

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS METABOLIZADOS,
SINTETIZADOS O LIBERADOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL
MAÍZ AZUL Y EL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides*.**

POR:

Q. B. P. Jesús Manuel Escajeda García

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIHUAHUA, MÉXICO

MARZO DEL 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Asunto: Liberación Tesis

Chihuahua, Chih., 27 de febrero del 2023

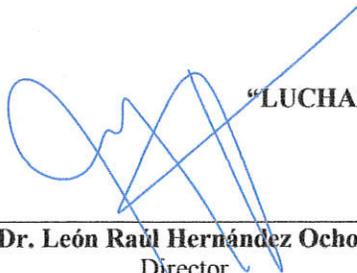
M.A.P. TERESA VIRIDIANA ESPINOZA MOLINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTE. -

Los que suscriben, informamos a usted que se llevó a cabo la revisión de la tesis titulada: **“Caracterización e identificación de compuestos metabolizados, sintetizados o liberados durante el proceso de fermentación de maíz azul y el hongo *colletotrichum gloeosporioides*”**, presentada por el estudiante **Jesús Manuel Escajeda García**, con número de matrícula **274235**, alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Ciencia en Tecnología en Alimentos**.

Se le fueron indicadas al estudiante las correcciones que eran necesarias efectuar, y después de realizarse lo anterior y verificar que las mismas fueron atendidas, manifestamos que el documento en cuestión, cumple con los requisitos de calidad y originalidad señalados por el Comité de Tesis y por la Facultad de Ciencias Químicas, por lo que autorizamos que sea impresa para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A T E N T A M E N T E

“LUCHAR PARA LOGRAR, LOGRAR PARA DAR”



Dr. León Raul Hernández Ochoa
Director



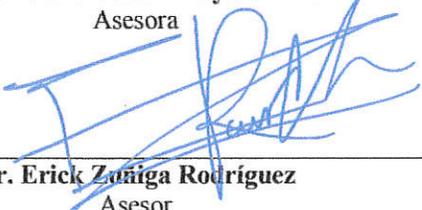
Dra. Fabiola Sandoval Salas
Asesora



Dra. Nubia Ivette Amaya Olivas
Asesora



Dra. Erika Salas Muñoz
Asesora



Dr. Erick Zamiga Rodríguez
Asesor



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIA
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Campus Universitario,
Carretera Universitaria 2
Chihuahua, Chih., México C.P 31125
Teléfonos: +52 (614) 236.6000
Correo electrónico: v.fcq.uach.mx

**POR UN
2023
SIN VIOLENCIA
DE GÉNERO**

2023

+uach

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme vida y salud para cumplir una meta más en mi vida.

A mi hija Emma, mi razón más grande de poder seguir, quiero que algún día estés orgullosa de todo lo que he logrado, porque todo lo hago por ti y para ti.

A mi esposa Guadalupe, no hay palabras para agradecerle a la vida por darme la mejor compañera de aventuras, este es un sueño de muchos que están por llegar y cumplir a tu lado, por siempre.

A nuestros padres y hermanos, por su confianza infinita y su apoyo incondicional, sin su esfuerzo y dedicación, nosotros no hubiésemos podido llegar hasta donde estamos ahorita.

Al Doctor León Hernández, el mejor mentor y maestro, gracias por siempre creer y valorar lo que hago, por guiarme cada paso en este largo camino, por ser no solo un gran director de tesis, sino un gran modelo a seguir.

A la Doctora Nubia Amaya quien ha estado de manera incondicional, sin importar hora o lugar, siempre con disposición a ayudar y a enseñar, sin duda un gran pilar en este proyecto.

A mi honorable comité, a la Doctora Erika Salas, la Doctora Nubia Amaya, la Doctora Fabiola Sandoval y al Doctor Erick Zúñiga por su gran ayuda a lo largo del proyecto, mi respeto y admiración para ustedes.

A la Doctora Lingyun Chen y todo su equipo por abrirnos las puertas de su laboratorio en la Universidad de Alberta en Canadá y habernos compartido todo su conocimiento dejándonos un inmenso aprendizaje.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento,
Jesús Manuel Escajeda García

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES TÉCNICOS.....	13
2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS	13
2.1.1 Terpenos (Terpenoides)	15
2.1.2 Compuestos fenólicos (PC)	16
2.1.3 Compuestos que contienen nitrógeno	19
2.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN	19
2.2.1 Fermentación de maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	20
2.3 MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.)	22
2.4 MAÍZ AZUL (<i>Zea mays</i> L.).....	22
2.4.1 Composición química del maíz azul (<i>Zea mays</i> L.).....	23
2.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE METABOLITOS SECUNDARIOS	24
2.6 HONGOS	25
2.6.1 Generalidades de los hongos.....	25
2.6.2 Hongos productores de metabolitos secundarios	26
2.7 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	28
2.7.1 Metabolitos secundarios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29
2.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS (GC/MS)	30
2.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	31
2.10 ANTECEDENTES PARTICULARES.....	33
III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	34
3.1 Objetivo general.....	34
3.2 Objetivos particulares	34
3.3 Hipótesis	35
3.4 Justificación	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

4.1 Materiales	35
4.2.1. Esterilización del grano de maíz azul	36
4.2.2 Molienda del grano de maíz azul y preparación de la harina.	36
4.2.3 Preparación de soluciones conidiales	36
4.2.4 Preparación de las muestras de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.	37
4.2.5 Proceso de fermentación de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	38
4.2.6 Extracción de metabolitos secundarios	40
4.2.7 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía de gases unido a espectrometría de masas.	40
4.2.8 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)	41
4.2.9 Diseño factorial de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.	42
V.RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
5.1 Caracterización Mediante Morfología de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	43
5.2 Soluciones conidiales de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	43
5.3 Fermentación de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	43
5.4 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía de gases unido a espectrometría de masas.	44
5.5 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)	51
5.5.1 Delfinidina 3-glucósido (DEL)	54
5.5.2 Ácido ferúlico (FA)	62
5.5.3 Ácido p-cumárico (PCA)	69
VI. CONCLUSIÓN	75
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Productos alimenticios fermentados a base de maíz en México y sus características tecnológicas. Tabla modificada de Cháves-López et al (2020).....	21
Tabla 2 Diversos productos sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones (Cortés-Sánchez et al., 2013)	27
Tabla 3 Proporciones de harina de maíz azul y medio de cultivo Czapek Dox en caldo montadas en los matraces Erlenmeyer hechos por triplicado.	38
Tabla 4 Identificación de las muestras resultantes de la fermentación de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Proporciones modificadas de la metodología de Aguilar et al (2010).....	39
Tabla 5 Condiciones empleadas en el análisis GC-MS	41
Tabla 6 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a los 20 días de fermentación.....	45
Tabla 7 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a los 25 días de fermentación.....	48
Tabla 8 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a los 30 días de fermentación.....	50
Tabla 9 Tiempos de retención de los picos de la curva de calibración y longitud de onda utilizada para el análisis de compuestos fenólicos producidos en la fermentación de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC).....	52
Tabla 10 Alimentos funcionales ricos con compuestos fenólicos	56
Tabla 11 Concentraciones de muestras de Delfinidina 3-glucósido (DEL) con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.....	57
Tabla 12 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de Delfinidina 3-glucósido (DEL).....	59

Tabla 13 Diseño Factorial de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de Delfinidina 3-glucósido (DEL).....	60
Tabla 14 Concentraciones de ácido ferúlico (FA) en muestras con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.....	63
Tabla 15 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de ácido ferúlico (FA).....	66
Tabla 16 Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de ácido ferúlico (FA).....	67
Tabla 17 Concentraciones de muestras de Ácido p-cumárico (PCA) con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.....	71
Tabla 18 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de ácido p-cumárico (PCA).....	73
Tabla 19 Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de ácido p-cumárico (PCA).....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de isopentano. (Taiz, 2005)	15
Figura 2 Estructura de isopreno. (Taiz, 2005)	15
Figura 3 Estructura básica y sustituyentes de las antocianidinas. (Garzón, 2008).....	17
Figura 4 Estructura y clasificación de compuestos fenólicos. (Rasouli et al., 2016).....	18
Figura 5 Célula fúngica: Fragmento de hifa (Modificada de Micología Médica Básica. (Bonifaz, 2012).	26
Figura 6 Morfología macroscópica y microscópica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Teñido con azul de algodón. 40 x.	29
Figura 7 Cromatógrafo de gases de la marca Agilent technologies modelo 7890B	31
Figura 8 Fórmulas para el cálculo de la concentración de soluciones conidiales. (Colomé et al., 1986).....	37
Figura 9 Cálculo de las soluciones conidiales	43
Figura 10 Muestras de la fermentación de harina de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.) con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	44
Figura 11 Cromatograma de muestra 20 F en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS). Tiempo de retención 3.358 y 5.745 min correspondiente a Acetoína y 2,3 butanediol, respectivamente.	48
Figura 12 Cromatograma de muestra 25 E en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS) Tiempo de retención 4.879 y 5.745 min correspondiente a ácido acético y 2,3 butanediol, respectivamente.....	49
Figura 13 Cromatograma de muestra 30 I en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS). Tiempo de retención 5.753 y 6.141 min correspondiente a ácido acético y 2,3 butanediol, respectivamente.....	51
Figura 14 Cromatograma obtenido en la curva de calibración en el análisis de la mezcla de estándares utilizados leído a una λ de 320 nm (ácido p-cumárico y ácido ferúlico)	52
Figura 15 Cromatograma obtenido en el análisis de la mezcla de estándares utilizados leído a una λ de 520 nm (Delfinidina 3-glucósido)	53

Figura 16 Perfil cromatográfico de muestra 30 E (Con 80 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 20 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)	57
Figura 17 Comparación de medias de Tukey de Delfinidina (DEL) en las muestras fermentadas de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	61
Figura 18 Perfil cromatográfico de muestra 25 I (Con 70 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 30 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)	63
Figura 19 Comparación de medias de Tukey de ácido ferúlico en las muestras fermentadas de harina de maíz azul con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	69
Figura 20 Perfil cromatográfico de muestra 25 B (Con 90 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 10 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)	70

LISTA DE ABREVIATURAS

®.- Marca registrada

°C.- Grado centígrados

μL - Microlitro

g.- Gramos

Kg.- Kilogramos

h.- Horas

Min.- Minutos

mg.- miligramos

mL.- mililitros

mg/Kg.- Miligramos por kilogramo

sp.- Especie

UV.- Ultravioleta

et al.- y colaboradores

ppm.- partes por millón

λ.- Longitud de onda

Con.- Conidias

RESUMEN

Los metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales son compuestos químicos derivados del metabolismo secundario de las plantas que cumplen múltiples funciones no vitales en éstas y juegan un papel importante en su adaptación y el medio ambiente, pero también representan una buena fuente de compuestos bioactivos que mejoran la salud humana. El objetivo de este trabajo fue la caracterización e identificación de compuestos presentes en harina de maíz azul antes y después de un proceso de fermentación donde se utilizaron diferentes proporciones de sustrato, es decir harina de maíz azul (*Zea mays* L.) y medio de cultivo Czapek Dox (90 mL de medio de cultivo con 10 g de harina de maíz azul, 80 mL de medio de cultivo con 20 g de harina de maíz azul y 70 mL de medio de cultivo con 30 g de harina de maíz azul) y se fermentaron en 3 tiempos diferentes (20, 25 y 30 días) con el hongo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*. Se realizó una caracterización e identificación de los compuestos mediante técnicas cromatográficas, como la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Los resultados obtenidos mostraron la presencia de Acetoína, 2, 3 butanediol y ácido acético en la GC, En HPLC se realizó la caracterización e identificación de compuestos fenólicos con tres soluciones estándar las cuales fueron delfinidina 3-glucósido (DEL), ácido p-cumárico (PCA) y ácido ferúlico (FA).

ABSTRACT

The secondary metabolites, secondary products, or natural products are chemical compounds derivative from secondary metabolism of the plants that achieve multiple functions non vitals in the plants and play an important role in its adaptation and the environment, but also represent a good source of bioactive compounds that improve human health. The aim of this work was the characterization and identification of compounds presents in blue corn flour before and after a fermentation process where different proportions were used of blue corn (*Zea Mays* L.) flour and Czapek Dox culture medium (90 mL of culture medium with 10 g of blue corn flour, 80 mL of culture medium with 20 g of blue corn flour and 70 mL of culture medium with 30 g of blue corn flour) and were fermented at 3 different times (20, 25 and 30 days) with the *Colletotrichum gloeosporioides* fungus. A characterization and identification of the compounds was carried out using chromatographic techniques, like Gas Chromatography (GC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), The obtained results showed the presence of Acetoín, 2, 3 butanediol, and acetic acid in the GC, In HPLC the Characterization and identification of phenolic compounds was carried out with three standards solutions which were delphinidin 3-glucoside (DEL), p-coumaric acid (PCA) and ferulic acid (FA).

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen capacidad para sintetizar diferentes moléculas orgánicas llamadas metabolitos secundarios. Las estructuras de esqueleto de carbono únicas son propiedades básicas de los metabolitos secundarios de las plantas. Los metabolitos secundarios no son imprescindibles para que una célula viva, pero juegan un papel en la interacción de la célula con su entorno, preservando la existencia continua del organismo en sus ecosistemas. Los metabolitos secundarios protegen a las plantas frente a estreses, tanto bióticos (bacterias, hongos, nemátodos, insectos o pastoreo de animales) como abióticos (temperatura y humedad elevadas, sombra, lesiones o presencia de metales pesados). Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse en grupos químicamente diferentes: terpenos, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados y compuestos que contienen azufre.

El maíz azul (*Zea mays* L.) debe su color a las antocianinas, las cuales están localizadas en una capa delgada que recubre al endospermo. Éste así mismo está formado por proteínas y gránulos de almidón (responsable de las propiedades de textura en productos elaborados con este cereal) cuya forma y tamaño tendrán influencia en sus propiedades funcionales (Lindeboom *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006). En México se cuenta con una gran diversidad de variedades de maíz azul. Así mismo existe variabilidad en tamaño, densidad y dureza del grano, así como en su composición química. En el caso de la fermentación, ésta se ha aplicado ampliamente en las industrias alimentaria, química, y farmacéutica para ayudar en la extracción, fabricación y modificación de compuestos bioactivos. (Mesfin *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue la caracterización e identificación de los compuestos presentes en la harina de maíz azul antes y después de un proceso de fermentación donde se utilizaron diferentes proporciones de harina de maíz azul (*Zea Mays* L.) y medio de cultivo Czapek Dox (90 mL de medio de cultivo con 10 g de harina de maíz azul, 80 mL de medio de cultivo con 20 g de harina de maíz azul y 70 mL de medio de cultivo con 30 g de harina de maíz azul) y se fermentaron en 3 tiempos diferentes (20, 25 y 30 días) con el hongo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*.

II. ANTECEDENTES TÉCNICOS

2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios (SM), productos secundarios o también llamados productos naturales de las plantas son compuestos químicos derivados del metabolismo secundario, cumplen múltiples funciones no vitales en las plantas, interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente para protegerlas de los depredadores herbívoros, virus, hongos y bacterias (Shilpa *et al.*, 2010; Pérez- Alonso *et al.*, 2011). Así mismo, representan fuente importante de ingredientes activos de medicamentos y de otros productos químicos como nutraceuticos (Goossens *et al.*, 2003, Valenzuela *et al.*, 2014).

Dichos metabolitos, dadas sus propiedades terapéuticas han sido los cimientos de la medicina moderna, ya que han sido utilizados en la fabricación de fármacos y fitofármacos.

Se definen también como aquellos compuestos que no poseen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan. Aunque estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, los que se encuentran en las plantas superiores son los que han despertado mayor interés desde el punto de vista de su posible función biológica y su aplicación.

Debido a que las plantas no pueden desplazarse de un lugar a otro, han desarrollado gran cantidad de estrategias para sobrevivir en su condición sedentaria, y en este sentido los metabolitos secundarios ejercen las siguientes funciones importantes: protegerlas de los depredadores, proporcionar cierta ventaja al competir por el hábitat con otras plantas, atraer polinizadores y simbiontes, además de otorgarles protección contra los diferentes tipos de estrés a los que se ven expuestos a lo largo de su vida (Robert *et al.*, 1985).

El metabolismo se define como una serie de reacciones o transformaciones bioquímicas catalizadas por enzimas que ocurren dentro de las células de un organismo y que son principalmente necesarias para su crecimiento, desarrollo y para una respuesta adecuada a su entorno (Wink, 1998). El metabolismo puede estar en forma de

anabolismo o catabolismo. Los metabolitos son los productos intermedios o productos del metabolismo. El término metabolitos suele restringirse a moléculas pequeñas (Taiz *et al.*, 2005).

Un metabolito primario está directamente involucrado en el crecimiento, desarrollo y reproducción normales (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos). Los metabolitos secundarios no están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un organismo, pero tienen una función ecológica. Se pueden encontrar en las hojas, el tallo, la raíz o la corteza de la planta, dependiendo del tipo de metabolito secundario que se haya producido (Hill, 1952). Los metabolitos secundarios se diferencian de los metabolitos primarios en tener una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario particular se encuentra en una sola especie vegetal o en un grupo de especies relacionado, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal. Durante muchos años se pensó que estos compuestos eran simplemente productos finales sin función del metabolismo o desechos metabólicos. Los estudios de estas sustancias fueron iniciados por químicos orgánicos de los siglos XIX y XX que se interesaron por este tipo de compuestos debido a su importancia como fármacos, compuestos que dan sabor y material industrial (Taiz *et al.*, 2005).

A diferencia de los metabolitos primarios, la ausencia de metabolitos secundarios no da como resultado la muerte inmediata, sino más bien un deterioro a largo plazo de la supervivencia o la estética de los organismos, o tal vez ningún cambio significativo en absoluto.

