



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BIOTRANSFORMACION DE ACIDOS  
HIDROXICINAMICOS MEDIANTE *Bacillus sp*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

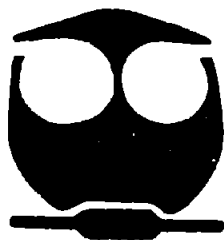
R I C A R D O L O P E Z M E J I A



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005



m. 339808



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ricardo López Mejía

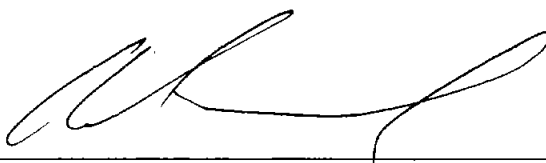
FECHA: 10 enero 2005

FIRMA: López Mejía Ricardo

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Eduardo Barzana García
Vocal	Prof. Francisca Iturbe Chinas
Secretario	Prof. Arturo Navarro Ocaña
1er. Suplente	Prof. Maria de los Ángeles Valdivia López
2do. Suplente	Prof. Blas flores Pérez

Este trabajo se desarrollo en el laboratorio 321 del conjunto "E" de la Facultad de Química.



---

ASESOR: Dr. Arturo Navarro Ocaña



---

SUPERVISOR TECNICO: Dr. Francisco Ruiz Terán

López Mejía Ricardo

---

SUSTENTANTE: Ricardo López Mejía

**A MIS PADRES: PEDRO y ROSA**

Porque por ustedes he llegado hasta donde me encuentro hoy  
Porque sin ustedes no sería nada  
Porque son TODO para mí... Jefes muchas gracias.

**A MIS HERMANOS: ERICK, VÍCTOR, PEDRO, JORDAN, GABY**

Les agradezco de todo corazón por haber confiado en mí,  
por darme su apoyo incondicional, porque gracias a ustedes  
estoy aquí... Gracias.

**A MI FAMILIA**

Abuelos, tíos, primos... Sobrinos, cuñadas y cuñado...  
No escribí los nombres de todos porque no serían suficientes  
unas 100 hojas para enumerar a todos y cada uno de ustedes.

**A MIS AMIGOS**

Hola inges: Bety, Raquel, Van, Manuel...

A la persona con la que hemos compartido mucho y que su  
mistad me hace pensar cada vez más que siempre existen  
personas en quién realmente puedes confiar: REBE te quiero  
mucho chaparrita.

A todos los habitantes del laboratorio 321 que de alguna  
u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

A mi amiga AVI que ya merito termina de escribir su  
tesis ¿verdad?...

A todas las personas que alguna vez fueron compañeros,  
amigos, conocidos y que hoy por una u otra razón no están  
conmigo... Muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

---

**Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por la paciencia mostrada durante las revisiones de este escrito y en el que se desarrolla actualmente... Dr. Gracias...**

**Al Dr. Pancho por la colaboración y sugerencias realizadas para la mejora de este trabajo.**

**A la Mtra. Fanny por los comentarios y sugerencias realizadas, con la finalidad de mejorar la presentación de este escrito... Muchas gracias.**

**Al Dr. Eduardo por las sugerencias realizadas para mejorar este trabajo.**

**A la Mtra. Sandra Bolaños, del laboratorio 324, por realizar la identificación del microorganismo mediante la técnica del PCR.**

**A DGAPA por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto (PAPIIT) IN207603**

**A LA UNAM por la formación que me ha dado**

ÍNDICE

	<b>PAGINAS</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	
Ácidos p-hidroxicinámicos	3
Cinámico	
p-metoxicinámico	
Cumárico	
Cafeico	
Ferúlico	
Sinápico	
Clorogénico	
Biotransformaciones	13
Mediante microorganismos	
Usando enzimas	
Técnicas especiales en las biotransformaciones enzimáticas	
Con cultivos de células vegetales (CCV)	
Ventajas y desventajas de las biotransformaciones	
Biotransformaciones de los ácidos p-hidroxicinámicos	22
Esterificaciones	
Nitración	
Reducciones	
Acoplamiento orto-oxidativo	
Descarboxilaciones	
Usos de los hidroxiestirenos	28
<b>Objetivos</b>	31
Objetivo general	
Objetivos particulares	

<b>Materiales y métodos</b>	<b>32</b>
Equipos	
Diagrama de trabajo	33
I. Sustratos	34
Adquisición de los ácidos hidroxicinámicos	
Extracción y purificación de ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz	
II. Biocatalizador	34
Medios de cultivos empleados	
Selección de la cepa bacteriana para la biotransformación	
III. Biotransformación	35
Crecimiento del microorganismo	
Biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos	
Verificación de la bioconversión mediante cromatografía en capa fina (CCF)	
IV. Purificación, identificación y caracterización de los productos	36
Biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos para la caracterización de los productos	
Extracción y purificación de los productos de la biotransformación	
Cuantificación química de los productos de la biotransformación	
V. Cinéticas de biotransformación	37
Preparación de las curvas de calibración	
Cinética de biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos	
Muestreo, preparación e inyección de las muestras de la cinética de biotransformación	
Cuantificación de los productos empleando el HPLC (cromatógrafo de líquidos de alta resolución)	
Cálculo de la concentración	



<b>Resultados</b>	39
Extracción de ácido ferúlico	
Selección de la cepa bacteriana para la biotransformación	
Biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos	
Cuantificación química del crudo de cada biotransformación	
Cinéticas de las biotransformaciones y cuantificación de los productos mediante el empleo del HPLC	
Resultados obtenidos de la Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	
<b>Discusión de resultados</b>	45
Extracción de ácido ferúlico	
Selección de la cepa bacteriana para la biotransformación	
Biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos	
Cuantificación química del crudo recuperado en cada biotransformación	
Cinéticas de biotransformación y cuantificación de los productos mediante el empleo del HPLC	
Resultados obtenidos de la Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	
<b>Conclusiones</b>	51
<b>Recomendaciones</b>	52
<b>Bibliografía</b>	53
<b>Apéndice I: Identificación de la cepa mediante secuenciación por PCR de la región V1 del gen ARN 16S</b>	59
<b>Apéndice II: Curvas patrón de los hidroxiestirenos</b>	62
<b>Apéndice III: Espectros de masas y RMN<sup>1</sup>H</b>	64

---

**RESUMEN**

Los ácidos p-hidroxicinámicos, son moléculas biológicamente importantes y abundantes en la naturaleza. Se obtienen del metabolismo secundario de las plantas, contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, que les confiere la propiedad de ser antioxidantes naturales.

La importancia de la transformación microbiana de los ácidos p-hidroxicinámicos se debe a la diversidad de productos que pueden obtenerse a partir de estos. Los derivados se usan como antioxidantes, precursores de aromas, monómeros para la producción de polímeros, así como de aditivos, tanto en la industria de los alimentos, como en la química y de farmacéutica.

En esta investigación se realizó la evaluación de la biotransformación que sufren los ácidos p-hidroxicinámicos (ácidos cinámico, p-metoxicinámico, cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y clorogénico), al ser incubados bajo condiciones controladas (pH, temperatura, agitación y tiempo de incubación) con la cepa bacteriana de *Bacillus sp.* aislada a partir del bagazo de café.

Los ácidos que resultaron ser biotransformados fueron: cumárico, cafeico, ferúlico y el sinápico. Posteriormente se continuó con la purificación, identificación y cuantificación de los productos obtenidos, siendo éstos los derivados descarboxilados correspondientes de cada uno de los ácidos.

Para finalizar este trabajo, se realizó una cinética de descarboxilación para cada uno de los ácidos transformados, la cual se monitoreó a diferentes tiempos de muestreo, mediante el empleo del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). En último lugar, con la ayuda del HPLC, se pudo calcular la concentración máxima de producto obtenida, así como el tiempo empleado por la cepa de *Bacillus sp.* en realizar, bajo condiciones de reacción controladas, la descarboxilación de una concentración de 1mg/mL en cada ensayo de bioconversión con cada uno de los ácidos descarboxilados.

Para la identificación de las estructuras de los productos obtenidos, se emplearon las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- $^1\text{H}$ ), la Espectrometría de Masas (EM).

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos, son compuestos fenólicos que son producidos por el metabolismo secundario de las plantas. Han sido muy estudiados debido a las propiedades que éstos o algunos de sus derivados presentan. En su mayoría, estos ácidos son producidos por la enzima fenilalanina amonio liasa que cataliza la reacción de L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico, en seguida este ácido es hidroxilado y/o hidroximetilado y los derivados obtenidos son esterificados con azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes, principalmente.

Los ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, clorogénico y el mismo ácido cinámico, han sido sometidos a diversas reacciones químicas, a transformaciones con enzimas o con células microbianas completas, con la finalidad de obtener derivados de importancia industrial.

Se ha reportado que la bioconversión de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, mediante el empleo de diversos géneros microbianos, proporciona una gran cantidad de productos de interés para las industrias farmacéutica, química, y de alimentos. La aplicación de éstos va desde aditivos para los alimentos, precursores de aromas, antioxidantes, y hasta la obtención de monómeros para la producción de biopolímeros. Entre los principales productos que se obtienen de esta reacción son: alquil hidroxicinamatos, ácido vainillínico, guayacol, vainillina, e hidroxiestirenos, entre otros.

El objetivo de este trabajo es realizar la biotransformación de los ácidos: cinámico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico y clorogénico, mediante el empleo de una cepa microbiana aislada a partir del bagazo de café, con la propósito de obtener los hidroxiestirenos en alto rendimiento, debido a que éstos son empleados como aditivos en las industrias, farmacéutica, química y en la de alimentos principalmente.

ANTECEDENTES

ÁCIDOS *p*-HIDROXICINÁMICOS

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos o *p*-hidroxicinámatos, son compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas mediante la ruta del "shikimato" a partir de la tirosina y fenilalanina usualmente como O-glucósidos y O-metilos conjugados [1]. Estos juegan un papel central en el metabolismo de fenoles en las plantas [2]. Forman parte de la pared celular de la mayoría de las células vegetales. Son metabolitos secundarios que existen en altos niveles en la dieta humana; comúnmente se les puede encontrar en el café, cereales (principalmente salvado de trigo, maíz, avena y cebada), y en algunas frutas [3]. Son de los principales antioxidantes constituyentes de frutas, vegetales y bebidas como la cerveza y algunos vinos. En la siguiente figura se muestran las estructuras los ácidos *p*-hidroxicinámicos que fueron empleados en este trabajo. Además, se muestra también la estructura del ácido cinámico.

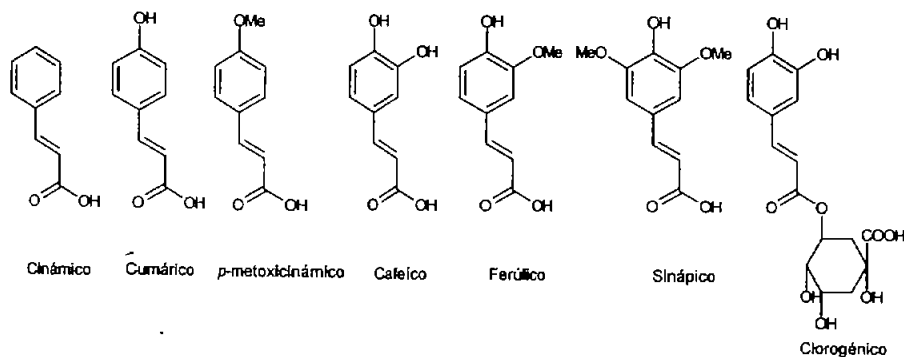


Figura 1: Estructura de los ácidos *p*-hidroxicinámicos empleados en este trabajo.

Los hidroxicinámatos más comunes son los ácidos ferúlico, cafeico, sinápico y el ácido *p*-cumárico (ver figura 1). A estos compuestos, raramente se les puede encontrar de forma libre en las plantas o en los alimentos, usualmente se encuentran esterificados a un azúcar, a algunos ácidos orgánicos o lípidos. Es posible también, encontrarlos como dímeros, particularmente en la pared celular de algunos cereales [3]. Estos ácidos se liberan durante la extracción de lignina y son responsables (*in vivo*) de la resistencia que puedan tener las plantas contra las plagas [4].

### Ácido Cinámico

Ácido 3-fenil-2-propenoico o ácido  $\beta$ -fenilacrilico (Ver figura1), puede ser preparado por síntesis química [5]. Mediante la condensación del benzaldehído con anhídrido acético y acetato de sodio (síntesis de Perkin). Por este método se obtienen buenos rendimientos.

#### **Características físicas**

Insoluble en agua fría, muy ligeramente soluble en agua caliente, altamente soluble en compuestos orgánicos como éter, acetato de etilo y acetona.

#### **Usos y derivados**

Se emplea en la elaboración de perfumes, así como de bromestírol, fenilacetaldehído, ésteres etílico y bencílico del ácido cinámico. Su sal sódica sirve para el tratamiento de la tuberculosis. Se emplea como primera materia prima para la síntesis del índigo artificial. Los ésteres del ácido cinámico con alcoholes triterpénicos y esteroides son considerados en alimentos y farmacia como antioxidantes, además promueven el desarrollo de vitaminas y son agentes efectivos contra el tratamiento de la arteriosclerosis. Varias funciones fisiológicas han despertado un interés particular en la síntesis de ésteres del ácido cinámico con derivados del colesterol [5,6]. En la figura 2 se muestra un éster del ácido cinámico con el colesterol.

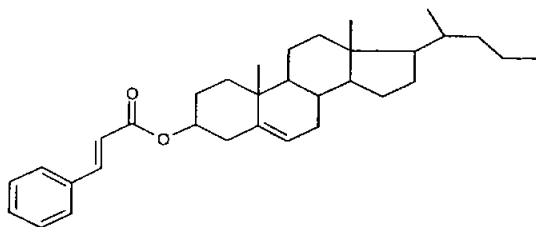


Figura 2. Ester del ácido cinámico con el colesterol [6].

#### **Fuentes**

Se encuentra en el bálsamo de Tolú, en un 80% como éster cinámico del toluresinatol, mezclado con éster benzotánico, junto con éster bencilcinámico. Además este bálsamo contiene un 12-15% de ácidos libres especialmente cinámico, junto con un poco de benzoico y vainillina[5]. Se encuentra también en las aguas de desecho de la extracción del aceite de olivo [7].

### Ácido p-metoxicinámico

Ácido 3-fenil-(4-metoxi)-2-propenoico), conocido más comúnmente como ácido p-metoxicinámico (Ver figura 1). Algunos de sus derivados, como el p-metoxicinámico de octilo, son empleados como fotoprotectores en cremas contra el sol.

#### Características físicas

Insoluble en agua fría, muy ligeramente soluble en agua caliente, soluble en solventes orgánicos como el éter, acetona y acetato de etilo.

### Ácido Cumárico

Ácido 3-fenil-(4-hidroxi)-2-propenoico, comúnmente conocido como ácido p-cumárico (ver figura 1). En la naturaleza se encuentran varios tipos de ácidos cumáricos, dependiendo de en qué posición del anillo aromático se encuentre el radical hidroxilo; se pueden encontrar los ácidos, m-cumárico y el o-cumárico, además del ácido p-cumárico.

#### Características físicas

Es poco soluble en agua fría, ligeramente soluble en agua caliente, muy soluble en solventes orgánicos como el éter, acetona y acetato de etilo.

#### Fuentes

Se le puede encontrar en frutas tales como la manzana, pera y cereza, entre otras. En los vegetales se encuentra en tomate, brócoli, zanahoria, espinaca, y algunos más. Rara vez se encuentra de forma libre en la naturaleza, generalmente se encuentra unido mediante un enlace éster a ácidos orgánicos, lípidos, azúcares o dimerizado en la pared celular de algunos cereales. Otras fuentes importantes son: los residuos industriales procedentes de la elaboración de sidra de manzana, jugos y en granos agotados procedentes de la elaboración de cerveza [8], en donde se sabe que existe como dehidrodímero o polimerizado dentro de la lignina[9]. En la siguiente figura se muestran derivados de origen natural del ácido cumárico.

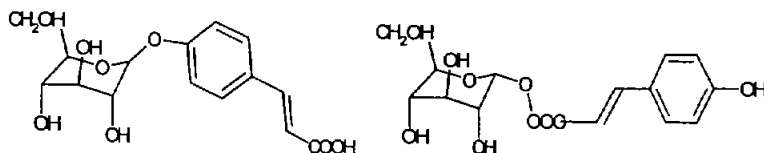


Figura 3: Derivados de origen natural del ácido cumárico.

### Ácido Cafeico

Ácido 3-fenil-(3,4-dihidroxi)-2-propenoico) o mejor conocido como ácido cafeico. Su estructura se muestra en la figura 1.

#### **Características físicas**

Escasamente soluble en agua fría, soluble en agua caliente, soluble en solventes orgánicos como el éter y acetato de etilo.

#### **Usos y derivados**

Los principales usos del ácido cafeico están dados por tener propiedades antioxidantes, muchos de sus derivados se encuentran de forma natural en bebidas y vegetales. El ácido cafeico y algunos de sus derivados son empleados ampliamente en cremas fotoprotectoras. Ha sido demostrado, *In Vitro*, que el ácido cafeico protege de manera muy eficiente de los daños causados por la luz UV [10].

Por otro lado, algunos derivados naturales del ácido cafeico principalmente esteres, además de tener propiedades antioxidantes, se les ha atribuido actividad preventiva contra la arterosclerosis. En la siguiente figura se muestran algunos derivados naturales del ácido cafeico.

