

Isolation of ferulic acid from nejayote using Centrifugal Partition Chromatography (CPC)

Aislamiento de ácido ferúlico a partir de nejayote usando Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC)

Carrizales Rabadán F., Eng.¹, Antunes-Ricardo M., Ph.D.¹, and Romero Robles L.E., Ph.D.¹

¹ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, Mexico
a01420926@itesm.mx, marilena.antunes@tec.mx, romero@tec.mx

Resumen— La producción de tortillas y productos derivados del maíz requiere de un proceso de cocción conocido como nixtamalización. Este proceso genera un residuo conocido como nejayote el cual es un efluente altamente alcalino y contaminante, ya que genera demandas bioquímicas de oxígeno. En México, la industria de la tortilla genera millones de metros cúbicos de nejayote anualmente. Actualmente, el nejayote es descartado en el tratamiento de aguas residuales. Investigaciones previas han demostrado que los sólidos del nejayote contienen fibra cruda (45.3%), calcio (5.7%) y ácidos hidroxycinnámicos siendo el más abundante el ácido ferúlico en forma libre y conjugado (219mg/100g). Estos compuestos fenólicos han demostrado gran potencial antioxidante, antiinflamatorio y quimiopreventivo. Esto demuestra un gran potencial para el desarrollo de ingredientes activos a partir del desecho industrial nejayote. Sin embargo, se requieren grandes cantidades de estos compuestos para desarrollar pruebas *in vivo*, y así validar el efecto citotóxico de estos compuestos, pero los procesos de extracción y purificación convencionales como son hidrólisis alcalina y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) son muy e involucran tiempos prolongados de dos hasta cuatro horas. Por esto se propone una alternativa del uso de tecnologías de purificación escalables a nivel industrial como es la cromatografía de partición centrífuga (CPC) ya que, está técnica permite procesar grandes cantidades de material y, en función de su coeficiente de distribución en un sistema de solventes simple y económico, permite separar los compuestos de interés obteniendo elevados rendimientos en periodos más cortos.

Palabras claves-- ácido ferúlico, cromatografía de partición centrífuga, nejayote, maíz.

Abstract— The production of tortillas and products derived from corn requires a cooking process known as nixtamalization. This process generates a waste known as nejayote which is a highly alkaline and polluting effluent, since it generates high biochemical oxygen demands. In Mexico, the tortilla industry generates millions of cubic meters of nejayote annually. Currently, nejayote is discarded as wastewater. Previous research has shown that nejayote solids contain crude fiber (45.3%), calcium (5.7%) and hydroxycinnamic acids, the most abundant being ferulic acid in free and conjugated form (219mg / 100g). These phenolic compounds have shown great antioxidant, anti-inflammatory and

chemopreventive potential. This shows great potential for the development of active ingredients from nejayote industrial waste. However, large amounts of these compounds are required to develop *in vivo* tests, and thus validate the cytotoxic effect of these compounds, but conventional extraction and purification processes such as alkaline hydrolysis and high performance liquid chromatography (HPLC) are very long and involve long times of two to four hours. For this reason, an alternative is proposed for the use of industrially scalable purification technologies such as centrifugal partition chromatography (CPC) since this technique allows to process large quantities of material and depending on its distribution coefficient in a system of Simple and inexpensive solvents, it allows to separate the compounds of interest obtaining high yields in shorter periods

Keywords—Corn, nejayote, ferulic acid, centrifugal partition chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz es una de las principales fuentes de alimentación en México generando un consumo de aproximadamente 23,500 millones de toneladas de este alimento al año [1, 2], con una proyección de incrementarse a 42,810 millones de toneladas para el 2030. La producción de tortillas y productos derivados del maíz requieren de un proceso de cocción en presencia de hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) como nixtamalización. Este proceso genera un residuo líquido conocido como nejayote, el cual presenta valores de pH superiores a 12 y se considera un efluente contaminante, ya que genera altas demandas bioquímicas de oxígeno [3].