Los metabolitos secundarios a menudo se limitan a un conjunto reducido de especies dentro de un grupo filogenético (Taiz *et al.*, 2005). Éstos son un término genérico que se utiliza para más de 30.000 sustancias diferentes que son producidas exclusivamente por plantas. Los científicos han descubierto recientemente la importancia de estas sustancias. Los metabolitos secundarios realizan una serie de funciones protectoras en el cuerpo humano, puede estimular el sistema inmunológico, proteger el cuerpo de los radicales libres, matar los gérmenes patógenos y mucho más.

Se dividen en tres grupos principales, o tres grupos químicamente distintos según sus orígenes biosintéticos: terpenos, fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno (Taiz *et al.*, 2005).

2.1.1 Terpenos (Terpenoides): Los terpenos, o terpenoides, constituyen la clase más grande de productos secundarios. Las diversas sustancias de esta clase son de naturaleza lipídica, los cuales no presentan solubilidad en agua. Son sintetizados a partir de acetil-CoA.

Los terpenos se forman mediante la fusión de cinco unidades de isopreno de carbono. Todos los terpenos provienen de la unión de distintos elementos con esqueleto de cinco carbonos ramificados del isopentano, en la figura 1 se muestra la estructura de isopentano.

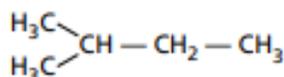


Figura 1 Estructura de isopentano. (Taiz, 2005)

Los elementos estructurales básicos de los terpenos son a veces llamadas unidades de isopreno porque los terpenos pueden descomponerse en altas temperaturas para dar isopreno, cuya estructura se muestra en la figura 2.

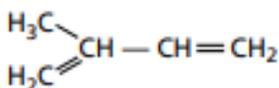


Figura 2 Estructura de isopreno. (Taiz, 2005)

Por tanto, todos los terpenos se denominan ocasionalmente isoprenoides.

La clasificación de los terpenos está dada por el número de unidades de cinco carbonos que contienen. Los terpenos de diez carbonos, es decir aquellos que contienen dos unidades C₅, se denominan monoterpenos; Los terpenos de quince carbonos (tres unidades C₅) se denominan sesquiterpenos; los terpenos de veinte carbonos (cuatro unidades C₅) se les llama diterpenos. Los terpenos más grandes que incluyen triterpenos (treinta carbonos), tetraterpenos (cuarenta carbonos) y politerpenoides ([C₅]_n carbonos, donde *n* es mayor a 8) (Taiz *et al.*, 2005).

2.1.2 Compuestos fenólicos (PC): Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios que contienen en su estructura un grupo fenol y un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático, llamados compuestos fenólicos. Los fenólicos vegetales son un grupo de casi diez mil compuestos: algunos presentan solubilidad solamente en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua, y algunos son polímeros grandes e insolubles.

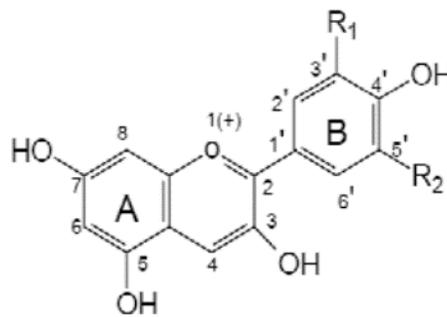
Los compuestos fenólicos desempeñan una gran cantidad de funciones en la planta. La mayoría presentan la función de defensa contra organismos herbívoros y patógenos. Otros actúan como soporte mecánico, también cumplen con la función de atraer polinizadores y dispersores de frutas y en disminuir el crecimiento de plantas competidoras adyacentes (Taiz *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en 4 grupos principales: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, y estilbenos (Rasouli *et al.*, 2016).

Dentro de los ácidos fenólicos se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos llamados así por sus grupos funcionales, los cuales son ácidos carboxílicos, grupos hidroxilo y su anillo aromático de benceno. Algunos ejemplos de éstos, son el ácido vanílico, ácido gálico y ácido siríngico, donde la diferencia de cada uno de ellos radica en los grupos OH y grupos metoxilo que tengan. Otra subclasificación de los ácidos fenólicos, son los ácidos hidroxicinámicos, su estructura básica conformada por un ácido carboxílico, un anillo aromático y un grupo alifático; algunos ejemplos son el ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico. Los

flavonoides se subclasifican en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles, isoflavonas, y antocianidinas.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, que pertenecen a la familia de los flavonoides, constituidos por dos anillos aromáticos: A y B, unidos por un anillo de pirano. Las variaciones de la estructura del anillo B dan lugar a seis antocianidinas conocidas, mostradas en la figura 3 y de igual manera en la figura 4 donde se encuentra un resumen de cada una de las estructuras de la clasificación de los PC.



Aglicona	Sustituyentes		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura 3 Estructura básica y sustituyentes de las antocianidinas. (Garzón, 2008)

Polyphenols	Basic structure	Examples		
Phenolic acids	Hydroxybenzoic acids	Vanillic acid	Gallic acid	Syringic acid
	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	Ferulic acid	p-Coumaric acid
Flavonoids	Flavones	Chrysin	Luteolin	Apigenin
	Flavonols	Galangin	Kaempferol	Quercetin
Flavonoids	Flavanones	Naringenin	Hesperetin	Eriodictyol
	Flavan-3-ols	Catechin	Epicatechin	Epigallocatechin (EGC)
	Isoflavones	Genistein	Daidzein	Neobavaisoflavone
	Anthocyanidins	Cyanidin	Delphinidin	Pelargonidin
Lignans	Pinoresinol			
Stilbenes	Resveratrol	Polydatin		

Figura 4 Estructura y clasificación de compuestos fenólicos. (Rasouli *et al.*, 2016)

La vía biosintética de los PC es bien conocida. Aunque una gran variedad de compuestos fenólicos están presentes en las plantas, la mayoría de ellos son generados por aminoácidos aromáticos, que incluyen fenilalanina, tirosina, y triptófano (Ozcan *et al.*, 2014; Farzaei *et al.*, 2015; Ferrazzano *et al.*, 2011; Valentão *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2008).

Los aminoácidos aromáticos son los componentes principales en las síntesis de compuestos fenólicos (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Las rutas de fenilpropanoides y ácido shikímico son las rutas principales en la generación de estos compuestos ubicuos (Ertani *et al.*, 2016; Kefeli *et al.*, 2003). Los flavonoides también pueden sintetizarse a partir de la ruta del ácido malónico, pero su papel en la biosíntesis de las PC es bastante mínimo (Gross *et al.*, 2008).

La enzima fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) tiene un papel importante en la biosíntesis de estos compuestos ubicuos (Ghasemzadeh *et al.*, 2011; Ertani *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2005). La inhibición de la enzima PAL reduce la formación de estos compuestos (Jorgensen *et al.*, 2005).

2.1.3 Compuestos que contienen nitrógeno: Una gran variedad de metabolitos secundarios vegetales tienen nitrógeno en su estructura. En esta categoría se incluyen defensas antiherbívoros tan conocidas como los alcaloides y los glucósidos cianogénicos, que muestran gran interés ya que son tóxicos para los seres humanos y cuentan con propiedades medicinales. La mayoría de los metabolitos secundarios nitrogenados se biosintetizan a partir de aminoácidos comunes (Taiz *et al.*, 2005).

2.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso de conversión biológica de sustratos en compuestos simples llevado a cabo con diferentes microorganismos tales como bacterias y hongos. En el curso de este colapso metabólico, también se liberan varios compuestos adicionales aparte de los productos habituales de fermentación, como dióxido de carbono y alcohol (Subramaniam, 2012). También se llaman “compuestos bioactivos” los cuales poseen actividad biológica. Recientemente, los investigadores han demostrado que

varios de estos metabolitos secundarios son de uso industrial y económicamente importantes. Se han utilizado en una variedad de industrias tales como productos farmacéuticos (Demain, 1999) y alimentos (Daverey y Pakshirajan, 2009), especialmente en el campo de probióticos (Dharmaraj, 2010) y prebióticos (Wang, 2009).

El desarrollo de técnicas como la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF) ha llevado a la producción a nivel industrial de compuestos bioactivos. Estas técnicas se han perfeccionado aún más según varios parámetros, tales como los sustratos utilizados, parámetros ambientales y los organismos utilizados para la fermentación.

La SmF utiliza sustratos líquidos que fluyen libremente, como la melaza y caldos. Los metabolitos secundarios se secretan en el caldo de fermentación. Los sustratos son utilizados con rapidez; es por eso que se debe de reemplazar de manera constante con nutrientes; cabe resaltar que los compuestos bioactivos sean purificados con facilidad, es una de sus principales ventajas. La SmF se usa mayoritariamente en la extracción de compuestos activos que deben ser usados en forma líquida.

El resultado de la fermentación varía mucho para cada sustrato; por lo tanto, es extremadamente importante elegir el sustrato correcto. Las técnicas de fermentación deben ser optimizadas para cada sustrato. Esto se debe principalmente a la razón por la cual un organismo reacciona de manera diferente a cada sustrato. Las tasas de utilización de varios nutrientes difieren en cada sustrato, y también lo hace la productividad. Algunos de los sustratos comunes usados en la fermentación de estado sólido son salvados de trigo, arroz y paja de arroz, heno, desechos de frutas y verduras, pulpa de papel, bagazo, fibra de coco y medios sintéticos (Pandey *et al.*, 1999). Los sustratos más comunes que se utilizan en la fermentación sumergida pueden ser melaza, azúcares solubles, medios de cultivo líquidos, jugos de vegetales y frutas.

2.2.1 Fermentación de maíz (*Zea mays* L.)

El maíz y sus productos fermentados derivados, al igual que otros cereales, son fundamentales para la nutrición humana en muchos países del mundo. Cultivos mixtos, constituidos principalmente por bacterias del ácido láctico (LAB) y las levaduras, son

responsables de la fermentación del maíz, aumentando así su valor nutricional y alargando la vida útil de los productos. Otros microorganismos involucrados, como mohos, bacterias del ácido acético, y *Bacillus spp.* puede contribuir a las características del producto final.

En los últimos años, la cantidad de informes que describen el proceso de fermentación en todo el mundo, así como los microorganismos involucrados en productos fermentados de maíz, particularmente de África y América Latina, ha aumentado significativamente. En la tabla 1 se presentan los productos alimenticios fermentados a base de maíz más comunes y sus principales características tecnológicas, como el tiempo y la temperatura de fermentación, pH y contenido de etanol (Chaves-López *et al.*, 2020).

Tabla 1 Productos alimenticios fermentados a base de maíz en México y sus características tecnológicas. Tabla modificada de Chaves-López *et al* (2020)

Nombre del producto	País	Tipo de alimento	Tiempo-Temperatura de fermentación	pH	Referencias
Atole Agrio	México	Bebida	6-12 h, 34 °C	3.9	(Steinkraus, 1996)
Pozol	México	Masa	2-7 días, Temperatura ambiente	4.2-4.6	(Wacher <i>et al.</i> , 1993)
Tesgüino	México	Bebida	2-7 días, Temperatura ambiente	No disponible	(Sangwan <i>et al.</i> , 2014)

2.3 MAÍZ (*Zea mays* L.)

El maíz (*Zea mays* L.) se clasifica según su taxonomía en el reino *Plantae*, pertenece a la clase angiosperma, a la subclase monocotiledónea, al orden de los cereales y a la familia de las gramíneas (Galarza, 2011).

La planta llega a alcanzar de uno a seis metros de alto, lo cual depende de la variedad. Las hojas pueden formar una larga vaina enrollada al tallo, con un limbo más largo y ancho. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy grandes conocidas como mazorcas (Galarza, 2011). En las mazorcas del maíz, se observan filas de ocho a treinta granos, y un largo hilo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca (Betrán *et al.*, 2001).

El maíz es uno de los cultivos de granos más diversos que se encuentran en la naturaleza y uno de los cereales más cultivados en el mundo. El maíz molido que incluyen harinas y salvado han sido parte integral de la dieta de todas las clases socioeconómicas en todo el mundo (Žilic *et al.*, 2012). Existe gran diversidad en el maíz, el cual presenta fenotipos pigmentados como morado, rojo y azul, que son los más comunes (López-Martínez *et al.*, 2009).

El principal país donde se origina y domestica el maíz (*Zea mays* L.) es en México, donde existen 59 variedades de acuerdo a la clasificación basada en las características morfológicas, lo que representa un gran porcentaje, con una cantidad de 220 a 300 variedades de maíz que existe en el continente americano. (Milán-Carrillo *et al.*, 2017).

México está en el quinto lugar de la producción mundial en maíz con 22, 069,254 toneladas. El porcentaje de producción por tipo de Maíz en el mundo, es liderado por el maíz blanco con un 86%, seguido del maíz amarillo con un 7%, mismo porcentaje que representan otros maíces de colores. El 54.5% del maíz blanco se produce en cuatro estados, Jalisco, Sinaloa, Estado de México y Michoacán. El 59.0% de la producción de maíz pigmentado es en Estado de México y Chiapas. El 80% de la producción de maíz amarillo se genera en Chihuahua, Jalisco y Tamaulipas.

2.4 MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.)

La gran parte del maíz es típicamente de grano harinoso. Presenta un endospermo de textura suave. Los pigmentos antocianicos de color azul se puede encontrar en la capa

de aleurona, entre mayor concentración de pigmentos antociánicos los granos tenderán a presentar una tonalidad más oscura (Betrán *et al.*, 2001).

El maíz azul presenta características nutricionales muy interesantes entre las cuales están: contiene una menor cantidad de almidón y su índice glucémico es inferior comparado con el maíz blanco, además de presentar una carga proteica superior en un 20% con respecto al maíz blanco (Mendez *et al.*, 2005). En México existe una gran diversidad de variedades de maíz azul. También existe variabilidad en tamaño, densidad y dureza del grano, así como la composición química de éste. Estas variantes se ven afectadas por factores genéticos, prácticas de cultivo, condiciones climáticas y tipo de suelo, así como la interacción entre estos factores. En regiones distintas del país se cultivan variedades criollas de maíz azul, entre las más importantes encontramos tabloncillo y Chalqueño (Agama, 2011).

2.4.1 Composición química del maíz azul (*Zea mays* L.)

El maíz azul es un cereal rico en compuestos fenólicos, los cuales son metabolitos secundarios que contribuyen al aroma, color y al sabor de los alimentos. Proporcionan resistencia al estrés ocasionado por condiciones ambientales, igualmente en daños provocados por plagas (Su-Chen, 2007).

2.4.1.1 Antocianinas

El maíz azul es una fuente importante de antocianinas con potenciales aplicaciones antioxidantes. Las antocianinas tienen un sustituyente hidroxilo glucosilado, el cual les da estabilidad y solubilidad. Dependiendo de cada sustituyente se podrán obtener diferentes colores. La variedad de antocianinas depende del número de grupos hidroxilo, azúcares, grupos alifáticos y ácidos aromáticos unidos a la estructura básica de las antocianinas. Los carbohidratos comúnmente unidos a las antocianidinas son glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa y ramnosa (Chirinos *et al.*, 2006).

Las diferentes antocianinas del maíz, conllevan a tener una diversidad enorme en el color y pigmentación de las diferentes variedades. En esta variación encontramos colores que van desde el rojo, pasando por el morado hasta llegar al color negro (De la parra, 2008).

Las antocianinas del maíz azul ya han sido previamente caracterizadas. Se ha demostrado que el grano de maíz azul presenta diez antocianinas diferentes, ya sean aciladas o no aciladas. Las antocianinas más importantes son la cianidina 3-glucósido (90%) y la pelargonidina 3-glucósido (8%) y la peonidina en menor cantidad con un 2%. (Styles-Ceska, 1972).

2.4.1.2 Ácidos fenólicos

La estructura química de un ácido fenólico se caracteriza por tener un anillo aromático, un ácido carboxílico y un grupo hidroxilo (Scalbert *et al.*, 2000).

Los ácidos fenólicos se pueden encontrar en pericarpio del grano. (Scalbert *et al.*, 2000). Los ácidos fenólicos tienen efecto terapéutico y antioxidante, son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico como el ácido ferúlico, p-cumárico y cafeíco.

2.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los hongos y las bacterias son microorganismos que tienen la capacidad de utilizar diversos sustratos sólidos como consecuencia de la diversidad de su evolución biológica y bioquímica; Los sustratos sólidos utilizados por los microorganismos incluyen, entre otros, plantas vivas. Se sabe que tanto las bacterias como los hongos colaboran con muchas plantas para formar asociaciones mutuamente beneficiosas (mutualistas) (Gunatilaka, 2006).

Un reciente estudio sugiere que los microorganismos asociados a las plantas, especialmente las bacterias rizosféricas (rizobacterias) y hongos endófitos, representan un recurso enorme y en gran parte sin explotar, de productos naturales con estructuras químicas que han sido optimizadas por la evolución para tener relevancia biológica y ecológica. Se ha encontrado una variedad diversa de productos bioactivos de molécula pequeña en estos microorganismos (Gunatilaka, 2006).

El término endófito se refiere a un microorganismo bacteriano o fúngico que coloniza los órganos interiores de las plantas, pero no tiene efectos patógenos sobre su huésped. En su asociación simbiótica, la planta huésped protege y alimenta al endófito, que “a cambio” produce metabolitos bioactivos para mejorar el crecimiento y la competitividad del huésped y protegerlo de los herbívoros y los patógenos de las plantas (Gunatilaka, 2006).

Se ha encontrado que los actinomicetos y hongos, de todos los microorganismos estudiados, son los productores más prolíficos de metabolitos secundarios (Gunatilaka, 2006).

2.6 HONGOS

2.6.1 Generalidades de los hongos

Los hongos se definen como organismos eucariotas que poseen núcleos organizados, así como también una membrana nuclear que está bien definida; son aerobios, heterótrofos y en general no presentan movilidad (Bonifaz, 2012). Dependiendo del medio donde se sitúen, los hongos pueden ser: saprófitos, (se alimentan de materia orgánica muerta) parásitos, (de materia orgánica viva), simbioses mutualistas, epifíticos (permanecen en la superficie) y endófitos. Esta clase de organismos se reproducen de manera asexual o sexual por medio de esporas, las hifas son la unidad estructural de los hongos, las cuales presentan una morfología cilíndrica que forma filamentos con crecimiento apical, proliferando a través de un sustrato. La pared celular externa está formada por quitina, glicoproteínas y glucanos (González, 2015).

