

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Ensayo de la reacción de esterificación enzimática de los ácidos cinámico-ferúlico y sus dehidro-derivados con ácido láctico”

Tesis
que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Bioquímicas)
presenta

Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Tutor: Dr. Arturo Navarro Ocaña

México, D. F., 2006



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.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Biocatálisis	5
1.2 Lipasas	12
1.2.1 Características y aplicaciones	12
1.2.2 Enzimas en Solventes Orgánicos	16
1.3 Ácidos cinámicos	19
1.3.1 Generalidades	19
1.3.2 Ácidos hidróxicinámicos y su esterificación enzimática	25
1.3.3 Derivados esterificados con α -hidroxiácidos	31
OBJETIVOS	33
Objetivo General	33
Objetivos Particulares	33
2. METODOLOGÍA	34
2.1 Plan de trabajo	34
2.2 Enzimas	35
2.3 Sustratos	35
2.4 Hidrólisis de ésteres	36
2.5 Ajuste de A_w	36
2.6 Reacciones de esterificación enzimática	36
2.6.1 Esterificación con alcoholes	36
2.6.2 Esterificación de ácido láctico y ácido oleico	37
2.6.3 Esterificación con ácido láctico	37
2.7 Análisis y monitoreo de las reacciones	37
2.7.1 Cromatografía en Capa Fina	37
2.7.2 Cromatografía de líquidos	38
2.8 Caracterización química de los productos	38
2.8.1 Espectros seleccionados	39

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 Estrategia general	41
3.2 Hidrólisis de ésteres	41
3.3 Reacciones de esterificación enzimática	43
3.3.1 Esterificación con alcoholes	43
3.3.1.1 Reacciones con ácido cinámico	43
3.3.1.2 Reacciones con ácido hidrocinámico	49
3.3.1.3 Reacciones con ácido ferúlico y su derivado hidrogenado	53
3.3.2 Esterificación con ácido láctico	58
3.3 Análisis de las causas estructurales que están involucradas en los rendimientos de reacción	65
3.4 Perspectivas	70
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXO	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo de reconocimiento y reacción del sitio activo de las serin-hidrolasas	12
Figura 2.	Localización estructural de los ácidos hidroxicinámicos en la pared celular de cereales	20
Figura 3.	Estructura general del ácido cinámico y sus derivados hidroxilados	20
Figura 4.	Derivados de AHC aislados de sus fuentes naturales	24
Figura 5.	Diagrama general de la esterificación de AHC catalizadas por enzimas	25
Figura 6.	Reacción del ácido <i>p</i> -cumárico y su derivado hidrogenado	28
Figura 7.	Reacción de los vinilésteres del ácido <i>p</i> -cumárico y del derivado hidrogenado	29
Figura 8.	Reacción de esterificación enzimática del ácido cinámico con alcoholes alifáticos	43
Figura 9.	Estructuras químicas de los nucleófilos empleados	44
Figura 10.	Desaparición del sustrato en la reacción del CA y el butanol	46
Figura 11.	Desaparición del sustrato en la reacción del CA y el <i>isopropanol</i>	47
Figura 12.	Reacción de esterificación enzimática del ácido hidrocínámico con alcoholes alifáticos	49
Figura 13.	Desaparición de sustrato en la reacción del dCA con Butanol	52
Figura 14.	Desaparición de sustrato en la reacción del dCA con <i>isopropanol</i>	52
Figura 15.	Esquema de la estructura común de los AHC	57
Figura 16.	Influencia de la polaridad del medio de reacción en los porcentajes de conversión	63
Figura 17.	Efecto de la deslocalización electrónica por efecto de la resonancia	67
Figura 18.	Mecanismo general de la reacción de esterificación	68
Figura 19.	Ruta de biosíntesis de ésteres de derivados del CA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Campos de aplicación de enzimas	6
Tabla 2.	Aplicaciones industriales de las lipasas	14
Tabla 3.	Ventajas y desventajas en el empleo de enzimas en solventes orgánicos	18
Tabla 4.	Propiedades y aplicaciones del ácido ferúlico	22
Tabla 5.	Reacciones donde se ha empleado a los AHC en esterificaciones enzimáticas	26
Tabla 6.	Variables consideradas en las reacciones de esterificación enzimática	31
Tabla 7.	Resultados de la selección de enzimas por hidrólisis de los metilésteres de CA y FA	41
Tabla 8.	Porcentajes de conversión de la reacción de CA con alcoholes	45
Tabla 9.	Datos de espectroscopia de IR del CA	48
Tabla 10.	Datos de espectroscopia de EM del CA	48
Tabla 11.	Datos de espectroscopia de IR del CAOPr	48
Tabla 12.	Datos de espectroscopia de EM del CAOPr	48
Tabla 13.	Datos de espectroscopia de RMN- ¹ H del CAOPr	48
Tabla 14.	Datos de espectroscopia de IR del CAOBu	49
Tabla 15.	Datos de espectroscopia de EM de CAOBu	49
Tabla 16.	Porcentajes de conversión de la reacción de dCA con alcoholes	50
Tabla 17.	Datos de espectroscopia de IR de FA	54
Tabla 18.	Datos de espectroscopia de EM de FA	54
Tabla 19.	Datos de espectroscopia de RMN- ¹ H de FA	54
Tabla 20.	Datos de espectroscopia de EM de FAOPr	55
Tabla 21.	Datos de espectroscopia de EM de FAOBu	55
Tabla 22.	Porcentajes de conversión de la reacción de dFA con alcoholes	55
Tabla 23.	Datos de espectroscopia de EM de dFAOPr	56
Tabla 24.	Datos de espectroscopia de RMN- ¹ H de dFAOPr	56
Tabla 25.	Datos de espectroscopia de EM de dFAOBu	56
Tabla 26.	Datos de espectroscopia de RMN- ¹ H de dFAOBu	56
Tabla 27.	Resultados de la reacción entre AHC y ácido láctico	60
Tabla 28.	Datos de espectroscopia de EM de CAOLac	60
Tabla 29.	Resultados de las reacciones de esterificación del CA con ácido láctico en distintas mezclas de reacción	62
Tabla 30.	Resultados de las reacciones de esterificación del FA con ácido láctico en distintas mezclas de reacción	62
Tabla 31.	Resumen de resultados	65

Lista de abreviaturas

Å	Angstroms
AHC	Ácidos hidroxicinámicos
A_w	Actividad termodinámica de agua
CA	Ácido cinámico
CAOBu	Cinamato de butilo
CAOPr	Cinamato de propilo
CAOLac	Éster láctico-cinámico
CaA	Ácido cafeico
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CuA	Ácido <i>para</i> -cumárico
dCA	Ácido dihidrocinámico
dFA	Ácido dihidroferúlico
dFAOBu	Hidroferulato de butilo
dFAOPr	Hidroferulato de propilo
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EM	Espectroscopía de masas
FA	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
FAOBu	Ferulato de butilo
FAOPr	Ferulato de propilo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto desempeño
IE-ID	Impacto electrónico-Inyección directa
IR	Infra-rojo
LPBD	Lipoproteína de baja densidad
MCA	Cinamato de metilo
MFA	Ferulato de metilo

MHz	Megahertz
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retención
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
SA	Ácido sinápico
t_{ret}	Tiempo de retención
UV	Rayos Ultra-violeta

RESUMEN

Los ácidos hidroxycinámicos (AHC) y sus ésteres derivados son compuestos ubicuos en la naturaleza. En los últimos años ha habido una gran cantidad de reportes de las propiedades de estos ésteres: entre otras se han asociado a actividades antioxidante, antialérgica, quelante, absorción de rayos UV, anticoagulante, colesterolémica, anticancerígena, anti-inflamatoria, antimicrobiana. Dos de estos compuestos, el ácido cafeoil- ϵ -málico y el ácido cafeoil tartárico, han sido aislados de distintas plantas y se ha encontrado que presentan algunas de estas características.

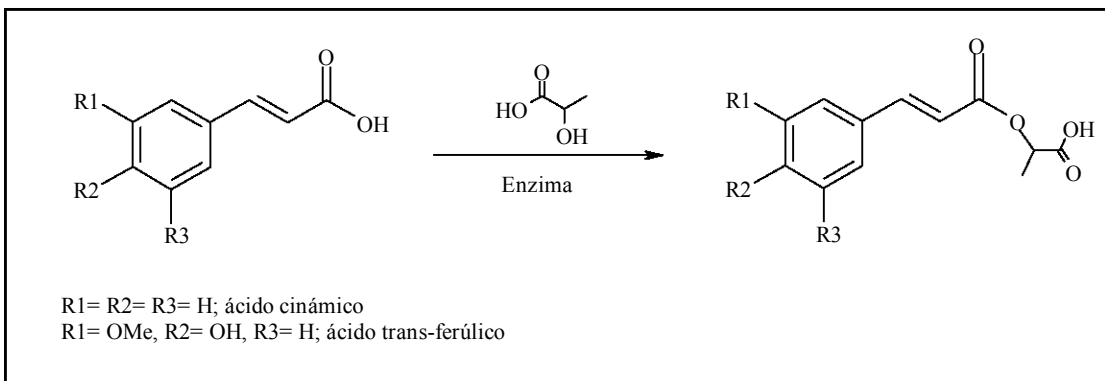
En este trabajo se intentó profundizar en la investigación de la esterificación enzimática de AHC, continuando con el estudio del aporte de las características estructurales de los AHC que ocasionan bajos rendimientos de reacción, así como proponer una vía distinta para sintetizar compuestos naturales como una alternativa para poder obtener las sustancias funcionales derivadas de los ácidos hidroxycinámicos. Para tal propósito se utilizaron dos de estos AHC: ácido cinámico (CA) y ácido ferúlico (FA), así como los derivados hidrogenados de estos (dCA y dFA, respectivamente). Como nucleófilos se emplearon alcoholes alifáticos primarios y secundarios (metanol, butanol e *iso*-propanol), así como un α -hidroxiácido (ácido láctico). Los alcoholes presentan varios resultados en este tipo de síntesis, pero a la fecha no se tienen reportes de la utilización de α -hidroxiácidos como nucleófilos en la síntesis de derivados de AHC (los α -hidroxiácidos han sido utilizados en reacciones de esterificación con ácidos grasos saturados e insaturados, principalmente).

En cuanto a los biocatalizadores, se trabajó con lipasas (Novozyme 435, Lipozyme y Chirazyme), ya que está ampliamente documentado su participación en este tipo de reacciones. También se emplearon dos feruloilesterasas (Depol 670 y Depol 740). Inicialmente se hicieron pruebas de reconocimiento de sustrato mediante la hidrólisis de los ésteres metílicos de CA, dCA, FA y dFA. Los catalizadores que realizaron esto fueron Novozyme 435, Lipozyme, Depols 670 y 740. Se descartó la Chirazyme debido a que no tuvo actividad sobre estos ésteres. Las enzimas seleccionadas se emplearon en los ensayos de condensación y solo las lipasas presentaron actividad. En aquellos casos en los que se utilizaron alcoholes, CA, dCA y dFA fueron esterificados en distintas

proporciones, siendo el dCA el mejor sustrato. El FA no reaccionó. La reacción con ácido láctico fue detectada con CA, dCA y dFA. Se cuantificó el porcentaje de conversión en la reacción del CA empleando una mezcla de distintas proporciones de hexano y *t*-butanol. En la mezcla Hexano:*t*-butanol (7:3) la conversión alcanzó el 19 %.

Los resultados obtenidos siguen la tendencia de lo que se ha observado en distintos trabajos relacionados a este: la presencia de un sustituyente electrodonador (OH) en el anillo aromático, así como el doble enlace de la cadena menguan el rendimiento de la esterificación, aunque en el caso de las reacciones con ácido láctico otros factores asociados a las características químicas de este nucleófilo pueden estar influyendo en los rendimientos.

De tal forma que el reto que se debe enfrentar si se desea continuar con el estudio de este tipo de reacciones es lograr el reconocimiento del (los) sustrato(s) por parte de la enzima, así como analizar las rutas metabólicas con las que son producidos estos compuestos *in-vivo* para mejorar los rendimientos con los que son producidos.



INTRODUCCIÓN

La utilización de procesos mediados por enzimas tiene sus orígenes hace miles de años (preparación de pan y cerveza, por ejemplo). Para el inicio del siglo XXI más de 200 enzimas tienen una aplicación comercial y una cantidad bastante mayor es empleada a nivel preparativo. El uso industrial de estos biocatalizadores se explica por las características propias de estos: en algunos casos son baratas (en comparación con los catalizadores químicos convencionales), suelen ser fáciles de operar y son *amigables* con el ambiente (condiciones *suaves* de pH y temperatura), participan en una gran cantidad de transformaciones y, principalmente, por su regio-, quimio- y estereoselectividad.

Del creciente número de esta clase de catalizadores se destacan las hidrolasas ya que este grupo de enzimas participa en reacciones en las que se obtienen eficientemente intermediarios y productos enantioméricamente puros, lo que confiere una gran importancia económica en la industria (principalmente la farmacéutica). Dentro del grupo de las hidrolasas encontramos a las esterasas y las lipasas, que deben su amplia utilización en gran parte a que se encuentran disponibles comercialmente tanto en su forma libre como inmovilizadas.

Las lipasas son enzimas que están presentes en casi todos los organismos, poseen una considerable importancia fisiológica y un gran potencial industrial. Además de participar en el proceso de digestión de grasas (catalizando la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres), poseen una gran importancia biotecnológica ya que son empleadas en la industria alimenticia y en la preparación de compuestos quirales. Este potencial industrial se debe a que las lipasas aceptan una amplia gama de sustratos (además de los ya mencionados acilgliceroles: ésteres alifáticos, alicíclicos y aromáticos; amidas; alcoholes y diversos ácidos carboxílicos; tioésteres y aminas activadas); son bastante estables en solventes orgánicos, lo que, dependiendo del tipo de solvente(s) utilizado(s), puede ser aplicado para reacciones de hidrólisis o síntesis; presentan una gran regio- y estéreo- selectividad con respecto a mezclas racémicas o sustratos con varios grupos hidroxilo.

Por otra parte, los ácidos hidroxicinámicos (AHC) y sus ésteres derivados (hidroxicinamatos) son compuestos que se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, principalmente como agentes estructurales y funcionales en la pared celular de plantas. Recientemente su estudio ha adquirido importancia debido a las propiedades químicas y biológicas que presentan. En los últimos 25 años ha habido un crecimiento considerable en la investigación de estos compuestos debido a que son precursores de sabores y aromas en las industrias de alimentos y fragancias, así como el ser considerados componentes bioactivos en la dieta (una gran parte del interés que despierta la investigación en cuanto a los potenciales beneficios del consumo de AHC se centra en intentar demostrar que estos compuestos y sus derivados participan de algunos de los efectos saludables de las dietas ricas en frutas, vegetales y fibra). De las propiedades *bioquímicas* que se les han detectado, la actividad antioxidante se presenta como la más destacada, ya que se ha encontrado está involucrada en la prevención de distintos males, tales como el envejecimiento celular, el cáncer y la arterosclerosis, entre otros.

Como consecuencia de estos factores y aunado a la tendencia mundial a usar productos de origen natural, la obtención de esta clase de compuestos resulta interesante. Es por dicha razones que en diversos grupos de investigación se ha intentado la biosíntesis de los ésteres derivados de los AHC, empleando principalmente lipasas. En casi todos los casos se han encontrado bajos rendimientos, comúnmente debido a la estructura química de los reactivos (la pérdida del carácter nucleófilo del carbonilo por efecto de la resonancia y mal reconocimiento por cuestiones de impedimentos estéricos) . El problema a resolver radica en que los derivados hidroxilados del ácido cinámico son pobres sustratos en este tipo de reacciones y la mejora de los rendimientos se presenta como una alternativa para la obtención de estos productos. Por lo anteriormente descrito el presente trabajo pretende profundizar en el estudio de las vías para preparar ésteres derivados de los AHC con mejores rendimientos, tomado como modelo la esterificación de AHC con α -hidroxiácidos. Cabe resaltar que a la fecha no se conocen trabajos que describan la formación de tales compuestos por métodos enzimáticos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Biocatálisis.

El empleo de enzimas (ya sea por medio de microorganismos, extractos crudos o aisladas) para el beneficio de la humanidad ha sido importante por siglos, aún sin saber que existían. La producción de pan, queso y bebidas fermentadas son ejemplos sobresalientes de su utilización. Pero no fue sino hasta el siglo pasado cuando el potencial de los procesos enzimáticos empezó a ser explotado a nivel industrial, aunque con algunas reservas: se comenzaron a emplear para la obtención de algunas sustancias como fructosa, ácido cítrico, penicilina y cefalosporinas, así como en procesos donde se obtenían mezclas de enantiómeros (resolución enantiomérica) (Hauer & Roberts, 2004).

Para el inicio del siglo XXI más de 200 enzimas tienen una aplicación comercial (Sharma et al.; 2001), siendo en la mayoría de los casos procesos que tienen menos de 30 años de utilizarse. Este incremento casi exponencial en el uso de enzimas se explica por sus características intrínsecas: en algunos casos son baratas (en comparación con los catalizadores químicos convencionales), suelen ser fáciles de operar y son *amigables* con el ambiente (condiciones *suaves* de pH y temperatura), participan en una gran cantidad de transformaciones y, principalmente, por su regio-, quimio- y estereoselectividad. Sumado a esto se tienen los grandes avances que se han dado en torno al conocimiento de técnicas moleculares, bioquímicas y biotecnológicas, lo que está permitiendo la manipulación y optimización de algunas enzimas de una manera tan rápida “que la información se debe actualizar con regularidad” (Robertson & Steer, 2004).

Una idea muy general de los campos de aplicación de las enzimas se resume en la tabla 1, tomada de Sharma y cols., 2001.

Tabla 1. Campos de aplicación de enzimas (Sharma et al., 2001)

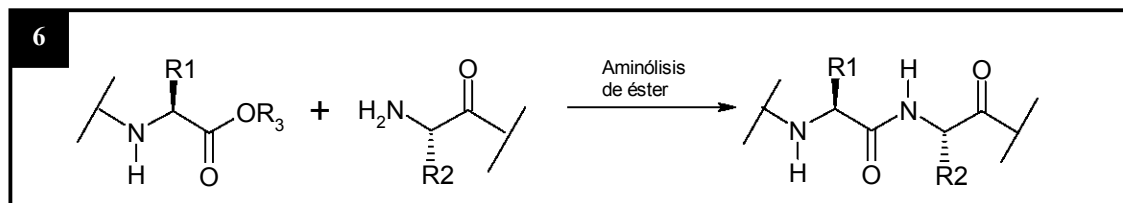
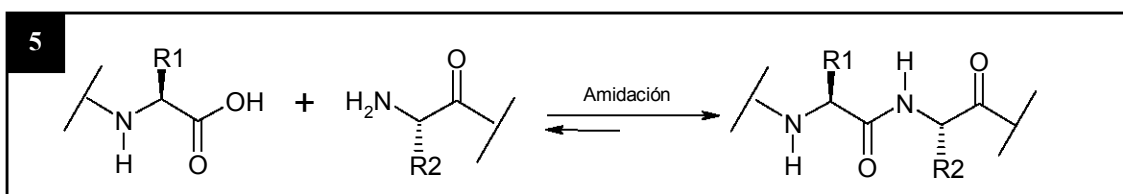
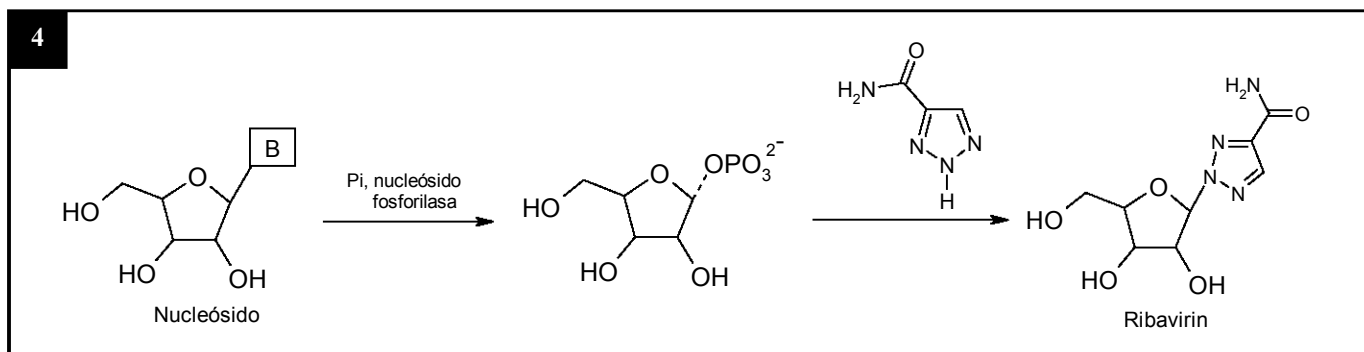
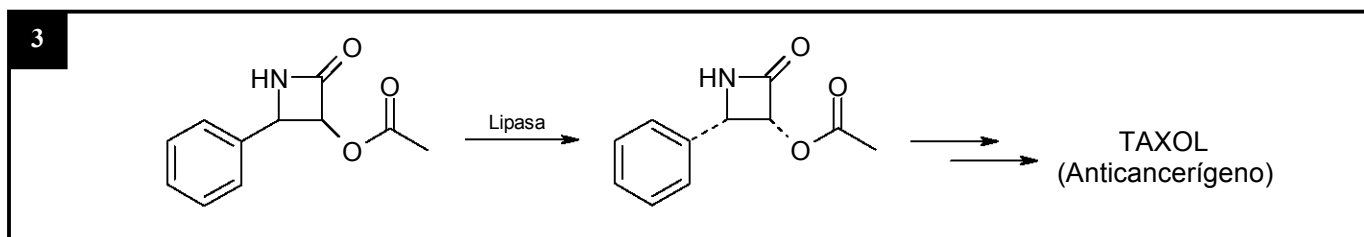
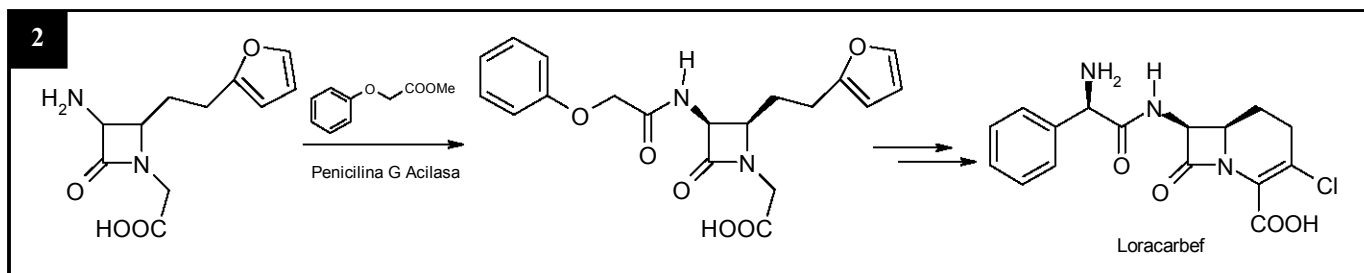
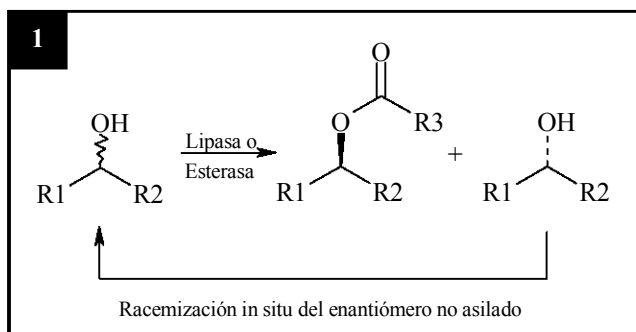
Campo	Aplicación
Investigación Científica	Reacciones de hidrólisis, síntesis, biotransformación, entre otras.
Industria cosmética	Protectores de piel; limpiadores de dientes.
Análisis Químico y Médico	Sangre, anticuerpos, control del colesterol.
Tratamientos Terapéuticos	Agentes antitrombóticos, antitumorales, antiinflamatorios; digestivos.
Catálisis Industrial	Síntesis química en industria alimentaria, de papel, farmacéutica, limpieza; tratamiento de residuos; síntesis de aminoácidos.

Debido a la experiencia en el uso de las hidrolasas (del creciente número de enzimas utilizadas, tanto a nivel industrial como en laboratorios de investigación, alrededor de un 75% es de tipo hidrolítica), se vislumbra que las otras clases de enzimas se utilizarán en mayor medida una vez que los parámetros económicos de su empleo sean definidos. Por ejemplo, las enzimas que promuevan las reacciones de óxido-reducción complementarán otras metodologías menos “verdes” en química preparativa (Faber, 2004).

El alto número de hidrolasas empleadas se explica debido a que este grupo de enzimas cataliza reacciones en las que se obtienen eficientemente intermediarios y productos enantioméricamente puros, lo que confiere una gran importancia económica en la industria (predominantemente la farmacéutica). A continuación se ejemplifican algunas de estas reacciones mediante procesos utilizados comercialmente.

Uno de los principales avances en esta clase de procesos enzimáticos se dio empleando hidrolasas para resoluciones enantioméricas (**reacción 1**). La limitante que se presenta en este caso es que el rendimiento máximo no puede ser mayor al 50%. De tal manera, mediante la resolución dinámica *in-situ* (empleando tanto una lipasa como un catalizador de racemización), el enantiómero que no sirve como sustrato a la lipasa es racemizado para que si lo sea incrementando gradualmente su concentración, aumentando así el rendimiento.

Algunos otros usos prácticos de las hidrolasas incluyen: el empleo de acilasas para cortar la cadena lateral del antibiótico β -lactamo e introducir una nueva cadena, para la síntesis de antibióticos de nueva generación (**reacción 2**); la síntesis de taxol mediante una lipasa (**reacción 3**); la síntesis del antiviral Ribavirin empleando una nucleósido fosforilasa (**reacción 4**). También se destaca la utilización de proteasas, ya que participan en la síntesis de péptidos en procesos termodinámicamente controlados, la condensación de un ácido con una amina (**reacción 5**) o en procesos cinéticamente controlados, aminólisis de un éster (**reacción 6**). A pesar de que las proteasas tienen como función natural el hidrolizar enlaces peptídicos, estas enzimas pueden servir para catalizar la formación de enlaces amida y éster bajo ciertas condiciones *in-vitro*. Estas 6 reacciones se esquematizan en la siguiente página.