En México, la industria de la tortilla genera millones de metros cúbicos de nejayote anualmente. Actualmente, el nejayote es descartado en el tratamiento de aguas residuales. Investigaciones previas han demostrado que entre los sólidos presentes en el nejayote se encuentran fibra cruda (45.3%), calcio (5.7%) y ácidos hidroxycinnámicos siendo el más abundante el ácido ferúlico (**Fig. 1**) en su forma libre y conjugado (219 mg/100g) [3]. Este compuesto fenólico ha demostrado gran potencial antioxidante, antiinflamatorio y quimiopreventivo. Esto constituye un gran potencial para el desarrollo de ingredientes activos a partir de este desecho agroindustrial, nejayote.

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2021.1.1.141>

ISBN: 978-958-52071-8-9 ISSN: 2414-6390

Uno de los retos en el desarrollo de nuevos ingredientes con potencial biológico, es la disponibilidad de grandes cantidades de estos compuestos para en primer lugar, desarrollar pruebas preclínicas y clínicas, y así validar la seguridad y efectividad de estos compuestos. En segundo lugar, contar con un sistema de producción escalable que pueda cubrir las demandas.

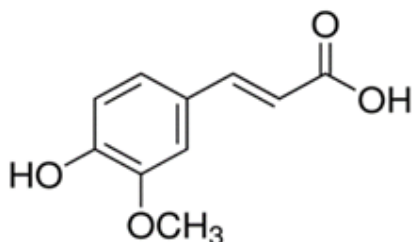


Fig. 1. Estructura química del ácido ferúlico

Los procesos convencionales para la extracción y purificación de ácido ferúlico como la hidrólisis alcalina y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) son muy costosos y consumen largos tiempos, haciéndolos poco rentables a nivel industrial. **El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la cromatografía de partición centrífuga (CPC) como una técnica de aislamiento para obtener compuestos antioxidantes como el ácido ferúlico a partir del nejayote generado como desecho durante el proceso de nixtamalización.** Esta técnica permite procesar grandes cantidades de material y, en función de su coeficiente de distribución en un sistema de solventes simple y económico, permite separar los compuestos de interés obteniendo elevados rendimientos en periodos más cortos. Otra ventaja de la CPC es que una técnica de separación que puede ser escalada a nivel industrial [4].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de nixtamal y obtención de nejayote

Todos los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio del Centro de Biotecnología FEMSA del Tecnológico de Monterrey, campus Monterrey, Mexico. Para obtener nejayote fresco se nixtamalizó maíz blanco (*Zea mays* L.). Se preparó nixtamal usando 1 kg de maíz, 3 litros de agua y adicionando 10 g de NaOH (Fisher Scientific, 99.5 %). El maíz se coció a 95 °C durante 35 minutos y dejando reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Después se procedió a recuperar el nejayote por decantación. El nejayote recuperado se almacenó en contenedores a -20 °C hasta su uso.

2.2 Filtración de sólidos solubles

La solución de nejayote se filtró al vacío usando una fibra de nylon (poros de 280 μm). Posteriormente la solución filtrada (sólidos < 280 μm) se congeló a -80 °C y liofilizó (FreeZone -84C, Labconco, MO) por 72 horas.

2.3 Selección de sistema de solventes para el fraccionamiento en CPC

Uno de los elementos fundamentales que afectan la eficiencia del fraccionamiento mediante cromatografía de partición centrífuga (CPC) es el sistema bifásico de solventes utilizado. En este proyecto se evaluaron cuatro sistemas de solventes bifásicos:

1. Sistema 1: *n*-hexano-acetato de etilo-metanol-agua (3:7:5:5, v/v/v/v)
2. Sistema 2: acetato de etilo-butanol-agua (1:1:10, v/v/v)
3. Sistema 3: acetato de etilo-agua (1:1, v/v)
4. Sistema 4: acetato de etilo-agua, ácido fórmico 1% (1:1, v/v).