Las células fúngicas poseen mitocondrias, retículo endoplasmático (con vesículas ricas en quitina-sintetasa, enzima que produce la quitina, principal componente de la pared celular), aparato de Golgi, entre otros organelos.

La membrana celular basal está bien organizada y contiene gran cantidad de esteroides; su principal componente es el ergosterol (Bonifaz, 2012).

La estructura de un hongo filamentoso se conforma de un micelio que, a su vez, está constituido por múltiples filamentos o hifas conformadas por una sucesión de células intercomunicadas. La hifa (figura 5) es un cilindro que varía de tamaño constituido por una pared celular rígida donde fluye protoplasma; el diámetro de las hifas varía de 1 a 30 micrómetros; termina en punta, donde está la zona de extensión y región de crecimiento. Algunos hongos muestran tabiques transversales llamados septos que forman un micelio tabicado (Arenas, 2014).

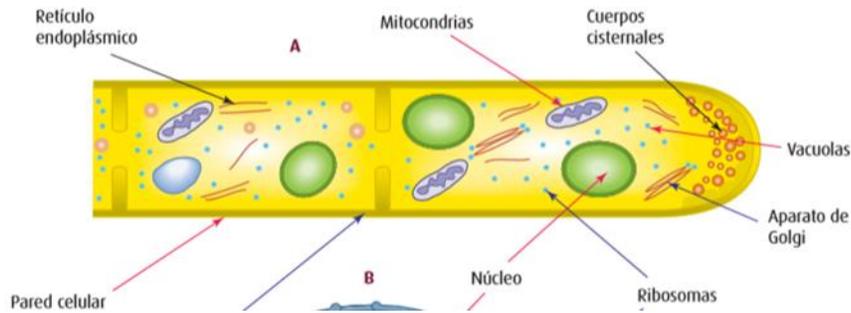


Figura 5 Célula fúngica: Fragmento de hifa (Modificada de *Micología Médica Básica*. (Bonifaz, 2012).

2.6.2 Hongos productores de metabolitos secundarios

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos de gran interés económico, industrial y científico. Tienen muchos beneficios a la salud y nutrición humana, al ser utilizados en procesos de fermentación de carácter industrial como la elaboración de pan, quesos, cervezas, vinos, producción de antibióticos, enzimas y hormonas (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013).

En la tabla 2 se muestran los diferentes productos sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones.

Tabla 2 Diversos productos sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013)

Microorganismo	Producto	Utilidad
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Industria alimentaria y farmacéutica
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol Biomasa Ergosterol	Industria cervecera, vinícola y producción de suplementos alimenticios.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ácido láctico	Industria alimentaria y farmacéutica
<i>Rhizopus nigricans</i>	11- γ -hidroxiprogesterona	Intermediario para la síntesis de 17-hidroxicorticoesterona
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilinas	Industria farmacéutica
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporina C	Industria farmacéutica
<i>Aspergillus sp.</i>	Celulasas, glucoamilasas, pectinasas, lactasas, lipasas, proteasas, diastasas.	Industria farmacéutica y alimentaria.
<i>Mucor sp.</i>	Renina	Industria alimentaria
<i>Ashbya gossypii</i>	Riboflavina	Industria alimentaria y farmacéutica
<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloides del ergot	Industria farmacéutica
<i>Trichoderma polysporum</i>	Ciclosporina	Industria farmacéutica
<i>Fusarium moniliforme</i>	Giberelinas	Productos agrícolas
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Productos agrícolas
<i>Candida utilis</i>	Biomasa Proteína y aminoácidos	Industria ganadera.

2.7 *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides es un hongo filamentosos, su estado teleomorfo es *Glomerella cingulata*. Es uno de los más importantes patógenos de plantas en todo el mundo, ocasiona la antracnosis, una enfermedad de las plantas en una variedad de huéspedes de árboles a pastos. La enfermedad se caracteriza por manchas hundidas de varios colores en hojas, tallos, frutas o flores. Estos puntos a menudo se amplían y llevan a la marchitez y muerte de los tejidos de la planta infectada. A continuación, en el tabla 3 se presenta la clasificación taxonómica.

Tabla 3 Clasificación taxonómica de *Colletotrichum gloeosporioides* (Kumar-Gautam, 2014).

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Orden	<i>Sordaryomycetes</i>
Clase	<i>Phyllachorales</i>
Familia	<i>Phylacoraceae</i>
Género	<i>Colletotrichum</i>
Especie	<i>gloeosporioides</i>

Este hongo produce colonias circulares, algodonosas de color marrón pálido a blanco grisáceo característico. El micelio del cultivo en crecimiento es hialino, septado y ramificado. El hongo produce conidios hialinos, unicelulares, ovoides a oblongos, ligeramente curvados o con forma de mancuerna, 10-15 μm (promedio) hasta 20 μm de longitud y 5-7 μm de ancho como se puede observar en la Figura 6. Existe una gran variación en el tamaño y la forma de los conidios de *C. gloeosporioides* dependiendo del hospedador del cual se aísla y su área de origen (Kumar-Gautam *et al.*, 2014).

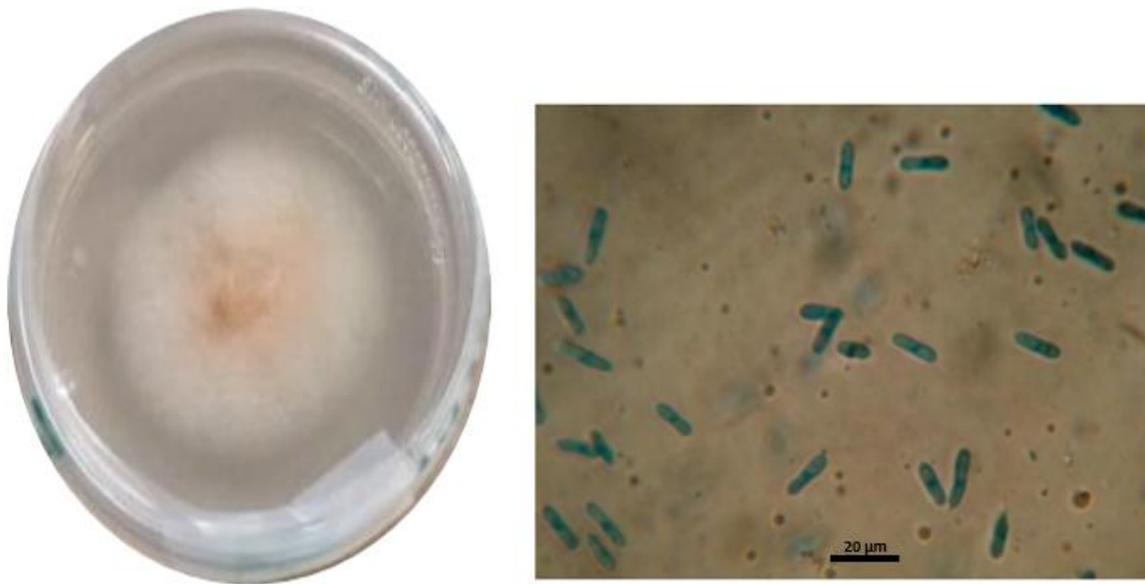


Figura 6 Morfología macroscópica y microscópica de *Colletotrichum gloeosporioides*. Teñido con azul de algodón. 40 x.

Zou et al., en el año 2000 obtuvieron un nuevo metabolito antimicrobiano, llamado ácido coletótrico el cual se aisló de un cultivo líquido de *Colletotrichum gloeosporioides*, hongo endófito de *Artemisia mongólica*. La estructura se determinó utilizando métodos espectroscópicos y fue probada su actividad antimicrobiana contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea*.

2.7.1 Metabolitos secundarios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Investigaciones anteriores sobre los hongos endofíticos, *Colletotrichum* sp. han llevado a la identificación de 109 compuestos que se dividen en las categorías de metabolitos que contienen nitrógeno (1–30), esteroides (31–43), terpenos (44–50), pironas (51– 63), fenólicos (64–88), ácidos grasos (89–95) y compuestos diversos (96–109) (kim *et al.*, 2019).

Entre ellos, se han informado varios metabolitos secundarios de más de una especie de *Colletotrichum* sp. Pero la mayoría de los metabolitos se encuentran cada uno en una especie única, respectivamente.

Dentro de los metabolitos secundarios reportados por Kim et al (2019) producidos por el género y especie *Colletotrichum gloeosporioides* se encuentran diferentes compuestos que están clasificados dependiendo de su origen los cuales son: compuestos que contienen nitrógeno, terpenos, ácidos grasos y compuestos misceláneos. Dentro de los compuestos que contienen nitrógeno se encuentran *Colletotricol A*, *micosporina alanina* y *ferricrocina*. Dentro de los terpenos el compuesto más importante producido por *C. gloeosporioides* es *colletotrichin A*. *Fenetil 2-hidroxipropanoato* y el *ácido ftálico isobutil éster* son los ácidos grasos elaborados por *C. gloeosporioides*. Dentro de los compuestos misceláneos más importantes, producidos por este hongo filamentoso están el *Colletotricona A*, *Colletotricona B*, *Nigrosporano A*, *Nigrosporano B* y *Gloeosporona*.

2.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

La cromatografía de gases unido a espectrometría de masas (GC/MS) es la técnica que une la capacidad que presenta la cromatografía de gases para separar compuestos con la precisión y capacidad selectiva del detector de masas. Tiene por objetivo separar, identificar y cuantificar mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. Esta unión permite examinar y calcular trazas de compuestos en mezclas complejas de una manera eficiente. Dependiendo de la repartición de las sustancias analizadas entre la fase estacionaria y móvil que constituye el sistema (Aguilent, 2010).

La cromatografía de gases permite separar compuestos de una muestra volátil en donde se distribuyen entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida o sólida presentes en una columna. La muestra a estudiar se volatiliza y se inyecta dentro de una columna cromatográfica. La elusión de los compuestos se lleva a cabo por medio de una fase gaseosa móvil la cual, es inerte y no genera reacción con las moléculas de la muestra, sólo las lleva a través de la columna cromatográfica. La cromatografía de gases permite realizar, análisis con una buena resolución y sensibilidad. Los resultados se pueden cuantificar y se pueden obtener durante poco tiempo. Los constituyentes a analizar deben de ser volátiles. La fase estacionaria es un fluido no volátil que se encuentra adherido a la columna. El método de separación se produce mediante la distribución de los componentes moleculares en las muestras entre la fase móvil y

estacionaria (Sagastume, 2018). En la figura 7 se muestra un cromatógrafo de gases de la marca Agilent technologies modelo 7890B.

Figura 7 Cromatógrafo de gases de la marca Agilent technologies modelo 7890B



2.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un tipo de cromatografía de columna, que generalmente es utilizada con el objetivo de la separación, identificación y cuantificación los compuestos activos presentes en una muestra (Martín *et al.*, 2005). El equipo de HPLC principalmente usa una columna donde se contiene una fase estacionaria, una bomba que transporta la fase móvil por la columna, y por último, un detector donde se muestran los tiempos de retención de las moléculas. Los tiempos de retención tienen una variación que depende de las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas a analizar y los solventes utilizados (Liu *et al.*, 2006).

La muestra que será analizada, se inyecta en un volumen pequeño en la corriente de la fase móvil, y se retrae por interacciones fisicoquímicas específicas con la fase estacionaria. El tiempo de retraso suele depender de la naturaleza de los analitos y de los constituyentes de ambas fases, tanto móviles como estacionarias. El tiempo el cual

el analito específico hace elusión, es decir, sale del final de la columna, es llamado tiempo de retención. Los solventes más utilizados incluyen cualquier combinación soluble en agua o en solventes orgánicos (como el etanol y acetonitrilo) (Liu *et al.*, 2006; Abidi, 2001). Se realiza una separación para variar la composición de la fase móvil durante el análisis, a esto se le conoce como gradiente de elución (Abidi, 2001). El gradiente separa la mezcla del analito como una función de la afinidad de este mismo con la fase móvil actual. La decisión sobre cuales solventes, aditivos y gradientes usar, tienen clara dependencia de la clase de analito y el tipo de fase estacionaria. (Liu *et al.*, 2006).

Para el análisis preciso de un compuesto, existen algunos parámetros los cuales son usados como estándares de un compuesto particular. Si ocurre un cambio en los parámetros, el resultado puede ser afectado considerablemente. Los parámetros más usados son: diámetro interno, tamaño de la partícula, tamaño del poro de la columna y la presión de la bomba. Para cada uno de los diferentes compuestos dichos parámetros pueden ser cambiados acorde a su propiedad química y naturaleza. (Liu *et al.*, 2006).

Diámetro interno (ID) de la columna: El diámetro interno de la columna es un aspecto crítico que determina la cantidad del analito el cual puede ser cargado en la columna y también influye en la sensibilidad. Las columnas son usualmente vistas en aplicaciones de carácter industriales como la purificación de algún metabolito activo. Las columnas pequeñas presentan una mejor sensibilidad y un menor consumo de solventes (Liu *et al.*, 2006).

Tamaño de la partícula: El HPLC más tradicional utiliza una fase estacionaria unida al exterior de pequeñas partículas en forma de esfera de Silicio (Si). Las partículas más normalmente proveen una mejor separación y área superficial (Liu *et al.*, 2006).

Tamaño del poro: La mayoría de las fases estacionarias están compuestas por poros para proveer una gran área de superficie. Los poros de menor tamaño poseen una mejor área de superficie mientras que los poros más grandes tienen una mejor cinética, especialmente para analitos más grandes. El tamaño de poro define la capacidad de las moléculas del analito a penetrar dentro de la partícula e interactuar con la superficie interna. Esto es muy importante porque la relación de la superficie de la partícula externa

a la interna es de aproximadamente 1:1000. La interacción molecular superficial ocurre principalmente en la superficie de la partícula interna (Liu *et al.*, 2006).

Presión de la bomba: Las bombas varían según su capacidad de producir presión, donde su rendimiento se mide en función de su capacidad para producir un caudal constante y reproducible. Los sistemas modernos de los HPLC han sido mejorados para trabajar a más altas presiones, por lo tanto pueden usar partículas más pequeñas en las columnas menores a 2µm (Liu *et al.*, 2006).

La instrumentación del HPLC consiste en:

Inyección de la muestra: Se dispone de inyectores de tabique para poder obtener la muestra. La muestra puede ser inyectada cuando la fase móvil está fluyendo o se ha detenido. Se puede usar una nueva válvula rotativa avanzada y un inyector de circuito para producir resultados reproducibles (Liu *et al.*, 2006).

Detector: Existen muchas maneras de detectar cuando una sustancia ha pasado por la columna. Generalmente se adjunta a espectroscopía UV (Ultravioleta), donde se detectan compuestos específicos. Algunos compuestos orgánicos absorben la luz UV en varias longitudes de onda. La cantidad de luz absorbida dependerá de la cantidad de un compuesto particular que esté pasando a través del haz en ese momento (Liu *et al.*, 2006).

Interpretación de las señales de salida del detector: La señal de salida se registra como una serie de picos, cada uno de los cuales representa un compuesto en la mezcla que pasa a través del detector y absorbe la luz UV. El área debajo del pico es proporcional a la cantidad de sustancia, que pasa a través del detector, y esta área puede calcularse automáticamente por la computadora conectada a la pantalla. (Liu *et al.*, 2006).

2.10 ANTECEDENTES PARTICULARES

La modificación de la metodología de fermentación, es decir las proporciones de harina de maíz azul y medio de cultivo Czapek Dox se basaron y modificaron tomando como base la metodología propuesta por Aguilar et al (2010) quienes evaluaron el contenido

de compuestos fenólicos en la cáscara de nuez pecana por medio de fermentaciones, variando las proporciones de las mismas. El hongo utilizado *Colletotrichum gloeosporioides* fue aislado e identificado por Alarcón-Sáenz (2017) del fruto de Chagalapoli (*Ardisia compressa*) y extrajo los compuestos fenólicos totales resultantes de la interacción entre el hongo y el fruto. Analizó las muestras por cromatografía líquida de alta resolución, para determinar la composición química de interés.

La bibliografía acerca de los metabolitos secundarios de *Colletotrichum gloeosporioides* es escasa, pero se encontró que Liu et al (2017) aislaron dos nuevos derivados del ciclohexeno, colletotriconas A y B (1 y 2) y un nuevo derivado de tiazol, colletotricol A, junto con seis metabolitos naturales conocidos del extracto de *Colletotrichum gloeosporioides*, un hongo endofítico derivado de *Aquilaria sinensis*; al igual Chen et al (2018) caracterizaron la estructura con Resonancia magnética nuclear un nuevo compuesto, Colletotrichina A, que fue producido por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Objetivo general

Caracterizar e identificar los compuestos metabolizados, sintetizados o liberados durante el proceso de fermentación de la harina de maíz azul y el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.2 Objetivos particulares

- Extraer e identificar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) los compuestos obtenidos mediante un proceso de fermentación a diferentes proporciones de harina de maíz azul y medio de cultivo Czapek Dox con *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Extraer e identificar y cuantificar por cromatografía líquida de Alta resolución (HPLC) los compuestos fenólicos obtenidos mediante de un proceso de fermentación a

diferentes proporciones de harina de maíz azul y medio de cultivo Czapek Dox con *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.3 Hipótesis

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* utilizará como sustrato la harina de maíz azul (*Zea mays* L.) para producir, liberar y/o metabolizar diferentes compuestos presentes que pudieran tener una aplicación alimentaria como conservadores alimentarios.