Una vez enumeradas algunas de las ventajas y aplicaciones que representa el trabajar con enzimas, se muestra un resumen de las investigaciones que se están desarrollando en la actualidad en síntesis enzimática en distintos grupos de investigación, propuesto en una revisión muy extensa presentado en la revista *Nature* (Koeller & Wong, 2001):

- 1) En primer lugar se plantea el diseño de sustratos para con ello desarrollar nuevas reacciones enzimáticas, principalmente en la búsqueda de compuestos quirales para la producción de nuevos fármacos.
- 2) El empleo de solventes orgánicos y cosolventes, conocido también con el nombre de Ingeniería de Solventes, se propone como una alternativa para mejorar la solubilidad tanto de sustratos (mejora la disponibilidad para la enzima) como productos, así como en aquellas reacciones donde sea posible la reversión del equilibrio termodinámico.
- 3) La inmovilización de enzimas para mejorar la estabilidad de las enzimas (en reacciones a altas temperaturas, por ejemplo).
- 4) El avance en el conocimiento de la expresión de proteínas está haciendo posible la producción de enzimas a gran escala.
- 5) Dentro del desarrollo de las tecnologías involucradas en la expresión genética, la mutagénesis o *evolución dirigida*, permite el cambio de ciertas propiedades enzimáticas (modificación de estereoespecificidad, por ejemplo).
- 6) Muchas de las investigaciones realizadas en el campo de la biocatálisis son realizadas en condiciones de laboratorio y al intentar ser escaladas a nivel industrial no dan los mismos resultados. Para la obtención de medicinas y compuestos de química fina diversos adelantos se están dando en su obtención a gran escala.
- 7) Gracias a que muchas de las técnicas de evaluación de actividad enzimática comienzan a ser más fáciles de aplicar, la búsqueda de nuevas enzimas es el último campo que se menciona en dicha revisión está en auge en los últimos años.

De estas posibilidades, la tendencia con quizá mayores perspectivas a distintos niveles es la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas mediante el empleo de técnicas genómicas que utilicen la “evolución” o mutación acelerada de un gen para producir enzimas aún más selectivas o que no se encuentren en la naturaleza (Koeller & Wong, 2001). Además, estas nuevas tecnologías para el *descubrimiento* y *mejoramiento* de enzimas ha permitido emplearlas en condiciones industriales severas (temperaturas altas, por ejemplo).

Existen motivaciones importantes que dictan las tendencias en la búsqueda de nuevos biocatalizadores. La primera, la curiosidad científica y el entendimiento de cómo un biocatalizador procesa los sustratos (lo que puede llevar al diseño de catalizadores no naturales, tomando como referencia los que se presentan en la naturaleza). La segunda, existen oportunidades a nivel industrial-comercial para reemplazar procesos químicos poco eficientes o costosos con unos más eficaces y semi-naturales o menos agresivos para el medio ambiente, lo cual genera un *plus* económico en países donde las leyes son estrictas respecto a la actividad industrial (Hauers & Roberts, 2004).

Mientras se consideran algunas de las perspectivas en el empleo de estas metodologías, es importante resaltar que la biocatálisis no se presenta como una *panacea* o un reemplazo de la química orgánica tradicional. Por el contrario, resulta una herramienta complementaria interesante en diversos procesos de síntesis. Por ejemplo, en el paso clave en el que un sustrato barato se convierta en un producto de química fina con alto valor agregado.

La razón que explica el incremento casi exponencial en el uso de enzimas en química orgánica es relativamente fácil de entender y se explica con algunas de las razones mencionadas líneas arriba. En primer lugar son muchas las enzimas que comienzan a estar disponibles en buenas cantidades, además de que sus condiciones de operación son suaves y en algunos casos son baratas. Y lo que resulta más importante en esta área de la química, poseen una gran quimio, regio y estereoselectividad en las reacciones que catalizan. Un ejemplo de la quimioselectividad lo encontramos en el uso de las nitrilasas en la reacción que convierte un grupo nitrilo en uno carboxílico, aún en presencia de un grupo éster. Las técnicas convencionales hubieran hidrolizado

el grupo éster preferentemente. Por lo que respecta a la regioselectividad, un ejemplo importante de su uso es en el campo de la química de carbohidratos, en donde es requerida la transformación de un solo grupo hidroxilo, en moléculas que poseen muchos de ellos (Hauer & Roberts, 2004). En el caso de la estereoselectividad, donde encontramos a enzimas como esterasas y lipasas en reacciones de resolución cinética (obtención de un enantiómero como intermediario en una reacción dada) de alcoholes secundarios y ácidos carboxílicos.

Anteriormente se hizo mención de que entre todas las enzimas que se conocen, las más utilizadas son las hidrolasas (ya que las reacciones que catalizan de forma natural suelen tener únicamente un sustrato y están termodinámicamente favorecidas) y, particularmente, las esterasas y las lipasas. Estas deben su aceptación en gran parte a dos factores (Schimid & Verger, 1998):

- a) Las lipasas soportan el efecto de la desnaturalización en la interfase donde actúan normalmente (ver sección 1.2). De tal forma, han desarrollado estructuras inusualmente estables que soportan el efecto de solventes no acuosos.
- b) El equilibrio termodinámico de la hidrólisis de grasas está “gobernado” en mayor parte por las concentraciones de los reactivos, por lo que se hace factible revertir el equilibrio termodinámico hacia la esterificación retirando el agua.

Gracias a estos factores, este tipo de enzimas se encuentran disponibles comercialmente en un buen número, tanto en su forma libre como inmovilizadas. De hecho, la expectativa es que adquieran una importancia industrial (volumen de uso) similar a la que actualmente tienen las proteasas y las carbohidrasas.

En la actualidad las lipasas son empleadas, en mayor porcentaje, en proveer moléculas llamadas *bloques de construcción* para su aplicación en nuevas rutas de síntesis de moléculas quirales. En la siguiente sección se profundizará en el estudio de estas enzimas.

1.2 Lipasas.

1.2.1 Características y aplicaciones.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3) son enzimas ampliamente difundidas en la naturaleza, que poseen una considerable importancia fisiológica y un gran potencial industrial (es por mucho el grupo de enzimas más estudiado en aplicaciones biosintéticas (Faber, 2000)). Además de participar en el proceso de digestión de grasas (catalizando la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres), poseen una gran importancia biotecnológica ya que son empleadas en la industria alimenticia y en la preparación de compuestos quirales (**tabla 2**, pag. 14).

Una forma más funcional en la que son clasificadas este tipo de enzimas es como Serin-hidrolasas, debido al mecanismo de reacción con el que actúan y el cuál se explica en el esquema de la figura 1. El sitio activo se compone de manera general por la llamada “*triada catalítica*”, formada de un residuo básico (serina) el cual es activado mediante puentes de hidrógeno con residuos de histidina y un ácido (glutamato o aspartato) (Schmid & Verger; 1998). El O del grupo hidroxílico de la serina hace un *ataque* nucleofílico sobre el carbonilo del éster (que es considerado el paso limitante de la reacción), formando un intermediario tetrahédrico que se estabiliza por la acción de un “agujero oxianiónico”. Finalmente, el intermediario se rompe por otro ataque nucleofílico sobre el carbonilo (R1 y R2 pueden ser H o grupo alquilo). La formación de este intermediario se supone es el paso limitante en la reacción de hidrólisis de ésteres orgánicos (Otto et al., 2000).

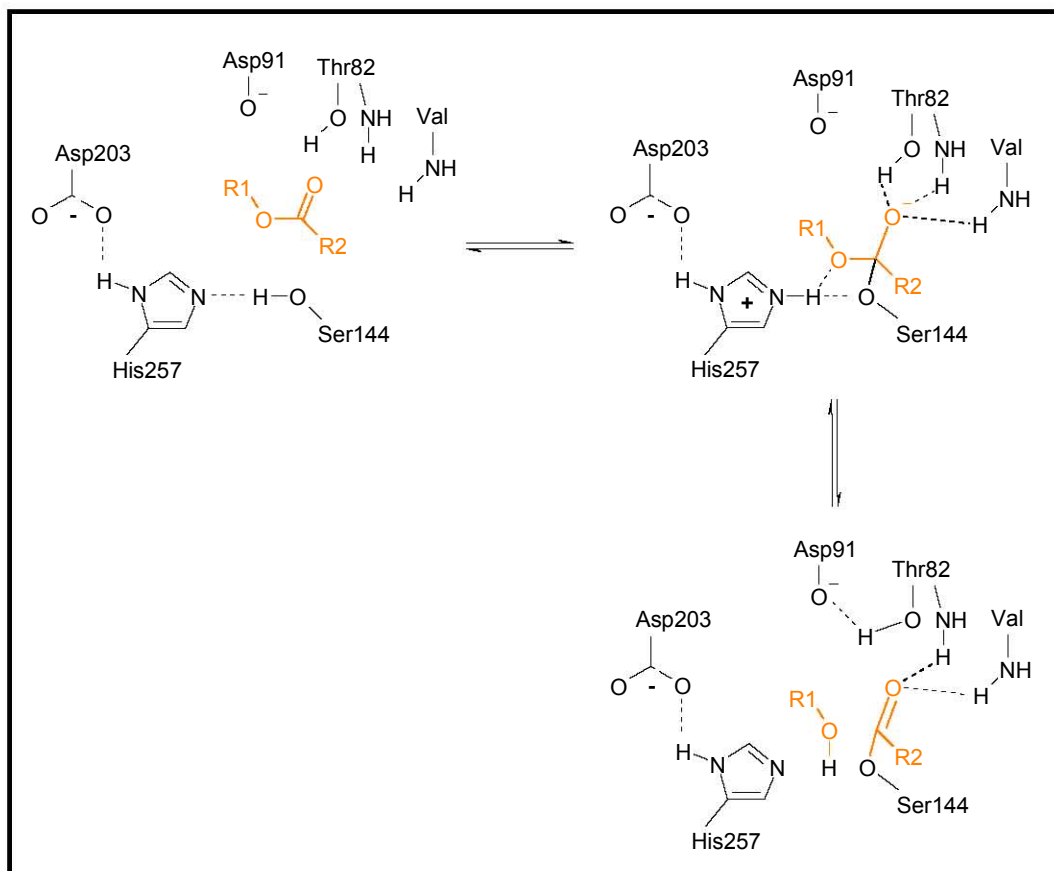


Figura 1. Mecanismo de reconocimiento y reacción del sitio activo de las serin-hidrolasas. Tomado de Schmid y Verger (1998).

Retomando el tema del potencial industrial que presentan estas enzimas, este se debe a distintas características, de las que se destacan 3:

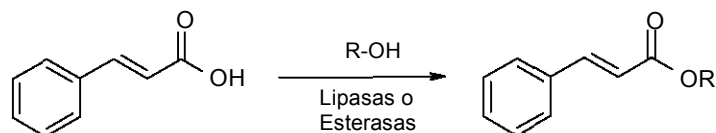
1) Las lipasas aceptan una amplia gama de sustratos (además de los ya mencionados acilglicérols: ésteres alifáticos, alicíclicos y aromáticos; amidas; alcoholes y diversos ácidos carboxílicos; tioésteres y aminas activadas); 2) son bastante estables en solventes orgánicos, lo que, dependiendo del tipo de solvente(s) utilizado(s), puede ser aplicado para reacciones de hidrólisis o síntesis; 3) presentan una gran regio- y estéreo- selectividad con respecto a mezclas racémicas o sustratos con varios grupos hidroxilo. Un breve resumen de los usos industriales de estas enzimas se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 2. Aplicaciones industriales de las lipasas (Sharma et al, 2001).

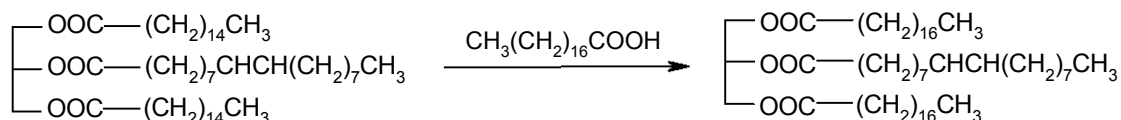
INDUSTRIA	REACCIÓN	APLICACIÓN
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Remoción de aceites en telas
Productos Lácteos	Hidrólisis y modificación de grasa de leche, maduración quesos	Desarrollo de saborizantes en productos lácteos
Panadera	Mejora en sabor	Prolongación de vida de anaquel
Bebidas	Optimización de aromas	Bebidas
Aderezos	Mejora en calidad sensorial	Mayonesas, aderezos
Alimentos funcionales	Transesterificación	Desarrollo de alimentos funcionales
Grasas y aceites	Transesterificación; hidrólisis	Aceite de cocoa, margarina, ácidos grasos, acilgliceroles
Química	Enantioselectividad, síntesis	Química fina, productos intermediarios quirales
Farmacéutica	Transesterificación, hidrólisis	Digestivos, compuestos quirales
Cosméticos	Síntesis	Emulsificantes, hidratantes
Papelera	Hidrólisis	Mejoramiento en la calidad y rendimiento del papel

Una de las características que se destaca en el empleo de lipasas, que ya fue mencionada, es que se pueden utilizar en medios de reacción orgánicos tanto para la resolución enantiomérica de mezclas como para la síntesis de nuevos productos. El estudio de esto último ha sido amplio en diversos campos de la química. Junto con este grupo de enzimas se ha utilizado otro tipo de hidrolasas, las esterases, que se emplean sobretodo en reacciones de esterificación y transesterificación. Algunos ejemplos del empleo de ambos tipos de enzimas son:

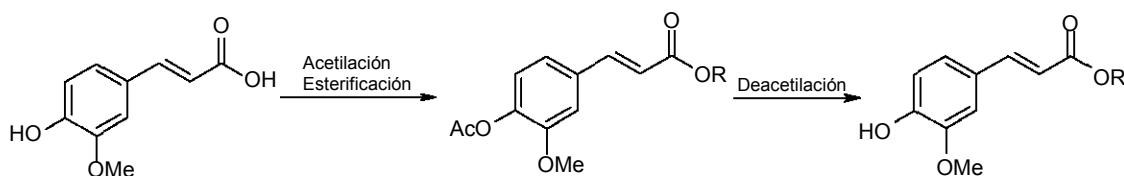
- Esterificación de ácido cinámico con monosacáridos, alquilglucósidos y alcoholes alifáticos, empleando lipasas y esterasas de origen microbiano para mejorar la solubilidad de los sustratos (Stamatis et al., 2001).



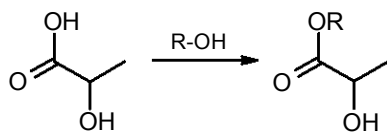
- Interesterificación de triglicéridos naturales con lipasas *sn*-1,3-regioselectivas para preparar derivados grasos para alimentos y medicinas (Schmid & Verger; 1998).



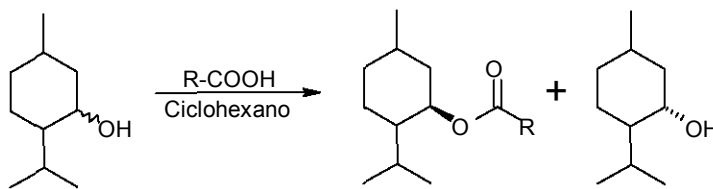
- Deacetilación del ácido ferúlico, para su esterificación sintética, mejorando su rendimiento (Mastihubová et al., 2001).



- Esterificación del ácido láctico con alcoholes alifáticos, para preparar tensoactivos (From et al., 1997).



- Resolución óptica del *dl*-mentol con lipasa de *Candida rugosa* y distintos donadores de acilo (Wang et al., 2002).



Dentro de este breve recuento de los usos de las lipasas, tanto en investigación como a escala industrial, se puede observar que se le dio un mayor énfasis a la síntesis de ésteres por encima de aquellos procesos de resolución enantiomérica. Esto se realizó con la intención de hacer notar que el empleo de estas enzimas ha sido limitado sobre todo a ácidos grasos y algunos ácidos carboxílicos. También resulta destacable mencionar que todos estos ejemplos sirven para ilustrar el empleo de medios no acuosos en la catálisis enzimática, tema que se revisa en las siguientes líneas.

1.2.2 Enzimas en Solventes Orgánicos.

En los últimos años la utilización de enzimas en medios no acuosos ha tenido un desarrollo considerable como una de las áreas más prometedoras dentro de la biotecnología y en combinación con la síntesis orgánica. La mayoría de los biocatalizadores convencionales han sido empleados en medios acuosos, debido a la creencia de que las enzimas en solventes orgánicos perdían una gran parte de su capacidad catalítica. Sin embargo con el paso del tiempo y el desarrollo de diversos experimentos se observó que algunas enzimas conservaban su actividad “normal” y, en algunas ocasiones, incluso la aumentaban. Además, se pudieron realizar reacciones que en medios acuosos resultaban imposibles de llevar a cabo (Klibanov, 2001).

Las razones que pueden explicar estos fenómenos son varias, entre otras: mejor solubilización de los sustratos-productos; control del desplazamiento del equilibrio termodinámico para favorecer la síntesis sobre la hidrólisis por medio del solvente; menor interacción de la enzima con el medio, lo que resulta en una mayor termoestabilidad a temperaturas mayores a las habituales; etc.

Paralelamente los avances en el campo de la bioquímica mostraron que muchas de las enzimas presentes en los seres vivos funcionan en medios hidrofóbicos o asociados a estos, como lo son las membranas celulares, lo cual hacía lógico pensar que conservara la actividad en lugares donde el agua no fuera el medio principal de reacción. Si a todo esto le sumamos algunos otros factores como: que el agua es un mal solvente para la mayoría de las reacciones orgánicas; cuando es utilizada, separarla de los productos es un proceso difícil debido a su alto punto de ebullición y a

su alto calor de vaporización; se facilitan reacciones laterales como hidrólisis, racemización, polimerización y descomposición; e interacciona fuertemente con las enzimas, lo que a altas temperaturas las desnaturaliza. De tal forma se puede observar que la aplicación de enzimas en medios en donde el agua no esté presente (o lo esté en bajas cantidades) es una idea atractiva, ya que se muestra como una herramienta potencial en síntesis orgánica.

En este punto es importante considerar el doble papel del agua en la actividad enzimática en medios orgánicos. Por una parte se habló ya de que el agua participa directa o indirectamente en casi todos los procesos de desnaturalización. Por la otra, es conocido que la presencia del agua es indispensable para que la enzima guarde su forma activa, mediante interacciones no covalentes tanto al exterior como al interior de dicha conformación.

Analizando los aspectos encontrados que ocasiona la presencia del agua, se puede concluir que la sustitución de una parte de ella (más no toda, como se analizará posteriormente) mediante un solvente orgánico haría que la proteína mantuviera su forma activa, y es en este punto que se basa el empleo de las técnicas de biocatálisis en medios no acuosos. De hecho, en la actualidad se llama a esta agua “*agua ligada*” y se considera como parte estructural de la enzima (Faber, 2000); pudiendo entender esta agua como una especie de *lubricante* molecular que permite a la proteína mantener cierta flexibilidad. El problema, ahora, es conocer la cantidad de agua que es necesaria para mantener esta actividad y ese monto de agua depende de la enzima que se esté estudiando y del solvente elegido (Faber, 2000). Por ejemplo, se ha visto que las lipasas poseen distintas actividades termodinámicas de agua (A_w) óptimas y estas varían según la fuente microbiana de la que proceden, desde el 0.3 hasta 1.0 (Gandhi et al.; 2000) . Wehtje y Adlercreutz (1997) presentan un trabajo en donde miden el perfil de la actividad de 4 diferentes lipasas en 4 distintas reacciones. Cabe destacar que esta agua debe de estar siempre presente, pues como ya se mencionó, es considerada como parte de la estructura. Así, se debe cuidar que el solvente no la remueva o desplace de su posición “molecular”.

Entonces se deben tomar en consideración tres factores: la polaridad del solvente, su A_w y que esta actividad se mantenga constante y no afecte el equilibrio de reacción. En cuanto a la polaridad se ha observado que entre más miscible con el agua y polar sea el solvente peor será para una reacción, ya que estos tienden a desplazar esta agua *estructural*. La actividad termodinámica de agua o A_w es empleada para referirse al agua necesaria para que una enzima mantenga su actividad debido a que describe *la masa del agua al equilibrio termodinámico*. Diversos métodos se han descrito para poder alcanzar y controlar este equilibrio (Berlung & Hult, 2000). Uno de los más utilizados es en el que los componentes de la reacción son previamente equilibrados a la A_w necesaria y conocida con una solución saturada de una sal dada.

Esta “cantidad” de agua es regularmente el factor limitante de las velocidades de catálisis, sobretodo en reacciones de esterificación. Para evitar que la cantidad de agua que se genera en una reacción de este tipo pueda ocasionar que el equilibrio termodinámico perjudique el rendimiento se debe de mantener constante el valor de A_w . El método más extendido para lograr este objetivo es la adición de agentes desecantes (mallas moleculares).

Sumado a esto se sabe que la hidrofobicidad de los medios de reacción ocasiona una menor interacción de la enzima con el medio, dando como resultado que mantenga una forma primordialmente activa. Esto se puede lograr de una manera más fácil con soportes inorgánicos como los que se suelen vender algunas de estas enzimas, lo que le confiere una mayor estabilidad a la estructura.

Para cerrar esta sección se presenta un breve resumen de las ventajas y desventajas que representa la utilización de enzimas en medios orgánicos (tabla 3).

Tabla 3. Ventajas y desventajas en el empleo de enzimas en solventes orgánicos.

Ventajas y desventajas en el empleo de enzima en solventes orgánicos	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Catalizan reacciones que no son posibles en agua. • Presentan una mayor estabilidad a la temperatura. • La selectividad puede ser controlada y/o invertida por el solvente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Normalmente presentan una actividad menor. • Presentan una menor movilidad conformacional.

1.3 Ácidos cinámicos.

1.3.1 Generalidades

En los últimos 20 años se ha investigado ampliamente en el campo de la obtención de antioxidantes de fuentes naturales (vegetales). Existen dos razones principales que han motivado esta búsqueda, la primera son las dudas que han despertado los antioxidantes sintéticos que se utilizan en la industria, sobretodo de alimentos, ya que se presumen carcinogénicos. La segunda, la tendencia mundial hacia el uso de sustancias y productos de origen natural. Por otra parte, es conocido que los compuestos fenólicos poseen una importante actividad antioxidante y dentro de este grupo encontramos a los ácidos cinámicos.

Los ácidos hidroxicinámicos (AHC) y sus ésteres derivados (hidroxicinamatos) son compuestos que se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, principalmente como agentes estructurales y funcionales en la pared celular de plantas (entrecruzando cadenas de polisacáridos, mediante enlaces éter y éster en la pared celular; como soporte; limitando el crecimiento celular y como parte del mecanismo de defensa de las plantas). Un esquema de lo anterior se puede observar en la **figura 2**, en donde se puede apreciar los puentes que forma el AHC más difundido, el ácido ferúlico, entre polisacáridos. Recientemente han adquirido importancia debido a sus propiedades químicas y biológicas: en los últimos 15 años ha habido un crecimiento considerable en la investigación de estos compuestos debido a que son precursores de sabores y aromas en las industrias de alimentos y fragancias, así como el ser considerados componentes bioactivos en la dieta (una gran parte del interés que despierta la investigación en cuanto a los potenciales beneficios del consumo de AHC se centra en intentar demostrar que estos compuestos y sus derivados participan de algunos de los efectos saludables de las dietas ricas en frutas, vegetales y fibra) (Ou & Kwok, 2004).

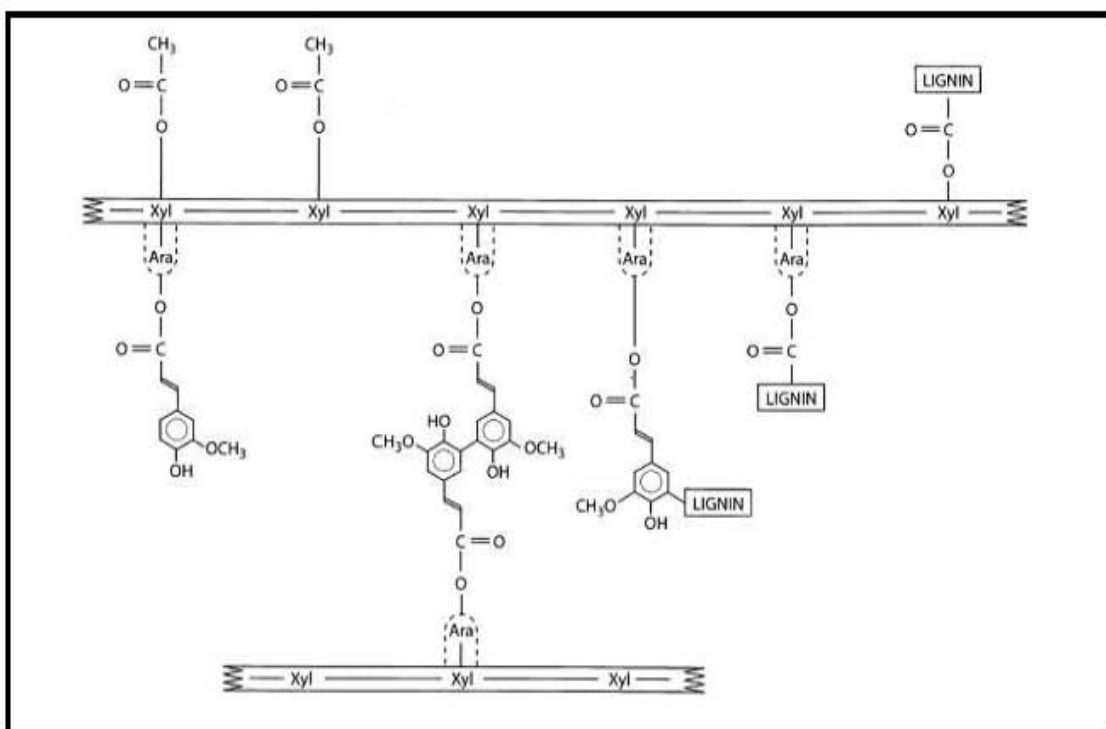


Figura 2. Localización estructural de los AHC en la pared celular de cereales. El inter cruzamiento de las cadenas de polisacáridos está dado por el FA (Tomada de Williamson et al, 1998).

De las propiedades *bioquímicas* que se les han detectado, la actividad antioxidante se presenta como la más destacada ya que se ha encontrado está involucrada en la prevención de distintos males, tales como el envejecimiento celular, el cáncer y la arterosclerosis, entre otros (Mathew & Abraham, 2004; Ou & Kwok, 2004). Como consecuencia de estos factores y aunado a la ya citada tendencia a usar productos de origen natural, la obtención de esta clase de compuestos resulta interesante. En la figura 3 se presenta la estructura general de los AHC. Los derivados se encuentran esterificados al carbono del grupo carbonilo.

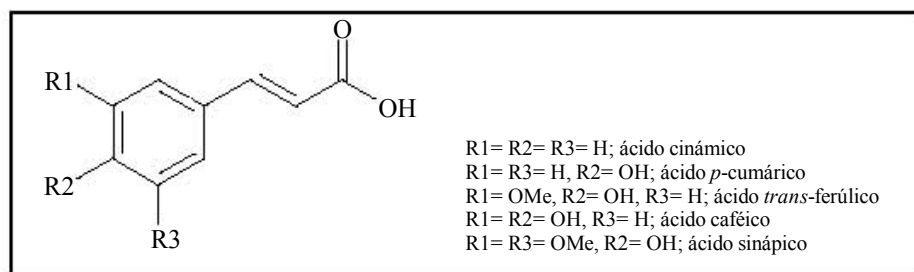


Figura 3. Estructura general del ácido cinámico y sus derivados hidroxilados.