2.4 Cálculo de los coeficientes de partición

Para determinar el coeficiente de partición (K_d) del ácido ferúlico en cada sistema de solventes se siguió el siguiente procedimiento: Para cada sistema de solventes, se tomó 1 mg de nejayote liofilizado y se transfirió a un tubo de 1.8 mL. A este tubo se le adicionaron 0.8 mL de la fase superior e inferior del sistema de solventes bifásico. Posteriormente, se mezcló vigorosamente durante 20 s en un vortex (S0200 VX-200, Gentech Bio, COL) y se centrifugaron a 25 °C (3000 xg por 5 min) para facilitar la separación. Luego, cada fase se evaporó hasta sequedad bajo condiciones de vacío (Genevac ROCKET™ Evaporation System, Ipswich UK Gardiner, NY). El residuo obtenido fue resuspendido en metanol al 50% (v/v) y analizado por HPLC-DAD. El valor de K_d se expresó como se muestra en la ecuación a continuación:

$$K_d = \frac{ABC_{FS}}{ABC_{FI}} \quad (1)$$

donde K_d es coeficiente de partición, ABC_{FS} es el área bajo la curva de la fase superior y ABC_{FI} el área bajo la curva de la fase inferior del sistema a evaluar.

2.5 Cuantificación de ácido ferúlico mediante HPLC

La cuantificación de ácido ferúlico se realizó usando un equipo de cromatografía líquida equipado con un detector de arreglos de diodos (HPLC-DAD (Agilent 1200 Series, Santa Clara, CA, U.S.A) y los cromatogramas se obtuvieron a 320 nm. La separación se llevó a cabo usando una columna Luna c18(2) 100 Å, Phenomenex (4.6 x 250 mm) operando a una temperatura de 40 °C a un flujo de 0.6 mL/min. La fase móvil utilizada fue A: agua acidificada con 0.1% de ácido fórmico

(Tedia, Fairfield, USA) y B: acetonitrilo (Tedia, Fairfield, USA). La separación se realizó durante 35 minutos incrementado el flujo como se indica (2 min-0%B); (5 min-40%B); (25 min-80%B); (30 min-100%B).

2.6 Preparación de sistema de solventes bifásico y muestra

Las fases superior e inferior del sistema de solventes seleccionado fueron equilibradas individualmente a temperatura ambiente y luego mezcladas vigorosamente. La muestra se preparó por disolución de 1.0015 g de nejayote liofilizado en 50 mL de fase inferior del sistema de solventes y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.2 µm.

2.7 Fraccionamiento de nejayote por CPC

El fraccionamiento de la muestra nejayote se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de partición centrifuga (CPC) marca Kromaton (Angers, France). El equipo se operó en modo dual comenzando por el modo ascendente como se describe a continuación: la fase inferior del sistema de solventes fue bombeada dentro de la columna a un flujo de 5 mL/minuto, la velocidad del equipo se ajustó a 500 rpm. Una vez establecido el equilibrio hidrostático (volumen de equilibrio 200 mL), se inyectó la muestra a la misma velocidad y flujo.

El proceso empezó eluyendo con la fase superior en modo ascendente a flujo de 5 mL/min por 70 minutos. Posteriormente, la fase inferior se usó como fase móvil en modo descendente durante 80 minutos al mismo flujo establecido. Las fracciones se colectaron cada minuto, obteniendo un total de 150 fracciones y se agruparon en *pools* de 10 fracciones cada uno para facilitar el análisis. Los *pools* obtenidos por CPC se evaporaron hasta sequedad en condiciones de vacío y posteriormente fueron analizados mediante HPLC-DAD usando las condiciones descritas anteriormente.

III. RESULTADOS

3.1 Cuantificación de ácido ferúlico en nejayote

El nejayote obtenido fue un líquido de color amarillo, apariencia turbia con presencia de sólidos suspendidos y con pH 12. El contenido de ácido ferúlico presente en el nejayote obtenido a partir de maíz blanco presentó una concentración de 17.31 mg ácido ferúlico/g de nejayote.

