



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**RECUPERACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO Y VAINILLINA DE RESIDUOS DE
PROCESO CON RESINAS Y SÍNTESIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE ÁCIDO
FERÚLICO A PARTIR DE VAINILLINA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

I. Q. MARCO AURELIO FLORES HERNÁNDEZ

TUTOR:

**DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA
FACULTAD DE QUÍMICA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

Por medio de estas líneas quiero agradecer a mi país por su contribución directa e indirecta en la realización de este proyecto de investigación.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de nuestra máxima casa de estudios por su contribución a mi formación como Maestro en Ciencias, por su disponibilidad en asesorías, por facilitar en tiempo y forma el proceso de titulación.

Al Laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y biotecnología de mi querida Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo proporcionado durante mi estancia para la realización de la parte experimental del proyecto de tesis.

Quiero expresar también mi agradecimiento al comité revisor conformado por la Dra. Amelia Guadalupe Farrés González-Sarabia, el Dr. Edmundo Castillo Rosales, el Dr. José Fausto Rivero Cruz, la Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza y el Dr. Miquel Gimeno Seco, por tomarse el tiempo para la revisión, discusión y análisis del documento de tesis.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por aceptarme como su estudiante, por guiarme y por su aporte invaluable no solamente en la realización de mi proyecto, sino también por brindarme la confianza y el conocimiento de un área de la química fascinante, y sobre todo por mostrarme que la investigación no está desvinculada de la convivencia y sana diversión.

Por último, para la realización del trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT para Marco Aurelio Flores Hernandez a través de la beca de maestría, con número de registro 576638. Gracias por dicho apoyo.

DEDICATORIA

A mi hermano “güerejito” como de cariño le decíamos, siempre me has inspirado a seguir adelante, y a mi tío Manuel que es el mejor tío que he tenido, descansen en paz donde quiera que se encuentren.

A mis padres, hoy puedo ver alcanzada esta meta en gran parte por ustedes, ya que siempre estuvieron motivándome a lo largo de este proceso. Gracias por su aliento, comprensión, consejos y su amor infinito.

María Hernandez Gutiérrez y Aurelio Flores Gallardo

A mi esposa por ser mi musa, mi fuente de energía, de sabiduría, calma, consejo en todo momento y estímulo en momentos críticos.

Mariela Uribe Godoy

A mis hermanos por su compañía, sus palabras y la mejor vibra del mundo. ¡Gracias!

Israel, Ulises y Nahiel

A mis suegros los cuales son excelentes personas, gracias por brindarme su amistad y darme un lugar en su familia.

Francisca Godoy, José Manuel Uribe

A mis cuñados por los lazos de hermandad y amistad que hemos fortalecido con el tiempo.

Claudia, Félix, Karina y Manuel

A mis queridos sobrinos que siempre me sacan una sonrisa de cariño y amor.

Arath, Erick, Aleshka e Iker Ulises

A mis amigos de siempre y a los que he ido conociendo, los cuales me han apoyado de diversas maneras además de pasar momentos muy gratos.

Anabell, Mauricio, Elvira y Rosa.

Y sin excepción a todos los que, de algún modo, han influido para bien en mi vida, mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su energía y sus consejos en cada momento de mi vida.

CONTENIDO	Pág.
1. RESUMEN	13
2. OBJETIVOS GENERALES	14
2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
3. HIPÓTESIS	15
4. INTRODUCCION	16
4.1. ALCANCE DE LA INVESTIGACION	17
5. ANTECEDENTES	18
5.1. Residuos Agroindustriales	18
5.2. Origen biológico del ácido ferúlico como compuesto fenólico	20
5.2.1. Principales fuentes biológicas del ácido ferúlico	21
5.2.2. Estructura química y propiedades fisicoquímicas del ácido ferúlico	23
5.2.3. Extracción de ácido ferúlico de fuentes naturales	25
5.2.4. Usos biológicos del ácido ferúlico	28
5.2.4.1. El ácido ferúlico como antioxidante	28
5.2.4.2. El ácido ferúlico como anti-diabético y agente anti-envejecimiento	29
5.2.4.3. El ácido ferúlico como exclusión de la decoloración de los alimentos y agente potenciador de crecimiento	29
5.2.4.4. Usos del ácido ferúlico en cosmética	29
5.2.4.5. El ácido ferúlico como un agente contra el cáncer	30
5.2.4.6. Protección pulmonar y el efecto cardiovascular del ácido ferúlico	30
5.2.4.7. El ácido ferúlico como conservante de alimentos	31
5.2.4.8. Aplicaciones adicionales del ácido ferúlico	32
5.2.5. Importancia del ácido ferúlico como bloque precursor	32
5.3. Vainillina: sus orígenes y situación actual	33
5.3.1. Composición de la vainilla	33
5.3.2. Estructura química y propiedades físicas de la vainillina	34
5.3.3. Producción de vainillina	35
5.3.3.1. Comercialización de la vainillina y la posición que ocupa en el mercado global	35
5.3.4. Usos en la industria farmacéutica y alimenticia de la vainillina	37
5.3.5. Obtención convencional de vainillina a partir de <i>Vainilla planifolia</i>	37
5.3.6. Procesos de producción de vainillina sintética	38
5.3.6.1. A partir de lignina y sus derivados	38
5.3.6.2. A partir de fenol produciendo guayacol	39
5.3.6.3. A partir de pirocatequina u ortodifenol	39
5.3.6.5. Síntesis de Laire a partir de eugenol	39

5.3.6.4. Síntesis de Tiemann y Haarmann a partir de coniferina	40
5.3.6.6. Síntesis de Williamson a partir de safrol	40
5.3.6.7. A partir de la oxidación de isoeugenol	41
5.3.7. Principales derivados vainilloides	41
5.4. Adsorción como operación unitaria en la obtención de ácido ferúlico y vainillina	42
5.4.1. Resinas poliméricas no iónicas como adsorbentes	43
5.4.2. Fundamentos de la adsorción dinámica o de lecho fijo	43
5.4.3. Adsorción en sistemas intermitentes o por lotes	44
5.4.4. Modelado matemático para la adsorción – desorción de ácido ferúlico y vainillina	44
5.4.4.1. Ajuste de curvas de ruptura experimental	45
5.5. Síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina	48
5.6.2. Promiscuidad enzimática en la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina	49
5.6.2.1. Hidrolasas en la biosíntesis química	51
5.6.2.2. Reacciones de origen aldólico catalizadas por hidrolasas	52
6. MATERIAL Y EQUIPO	53
6.1. Material	53
6.2. Instrumentación	53
6.3. Equipo	54
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	56
7.1. Descripción experimental del proceso de recuperación de ácido ferúlico	56
7.1.1. Tratamiento del nejayote	56
7.1.2. Estudio de adsorción - desorción por lotes de ácido ferúlico	56
7.1.3. Estudio de adsorción - desorción en columna de ácido ferúlico	57
7.1.4. Purificación del ácido ferúlico a través de una columna cromatográfica	57
7.1.5. Cristalización del ácido ferúlico	58
7.1.6. Identificación por cromatografía en capa fina del ácido ferúlico	58
7.1.7. Cuantificación del ácido ferúlico por espectrofotometría	58
7.1.8. Cuantificación del ácido ferúlico por HPLC	59
7.2. Descripción experimental del proceso de recuperación de vainillina	60
7.2.1. Preparación del extracto de residuos de vainas de vainilla planifolia	60
7.2.2. Preparación de la resina Sepabeads	61
7.2.3. Estudios de adsorción-desorción vainillina por lotes	61
7.2.4. Estudios de adsorción-desorción de vainillina en lecho fijo	62
7.2.5. Recuperación de la resina Sepabeads	62
7.2.6. Cuantificación de vainillina por espectrofotometría	63

7.2.7. Análisis cualitativo de vainillina en capa fina	63
7.2.8. Proceso de purificación de la vainillina por cristalización	64
7.2.9. Cuantificación de la vainillina por HPLC	64
7.3. Descripción experimental de la síntesis química y enzimática de ácido ferúlico a partir vainillina	65
7.3.1. Síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina	65
7.3.1.1. Síntesis química por condensación malónica	65
7.3.1.2. Condiciones de análisis de la síntesis química de vainillina a ácido ferúlico	66
7.3.2. Biosíntesis enzimática de vainillina a ácido ferúlico	66
7.3.2.1. Monitoreo de los mejores productos de la biotransformación	67
7.3.2.2. Condiciones de análisis de la bioconversión enzimática de vainillina a ácido ferúlico	68
8. RESULTADOS Y DISCUSION	69
8.1. Análisis de resultados en la obtención de ácido ferúlico	69
8.1.1. Elección del mejor disolvente para la extracción de ácido ferúlico	69
8.1.1.1. Identificación por método gravimétrico de la extracción líquido-líquido	69
8.1.1.2. Identificación por HPLC de la extracción líquido-líquido	70
8.1.2. Análisis de adsorción de ácido ferúlico en resinas	71
8.1.2.1. Obtención del ácido ferúlico a partir de experimentos de adsorción en lotes	72
8.1.2.2. Estudio de la rapidez de adsorción	73
8.1.2.3. Obtención de ácido ferúlico a partir de experimentos en columna a escala preparative	74
8.1.2.4. Rendimiento de la recuperación de ácido ferúlico por adsorción	77
8.1.2.5. Carga de ácido ferúlico adsorbido	78
8.1.2.6. Análisis por cromatografía líquida del ácido ferúlico	78
8.1.2.7. Purificación de ácido ferúlico e identificación de algunos residuos o impurezas provenientes de la adsorción – desorción.	79
8.1.2.7.1. Identificación cualitativa de ácido ferúlico y de residuos por cristalización	80
8.1.2.7.2. Análisis cuantitativo de ácido ferúlico y de residuos por columna cromatografica	81
8.2. Análisis de resultados en la obtención de vainillina	84
8.2.1. Elección del disolvente en la extracción por adsorción de vainillina	85
8.2.2. Isotermas de adsorción de equilibrio por lotes de la vainillina	86
8.2.3. Modelización de adsorción de lecho fijo de vainillina	87
8.2.4. Rapidez de adsorción - desorción de equilibrio de lecho fijo de la vainillina	89
8.2.5. Rendimiento del extracto de los residuos de vainas de vainilla empleando el	

espectrofotómetro UV	90
8.2.6. Detección cualitativa y cuantitativa por HPLC de la vainillina	91
8.3. Análisis de resultados de la síntesis químicas de ácido ferúlico a partir de vainillina	93
8.3.1. Resultados y análisis cualitativo en CCF de los catalizadores de prueba empleados en la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina	97
8.3.2. Análisis de los catalizadores seleccionados en la síntesis química de vainillina a ácido ferúlico	98
8.3.3. Identificación y determinación conversión por HPLC de vainillina a ácido ferúlico por síntesis química	101
8.4. Análisis de resultados de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina	103
8.4.1. Optimización de los biocatalizadores seleccionados en la biosíntesis de ácido ferúlico	109
8.4.1.1. Efecto de la temperatura y pH a distintas proporciones de biocatalizador con respecto al tiempo	109
8.4.2. Identificación de ácido ferúlico por HPLC obtenido a partir de vainillina empleando los mejores biocatalizadores propuestos	115
9. CONCLUSIONES	118
10. BIBLIOGRAFIA	119
11. ANEXOS	130

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Nombre	Pág.
1	Estructura molecular de los ácidos hidroxicinámicos.	21
2	Un modelo esquemático de las paredes celulares de las plantas gramíneas.	23
3	Esquema del arreglo molecular del ácido ferúlico y otros ácidos hidroxicinámicos en la lignina.	23
4	Estructura química del ácido ferúlico y sus respectivos grupos funcionales.	24
5	Isómeros de la molécula de ácido ferúlico.	24
6	Estados de protonación que presenta el ácido ferúlico en disolución a pH 4.0, 7.0 y 9.0 con sus diversos valores de pKa y sus correspondientes iones.	24
7	Diagrama del proceso de hidrólisis vegetal sometido a tratamiento alcalino.	27
8	Estabilización por resonancia del radical de ácido ferúlico.	28
9	Diferentes aplicaciones de ácido ferúlico.	31

10	Estructuras químicas de los componentes mayoritarios que confieren el sabor a vainilla.	34
11	Estructura molecular de la vainillina y sus grupos funcionales característicos.	35
12	Países más importantes en la producción de vainillina.	36
13	Importaciones de vainillina natural en México.	37
14	Obtención de vainillina a partir de guayacol.	39
15	Obtención de vainillina a partir de pirocatequina.	39
16	Obtención de vainillina a partir de coniferina.	40
17	Obtención de vainillina a partir de eugenol.	40
18	Obtención de vainillina a partir de safrol.	41
19	Obtención de vainillina a partir de oxidación de isoeugenol.	41
20	Estructuras de la vainillina y derivados vainilloides.	42
21	Relación del volumen gastado de extracto con respecto a la concentración absorbida.	43
22	Tipos de isotermas de adsorción.	44
23	Tipos de reacciones químicas de la vainillina, una de estas reacciones empleada en este trabajo es la condensación del grupo funcional aldehído.	48
24	Reacción general de condensación química.	49
25	Clasificación mecánica de la promiscuidad enzimática	50
26	Procedimiento teórico-experimental en la obtención de ácido ferúlico.	56
27	Metodología propuesta en la obtención de vainillina de residuos de vainas de vainilla.	60
28	Metodología propuesta de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina	65
29	Metodología propuesta de la biosíntesis enzimática de vainillina a ácido ferúlico.	67
30	CCF de la extracción de ácido ferúlico de nejayote	69
31	Extracción convencional líquido-líquido de ácido ferúlico	70
32	Cuantificación por HPLC de extracción convencional	71
33	Isoterma de adsorción por lotes con amberlita XAD7HP para el ácido ferúlico.	72
34	Cinética de adsorción de ácido ferúlico en Amberlita.	73
35	Curva de rompimiento de ácido ferúlico en 0.5 g de Amberlita soportado en una columna, flujo 3.6 mL/min. Curva teórica con $Da=0.03$.	75
36	Ácido ferúlico desorbido, empleando diferentes volúmenes de acetato de etilo.	76
37	Cromatoplaqueta del producto de desorción (ácido ferúlico) con acetato de etilo, revelada con DPPH y en UV.	78
38	Cromatograma del producto de desorción, ácido ferúlico (AF) con acetato de etilo.	79
39	Monitorio de las cromatoplaquetas y muestras de cristales.	80

40	CCF en placas de celulosa con proporciones en aumento de hexano en diclorometano.	81
41	Monitoreo en CCF de las fracciones obtenidas en columna cromatografica de ácido ferúlico con respecto a su estándar.	82
42	CCF de los dos métodos por fracciones y por fases revelados en UV y DPPH	82
43	Gráfico de la cantidad de AF en las fases analizadas	83
44	Cantidad de AF en las fracciones analizadas	84
45	Isotermas de adsorción de vainillina en agua:etanol en el adsorbente Sepabeads SP825 a temperatura ambiente.	86
46	Concentración de la vainillina frente al tiempo en la salida de la columna de adsorción.	88
47	Concentración de la vainillina frente al tiempo durante el proceso de adsorción desorción en la columna de adsorción en la columna de adsorción.	89
48	Cromatoplasmas obtenidas durante el proceso de adsorción – desorción de la vainillina proveniente de los residuos de vainas de vainilla.	91
49	Identificación en la cromatoplasma de la vainillina extraída.	92
50	Cromatogramas de la vainillina estándar y de la vainillina obtenida por adsorción desorción de residuos de vainas de vainilla junto con la identificación en la cromatoplasma de la vainillina extraída a 348 nm.	93
51	Comparación entre la Condensación de Knoevenagel simple y la misma con la Modificación de Doebner.	94
52	Ecuación general de la condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina.	95
53	Mecanismo de reacción propuesto de la condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina.	96
54	Placa cromatográfica de las síntesis químicas de vainillina – ácido ferúlico, lado izquierdo muestra la placa en UV y derecho con revelador de sulfato sérico.	97
55	Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico en la síntesis química a ácido ferúlico, obtenida a partir de piperidina como catalizador.	98
56	Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico en la síntesis química a ácido ferúlico, a partir de citrato de amonio dibásico como catalizador.	99
57	Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico en la síntesis química a ácido ferúlico, obtenida a partir de trietilamina como catalizador.	100
58	Rendimientos porcentuales con respecto al tiempo de la síntesis química de vainillina a ácido ferúlico con los mejores catalizadores químicos empleados.	100
59	Cromatograma de ácido ferúlico estándar.	102

60	Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina. Catalizador: Piperidina.	102
61	Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina. Catalizador: Citrato de amonio dibásico.	103
62	Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina. Catalizador: Trietilamina.	103
63	Ecuación general de la síntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina.	
64	Mecanismo de reacción propuesto de la condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, empleando como ejemplo de lipasa como enzima promiscua.	105 106
65	Cromatoplasmas de un screening de diversos biocatalizadores, en el proceso de hidrólisis de la vainillina y ácido malónico en la obtención de ácido ferúlico.	107
66	Análisis estadístico del screening de diversos biocatalizadores, en el proceso de hidrólisis de la vainillina y ácido malónico en la obtención de ácido ferúlico.	108
67	Influencia de la proporción del biocatalizador (P-INA, P-SME y R-ICV) en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina con respecto al tiempo a 40°C de temperatura.	110
68	Influencia de la proporción del biocatalizador (P-INA, P-SME y R-ICV) en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina con respecto al tiempo a 50°C de temperatura.	111
69	Influencia de la proporción del biocatalizador (P-INA, P-SME y R-ICV) en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina con respecto al tiempo a 60°C de temperatura.	112
70	Obtención de los mejores biocatalizadores seleccionados en la obtención de ácido ferúlico.	114
71	Cromatoplasmas en revelador UV y sulfato sérico de las principales enzimas empleadas	115
72	Cromatograma de la síntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina con papaína (P-INA) empleado como biocatalizador o enzima	116
73	Cromatograma de la síntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina con pepsina de cerdo (P-PSME) empleado como biocatalizador o enzima.	116
74	Cromatograma de la síntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina con lipasa de Ricino (R-ICV) empleado como biocatalizador o enzima.	116
A1	Curva patrón para la determinación espectrofotométrica en UV a 380 nm con agua de ácido ferúlico.	130
A2	Curva de calibración de absorbancia de la vainillina.	130

INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pág.
1	Principales ingredientes extraídos de residuos agroindustriales.	20
2	Contenido de ácido ferúlico en diferentes fuentes conocidas.	22
3	Conjunto de propiedades fisicoquímicas del nejayote, reportadas antes y después de un proceso de filtración.	26
4	Importancia del ácido ferúlico como bloque precursor empleando diversos microorganismos en la biotransformación de diferentes sustratos.	32
5	Componentes mayoritarios presentes en la vaina de vainilla curada.	34
6	Algunas de las propiedades físicas de la vainillina.	35
7	Clasificación de las vainas de vainilla	38
8	Método por gradientes para identificación de ácido ferúlico.	60
9	Cantidad de muestra obtenida de ácido ferúlico con CH ₃ Cl ₂ y con AcoEt	69
10	Cuantificación utilizando altura de la señal de ácido ferúlico en HPLC.	70
11	Cuantificación en muestra de ácido ferúlico por HPLC.	71
12	Área superficial del adsorbente empleado y valores de ajuste de la isoterma de Freundlich.	73
13	Parámetros de la ecuación de pseudo-primer orden para el proceso de adsorción. El valor de “q _e ” se obtiene a partir de la isoterma de adsorción.	74
14	Comparación de los resultados obtenidos de ácido ferúlico con otras referencias.	77
15	Peso de muestra recolectada de ácido ferúlico	81
16	Peso de muestra obtenida de ácido ferúlico	82
17	Cuantificación de método por gradiente en fracción y en fase de ácido ferúlico	83
18	Cuantificación de arabinosilanos presentes en la muestra de ácido ferúlico al purificar.	84
19	Parámetros de equilibrio en adsorción de la vainillina en la resina Sepabeads SP825.	86
20	Coefficientes de transferencia de masa, tiempos estequiométricos teóricos y experimentales y cantidades adsorbidas de vainillina para cada C ₀ .	87
21	Resumen de avances de los parámetros de coeficiente de dispersión axial, la difusividad molecular del soluto y la difusividad de poro efectivo.	88
22	Resultados de la recuperación de vainillina por adsorción así como de su purificación y sus respectivos rendimientos reales.	92

23	Resultado de la síntesis química de ácido ferúlico recuperado y su rendimiento real.	101
24	Principales enzimas relacionadas en las cromatoplasmas con respecto a la gráfica circular.	109
25	Resultado de la síntesis enzimática de ácido ferúlico recuperado y su rendimiento real	113

1. RESUMEN

El aprovechamiento de agro-residuos para obtener productos de mayor valor agregado, se está convirtiendo en una alternativa verde dentro de los procesos industriales, claramente marcada dentro de la sustentabilidad (López-Simeon *et al*, 2012). Uno de estos residuos es el líquido residual de la nixtamalización, que se puede utilizar para la generación de compuestos como el ácido ferúlico. Por otro lado, la generación de vainillina natural es escasa, existiendo la posibilidad de introducir al mercado un porcentaje mayor a partir de residuos de vainas de vainilla con un proceso de separación integrado. Ambos residuos fueron procesados por medio de una etapa de adsorción y una de desorción con base en el potencial de resinas poliméricas macroporosas no iónicas, utilizando experimentos por lotes y lecho fijo, que son provistos con el modelo de Freundlich, mejorando así la obtención de ácido ferúlico y vainillina, ambos productos muy importantes en la industria farmacéutica y alimenticia.

Otra alternativa es la conversión de bloques precursores participantes en la vía de la síntesis orgánica en productos requeridos para su aprovechamiento, como es el caso de sintetizar ácido ferúlico a partir de vainillina, lo cual es una vía poco estudiada y que requiere una mejor revisión, dada el aumento en importancia del ácido ferúlico. Por lo que, en primera instancia, se aborda la obtención de ácido ferúlico por medio de su síntesis química a partir de vainillina, empleando el método de condensación malónica catalizada con bases débiles de origen amínico, dando resultados positivos comparables o mejorando a los mínimos resultados reportados en investigaciones reportadas. Adicionalmente, esta investigación cubre parte del campo de promiscuidad catalítica, en el que pone de relieve la actividad más sorprendente y no común que esta clase de enzimas muestra en transformaciones sintéticas orgánicas, extendiéndose a la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, donde se ha iniciado el estudio de hidrolasas en la catálisis de actividades no convencionales, aplicándolas a la reacción malónica. Se llevó a cabo un *screening* de distintas enzimas hidrolíticas (lipasas, esterasas, proteasas y amilasas) mostrándose resultados satisfactorios en algunas de ellas. La conversión en las biotransformaciones mostró una fuerte dependencia de la actividad de agua, de la temperatura y, asimismo, de la cantidad de hidrolasa empleada. Se obtuvieron resultados positivos que constituyen el primer reporte en la literatura.

2. OBJETIVOS GENERALES

- Recuperar a escala preparativa el ácido ferúlico y la vainillina de residuos de proceso con resinas.
- Sintetizar por métodos químicos y enzimáticos el ácido ferúlico a partir de vainillina.

2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para el ácido ferúlico:

- Extraer el ácido ferúlico proveniente del nejayote, utilizando el método de adsorción/desorción por medio de la resina Amberlita.
- Determinar cualitativamente por cromatografía en capa fina (CCF) y por punto de fusión la presencia de ácido ferúlico en el extracto.
- Aplicar los métodos de separación por columna cromatográfica y cristalización con el fin de obtener cristales de ácido ferúlico con mayor grado de pureza y el tipo de impurezas presentes.
- Identificar las muestras obtenidas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y comparar el rendimiento de ácido ferúlico con el obtenido por otros autores.

Para la vainillina:

- Obtener vainillina a partir de residuos de vainas de *Vainilla planifolia* por sonicación y después por adsorción/desorción en resina Sepabeads.
- Determinar cualitativamente por CCF y por punto de fusión la presencia de vainillina.
- Aplicar el método de cristalización con el fin de obtener cristales de vainillina con mayor grado de pureza.
- Evaluar la cuantificación espectrofotométrica de la vainillina analizando las respectivas isothermas de adsorción.
- Identificar mediante HPLC las muestras obtenidas y comparar el rendimiento de la vainillina con otras referencias.

Para la síntesis química y enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina

- Realizar la síntesis química por condensación y promiscuidad enzimática de vainillina a ácido ferúlico.
- Determinar de manera cualitativa con CCF la presencia de ácido ferúlico obtenida de las síntesis químico/enzimáticas.
- Realizar la cuantificación espectrofotométrica de la conversión de vainillina a ácido ferúlico en presencia catalizadores químicos y enzimas, analizando las respectivas gráficas de cinética química y catálisis.
- Identificar el ácido ferúlico mediante HPLC las muestras obtenidas en las síntesis químico/enzimáticas y comparar su rendimiento.

3. HIPÓTESIS

La extracción de los compuestos de interés a partir de residuos de proceso puede ser más eficiente con el uso de resinas que interactúen con distintos compuestos. El remanente así extraído podría emplearse como sustratos de conversiones químicas o enzimáticas para la obtención de compuestos de interés.

4. INTRODUCCION

La preocupación acerca del aprovechamiento de residuos agroindustriales ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica, en donde los procesos de transformación generan desechos y subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. Sin embargo, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales no han sido aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor es aún desconocido (Saval, 2012). Entre los diversos residuos agroindustriales se tiene el líquido residual llamado “nejayote”, que se genera durante la nixtamalización y que se puede utilizar para la generación de ácido ferúlico, de gran interés en la industria farmacéutica y es un precursor en la producción de vainillina (Salgado *et al*, 2012). Por otro lado, la vainillina es un aldehído fenólico importante en la industria del sabor y de las fragancias, así como precursor de la síntesis de varios productos de química fina de segunda generación de uso farmacéutico (Ibrahim *et al*, 2012).

La mayoría de los estudios de adsorción informan la recuperación de monómeros fenólicos funcionalizados a partir de medios de ligninas oxidadas por resinas de intercambio iónico, que se centra particularmente en la vainillina, pero no provenientes de residuos propiamente de las vainas de vainilla (Stecker *et al*, 2014; Mota *et al*, 2016). Recientemente la aplicación de resinas poliméricas no iónicas para recuperar compuestos fenólicos ha ganado considerable interés por muchas razones (Zhang *et al*, 2008; Michailof *et al*, 2008; Xiao *et al*, 2009; Wang *et al*, 2010; Samah *et al*, 2013). La adsorción de compuestos fenólicos en resinas no polares es factible debido a la existencia de grupos hidrófobos e hidrófilos en la molécula. El pH se mantiene constante a lo largo del proceso para evitar la precipitación. Estas resinas son químicamente estables e inertes que son adecuados para aplicaciones bajo una amplia variedad de condiciones (Crittenden *et al*, 1998; Kunin, 1991). Esto hace que las resinas poliméricas sean de especial interés, para que a partir de residuos agroindustriales se logre la recuperación de bloques precursores de síntesis orgánica, como el ácido ferúlico y la vainillina.

Nuevas estrategias de síntesis hacia procesos sostenibles ambientales y económicos se están desarrollando, con lo cual, se busca que sean en una reacción simple, de un solo paso, sin la formación de productos secundarios, que el rendimiento sea del 100%, con una disminución de uso de disolvente, que sea segura y que los reactivos sean fáciles de sintetizar o que sean comerciales (Bradshaw y Bonjoch, 2015). Por otro lado, también está el aprovechar el poder de las enzimas, ya sea en medios acuosos que catalizan reacciones

sobre todo de hidrólisis y óxido reducción, pero también en medios no acuosos en el que catalizan las reacciones contrarias introduciendo el concepto de promiscuidad enzimática (Kamm y Kamm, 2004).

Un campo escasamente estudiado para fines de beneficio productivo y económico, es la obtención de vainillina a partir de residuo de vainas de vainilla y a su vez la obtención de ácido ferúlico a partir de dichos residuos. Puesto que el ácido ferúlico que proviene de residuos de la vainilla, es viable económicamente su obtención dada la gran importancia del ácido ferúlico, donde va ampliando sus horizontes en la industria alimenticia y farmacéutica, dándole cada vez más, mayor valor agregado.

La presente investigación se inicia con una revisión bibliográfica del ácido ferúlico y vainillina, en la que se describen las principales características químico/biológicas del ácido ferúlico y vainillina, así como diversos métodos de obtención descritos hasta el momento, y la posible síntesis química y enzimática de vainillina a ácido ferúlico.

Se propuso obtener directamente el nejayote o residuos de nixtamalización de lugares donde se procesa el maíz. De los residuos de las vainas de *vainilla planifolia* se extrajo por sonicación el extracto de vainilla. Una vez obtenidas, las materias primas respectivas, se empleó el método de adsorción – desorción, con resinas poliméricas macroporosa para recuperar, tanto el ácido ferúlico proveniente del “nejayote” como la vainillina proveniente del extracto de residuos de vainilla, los cuales impactarán en la mejora productiva a largo plazo. Por otro lado, para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, se seleccionó el método de condensación malónica empleando bases orgánicas débiles como catalizadores, tales como la piperidina, el citrato de amonio dibásico y la trietilamina (síntesis química) y enzimas como la papaína, lipasa de ricino y pepsina (biosíntesis enzimática).

4.1. ALCANCE DE LA INVESTIGACION

Los resultados de este proyecto, permitirán obtener una mejor implementación de procesos químicos sustentables con recursos que se producen en el país y que actualmente se siguen desechando. También el desarrollo de este proyecto impactará en el uso y conocimiento de los métodos químicos y enzimáticos para la modificación de compuestos orgánicos y en el de recuperación de compuestos de la biomasa con nuevos procesos de extracción y purificación, compatibles con el medio ambiente y sustentables.

5. ANTECEDENTES

5.1. Residuos agroindustriales

Con cierta frecuencia utilizamos en forma indistinta los términos: subproductos, residuos y desechos, sin importar que existe una diferencia conceptual entre ellos. Un “subproducto” es un producto secundario, bien conocido, útil y comercializable, que resulta de un proceso industrial. El término “residuos”, se aplica a aquéllos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. Desde este punto de vista, los términos “subproducto” y “residuo” podrían utilizarse como sinónimos, no así el término “desecho”, que está referido a aquellos materiales que no tienen algún valor comercial, ni poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se le debe dar una disposición final (Saval, 2012).

Los residuos aumentan permanentemente en cantidad y complejidad conforme se incrementa la población y el desarrollo tecnológico, provocando una mayor dificultad del medio natural para asimilar, degradar y reutilizar las sustancias y materiales que los constituyen. Por otro lado, la “agroindustria” es una “actividad que integra la producción primaria agrícola, pecuaria o forestal, el proceso de beneficio o transformación, así como la comercialización del producto, sin dejar de lado los aspectos de administración, mercadotecnia y financiamiento” (Saval, 2012).

A partir de lo anterior, se puede decir que, los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final (Saval, 2012). Las tecnologías actuales deben ser capaces de recuperar, reciclar y dar sustentabilidad a la obtención de ingredientes de alto valor agregado, los cuales se pueden utilizar en la industria alimenticia o farmacéutica (Galanakis, 2012).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, a nivel mundial se desperdicia aproximadamente una tercera parte de los alimentos

generados para consumo humano (Galanakis, 2012) desde el campo de cultivo hasta la etapa de comercialización. Debido a la gran variedad de residuos que se puede obtener, es importante aprovecharlos eficientemente, realizando la identificación, cuantificación y caracterización de los mismos para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, y con esto poder definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. (Mirabella *et al*, 2014).

México produce 75.73 millones de toneladas de materia seca, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos de maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, cáscara de algodón, entre otros. El resto, 15.60 millones de toneladas corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, maguey o agave, mazorcas y olotes, así como pulpa de café (Valdez *et al*, 2010).

Los residuos generados en las transformaciones agroindustriales y las pérdidas postcosecha en nuestro país aún no han sido aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor es aún desconocido y, sobretodo, por la falta de métodos apropiados para la preparación y caracterización de sustancias de mayor valor agregado con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usadas en los procesos de mayor valor agregado. La mayor cantidad de residuos sólidos que genera la agricultura, son de origen vegetal, provenientes de cosechas o fracciones de cultivos que no son de interés o no cumplen con los requisitos de calidad mínimos para ser comercializados. (González-Álvarez, 2013). Los residuos agroindustriales pueden ser de origen animal o vegetal, y se pueden dividir en siete grupos como se muestra en la **Tabla 1** (Valdez *et al*, 2010; Galanakis, 2012).

Las aplicaciones que se le ha dado a este tipo de residuos se pueden clasificar en cuatro grupos: (I) pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos bioactivos e ingredientes alimenticios (fibras dietéticas, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas); (II) producción de enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos y biocombustibles; (III) producción de alimento para animales y (IV) producción de composta (Federici *et al*, 2009; Ayala-Zavala *et al*, 2011; Galanakis, 2012; Chandrasekaran *et al*, 2013). Dentro de estas aplicaciones, las enzimas representan una herramienta muy útil para el pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos con alto valor agregado.

Tabla 1. Principales ingredientes extraídos de residuos agroindustriales.

<i>Origen del residuo</i>	<i>Ingrediente de interés</i>	<i>Origen del residuo</i>	<i>Ingrediente de interés</i>
<i>Cereales</i>	Albúmina, globulina, hemicelulosa, fibras insolubles, arabinosilanos, beta-glucanos, glucosa, arabinosa, galactosa.	<i>Frutas y verduras</i>	Hesperidina, limoneno, Pectina, fenoles, fibra dietética, tartrato de calcio, beta-caroteno, licopeno, carotenoides
<i>Raíces y tubérculos</i>	Arabinosilanos, fenoles, ácidos orgánicos	<i>Productos cárnicos</i>	Proteínas, hidrolizados de proteínas
<i>Plantas oleaginosas</i>	Fitoesteroles, albúmina, Fenoles, pectina	<i>Productos lácteos</i>	Lactosa, beta-lactoglobulina, alfa-lactalbúmina
<i>Pescados y mariscos</i>	Proteínas, lípidos, quitina, quitosano.		

Fuente: Galanakis, 2012.