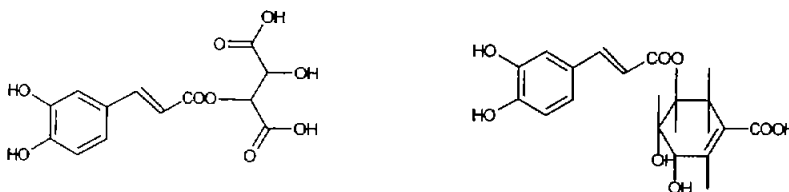


Figura 4: Derivados naturales del ácido cafeico

#### **Fuentes**

En forma natural se encuentra en café, semillas de girasol, cáscara de papa, zanahorias, etc., mientras que en las semillas de girasol puede encontrarse junto con el ácido clorogénico hasta en una concentración de 700g/Kg del total de los ácidos presentes y se encuentra principalmente en el corazón de la semilla [11].

#### **Obtención del ácido cafeico**

El ácido cafeico puede ser producido por desesterificación del ácido clorogénico en agua, liberándose así el ácido cafeico y el ácido quínico. Para obtener ácido cafeico a partir del ácido clorogénico, mediante el empleo de enzimas aisladas, se coloca el ácido

clorogénico junto con la enzima (lipasa de *C. antarctica* por ejemplo), bajo condiciones controladas de pH, temperatura, agitación y tiempo de reacción. La verificación se realiza mediante CCF y la purificación se puede realizar en una columna cromatográfica. La reacción de hidrólisis puede ser realizada por varias enzimas como la lipasa de *A niger*, algunas celulasas y la carbohidrato hidrolasa, entre otras [12].

### Ácido Ferúlico

El ácido ferúlico (ácido 3-fenil-(4-hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico) (ver figura 1). Fue aislado a partir de la planta *Férula foetida* en 1886. El nombre de ácido ferúlico obviamente se deriva del nombre botánico de la planta de la cual fue extraído. Es un compuesto que se encuentra en la mayoría de las plantas y en mayor cantidad en los cereales (maíz, trigo, cebada, arroz, etc.), también es posible encontrarlo en el café, donde forma parte de la pared celular y constituye un puente de unión entre xilanos. En la siguiente figura se ejemplifica lo anterior.

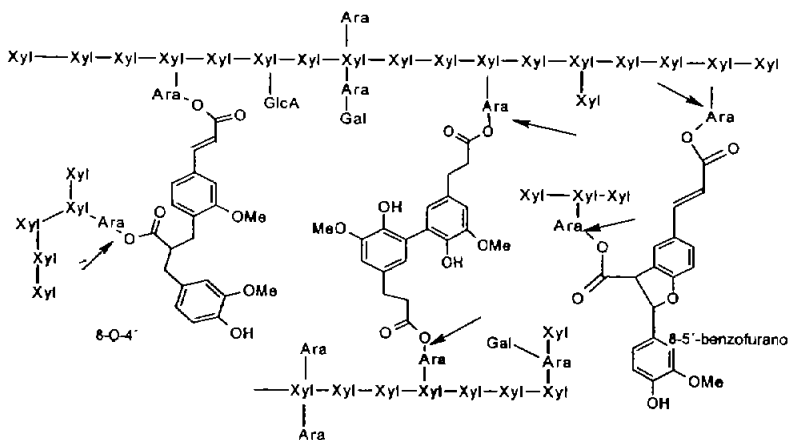


Figura 5: Ácido ferúlico unido a xilanos en las plantas de maíz.

En las plantas el ácido ferúlico juega un papel muy importante, ya que mantiene la rigidez de las mismas mediante enlaces cruzados, proporciona protección contra la invasión de patógenos y al daño que pueda ser causado por los radicales libres de oxígeno. Dado que las plantas son susceptibles a daños causados por la luz UV, el ácido ferúlico juega un papel primordial en la protección del contenido celular. El núcleo ferúlico absorbe a



longitud de onda similar a la que absorben las moléculas del ADN, evitando así daños en esta macromolécula; evita también la peroxidación de los lípidos [13].

#### **Características físicas**

Ligeramente soluble en agua fría, altamente soluble en agua caliente, soluble en solventes orgánicos como el acetato de etilo, acetona y éter.

#### **Fuentes**

Se encuentra aproximadamente en un 2% en las cascarillas de maíz, en granos de trigo forma casi el 0.5% de la materia seca y en los granos de cebada forma casi el 0.14% de la materia seca total [4]. Pero también es posible encontrarlo en una gran variedad de frutas y en los productos derivados de estos como jugos de frutas, algunos vinos y en la cerveza donde tiene una gran participación en el sabor de la misma [3, 13].

#### **Usos y derivados**

A nivel industrial, la importancia del ácido ferúlico radica en su actividad antioxidante y por ello es empleado como antioxidante natural en alimentos, además de que tiene la capacidad de funcionar como inhibidor de sabores amargos, es un ingrediente activo en lociones y cremas que protegen contra los rayos UV, siendo un fotoprotector que preserva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno [14]. A este compuesto se le ha asociado también con actividad antihepática, antiestrogénica, antitumoral, antimicótica e hipocolesterolemia [15]. Por otro lado, ha sido reportado también que el ácido ferúlico tiene cierta actividad anticancerígena [16].

Entre los derivados más importantes del ácido ferúlico se encuentran dímeros, glucósidos y ésteres, la mayoría de ellos con propiedades antioxidantes, pero también son empleados como anti-inflamatorios en la medicina herbolaria en China; se encuentran en varias cremas fotoprotectoras y en cosméticos (dímeros, algunos glucósidos). En cuanto a los ésteres del ácido ferúlico, son una amplia gama de compuestos conocidos, los cuales son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos y de farmacia, principalmente en los países asiáticos.

Se ha comprobado que los dímeros del ácido tienen una mejor actividad antioxidante que el ácido en sí, esto se debe principalmente a que los dímeros tienen una mejor solubilidad en la parte lipídica, ello implica una mayor distribución del antioxidante en la parte grasa y una mayor protección a la misma [15].

Se han reportado ésteres del ácido ferúlico con alcoholes primarios (del metanol al undecanol), los cuales tienen propiedad antioxidante [17].

### **Obtención del ácido ferúlico**

La extracción del ácido ferúlico se realiza principalmente de las gramíneas y debido al arreglo que presenta en dichas plantas (ver figura 5), se ha determinado que mediante una hidrólisis alcalina de los enlaces ésteres se puede realizar la liberación del mismo. En general, la manera de realizar la extracción del ácido ferúlico es mediante una hidrólisis alcalina de la fuente empleada, sin embargo se han realizado también un doble tratamiento, térmico-enzimático, en la extracción del ácido ferúlico a partir del maíz [18].

Una de las formas para la extracción del ácido ferúlico es la hidrólisis alcalina de la fuente completa o sólo del salvado (en caso de ser granos), la solución alcalina junto con la acción de la temperatura (generalmente superior a 95°C), realizan la hidrólisis de los enlaces que mantienen unido este ácido con los polisacáridos; una posterior acidificación termina por extraer el ácido y posteriormente se puede separar mediante el empleo de solventes orgánicos como el acetato de etilo. Puede ser purificado mediante recristalización por par de disolventes u otra técnica.

### **Ácido Sinápico**

El ácido Sinápico (Ácido 3-fenil-(3-hidroxi-3,5-dimetoxi)-2-propenoico), es otro de los ácidos derivados del ácido cinámico (Ver figura 1).

### **Características físicas**

Color café, es un ácido muy poco soluble en agua fría, soluble en solventes orgánicos como el éter, acetato de etilo y acetona.

### **Fuentes**

El ácido sinápico es un componente de la ligninocelulosa, está presente en aguas de lavado del aceite de oliva, pero también ha sido aislado en diferentes plantas [19]. Se encuentra también en cereales y en sus derivados. En vegetales, rara vez se encuentra en forma libre, generalmente está ésterificado con azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes, como en el caso del brócoli (ver figura 6) [20]. Por otro lado, este ácido es muy importante para la identificación del café mexicano, puesto que únicamente se encuentra en café de origen nacional [21].

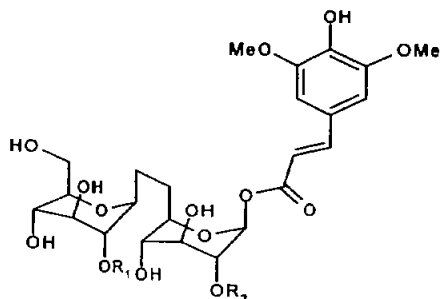


Figura 6: Hidroxicinámato derivado del ácido sinápico aislado del brócoli.

### Obtención

El ácido sinápico es generalmente extraído de la misma forma en que se extraen todos los ácidos *p*-hidroxicinámicos, mediante la hidrólisis alcalina de la fuente empleada, al igual que el resto de los ácidos *p*-hidroxicinámicos. La variación del tiempo de extracción es diferente para cada ácido debido a que algunos tienen mayor o menor estabilidad que otros, en este caso éste ácido, junto con el cafeico son de los más susceptibles a la oxidación. La purificación del producto se realiza una vez que este ha sido identificado plenamente mediante CCF u otra técnica.

### Ácido Clorogénico

Las plantas son muy conocidas por contener cantidades significativas de varios ácidos polifenólicos, tales como el *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sus glucósidos o esteres.

El ácido 5-cafeilquínico o ácido clorogénico (ver figura 1), esta ampliamente distribuido en la naturaleza. Se presenta en semillas de girasol, piel de papa, zanahorias, café, frutas y productos derivados de los mismos, aunque a los esteres de los hidroxicinámatos con el ácido quínico se les denomina también ácidos clorogénicos. En la siguiente figura se muestra un derivado natural del ácido clorogénico.

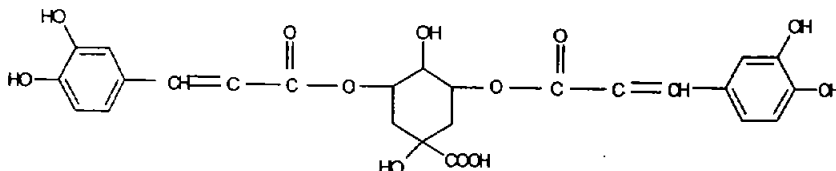


Figura 7: Ácido iso-clorogénico

### Usos

El ácido clorogénico puede ser considerado como almacén de ácido cafeico, dado que la biosíntesis del ácido clorogénico a partir del ácido cafeico es reversible (ver figura 8). Entre los usos más importantes que pueda tener este ácido, está su capacidad de inhibir al acetato de metilazometanol, que es un compuesto que induce cáncer en hámsteres, así como prevenir el cáncer oral en ratas e inhibe el efecto del compuesto metilnitrosoarea que produce cáncer en el estómago en ratas [22].

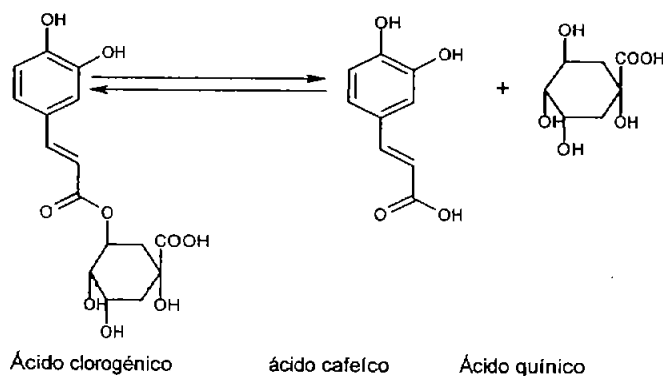


Figura 8: Reversibilidad de la biosíntesis del ácido clorogénico a partir de los ácidos cafeico y quínico.

Por otro lado, se han usado los ácidos clorogénicos como criterio de selección genotípica en café, para *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, pues su contenido de ácidos clorogénicos varía entre un 7 y 10% en base seca [23].

### Obtención

La extracción y purificación de los ácidos clorogénicos a partir de granos de café verde se realiza como se describe a continuación: primero para evitar la degradación de estos ácidos se congelan la muestra con nitrógeno líquido, y se muelen durante 15 minutos. Se colocan una mezcla metanol-agua (70/30) y 0.5% de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y se agita (125 rpm) a  $4^\circ\text{C}$  en ausencia de luz por una noche. Terminada la extracción se filtra la solución, posteriormente la muestra es directamente tratada con agentes de Carrez, que provocan la precipitación de polisacáridos, proteínas solubles y otros materiales coloidales. La muestra se analiza posteriormente mediante el HPLC [24].

## BIOTRANSFORMACIONES

La biotransformación se define como todo cambio en la estructura de un compuesto químico realizado por seres vivos o parte de ellos. Estos catalizadores de origen natural ofrecen algunas ventajas en la producción de sustancias tradicionales o nuevas, respecto a la síntesis química. Algunas de las ventajas por las cuales se opta por el empleo de los biocatalizadores sobre la química tradicional son: las enzimas poseen alta especificidad (en términos de regio, quimio, y estereoespecificidad), con respecto a los sustratos sobre los que actúan. Los procesos en que son empleadas son generalmente más rápidos; no requieren condiciones extremas de reacción; proporcionan altos rendimientos en productos enantioméricamente puros; no forman subproductos y son capaces de producir compuestos nuevos a partir de sustratos diferentes a los que suelen transformar a nivel celular [15].

### Biotransformaciones mediante el empleo de microorganismos

Una gran variedad de microorganismos han sido empleados para realizar un sin fin de reacciones de biotransformación sobre una gran diversidad de diferentes sustratos. A continuación se mencionan sólo algunos ejemplos de dichas reacciones biocatalizadas por una variedad de microorganismos [25].

1. **Desracemización:** Un problema común en síntesis orgánica es la formación de mezcla racémica. Algunos microorganismos (*Candida parapsilosis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas polycolor*, entre otros.) tienen la capacidad de producir a partir de una mezcla racémica un solo enantiomero lo que es muy importante en las industrias química, farmacéutica y de alimentos. Como se muestra en la siguiente figura.



Figura 9: Desracemización mediada por microorganismos.

2. **Reducción:** Algunas de las reacciones más comunes son sin duda las reacciones de reducción, mediadas principalmente por una gran diversidad de levaduras, de entre

las que se puede destacar a la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae*. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de reacción de reducción.

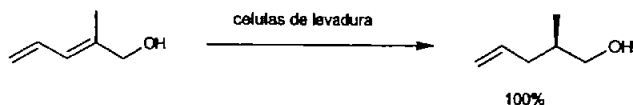


Figura 10: Reducción de un doble enlace por levaduras.

3. **Hidroxilación:** Muchos alcanos pueden ser activados mediante la biohidroxilación. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de dicha reacción. Los microorganismos son capaces también de realizar hidroxilaciones sobre anillos aromáticos, como el caso del ácido nicotínico que es hidroxilado en la posición 6 por *Pseudomonas* o *Bacillus sp* a nivel industrial. El orden de hidroxilación es inverso al de radicales libres ( $2^\circ > 3^\circ > 1^\circ$ ).

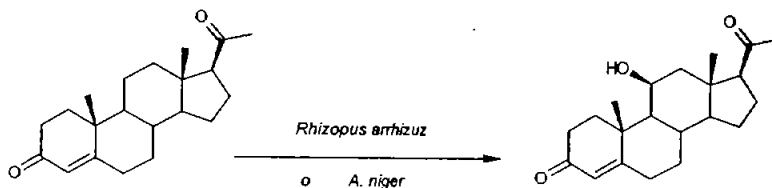


Figura 11: Hidroxilación de la progesterona.

4. **Epoxidación de alquenos:** La reacción de epoxidación es ampliamente usada para la obtención de intermediarios de alto valor en la síntesis de compuestos quirales. Los microorganismos más estudiados son las cepas de *Pseudomonas oleovorans*, pero no son los únicos empleados, se han reportado cepas de *Nocardia corallina*, *Micobacterium* o de *Xanthobacter sp.*, en la siguiente figura se muestra un ejemplo de reacción de epoxidación.

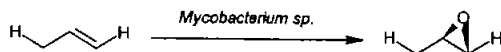


Figura 12: Reacción de epoxidación de un alqueno

5. **Oxidación de alquiltioeteres:** Los tioeteres pueden ser oxidados asimétricamente por microorganismos como *Corynebacterium equi*, *Rhodococcus equi*,

*Helminthosporium sp.* y *Mortierella isabellina*, y se obtienen altos rendimientos de productos ópticamente puros.

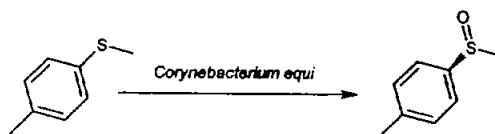


Figura 13: Oxidación de un alquiltioeter.

En la tabla 1, se muestran algunos tipos de moléculas aromáticas producidas por los Basidiomicetos, mediante biotransformación y que son empleadas directamente en al industria de los alimentos [26].

Sabor	Olor	Biotransformación especies	Precursor
Vainilla	Vainilla	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácidos vainílicos, ferúlico
Benzaldehído	Almendra amarga	<i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Ischnoderma benzoinum</i> , <i>Polyporus sp.</i> , <i>Poria cocos</i>	Fenilalanina, aceite de castor, lignina, ácido benzoico, asparagina.
Antranilato de metilo	Flor de naranjo, fresa silvestre	<i>Trametes sp.</i> , <i>Polyporus sp.</i> , <i>Picoporus cinnabarinus</i>	Metil-N-metil-antranilato, ácido antranílico
Anisaldehído	Vainilla y anís	<i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Ischnoderma benzoinum</i> ,	Tirosina y lignina
Veratraldehído	Vainilla	<i>Pleurotus sp</i>	Lignina y paja
Acetofenona	Flor de naranjo	<i>Polyporus sp.</i>	Aceite de castor y lignina
Benzoato de etilo	Frutal	<i>Polyporus sp.</i>	Aceite de castor

Tabla 1: Sabores relacionados al benzoato producidos por Basidiomicetos [26].

