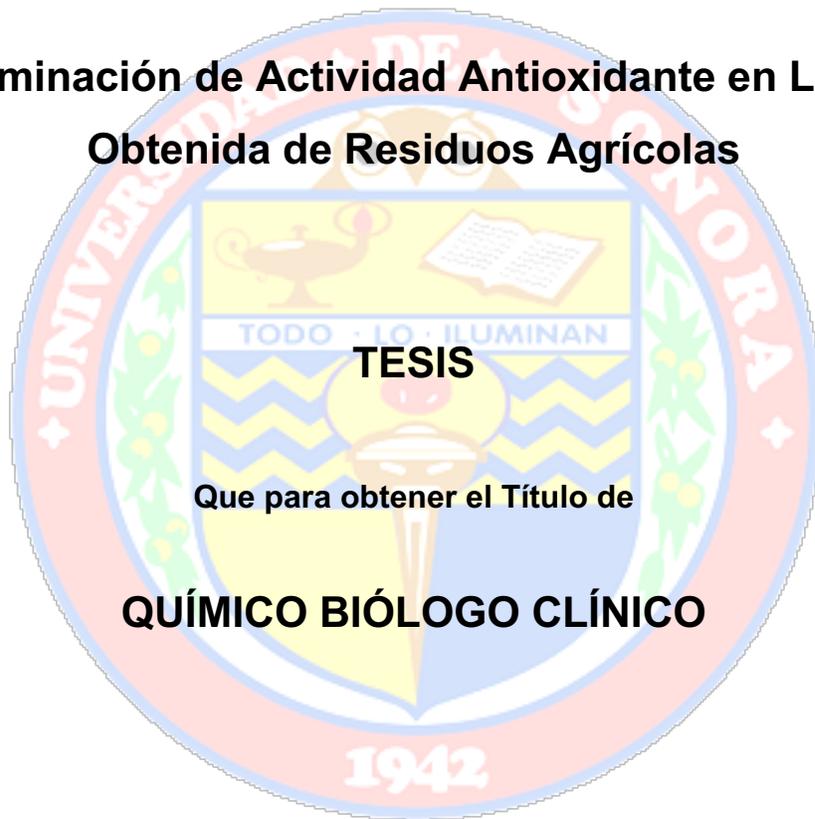


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

## Determinación de Actividad Antioxidante en Lignina Obtenida de Residuos Agrícolas



**TESIS**

Que para obtener el Título de

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**José Aurelio Gaspar García**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **José Aurelio Gaspar García** lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

---

Presidente

Dra. Beatriz Montaña Leyva

---

Secretario

Dra. Dora Edith Valencia Rivera

---

Dr. Jesús Ortega García

Vocal

---

Q.B. Rafael de la Rosa López

Suplente

## DEDICATORIA

Dedico mi proyecto de tesis a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y por el valor mostrado en mis años de licenciatura con su sacrificio y esfuerzo.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis abuelos que son el principal cimiento de mi familia que me han enseñado la responsabilidad y deseos de superación, que son mi ejemplo a seguir por sus grandes virtudes y su gran corazón para apoyarme incondicionalmente en cada momento de mi carrera.

A Sara Elena Vázquez Limón por su compañía y cariño a través del tiempo, que me ha enseñado que con esfuerzo y dedicación se pueden lograr grandes cosas. Me diste la motivación para concluir con éxito este proyecto de tesis.

A mis hermanos y familia que me brindaron su apoyo, cariño y siempre estar en los momentos importantes de mi vida.

A mis amigos que me brindaron su compañía y apoyo a través de toda la carrera, por su cariño y confianza depositada en mí, gracias: Dolores Isela Aguilar González, Héctor Manuel Angulo Murrieta, Carlos Antonio Vásquez Carrasco y Herman Eduardo Chávez Salas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis padres por ser las principales personas que me ayudan a alcanzar mis sueños, gracias por cada día confiar y creer en mí, por ayudarme a cumplir mis metas, agradezco el amor, dedicación y paciencia recibida durante mi formación.

También, agradezco a mis formadores, Dra. Dora Edith Valencia Rivera, Dra. Beatriz Montaña Leyva, Dr. Jesús Ortega García, personas que se han esforzado por ayudarme y transmitirme sus conocimientos con gran dedicación, que han hecho que logre importantes objetivos de mi vida como culminar mi carrera y proyecto de tesis, pero sobre todo por ser excelentes personas y unos grandes amigos en quien confiar.

Agradezco a la Universidad de Sonora, por contribuir en mi formación académica a lo largo de la carrera, que me enseñó valores fundamentales para ser un profesionalista de bien.

## CONTENIDO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	7
<b>LISTA DE TABLAS</b>	8
<b>RESUMEN</b>	9
<b>INTRODUCCION</b>	10
<b>OBJETIVOS</b>	12
General	12
Específicos	12
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	13
Composición Química de los Residuos Agrícolas	13
Celulosa	14
Hemicelulosa	14
Lignina	15
Características Químicas de la Lignina	16
Evaluación de la Actividad Antioxidante	18
Método del DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	20
Método de Folin-Ciocalteu	21
Actividad Antioxidante de la Lignina	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
Materia Prima	24
Preparación de la Materia Prima	24
Caracterización de los Residuos Agrícolas	24
Cuantificación de la Lignina	24
Cuantificación de Celulosa y Hemicelulosa	25
Extracción de la Lignina	25
Actividad Antioxidante de la Lignina	26
Preparación del Extracto Etanólico	26
Ensayo del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*)	26
Cuantificación de Fenoles Totales	27

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico	28
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	29
Caracterización de los Residuos Agrícolas	29
Actividad Antioxidante de las Ligninas Organosolv (LOT y LOS)	30
<b>CONCLUSIONES</b>	35
<b>RECOMENDACIONES</b>	36
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura química de la celulosa y enlaces intermoleculares de hidrógeno.	15
2. Diagrama esquemático de la pared celular de las gramíneas.	16
3. Principales precursores de la lignina (monolignoles) y sus estructuras aromáticas en el polímero de lignina.	17
4. Estructura química representativa del polímero de lignina y sus enlaces principales.	19
5. Reacción de desprotonación del grupo funcional reactivo en el método del DPPH•.	21
6. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu.	22
7. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de la lignina Organosolv evaluados por el método del DPPH• en comparación con el antioxidante estándar (vitamina C, 70 $\mu$ M, 24.6 $\mu$ g/mL). Las concentraciones de la lignina fueron de (0-200 $\mu$ g/mL).	32
8. Fenoles totales (mgEAG/g lignina) y EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) de las ligninas Organosolv evaluadas en comparación con el antioxidante estándar (vitamina C, 70 $\mu$ M): lignina de trigo (LOT) y lignina de sorgo (LOS).	34

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Composición lignocelulósica de los residuos agrícolas de trigo y sorgo. Valores obtenidos en base seca.	29
2. Actividad antioxidante (Act AOX) de los extractos etanólicos de la lignina Organosolv y de la vitamina C (Vit C) evaluados por el método del DPPH*. Lignina Organosolv de trigo (LOT); lignina Organosolv de sorgo (LOS).	31
3. Contenido de fenoles (mgEAG/g lignina) y EC <sub>50</sub> (µg/mL) de las ligninas Organosolv de trigo (LOT); lignina Organosolv de sorgo (LOS) y vitamina C (Vit C) como antioxidante estándar (70 µM).	33

## RESUMEN

Los antioxidantes son moléculas que pueden capturar o inhibir los radicales libres evitando la oxidación. La demanda del uso de antioxidantes naturales ha aumentado debido a los riesgos potenciales que estos presentan. Los polifenoles, son un grupo de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante. La lignina es el polímero fenólico natural más abundante en la naturaleza. Debido a su estructura, las ligninas presentan actividades biológicas con aplicaciones prometedoras en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. La lignina es uno de los componentes principales de los residuos agrícolas (15-40% de su contenido). La fracción de lignina extraída con solventes orgánicos (método Organosolv), permite la obtención de ligninas con específicos pesos moleculares, baja polidispersidad y alto contenido de compuestos fenólicos. Por esta razón, en este trabajo se propuso extraer la lignina de residuos agrícolas de trigo y sorgo por un método con solventes orgánicos y evaluar su actividad antioxidante.

El rendimiento de la extracción de lignina obtenida por el método Organosolv fue alrededor del 8.24%. La actividad antioxidante de las muestras se evaluó por el método del DPPH\*. Del mismo modo, se calculó el EC<sub>50</sub> y se cuantificó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. De acuerdo con los resultados obtenidos, las ligninas extraídas de residuos agrícolas de trigo (LOT) y de sorgo (LOS) mostraron actividad antioxidante. Sin embargo, la LOT resultó con mayor actividad (80.79%) que la LOS (75.26%). Asimismo, la LOT mostró mayor contenido de fenoles totales (95.75 mg EAG/ g de lignina) y menor valor de EC<sub>50</sub> (94.92 ± 0.83 µg/mL) en comparación con la LOS (Fenoles totales: 72.42 mg EAG/ g de lignina; EC<sub>50</sub> :116.00 ± 8.48 µg/mL). Dichos resultados se pueden relacionar con un mayor contenido de grupos hidroxilo fenólicos, menor peso molecular y una menor cantidad de carbohidratos residuales presentes en la lignina extraída a partir de residuos de trigo.

## INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son molécula que pueden capturar o inhibir los radicales libres presentes en sistemas vivos y alimentos, evitando la oxidación; ya sea por medio de la donación de átomo de hidrógeno o la transferencia de electrones (Salem *et al.*, 2014). Los antioxidantes pueden ser naturales como ciertas vitaminas, tocoferoles, minerales; y sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el terbutilhidroquinona (TBHQ), etc. Hoy en día, el costo de manufactura de los antioxidantes sintéticos, los riesgos potenciales a humanos y animales, así como la necesidad de incrementar la seguridad alimentaria ha aumentado la demanda del uso de antioxidantes naturales (Valdez-Morales *et al.*, 2014). Los polifenoles, es un grupo de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante. Recientemente, el interés en los polifenoles se ha incrementado debido a que son capaces de capturar radicales libres evitando las reacciones en cadena que llevan a la oxidación (Grace *et al.*, 2014). Se ha observado que presentan efectos favorables en la anti-oxidación de proteínas y lípidos (Kortenska *et al.*, 2002), además de que tienen efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Miyake *et al.*, 1999).

La lignina es el polímero fenólico natural más abundante en la naturaleza. Básicamente, está constituido por unidades entrecruzadas de alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. La composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Lu y John, 2010). La lignina es obtenida como un subproducto de la pulpa de celulosa en la fabricación de papel (Visthal y Kraslawsk, 2011). Hasta ahora, el principal uso de la lignina ha sido únicamente como fuente de combustión de bajo grado (Ge *et al.*, 2014), y a pesar de que también ha tenido otras aplicaciones secundarias como bioabsorbentes (Ge *et al.*, 2014), dispersantes (Li *et al.*, 2011), o adhesivos (Thakur *et al.*, 2014; Valdez-Morales *et al.*, 2014), no se ha podido encontrar una aplicación a gran escala. Sin embargo, se ha reportado que, debido a su estructura, las ligninas presentan actividades biológicas con aplicaciones prometedoras en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Ugartondo *et al.*, 2008), por lo que una posible aplicación para este subproducto puede ser la obtención de antioxidantes naturales y seguros. De acuerdo con investigaciones, la fracción de lignina extraída en solventes orgánicos, e.g. alcohol, permite la obtención de ligninas con específicos pesos moleculares, baja polidispersidad y alto contenido de

compuestos fenólicos (Saito *et al.*, 2014) lo que se asocia con una mayor actividad biológica (Azadfar *et al.*, 2015). Investigaciones muestran que las propiedades antioxidantes de las ligninas se derivan de su capacidad de detener la reacción en cadena de los radicales libres gracias a su habilidad de donar hidrógeno a partir de los grupos hidroxilo fenólicos, formando así el producto final estable (Shimada *et al.*, 1992).

Por otro lado, en los últimos años la demanda y producción de cultivos de cereales ha aumentado en gran medida y con ello la generación de residuos agrícolas. Estos residuos lignocelulósicos son comúnmente quemados al aire libre con el fin de eliminarlos de manera rápida despejando la zona de cultivo y eliminar plagas (Lemieux *et al.*, 2004). Sin embargo, investigaciones científicas han demostrado que la quema de los residuos genera daño al medio ambiente además de pérdidas de suelo y disminución de la materia orgánica, componente esencial de los suelos para mantener su productividad. En Sonora, el cultivo del trigo y sorgo se encuentran dentro de los principales en cuanto a superficie de siembra y toneladas de producción anuales (superficie de siembra: 326,497; 46,018 Ha, respectivamente; producción: 1.64 millones; 472,616 Ton, respectivamente) (SIAP-SAGARPA, 2017). De acuerdo con la Secretaría de Energía del Gobierno Federal de México, por cada hectárea producida se originan aproximadamente 10 toneladas de residuos. Por lo que solo en Sonora, se generan cerca de 3.8 millones de toneladas anuales.

La lignina es uno de los componentes principales de los residuos lignocelulósicos, representando del 15-40% de su contenido (Yang *et al.*, 2012). Por lo que en este trabajo se propone investigar el uso de los residuos agrícolas de dos cultivos principales en Sonora, trigo y sorgo, como fuente potencial de lignina con actividad antioxidante. A nivel científico se plantea adquirir un mejor conocimiento acerca de las propiedades biológicas de este compuesto, y además, exponer un uso alternativo de los subproductos agrícolas y de este modo reducir la contaminación que se genera durante su quema a campo abierto.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la actividad antioxidante en lignina proveniente de residuos agrícolas.

### **Específicos**

- Extraer la lignina a partir de residuos agrícolas por un método con solventes orgánicos (Organosolv).
- Evaluar la actividad antioxidante de la lignina Organosolv por el método del DPPH\*.
- Determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales en la lignina por medio de un método colorimétrico.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se denomina residuos agrícolas o rastrojos a todos los restos de la estructura de la planta una vez cosechados los granos. En los últimos años la demanda y producción de cultivos de cereales ha aumentado en gran medida y con ello la generación de residuos agrícolas. En varios países la opción más económica de eliminar estos residuos es a través de la quema descontrolada, ya que agricultores aseguran que esto les permite disminuir el volumen de material, limpiar, despejar la zona para el cultivo, eliminar plagas y liberar nutrientes (Lemieux *et al.*, 2004). Sin embargo, investigaciones científicas han demostrado que la quema de los residuos son una fuente de contaminación atmosférica ya que se liberan gases del efecto invernadero tales como el metano, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxido nitroso, entre otros. Además, generan pérdidas de suelo y disminución de la materia orgánica, componente esencial de los suelos para mantener su productividad.

Debido a su gran abundancia y renovabilidad, en las últimas décadas los residuos agrícolas se han utilizados para la producción de energía e.g. biocombustibles y biogás. También han sido aplicados para el reforzamiento de materiales, además de que están siendo estudiados como materia prima para la obtención de biopolímeros con actividad biológica.

### Composición Química de los Residuos Agrícolas

Los residuos agrícolas o rastrojos provenientes de cereales son un material heterogéneo formado por tres componentes químicos principales que son esenciales para la fuerza física y la estructura química de la planta la celulosa, la hemicelulosa y la lignina; (Sun, *et al.*, 1998). También contienen componentes minoritarios como pectinas, minerales y ceras, los cuales son de vital importancia para algunos procesos fisiológicos de la planta (Xu, 2010). El análisis químico muestra que los residuos lignocelulósicos son ricos en carbohidratos, compuestos fenólicos y en menor proporción proteínas, cenizas, ceras y pectinas. Junto con estos componentes, son también ricos en compuestos bioactivos y vitaminas (Slavin, 2003). La composición precisa de macro y micronutrientes puede variar

de cultivar a cultivar, etapas de crecimiento de la planta, la naturaleza del suelo y las condiciones climáticas (Yasin, 2010).

## **Celulosa**

La celulosa es el polímero dominante en las plantas herbáceas así como en las plantas superiores. Químicamente la celulosa consiste en cadenas lineales de celobiosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1→4) (Hendriks *et al.*, 2009). En la naturaleza, las cadenas de celulosa están unidas de una manera ordenada formando microfibras empaquetadas muy densamente que se estabilizan a través de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (Figura 1). Estas microfibras tienen un diámetro aproximado de 80-10 nm y longitudes de unos pocos micrómetros (Alemdar y Sain 2008).

## **Hemicelulosa**

Las hemicelulosas son el segundo polímero más abundante en la paja de los cereales (Xu, 2010). Las hemicelulosas son polímeros ramificados de bajo peso molecular con un grado de polimerización de 20-800. La hemicelulosa de la pared celular de las gramíneas normalmente contiene una cadena principal de  $\beta$ -(1→4) xilopiranosil con pequeñas ramificaciones (Saha, 2003). Los xilanos son el componente principal de las hemicelulosa de las paredes celulares secundarias que constituyen aproximadamente el 20-30% de la biomasa de las plantas herbáceas. Los xilanos son heteropolímeros formados por una cadena de xilosas unidas por medio de enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1→4), uniéndose a pequeñas cadenas de carbohidratos. En general, las hemicelulosas forman una matriz para las microfibras de celulosa involucrando interacciones moleculares como puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals.