3.4 Justificación

La identificación de compuestos que fueron sintetizados, metabolizados, y/o biotransformados por parte de *Colletotrichum gloeosporioides* en la harina de maíz azul abre la posibilidad de encontrar nuevos compuestos de distinta naturaleza, para así obtener un rango o espectro más amplio de estos compuestos. Es importante señalar que no existen antecedentes bibliográficos de la producción o síntesis de compuestos (no fenólicos) a partir del proceso de fermentación con hongos filamentosos y maíz azul. La aplicación alimentaria de estos compuestos identificados puede estar orientada hacia la conservación y/o enriquecimiento nutrimental de productos alimentarios.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar Papa-Dextrosa Golden Bell, agar Czapek Dox Golden Bell y agar Sabouraud Golden Bell para el mantenimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* el cual fue aislado como hongo endófito del fruto Chagalapoli (*Ardisia compressa*) y se identificó por Alarcón-Sáenz en 2017, y permanece actualmente en el cepario de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Para las fermentaciones es necesario el uso de una

incubadora Shaker Innova 4300. El grano de maíz azul, se obtuvo del municipio de Gómez Farías del estado de Chihuahua.

4.2 Métodos

4.2.1. Esterilización del grano de maíz azul

Para evitar la contaminación de la harina se sometieron los granos de maíz azul a un proceso de esterilización, para evitar afectar la presencia axénica del hongo durante la fermentación y pudiese perjudicar el ambiente de esterilidad que se necesitó para obtener una harina completamente libre de microorganismos. Posteriormente en frascos previamente lavados y estériles, se depositaron los granos de maíz azul los cuales se llevaron a la autoclave (T-Fal ® de aluminio pulido de calibre pesado, 22 cuartos de galón) a 120 °C durante 15 minutos.

4.2.2 Molienda del grano de maíz azul y preparación de la harina.

En un molino eléctrico Magic Bullet ®, cada una de sus piezas que integran el equipo, se lavó con jabón líquido, se limpió con torundas de alcohol etílico grado reactivo, y se dejaron en la campana UV durante 30 minutos, eliminando cualquier tipo de contaminación y suciedad. Se procedió a la molienda del maíz azul para producir la harina de maíz azul y ésta se depositó en frascos estériles para su uso en el proceso de fermentación.

4.2.3 Preparación de soluciones conidiales

Se realizó la preparación de las soluciones conidiales siguiendo la metodología descrita por Colomé et al., (1986). Se utilizó un cultivo de 10 días a 28 °C en agar Papa-Dextrosa (PDA) el cual se preparó en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se preparó una solución de Tween 80 con agua destilada al 0.1% de concentración, la cual se depositó en frascos de vidrio previamente estériles, que posteriormente fueron esterilizados en la autoclave T-fal ® de aluminio pulido de calibre pesado, 22 cuartos de galón a 120 °C durante 15 minutos. Se depositaron los matraces Erlenmeyer con el cultivo de *Colletotrichum*

gloeosporioides por triplicado, y la solución de Tween 80-agua destilada al 1% estéril. Se agitaron las cajas Petri conteniendo el hongo de manera manual y transversal durante 2 minutos, para desprender los conidios del hongo. Se tomaron 10 mL de solución con una pipeta serológica de 10 mL de volumen la cual se esterilizó anteriormente en una estufa Quincy Lab 30GC Gravity Convection Lab Oven, 2.0 Cu.Ft., 115V 1200W a 150 ° C durante 1 hora envuelta de papel estraza. Con ayuda de una micropipeta de 1000 mL con punta estéril se mezcló la solución Tween 80 con el hongo, esto para contribuir en el desprendimiento de los conidios. Se depositaron una gota de esa solución resultante en la cámara de Neubauer, utilizando los cuadrantes extremos y el central para realizar el conteo de conidias.

Para calcular la concentración se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración obtenida} = \frac{\# \text{ Conidias}}{\text{mL}} = (\text{Conidias contadas})(5)(10,000)$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Concentración obtenida} \left(\frac{\text{conidias}}{\text{mL}}\right)}{\text{Concentración deseada}}$$

Figura 8 Fórmulas para el cálculo de la concentración de soluciones conidiales.
(Colomé *et al.*, 1986)

4.2.4 Preparación de las muestras de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.2.4.1 Pesado de la harina de maíz azul

Después de haber obtenido la harina de maíz azul estéril, se pesaron en pedazos de papel estraza previamente esterilizados en una estufa a 150 °C durante una hora, para prevenir contaminaciones. Se depositó la harina a cada uno de los matraces con las proporciones correspondientes en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar.

4.2.4.2 Inoculación de soluciones conidiales a las muestras de maíz azul (*Zea mays* L.) con medio de cultivo Czapek Dox.

Se realizaron las inoculaciones de las soluciones conidiales en una campana de flujo laminar limpia con lámpara de UV previamente encendida durante 30 minutos, para eliminar cualquier contaminación posible. Se depositaron 100 µL de solución conidial con concentración de 1.3×10^6 conidias/mL a cada una de las muestras correspondientes, cuya proporción se explica más adelante. Se utilizó la metodología modificada de Alarcón-Sáenz, 2017.

4.2.5 Proceso de fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*

4.2.5.1 Procesamiento y análisis de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*.

Se montaron tres distintas proporciones donde se varió la cantidad de medio de cultivo y de harina de maíz azul, así como también el tiempo de fermentación que fue de 20, 25, y 30 días. Las proporciones utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Proporciones de harina de maíz azul y medio de cultivo Czapek Dox en caldo montadas en los matraces Erlenmeyer hechos por triplicado.

Código de muestra	Medio de cultivo (mL)	Harina de maíz azul (g)
A-B-C	90	10
D-E-F	80	20
G-H-I	70	30

En la tabla 4 se muestra la manera en que se identificó cada una de las muestras obtenidas en la fermentación, con la finalidad de tener un mayor orden y evitar cualquier problema de manipulación.

Los controles tuvieron la misma proporción de cada una de las muestras, con la única diferencia de que no fueron inoculados con soluciones conidiales al 1.3×10^6 conidias/mL de *Colletotrichum gloeosporioides* si no que se les depositaron 100 μ L de agua destilada estéril. Se usó un control por cada proporción correspondiente a 20, 25 y 30 días, es decir que en total se utilizaron 9 muestras control.

Tabla 4 Identificación de las muestras resultantes de la fermentación de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides*. Proporciones modificadas de la metodología de Aguilar *et al* (2010)

Medio de cultivo líquido Czapek Dox (mL) – Harina de maíz (Zea mays L.) (g)												
Tiempo (días)	90 mL -10 g			Cx	80 mL-20 g			Cx	70 mL-30 g			Cx
20	20 A	20 B	20 C	90-10 20 cx	20 D	20 E	20 F	80-20 20 cx	20 G	20 H	20 I	70-30 20 cx
25	25 A	25 B	25 C	90 -10 25 cx	25 D	25 E	25 F	80-20 25 cx	25 G	25 H	25 I	70-30 25 cx
30	30 A	30 B	30 C	90 -10 30 Cx	30 D	30 E	30 F	80-20 30 cx	30 G	30 H	30 I	70 -30 30 cx

Las muestras se fermentaron en una incubadora Shaker Innova 4300. La temperatura se ajustó a 28 °C a 50 rpm durante el tiempo establecido de 20, 25 y 30 días. Cada vez que se retiraron las muestras cumpliéndose el tiempo requerido, se pausó por un máximo de 3 min, se abrió la compuerta de la incubadora, y se retiraron las muestras para posteriormente seguir la incubación.

4.2.6 Extracción de metabolitos secundarios

Se extrajeron los metabolitos secundarios a la harina de maíz azul sin fermentar (inicial) y a cada una de las muestras durante el proceso de fermentación, con el objetivo de determinar el efecto del proceso de fermentación de la harina en presencia del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.2.6.1 Extracción de metabolitos secundarios, inicial (sin el proceso de fermentación) y después del proceso de fermentación.

Para la extracción inicial de metabolitos secundarios, se utilizó la técnica descrita por De Wanto et al., (2002). Se depositó 1 gramo de harina de maíz azul en un tubo Falcon, se cubrió la muestra con 20 mL de etanol. A continuación, se homogeneizaron en un sonicador Branson 3800 por 60 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 4000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. Las muestras se filtraron haciendo uso de filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm. Se tomaron 800 µL y se depositaron en un vial para el análisis por HPLC.

Una vez finalizado el tiempo de fermentación para cada una de las muestras se filtraron con ayuda de un colador lavado y previamente desinfectado, posteriormente el sobrenadante de cada muestra se recolectó en tubos Falcon estériles y mediante extracción con solvente se le agregaron 20 mL de Etanol, agitándose por inversión. Al emplear la extracción asistida por ultrasonido, cada una de las muestras se sonicaron durante una hora en agua destilada con hielo haciendo uso de un sonicador Branson 3800. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C utilizando una centrífuga eppendorf 5804 R.

4.2.7 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía de gases unido a espectrometría de masas.

En la preparación de cada extracto previo al análisis por cromatografía de gases unido a espectrometría de masas, fue necesario filtrar cada uno de los extractos con filtro de jeringa de nylon de 0.45µm, con lo cual se eliminó cualquier residuo sólido e impurezas presentes en los extractos. La identificación de los componentes volátiles de los extractos obtenidos tanto de la extracción inicial y de la extracción después de la fermentación se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 7890B

acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C. Para establecer las condiciones del análisis se tomó en cuenta condiciones reportadas en análisis similares para la identificación de compuestos volátiles en extractos con base en la metodología descrita por Nevárez (2020). Las condiciones de operación se presentan en la tabla 5.

Tabla 5 Condiciones empleadas en el análisis GC-MS

Columna	HP-INNOWax
Flujo de Helio	1 μ L/min
Volumen de inyección	1 μ L
Temperatura de inyección	260 °C
Temperatura 1	40 °C
Temperatura 2	260 °C
Rampa	4 °C/min
Temperatura 3	260 °C 15 min
Temperatura de la fuente	200 °C
Masas	40-600 u.m.a
Tiempo muerto	7 minutos
Tiempo de finalización	60 minutos
Split	25:1

4.2.8 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

Se pesaron 2.5 mg de ácido p-cumárico, ácido ferúlico y Delfinidina 3-glucósido, los cuales se depositaron en un matraz aforado de 25 mL con alcohol Etílico Anhidro CTR con 99.924% de pureza. Se calculó la concentración de cada uno. (Villarreal *et al.*, 2022)

Se tomaron 2.4 mL de cada uno de los estándares: p-cumárico, ácido ferúlico y Delfinidina 3-glucósido y se depositaron en un frasco ámbar estéril obteniendo un volumen total de 12 mL esto con la finalidad de formar un mix de estándares el cual fue mezclado en proporción 1:1 con las muestras ya filtradas resultantes de la fermentación

de Maíz azul (*Zea mays*) y *Colletotrichum gloeosporioides*, es decir 400µL de muestra con 400 µL del mix de estándares (Villarreal *et al.*, 2022).

Las muestras y los estándares se analizaron con la metodología modificada de Villarreal *et al* (2022) por HPLC en un equipo Agilent 1200 series con un detector UV-DAD con arreglo de Diodos con una columna Agilent Zorbax SB-C18 4.6x250 mm con tamaño de poro de 5 µm. Se corrió con dos disolventes bajo un sistema de gradientes; los disolventes fueron A (Agua tridestilada) y B (Metanol-ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%) Se empleó un gradiente lineal de * 5% hasta el 50% por 17 minutos, una elusión isocrática por 5 minutos (50% B y un gradiente lineal de 50% de B hasta 5% de B por 3 min). La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min, con un volumen de inyección de 20 µL y tiempo de corrida de 25 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo en 35 ° C.

4.2.9 Diseño factorial de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*.

La variable dependiente correspondió al valor de la concentración de cada uno de los estándares presentes en las muestras de la fermentación, el factor 1 son las proporciones de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) y medio de cultivo Czapek Dox, y el factor 2 es el tiempo de la fermentación en días, además de la evaluación de la interacción entre ambos factores. Para cada estándar se obtuvo la suma de los cuadrados (SS), los grados de libertad (GL), el promedio de los cuadrados (MS), el valor de F y F crítica correspondiente al nivel de significancia (α) de 0.05. Se llevó a cabo también una comparación múltiple de medias de Tukey en el caso de ácido Ferúlico ya que resultados obtenidos indicaron que son significativamente diferentes. Se utilizó el software estadístico Minitab 17 ®.

V.RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Caracterización Mediante Morfología de *Colletotrichum gloeosporioides*

El hongo endófito *Colletotrichum gloeosporioides* fue aislado e identificado molecularmente previamente del fruto Chagalapoli (*Ardisia compressa*) por Alarcón-Sáenz en el 2017. Se resembró el hongo cada 15 días en medios de cultivos nuevos Papa-Dextrosa (PDA) para el mantenimiento del hongo vivo en las condiciones estériles recomendadas.

5.2 Soluciones conidiales de *Colletotrichum gloeosporioides*

Se calculó la concentración de las soluciones conidiales, siendo ésta misma 1.3×10^6 con/mL (figura 9). No se requirió hacer ninguna dilución, ya que la concentración obtenida es muy cercana a la concentración deseada de 1×10^6 con/mL que reportó Alarcón-Sáenz en el 2017 y que es el documento que se utilizó como base en este estudio.

$$\begin{aligned} \text{Concentración obtenida} &= (26 \text{ conidias contadas})(5)(10,000) \\ &= 1.3 \times 10^6 \text{ conidias/mL} \end{aligned}$$

Figura 9 Cálculo de las soluciones conidiales

5.3 Fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*

Las 37 muestras de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* correspondientes a 20 días, 25 días y 30 días de fermentación no presentaron ningún tipo de contaminación microbiana externa, la cual se comprobó utilizando los controles de la fermentación cuyo objetivo fue comprobar la presencia axénica de *Colletotrichum gloeosporioides*. En la figura 10 se puede observar cada una de las muestras correspondientes a 20, 25 y 30 días de fermentación.



Figura 10 Muestras de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides*

5.4 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía de gases unido a espectrometría de masas.

A los 20 días de fermentación, la molécula más identificada fue la acetoína. La acetoína (3-hidroxi-2-butanona) es un líquido pálido a amarillento, debido a su agradable olor a yogurt y sabor a mantequilla se utiliza como agente potenciador en alimentos, aunque su uso no solo se limita en la industria alimentaria, al ser utilizada en la fabricación de jabones, detergentes, cosméticos y perfumes (Xiao *et al.*, 2014). La acetoína es producida por bacterias principalmente mediante fermentación.

A los 25 días de fermentación, la molécula que más se identificó fue el 2,3-butanediol. El 2,3 butanediol es una sustancia sin color y olor, con un alto punto de ebullición (180-184°C) y punto de congelación bajo (Garg *et al.*, 1995). A diferencia de la acetoína la aplicación del 2,3-butanediol está más orientada a la industria automotriz, ya que es

utilizado como aditivo de combustible. A los 30 días, se produjo de igual manera más 2,3-butanediol, identificándose en 25 muestras de las 27 muestras totales. A pesar de que las dos moléculas producidas o metabolizadas en la fermentación de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides* no comparten la misma aplicación, son metabolitos vecinos en la vía metabólica para la producción bacteriana de Acetoína, siendo dicha molécula precursora del 2,3-butanediol (Garg *et al.*, 1995). Cabe resaltar que si bien la Acetoína es producida principalmente por bacterias además de levaduras, no existen referencias bibliográficas acerca de su producción por parte de hongos filamentosos, siendo este trabajo de investigación uno de los primeros en reportar la producción de Acetoína por parte *Colletotrichum gloeosporioides* siendo éste un hongo filamentosos. Se comprobó que entre más avanza el tiempo de fermentación, la biosíntesis de 2,3 butanediol aumenta, es decir, a los 20 días de fermentación todavía se identificaron picos correspondientes a acetoína, a los 25 días aumentó más la producción de 2,3 butanediol, y a los 30 días de fermentación, se identificaron picos en los cromatogramas únicamente de 2,3 butanediol independientemente de cualquier proporción.

En la tabla 6, 7 y 8 se muestran los picos mayoritarios de los compuestos bioactivos que se detectaron a partir de los extractos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* a los 20, 25 y 30 días de fermentación respectivamente.

Tabla 6 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* a los 20 días de fermentación.

Muestra	Proporción (medio de cultivo-harina de maíz azul)	Número de pico	Tiempo de retención	CAS	Probabilidad (%)	Compuestos analizados
20 A	90 mL-10 g	1	3.361	513-86-0	81.10	Acetoína

		3	4.868	64-19-7	73.5	Ácido acético
		5	5.753	513-85-9	32.2	2,3 butanediol
		1	3.367	513-86-0	80.2	Acetoína
20 B	90 mL-10 g	2	4.881	64-19-7	70.3	Ácido acético
		3	5.753	24347-58-8	58	2,3-butanediol
		1	3.367	513-86-0	60.7	Acetoína
20 C	90 mL-10 g	2	4.881	64-19-7	76.4	Ácido acético
		4	5753	24347-58-58	33.5	2,3-butanediol
20 D	80 mL-20 g	1	3.359	513-86-0	58	Acetoína
		3	4.879	64-19-7	71.8	Ácido acético
		4	5.745	24347-58-8	46.5	2,3-butanediol
		1	3.358	513-86-0	79.9	Acetoína
20 E	80 mL-20 g	4	4.872	64-19-7	66.2	Ácido acético
		7	5.745	24347-58-8	33.8	2,3-Butanediol
		1	3.358	513-86-0	81	Acetoína
20 F	80 mL-20 g	7	5.745	513-85-9	34.5	2,3 butanediol
		1	3.352	513-86-0	78.6	Acetoína
20 G	70 mL-30 g	4	4.846	64-19-7	71.2	Ácido acético
		6	5.746	24347-58-8	36.4	2,3 butanediol
		1	3.352	513-86-0	79.8	Acetoína
20 H	70 mL-30 g	3	4.853	64-19-7	71	Ácido acético
		5	5.745	24347-58-8	38.5	2,3-butanediol
		1	3.361	513-86-0	83.9	Acetoína
20 I	70 mL-30 g	2	3.367	64-19-7	71.8	Ácido acético
		3	5.745	24347-58-8	38.5	2,3-butanediol

Bolaji et al (2020) identificaron compuestos volátiles por cromatografía de gases con espectrometría de masas variando el tiempo del proceso de fermentación espontánea en la elaboración de ogi, una bebida fermentada a base de maíz y otros cereales, donde estos compuestos fueron identificados como Acetaldehído, Etanol, Ácido acético, Propanol, 2- Metil propanal, 2-metil1 propanol, 2,3- Butanodiona, 3-Metil butanol, 2-metil butanol, 2,3-butanediol, heptanol, ácido propanoico, entre otros. Se compararon los resultados obtenidos en el presente estudio, y se obtuvieron algunas similitudes con respecto a los compuestos identificados en GC-MS, coincidiendo con la producción de ácido acético y 2,3-Butanediol, cabe resaltar que aunque en ambos estudios, los metabolitos secundarios se obtuvieron mediante un proceso de fermentación y con el mismo sustrato, aunque no en las mismas condiciones, difiriendo también el tipo de microorganismo utilizado.