A nivel mundial se han producido anualmente 5000 millones de toneladas de biomasa de la agricultura, que efectiva y económicamente se pueden convertir en productos valiosos de potencial industrial y comercial y también para reducir el impacto perjudicial de estos residuos en el medio ambiente (Wang *et al*, 2016). Aproximadamente la mitad de la materia vegetal está compuesta de lignocelulosas que es la materia orgánica renovable más abundante en el suelo (Singh *et al*, 2012). Se compone de celulosa (35-50%), hemicelulosa (20-35%) y lignina (15-25%) fuertemente conectada entre sí por una variedad de enlaces no covalentes y covalentes (Limayem y Ricke, 2012).

5.2. Origen biológico del ácido ferúlico como compuesto fenólico

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes y abarcan desde moléculas fenólicas sencillas, hasta compuestos polimerizados, incluyendo sus derivados funcionales. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos o polifenólicos y se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico que conduce, mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos, a los ácidos cinámicos y sus derivados, y la ruta de los poliacetatos. La mayoría de los compuestos fenólicos, se encuentran enlazados con mono y polisacáridos, ligados con uno o más grupos fenólicos y/o como derivados de ésteres, son importantes de manera fisiológica y morfológica en las plantas, juegan un papel importante en el crecimiento y reproducción al proteger de patógenos y predadores, además de contribuir con aspectos sensoriales de frutas y vegetales. Se pueden clasificar en

diferentes tipos: en ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico), flavonoides (flavonoles, flavanoles flavonas, flavononas, isoflavonas, proanticianidinas), estilbenos y ligninas (Mañach *et al*, 2005; Acosta-Estrada *et al*, 2014).

Los ácidos fenólicos se encuentran de forma libre y enlazados a otros compuestos en granos y exhiben un amplio conjunto de propiedades fisiológicas (Balasundram *et al*, 2006). Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico. Los primeros son muy abundantes en la naturaleza tanto libres, como formando ácidos o aldehídos Ejemplos de estos últimos son la vainillina y el anisaldehído (Acosta *et al*, 2014).

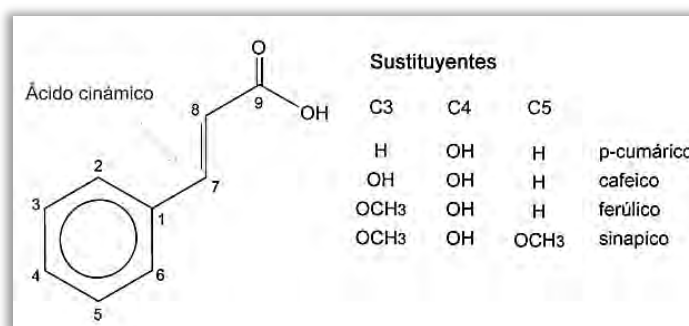


Figura 1. Estructura molecular de los ácidos hidroxicinámicos. Fuente: Mladd, 2008.

Los ácidos hidroxicinámicos (Figura 1) son un grupo de compuestos fenólicos ácidos encontrados ampliamente en plantas y semillas. Se presentan unidos en forma conjugada y esterificada en frutas, vegetales y granos. El ácido ferúlico es el más abundante y fue descrito en 1866 como un componente de *Ferula foetida*, y se encuentra de manera ubicua en los tejidos de las plantas principalmente en la estructura de las paredes celulares (Rosazza, 1995).

5.2.1. Principales fuentes biológicas del ácido ferúlico

Las gramíneas son una de las fuentes esenciales del ácido ferúlico. Constituyen una familia cosmopolita integrada por unos 500 géneros y tal vez unas 8,000 especies. Pertenecen al orden Juncales en la clase Commelinidae (Mattila y Hellstrom, 2007; Wong *et al*, 2011). Las paredes celulares (1,4% de peso seco) de los granos de cereales y una variedad de plantas de alimentos (piña, plátano, espinacas, y remolacha) contiene una cantidad de 0,5-2% extractable de ácido ferúlico, principalmente en la forma *trans*-isomérico, y esterificado con polisacáridos específicos (Kumar y Pruthi, 2014). En la Tabla 2 se resume el contenido de ácido ferúlico en diferentes fuentes conocidas.

Tabla 2. Contenido de ácido ferúlico en diferentes fuentes conocidas.

Fuente	Ácido ferúlico (mg /100 g)
<i>Brotos de bambú</i>	243.60
<i>Oenanthe</i>	7.30 – 34.00
<i>Berenjena</i>	7.30 – 35.00
<i>Remolacha roja</i>	25.00
<i>Bardana</i>	7.30 – 19.00
<i>Soja</i>	12.00
<i>Maní</i>	8.70
<i>Espinacas</i>	7.40
<i>Coles rojas</i>	6.30 – 6.50
<i>Tomate</i>	0.29 – 6.00
<i>Rábano</i>	4.60
<i>Brócoli</i>	4.10
<i>Zanahoria</i>	1.20 – 2.80
<i>Chirivía</i>	2.20
<i>Mizuna</i>	1.40 – 1.80
<i>Albahaca cultivada</i>	1.50
<i>Repollo o col chino</i>	1.40
<i>Lechugas cultivadas</i>	0.19 – 1.40
<i>de judías verdes / fresca</i>	1.20
<i>Aguacate</i>	1.10
<i>Pomelo</i>	10.07 – 11.06
<i>Naranja</i>	9.02 – 9.09
<i>Plátano</i>	5.40
<i>Bayas</i>	0.25 – 2.70
<i>Ruibarbo</i>	2.00
<i>Ciruela oscura</i>	1.47
<i>Manzanas</i>	0.27 – 0.85
<i>Pulpa de remolacha azucarera</i>	800.00
<i>Palomitas de maíz</i>	313.00
<i>Pan de centeno de grano entero</i>	54.00
<i>Copos de avena de grano entero</i>	25.00 – 52.00
<i>Maíz dulce</i>	42.00
<i>Escabeche de remolacha roja</i>	39.00
<i>Arroz marrón, vaporizado y de grano largo</i>	24.00
<i>Café</i>	9.10 – 14.30
<i>Espagueti hervido</i>	13.60
<i>Pastas</i>	12.00
<i>Pan blanco de trigo</i>	8.20

Fuente: Zhao y Moghadasian 2008.

El ácido ferúlico en las paredes celulares de las plantas (Figura 2), se encuentra covalentemente ligado a polisacáridos por enlaces éster y a compuestos de lignina por enlaces éter. Los arabinoxilanos y glucanos son polisacáridos de la matriz y hacen que la estructura entre las microfibrillas de celulosa refuerce aún más la red (Saulnier *et al*, 2001).

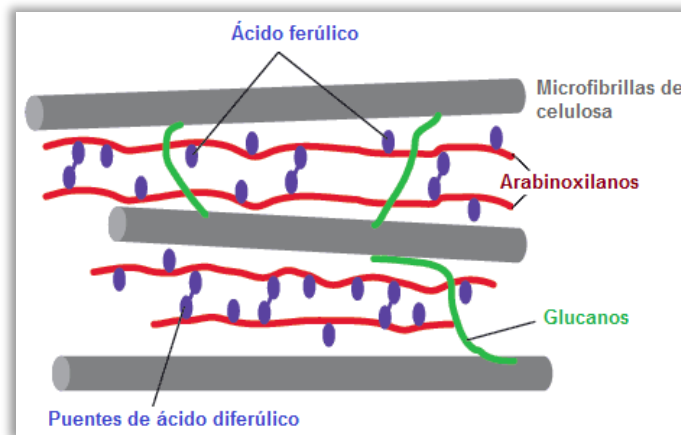


Figura 2. Un modelo esquemático de las paredes celulares de las plantas gramíneas

Fuente: Modificado de <http://iss.jaxa.jp/en/kiboexp/theme/first/ferulate/>

En la **Figura 3** se observan los enlaces éter o éster con los que está unido el ácido ferúlico a la lignina y la manera en que forma puentes diéster-éter entre los polisacáridos.

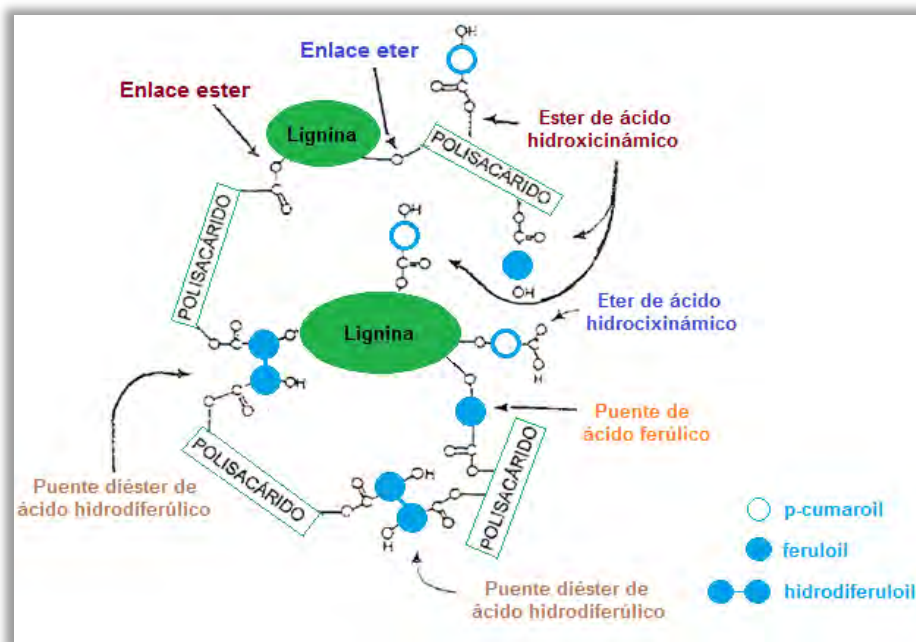


Figura 3. Esquema del arreglo molecular del ácido ferúlico y otros ácidos hidroxicinámicos en la lignina. Fuente: Modificado de Saulnier *et al*, 2001.

5.2.2. Estructura química y propiedades fisicoquímicas del ácido ferúlico

Su nombre IUPAC es ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (**Figura 4**). La estructura de la molécula de ácido ferúlico corresponde al ácido cinámico, donde el anillo bencénico está hidroxilado en la posición *para*- y oxigenado en la posición *meta*-, con respecto al enlace vinílico unido a un grupo carboxílico (**Figura 5**) (Zhao y Moghadasian, 2008).

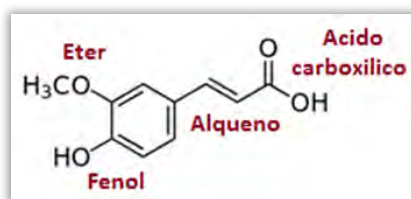


Figura 4. Estructura química del ácido ferúlico y sus respectivos grupos funcionales. Fuente: Elaboración propia.

La masa molar del ácido ferúlico es de 194.184 g/mol en condiciones estándar (25 °C y 1 atm) y punto de fusión de 174 °C, su apariencia es la de cristales que van desde blancos hasta amarillo pálido, es fotosensible, termoestable, posee un sabor astringente y amargo. Debido al doble enlace, tiene la conformación *cis* y *trans* (Figura 5). El isómero *trans* se puede aislar de la estructura compleja de la lignina, taninos hidrolizables y ésteres glicosilados y puede ser cristalizado con agua caliente (Zhao y Moghadasian, 2008).

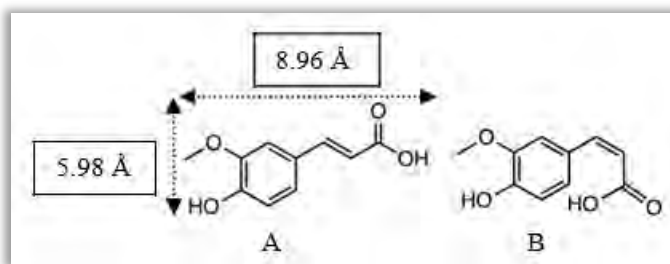


Figura 5. Isómeros de la molécula de ácido ferúlico: (A) *trans* y (B) *cis*. Fuente: Dávila-Guzmán *et al*, 2012

El ácido ferúlico es un ácido dibásico debido a que en solución acuosa tiene la capacidad de desprender dos protones; la primera desprotonación produce un anión carboxilato y la segunda genera el anión fenolato. El alto nivel de resonancia estabiliza el anión fenolato en la molécula (Figura 6).

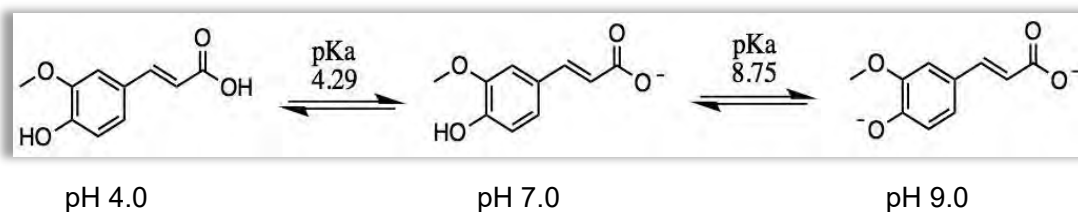


Figura 6. Estados de protonación que presenta el ácido ferúlico en disolución a pH 4.0, 7.0 y 9.0 (comportamiento ácido-base) con sus diversos valores de constante de disociación ácida pKa y sus correspondientes iones. Fuente: Dávila-Guzmán *et al*, 2012

La molécula de ácido ferúlico fluoresce a longitudes de onda máximas de excitación y emisión de 310 nm y 330 nm, respectivamente (Zhang, Li, Jia, Chao y Zhang, 2009). Otras fuentes

proporcionan que en solución acuosa a pH 6.0 (configuración *trans*-) este compuesto es capaz de absorber luz en la región del ultravioleta presentado dos máximos de absorción a los 284 nm ($\log \epsilon = 4.18$) y 387 nm ($\log \epsilon = 4.19$). Es altamente soluble en metanol, etanol y acetato de etilo; moderadamente soluble en éter, y presenta muy baja solubilidad con benceno, éter de petróleo y agua (0.69 mg/mL) (Saulnier *et al*, 2001).

5.2.3. Extracción de ácido ferúlico de fuentes naturales

Numerosos métodos alcalinos, ácidos y enzimáticos para la extracción de ácido ferúlico de diferentes fuentes se han propuesto en la literatura (Kim *et al*, 2006; Sindhu y Abraham, 2006; Anvar y Mazza, 2009; Soto *et al*, 2011). Sin embargo, la optimización de los parámetros críticos para el aislamiento de ácido ferúlico, como el momento de la extracción, el pH y la temperatura es esencial para su alto rendimiento (Guo *et al*, 2003).

El tratamiento de fibras naturales por hidrólisis alcalina es ampliamente usado para modificar la estructura molecular de fuentes biológicas. Los sistemas de origen vegetal a los cuales se les somete a un tratamiento alcalino tienen un menor contenido de lignina, se les remueven grasas, aceites y disminuye su arreglo cristalino (Kabir *et al*, 2012). Durante el tratamiento, condiciones muy suaves pueden no separar del todo el ácido ferúlico de los componentes de la pared celular, pero condiciones muy severas pueden oxidarlo (Saulnier *et al*, 2001).

La nixtamalización es un proceso en el que el grano de maíz es sometido a tratamiento alcalino térmico, produciendo cambios en las características morfológicas y reológicas del maíz (Figura 7). Entre él se encuentran la degradación del pericarpio (compuesto por fibra y compuestos fenólicos), la pérdida de proteínas solubles (principalmente albumina y globulina contenidas en el germen) y la parcial gelatinización del almidón. Esto conduce al reblandecimiento del pericarpio y la remoción del mismo, además de que favorece la absorción de agua por parte del endospermo para su molienda (Méndez-Montealvo *et al*, 2008). Durante la nixtamalización, aproximadamente 75 L de agua se emplean para procesar 50 kg de maíz, lo cual genera una cantidad similar de agua residual alcalina (Nejayote). Se ha estimado que una planta con capacidad de 600 toneladas de grano de maíz al día, genera 1500-2000 m³ de nejayote, considerando que el endospermo toma entre 14-48% del agua del proceso de nixtamalización. La industria de la tortilla genera residuos de 14.4 millones m³ anualmente, compuesto principalmente de agua, cal viva, endospermo de maíz, una gran variedad de microorganismos, además de un alto contenido de fibra como residuos de

cascarilla (19.3%), calcio (13.1%), diversos ácidos cinámicos y aproximadamente 125 veces más de ácido ferúlico y 15 veces de su forma compuesta que el grano crudo (Méndez-Montealvo *et al*, 2008). Así, la utilización del nejayote para su tratamiento requiere de conocer sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 3).

Tabla 3. Conjunto de propiedades fisicoquímicas del nejayote, reportadas antes y después de un proceso de filtración

Contenido	Nejayote	Nejayote filtrado
Sólidos Totales (%)	2.28 ± 0.18	1.12 ± 0.11
Humedad (%)	97.72 ± 0.26	98.9 ± 0.21
pH	11.39 ± 0.49	10.53 ± 0.32
Densidad (kg/m ³)	1003.5 ± 2.45	991.01 ± 1.91
Viscosidad (Pa·s)	0.002301 ± 4.3E-05	0.002097 ± 5.2E-05
Grasas (%)	0.008 ± 0.002	0.007 ± 0.003
Proteínas totales (%)	0.113 ± 0.007	0.112 ± 0.027
Fibra (%)	0.581 ± 0.013	0.2781 ± 0.014
Carbohidratos (%)	0.862 ± 0.016	0.379 ± 0.031
Calcio (mg/L)	1526.21 ± 26.53	712.4 ± 11.53
Dureza (mg/L)	5768.67 ± 0.46	3847.48 ± 15.2
Sólidos sedimentables (µL/L)	> 100,000	<100
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	8342.5 ± 25.3	140.6 ± 8.7

Fuente: Valderrama-Bravo, Gutiérrez-Cortez *et al*, 2012.

Además del ácido ferulico el nejayote posee otros residuos o impurezas que a pesar de que se encuentran en menor proporción en el residuo de maíz son de gran interés en la industria, dado que el ferulato forma dímeros y oligómeros (Bunzel *et al*, 2001), que están unidos a la pared celular del maíz y además tienen implicaciones importantes para la fisiología de la planta, la patología, ciencia de los alimentos y la nutrición humana, así como la de los rumiantes (Ralph *et al*, 2004). Los dímeros de ferúlico están involucrados en la resistencia genotípica del maíz a *Fusarium graminearum* (Valdez-Vazquez *et al*, 2010), en mantener lo crujiente de las frutas y verduras (Waldron *et al*, 2003), en mejorar la digestibilidad del forraje, en influenciar las propiedades fisicoquímicas de la fibra dietética y en las propiedades de la masa de productos horneados (Flander *et al* 2008). Otro compuesto de interés son los arabinosanos son polisacáridos localizados principalmente en la pared celular del endospermo, la capa aleurona y el pericarpio de los granos de cereal; su composición y grado de ramificación depende de la fuente. Están constituidos de una estructura lineal de β-(1,4)-D-xylopiranosa y residuos de L- arabinofuranos. Este polímero puede presentar

residuos de arabinosa esterificados con ácido ferúlico (Carvajal *et al*, 2015). Estos forman geles insípidos e inodoros, con una alta capacidad de absorción de agua (100g de agua/g arabinoxilanos), ausencia de pH o susceptibilidad electrolítica, son estables al calentamiento y no sufren sinéresis después de un largo tiempo. Algunos estudios han descrito previamente el interés tecnológico de las aplicaciones de los geles de arabinoxilanos principalmente en la industria alimenticia y farmacológica. Pueden ser utilizados como adhesivos, espesantes, estabilizantes, emulsificantes, y formadores de películas (Carvajal *et al*, 2015).

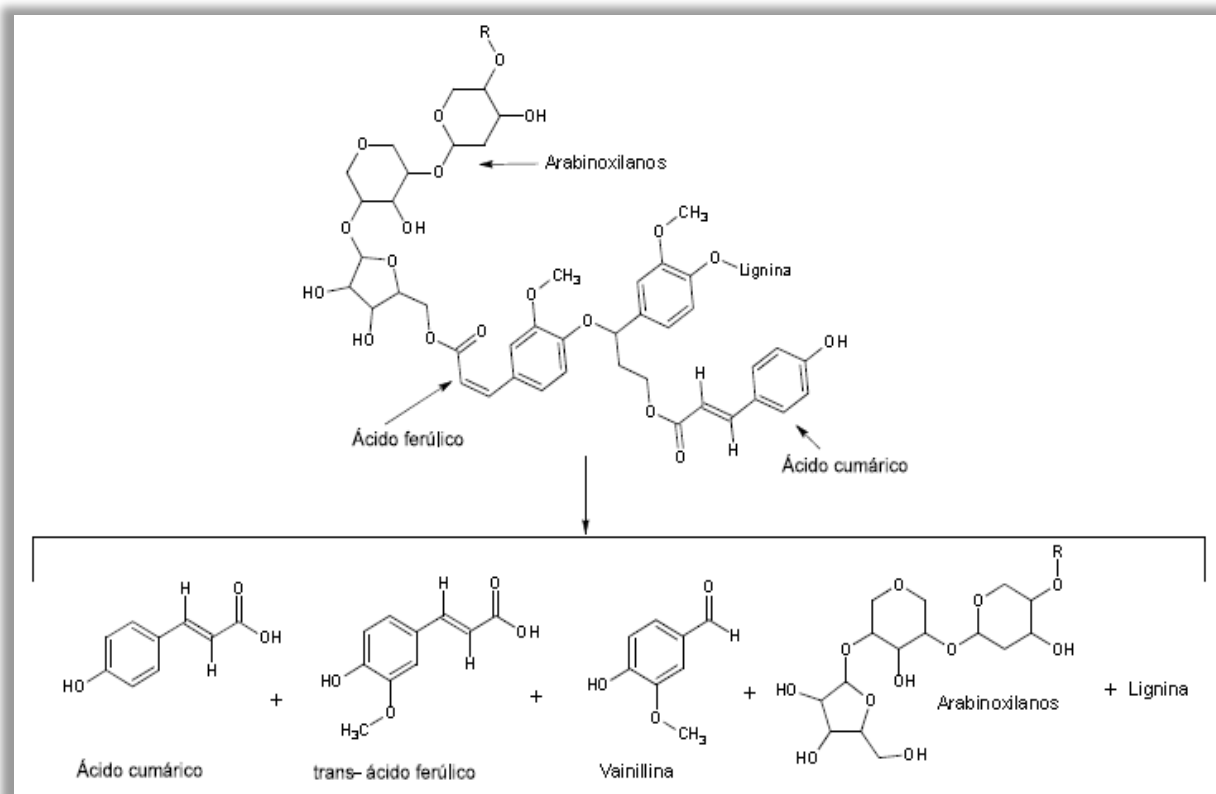


Figura 7. Diagrama del proceso de hidrólisis vegetal sometido a tratamiento alcalino, con el fin de observar la ruptura de los enlaces. Fuente: Modificado de Buranov y Mazza, 2009.

La hidrólisis ácida comienza con un hidrolizado con H_2SO_4 0.2N en un baño de agua. El recipiente es enfriado; se adiciona una suspensión de amilasa fúngica en acetato de sodio acuoso. La mezcla es incubada y centrifugada. Los ácidos fenólicos son extraídos con acetato de etilo y concentrado en un rotavapor. El rendimiento de esta técnica es de 37-416 $\mu g/g$ (Buranov *et al*, 2009).

El aislamiento de ácido ferúlico para la producción comercial por medios enzimáticos es un reto difícil porque la mayor parte de los contenidos de ácido ferúlico en plantas están unidos covalentemente con la lignina y otros biopolímeros. Recientemente, se ha mejorado la

producción enzimática de ácido ferúlico a partir de salvado de arroz desengrasado, y se ha sugerido que las enzimas de *Streptomyces* también se pueden utilizar para la extracción de ácido ferúlico de otras fuentes como: salvado bruto de arroz, salvado de trigo y de mazorca de maíz (Uraji, 2013). Otros estudios de biotransformación para la producción de ácido ferúlico pueden darse a partir del de eugenol con el uso de la cepa recombinante de *Ralstonia eutropha* H16. También se ha conseguido casi el 90% de los rendimientos en la producción de ácido ferúlico a partir de eugenol y alcohol coniferílico mediante el uso de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (Kumar y Pruthi, 2014).

5.2.4. Usos biológicos del ácido ferúlico

Los usos biológicos del ácido ferúlico entraron en observación cuando un grupo de investigadores japoneses descubrió propiedades antioxidantes de ésteres ésterilglucósidos de ácido ferúlico, que se extrajo a partir de aceite de arroz (Yagi y Ohishi, 1979) El ácido ferúlico exhibe una amplia gama de efectos biomédicos, además de nuevas aplicaciones en el área de alimentos y cosmética (Ou y Kwok, 2004; Rukkumani *et al*, 2004)

5.2.4.1. El ácido ferúlico como antioxidante

El ácido ferúlico exhibe actividad antioxidante en respuesta a los radicales libres a través de la donación de un átomo de hidrógeno de su grupo hidroxilo fenólico, es decir, gracias a la capacidad interrumpir reacciones en cadena, participa en la estabilización de un radical mediante resonancia, dado que el electrón desapareado puede deslocalizarse en toda la molécula, por lo que, la estabilización por resonancia del ácido ferúlico (Figura 8) es la principal causa de su carácter antioxidante. Por lo tanto, puede proteger al ADN y a los lípidos de la oxidación por parte de especies reactivas de O₂. Como resultado de lo anterior se muestra una fuerte actividad antiinflamatoria (Ou *et al*, 2004; Natalia *et al*, 2013).

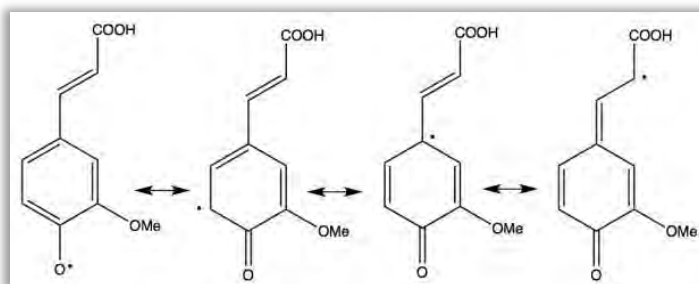


Figura 8. Estabilización por resonancia del radical de ácido ferúlico. Fuente: Graf, 1992

5.2.4.2. El ácido ferúlico como un anti-diabético y agente anti-envejecimiento

La diabetes, es el trastorno endocrino más común en los seres humanos, se caracteriza por la hiperglucemia, el exceso de producción de radicales libres y el estrés oxidativo (Aragno, 2000). Debido a la tensión oxidativa, se inicia un desequilibrio entre los niveles de pro-oxidantes y antioxidantes que conducen a la lesión celular en los sistemas biológicos. El ácido ferúlico ayuda en la neutralización de los radicales libres presentes en el páncreas, que se produce por el uso de estreptozotocina, por lo tanto, disminuye la toxicidad de estreptozotocina. La reducción en el estrés oxidativo / toxicidad podría ayudar a las células beta a proliferar e irradiar más insulina al páncreas. El aumento de la secreción de la insulina provoca un aumento en la utilización de glucosa a partir de tejidos hepáticos adicionales que disminuye el nivel de glucosa en sangre (Balasubashini *et al*, 2004).

5.2.4.3. El ácido ferúlico impide de la decoloración de los alimentos y es agente potenciador de crecimiento

El ácido ferúlico se ha utilizado para mantener el color de guisantes verdes, evitar la decoloración del té verde, y la oxidación de plátano, tornándose a color negro, se reduce la contaminación bacteriana. Se encontró que el ácido ferúlico y g-oryzanol previenen la fotooxidación de la luteína y la astaxantina en el besugo rojo (Maoka *et al*, 2008). Debido a la similitud estructural del ácido ferúlico con normetanefrina (primer metabolito de Norepinefrina), imita el efecto estimulante sobre la somatotropina en la glándula pituitaria y, por tanto, aumenta el crecimiento (Kumar y Pruthi, 2014).

5.2.4.4. Usos de ácido ferúlico en cosmética

La formación de ROS (especies de oxígeno reactivo) es la principal causa de daño cutáneo inducido por UV. Durante la exposición a la radiación, un fotón interactúa con el ácido trans-urocánico en la piel y genera oxígeno singlete que puede activar toda la cascada de oxígeno libre con oxidación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, resultando en cambios de foto envejecimiento y cáncer de piel (Barone *et al*, 2009; Blume, 2013). Debido a su estructura el ácido ferúlico es un fuerte absorbente de UV, convirtiéndose en un agente fotoprotector de la luz solar, por lo que la piel lo absorbe a la misma velocidad a pH ácido y neutro, protegiendo al cuerpo de radicales libres y especies reactivas de oxígeno. El ácido ferúlico en formulaciones con la vitamina E y vitamina C proporciona cerca de 4-8 veces protección contra el daño de la radiación solar, previniendo eritemas, arrugas y áreas de pigmentación.

Debido a su alto grado de conjugación e instauración y permeabilidad en la piel se le ha asociado con actividades antimicóticas (Mancuso y Santangelo, 2014).

5.2.4.5. El ácido ferúlico como un agente contra el cáncer

Los antioxidantes presentes en la dieta tienen la particularidad de ser inhibidores potenciales del crecimiento celular expuesto, razón por la cual la actividad anti-carcinogénica de ácido ferúlico está relacionada con su capacidad de barrer el ROS y la estimulación de enzimas citoprotectoras (Barone *et al*, 2009). Debido a la construcción de radicales libres en leucocitos y otras células, la nicotina tiene un papel clave en la patogénesis del cáncer de pulmón, por lo que haciendo pruebas en linfocitos de sangre periférica de ratas el ácido ferúlico contrarresta la peroxidación lipídica inducida por nicotina y la reducción en el nivel de GSH (glutathiona reducida) (Sudheer *et al*, 2007). La estimulación de la enzima de desintoxicación parece ser un mecanismo para la acción anticancerígena del ácido ferúlico; que mejora la actividad de la enzima UGTs (UDP-glucuronosiltransferasas), drásticamente en el hígado; debido a esta razón se produce una mejor detoxificación de compuestos cancerígenos y posterior prevención del cáncer gastrointestinal (Van der Logt *et al*, 2003). El ácido ferúlico también inhibe el crecimiento de células de cáncer de colon y comprende un potencial de supresión de tumor en líneas celulares de cáncer de mama. También disminuye los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia de carcinomas mediante el aumento de la defensa inmunológica natural (Menéndez *et al*, 2008).

5.2.4.6. Protección pulmonar y el efecto cardiovascular de ácido ferúlico

La nicotina es uno de los principales compuestos peligrosos del humo del cigarrillo. Provoca la lesión celular oxidativa aumentando la peroxidación lipídica que se supone desempeña un papel clave en la patogénesis de varias enfermedades relacionadas con el tabaco (Warren *et al*, 2013). Debido a la administración de ácido ferúlico, se produce una reacción inversa en el daño, que es inducida por la nicotina. El ácido ferúlico provoca un aumento significativo en la defensa antioxidante endógena, que protegen a las células del daño oxidativo. Por otro lado, se ha comprobado que el ácido ferúlico reduce la rigidez diastólica del ventrículo izquierdo, atenúa la presencia de células inflamatorias, la acumulación y deposición de hierro férrico y colágeno en los ventrículos y los riñones izquierdos. De manera análoga, se ha observado que tiene efectos positivos sobre arritmias cardíacas (Zhao y Tanaka, 2014), tiene actividad antimutagénica (Birošová *et al*, 2005) y de igual modo, se le ha conferido actividad antitrombótica (Fujita *et al*, 2008; Ramar *et al*, 2012; Urbaniak *et al*, 2013).

5.2.4.7. El ácido ferúlico como conservador de alimentos

El ácido ferúlico tiene aplicaciones en la conservación de alimentos como un agente de reticulación. El primer informe sobre el uso de ácido ferúlico como conservador de alimentos se hizo en Japón (Oosterveld *et al*, 2010); para preservar las naranjas y para inhibir la auto-oxidación de aceite de linaza. Con la adición de cobre (Cu) o hierro (Fe), también se encontraron compuestos fenólicos para estabilizar el aceite de manteca de cerdo y de soja. Las mezclas de ácido ferúlico y aminoácidos o dipéptidos (tales como glicilglicina) ejercen una consecuencia inhibitoria sinérgica sobre la peroxidación de ácido linoleico. El ácido ferúlico es un buen agente de entrelazamiento con polisacáridos como la pectina y los arabinosilanos para incrementar su viscosidad y formar geles, haciendo posible el uso de polisacáridos de bajo peso molecular con baja viscosidad para la formación de geles en el procesado de alimentos, además puede reaccionar con los aminoácidos de las proteínas para mejorar las propiedades de películas proteicas (Kumar y Pruthi, 2014).

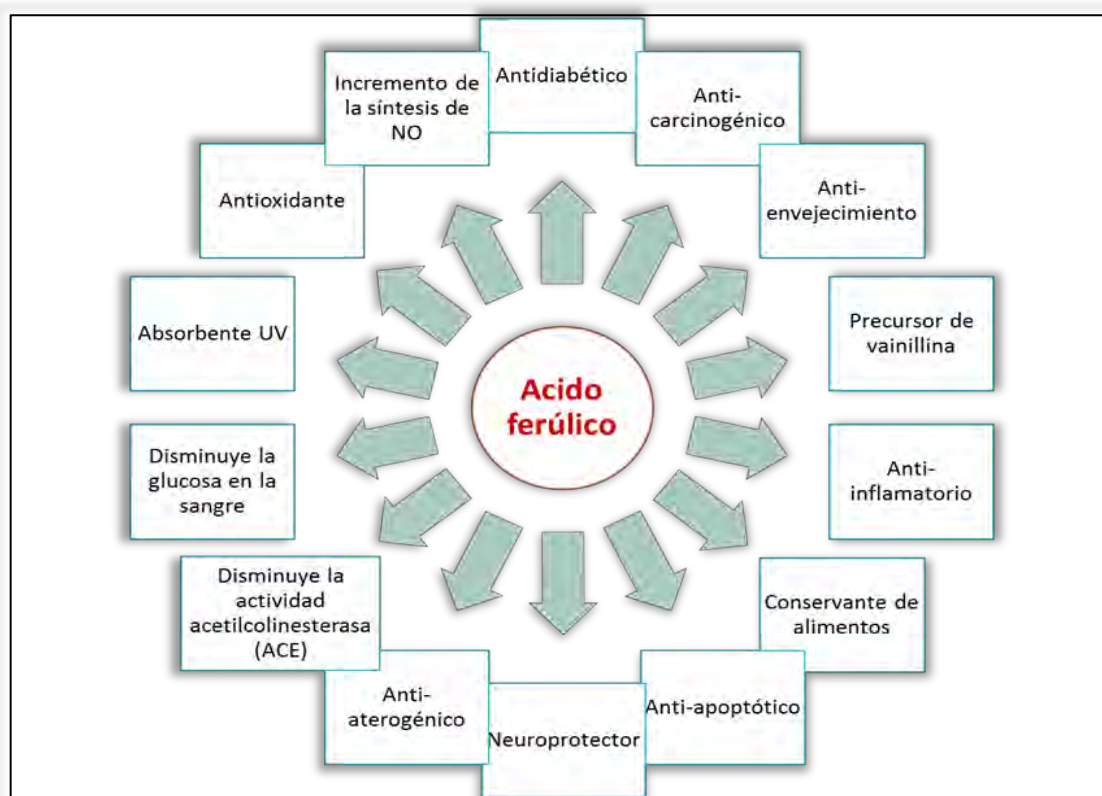


Figura 9. Diferentes aplicaciones de ácido ferúlico conocidas que exhibe una variedad de aplicaciones industriales biomédica, farmacéutica y alimenticia.