3.2 Coeficientes de partición de ácido ferúlico en los sistemas de solventes bifásicos

Se determinaron los coeficientes de partición (Kd) del ácido ferúlico en cada uno de los sistemas de solventes usando

la ecuación 1 previamente descrita (sección 2.4). En la Tabla I se observan los Kd obtenidos.

TABLA I.
COEFICIENTES DE PARTICIÓN (Kd) OBTENIDOS PARA ÁCIDO FERÚLICO EN CADA SISTEMA DE SOLVENTES

Sistema	Kd
n-hexano-acetato de etilo-metanol-agua (3:7:5:5)	0.28 ± 0.08
Acetato de etilo-butanol-agua (1:1:10)	0.98 ± 0.12
Acetato de etilo-agua (1:1)	0.21 ± 0.04
Acetato de etilo-agua ácido fórmico 1% (1:1)	2.97 ± 1.28

Analizando los promedios obtenidos se optó por usar el sistema 2, ya que presentó un valor de 0.98 el cuál es idóneo para la elución equitativa del analito en las dos fases del sistema de solventes, esto permitirá la distribución mayoritaria del ácido ferúlico entre las dos fases y evitará pérdidas del analito durante el proceso de fraccionamiento [4] [5].

3.3 Caracterización por HPLC-DAD de ácido ferúlico en *pools* obtenidos

Se realizó el análisis de un estándar de ácido ferúlico para usar como referencia en el análisis de los perfiles del fraccionamiento. Se puede observar en el cromatograma del estándar de ácido ferúlico (Fig. 2A) la presencia del pico atribuido a este en un tiempo de retención de 4 minutos. Igualmente se analizó la muestra de nejayote (previo a su fraccionamiento) para observar su perfil fitoquímico. Como se muestra en la Fig. 2B, la presencia del ácido ferúlico se observa en el mismo tiempo de retención al analizado en el estándar del compuesto.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de fraccionamiento se llevó a cabo en dos modos, ascendente y descendente. En la Fig. 3 se pueden apreciar los cromatogramas de los *pools* obtenidos en modo ascendente (Fig. 2C) (*pools* 1-7) y modo descendente (Fig. 2D) (*pools* 8-15).