Otro ejemplo de biotransformación con empleo directo en la industria de los alimentos es la obtención de  $\gamma$ -lactona, que es el principal componente del sabor de los duraznos y el albaricque, el cual se obtiene mediante la biotransformación del aceite de castor mediante el empleo de levaduras *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobotomyces* (el sustrato contiene cerca de un 85% de ácidos grasos consistentes en ácido ricinoleico, que resulta ser un buen precursor de la  $\gamma$ -lactona) [26].

### **Biotransformaciones mediante enzimas**

La mayoría de las reacciones realizadas en los seres vivos no sucederían a una velocidad apreciable sin la catálisis. Los catalizadores de estas reacciones biológicas son proteínas llamadas enzimas.

Cada organismo produce una gran variedad de enzimas, las cuales están involucradas en reacciones metabólicas. Existen microorganismos que producen enzimas en grandes cantidades y no las retienen dentro de la célula, las excretan al medio y generalmente estas enzimas extracelulares tienen la capacidad de degradar materiales insolubles, para que luego puedan ser transportados los productos de la digestión hacia el interior de la célula, donde son empleados como nutrientes para el desarrollo de la misma.

Actualmente se utilizan una gran cantidad de enzimas extracelulares en las industrias alimentarias, farmacéuticas y textil y son producidas en grandes cantidades mediante biosíntesis microbiana. Comercialmente se producen enzimas procedentes de bacterias, levaduras y hongos [27].

El empleo de enzimas purificadas en la biotransformación y obtención de nuevos productos ofrece grandes ventajas con respecto a la síntesis orgánica corriente, en la obtención de nuevos productos o mejorar los rendimientos y pureza de los compuestos obtenidos.

La primera consideración para incorporar la biotransformación en una síntesis química, es el control estereo y regioselectivo que puede ser obtenido al usar una enzima como catalizador de una reacción. Las bioconversiones son cada vez más aceptadas en la generación de productos ópticamente puros y de compuestos de interés [15].

El potencial de la biocatálisis en la industria farmacéutica ha sido bien conocido por muchos años. Los avances en fermentaciones, purificación e inmovilización de enzimas dan como resultado biocatalizadores más estables, lo que significa la reducción de costos. Por otro lado, los avances en enzimología no acuosa han simplificado tanto las transformaciones como la purificación del producto. Finalmente, las técnicas de inmovilización donde se emplean proteínas cristalizadas aporta como resultado la creación de mejoras en este tipo de catálisis. Pero, la aplicación de enzimas aisladas en la tecnología de las fermentaciones como catalizadores en síntesis de productos farmacéuticos, aún es limitada.



En la tabla 2, se muestran algunos productos de aplicación farmacéutica modificados enzimáticamente, las enzimas responsables y la reacción que catalizan.

Producto	Tipo de enzima	Reacción catalizada
Naproxeno	Lipasa inmovilizada	Hidrólisis
Cetoprofeno, fluorbiprofeno, ceterolac	Lipasa y proteasa	Hidrólisis
Captopril	Lipasa	Hidrólisis
Camptosar	Lipasa	Hidrólisis
Carbovir	Hidrolasa	Hidrólisis
Ninedipina, nitrendipina, nicardipina (bloqueadores de los canales de calcio)	Esterasas y lipasas	Hidrólisis
Castanospermina (inhibe replicación del VIH)	Lipasa	Acilación
Desoxinojiromicina, desoximanojiromicina (inhibidores de la síntesis y excreción de glicoproteínas)	Aldolasa	Condensación
Broxaterol	Alcohol deshidrogenasa	Reducción
Evernimomicina	Oxidasa	Oxidación
SH56592 (anti-fúngico)	Lipasa	Acetilación
Benzodiazepina	Reductasa	Reducción
Diltiacem (bloqueador de los canales de calcio)	lipasa	Hidrólisis

Tabla 2: Enzimas empleadas en biocatálisis de productos farmacéuticos. Elaboración propia de [28].

Las enzimas más empleadas en la síntesis orgánica son las hidrolasas (cerca de dos tercios de los reportes de biotransformaciones, se llevan a cabo usando proteasas, esterases o lipasas), seguidas de las oxidorreductasas y las demás clases de enzimas en mucho menor cantidad, pero su uso se incrementa.

El amplio empleo de las enzimas hidrolíticas se debe a la gran variedad de usos que estas pueden presentar, lo que incluye la formación de ésteres de fosfato, ésteres, epóxidos, nitrilos y hasta la formación de polímeros.

Las reacciones de oxidación, son realizadas por oxigenasas que incorporan oxígeno molecular al sustrato, ya sea uno o los dos átomos del  $O_2$  por una transferencia de electrones, siendo el oxígeno el donador.

En la tabla 3 se muestran los grupos funcionales que pueden ser susceptibles a la oxidación mediante enzimas, y algunos de los microorganismos que pueden producir enzimas oxidasas.

Grupo funcional	Enzima	Acción enzimática
Hidroxilos y alquilos	3- $\alpha$ -hidroxiesterol deshidrogenasa	Oxidación estereoespecífica y reducción de cetonas de ácidos biliares
Alquenos	Peroxidasa	Epoxidación de estirenos
Arilos	Lacasa	Oxidación de benzo[ <i>a</i> ]pireno y 6,12-quinonas
Ácidos carboxílicos	15-lipoxigenasa	Oxidación de ácidos grasos
Azufrados	Vanadio bromoperoxidasa	Oxida usando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grupos sulfuro

Tabla 3: Uso de enzimas oxidasas en la química orgánica [14].

Otro tipo de biotransformaciones también están causando un gran impacto dentro del campo de la biotecnología, son enzimas que catalizan reacciones poco comunes pero de gran importancia en la industria. A continuación se muestran algunos ejemplos de estas nuevas enzimas y su aplicación.

1. Carboxilación.-Enzima carboxilasa descubierta en la bacteria *Thavera aromatica* y es empleada en la síntesis de ácido-4-hidroxibenzoico a partir de fenol y CO<sub>2</sub> en un recipiente con temperatura sub-atmosférica y presión de CO<sub>2</sub>, con un 100% de selectividad. Otra enzima carboxilasa fue obtenida de *B. megaterium* la cual actúa sobre pirroles y es reversible. Esta enzima tiene acción cuando se adicionan altas concentraciones de bicarbonato.
2. Polimerización.- La lipasa del páncreas de cerdo, cataliza la polimerización de la caprolactona esta reacción es ampliamente regioespecífica. Otra enzima empleada en este tipo de reacción es una peroxidasa, la cual se emplea en la polimerización de anilina en presencia de plantilla poli aniónica, poli estireno sulfonado para producir un conductor soluble en agua, complejo de polianilina [14].

### Técnicas especiales en las biotransformaciones enzimáticas

Dado que la mayoría de los solventes orgánicos son insolubles en agua, y la biocatálisis convencional se lleva a cabo en soluciones acuosas, esa es una gran limitación para las aplicaciones sintéticas de las biotransformaciones.

Los avances de la cinética enzimática en medios orgánicos se basan en la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos.

A continuación se muestran algunos ejemplos del uso de solventes orgánicos aplicados a la biocatálisis en sistemas mono y bifásicos.

1. Sistema de solventes bifásicos.-Hidrólisis de un ester en su correspondiente ácido con alto rendimiento. La hidrólisis se llevó a cabo en mezcla de agua/benceno en presencia de lipasa de *C. rugosa*, la cual fue pre-tratada con 2-propanol. Otra enzima reportada es la hidroxicinitrilo liasa de *Hevea brasiliensis*, la cual genera enantiómeros puros de (S)-cianohidrininas en rendimientos de hasta el 99%, tomando como materias primas a los compuestos alifáticos, insaturados, aromáticos y aldehídos heteroaromáticos, en presencia de dos fases acuosas (buffer/metilterbutil éter). Se ha reportado también la descarboxilación del ácido ferúlico a 4-vinilguayacol en un sistema de dos fases [29].
2. Sistema monofásico de solventes.-Diferentes solventes orgánicos han sido empleados en la obtención de varios compuestos farmacéuticos, como (S)-naproxeno y (S)-ibuprofeno de sus correspondientes tioesteres usando lipasa proveniente de *Candida rugosa*, que además cataliza las reacciones de tiotransferificación o hidrólisis en solventes orgánicos. Se han empleado también solventes como benceno, hexano, tetrahidrofurano, tolueno, octano y *n*-decanol. En sistemas bifásicos se emplean los anteriores solventes con agua.
3. Sin solventes.-Lipasas de *C. antarctica* y de *Rhizomucor miehei* han sido empleadas para esterificar ácidos grasos (laurico) con una larga cadena de tioles, como el decanotiol en presencia de una malla molecular de 0.4nm, para producir la cadena de aciltiol ester. La enzima realiza la transtioesterificación libre de solvente.
4. Detergentes y éteres corona.-El remojo de los cristales de proteína en una solución de 18-corona-6-éter en acetonitrilo seguido por evaporación del solvente, resulta en un aumento de 13 veces la velocidad de la actividad enzimática en la formación de péptidos. Por otro lado, una lipasa y un nuevo tipo de detergente han sido empleados para realizar la transferificación irreversible del 6-metil-5-hepten-2-ol o del 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol con isopropenil carboxilato en solventes orgánicos.
5. CO<sub>2</sub> supercrítico.- Se ha estudiado la velocidad y selectividad de la reacción enzimática de esterificación del ibuprofeno y 1-feniletanol con CO<sub>2</sub> supercrítico

como solvente. El estudio se realizó en un reactor tipo batch, con un rango de temperatura de 40 a 160°C se produjo la esterificación del ibuprofeno con un exceso enantiomérico del 99%, siendo además esta reacción independiente de la temperatura.

6. Enzimas inmovilizadas.-La inmovilización de las enzimas puede alterar las condiciones impuestas sobre la ésta, cuando se solubiliza el sustrato orgánico. Entre estos se problemas incluyen la desestabilización de la enzima, desnaturalización y su auto oxidación, entre otros [14].

### Biotransformación mediante el empleo de Cultivo de Células Vegetales (CCV)

La biotransformación con CCV, representa una alternativa más para la producción a nivel industrial de compuestos de interés farmacéutico y de alimentos principalmente. En el campo de los alimentos representa una forma "natural" de sintetizarlos. Existen diversos métodos para realizar los ensayos de biotransformación con CCV, siendo uno de los más importantes la adición de un compuesto (origen natural o sintético) que sirve de sustrato a las enzimas contenidas en el CCV.

A continuación se presentan algunas de las reacciones principales catalizadas por cultivos de células vegetales o enzimas extraídas de los CCV.

1. Reducción de los dobles enlaces C-C y C-O, como lo representa la formación de alcoholes a partir de compuestos como las cetonas aromáticas (ejemplo, la reducción de acetofenona a 1-feniletanol por CCV inmovilizadas de *Gardenia jasminoides*).



Figura 14: Reducción de la acetofenona a 1-feniletanol

2.  $\beta$ -oxidaciones, como lo representa la oxidación del ácido ferúlico a vainillina mediante cultivos en suspensión de *D. carota* la cual es precedida de una descarboxilación, técnica desarrollada a partir de la síntesis de estirenos utilizando como precursores diversos ácidos derivados del ácido cinámico. Esta reacción ha sido ampliamente estudiada debido al alto valor comercial de la vainillina "natural"

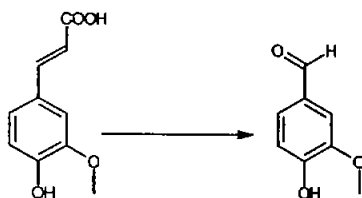


Figura 15:  $\beta$ -oxidación del ácido ferúlico a vainillina

- Desmetilaciones y descarboxilaciones, como en la formación de precursores para la formación de vainillina; por ejemplo el caso de la descarboxilación del ácido ferúlico para obtener eugenol mediante CCV de *Nicotina tabacum*.

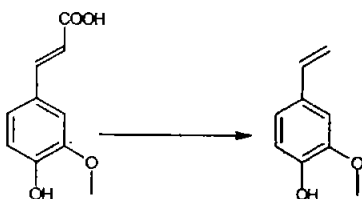


Figura 16: Descarboxilación del ácido *trans*-ferúlico

- Una biotransformación que se ha observado principalmente en células de origen vegetal y que es de gran importancia en la industria farmacéutica, ya que ayuda a la solubilización de productos de baja solubilidad en agua, es la glicosidación de compuestos fenólicos, como lo representa la glicosidación de la hidroquinona a arbutina con CCV de *Digitalis purpurea* [15].

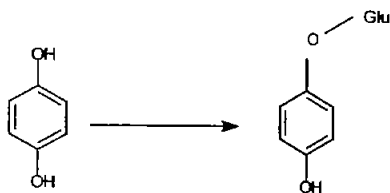


Figura 17: Glicosidación de la hidroquinona

### Ventajas y desventajas de las biotransformaciones

El impacto que han tenido las biotransformaciones en la síntesis orgánica se debe a que tienen ciertas ventajas sobre la síntesis orgánica tradicional.

### Ventajas

- El poder catalítico de los biocatalizadores hace que se incremente la velocidad de las reacciones químicas de  $10^8$  a  $10^{20}$  veces.
- A diferencia de muchos catalizadores químicos donde se utilizan metales pesados, los biocatalizadores se degradan siendo compatibles con el medio ambiente.
- Los biocatalizadores actúan bajo condiciones suaves de reacción, en un intervalo de pH de 5 a 8 a una temperatura de 20 a 37°C y en algunas ocasiones, a temperaturas superiores. En el caso de las enzimas, se ha encontrado que esto minimiza las reacciones de descomposición, isomerización o racemización que se presentan en la síntesis tradicional.
- El biocatalizador es capaz de realizar diferentes tipos de reacciones químicas y muy posiblemente existe una bio-reacción por cada reacción usada en la síntesis orgánica.
- Los biocatalizadores son quimioselectivos, por lo cual actúan sobre un solo grupo funcional.
- Los biocatalizadores son regio y diastereoselectivos, lo que significa que pueden distinguir entre grupos funcionales con diferentes ambientes químicos.
- Los biocatalizadores son enantioselectivos, lo cual puede ser empleado para realizar la catálisis bioselectiva y conversiones asimétricas.
- El biocatalizador no están restringido a sus sustratos naturales. La mayoría de ellos realizan reacciones específicas, pero aceptan una amplia variedad de sustratos.
- El costo económico y ecológico al utilizar biocatalizadores es menor al de la síntesis tradicional.
- Muchos biocatalizadores (células completas) no requieren cofactores adicionales.

### Desventajas

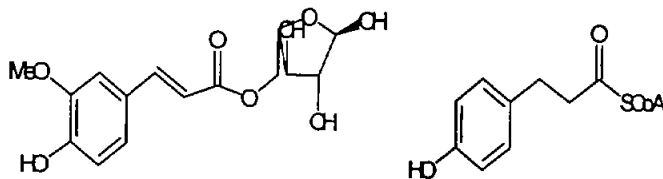
- La cantidad de biomasa necesaria (cuando se emplean células completas) es mucho mayor al rendimiento del producto a obtener.
- Cuando se manejan enzimas, muchas veces ya no es posible recuperarlas.
- En biotransformaciones en medios no acuosos, el biocatalizador puede tener baja estabilidad en los solventes orgánicos.
- Algunos biocatalizadores pueden inhibirse con el producto final o intermediarios.

- Algunos biocatalizadores (células completas) pueden dar más de un producto partiendo de un mismo sustrato.
- La dificultad para realizar la purificación de los productos.

### BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS ÁCIDOS p-HIDROXICINÁMICOS

Los ácidos p-hidroxicinámicos han sido empleados como sustratos para la obtención de nuevos productos mediante la biotransformación con diferentes microorganismos y obteniendo una diversidad de derivados, que van desde esteres de dichos ácidos a productos como alcoholes y monómeros para polímeros (hidroxiestirenos), entre otros más. Se tienen descritas una gran variedad de reacciones a las que han sido sometidos los ácidos p-hidroxicinámicos; sin embargo, sólo se ejemplificaran algunas de las reacciones más comunes.

1. **Reacciones de esterificación:** Se han obtenido una gran cantidad esteres de los ácidos hidroxicinámicos mediante empleo de enzimas, células completas, CCV, o aislados de plantas. A continuación se presentan sólo algunos ejemplos de esteres obtenidos mediante biotransformación. Se han preparado esteres de ácidos p-hidroxicinámicos con acetilcoenzima A (ACoA) mediante el empleo de cultivo de células vegetales (CCV) de perejil (*Petroselinum hortense Hoffm*). Los ácidos empleados son los ácidos: cinámico, ferúlico, cumárico, p-metoxicinámico, y ferúlico. Obteniéndose principalmente el p-cumaroil-CoA, dado que el ácido cumárico fue el sustrato más efectivo. [30]



Figuras 18: Esteres derivados del ácido ferúlico y cumárico.

Los esteres de fenoles naturales con alcoholes triterpénicos y esteroides son considerados en alimentos y medicina como antioxidantes, promueven el desarrollo de vitaminas y son agentes efectivos en el tratamiento de la arteriosclerosis. Otros productos

de interés son los obtenidos de la esterificación entre el ácido cinámico con derivados del colesterol (ver figura 2) [6].

Sin duda los esteres derivados de los ácidos p-hidroxicinámicos tienen cualidades que les confieren cierta importancia en las industrias de farmacia y alimentos principalmente, donde son empleados como antioxidantes y fotoprotectores. En la tabla 4 se mencionan algunos derivados del ácido ferúlico que tienen la capacidad de ser antioxidantes.