Fuente: Modificado de Kumar y Pruthi, 2014.

5.2.4.8. Aplicaciones adicionales del ácido ferúlico

Como derivado de amida del ácido ferúlico, formado por la condensación de ácido ferúlico con la tiramina puede ser utilizado como un indicador de estrés ambiental en las plantas. El ácido ferúlico también aumenta la estabilidad del citocromo c, y por lo tanto inhibe la apoptosis (muerte celular programada), que es inducida por el citocromo c (Yang *et al*, 2007). El ácido ferúlico es un nuevo agente terapéutico potencial para las enfermedades isquémicas (Lina *et al*, 2010); También mejora la unión de IgE a los alérgenos de nueces de guisantes (Chung *et al*, 2011). Se ha demostrado que actúa como un modulador de β -secretasa con potencial terapéutico contra la enfermedad de Alzheimer (Mori *et al* 2013), y se ha encontrado que mejora la estructura y la función del corazón, vasos sanguíneos, hígado y riñones en ratas hipertensas (Alam *et al*, 2013; Sarekha *et al*, 2013). El papel funcional y las diferentes aplicaciones del ácido ferúlico se representan en la Figura 9.

5.2.5. Importancia del ácido ferúlico como bloque precursor

Tabla 4. Importancia del ácido ferúlico como precursor empleando diversos microorganismos en la biotransformación de diferentes sustratos.

Microorganismo	Precursor	Producto	Referencia
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Falconer <i>et al</i> , 1994; Lesage-Meessen <i>et al</i> 2010
<i>Aspergillus niger</i> C28B25, DAR2 y K8	Ácido ferúlico	Vainillina, 4-Vinil Guayacol y ácido vainillínico	Lesage-Meesen <i>et al</i> , 1996; Baqueiro-Peña <i>et al</i> , 2010. Motedayen Nazila <i>et al</i> , 2013
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Labuda <i>et al</i> , 1993
<i>Spirulina platensis</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Ramachandra <i>et al</i> , 2000
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Usha Tripathi <i>et al</i> , 1999
<i>Paecilomyces variotti</i>	Ácido ferúlico	Vainillina, ácido vainillínico	Ghosh Shashwati <i>et al</i> , 2006.
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Krishnamohan y Khanna, 1994
<i>Streptomyces setonni</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Belén, Cortés-Domínguez, 2012.
<i>Polyporus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Rosazza <i>et al</i> , 1995
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Edlin <i>et al</i> , 1995
<i>Streptomyces sannanensis</i> y <i>cervisae</i>	Ácido ferúlico	Ácido vainillico, 4-vinil guayacol, guayacol, ácido protocatecuico	Wenwen, Tang, Ni, Wu, Tao y Xu, 2013
<i>Enterobacter sp. Px6-4</i>	Ácido ferúlico	4-vinil guayacol, Vainillina, 4-etilguayacol	Xuemei, Yang, Qin y Zhang, 2008
<i>Debaryomyces hansenii</i> 539	Ácido ferúlico	4-vinil guayacol, vainillina, ácido vainillico y alcohol vainillico	Sindhu y Sudheesh, 2007
<i>Bacillus coagulans</i> BK07	Ácido ferúlico	4-vinil guayacol, Vainillina, ácido protocatecuico	Peng, Zhengrong, Suyue, Zhongtian, Xiaojuan, Ningbo y Hongyu, 2016
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Ácido ferúlico	4-vinil guayacol	Altine, Iqbal, Wei y Ismail, 2012
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Del Bello, 2013

El ácido ferúlico es precursor de una gran variedad de compuestos antimicrobianos, moléculas receptoras de señales y fitoalexinas las cuales tienen un papel importante en las respuestas de defensa de la planta. Adicionalmente, el ácido ferúlico se usa para la producción de vainillina natural y es esencial en la obtención de otros productos de interés comercial como el ácido vainilínico, el guayacol, el 4-vinilguayacol, ácido protocatecuico, 4-etilguayacol, entre otros, a través de diferentes microorganismos como bacterias, hongos, tejidos vegetales y levaduras (Tabla 4).

5.3. Vainillina: sus orígenes y situación actual

Conocida en todo el mundo la vainilla se relaciona originalmente con la cultura totonaca, de la región de Papantla, Veracruz. Este perfumado fruto, es llamado en náhuatl "tlilxóchitl", que significa vaina negra. En la época prehispánica, los aztecas cultivaron la vainilla y la usaron como saborizante del xocolatl, palabra usada para describir el chocolate. Tras la conquista española, en 1521 la vainilla fue introducida a Europa comenzando por España, seguida de Inglaterra y Francia en el siglo XVIII y llegó hasta las islas del Océano Índico a mediados del Siglo XIX a Madagascar, donde ha llegado a convertirse en el mayor productor mundial de la vainilla; Después de 350 años en que se ha cultivado en el extranjero, México el único abastecedor de vainilla en este continente (Solvay, 2014). La vainilla, es una orquídea tropical perteneciente a la familia de Orquidáceas y alrededor de 110 especies han sido identificadas, pero sólo 3 especies tienen importancia comercial: *Vanilla fragrans* conocida como *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* y *Vanilla tahitensis*. La especie más cotizada es *Vanilla planifolia*, ya que debido a sus características es la especie más importada (99 %) en Estados Unidos (Wilez and Jons, 1992; Solvay, 2014).

5.3.1. Composición de la Vainilla

Los constituyentes del aroma y sabor de la vainilla son los carbonilos, alcoholes aromáticos, ácidos y ésteres aromáticos, fenoles, alcoholes alifáticos, lactones aromáticos, hidrocarburos alifáticos, terpenoides, heterociclos, etc. Los componentes no volátiles que le proporcionan el sabor son taninos, polifenoles, resinas y aminoácidos libres (Thiel, 2004).

Estudios recientes muestran que son más de 250 compuestos aromáticos volátiles que contribuyen al sabor y olor del mismo. Entre los principales componentes de la vainilla se encuentran el 4-Hidroxibenzaldehído (Vainillina), p-Hidroxibenzaldehído, ácido vainilínico y p-metoxibenzaldehído (Figura 10) (Thiel, 2004).

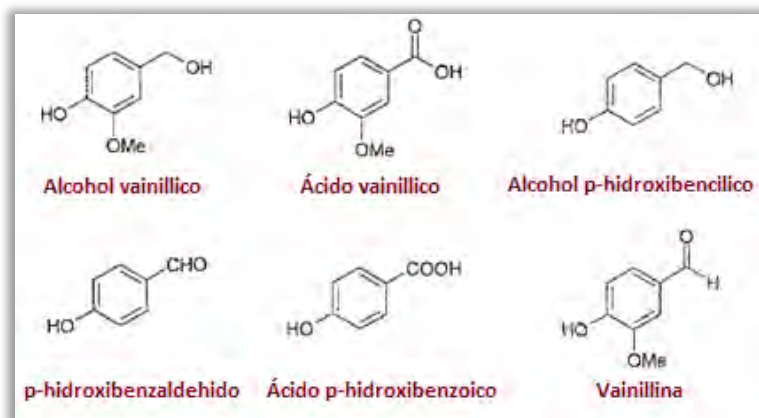


Figura 10. Estructuras químicas de los componentes mayoritarios que confieren el sabor a vainilla.
Fuente: Elaboración propia.

La vainillina es uno de los compuestos que se encuentra en mayor cantidad en los extractos naturales de vainilla (Tabla 5) (Thiel, 2004). La relación entre los distintos componentes la determina las condiciones del cultivo, los nutrientes que contiene la tierra, la madurez con la que se recoge la cosecha y el método de curado (Kamm et al, 2004).

Tabla 5. Componentes mayoritarios presentes en la vaina de vainilla curada

Componente	g/kg (base seca)
Vainillina	20
Ácido vainillico	1
p-hidroxibenzaldehído	2
p-hidroxibenzil-metil-éter	0.2
Azúcares Totales	250
Grasa	150
Celulosa	150-300
Minerales	60
Agua	350

Fuente: Thiel, 2004

5.3.2. Estructura química y propiedades físicas de la Vainillina

La vainillina forma cristales blancos de olores agradables y sensibles a la humedad; se ve afectada por la luz y sus soluciones acuosas son acidas; se le conoce también como: aldehído vanílico, aldehído metil-protocatéquico y su nombre (IUPAC) es 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Figura 11). Buena solubilidad en etanol (Tabla 6). Es un compuesto de los benzaldehídos con un grupo hidroxilo en la 4ª posición, el cual en medio alcalino se protona. Esta protonación provoca que la banda espectrofotométrica se desplace de 308 a 348 nm (Hocking, 1997). Este efecto batocrómico o de corrimiento hacia el rojo se presenta cuando se encuentran en solución en el extracto de vainilla.

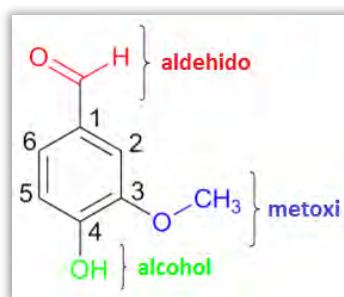


Figura 11. Estructura molecular de la vainillina y sus grupos funcionales característicos de la vainillina. MM = 152.14 g/mol. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Algunas de las propiedades físicas de la vainillina.

<i>Propiedad</i>	<i>Dato físico</i>
<i>Punto de fusión</i>	80 - 83 °C
<i>Punto de ebullición</i>	285 °C
<i>Gravedad específica</i>	1.056 a 20 °C
<i>Solubilidad</i>	1 g de vainillina en 100 g de agua a 14 °C; muy soluble en alcohol etílico, acetona y éter. Soluble en piridina, cloroformo, sulfuro de carbono, ácido acético glacial y en las soluciones de hidróxidos de metales alcalinos y otros solventes orgánicos.

Fuente: Crittenden, 1998.

5.3.3. Producción de vainillina

De la producción anual solo el 2% de vainillina se encuentra contenido en las vainas de vainilla. El mercado de vainas es altamente fluctuante en términos de disponibilidad, precio y calidad, debido a variaciones en el rendimiento de las cosechas, a fluctuaciones del clima, enfermedades, motivos económicos y políticos, además de cosecha precoz y especulación. La extracción y producción de vainillina natural de otros medios es muy escasa (0.01 a 1 % en peso) y poco ambiental (extracciones con éter de petróleo y tolueno) como los que se obtienen a partir de resinas y bálsamos de Oak Moss, Tolú y Tonka, a partir de cascara de papa y a partir de la remolacha de azúcar o betabel. (Flores y Quintanar, 1982).

5.3.3.1. Comercialización y mercado global de la vainillina

Actualmente la vainilla ocupa el segundo lugar después del azafrán, como la especie más cara a nivel mundial, alcanzando los 80 millones de dólares y su precio por Kg ha llegado a los \$500 dólares. El elevado precio se debe a que los procesos de cultivo, polinización y

cosecha se realizan a mano tardando muchos meses para obtener un producto de alta calidad. Se requieren de 4 kg de vainas verdes para obtener 1 Kg de vainilla curada y a partir de 50 kg de vainilla curada se obtiene alrededor de 1 kg de vainillina, teniéndose que polinizar alrededor de 40,00 flores (Rao y Ravi shankar 2000; Kamm *et al*, 2004; Holladay *et al*, 2007; Solvay, 2014). En la **Figura 12** se muestran los mayores productores de vainillina.

La producción anual de vainas de vainilla es de cerca de 2000 Millones de toneladas (MT), lo que correspondería a 40 MT de vainillina como máximo considerando una cantidad de 2% de contenido de vainilla en las vainas. Por otro lado, la demanda mundial de vainillina es de aproximadamente 20000 MT al año. Como consecuencia, las vainas de vainilla no servirían a más de 0,2% de la demanda mundial, el resto es producido sintéticamente (Solvay, 2016).

La vainillina extraída a partir de vainas de vainilla tiene un valor que fluctúa entre \$1200 y \$4000 dólares por Kg, en contraste con el precio de la vainillina sintética cuyo precio es menor a los \$15 dólares por Kg y del cual el 50% se utiliza como intermediario en la industria química y farmacéutica para la producción de herbicidas, agentes antiespumantes, medicinas, aromatizantes y ceras de pisos (Solvay, 2016; Bjørsvik, 2002). Se están haciendo esfuerzos para la obtención biotecnológica de vainillina considerada natural, a partir de ácido ferúlico (\$ 1,000 por Kg) para que la obtención de productos sea más amigable ambientalmente (Delisi *et al*, 2016).

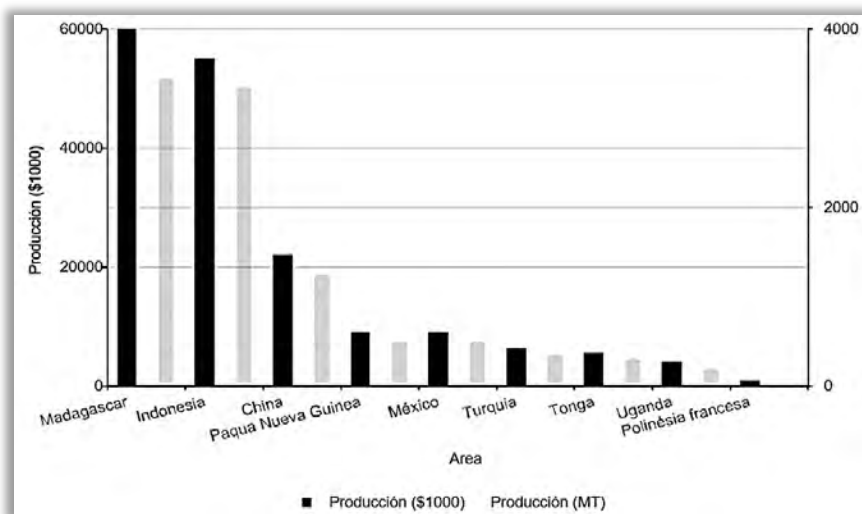


Figura 12. Países más importantes en la producción de vainillina. Fuente: FAOSTAT; 2015.

Aunque el consumo de este producto en México es mayor de 65 toneladas al año (considerando la vainilla sintética), actualmente se tiene que importar en gran proporción vainillina natural (**Figura 13**).

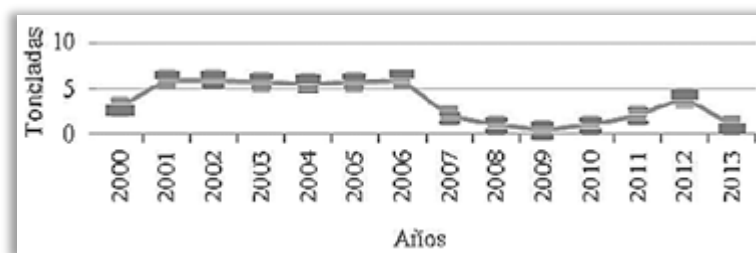


Figura 13. Importaciones de vainillina natural en México.

Fuente: Financiera Nacional de Desarrollo, Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. 2014.

5.3.4. Usos en la industria farmacéutica y alimenticia de la vainillina

La vainillina es una sustancia que brinda sabor y es usada principalmente en alimentos. Sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas protegen a productos alimentarios. Es utilizada como un aditivo en alimento, en la industria del chocolate, en vinos y licores, helados, confitería, café, en cigarros y puros, en productos horneados como pasteles, galletas, etc. Es usado como especia en formulaciones de oleorresinas y salsas (Davidson *et al*, 2000). En la industria farmacéutica se utiliza como un ingrediente en perfumes y cosméticos y en fármacos de segunda generación como 3,4,5 trimetoxibenzaldehído, un bloque de construcción del agente antibacteriano trimetoprima o levodopa, que se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Bjørsvik, 2002).

5.3.5. Obtención convencional de vainillina a partir de *Vainilla planifolia*

El proceso requiere que la polinización de las flores se realice de manera manual. Las vainas se recolectan antes de que maduren y se ponen a secar directamente al sol o en una estufa entre 50 y 60 °C, durante unos días. Las vainas se tornan de color pardo oscuro, cubiertas de pequeños cristales perfumados. En el "Matado" se detiene el metabolismo aerobio de la vaina y la vida vegetativa. En el "Sudado" se deshidrata la vaina rápidamente y se lleva a cabo una fermentación lenta, en donde ocurren reacciones enzimáticas y no enzimáticas formándose así, azúcares, fenoles, quininas, pigmentos, vainillina y otros compuestos aromáticos. En el "Secado" las vainas quedan con un 20-25% de humedad. Durante el proceso de "Curado", la glucovainillina es enzimáticamente convertida por la glucosidasa en glucosa y en un aldehído de vainilla. Las vainas curadas de vainilla contienen azúcares, fibras de lignocelulosa, ácidos orgánicos, vainillina, fenoles, aceites, resinas, gomas, pigmentos, minerales, compuestos aromáticos y aceites esenciales. Durante el acondicionamiento las vainas se colocan en cajas cerradas durante meses, donde definen

sus características de fragancia. La extracción se realiza con éter etílico. El solvente se destila y el residuo se purifica con recristalización en éter de petróleo (Aserca, 2002). El contenido de vainillina en las vainas de vainilla se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Clasificación de las vainas de vainilla, de acuerdo al % de humedad, concentración de vainillina y apariencia sensorial. Tomado de la norma mexicana NMX-FF-074-1996

<i>Categoría</i>	<i>Humedad (%)</i>	<i>Vainillina (%)</i>	<i>Tamaño promedio (cm)</i>	<i>Color y apariencia</i>	<i>Aroma y olor</i>
<i>Extrema</i>	25 – 27	2.50 en adelante	19.9 – 22.9	Café oscuro o café negruzco, flexibilidad y tamaño uniforme	Dulce y delicado
<i>Primera</i>	19 – 24.9	2.00 – 2.49	16.1 – 18.6	Café oscuro con filamentos rojizos, más o menos brillante y flexible	Dulce
<i>Segunda</i>	16 – 18.9	1.30 – 1.99	12.1 – 14.8	Café claro con pequeñas rayas rojizas, poco flexible y brillante	Suave

5.3.6. Procesos de producción de vainillina sintética

La vainillina natural es escasa desde hace tiempo y para satisfacer su demanda, se ha propiciado la incorporación de vainillina sintética, la cual, en los últimos años, se ha comprobado los daños que puede causar a la salud humana (Retes-Mantilla *et al*, 2015), por lo que, cabe mencionar algunas de las síntesis de vainillina sintética más importantes.

5.3.6.1. A partir de lignina y sus derivados

Uno de los métodos industriales para la obtención de vainillina a partir de lignina es el de Marathon-Howard. La lignina está contenida en los líquidos bisulfíticos residuales en la fabricación de papel. El líquido bisulfítico residual se precipita fraccionalmente con hidróxido de calcio; el precipitado de lignosulfonato de calcio básico, libre de carbohidratos, se separa por filtración continua en vacío y se digiere bajo presión con solución concentrada de NaOH; de 2 a 3 % de la lignina se convierte en vainillina.

La solución acuosa residual de sales de sodio se acidifica con anhídrido sulfuroso que precipita los materiales fenólicos perjudiciales, pero deja la vainillina en solución como producto de adición de bisulfito de sodio; se filtra la solución, se acidifica con ácido sulfúrico y se expulsa el anhídrido sulfuroso. Se separa la vainillina cruda por filtración y se purifica por destilación en alto vacío y recristalización acuosa. Los métodos más recientes se basan en el mismo principio (Marshall, 1999).

5.3.6.2. A partir de fenol produciendo guayacol

Una de las síntesis industriales de la vainillina es por el proceso de fabricación de guayacol a partir de fenol. Una vez que se obtiene el guayacol, se trata con formaldehído y p-nitroso-N,N-dimetilanilina en presencia de metanol, agua y ácido clorhídrico. El metanol se separa por destilación del producto de la reacción, el que después se trata con benceno para extraer la vainillina. Después de separar el benceno, la vainillina se filtra y seca (Figura 14).

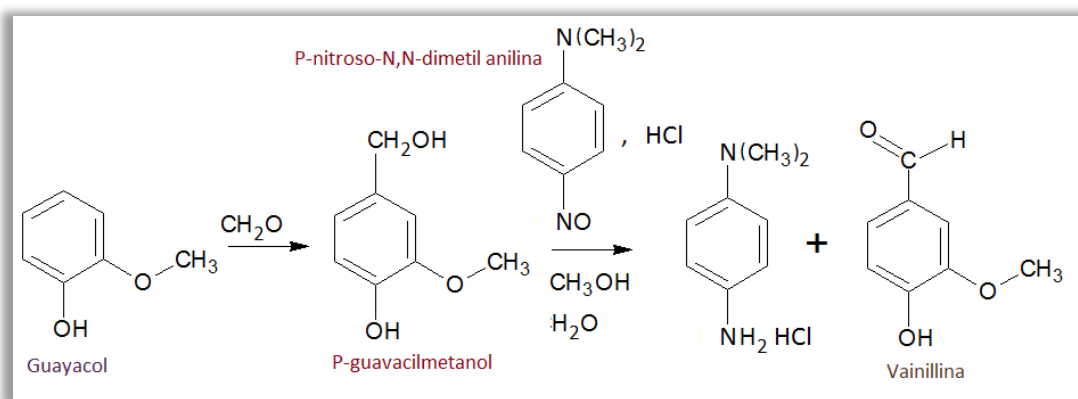


Figura 14. Obtención de vainillina a partir de guayacol. Fuente: Flores y Quintanar, 1982.

5.3.6.3. A partir de la pirocatequina u ortodifenol.

Al tratar pirocatequina con cloroformo en solución alcalina (Figura 15), se obtiene aldehído protocatéquico que al metilarse con sulfato de dimetilo en solución alcalina y en caliente produce vainillina como producto principal (Flores y Quintanar, 1982).

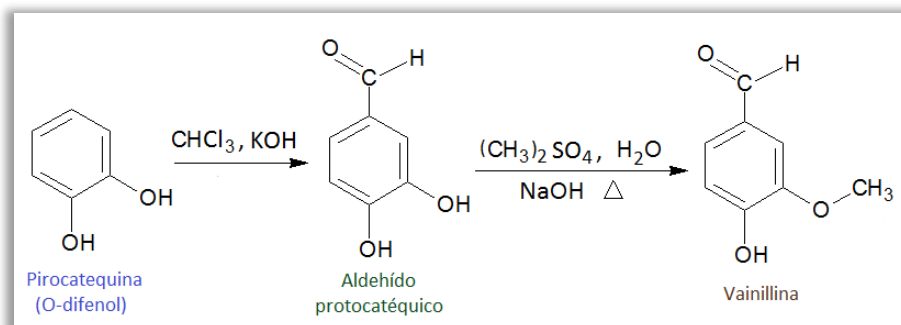


Figura 15. Obtención de Vainillina a partir de pirocatequina. Fuente: Kumar, 2012.

5.3.6.5. Síntesis de Laire, a partir de eugenol.

Por mucho tiempo, la fuente más importante de vainillina fue el eugenol (componente mayoritario del clavo). Tiemann en 1876 desarrolló diversos métodos químicos para producir vainillina a partir del eugenol (Figura 16), sin embargo, es muy tóxico para los

microorganismos, causa lisis en la célula, inhibe el crecimiento y el metabolismo de éstos (Flores y Quintanar, 1982).

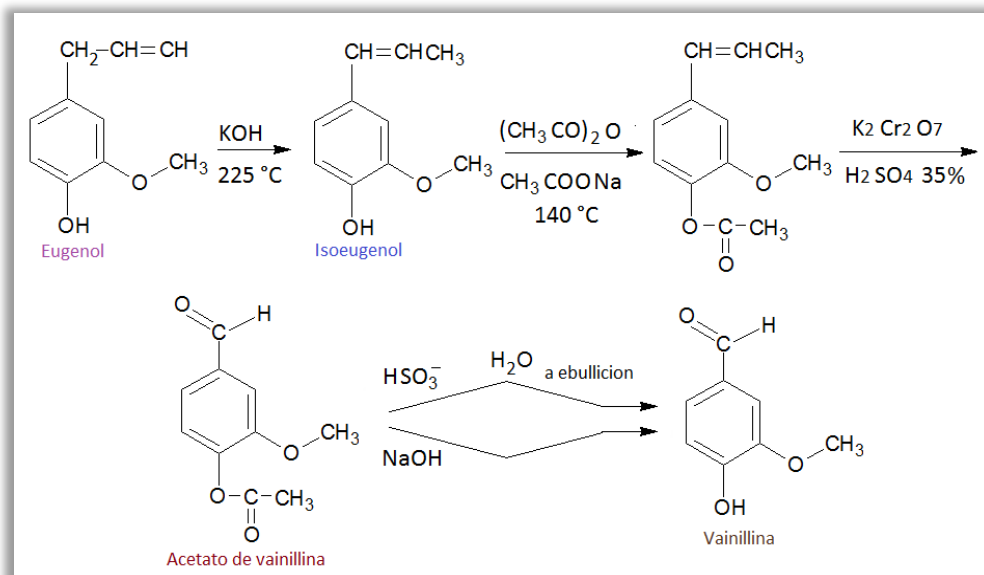


Figura 16. Obtención de vainillina a partir de eugenol. Fuente: Kumar. Pr, 2012.

5.3.6.4. Síntesis de Tiemann y Haarmann a partir de coniferina.

La coniferina es un glucósido con estructura molecular semejante a la de la vainillina, que se halla en las capas de crecimiento secundario de las coníferas. La coniferina reacciona con mezcla crómica para que se oxide la cadena lateral y se forme la glucovainillina, la que se hidroliza en medio ácido, para obtener glucosa y vainillina (Figura 17).

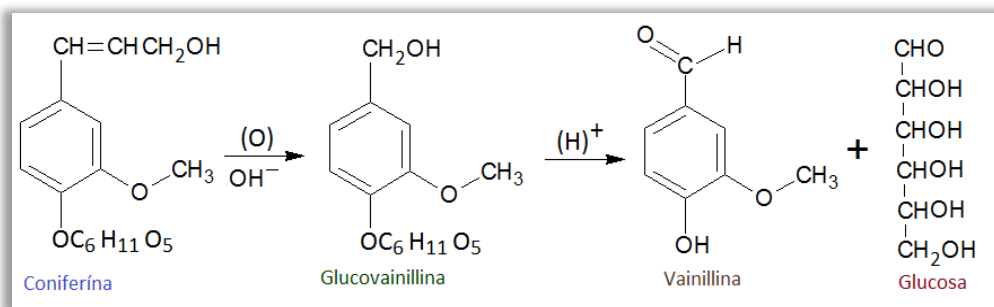


Figura 17. Obtención de vainillina a partir de coniferina. Fuente: Kumar, 2012.

5.3.6.6. Síntesis de Williamson a partir del safrol.

El safrol, principal componente del aceite de alcanfor, se trata con álcali. Para producir el isosafrol, este se oxida a aldehído protocatéquico, que se metila para obtener vainillina. El rendimiento es de 50% (Figura 18).

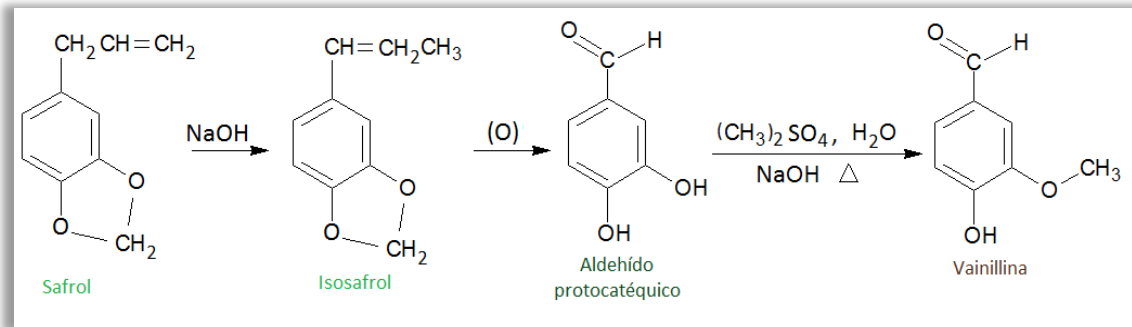


Figura 18. Obtención de vainillina a partir de safrol. Fuente: Kumar. Pr, 2012.

5.3.6.7. A partir de la oxidación de isoeugenol

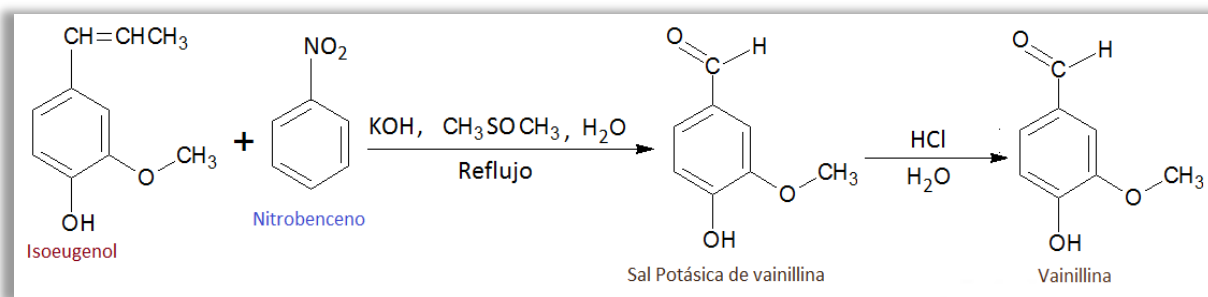


Figura 19. Obtención de vainillina a partir de oxidación de isoeugenol. Fuente: Kumar. Pr, 2012.

La obtención de vainillina a partir de isoeugenol es un ejemplo de oxidación en una cadena lateral. La estabilidad del isoeugenol, por ser un p-hidroxifenil propeno, facilita el rompimiento del enlace C-C empleando como agente oxidante nitrobenzeno en medio alcalino. Este compuesto no destruye el grupo funcional fenólico del isoeugenol y únicamente oxida la cadena lateral, hasta el grupo aldehído (Figura 19), (Flores y Quintanar, 1982). La acidificación de la sal, produce vainillina.

5.3.7. Principales derivados vainilloides

De los principales derivados de la vainillina se encuentra el alcohol vainillínico, el ácido vainillínico y el dímero de la vainillina (Bagheri-kalmarzi *et al*, 2012). (Figura 20) estos se han evaluado como inhibidores de acción de la tirosinasa, enzima que en mamíferos causa la pigmentación de piel, ojos y cabello. En plantas produce la coloración café lo cual determina la calidad de los productos agrícolas de consumo humano; los resultados obtenidos mostraron que la vainillina no presentaba inhibición de la actividad de la enzima mientras que el ácido vainillínico y el alcohol vainillínico si la mostraban.

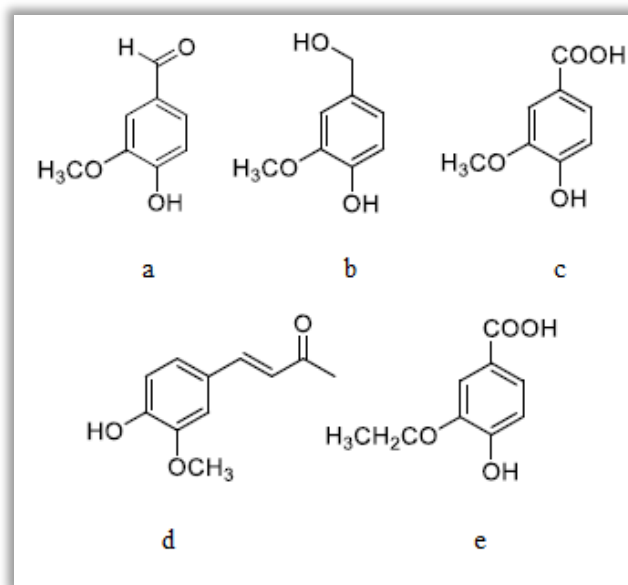


Figura 20. Estructuras de la vainillina (a), y derivados vainilloides: alcohol vainillínico (b), ácido vainillínico (c) 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona (d) y ácido 3-etoxi-4-hidroxibenzoico (e) (Bagheri, 2012).

Recientemente, se sintetizó una serie de epoxi vainilloides, utilizando la vainillina y sus derivados oxidados y reducidos, ácido vainillínico y alcohol vainillínico, respectivamente. El ácido vanílico, por ejemplo, es un agente de fragancia y aroma valorada con varios efectos beneficiosos adicionales debido a ser quimiopreventivo, hepatoprotector y de actividad cardio protectora, y un mercado mundial en diversas áreas de aplicación superiores a \$ 200 millones (Fache, 2015; Delisi *et al*, 2016).

5.4. Adsorción como operación unitaria en la obtención de ácido ferúlico y vainillina

La adsorción es un método de purificación que consiste en la transferencia de material desde una fase hacia una superficie, donde se enlaza mediante fuerzas inter moleculares. El adsorbato es la sustancia que se concentra en la superficie y el adsorbente es el material sobre el cual éste se acumula. A partir de las curvas de avance se obtiene una descripción de la velocidad de transferencia de masa al adsorbente. (Huang, Jin, Deng, 2002). La transferencia del soluto hacia el adsorbente se controla por mecanismos como: la transferencia de masa externa, la adsorción sobre la superficie del adsorbente, la transferencia de masa interna a través de la fase del fluido que ocupa los poros del adsorbente y la transferencia de masa interna a lo largo de las superficies sólidas de los poros del adsorbente (Pan *et al*, 2003).