En la figura 11, 12 y 13 se muestran los distintos cromatogramas obtenidos en diferentes muestras de la fermentación: 20 F (80 mL de medio de cultivo Czapek Dox con 20 g de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) a los 20 días de fermentación); 25 E (80 mL de medio de cultivo Czapek Dox con 20 g de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) a los 25 días de fermentación); y 30 I (70 mL de medio de cultivo Czapek Dox con 30 g de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) a los 30 días de fermentación) respectivamente.

20 F

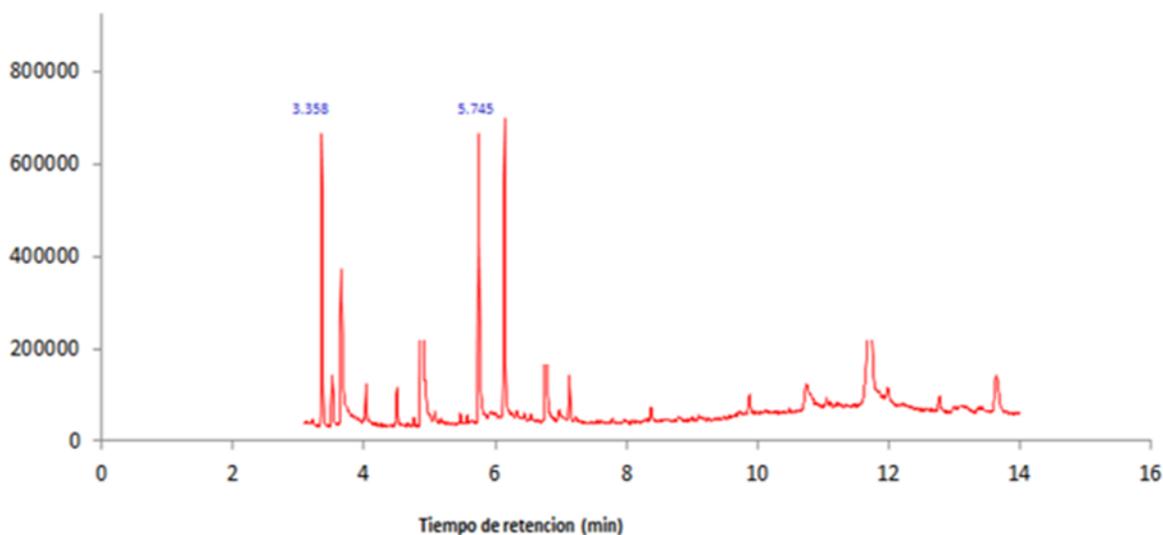


Figura 11 Cromatograma de muestra 20 F en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS). Tiempo de retención 3.358 y 5.745 min correspondiente a Acetoína y 2,3 butanediol, respectivamente.

Tabla 7 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* a los 25 días de fermentación.

Muestra	Proporción (medio de cultivo-harina de maíz azul)	Número de picos	Tiempo de retención	CAS	Probabilidad (%)	Compuestos analizados
25 A	90 mL-10 g	1	4.879	64-19-7	73.8	Ácido acético
		3	5.752	24347-58-8	47.6	2,3-butanediol
25 B	90 mL-10 g	1	4.879	64-19-7	75.6	Ácido acético
		3	5.746	24347-58-8	48	2,3-butanediol
25 C	90 mL-10 g	3	4.859	64-19-7	72.5	Ácido acético
		5	5.745	24347-58-8	45.6	2,3-butanediol
25 D	80 mL-20 g	3	4.872	64-19-7	75.3	Ácido acético
		1	4.859	64-19-7	71.5	Ácido acético
25 E	80 mL-20 g	2	5.745	24347-58-8	50.4	2,3-butanediol
		1	3.372	513-86-0	83.2	Acetoína
25 F	80 mL-20 g	3	4.918	64-19-7	62.4	Ácido acético
		4	5.752	24347-58-8	53	2,3-butanediol
25 G	70 mL-30 g	1	3.365	513-86-0	75.6	Acetoína
		2	5.752	24347-58-8	49.2	2,3-butanediol

25 H	70 mL-30 g	1	3.359	513-86-0	83.8	Acetoína
		6	5.746	24347-58-8	33.8	2,3-butanediol
25 I	70 mL-30 g	1	3.365	513-86-0	80.5	Acetoína
		4	4.853	64-19-7	72	Ácido acético
		5	5.752	24347-58-8	36.3	2,3-butanediol

25 E

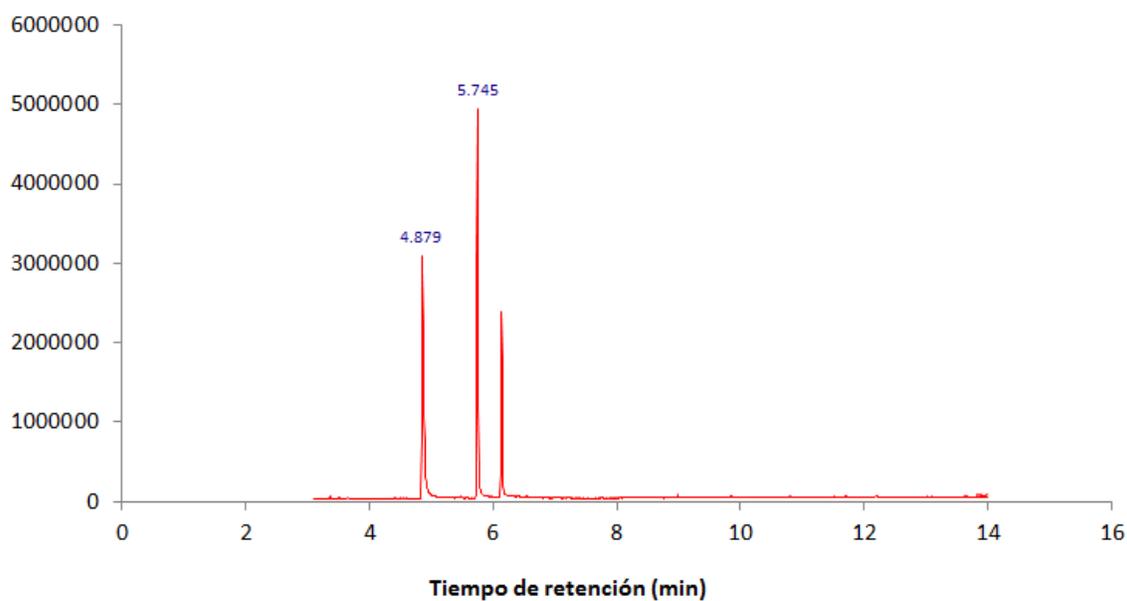


Figura 12 Cromatograma de muestra 25 E en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS) Tiempo de retención 4.879 y 5.745 min correspondiente a ácido acético y 2,3 butanediol, respectivamente.

Tabla 8 Picos mayoritarios de los compuestos bioactivos detectados a partir de los extractos etanólicos de las muestras fermentadas de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* a los 30 días de fermentación.

Muestra	Proporción (medio de cultivo-harina de maíz azul)	Número de picos	Tiempo de retención	CAS	Probabilidad (%)	Compuestos analizados
30 A	90 mL-10 g	1	5.753	513-85-9	32.2	2,3 butanediol
		2	6.141	513-85-9	45.6	2,3 butanediol
30 B	90 mL-10 g	1	3.361	513-86-0	86.8	Acetoína
		2	4.881	64-19-7	70.3	Ácido acético
30 C	90 mL-10 g	3	5.753	24347-58-8	58	2,3-butanediol
		1	3.367	513-86-0	60.7	Acetoína
30 D	80 mL-20 g	4	5.745	24347-58-8	42.8	2,3-Butanediol
		2	5.753	513-85-9	32.2	2,3 butanediol
30 E	80 mL-20 g	3	6.141	513-85-9	30.85	2,3 butanediol
		3	5.753	513-85-9	36.7	2,3 butanediol
30 F	80 mL-20 g	4	6.141	513-85-9	30.85	2,3 butanediol
		2	4.868	64-19-7	73.5	Ácido acético
30 G	70 mL-30 g	3	5.753	513-85-9	38.6	2,3 butanediol
		4	6.141	513-85-9	30.85	2,3 butanediol
30 H	70 mL-30 g	3	5.753	513-85-9	42.9	2,3 butanediol
30 I	70 mL-30 g	5	5.753	513-85-9	43.5	2,3 butanediol
		6	6.141	513-85-9	30.85	2,3 butanediol

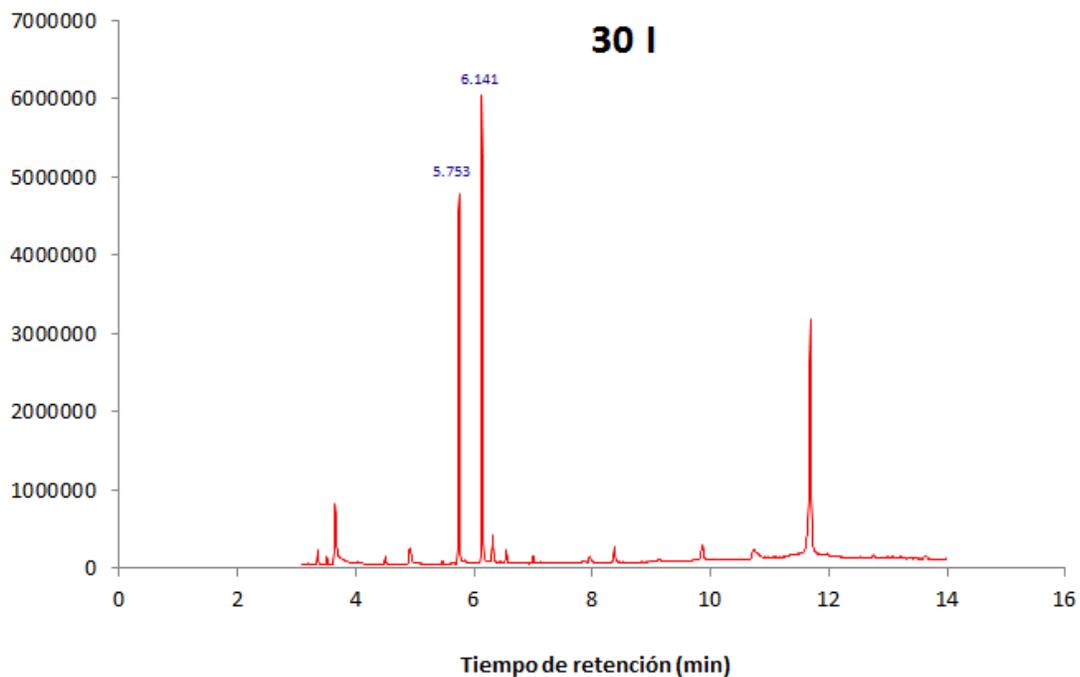


Figura 13 Cromatograma de muestra 30 I en el análisis de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC-MS). Tiempo de retención 5.753 y 6.141 min correspondiente a ácido acético y 2,3 butanediol, respectivamente.

5.5 Análisis de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizaron 3 estándares de compuestos fenólicos: la Delfinidina 3-glucósido (DEL), ácido ferúlico (FA) y ácido p-cumárico (PCA). Según Salinas-Moreno et al (2012) reportaron que la delfinidina 3- glucósido es una de las antocianinas presentes en granos de maíz azul, de diferentes variedades. Villarreal et al (2022) reportaron que en las muestras obtenidas de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* se produjeron Cianidina 3-glucósido, y pelargonidina 3-glucósido, es por eso que se decidió cuantificar la concentración de DEL, fermentando exactamente a las mismas condiciones. Así mismo en el trabajo antes mencionado también se identificó y cuantificó la concentración de ácidos cinámicos, obteniendo una clara potencialización del compuesto fenólico durante la fermentación,

es por eso que también se seleccionaron el ácido ferúlico (FA) y ácido p-Coumárico (PCA) por HPLC.

Los tres estándares fueron eluidos en tres diferentes tiempos de retención (RT). La delphinidina 3- glucósido (DEL) fue detectada a los 6.05 min a una longitud de onda de 520 nm, por su parte el ácido p-cumárico (PCA) y el ácido ferúlico (FA) se detectaron a los 23.75 y 24.39 min respectivamente, a 320 nm de longitud de onda. La información detallada se muestra en la tabla 9 siguiente.

Tabla 9 Tiempos de retención de los picos de la curva de calibración y longitud de onda utilizada para el análisis de compuestos fenólicos producidos en la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

Estándar	Tiempos de retención (minutos)	Longitud de onda (nm)
Delfinidina 3-glucósido	6.05	520
Ácido p-cumárico	23.75	320
Ácido ferúlico	24.39	320

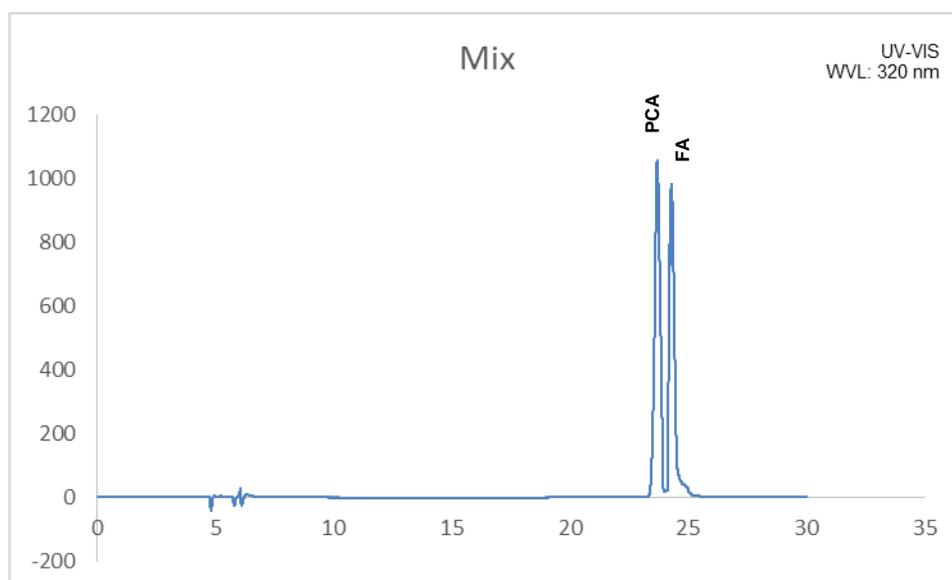


Figura 14 Cromatograma obtenido en la curva de calibración en el análisis de la mezcla de estándares utilizados leído a una λ de 320 nm (ácido p-cumárico y ácido ferúlico)

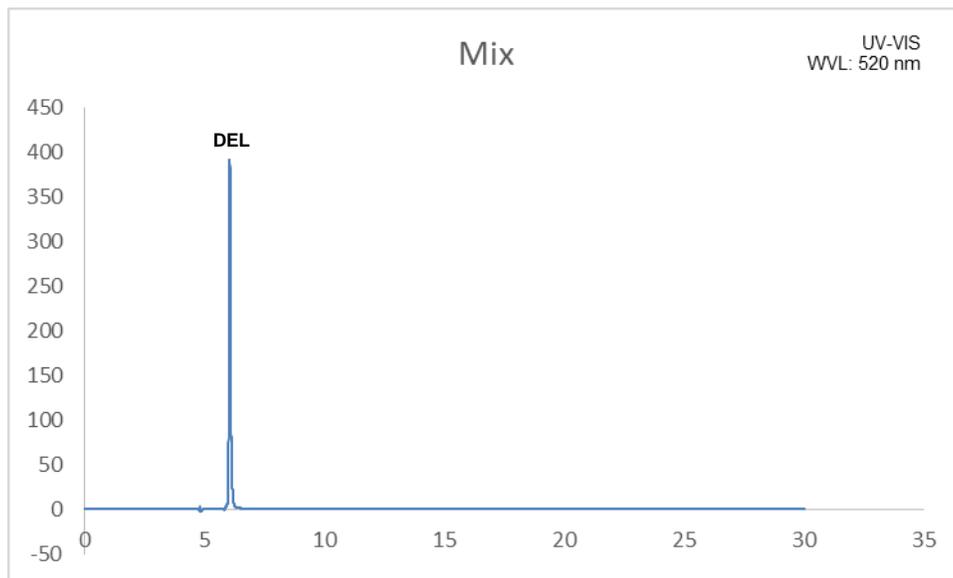


Figura 15 Cromatograma obtenido en el análisis de la mezcla de estándares utilizados leído a una λ de 520 nm (Delfinidina 3-glucósido)

En los cromatogramas anteriores (figura 14 y 15) podemos observar las señales generadas de la mezcla de los estándares utilizados (DEL, PCA, FA) leído a dos longitudes de onda (λ) diferentes, esto debido a que como sabemos para el caso de las antocianinas (DEL) estas son leídas mejor con una longitud de onda de 520 nm, mientras que para el caso de ácidos fenólicos éstos son mejor leídos con una longitud de onda de 320 nm y cómo podemos observar en los cromatogramas esto se cumple debido a que una longitud de onda de 320 nm en el caso de la detección de delfinidina la intensidad en la detección es escasa o casi imperceptible en el cromatograma (figura 14), mientras que una longitud de 520 nm para la detección de delfinidina si es posible observarse en el cromatograma (figura 15), al igual utilizando una longitud de onda de 520 nm para la detección de los ácido fenólicos (PCA y FA), es imperceptible (figura 15), mientras que haciendo uso de una longitud de onda de 320 nm se pueden observar los picos de estos compuestos (figura 14).