Derivados del ácido ferúlico con actividad antioxidante
Esteres de los primeros 11 alcoholes primarios.(del metanol al undecanol)
Ester del alcohol isopropílico
Ester del alcohol terbutílico
Ester del alcohol 2- metil-1-butanol
Ester del alcohol 2-etil-1-hexanol
Ester del alcohol 3,5,5-trimetil-1-hexanol

Tabla.4: Derivados del ácido ferúlico con poder antioxidante [17]

**II. Reacciones de nitración:** La nitración de fenoles es una reacción más compleja que la formación de esteres de los ácidos p-hidroxicinámicos. A continuación se muestran algunos ejemplos de productos nitrados. Las reacciones de nitración son generalmente llevadas a cabo por enzimas peroxidadas. La reacción de nitración del ácido p-cumárico es llevada a cabo por una enzima peroxidasa procedente de rábano picante (HRP) la cual emplea además  $\text{NaNO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para poder realizar la nitración. El producto obtenido se muestra en la siguiente figura [19].

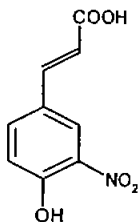


Figura 19: Producto del ácido cumárico nitrado por la peroxidasa de rábano picante [31]

Pero no sólo han sido reportados derivados nitrados del ácido cumárico, también se reportaron productos nitrados del ácido ferúlico [31].



**III. Reacciones de reducción:** Han sido reportadas reacciones de reducción para los ácidos p-hidroxicinámicos. Mediante el empleo de células de fríjol de soya en suspensión, se ha logrado la biorreducción del ácido p-cumárico y ferúlico a su respectivo alcohol [32], según se muestra en la siguiente figura 20.

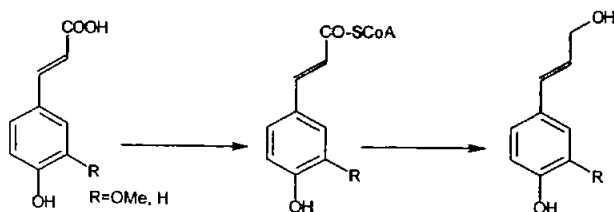
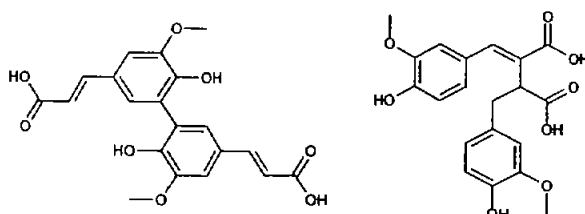


Figura 20: Reducción de ácido cumárico y ferúlico a su respectivo alcohol [32]

En otro trabajo más reciente se empleó al microorganismo *Pyrococcus furiosus* y se ha reducido el ácido cinámico al alcohol correspondiente, al igual que otros ácidos carboxílicos y aromáticos [33].

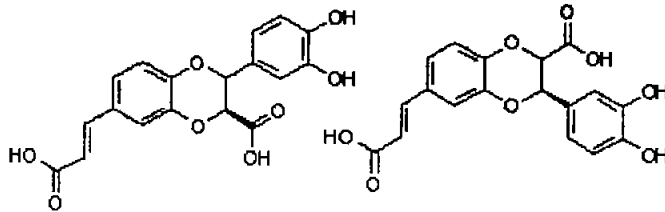
**IV. Reacciones de acoplamiento orto-oxidativo:** Muchos investigadores han enfocado su atención en las oxidaciones enzimáticas que sufren los ácidos ferúlico y cafeico principalmente. Muchos de estos estudios se dirigen hacia la obtención de compuestos naturales como la lignina. Se ha reportado una enzima (cafeato peroxidasa) que cataliza la reacción por dos diferentes vías, proporcionando dos diferentes productos [34]. Según, se muestra en la siguiente figura.



Figuras 21: Productos de acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico mediante el empleo de la cafeato peroxidasa [34].

Por otro lado, mediante el empleo de una enzima llamada “lacasa” se han producido, mediante oxidación, también diferulatos [35]. Del ácido cafeico también han sido obtenidos

productos de acoplamiento oxidativo cuando se emplea una peroxidasa de rábano picante (HRP). Los productos se presentan en la siguiente figura.



Figuras 22: Productos de acoplamiento oxidativo del ácido cafeico [36].

**V. Reacciones de descarboxilación:** Un gran número de especies de microorganismos que tienen la capacidad de realizar la descarboxilación no oxidativa de los ácidos p-hidroxicinámicos han sido reportadas. Estos microorganismos transforman los ácidos p-hidroxicinámicos en sus respectivos hidroxiestirenos por la eliminación del grupo carboxilo. Dada la importancia de la reacción se ha reportado la caracterización, purificación y clonación de las enzimas responsables, con la finalidad de producir los hidroxiestirenos en cantidades más allá de las obtenidas en el laboratorio, como es el caso de la patente obtenida para la descarboxilasa del ácido ferúlico [37]. En la tabla 5 se muestran algunos de los más importantes microorganismos de los cuales se ha realizado el estudio de la caracterización, purificación y en algunos casos de la clonación (expresión) de la enzima responsable de la descarboxilación de los ácidos p-hidroxicinámicos.

Microorganismo	Ácido empleados					Referencia
	Cinámico	Cumárico	Cafeico	Ferúlico	Sinápico	
<i>Bretanomyces anomalus</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	[38]
<i>Bacillus subtilis</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	o no empleado	[39]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo		[40, 41]
<i>Bacillus pumilis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo		[42]
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo		[43]

Tabla 5: Microorganismos de los cuales se ha realizado la caracterización o expresión de la enzima. Fuente:

Elaboración propia

Pero los microorganismos que se mencionan en la tabla 5 no son los únicos capaces de realizar la descarboxilación de los ácidos p-hidroxicinámicos. Se ha reportado también que los cultivos de células vegetales (CCV) son capaces de realizar la misma reacción [44]. A continuación se mencionan los microorganismos capaces de realizar la descarboxilación de cada uno de los ácidos hidroxicinámicos.

A. **Ácido cumárico.**

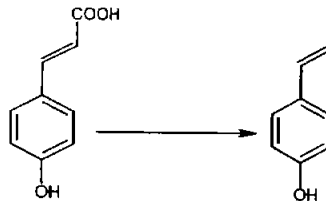


Figura 23: Ácido cumárico y el 4-vinilfenol.

La descarboxilación del ácido cumárico es realizada por los siguientes microorganismos, *Pseudomas*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, 33 cepas termófilas de *Bacillus sp.*, *Curvularia lunata*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Bretanomyces anomalus*, *Klebsiella oxytoca*, *Saccharomyces buyanus*, *E. coli* recombinante y CCV. Los cuales tienen la capacidad de realizar la descarboxilación de más de uno de los ácidos p-hidroxicinámicos.

B. **Ácido cafeico.**

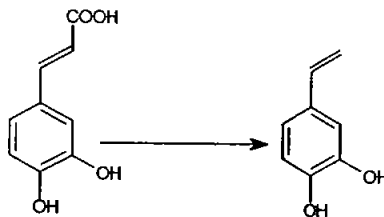


Figura 24: Ácido cafeico y el dihidroxiestireno obtenido de la descarboxilación.

Los microorganismos que son capaces de realizar la descarboxilación del ácido cafeico son los siguientes: *Breyanomyces anomalus*, *Curvularia lunata*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

*megaterium*, *E. coli* recombinante, *Klebsiella oxytoca*, *A. niger*, *A. alliaceus*, *Penicillium notatum*.

C. **Ácido ferúlico.-**

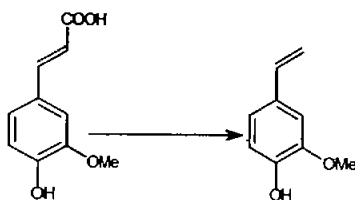


Figura 25: Ácido ferúlico y el 4-vinilguayacol

A continuación se presentan los microorganismos que pueden llevar a cabo la descarboxilación del ácido ferúlico. *Pseudomonas*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces buyanus*, *Rhodotorula sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Sporotrichum thermophile*, *Bacillus pumilus*, 33 cepas termófilas de *Bacillus sp*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Curvularia lunata*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *E. coli* recombinante, *Bretanomyces anomalus*, *Klebsiella oxytoca*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Hansenula* y CCV.

D. **Ácido sinápico.**

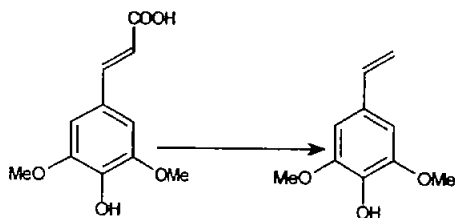
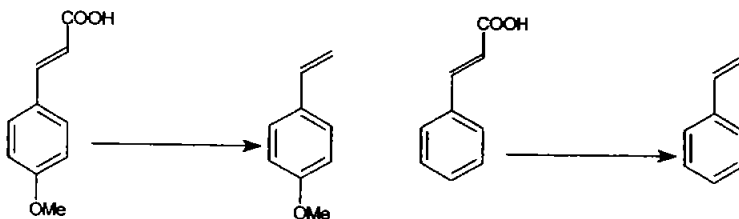


Figura 26: Ácido sinápico y se derivado descarboxilado.

Dado que este ácido ha sido muy poco estudiado no hay muchos reportes en los que se mencionen nuevos biocatalizadores empleados para la descarboxilación del ácido sinápico a su respectivo hidroxiestireno (4-hidroxi-5,3 dimetoxiestireno), pero mediante el empleo

de *Klebsiella oxytoca* se ha logrado identificar una mínima cantidad del hidroxiestireno resultante de la descarboxilación del ácido sinápico.

**E. Ácido cinámico y p-metoxicinámico.**



Figuras 27: ácido cinámico y ácido p-metoxicinámico y sus derivados descarboxilados.

Se sabe que únicamente *S. cerevisiae* es capaz de realizar la descarboxilación de los ácidos cinámico y p-metoxicinámico, al igual de otros ácidos hidroxicinámicos que no tienen libre el grupo hidroxilo de la posición 4.

**USOS DE LOS HIDROXIESTIRENOS**

Los fenoles volátiles son un grupo de compuestos con una fuerte influencia en el sabor del vino. Se ha encontrado que el 4-etilfenol y 4-etilguayacol tienen una gran aportación en el sabor de vinos rojos, mientras que 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol la tienen en vinos blancos [45]. Los fenoles derivados de los ácidos p-hidroxicinámicos son sustratos para la producción de nuevos sabores y fragancias [37]. Además de contribuir al aroma natural en vinos también lo hacen en otras bebidas fermentadas, así como en algunos alimentos [46].

Estudios sensoriales muestran que la concentración ideal de 4-vinil derivados en el vino es de aproximadamente 2mg/mL y que concentraciones arriba de 4mg/mL afectan de forma negativa la percepción del aroma. En bebidas como el café las notas de olor proporcionadas por el 4-vinilguayacol tienen importancia al resaltar el sabor condimentado de éste, pero proporciona también notas de olor humeante que son notas clave para los componentes de sabor del café, pero no participa directamente en el sabor del mismo [47]

Los usos que estos productos (hidroxiestirenos) puedan tener en los alimentos fermentados y principalmente en bebidas es extenso, sin embargo, estos compuestos tienen la inconveniencia de que cuando se encuentran presentes en altas concentraciones producen

sabores indeseables (amargos), después de cierto tiempo de almacenamiento, como en el caso del 4-vinilguayacol en el jugo de naranja [48].

Pero, más allá de la aplicación en los alimentos, los hidroxiestirenos obtenidos mediante la biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos, pueden ser procesados hasta obtener diversos polímeros insolubles similares al poli estireno, pero con algunas propiedades diferentes que pueden ser proporcionadas por los diferentes grupos -OH y -OMe que se encuentran en el anillo aromático. Lo que podría traer una nueva gama de polímeros biodegradables "naturales" por el origen "natural" de los monómeros. En la figura 28, se muestra un polímero derivado del ácido ferúlico, pero también se pueden obtener polímeros de los hidroxiestirenos obtenidos de la descarboxilación de los ácidos p-hidroxicinámicos mediante el empleo de la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*

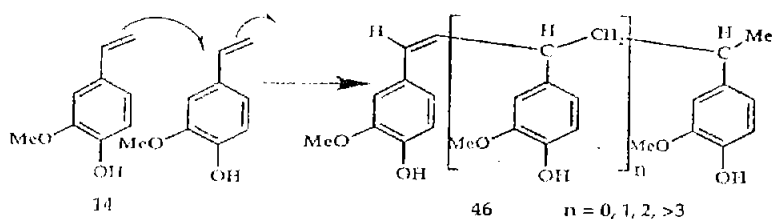


Figura 28: Polímero derivado del ácido ferúlico.

Por otro lado, se ha reportado la bioconversión para la formación de epóxidos puros a partir de un grupo de diversos compuestos derivados del estireno y empleando como biocatalizador una cepa de *E. coli* recombinante, que contienen una enzima denominada estireno-mooxigenasa, procedente de *Pseudomonas fluorescens* (ver la figura 29). La producción de estos compuestos enantioméricos puros se debe al empleo que pueden tener como auxiliares quirales y ligandos [49].

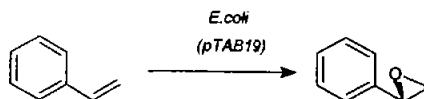


Figura 29: Formación de epóxidos enantioméricamente puros por la cepa de *E. coli* recombinante

Pero estos no son los únicos compuestos que se pueden obtener a partir del metabolismo de los hidroxiestirenos. Mediante el empleo de diversos microorganismos se pueden obtener una diversa gama de productos, los cuales pueden ser de gran interés para la

industria de los alimentos, farmacia y química. En la figura 31 se muestran algunos de los productos que se pueden obtener mediante el empleo de diversas cepas microbianas en la degradación del estireno [50].

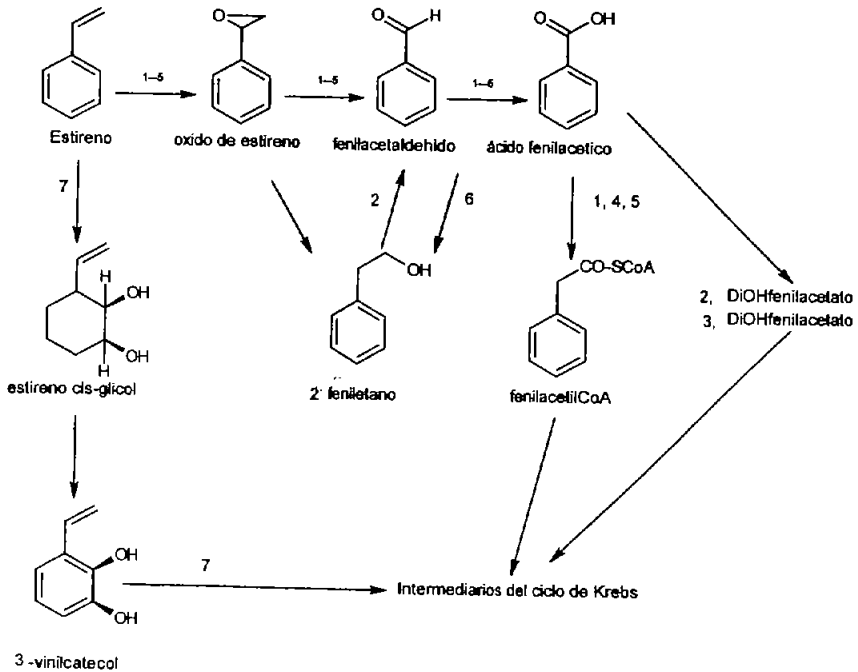


Figura 30: Resumen de rutas de la degradación del estireno. Los números se asocian con la ruta identificada con el microorganismo. 1. *P. putida* CA-3; 2. *Xanthobacter* strain 124X; 3. *Xanthobacter* strain S5; 4. *P. fluorescens* ST; 5. *Pseudomonas* sp strain Y2; 6. *Corynebacterium* strain ST-10; 7. *Rhodococcus rhoduchrous* NCIMB13269.

### OBJETIVOS

#### General

- Realizar la biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos mediante la cepa bacteriana recientemente aislada y caracterizada como *Bacillus sp* con la finalidad de obtener productos útiles en las industrias química, farmacéutica y de alimentos.

#### Particulares

- Realizar un cribado partiendo de 12 cepas microbianas y seleccionar una de éstas para realizar la bioconversión de ácidos p-hidroxicinámicos.
- Caracterizar los productos mayoritarios de la biotransformación de cada uno de los ácidos empleados.
- Realizar la cinética de bioconversión de los ácidos p-hidroxicinámicos.



### METODOLOGIA

#### Materiales y métodos

En esta parte sólo se mencionaran los equipos los equipos externos empleados principalmente en la identificación de los productos descarboxilados de los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico; mientras que los materiales y equipos empleados directamente en la investigación se mencionaran en la descripción de cada técnica empleada en este trabajo.

- Espectrómetro de Masas (MS) Hewlett-Packard 5945 A, JMS-SX102A Jeol y LMSAX505.
- Espectrómetro de RMN-<sup>1</sup>H Varian Gemini.

Para la realización de este trabajo se dividió la metodología en cinco partes. En la primera se obtuvo la materia prima (ácidos *p*-hidroxicinámicos), en la segunda se realizó la selección de la cepa bacteriana que sería empleada en la biotransformación de los ácidos, en la tercera parte, se realizó la biotransformación de los ácidos. La cuarta parte constó de la identificación de los productos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas (IR, MS, RMN <sup>1</sup>H) y la quinta y última parte constó de la cinética de biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, como se muestra en el diagrama de la pagina 33.