Sin embargo, se debe hacer énfasis en que la actividad antioxidante de estos compuestos no refleja necesariamente beneficios a la salud, ya que primero deben ser absorbidos en el intestino para poder estar biodisponibles. Recientemente comienzan a aparecer estudios que abordan este asunto así como la relevancia de sus efectos para la salud humana. Una revisión muy completa al respecto de este tema se puede consultar de los autores Ou y Kwok (2004).

Los AHC predominantes en la naturaleza son el ácido caféico y el ácido ferúlico. El ácido caféico normalmente se encuentra unido mediante un enlace éster al ácido quínico (forma soluble del ácido clorogénico), es muy abundante en el café y en menor medida en otros vegetales (se estima que una persona que consume mucho café ingiere hasta 2000 mg de ácido clorogénico al día)(Kroon & Williamson; 1999) Además, de la serie de los ácidos cinámicos (fig. 3) es el que presenta mayor actividad antioxidante.

Por su parte, el ácido ferúlico es el más representativo del grupo, ya que se encuentra de manera casi ubicua en el reino vegetal y es el más abundante: varía desde 5 g/kg en el salvado de trigo, 9 g/kg en la pulpa del camote, hasta 50 g/kg en el grano de maíz (todos en peso seco) (Ou & Kwok, 2004). Es raro encontrarlo en su forma libre, pero es usual hallarlo como puente entre polisacáridos (arabinosilanos, pectina, xiloglucanos; fig. 2) formando enlaces éster y éter. Además, en años recientes ha habido un incremento en el número de reportes que hablan de las funciones fisiológicas en humanos tanto del ácido ferúlico como de sus derivados y las moléculas relacionadas a su estructura. En la siguiente tabla se presentan algunas de las propiedades y/o aplicaciones del ácido ferúlico.

Tabla 4. Propiedades y aplicaciones del ácido ferúlico. Información obtenida de: Ou & Kwok, 2004; Mathew & Abraham, 2004.

Propiedades y aplicaciones del ácido ferúlico	
PROPIEDADES/APLICACIÓN	EFEECTO
• Actividad antioxidante	• Atrapa los radicales libres.
• Colesterolemia	• Reduce el colesterol y las LPBD del plasma.
• Prevención de arteriosclerosis y trombosis	• Inhibe la agregación de plaquetas.
• Actividad antimicrobiana	• Inhibe crecimiento bacteriano, de levaduras y de virus.
• Actividad antiinflamatoria	• Inhibe proteínas que promueven la inflamación
• Actividad anticancerígeno	• Efecto quimiopreventivo en carcinogénesis
• Producción de vainillina	• Por decarboxilación microbiana
• Conservador de alimentos	• Debido a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas
• Agente inter-cruzador de polisacáridos	• Incrementa la viscosidad y forma geles de pectina y arabinosilanos
• Lociones para la piel y suplementos para deportistas	• Absorbe rayos UV y estimula la secreción de hormonas

No obstante la *ubicuidad* de los AHC existe una parte negativa en lo que se refiere a la biodisponibilidad de sus derivados, ya que se encuentran en bajas concentraciones en su fuente natural. Algunos ejemplos de AHC esterificados aislados de algunas plantas los representan las estructuras que se encuentran en la fig. 4, pag. 24 (Bergman et al., 2001; Cartron et al., 2001; Whitaker et al., 2001; Sarpaz et al., 2002). El ácido cafeoil-*l*-málico y el verbascósido (actenósido) se han aislado de *Marrubium vulgare*, una planta de origen europeo empleada en medicina tradicional como sedante y antiinflamatorio. Esta última propiedad, antiinflamatoria, se atribuye a varias plantas que contienen como constituyente mayoritario al verbascósido y se sugiere que esta actividad está asociada en parte a la inhibición de la 5-lipoxigenasa y a la capacidad (sumada a la de los fenilpropanoides) de *atrapar* los radicales libres *in-*

vitro. Sahpaz et al. (2002) reportan que actúa selectivamente sobre una de las isoenzimas que forman la ciclooxigenasa (Cox-2). Este estado de la enzima forma prostanoïdes involucrados en dolor e inflamación, lo que podría reducir los efectos colaterales observados en el uso terapéutico de algunos antiinflamatorios no esteroïdales. El ácido cafeoiltartárico, encontrado dentro de una mezcla de compuestos fenólicos extraídos de desechos de aceite de oliva, vino tinto y granos verdes de café (arábica y robusta), presentó una actividad antioxidante alta (más del doble) comparada con la del ácido caféico (Cartron et al., 2001). En ese trabajo se estudiaron los fenoles presentes en la dieta de los franceses y su posible participación en la baja tasa de problemas coronarios de esta comunidad. Kikuzaki et al. (2002) comparan las actividades antioxidantes del ácido ferúlico y algunos compuestos relacionados, mediante pruebas estandarizadas como lo es el secuestro del radical DPPH. Uno de estos compuestos, el cicloartenilferulato, es una molécula que se encuentra con algunos otros ésteres derivados del ácido ferúlico en el aceite de arroz. La actividad ante el DPPH del ácido ferúlico y el cicloartenilferulato es muy similar, lo que se destaca es la gran solubilidad de este último en sustancias hidrofóbicas lo que lo hace un prospecto interesante para su empleo en alimentos.

Como se puede apreciar en la figura se han aislado AHC esterificados con moléculas distintas a los polisacáridos de la pared celular, como: polioles, esteroides, estanoles y α -hidroxiácidos. Esto, sumado al factor de la extracción en bajas concentraciones de estos compuestos, ha ocasionado que diversos grupos de investigación se hayan dado a la tarea de intentar obtener esta clase de compuestos en condiciones *in-vitro*. Existen dos vertientes para la resolución de este problema, ya sea a través de la síntesis química tradicional (la cual presenta varios inconvenientes, entre otros: la sensibilidad de los AHC a ciertas condiciones de pH y temperatura, la necesidad de *proteger* el grupo hidroxilo reactivo en posición *para* mediante acetilación, o el empleo de cloruros o anhídridos ácidos para mejorar los rendimientos); o con rutas sintéticas que empleen la biocatálisis como herramienta. Por varias de las razones ya descritas a lo largo de este texto, se emplean enzimas (principalmente lipasas) que en medios orgánicos catalizan la formación de los ésteres.

De tal forma que el enfoque a partir de ahora se centrará en la segunda vertiente y en la siguiente sección se hablará a mayor profundidad del tema.

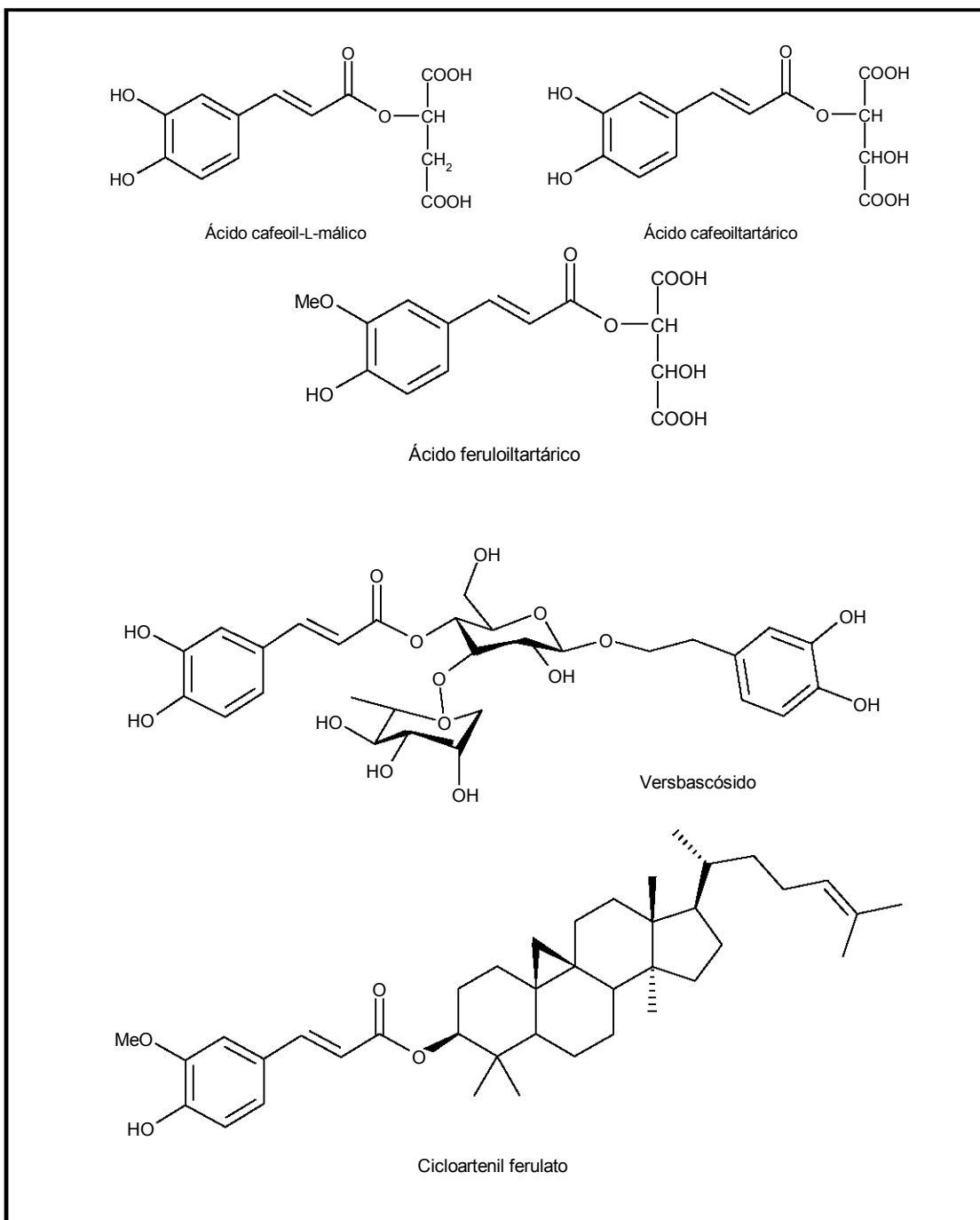


Figura 4. Derivados de AHC aislados de fuentes naturales: Ácido cafeoil-L-málico y versbascósido aislados de *Marrubium vulgare*; Ácido rosmarínico y ácido feruloiltartárico aislado de *Salvia*; cicloartenil ferulato aislado del aceite de arroz (γ -oryzanol).

1.3.2 Ácidos hidróxicinámicos y su esterificación enzimática.

Además de las razones que se señalaban al final de la sección anterior, como *motivadores* para la obtención de esta clase de ésteres, existe otra que yace más específicamente en una de sus principales aplicaciones industriales (y beneficio económico): en su forma libre, los AHC usualmente son hidrofílicos y hacen que su utilización en productos comercializables (alimentos con altos contenidos de grasas o algunas medicinas, por ejemplo) se dificulte. Así, la esterificación de estos compuestos origina que la solubilidad se vea alterada, mientras que la actividad antioxidante no, ya que la estructura resonante involucrada no resulta afectada.

En la siguiente figura se presenta un diagrama general de la reacción esterificación de AHC. Como se puede ver en la figura 2 (p. 20), estos se encuentran asociados a las paredes celulares de las plantas formando “puentes” entre polisacáridos (Prates et al., 2001).

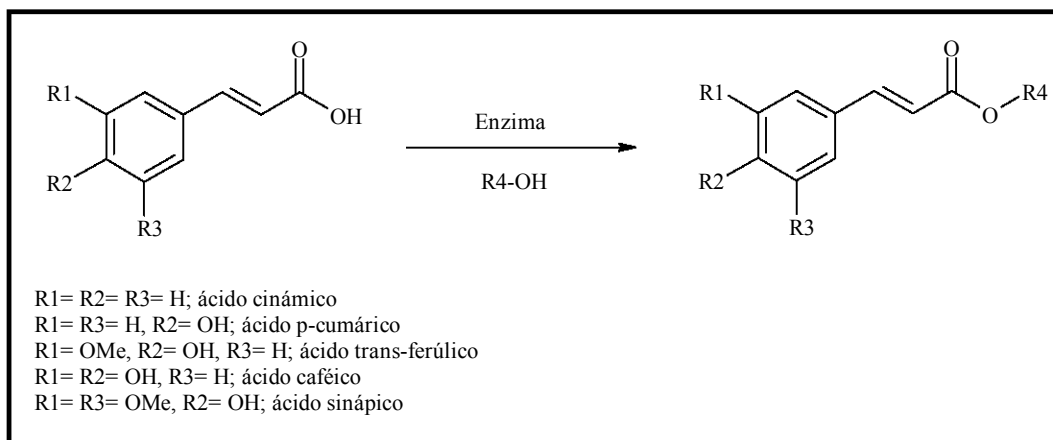


Figura 5. Diagrama general de la reacción de esterificación de AHC catalizada por enzimas.

En la tabla 5 se resumen los sustratos y las condiciones en que se han intentado esterificar a los AHC, así como las referencias de estos trabajos. Cabe recordar que la reacción de esterificación es la unión entre dos moléculas: un grupo ácido (donador de acilo) y un grupo hidroxilo (nucleófilo).

Tabla 5. Reacciones destacadas en donde se han empleado AHC en esterificaciones enzimáticas.

ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (AHC)				
AHC	Nucleófilo	Enzima	Solvente	Referencia
CaA dCaA CA FA	+ Butanol + Octanol + Dodecanol	Lipasa (Novo-435)	Nucleófilo	Guyot et al, 1997
FA	+ Pentanol	Esterasa (<i>FAEA</i>)	Hexano, emulsiones w/o	Giuliani et al, 2001
CA	+ Butanol	Lipasa (<i>CAL-B</i>)	Butanol Ciclohexano Pentano	Buisman et al, 1998
FA	+ Octanol	Lipasa	<i>t</i> -butanol	Compton et al, 2000
CA CuA FA	+ Octanol + Glucosa + Fructosa	Lipasa Esterasa Cutinasa	Octanol <i>t</i> -butanol	Stamatis et al, 2001
CA CuA FA	+ Propanol	Esterasa (<i>FAEA</i>)	Emulsiones (Hexano /propanol /agua)	Topakas et al, 2003
CA dCA CuA CaA	+ Glucosa	Lipasa (<i>CAL-B</i>)	<i>t</i> -butanol	Otto et al, 2000
Vinil éster de: CA, CuA, FA	+ Metilshiki- mato	Lipasa (<i>CAL-A</i>)	<i>t</i> -butilmetil éter	Armesto et al, 2003

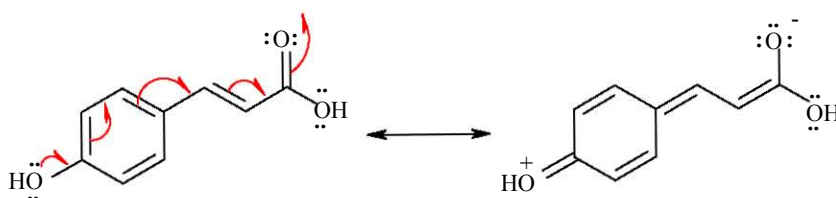
Como muestra la tabla anterior, son variados los trabajos existentes en cuanto a la posibilidad de esterificar los AHC. A su vez resalta que principalmente se han utilizado lipasas, aunque también han sido usadas algunas esterasas (Stamatis et al., 2001). En el texto ya han sido mencionadas algunas de las propiedades que poseen

estas enzimas (presentan afinidad por una amplia variedad de compuestos y se tiene conocimiento de su utilización en una amplia gama de reacciones de esterificación).

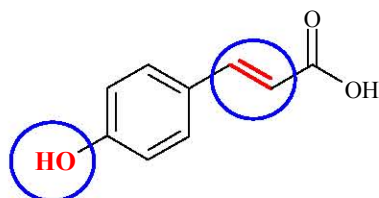
De las esterasas que son mencionadas en dichas investigaciones resaltan las feruloilesterasas, que tienen como sustrato natural los ésteres que forma el ácido ferúlico en la pared celular (Mathew & Abraham, 2004). Estas enzimas poseen características estructurales similares a las lipasas (plegamiento α/β , tríada catalítica en sitio activo Asp/His/Ser) y son producidas por hongos patógenos invasores de plantas (Hatzakis et al, 2002). Es justo con este tipo de esterasas que se dan los mejores resultados (Giuliani et al, 2001), pero también se han tratado de utilizar en otros casos y no han sido capaces de catalizar dichas reacciones (Stamatis et al, 2001).

Todos estos estudios nos señalan los inconvenientes que se presentan al intentar realizar esta clase de reacciones entre derivados hidroxilados del ácido cinámico con distintas clases de alcoholes en medios orgánicos utilizando enzimas como catalizadores. Los problemas comunes a los que se han enfrentado al realizar estas reacciones son las bajas velocidades del orden de días) y los bajos rendimientos. Algunas de las razones para que se den estos resultados son las siguientes (Buisman et al., 1998; Guyot et al., 1997; Stamatis et al., 2001):

1. La deslocalización electrónica que producen los grupos hidroxilos como sustituyentes dentro del anillo bencénico y que disminuye la reactividad del carbonilo que debe sufrir el ataque nucleofílico. En el siguiente esquema se observan las estructuras de resonancia que provoca este movimiento de electrones y que se presume como un elemento que altera la esterificación.



2. La insaturación de la cadena alifática lateral, que al parecer confiere cierta rigidez a la molécula que le impide interactuar en el sitio activo; además de que al estar conjugada con el anillo aromático participa también en la deslocalización electrónica ya mencionada. En la siguiente estructura se destacan los puntos arriba mencionados.



Para resaltar los dos factores descritos se toma como molécula modelo el ácido *p*-cumárico, ya que un ejemplo claro de la influencia del doble enlace se presenta en el trabajo de Stamatis y col. (2001): se compararon los rendimientos de esterificación del ácido *p*-cumárico y su derivado hidrogenado (ácido *p*-hidroxifenilpropiónico) con octanol empleando distintas enzimas. En todos los casos el rendimiento que presenta el segundo ácido es de al menos el triple que el del primero. En la figura 6 se resume lo anterior.

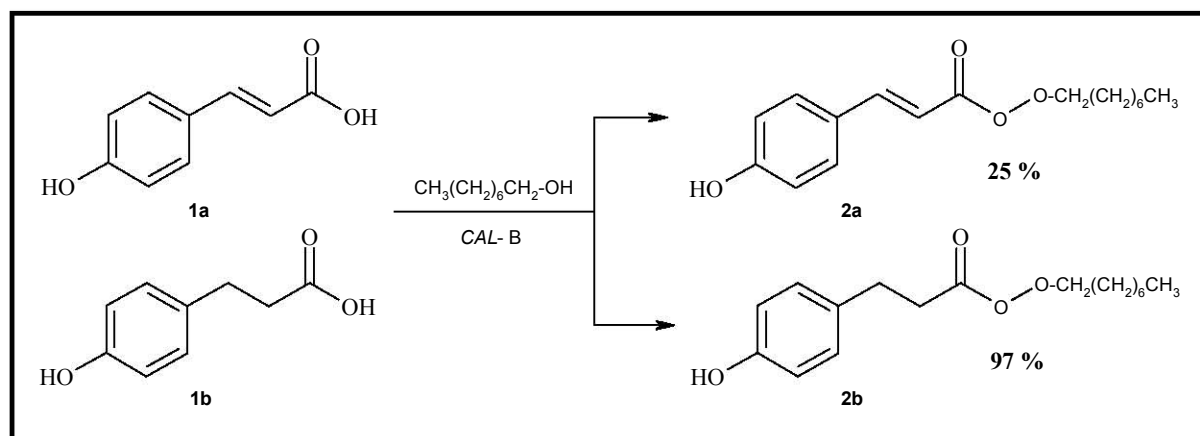


Figura 6. Reacción del ácido *p*-cumárico y su derivado hidrogenado: 1a ácido *p*-cumárico; 1b ácido *p*-hidroxifenilpropiónico; 2a cumarato de octilo (rendimiento = 25%); 2b hidroxifenilpropionato de octilo (rendimiento = 97%). Las reacciones se realizaron con la enzima CAL-B (lipasa de *Candida antarctica*) a 45 °C, durante 12 días.

Otra opción que se ha explorado es la transesterificación, partiendo del punto de que las lipasas y las esterasas también catalizan este tipo de reacciones, y que de esta forma se facilitaría el reconocimiento del sustrato (cabe recordar que las lipasas y las esterasas tienen por sustratos naturales moléculas con una cierta longitud). Armesto y col. (2003) presentan un trabajo en el que se ensaya la transesterificación de los vinilésteres de los ácidos cinámico, cumárico y ferúlico con un derivado del ácido shikímico. Comparando los resultados de este trabajo con los de Stamatis, se aprecia que mientras el viniléster del ácido cumárico no reacciona, el derivado hidrogenado de este presenta un rendimiento considerable (50%). En ambos casos la ausencia de la insaturación lateral mejora considerablemente la reacción. En la figura 7 se observa el diagrama de la reacción descrita.

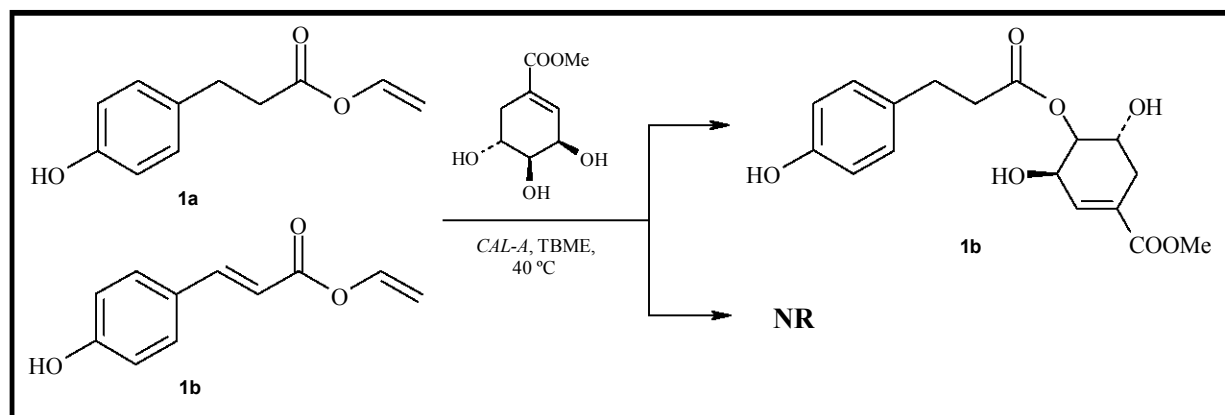


Figura 7. Reacción de los viniles ésteres del ácido *p*-cumárico (1b) y el del derivado hidrogenado (1a). 1a: *p*-hidroxifenilpropionato de vinilo; 1b: cumarato de vinilo; 2a: 4-*O*-cumaroilmethylshikimato; NR: no reaccionó. CAL-A: lipasa A de *Candida antarctica*; TBME: *t*-butilmetil éter. El tiempo de reacción fue de 8.5 hs para el primero y 72 hs para el segundo.

Contrario a lo que se pudiera suponer, en diversas referencias se presentan datos en los que la actividad antioxidante de los AHC y sus derivados hidrogenados es similar. Nenadis y col. (2003) realizaron diversas pruebas de actividad antioxidante para comparar el ácido cinámico (CA) y su derivado hidrogenado (dCA). Ellos encontraron que este último presentaba una mayor actividad antioxidante hacia el radical DPPH que el CA, mientras que en otras pruebas concluyeron que la extensión de la conjugación a la cadena alifática parece mejorar las propiedades descritas, ya que participa en la estabilización del radical por resonancia. Un trabajo anterior (Kikuzaki

et al., 2002) comparó a su vez las actividades antioxidantes de los ácidos caféico (CaA), sinápico (SA), ferúlico (FA), cumárico (CuA) y de algunos derivados esterificados del FA. Con respecto al radical DPPH encontraron, de mayor a menor actividad lo siguiente: CaA>SA>FA>ésteres FA>CuA. También concluyeron que no solo es importante la actividad secuestrante de los antioxidantes, también lo es la afinidad por los sustratos lípidos, lo que se mejora esterificando los AHC (aumentando su liposolubilidad).

La tendencia general de los resultados encontrados son bajos rendimientos de reacción, excepto en algunos casos (como los mostrados en los dos esquemas anteriores) y cuando se emplean los derivados hidrogenados de los ácidos o el ácido cinámico (el cual carece del sustituyente hidroxilo en el anillo aromático). La excepción a esta tendencia la presenta el trabajo de Giuliani y col. (2001) que han encontrado el mejor resultado con el ácido ferúlico, ya que al hacerlo reaccionar con pentanol alcanzaron el rendimiento más alto, 60%. Si bien un nivel de conversión así de elevado es lo que se busca en este tipo de ensayos, el método emplea un sistema de microemulsiones (w/o) que no se ha encontrado aún en ningún otro trabajo, por lo que se presume no resulta fácil de manejar ni de repetir.

En todos los trabajos citados en esta sección es también un factor destacable el uso de distintos solventes: desde utilizar los mismos nucleófilos como tales hasta una amplia gama de disolventes, que varía desde el *t*-butanol hasta el ciclohexano (Buisman et al, 1998). Otros elementos que se consideran en estos ensayos son: la actividad acuosa (A_w), la temperatura y agentes que atrapen el agua que se libera en la reacción. Sin ser algo que se cumpla en todo momento, en la mayoría de los casos el A_w se ajusta a 0.22, la temperatura oscila entre los 50 y 60 °C, y el agua liberada se “retira” del medio de reacción con malla molecular (4Å).

Como se puede constatar en estas líneas, son varios los parámetros que están involucrados en la consecución óptima de estas reacciones. También aparece que el tipo de moléculas que se pueden formar es muy amplio, ya que solo depende del

reconocimiento enzimático del donador de acilo (los AHC). De tal forma que el trabajo por hacer es mucho y la aplicación de los resultados parece ser mayor. A manera de conclusión se resumen en la siguiente tabla algunos de los factores que deben ser considerados cuando se decide trabajar con estos compuestos. Algunos de ellos se abordaron en esta breve introducción, otros quedan pendientes de ser tratados.

Tabla 6. Variables a considerar en reacciones de esterificación enzimática de AHC.