5.4.1. Resinas poliméricas no iónicas como adsorbentes

Los adsorbentes se clasifican según el tipo de estructura y las características de adsorción. Según las características de adsorción del agua, pueden clasificarse como hidrófobos (superficie no polar) o hidrofílicos (superficie polar) (Kunin, 1991. Suresh *et al*, 2012). Puesto que los compuestos fenólicos tienen donantes de hidrógeno, se ha estudiado el efecto de los grupos funcionales en resinas poliméricas como promotores de enlace de H para mejorar la capacidad de adsorción de estos compuestos (Long *et al*, 2002; Jiang *et al*, 2007).

5.4.2. Fundamentos de la adsorción dinámica o de lecho fijo

El análisis de lechos fijos de adsorbentes se basa en la construcción de las curvas de concentración del efluente a la salida de la columna en función del tiempo y los ciclos de adsorción, los cuales son función de la geometría del adsorbente y de las condiciones de operación (caudal, temperatura, tiempo de residencia). La curva de concentración del efluente en función del tiempo se obtiene haciendo fluir un fluido que contenga un soluto adsorbible con una concentración inicial C_0 a través de un lecho fijo con un adsorbente limpio o regenerado. Como el flujo de dicho fluido continúa, el lecho se llega a saturar en una posición determinada y se establece una distribución de la concentración dentro del lecho. La Figura 21 muestra el agotamiento durante el uso de una columna. En el punto C_3 la columna empieza a saturarse y cerca del punto C_4 ya no tiene capacidad de adsorción. (Farooq *et al*, 1990).

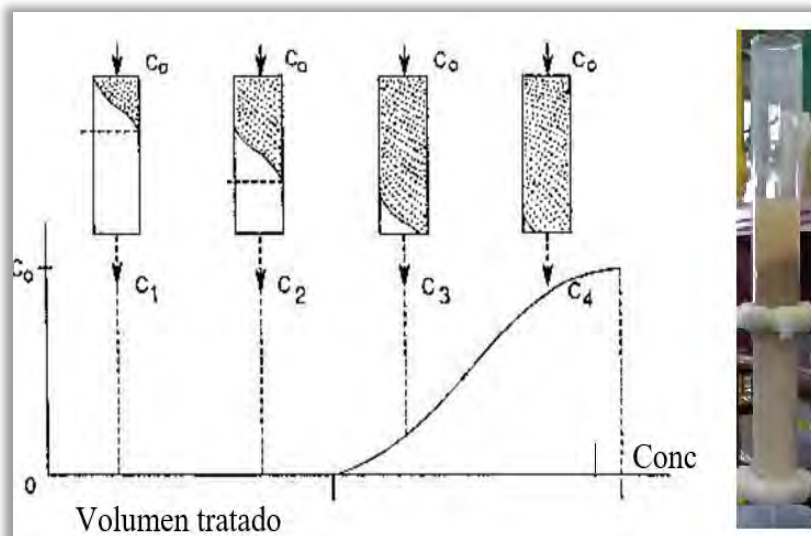


Figura 21. Relación del volumen gastado de extracto con respecto a la concentración absorbida.

Fuente: Farooq *et al*, 1990.

5.4.3. Adsorción en sistemas intermitentes o por lotes

La recuperación de un soluto por adsorción también puede realizarse en sistemas intermitentes (lecho suspendido de adsorbente) poniendo en contacto el adsorbente con la fase líquida en vasos de precipitado a una temperatura dada y un nivel de agitación controlado. Después de un tiempo de contacto establecido pueden utilizarse parámetros cualitativos para determinar la saturación del adsorbente (Farooq *et al*, 1990).

5.4.4. Modelado matemático para la adsorción – desorción de ácido ferúlico y vainillina

La isoterma de adsorción es la relación de equilibrio entre la concentración en la fase fluida y la concentración en las partículas de adsorbente a una temperatura determinada. Los datos de las isotermas, permiten conocer la cantidad de materia que puede adsorber un gramo de adsorbente. Entre los diferentes tipos de isotermas tenemos: la isoterma lineal que pasa por el origen de coordenadas y la cantidad adsorbida (q_{ads} , g/g_{resina seca}) es proporcional a la concentración en el fluido. Las isotermas que son convexas hacia arriba se denominan favorables, debido a que puede obtenerse una carga relativamente elevada del sólido para una baja concentración en el fluido. El caso límite de una isoterma muy favorable es la adsorción irreversible, donde la cantidad adsorbida es independiente de la disminución de concentración hasta valores muy bajos. Una isoterma que es cóncava hacia arriba recibe el nombre de desfavorable debido a que se obtienen cargas del sólido relativamente bajas ya que conducen a largas zonas de transferencia de materia en el lecho. La [Figura 22](#) ilustra el comportamiento gráfico entre la carga de adsorbato en función de la concentración de la solución, para cada tipo de isoterma. (McCabe *et al*, 2014)

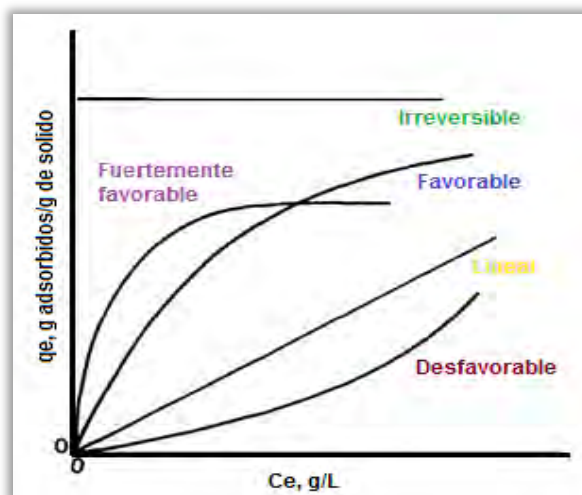


Figura 22. Tipos de isotermas de adsorción. Fuente: McCabe *et al*, 2014

La capacidad de adsorción del adsorbente para un soluto específico corresponde a la cantidad adsorbida alcanzada en una solución saturada. En los sistemas por lotes, la cantidad de soluto que desaparece de la solución se adsorbe en el adsorbente. Por lo tanto, la capacidad de adsorción se puede acceder a través de un balance de materia:

$$q_e = \frac{(C_{alim} - C_e)V}{W}$$

donde q_e (g/g_{resina seca}) es capacidad de adsorción, C_{alim} (g/L) y C_e son concentraciones iniciales del soluto en la solución y de equilibrio del soluto en la solución (g/L) respectivamente, V (L) es el volumen de la solución inicial y W (g) el peso de la resina seca.

La isoterma de Freundlich (Freundlich, 1909) es una ecuación empírica que describe la adsorción en superficies heterogéneas que conduce a un mejor ajuste, especialmente para la adsorción a partir de líquidos. Este modelo supone la existencia de diferentes energías de adsorción se agrupan en parches de la misma magnitud, que son independientes y no interactúan unos con otros (Duong, 1998) expresándose por la siguiente ecuación:

$$q_e = K_L C_e^{1/n}$$

Donde K_F ((g/g_{resina seca}) (L/g)^{1/n}) es la constante indicativa de la capacidad relativa del adsorbente para la isoterma de Freundlich y n es el exponente Freundlich (adimensional). Cuando n es mayor que 1 indica una adsorción favorable. K_F y n son constantes empíricas que indican la curvatura y pendiente de la isoterma. Cada parámetro de isothermas se puede determinar por ajuste de los datos por mínimos cuadrados a través de minimizar la suma de los residuales al cuadrado entre los puntos de datos experimentales y los valores estimados.

5.4.4.1. Ajuste de curvas de ruptura experimental

La transferencia de masa efectiva entre el fluido (fase líquida) y el sólido se describe en el modelo de fuerza motriz lineal o motor lineal (FML), la cual asume la adsorción isotérmica de equilibrio entre el fluido y las fases sólidas, el flujo de tapón con dispersión axial, la porosidad constante de lecho y no hay gradientes radiales dentro del lecho (Glueckauf, 1947), donde se incluye el balance de masa para la fase líquida. (Abková *et al*, 2007). La ecuación de balance de masa de la especie "i" ya sea ácido ferúlico o vainillina en la fase líquida en un elemento de volumen del lecho y se define por la siguiente ecuación:

$$D_{ax} = \frac{\partial^2 C_i(z, t)}{\partial z^2} - u_i \frac{\partial C_i(z, t)}{\partial z} - \frac{\partial C_i(z, t)}{\partial t} - \left(\frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \right) f_h \rho_{app} \frac{\partial q_i(z, t)}{\partial t} = 0$$

Donde, D_{ax} (m^2/min) es el coeficiente de dispersión axial, C_i (g/L) es la concentración en la fase fluida a granel para la especie i , u_i es la velocidad intersticial (m/min), q_i ($g/g_{resina\ seca}$) es la concentración de la fase adsorbida promedio de las especies ' i ' en las partículas adsorbentes, z (m) y t (min) son las variables de posición y tiempo axiales, respectivamente, e « i » se refiere al soluto estudiado. Las condiciones de contorno de Danckwerts definen las condiciones de contorno de la ecuación de balance de masas:

$$z = 0 \rightarrow D_{ax} \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} \Big|_{z=0} = u_i [C(0, t) - C_0], \quad z = L \rightarrow \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} \Big|_{z=L} = 0$$

El modelo estima la contribución de las resistencias de transferencia de masa, tomando en cuenta un perfil de concentración parabólica dentro de una partícula esférica, que indica que la velocidad de adsorción es proporcional a la fuerza motriz (diferencia entre la concentración de fase adsorbida en equilibrio con la concentración de líquido a granel y la concentración media de fase adsorbida en la partícula) siendo necesario para alcanzar el equilibrio:

$$\frac{\partial q_i(z, t)}{\partial t} = k_{LDF} [q_i^*(z, t) - q_i(z, t)]$$

Donde, q_i^* ($g/g_{resina\ seca}$) es la concentración de la fase adsorbida en equilibrio con la concentración mayor en un momento determinado y la posición y k_{FML} (min^{-1}) es la constante de motor lineal de velocidad cinética.

$$k_{LDF} = \frac{\Omega D_{pe,i}}{f_h \rho_{app} r_p^2 \frac{dq_i^*}{dC}}$$

Donde, r_p (m) es el radio de la partícula adsorbente, $D_{pe,i}$ (m^2/min) es la difusividad de poro efectivo, Ω (adimensional) es el factor de FML igual a 15 para partículas esféricas, dq_i^*/dC_i es la pendiente de la isoterma de equilibrio de adsorción y q_i^* ($g/g_{resina\ seca}$) es la concentración adsorbida de la fase en equilibrio con la concentración mayor en el tiempo t en la posición axial z (Abková *et al*, 2007). los coeficientes de transferencia de masa se calculan utilizando la pendiente de la cuerda ($\Delta q/\Delta C$). La dispersión axial en el lecho de relleno se calcula mediante la siguiente expresión, utilizando el número de Peclet (adimensional) reportado (Guiochon, 2006).

$$Pe = \frac{u_i L_b}{D_{ax}}$$

La difusividad efectiva de poro $D_{pe,i}$ (m^2/min) se calculó por la siguiente expresión:

$$D_{pe,i} = \frac{\varepsilon_p D_{m,i}}{\tau}$$

Donde, $D_{m,i}$ (m^2/min) es la difusividad molecular del soluto 'i' en el disolvente y τ es el factor de tortuosidad (Smith, 1981), que corresponde a la inversa de la porosidad de las partículas, ε_p (L_{poro}/L_{part}). $D_{m,i}$ para cada soluto por la correlación (Wilke y Chang, 1955):

$$D_{m,i} = 4.44 \times 10^{-10} \frac{T \sqrt{\phi M}}{\mu V_{m,i}^{0.6}}$$

Donde, ϕ (adimensional) es el factor de asociación del disolvente, que representa las interacciones soluto-disolvente con un factor de asociación de 2.6 cuando el disolvente es agua, M (g/mol) es el peso molecular del disolvente, μ (cP) es la viscosidad del disolvente, $V_{m,i}$ (cm^3/mol) es el volumen molar de soluto en su punto de ebullición normal estimada por el método aditivo sencillo (Partington, 1949). El tiempo estequiométrico experimental ($t_{st,exp}$, min) se determina (Ruthven, 1984), para el flujo de alimentación constante:

$$t_{st,exp} = \int_0^{\infty} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt$$

Donde, C_0 (g/L) es la concentración de soluto en la entrada de la columna, C (g/L) es la concentración de soluto en la salida de la columna para el tiempo t (min). El $T_{st,exp}$ puede ser calculado por el área debajo de la gráfica $1 - C/C_0$ vs tiempo y la integral se calcula aplicando la regla trapezoidal. El tiempo estequiométrico experimental se compara con el teórico ($t_{st,teor}$, min) estimado con el equilibrio de modelo de isoterma de Freundlich obtenido de la siguiente manera (Rodrigues, 1989):

$$t_{st,teor} = \frac{L_b}{u_i} \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \right) \left(\frac{q_e \rho_{app} f_h}{C_0} \right) \right]$$

Donde q_e (g/ g_{resina seca}) es la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso seco de adsorbente en equilibrio con C_0 , ρ_{app} (g_{resina húmeda} / L_{resina húmeda}) es la densidad aparente de la partícula y f_h (g_{resina seca} / g_{resina húmeda}) es la relación de masas de la partícula seca y de la partícula húmeda, ε_B es la porosidad del lecho, L_b (m) es la longitud de la cama y u_i (m/min) es la velocidad intersticial que es calculada como (Guiochon, 2006):

$$u_i = \frac{Q}{A \varepsilon_b}$$

Donde Q (m^3/min) es la tasa de flujo o caudal proveniente de unidades en mL/min y A (m^2) es el área de la sección transversal de la cama. La cantidad adsorbida experimental del

adsorbato (Ácido ferúlico o Vainillina) ($q_{ads, exp}$, g/g_{resina seca}), se calcula con la siguiente expresión:

$$q_{ads,exp} = \frac{QC_0 t_{st,exp}}{V_b(1 - \varepsilon_b)\rho_{app}f_h} - \frac{\varepsilon_b C_0}{(1 - \varepsilon_b)\rho_{app}f_h}$$

Donde V_b (m³) es el volumen de lecho. El estudio de adsorción-desorción se realiza con los perfiles de concentración y se cuantifican como se describe en la sección anterior. La cantidad desorbida experimental (q_{des} , g/g_{resina seca}) se calcula con la siguiente ecuación:

$$q_{des} = \frac{\int_0^t Q dt}{V_b(1 - \varepsilon_b)\rho_{app}f_h} - \frac{\varepsilon_b C_0}{(1 - \varepsilon_b)\rho_{app}f_h}$$

El modelo de ecuaciones, es resuelto numéricamente con Algebra FX 2.0 plus, usando uno de sus solucionadores integrados, y discretizando el dominio axial utilizando el método de colocación ortogonal en elementos finitos de segundo orden en cada elemento.

5.5. Síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina

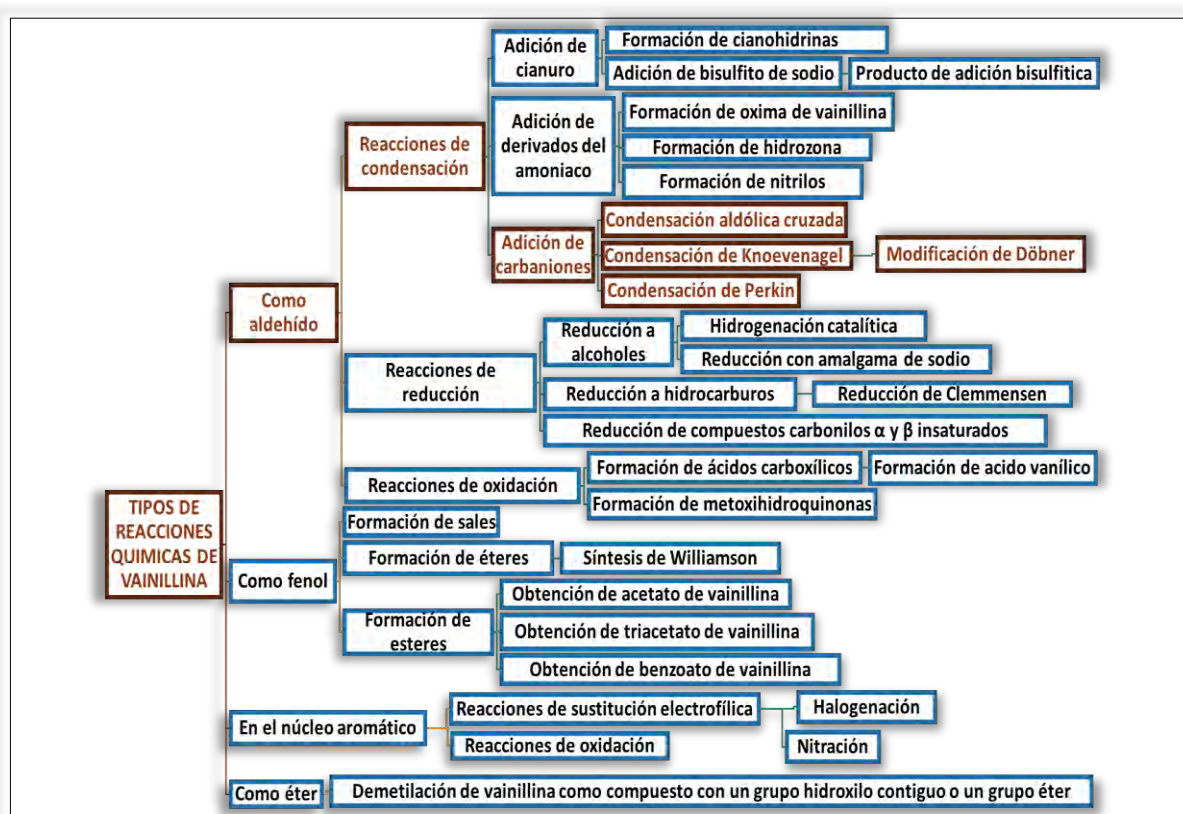


Figura 23. Tipos de reacciones químicas de la vainillina, una de estas reacciones empleada en este trabajo es la condensación del grupo funcional aldehído. Fuente: Elaboración propia.

La vainillina, debido a su estructura molecular, puede actuar como un aldehído, un fenol, un anillo aromático o como un éter, dependiendo del grupo funcional que se trate (Figura 23), (Chavarría, 2007). La síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina se puede comprender mejor a partir de reacciones de condensación, las cuales son aquellas que se llevan a cabo entre dos compuestos (formación de enlaces C-C) y tienen el grupo funcional carbonilo dentro de su estructura (C=O). Involucran una combinación de dos procesos, una adición nucleofílica y una sustitución. En estas, un reactante (el nucleófilo) es convertido a su ion enolato y sufre una sustitución por reaccionar con el otro reactante, el cual sufre una reacción de adición (Figura 33) (IUPAC Compendium of Chemical, 2017).

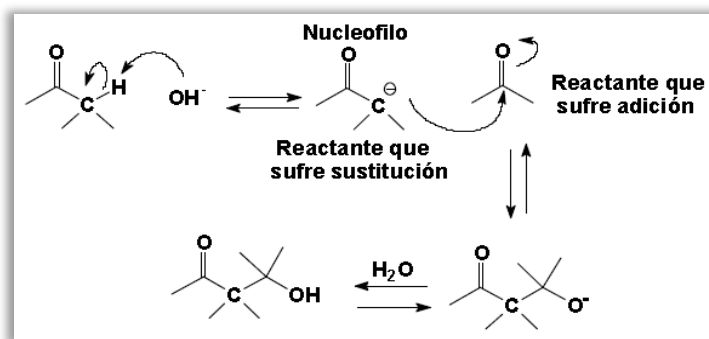


Figura 24. Reacción general de condensación química Fuente: Bermúdez, 2010.

De las reacciones que permiten generar enlaces C-C y que utilizan carbaniones estabilizados por un grupo acilo para unirlos a aldehídos están, las condensaciones de Knoevenagel, con modificación de Döbner (condensaciones malónicas) y la de Perkin, que pueden utilizarse para la obtención de ácidos α , β - insaturados, así como ésteres. La reacción de Knoevenagel es una reacción de sustitución nucleofílica, que resulta de la condensación entre un grupo metileno activo del éster o ácido y un aldehído (alifático o aromático). Al igual que toda condensación aldólica, esta reacción se produce por el ataque de un carbanión que se forma por la separación de un H- α , con respecto al carbonilo del grupo funcional aldehído, que se activa por la presencia del carbonilo (del éster o ácido). La base que se usa como catalizador es de origen orgánico como la dietilamina, la piridina o la piperidina (De la Cruz *et al*, 1996; El Khatib *et al*, 2007). El mecanismo de reacción de la Condensación de Knoevenagel es complejo porque presenta varios procesos intermedios de transposiciones (Kerrigan, 2001).

5.6.2. Promiscuidad enzimática en la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina.

La síntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina se puede comprender mejor a partir del comportamiento de ciertas enzimas. Las enzimas, como resultado de una larga

evolución, muestran una gran eficiencia y selectividad. A parte de las mejoras en la eficiencia y selectividad de los biocatalizadores cabe destacar su biodegradabilidad y utilidad para catalizar un amplio espectro de reacciones (promiscuidad catalítica). Por otra parte, las condiciones suaves de presión y temperatura que se utilizan en las biotransformaciones, evitan la aparición de reacciones colaterales indeseadas (recemizaciones, epimerizaciones o transposiciones) que perjudicarían la economía del proceso. En síntesis orgánica, las reacciones enzimáticas son una herramienta eficiente y verde debido a su alta selectividad, condiciones suaves y uso potencial de los recursos regenerables de bajo costo (Jian-Ping Fu *et al*, 2013).

En este contexto se engloba el concepto de “*promiscuidad*” de las enzimas, referido a la capacidad de estos biocatalizadores de llevar a cabo diferentes transformaciones químicas sobre un amplio número de sustratos, naturales o no (Bornscheuer *et al*, 2004). Se establecen tres tipos de *promiscuidad* enzimática (Figura 25), debidas a: i) las condiciones de reacción (promiscuidad condicional), ii) la variedad de sustratos (promiscuidad del sustrato) y iii) la actividad catalítica de la enzima (promiscuidad catalítica) (Hult y Berglund, 2007; Piedrafita, Keller y Ralser, 2015).

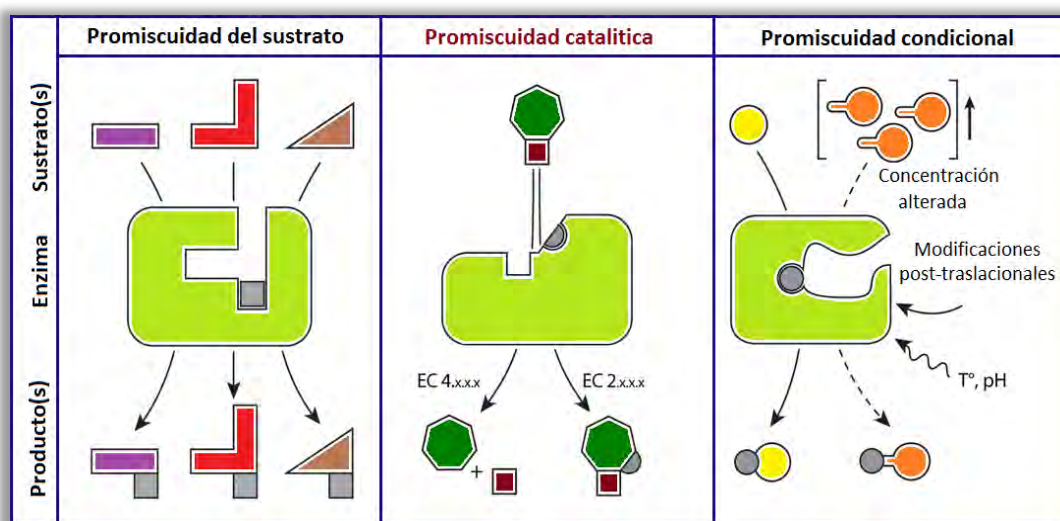


Figura 25. Clasificación mecánica de la promiscuidad enzimática.

(Modificado de Piedrafita, Keller y Ralser, 2015).

En el primer tipo, se incluye la capacidad de muchas enzimas de presentar actividad en su medio no convencional, como es el caso de las lipasas en disolventes orgánicos. El segundo tipo de promiscuidad, se refiere al amplio rango de sustratos que pueden ser aceptados por las enzimas. El mecanismo de acción sobre estos sustratos es similar en todos ellos,

formándose un estado de transición equivalente al que se formaría con un sustrato natural. En este grupo, también se incluyen aquellos mutantes con los que se han obtenido enzimas capaces de tolerar un mayor número de sustratos que la enzima nativa, o con estereoselectividad opuesta, como en el caso de la lipasa de *Cándida antártica*, isoforma B (CALB) (Magnusson *et al*, 2005), pasando a ser *S*-selectiva en lugar de *R*-selectiva (Reetz *et al*, 2007). El último tipo de *promiscuidad* enzimática, se refiere a la capacidad del sitio activo de las enzimas de catalizar más de una transformación química. Algunos investigadores han desarrollado otro tipo de reacciones, mediante el aprovechamiento de la maquinaria catalítica de las lipasas (Torres *et al*, 2004).

5.6.2.1. Hidrolasas en la síntesis química

Las hidrolasas son una herramienta ideal para la aceleración de transformaciones sintéticas debido a su alta estabilidad, eficiencia catalítica, disponibilidad comercial y amplia especificidad de sustrato en una gran variedad de procesos biocatalizados. En los últimos años, han aparecido reacciones no convencionales catalizadas por enzimas hidrolíticas, como las lipasas y acilasas que son biocatalizadores promiscuos que muestra buenos niveles de reactividad en la formación de enlaces C-C, la formación del enlace C-heteroátomo, los procesos oxidativos, y novedosas reacciones hidrolíticas (Busto y Gotor 2010).

Las hidrolasas poseen amplia estabilidad, buena gama de compatibilidad de sustrato y una alta eficiencia en la formación de varios enlaces químicos. Se han utilizado para catalizar adicciones de Michael, adicciones de Markovnikov, reacciones directas de Mannich y reacciones de Henry, entre las hidrolasas más importantes tenemos las lipasas, proteasas y neutrasas (Jian-Ping Fu *et al*, 2013). Las hidrolasas de mayor interés están representadas por las enzimas proteolíticas, que representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan. Las industrias que aplican enzimas para sus productos invierten anualmente cerca de un billón de dólares, de las cuales el 75% son enzimas hidrolíticas. Las proteasas representan el 60% de total de las ventas mundiales (Barrett *et al*, 2004).

La mayoría de estas enzimas proviene de fuentes microbianas, pero varias proteinasas vegetales tales como papaína (pepsina cisteinica de gran interés en procesos biocatalíticos), bromelaína y ficina siguen siendo preferidas en un gran número de procesos. Sin embargo, el número de proteasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es aún muy bajo (Trejo, 2005).

5.6.2.2. Reacciones de origen aldólico catalizadas por hidrolasas

La reacción aldólica es una poderosa estrategia de síntesis para la construcción de nuevos enlaces C-C. Hay muchos informes sobre reacciones aldólicas enantioselectivas catalizadas por pequeñas moléculas orgánicas y complejos metálicos. Se han reportado con éxito algunas reacciones aldólicas catalizadas directamente por hidrolasas (Wang *et al*, 2008). Se ha utilizado el mutante CAL-B (lipasa de *Cándida antártica*) para catalizar adiciones aldólicas y también se ha informado de reacciones aldólicas asimétricas catalizadas por lipasas en acetona "húmeda". Recientemente, han reportado reacciones aldólicas asimétricas catalizadas por p1 nucleasa de *Penicillium citrinum*, proteasa alcalina de *Blicheniformis*, quimopapaína de *Carica papaya*, y proteasa ácida de *Aspergillus usarii*, respectivamente. Sin embargo, hasta ahora, la gama de donantes aldólicos se ha mantenido estrecha en las reacciones aldólicas de hidrolasas catalizadas. También se ha reportado que la lipasa de páncreas porcina cataliza reacciones aldólicas de aldehídos aromáticos y cetonas heterocíclicas, otros ejemplos está en las reacciones aldólicas asimétricas catalizadas directamente por hidrolasas de cetonas heterocíclicas con aldehídos en medio orgánico. Algunas proteinasas de cisteínas de las plantas, como la papaína, ficina y bromelaina se han explotado comercialmente en la industria alimentaria para enternecer la carne, elaboración de la cerveza y la cocción de galleta, así como la producción de hidrolizados de proteínas. Se sabe que este tipo de enzimas muestran promiscuidad catalítica para catalizar las reacciones aldólicas asimétricas directas de nitrógeno, oxígeno o azufre que contienen cetonas heterocíclicas con aldehídos en medio orgánico (Jian-Ping *et al*, 2013).

6. MATERIAL, INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO

6.1. Material

Material biológico:

- Nejayote.
- Residuos de vainas de vainilla.
- Pimienta negra.
- Enzimas: Papaína, Lipasa de ricino y pepsina de cerdo, entre otras hidrolasas liofilizadas o inmovilizadas disponibles en el laboratorio.

Reactivos:

- Ácido ferúlico (99%, Sigma Aldrich).
- Vainillina (99%, Sigma Aldrich).
- Ácido clorhídrico concentrado (97%, Sigma Aldrich).
- Ácido acético concentrado (99%, Sigma Aldrich)
- Hidróxido de sodio (Merck).
- Acido malónico (Sigma Aldrich)
- Catalizadores: Piperidina, trietilamina, citrato de amonio dibásico, dicitohexilcarbodiimida, óxido de calcio. (Sigma-Aldrich, sin purificación adicional).

Solventes:

- Acetonitrilo (grado HPLC).
- Acetato de etilo.
- Acetona.
- Agua destilada.
- Alcohol etílico.
- Diclorometano.
- Hexano.
- Dioxano (Merck)
- Metanol (grado HPLC).
- Piridina (Sigma-Aldrich).

Adsorbentes:

- Amberlita Amberlite XAD-7HP (Sigma-Aldrich)
- Gel de sílice 60 (Merck) para cromatografía en columna
- Gel de sílice 60 GF 254 para la CCF.
- Sepabeads SP825: estireno divinilbenceno (Mitsubishi Chem. Corp),

Reveladores para capa fina:

- Solución de sulfato cérico (sulfato cérico 12.5 g, 350 g de hielo y 22.1 mL de H₂SO₄)
- Solución metanólica de DPPH (0.1 g de DPPH y 50 mL de metanol).

6.2. Instrumentación

- Agitador magnético con plancha de calentamiento.
- Canastilla de calentamiento.
- Columna de adsorción 6 cm x 60 cm
- Embudo Buchner con papel filtro Watman No 4.
- Embudo de separación de 2 L.
- Matraz bola de 250 mL.
- Matraces de 4 L.
- Micropipeta semiautomáticas: rango de operación: 100 µL – 1 000 µL.
- Puntas para micropipeta: rango de operación: 100 – 1000 µL.
- Quitazato de 500 mL.
- Matraces volumétricos graduados de 25 - 100 mL.
- Matraces volumétricos de 10 mL
- Refrigerante de vidrio con uniones esmerilados.
- Reóstato 300 W.
- Vasos de precipitación de 50 - 500 mL.
- Soportes universales y anillos.

6.3. Equipo

- Agitador orbital Thermo Scientific MaxQ-4000.
- Aparato Fisher.

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus con precisión de 0.0001 mg.
- Centrifuga Eppendorf S810-R 15 Amp.
- Espectrofotómetro Agilent technologies Cary 60 UV-Vis, equipado con:
 - Una celda de cuarzo de 1 cm.
 - Software Cary 60 Scan Simple Reads.
- Licuadora Krups GL4100.
- Sonicador Cole-Parmer 8892.
- Revelador UV de cromatoplasmas.
- Sistema HPLC Waters equipado con:
 - un desgasificador en línea.
 - una bomba binaria Waters 1525.
 - automuestreador Waters 2707.
 - detector de absorbancia UV dual Waters 2487.
 - columna analítica: Waters Symmetry C18 5 μm (3.9x150 mm).
 - Software: Empower.
 - Filtros preparativos Millipore.
 - Viales de 2 mL con tapa de plástico de inyección directa.
- Rotavapor Büchi R-210

7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1. Descripción experimental del proceso de recuperación de ácido ferúlico



Figura 26. Procedimiento teórico-experimental en la obtención de ácido ferúlico.

Fuente: Elaboración propia.

7.1.1. Tratamiento del Nejayote

Se colocan 20 L de nejayote (pH= 10) en un recipiente, (procedente de un molino de nixtamal al sur de la ciudad de México). Enseguida se filtra con un dispositivo que consiste en un embudo Buchner con un papel filtro Watman No 4 y sobre este una cama de celita seca con una altura de 1 cm. El nejayote se hace pasar a través de dicho dispositivo para eliminar las cascarillas y la biomasa proveniente de la hidrólisis del maíz. Posteriormente se reduce el hidrolizado con HCl a pH= 3, (6-10 mL de ácido por cada litro de nejayote) con el objetivo de acidificarlo y recuperar el ácido ferúlico, la proporción a usar es de 10 mL de ácido por cada litro de nejayote. En la Figura 26 se muestra el procedimiento teórico – experimental.

7.1.2. Estudio de adsorción-desorción por lotes de ácido ferúlico

El procedimiento consiste en adicionar 20 g de resina Amberlite XAD-7HP como adsorbente por cada litro de nejayote. Se agita y se filtra la resina mediante manta de cielo y con ayuda del vacío, se deja por un tiempo en el embudo de filtración para eliminar la mayor cantidad de agua posible. La solución ácida se neutraliza con NaOH y se desecha por el drenaje. Se filtra para separar el solvente cargado de la resina, se devuelve la resina al matraz y el volumen final de acetato de etilo cargado se destila al vacío con ayuda de un rotavapor a no

más de 40 °C. El extracto seco entonces, puede ser purificado ya sea por cristalización o mediante columna cromatográfica.