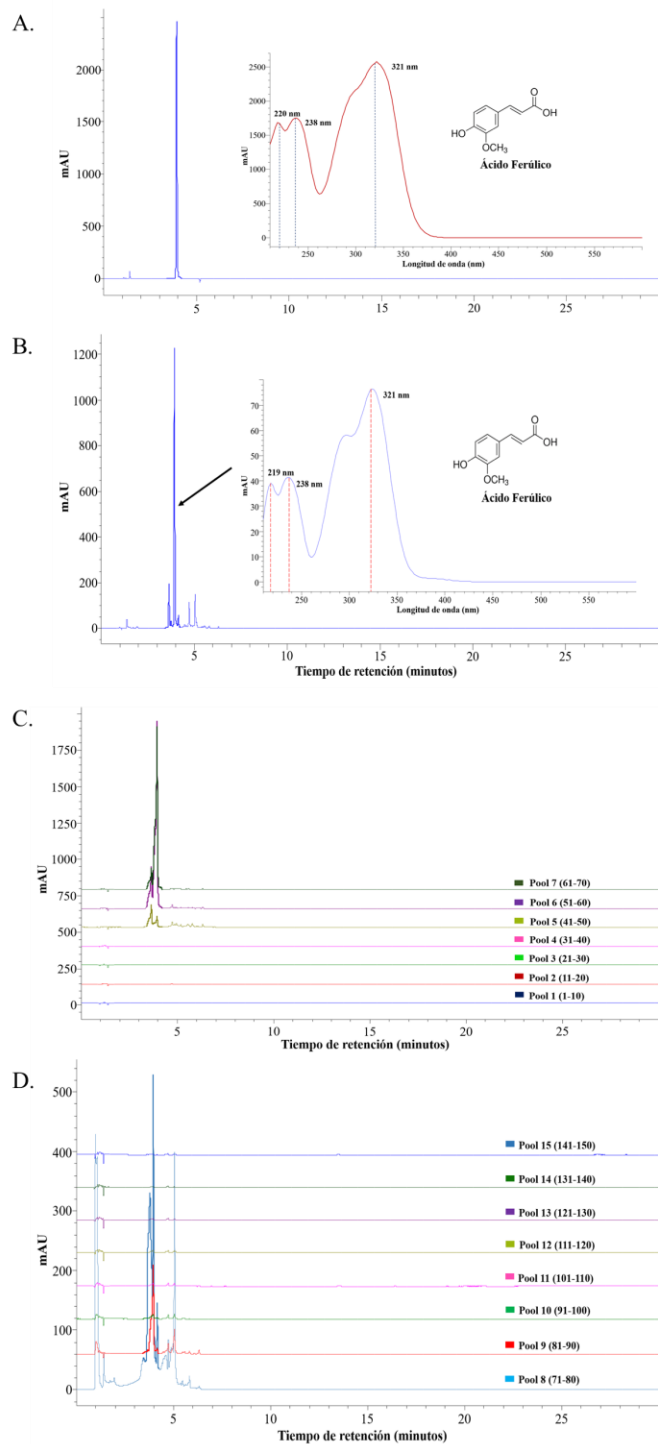


Fig. 1. Cromatogramas obtenidos para el estándar de ácido ferúlico (A), nejayote (B), compuestos eluidos por CPC en modo ascendente (C) y descendente (D) analizados mediante HPLC-DAD a 320 nm

3.4 Cuantificación de ácido ferúlico y Kd de pools obtenidos por CPC

En la Fig. 3A se muestran los cromatogramas obtenidos para los pools 5-9. Se puede apreciar como la presencia de ácido ferúlico empieza con una concentración de 117 mg/g y llega a un máximo de 3570 mg/g en el pool 7, posteriormente comienza a descender llegando a un mínimo de 2.3 mg/g.

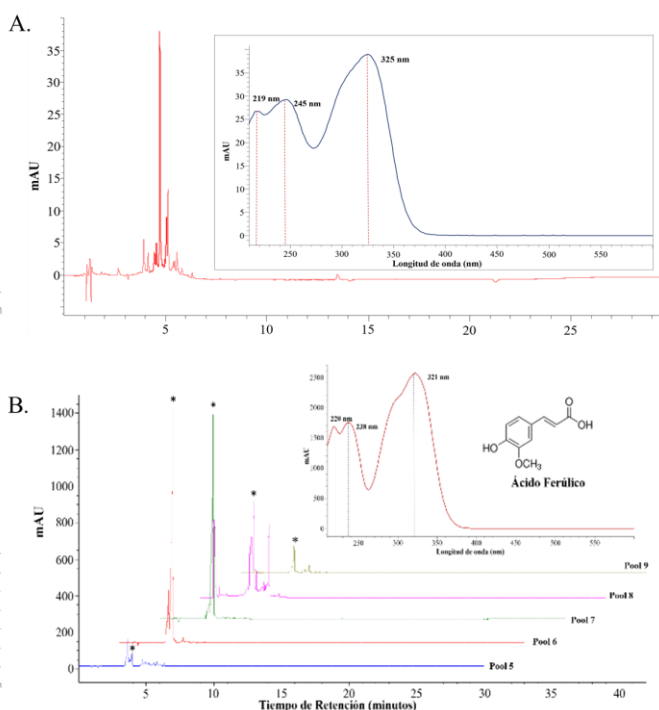


Fig. 3. Cromatogramas de pools 5-9 (A) y etapa de extrusión (B) obtenidos por CPC, analizados mediante HPLC-DAD a 320 nm

Al final del fraccionamiento se realizó una etapa de extrusión para analizar los compuestos que se quedaron retenidos en la columna. Como se puede observar en la Fig. 3B, no hay presencia de ácido ferúlico en la fase inferior extruida, sin embargo, se aprecia la presencia de otro pico a un tiempo de retención de 4.72 minutos, presentando longitudes de onda de 219, 245 y 325 nm. Estos datos pueden indicar la presencia de un derivado de ácido ferúlico, pero a una concentración baja.