VARIABLES A CONSIDERAR EN LAS REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN DE AHC
<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de sustratos • Naturaleza del sustrato (AHC) • Solubilidad • Tipo(s) de solvente(s) • Actividad de agua (A_w) • Temperatura • Tipo de enzima (extracto, inmovilizada) • Sistema de reacción

1.3.3 Derivados esterificados con α -hidroxiácidos

Como ya se mencionó los AHC se encuentran en la naturaleza como ésteres, principalmente del ácido quínico, pero también con otras moléculas del tipo de los α -hidroxiácidos, tales como: ácidos málico y tartárico, α -hidroxihidrocafeico, galactárico, glucárico, glucónico, etc. Entre otros, Nenadis y col. (2003) destacan que los derivados del AHC son propensos a sufrir cambios dentro del tracto intestinal: metilaciones en el anillo aromático, hidrogenación de la cadena lateral o la hidrólisis de los ésteres, representan algunos ejemplos. De tal forma, los ésteres de AHC con α -hidroxiácidos son propensos a separarse en sus partes dentro del organismo al ser consumidos. Las propiedades de los AHC ya han sido discutidas, mientras que las de los hidroxiácidos no. Un ácido de este tipo, quizá el más importante a nivel industrial, es el ácido láctico. Esta sustancia presenta, entre muchas propiedades, actividad

antimicrobiana y puede ser utilizada también como humectante en el tratamiento de algunas enfermedades de la piel, de ahí que posea interés en las industrias farmacéutica y cosmética. La preparación de esta clase de ésteres mediante técnicas que involucren enzimas no está reportada, mientras que de su síntesis química convencional no existen muchos registros ya que es complicada y arroja bajos rendimientos. Algunos investigadores (Kiran y Divakar, 2001; Torres y Otero, 2001) han intentado la esterificación de α -hidroxiácidos con ácidos grasos, utilizando estos últimos en proporciones grandes para disminuir el riesgo de polimerización que se corren al emplear a los ácidos hidroxilados.

De tal forma, la preparación de ésteres de este tipo representa una doble ventaja, ya que se pueden aprovechar las propiedades de ambos tipos de compuestos.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Establecer una metodología para obtener ésteres a partir de los ácidos cinámico y ferúlico y sus dehidro-derivados con α -hidroxiácidos empleando enzimas como catalizadores.

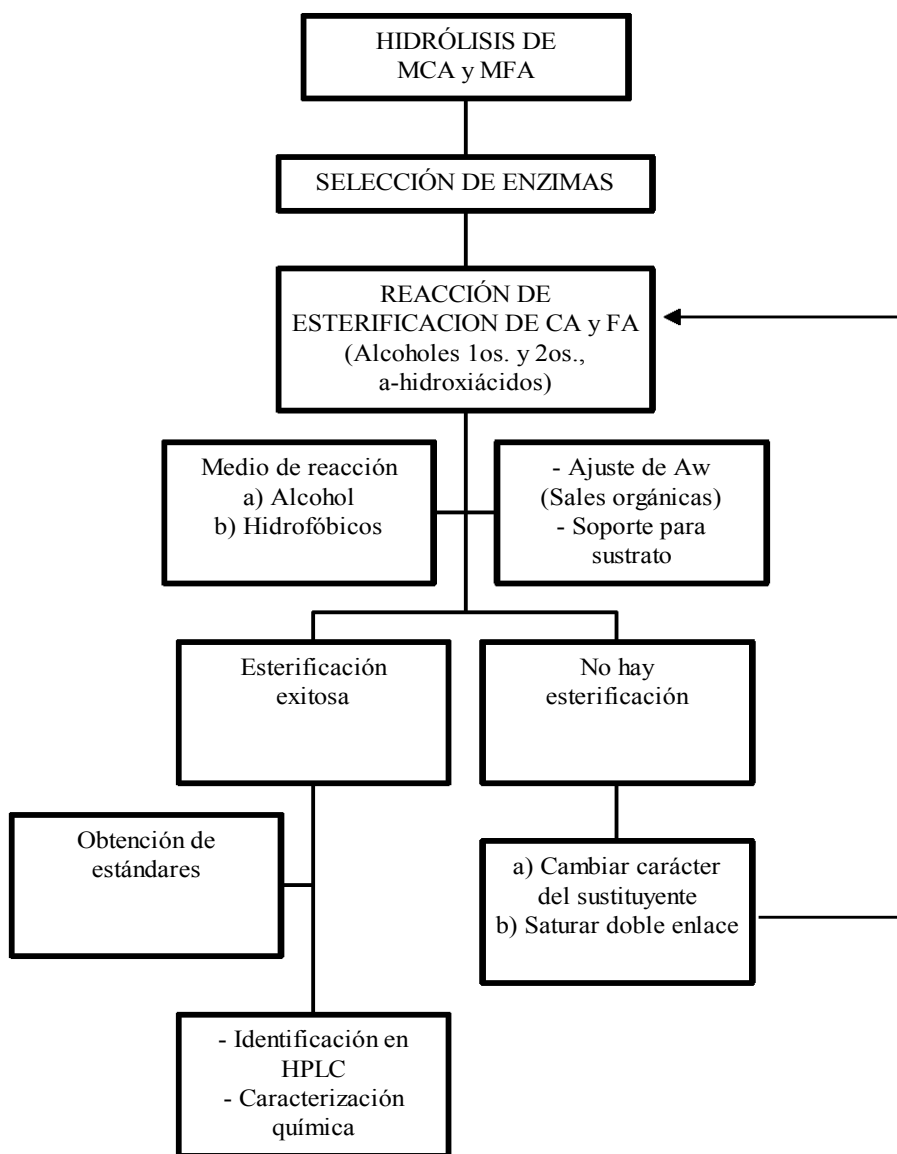
Objetivos particulares.

- Realizar una selección de enzimas que reconozcan a los donadores de acilo mediante pruebas de hidrólisis del metiléster de los ácidos ferúlico y cinámico, y posteriormente, en reacciones de esterificación con alcoholes alifáticos.
- Analizar las propiedades estructurales de los donadores de acilo que afectan los rendimientos de las reacciones de esterificación.
- Estudiar las reacciones de esterificación entre los donadores de acilo seleccionados y el ácido láctico.

2. METODOLOGÍA

2.1 Plan de trabajo

El proyecto se realizó siguiendo el diagrama de trabajo que se muestra al final del párrafo, este procedimiento fue aplicado como una estrategia general para intentar cubrir los objetivos planteados. De tal forma se escogieron los biocatalizadores, se realizaron las reacciones con los sustratos en estudio y se aislaron, purificaron y caracterizaron los productos:



2.2 Enzimas

Se utilizaron las siguientes enzimas:

Lipasas: Novozyme 435 (lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada), LipozymeTM (*M. miehei*) (ambas de Novo Nordisk, Dinamarca) y Chirazyme^R L-1 (Boehringer-Mannheim, Alemania). Esterasas: Depol 670-L y Depol 740-D, ambas estabilizadas por una mezcla de polietilenglicol (Novo Nordisk, Dinamarca).

2.3 Sustratos

Ácido ferúlico (ácido 3-(4'-hidroxi-3'-metoxi)fenil-2-propenoico), se obtiene por extracción de las aguas de desecho de la nixtamalización del maíz (nejayote), por un método previamente descrito (Tercero, 2001). Por cada litro de nejayote se añaden 6 mL de HCl concentrado, de manera que se alcance un pH de 3.0 a 3.5. Posteriormente se añaden 6 g de carbón activado/ L de nejayote y se agita por 0.5 hs. Esta mezcla se centrifuga 15 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se decanta y el sedimento se extrae con acetato de etilo a 50 °C. El extracto se concentra y el sólido obtenido se recristaliza de acetona/agua. Se obtienen polvo blanco y/o cristales. La pureza se detecta por punto de fusión.

Ácido cinámico (ácido 3-fenil-2-propenoico), grado reactivo marca Aldrich.

Ésteres metílicos de ácido ferúlico (MFA) y ácido cinámico (MCA), siguiendo el método de esterificación de Fischer: 1 g del ácido se coloca en 20 mL de metanol seco y 0.5 mL de H₂SO₄ (conc.). Se mantiene a reflujo durante 4 hs, en un aparato que posea un dispositivo deshidratador del condensado. La reacción se realiza en atmósfera inerte de N₂. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se lava con un volumen igual de agua destilada y se hacen extracciones con CH₂Cl₂. Posteriormente la fase orgánica es lavada con una solución saturada de NaHCO₃. El producto de recristaliza de etanol/agua.

Hidrogenación del ácido cinámico y del ácido ferúlico (dCA), 1 g del ácido en cuestión se disuelve en 5 mL de acetato de etilo anhidro. Se adiciona 0.1 g de una mezcla Pd/carbón activado. La mezcla se coloca en un matraz a presión reducida y agitación

continúa toda la noche. Pasado este tiempo se filtra la mezcla y el filtrado se seca en un evaporador rotatorio (Büchi B-490).

La pureza de todos los sustratos se comprobó por espectroscopía IR, MS y RMN-¹H. (Ver sección de Resultados y Discusión).

2.4 Hidrólisis de ésteres

A 4 mL de una solución 2 mM del éster en cuestión (ésteres metílicos de los ácidos cinámico y ferúlico) en buffer MOPS 0.1 M (pH = 6), se le añaden distintas cantidades de enzima (se mencionan en los resultados). La reacción se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 30°C, 230 rpm. 4 hs. Los resultados se monitorean por cromatografía en capa fina, según se describe en la sección 2.7.1.

2.5 Ajuste de A_w

Se dejaron equilibrar todos los componentes de la reacción, por separado, con una solución saturada de acetato de potasio ($A_w = 0.22$) durante 48 hs a temperatura ambiente (20 °C) (Torres & Otero, 2001).

2.6 Reacciones de esterificación enzimática

2.6.1 Esterificación con alcoholes

Para la obtención de los ésteres mediante catálisis enzimática se ajustó la técnica descrita por Guyot y col. (1997). El ácido se disolvía en 5mL del alcohol, de manera que la concentración fuera de 90 mM. La cantidad de enzima era de 50 mg. La reacción se llevó a cabo en reactores sellados, en intervalos que variaban de 5 a 10 días a 60 °C y agitación rotatoria de 200 rpm. La caracterización química de los productos de estas reacciones, y las de la sección 2.6.3, se realizaron por distintas técnicas espectroscópicas y los resultados de estas se resumen en tablas en la sección de Resultados y Discusión.

2.6.2 Esterificación de ácido láctico y ácido oleico

Esta reacción se realizó para corroborar que era posible emplear el ácido láctico como nucleófilo y para ensayar las condiciones necesarias para emplearlo en la esterificación con los ácidos cinámicos. La metodología fue descrita por Torres y Otero (2001): el ácido láctico se adsorbía en sílica gel-60 a razón de 1:2 (mg) y la mezcla obtenida se secaba a presión reducida. Posteriormente se le añadían de 50 a 100 mg de malla molecular (4 Å) y de 50 a 100 mg de enzima. Al colocar toda esta mezcla en el reactor, se adicionaban 4 mL de hexano. Además, se pesaba una cantidad de ácido oléico de manera que la relación láctico: ácido oléico fuera 1:5. Después de ajustar el Aw durante 48 hs., se llevaba a cabo la reacción a 50°C, en agitación rotatoria a 240 rpm, durante 5 días. Al terminar este tiempo, se filtra la mezcla reactiva y se seca en un evaporador rotatorio.

2.6.3 Esterificación con ácido láctico

La reacción del ácido láctico con los AHC, siguió la metodología descrita en el párrafo anterior con un único ajuste en el solvente empleado como medio de reacción: se emplearon hexano y distintas mezclas de hexano con *t*-butanol (desde 90:10 hasta 10:90). La relación de donador de acilo:nucleófilo se mantuvo de 5:1.

2.7 Análisis y monitoreo de las reacciones

2.7.1 Cromatografía en Capa Fina

La separación por cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo en placas Alugram Sil G/ UV, de gel de sílice 60. La mezcla eluyente empleada normalmente fue de Hexano:acetato de etilo:ac. acético (7:3:0.01) para las reacciones de esterificación en donde participaban los ácidos cinámico y ferúlico, a excepción que se especifique otra cosa. Las placas fueron visualizadas mediante cámara UV y por los reveladores de sulfato cérico y cloruro férrico en solución etanólica. Los factores de retención (Rf) para

este sistema de elusión fueron: ácido ferúlico, 0.35; metilferulato, 0.56; ácido cinámico, 0.3; propilcinamato, 0.6; butilcinamato, 0.9.

2.7.2 Cromatografía de líquidos

Para la cuantificación de los productos de reacción se empleó la cromatografía de líquidos (HPLC). Se utilizó una columna Nova-Pak C₁₈, 300mm de longitud. La fase móvil fue una mezcla de etanol/ agua (70/30) y la detección se alcanzó mediante un detector de arreglo de diodos Waters 2487 dual λ detector de absorbancia UV a 280 y 320 nm.

2.8 Caracterización química de los productos

Los espectros de infra-rojo (IR) se corrieron en pastilla de KBr y en película (según sea el caso), en los equipos IR Perkin-Elmer 283 y Nicolet FT-IR 55X; las bandas de absorción están reportadas en cm^{-1} . La espectroscopía de masas (EM) se realizó por cromatografía de gases (CG)/impacto electrónico (IE) de baja resolución; empleando un equipo de gases/masas Hewlett-Packard 5945-A, JMS-SX102A Jeol. La resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) se corrió a 300 MHz en CDCl₃ en un equipo Varian Gemini; los desplazamientos químicos (δ) están en ppm y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz. Se asignaron las siguientes abreviaturas: s = singulete, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete, m = multiplete. Todos estos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (U.S.A.I.) de la Facultad de Química, U.N.A.M.

2.8.1 Espectros seleccionados.

A continuación se presentan los datos destacables de los espectros que se seleccionaron, los cuales se pueden consultar en el anexo al final de este escrito.

Ácido Cinámico (CA)

IR (ν) 3065, 3025, 2829, 1889, 1678, 1628 **EM** m/z 147 (M^+ , 100)

Ácido hidrocinámico (dCA)

EM m/z 150 (M^+ , 50), 91 (100)

Isopropil cinamato (CAOPr)

IR (ν) 3410, 3060, 3028, 2959, 2932, 2873, 1713, 1638, 1450, 1309, 1279, 1201, 1169, 767, 711, 684. **EM** (m/z) 190 (M^+ , 50), 131 (100). **RMN-¹H**: δ 5.00 (m, $J=6.3$, 1 H, $OCH(R)_2$), 1.2 (d, $J=6.3$, 6H RCH_3)

Butil cinamato (CAOBu)

IR (ν) 3417, 2956, 2925, 2854, 1716, 1637, 1578, 1379, 1309, 1279, 1201, 1169, 767, 709, 684. **EM** (m/z) 204 (M^+ , 40), 131 (100). **RMN-¹H**: δ 7.59 (d, $J=15.6$, 1H *trans*), 7.44 (t, $J=$, 2H arom), 7.3 (d, $J=$, 2H arom), 7.17 (s, 1H Ar-OH), 6.36 (d, $J=16$, 1H *trans*), 4.07 (d, $J=4.07$, 2H, OCH_2R)

Ácido ferúlico (FA)

RMN-¹H: δ 7.71 (d, $J=15.98$, 1H, *trans*), 7.12 (d, $J=8.12$, 1H, arom), 7.07 (dd, $J=4.36$, 1H, arom), 6.93 (d, $J=1.92$, 1H, arom), 6.29 (d, $J=15.88$, 1H, *trans*), 3.94 (s, 3H, CH_3-R). **IR** (ν) 3432, 2968, 1665, 1598, 1514, 1273, 945. **EM** m/z 194 (M^+ , 10), 179 (100).

isoPropilferulato (FAOPr)

EM m/z 236 (M^+ , 95), 194 (100)

Butilferulato (FAOBu)

EM m/z 250 (M^+ , 85), 194 (100)

isopropil hidroferulato (dFAOPr)

EM m/z 238 (M^+ , 70), 137 (100). **RMN-¹H**: δ 5.00 (m, $J=$, H $-OCH(R)_2$), 2.88 (t, $J=7.4$, $-CH_2-COOR$)

Butil hidroferulato (dFAOBu)

EM m/z 252 (M⁺, 80), 137 (100). **RMN-¹H**: δ 4.07 (t, J= 6.6, 2H -CH₂), 3.88 (s, 1H, -OCH₃), 2.881 (t, J₅₋₆= 7.8, 2H, CH₂-COOR), 2.591 (t, J₆₋₅= 7.8, 2H, ArCH₂-), 1.185 (q, J₃₋₂= 7.1, 2H, CH₂), 1.33 (m, J₂₋₃= 7.2, 2H, CH₂), 0.917 (t, J₁₋₂= 7.5, 3H, CH₃)

Éster lactocinamato (CAOLac)

EM m/z 220 (M⁺, 1), 147 (100)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estrategia general

La estrategia que se siguió para cubrir los objetivos planteados al inicio de este proyecto fue la siguiente: en primera instancia, se realizó una selección de enzimas (lipasas y esterasas) mediante un ensayo de hidrólisis de los ésteres metílicos de los AHC seleccionados, para observar la posible identificación de los sustratos así como la actividad de los catalizadores; con estas enzimas se realizaron pruebas de esterificación entre alcoholes alifáticos primario y secundario (butanol e *isopropanol*) y los AHC; a continuación se efectuaron las reacciones con los nucleófilos elegidos y el ácido láctico; posteriormente se caracterizaron los productos y se compararon los resultados obtenidos para conocer la influencia de la estructura de los AHC empleados. A continuación se detallan los resultados y los análisis de los mismos.

3.2 Hidrólisis de ésteres

Para evaluar el reconocimiento del sustrato donador de acilo, se probaron un grupo de enzimas (lipasas y esterasas) en un ensayo ya conocido en el que se hidroliza el éster metílico de algún AHC (Williamson et al, 1998). En el caso de este proyecto se hicieron las pruebas para los metilésteres de los ácidos cinámico (MCA) y ferúlico (MFA), preparados mediante la técnica de esterificación catalizada por ácido y a reflujo, con un agente desecante que eliminara el agua que se producía en la reacción (método de Fischer). Las reacciones se monitorearon por CCF y los resultados se resumen en la tabla 7, que se presenta a continuación.

Tabla 7. Resultados de la selección de enzimas por hidrólisis de los metil ésteres de los AHC con diferentes enzimas.

REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE LOS METILÉSTERES DE AHC		
ENZIMA	HIDRÓLISIS	
	MCA	MFA
Extracto Avena	No	No
Extracto Avena Liof.	No	No
Depol 670L	Si	Si
Depol 740D	Si	Si
Chirazyme	No	No
Lipozyme	Si	No
Novozyme 435	Si	No

En el caso del CA, las enzimas seleccionadas fueron las lipasas Lipozyme, Novozyme 435, Chirazyme, así como las esterasas Depol 670L y Depol 740D. En lo que respecta al FA se seleccionaron únicamente las esterasas, las cuales tienen a los ésteres que forma éste AHC como sustrato natural. Los datos concuerdan con pruebas reportadas con anterioridad en donde el etil éster del FA no es un buen sustrato para hidrólisis con las lipasas (Andersen et al, 2002). En dicho trabajo realiza una selección con diversas lipasas (entre ellas Novozyme 435 y Lipozyme) para detectar si poseen actividad de feruloil esterasa y concluyen que no poseen una actividad significativa.

Una vez recopilados los resultados de dichos ensayos se decidió utilizar las enzimas que se seleccionaron en la hidrólisis del metil éster del CA, ya que al menos así se tenía información de que las enzimas poseían actividad y, como consecuencia de esto, existía un reconocimiento tanto del anillo aromático como del enlace éster. El empleo de las esterasas fue descartado debido a que una vez liofilizadas (estas enzimas se comercializan en un sistema de polioles para estabilizarlas, pero para su empleo en medios no-acuosos era necesario filtrarlas y liofilizarlas) se probaron en el ensayo de hidrólisis descrito líneas arriba, rompimiento del éster metílico, para corroborar si retenían su actividad. Esta no se conservó, por lo que se descartaron tanto la Depol 670L como la Depol 740. De tal forma se puede afirmar que estas enzimas son muy inestables una vez que se les retira la matriz con la que se vende. Cabe destacar que enzimas de este tipo (feruloilesterasas, pero de *F. oxysporum*) ya habían sido probadas en reacciones de esterificación entre AHC y en dichos trabajos se encontraron rendimientos de reacción pobres, por debajo del 10 % de conversión después de 10 días (Stamatis et al., 2001; Topakas et al., 2003). Estos datos nos podrían indicar que aún cuando las enzimas Depol hubieran podido ser empleadas, esto no aseguraba mejores resultados.

3.3 Reacciones de esterificación enzimática

3.3.1 Esterificación con alcoholes

3.3.1.1 Reacciones con ácido cinámico

Con las enzimas seleccionadas en la sección 3.1 se realizaron las pruebas de esterificación con alcoholes alifáticos: *iso*-propanol y butanol, cuyas estructuras se observan en la figura 8.

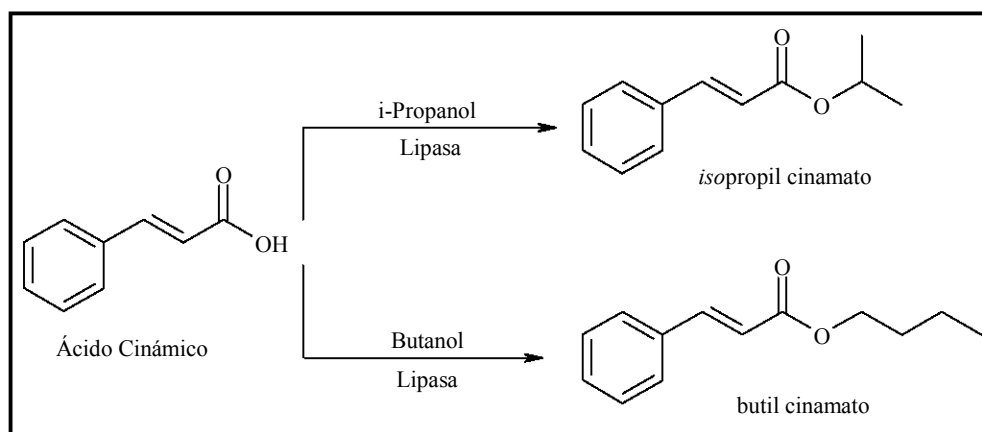


Figura 8. Reacciones de esterificación enzimática de ácido cinámico con alcoholes alifáticos.

Todos los ensayos que se describen en esta sección y en las dos subsecuentes, se llevaron a cabo con el objetivo de probar tanto las condiciones de reacción como el reconocimiento del donador de acilo por parte de las enzimas (ahora en un medio de reacción distinto al que fueron seleccionadas), por un método sencillo (Guyot et al, 1997). A su vez, los alcoholes empleados (butanol e *iso*-propanol) se emplearon para determinar diversos factores: el alcohol primario (butanol) permitía conocer la actividad de las enzimas en un ensayo que ya ha sido estudiado; el alcohol secundario (*iso*-propanol) representa un nucleófilo menos eficiente, además de que el grupo hidroxilo del ácido láctico es de carácter secundario y esto ayuda a conocer el comportamiento de las enzimas. En la figura 9 se observan las estructuras de estos dos alcoholes y del ácido.

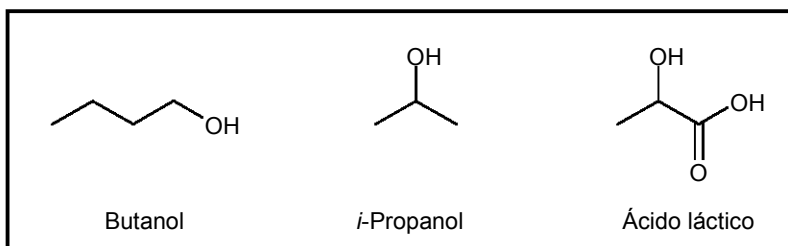


Figura 9. Estructuras químicas de los nucleófilos empleados.

La primera de estas pruebas fue hacer reaccionar el butanol ya que se tenía conocimiento de la esterificación de AHC con este alcohol con buenos rendimientos (Guyot et al., 1997; Priya & Chadha, 2003), así que dicho ensayo se presentaba como un buen parámetro para evaluar tanto las condiciones de reacción como la capacidad de las enzimas para llevarla a cabo (su actividad). Posteriormente se utilizó el *iso*-propanol debido a que su grupo hidroxilo es de carácter secundario, tal como el del ácido láctico, y de esta forma se podía presumir el reconocimiento del alcohol secundario como nucleófilo. Este parámetro es importante de evaluar ya que algunos autores han encontrado que los alcoholes primarios son mejores sustratos en este tipo de reacciones que los secundarios (Torres & Otero, 2001), debido a cuestiones de impedimento estérico.

De esta manera a continuación se muestran, en primer lugar, los datos de las reacciones del ácido cinámico (tabla 8) y, posteriormente, los de su derivado hidrogenado (tabla 16, p. 50) con dos alcoholes alifáticos. Los rendimientos de las reacciones (% de conversión) se midieron por HPLC, en base a la desaparición del donador de acilo (CA y dCA).

Los tiempos a los que se tomaron muestras para seguir el desarrollo del ensayo se distribuyeron de la siguiente forma: desde el tiempo 0 cada 24 hs durante 5 días y al día 10. De dichas muestras se retiraban 20 μ L de la mezcla de reacción, se filtraban, se concentraban a presión reducida y se resuspendían en 2 mL de metanol para su posterior análisis cromatográfico. Los resultados de estos ensayos se resumen en la tabla 8. Los rendimientos de la reacciones se calcularon de la concentración de sustrato que había reaccionado comparada con la concentración inicial (porcentaje de conversión molar). Paralelamente a este procedimiento, se obtuvo un estándar por vía sintética convencional (método de Fischer) del éster butílico para poder tener una mejor referencia tanto en HPLC como en EM. Los tiempos de retención (t_{ret}) para el CA, el éster propílico y el éster butílico

fueron, respectivamente: 2.85, 4.8 y 5.6 minutos, a las condiciones mencionadas en la metodología.

Tabla 8. Rendimientos de reacción de esterificación del ácido cinámico (CA) y alcoholes alifáticos (butanol (BuOH) e *iso*-propanol (*i*-PrOH)) catalizada por las lipasas Novozyme 435 y Lipozyme. Tiempo de reacción: 10 días, 60 °C, 90 mM del donador en 5 mL del alcohol.

REACCIÓN	RENDIMIENTO (%MOLAR)	
	Novozyme 435	Lipozyme
CA + BuOH	32	19
CA + <i>i</i> -PrOH	23	14

En el figura 10 se puede observar el comportamiento en la desaparición del sustrato de las reacciones del CA con el BuOH. A partir de estos resultados resalta que la Novozyme 435 presenta tanto una velocidad ligeramente mayor como un mejor rendimiento de reacción debido a la diferencia entre las pendientes de la curva del tiempo 0 al día 4, lo cual es concordante con los datos que se presentan en el trabajo de donde se tomó la metodología seguida hasta el momento (Guyot et al., 1997), pero sin ser tan altos como aquellos (90%). Los datos que se rescatan de esta prueba sirven para comprobar varias cosas: que el sustrato era reconocido como donador de acilo por la enzima; que las condiciones de reacción eran adecuadas; además de comparar los rendimientos entre ambas enzimas.