7.1.3. Estudio de adsorción-desorción en columna de ácido ferúlico

Esta se realiza pasando por una columna empacada de 60 cm de longitud por 6 cm de diámetro interno con amberlita XAD-7HD el nejayote tratado (1:7 en relación con el nejayote con ácido ferúlico), El nejayote se vierte a la columna de manera manual apoyándose de un embudo de separación de 2 L, de tal manera que su caudal sea constante (3.6 mL/min) a temperatura ambiente y concentración de alimentación de acuerdo a la capturada de aprox. 0.7 g/L. De este modo la columna se alimenta con el nejayote y se recogen muestras en la salida de la columna, posterior al proceso de adsorción, se desorbe con acetato de etilo para extraer el ácido ferúlico de la columna. Se cuantifica mediante espectrofotometría UV-Vis. y se hacen los cálculos respectivos referentes a las isothermas empleadas y a su cinética de adsorción y desorción (ver modelado matemático de adsorción). Finalmente se recupera la amberlita de la columna y lava con diclorometano (24 h, 200 rpm), se deja secar a temperatura ambiente y se lava con EtOH (24 h), Se vuelve a secar la resina a temperatura ambiente, y se lava con 50 mL de NaOH 2M y neutraliza con HCl 2M.

7.1.4. Purificación del ácido ferúlico a través de una columna cromatográfica

Después de realizar el proceso de adsorción por medio de la resina, se determina el procedimiento para la purificación del ácido ferúlico e identificación de algunas de sus impurezas o residuos, en que se prepara una columna cromatográfica, para ello la columna se tapa con un algodón en la zona de vertido y se empaca con celulosa, la cantidad de celulosa que se utiliza es en función de la cantidad de extracto obtenido de la recuperación y/o extracción; la relación es de 200 g de celulosa/4 g extracto. Los eluyentes utilizados son hexano:diclorometano (1:1). 4 g del extracto seco se disuelve en 25 mL de acetona (la muestra se seca con celita para obtener un sólido y permitir que la muestra se desplace por la columna lo más homogéneamente posible). Una vez que se forma el sólido se incorpora a la columna cromatográfica. Se hacen pasar 800 mL del par de eluyentes de la mezcla 1:1 de hexano:diclorometano. Se adicionan 25 g de celulosa a la muestra con acetona y se empaca la muestra a la columna. Posteriormente se hacen pasar 700 mL de hexano:diclorometano de la mezcla 3:7. Después se hace pasar 1.4 L de hexano:diclorometano. Después, se hace pasar 800 mL de acetona y por ultimo 900 mL de

etanol, obteniéndose así las diferentes fracciones. Se concentran las fracciones colectadas en el rotavapor, con una temperatura del baño de 60 °C y 150 rpm. Se recrystaliza el ácido ferúlico a partir de las fracciones en donde se detecta la mayor cantidad de ferúlico por CCF.

7.1.5. Cristalización del ácido ferúlico

Para las cristalizaciones primero se realizan extracciones líquido – líquido con 30 mL de muestra de ácido ferúlico impuro obtenido de la adsorción – desorción (fase acuosa). Se ejecutan tres diferentes extracciones: con diclorometano (2x25), otra con acetato de etilo (2x25) y fase acuosa más 30 mL de acetona y 48 horas después se realiza decantación de xilanos. La metodología de la extracción líquido-líquido proviene de la adaptación de patente: Proceso para la recuperación de ácido ferúlico. WO 2004110975 A1, así como la patente americana No 6,143,543. Para un proceso de cristalización ya con un grado de pureza alto de ácido ferúlico se disuelve en la mínima cantidad de agua caliente (5 mL/ 0.5g), ya disuelto, se comienza a evaporar el agua hasta que el volumen final sea la mitad del volumen inicial (la evaporación del agua debe ser lenta y no sobrepasar los 40°C). Se deja en reposo durante 24 horas para obtener los cristales de ácido ferúlico.

7.1.6. Identificación por cromatografía en capa fina de ácido ferúlico

Se disuelve en un vial aproximadamente 50 mg de cada extracto rico en ácido ferúlico en 2 mL de acetato de etilo. En una placa de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria se aplican los extractos con ayuda de un capilar para ser comparados con la referencia (estándar de ácido ferúlico). Para el caso de los extractos, la fase móvil es cloroformo:metanol (9:1) con una gota de ácido acético para mejorar la resolución en las placas. Los reveladores son sulfato cérico o DPPH, los cuales son esparcidos sobre las placas y secados sobre una plancha, para su identificación.

7.1.7. Cuantificación del ácido ferúlico por espectrofotometría

El método para la cuantificación del ácido ferúlico se basa en la capacidad que tiene el compuesto para absorber en la región UV. En primera instancia, se realiza un barrido del espectro de luz en la región de 200 nm a 400 nm y se determina que la longitud de onda adecuada para la cuantificación de ácido ferúlico en agua es de 380 nm.

Construcción de la curva patron: Una vez seleccionada la longitud de onda, se pesan diferentes cantidades del estándar de ácido ferúlico: 56.00, 36.00, 28.75, 23.00, 18.40, 14.70,

11.75, 9.35 y 7.50 mg, diluirlas en agua desionizada y aforar usando matraces de 50 mL, se sónica por 5 min, se toman lecturas de absorbancia a 380 nm contra un blanco de agua desionizada. Todo lo anterior se obtiene por triplicado, se sacan los promedios y se traza la gráfica de concentración contra absorbancia para obtener la ecuación de la recta (Anexo).

Preparación de la muestra: En matraces con aforo de 50 mL se diluyen aproximadamente 50 mg de cada extracto obtenido de las muestras de nejayotes, se afora con agua desionizada y se sónica por 5 minutos. Al cabo de ese tiempo se toma la absorbancia de cada una de ellas contra el blanco de agua desionizada e interpola en la curva patrón para obtener la concentración.

7.1.8. Cuantificación del ácido ferúlico por HPLC

Construcción de la curva patrón: la curva se construye diluyendo ácido ferúlico grado HPLC en metanol grado HPLC, en concentraciones de 0.2 mg/mL, 1 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL y 7 mg/mL, cada una por separado y aforando a 1 mL, se sónica por 5 minutos y cada una se inyecta por triplicado. Se saca el promedio de cada área bajo la curva dada por el programa de Excel de cada punto y se gráfica en contra de la concentración. Se obtiene la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación (Anexo).

Preparación de la muestra: Se pesan 5 mg de cada uno de los extractos secos, se afora a 1 mL con metanol grado HPLC, se sónica por 5 minutos e inyecta por triplicado en las condiciones cromatográficas abajo descritas. Para los casos de identificación de los extractos de la extracción convencional de ácido ferúlico e identificación de impurezas se toman 100 μ L de muestra y se diluyen en 300 μ L de metanol y se aplican 0.3 μ L y se lee en HPLC. Para el caso de la adsorción de ácido ferúlico el procedimiento consiste en tener una solución de concentración conocida de ácido ferúlico y añade cantidades de adsorbente, se mide en HPLC la cantidad de ácido ferúlico residual en la mezcla y se determina por balance de materia la cantidad de sustancia adsorbida.

Condiciones cromatográficas: Fase Móvil (eluyente): A: Ácido acético 1% y B: Metanol (100 % v/v). Volumen de bucle de inyección o de muestra inyectada: 20 μ L. Longitud de detección en el detector de UV se fijó en: 380 nm. Los cromatogramas se realizan a temperatura ambiente y un flujo de 0,9 mL min⁻¹ en una elución por gradientes (Tabla 8). Se identifica la muestra de ácido ferúlico con base al tiempo de retención del ácido ferúlico estándar y se determina el rendimiento del área bajo la curva del ácido ferúlico de las

muestras. Cabe mencionar que la metodología empleada para la identificación y cuantificación de ácido ferúlico es la misma para la vainillina dado su identificación en el rango de detección en 348 nm, incluyendo sus respectivas reacciones de conversión químico y enzimática de vainillina a ácido ferúlico.

Tabla 8. Método por gradientes para identificación de ácido ferúlico.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
0	90	10
5	85	15
10	80	20
12.5	75	25
15	70	30
20	65	35
23	60	40

A: Ácido acético 1% v/v

B: Metanol 100 % v/v

7.2. Descripción experimental del proceso de recuperación de vainillina

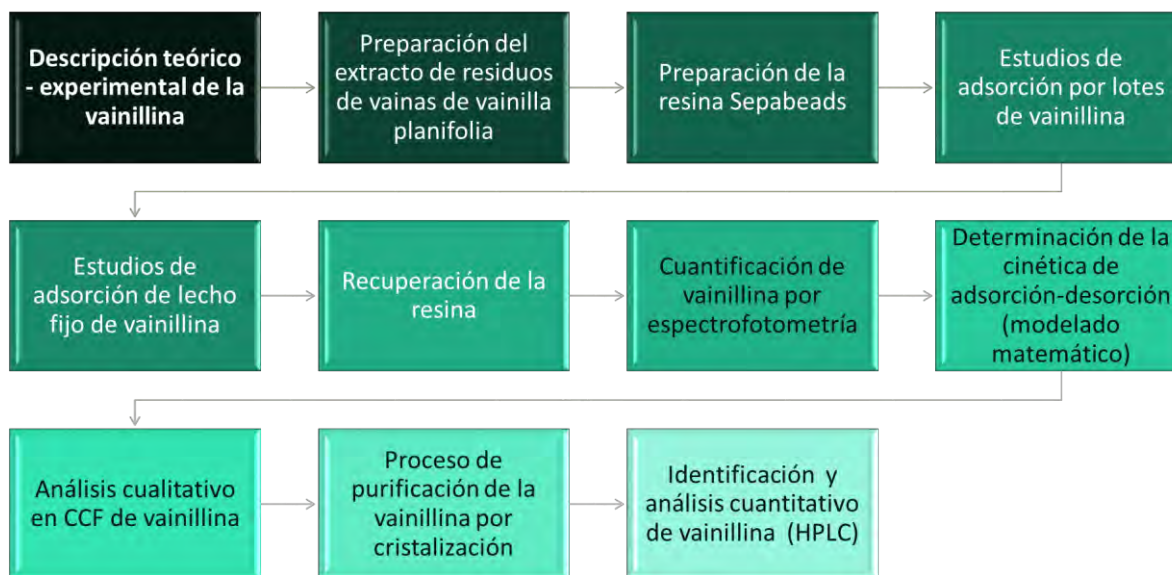


Figura 27. Metodología propuesta en la obtención de vainillina de residuos de vainas de vainilla.

Fuente: Elaboración propia.

7.2.1. Preparación del extracto de residuos de vainas de vainilla planifolia

Se emplean 400 g de residuos de vainas de vainilla (procedente de la región de noroeste de Puebla pegado a Veracruz) cortados a un tamaño aproximado de 4 mm X 4 mm. Después se procede a moler en la licuadora para obtener un polvo fino. Ya molidos los residuos de

vainas de vainilla se colocan en 4 matraces de 1 litro, 100 g por cada matraz. Se agrega hasta la marca del matraz 1000 mL de disolución etanol-agua (50:50, % V/V), posteriormente se introducen los matraces en un sonicador a una temperatura constante de 60 °C durante 60 minutos. Los extractos ya sonicados se centrifugan durante 45 minutos a 3000 rcf de velocidad y 4 °C, luego de centrifugar los residuos se separan del extracto por decantación y filtrado al vacío. En la [Figura 27](#) se muestra el procedimiento teórico – experimental.

7.2.2. Preparación de la resina Sepabeads

Los experimentos de adsorción y desorción se realizan con un adsorbente polimérico macroporoso Sepabeads SP825 utilizándose los estudios de por lote y lecho fijo. La resina es ya caracterizada por el proveedor y en diversas literaturas. Para fines prácticos en este trabajo solo se limita al empleo de los parámetros ya reportados como: la densidad aparente de la partícula o del adsorbente húmedo (1012 g/L), el % del contenido de humedad (68.2 %), el volumen de poros (2.05 mL/g), el promedio de la porosidad de las partículas (0.73 $L_{\text{poro}}/L_{\text{part}}$), el promedio de tamaño de partícula (483 μm), el área superficial específica (1160 m^2/g) y el promedio de radio de poro (35 Å). Estos valores sirven para el cálculo de las respectivas isothermas de adsorción teóricas en comparación con las experimentales.

Antes de iniciar los experimentos de adsorción – desorción, la resina se lava para eliminar cualquier contaminante o monómerosantes. Se utiliza una proporción de volumen de lecho, a temperatura ambiente. Inicialmente, la resina se aclara con agua desionizada y se coloca en un agitador orbital a 160 rpm durante aproximadamente 0,5 h. Esta etapa se repite una vez más. Después, la resina se lava con metanol y se coloca en el agitador orbital a 160 rpm con metanol durante aproximadamente 0,5 h. El metanol se sustituye por metanol acidificado (0,1% de ácido fórmico) y se agita a 160 rpm durante 0,5 h. Después, la resina se enjuaga con agua y se añade agua acidificada (0,1% de ácido fórmico). La mezcla se agita durante 0,5 h y esta etapa se repite dos veces con agua desionizada (Mota *et al*, [2016](#)).

7.2.3. Estudios de adsorción de vainillina por lotes

Para los experimentos por lotes para los extractos de vainilla (con 40 mL etanol-agua al 50 % en v/v, de aprox. 4 g/L del compuesto). Se utilizan diferentes cantidades de adsorbente para los diversos lotes: 6 g, 10 g, 14 g, 16 g, 18 g y 20 g de peso seco. Las muestras de lotes se agitan en un agitador orbital durante 12 horas a temperatura ambiente, con el fin de asegurar que se cumpla el equilibrio de adsorción en cada adsorbente. Se filtra cada muestra

para separar el solvente cargado de la resina, se devuelve la resina al matraz y el volumen final cargado es destilado al vacío con ayuda de un rotavapor a no más de 40°C. El extracto seco entonces, puede ser purificado, ya sea por cristalización o mediante columna cromatográfica. Por último, se cuantifica por espectrofotómetro UV-Vis. El pH se controla alrededor de 4.

7.2.4. Estudios de adsorción vainillina en lecho fijo

El estudio de adsorción de lecho fijado sobre Sepabeads SP825 se lleva a cabo en una columna de vidrio de 60 cm de longitud y 6 cm de diámetro interno. (La porosidad del lecho (ϵ_B) de 0,35 y el número de Peclet (Pe) de 98 que se estima mediante experimentos reportados) (Huang *et al*, 2013). La solución acuosa de vainillina se vierte en la columna de manera manual apoyándose de un embudo de separación de 2 L, de tal manera que su caudal sea constante (5 mL/min) a temperatura ambiente y concentraciones de alimentación (1 g/L). De este modo la columna se alimenta con la solución y se recogen muestras en la salida de la columna, se diluye y se cuantifica mediante espectrofotometría UV-Vis. El tiempo estequiométrico experimental ($t_{st, exp}$, min) se determina para el flujo de alimentación constante y se compara con el teórico estimado ($t_{st, teor}$, min) con el equilibrio de modelo de isoterma obtenido de Freundlich.

Por último, se calcula la cantidad adsorbida y desorbida experimental de vainillina ($q_{ads, exp}$, g/g resina seca) (q_{des} , g/g resina seca), basándose en las ecuaciones vistas en la parte teórica. El estudio de adsorción-desorción de la vainillina y la concentración de la alimentación (C_{Alim}) se realizan con los perfiles de concentración. El modelo de ecuaciones, es resuelto numéricamente con Algebra FX 2.0 plus, usando uno de sus solucionadores integrados, y discretizando el dominio axial utilizando el método numérico de colocación ortogonal en elementos finitos de segundo orden en cada elemento. El modelo matemático contiene un sistema de derivadas parciales y ecuaciones algebraicas (PDAEs).

7.2.5. Recuperación de la resina Sepabeads

Después las ejecución de adsorción – desorción, se recurre a la recuperación de la resina Sepabeads la cual queda cargada con un grado mínimo de residuos, para ello la columna se regenera mediante elución sobre el volumen del lecho fijo con acetato de etilo para la eliminación de residuos afines a dicho disolvente, después una solución de NaOH 4 N, luego HCl 4N para su neutralización (empleando 16 volúmenes de cada solución proporcionales

al lecho fijo, aproximadamente 2 L por cada solución), y por último la resina es enjuagada con agua destilada hasta alcanzar el pH inicial de 6-7, el acetato de etilo se recupera con impurezas en garrafas de residuo para su posterior recuperación y se desecha el agua formada. Dicho procedimiento se realiza 3 veces. Por último, se deja secar la resina al vacío para su contención y posterior uso, con lo anterior se asegura la eliminación de cualquier residuo que quede en la resina.

7.2.6. Cuantificación de vainillina por espectrofotometría

El método para la cuantificación de la vainillina se basa en la capacidad que tiene este compuesto para absorber en la región UV. Para ello, se realiza un barrido del espectro de luz en la región de 200 nm a 400 nm y se determina que la longitud de onda adecuada para la cuantificación de vainillina en agua es de 348 nm.

Construcción de la curva patrón: Una vez seleccionada la longitud de onda se determina la curva patrón de la vainillina de lo cual, se prepara una disolución madre. La cual fue preparada disolviendo 0.01 g de vainillina estándar en 5 mL de etanol absoluto y aforando con agua destilada hasta 100 mL. A partir de la disolución madre se preparan disoluciones estándar tomando alícuotas de diferentes volúmenes. Cada alícuota se afora hasta la marca a 100 mL añadiendo agua y 2 mL de disolución de NaOH 0.1 N. Se mezcla y se sónica por 5 min. El blanco de reactivos para ajustar a cero el espectrofotómetro se prepara con la adición de 80 mL de agua (de preferencia desionizada) en un matraz volumétrico de 100 mL adicionando 2 mL de NaOH 0.1 N y diluyendo con agua hasta la marca. Se toman lecturas de absorbancia a 348 nm contra el blanco de agua desionizada. Todo lo anterior por se hace por triplicado, se sacan los promedios y se traza la gráfica de concentración contra absorbancia para generar la curva de calibración y obtener la ecuación de la recta (Anexo).

Preparación de la muestra: En matraces con aforo de 50 mL se diluyen 50 mg de cada extracto obtenido del proceso de adsorción-desorción, se afora con agua desionizada y sónica por 5 min. Se toma la absorbancia de cada muestra contra el blanco de agua, se interpola en la curva patrón para obtener la concentración.

7.2.7. Análisis cualitativo de vainillina en capa fina

Se disuelve en un vial 50 mg de extracto de vainillina en 2 mL de acetato de etilo. En una placa de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria se aplican los extractos con ayuda de un capilar para ser comparados con la referencia (estándar de vainillina). Para el caso de

los extractos la fase móvil utilizada es acetato de etilo:hexano (7:3). El revelador utilizado es sulfato cérico, el cual es esreado sobre la placa y al final secada sobre una plancha. Se Identifica la presencia de vainillina proveniente del extracto.

7.2.8. Proceso de purificación de la vainillina por cristalización

Para purificar la vainillina se usa acetato de etilo en proporción de 25 mililitros de acetato de etilo por cada gramo de vainillina impura. Cada una de las extracciones se realizan en caliente y con agitación durante 15 minutos, enseguida se decanta y se deja reposar dos horas, aproximadamente, para que cristalice la mayor parte de vainillina. Si los cristales que se obtienen tienen forma de agujas de color amarillo pálido, con olor a vainilla, se sigue adelante con una mayor purificación con objeto de separar la máxima cantidad de vainillina pura, las extracciones se controlan por cromatografía en capa fina. Por lo que, los cristales se disuelven con agua destilada caliente, a razón de 37 mililitros de agua caliente por cada gramo de vainillina. Una vez disueltos los cristales, se agregan 0.2 gramos de carbón activado por cada gramo de vainillina para decolorarla. La solución se dejó hervir durante 15 minutos. En seguida se filtra a vacío y el filtrado se deja reposar 2 horas, aproximadamente. Los cristales que se obtienen deben tener forma de agujas de color blanco.

7.2.9. Cuantificación de vainillina por HPLC

Para la preparación analítica en HPLC la vainillina estándar y la vainillina purificada proveniente del extracto obtenido, se preparan en agua desionizada y se filtran a través de una membrana de nylon 0,2 μm . Una vez con los extractos secos de vainillina se pesa 1 mg de cada uno y se aforan a 1mL con metanol grado HPLC, lo mismo para la vainillina estándar, se sónicen por 5 minutos e inyectan por triplicado salvo la vainillina estándar la cual sirve solo de referencia. Las soluciones de vainillina estándar y las muestras se filtran antes de la inyección utilizando un filtro de jeringa de 0,2 μm . La metodología empleada (por gradientes) para la identificación y cuantificación de vainillina, es la misma que la empleada en la del ácido ferúlico, (ver sección de condiciones cromatográficas del ácido ferúlico), solo que para este caso en los cromatogramas se identifica el tiempo de retención de las muestras de vainillina y se compara con las obtenida de la vainillina estándar, para confirmar la proximidad de las áreas y tiempos de retención de las muestras con el respectivo estándar. Por último, se cuantifica el rendimiento con base al área bajo la curva de la vainillina obtenida de las muestras.

7.3. Descripción experimental de la síntesis química y enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina

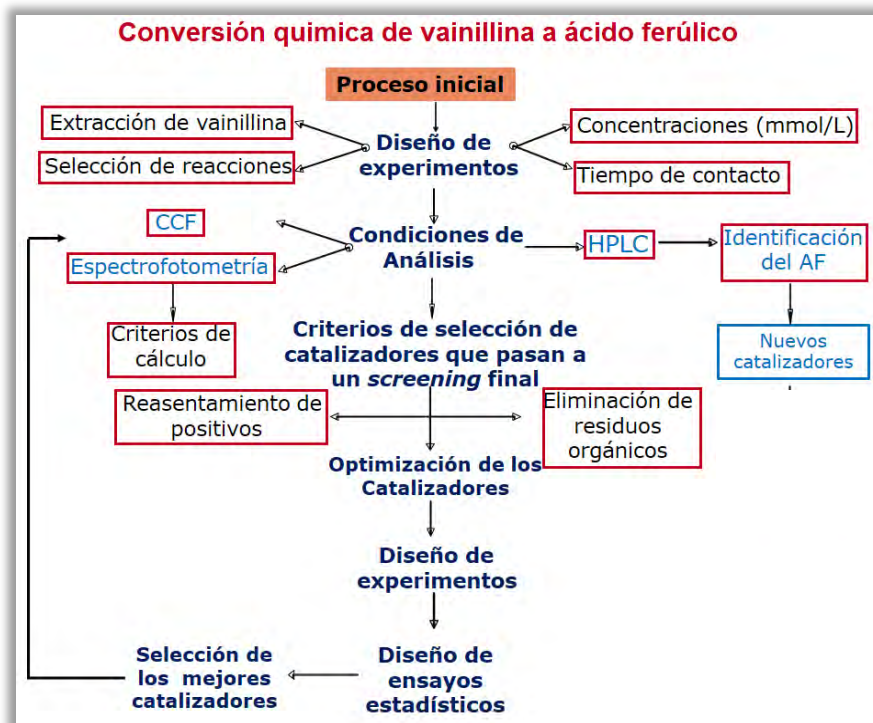


Figura 28. Metodología propuesta de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina.

Fuente: Elaboración propia.

7.3.1. Síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina

Se utilizan las principalmente reacciones de condensación de adición de carbaniones donde se involucran reacciones de condensación aldólicas modificadas (reacción de Knoevenagel con modificación de Dobner), en el que se empleó el ácido malónico (condensación malónica) que un ácido dicarboxílico, catalizadas por bases orgánicas como piperidina, trietilamina, dicitclohexilcarbodiimida, citrato de amonio y óxido de calcio. La síntesis preparativa de las principales reacciones químicas en la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina se muestran con respecto a la metodología propuesta (Figura 28).

7.3.1.1. Síntesis química por condensación malónica

La Vainillina (11.3 g, 74.4 mmol, 1 eq) se mezcla con ácido malónico (15.5 g, 149 mmol, 2 eq), para cada reacción de condensación se emplean diversos catalizadores en un respectivo medio de reacción: piperidina (0.74 mL) en piridina (37.2 mL); trietilamina (40.5 ml) en dioxano (30 mL); citrato de amonio dibásico (16.9 g) en dioxano (30 mL);

diciclohexilcarbodiimida (14.2 g) en dioxano (30 mL) y óxido de calcio (0.37 g) en tetrahidrofurano (30 mL).

Cada una de las mezclas se agitan durante 3 horas a 90 °C y 2 h a reflujo. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añade hielo/agua (200 ml) con el fin de precipitar el producto que se separa por filtración y se lava con agua fría. (Pion, Reano, Ducrot y Allais. 2013). Se acidifica a pH 3 y se realizan extracciones en acetato de etilo-agua, la fase orgánica se destila en rotavapor y se realiza la sucesiva recristalización.

7.3.1.2. Condiciones de análisis de la síntesis química de vainillina a ácido ferúlico

Una vez que se concentran los productos orgánicos de cada una de las reacciones, se recuperan los sólidos y una proporción de estos se disuelven en acetato de etilo (0.5 g extracto/5 mL acetato de etilo). Se preparan también un estándar de ácido ferúlico y otro de vainillina. En una placa cromatográfica Macherey-Nagel de silica gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄, se aplica 1µL de cada uno de los extractos, incluidos los estándares. La placa se introduce en una cámara reveladora cuyo eluyente es: acetato de etilo:cloroformo (relación 5:5). Una vez completada la elución de las muestras, la placa se observa en una cámara con una lámpara UV-Visible. Las placas son aspersadas con sulfato sérico y/o DPPH para hacer visible la presencia del ácido ferúlico. Durante el proceso de la reacción se toman alícuotas de 0.2 mL y se ajusta el pH=3, para el respectivo análisis de absorbancia en el espectrofotómetro UV-visible a 380 nm, a distintos intervalos de tiempo y determinar la cinética de reacción respectiva. El producto obtenido de la reacción se prepara para su identificación y cuantificación de acuerdo a la metodología propuesta en el HPLC.

7.3.2. Biosíntesis enzimática de vainillina a ácido ferúlico

Para la biosíntesis enzimática de vainillina a ácido ferúlico, se realiza un screening de enzimas comerciales que se obtienen previamente en el laboratorio, ya sea liofilizadas o inmovilizadas en alguna resina, en el que se emplean hidrolasas (proteasas, lipasas y neutrasas) que contribuyen a hacer reacciones específicas en la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina en síntesis con ácido malónico. Para ello, se mezcla vainillina (0.77 g, 0.50 mmol), biocatalizador o enzima (75 mg) y ácido malónico (0.26 g, 0,25 mmol) en MeCN (0,85 mL) y agua desionizada (0,15 mL) se agitan a 30 °C y 200 rpm. (Jian-Ping *et al*, 2013). La metodología propuesta de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina se muestra en la [Figura 29](#).

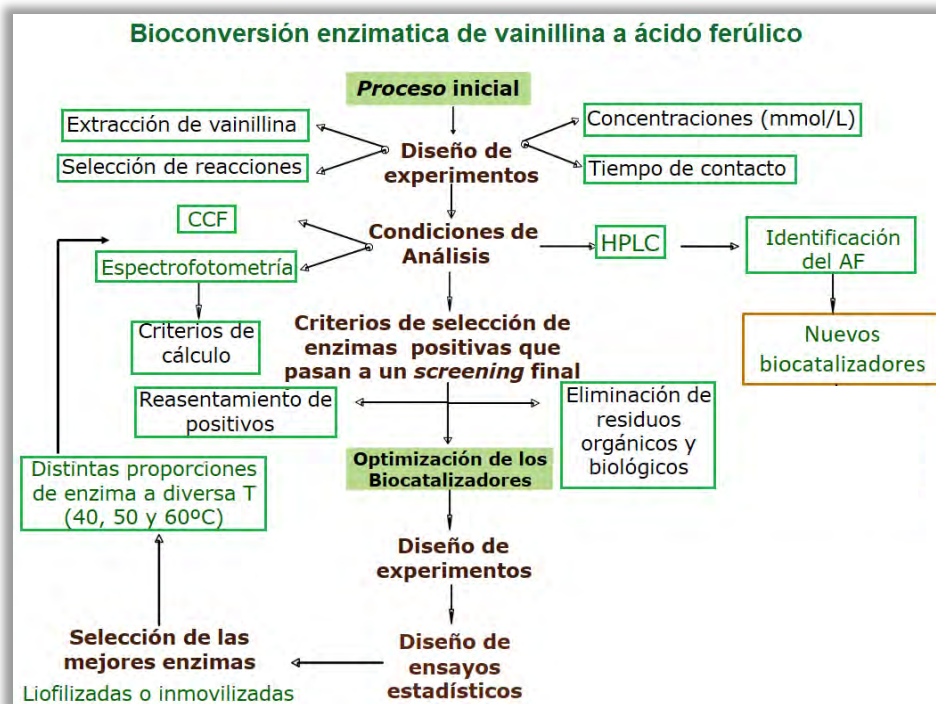


Figura 29. Metodología propuesta de la biosíntesis enzimática de vainillina a ácido ferúlico

Fuente: Elaboración propia.

7.3.2.1. Monitoreo de los mejores productos de la biotransformación

Durante el proceso de reacción se toman alícuotas de 200 μL a las 12 horas para cada una de las reacciones del screening propuesto y se filtran para eliminar cada enzima. A partir de ese momento comienza a hacer el monitoreo de la formación de ácido ferúlico y el consumo de vainillina durante 72 horas con un lapso para cada muestreo de 12 horas. Posteriormente se hacen pruebas de CCF a todas las reacciones involucradas y se comparan con el estándar de ácido ferúlico y vainillina y se determinan los mejores resultados máximo al término de las 72 horas.

Las reacciones de cada una de las enzimas involucradas se terminan por filtración para eliminar la enzima. El CH_2Cl_2 se utiliza para lavar el papel filtro para asegurar que los productos obtenidos se disuelven en el filtrado. A continuación, el filtrado se lavó tres veces con agua. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, y los disolventes se eliminan a presión reducida. A los productos se les realizan extracciones en acetato de etilo-agua, la fase orgánica se destila en rotavapor y se realiza la sucesiva recristalización.

7.3.2.2. Condiciones de análisis de la bioconversión enzimática de vainillina a ácido ferúlico

Las muestras de las reacciones en cada intervalo de tiempo se analizan en el espectrofotómetro UV-Visible a 348 nm y 380 nm, para recabar los datos de concentración de las respectivas reacciones en hojas de Excel para su análisis estadístico y se compara en gráficas los mejores catalizadores propuestos junto con los resultados obtenidos en CCF. Se seleccionan los mejores biocatalizadores con los cuales se hacen pruebas de optimización de producto, por lo que se modifica la temperatura (a 40 °C, 50 °C y 60 °C), la concentración de los reactivos (ácido malónico y vainillina) al tomar uno u otro como reactivo limitante y se modifica la cantidad de cada biocatalizador al duplicar y triplicar la cantidad sobre cada reacción. Con las enzimas seleccionadas se repiten las condiciones de análisis y adicionalmente se identifica y cuantifica el rendimiento de ácido ferúlico en HPLC con la metodología propuesta para el ácido ferúlico y vainillina, de la siguiente manera:

Preparación de la muestra: En cada tiempo de monitoreo, se sustraen aproximadamente 2 mL del medio de cultivo, los cuales se filtran a través de un filtro millipore de 0.2 µm con la finalidad de eliminar las enzimas presentes en la muestra.

Inyección de la muestra: Estas muestras también son inyectadas con dos patrones internos uno de ácido ferúlico y otro de vainillina, teniéndose como mínimo 2 repeticiones por muestra. Las soluciones de vainillina y ácido ferúlico estándar y las muestras se filtran antes de la inyección utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm.

Los cromatogramas se identifican bajo el método por gradientes, visto en la sección de condiciones cromatográficas del ácido ferúlico. El tiempo de retención de la vainillina y ácido ferúlico estándar se comparan con las muestras de obtenidas de las síntesis químico/enzimáticas de vainillina a ácido ferúlico para confirmar su aproximación al pico respectivo del estándar y por último se cuantifica el rendimiento con base al área bajo la curva del ácido ferúlico que se obtiene de las muestras.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Análisis de resultados en la obtención de ácido ferúlico

8.1.1. Elección del mejor disolvente para la extracción de ácido ferúlico

Al nejayote se le aplicaron extracciones consecutivas de diclorometano y acetato de etilo para su cuantificación mediante HPLC con el fin de obtener el disolvente más propicio para la adsorción – desorción de ácido ferúlico y su comparación con el método convencional.

8.1.1.1. Identificación por método gravimétrico de la extracción líquido-líquido

Los valores obtenidos (Tabla 9), tienen un coeficiente de variación bajos por lo que se puede considerar confiable. Se realizó una cromatografía en capa fina con placas de sílice y cloroformo:acético (9:1) como eluyente, posteriormente se reveló con DPPH (Figura30).

Tabla 9. Cantidad de muestra obtenida de ácido ferúlico con CH₃Cl₂ y con acetato de etilo.

		Determinación					
Material	1	2	3	Promedio (mg/L)	D. Est.	CV	
Nejayote	Diclorometano						
	650.00	780.00	650.00	693.33	75.06	5.83	
	Acetato de etilo						
	866.67	866.67	866.67	866.67	0.00	0	

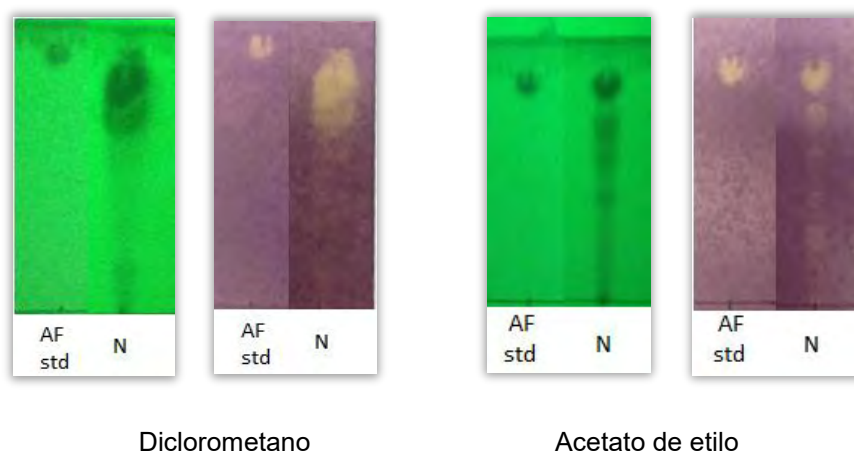


Figura 30. CCF de la extracción de ácido ferúlico de nejayote (N) con diclorometano y con acetato de etilo con respecto al ácido ferúlico estándar (AF std). Las muestras en revelador UV y revelador DPPH

Se observa en la [Figura 30](#). que todas las muestras contienen ácido ferúlico pues la señal del ácido ferúlico estándar tiene un Rf de 0.43 y se presenta en todas ellas. Las señales que se observan por debajo del ácido ferúlico probablemente sean dímeros y/o oligómeros, observándose mayor cantidad en donde la extracción fue con acetato de etilo. El cloruro de metileno es más selectivo para la extracción de ácido ferúlico.

