M, E., Castro M, R., & Yáñez F, J. (2016). An overview of nejayote a nixtamalization byproduct. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 8(2): 41-61.
- Escalante, A., Ramírez, B., Torres, P., Barrón, M., Figueroa, J., & López, J. (2013). La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 1(2): 36(4).
- Espinosa, C., Treviño, J., Garza, R., Verde, R., Rivas, C., & Morales, M. (2015). Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3): 52-56.
- FAO. (1993). *Grasas, aceites y productos derivados* (8a ed., Vol. 8). Roma.
- Fernández, A., & Peña, C. (5 de noviembre de 2018). Bioactive compounds in pigmented maize. Recuperado el 12 de marzo de 2019, de www.intechopen.com: <http://dx.org/10.5772/intechopen.78340>
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2): 47-88.
- Fontanals, N., Marcé, R., & Borrull, F. (2010). Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares. *Cromatografía y técnicas afines*, 31(1): 4-10.
- Fragoso, J., Ramírez, J., Cruz, D., Pérez, O., de la Peña, A., & Vargas, G. (2009). Marcadores pro y antiinflamatorios en la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo. *Archivos de Cardiología de México*, 79(1), 1665-1731.
- García, L., Yahuaca, B., Cortez, C., & Vázquez, P. (2015). Extracción total de las antocianinas del maíz azul tzirantza y de sus productos nixtamalizados. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarios*, 1(10): 595-600.

- García, M., Quintero, R., & López, A. (2013). *Biotecnología alimentaria*. D.F., México: Limusa. 30-36.
- Gil, Á. (2010). *Tratado de nutrición* (2a ed., Vol. I). Madrid, España: Panamericana. 100-1010.
- González, B., Beltrán, M., Olivares, G., & Barrilao, G. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista de Enfermedades no Transmisibles*, 5(1): 2221-2434.
- Gutierrez, Z., Ledesma, R., García, G., & Grajales, C. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 10(2): 33(1).
- Guzmán, L., García, v., Custa, O., Jaramillo, G., & Ramón, G. (diciembre de 2017). Composición química y actividad antiinflamatoria de extracto de partes aéreas de *Portulaca oleracea* (verdolaga). Recuperado el 08 de 08 de 2018, de <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/185/78>.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9(1): 1-32.
- Hernández, V., Salinas, Y., Ramírez, J., Vázquez, G., Dominguez, A., & Ramirez, A. (2016). Color, phenolic composition and antioxidant activity of blue tortillas from Mexican maize races. *CyTa-Journal of Food*, 14(3): 473-481.
- Herrera, M., Cruz, C., Trujillo, C., Rodriguez, M., García, H., Chávez, H., y otros. (2017). Antioxidant and antiproliferative activity of blue corn and tortilla from native maize. *Chemistry Central Journal*, 11(110): 1-8.
- Houghton, P., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A., Carlson, J., & Li, H. (2004). Gastric cancer origination from bone marrow-derived cells. *Science*, 1568-1571.
- Huamán, C., Aquino, E., Chirinos, R., Campos, D., & Gálvez, L. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de accesiones de maíz (*Zea mays* L.) morado nativo del Perú. *Agronomía colombiana*, 34(1), 1352-1355.
- INEGI. (2018). *Mortalidad por principales tumores malignos*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2014). *Manual de enfermería oncológica*. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de salud .

- Jeong, H., Phan, A., & Choi, J. (2017). Anti-cancer effects of polyphenolic. *Pharmacognosy Magazine*, 13(9): 595-599.
- Jiménez, L., & Merchant, H. (2003). *Biología Celular y Molecular* (Vol. 1). México: Pearson.
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Jibe, M., y otros. (2005). Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(3): 527-530.
- Kato, T., Mera, L., Serratos, A., & Bye, R. (2009). Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, 32(4): 1-16.
- Kim, J., Meydani, M., & Guo, W. (2006). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(8):165-176.
- Kinsella, J., Frankel, E., German, B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 1(9): 85.
- Lam, T., & Shaw, M. (1970). Removal of phenolics from extracts by grinding with anion exchange resin. *Biohemical and Biophysical Communications*, 39(5): 995-968.
- Larson, R. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4): 969-978.
- Li, Q., & Verma, I. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Review Immunology*, 2(1): 975.
- Longo, D., Kasper, D., Jameson, L., Fauci, A., Hauser, S., & Loscalzo, J. (2012). *Harrison: principios de medicina interna* (18a ed., Vol. 1). México: Mc Graw Hil.
- Mabinya, L., Mafunga, T., & Brand, J. (2006). Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography. *African Journal of Biotechnology*, 5(13): 1271-1273.
- Madeiras, V., & Queiroz, L. (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of *brown algae*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 62(5): 303-307.