En la Tabla II se pueden observar las concentraciones obtenidas de ácido ferúlico en los pools 5-9 y el número de veces que se logró concentrar el compuesto en cada pool. Igualmente, en la Fig. 4 se expone la relación de concentración de ácido ferúlico en cada pool con respecto al Kd obtenido en cada uno respectivamente.

3.5 Recuperación de muestra

Se realizó el cálculo de las cantidades de ácido ferúlico obtenidas después del fraccionamiento por CPC, esto incluye lo recuperado en el extruido. El total obtenido de estas fue de 11.15 mg/g de ácido ferúlico, esto representa un valor de recuperación final de 80.56 % del compuesto.

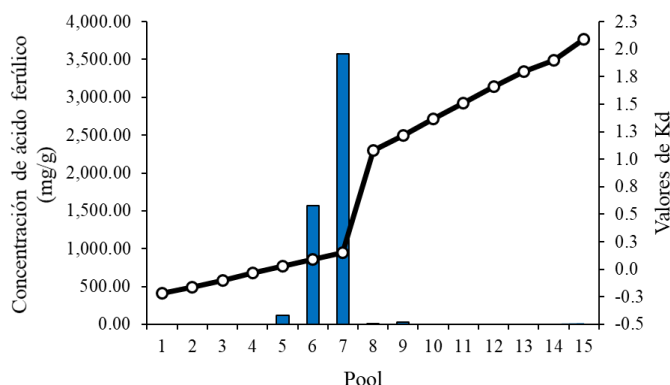


Fig. 4. Relación concentración vs Kd de ácido ferúlico obtenido en pools a partir del fraccionamiento de nejayote.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Selección de sistema de solvente

Una vez analizados los coeficientes de partición obtenidos para cada sistema de solventes bifásico, se seleccionó el sistema 2 compuesto por acetato de etilo-butanol-agua (1:1:10, v/v/v), ya que presentó un valor de Kd de 0.98, el cual es el más idóneo para el fraccionamiento de ácido ferúlico dada su cercanía al valor de 1. Como reporta Ito, Y. (2005), el valor de Kd igual a 1 es donde el analito puede distribuirse de forma equitativa tanto en la fase superior como en la fase inferior. Valores < 1 y > 1 distribuirán el analito a la parte más hidrofílica o menos hidrofílica respectivamente del sistema de solventes empleado [6].

4.2 Cuantificación de ácido ferúlico en nejayote y valores relacionados

Como se mencionó anteriormente, la concentración de ácido ferúlico en el nejayote previo al fraccionamiento por CPC fue de 17.31 mg/g. Este valor coincide con concentraciones previamente reportadas, por ejemplo, Rojas-García, *et al* (2012), reportan 11.69 mg/g de ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz blanco, igualmente Gutiérrez-Uribe, *et al* (2010), reportan concentraciones de 13.49 mg/g de ácido ferúlico en nejayote de maíz blanco [7][8].

4.3 Caracterización de ácido ferúlico en pools obtenidos por CPC

TABLA II.
ÁCIDO FERÚLICO CONCENTRADO POR FRACCIÓN OBTENIDA POR CPC

Fracción	[Ácido Ferúlico] (mg/g)	# veces concentrado
Nejayote	17.31	-
5	117.0	6.8
6	1563.9	90.4
7	3570.0	206.3
8	2.3	0.1
9	34.3	2.0