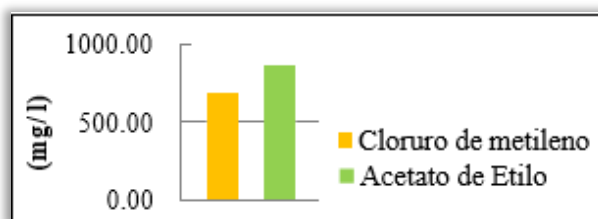


Figura 31. Extracción convencional líquido-líquido de ácido ferúlico

Del gráfico de la [Figura 31](#) la tendencia indica que se obtiene más extracto al usar acetato de etilo, lo cual concuerda con la literatura, ya que se reporta que la extracción de ácido ferúlico se realiza con dietil éter o con acetato de etilo (Run-Can *et al*, 2001).

8.1.1.2. Identificación por HPLC de la extracción líquido-líquido

El equipo calculo tanto la concentración por área, como la concentración por altura, siendo la última más confiable debido a que el área se ve afectada por la humedad del ambiente. De esta se obtuvo una regresión lineal con ecuación.

Tabla 10. Cuantificación utilizando altura de la señal de ácido ferúlico en HPLC.

Material: Nejayote	µg/ 0.3 µl		Rf	
	1	2	1	2
	Diclorometano			
$y=171.1+0.105x, r= 0.9838$	0.636	0.879	0.43	0.42
	Acetato de etilo			
$y=0322.7+0.0461x, r= 0.9572$	1.469	1.733	0.39	0.40

En la [Tabla 10](#) se muestra que el Rf oscila entre 0.42 y 0.43 que es la misma oscilación que mostró el estándar contra el cual fueron comparados para el caso de la extracción con diclorometano y se obtienen valores de recuperación de ácido ferúlico similares a los encontrados por gravimetría. Se reportan también los Rf obtenidos para las muestras en acetato de etilo, los cuales concuerdan con el que se calculó para el estándar (0.38-0.39), adicionalmente también se obtienen valores muy semejantes a los obtenidos por gravimetría, haciendo más confiable la interpretación de los datos

Tabla 11. Cuantificación en muestra de ácido ferúlico por HPLC

Material Nejayote	mg AF/mL		Promedio	Desv. Est	CV
	1	2			
Diclorometano					
	169.52	234.51	202.01	45.95	22.75
Acetato de etilo					
	190.	263.8	227.27	51.70	22.75

El coeficiente de variación elevado en el nejayote en la evaluación es elevado (Tabla 11), debido a que la cantidad de AF que contiene es muy poca y el equipo tuvo trabajos al cuantificarla por lo que se debió haber aplicado más muestra, es decir, a pesar de haber duplicado el volumen aplicado para el residuo de maíz éste es muy bajo por lo que la aplicación no es tan precisa y eso repercute en la cuantificación por lo que se recomienda duplicar este volumen para futuras cuantificaciones.



Figura 32. Cuantificación por HPLC de extracción convencional

De la Figura 32 se grafica la cantidad de AF presente en la muestra extraída con acetato de etilo que recupera la mayor cantidad a diferencia de lo extraído con cloruro de metileno.

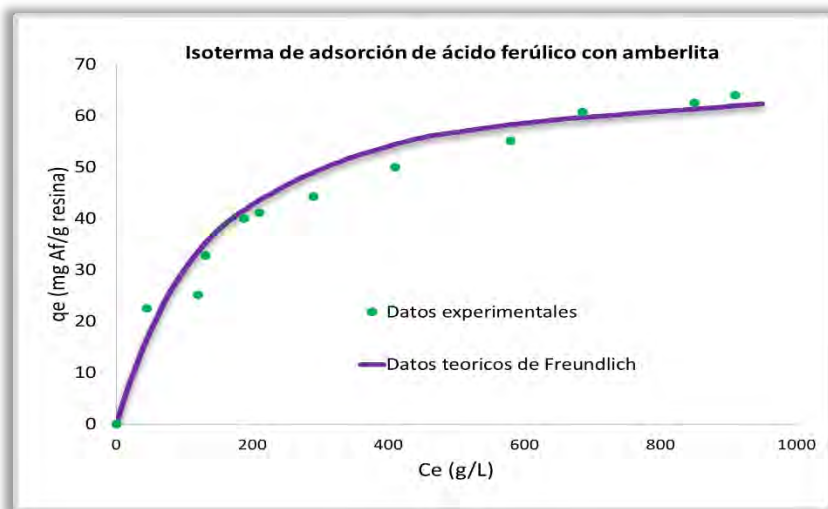
8.1.2. Análisis de adsorción de ácido ferúlico en resinas

El uso de resinas es adecuada para la recuperación de residuos de ácido ferúlico y de vainillina, por diversas razones: el pH se mantiene constante a lo largo del proceso de evitar la precipitación; estas resinas son químicamente estables e inertes que son adecuados para aplicaciones bajo una amplia variedad de condiciones; la recuperación de compuestos fenólicos y la regeneración de la resina se pueden realizar simultáneamente en un solo paso; y sus propiedades de adsorción se pueden modelar por la hidrofobicidad de la superficie, área superficial y porosidad, alta recuperación de producto (Crittenden, *et al.* 1998; Kunin,

1991). El costo de las resinas es variado dependiendo del tipo de amberlita y proveedor; siendo la amberlita XAD-7HP la que se empleó para la recuperación de ácido ferúlico, esta tiene un valor de aproximado de \$ 230 dólares por Kg; En cuanto al costo de la resina Sepabeads SP-820 que más adelante se analiza con la recuperación de vainillina, su precio aproximado es de \$ 450 dólares por Kg. Dichos precios son moderados, si tomamos en cuenta las ventajas anteriormente descritas. Esto hace que las resinas poliméricas sean de especial interés, para que a partir de residuos agroindustriales se lograra la recuperación de precursores de síntesis orgánica como el AF y la vainillina.

8.1.2.1. Obtención del ácido ferúlico a partir de experimentos de adsorción en lotes.

Dado que la adsorción es la capacidad de un adsorbente de retirar una especie química de un medio acuoso, los datos deben ser obtenidos de manera experimental, ya que no existe un método predictivo para su estimación en medios acuosos. Los datos teóricos son solo del ajuste de ecuaciones usando resultados experimentales; por lo que no son predictivos; pero permiten tener un mayor entendimiento del proceso de adsorción (Lira-Parada, 2014). Se procedió a probar con amberlita para observar su capacidad de adsorción al ácido ferúlico, en un sistema con ácido ferúlico y agua.



C_e : concentración de equilibrio del adsorbato en la solución a granel (g/L)

q_e : cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso seco de adsorbente en equilibrio (mg/g resina seca)

Figura 33. Isotherma de adsorción por lotes con amberlita XAD-7HP para el ácido ferúlico.

En la Figura 33, se presenta la capacidad de adsorción en función de la concentración para amberlita en un sistema tipo batch. Los datos experimentales se representan con puntos y los teóricos de ajuste con líneas. Donde se muestra para todo el rango de concentraciones,

la capacidad de adsorción de ácido ferúlico en amberlita, los valores ajustados se obtuvieron con unos de los procedimientos conocido como de mínimos cuadrados para el ajuste de las curvas con el modelo de la isoterma de Freundlich, obteniendo los valores mostrados en la isoterma de adsorción de la [Figura 33](#)

El modelado de la curva con el modelo de Freundlich en la obtención de ácido ferúlico tuvo un porcentaje de error de ajuste relativamente bajo (4 %); por lo tanto, el ajuste de los datos experimentales con la ecuación teórica de Freundlich es adecuado. Los valores de acuerdo a la [Tabla 12](#) de la capacidad relativa del adsorbente “K” de Freundlich son del orden de magnitud grande denotando una gran curvatura, lo cual implica una mayor capacidad de adsorción, en el caso, del valor del exponente de Freundlich “n” que indica la pendiente de la isoterma, la cual también es grande, dado que cuando “n” es mayor que 1 indica una adsorción favorable, generando que sea menos sensible para todo el intervalo de concentraciones (Duong, 1998).

Tabla 12. Área superficial del adsorbente empleado y valores de ajuste en isoterma de Freundlich

Material	K	N	%de error del ajuste
Amberlite XD7HP	6.00	2.84	4.00

8.1.2.2. Estudio de la rapidez de adsorción

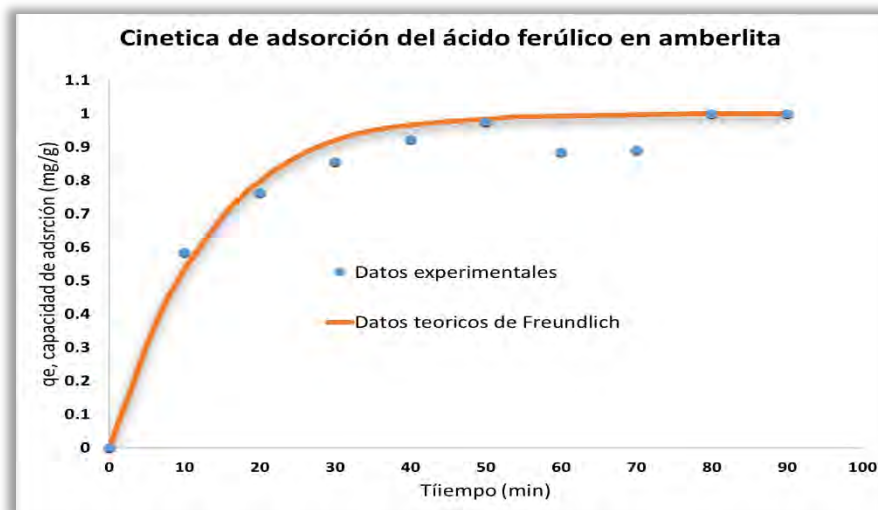


Figura 34. Cinética de adsorción de ácido ferúlico en Amberlita

Una vez determinada la capacidad de adsorción se procedió a realizar experimentos para evaluar la rapidez de adsorción. Se ilustra a continuación en la [Figura 34](#) la capacidad de adsorción en función del tiempo. Los datos experimentales se representan con puntos y los

datos teóricos del ajuste de datos con líneas. Además, se añade una curva de datos teóricos, para observar la tendencia de rapidez.

El ajuste de los datos teóricos a partir de datos experimentales se realizó con la siguiente ecuación diferencial de primer orden:

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q - q_e)$$

Cuya solución es:

$$q = q_e(1 - \exp(-k * t)) = q_e(1 - \exp(-t/\tau_c))$$

$$\frac{q}{q_e} = (1 - \exp(-k * t))$$

Este modelo teórico es de dos parámetros, considera por sí mismo la capacidad de adsorción en el equilibrio que, por lo tanto, el término puede ser sustituido por los datos teóricos, obtenidos en la isoterma de adsorción previa.

$$q = q_e(1 - \exp(-k * t)) = q_e(1 - \exp(-t/\tau_c)) = (1 - \exp(-t/\tau_c))$$

$$\frac{q}{KC_e^{\frac{1}{n}}} = (1 - \exp(-k * t))$$

A partir de las curvas de cinética de adsorción, con la resina hidrofóbica no iónica, se observa la curvatura en los datos experimentales de capacidad de adsorción en función del tiempo; por lo que, existe dependencia de la capacidad de adsorción en función del tiempo. Por ende, se puede asociar con la ecuación de un parámetro lineal el valor de la constante cinética.

Tabla 13. Parámetros de la ecuación de pseudo-primer orden para el proceso de adsorción. El valor de “q_e” se obtiene a partir de la isoterma de adsorción.

Adsorbente	k(min ⁻¹)	τ _c (min)
Amberlite XAD-7HP	0.0725	13.79

El significado físico de la constante de respuesta τ_c de indica el tiempo en el cual se logra el valor del equilibrio (Tabla 13).

8.1.2.3 Obtención de ácido ferúlico a partir de experimentos en columna a escala preparativa

Con la finalidad de optimizar la adsorción de ácido ferúlico, se optó por realizar el proceso en columna, para ello se montaron columnas con cantidad conocida de Amberlita. Se estudió

el sistema en continuo, ya que de esta manera se estarían realizando en lugar de cuatro operaciones (adsorción-filtración-desorción-filtración) dos operaciones unitarias (adsorción-desorción) ya que la filtración se realizaría en el mismo momento de la adsorción-desorción, durante el flujo continuo del disolvente (Lira-Parada, 2014). Con esto en mente se procedió a realizar experimentos en columna utilizando 20 L de nejayote con una concentración de alimentación de 1.247 g/L. Se estimó que se debían usar 180 g de adsorbente, siendo congruente que al final del proceso debía tener por cada g de ácido ferúlico en nejayote:7 g de adsorbente. El flujo volumétrico se estableció en 2 L/hora, para permitir el contacto, relativamente prolongado de la disolución con el adsorbente, el flujo se puede aumentar, si se aumenta el tamaño de la cama de adsorción. Se presentan a continuación los resultados experimentales. En vista de que se tenía una gran cantidad de datos experimentales y teóricos se representaron con puntos; sin embargo, se hace la anotación correspondiente en cada caso. Para el ajuste se tienen ecuaciones teóricas de ajuste y, por lo tanto, se ajustaron parámetros a los datos experimentales.

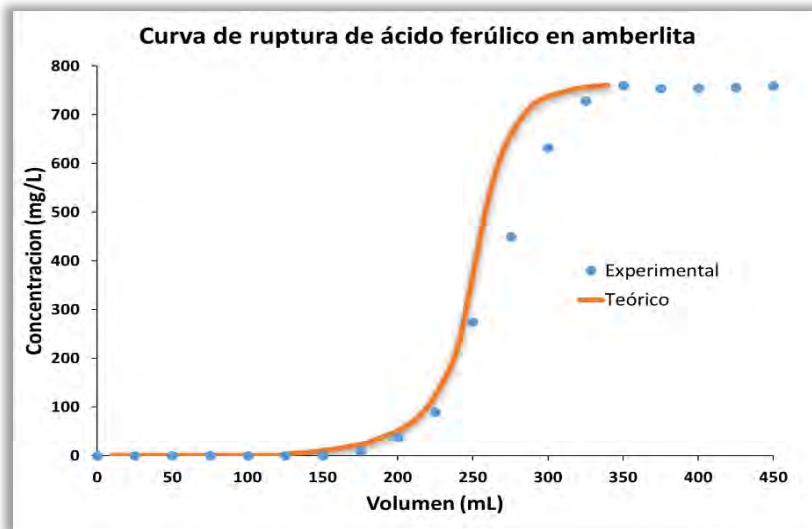


Figura 35. Curva de rompimiento de ácido ferúlico en 0.5 g de Amberlita soportado en una columna, flujo 3.6 mL/min. Curva teórica con $Da=0.03$.

A la Figura 35 se le denomina de ruptura, debido a que el soporte se comienza a saturar hasta que no puede almacenar una mayor cantidad de adsorbente, en este punto se tiene la ruptura, se observa que la concentración del volumen tratado aumenta, debido a que el soporte está saturándose cada vez más, limitando la fuerza impulsora de transferencia de masa. El ajuste de la curva se realizó de acuerdo a lo estudiado en la parte teórica, sin embargo, en esta ocasión se obtuvo el número adimensional Damkohler, la resolución de la

ecuación diferencial de derivadas parciales, se realizó de manera similar a lo ya publicado, obteniendo:

$$V(\phi, Da) = \frac{1}{Da} \int_{0.3967}^{\phi} \frac{d\phi}{\phi - \phi^{1/n}} + 250, \quad Da_x = \frac{k_1 * V_{total}}{Q} = 0.03$$

A partir de los datos obtenidos de Damkholer Da del ajuste y de la definición del número adimensional, se puede hacer un estimado de la constante “K” para el proceso en lotes para la amberlita, basada en experimentos en continuo. Obteniendo los estimados de la **Tabla 12**. Por lo tanto, el valor numérico de la constante de tiempo de indica que el proceso se lleva a cabo en tiempos relativamente cortos, basado en experimentos de columna para la adsorción. Del comportamiento de la curva de ruptura se infiere que el sistema en columna en comparación con el batch o por lote es más eficiente, debido a que físicamente se tiene un equilibrio con la disolución que pasa con el sistema a altas concentraciones, a diferencia de la operación en batch donde se obtiene un sistema en equilibrio con una disolución a bajas concentraciones; por lo tanto, el sistema en columna aprovecha toda la capacidad de adsorción del sólido, por el tipo de equilibrio establecido. La desorción de ácido ferúlico en Amberlita se estudió en experimentos en columna después de la adsorción, asegurando que la cantidad de adsorbente y ácido ferúlico quedaba en la columna; por lo tanto, no existiría pérdida de materia durante la filtración. Para probar los resultados anteriores en la obtención de ácido ferúlico se inyectaron en el HPLC alícuotas cada 4 L de los veinte tratados.

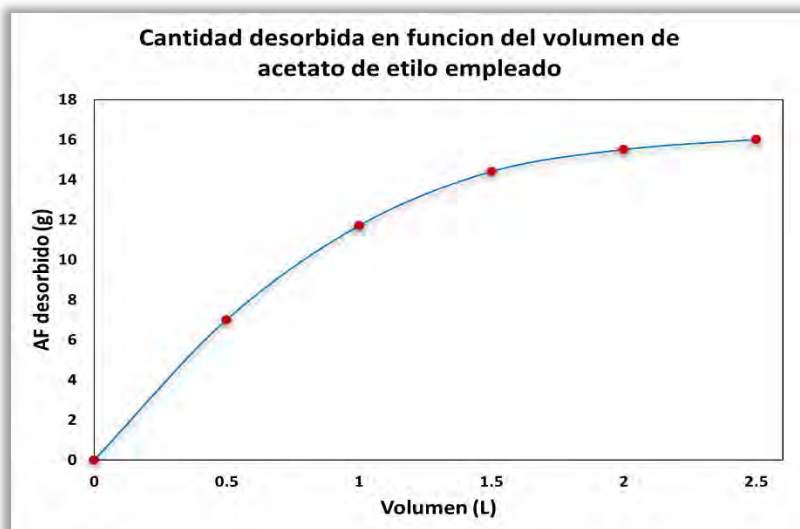


Figura 36. Ácido ferúlico desorbido, empleando diferentes volúmenes de acetato de etilo.

Para todos los casos, se observó que no existía ácido ferúlico en la solución que había pasado por la cama de adsorción. Posteriormente, el sistema se conectó en vacío para

permitir el secado de la columna. En esta ocasión se probó la desorción de ácido ferúlico con acetato de etilo en forma batch. Se cuantificó la cantidad de ácido ferúlico que se desorbía en el sistema en función del volumen de acetato de etilo usado. La desorción del ácido ferúlico se logró con un porcentaje alto 90%. Este resultado es significativo, ya que se ha logrado desorber nuestro producto con una relación de volúmenes 1:10 (2 L acetato de etilo: 20 L nejayote). En la [Figura 36](#) presentan los resultados experimentales de los procedimientos de desorción de forma gráfica también en la literatura correspondiente además de otros datos de adsorción-desorción de ácido ferúlico.

8.1.2.4. Rendimiento de la recuperación de ácido ferúlico por adsorción

En la obtención de ácido ferúlico a escala preparativa se utilizó el nejayote recolectado de un molino del sur de la Ciudad de México. Después de realizar la desorción por cada litro de nejayote se recuperaron 1.075 g/L de extracto con un rendimiento de 86.20 %. El estudio llevado a cabo con la metodología propuesta mostró un aumento de 1,3 veces en la producción de ácido ferúlico en comparación con la técnica de extracción convencional (Tilay *et al*, 2008). Para ello, el rendimiento en la recuperación de ácido ferúlico se calculó como la razón entre la masa de ácido ferúlico recuperada por adsorción y concentración de alimentación de ácido ferúlico en el *nejayote* que se trató.

$$R = \frac{C_{AF \text{ de adsorcio}}}{C_{AF \text{ de alim.}}} \times 100$$

Donde: R es igual al rendimiento de la recuperación [g/L], $M_{\text{ácido ferúlico}}$ es la masa de ácido ferúlico recuperado [g], V_{Nejayote} es el volumen de nejayote tratado [L]. De este modo se compararon los resultados obtenidos con los de tesis anteriores en las que se utilizaron nejayotes de molinos de la Ciudad de México y se observó que este valor está en el rango de lo esperado ([Tabla 14](#)). Esto indica que se puede mejorar la extracción de ácido ferúlico, probando adicionalmente con otras resinas de interés.

Tabla 14. Comparación de los resultados obtenidos de ácido ferúlico a razón de su rendimiento y su carga en la resina, con otras referencias.

<i>g de ácido ferúlico /L de nejayote</i>	Referencia
1.000	Chavarría, 2007
0.823	Tilay <i>et al</i> , 2008
0.680	Gonzales <i>et al</i> , 2009
1.075	En esta investigación

8.1.2.5. Carga de ácido ferúlico adsorbido

La carga de ácido ferúlico adsorbido representa la cantidad másica de ácido ferúlico que la resina es capaz de adsorber. Se calcula como una razón entre la masa adsorbida y la masa de adsorbente utilizada.

$$q_e = \frac{m_{\text{ácido ferúlico}}}{m_{\text{resina}}}$$

Donde: q_e es carga de adsorbato [adimensional] y m_{resina} es la masa de resina utilizada [g]. Si tomamos en cuenta, que el estimado respectivo 1.0 g de ácido ferúlico en nejayote por cada 7.0 g de adsorbente, tenemos que q_e es igual a 0.1428, si experimentalmente se obtuvieron 1.075 g de ácido ferúlico/L de nejayote, tenemos una masa de resina real utilizada de 7.5 g por litro de nejayote, esto considerando que aún mantiene un cierto grado de impurezas, como algunos dímeros de ferúlico.

8.1.2.6. Análisis por cromatografía líquida del ácido ferúlico

En la cromatoplaqueta de la [Figura 37](#) no hay compuestos orgánicos de mayor polaridad o mayor peso molecular. En función de todo lo anterior, se puede inferir que el procedimiento de desorción con acetato de etilo es selectivo al ácido ferúlico y compuestos fenólicos análogos. La cromatoplaqueta en sulfato cérico, permite observar la presencia solamente de ácido ferúlico y dímeros u oligómeros, lo mismo en UV se aprecia una región adicional de compuestos fenólicos en la parte inferior de la placa. Se sabe que la banda inferior corresponde a dímeros debido a trabajos previos en el grupo de investigación (Salas, 2014).

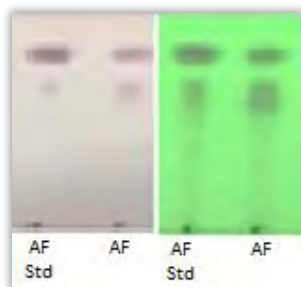


Figura 37. Cromatoplaqueta del producto de desorción (ácido ferúlico) con acetato de etilo, revelada con DPPH y en UV.

Para probar la pureza del crudo de la desorción, se inyectó la muestra en el HPLC, Cabe mencionar que la Metodología empleada para la construcción de la curva ya estaba integrada al programa del HPLC por estudios previos en el laboratorio por lo que se recurrió solo a tomar los cromatogramas correspondientes con base al protocolo establecido en el

HPLC. En función del cromatograma (Figura 38) se aprecia que el pico correspondiente al ácido ferúlico tiene una conversión en área del 86.2 % en un tiempo de retención de 18.989 min. Por lo cual de cada litro de nejayote se esperan 0.9245 g de ácido ferúlico. En este caso al haber utilizado 20 L de nejayote se obtuvieron 18.46 g de extracto con la pureza señalada.

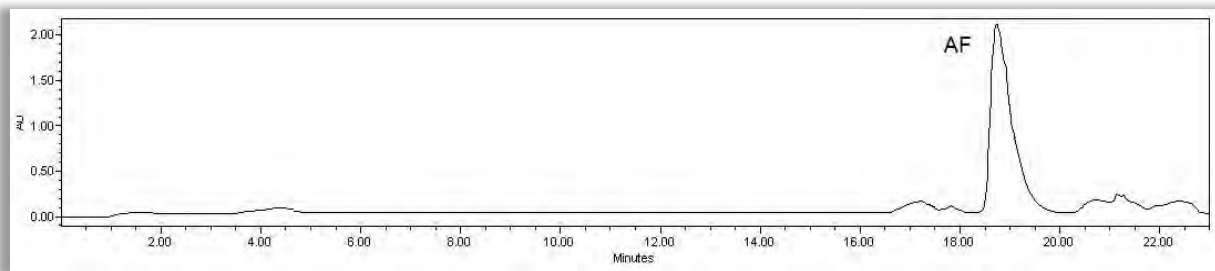


Figura 38. Cromatograma del producto de desorción, ácido ferúlico (AF) con acetato de etilo.

Es importante mencionar que en el punto de aplicación de la muestra no se ven compuestos orgánicos; por lo tanto, el método es selectivo ya que no hay compuestos orgánicos de mayor polaridad o mayor peso molecular. En función de todo lo anterior, se puede inferir que el procedimiento de desorción con acetato de etilo es selectivo al ácido ferúlico y compuestos fenólicos análogos. Sin embargo, el punto de fusión del crudo registrado fue de 158 °C, el cual es relativamente bajo al del estándar puro, que es de 171°C. Esto tal vez debido, por un lado, a que el ácido ferúlico presente en el nejayote existe en tres formas moleculares, siendo estas el monómero (ácido ferúlico), el dímero (ácido biferúlico), y el trímero (ácido triferúlico). También debido a las principales impurezas que pueden encontrarse en el ácido ferúlico recuperado de la adsorción como arabinosilanos, materiales cerosos que han sido adsorbidos en la resina y solubilizados en el acetato de etilo. Estos materiales cerosos por su naturaleza fisicoquímica necesitan cantidades relativamente bajas de calor para fundirse. Esta es la razón por la que el punto de fusión de las muestras es mucho más bajas que para el estándar de ácido ferúlico. Considerando que se deba a las impurezas provenientes del proceso de recuperación, como se puede cotejar con lo observado en la cromatoplaqueta y en el cromatograma. Con la elaboración de un procedimiento experimental para purificar el producto, se alcanzó a conseguir el 95.27 % de pureza.

8.1.2.7. Purificación de ácido ferúlico e identificación de algunos residuos o impurezas provenientes de la adsorción – desorción.

Una vez que se cuantificó el ácido ferúlico presente en la adsorción – desorción en resina amberlita a un pH=3. Se pensó que se podía purificar adicionalmente el producto para intentar aumentar la pureza del extracto obteniéndolo por cristalización o columna

cromatográfica. Adicionalmente se prosiguió a tratar de separar las impurezas o residuos ya que se encuentran presentes en más de un 10 % resultando estar en gran proporción en el nejayote al extraer el ácido ferúlico, la cual contenía dímeros (D) y oligómeros (O). Se reporta que los dímeros en algunos casos son antioxidantes más efectivos que el AF (Andreasen et al. 2001). La muestra fue sometida a dos procesos de purificación, cristalización por par de disolventes y columna con celulosa.

8.1.2.7.1. Identificación cualitativa de ácido ferúlico y de residuos por cristalización

La cristalización se realizó utilizando tres sistemas: agua, acetona-agua y etanol-agua encontrando los siguientes resultados.

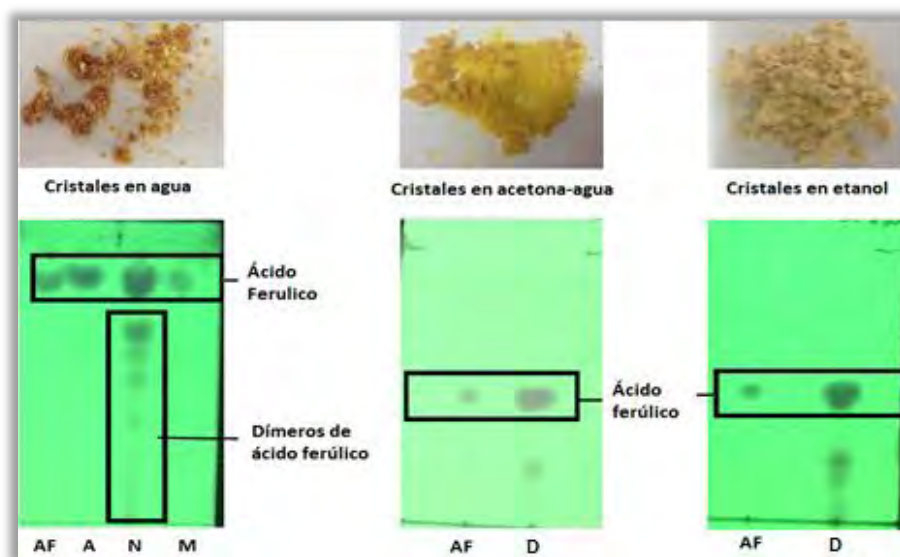


Figura 39. Monitorio de las cromatoplas y muestras de cristales. Donde: AF es el ácido ferúlico estándar, D=Dímeros y NMA es la muestra: A= cristales amarillos, N= cristales naranjas, y M= aguas madre.

De la Figura 39 donde se utilizó la muestra en agua además de presentar una señal para el ferúlico presenta otras señales, se muestra además que se obtuvieron cristales de diferentes colores y se observa que los anaranjados son ricos en dímeros y oligómeros mientras que los amarillos son de AF. Hay una mayor definición en los cristales obtenidos con acetona-agua y etanol. agua si como una sola señal que no pertenece al ferúlico. En los cristales con etanol se observa en la cromatoplasca otras 3 señales probablemente de una menor cantidad de dímeros. El agua resultó ser el disolvente que, a pesar de dar dos cristales diferentes, uno se obtuvo sin señales ajenas al ferúlico según la CCF.

8.1.2.7.2. Análisis cuantitativo de ácido ferúlico y de residuos por columna cromatografica

También de la misma muestra obtenida con amberlita y nejayote se realizó una columna de separación para la cual se probaron diferentes proporciones de Hexano-Diclorometano para elegir la mejor. Se empleó celulosa debido a su bajo costo y se eligieron las fases 1:1 y 7:3 de CH₂Cl₂:Hexano (Figura 40), adicionalmente acetona y etanol dado que mostraron algunas señales en las cromatoplasas vistas por cristalización (Figura 39); con el fin de recuperar ácido ferúlico en las primeras dos, dímeros en la tercera y cuarta. De esta columna se recolectó mediante el método por gradiente.



Figura 40. CCF en placas de celulosa con proporciones en aumento de hexano en diclorometano

Se reporta en la Tabla 15 que la mayor cantidad de muestra es arrastrada por la primera fase, con la misma proporción de hexano-diclorometano. Los colores de las fases son distintos (amarillo, 1:1; amarillo pálido 7:3; y amarillo traslucido; acetona y etanol) lo que se debe a la proporción de dímeros-AF presente por volumen definido.

Tabla 15. Peso de muestra recolectada de ácido ferúlico.

Fase	g	%
1:1	3.77	81.96
7:3	0.26	5.65
Acetona	0.05	1.09
Etanol	0.2	4.35

Se les dio seguimiento mediante CCF para al final juntar las fases en donde predominara el mismo compuesto. Como se observa en la Figura 41 las primeras fracciones tienen una señal muy intensa que no está a la misma altura del estándar por lo que se juntaron las corridas 1 y 2, de la 3 hasta la 10, 11-16, 17-22, 23-24 y 25. Aunque a partir de la 16 ya no se identificó ninguna señal en capa fina. Esto se realizó antes de concentrar cada fracción por lo que se recomienda concentrar cada 100 mL, aplicar una CCF y después juntar las fracciones en donde se observen las mismas señales.

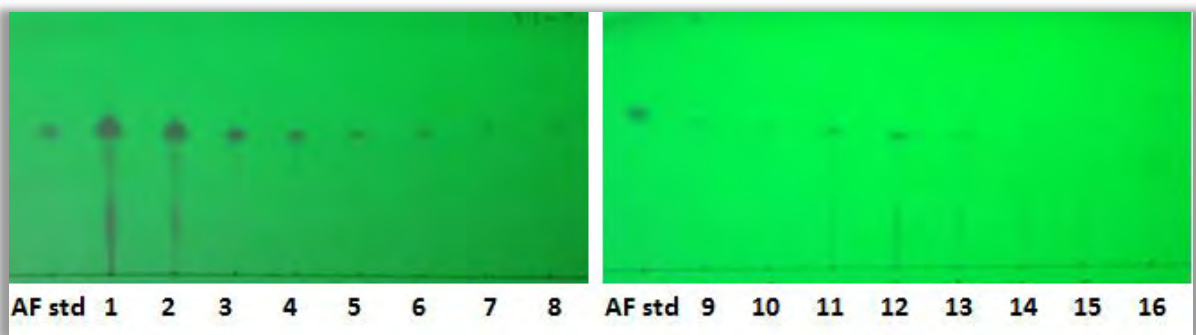


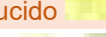

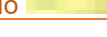


Figura 41. Monitoreo en CCF de las fracciones obtenidas en columna cromatografica de ácido ferúlico con respecto a su estándar.

Se reporta en la **Tabla 16** la cantidad de muestra obtenida con cada fase, siendo la 1-2 mayoritaria con una proporción de hexano diclorometano 1:1.

Tabla 16. Peso de muestra obtenida de ácido ferúlico

Fracción	g	%	Apariencia en matraz
1-2	2.74	64.93	Amarillo turbio 
3-10	0.7	16.59	Blanquizco 
11-16	0.24	5.69	Amarillo pálido traslucido 
17-22	0.2	4.74	Semitransparente 
23-34	0.22	5.21	Amarillo traslucido 

Hay una coloración distinta en cada fase como se observa en la **Tabla 16**. Se esperaría que a mayor proporción de AF sobre los dímeros, la solución fuera traslúcida, amarillo paja.