- Martínez, I. (1999). Cáncer y medicina alternativa. *Revista cubana de oncología*, 15(2): 77-88.
- Méndez, L., Cruz, M., Barriada, L. (2020) Profile of phenolic acids, antioxidant activity and total phenolic compounds during blue corn tortilla processing and its bioaccessibility. *Journal Food Technology*, 57(12): 4688-4696.
- Mendoza, G., Mendoza, M., Delgada, A., Castillo, F., Kato, T., & Cruz, S. (2017). Antocianinas totales y parámetros de color. *Revista Fitotecnia*, 1(5): 471-479.
- Mercado, G., Carrillo, R., Wall, L., López, A., & Parrilla, E. (11 de 11 de 2018). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1). Obtenido de <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Mercado M, G., de la Rosa C, L., Wall M, A., López D, A., & Álvarez P, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1): 36-46.
- Moreno, M., Trujillo, F., Gallegos, M., Reynoso, R., González, R., Gallegos, J., y otros. (2015). Antioxidant anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80(1): 144-153.
- Muñoz, J., María, A., & Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Recuperado el 09 de 09 de 2018, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637115003> ISSN 1727-558X.
- Nasr, B., Kilani, J., Kovacic, H., Chekir, G., Ghedira, K., & Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration on proliferation, superoxide production of human tumor cells in vitro. *Europe Journal of Pharmacology*, 99(1): 766-799.
- NIH. (12 de 10 de 2017). Instituto Nacional del cáncer. Recuperado el 20 de 11 de 2018, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>.
- Osama, B., Azza, A., Sherief, M., & Hamada, F. (2006). In vitro effects of ferulic acid on gastrointestinal motility: Inhibition of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 33(12): 5363–5367.
- palacios, I., Lozano, M., Moro, C., Arrigo, M., Rostagno, M., Martínez, J., y otros. (2011).

Antioxidants properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemical*, 128(3): 674-678.

Pehlivan, F., Sahin, G., & Ucar, A. (2016). The effect of oxidative stress on phenolic composition and antioxidant metabolism in callus culture of common daysi. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 13(4): 34-41.

Poivetin Chacón, A. (2016). Radioterapia como tratamiento del cáncer, oncología médica quirúrgica y radioterapia. México: Manual Moderno. 1900-1965.

Pompeu, D., Moura, F., Silva, E., & Rogez, H. (2010). Equilibria, kinetics, and mechanisms for the adsorption of four classes of phenolic compounds onto synthetic resins. *Separation Science and Technology*, 1(45): 45-55.

Ramírez. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3): 463-471.

Ramos, F., Muñoz, A., Alvarado, C., Alvarado, Á., & Yáñez, J. (2012). Purple Corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of Medicinal Food*, 15(2): 206-215.

Salinas, Y., Hernández, V., Trejo, L., Ramírez, L., & Iñiguez, O. (2017). Composición nutricional y de compuestos bioactivos en tortillas de maíz con grano azul/morado. *Revista Mexicana de ciencias Agrícolas*, 8(7): 1483-1496.

Salinas, Y., Pérez, J., Vázquez, G., Aragon, F., & Velázquez, G. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Agrociencia*, 46(7): 140-195.

Salmerón, A., Rodríguez, N., Pineda, V., Cristiani, E., Juárez, C., Ruiz, N., y otros. (2003). Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor. *Journal of Environmental and Science*, 2(5): 401-406.

Sánchez, J., & Stuber, C. (2000). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany*, 54(1): 43-59.