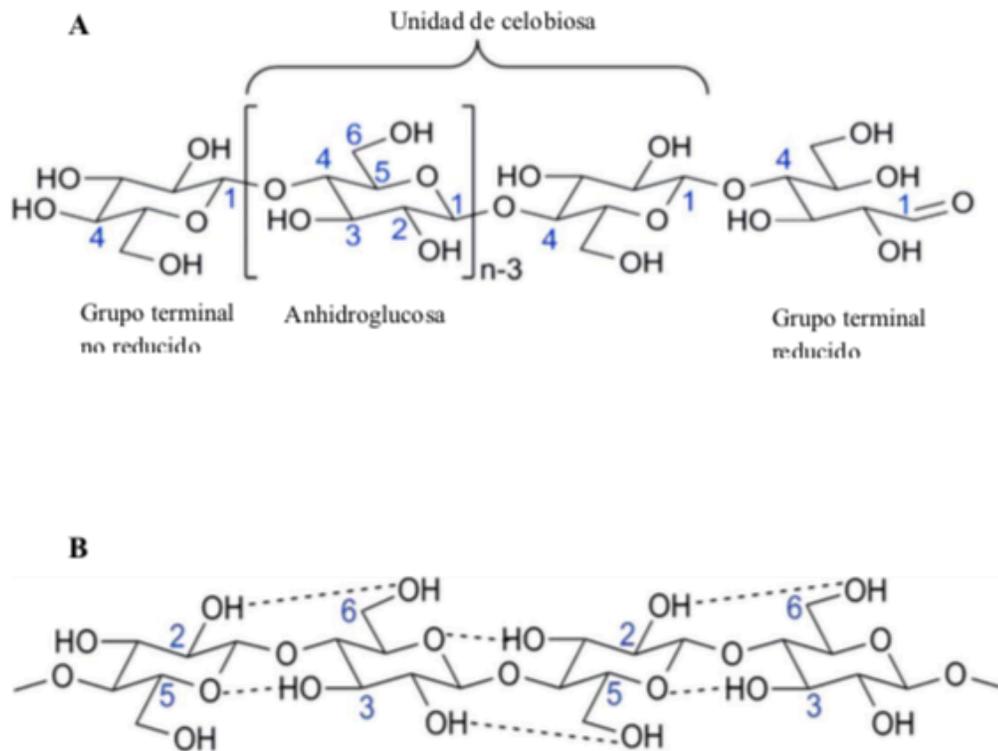


Figura 1. Estructura química de la celulosa y enlaces intermoleculares de hidrógeno (Credou *et al.*, 2014).

### Lignina

La lignina se conoce como un grupo de polímeros aromáticos resultantes del acoplamiento oxidativo de unidades de fenilpropano (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). Está presente en cantidades significativas en plantas, representando de un 15-25% (p/p) de la biomasa herbácea. La lignina les confiere rigidez a los tallos, brinda protección contra ataques de microorganismos y participa en el transporte de agua y nutrientes a través del sistema vascular de las plantas (Buranov *et al.*, 2008). Su hidrofobicidad junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos es importante para la permeabilidad de los poros entre las células vegetales. Durante la síntesis de la pared celular de las plantas, los polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa son establecidos en primer lugar, la lignina, llena los espacios entre las fibras de los polisacáridos uniéndolos y haciéndolos fuertes (Figura 2).

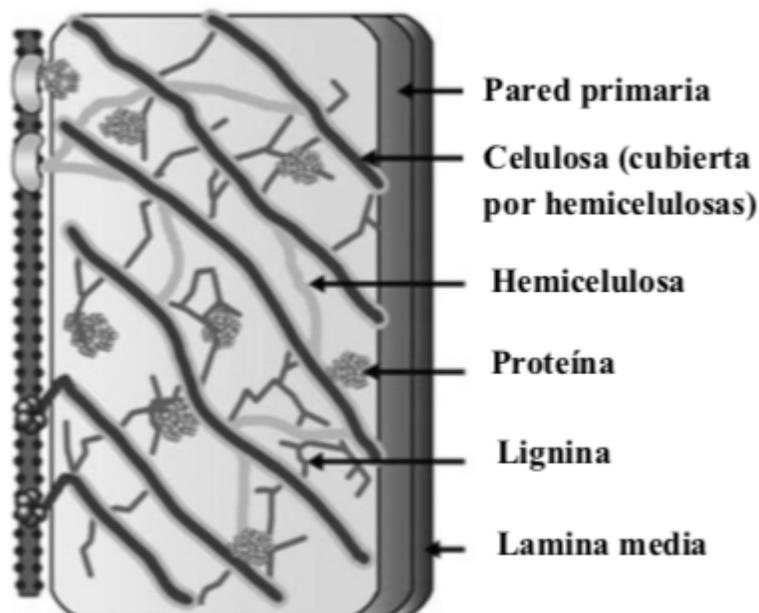


Figura 2. Diagrama esquemático de la pared celular de las gramíneas.

### Características Químicas de la Lignina

La lignina es uno de los principales componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica y el compuesto polifenólico más abundante en la Tierra. En general, se define como una molécula amorfa y heterogénea de unidades de fenilpropano. Sin embargo, su estructura química depende en gran medida del origen botánico, condiciones de cultivo de la planta y el método de extracción (Gordobil *et al.*, 2018). La definición estructural de la lignina más aceptada tiene las siguientes características: i) son polímeros vegetales contruidos a base de unidades de fenilpropano; ii) presentan gran cantidad de grupos metoxilo; iii) son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente y fácilmente condensables con fenoles o tioles (Lu *et al.*, 2010).

La lignina consiste en unidades de fenilpropano y sus precursores son tres alcoholes aromáticos (llamados monolignoles), alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 3). Los respectivos constituyentes aromáticos de los alcoholes en el polímero son tres residuos llamados: guaiacil (G) (originado del alcohol coniferílico), siringil (S) (originado del alcohol sinapílico) y *p*-hidroxifenil (H) (originado del alcohol *p*-cumarílico) (Lewis y Yamamoto, 1990).

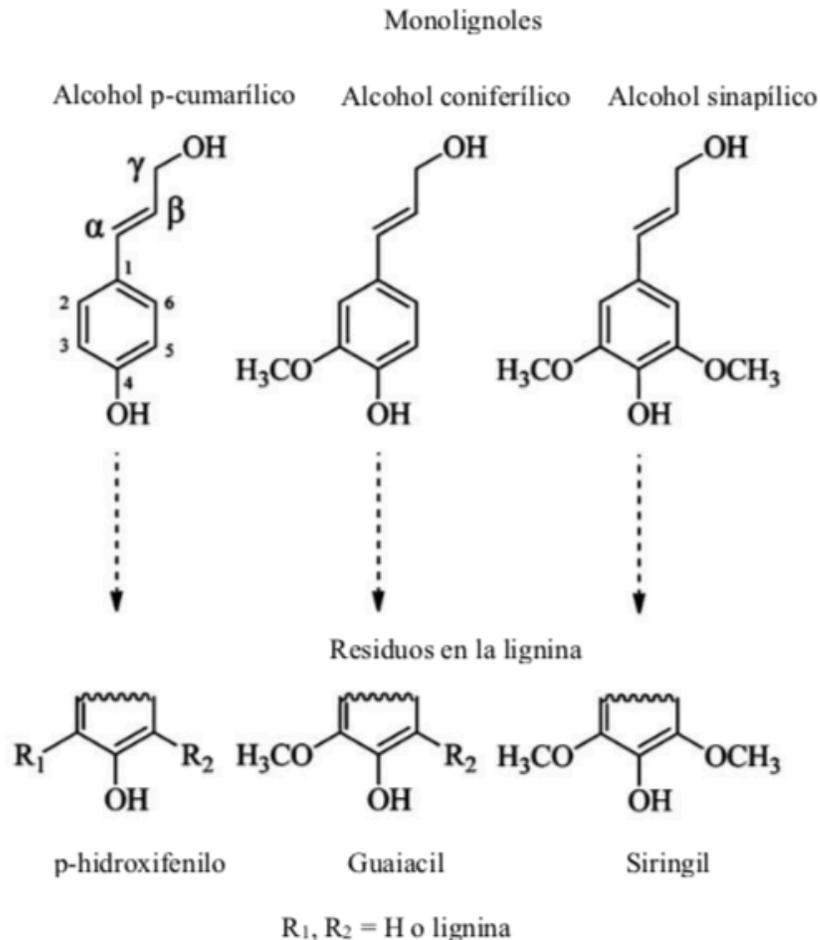


Figura 3. Principales precursores de la lignina (monolignoles) y sus estructuras aromáticas en el polímero de lignina. (Adaptada de Laurichesse y Avérous, 2014).

Los tres principales monolignoles se forman en el citoplasma a través de la “ruta del shikimato” que produce fenilalanina como intermedio clave (Vanholme *et al.*, 2010). Los monolignoles se generan mediante reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación catalizadas por diversas enzimas.