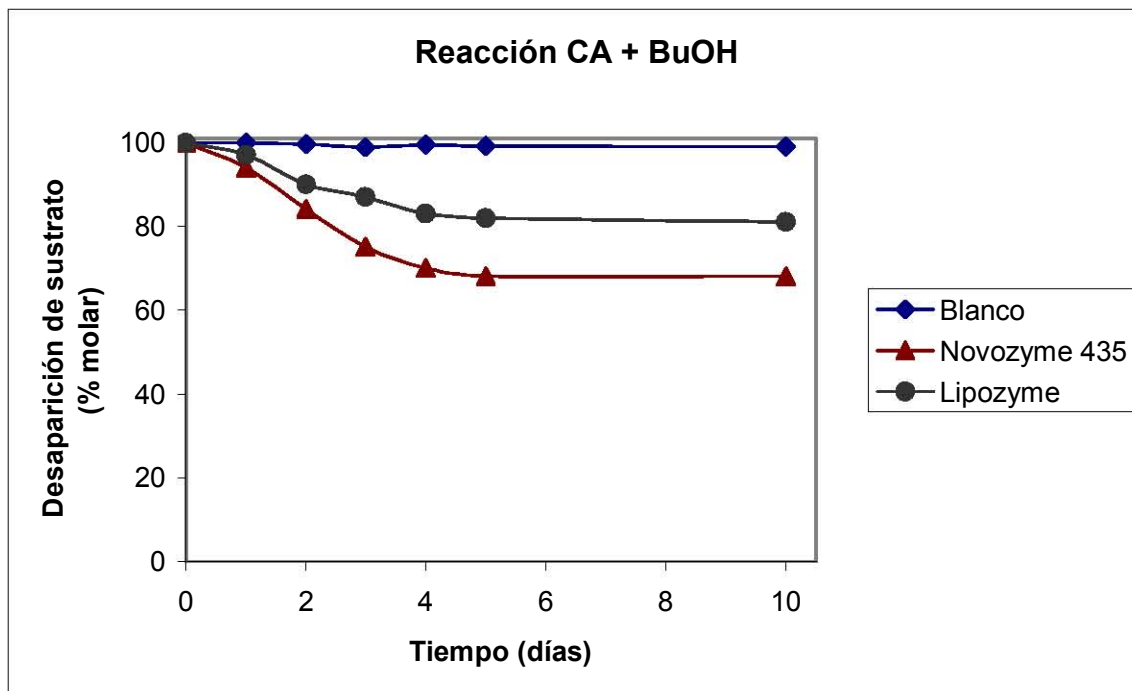


Fig 10. Desaparición de sustrato en la reacción CA + BuOH, utilizando las enzimas Novozyme 435 y Lipozyme.

De los datos que corresponden a la reacción entre el CA y el *i*-PrOH (figura 11, en la siguiente página), reconocimiento de un alcohol secundario (análogo del grupo hidroxilo secundario de un α -hidroxiácido), se puede observar que para ambas enzimas se presenta una disminución en el rendimiento de la reacción, siendo de nueva cuenta Novozyme 435 la que mejores resultados presenta. A un inicio, entre las 0 y las 48 hs., las pendientes de las curvas de ambas enzimas son muy similares lo que representa una velocidad de reacción similar. A partir de este punto la Lipozyme parece llegar a su saturación pues disminuye la pendiente de la curva. Por el contrario, la velocidad de conversión de la Novo 435 solo empieza a disminuir a las 96 hs.

Si se toma como marco de comparación los rendimientos que proporcionan las enzimas, se encuentra que la que dio mejores resultados en estos ensayos es la misma lipasa que en reportes anteriores ha presentado los porcentajes de conversión más altos. Stamatis y cols. (2001) comparan estas dos lipasas en la esterificación de distintos AHC con 1-octanol y cuando el donador de acilo es el CA la diferencia en el rendimiento de reacción empleando la Novozyme 435 con respecto a la Lipozyme es mayor al 20%.

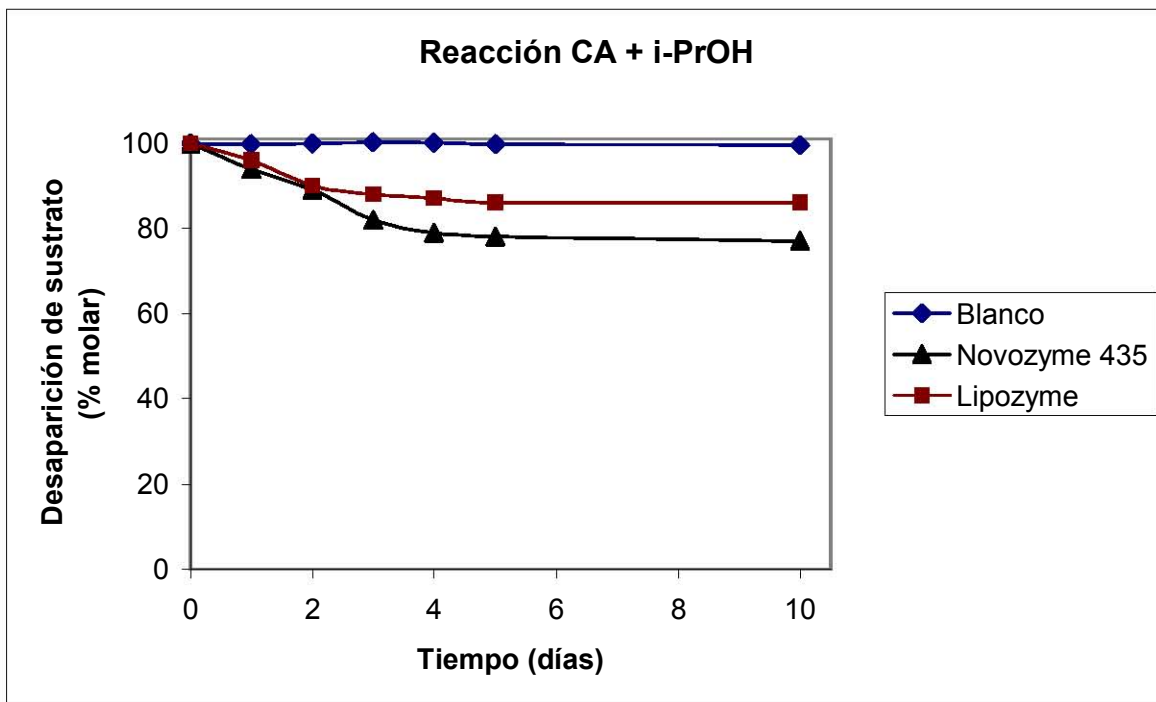


Fig. 11: Desaparición de sustrato en la reacción CA + i-PrOH, utilizando las enzimas Novozyme 435 y Lipozyme.

Por otra parte, en lo que se refiere a los nucleófilos, se puede observar que los resultados fueron acorde a los esperado. El alcohol primario (butanol) resultó un mejor sustrato que el alcohol secundario (*iso*-propanol), ya que para ambas enzimas el rendimiento de uno con respecto al otro fue de 9% para la Novo435 y de 5% para la Lipozyme. Si se toma como factor de referencia en estas reacciones el catalizador que mejores resultados dio según el trabajo de Stamatis (la Novo 435), en la reacción con el BuOH el rendimiento está cercano al 35%, mientras que con el *i*-PrOH no pasó del 20%. En algunas referencias se explican estas diferencias en los rendimientos debido a un supuesto impedimento estérico que presentarían los alcoholes secundarios al entrar en contacto con el sitio activo de las lipasas, el cual los primarios no (Torres & Otero, 2001).

La caracterización química de los productos obtenidos se realizó mediante diversas técnicas espectroscópicas, los datos que se obtuvieron de ellas se resumen a continuación y los espectros de donde se obtiene esta información pueden ser consultados al final de este texto en un anexo. En primer lugar se observan los datos de IR y EM del ácido cinámico, los cuales se utilizaron como referentes para comparar los de los productos de reacción.

Seguido a estos datos se encuentran los del cinamato de *iso*-propilo (tablas 11-13); aquí se destacan la banda típica del enlace éster que se observa en el IR (1678 cm^{-1}), el patrón de fragmentación de EM y las señales del hidrógeno del metilo unido al O del enlace éster (H^b). Mismo caso del butil cinamato (tablas 14 y 15), en cuanto a las señales presentadas por IR (la señal típica de absorción del enlace éster 1716 cm^{-1}) y EM (ión molecular a 220, con un patrón de fragmentación muy similar a la del propilcinamato). No se consideró realizar el espectro de IR del butilcinamato debido a que los datos de IR y EM resultaban suficientes para asignar la estructura.

Tabla 9. IR del ácido cinámico

IR (KBr/Pastilla) ν max (cm^{-1}): Espectro CA	3065 (OH), 3025 (arC-H), 1678 (C=O), 1628 (C=C), 1284 (C-OH)
--	---

Tabla 10. EM del ácido cinámico

GS/EM IE m/z Espectro CA	147 (M^+ , 100)
-----------------------------	---------------------------

Tabla 11. IR del isopropil cinamato

IR (Película) ν max (cm^{-1}): Espectro CAOPr	3410 (OH), 3060, 3028 (arC-H), 2959, 2932, 2873 (C-H), 1713(C=O conj), 1638 (C=C), 1309, 1201 (C-O), 1172 (C-(CH_3) ₂)
---	---

Tabla 12. EM del isopropil cinamato

GS/EM IE m/z Espectro CAOPr	190 (M^+ , 50), 131 (100)
--------------------------------	-------------------------------------

Tabla 13. RMN-¹H del isopropil cinamato

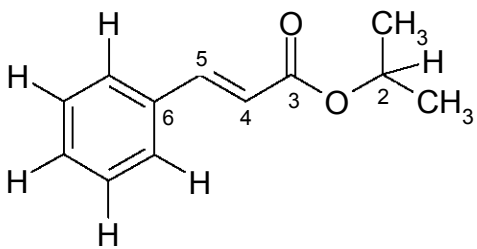
Desplazamientos Químicos (ppm) Constantes de acoplamiento J (hertz) CAOPr

5.00 (q, $J_{2-1} = 6.3$), 1.2 (d, $J_{1-2} = 6.3$)

Tabla 14. IR del butil cinamato

IR (Película) ν max (cm ⁻¹):	3417 (OH), 2956, 2925, 2854 (C-H), 1716
Espectro CAOBU	(C=O conj), 1637 (C=C), 1279, 1201 (C-O), 1169, 767, 709 (CH ₂)

Tabla 15. EM del butil cinamato

GS/EM IE m/z	204 (M ⁺ , 40), 131 (100)
Espectro CAOBU	

3.3.1.2 Reacciones con el ácido hidrocinámico

En lo que concierne al derivado hidrogenado del ácido cinámico (dCA), los resultados son congruentes con lo reportado y se resumen en la tabla 16. Para ambos nucleófilos y con ambas enzimas los rendimientos son más altos que para el CA y, lo que es más destacable, la reacción se lleva a cabo en un menor tiempo. De hecho no fue necesario monitorear las reacciones durante tantos días como lo fue para las anteriores, ya que los puntos más altos de conversión se alcanzaban en un 1 día. En la figura 12 se presenta el esquema general de las reacciones del dCA con los alcoholes seleccionados, mientras que en la tabla 18 se encuentran los rendimientos (% de conversión) de las reacciones con las dos enzimas empleadas.

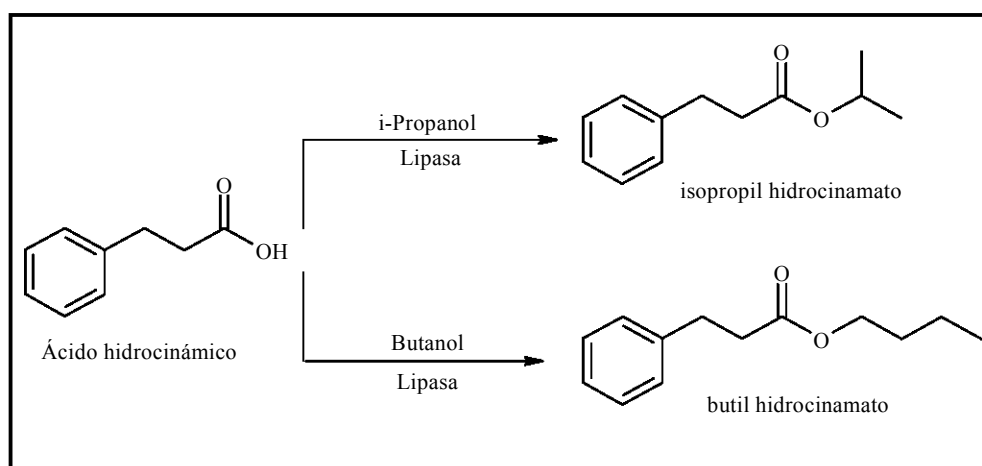


Figura 12. Reacción de esterificación enzimática de ácido hidrocinámico (dCA) con alcoholes alifáticos.

Tabla 16. Rendimientos de reacción de esterificación del ácido cinámico hidrocínámico (dCA) y alcoholes alifáticos (butanol (BuOH) e *iso*-propanol (*i*-PrOH)) catalizada por las lipasas Novozyme 435 y Lipozyme. Tiempo de reacción: 5 días.

REACCIÓN	RENDIMIENTO (%MOLAR)	
	Novozyme 435	Lipozyme
dCA + BuOH	55	49
dCA + <i>i</i> -PrOH	38	33

En esta tabla se puede observar que los rendimientos casi duplican a los obtenidos en las reacciones con CA, con ambas enzimas y con los dos nucleófilos. También se puede destacar que en ambos casos el butanol sigue siendo mejor sustrato, ya que presenta porcentajes de conversión por arriba de 10 puntos más que el *isopropanol*.

La razón por la cual la saturación de la cadena lateral ocasiona mejores rendimientos de reacción se ha explicado (Priya & Chadha, 2003) debido a que la ausencia del doble enlace permite al donador de acilo una mayor movilidad y, por tanto, un mejor reconocimiento en el sitio activo (la libertad de rotación del enlace σ parece favorecerlo a diferencia de la rigidez que confiere un enlace π), lo que es concordante con los resultados mostrados en el presente escrito. En esta misma investigación (Priya y Chadha, 2003) se realiza tanto la esterificación como la transesterificación del dCA y de su éster etílico (respectivamente) con amplia gama de alcoholes, de carácter 1° 2° y 3° , desde el metanol hasta el cinamol, y dentro de los cuáles se encuentran el butanol y el *i*-propanol. El rendimiento que presenta el butanol en ambos casos (esterificación y transesterificación del etilhidrocínamate) es de 83 y 92 %, siendo el mismo nucleófilo solvente. Caso contrario es el del *i*-propanol, el cual en la reacción de esterificación es tan buen nucleófilo como el butanol, pues presenta también un 83% de rendimiento, siendo estos resultados contrarios a los expuestos en este proyecto en donde siempre fueron inferiores los del alcohol secundario lo que muestra que no existe un argumento sólido para afirmar que los alcoholes secundarios son siempre peores nucleófilos que los primarios. La razón principal de esta diferencia debe radicar en la enzima, ya que estos investigadores emplean una lipasa derivada de *Pseudomonas cepacia*, y en la temperatura de reacción (30 °C). En un amplio estudio realizado por Otto y col. (2000), los autores encuentran que la lipasa Novo 435

(Cal-B) no presenta activación interfacial (como si lo hace la mayoría de las lipasas) y sugieren que debido a la estructura de la enzima que conduce al sitio activo, esta no acepta moléculas voluminosas (que no es el caso del alcohol *isopropílico*).

En una amplia revisión acerca del empleo de lipasas en síntesis orgánicas, Schmid y Verger (1998), sugieren que una de las desventajas en la selectividad de estas enzimas la representa la afinidad por el donador de acilo, ya que la mayoría acepta cadenas lineales (alifáticas) de una mejor manera que los grupos aromáticos voluminosos. En los resultados aquí presentados parece que los rendimientos en los ensayos de esterificación están más bien ligados al carácter propio del donador y no tanto a ser voluminoso.

En las figuras 13 y 14 se observan la desaparición del dCA en las reacciones con butanol e *isopropanol*, respectivamente. Ambas gráficas presentan un comportamiento similar, con una pendiente pronunciada en el transcurso del primer día, para luego mantenerse constantes entre el primer y segundo día, y hasta el quinto donde se decidió terminar la reacción debido a que no se observaba un mayor consumo de donador de acilo. Ahora, tomando como referencia las enzimas se puede apreciar que la tendencia seguida en las reacciones con CA se mantiene con el dCA. Con ambos nucleófilos la Lipozyme se satura a un tiempo similar que la Novo 435, pero a una menor concentración de los productos.

La última parte del ensayo correspondió a la asignación de estructuras de los productos. Solo se realizaron estudios de EM y tanto los iones moleculares como los patrones de fragmentación son congruentes con las estructuras esperadas. Dichos datos no se presentan pues lo que se quería contrastar es la diferencia de rendimientos asociada a las distintas características estructurales de los sustratos (donadores de acilo).

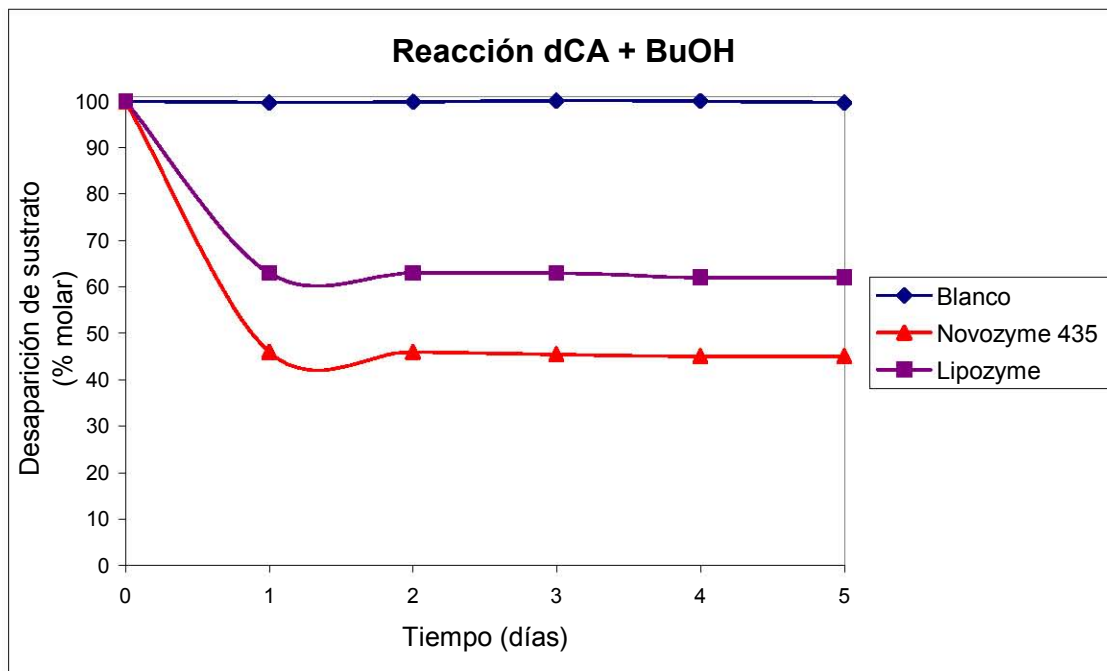


Figura 13. Desaparición de sustrato en la reacción de dCA con Butanol.

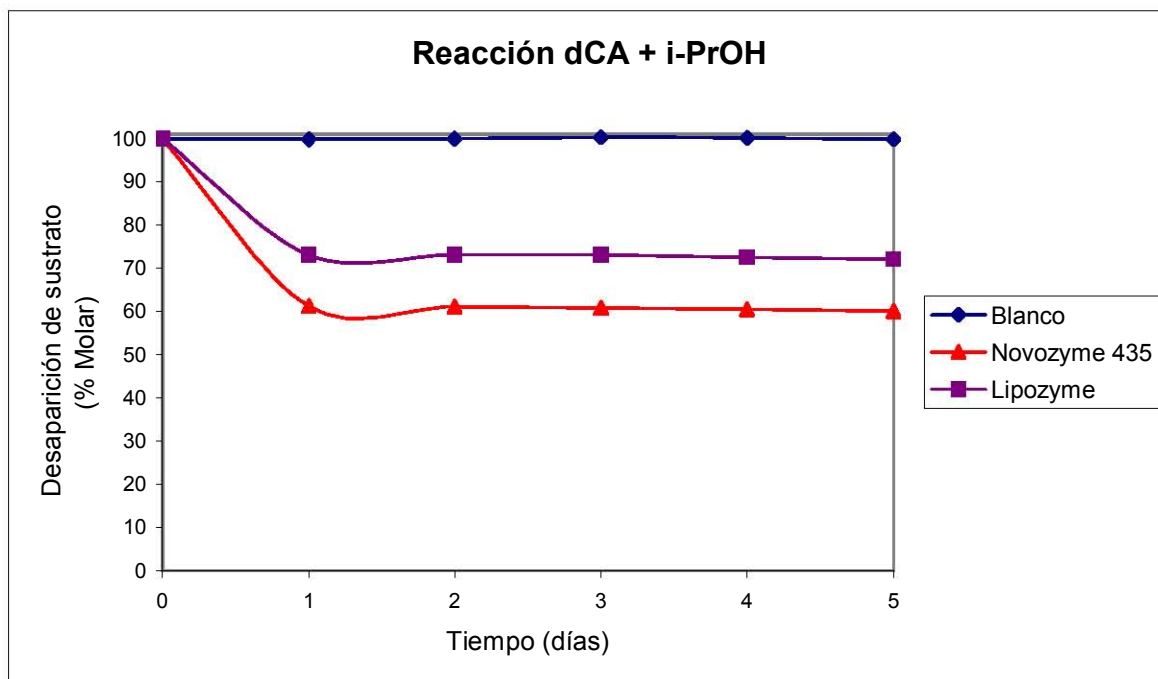


Figura 14. Desaparición de sustrato en la reacción de dCA con *iso*-propanol.

De tal manera, y con base en las observaciones hechas en esta sección, donde 2 enzimas (Novo435 y Lipozyme) llevan a cabo las reacciones de esterificación propuestas y, principalmente, teniendo en consideración que ambas enzimas reconocían un alcohol secundario como nucleófilo, se decidió utilizar ambas en los ensayos con ácido láctico. Además se pudo constatar que cuando el donador de acilo se encuentra saturado en su cadena alifática las reacciones presentan mejores rendimientos, de manera que a seguir se presenta el comportamiento de un sustrato con sustituyentes en el anillo aromático.

Antes de pasar a los resultados del FA y del dFA, y a manera de justificación para el empleo de los derivados hidrogenados, vale hacer mención de que si bien no existe evidencia concluyente que indique que los AHC vean alterada su actividad antioxidante al estar saturados en su cadena alifática lateral, si es conocido que muchos de estos compuestos hidrogenados poseen diversas propiedades bioquímicas: sirven como protectores a la desnaturalización de la quimiotripsina; son precursores de analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos; son empleados como intermediarios en la síntesis de inhibidores de proteasas de HIV (Priya y Chadha, 2003).

3.3.1.3 Reacciones con ácido ferúlico y su derivado hidrogenado

En la sección 3.1 se hizo mención de que las únicas enzimas que reconocieron al FA en la hidrólisis del MFA fueron las feruloilesterasas. Estas enzimas poseen como sustratos naturales a los ésteres que forman el FA con diversos polisacáridos de la corteza arbórea, así que se podía presumir que realizaran dicho ensayo. Por los motivos ya descritos (p. 42), estas enzimas no pudieron ser empleadas y se decidió probar las lipasas seleccionadas para los ensayos de esterificación de CA. Las cuales, por otra parte, ya habían sido utilizadas en ensayos de este tipo (trabajos resumidos en la tabla 5, pag. 26). Los resultados que se generaron en esta serie de reacciones se describen a continuación.

En los ensayos realizados con las lipasas Novo 435 y Lipozyme, los resultados obtenidos están en concordancia con los varios trabajos que se han presentado al respecto. Aparentemente, para ambas enzimas y con los dos nucleófilos, el FA es reconocido como

donador de acilo, pero la cantidad de productos que se forman es incuantificable. Debido a esto, no pueden ser aislados y caracterizados por resonancia. Se presume la formación del propilferulato y del butilferulato por los datos que arroja el espectro de CG/EM de la mezcla de reacción, donde la técnica permite separar los compuestos involucrados, pero no aislarlos debido a que se volatilizan y descomponen. En dichos espectros se nota la presencia de compuestos con iones moleculares y patrones de fragmentación a los esperados para dichos productos. Tales datos se resumen en las tablas 20 y 21, para el ferulato de propilo y el ferulato de butilo. Antes de dichas tablas se presentan los datos de IR, EM y RMN-¹H del ácido ferúlico (tablas 17-19), para hacer una comparación de los datos obtenidos.

Tabla 17. IR del ácido ferúlico

IR (KBr/Pastilla) ν max (cm ⁻¹):	3432 (arO-H), 2968 (Ar-H), 1665 (C=O),
Espectro FA	1598, 1514, 1273 (Ar-O-Me), 945

Tabla 18. EM del ácido ferúlico

GS/EM IE m/z	194 (M ⁺ , 10), 179 (100)
Espectro FA	

Tabla 19. RMN-¹H del ácido ferúlico

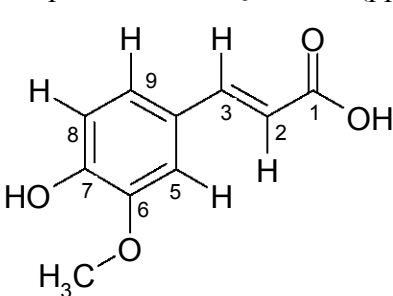
Desplazamientos Químicos (ppm) Constantes de acoplamiento J (hertz) FA

7.71 (d, J ₂₋₃ = 15.98), 7.12 (d, J= 8.12, 1H, arom), 7.07 (dd, J= 4.36, 1H, arom), 6.93 (d, J= 1.92, 1H, arom), 6.29 (d, J ₃₋₂ = 15.88), 3.94 (s, 3H, -OCH ₃)

Tabla 20. EM del *iso*-propilferulato

GS/EM IE m/z	236 (M ⁺ , 95), 194 (100)
Espectro FAOPr	

Tabla 21. EM del butilferulato

GS/EM IE m/z	250 (M ⁺ , 85), 194 (100)
Espectro FAOBu	

Por el contrario, y al igual que sucede entre el CA y el dCA, el derivado hidrogenado del ácido ferúlico (dFA) es mejor sustrato que el FA para los ensayos realizados. Las razones para que esto ocurra parecen explicarse, parcialmente, en la sección precedente, donde se menciona el papel que desempeña el doble enlace en el reconocimiento molecular enzimático. Si bien los rendimientos que se alcanzan con el dFA no son tan altos como para el dCA, si fue posible el aislamiento y caracterización de los productos. Una vez más fue la Novo 435 la enzima que mejores porcentajes de conversión dio para ambos alcoholes. Si bien los rendimientos no son despreciables, si es notable que la presencia de sustituyentes en el anillo aromático aparece como un factor que disminuye los rendimientos de reacción. En la tabla 22 se presentan los datos de los resultados de estos ensayos.