- Scheel, C. (2016). Beyond sustainability. Transforming industrial. *Journal of Cleaner Production*, 1(131): 376-386.
- Shen, J., Ai-min, L., Chun, W., & Quan-Xin, Z. (2007). Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by aminated hypercrosslinked polymers. *Journal and Environmental Sciences*, 19(1): 135-140.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1 de junio de 2002). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of *soybean* oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6): 945-948.
- Sotero, M., Rodríguez, M., García, H., Chávez, J., guzmán, R., & Oliart, R. (2017). Efecto de extractos de tortilla y maíz azul en la actividad antioxidante y antiproliferativa en la línea celular de cáncer de próstata LNCap. Veracruz, México: Unidad de Investigación y Desarrollo en alimentos-Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Soto, M., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: *Food Engineering Reviews*, 105(1): 105-110.
- Suárez, K., López, E., López, J., Cornejo, J., Oropeza, M., & López, E. (2016). Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*, 284(15): 536-542.
- Téllez, V., López, O., Aragón, A., & Zayas, M. (noviembre de 2018). Lodos residuales de nejayote como sustratos para la germinación de *Contaminación ambiental*. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(3): 395-404.
- Thibaul, C., Couteau, Duarte, Heldt-Hansen, & Kroon. (1998). Fungal bioconversion of agricultural by-products to vainillin. *Food Science and Technology*, 31(6): 350-536.
- Thomas, R., & Kim, M. (2005). Pigallocatechin gallate inhibits HIF-1 α degradation in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 543-548.
- Toda, S., Kimura, M., & Ohnishi, M. (1991). Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Plantas Medicinales*, 57(1): 8-10.

- Trejo, A., Bravo, L., Venegas, J., & Jiménez, D. (2016). Hidrólisis ácida de citrus sinensis para la obtención de azúcares fermentables. *Revista de Tecnología e Innovación*, 3(7): 46-50.
- Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemical*, 66(4): 401-436.
- Valenciaga, D., & Chongo, B. (2004). La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4): 343-350.
- Van, F., Peters, S., Gross, G., Roldan, V., Klinkerberg, R., De vos, C., y otros. (2012). Polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and colon region dependent gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and Colon-Region dependent. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60(45): 11331-11342.
- Vega, A., Reyes, S., De León, J., Bonilla, A., & Franco, H. (2014). Cuantificación de cafeína en cafés comerciales de Panamá. *Ciencia y Tecnología*, 30(2): 378-254.
- Xuan, H., Zhen, L., Haiyue, Y., Qing, S., Kai, W., Qingtao, H., y otros. (2014). Antitumor activity of chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1155/2014/280120>.
- Yang, C., Landan, J., Huang, M., & Newmark, H. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1): 381-406.
- Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, A. M., Alvarado, C., & Bertha, L. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte Médico*, 5(2).
- Zhang, X., Lin, D., Jiang, R., Li, H., Wan, J., & Li, H. (2016). Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncology Reports*, 36(1): 271-278.

Anexo A. Método de extracción y concentración de ácido ferúlico presente en el nejayote derivado de maíz azul.



Diagrama del proceso de obtención de nejayote, concentración y purificación de los ácidos fenólicos mediante el empleo de resinas.

Anexo B. Curva de calibración de ácido ferúlico

Para la cuantificación de ácido ferúlico se realizó una curva de calibración con una R^2 de 0.98, la cual se expresa en la ecuación del [gráfico 1](#), en donde el eje “x” representa la absorbancia en mAU y el eje “y” la concentración del ácido ferúlico en [mg de ácido ferúlico/mL].