Para la formación de los polímeros de lignina los monolignoles interacciones en la pared celular a través de reacciones de oxidación (Liu *et al.*, 2011). En cultivos herbáceos como el trigo, la lignina contiene los tres monolignoles (H, G y S) en una proporción de 5, 49 y 46 %, mientras que, en plantas leñosas, las unidades G y S son las predominantes (Billa *et al.*, 1998; Lapierre *et al.*, 1995).

Durante el proceso de lignificación, las unidades monoméricas producen un polímero complejo, unido por enlaces  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1, 5-5, 4-O-5 y  $\beta$ - $\beta$  (Figura 4) (Adler, 1977; Boerian *et al.*, 2003). Los enlaces más abundantes en la lignina son los  $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4). La lignina se encuentra siempre asociada con carbohidratos (en particular con hemicelulosas) a través de enlaces covalentes en dos sitios: el carbono alfa y el carbono 4 en el anillo bencénico y a esta asociación se conoce como complejos lignina-carbohidratos (Buranov *et al.*, 2008; Xu, 2010). En las plantas herbáceas, los ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico y ferúlico) se unen a la lignina y hemicelulosas mediante enlaces de tipo éster y éter formando complejos lignina-fenólicos-carbohidratos (Baucher *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002).

### **Evaluación de la Actividad Antioxidante**

Los antioxidantes se pueden definir como compuestos que pueden retrasar o impedir la oxidación de los lípidos, ácidos nucleicos, o de otras moléculas (Wang, 2007). La reacción de oxidación generalmente sigue tres pasos principales que incluyen i) la iniciación, donde se producen los radicales libres; ii) la propagación, donde se crean los radicales libres a través de una reacción en cadena que involucra una serie de moléculas, y finalmente iii) la terminación, durante la cual dos radicales libres interactúan entre sí para terminar la reacción (Azadfar *et al.*, 2015).

Actualmente, existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. Una de las estrategias más aplicadas en las evaluaciones *in vitro*, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, donde la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Kuskoski *et al.*, 2004). Asimismo, existen dos tipos de métodos que dependen del mecanismo de acción de los antioxidantes. La primera, involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la segunda, la transferencia de electrones individuales (SET) (Dudonne *et al.*, 2009). Las pruebas tipo HAT son más relevantes para evaluar la capacidad de los antioxidantes para romper la reacción de oxidación en cadena de los lípidos. Las reacciones tipo HAT dependen del solvente y del pH, generalmente son rápidas, completándose regularmente en segundos o minutos (Karadag *et al.*, 2009). En los métodos SET, la reactividad relativa se basa en el potencial de desprotonación e ionización del grupo funcional reactivo. Este

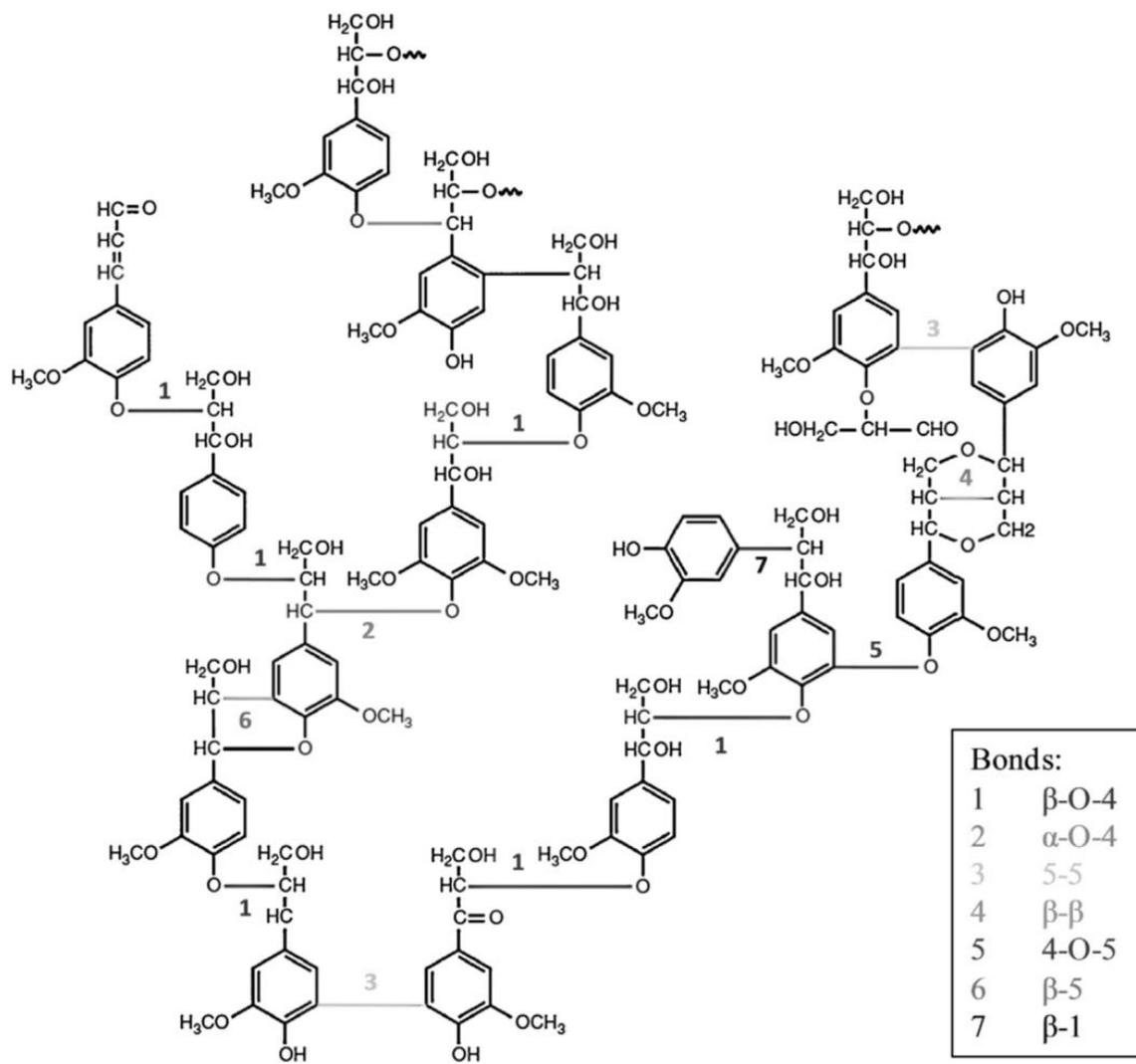


Figura 4. Estructura química representativa del polímero de lignina y sus enlaces principales (Laurichesse *et al.*, 2014).

tipo de ensayos básicamente constan de un antioxidante y una molécula oxidante. El oxidante extrae un electrón del antioxidante, causando un cambio de color que es proporcional a la concentración de antioxidante. La reacción llega a su fin cuando se detiene el cambio de color (Karadag *et al.*, 2009).

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante que comúnmente se utilizan son ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (FRAP), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas. En el ensayo FRAP se mide la capacidad de una muestra para reducir metales mientras que en los métodos ABTS, DPPH y ORAC se mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para capturar radicales libres. Dentro de estos métodos de análisis existen diferentes mecanismos de reacción. En los métodos FRAP, ABTS y DPPH ocurre una reacción con transferencia electrónica denominada transferencia de electrones individuales (SET), mientras que en el método ORAC ocurre una reacción denominada transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) (Huang, 2005; Samaniego-Sánchez *et al.*, 2007).

### **Método del DPPH\* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

El método del DPPH fue desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995). Es una técnica sencilla, de fácil preparación; sin embargo, el radical DPPH solo es soluble en solventes orgánicos por lo que no es útil para medir la actividad en compuestos de naturaleza hidrofílico. Este método se basa en la capacidad del radical libre estable 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de hidrógeno. El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos -OH activos donadores de hidrógeno capaces de capturar los radicales libres (Kaneda *et al.*, 1995). Al inicio del ensayo, el radical DPPH• posee un electrón desapareado mostrando un color azul-violeta como se muestra en la Figura 5, en presencia de una sustancia antioxidante el radical DPPH se reduce por lo que se decolora a amarillo pálido.

Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH (Chávez *et al.*, 2004).