Diagrama de trabajo

Biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos

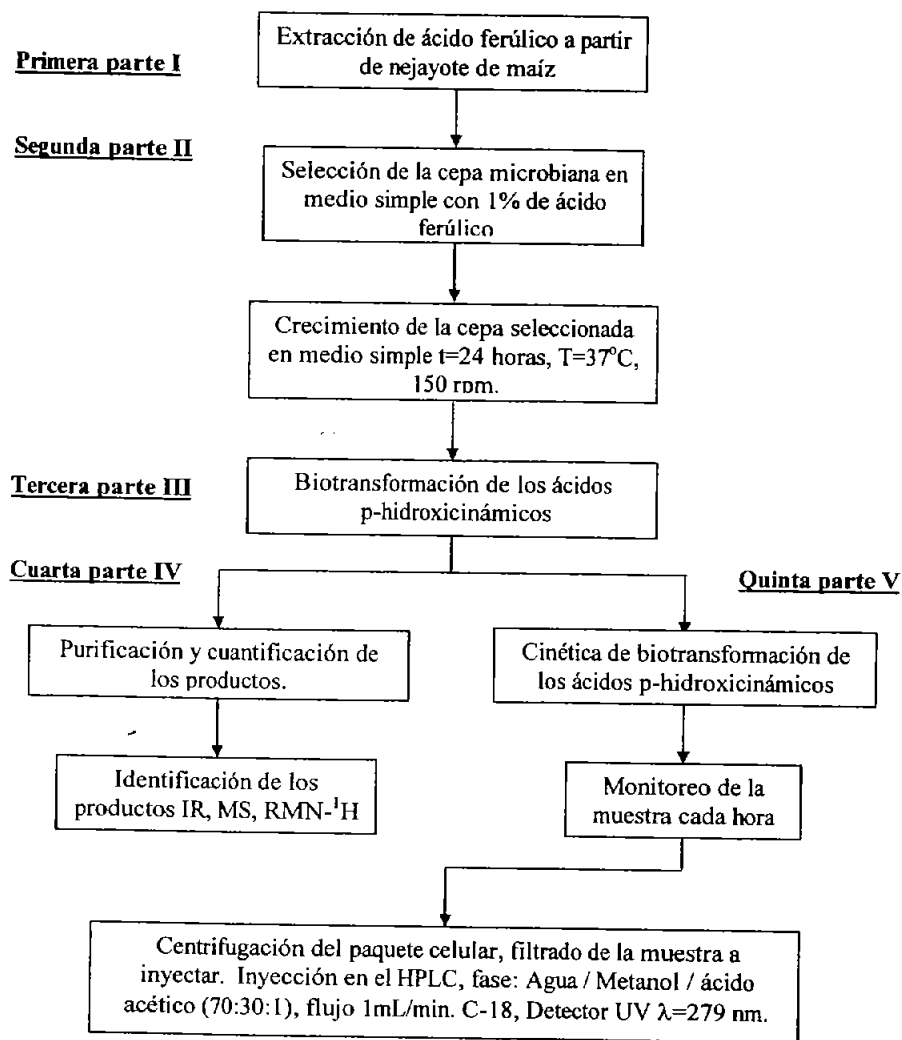


Figura 32. Diagrama general de la biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos con la cepa microbiana seleccionada.

**I. Sustratos**

**Adquisición de los ácidos p-hidroxicinámicos**

Los ácidos p-hidroxicinámicos a biotransformar fueron todos, excepto el ácido ferúlico adquiridos de la marca comercial Aldrich, calidad reactivo analítico. Todos ellos predominantes en la forma trans en un 98%. Mientras que el ácido ferúlico fue extraído a partir de nejayote de maíz.

**Extracción y purificación de ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz**

La extracción del ácido ferúlico se realizó a partir de 20L de nejayote de maíz procedente de un molino de nixtamal a los cuales se les adicionó HCl concentrado, hasta tener un pH=4 (6mL de ácido/L) y se agitó con la finalidad de extraer el ácido ferúlico. Se mantiene la agitación y posteriormente se agrega carbón activado (6g/L) para recuperar el ácido, y se continuó con la agitación durante 10 minutos más. La mezcla de carbón/nejayote fue sometida a centrifugación durante 10min / 3000 rpm en una centrifuga Beckman J12-MC. Posteriormente se realizó la separación del ácido ferúlico a partir del nejayote empleando acetato de etilo caliente, las fracciones de acetato de etilo se juntaron, secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron en un rotavapor Büchi waterbath B-841, con una temperatura de baño de 45°C y agitación de 130 rpm.

La purificación del ácido ferúlico se realizó mediante cristalización por par de disolventes (agua /acetona).

**II. Biocatalizador**

**Medios de cultivo empleados**

El medio de cultivo empleado ("mínimo") para realizar el crecimiento de las células microbianas para la biotransformación y la cinética (ver tabla 6), empleándose agar-papa-dextrosa (PDA), solo para mantener la viabilidad de la cepa elegida.

Medio de cultivo mínimo	
Componentes	Cantidad en gramos para 1L de medio líquido
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub>	0.13
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
Glucosa	5

Tabla 6: Medio "mínimo" empleado en la biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos.

**NOTA:** El medio de cultivo empleado en la selección de la cepa para la biotransformación es esencialmente el mismo que el de la tabla 6, con la diferencia de que la selección se realizó en medio "mínimo sólido" (contenía 1.5% de agar para solidificar el medio de cultivo) y una cantidad del 1% de ácido ferúlico.

### **Selección de cepa bacteriana para la biotransformación**

Se tuvo una serie de 12 cepas microbianas puras, las cuales podían ser potencialmente empleadas para la biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos, pero para ello, fue necesario sembrarlas primero en medio sólido mínimo (Ver tabla 6) el cual contenía un 1% de ácido ferúlico. De esta selección, se obtuvieron tres cepas microbianas capaces de desarrollarse en el medio empleado, siendo estas dos cepas de bacterias y una levadura.

Se eligió una bacteria del genero *Bacillus* para realizar la biotransformación de los ácidos empleados, dado que presentó una mayor rapidez en realizar la biotransformación del ácido ferúlico sobre la otra bacteria y la levadura.

La prueba de biotransformación se realizó en matraces de 250 mL Erlen-meyer uno por cada microorganismo y se tomaron cromatoplasmas (CCF y se emplearon cromatófolios Alugramasil-JV254) a diferentes tiempos durante 24 horas de incubación con el ácido.

### **III. Biotransformación**

#### **Crecimiento del microorganismo**

El microorganismo se mantuvo siempre conservado en el congelador en una solución de agua y glicérol (50:50) para mantener su viabilidad. Se sembró 24 horas antes de la bioconversión en medio mínimo, colocándose una asada en un matraz con 50 mL de medio previamente esterilizado. Se incubó a 37°C y 150 rpm, durante 24 horas en una incubadora de agitación orbital. Esta operación se realizó por triplicado en cada uno de los ácidos empleados.

#### **Biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos**

Pasadas las 24 horas de incubación se procedió a agregar el ácido p-hidroxicinámico a biotransformar (50 mg), teniendo una concentración final en el medio de cultivo de 1mg/mL. Todo el procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar para evitar contaminación por otros microorganismos.

### **Verificación de la transformación de los ácidos mediante Cromatografía en Capa Fina**

La verificación de la biotransformación de los ácidos se realizó mediante CCF, en la cual se muestran tanto al estándar del ácido como al producto obtenido de la biotransformación, después de 24 horas de incubación. Realizando primero la separación del paquete celular mediante una microcentrifuga y posteriormente realizando una extracción a partir del sobrenadante con acetato de etilo. La mezcla eluyente empleada fue de hexano:acetato de etilo 7:3.

### **IV. Purificación, identificación y caracterización de los productos**

#### **Biotransformación de ácidos p-hidroxicinámicos para la caracterización de los productos**

Para la caracterización de los productos resultados de la bioconversión de los ácidos p-hidroxicinámicos fue necesario obtener una cantidad mínima necesaria de dichos derivados. Para ello se realizó la bioconversión de 2g de cada uno de los ácidos transformados (*p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) por la cepa de *Bacillus sp.* La metodología se desarrolló de la siguiente forma: se colocaron 8 matraces de 500mL con un volumen de 250mL de medio de cultivo "simple" en los cuales, después de la esterilización se creció la cepa bacteriana colocándose los matraces en incubación (24 horas, 150rpm y 37°C), pasado este tiempo, se agregaron 250 mg del ácido a biotransformar en cada uno de los matraces. Este procedimiento se realizó con cada uno de estos ácidos.

#### **Extracción y purificación de los productos de la biotransformación**

Una vez transcurrido el tiempo de la biotransformación (24 horas para los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y 48h para los ácidos cafeico y sinápico), se procedió a separar las células mediante centrifugación (12000 rpm /10min. a una temperatura de 4°C), inmediatamente se juntó el sobrenadante (2L) y se procedió a extraer el producto mediante fracciones de acetato de etilo en embudos de separación (a razón de 3x150 mL de acetato de etilo por litro de medio libre de células). Se juntaron, secaron y concentraron las fracciones de acetato de etilo mediante el empleo de un rotavapor. El extracto crudo se pesó para conocer el rendimiento de la bioconversión. Posteriormente se procedió a purificar el producto obtenido mediante una columna cromatográfica de gel de sílice.

A continuación se describe el proceso de purificación mediante una columna cromatográfica: al extracto obtenido se le agregó celita industrial en metanol, y posteriormente se evaporó totalmente el solvente en un rotavapor hasta obtener un fino polvo. Por otro lado, a la columna se le agregó sílica gel a razón de 20 partes de sílica por una del sustrato, en una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (70:30) y se empaca la columna. Una vez lista la columna se agrega la celita con el producto adsorbido, las fracciones se colectaron en matraces de 250 mL (50 mL) por fracción. Las fracciones fueron monitoreadas mediante CCF y se juntaron las que contenían el producto de la biotransformación. Este mismo procedimiento se realizó con cada uno de los ácidos que fueron biotransformados.

### **Cuantificación química de los productos de la biotransformación**

La cuantificación química de los productos obtenidos se realizó mediante la cuantificación del crudo recuperado (el residuo obtenido de la extracción con acetato de etilo) de la biotransformación de los 2 g de cada uno de los ácidos.

## **V. Cinéticas de biotransformación**

### **Preparación de las curvas de calibración**

Se realizó una curva de calibración para cada uno de los hidroxiestirenos obtenidos de la reacción de biotransformación a la que fueron sometidos los ácidos p-hidroxicinámicos con las condiciones antes mencionadas. Se manejaron cuatro concentraciones para cada una de las curvas, inyectándose en el HPLC cada concentración por triplicado.

### **Cinética de biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos**

La cinética de biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos se realizó con la finalidad de obtener el tiempo en el cual son descarboxilados totalmente los ácidos por la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*, y se realizó de la manera que se describe a continuación: se crecieron las células en el medio de cultivo empleado, durante 24 horas bajo con las condiciones mencionadas anteriormente (37°C, 150rpm), transcurrido este tiempo, se agregó el ácido a biotransformar y se tomo nota de la hora. A la primera hora de haber agregado el ácido, se tomó la primera muestra (2mL) con una micropipeta y se colocaron en dos tubos eppendorft (1mL para c/u), teniendo un total de 6 mL (la biotransformación se realizó por triplicado), inmediatamente después se centrifugaron y se separó el paquete

celular del medio líquido, el cual fue colocado en viales tapados y colocados en refrigeración hasta el momento de su inyección en el HPLC. Se tomaron muestras continuas de 1 a 8 horas, la muestra siguiente se tomó a las 24 horas o más tiempo según se observe el ácido sin biotransformar en los cromatogramas del HPLC. Este procedimiento se realizó para cada uno de los ácidos que fueron transformados por la cepa de *Bacillus sp.*

### **Muestreo, preparación e inyección de las muestras de la cinética de biotransformación**

En cada tiempo de monitoreo de la cinética, se tomaron 2mL del medio de cultivo de cada matraz, a los cuales se les eliminaron las células mediante centrifugación, al medio libre de células se filtró a través de un filtro Millipore de 0.2 $\mu$ m; mediante un jeringa de insulina se tomó 0.2mL del filtrado e inmediatamente se inyectó y registró en el HPLC.

### **Cuantificación de los productos empleando el HPLC (cromatógrafo de líquidos de alta resolución)**

La identificación y cuantificación se realizó mediante el empleo del HPLC, de doble bomba de la marca Waters 1525, y se empleó una columna C-18 (3.9 X 300mm) de la misma marca, un detector de doble luz UV Waters 2487, que operó a una longitud de onda de 279 nm. La fase móvil utilizada fue una mezcla de Agua:Metanol:Ácido acético glacial (70:30:1), el agua y el metanol grado HPLC. El agua fue acidificada y posteriormente filtrada en un sistema Millipore con una membrana de 0.45  $\mu$  de acetato de celulosa. La fase móvil se desgasificó en un sonicador Brasonic Ultrasonic Cleaners modelo 220, durante 20 minutos. El flujo empleado fue de 1 mL/min., el volumen de la muestra inyectada fue de 20  $\mu$ L. La columna fue calentada a una temperatura de 45°C y se manejó una presión máxima en el cromatógrafo de 26000psi. Al terminó de las inyecciones la columna fue lavada con la misma fase eluyente.

### **Calculo de la concentración**

Para poder calcular la concentración de los productos obtenidos, se identificaron los tiempos de retención de cada producto, su respectiva área y la absorbancia leída para una de las inyecciones de las curvas patrón, posteriormente con los datos de área-concentración se procedió a realizar la curva correspondiente, la cual sería empleada más tarde para calcular la concentración de los hidroxiestirenos a cada tiempo de muestreo y calcular también la concentración final total del producto.

## RESULTADOS

### Extracción de ácido ferúlico

La extracción del ácido ferúlico se realizó dos veces a partir de las aguas de nixtamalización del maíz. En dichas ocasiones se partió de una cantidad de 2L, cuando se realizó la extracción a partir de 2L de nejayote estos se obtuvieron a partir de 2kg de maíz blanco, y 20L de nejayote para cada una de dichas extracciones. Los resultados se presentan en la tabla 7.

Cantidad de nejayote	Cantidad de ácido ferúlico extraído (g/L)
2L	2.12
20 L	2.13

Tabla 7: Recuperación de ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz.

### Selección de la cepa bacteriana para la biotransformación

Para realizar la selección de la cepa se partió de 12 de microorganismos previamente aislados (a partir de mucílago de café). La selección se realizó sembrando las cepas en un medio de cultivo "mínimo" con ácido ferúlico al 1% (tabla 6), en cajas petri, las cuales se incubaron durante 24 horas a 35-37°C.

Se obtuvieron tres cepas (dos bacterias y una levadura) capaces de crecer en medio mínimo con ácido ferúlico, dado que el resto de las restantes cepas microbianas no presentaron desarrollo alguno en las cajas petri de medio "mínimo" con ácido ferúlico. De las tres cepas que desarrollaron en este medio sólo se seleccionó una sola para realizar la biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos. Debido a que se debería trabajar con una sola cepa microbiana en la biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, fue necesario realizar una prueba de transformación empleando como sustrato modelo al ácido ferúlico. La prueba se realizó en matraces de 250mL con 50mL de medio uno por cada cepa, se creció la cepa en incubación durante (24 h, 150rpm, 37°C), pasado este paso, se adicionó a cada uno de los matraces 50mg de ácido ferúlico, la prueba se dio por terminada 24h después de haber agregado el ácido al medio de cultivo. Al término de la prueba se realizó el muestreo mediante CCF para verificar la bioconversión del ácido ferúlico. Con el resultado de la CCF se seleccionó una bacteriana la cual sería posteriormente identificada como *Bacillus sp.* Los criterios de discriminación empleados en la selección de esta cepa fueron principalmente: el tiempo que emplearon en la biotransformación del



ácido ferúlico, el segundo, la cantidad y variedad de subproductos que se obtenían de un mismo sustrato y el tercero, que el producto principal de la transformación no fuera posteriormente metabolizado.

La cepa seleccionada tuvo la característica de realizar una rápida descarboxilación del ácido ferúlico, proporcionando un producto principal y en un alto rendimiento mayor del 90%. Esta cepa tiene además de realizar la biotransformación la ventaja de no continuar con la transformación del producto obtenido.

### Biotransformación y de los ácidos *p*-hidroxicinámicos

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos que fueron sometidos a biotransformación mediante la cepa bacteriana de *Bacillus sp* fueron, el *p*-metoxicinámico, cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, clorogénico y se incluyó el mismo ácido cinámico, de los cuales sólo cuatro de ellos dieron reacción de transformación positiva.

El diagrama general de la reacción de descarboxilación para los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, se presenta a continuación (figura 33).

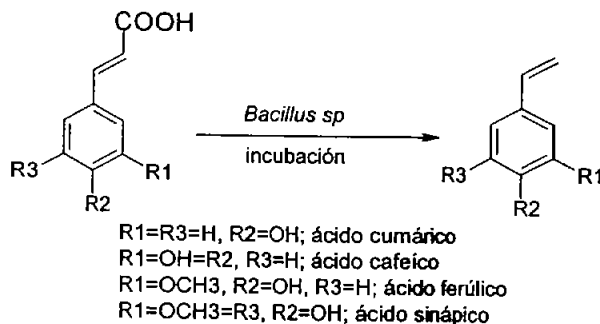


Figura 33: Diagrama general de la descarboxilación realizada por *Bacillus sp*

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos que no fueron descarboxilados por la cepa bacteriana de *Bacillus sp*, fueron el cinámico, *p*-metoxicinámico y el clorogénico.