5.5.1 Delfinidina 3-glucósido (DEL)

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los principales componentes del maíz azul, son las antocianinas, ya que son las que le proveen el color azul característico. Salinas-Moreno *et al.*, (2012) realizaron un perfil de antocianinas presentes en 3 tipos de maíz azul obteniendo como resultado un pico mayoritario de Cianidina 3-glucósido, repitiéndose lo mismo con un estudio realizado por Escalante-Aburto *et al.*, (2016) quienes analizaron las antocianinas específicas en maíz azul proveniente de refrigerios de segunda generación.

En las muestras iniciales (sin fermentar) se extrajeron los compuestos fenólicos en harina de maíz azul para comparar las concentraciones de compuestos fenólicos antes y después de la fermentación con *Colletotrichum gloeosporioides*. Los valores de las concentraciones obtenidas a los 20 días de fermentación presentaron un promedio de 1,756 mg/kg. A los 25 días de fermentación el promedio disminuye con 1,192 mg/kg, finalizando que la concentración a los 30 días de fermentación supera a los otros dos factores por 2,044 mg/kg.

Anteriormente Villarreal *et al* (2022) reportaron que tanto la Cianidina 3-glucósido (CYA) como la Pelargonidina 3-glucósido (PEL), antocianinas presentes en el maíz azul, presentaron valores promedios en muestras fermentadas de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) de 90.7543, 138.55 y 129.06 mg/kg a los 20, 25 y 30 días de fermentación respectivamente. Por lo que comparando con las concentraciones obtenidas de DEL, se observa que existió un aumento notablemente con respecto a los otros compuestos fenólicos analizados.

Como ya se ha mencionado anteriormente el maíz azul es un cereal muy consumido en México y América central, ha sido incorporado a la dieta humana por siglos y se ha utilizado de bastantes maneras tales como, alimentos, bebidas, botanas o bien, en forma de tortilla que se pudiera considerar la manera más popular de consumirlo. El maíz de variedad pigmentada, en este caso el de color azul contiene una alta variedad de antocianinas.

Como se ha mencionado anteriormente, DEL es uno de los principales compuestos bioactivos de antocianinas presentes en diversos alimentos de origen vegetal. Se puede extraer de las plantas y se han aplicado ampliamente en la industria alimentaria como colorante, antioxidante, material conservante y aditivos funcionales (Kumar *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2019). En la tabla 10 se puede observar una variedad de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos, así como la propiedad funcional que tiene cada uno. Oberlencher *et al.* (2018) reportaron que la cantidad de antocianinas totales (ANTT) presentes en el maíz azul, está dentro de un rango bastante amplio que va desde 47.5 a 1289 mg/kg, este valor se comparó con la cantidad obtenida en este estudio de la harina de maíz azul (*Zea mays* L.) sin fermentar, donde se obtuvieron 168 mg/kg en promedio, siendo esta una concentración dentro del rango de valores y que es comparativo con los obtenidos por otros autores. Puede considerarse una cantidad normal esperada de Delfinidina 3-glucósido ya que son moléculas abundantes especialmente en el maíz azul (*Zea mays* L.).

En el caso de las muestras fermentadas con *Colletotrichum gloeosporioides* y maíz azul (*Zea mays* L.), Villarreal *et al.* (2022) reportaron las concentraciones de otras antocianinas también presentes en el maíz azul (*Zea mays* L.), Cianidina 3-glucósido y Pelargonidina 3-glucósido, con 119.86 mg/kg y 83.11 mg/kg respectivamente. Xu *et al.* (2022) reportaron la producción de DEL mediante proceso de fermentación con *Saccaromyces cerevisiae* genéticamente modificadas para la producción de antocianinas, donde obtuvieron 7.1 mg/kg, al comparar estas concentraciones con las obtenidas en el presente proyecto (valor promedio de 1,664 mg/kg) son relativamente bajas.

Sin embargo, las antocianinas son pigmentos naturales solubles en agua con baja solubilidad en solventes orgánicos y son vulnerables a factores externos, como altas temperaturas, luz y ambientes fuertemente ácidos y alcalinos, cuyas propiedades limitan sus aplicaciones en matrices alimentarias (Fenger *et al.*, 2019; Matsufuji *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2017; Tachibana *et al.*, 2017) Las antocianinas aciladas presentan alternativas potenciales a las antocianinas debido a sus funciones y ventajas únicas en comparación con los análogos no acilados, atribuidas al cambio estructural en las

antocianinas que es el resultado de la conexión de grupos acilo. (Cruz *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019)

Tabla 10 Alimentos funcionales ricos con compuestos fenólicos

Alimentos	Propiedad funcional	Referencia
Omija	Antioxidante	Kim <i>et al.</i> , 2009
Frijoles rojos de soya	Antitumoral	Koide <i>et al.</i> , 1997
Repollo morado	Supresor de tumores	Hagiwara <i>et al.</i> , 2002
Vino tinto	Supresión de células cancerígenas HCT-15 del colon humano	Kamei <i>et al.</i> , 1998
Arándanos	Inhibición de la iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis	Tristán <i>et al.</i> , 2005
Frambuesa	Efecto supresor de prostanglandina EG2, relacionada con la actividad antiinflamatoria	Vuorela <i>et al.</i> , 2005
Bayas rojas	Alivio en retinopatía diabética	Perossini <i>et al.</i> , 1987

En la figura 16 se muestra el cromatograma de la muestra 30 E (Con 80 mL de medio de cultivo Czapek-Dox con 20 g de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) y 25 días de fermentación) que corresponde a la muestra con mayor concentración de delfinidina 3-glucósido, teniendo un valor de 2,807 mg/kg. Así como también en la tabla 11 se observan todas las concentraciones de delfinidina 3-glucósido (DEL) en las muestras con diferentes proporciones y tiempo de 20, 25 y 30 días de fermentación.

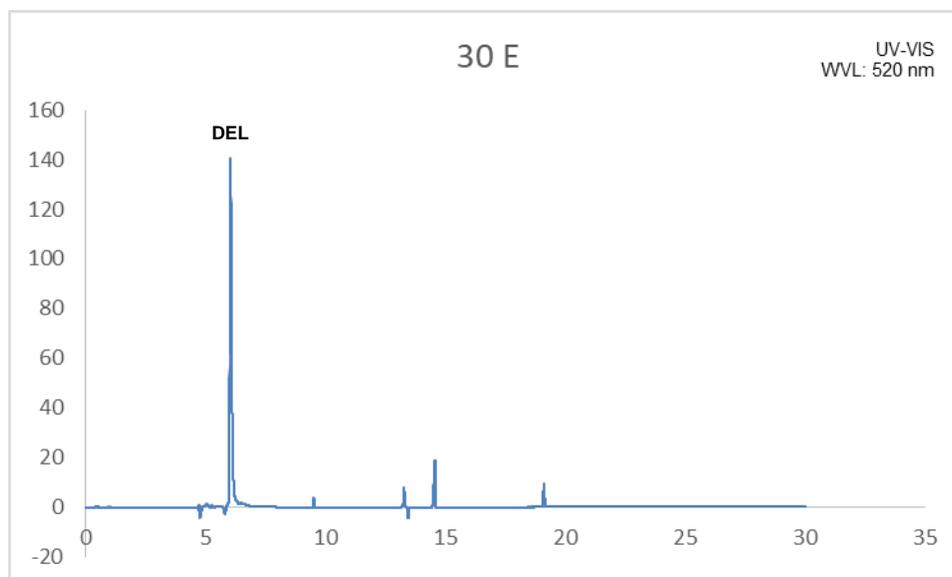


Figura 16 Perfil cromatográfico de muestra 30 E (Con 80 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 20 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)

Tabla 11 Concentraciones de muestras de Delfinidina 3-glucósido (DEL) con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.

Muestras	Concentración de la muestra (ppm)
20 A	1533.21
20 B	1718.09
20 C	2039.96
20 D	1643.49
20 E	2334.37
20 F	2474.99
20 G	300.78
20 H	1918.21
20 I	1845.76
25 A	151.86
25 B	302.94

25 C	914.17
25 D	135.15
25 E	208.52
25 F	2076.81
25 G	2571.67
25 H	2627.46
25 I	1747.85
30 A	2426.04
30 B	1248.69
30 C	1794.12
30 D	1874.07
30 E	2807.84
30 F	2393.80
30 G	2494.28
30 H	1647.84
30 I	1713.94

En el diseño factorial el valor de F en el factor de las proporciones es igual a 1.20, el del factor tiempo es 2.88, y por último el valor de la interacción entre ambos factores pertenece a 3.77, los dos primeros valores mencionados son menores a la F crítica correspondiente al valor de α (nivel de significancia) de 0.05 el cual es 3.5545 en el caso de los dos factores y 2.9277 en la interacción, (el valor de α tanto para los factores como para la interacción son exactamente los mismos para todos los estándares) por lo que no se rechazó la hipótesis nula para ninguno de los dos factores y su interacción, dando como resultado que las proporciones, el tiempo y la interacción entre ellos no influye en la concentración de delfinidina 3-glucósido en las muestras fermentadas. En las tablas 12 y 13 se puede ver el estadístico completo, así como también la comparación de medias de Tukey representada en la figura 17.

Tabla 12 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de Delfinidina 3-glucósido (DEL).

RESUMEN	20	25	30	Total
<i>90-10</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	5291.26	1368.97	5468.85	12129.08
Promedio	1763.753333	456.3233333	1822.95	1347.675556
Varianza	65762.74563	162923.9692	347161.6323	591530.3238
<i>80-20</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	6452.85	2420.48	7075.71	15949.04
Promedio	2150.95	806.8266667	2358.57	1772.115556
Varianza	198080.2348	1210989.039	218912.4679	939205.5571
<i>70-30</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	4064.75	6946.98	5856.06	16867.79
Promedio	1354.916667	2315.66	1952.02	1874.198889
Varianza	834715.3346	242584.2781	221626.7332	501205.8606
<i>Total</i>				
Cuenta	9	9	9	
Suma	15808.86	10736.43	18400.62	
Promedio	1756.54	1192.936667	2044.513333	
Varianza	393481.7971	1136194.754	255529.0523	

Tabla 13 Diseño Factorial de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides* de Delfinidina 3-glucósido (DEL).

ANÁLISIS DE VARIANZA DE DELFINIDINA 3 GLUCÓSIDO (DEL)							
	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad	Valor crítico para F $\alpha=0.05$	
Proporciones	1403391.42	2	701695.71	1.20	0.321	3.5545	
Tiempo	3377280.53	2	1688640.26	2.88	0.077	3.5545	
Interacción	5872740.52	4	1468185.13	3.77	0.021	2.9277	
Dentro del grupo	7005512.87	18	389195.15				
Total	17658925.35	26					

Hipótesis nula (Ho): Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna (Ha): Al menos una es diferente

F es MAYOR a F crítica= Rechazo Ho
 F es MENOR a F crítica= No rechazo Ho

PROPORCIONES	NRHO	LAS PROPORCIONES NO INFLUYEN EN LA CONCENTRACIÓN
TIEMPO	NRHO	EL TIEMPO NO INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN
INTERACCION	RHO	LA INTERACCIÓN ENTRE AMBOS FACTORES INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN

Tukey Pairwise Comparisons: Response = DEL, Term = Proporciones

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Proporciones	N	Mean	Grouping
70-30	9	1874.20	A
80-20	9	1772.12	A
90-10	9	1347.68	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = DEL, Term = Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
30	9	2044.51	A
20	9	1756.54	A
25	9	1192.94	A

Means that do not share a letter are significantly different.

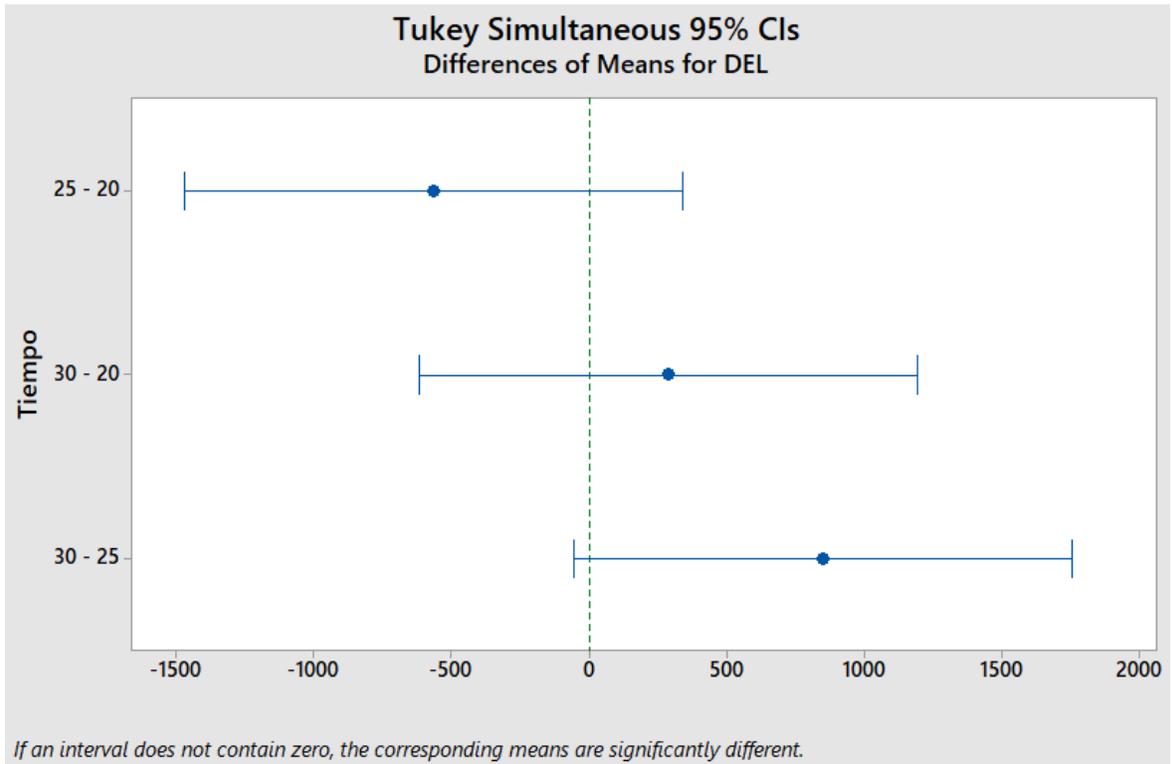
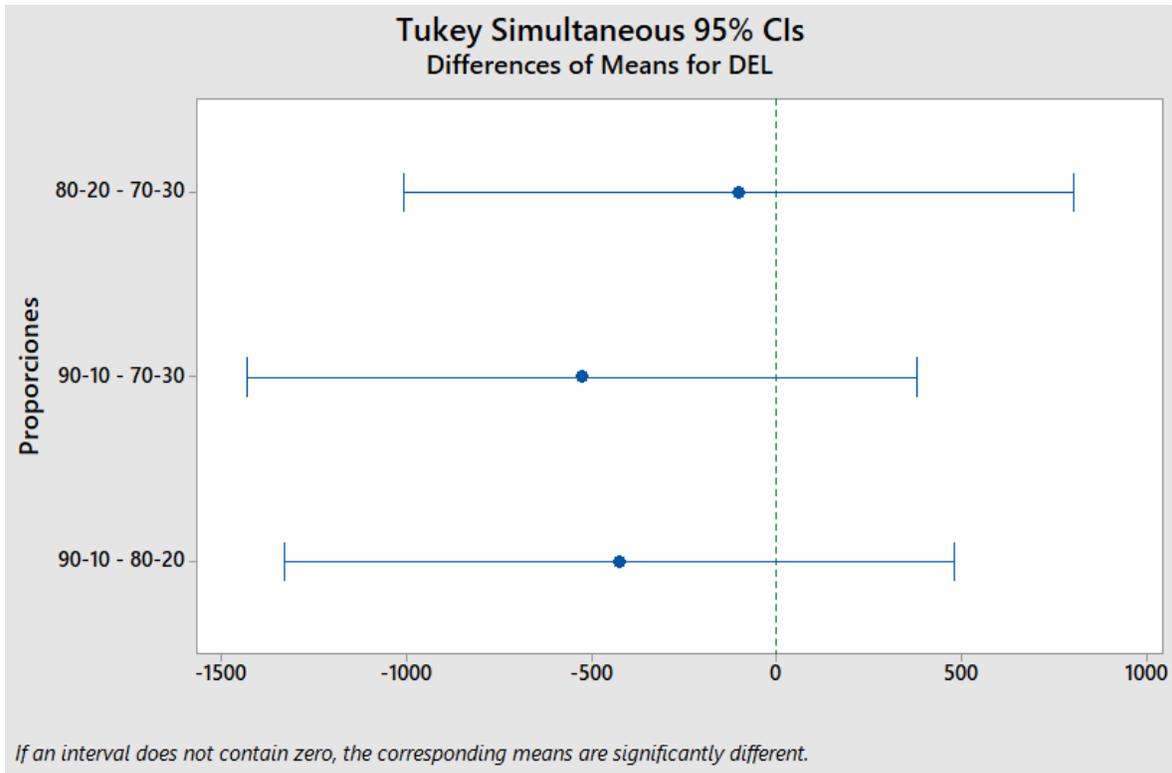


Figura 17 Comparación de medias de Tukey de Delfinidina (DEL) en las muestras fermentadas de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides*.

5.5.2 Ácido ferúlico (FA)

Kumar-Singh et al., 2013 comprobaron que el ácido cinámico es uno de los fenilpropanoides básicos con actividad antioxidante, producido por las plantas en respuesta a condiciones estresantes, en éste caso ellos utilizaron semillas de maíz a las cuales los sometieron a un tratamiento de cloruro de Sodio (NaCl) para provocar estrés en el crecimiento de la planta. Las antocianidinas se acumulan en las plantas en su forma glucosilado; es decir, están unidas a algún azúcar, llamándose antocianinas. Normalmente los azúcares mencionados están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-coumarico, cafeíco, ferúlico o sinápico) los cuales le dan estabilidad a las plantas en condiciones de pH y temperaturas extremas.