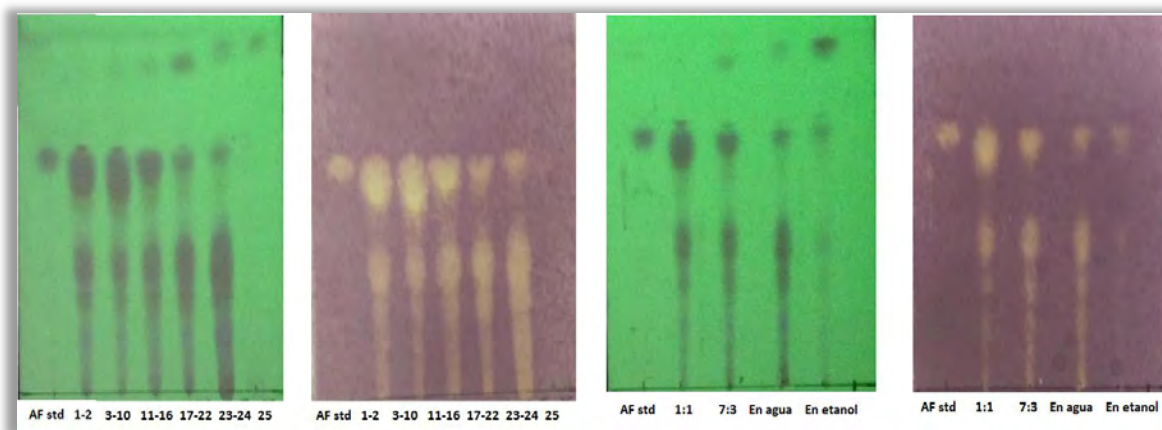


Figura 42. CCF de los dos métodos por fracciones y por fases revelados en UV y DPPH

En la **Figura 42** se observa que la señal de AF se vuelve menos intensa al paso de las fases, siendo casi imperceptible en las últimas corridas para ambas placas; todas las señales presentan actividad antioxidante, dado el revelador DPPH al que se somete. Se eligieron la primera y la última fracción y las fases 1:1 hexano:diclorometano y acetona

para ser analizadas mediante HTLC (**Tabla 17**): Utilizando la cuantificación por medio de la altura del pico con una ecuación: $y=200.2+0.09234x$, $r= 0.99115$

Tabla 17. Cuantificación de método por gradiente en fracción y en fase de ácido ferúlico

Fracción	µg/µL	Rf	% AF	Fase	µg/µL	Rf	% AF
1-2	6.341	0.41	80.89	1:1	6.4033	0.4	94.72
	6.493	0.41	82.82		6.4766	0.41	95.81
23-34	ND	0.41	0.00	Acetona	0.3469	0.42	5.13
	ND	0.41	0.00		0.6426	0.42	9.51

De todas las fracciones se tomaron 0.0025g de muestra y se observa que hay una mayor cantidad de AF en la fase que fue extraída con 700mL de hexano:diclorometano en la misma proporción tabla 10. Se reporta también que en la fase 23-24 de la **Tabla 17** no hay una cantidad perceptible de AF.

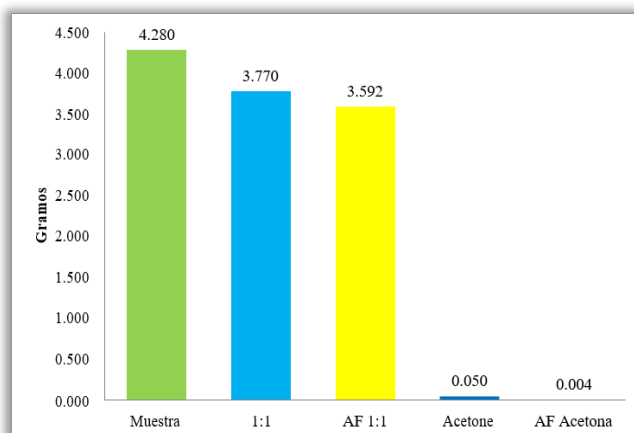


Figura 43. Gráfico de la cantidad de AF en las fases analizadas

De los 4.28 gramos sometidos a la separación por columna cromatografica 3.3370 g fueron recolectados en la fase 1:1 siendo 3.592 g de ácido ferúlico. Mientras que en los 0.05 g de extracto recolectados en la fase de acetona solo hay 0.004 g de ácido ferúlico (**Figura 43**). Los residuos totales fueron de 0.70 g aproximadamente.

De los 4.22 gramos sometidos a la separación por columna 2.74 g fueron recolectados en la fracción 1-2 la cual contenía una proporción de hexano diclorometano 1:1 siendo 2.24 g AF, mientras que en las fases analizadas 23-24 no se encontró una cantidad apreciable de ferúlico, a pesar de que se reportó un Rf de 0.41 (**Figura 44**)

Al usar la columna de celulosa se encontró que la mejor recolección fue por fases siendo la fase 1:1 diclorometano:hexano con un 95.27% de pureza de ácido ferúlico.

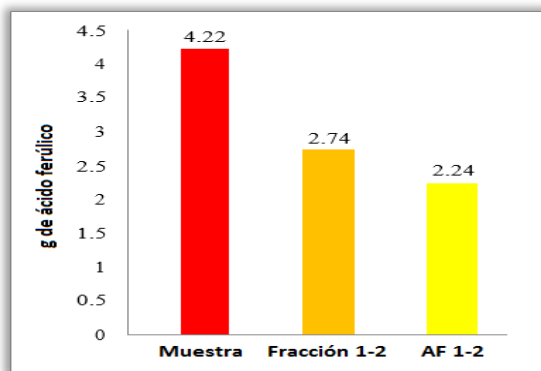


Figura 44. Cantidad de AF en las fracciones analizadas

Para la recuperación de arabinosilanos (Tabla 18), una vez que se realizaron las extracciones consecutivas de cada muestra se le adicionaron 30 ml de acetona con lo que se consiguió precipitar los arabinosilanos presentes, los cuales se dejaron sedimentar a temperatura ambiente y al alcance de la luz solar, recuperando 274.4 mg/L, con una proporción dentro de las impurezas de 39.2 %, y con un proporción dentro de la muestra de ácido ferúlico obtenido de la adsorción de 6.4 %, de un total de 13.8 % los cuales contienen otros dímeros u oligómeros.

Tabla 18. Cuantificación de arabinosilanos presentes en la muestra de ácido ferúlico al purificar.

Material Nejayote	Determinación de arabinosilanos					
	1	2	3	Promedio (mg/L)	D. Est	CV
	13.87	42.90	25.57	27.44	14.61	53.23

8.2. Análisis de resultados en la obtención de vainillina

Aunque en muchas ocasiones en el país se descartan muchos productos agroindustriales que tienen gran importancia a nivel mundial y que orgullosamente tienen su origen en el país, como es el caso de la vainilla, esta tiene una escasa participación en el mercado nacional para su consumo, así como para su apertura a un mayor mercado internacional, dado que no se le ha dado el interés que se pudiese esperar, por lo que, se deben de implementar medidas para maximizar su producción agroindustrial. Adicionalmente el aprovechamiento de los propios residuos de la post-cosecha, entre los que se cuentan principalmente, hojas y vainas de vainilla, debe optimizarse, dado que se pueden obtener sustancias de gran valor como la vainillina. En esta investigación al trabajar con métodos de recuperación a escala preparativa, como la adsorción – desorción en resinas como el Sepabeads, se han

recuperado buena cantidad de producto de interés, para que en un futuro se logre su escalamiento industrial, por medio de columnas de adsorción, lo cual hara posible su óptima recuperación, constatándose en los resultados que a continuación se enumeran.

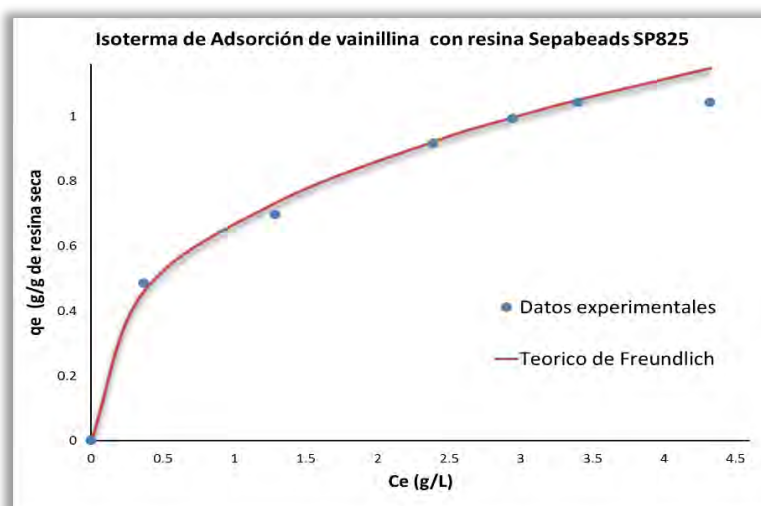
8.2.1. Elección del disolvente en la extracción por adsorción de vainillina

De acuerdo a las propiedades físicas de solubilidad de vainillina, el efecto de diferentes disolventes sobre la extracción de vainillina es mayor en disolventes polares como etanol, metanol y menos en el caso del disolvente no polar como hexano. Considerando su solubilidad se pensó en realizar la adsorción con el disolvente más apropiado, lo que de acuerdo a ciertas investigaciones (Jadhav *et al*, 2009) la extracción de vainillina a partir de residuos de vainas de vainilla curada es la máxima en etanol, siendo viable utilizar dicho disolvente óptimo para un rendimiento máximo de vainillina, sobre todo en el proceso de desorción en la resina Sepabeads. Por otro lado, la estructura de los grupos de vainillina se conserva en soluciones acuosas o que contienen bajos porcentajes de etanol (para el proceso de adsorción), de acuerdo a algunas investigaciones (Frenkel y Havkin-Frenkel, 2006), aparentemente la hidrofobicidad de los disolventes orgánicos mejora el apilamiento aromático propiamente de la vainillina. Sin embargo, cuando la vainillina se expone principalmente a un microambiente acuoso, puede haber una disminución en las interacciones de apilamiento de p-p. Además, las moléculas de agua que envuelven cristales de vainillina pueden formar enlaces de hidrógeno que unen moléculas vecinas de vainillina en un grupo. De este modo un ambiente acuoso aumenta la solubilidad de la vainillina y, en consecuencia, romper la estructura multimolecular de los agregados de vainillina.

Si consideramos ambos aspectos de solubilidad de la vainillina tanto en etanol como en agua, la extracción de vainillina a partir de residuos de vainas de vainilla curada está fuertemente influenciada por la concentración de etanol en agua. Cuando el porcentaje de volumen de etanol en el disolvente es inferior al 50% (v/v), la extracción aumenta con el aumento de la concentración de etanol. Sin embargo, más allá de esta concentración, cualquier aumento adicional es perjudicial para el proceso de extracción. Una solución 1:1 v/v de etanol/agua da como resultado la extracción máxima de liberación de vainillina a partir de residuos de vainas de vainilla curadas (la cual se realizó en un sonicador para una máxima efectividad). Esto puede atribuirse a una mayor polaridad de los disolventes que contienen agua, lo que facilita la solubilización de la vainillina.

8.2.2. Isotermas de adsorción de equilibrio por lotes de la vainillina

En principio se utilizaron isotermas de equilibrio para la adsorción de la vainillina del extracto proveniente de los residuos de las vainas de vainilla, a partir de soluciones en etanol-agua 1:1 v/v en la resina Sepabeads SP825 midiéndose y ajustándose al modelo Freundlich. En el sentido extraer la vainillina con una solución en las mismas proporciones de etanol agua, es porque se ha demostrado que ha dado como resultado la extracción líquida convencional máxima de liberación de vainillina, para lo cual se plantea a partir de residuos de vainas de vainilla curadas. Esta liberación de vainillina se puede atribuir a una mayor polaridad de los disolventes que contienen agua, lo que facilita la solubilización de la vainillina (Kappatos *et al*, 1996) y su mejor extracción por medio de la adsorción – desorción. La Figura 45 muestra las cantidades experimentales adsorbidas y desorbidas como una función de la concentración de fase líquida en equilibrio a temperatura ambiente y el respectivo ajuste al modelo de Freundlich.



C_e : concentración de equilibrio del adsorbato en la solución a granel

q_e : cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso seco de adsorbente en equilibrio

Figura 45. Isotermas de adsorción de vainillina en agua:etanol en el adsorbente Sepabeads SP825.

Tabla 19. Parámetros de equilibrio en la adsorción de la vainillina en la resina Sepabeads SP825.

Modelo	Parámetros		
Freundlich	N		2.690
	K_F	$(g/g_{resina\ seca}) (L/g)^{1/n}$	1.035
	$\sum_{i=1}^n (q_{exp} - q_{calc})^2$		0.010

El modelo de Freundlich se adapta bien a los datos experimentales, El modelado de la curva con el modelo de Freundlich en la obtención de vainilla tuvo un porcentaje de error del ajuste

relativamente bajo (1 %); por lo tanto, el ajuste de los datos experimentales con la ecuación teórica de Freundlich es adecuado.

Los valores de acuerdo a la **Tabla 19** de la capacidad relativa del adsorbente “K” de Freundlich son del orden de magnitud grande denotando una gran curvatura, lo cual implica una mayor capacidad de adsorción, en el caso, del valor del exponente de Freundlich “n” que indica la pendiente de la isoterma es también grande, por lo que, dado que “n” es mayor que 1 indica una adsorción favorable, generando que sea menos sensible para todo el intervalo de concentraciones (Duong, 1998). Dicho modelado también describe los mejores experimentos por lotes para concentraciones de equilibrio de la vainillina por debajo de 3.4 g/L, en la solución a granel. La cantidad de vainillina adsorbida por unidad de peso seco de resina en equilibrio fue de 1.04 g/g resina seca. Donde dados los lotes establecidos la mejor relación es 1:18; por cada gramo de vainillina se requiere 18 gramos de resina Sepabeads.

Tabla 20. Coeficientes de transferencia de masa, tiempos estequiométricos teóricos y experimentales y cantidades adsorbidas de vainillina para cada C_0 .

<i>Isoterma</i>	C_0 g/L	K_{FML} min ⁻¹	$T_{st, \text{teórico}}$ min	$T_{st, \text{exp}}$ min	$SD^*(\%)$	$q_{ads, \text{teórico}}$ g/g resina seca	$q_{ads, \text{exp}}$ g/g resina seca
<i>Freundlich</i>	0.40	0.030	114.30	113.50	0.79	1.0495	1.0412

(SD (%) corresponde a la desviación estándar entre el tiempo estequiométrico experimental y teórica)

$$SD(\%) = \frac{|t_{st_theor} - t_{st_exp}|}{t_{st_theor}} \times 100;$$

8.2.3. Modelización de adsorción de lecho fijo de vainillina

Dado que la matriz del extracto después de la sonicación aun contenía partículas finas que pueden bloquear el flujo del extracto a través del lecho fijo en la columna para su extracción, fue necesario eliminarlas, por medio de la centrifugación, decantación y filtración al vacío. Los ensayos de adsorción en lecho fijo con solución acuosa de vainillina se realizaron en un lecho de la columna de longitud de 30 cm y 6 cm de diámetro para un caudal de 5 mL/min. Se estudió la misma concentración de alimentación 1.1 g/L a temperatura ambiente para validar los modelos de isothermas obtenidas por estudios de equilibrio de lotes. Las condiciones experimentales y los resultados se resumen en la **Tabla 20**. El modelo matemático se ha indicado en la parte teórica y se llevó a cabo para describir los perfiles de rotura que se pueden conseguir para la vainillina, como otra forma de ajustar dichos resultados. Los parámetros del modelo matemático, la dispersión axial, difusividad molecular

y difusividad de poro efectivo se indican en la **Tabla 21**. Para el ensayo llevado a cabo, la k_{FML} se calculó como se refiere en la parte teórica y se definen en la **Tabla 20**.

Tabla 21. Resumen de avances de los parámetros de coeficiente de dispersión axial, la difusividad molecular del soluto y la difusividad de poro efectivo, utilizados en los perfiles de ruptura de las curvas adsorción desorción de la vainillina.

(Condiciones: Flujo de alimentación de 5 mL/min y una columna de 5,6 x 1 cm con porosidad de 0,35).

Compuesto	TK	D_{ax} m ² /min	$D_{m,i}$ m ² /min	$D_{pe,i}$ m ² /min
Vainillina	298	1.04×10^{-4}	4.95×10^{-8}	2.62×10^{-8}

Con el aumento de la concentración, la pendiente $\Delta q/\Delta C$ disminuye como resultado de una mayor k_{FML} y, por tanto, menores resistencias de transferencia de masa. Considerando los experimentos llevados a cabo para la vainillina a temperatura ambiente que es posible observar que k_{FML} aumenta linealmente con el aumento de la concentración con un coeficiente de correlación R^2 de 0,9892.

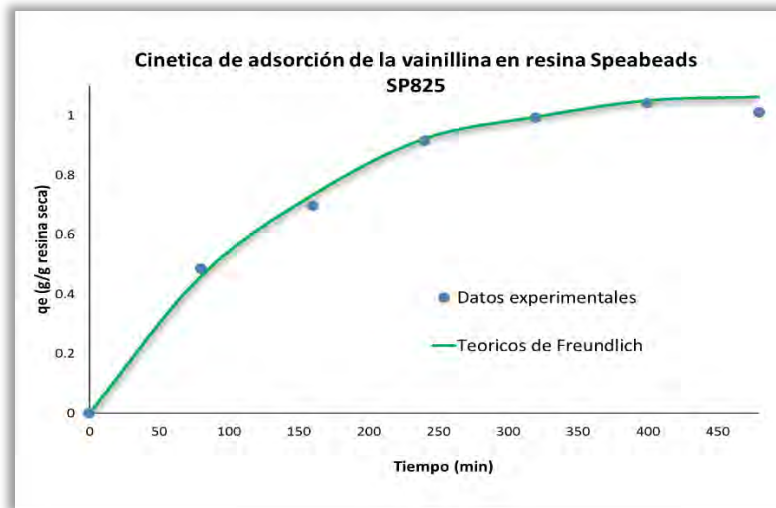


Figura 46. Concentración de la vainillina frente al tiempo en la salida de la columna de adsorción.

(Condiciones: Columna con resina Sepabeads SP825 para diferentes concentraciones de alimentación a temperatura ambiente y un caudal de 5 mL/min, en una columna de 30 x 6 cm y porosidad de 0,35. Puntos corresponden a los puntos experimentales y la línea para el modelado matemático con isoterma de Freundlich. El modelo de Flujo de dispersión axial se utilizó para ajustar las curvas de ruptura experimentales).

La **Figura 46** muestra los perfiles de concentración transitorios experimentales y predichos para la adsorción de la vainillina en solución acuosa sobre Sepabeads SP825 mostrado para el modelo de Freundlich respecto al tiempo de adsorción. Cada avance se modeló teniendo en cuenta el equilibrio de la isoterma de Freundlich obtenido y la aproximación FML para la transferencia de masa entre partículas. Los comportamientos previstos demuestran que el modelo matemático es considerado adecuado para describir los experimentos de lecho fijo.

8.2.4. Rapidez de adsorción-desorción de equilibrio en lecho fijo de la vainillina

La cantidad adsorbida experimental y el tiempo estequiométrico obtenido para el caso de la vainillina coinciden satisfactoriamente con los valores predichos con el modelo de Freundlich (Tabla 19). Los ensayos de lecho fijo con soluciones acuosas de vainillina se realizaron en un lecho de columna de longitud de 30 cm y 6 cm de diámetro para un caudal de 5 mL/min. Se realizaron estudios de desorción con etanol para los experimentos con vainillina a temperatura ambiente y concentración de alimentación 1.1 g/L. Después de eluir 9 h con el caudal, se desorbe aproximadamente 89.72 % de la cantidad inicialmente adsorbido de la vainillina. Además, el modelo de Freundlich describe adecuadamente los estudios de desorción realizado, ya que la curva teórica prácticamente coincide con los puntos de desorción experimentales. Es importante notar que el estudio de desorción realizado con etanol fue más rápido y dio lugar a una alta dilución de la solución final.

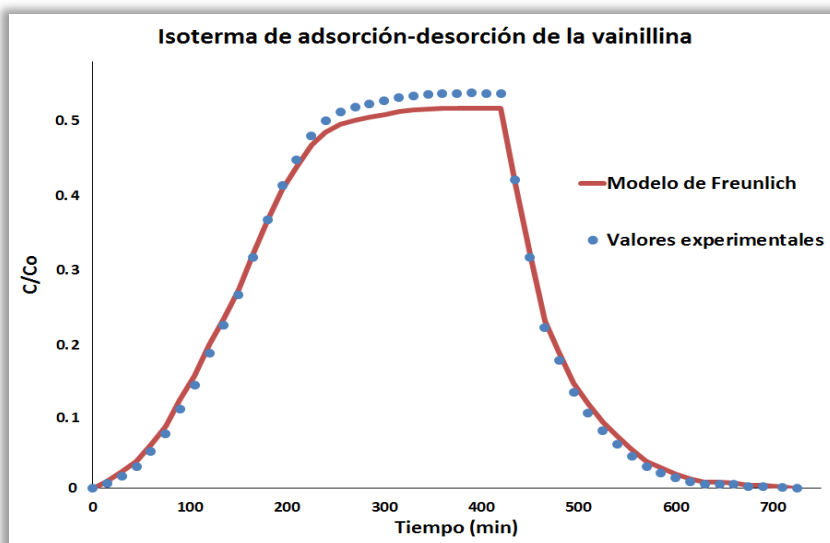


Figura 47. Concentración de la vainillina a través al tiempo durante el proceso de adsorción-desorción en la columna de adsorción.

(Condiciones: alimentación de 1 g/L sobre la resina Sepabeads SP825 y adsorción en agua y desorción con etanol a 293 K, caudal 5 ml/min. Los puntos corresponden a los valores experimentales, y las líneas de trazos (rojas) son las teóricas obtenidas con isoterma de Freundlich. $D_{ax} = 1.04 \times 10^{-4}$)

Para probar los resultados anteriores en la obtención de vainillina se tomó lectura de alícuotas en el espectrofotómetro cada 100 mL de los 4 L del extracto. Para todos los casos, se observó que no existía vainillina en la solución que había pasado por la cama de adsorción. Posteriormente, el sistema se conectó en vacío para permitir el secado de la columna. En esta ocasión se probó la desorción de la vainillina con etanol dada su gran

afinidad a este disolvente y en forma batch. Se cuantificó la cantidad de vainillina que se desorbía en el sistema en función del tiempo. La desorción de vainillina se logró con un porcentaje alto respecto al total, empleando 4 L de etanol.

Por lo tanto, se puede recuperar la vainillina y posteriormente vaporizar el disolvente para obtener el sólido, aunque dada la naturaleza de los disolventes las mezclas de estos muestran características azeotropicas, los cuales pueden mostrar un inconveniente a la hora de recuperar la vainillina dado que es semivolatil a la temperatura que se alcanza la separación de los líquidos, pudiendo obtener un rendimiento menor al óptimo. Como se puede ver en la [Figura 47](#), la forma de la curva de desorción es diferente de la curva de adsorción debido a la no linealidad del equilibrio de adsorción (frente dispersivo). Es importante notar que los estudios de desorción realizados con etanol fueron considerablemente más rápidos y dieron lugar a una alta dilución de la solución final obtenida. Teniendo en cuenta esto, la literatura existente muestra la ventaja de emplear disolventes orgánicos como agente de elución ([Wang et al, 2010](#)).

8.2.5. Rendimiento del extracto de los residuos de vainas de vainilla empleando el espectrofotómetro UV

Con base en el método de espectrofotometría UV-Visible, se prepararon disoluciones estándar y se determinó la absorbancia a 348 nm de todas las disoluciones. Dado que se tomó la absorbancia por medio a cada una de las muestras de los tubos obtenidos en el proceso de adsorción – desorción, se determinó la cantidad de vainillina presente en el extracto total empleado. Por lo que, con base en la concentración inicial de vainillina valorada en el espectrofotómetro de 1.1 g/L, la vainillina alcanzo con el proceso de adsorción – desorción una concentración al equilibrio de aprox. 0.987 g/L de lo extraído, de este modo, se evaluó con el análisis de la concentración en el espectrofotómetro una recuperación de 3.9 g de lo extraído de vainillina con un grado de pureza de 89.72 % de 400 g en base seca de residuos de vainas de vainilla, disueltos en 4 L de etanol: agua. En este trabajo, la capacidad máxima de adsorción de la resina Sepabeads SP825 fue 0.56 g/g_{resina seca}, un valor superior a los reportados en la literatura que emplean otras resinas no polares (que van desde 0,07 a 0,42 g/g). De entre todos, ([Zhang et al, 2008](#); [Jin y Huang, 2013](#)) informaron de las más altas capacidades de adsorción de 0,42 g/g y 0,36 g/g para la vainillina, respectivamente, que emplean resinas poliméricas reticuladas sintéticas. ([Michailof et al, 2008](#)) logró obtener capacidades máximas de adsorción que van desde 0,19 a 0,20 g/g,

utilizando carbón activado. (Z-abková *et al*, 2007) estudiaron la resina no polar de estireno divinilbenceno SP206, similar a la utilizada en este trabajo, pero con una menor área de superficie (556 m²/g), e informó de una capacidad máxima de adsorción de 0,12 g/g_{resina seca}.

8.2.6. Detección cualitativa y cuantitativa por HPLC de la vainillina.

Las cromatoplasmas de la Figura 48, corresponden a muestras a lo largo del proceso de adsorción en agua y desorción en etanol. Estos resultados indican que se detecta escasa cantidad de vainillina que no se adsorbió en la resina. Este resultado se puede comparar a los datos obtenidos en un experimento previo de adsorción - desorción con respecto a la concentración normalizada de la vainillina frente al tiempo en la salida de la columna de adsorción y, por otro lado, la identificación de la vainillina a lo largo del proceso de desorción, es concordante con los resultados obtenidos en la desorción visto anteriormente de aproximadamente 83-85% de la cantidad inicialmente adsorbida de la vainillina.

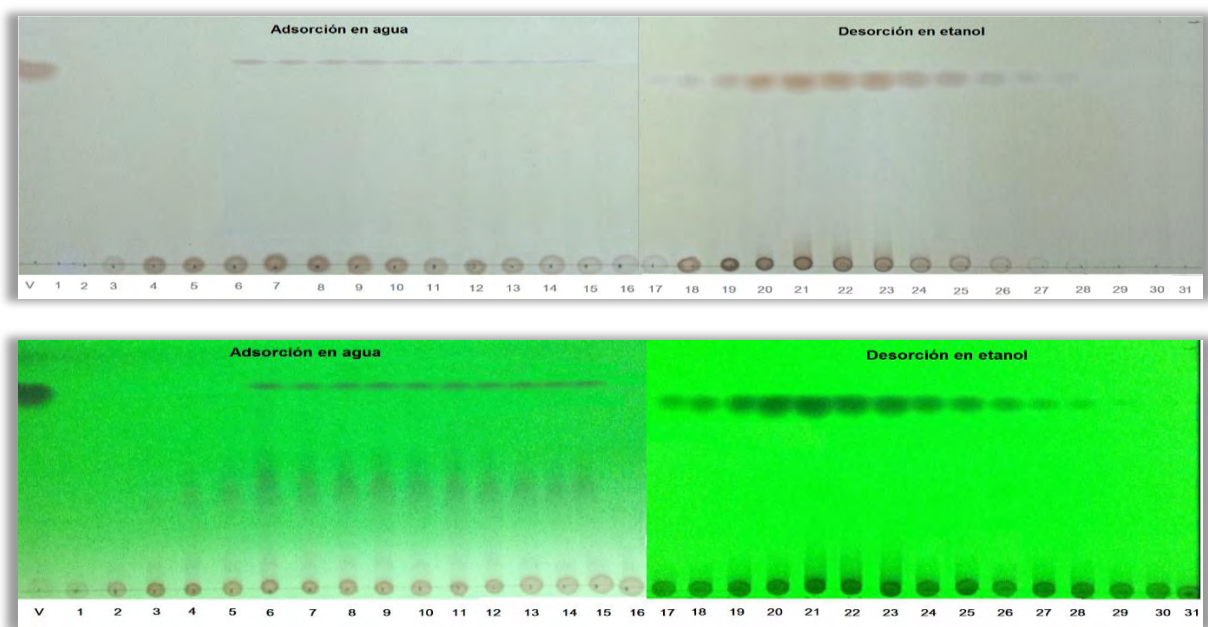


Figura 48. Cromatoplasmas de muestras obtenidas durante el proceso de adsorción – desorción de la vainillina en la columna de adsorción proveniente del extracto de vainas de vainilla con respecto a un estándar de vainillina (V). Las muestras se tomaron cada 15 min. Parte superior en revelador sulfato cérico e inferior en UV.

También se comparó con los resultados cualitativos de la CCF (Figura 49), donde el valor de R_f de la vainillina fue de 0,84. En dicha placa cromatográfica se compara la vainillina estándar con la vainillina (V) obtenida después de la desorción en Sepabeads. Con ello se

demuestra la única presencia de vainillina con escasas impurezas que son tratadas para un mayor rendimiento y comparadas con los resultados obtenidos en la identificación en HPLC.

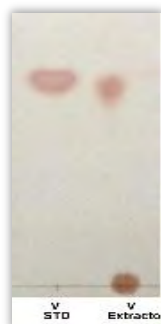


Figura 49. Identificación en la cromatopla de la vainillina extraída por adsorción – desorción.

El punto de fusión que se registró de la vainillina obtenida del extracto proveniente de los residuos de vainas de vainilla fue de 78 °C, el cual es menor al del estándar puro, que es de 80-83 °C, considerando que se debe a las mínimas impurezas presentes en el sistema de acuerdo al cálculo del área de los picos cromatográficos, esto debido al método de extracción por adsorción-desorción aumentando la pureza del extracto obtenido por cristalización de acuerdo a la metodología planteada fue de un 89.72 % a un 97.01 % donde la recuperación final fue de 3.78 g, es decir que por cada 100 g en base seca de residuos de vainas de vainilla se tienen 0.945 g (Tabla 22) si se toma en cuenta que la cantidad de vainillina por cada 100 g en base seca es de 1.1 g se tiene un rendimiento real de 85.90 %. Cabe señalar que durante el proceso de recuperación de vainillina después de la adsorción-desorción y antes de cristalización, se pudo haber perdido buena parte de la vainillina debido a la semi-volatilidad de la vainillina, aunado a los residuos o impurezas presentes que no se fueron identificados, dado que no se contemplaron dentro de los objetivos de este trabajo, sin embargo, a pesar de que existe variados reporte de los componentes que integran las vainas vainilla, se sugiere su estudio para futuras investigaciones, puesto que el estudio de la vainillina como precursor sigue siendo un tema de estudio muy amplio.

Tabla 22. Resultados de la recuperación de vainillina por adsorción, así como de su purificación y sus respectivos rendimientos reales

Por cada 100 de base seca			
Vainillina recuperada (g)		% de pureza	
De la adsorción	De la purificación	De la adsorción	De la purificación
0.975	0.945	89.72	97.01

La Figura 50 muestra los resultados obtenidos de la vainillina derivada de residuos de vainas de vainilla obtenida por el método de adsorción – desorción, en comparación con la vainillina estándar, donde el pico más prominente con tiempo de retención de 13.709 min (conversión de 99.61 %) para la vainillina estándar y 14.092 min (conversión de 97.01 %) para el extracto, por lo que el extracto de vainillina fue identificado por comparación con la vainillina estándar en 348 nm. Se observa que es casi igual el del extracto al del estándar, la variación es debido a un cierto grado de impurezas mínimo presentes en la vainillina extraída.

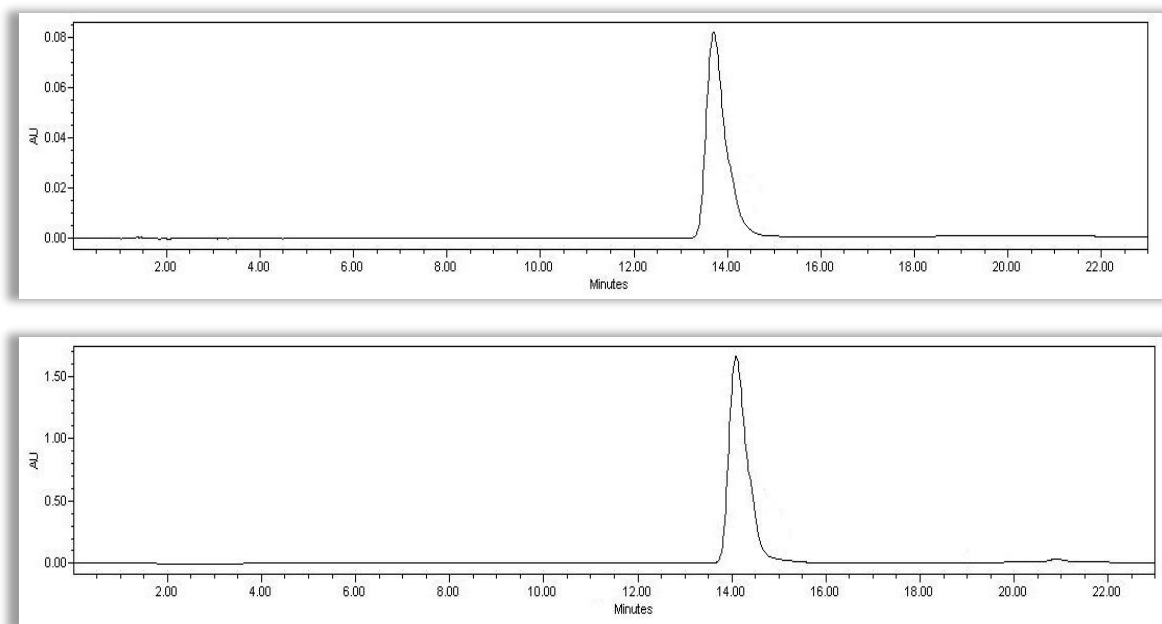


Figura 50. Cromatogramas de la vainillina estándar (superior) y de la vainillina obtenida por adsorción desorción de residuos de vainas de vainilla.