El proceso de fraccionamiento por CPC se llevó a cabo en modo dual. Durante el modo ascendente la presencia de ácido ferúlico en los pools 1-4 fue nula (Fig. 2C), esto se debe a la influencia de otros compuestos en el nejayote como son outrescinas, antocianinas y otros compuestos fenólicos libres y ligados que pueden limitar la absorción del ácido ferúlico en la fase orgánica [3][8]. Posterior al pool 4, la concentración de ácido ferúlico empieza a aumentar llegando a un punto máximo de concentración en el pool 7 (Fig. 2C), la alta concentración de ácido ferúlico en este pool se atribuye a la fase superior, la cual fungió como fase móvil en el modo ascendente. La presencia del acetato de etilo favoreció la elución del compuesto, ya que, por su selectividad, este desprotona el grupo hidroxilo en el ácido ferúlico [9][10]. Esto promueve la migración del ácido ferúlico hacia la fase, acumulando su concentración en los pools 6 y 7.

Posteriormente, la concentración disminuye en los pools 8 y 9 (Fig. 2D), esto se atribuye al cambio de elución, donde la fase inferior es la móvil. La presencia del acetato de etilo es menor, haciendo de la elución del ácido ferúlico a una concentración menor. Finalmente, en el pool 10 y los restantes (Fig. 2D) no hubo presencia del compuesto.

4.4 Concentraciones de ácido ferúlico y su relación con los Kd en cada pool

El comportamiento de concentración contra el Kd en cada pool se puede explicar tomando lo reportado en la literatura por Ito, (2005); los valores de Kd obtenidos en los pools 5-7 (Fig. 4) son < 1, sin embargo difieren del valor inicial obtenido para el sistema, 0.98, este cambio se puede atribuir a una interacción directa de cada fase con el ácido ferúlico, ya que, la afinidad del sistema se favorece hacia la fase superior [10], la cual contiene acetato de etilo, y este compuesto ha sido reportado como idóneo para la separación de compuestos fenólicos como son el ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico, etc. [6]. Por otro lado, para los pools 8

y 9 (Fig. 4), los valores de K_d fueron > 1 , esto se debe al modo de elución, ya que la fase móvil era la acuosa y no hay presencia de acetato de etilo en esta, lo cual presentó una elución del compuesto casi nula.

4.5 Recuperación de ácido ferúlico y comentarios sobre el proceso de CPC

La suma de concentraciones obtenidas en los pools y en el extruido fue de 11.15 mg/g de ácido ferúlico, esto muestra un porcentaje de recuperación del 80.56 % del total de 13.84 mg/g inyectados en el CPC. Este valor de recuperación coincide con reportes en la literatura, por ejemplo, Aarabi *et al* [11], reportan porcentajes de recuperación para compuestos fenólicos de 65% obtenidos por CPC a partir de remolacha de azúcar (*Beta vulgaris* L.), así mismo, Liu, *et al* [12], reportan 95 % de recuperación de compuestos fenólicos obtenidos por CPC a partir de matrices vegetales.

El procedimiento para fraccionar por CPC se presta para la implementación de mejoras, ya sea a la hora de ejecutar manualmente el proceso o de optimizar parámetros como flujo, velocidad de separación (rpm), etc., los cuales afectan al fraccionamiento de compuestos por CPC. Es importante el monitoreo constante del proceso completo, desde la inyección de la muestra hasta la recolección de las fracciones, así se puede garantizar una recolección mayoritaria de la muestra inyectada. Igualmente, revisar el equipo en su totalidad para evitar fugas o derrames que puedan afectar la obtención de las fracciones finales. En algunos casos puede quedar remanente de la muestra inyectada en la columna, por esta razón se realiza un proceso de extrusión después del fraccionamiento.

Durante la extrusión en este fraccionamiento en particular, no se detectó la presencia de ácido ferúlico en la fase inferior, por otro lado, en la fase superior se cuantificó una concentración mínima de 1.41 mg/g. Esto indica que el restante 19.44 % se perdió en la inyección de la muestra y la recolección de las fracciones, sin embargo, la presencia mínima del ácido ferúlico en el extruido indica un aislamiento satisfactorio del compuesto usando los parámetros antes descritos.