Los ácidos cinámicos se pueden encontrar disponibles en frijol, té, cocoa, manzanas, peras, cerezas, cítrico, uvas, espinaca, papa, tomate, remolacha, alcachofa, apio y cereales (Clifford *et al.*, 1999). A menudo los ácidos cinámicos aparecen en forma de esterres conjugados con el ácido quínico, conocido como ácido clorogénico (Guzmán, 2014).

La concentración de FA en maíz azul (*Zea mays* L.) según un estudio realizado por Pozo-Insfran en el 2006, se reportó la cantidad de 102 mg/kg. En las muestras iniciales de harina de maíz azul en el presente proyecto se obtuvo un valor promedio de 108 mg/Kg, siendo muy similar a la reportada por Pozo-Insfran. En el caso de Villarreal et al (2022) reportaron cantidades producidas de ácido cinámico de 132.60 mg/Kg siendo un valor relativamente más alto al ser comparada con el presente proyecto. En el caso de las muestras fermentadas se obtuvieron concentraciones con valores promedio de 235 mg/Kg, este valor resulta similar al ser comparado con el reportado con Huajun et al (2021) donde ellos obtuvieron mediante fermentación, 212 mg/kg con una bacteria *Streptomyces spectabilis*. En la figura 18 se muestra el cromatograma de la muestra 25 I (Con 70 mL de medio de cultivo Czapek-Dox con 30 gramos de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) y 25 días de fermentación) que corresponde a la muestra con mayor concentración de ácido ferúlico teniendo un valor de 261 mg/kg. Así como también en la

tabla 14 se observan todas las concentraciones de ácido ferúlico (FA) en las muestras con diferentes proporciones y tiempo de 20, 25 y 30 días de fermentación.

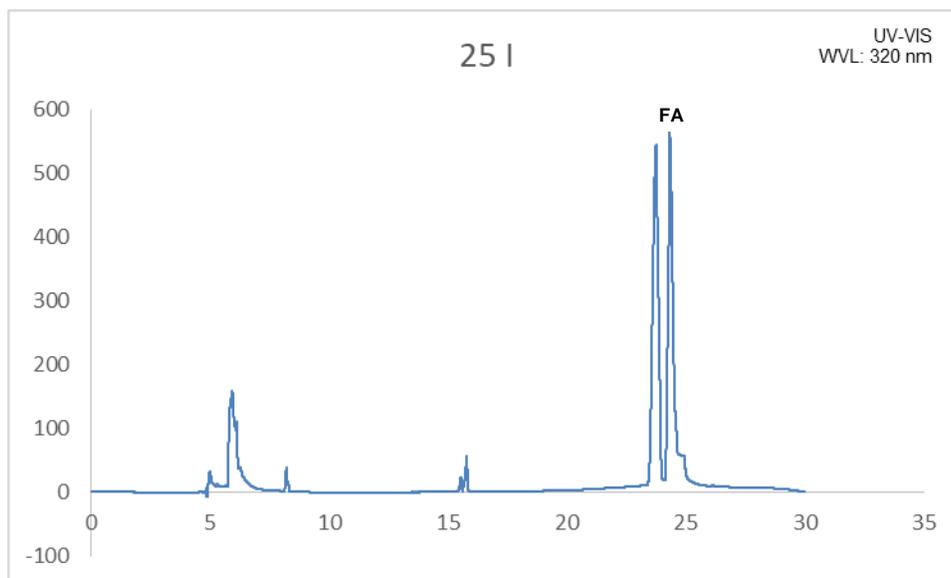


Figura 18 Perfil cromatográfico de muestra 25 I (Con 70 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 30 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)

Tabla 14 Concentraciones de ácido ferúlico (FA) en muestras con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.

Muestras	Concentración de la muestra (ppm)
20 A	220.01
20 B	229.98
20 C	230.20
20 D	220.29
20 E	229.33
20 F	241.09
20 G	238.09

20 H	237.58
20 I	229.98
25 A	231.75
25 B	235.00
25 C	212.34
25 D	232.72
25 E	212.21
25 F	245.75
25 G	245.54
25 H	247.99
25 I	261.51
30 A	229.18
30 B	238.00
30 C	235.01
30 D	232.69
30 E	241.95
30 F	232.12
30 G	253.61
30 H	245.72
30 I	250.65

En el diseño factorial el valor de F en el factor de las proporciones es igual a 8.55, el del factor tiempo es 2.31 y por último el valor de la interacción entre ambos factores pertenece a 0.85. El factor de las proporciones es mayor al valor de la F crítica por lo que las proporciones si afectan a la concentración de ácido ferúlico en las muestras fermentadas. Los valores del tiempo y la interacción entre ambos factores son menores a la F crítica correspondiente al valor de α (nivel de significancia) de 0.05 por lo que no se rechazó la hipótesis nula para ninguno de los dos factores y su interacción, dando

como resultado que el tiempo y la interacción entre ellos no influye en la concentración de ácido ferúlico en las muestras fermentadas. En las tablas 15 y 16 se puede observar el estadístico completo. En la figura 19 se muestra la comparación de medias de Tukey ya que el factor proporciones presenta un efecto significativo, determinando a partir de esta comparación, que las proporciones que influyen o dan lugar a una mayor concentración de ácido ferúlico pertenecen a las muestras G, H, I, (70 mL de medio cultivo, 30 g de harina de maíz azul).

Tabla 15 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de ácido ferúlico (FA).

RESUMEN	20	25	30	Total
<i>90-10</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	680.19	679.09	702.19	2061.47
Promedio	226.73	226.3633333	234.0633333	229.0522222
Varianza	33.8809	150.1310333	20.12023333	65.18331944
<i>80-20</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	690.71	690.68	706.76	2088.15
Promedio	230.236667	230.2266667	235.5866667	232.0166667
Varianza	108.776533	285.8954333	30.45023333	113.449575
<i>70-30</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	705.65	755.04	749.98	2210.67
Promedio	235.216667	251.68	249.9933333	245.63
Varianza	20.6320333	73.9723	15.88643333	89.1522
<i>Total</i>				
Cuenta	9	9	9	
Suma	2076.55	2124.81	2158.93	
Promedio	230.727778	236.09	239.8811111	
Varianza	54.4624444	267.01275	74.56891111	

Tabla 16 Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides* de ácido ferúlico (FA).

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ÁCIDO FERÚLICO (FA)						
	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Proporciones	1406.80	2	703.40	8.55	0.0024	3.5545
Tiempo	380.72	2	190.36	2.31	0.1273	3.5545
Interacción	282.06	4	70.51	0.85	0.5076	2.9277
Dentro del grupo	1479.49	18	82.19			
Total	3549.08	26				
Hipótesis nula (Ho): Todas las medias son iguales			F es MAYOR a F crítica= Rechazo Ho			
Hipótesis alterna (Ha): Al menos una es diferente			F es MENOR a F crítica= No rechazo Ho			
PROPORCIONES	RHO	LAS PROPORCIONES INFLUYEN EN LA CONCENTRACIÓN				
TIEMPO	NRHO	EL TIEMPO NO INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN				
INTERACCION	NRHO	LA INTERACCIÓN ENTRE AMBOS FACTORES NO INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN				

Comparisons for FA

Tukey Pairwise Comparisons: Response = FA, Term = Proporciones

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Proporciones	N	Mean	Grouping
70-30	9	245.630	A
80-20	9	232.017	B
90-10	9	229.052	B

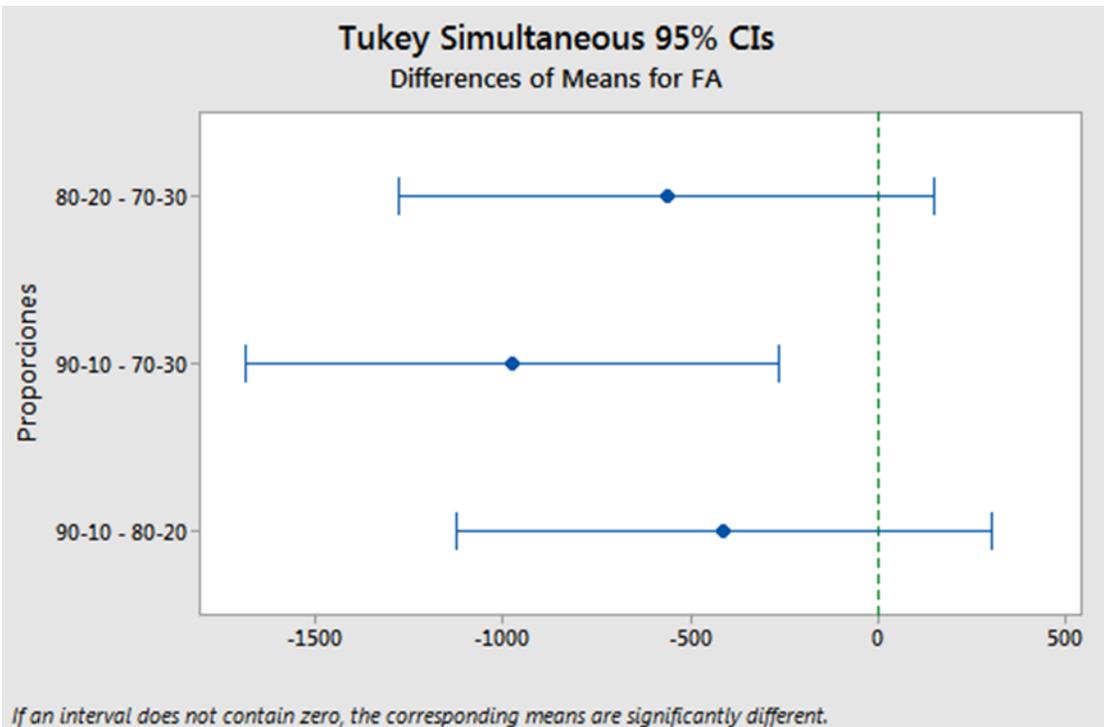
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = FA, Term = Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
30	9	239.881	A
25	9	236.090	A
20	9	230.728	A

Means that do not share a letter are significantly different.



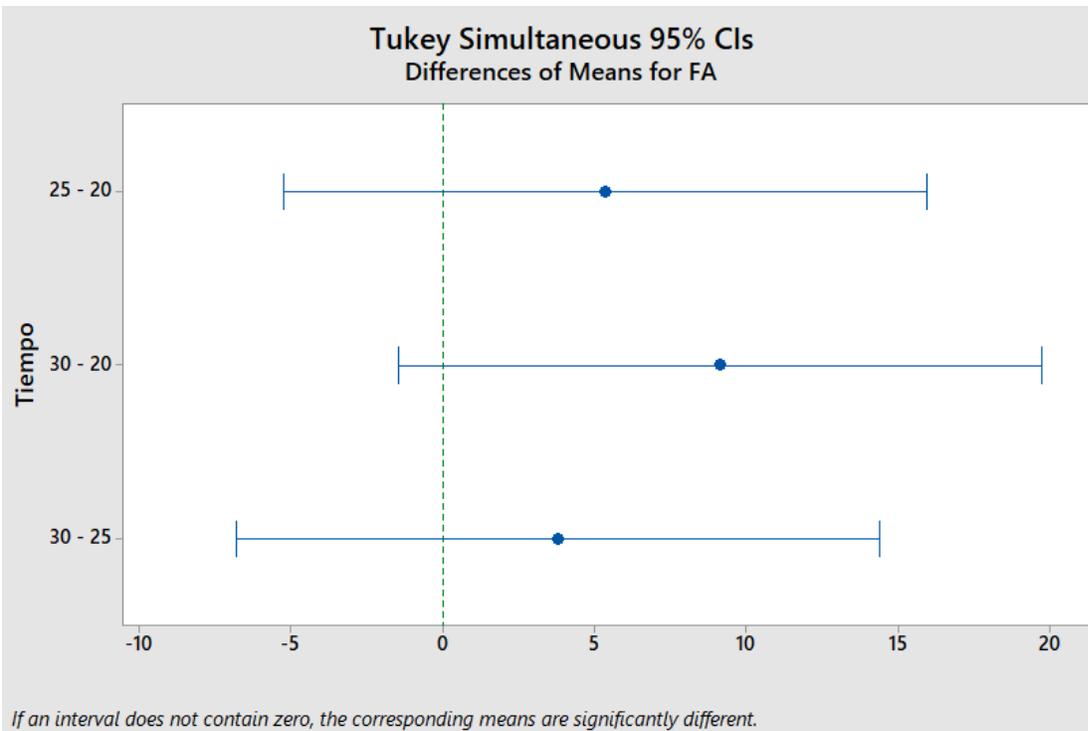


Figura 19 Comparación de medias de Tukey de ácido ferúlico en las muestras fermentadas de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides*.

5.5.3 Ácido p-cumárico (PCA)

Según lo reportado en la bibliografía, El ácido p-cumárico (PCA), es un ácido fenólico de la familia de los ácidos hidroxicinámicos, se sintetiza biológicamente a través de la vía del shikimato con fenilalanina y tirosina como precursores. El PCA se encuentra de forma ubicua en plantas y hongos en forma libre o ligada. El PCA se distribuye ampliamente en frutas (p. ej., manzanas, peras, uvas, naranjas, tomates y bayas), verduras (p. ej., frijoles, papas y cebollas) y cereales (p. ej., maíz, avena y trigo) (El-Seedi *et al.*, 2022).

La presencia de PCA en las muestras de extracción inicial de la fermentación de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) con *Colletotrichum gloeosporioides* tuvieron un promedio de 162.88 mg/kg. La concentración del contenido total de PCA en muestra de maíz azul (*Zea mays* L.) según Boz et al (2015) puede llegar a un rango de 47.5 a 2555 mg/kg.

Los valores de las concentraciones obtenidas a los 20 días de fermentación presentaron un promedio de 514 mg/kg. A los 25 días de fermentación el promedio aumenta con 541 mg/kg, finalizando que la concentración a los 30 días de fermentación vuelve a bajar los valores de concentración a 530 mg/kg. En la tabla 17 se muestran las concentraciones de muestras de ácido p-cumárico (PCA) con diferentes proporciones de 20, 25 y 30 días de fermentación.

En comparación con otros autores como cai et al (2022) se han producido hasta 30,000 mg/kg de PCA utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae*, siendo las producidas en el presente proyecto inferiores a dicho valor.

En la figura 20 se puede observar el perfil cromatográfico de la muestra 25 B que corresponde a la muestra con mayor concentración de ácido p-cumárico teniendo un valor de 597 mg/kg. Además se muestra la tabla 17 donde se puede observar todas las concentraciones correspondientes al PCA en las muestras fermentadas de 20, 25 y 30 días.

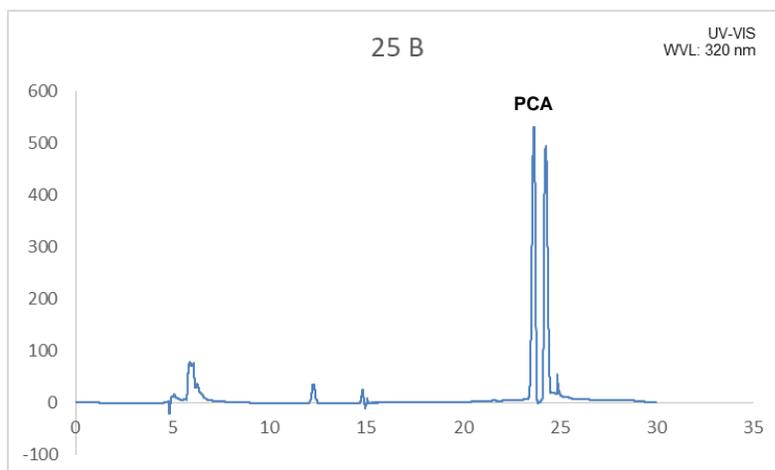


Figura 20 Perfil cromatográfico de muestra 25 B (Con 90 ml de medio de cultivo Czapek-Dox con 10 gramos de harina de maíz azul y 25 días de fermentación)

Tabla 17 Concentraciones de muestras de Ácido p-cumárico (PCA) con diferentes proporciones y 20, 25 y 30 días de fermentación.

Muestras	Concentración de la muestra (ppm)
20 A	495.47
20 B	537.61
20 C	539.71
20 D	504.31
20 E	529.42
20 F	381.86
20 G	559.68
20 H	552.82
20 I	525.62
25 A	593.64
25 B	597.02
25 C	527.66
25 D	495.69
25 E	565.49
25 F	598.59
25 G	369.45
25 H	591.24
25 I	584.91
30 A	502.20
30 B	579.67
30 C	530.48
30 D	530.35
30 E	342.02
30 F	524.75
30 G	590.43
30 H	589.32
30 I	589.33

En el diseño factorial el valor de F en el factor de las proporciones es igual a 1.72, el del factor tiempo es 0.54, y por último el valor de la interacción entre ambos factores pertenece a 1.20. Los tres valores tanto del factor de las proporciones, el tiempo y la interacción entre ambos, son menores a la F crítica por lo que no se rechazó la hipótesis nula para los factores mencionados, por lo que las proporciones, el tiempo y la interacción no influyen en la concentración de ácido p-coumárico en las muestras fermentadas. En las tablas 18 y 19 se puede ver el estadístico completo.

Tabla 18 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de ácido p-cumárico (PCA).