### Cuantificación química del crudo recuperado en cada biotransformación

En la tabla 8, se resumen las condiciones de tiempo y concentración de los ácidos *p*-hidroxicinámicos, que fueron manejadas para la obtención de la cantidad mínima necesaria de los hidroxiestirenos para su posterior caracterización mediante estudios de

espectroscopia (MS, RMNH<sup>1</sup>). También se presentan los resultados de la recuperación del crudo de reacción al finalizar la biotransformación. Con base en estos resultados se procedió a realizar la cuantificación química de los productos obtenidos de la descarboxilación.

Ácido empleado (2g)	Tiempo de incubación	(g) teóricos a obtener del producto	Producto biotransformación recuperado (%)
Cumárico	24 horas	1.47	95.68
Cafeico	48 horas	1.14	26.90
Ferúlico	24 horas	1.54	71.00
Sinápico	48 horas	1.60	63.50

Tabla 8: Rendimiento final de la cuantificación química obtenido a partir del crudo de reacción recuperado.

Con base en los resultados de la primera prueba de biotransformación de los ácidos cafeico y sinápico, se eligieron tiempos de incubación de 48h para ambos ácidos, esto debido a que se verificó mediante CCF que a las 24h de incubación aún no se llevaba a cabo una buena bioconversión. Dado que los rendimientos presentados en la tabla 8 no son los reales (en cuanto a concentración real del hidroxiestireno). Debido a que sólo se realizó una cuantificación del crudo y no del producto purificado fue necesario realizar la cinética de la reacción de descarboxilación para cada uno de los ácidos transformados para conocer la concentración real de los hidroxiestirenos.

### Cinéticas de las biotransformaciones y cuantificación de los productos mediante el empleo del HPLC

Con la finalidad de conocer el tiempo al cual ya no hay más producción de los hidroxiestirenos y la concentración final total de los productos obtenidos, se realizó la cinética de biotransformación para cada uno de los ácidos que fueron descarboxilados por la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*

La tabla 9, muestra los resultados obtenidos de la cinética de biotransformación de los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico los tiempos a los cuales se tiene el mayor rendimiento de los productos descarboxilados, el calculo teórico del rendimiento a obtener, y la concentración final obtenida por ciento (%) y en miligramos de cada uno de los hidroxiestirenos. Las concentraciones finales fueron calculadas mediante la ayuda del HPLC.

Ácido	mg a biotransformar	Tiempo de incubación	mg teóricos a obtener del producto	mg reales (HPLC)	Rendimiento %
Cumárico	53.5	6 a 7 horas	39.14	38.88	99.31
Caféico	52.3	35 a 36 horas	39.62	36.85	93.00
Ferúlico	51.3	8 a 9 horas	40.078	39.65	98.93
Sinápico	50.4	72 horas	40.5	11.21	27.68

Tabla 9: Resultados de la cinética de biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos. Tiempo máximo de biotransformación y cantidad producida del hidroxiestireno encontrados para cada uno de los ácidos.

En la figura 34 se muestran los gráficos obtenidos de las cinéticas de los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico. Los puntos de cada grafico representan la concentración en miligramos (mg) del producto obtenido de la biotransformación (hidroxiestireno) a cada tiempo de muestreo, para cada uno de los ácidos p-hidroxicinámicos que fueron biotransformados por la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*

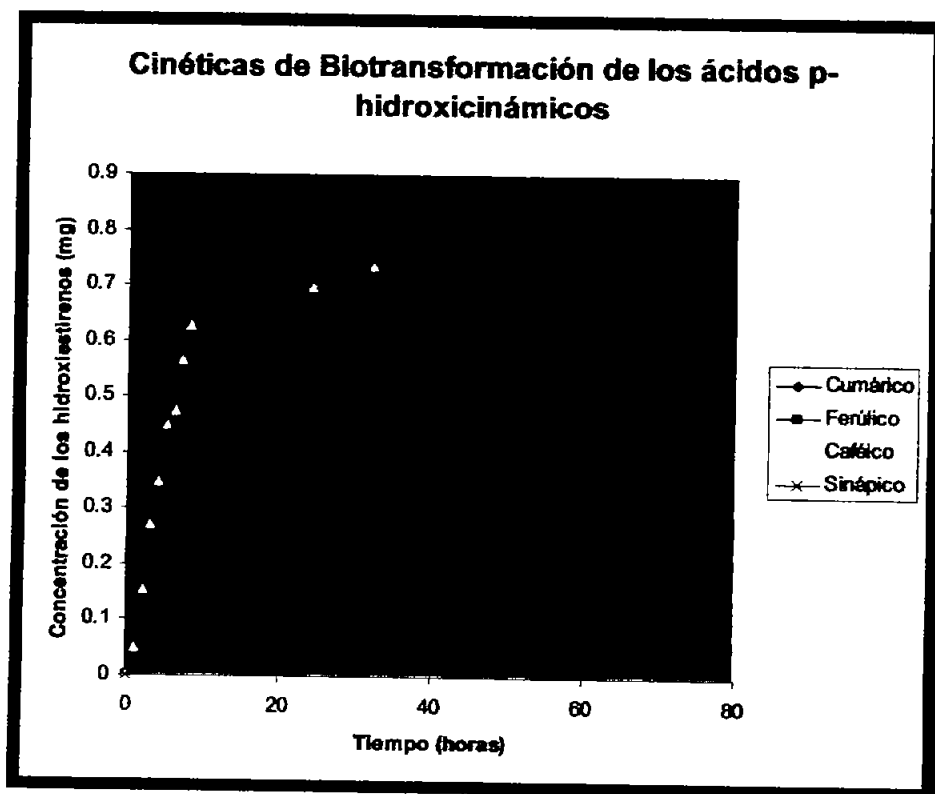


Figura 34: Cinéticas de biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos.

La cuantificación de los hidroxiestirenos, se realizó a partir de las curvas patrón previamente preparadas (Ver las curvas en el anexo 1, figuras: 37, 38, 39 y 40). La cantidad del producto en cada tiempo de muestreo y la concentración final total, se calculó mediante la extrapolación de los datos obtenidos en cada una de las inyecciones de la cinética, con los datos de las curvas ajustadas mediante regresión lineal, en las cuales se graficó, la concentración de los estándares contra absorbancia medida por el HPLC.

### Resultados obtenidos de la Espectrometría de masas y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno

En la tabla 10, se muestran los datos de la espectrometría de Masas (MS) de los hidroxiestirenos obtenidos de la descarboxilación.

Hidroxiestirenos	EM (M <sup>+</sup> ) UMA
4-hidroxiestireno	120
3, 4-dihidroxiestireno	136
4,hidoxi-3-metoxiestireno	150
4-hidroxí-3,5-dimetoxiestireno	180

Tabla 10: Datos de ión molecular obtenidos de los espectros de masas de los productos.

Los espectros de RMN ( $H^1$ ) correspondientes a los hidroxiestirenos se presentan en el anexo 2, los cuales concuerdan con los descritos en la literatura. A manera de ejemplo se comparan los del 4-vinilguayacol obtenido en este estudio, con el publicado por Karmakar y colaboradores, 2000 [51].

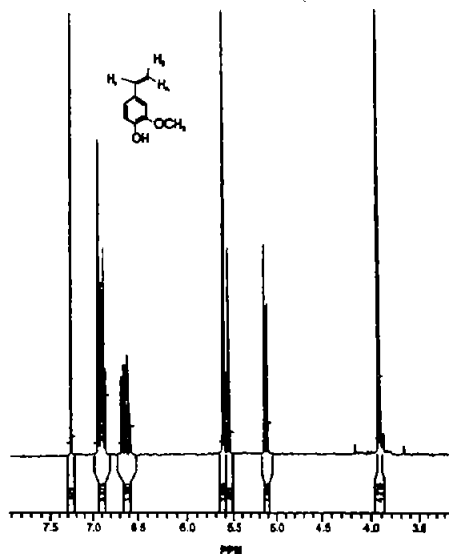


Fig. 1. <sup>1</sup>H-NMR spectra of 4-vinylcatechol.

Figura 35: Espectro de RMN <sup>1</sup>H reportado por Karmakar y colaboradores, 2000 [52].

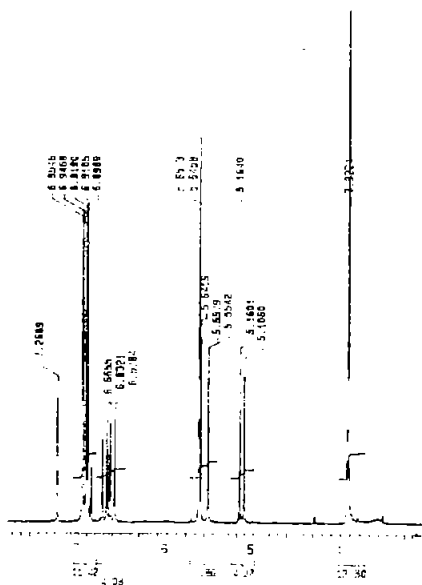


Figura 36: Espectro de RMN <sup>1</sup>H obtenido en este trabajo.

### **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

#### **Extracción de ácido ferúlico**

En la extracción del ácido ferúlico a partir del nejayote de maíz, se obtuvo un buen rendimiento, aunque menor (2.1%) al reportado por Saulnier et. al. [52] Donde mencionan que en el salvado de maíz este ácido puede alcanzar una concentración aproximada de 3% p/p., esto debido a que en la publicación anterior realizaron la extracción con la ayuda de extractos enzimáticos, lo que no se realizó en este trabajo. Sin embargo, el método de extracción empleado en este trabajo (hidrólisis alcalina) resulta ser bueno. Debido a que en la extracción realizada en el laboratorio se partió de una cantidad de 2kg de maíz y de esta cantidad se realizó la nixtamalización y separación del nejayote (2L), del cual posteriormente se realizaría extracción del ácido ferúlico; el rendimiento de extracción (2.12g/L), partiendo de los 2L, es prácticamente el mismo rendimiento (2.13) que se obtiene en la extracción partiendo de los 20L de nejayote obtenido de una tortillería.

#### **Selección de la cepa bacteriana para la biotransformación**

La selección del microorganismo adecuado se realizó después de crecer las 12 cepas en medio mínimo con 1% de ácido ferúlico. De este primer paso se obtuvieron tres cepas capaces de crecer en medio con ácido ferúlico (dos bacterias y una levadura). Fue entonces necesario realizar una última prueba de bioconversión, para seleccionar la cepa que finalmente sería empleada en la cinética y biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos.

Con base en criterios previamente definidos (ver Pág. 45-46), para realizar la selección de la cepa que finalmente se emplearía en la transformación de dichos ácidos. Se logró elegir una cepa bacteriana la cual cumplió con dichos juicios. Ésta bacteria, realizó la biotransformación del ácido ferúlico en menos de 24 horas, mientras que la segunda bacteria y la levadura sólo pudieron hacer la biotransformación de la misma cantidad de ácido ferúlico después de 48 y 72 horas respectivamente.

#### **Biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos**

Se realizó la biotransformación de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (*p*-metoxicinámico, cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, clorogénico), e inclusive el ácido cinámico, mediante el empleo de la cepa de *Bacillus sp*, como resultado se obtuvieron los derivados descarboxilados, excepto los productos de los ácidos cinámico, *p*-metoxicinámico y

clorogénico. El tiempo empleado en la reacción, y la cantidad máxima del hidroxiestireno obtenido se calculo mediante el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se ha reportado que la descarboxilación del ácido cumárico fue realizada por los microorganismos, *Pseudomonas*, *Acinetobacter calcoaceticus*, 33 cepas termófilas de *Bacillus sp*, *Curvularia lunata*, *Lactobacillus brevis*, *Bretanomyces anomalus*, *Klebsiella oxytoca*, *Saccharomyces buyanus*, *E coli* recombinante y CCV. Los cuales tienen la capacidad de realizar la descarboxilación de más de uno de los ácidos p-hidroxicinámicos. En trabajos similares a lo reportado en esta tesis, se mencionan varias cepas de a *L. plantarum*, una de las cuales (*L. plantarum* LPNC8) realiza la descarboxilación a una concentración de 1.2 mM de ácido cumárico en 2.5 hrs. de incubación [42]. En otro reporte otra cepa de *L. plantarum* realizó la descarboxilación del ácido cumárico (concentración de 100µg/mL) proporcionando un rendimiento que varía entre los 35 y 95 µg/mL, en un tiempo de incubación de 24 hrs. En este mismo trabajo se reportan una variedad de cepas de bacteria lácticas las cuales realizan la descarboxilación del mismo ácido pero emplean tiempos de hasta 80 horas de incubación para obtener un máximo del producto descarboxilado [49]. Por otro lado, *Bacillus megaterium*, realizó la descarboxilación de una concentración de 0.8mg/mL de ácido cumárico en un tiempo de 6 horas, suministrando un rendimiento del 100% de la reacción de descarboxilación [53].

Los microorganismos que se han reportado y que tienen la capacidad de realizar la descarboxilación del ácido cafeico son: *Bretanomyces anomalus* *Curvularia lunata*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *E coli* recombinante, *Klebsiella oxytoca*, *A. niger*, *A.alliaceus*, *Penicillium notatum*. En el caso del ácido cafeico no se ha encontrado reportado condiciones de concentración del ácido y el tiempo de descarboxilación.

De todos los ácidos p-hidroxicinámicos, el ácido ferúlico es el que más se ha empleado en reacciones de biotransformación. Los microorganismos que se han reportado tienen la capacidad de realizar la descarboxilación del ácido ferúlico son: *Pseudomonas*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces buyanus*, *Rhodotorula sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Sporotrichum thermopile*, *Bacillus pumilus*, 33 cepas termófilas de *Bacillus sp*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Curvularia lunata*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *L.crispatus*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *E. coli* recombinante, *Bretanomyces anomalus*, *Klebsiella oxytoca*,

*Fusarium*, *Aspergillus*, *Hansenula* y CCV. De las publicaciones más importantes acerca de la descarboxilación del ácido ferúlico se tiene el realizado por In-Young Lee y colaboradores [29], que reportaron la descarboxilación del ácido ferúlico en un sistema bifásico, donde comenzaron con una concentración inicial de 0.5g/L del ácido ferúlico y obtuvieron al término de la descarboxilación concentraciones superiores a 2g/L del 4-vinilguayacol, esto debido a la ventaja que ofrece la doble fase. El microorganismo empleado en esta descarboxilación fue *Bacillus pumilus*. Otra cepa empleada en la descarboxilación del ácido ferúlico es *Bacillus coagulans* [51], el cual realiza la biotransformación del ferúlico a 4-vinilguayacol en un tiempo máximo de 7 horas de incubación manejando una concentración de 0.1% de ácido ferúlico.

El ácido sinápico ha sido muy poco estudiado y no hay reportes en los que se mencionen nuevos biocatalizadores empleados para la descarboxilación de este ácido a su respectivo hidroxiestireno (4-hidroxi-5,3 dimetoxiestireno). Sin embargo, se ha logrado identificar una mínima cantidad (trazas) del hidroxiestireno resultante de la descarboxilación de dicho ácido mediante el empleo de *Klebsiella oxytoca* como biocatalizador [54].

De las publicaciones encontradas hasta la fecha las condiciones manejadas para la descarboxilación de estos ácidos son similares, pero lo más importante para la comparación con la cepa de *Bacillus sp*, es la concentración de estos ácidos. La mayoría de los reportes utilizan concentraciones de 1.2 a 2mM, que son menores a la concentración manejada en este trabajo de tesis la cual fue de 6.1 mM. Acerca de la biotransformación mediante la cepa de *Bacillus sp*, este microorganismo posee algunas ventajas sobre todos los antes mencionados. Primero, tiene la capacidad de realizar la descarboxilación de 4 ácidos importantes que son el cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, y esto no ha sido reportado hasta la fecha. Segundo este microorganismo no realiza una rápida transformación del producto descarboxilado y tercero, en la reacción de transformación no hay producción de subproductos, como es el caso de muchos microorganismos, que al realizar la bioconversión de cualquiera de los ácidos también producen una serie de compuestos, lo que hace que se obtenga un menor rendimiento de un producto en específico.

### **Cuantificación química del crudo recuperado en cada biotransformación**

Los resultados de la cuantificación química de la de descarboxilación fueron muy variados. Se recupero desde el 26% hasta el 95%, esto puede ser debido a las diferencias en



solubilidad en agua que presentan dichos compuestos, lo que hace que un ácido tenga una mayor disponibilidad en el medio acuoso que otro. Es probable que como el ácido sinápico es menos polar que los otros ácidos, éste se quede por más tiempo dentro de la célula y por ello se recupere una mucho menor cantidad de crudo de reacción. La cuantificación química de la transformación se llevo a cabo mediante la estimación del crudo obtenido después de la extracción con acetato de etilo. Los rendimientos presentados en la sección de resultados tabla 8 (Pág. 48) no nos indican la concentración exacta de los hidroxiestirenos, debido a que en este paso se cuantificaron los crudos y no los productos de interés (hidroxiestirenos como tal), ello implicó que se realizara la cinética para conocer la concentración final total al tiempo máximo de incubación.

#### **Cinéticas de las biotransformaciones y cuantificación de los productos mediante el empleo del HPLC**

Este reporte de tesis esta dirigido hacia la cinética de biotransformación de los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, que al ser incubados en condiciones controladas (temperatura, pH, agitación) con la cepa de *Bacillus sp*, los productos obtenidos de la reacción de bioconversión fueron los derivados descarboxilados de cada uno de estos ácidos.