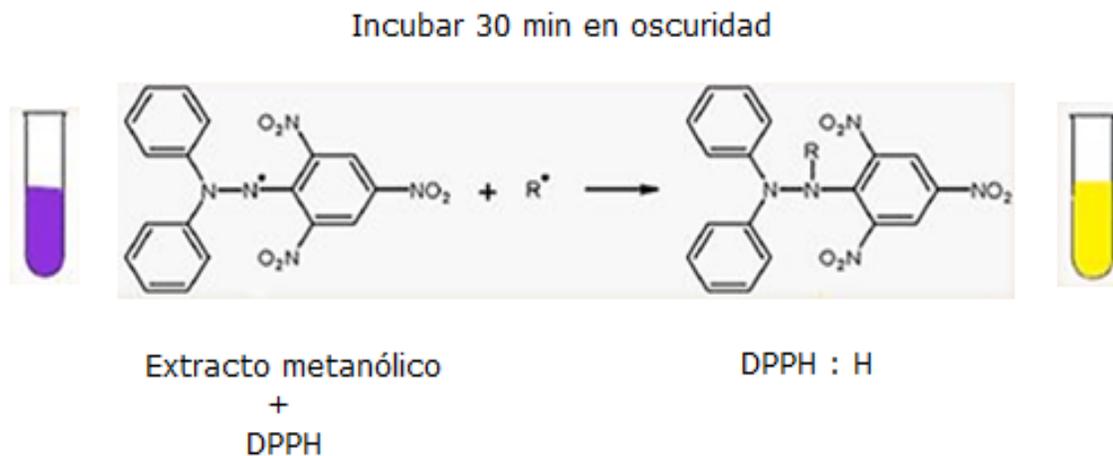


Figura 5. Reacción de desprotonación del grupo funcional reactivo en el método del DPPH•.

### Método de Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu es utilizado como medida del contenido en compuestos fenólicos totales. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a 765 nm. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, los cuales y reaccionan con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Como se observa en la Figura 6, el ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), es de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad está relacionada con el contenido en polifenoles. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

Generalmente, los resultados de este método se expresan en equivalentes de ácido gálico (EGA). Sin embargo, múltiples trabajos han usado gran variedad de estándares, como: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico y ácido ferúlico, lo que complica la comparación entre muestras. Sumándose la no estandarización del método en condiciones como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura.

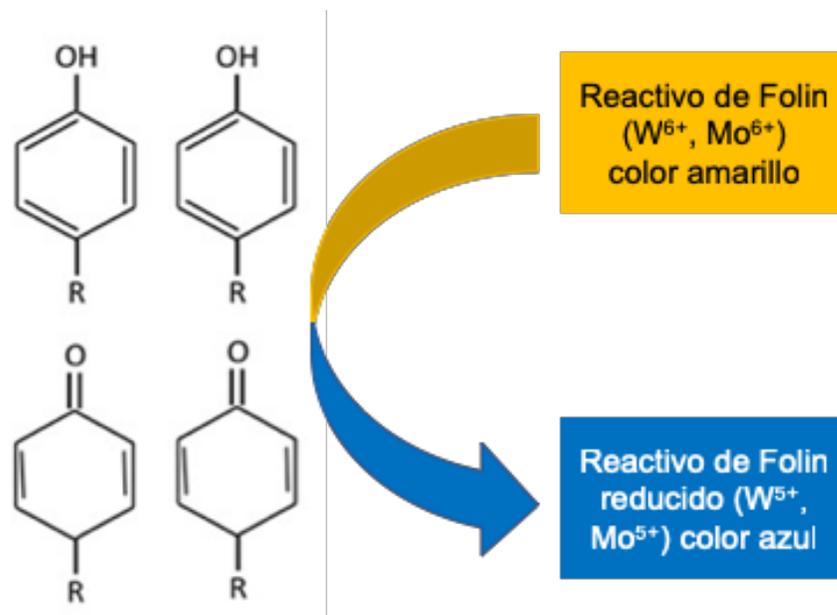


Figura 6. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu.

### Actividad Antioxidante de la Lignina

En general hay dos categorías básicas de antioxidantes: los naturales y los sintéticos. Los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico (Velioglu *et al.*, 1998).

La necesidad de encontrar alternativas a los antioxidantes sintéticos radica en el hecho de que varios estudios han demostrado su efecto dañino a nivel molecular y celular, incluso a bajas concentraciones. El alto potencial de la lignina como antioxidante ha sido anteriormente reportado haciéndolo una buena alternativa para reemplazar antioxidantes sintéticos citotóxicos como el butilhidroxitolueno (BHT) o el butilhidroxianisol (BHA), los cuales se utilizan ampliamente en industrias como la farmacéutica, cosmética, alimentación y plásticos. Además, la lignina también ha demostrado su efecto inhibitor contra algunos microorganismos, como las bacterias y hongos. Sin embargo, su capacidad inhibitoria depende principalmente del origen genético de la lignina y del proceso de aislamiento o extracción.

Los antioxidantes de origen fenólico, como la lignina, son capaces de detener la reacción en cadena de los radicales libres gracias a su capacidad de donar hidrógeno a partir de los grupos hidroxilo fenólicos, formando así el producto final estable (Shimada *et al.*, 1992). Se ha reportado que los polímeros de lignina que contienen mayor número de grupos hidroxilo fenólicos, menor cantidad de grupos hidroxilos alifáticos, bajo peso molecular y baja polidispersidad presentan mayor actividad antioxidante (Azadfar *et al.*, 2015).

Así mismo, de acuerdo con Dizhbite *et al.* (2004) un factor que afecta fuertemente la actividad de captación de radicales de la lignina es su pureza. Por lo tanto, la presencia de componentes no lignínicos como hemicelulosas, podría disminuir la capacidad antioxidante de las muestras, ya que los carbohidratos pueden generar enlaces de hidrógeno con los grupos fenólicos de lignina, lo que interfiere en las propiedades antioxidantes de la lignina.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materia Prima**

Se utilizaron residuos agrícolas provenientes de trigo cristalino (*Triticum durum*) de la variedad Patronato Oro C2008, ciclo agrícola 2011 y de sorgo (*Sorghum bicolor*), variedad Argos, ciclo agrícola 2016.

### **Preparación de la Materia Prima**

Inicialmente los residuos agrícolas fueron molidos en un molino de cuchillas (Pulvex, Modelo 200, S.A. de C.V., México) y se pasaron a través de una malla número 20 (850µm) y 30 (600µm) para homogenizar el tamaño de partícula. Posteriormente las muestras molidas fueron desgrasadas en un equipo Soxhlet durante 6 h usando éter de petróleo como solvente. Una vez desgrasadas, las muestras fueron guardadas en bolsas de polietileno para sus análisis posteriores.

### **Caracterización de los Residuos Agrícolas**

#### **Cuantificación de Lignina**

La determinación del contenido de lignina se realizó siguiendo los estándares T222 om-83 y 250 UM-85 de la TAPPI. Los cuales se basan en la cuantificación del residuo que queda después de la sacarificación de la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, con ácido sulfúrico. Se colocó 1g en un tubo y se añadió 15mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v). Enseguida la mezcla fue incubada durante 2h en un baño de agua a 20°C con sonicación intermitente. Se añadieron 10mL de agua y se mantuvo en reflujo durante 2h en un baño de agua hirviendo. Después de este lapso la muestra fue pasada a través de un filtro de vidrio prepesado, se lavó con agua y se secó en la estufa. La cantidad de lignina fue determinada por diferencia de peso.

## **Cuantificación de Celulosa y Hemicelulosa**

La cuantificación se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Zobel et al. (1966). Primeramente, se obtuvo el contenido total de las fibras, llamada holocelulosa (holocelulosa = celulosa + hemicelulosa). Se pesaron 0.7 g de paja en un matraz Erlenmeyer y se agregaron 10 mL de la solución A (Ácido Acético 1.049 M y NaOH 0.5 M). Inmediatamente se agregó 1 mL de la solución B (NaClO<sub>2</sub> al 20% m/v) y se agitó vigorosamente hasta que toda la paja estuvo en contacto con las soluciones añadidas. Las muestras fueron llevadas a un baño de agua a 70°C agitándose cada 30 minutos. La digestión se mantuvo durante 4 horas, agregándose: 1 mL de la solución B a los 45, 90, 150 y 210 minutos del experimento. Enseguida, la holocelulosa se pasó a través de filtros de vidrio previamente pesados y se lavó con 100 mL de ácido acético al 1% (v/v) y después con 10 mL de acetona. Los filtros con la holocelulosa fueron colocados en una estufa a 105°C durante 12 horas. La holocelulosa fue calculada como porcentaje en peso. Después de calcular el porcentaje de la holocelulosa, se determinó el contenido de celulosa. A la holocelulosa contenida en cada filtro se le añadieron 3 mL de NaOH al 17.5% (p/v). Pasando 5 min se adicionaron nuevamente 3 mL de NaOH. Después de 35 min la reacción se detuvo añadiendo 15 mL de agua. La muestra se filtró con 60 mL de agua, seguido de 5 mL de ácido acético y 60 mL de agua otra vez. Para finalizar, 20 mL de acetona fueron añadidos y se dejó secar a 105°C. La celulosa fue determinada en base al porcentaje en peso. El contenido de hemicelulosa se calculó por diferencia de contenido entre la holocelulosa y la celulosa.

## **Extracción de la Lignina**

Para la extracción de la lignina se utilizó un método con solventes orgánicos (Organosolv) el cual ha demostrado que extrae ligninas con alta actividad biológica.