RESUMEN	20	25	30	Total
<i>90-10</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	1572.79	1718.32	1612.35	4903.46
Promedio	524.263333	572.773333	537.45	544.8288889
Varianza	622.894533	1529.265733	1536.8359	1394.104811
<i>80-20</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	1415.59	1659.77	1397.12	4472.48
Promedio	471.863333	553.2566667	465.7066667	496.9422222
Varianza	6233.07803	2759.343333	11481.6336	6909.486469
<i>70-30</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	1638.12	1545.6	1769.08	4952.8
Promedio	546.04	515.2	589.693333	550.3111111
Varianza	324.4972	15942.3141	0.40703333	5117.551561
<i>Total</i>				
Cuenta	9	9	9	
Suma	4626.5	4923.69	4778.55	
Promedio	514.055556	547.0766667	530.95	
Varianza	2885.38758	5700.71815	6160.8648	

Tabla 19 Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones de las muestras de la fermentación de harina de maíz azul con *Colletotrichum gloeosporioides* de ácido p-cumárico (PCA).

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ÁCIDO p-COUMÁRICO (PCA)						
	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (GL)	Promedio de los cuadrados (MS)	F	Probabilidad d	Valor crítico para F $\alpha=0.05$
Proporciones	15514.27	2	7757.13	1.72	0.20	3.55
Tiempo	4907.65	2	2453.82	0.54	0.58	3.55
Interacción	21600.94	4	5400.23	1.20	0.34	2.92
Dentro del grupo	80860.53	18	4492.25			
Total	122883.42	26				
Hipótesis nula (Ho): Todas las medias son iguales			F es MAYOR a F crítica= Rechazo Ho			
Hipótesis alterna (Ha): Al menos una es diferente			F es MENOR a F crítica= No rechazo Ho			
PROPORCIONES	NRHO	LAS PROPORCIONES NO INFLUYEN EN LA CONCENTRACIÓN				
TIEMPO	NRHO	EL TIEMPO NO INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN				
INTERACCION	NRHO	LA INTERACCIÓN ENTRE AMBOS FACTORES NO INFLUYE EN LA CONCENTRACIÓN				

VI. CONCLUSIÓN

En la identificación por cromatografía de gases unido a espectrometría de masas (GC-MS) en las muestras de harina de maíz azul (*Zea mays* L.) de la extracción inicial se encontraron picos referentes a la presencia de etil oleato, molécula producida al combinar ácido oleico y etanol. A los 20 días de la fermentación, la molécula predominante en la identificación de metabolitos secundarios por GC-MS se trató de Acetoína y a los 25 y 30 días de la fermentación se obtuvo en mayoría el 2-3 butanediol.

En la cuantificación e identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía líquida de Alta resolución (HPLC) se utilizaron 3 estándares de compuestos fenólicos, Delfinidina 3-glucósido (DEL), ácido p-cumárico (PCA) y ácido ferúlico (FA). Se obtuvieron 168 mg/Kg de DEL en muestras de extracción inicial, estando dentro del rango reportado anteriormente por Oberlerchner et al (2008). Así mismo, en las muestras fermentadas se obtuvieron concentraciones de entre 135 a 2,800 mg/Kg, comparados con los resultados obtenidos antes por Xu et al (2022) son valores superiores.

Se encontraron concentraciones de PCA y FA en muestras iniciales de 162 mg/Kg y 149 mg/Kg respectivamente, y en muestras fermentadas superaron los 500 mg/Kg en el caso de PCA y 200 mg/Kg en FA.

A partir del diseño experimental se puede concluir que no hay diferencias significativas en la concentración de los metabolitos secundarios en ambos factores, proporciones de sustrato y tiempos de fermentación en el caso de DEL y PCA, mientras que existen diferencias significativas en factor proporciones a nivel 70 g harina maíz azul y 30 mL de medio de cultivo Czapek Dox (muestras G, H, I) donde estas proporciones presentan la mayor concentración de FA.

C. gloeosporioides es capaz de metabolizar/sintetizar liberar compuestos con actividad biológica obteniendo así una gama más amplia de los ya existentes, además de potencializar la producción de flavonoides como DEL y ácidos hidroxicinámicos, como FA y PCA (los tres presentes en el maíz azul).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi, S. L.** 1991. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. *J. Chromatogr.* 587: 193-203.
- Agama, E.** 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 3: 317-329.
- Agilent, T.** 2010. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC (5990^a,-54888ES eds., Vol. 1) Agilent Technologies, Inc.; www.agilent.com/chem/store.
- Alarcón-Sáenz, M.A.** 2017. Aislamiento E Identificación De Un Hongo Endófito Del Fruto De Chagalapoli (*Ardisia Compressa*) Y Su Relación En La Composición Química. Tesis para maestro en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Arenas. R.** 2014. *Micología Médica ilustrada.* 5^a Edición. Editorial McGraw-Hill.
- Betran, F.; Bockholt, A.; Rooney, R.** 2001. Blue corn in specialty corns. *Food Hydrocolloids* 5: 455-467.
- Bolaji-Olusola, T., Apotiola, Z. O., Ojo, T. I., Abdussalaam, R. B., Akoro, S. M., Ogunsola, O. A.** 2020. Volatile Compounds Determination by GC-MS and Identification of Dominant Microorganism at Varying Fermentation Period of Ogi Slurry. *J. Food. Stab* (2020) 3 (1): 38-56
- Bonifaz-Trujillo, A.** 2012. *Micología médica básica.* 4^a Edición. Editorial McGrawHill.
- Bravo, L.** 1998 Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56(11), 317–333.
- Brglez Mojzer, E.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U.** 2016 Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* 21(7), 901–939.

Cai, M., Jiayu, L., Song, X., Li, Y., Wu, Z., Xu, H., Qiao, M. 2022. De novo biosynthesis of p-coumaric acid and caffeic acid from carboxymethyl-cellulose by microbial co-culture strategy. *Microbial Cell Factories* (2022) 21:81

Cháves-López, C.; Rossi, C.; Maggio, F.; Paparella, A.; Serio, A. 2020. Changes Ocurring in Spontaneous Maize Fermentation: An Overview. *Fermentation* 6, 36.

Chen, Y.; Yang, Z.; Sun, J.; Song, T.; Zhu, B.; Zhao, J. 2018. Colletotrichine A, a new sesquiterpenoid, from *Colletotrichum gloeosporioides* GT-7, a fungal endophyte of *Uncaria rhynchophylla*. *Natural product research*. Informa UK, Limited, trading as Taylor & Francis Group. Vol 32, No. 8 pp. 880-884.

Clydesdale, F. M.; Francis, F. J. 1985 *Food Nutrition and Health*; Springer Science & Business Media, Netherlands.

Colomé, J.S.; Cano, R. J.; Kubinski, A. M.; Grady, D.V. 1986. *Laboratory Exercises in Microbiology*. California Politechnic State University. West Publishing Company. 580 pp.

Cortés-Sánchez, A.J., Mosqueda-Olivares, T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, vol. 12, núm. 2, pp. 64-90 Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.

Clifford, M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates, ature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 79, 362–372.

Cruz, L.; Fernandes, I.; Guimaraes, M.; de Freitas, V.; Mateus, N. 2016. Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate. *Food Funct.* 7, 2754–2762.

Daverey, A. and Pakshirajan, K. 2009. Production of sophrolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. *Food Research International*, 42: 499-504.

De la Parra, C.; Serna, S.; Hai, L. 2008. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4177- 4183

Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Serna-Sáldivar, O., Talcott, S. T. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International* 39. 696–703

Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 455-463.

Dewanto, V.; Wu, K.K.; Liu, R.H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014.

Dharmaraj, S. 2010 Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 2123-2139.

Dulf, F.V. 2016. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fraction of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry*, v.209, p.27-36.

Ertani, A.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Tinti, A.; Nardi, S. 2016 Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. *Molecules*. 21, 205.

EI-Seedi HR, EI-Said AM, Khalifa SA, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK. 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J Agric Food Chem* 60:10877–10895.

Escalante-Aburto, A.; Ponce-García, N.; Ramírez-Wong, B.; Torres-Chávez, P. I.; Figueroa-Cárdenas, J.; Gutiérrez-Dorado, R.; 2016. Specific Anthocyanin Contents of Whole Blue Maize Second-Generation Snacks: An Evaluation Using Response Surface Methodology and Lime Cooking Extrusion *Journal of Chemistry* Volume. Article ID 5491693, 8 pages.

Ferrazzano, G.F.; Amato, I.; Ingenito, A.; Zarrelli, A.; Pinto, G.; Pollio, A. 2011 Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review. *Molecules* 16, 1486–1507.

Fenger, J.A.; Moloney, M.; Robbins, R.J.; Collins, T.M.; Dangles, O. 2019. The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. *Food Funct.* 2019, 10, 6740–6751.

Galarza, J. M. 2011. Situación actual y perspectivas del maíz en México. SIAP. <https://www.siap.gob.mx>

Garg, S. K., Jain, A. 1995. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. *Bioresource Technology* 5. 103-109.

Garzón, G. A. 2008 Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review. *Acta biol. Colomb.* Vol. 13 No. 3, 27-36

Ghasemzadeh, A.; Ghasemzadeh, N. 2011 Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* 5, 6697–6703

González. 2015. TESIS: Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie *Piper aduncum* (Piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas. Universidad Tecnológica de Pereira.

Goossens A, Häkkinen S, Laakso I, Seppänen Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8595-8600.

Guzman, J. D. 2014. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules* 19, 19292-19349.

Gunatilaka, A. A. L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.*, v.69, p.509-526.

Gross, G.G. 2008. From lignins to tannins: Forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* 69, 3018–3031

Hill, A. F. 1952. *Economic Botany. A textbook of useful plant and plant Products* (2nd edn.). MC-Graw-Hill Book Company Inc., New York, U.S.A. 743p.

Huajun, L., Zhang, Y., Shao, J., Liu, H., Wang, Y. 2021. Ferulic Acid production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresources and Bioprocessing*. 8, (70).

Qian, B.J.; Liu, J.H.; Zhao, S.J.; Cai, J.X.; Jing, P. 2017. The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food Chem.* 2017, 228, 526–532.

Jørgensen, K.; Rasmussen, A. V.; Morant, M.; Nielsen, A.H.; Bjarnholt, N.; Zagrobelny, M.; Bak, S.; Møller, B. L. 2005 Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 280–291.

Kefeli, V.I.; Kalevitch, M.; Borsari, B. 2003 Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol.* 2, 13–18.

Khurana, S.; Venkataraman, K.; Hollingsworth, A.; Piche, M.; Tai, T. 2013 Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES* 5(10), 3779–3827.

Kim, J.; Shim, S.; 2019. The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* as a source for bioactive secondary metabolites. *The Pharmaceutical Society of Korea. Arch. Pharm. Res.* Springer.

Kumar-Gautam, A. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides: Biology, Pathogenicity and Management in India* Review Article, *J Plant Physiol Pathol* Vol: 2 Issue: 2

Kumar, Y.; Yadav, D.N.; Ahmad, T.; Narsaiah, K. Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015, 14, 796–812. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019, 18, 1533–1549.

Lindeboom, N.; Chang, P. R. and Tyler, R. T. 2004. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch/Starke*. 56:89-99.

Liu Y., Lee M.L. 2006 Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography*. 1104 (1-2): 198-202.

Liu, H.; Tan, H.; Chen, Y.; Li, S.; Li, H.; Zhang, W. 2017 Secondary metabolites from the *Colletotrichum gloeosporioides* A12, an endophytic fungus derived from *Aquilaria sinensis*. *Natural products research*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

Luo, C.L., Zhou, Q., Yang, Z.W., Wang, R.D., Zhang, J.L. 2018. Evaluation of structure and bioprotective activity of key high molecular weight acylated anthocyanin compounds isolated from the purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No.8). *Food Chem*. 2018, 241, 23–31.

Matsufuji, H.; Kido, H.; Misawa, H.; Yaguchi, J.; Otsuki, T.; Chino, M.; Takeda, M.; Yamagata, K. 2007. Stability to Light, Heat, and Hydrogen Peroxide at Different pH Values and DPPH Radical Scavenging Activity of Acylated Anthocyanins from Red Radish Extract. *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55, 3692–3701.

Méndez, G.; Solorza, J.; Paredes, O. 2005. Composición química y colorimétrica de híbridos y variedades de maíz. *Revista Agrociencia*. 39: 267-274

Mesfin, T.; Wassie, H.; Kassa, S. 2019. Effects of Nitrogen and Blended Fertilizers on Yield and Yield Components of tef (*Eragrostis tef* Trotter) in Central Highlands of Ethiopia. *International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology* Vol 6 Issue 8, pg. 15-64.

Mishra, S. and Raid, T. 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids*. 20:557-566.

Nevárez, L. O. 2020. Caracterización química y de parámetros toxicológicos agudos de los extractos del Ocotillo (*Fouquieria splendens*) en tres temporadas del año. Universidad Autónoma de Chihuahua. Tesis de licenciatura para Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Oberlerchner, J. T., Fuchs, C., Grausgruber, H., Potthast, A., Böhmendorfer, S. 2018. Côté calibration—making optimal use of time and space in quantitative high performance thin layer chromatography. *J Chromatogr A*. 1533:193–8.

Oh, M. M.; Trick, H. N.; Rajashekar, C. 2009 Secondary Metabolism and Antioxidants are Involved in Environmental Adaptation and Stress Tolerance in Lettuce. *J. Plant Physiol.*, 166(2), 180–191.

Ozcan, T.; Akpınar-Bayızit, A.; Yılmaz-Ersan, L.; Delikanlı, B. 2014 Phenolics in human health. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 5, 393–396

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Singh–Nee, N.; Poonam. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77 (1): 149-162.

Pérez-Alonso N, Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4):195-211.

Pragasam SJ, Venkatesan V and Rasool M. 2013. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation* 36:169–176.

Rasouli, H., Farzaei, M. H., Mansouri, K., Mohammadzadeh, S., Khodarahmi, R. 2016 Plant Cell Cancer: May Natural Phenolic Compounds Prevent Onset and Development of Plant Cell Malignancy? A Literature Review. *Molecules*. 21, 1104

Robert, M.; Reyes, J.; Loyola, V. 1985. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro. Departamento de Genética y Fisiología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. Cap 9 pp 211-225.

Sangwan, S.; Kumar, S.; Goyal, S. 2014 Maize utilisation in food bioprocessing: An overview. In *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*; Chaudhary, D.P., Kumar, S., Langyan, S., Eds.; Springer: New Delhi, India, pp. 119–134.

Sagastume, D. 2018. Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases en tres especies del género piper y evaluación de la actividad citotóxica. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Salinas-Moreno, Y.; García-Salinas, C.; Ramírez-Díaz, J. L.; Alemán-de la Torre, I. 2017 Phenolic Compounds in Maize Grains and Its Nixtamalized Products. INTECH. Phenolic compounds- Natural sources, Importance and applications. Chapter 8

Salinas-Moreno, Y.; García-Salinas, C.; Coutiño-Estrada, B.; Vidal-Martínez, V. 2013. CONTENT AND TYPE VARIABILITY OF ANTHOCYANINS IN BLUE/PURPLE COLORED GRAINS OF MEXICAN MAIZE POPULATIONS. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 Supl. 3-A: 285 – 294.

Salinas-Moreno, Y.; Pérez-Alonso, J.; Vázquez-Carrillo, G.; Aragón-Cuevas, F.; Velázquez-Cardelas, G. A. 2012. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. Agrociencia 47:815-825.

Scalbert, A.; Willianson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal of Nutrition. 1300: 2073-2085.

Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, BS. 2010. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. J Plant Sci 5:222-247.

Steinkraus, K.H. 1996. Handbook of Indigenous Fermented Food, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA

Styles, E.; Ceska, O. 1972. Flavonoid pigments in generic strains of maize. Journal of Phytochemistry. 11: 3019- 3021.

Subramaniam, R., Vimala, R. 2012. Solid State and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. International Journal of Science and Nature. I.J.S.N., VOL. 3. 480-486.

Tachibana, N., Kimura, Y., Ohno, T. 2014. Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. *Food Chem.* 2014, 143, 452–458.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2005. *Plant physiology*. Third Edition. Sinauer Association Inc., California, U .S. A. 690p.

Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Bastos, M.L. 2002 Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4989–4993.

Valenzuela, A.; Valenzuela, R.; Sanhueza, J.; Morales, G. 2014. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿Vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista chilena de nutrición*, 41(2):198-204.

Villarreal-Rodríguez, G., Escajeda-García, J.M., Amaya-Olivas, N. I., Chávez-Flores, D., Neder-Suárez, D., Ayala-Soto, J. G., Quintero-Ramos, A., Ruiz-Anchondo, T., Hernández-Ochoa, L. 2022. Determination of Phenolic Compounds in Blue Corn Flour (*Zea mays* L.) Produced and/or Metabolized by *Colletotrichum gloeosporioides* in a Fermentation Process. *Fermentation* 2022, 8, 243. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060243>

Wacher, C.; Canas, A.; Cook, P.E.; Barzana, E.; Owens, J.D. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 269–274.

Wang, Y. 2009 Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research Journal*, 42: 8-12.

Wink, M. 1998. Plant Breeding: Importance of plant secondary metabolite for protection against pathogen and herbivores *Theoretical and Applied Genetics* 75: pp225-233.

Xiao, Z., Lu, J. 2014. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances* 32, 492-503.

Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R.D., Fang, Z. 2019. 3-Deoxyanthocyanidin Colorant: Nature, Health, Synthesis, and Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 1533–1549.

Xu, S., Li, G., Zhou, J., Chen, G., Shao, J. 2022. Efficient production of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae* by introducing anthocyanin transporter and knocking out endogenous degrading enzymes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:899182.

doi: 10.3389/fbioe.2022.899182 **Yang, W., Kortnesniemi, M., Ma, X., Zheng, J., Yang, B.** 2019. Enzymatic acylation of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins and evaluation of lipophilic properties and antioxidant capacity of derivatives. *Food Chem.* 2019, 281, 189–196

Yue, W.; Ming, Q.-L.; Lin, B.; Rahman, K.; Zheng, C.-J.; Han, T.; Qin, L.-P. 2016 Medicinal Plant Cell Suspension Cultures: Pharmaceutical Applications and High-Yielding Strategies for the Desired Secondary Metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(2), 215–232.

Žilić. A.; Serpen, A.; Akıllıoğlu, G.; Gökmen, V.; Vančetović, J. 2012. Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels *J. Agric. Food Chem.* 60 (5), pp. 1224–1231