El ácido *p*-cumárico fue el que requirió un menor tiempo de incubación (en un medio de cultivo con un crecimiento bacteriano de 24 hrs. de incubación en medio simple sin ácido alguno, ver tabla 8) y del cual se obtuvo la mayor concentración del hidroxiestireno. El ácido ferúlico fue el segundo ácido más rápido en ser transformado. Para estos dos ácidos el tiempo requerido para ser descarboxilado fue de 7 y 9 horas respectivamente obteniéndose en ambos casos, concentraciones de los hidroxiestirenos superiores al 95%. Para el ácido cafeico el tiempo requerido fue de 36 horas de incubación proporcionando una concentración del hidroxiestireno del 93%. Mientras que el ácido sinápico no fue descarboxilado en su totalidad, sin embargo, sí se obtuvo un buen rendimiento (27 %), en comparación con lo publicado por Hashidoko y Tahara, 1998 [54], donde reportaron haber encontrado trazas de dicho producto.

Por otro lado, sí se han reportado trabajos en los cuales se realizó un estudio cinético de la descarboxilación de algunos ácidos *p*-hidroxicinámicos, como el presentado por Donaghy y colaboradores, 1999 [48], en el cual reportaron una cinética de

biotransformación del ácido ferúlico mediante el empleo de una levadura (*Candida lambica*) obtenida de una muestra de jugo de manzana que no fue pasteurizado. La biotransformación ocurrió en un buffer de pH 6 y con una cinética de hasta 50 horas de incubación. Se empleó una concentración de 2 mg/mL de ácido ferúlico (disuelto en agua:metanol), la incubación se llevó a cabo a 27°C con agitación y se tomaron muestras cada 2 horas, obteniéndose un máximo de 310µg/mL después de 40 horas de incubación. En nuestro caso, no se utilizó buffer alguno en la reacción de descarboxilación mediada por la cepa de *Bacillus sp.*, y se empleó únicamente una concentración de 1mg/mL de ácido ferúlico, pero el tiempo de la máxima producción del producto descarboxilado es mucho menor (alrededor de 9 horas de incubación), que el reportado por Donaghy y colaboradores, 2000 [48], lo cual indica que la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*, aislada en el laboratorio de trabajo, tiene una mejor capacidad de realizar la descarboxilación que la levadura *Candida lambica*, dado que en el tiempo que ellos reportaron es más de 4 veces superior al reportado en este trabajo, aún cuando la concentración del ácido empleada es del doble, lo que hace a la cepa de *Bacillus sp.*, más eficiente para la descarboxilación del ácido ferúlico y esta misma cepa tiene la capacidad de realizar la descarboxilación de tres ácidos p-hidroxicinámicos más (cumárico, cafeico y sinápico), mientras que para la levadura no se reporta reacción de descarboxilación sobre otro de los ácidos p-hidroxicinámicos.

Ha sido reportada también, una cepa bacteriana de *Bacillus coagulans*, (Karmakar y colaboradores, 2000 [51]), la cual realizó la descarboxilación del ácido ferúlico en 7 horas de incubación, pero en este reporte se utilizó una concentración de 0.1% (10 veces menos que la empleada en este trabajo de tesis) de ácido ferúlico en el medio de cultivo, usaron también un buffer de pH 7 (Tris-HCl), mientras que para este trabajo se manipuló una concentración de 1% de ácido ferúlico (en general de todos los ácidos empleados,) y como se mencionó antes en nuestro trabajo no se empleó buffer alguno.

Un trabajo más que presenta un estudio cinético de la biotransformación ácidos p-hidroxicinámicos (ferúlico y cumárico), es el reportado por Van Beek y Priest, 2000 [55], donde presentan varios gráficos de la reacción de descarboxilación realizada por mezclas de microorganismos (ya sea levaduras o bacterias lácticas) y los tiempos de biotransformación son muy altos (los cuales fluctúan alrededor de las 75 horas de incubación) comparados con los tiempos obtenidos para estos mismos ácidos en este trabajo.

Sin embargo, en su mayoría los trabajos reportados sobre descarboxilación de ácidos p-hidroxicinámicos no presentan cinéticas de bioconversión de dichos ácidos. Muchos trabajos de este tipo tienen un enfoque dado hacia la actividad enzimática o la caracterización de la enzima responsable de realizar dicha reacción más que a la cinética de biotransformación de dichos ácidos, como el trabajo realizado por Barthelmebs y colaboradores 2000 [41], Degrassi y colaboradores 1995 [42], en donde se enfocan mucho más hacia la actividad enzimática, aún cuando realizan un monitoreo a diferentes tiempos de la incubación de los ácidos cumárico y ferúlico en presencia de los microorganismos empleados. En algunos reportes como el presentado por Torres y Rosaza 2001 [53], sólo mencionan el tiempo de incubación al que se colocaron las muestras de los ácidos y los microorganismos responsables.

### **Resultados de la Espectrometría de Masas y de la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.**

Los datos obtenidos de la espectrometría de masas para cada uno de los hidroxiestirenos corresponden; propiamente el ión molecular corresponde con el peso molecular de cada una de las moléculas (hidroxiestirenos) identificadas.

Por otro lado, los datos de  $RMNH^1$  para el 4-vinilguayacol corresponden los datos reportados por Karmakar y colaboradores, 2000 [51]. Mientras, que la identificación de los hidroxiestirenos derivados del ácido cumárico, cafeico, y sinápico coinciden con los datos reportados por Yasuyuki y Satoshi, 1998 [54].

### CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó de manera exitosa y con buen rendimiento la extracción del ácido ferúlico a partir del nejayote de maíz.
- ✓ Fue seleccionada una cepa bacteriana a partir de doce cepas posibles e identificada posteriormente como *Bacillus sp.*, capaz de realizar la descarboxilación de cuatro ácidos p-hidroxicinámicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico).
- ✓ La cepa de *Bacillus sp.* sólo requiere de condiciones simples de desarrollo e incubación (medio "simple", 37°C, 150 rpm) para que realice la descarboxilación de los ácidos p-hidroxicinámicos.
- ✓ Se obtuvo una rápida y eficiente biotransformación de los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico, realizada por la cepa bacteriana de *Bacillus sp.*
- ✓ Para el caso del ácido sinápico se obtuvo un rendimiento en la descarboxilación del 27%, que es muy favorable, dado que en reportes anteriores se han obtenido únicamente trazas del producto descarboxilado.
- ✓ Fueron identificados mediante técnicas de espectrometría los productos obtenidos en la biotransformación de cada uno de los ácidos hidroxicinámicos, siendo estos los derivados descarboxilados de cada ácido correspondiente.
- ✓ Se realizó la cinética de biotransformación para cada ácido descarboxilado, con la finalidad de conocer el tiempo al cual se obtienen la mayor producción de los hidroxiestirenos de los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico. En el caso del ácido sinápico se observó que después de 72 horas de incubación ya no es producida una mayor cantidad del hidroxiestireno.

### RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere se realice la biotransformación de otros ácidos hidroxicinámicos diferentes a los empleados en este trabajo, para tener un reporte más completo de la capacidad del microorganismo para realizar la descarboxilación de estos ácidos.
- ✓ Se recomienda evaluar los diferentes parámetros que intervienen en la biotransformación del ácido sinápico, como son la concentración de ácido en el medio de cultivo, manejar diferentes temperaturas y velocidades de agitación, tiempo de incubación, así como también la posibilidad de realizar una biotransformación en doble fase para obtener un rendimiento mayor del hidroxiestireno de este ácido.
- ✓ La cepa de *Bacillus sp* tiene la capacidad de realizar la biotransformación de una concentración mayor a 50 mg/mL de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico. Por ello, se sugiere encontrar la concentración adecuada para una mayor producción de los hidroxiestirenos correspondientes.
- ✓ Para una producción en mayores cantidades de los hidroxiestirenos se recomienda el aislamiento, clonación y sobre expresión de la o las enzimas responsables de la descarboxilación de estos ácidos.

**Bibliografía**

- [1] Ibrain, R.; Barron, D. In: Dey, PM.; Harnone, JB,eds. *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1989, 75-111
- [2] Packer, Lester, Midori Hiramatsu, Toshikozy Yoshikawa. Capitulo 18. Antioxidant food supplements in human health. Academic Press, 1999
- [3] G. Gross, George. Plant Polyphenols 2 *Chem., Biology, Pharmacology, Ecology* 1999, 2, 482-494.
- [4] Nashielly, Paola T. M. Recuperación y biotransformación del ácido ferúlico. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.f., 2001
- [5] Fritz, Ullman. Enciclopedia de química industrial. Sección III, tomo IV. Segunda edición. Barcelona España. Pág. 89, 727-729.
- [6] Shopova N., Ts. Milkova. Thermal decomposition of Cholesteryl esters of cinnamic acid derivatives and their effect on the  $\alpha$ -tetrahydroperoxy free-radical-induced decomposition. *Thermochimica Acta* 2000, 356, 101-107.
- [7] Chamkha, Mohamed, Bharat K. C. Patel, Jean-Louis Garcia and Marc Labat. Isolation of *Clostridium bifermentans* from oil mill wastewaters converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of the species. *Anaerobe*, 2001, 7, 189-197
- [8] B. Barolomé, M Santos, J. J. J Jiménez, M. J del Nozal and C. Gómez-Cordovés. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of cereal science*, 2002, 36, 51-58.
- [9] T. B. T. Lam, K. Kadoya, K. Liyama. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*. 2001, 57, 987-992.
- [10] Saija, Antonella, Antonio Tomaino, Domenico Trombetta, Anna De Pasquale, Nicola Uccella, Tony Barbuzzi, Donatella Paolino, Francesco Bonina. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000, 199, 39-47
- [11] Pedrosa, M. Mercedes, Muzquiz Mercedes, Concepción Garcia-Vallejo, Carmen Burbano, Carmen Cuadrado, Gemma Ayet and Luz M. Robledo. Determination of caffeic and Chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *J. Sci. Food Agric*. 2000, 80, 459-464

- [12] Cheetham; Peter S. J., Banister; Nigel E. United States Patent. 424/60,59 560/38,60,75. 1995 pp 7-17
- [13] Craig, Faulds Belinda Clarke & Gary Williamson Ferulic acid unearthed. *Chemistry in Britain* 2000, 48-50.
- [14] Loughlin, Wendy A. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource technology*, 2000, 74, 49-62.
- [15] Santamaria. A., Sergio A. Biotransformación del ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis licenciatura, Facultad de Química de la UNAM, México D.F.
- [16] Shiyi, Ou and Kin-Chor Kwok. Review ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications foods. *Journal of science of food and agriculture*. 2004, 84, 1261-168.
- [17] Hiroe Kikazaki, Masashi Hisamoto, Kanae Hirose, Kayo Ariyama, and Hisaji Tamiguchi. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food chem.* 2002, 50, 2161-2168.
- [18] Saulnier L. Marot, C. Elgorria M., Bonnin E. Thibault J.-F. Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. *carbohydratesPolymers*. 2001, 45. 269-275.
- [19] DellaGreca, Marina. Gabriele Pinto, Antonio Pollio, Lucio Previtiera and Favio Temussi. Biotransformation of sinapic acid by green algae *Stichococcus bacillaris* 155LTP and *Antikistrodesmus braunii* C202.7a. *Tetrahedron Letters*. 2003, 44, 2779-2780
- [20] R. Price, Keith. Francesco Casuscelli, Ian J. Colquhoun and Michael J. C. Rhodes. Hydroxycinnamic acid esters from broccoli florest. *Phytochemistry*. 1997, 45, 1687- 1687
- [21] P. B. Andrade, R. Leitão, R. M. Seabra, M B. Oliveira & M. A. Ferreira. 3, 4-dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea arabica*. *Food chemistry*. 1998, 61, 511-514
- [22] Hideky Mori, Kunihiro Kawabata, Kengo Matsunaga, Jun Ushida, Keiko Fujii, Akira Hara, Takuji Tanaca and Hiromichi Murai. Chemopreventive effects of coffee and rice constituents on colorectal carcinogenesis. *Biofactors*. 2000, 12, 101-105
- [23] Guerrero, G. and M. Suárez. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. *J. Agric. Food chem.* 2001, 49, 2454-2458

- [24] Chin-Long Ky, Michel Noirot, and Serge Hamon. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea sp.*). *J. Agric. Food chem.* **1997**, 45, 786-790
- [25] Kurt Faber. Biotransformations in organic chemistry. Textbook 4<sup>th</sup> edition. Ed Springer. **1999**.
- [26] Lomasco, Anne. Christelle Stentelaire, Marcel Asther and Laurence Lesage-Meessen. Basidiomycetes as a new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. Focus
- [27] Aguilar Leyte Leticia. Obtención de talidomida mediante biotransformaciones con *S. cerevisiae*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química de la UNAM, México D.F.
- [28] Aleksey, Zaks and David R. Dodds. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *DDT*, **1997**, 2 No. 12.
- [29] In-Young Lee, Timothy G. Volm, and John P. N. Rozzasa. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*. **1998**, 23, 261-266
- [30] Hahlbrock K. K and H. Grisebach. Formation of coenzyme A esters of cinnamic acids with an enzyme preparation from cell suspension cultures of parsley. *FEBS LETTERS* **1970**, 11, 62-64.
- [31] Yasuko Sakihama, Ryoko Tamaki, Hisashi Shimoji, Toshio Ichiba, Yukiharu Fukushi, Satoshi Tahara, Hideo Yamasaki. Enzymatic nitration of phytohenols: evidence for peroxynitrite-independent nitration of plant secondary metabolites. *FEBS LETTERS*. **2003**, 553, 377-380.
- [32] Ebel J. and H. Grisebach. Reduction of cinnamic acids to cinnamyl alcohols with an enzyme preparation from cell suspension cultures of soybean (*Glycine Max*). *FEBS LETTERS*. **1973**, 30, 141-143.
- [33] Eyke C.D. van den Ban, Hendra M. Willems, Hans Wassink, Colja Laane, Hubb Haaker. Bioreduction of carboxylic acids by *Pyrococcus furiosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. **1999**, 25, 251-257.
- [34] Rosazza, JPN. Z Huang, L Dostal, T Volm and B. Rousseau. Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product *J. ind. Micro.* **1995**, 15, 457-471



- [35] Carunchio, Federica., Carlo Crescenzi, Anna Girelli, Antonella Messina, Anna Maria Tarola. Oxidation of ferulic acid by lacase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta*, **2001**, 55, 189-200.
- [36] Matsumoto, Keiji. Hironobu Takashi, Youko Miyake and Yoshiyasu Fukuyama. Convenient syntheses of neurotropic americanol A and isoamericanol A by HRP catalyzed oxidative coupling of caffeic acid. *Tetrahedron letters*. **1999**, 40, 3185-3186
- [37] Ago, Shoji, Kikuchi, Yasuhiro. United States Patent. 426/,11,29,49,52,62,592. **2002**
- [38] Duncan A. N Edlin, Arjan Narbad, Michael J. Gasson, J. Richard Dickinson and David Lloyd. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Bretanomyces anomalus*. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 22, 232-239.
- [39] Cavin, Jean-Francois., Veronique Dartois and Charles Diviés. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **1998**, 64, 1466-1471
- [40] Cavin, Jean-Francois. Lise Barthelmebs, Jean Guzzo, Jozef Van Beeumen, Bart Samy, Jean-Francois Travers, Charles Diviés. Purification and characterization of p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS microbiology letters*. **1997**, 147, 291-295
- [41] Barthelmebs, Lise., Charles Diviés, and Jean-Francois Cavin. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 3368-3375
- [42] Degrassi, Guiliano., Patrizia Polverino De Laureto, and Carlo V. Bruschi. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **1995**, 61, 326-332
- [43] Zago, Annaza., Guiliano Degrassi, and Carlo V. Bruschi. Cloning, sequencing, and expresión in *E coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase. *Applied and Environmental Microbiology*. **1995**, 61, 4484-4486
- [44] Takemoto, Masumi., and Kazuo Achiwa. Synthesis of styrenes through the decarboxylation of trans-cinnamic acids bay plant cell cultures. *Tetrahedron Letters*. **1999**, 40, 6595-6598

- [45] Dias L., S. Dias, T. Sancho, H. Stender, A. Querol, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro. Identification of yeast isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food microbiology*. **2003**, 20, 567-574
- [46] Barthelmebs, Lise., Charles Diviés, and Jean-Francois Cavin. Expression in *Escherichia coli* of native and chimeric phenolic acid decarboxylases with modified enzymatic activities and method screening recombinant *E. coli* strains expressing these enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. **2001**, 67, 1063-1069
- [47] Dorfner, Ralph., Thomas Ferge, Antonius Kettrup, Ralf Zimmermann and Chahan Yertzian. Real-time monitoring of 4-vinylguaiacol, guaiacol, and phenol during coffee roasting laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food chem.* **2003**, 51, 5768-5773
- [48] A. Donaghy, John., Paul Kelly and Alan McKay. Conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 453-456
- [49] Bernasconi, Silvana., Fulvia Orsini, Guido Sello, Andrea Colmenga, Enrica Galli and Guiseppina Bestetti. Bioconversión of substituted styrenes to the corresponding enantiomerically pure epoxides by a recombinant *Escherichia coli* strain. *Tetrahedron letters*. **2000**, 41, 9157-9161
- [50] Niall D. O'Leary, Kevin E. O'Connor, Alan D. W. Dobson. Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiology reviews*. **2002**, 26, 403-4017
- [51] Karmakar B., R.M. Vohra, H. Nandanwar, P. Sharma, K.G. Gupta, R.C. Sobti. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by newly isolated strain of *Bacillus coagulans* *J of Biotechnology*. **2000**, 80, 195-202
- [52] Saulnier L., Marot C., Elgorria M., Bonnin, Thibault J.-F. *Carbohydrate polymers*. **2001**, 45, 269-275.
- [53] L. Torres, Janelle., y Torres and John P. N. Rozzasa. Microbial transformations of p-cumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *J Nat. Prod*. **2001**, 64, 1408-1414