Se siguió el método descrito por Xu *et al.*, (2006). A 10 g de muestra, fue añadida una mezcla de ácido fórmico, ácido acético y agua (30:60:10, v/v/v) con una relación sólido/líquido 20:1 (mL/g). Los recipientes fueron colocados en un baño de agua a 85 °C durante 4 horas con agitación constante. Después, la fase sólida y líquida se separó usando una tela de nylon como filtro dando dos lavados con agua destilada. La fase sólida

fue considerada como celulosa. El licor de cocimiento fue concentrado (fase líquida que contiene restos de los solventes, hemicelulosas y lignina) utilizando un rotavapor (Yamato RE301). Una vez concentrado el licor de cocimiento se añadió 3 volúmenes de etanol al 95% y se dejó reposar (12h a temperatura ambiente) con la finalidad de precipitar los carbohidratos. Este paso fue repetido 3 veces. Para remover los carbohidratos precipitados se utilizaron filtros Whatman de 47mm considerándose lo retenido como hemicelulosa. El líquido color café oscuro que se obtuvo después del filtrado se concentró y fue considerado como lignina Organosolv. Por último, el concentrado fue lavado de la siguiente manera: 1mL de licor se colocó en un tubo (50 mL), se aforó con agua destilada y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Después de este lapso se decanta el sobrenadante y en el mismo tubo se añadió un mililitro más de licor. Se afora con agua destilada y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Enseguida, el tubo se vuela a decantar y los últimos pasos se repiten hasta que el licor se termine. Por último, la lignina (lignina Organosolv) se recupera y se deja secar en una estufa a 30 °C.

### **Actividad Antioxidante de la Lignina**

#### **Preparación del Extracto Etanólico**

La actividad antioxidante de la lignina se determinará a partir del extracto etanólico preparado de la siguiente manera. Se preparó una mezcla de lignina/etanol en una concentración de 1mg/mL. La mezcla se agitó durante 10 min y se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante (fracción soluble de lignina en etanol) se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente. Enseguida se resuspendió la fracción soluble de lignina en etanol y se preparó una solución stock de 2.5 mg/mL.

#### **Ensayo del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH\*)**

La actividad antioxidante se determinará por medio de un método espectroscópico que se basa en el descenso de la absorbancia del radical libre (DPPH) en presencia del extracto etanólico de la lignina. A partir de la solución stock (2.5mg/mL) prepararon concentraciones entre 0-200 µg/mL y se evaluaron de la siguiente manera. A 100 µL del

extracto etanólico de lignina se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de una solución de DPPH (300  $\mu\text{M}$ ) recién preparada. La absorbancia fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo scientific Multiskan Go) utilizando como blanco control etanol absoluto y vitamina C (70  $\mu\text{M}$ ) como control de referencia. Los resultados fueron expresados en porcentaje de actividad antioxidante en base a la proporción de degradación de DPPH comparada con el control estándar (mezcla 1:1, etanol:DPPH) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% A_{\text{aox}} = 100 \% - \% \text{ de inhibición} \quad (1)$$

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_0 - A_m}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia del estándar;  $A_m$  es la absorbancia de la muestra a los 30 min. El  $\text{EC}_{50}$  se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres.

### **Cuantificación de Fenoles Totales**

El contenido de fenoles totales presente se determinó utilizando el método descrito por Gillespie y col. con ligeras modificaciones (Singleton y Rossi, 1965; Ainsworth y Gillespie, 2007). Se depositaron 10  $\mu\text{L}$  (2.5 mg/mL) del extracto en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, fueron añadidos 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.25N, 60  $\mu\text{L}$  de Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7%), y 90  $\mu\text{L}$  de agua para obtenerse un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  por pozo. La placa fue incubada en oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora. La absorbancia fue medida a 750 nm en un lector de microplacas (Thermo scientific Multiskan Go). Los resultados fueron calculados utilizando una curva estándar de ácido gálico y fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g).

## **Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados con estadística descriptiva y análisis de varianza a un nivel de significancia de 95% utilizando XLSTAT-2019.1.2 (Addinsoft Corp).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de los Residuos Agrícolas

La composición química de los residuos agrícolas de trigo y sorgo se muestran en la Tabla 1. Se puede observar que el residuo agrícola del sorgo contiene mayor porcentaje de lignina ( $23.7 \pm 2.29$  %) en comparación con el del trigo ( $14.1 \pm 1.89$  %). Sin embargo, el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se encuentran dentro de los rangos reportados anteriormente para residuos agrícolas (Rowell *et al.*, 1997; Gressel y Zilberstein, 2003).

Tabla. 1. Composición lignocelulósica de los residuos agrícolas de trigo y sorgo. Valores obtenidos en base seca.

Composición (%)	Residuos trigo	Residuos sorgo
Celulosa	$38.2 \pm 0.70^a$	$29.8 \pm 0.64^b$
Hemicelulosa	$35.5 \pm 0.97^a$	$26.8 \pm 0.17^b$
Lignina	$14.1 \pm 1.89^b$	$23.7 \pm 2.29^a$

Dentro de una misma línea, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

El rendimiento de extracción de la lignina por el método Organosolv utilizado en este estudio fue de cerca del 8.24%. A pesar de que el rendimiento está bajo, investigaciones muestran que este método de obtención extrae ligninas de alta pureza, bajo peso molecular (500–5000Da) y bajo índice de polidispersidad (1.5–2.5), lo cual está relacionado con mayor actividad biológica (Lora *et al.*, 2008).

### Actividad Antioxidante de las Ligninas Organosolv (LOT y LOS)

La capacidad para neutralizar radicales libres de la Lignina Organosolv (LO) fue determinada por el método del DPPH\*. Las concentraciones evaluadas se encontraron en el rango de 0 a 200 µg/mL utilizándose vitamina C (70 µM) como control de referencia (Tabla 2). El radical DPPH\* ha sido ampliamente utilizado para probar la capacidad antioxidante de ligninas aisladas a partir de diferentes fuentes. Investigaciones muestran que la actividad de captación de radicales de la lignina depende tanto del método de obtención y proceso de purificación, así como de sus grupos hidroxilo fenólicos, del peso molecular y la polidispersidad (Dizhbite *et al.* 2004).

Los resultados de la actividad antioxidante de la lignina expresada como porcentaje de actividad antioxidante se muestran en la Figura 7. Para la máxima concentración evaluada (200 µg/mL), el porcentaje de actividad antioxidante de la Lignina Organosolv de Trigo (LOT) y de la Lignina Organosolv de Sorgo (LOS) fue de  $80.79 \pm 0.26$  y  $75.26 \pm 3.97$  %, respectivamente. Mientras que el control positivo (vitamina C), presentó un valor de  $96.39 \pm 0.61$  %. Estos resultados concuerdan con los reportados por García *et al.*, (2010), quienes estudiaron la actividad antioxidante de lignina Organosolv extraída de pasto *Mischantus sinensis* y encontraron alrededor del 79% de actividad antioxidante.

Estudios realizados sobre la estructura de la lignina han demostrado que los grupos hidroxilo fenólicos son esenciales para la captación de radicales, ya que pueden atraparlos y convertirse en radicales fenoxilo (Barclay *et al.* 1997). Además, los grupos metoxilo ubicados en la posición orto respecto a los grupos hidroxilo pueden estabilizar los radicales fenoxilo (Pan *et al.* 2006), impidiéndoles la propagación y la resonancia (Ma *et al.*, 2013). Asimismo, se ha reportado que los polímeros de lignina que contienen mayor número de grupos hidroxilo fenólicos, menor cantidad de grupos hidroxilo alifáticos, bajo peso molecular y baja polidispersidad presentan mayor actividad antioxidante (Azadfar *et al.*, 2015). De acuerdo con Dizhbite *et al.* (2004) un factor que afecta fuertemente la actividad de captación de radicales de la lignina es su pureza. Ellos observaron que la capacidad antioxidante de la lignina disminuye con la presencia de carbohidratos, debido a que sus grupos polares tienden a formar enlaces de hidrógeno con los grupos fenólicos de la lignina.

Tabla 2. Actividad antioxidante (% Act AOX) de los extractos etanólicos de la lignina Organosolv evaluados por el método del DPPH\*. Lignina Organosolv de trigo (LOT); lignina Organosolv de sorgo (LOS).

<b>Muestra</b>	<b>µg/mL</b>	<b>% Inhibición</b>	<b>% Act AOX</b>
LOT <sup>a</sup>	3.13	87.94 ± 1.96	12.06 ± 1.96
	6.25	89.88 ± 5.18	10.12 ± 5.18
	12.5	78.60 ± 0.64	21.40 ± 0.64
	25	71.39 ± 0.37	28.61 ± 0.37
	50	58.66 ± 7.78	41.34 ± 7.78
	100	38.52 ± 11.2	61.48 ± 11.20
	200	19.21 ± 6.56	80.79 ± 6.56
LOS <sup>b</sup>	3.13	92.32 ± 0.85	7.68 ± 0.85
	6.25	87.51 ± 3.68	12.49 ± 3.68
	12.5	48.58 ± 2.19	15.14 ± 2.19
	25	79.65 ± 3.70	20.35 ± 3.70
	50	66.88 ± 2.31	33.12 ± 2.31
	100	48.58 ± 6.41	51.42 ± 6.41
	200	24.74 ± 3.97	75.26 ± 3.97

Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0.05).