Tabla 22. Rendimientos de reacción de esterificación del ácido hidroferúlico (dFA) y alcoholes alifáticos (butanol (BuOH) e *iso*-propanol (*i*-PrOH)) catalizada por las lipasas Novozyme 435 y Lipozyme. Tiempo de reacción: 5 días.

REACCIÓN	RENDIMIENTO (% MOLAR)	
	Novozyme 435	Lipozyme
dFA + BuOH	26	18
dFA + <i>i</i> -PrOH	21	13

Para tener una mayor certeza de que los productos que se estaban obteniendo eran los correctos se realizó el análisis espectroscópico. Los datos de los espectros de EM y RMN-¹H para los productos de dichas reacciones se presentan de la siguiente forma: isopropilhidroferulato (tablas 23 y 24) y butilhidroferulato (tablas 25 y 26).

En la tabla 23 se puede apreciar que el ión molecular corresponde al del producto, mientras que en la tabla 24 los datos a resaltar y que ayudan a verificar que esta sea la estructura correcta son los hidrógenos en 2 y 4. Dichos desplazamientos químicos corresponden a H en esa situación. Por otra parte, la tabla 25 muestra que el ión molecular del FAOBu corresponde a su peso molecular, mientras que en la tabla 26 se aprecia el desplazamiento químico de los hidrógenos del C-4.

Tabla 23. EM del isopropil hidroferulato

GS/EM IE m/z	238 (M ⁺ , 70), 137 (100)
Espectro dFAOPr	

Tabla 24. RMN-¹H del isopropil hidroferulato

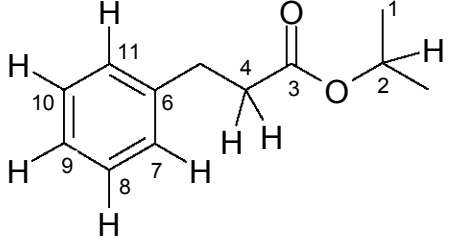
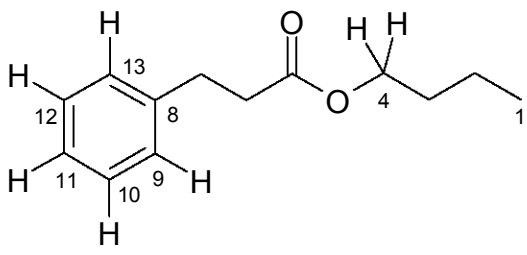
Desplazamientos Químicos (ppm) Constantes de acoplamiento J (hertz) dFAOPr

5.00 (q, J ₂₋₁ = 6.3), 2.881 (t, J ₄₋₅ = 7.4)

Tabla 25. EM del butil hidroferulato

GS/EM IE m/z	252 (M ⁺ , 80), 137 (100)
Espectro dFAOBu	

Tabla 26. RMN-¹H del butil hidroferulato

Desplazamientos Químicos (ppm) Constantes de acoplamiento J (hertz) dFAOBu

4.07 (t, J ₄₋₃ = 6.6, 2H, -OCH ₂ -), 3.88 (s, 3H, -OCH ₃), 2.881 (t, J ₅₋₆ = 7.8, 2H, CH ₂ -COOR), 2.591 (t, J ₆₋₅ = 7.8, 2H, ArCH ₂ -), 1.185 (q, J ₃₋₂ = 7.1, 2H, CH ₂), 1.33 (m, J ₂₋₃ = 7.2, 2H, CH ₂), 0.917 (t, J ₁₋₂ = 7.5, 3H, CH ₃)

Ahora, comparando los rendimientos entre el dCA y el dFA para todos los casos, podemos observar que el dCA es un mejor sustrato que el dFA, y es aquí donde entra en juego el otro factor mencionado como detractor en el reconocimiento por parte de las enzimas: la presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático. En un trabajo presentado por Armesto y col. (2003), se realizaron las transesterificaciones de los vinilésteres de AHC con diversos polioles y encuentran que aún cuando se satura el doble enlace de la cadena alifática (fig. 7, pag. 29), la presencia del grupo hidroxilo afecta el porcentaje de conversión de la reacción (hasta en un 50%). En este punto se puede presumir que la presencia del grupo OH, aún en la ausencia de la extensión del efecto de resonancia por el doble enlace en la cadena alifática lateral, es un factor que afecta el porcentaje de conversión, pues puede provocar alguna especie de impedimento estérico o algún otro tipo de interacción en torno al sitio activo o las regiones que lo circundan. Sin embargo, esta última afirmación no es compatible con otros reportes en donde se han comparado sustratos similares a estos. Por ejemplo, Stamatis y col. (2001) observan que los porcentajes de conversión del CA y del derivado hidrogenado del ácido cumárico a sus octilésteres es muy similar. Mientras que para Guyot y col. (1997) los rendimientos en la reacción de formación de los ésteres butílicos del CA y del derivado hidrogenado del ácido caféico varían por solo un 10%, y ambos están por encima del 75%. De tal forma que la presencia del grupo OCH₃ adyacente al OH en el anillo aromático aparece como otro factor a considerar como un participante en este supuesto impedimento estérico.

En la figura 15 se esquematizan los dos aspectos de la estructura que aparentan incidir en la consecución de las reacciones de esterificación estudiadas.

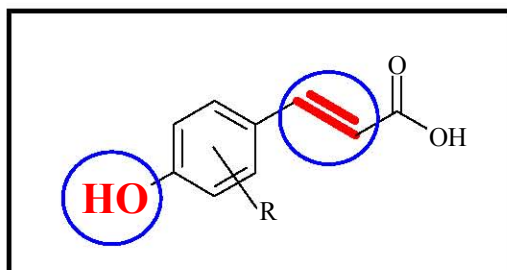


Figura 15. Esquema de la estructura común a todos los AHC, donde se resaltan los aspectos estructurales involucrados en los bajos rendimientos de reacción. Donde R puede ser H o CH₃O en posición *meta* al propileno.

3.3.2 Esterificación con ácido láctico

La reacción de esterificación de los AHC con ácido láctico presenta, en general, unos resultados similares a los obtenidos en la sección 3.3.1, ya que los donadores de acilo que reaccionan son aquellos que no poseen sustituyentes en el anillo aromático o, que al tenerlos, están saturados en la cadena alifática lateral. Es decir, el ácido ferúlico no reaccionó con el láctico, mientras que los ácidos cinámico, hidrocínámico e hidroferúlico sí lo hicieron. Por otra parte, se presentaron ciertos problemas con la caracterización química plena de dichos productos, siendo presumible la formación de algunos de los productos esperados mediante los datos obtenidos por las técnicas de GC/EM y RMN-¹H y los rendimientos obtenidos a partir de los porcentajes de conversión del ácido láctico.

La metodología empleada en este grupo de ensayos presentaba distintas variantes con respecto a las técnicas empleadas en las esterificaciones con alcoholes. En primer lugar había que considerar la naturaleza del nucleófilo. El ácido láctico (y en general todos los α -hidroxiácidos polares) puede actuar tanto como donador de acilo y nucleófilo (lo que hace que pueda sufrir reacciones de polimerización), lo que también provoca una competencia por el sitio activo. Otro factor a considerar es su alta polaridad, que en medios hidrofóbicos ocasiona que este sustrato tienda a buscar moléculas afines de tal forma que rodea e interacciona con los grupos hidrofílicos de la enzima alterando su conformación activa, desplazando el agua *ligada* o estructural. Tomando en cuenta estos datos se decidió emplear la estrategia seguida por Torres & Otero (2001), para contrarrestar los problemas que se presentan. Estos autores optan por emplear un material que funcione como reservorio para el ácido láctico, la gel de sílice. El empleo de la gel de sílice está justificado ya que su presencia ocasiona una mejora en los rendimientos de reacción, comparada con aquellas que no lo utilizan, tanto en el trabajo descrito como en el de Wei y col. (2003). Por otra parte, la presencia de este agente desecante ayuda a regular la presencia del nucleófilo en el medio de reacción lo que minimiza la posibilidad de que se polimerice, reacción que se ve favorecida en medios hidrofóbicos y a altas temperaturas (Torres y Otero, 2001). El aspecto negativo de esta parte radica en que la interacción entre soporte y nucleófilo sea tan grande que evite que reaccione con el donador.

Otro parámetro que se considera es la proporción de los sustratos. Los autores se avocan a utilizar al nucleófilo en una proporción molar menor a la del donador (desde 1:2 hasta 1:10), para evitar así la posible competencia por el sitio activo de la que se hablaba líneas arriba. De esta forma logran obtener ésteres de ácido láctico con ácidos grasos (de distintas longitudes) con rendimientos tan altos como 50 %. Otros trabajos en los que se esterifica el ácido láctico, ácidos grasos o alcoholes, emplean una proporción molar similar y obtienen buenos resultados (From et al, 1997; Torres y Otero, 1999-I; Wei et al, 2003). Basados en toda esta información, se decidió ajustar dicha técnica a los ensayos de esterificación, utilizando como medios de reacción hexano y mezclas de hexano/*t*-butanol a distintas proporciones. La elección del solvente se debió a que en los reportes mencionados y, en general, para las reacciones en las que se emplean lipasas se ha encontrado que el hexano es uno de los mejores medios de reacción; entre otras cosas porque es fácil de separar de las mezclas de reacción. Por otra parte el empleo de *t*-butanol ayuda en la solubilización de los sustratos debido a su mayor polaridad y, a pesar de ser un alcohol, no es reactivo en estos ensayos ya que su carácter de alcohol terciario le impide reaccionar. Una vez justificado el empleo de la técnica para las reacciones de AHC con ácido láctico, se plantearán y analizarán los resultados obtenidos.

En la tabla 27 se resumen los datos obtenidos a partir de las reacciones con los donadores de acilo empleados, siguiendo tal cual la técnica descrita en la página anterior, empleando como medio de reacción únicamente hexano. Dichos ensayos se realizaron de manera cualitativa para conocer la posible formación de productos.

En dicha tabla se puede constatar que de nueva cuenta el CA, el dCA y el dFA fueron los donadores que pudieron formar los ésteres, mientras que el FA no presenta cambio. Se muestran los datos de las reacciones que se realizaron con el CA (tabla 31), modelo escogido para el análisis de estas reacciones variando la mezcla de reacción, como se explica líneas abajo. La cuantificación de estos productos se realizó por HPLC con un detector de índice de refracción.

Las mezclas de reacción fueron enviadas a CG/EM y es con los datos obtenidos en esta técnica que se pudo corroborar la presencia de los productos. El espectro más representativo es el del CA y se presenta en el anexo (al final de este texto). En este se

puede observar que la señal del éster formado queda embebida dentro de la señal del CA que no reaccionó y la resolución no se pudo mejorar con el equipo con que cuenta el laboratorio donde se realizan esos análisis. Sin embargo si fue posible obtener el patrón de fragmentación y corresponde con el del éster esperado (tabla 28), con un ión molecular ($M^+ = 220$) en una proporción muy baja como es de esperarse con un grupo ácido de esa naturaleza.

Tabla 27. Datos de la reacción de esterificación entre los AHC y el ácido láctico. +: reacción positiva; -: reacción negativa.

SUSTRATO	SOLVENTE	REACCIÓN	
		Enzima	
		N435	Lipozyme
CA	Hexano	+	-
dCA	Hexano	+	-
FA	Hexano	-	-
dFA	Hexano	+	-

Tabla 28. EM del éster de CA con ácido láctico (CAOLac)

GS/EM IE m/z	220 (M^+ , 1), 147 (100)
Espectro CAOLac	

El que la reacción de esterificación de los AHC con el ácido láctico haya sido positiva, contrasta con lo reportado por From y col. (1997) quienes encontraron que este hidroxiaácido no solo no se presentaba como un buen nucleófilo para la Novo435 al intentar esterificarlo con ácido decanoico, sino que aparece como un mejor donador de acilo. Esto a pesar de que ya existían reportes de que esta lipasa sí acepta hidroxiaácidos como nucleófilos (Ohya et al, 1995; Torres y Otero, 1999-I; Torres y Otero, 2001; Wei et al, 2003).

Una vez encontrado que se sí obtienen resultados positivos, se intentó lograr una caracterización plena de los productos así como observar la influencia que tiene la solubilidad de los sustratos mediante el recurso de optimizar el medio de reacción de

manera que fuera aumentando en un gradiente de polaridad, lo que trae como consecuencia una mayor disponibilidad de estos para la enzima.

Lo anterior se fundamenta en diversos trabajos (Buisman et al, 1998; Priya y Chadha, 2003; Wei et al, 2003; entre otros) donde se hace referencia a los cambios de actividad de las enzimas dependiendo de la polaridad del medio de reacción, lo cual es atribuible principalmente a la mayor solubilidad de los sustratos y/o productos (lo que altera el equilibrio de la reacción); en menor medida se puede deber a las diversas interacciones que puede tener la enzima con el medio. Basados en estos supuestos, y teorizando sobre los bajos rendimientos de reacción, se decidió emplear un cosolvente (alcohol *tert*-butílico o *t*-BuOH) para mejorar la solubilidad tanto de los AHC como del ácido láctico, los cuales son sustratos más bien hidrofílicos.

Se probaron varias proporciones de solventes en la reacción entre el CA y el FA (las dos moléculas modelo de este estudio) con el láctico, y los resultados se resumen en las siguientes tablas (29, para el CA y 30, para el FA). En el primer caso, el éster del CA, se puede observar que la formación del producto se da en bajas proporciones (entre 9.1 y 19.2 %). Si bien existe una tendencia a mejorar la cantidad de producto obtenida cuando el medio se hace un poco más polar, el mejor de los rendimientos se da aún en un medio claramente hidrofóbico (Hexano:*t*-BuOH 7:3). Además, parece darse una tendencia tipo campana, donde el mejor porcentaje de conversión se observa en el punto señalado y decrece a ambos lados (cuando aumenta y cuando disminuye la polaridad del medio) (Figura 16, pag. 63).

Por otra parte, al no tener un estándar del producto de esta reacción, los datos que arrojaron los espectros de MS sirven para hacer notar la presencia del producto por su patrón de descomposición. Dicho espectro también nos muestra que no se forman polímeros del láctico ni lactonas. Por el contrario, los datos obtenidos de la EM de las mezclas de reacción del FA no dan indicio alguno de que se haya formado algún éster entre ambos sustratos. De entrada se podría suponer que al cambiar el medio de reacción el FA, más polar que el CA, estaría más disponible para las enzimas. Sin embargo, la adición de un cosolvente no parece incidir en nada a la reacción.

Tabla 29. Resultados de las reacciones de esterificación del CA con ácido láctico en distintas mezclas de reacción. Rendimientos en % de conversión de ácido láctico.

REACCIÓN	SOLVENTE (% mezcla)	RESULTADO	
		Enzima	
		N435 (% conversión)	Lipozyme
CA + Lac	Hex	9.1	-
CA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (90:10)	18.5	-
CA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (70:30)	19.2	-
CA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (50:50)	15.2	-
CA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (30:70)	14.0	-

Tabla 30. Resultados de las reacciones de esterificación del FA con ácido láctico en distintas mezclas de reacción.

REACCIÓN	SOLVENTE (% mezcla)	RESULTADO	
		Enzima	
		N435	Lipozyme
FA + Lac	Hex	-	-
FA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (90:10)	-	-
FA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (70:30)	-	-
FA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (50:50)	-	-
FA + Lac	Hex: <i>t</i> -BuOH (30:70)	-	-

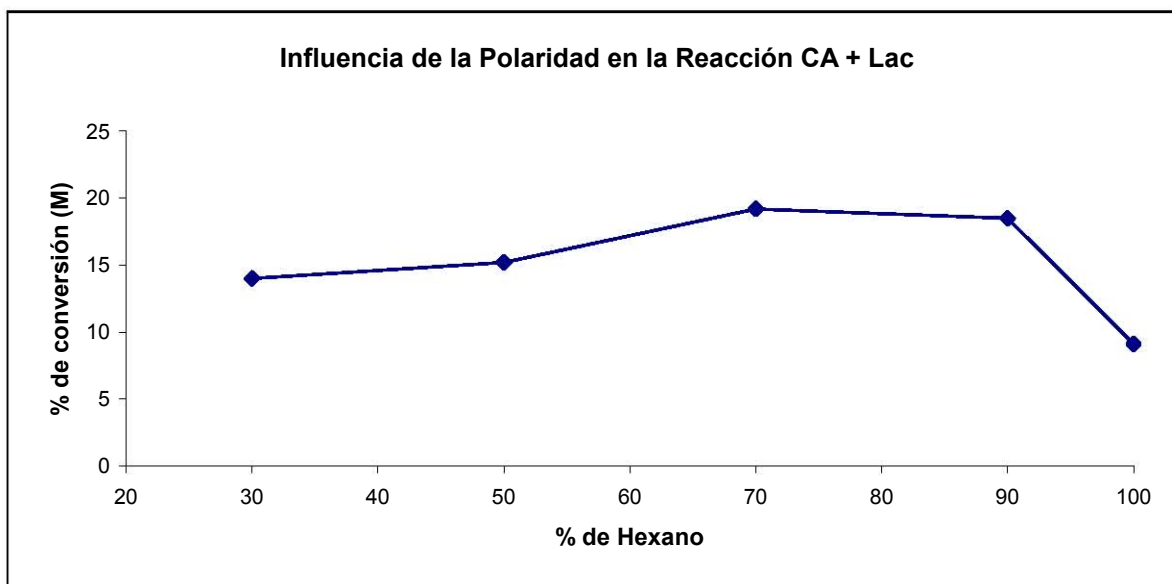


Figura 16. Influencia de la polaridad del medio en los % de conversión del ácido láctico en la esterificación con ácido cinámico. En el eje de las abscisas se presenta el porcentaje de hexano en la mezcla con el *t*-BuOH (que representa el resto de la mezcla).

De estos ensayos se pueden obtener diversas conclusiones:

1) Se observa que la formación de ésteres empleando el ácido láctico como nucleófilo es posible y que el factor que limita la reacción lo representa el carácter del donador de acilo. Esto parece corroborarse al analizar la tabla 29, ya que se nota que los rendimientos son bajos y el rango con el que aparecen las conversiones es pequeño.

Sin embargo no se puede hacer a un lado la influencia que tiene el carácter ácido del donador, ya que también se tendría que realizar un análisis de la posible competencia entre ambos sustratos por el sitio activo de la enzima. Al mismo tiempo existen otro grupo de factores (las características del medio, la presencia de la sílica gel) que podrían tener también una alta influencia en los resultados.

2) Dentro de este grupo de reacciones es que en ningún caso la lipasa Lipozyme llevó a cabo alguna de las reacciones. Como ya ha sido documentado a lo largo de este escrito, para las reacciones de esterificación de los del CA y los AHC la Novo435 aparece generalmente como un mejor catalizador si se le compara con la Lipozyme. Un estudio comparativo muy claro lo representa el de Stamatis y col. (2001). Sin embargo en ese

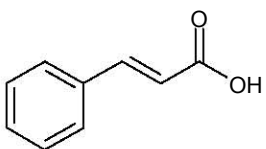
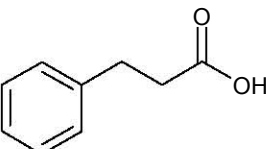
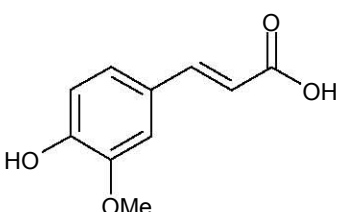
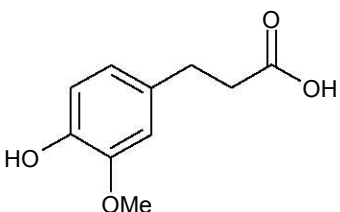
mismo trabajo es esta última enzima la que aparenta tener una mejor afinidad por el FA, lo que el presente estudio contradice.

En lo que se refiere a estudios con el ácido láctico, también la lipasa Novo 435 presenta mejores conversiones que la Lipozyme. De esta manera con el presente estudio se puede corroborar que la Novozyme 435 es una enzima con una mayor variedad de aplicaciones, ya que acepta más y distintos sustratos que la Lipozyme, además de que proporciona una mayor cantidad de producto en comparación.

3.4 Análisis de las causas estructurales que están involucradas en los rendimientos de reacción.

A continuación se presentan los datos de los todos los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 31). En base a esta tabla se realizará una discusión más puntual de los factores que afectaron a estas reacciones, haciendo una comparación de los rendimientos.

Tabla 31. Resumen de los resultados de las reacciones de esterificación enzimática. * : se refiere a aquellas en donde solo se empleó hexano como medio de reacción. N435: Novozyme 435; Lipoz: Lipozyme

DONADOR	NUCLEÓFILO	% CONVERSIÓN MOLAR	
		N435	Lipoz
	<i>i</i> -Propanol	23	14
	Butanol	32	19
	Ac. láctico*	9	-
	<i>i</i> -Propanol	38	33
	Butanol	55	49
	Ac. láctico*	trazas	-
	<i>i</i> -Propanol	trazas	trazas
	Butanol	trazas	trazas
	Ac. láctico*	-	-
	<i>i</i> -Propanol	21	13
	Butanol	26	18
	Ac. láctico*	trazas	-

Como se indicó en los antecedentes, son dos las características estructurales que preferentemente impiden la obtención de rendimientos altos.

En primer lugar se tiene el doble enlace en la cadena alifática. Para todos los casos y con ambas enzimas es claro que la ausencia de este doble enlace proporciona porcentajes de conversión más altos. En el caso del dCA casi duplica los del CA, mientras que para el dFA es aún más claro que es reconocido como donador de una manera mucho más clara que para el FA. Esta influencia en la formación de productos esta asociada a la rigidez que le confiere el enlace π a la molécula lo cual ocasiona que la interacción en el sitio activo sea menos eficiente.

La otra característica que se ha estudiado es la presencia de sustituyentes en el anillo aromático y, cuando es el caso, que estos sustituyentes ocasionen un efecto mesomérico extendido a la cadena. Si comparamos los resultados del dCA y del dFA, podemos observar que la presencia de los sustituyentes hidroxilo (OH) y metoxilo (OCH₃) del ácido hidroferúlico ocasionan un descenso considerable en los rendimientos de reacción. Se proponen, a su vez, dos posibles explicaciones: a) que exista una interacción entre estos dos grupos y los residuos que conforman el entorno del sitio activo de las enzimas y sea esto lo que impida el acceso del sustrato. b) Basada en los estudios que estructurales que se han realizado con la Novozyme 435, Otto y col. (2000) propusieron que el acceso al sitio activo de esta enzima es distinto para el donador de acilo y para el nucleófilo: sugieren que existen dos *vías* o *canales* de entrada, de tal manera que cada sustrato posee una ruta de admisión especializada. Así, este conducto de ingreso puede tener una forma tal que entre más voluminoso sea el sustrato, más difícil será que entre en contacto con el sitio activo y, por lo tanto, reaccione.

Ahora, la combinación de ambos aspectos estructurales se refleja en la disminución de la propensión del carbono del carbonilo a sufrir una ataque nucleofílico. Esa comparación la podemos hacer con los datos del CA y del FA, donde el primero presenta rendimientos altos mientras que el segundo solo es parcialmente reconocido y se obtienen trazas, para los casos de los alcoholes. Para explicar de una manera más clara esta deslocalización electrónica que sufre el FA, esta se esquematiza en la siguiente figura (fig. 17).

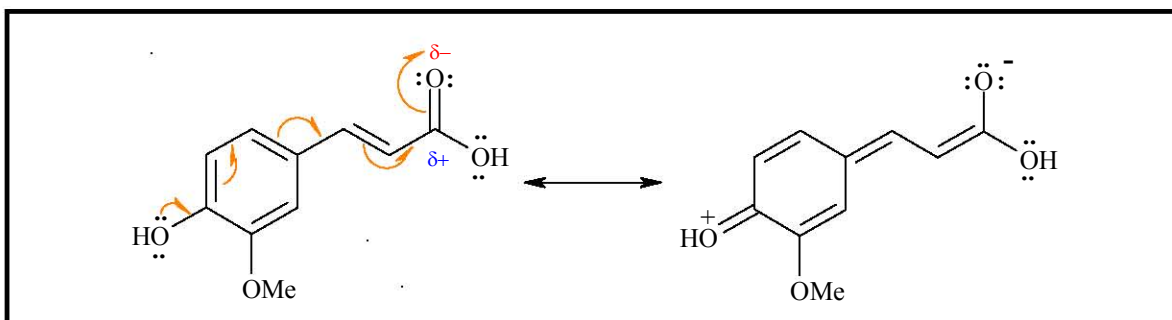


Figura 17. Efecto de la deslocalización electrónica por resonancia en la molécula de ácido ferúlico. En la estructura de la izquierda (A) se esquematiza la forma en que el grupo electrodonador (OH) ocasiona la pérdida de la carga parcial positiva (δ^+) del C del carbonilo (estructura derecha o B), lo que a su vez provoca que ese átomo ya no sea propenso al ataque nucleofílico del alcohol. A pesar de que esta migración de electrones trae la formación de cargas, estas se anulan y la molécula sigue siendo neutra.

La pérdida de la carga parcial positiva que posee el C del carbonilo (δ^+), viene dada por un efecto a “larga distancia” (resonancia) propia de las moléculas aromáticas y extendida por el doble enlace de la cadena alifática, el cual se encuentra conjugado a los enlaces π del anillo. El oxígeno del grupo OH, grupo electrodonador, que se encuentra en posición *para* deslocaliza uno de sus dos pares de electrones libres hacia el anillo bencénico, el cual redistribuye tanto sus enlaces dobles como aquellos que se encuentran conjugados, es decir, hasta el O del carbonilo (A). Dicho movimiento electrónico ocasiona que el dipolo que genera el C=O se pierda y, por lo tanto, el C se poco propenso a sufrir un ataque nucleofílico (B).

Asimismo, existe un factor que no ha sido considerado en los diversos trabajos que se han realizado para intentar esterificar los AHC: la capacidad del grupo -OH del ácido carboxílico de ser sustituido por un grupo alcoxi o, como se le llamaría en la jerga de la química orgánica, que tan bueno resulta como *grupo saliente*. El estudio de la reacción de esterificación nos indica que los mejores grupos salientes son aquellos que como entidades libres son más estables, es decir, en términos de la teoría ácido-base, que a menor fuerza básica será más fácil que la entidad sea sustituida por otra (Smith y March, 2001). Si tomamos como ejemplo la reacción de esterificación según la técnica de Fischer (la síntesis química convencional de ésteres), en ella se emplea un ácido fuerte como catalizador (H_2SO_4 , por ejemplo) para *activar* el hidroxilo de manera que se protone ($-\text{OH}_2^+$). Este catión lo convierte en un buen grupo saliente ya que el agua es una base débil, además de

que le confiere al C del carbonilo una mayor carga parcial positiva (ya que atrae con mayor fuerza el par de electrones del enlace), que conlleva a una mayor propensión al ataque nucleofílico (Figura 18).