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [54] Hashidoko, Yasuki., and Satoshi Thara. Stereochemically specific proton transfer in decarboxylation of 4-hidroxicinnamic acids by 4-hidrixicinnamate decarboxylase from *Klebsiella oxytoca*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1998**, 15, 225-230
- [55] Van Beek, Silvie., and Fergus G. Priest. Decarboxilation of substituted cinnamic acids by lactic bacteria isolated duraing malt whisky fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 5322-5328

**Identificación de la cepa microbiana mediante secuenciación por PCR de la región V1 del gen ARN 16S**

La cepa fue sembrada en caja petri en medio MRS y se incubaron durante 24 h. a 36°C. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de acuerdo con la técnica reportada por Lawson y cols. (1989)

Se colocaron 500µL de amortiguador TES en tubos eppendorf. Se tomó muestra con asa estéril (aproximadamente del tamaño de un grano de arroz) de la caja petri y se depositó en algunos tubos. A continuación se adicionaron 20µL de solución de lisozima [20µg. µL<sup>-1</sup>] y se incubaron a 37 °C durante 15 min. o hasta visualizar viscosidad. En seguida se adicionaron 8µL de solución de pronasa [10µg. µL<sup>-1</sup>] y 8µL de RNAsa [20µg. µL<sup>-1</sup>] a cada tubo eppendorf, se agitaron las muestras y se incubaron a 65°C por espacio de 1h. Se les adicionó posteriormente 120µL de SDS al 10% a los tubos y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y se les adicionó 600µL de solución de fenol:cloroformo (25:24), se agitan vigorosamente hasta obtener una emulsión blanca. A continuación se centrifugaron durante 10min. a 14000 rpm. Se obtuvieron 3 capas, se extrajo la primera y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. Se adicionó 1mL de etanol absoluto y se agitó suavemente cada muestra. En seguida se centrifugaron las muestras durante 10min. a 10000 rpm. Inmediatamente se retiró el sobrenadante con micropipeta y se dejó que secan los precipitados. Luego se resuspendieron en 50µL de agua des-ionizada estéril y después se congelaron a -21°C. Finalmente se comprobó la calidad de la extracción de ADN de la cepa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (wt/Vol) y amortiguador TEB [1X], y fue revelada con una solución de bromuro de etidio [10µL/mL] y observada a través del Fluor-S (BIORAD).

**Amplificación por PCR de la región V1 del gen ARN 16S**

Se amplificó aproximadamente la mitad del gen de ARNr 16S utilizando los cebadores 3 y PA para bacterias (tabla 1) por PCR bajo las condiciones mostradas en las tablas 2 y 3, utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400.

Primer	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Hacia delante
γ	ACTGCCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia delante

Tabla 1: Cebadores para PCR en este estudio.

Componente	Volumen	Concentración en la reacción
Amortiguador para PCR 10X	10 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ L	50 Mm
dNTPs	2 $\mu$ L	10 mM
Primer 3	1 $\mu$ L	20 pmol/ $\mu$ L
Primer A	1 $\mu$ L	20 pmol/ $\mu$ L
Templado	10 $\mu$ L	10 ng/ $\mu$ L
Taq polimerasa	2 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
Agua destilada	Para 100 $\mu$ L	-----

Tabla 2: Protocolo para amplificación por PCR del fragmento pA-3

Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min.
34	94°C	1 min.
	65°C	1.30 min.
	72°C	2 min.
2	72°C	15 min.

Tabla 3: Condiciones de PCR para el termociclador.

Se visualizaron los productos del PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se revelaron con una solución de bromuro de etidio [10 $\mu$ L/mL] y se observaron a través del Fluor-S (BIORAD).

#### Limpieza de los productos de PCR de la cepa pura

Los productos de PCR de la cepa pura fueron purificados utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen

### Secuenciación

Posteriormente los productos de PCR que incluyeron la región hiperviable VI, de enviaron a secuenciar con el primer gama ( $\gamma$ ) (tabla 4) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las condiciones requeridas para la secuenciación se muestran en la tabla 4.

	Concentración	Volumen
Muestra cepa	20 ng/ $\mu$ L	$\mu$ L
Primer gama ( $\gamma$ )	20 pm/ $\mu$ L	$\mu$ L

Tabla 4: Condiciones para secuenciar la cepa pura.

### Comparación de las secuencias

La base de datos utilizada para comparar la secuencia de la cepa bacteriana fue el National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>) utilizando los servicios de BLAST. De esta manera se caracterizó al microorganismo seleccionado para la realización de la biotransformación de los ácidos p-hidroxicinámicos.

### Curvas patrón de los hidroxiestirenos

A continuación se muestran las curvas patrón empleadas para realizar los cálculos de la concentración final total de cada uno de los hidroxiestirenos.

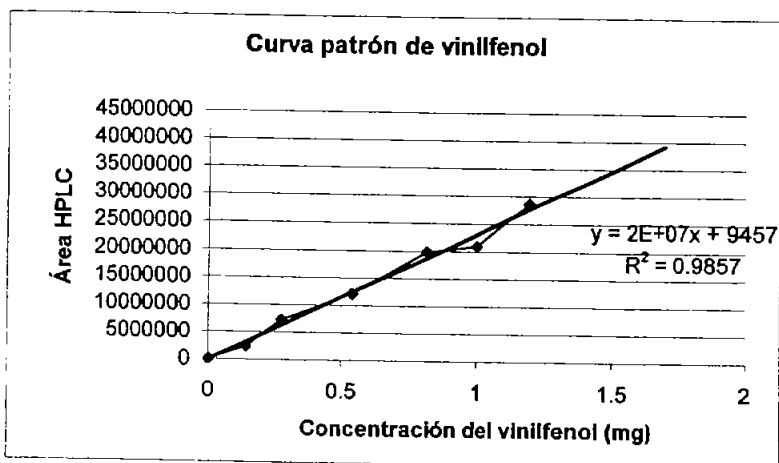


Figura 37: Curva patrón empleada para calcular la concentración del 4-vinilfenol

La figura anterior muestra los datos obtenidos de la curva patrón del 4-vinilfenol que es el producto obtenido de la descarboxilación del ácido cumárico.

En la siguiente figura se muestra la curva patrón del 3-hidroxivinilfenol (producto descarboxilado del ácido cafeico). Esta fue empleada en el cálculo de la concentración del vinilcafeico de la cinética de biotransformación.

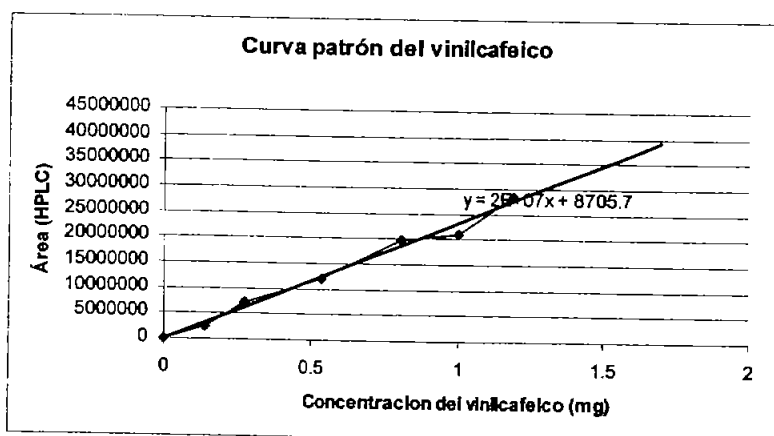


Figura 38: Curva patrón empleada para calcular la concentración del vinilcafeico.

La figura que se muestra a continuación es la curva patrón empleada del 4-vinilguayacol empleado calcular la concentración del mismo producto a los diferentes tiempos de muestreo y la concentración de este producto en la biotransformación del ácido ferúlico.

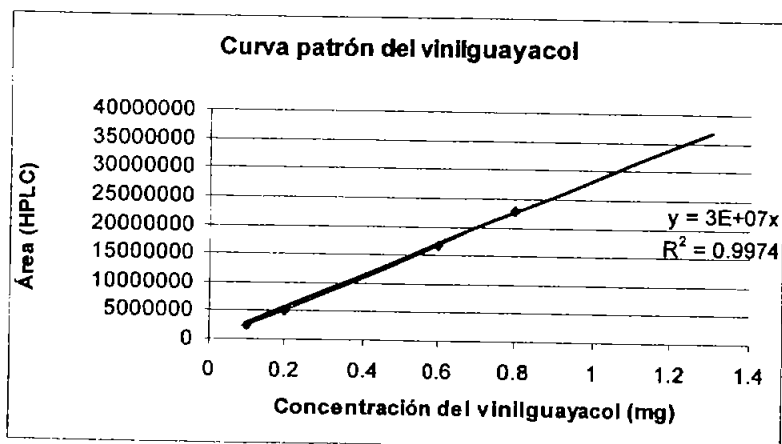


Figura 39: Curva patrón empleada para calcular la concentración final total del 4-vinilguayacol

La siguiente figura muestra la curva patrón del vinilsinápico realizada para poder calcular la concentración final del producto descarboxilado del ácido sinápico al término de la biotransformación de este ácido.

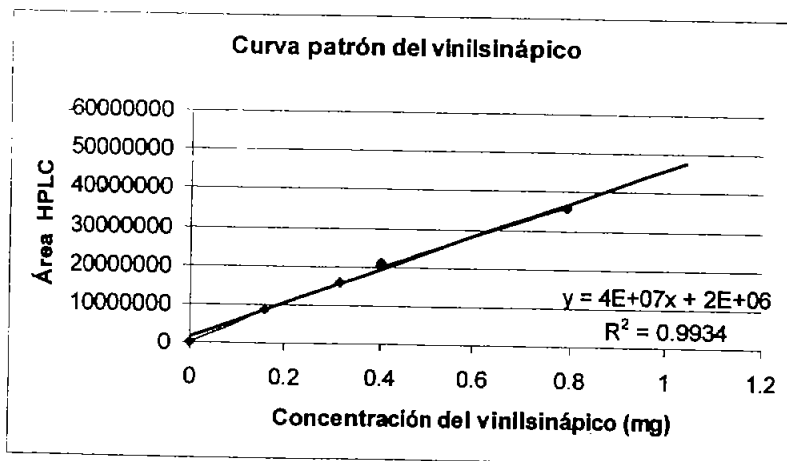


Figura 40: Curva patrón empleada para calcular la concentración del vinilsinápico

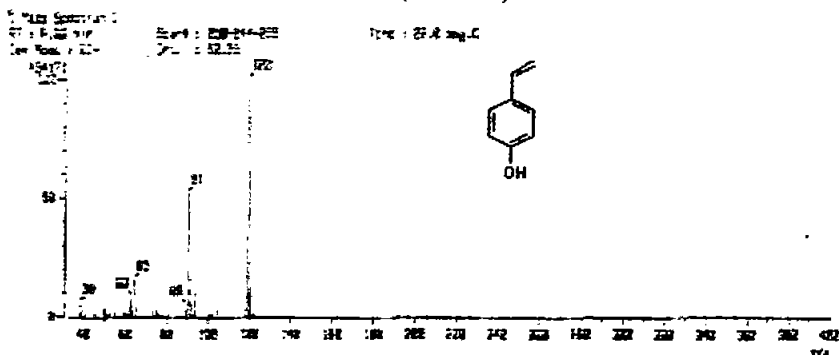
Las concentraciones de las curvas patrón fueron inyectadas por triplicado para tener curvas más confiables.



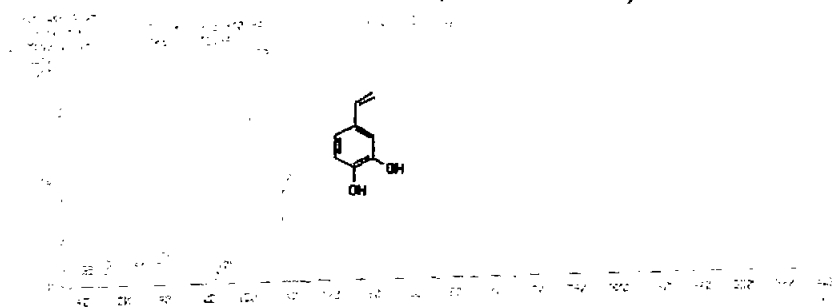
ESPECTROS DE MASAS Y RMN<sup>1</sup>H

## Parte 1: espectros de masas

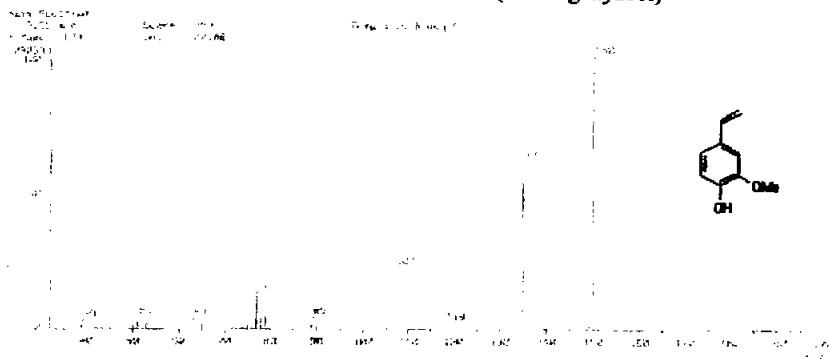
## Espectro de masas del 4-hidroxiestireno (vinilfenol)



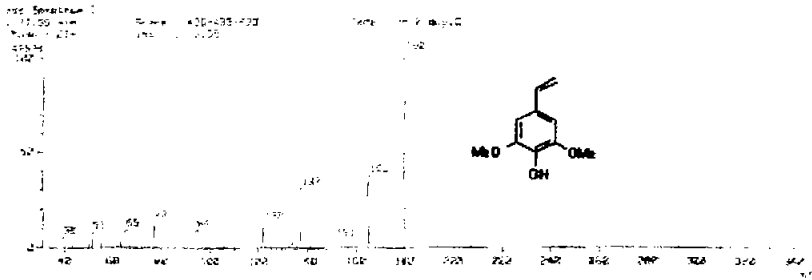
## Espectro de masas del 3,4-dihidroxiestireno (3-hidroxivinilfenol)



## Espectro de masas del 4-hidroxi-3-metoxiestireno (4-vinilguayacol)

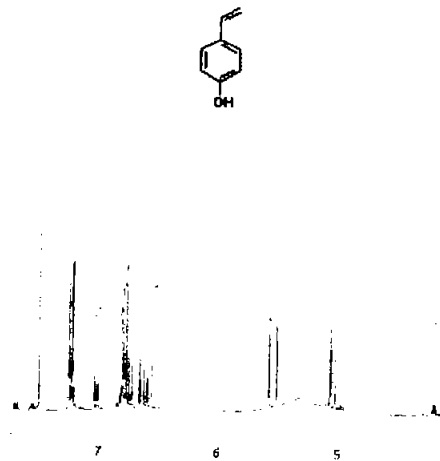


**Espectro de masas del 4-hidroxi-3,5-dimetoxiestireno**

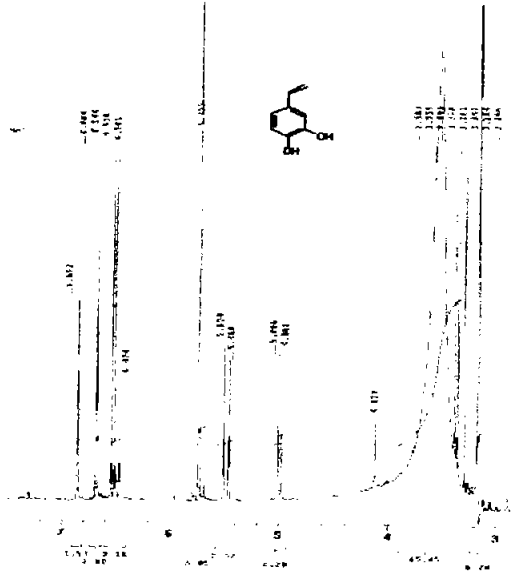


**PARTE 2: ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup>H**

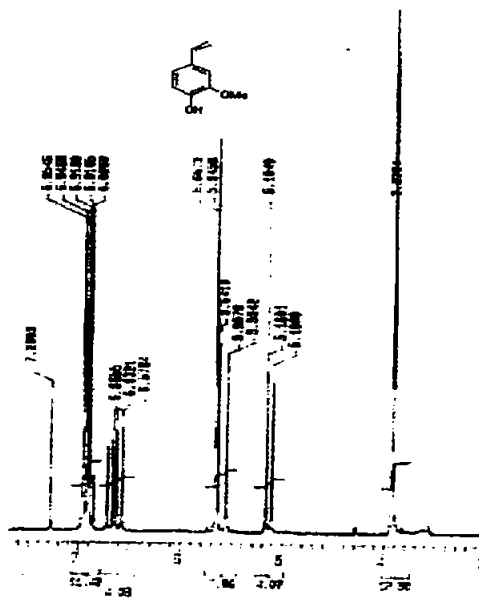
**Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 4-hidroxiestireno**



Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 3,4-dihidroxiestireno



Espectro RMN <sup>1</sup>H del 4-hidroxi-3-metoxiestireno



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 4-hidroxi-3,5-dimetoxiestireno