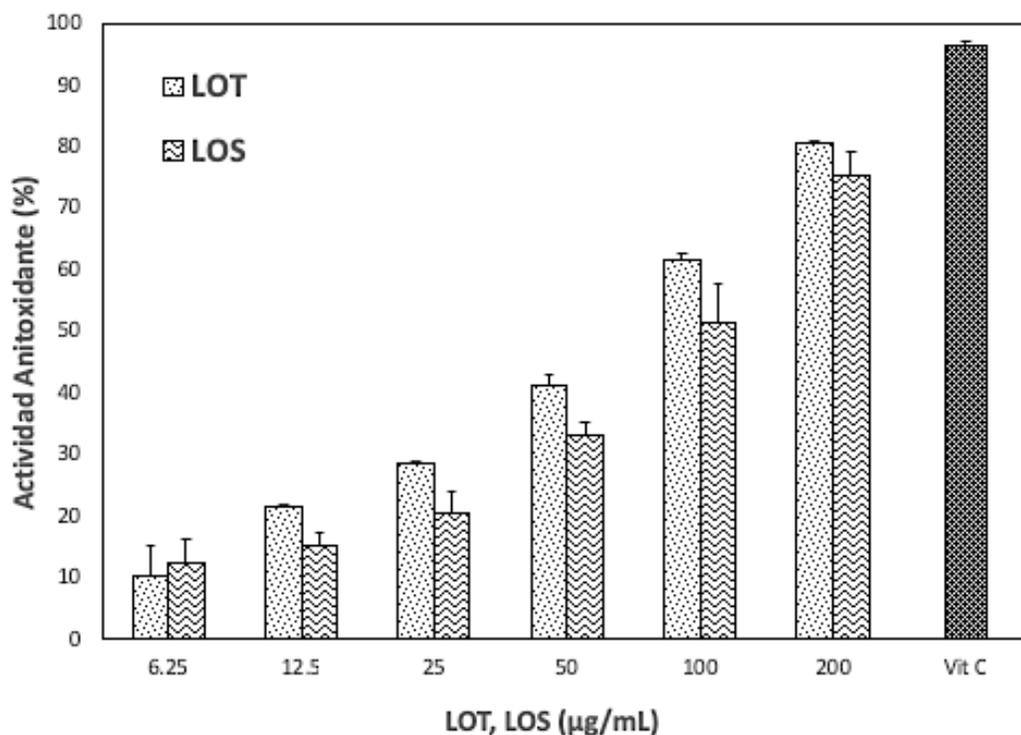


Figura 7. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de la lignina Organosolv evaluados por el método del DPPH\* en comparación con el antioxidante estándar (vitamina C, 70 µM, 24.6 µg/mL). Las concentraciones de la lignina fueron de (0-200 µg/mL).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los residuos agrícolas provenientes de trigo y sorgo pueden ser una fuente natural de antioxidantes. Sin embargo, en la Figura 7 se observa que la actividad antioxidante resultó significativamente mayor en la LOT comparada con la LOS. Estos resultados se pueden relacionar con la composición de los compuestos fenólicos y su peso molecular; un mayor contenido de grupos hidroxilo fenólicos y menor peso molecular podrían estar otorgando una mayor actividad antioxidante a la lignina extraída a partir de paja de trigo. O bien, la lignina extraída de residuos de sorgo podría contener una mayor cantidad de carbohidratos y

cenizas residuales. Investigaciones muestran que existe una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el total de compuestos fenólicos (Fuentes-Alventosa *et al.*, 2008).

En la Tabla 3 y Figura 8 se muestra el contenido de fenoles totales de las ligninas Organosolv extraída a partir de los residuos agrícolas de trigo (LOT) y sorgo (LOS). Los resultados fueron expresados como equivalente de ácido gálico por gramo de muestra. Se observa que el mayor contenido de grupos fenólicos corresponde a la LOT ( $95.75 \pm 2.27$  mgEAG/g lignina). Estos resultados concuerdan con la actividad antioxidante encontrada por el método del DPPH\*. Además, de acuerdo con el Instituto Argentino de Normalización (IRAM, 2004), para que un extracto de origen natural sea considerado biológicamente activo, deberá contener 50 mg EAG/g; lo cual indica que la lignina obtenida a partir de los residuos agrícolas en este estudio puede ser considerada un compuesto con actividad antioxidante.

Tabla 3. Contenido de fenoles (mgEAG/g lignina) y  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las ligninas Organosolv de trigo (LOT); lignina Organosolv de sorgo (LOS) y vitamina C (Vit C) como antioxidante estándar ( $70 \mu\text{M}$ ).

<b>Muestra</b>	<b>mgEAG/g lignina</b>	<b><math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>LOT</b>	$95.75 \pm 2.27^a$	$94.92 \pm 0.83^b$
<b>LOS</b>	$72.42 \pm 2.40^b$	$116.00 \pm 8.48^a$
<b>Vit C</b>	-	$5.38 \pm 0.37^c$

Dentro de una misma línea, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

La concentración inhibitoria media del radical en las ligninas Organosolv ( $EC_{50}$ ) se muestran en la Tabla 3. En la Figura 8 se observa que existe una correlación entre los fenoles totales y el valor de  $EC_{50}$ , a mayor contenido de fenoles, menor es el valor de  $EC_{50}$  y, por lo tanto, más alto es el potencial antioxidante. En valor de  $EC_{50}$  encontrado en la

LOT ( $EC_{50}$ :  $94.92 \pm 0.83 \mu\text{g/mL}$ ) fue cercano al reportado por Zhang *et al.* (2015), quienes también evaluaron lignina Organosolv extraída a partir de paja de trigo ( $EC_{50}$ :  $88.3 \mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, el valor de  $EC_{50}$  de la lignina extraída a partir de residuos de sorgo ( $116.00 \pm 8.48 \mu\text{g/mL}$ ) resultó mayor en comparación con la de trigo. Estos resultados concuerdan con la actividad antioxidante determinada por el método del DPPH\*, donde se observó que la lignina extraída a partir de paja de trigo presentó la mayor actividad. Como se mencionó anteriormente, este comportamiento se puede deber a una mayor proporción de grupos hidroxilo fenólicos presentes en la lignina Organosolv extraída de paja de trigo, así como a un menor peso molecular.

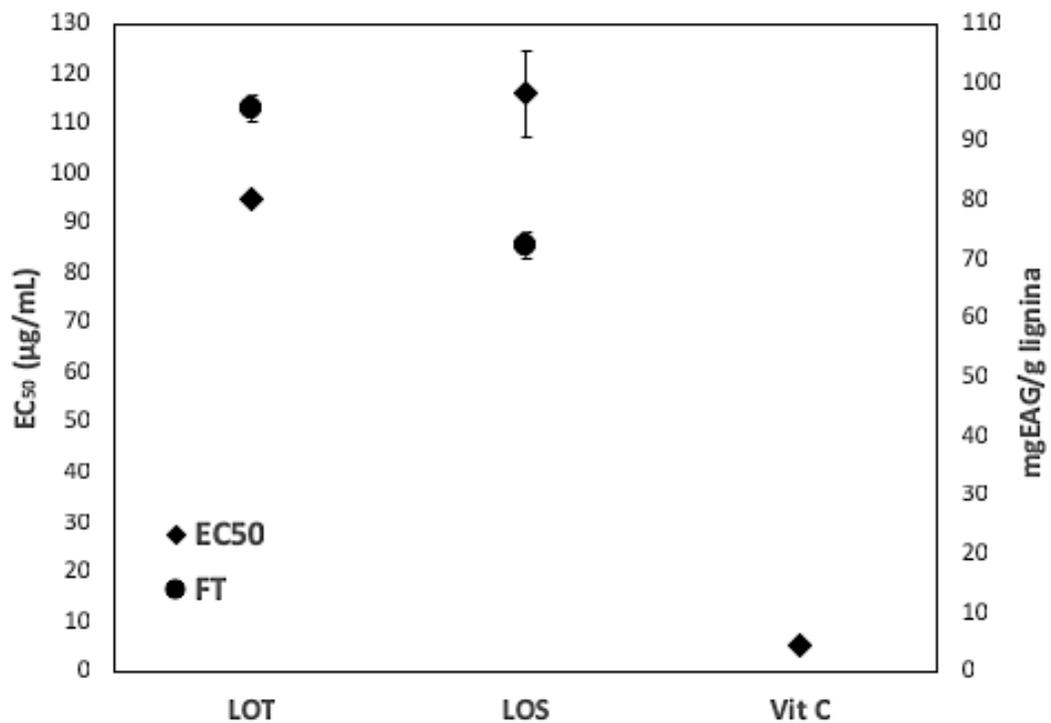


Figura 8. Fenoles totales (mgEAG/g lignina) y  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las ligninas Organosolv evaluadas en comparación con el antioxidante estándar (vitamina C,  $70 \mu\text{M}$ ): lignina de trigo (LOT) y lignina de sorgo (LOS).