V. CONCLUSIONES

El ácido ferúlico se logró concentrar en los pools 5 a 9, obteniendo la concentración máxima en el pool 7 con 3570 mg/g y la mínima en el pool 8 con 2.3 mg/g. Se logró concentrar hasta 206 veces más el ácido ferúlico en el pool 7 usando CPC con un sistema de solventes constituido con acetato de etilo-butanol-agua (1:1:10, v/v/v), presentando un coeficiente de partición de 0.98 ± 0.12 y empleando la cromatografía de partición centrífuga en modo dual usando los parámetros de flujo: 5 mL/min y velocidad de 500 rpm para el fraccionamiento del nejayote. El porcentaje de recuperación de 80.56 % indica una separación exitosa del ácido ferúlico, sin

embargo, se puede indagar a futuro en modificaciones tanto al sistema de solventes como a las condiciones que se usaron para el fraccionamiento.

El nejayote contiene concentraciones altas de ácido ferúlico, el cual es un compuesto con alto valor biológico por sus propiedades antioxidantes y quimiopreventivas, por esto es importante que con el uso de tecnologías como la cromatografía de partición centrífuga (CPC) se investigue su extracción y/o aislamiento, así mismo es crucial la selección del sistema de solventes para el procedimiento, ya que este influye en la elución completa del compuesto. Con el uso de nejayote como materia prima para obtener ácido ferúlico, se busca darle un aprovechamiento y evitar que este se vuelva un desecho más en los cuerpos efluentes que produce el campo agroindustrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Tecnológico de Monterrey y al grupo de enfoque en investigación estratégica NutriOmics y Tecnologías Emergentes por su apoyo en esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] SAGARPA. (2017). Agrícola Nacional. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, I (1), 1–14.
- [2] Díaz-Montes, E., Castro-Muñoz, R., & Yáñez-Fernández, J. (2016). An overview of nejayote, a nixtamalization by product. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 8(2), 41–60. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2016.03.002>
- [3] Acosta-Estrada, B. A., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2015). Chemopreventive effects of feruloyl putrescines from wastewater (Nejayote) of lime-cooked white maize (*Zea mays*). *Journal of Cereal Science*, 64(N/D), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.012>
- [4] Berthod, A., & Armstrong, D. W. (1988). Centrifugal partition chromatography. I. General features. *Journal of Liquid Chromatography*, 11(3), 547–566. <https://doi.org/10.1080/01483918808068331>
- [5] Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>
- [6] Huang, X.-Y., Ignatova, S., Hewitson, P., & Di, D.-L. (2016). An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 214–225. doi: 10.1016/j.trac.2015.08.006
- [7] Rojas-García, C., García-Lara, S., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2012). Chemopreventive effects of free and bound phenolics associated to steep waters (Nejayote) obtained after nixtamalization of different maize types. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 94–99. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0272-y>
- [8] Gutiérrez-Urbe, J. A., Rojas-García, C., García-Lara, S., & Serna-Saldívar, S. O. (2010). Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey tortillas. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.003>
- [9] Pacheco, I. M. (2015). Obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz. (Tesis de maestría). Repositorio Nacional Mexicano. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/91/1/IgnacioPachecoMoisés.pdf>
- [10] Yu, L. (2008). *Wheat antioxidants*. Hoboken, NJ: Wiley. doi: 10.1529/biophysj.106.090175

- [11] Aarabi, A., Honarvar, M., Mizani, M., Faghihian, H., & Gerami, A. (2016). Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Italian Journal of Food Science*, 28(3), 362–375. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v143>
- [12] Liu, Y., Lopez-Avila, V., Alcaraz, M., & Jones, T. L. (1994). Centrifugal Partition Chromatographic Extraction of Phenols and Organochlorine Pesticides from Water Samples. *Analytical Chemistry*, 66(24), 4483–4489. doi: 10.1021/ac00096a014