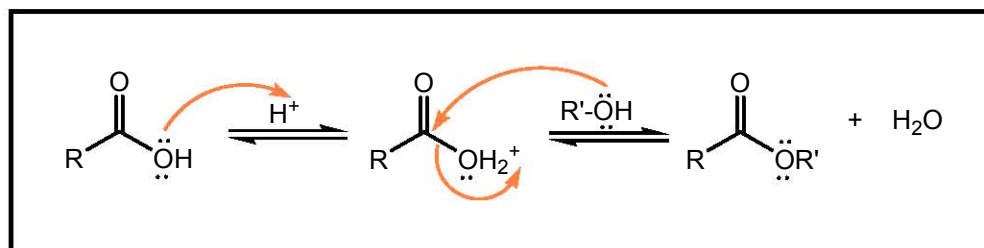


Figura 18. Mecanismo general de reacción de esterificación en medio ácido.

Esto es lo que acarrea la síntesis química y no es el mismo mecanismo que se sigue a nivel celular, por lo que el estudio de la biosíntesis de estos compuestos *in-vivo* también da pistas claras del porque estas reacciones resultan complicadas. Sin embargo, a pesar de no ser exactamente igual, la química hecha por El Hombre siempre ha tratado de emular a la naturaleza, por lo que existen varios puntos de convergencia. En la siguiente figura 19 se presenta una ruta metabólica en la que se esquematiza la formación de los ésteres derivados de los AHC.

Dentro del estudio de la biosíntesis de derivados del ácido cinámico, se ha encontrado que esta clase de compuestos tienen como *precursor* común a la fenilalanina y siguen la ruta de los fenilpropanoides, habitual en casi todas las plantas. Además, está documentado que los AHC deben ser *activados* antes de que puedan sufrir reacciones de derivatización hacia ésteres u otro tipo de moléculas (vainillina, por ejemplo) (Petersen y Simmonds, 2003; Walton et al, 2003), que por lo mencionado líneas arriba guarda una analogía con la síntesis química convencional de ésteres. En la mayoría de los casos se ha descrito la formación de un tioéster a través de la unión de un acetyl-CoA. Una vía propuesta a partir de la revisión bibliográfica realizada se presenta en la figura anterior, tomando como moléculas base al ácido cinámico (2) y al ácido ferúlico (3), a partir de la fenilalanina (1). La tioacetilación de (3) da como resultado la activación de la molécula y forma la feruloil-S-CoA (4a); la adición de una molécula de agua a la insaturación (3) quita la rigidez a la cadena y forma el ácido 3(4'-hidroxi-3'-metoxi)fenil-2-hidroxi-propanoico (4b), que también da paso a una posible esterificación; la formación de (4c) activa la

molécula de manera que sea propensa a una decarboxilación y la consecuente formación de moléculas de alto valor comercial, como es la vainillina.

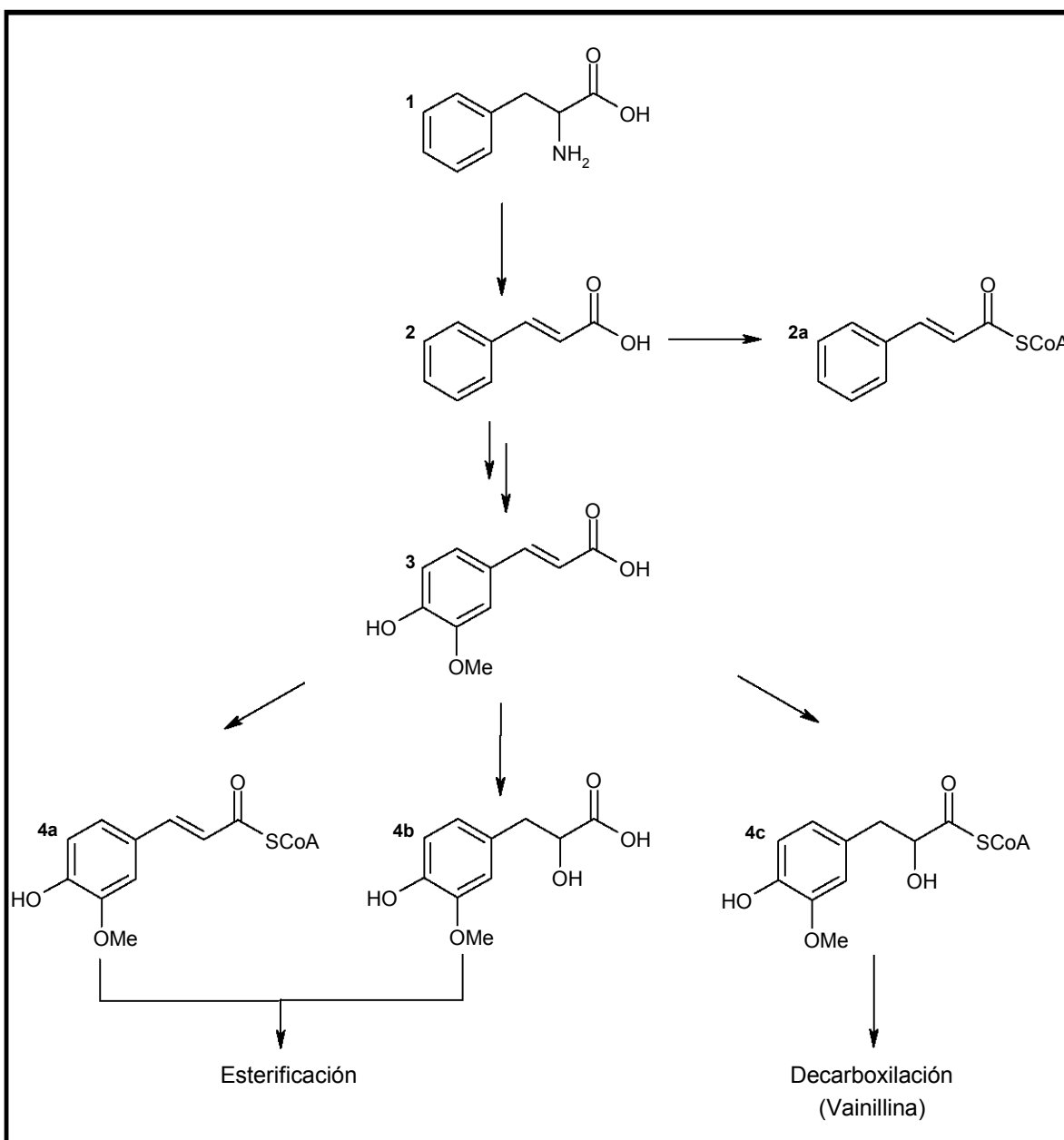


Figura 19. Ruta sugerida de biosíntesis de ésteres y otros compuestos derivados del ácido cinámico y del ácido ferúlico. La fenilalanina (1) sufre una eliminación para formar el ácido cinámico (2), el cual puede seguir dos vías: la primera es que se *active* mediante la formación de un tioéster, el cual puede formar ésteres con diversas moléculas; la segunda, en varios pasos es adicionado con un grupo hidroxilo y un grupo metoxilo para formar el ácido ferúlico (3). El ácido ferúlico puede seguir 3 caminos distintos, en dos de ellos puede llegar a formar ésteres a través de 2 intermediarios: feruloil-CoA (4a) o ácido 4-hidroxi-3-metoxifenil láctico (4b). Por otra parte puede ser decarboxilado el derivado acetilado de (4b) para formar vainillina (Tomado de Walton et al, 2003).

3.4 Perspectivas

De tal manera, haciendo un análisis de los datos que se presentan en este proyecto y, particularmente, por los que se presentan en esta sección (la forma en que los ésteres de AHC son sintetizados *in-vivo*), se puede notar que para tener un rendimiento de reacción bueno *in-vitro* de los ésteres propuestos en este trabajo es necesario tomar en consideración diversos factores, entre los que podemos destacar: la naturaleza del donador de acilo; buscar la forma de “activarlos” para hacerlos más reactivos y mejorar la capacidad de intercambio de un nucleófilo por otro, que a la vez crea otro problema en lo que se respecta a regenerar los activadores; encontrar medios de reacciones en donde las enzimas tengan actividad y donde los sustratos estén más en contacto con el catalizador.

También es importante encontrar un método de separación optimizado para tener los productos de esterificación con el ácido láctico, de manera que se cuantifiquen y, por tanto, se pueda apreciar la influencia del medio de reacción y la actividad enzimática. Además, si bien uno de los objetivos principales al trabajar con AHC es su capacidad antioxidante, es importante no pasar por alto que los derivados hidrogenados de estos también poseen algunas propiedades interesante, tanto como precursores de otras moléculas como por ellas mismas (secc. 3.2.1.1, pag. 49) y que la información acerca de las aplicaciones conocidas, y de algunas nuevas, de estos compuestos (hidrogenados o no), fluye con cierta rapidez (por ejemplo, Fuiza et al, 2004).

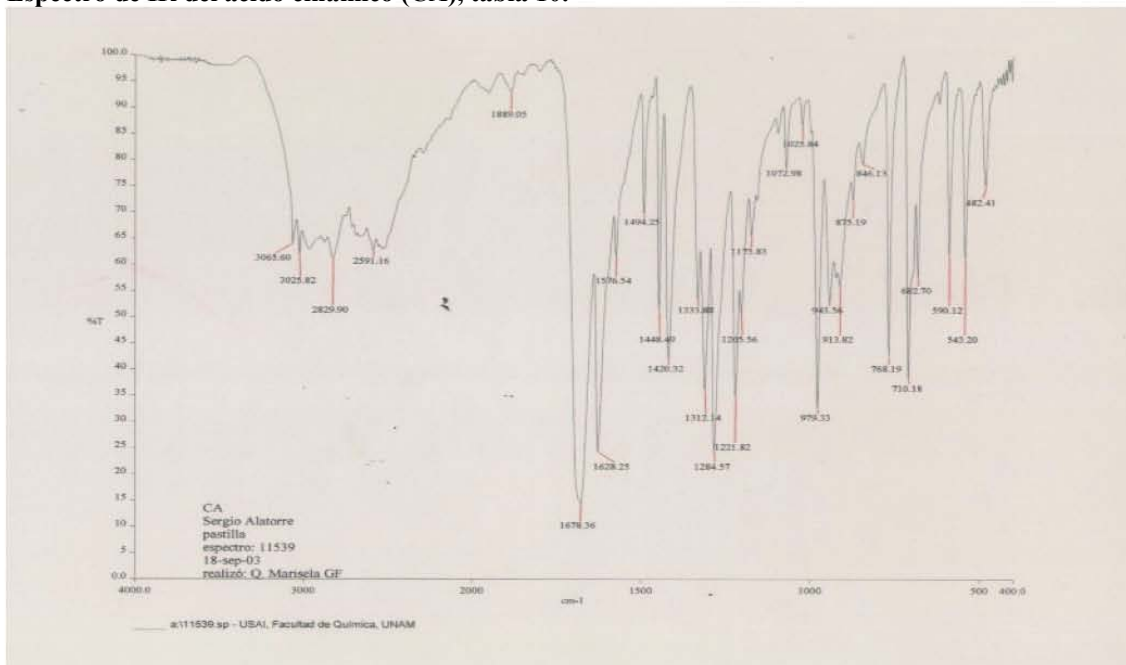
Teorizando un poco más hacia las perspectivas a futuro, es posible también que los avances en las cuestiones de ingeniería de proteínas o la mutagénesis dirigida, así como los progresos en los sistemas regeneradores de cofactores (activadores), sean herramientas que ayuden a solucionar los problemas encontrados en la consecución de este tipo de reacciones y en particular con los ácidos hidroxicinámicos.

CONCLUSIONES

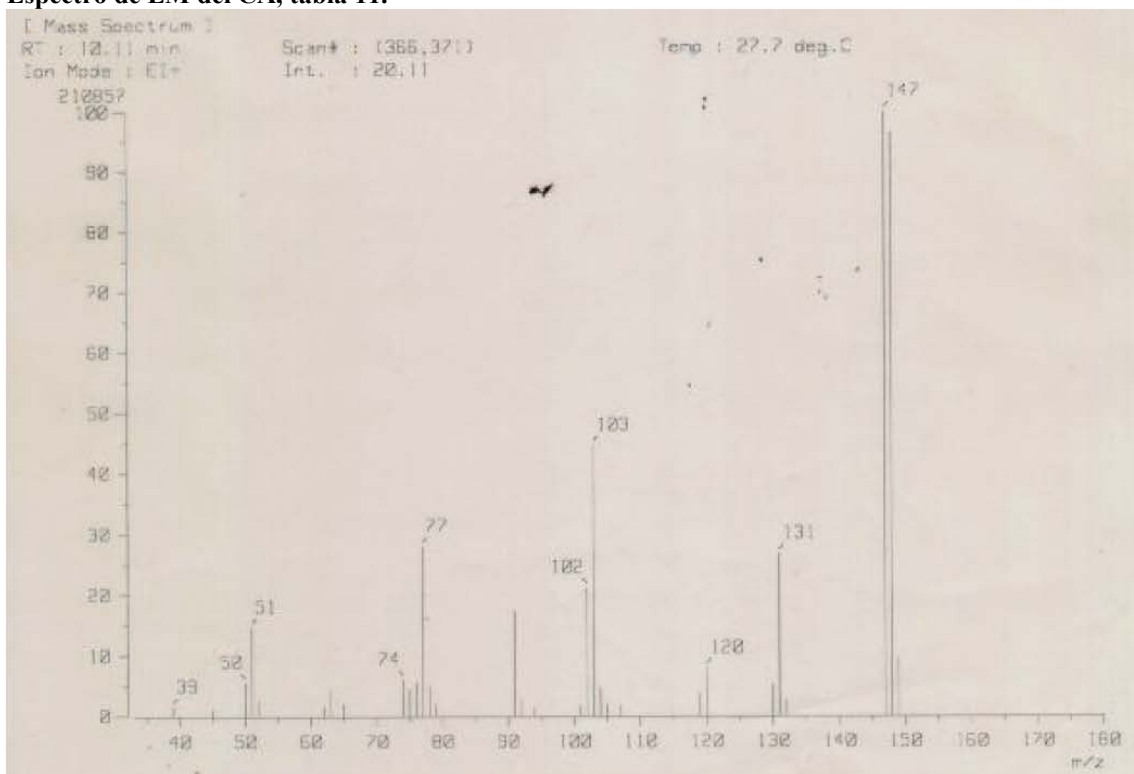
- Las esterasas Depol 640L y Depol 740D presentaron actividad hidrolítica sobre los metil ésteres de los ácidos cinámico (MCA) y ferúlico (MFA), mientras que las Lipasas Novozyme 435 y Lipozyme solo hidrolizaron al MCA. Las demás enzimas fueron descartadas.
- Los donadores de acilo que presentaron mejores rendimientos en las esterificaciones con los alcoholes *isopropanol* y *butanol*, de mayor a menor porcentaje de conversión, fueron: el que no poseía sustituyentes en el anillo ni insaturación en la cadena alifática (dCA), seguido del sustrato que si tenía insaturación (CA), luego el donador que tenía sustituyentes en el anillo pero no insaturación (dFA). El que combinaba ambas características resultó un mal sustrato (FA).
- En las reacciones de esterificación con ácido láctico se encontró que este puede funcionar como nucleófilo en condiciones especiales.
- La lipasa Novozyme 435 demostró una mayor selectividad por los donadores de acilo empleados que la Lipozyme.
- La presencia de una insaturación en la cadena alifática y/o de un sustituyente electrodonador en el anillo aromático de los AHC, son factores que alteran los rendimientos en las reacciones de esterificación con distintos nucleófilos.

ESPECTROS SELECCIONADOS

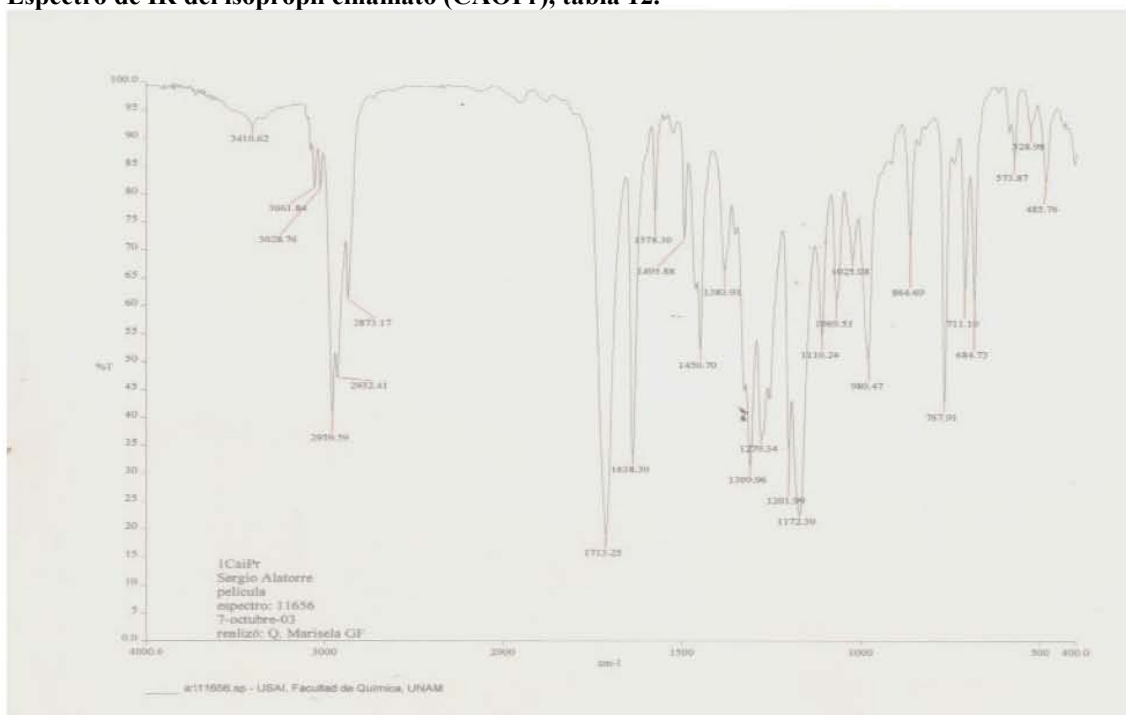
Espectro de IR del ácido cinámico (CA), tabla 10.



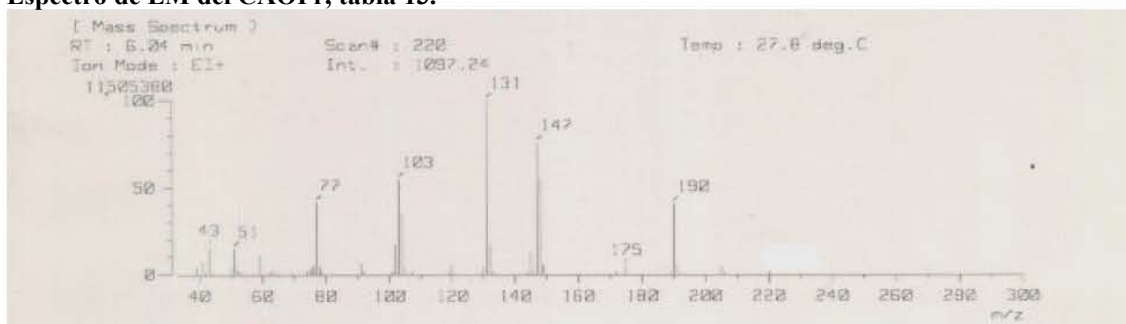
Espectro de EM del CA, tabla 11.



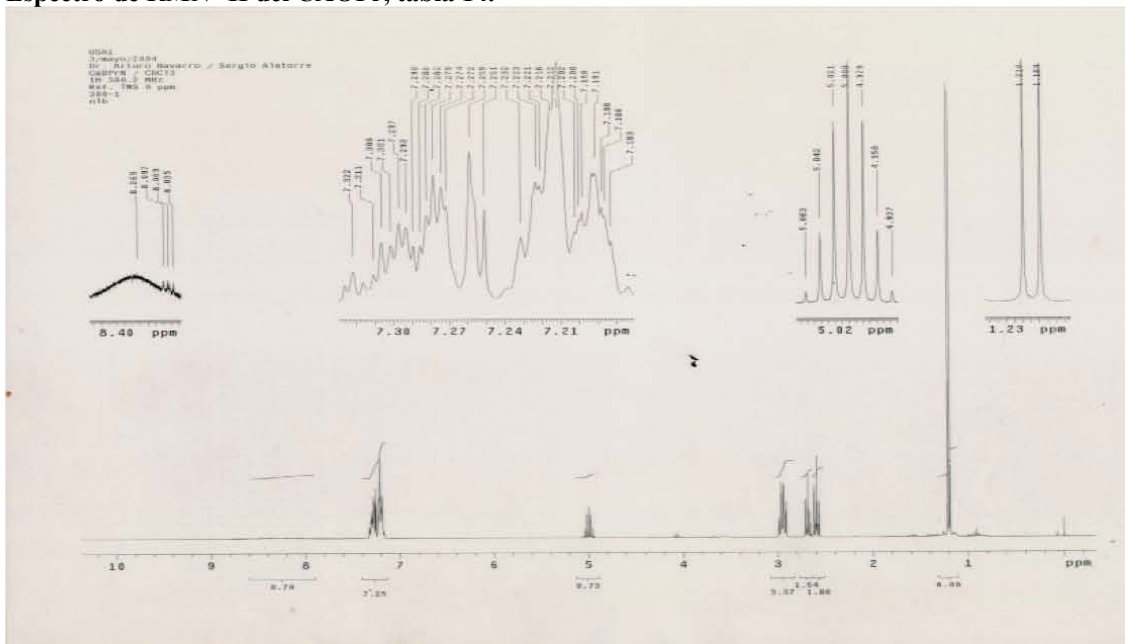
Espectro de IR del isopropil cinamato (CAOPr), tabla 12.



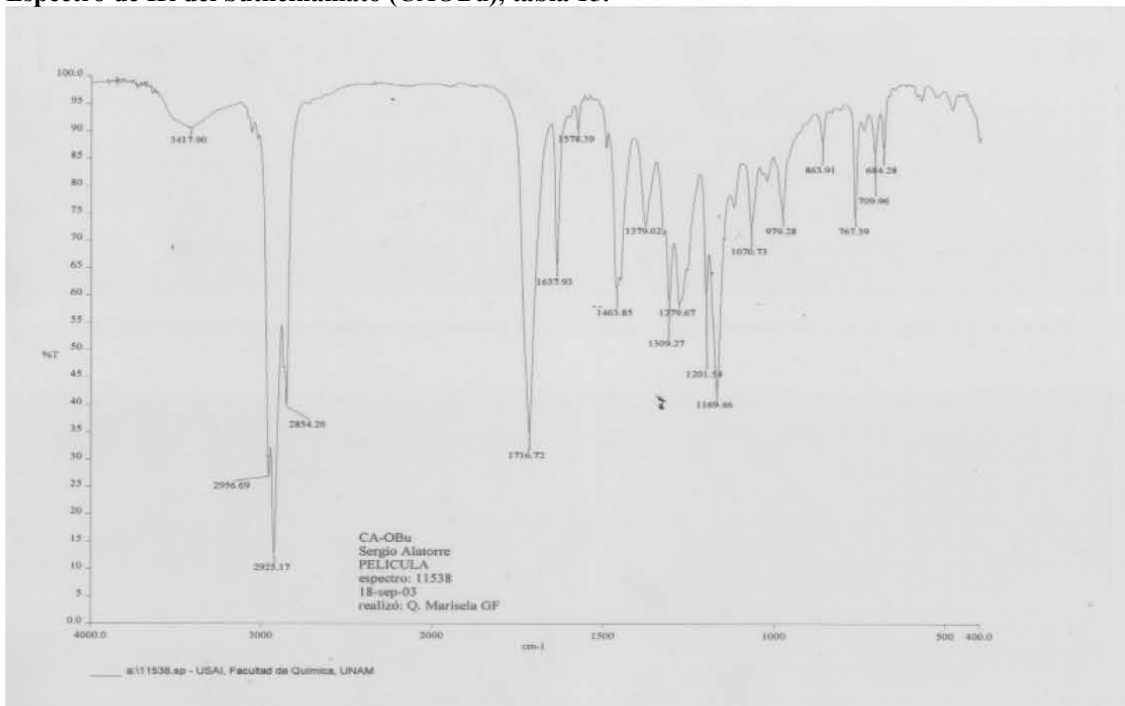
Espectro de EM del CAOPr, tabla 13.



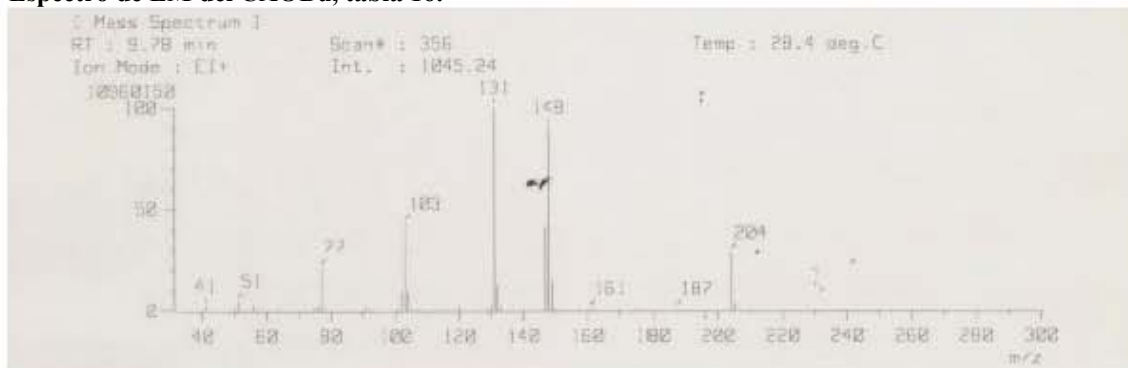
Espectro de RMN-¹H del CAOPr, tabla 14.