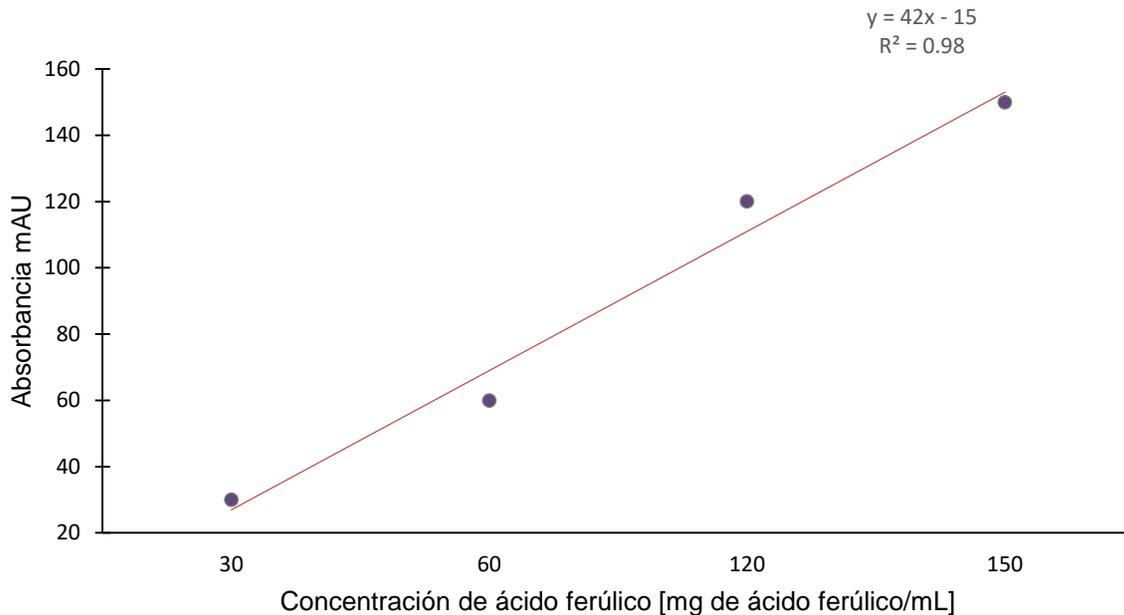


Gráfico 1. Curva de calibración del ácido ferúlico en cromatografía de HPLC-UV

Cada muestra se realizó por triplicado. El valor de absorbancia se obtuvo realizando la medición a 310 nm (Luengas *et al.*,2015). Según el valor obtenido de R^2 , la dispersión y variabilidad de los datos es mínima, esta cercana a la normal. Por lo tanto, la curva de calibración puede ser empleada para realizar las mediciones de ácido ferúlico en el extracto de nejayote.

Anexo C. Identificación cualitativa de los compuestos fenólicos del nejayote por cromatografía en capa fina.

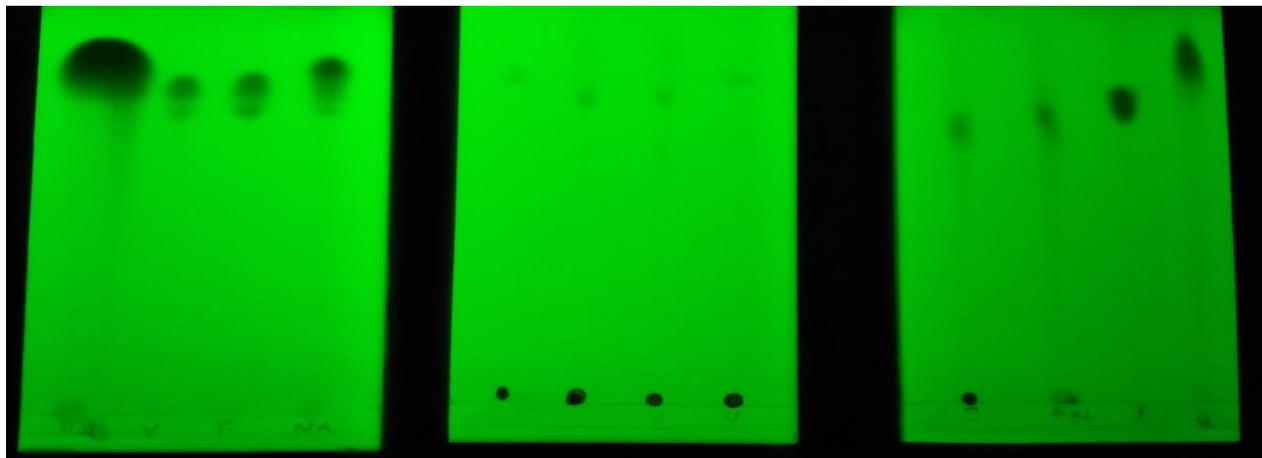


Figura 15. Cromatografía en placa fina para la identificación de ácidos fenólicos (ácido ferúlico) en el extracto filtrado de nejayote. De izquierda a derecha: a) nejayote, b) ácido vanílico, c) ácido ferúlico, d) mezcla de ácidos fenólicos aromáticos, e) fracción 1; cloroformo, f) fracción 2; cloroformo:acetato de etilo, g) fracción 3; acetato de etilo:acetona, h) fracción 4; acetona, i) fracción 5; acetona gálico, j) ferúlico y k) quercetina.