## CONCLUSIONES

En este proyecto se logró aislar ligninas a partir de residuos agrícolas utilizando un método con solventes orgánicos.

La lignina obtenida demostró tener actividad antioxidante por lo que puede ser utilizado como un aditivo natural en alimentos, fármacos y cosméticos.

La lignina extraída de residuos agrícolas de trigo resultó con el mayor porcentaje de actividad antioxidante, mayor contenido de fenoles totales y menor valor de  $EC_{50}$ , lo cual puede estar relacionado con una mayor proporción de grupos hidroxilo fenólicos, menor peso molecular y una mayor pureza.

## **RECOMENDACIONES**

Determinar la estructura de los compuestos fenólicos de la lignina y relacionarlo con su actividad antioxidante.

Determinar el peso molecular de las ligninas extraídas, ya que se ha reportado que a mayor peso molecular aumenta la heterogeneidad de la lignina lo que conlleva a una disminución de la actividad de captación de radicales.

Cuantificar el porcentaje de carbohidratos residuales ya que pueden interferir con la actividad antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adler E. 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Science and Technology* 11(3):169-218.
- Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2:875–877.
- Alemdar A, Sain M. 2008. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology* 68(2):557- 565.
- Azadfar M, Gao AH, Bule MV, Chen S. 2015. Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. *International Journal of Biological Macromolecules* 75:58–660.
- Barclay LRC, Xi F, Norris JQ. 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Lignin Model Compounds, *Journal of Wood Chemistry and Technology* 17:1-2, 73-90.
- Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17(2):125-197.
- Billa E, Koukios EG, Monties B. 1998. Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability* 59(1-3):71-75.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54:519-546.
- Buranov AU, Mazza G. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28(3):237-259.
- Chávez M, Marcelo ED. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4(4): 15-46.
- Credou J, Berthelot T. 2014. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B* 2(30):4767-4788.
- Dizhbite T, Galina T, Vilhelmina J, Uldis V. 2004. Characterization of the radical scavenging activity of lignins—natural antioxidants. *Elsevier* 95(3):3069-3017.
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem* 57:1768– 1774.

Feng Xu, Sun JX, Sun RC, Fowler P, Baird MS. 2006. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw *Industrial Crops and Products* 23:180–193.

García A, Toledano A, Andrés MA, Labidi J. 2010. Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry* 45(6):935-940.

Ge Y, Wei Q, Li Z. 2014. Preparation and evaluation of the free radical scavenging activities of nanoscale lignin biomaterials. *BioResources* 9(4):6699-6709.

Grace MH, Esposito D, Dunlap KL, Lila MA. 2014. "Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity, and anti-inflammatory bioactivity in wild Alaskan and commercial vaccinium berries," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(18):4007-4017.

Gressel J, Zilberstein A. 2003. Let them eat (GM) straw *TRENDS in Biotechnology* 12(21).

Hendriks AT, WM, Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100(1):10-18.

Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.

[IRAM]. Instituto Argentino de Normalización - Subcomité de productos agroalimentarios del NOA 2004. Norma IRAM 15935-1 Scheme 1. Buenos Aires.

Karadag A, Ozcelik B, Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* 2:41–60.

Kortenska VD, Yanishlieva NV, Kasaikina OT, Totzeva IT, Boneva MI, Russina IF. 2002. "Phenol antioxidant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds," *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(8):513-519.

Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 25(4):726-732.

Lapierre C, Pollet B, Rolando C. 1995. New Insights into the Molecular Architecture of Hardwood Lignins by Chemical Degradative Methods. *Research on Chemical Intermediates* 21(3-5):397-412.

Laurichesse S, Averous L. 2014. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers, *Prog. Polym. Sci.* 39(7):1266-1290.

Lemieux PM, Lutes CC, Santoianni DA. 2004. Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Elsevier*, 30(1):1-32.

Lewis NG, Yamamoto E. 1990. Lignin - Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 455-496.

Li CL, Cheng G, Balan V, Kent MS, Ong M, Chundawat SPS, Sousa LD, Melnichenko YB, Dale BE, Simmons BA, Singh S. 2011. Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresour Technol* 102(13):6928-6936.

Liu CJ, Miao YC, Zhang KW. 2011. Sequestration and Transport of Lignin Monomeric Precursors. *Molecules* 16(1):710-727.

Lora JH, 2008. Industrial commercial lignins: Sources, properties and applications. In M. Belgacem, and A. Gandini (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Oxford, UK, Elsevier:225-241.

Lu F, Ralph J. 2010. Chapter 6 - Lignin. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. Amsterdam: Elsevier:169-207.

Lu F, John R. 2010. *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biochemicals*. Amsterdam: Elsevier.

Ma P, Gao Y, Zhai HM. 2013. Fractionated Wheat Straw Lignin and Its Application as Antioxidant. *Bioresources* 8(4):5581-5595.

Miyake Y, Murakami A, Sugiyama Y, Isobe M, Koskimizu K, Ohigashi H. 1999. "Identification of coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(8):3151-3157.

Oihana G, Herrera R, Yahyaoui M, Ilk S, Murat K, Labidi J. 2018. Potential use of kraft and organosolv lignins as a natural additive for healthcare products *RSC Adv.* 8:24525–24533.

Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, Sabatini AG, Marcazzan GL, Bogdanov S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis* 15:235-240.

Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz P, Marita J, Hatfield R, Ralph S, Christensen J, Boerjan W. 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3(1-2):29-60.

Rowell RM, Young RA, Rowell JK. 1997. in *Paper and Composites from Agro-Based Resources*. CRC Press. 7-427 p.

- Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(5):279-291.
- Saito T, Perkins JH, Vautard F, Meyer HM, Messman JM, Tolnai B, Naskar AK. 2014. Methanol Fractionation of Softwood Kraft Lignin: Impact on the Lignin Properties. *Chem. Sus. Chem* 7(1):221-228.
- Salem MZM., Abdel-Megeed A, Ali HM. 2014. "Stem wood and bark extracts of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook): Chemical analysis and antibacterial, antifungal, and antioxidant properties," *BioResources* 9(2):2382-2395.
- Samaniego-Sánchez C, Troncoso-González AM, García-Parrilla MC, Quesada-Granados JJ, García de la Serrana HL, López MC. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica chimica acta* 593:103-107.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara T, Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion *J. Agr. Food Chem* 40:945-948.
- SIAP-SAGARPA (2017). Boletín de la producción de Trigo, 26 de octubre de 2017. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211692/produccion\\_trigo\\_marzo\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211692/produccion_trigo_marzo_2017.pdf)
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158.
- Slavin, J. 2003. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(1):129-134.
- Sun RC, Sun XF, Wang SQ, Zhu W, Wang X Y. 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products* 15(3):179-188.
- Sun R, Fang JM, Rowlands P, Bolton J. 1998. Physicochemical and Thermal Characterization of Wheat Straw Hemicelluloses and Cellulose. *J Agric Food Chem* 46(7):2804-2809.
- Thakur VK, Thakur MK, Raghavan P, Kessler MR. 2014. Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: a review. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2:1072–1092.
- Ugartondo V, Mitjans M, Vinardell MP. 2008. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Elsevier* 99(14):6683-6687.

- Valdez-Morales M, Espinosa-Alonso LG, Espinoza-Torres LC, Delgado-Vargas F, Medina-Godoy S. 2014. "Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts," *Journal of Agricultural And Food Chemistry* 62(23):5281-5289.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol* 153(3):895-905.
- Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Omah B. 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and grain Products. *Journal Agricultural food chemistry*. 46:4113-4117.
- Vishtal A, Kraslawski A. 2011. Challenges in industrial applications of technical lignins. *Bioresources*, 6(3):3547-3568.
- Williams WB, Cuvelier ME, Berset C. 2015. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28:25-30.
- Xu F. 2010. Chapter 2 - Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. Amsterdam: Elsevier. 9- 47 p.
- Yasin MAB, Bazmi A, Karim S. 2010. " Cellular Polymers. Efficient Utilization of Rice-Wheat Straw to Produce Value-Added Composite Products. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 1(2).136-143.
- Zhang S, Zhang Y, Liu L, Fang G. 2015. Antioxidant activity of Organosolv lignin degraded usin SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/ZrO<sub>2</sub> as catalyst. *BioResoucer* 10(4):6819-6829.