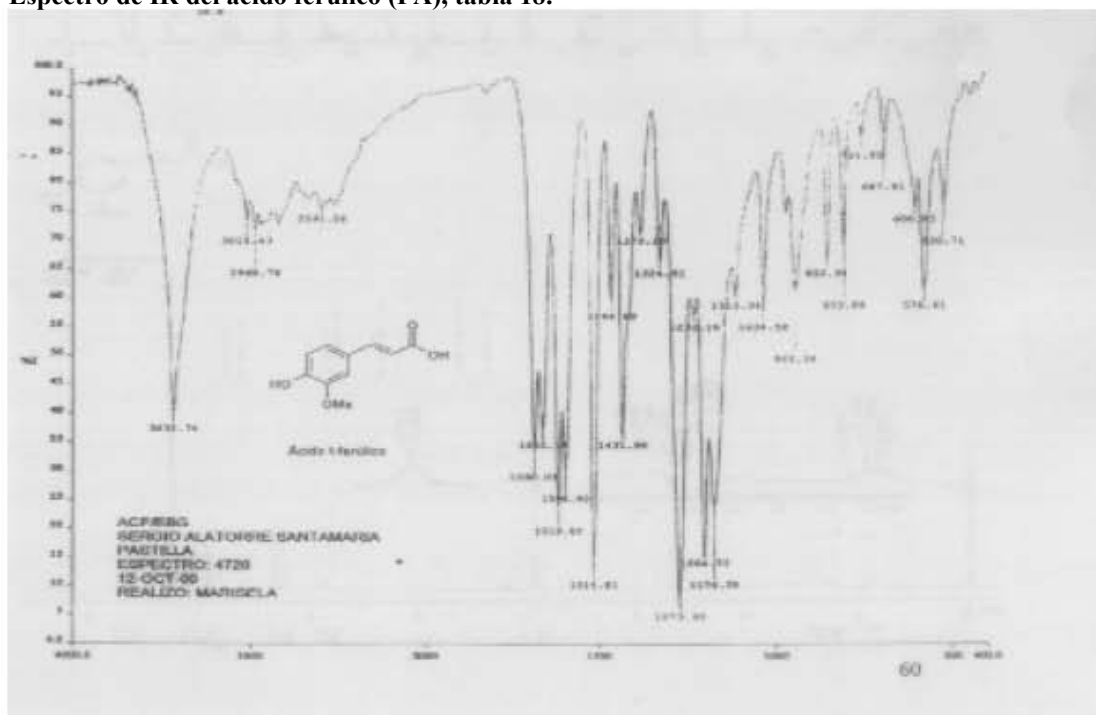
Espectro de IR del butilcinamato (CAOBu), tabla 15.



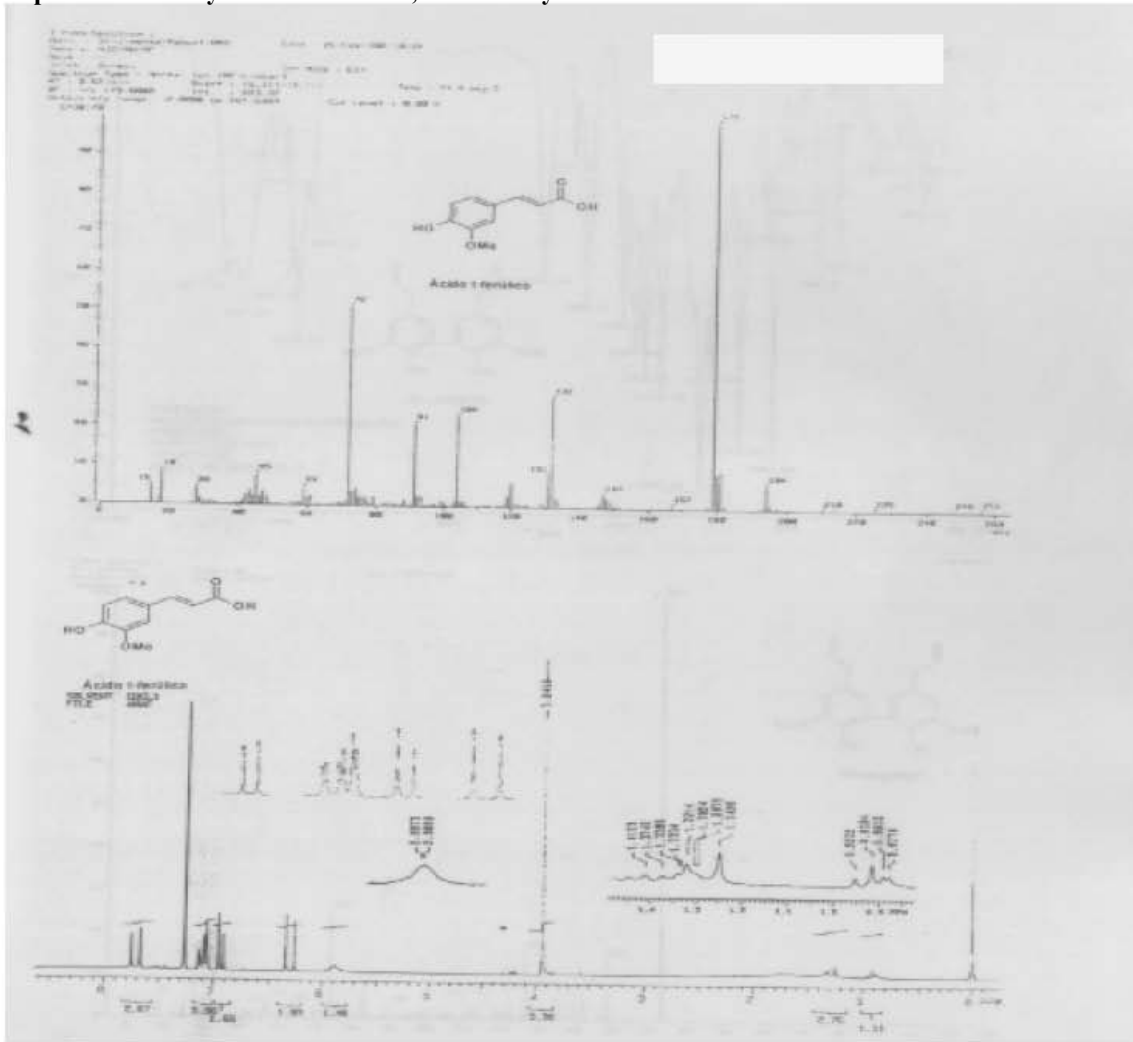
Espectro de EM del CAOBU, tabla 16.



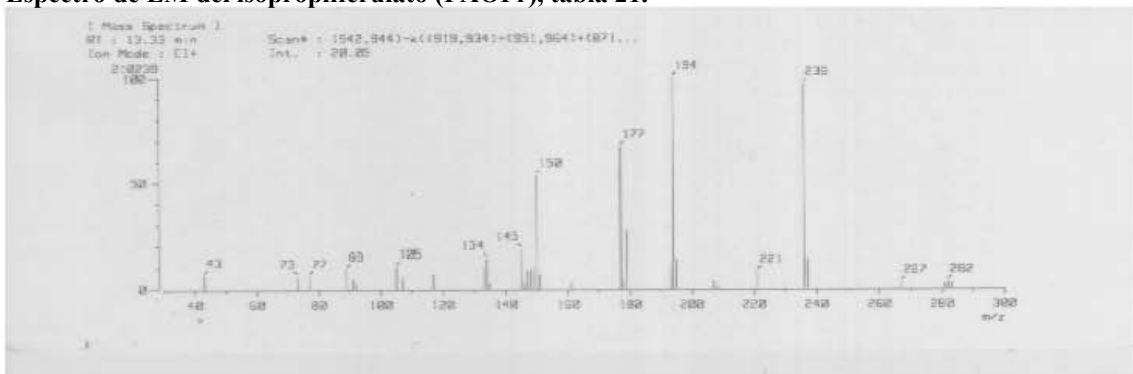
Espectro de IR del ácido ferúlico (FA), tabla 18.



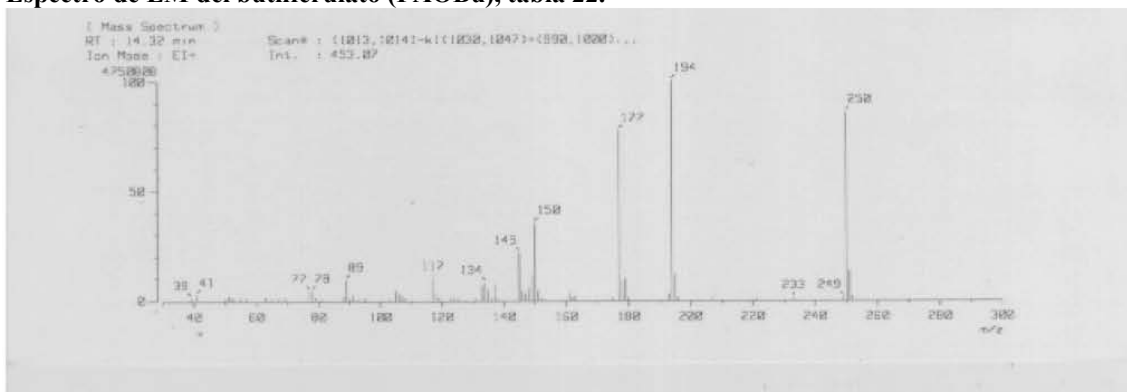
Espectros de EM y RMN-¹H del FA, Tablas 19 y 20



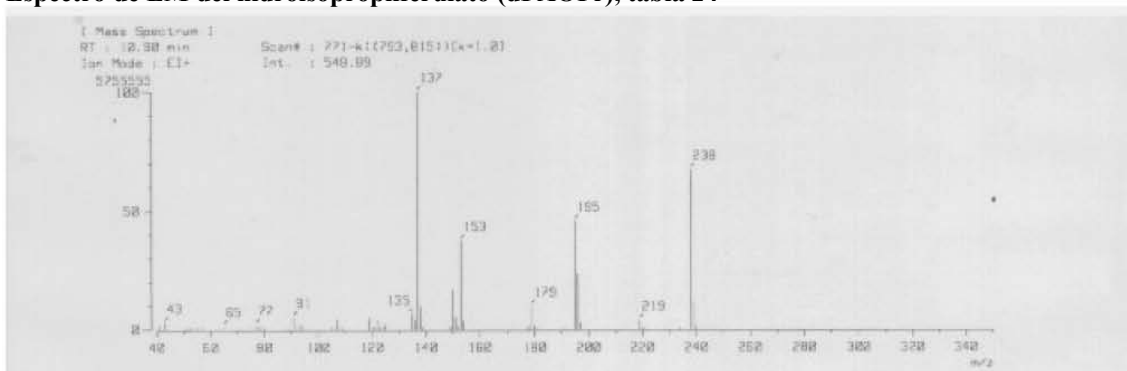
Espectro de EM del isopropilferulato (FAOPr), tabla 21.



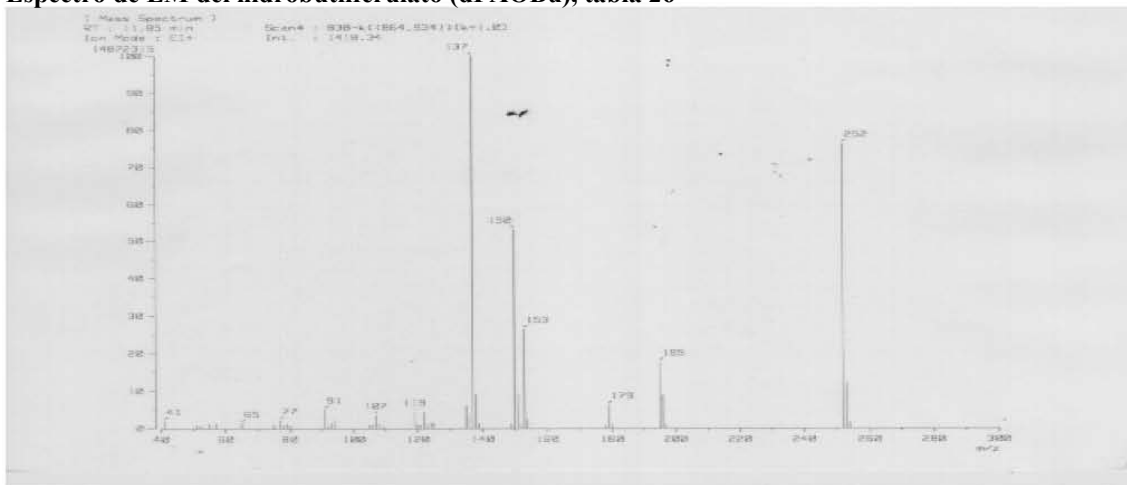
Espectro de EM del butilferulato (FAOBu), tabla 22.

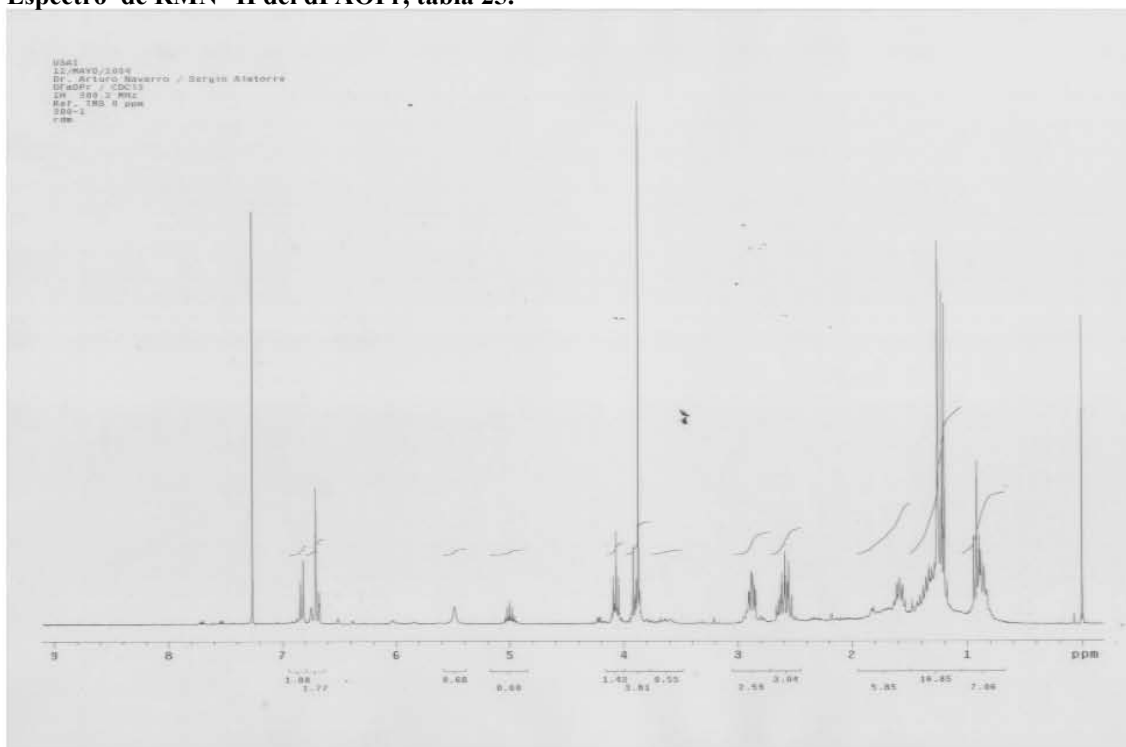
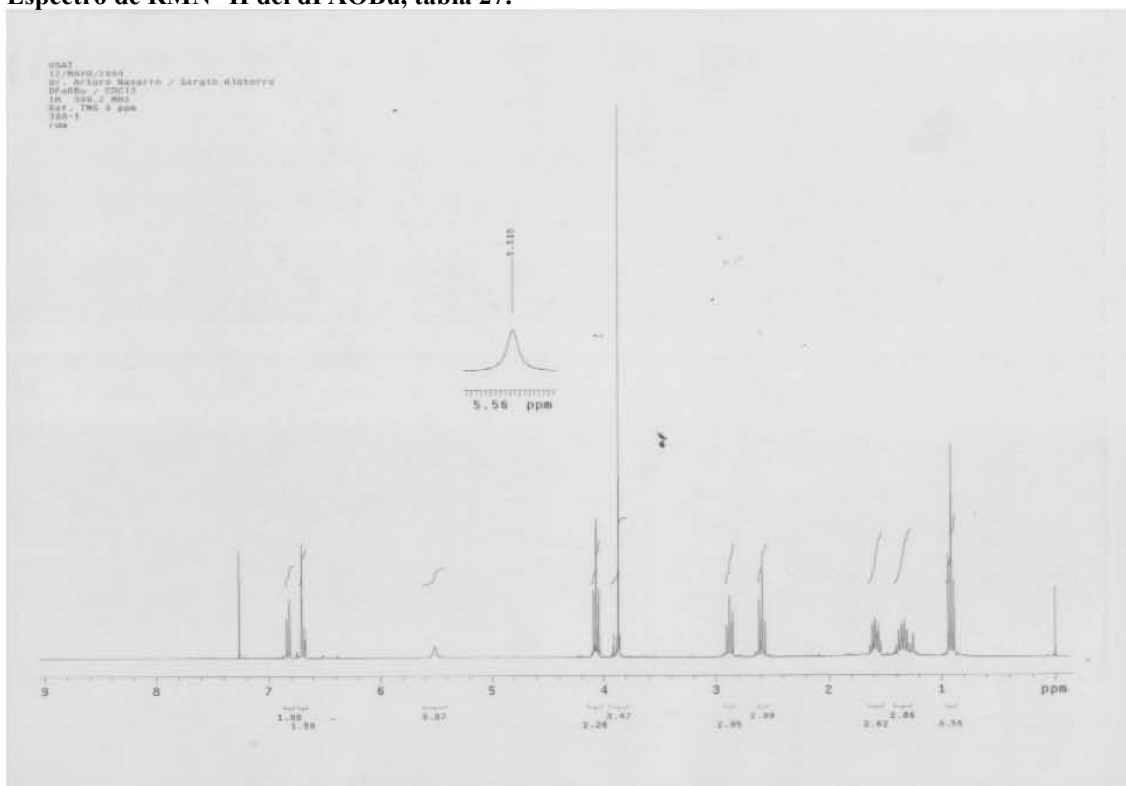


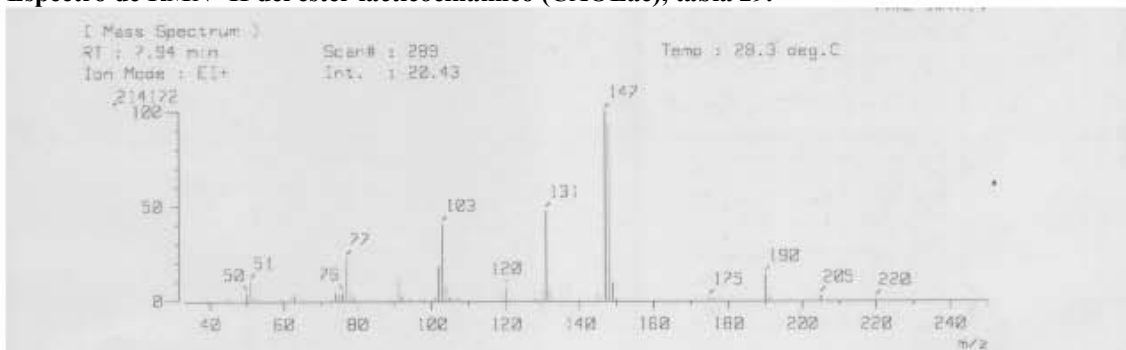
Espectro de EM del hidroisopropilferulato (dFAOPr), tabla 24



Espectro de EM del hidrobutilferulato (dFAOBu), tabla 26



Espectro de RMN-¹H del dFAOPr, tabla 25.Espectro de RMN-¹H del dFAOBu, tabla 27.

Espectro de RMN-¹H del éster láctico (CAOLac), tabla 29.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aliwan, F.; Kroon, P.; Faulds, C.; Pickersgill, R.; Williamson, G. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 457-459.
2. Andersen, A.; Svendsen, A.; Vind, J.; Lasen, S.; Hjort, K.; Borch, K.; Patkar, S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, 26, 47-55.
3. Armesto, N.; Ferrero, M.; Fernandez, S.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5784-87.
4. Bartolomé, B.; Faulds, C.; Kroon, P.; Waldron, K.; Gilbert, H.; Hazlewood, G.; Williamson, G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 208-212.
5. Bellot, C.; Choisnard, L.; Castillo, E.; Marty, A. *Enz. Microb. Technol.* **2001**, 28, 362-369.
6. Bergman, M.; Varshavsky, L.; Gottlieb, H.; Grossman, S. *Phytochemistry* **2001**, 58, 143-152.
7. Bonnin, E.; Brunel, M.; Gouy, Y.; Lesage-Meessen, L.; Asther, M.; Thibault, J. *Enz. Microbiol. Tech.* **2001**, 28, 70-80.
8. Buisman, G.; van Helteren, C.; Kramer, G.; Veldsink, J.; Derksen, J.; Cuperus, F. *Biotechnol. Lett.* **1998**, 20, 131-136.
9. Cartron, E.; Carbonneau, M-A.; Fouret, G.; Descomps, B.; Léger, C. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 480-486.
10. Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254.
11. Condo, A.; Baker, D.; Moreau, R.; Hicks, K. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4961-4964.
12. de Vries, R.; Faulds, C.; Visser, J. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 443-446.
13. De Vries, R.; Michelsen, B.; Poulsen, C.; Kroon, P.; van den Heuvel, H.; Faulds, C.; Williamson, G.; van den Homberg, J.; Visser, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4638-4644.
14. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* **2000**, 4a. edición, 335-348.
15. Figueroa-Espinoza, M.-C. ; Villeneuve, P. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, Reviews, A-I.
16. Fiuza, S.M.; Gomes, C.; Teixeira, L.J.; Girao da Cruz, M.T.; Cordeiro, M.N.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M.P. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3581-3589.
17. Fojan, P.; Jonson, P. H.; Petersen, M.; Petersen, S. *Biochimie* **2000**, 82, 1033-1041.
18. From, M., Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. *Biotechnol. Letters* **1997**, 19, 315-317.
19. Gandhi, N.; Patil, N.; Sawant, S.; Joshi, J. *Catal. Rev.-Sci. Eng.* **2000**, 42, 439-480.
20. García-Conesa, M.; Kroon, P.; Ralph, J.; Mellon, F.; Colquhoun, I.; Saulnier, L.; Thibault, J.; Williamson, G. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 644-652.
21. Giuliani, S.; Piana, C.; Hochkoepller, A.; Pifferi, P. G.; Williamson, G.; Faulds, C. D. *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, 325-330.
22. Gutman, A.; Shkolnik, E.; Shapira, M. *Tetrahedron* **1992**, 48, 8775-8780.
23. Guyot, B.; Bosquette, B.; Pina, M.; Graille, J. *Biotech. Lett.* **1997**, 19, 529-532.

24. Hatzakis, N.; Daphnomili, D.; Smonou, I. *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*. **2002**, *840*, 1-3.
25. Hauer, B.; Roberts, S. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 103-105.
26. Kiran, K.; Divakar, S. *J. Biotech.* **2001**, *87*, 109-121.
27. Klibanov, A. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97-101.
28. Klibanov, A. *Nature* **2001**, *409*, 241-246.
29. Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akimaya, K.; Taniguchi, H. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2161-2168.
30. Kroon, P.; Faulds, C.; Brézillon, C.; Williamson, G. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 245-251.
31. Kroon, P.; Williamson, G.; Fish, N.; Archer, D.; Belshaw, N. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6740-6752.
32. Koeller, K.; Wong, C-H. *Nature* **2001**, *409*, 232-240.
33. Kweon, M-H.; Hwang, H-J.; Sung, H-C. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4646-4655.
34. Ley, J.; Bertram, H-J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1277-1282.
35. Longhi, S.; Cambillau, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 185-196.
36. Lu, Y.; Yeap Foo, L. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 117-140.
37. Mastiubová, M.; Mastihuba, V.; Kremnický, L.; Willet, J.; Côté, G. *Synlett* **2001**, *10*, 1559-1560.
38. Maugard, T.; Tudella, J.; Legoy, M. D. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 358-362.
39. Mathew, S.; Abraham, T. E. *Crit. Rev. Biotech.* **2004**, *24* (2-3), 59-83.
40. Mohamed, M. A.; Mohamed, S. A.; Mohamed, T. M.; Fahmy, A. S. *Biores. Tech.* **2000**, *73*, 227-234.
41. Moon, J-K; Terao, J. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5062-5065.
42. Ogino, H.; Ishikawa, H. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 109-116.
43. Otto, R.; Scheib, H.; Bornscheuer, U.; Pleiss, J.; Syldatk, C.; Schmid, R. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2000**, *8*, 201-211.
44. Ou, S.; Kwok, K-C. *J. Food Sci. Agric.* **2004**, *84*, 1261-1269.
45. Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. *Curr. Op. Biotech.* **2004**, *15*, 272-279.
46. Petersen, M.; Simmonds, M. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121-125.
47. Powell, K.; Ramer, S.; del Cardayré, S.; Stemmer, W.; Tobin, M.; Longchamp, P.; Huisman, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948-3959.
48. Priya, K; Chadha, A. *Enz. Microb. Tech.* **2003**, *6256*, 1-6.
49. Robertson, D.; Steer, B. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 141-149.
50. Sancho, A.; Faulds, C.; Bartolomé, B.; Williamson, G. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 447-449.

51. Sahpaz, S.; Garbacki, N.; Tits, M.; Bailleul, F. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 389-392.
52. Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *49*, 258-268.
53. Schmid, R.; Verger, R.; *Angew. Chim. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1605-1633.
54. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627-662.
55. Silva, F.; Borges, F.; Ferreira, M. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3936-3941.
56. Smith, M. S.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry* **2001**, 5a. edición. 445-449.
57. Stamatis, H.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B.; Kolisis, F. **1998**, *4*, 229-236.
58. Stamatis, H.; Sereti, V.; Kolisis, F. N. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2001**, *11*, 323-328.
59. Staubmann, R.; Ncube, I.; Gübitz, G. M.; Steiner, W.; Read, J. S. *J. Biotechnol.* **1999**, *75*, 117-126.
60. Topakas, E.; Stamatis, H.; Biely, P.; Kekos, D.; Macris, B.; Christakopoulos, P. *J. Biotech.* **2003**, *00*, 1-12.
61. Torres, C.; Bernabé, M.; Otero, C. *Enz. Microb. Tech.* **1999**, *25*, 753-761.
62. Torres, C.; Otero, C. *Enz. Microb. Tech.* **1999**, *25*, 745-752.
63. Torres, C.; Otero, C. *Enz. Microb. Tech.* **2001**, *29*, 3-12.
64. Walton, N.; Mayer, M.; Nabad, A. *Phytochemistry.* **2003**, 505-515.
65. Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D. *Org. Proc. Res. Dev.* **2000**, *4*, 286-290.
66. Wang, D.; Nag, A.; Lee, G.; Shaw, J. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 262-265.
67. Weber, N.; Weitkamp, P.; Mukherjee, D. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5210-5216.
68. Wehtje, E.; Adlercreutz, P. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 798-806.
69. Wei, D.; Gu, C.; Son, Q.; Su, W. *Enz. Microb. Tech.* **2003**, *33*, 508-512.
70. Williamson, G.; Kroon, P.; Faulds, C. *Microbiology* **1998**, *144*, 2011-2023.
71. Whitaker, B. D.; Schmidt, W. F.; Kirk, M. C.; Barnes, S. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3787-3792.
72. Yu, P.; Maenz, D.; McKinnon, J.; Racz, V.; Christensen, D. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1625-1630.