8.3. Análisis de resultados de la síntesis química de ácido ferúlico a partir de vainillina

Como se sabe y dado lo expuesto en la parte introductoria, la vainillina tiene un costo mucho más elevado comparado con el ácido ferúlico, del orden de unas 10 veces más, sin embargo, si el ácido ferúlico se sintetiza de la vainillina proveniente de residuos de vainas de vainilla, pudiese convertirse en un producto rentable desde el punto de vista económico. Por otro lado, la vainillina, tiene ya siglos de comercialización y difusión debido a las propiedades que la caracterizan, por lo que es más que obvio su alto valor agregado, no siendo así el ácido ferúlico que, aunque se descubrió hace poco más de un siglo, no fue sino hasta hace unas cuantas décadas que se comenzó a investigar y difundir la gran importancia que tiene como compuesto, sobre todo en beneficio de la salud humana.

Por tal motivo, para las síntesis de ácido ferúlico, se analizó que la condensación de Knoevenagel puede presentar ciertas variantes en función de la estructura química del producto a sintetizar con ciertas condiciones operativas (Loupy, 2003). Como es el caso de modificación de Doebner donde cambia uno de los reactivos, en vez de usar un éster, se desarrolla con un ácido carboxílico, además de que se usa un catalizador menos básico como es la piridina (amina terciaria aromática) respecto a la piperidina (amina secundaria cíclica) (Bruice, 2008; Heravi, 2014).

De este modo la propuesta de síntesis química que se presenta, parte de un aldehído aromático (vainillina) con un ácido carboxílico (ácido malónico) en la obtención de un derivado de ácido hidroxicinámico (ácido ferúlico), en presencia de una base como catalizador (como la piperidina, considerando la inserción de otras bases de origen amínico) y como medio de reacción un disolvente que mejore las condiciones de reacción como la piridina (considerando la inserción de otros tipos de disolventes químicamente más verdes).

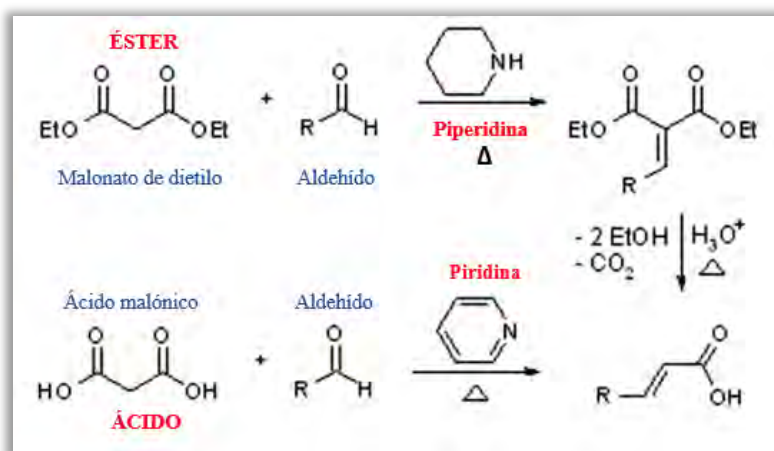


Figura 51. Comparación entre la Condensación de Knoevenagel simple y la misma con la Modificación de Doebner. (El Khatib *et al*, 2007).

Esto induce a que dicha condensación sea una modificación a la ya conocida reacción de condensación de Knoevenagel la cual se convino con la modificación de Doebner. Es decir, una modificación de Doebner presenta una descarboxilación y eliminación por efecto de una amina como catalizador como la piperidina, la trietilamina o el citrato de amonio, donde la reacción se produce entre un ácido mono o di-carboxílico con un aldehído alifático o aromático, en presencia de un medio de reacción como la piridina que comúnmente se está usando, pero con variantes como el dioxano. La piridina, entre otras, facilita la descarboxilación del compuesto. (El Khatib *et al*, 2007). En la Figura 51 se pueden observar

las diferencias para la variante de Doebner con respecto a la condensación de Knoevenagel. Dado lo anterior el proceso general propuesto consiste primero en que la base ataca al ácido en la posición del carbonilo y se forma un enol intermedio. Luego, el enol reacciona con la base para formar el carbanión que se estabiliza con el ácido débil. En seguida, el aldehído es atacado por el carbanión y el aldol resultante se produce en paralelo con la formación de una sal derivada de la base usada. Por último; La condensación aldólica final se da por la eliminación inducida por la base.

En las Figuras 52 y 53 se presenta la ecuación general y el mecanismo de reacción propuesto respectivamente, cuando la piperidina u otra base de origen amínico actúa como un catalizador orgánico, que implica la formación de una imina intermedia o su sal correspondiente, como receptor para la formación del carbocatión y carbanión, respectivos. Dada la ruta de síntesis química de la vainillina por el método de condensación malónica combinando parte del proceso de la condensación de Knoevenagel con la de Döbner tenemos la siguiente reacción generalizada, además se propone el mecanismo de reacción de la condensación malónica.

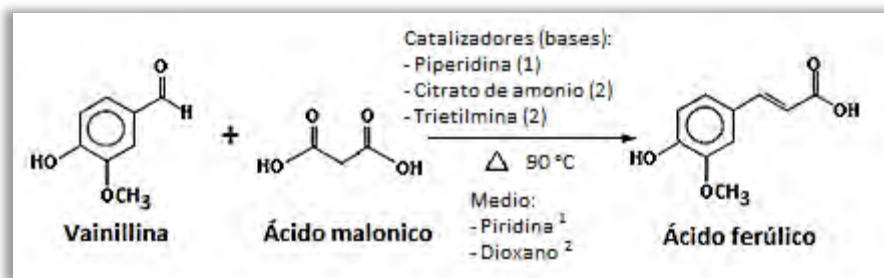


Figura 52. Ecuación general de condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina.

Del mecanismo de reacción propuesto que se ilustra en la Figura 44 se puede deducir que al agregarle al medio básico de reacción el ácido malónico, éste reaccionó con la base orgánica, tomando un protón del carbono α y con esto crear resonancia; el compuesto inicial pierde agua para dar lugar a un ion malonato. Después se adicionó la vainillina (benzaldehído) y se dejó calentar a reflujo hasta que la solución que era amarillo oscuro se tornó a clara, en este paso sucedió la reacción entre el malonato de etilo y el benzaldehído catalizado por la base orgánica para producir una sal amínica de ácido ferúlico, después se procedió a eliminar el medio de reacción y los residuos de vainillina que no reaccionaron por destilación.

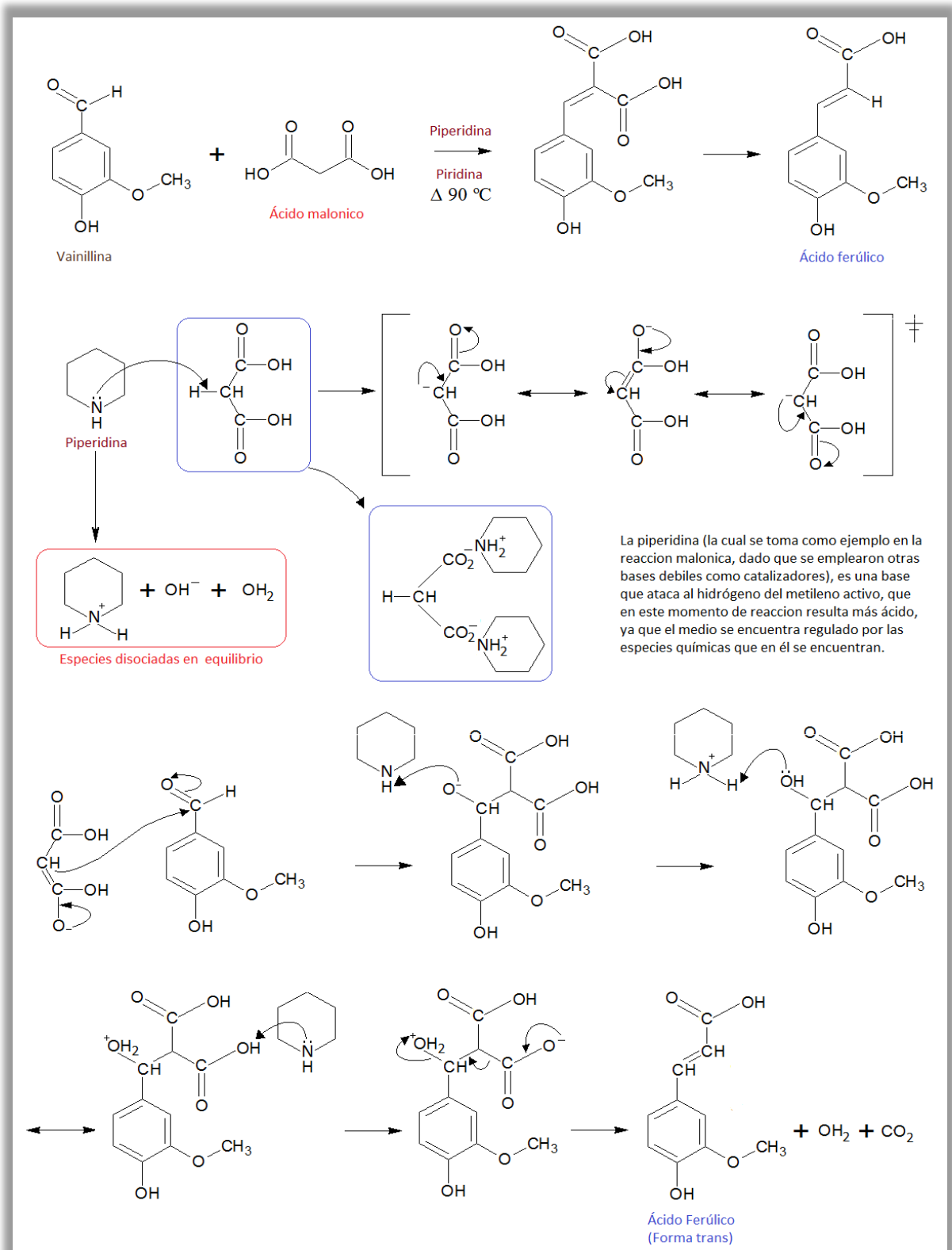


Figura 53. Mecanismo de reacción propuesto de la condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, empleando como ejemplo de catalizador la piperidina.

Fuente: Elaboración propia.

8.3.1. Resultados y análisis cualitativo en CCF de los catalizadores de prueba empleados en la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina

En la placa cromatográfica (Figura 54) solo las tres primeras síntesis químicas muestran que contienen ácido ferúlico pues la señal del estándar que tiene un Rf de 0.7 se presenta en todas ellas, además de que dado la coloración que se presenta con el revelador también muestran el mismo singular color, es decir, estas muestras presentan la misma señal correspondiente al ácido ferúlico. Sin embargo, al comparar individualmente cada corrimiento, la que presenta mayor cantidad de ferúlico es la realizada con vainillina y ácido malónico con piperidina como base orgánica catalizadora en un medio de piridina, (3er corrimiento de izquierda a derecha: VAM-PP), sin embargo, la placa revela la presencia de vainillina, por lo que se requiere optimizar las condiciones dadas. En el cuarto corrimiento, que es con trietilamina como catalizador en presencia de ácido malónico y vainillina (VAM-TEA), también hubo una buena cantidad de ácido ferúlico, no obstante, aún quedan trazas, aunque mínimas de vainillina. En el quinto corrimiento de la placa la cual se hizo con vainillina y ácido malónico en presencia de una nueva base como lo es el citrato de amonio dibásico (VAM-CAD), donde se observa que se forma ácido ferúlico, pero aún existe la presencia de los sustratos empleados. Las otras 4 síntesis muestran que no hay conversión química, es decir, las marcas mostradas con respecto al Rf de la vainillina muestran solo la permanencia de este sustrato sin formación de ferúlico. Las siguientes placas cromatográficas muestra los resultados obtenidos de la conversión química vainillina - ácido ferúlico.

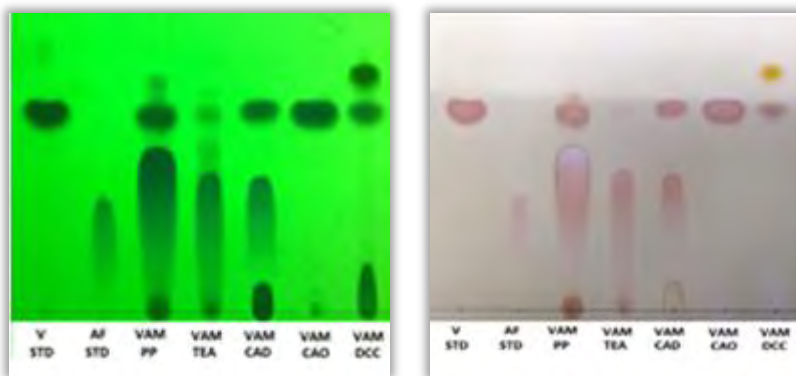


Figura 54. Placa cromatográfica de las síntesis químicas de ácido ferúlico. Donde se compara la vainillina estándar (V STD) y el ácido ferúlico estándar (AF STD) con las muestras en la identificación de ácido ferúlico. Cada corrida corresponde al catalizador empleado: piperidina (VAM-PP), citrato de amonio dibásico (VAM-CAD) trietilamina (VAM-TEA), oxido de calcio (CAO) y dicitohexilcarbodiimida (DCC). Lado izquierdo muestra la placa en UV y derecho con revelador de sulfato sérico.

Ya que el producto obtenido al filtrar se encontraba no protonado y ionizado y como se tenía en la forma de la sal amónica de ácido ferúlico (de acuerdo a las características del catalizador), y dado que es soluble en agua, se le agregó HCl para acidificar y de este modo protonarse y dejar de ionizarse, logrando precipitarse como ácido ferúlico (sólido o cristales muy finos de color blanco brillante), el cual se cristalizó y con ello se determinó el rendimiento de la reacción, siendo el ácido malónico el reactivo limitante.

8.3.2. Análisis de los catalizadores seleccionados para la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina

En las Figuras 55, 56 y 57 se muestran las gráficas de las principales reacciones de síntesis química de vainillina a ácido ferúlico, en dichas gráficas, se observa que a las condiciones descritas en la parte metodológica, presentan rendimientos positivos para una reacción malónica, en un tiempo aproximado de 6 horas, con los catalizadores empleado de piperidina, citrato de amonio y trietilamina, cabe mencionar que los dos primeros tienen rendimientos muy similares, con la única diferencia que la catalizada con citrato de amonio es más generosa con el medio ambiente y es la que se propone con respecto a la piperidina (ya reportada en la literatura).

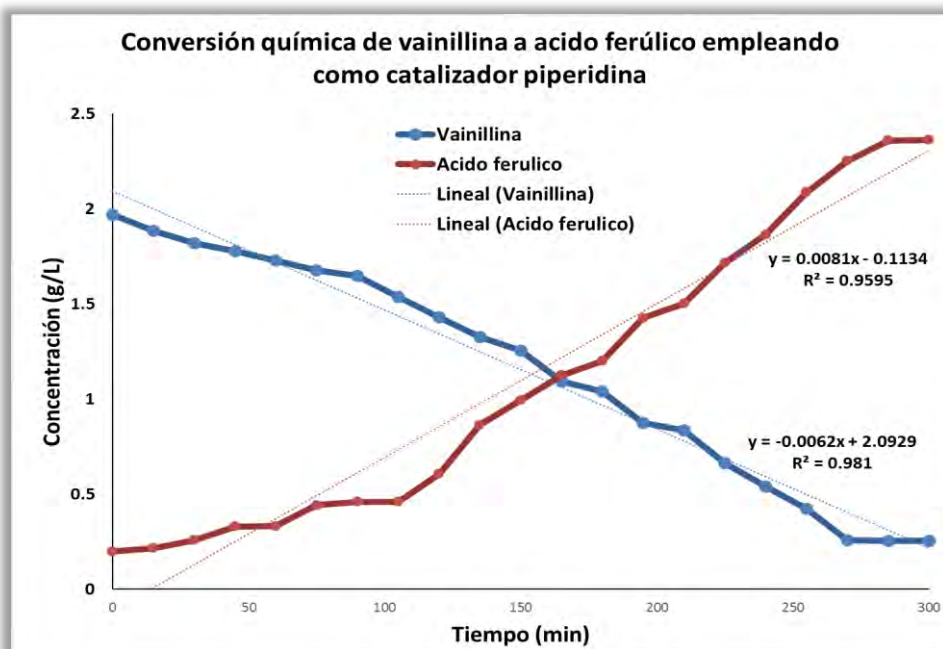


Figura 55. Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico para la síntesis química de ácido ferúlico, obtenida a partir de piperidina como catalizador.

Sin embargo, la catalizada con piperidina se buscó que dicho catalizador proviniese de un producto natural y poder hacerlo de este modo más generoso con el medio ambiente; para ello se extrajo de la pimienta negra, la piperina, una sustancia que en medio ácido puede pasar a formar la misma piperidina requerida, el cual se agregó a la mezcla de reacción ya acidificado por lo que dicho proceso funciono con dicha variante en la síntesis, proporcionando resultados positivos, vistos más adelante.

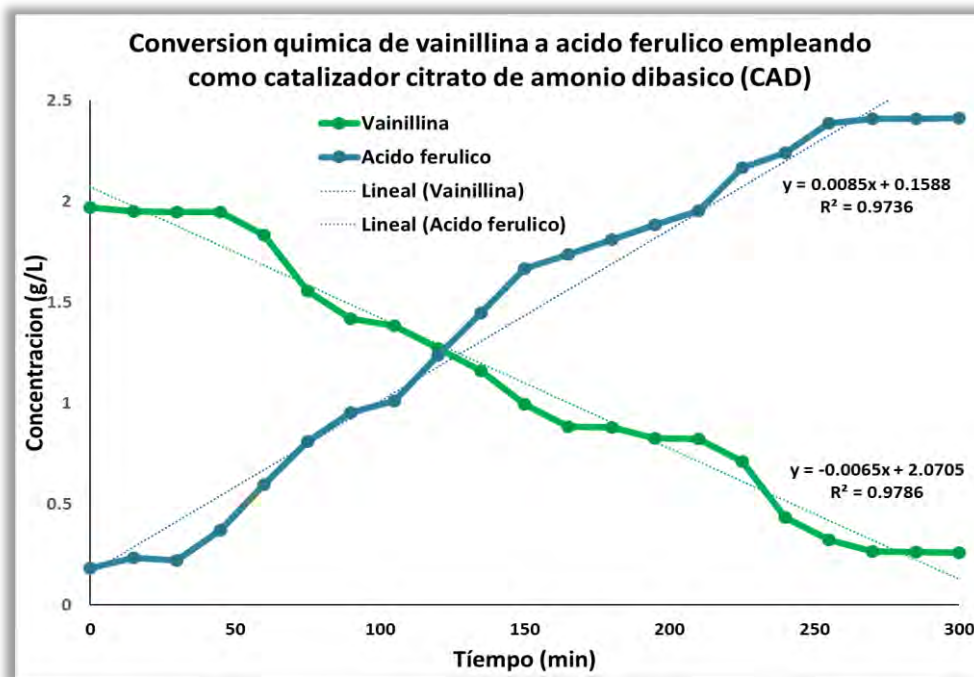


Figura 56. Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico para la síntesis química de ácido ferúlico, a partir de citrato de amonio dibásico como catalizador.

En el caso de la trietilamina (Figura 57) la reacción no se completó en el tiempo establecido en comparación con las dos reacciones anteriores, requiriendo mayor tiempo, por lo que se obtuvo menor rendimiento. Dado el uso de catalizadores como el citrato de amonio en la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina, se busca obtener una síntesis orgánica más ideal, acorde con los lineamientos actuales de sustentabilidad con una química más verde.

Como se puede apreciar en las gráficas de las Figuras 55, 56 y 57, el proceso cinético de reacción de la vainillina propicia la formación de ácido ferúlico, con los catalizadores empleados. De acuerdo a la regresión lineal de cada uno de los procesos de formación sobre todo de ácido ferúlico, el coeficiente de determinación o R-cuadrada tiene un valor elevados de 0.9595, 0.9736 y 0.9770 para el caso de los catalizadores empleados de piperidina, citrato de amonio y trietilamina respectivamente. Lo anterior indica que hay una fuerte correlación

entre las variables X y Y, es decir, la modificación del tiempo se ve afectado por la concentración de la reacción involucrada para la formación del producto, siendo R^2 elevada indica que nuestro modelo es confiable.

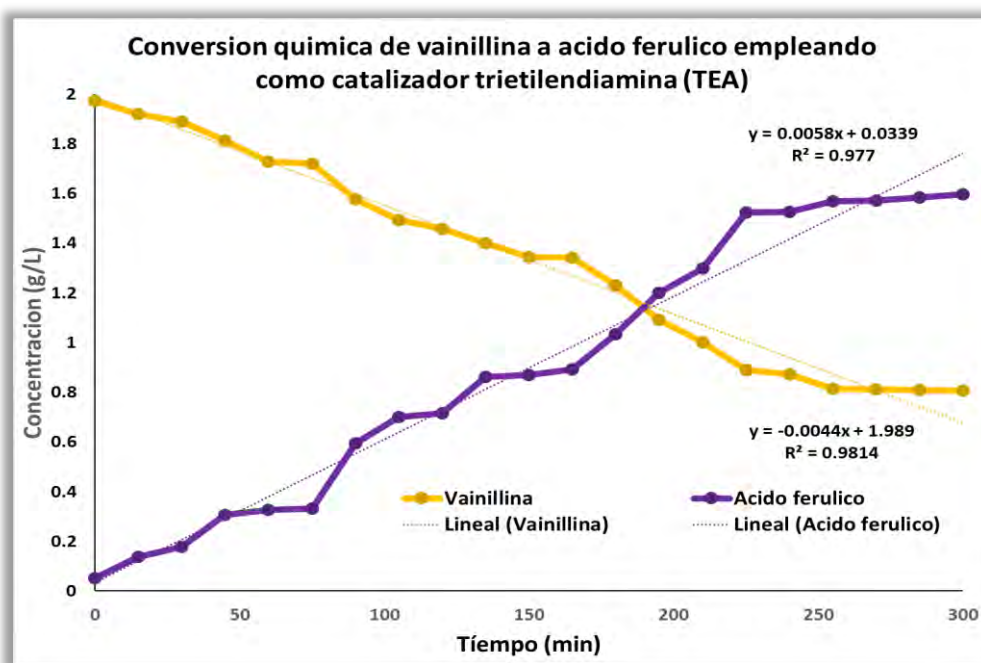


Figura 57. Cinética de reacción de la vainillina con ácido malónico para la síntesis química de ácido ferúlico, obtenida a partir de trietilamina como catalizador.

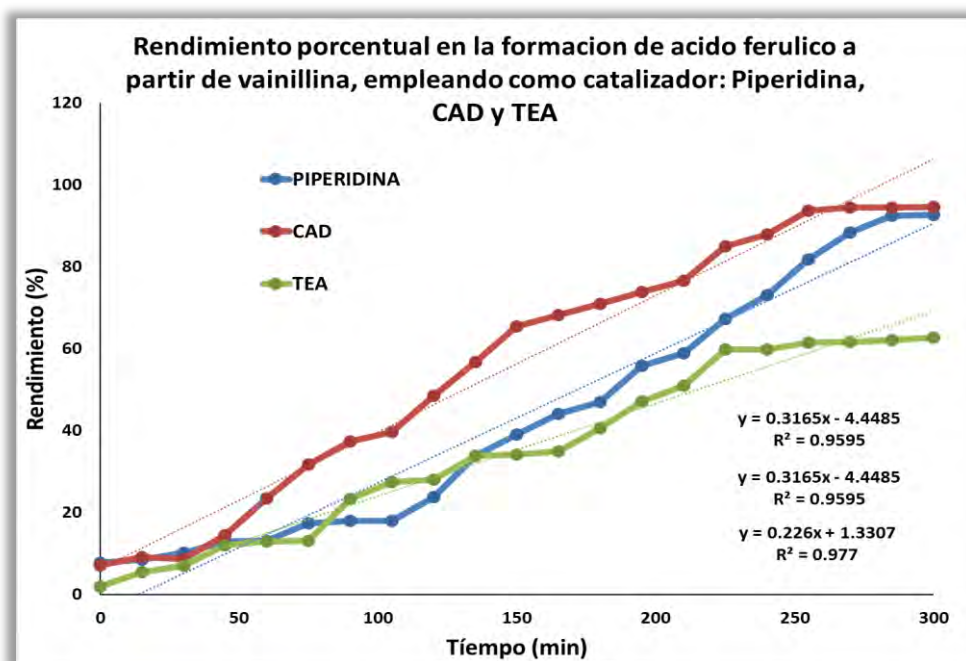


Figura 58. Rendimientos porcentuales con respecto al tiempo de la síntesis química de vainillina a ácido ferúlico con los mejores catalizadores químicos empleados.

La **Figura 58** muestran los mejores rendimientos empleando los catalizadores químicos en la conversión de vainillina a ácido ferúlico. Para ello se hizo uso de las absorbancias en intervalos de tiempo durante la reacción, los cuales nos proporcionan los respectivos rendimientos del ácido ferúlico con respecto al tiempo. De acuerdo a la estequiometría propuesta en la sección metodológica, el rendimiento ideal de ácido ferúlico es lo equivalente a 14.47 g y del cual se determinan los rendimientos reales y el respectivo ácido ferúlico recuperado, con los diversos catalizadores empleados (**Tabla 23**). Experimentalmente ya se tienen reportes con la piperidina como catalizador con mejoras de rendimiento de hasta 81-94 % (Pion, Reano, Ducrot y Allais, 2013; Heravy *et al*, 2014).

Los resultados obtenidos muestran que son muy similares los valores obtenidos con los catalizadores de piperidina y citrato de amonio, que son los que dieron mejores rendimientos. Sin embargo, estos resultados muestran una situación más ventajosa con el uso de citrato de amonio, ya que el uso de piperidina presenta ciertas desventajas, más si su manipulación no es la adecuada, dado que es fácilmente inflamable, puede provocar quemaduras al contacto con la piel, además de ser tóxico por inhalación propiciando esterilidad temporal; no se debe permitir el paso al sistema de desagüe pues contamina suelos y agua. Por otro lado, el citrato de amonio dibásico es más fácil de separar del producto de interés puesto que es muy soluble en agua, muy poco inflamable, se puede eliminar con agua en grado moderado, no se espera que este material sea bioacumulable significativamente, es un agente suave para su manipulación (se utiliza como agente de limpieza e inhibidor de corrosión, así como en fármacos), ligeramente peligroso ya que solo provoca irritación si su manipulación no es la adecuada y su color de almacenaje es verde

Tabla 23. Resultado de la síntesis química de ácido ferúlico recuperado y su rendimiento real.

<i>Catalizador</i>	<i>Ácido ferúlico recuperado (g)</i>	<i>Rendimiento real (%)</i>
<i>Piperidina</i>	13.39	92.59
<i>Citrato de amonio dibásico</i>	13.67	94.5
<i>Trietilamina</i>	9.05	62.60

8.3.3. Identificación y conversión por HPLC de vainillina a ácido ferúlico por síntesis química

La detección simultánea por HPLC de vainillina y ácido ferúlico, permite denotar, la cantidad de vainillina que reaccionó y el rendimiento respecto a la formación de ácido ferúlico (Hingse,

2014). La identificación del ácido ferúlico con la metodología empleada en los cromatogramas para el ácido ferúlico estándar es de 19.437 min (Figura 59), y en las reacciones químicas se obtuvieron a 18.989 min (Figura 60), 19.248 min (Figura 61) y 19,479 min (Figura 62), para las síntesis de ácido ferúlico, con los catalizadores de piperidina, citrato de amonio dibásico y trietilamina respectivamente, inyectados por triplicado al HPLC, razón por la cual los dos primeros catalizadores muestran una muy buena disposición en la identificación de ácido ferúlico y en el caso de la trietilamina es la más próxima al tiempo de retención del ácido ferúlico estándar.

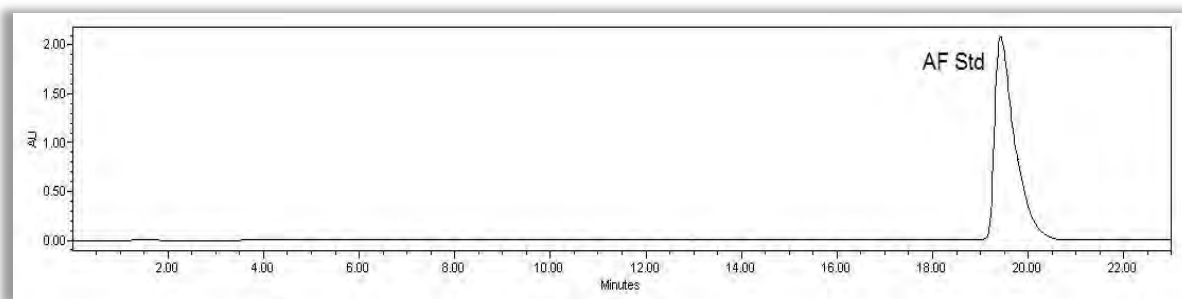


Figura 59. Cromatograma de ácido ferúlico estándar (AF Std)

Datos reportados por Graf sobre la condensación del ácido malónico con vainilla en presencia de catalizador quinolina a 80 °C por 8 horas produce ácido ferúlico con un rendimiento teórico de 50.3 %. Vorsatz mejoró este rendimiento a 73% llevando a cabo la condensación a temperatura ambiente por 3 semanas (Graf, 1992). Por otro lado, analizando los cromatogramas respectivos y comparando con los resultados obtenidos en las gráficas respectivas, para el caso en el que se utilizó como catalizador citrato de amonio dibásico a 90 °C por 6 horas se obtuvo una conversión de 97.71 % solo comparable al que se obtiene con el catalizador de piperidina que fue de 97.28 % y de trietilamina en menor proporción de 21.31 %, en el mismo tiempo y temperatura de reacción.

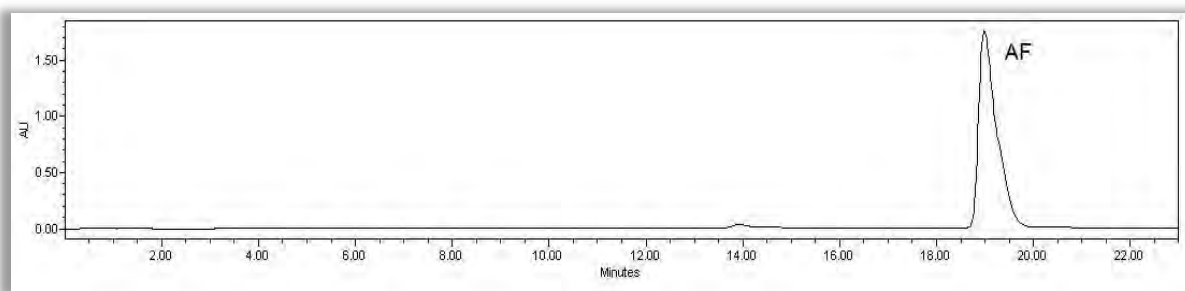


Figura 60. Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina.
Catalizador: Piperidina

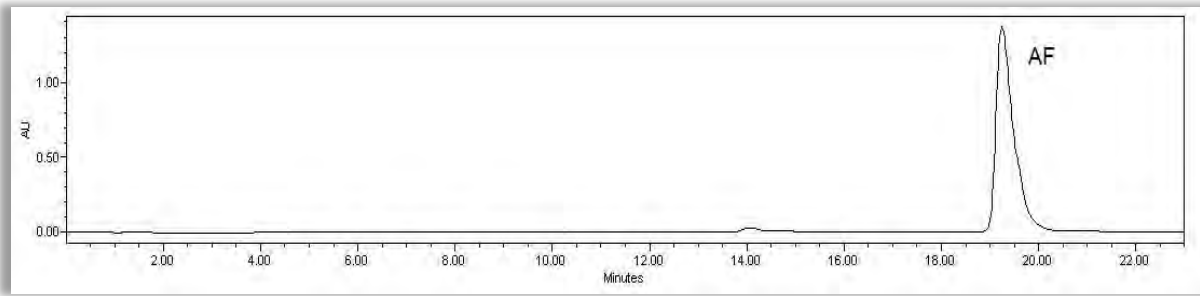


Figura 61. Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina.
Catalizador: citrato de amonio dibásico.

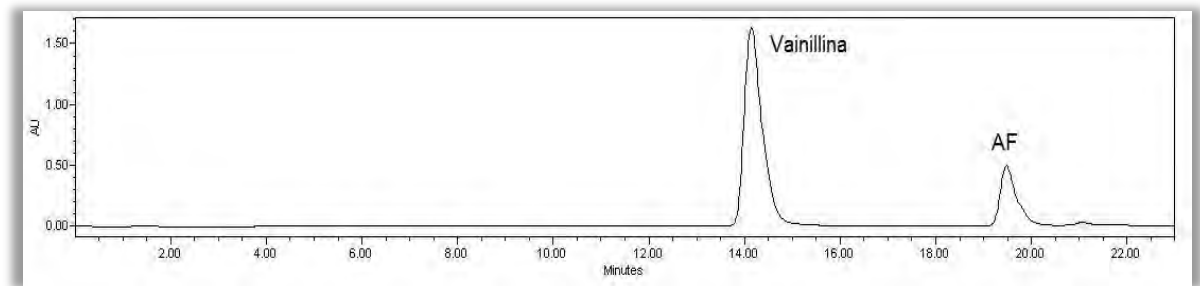


Figura 62. Cromatograma de la síntesis química de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina.
Catalizador: trietilamina (TEA).

8.4. Análisis de resultados de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina.

El ácido ferúlico generado de procesos químicos no puede ser considerado como natural. Sin embargo, se puede obtener mediante síntesis química más amigable con el medio ambiente. Otra particular forma de obtener el ácido ferúlico considerado específicamente natural es mediante el empleo de la promiscuidad catalítica enzimática, la cual se puede dar en muchas hidrolasas, en especial proteasas y lipasas a partir de otras fuentes naturales como es el caso de la vainillina obtenida de residuos de vainas de vainilla.

En un medio de reacción adecuado la promiscuidad catalítica de hidrolasas, propician la catálisis de las reacciones de condensación, muy contrario a la que comúnmente se promueve en la hidrólisis. Sin embargo, es importante dentro de este análisis entender que la distribución del agua en un sistema de reacción enzimática, tiene dos tipos de agua: el agua libre y el agua ligada: El agua ligada, es el agua que por puentes de hidrogeno o fuerzas intermoleculares logro quedarse unida o lo suficientemente arraigada a las enzimas. El agua esta tan ligada por puentes de hidrogeno que la remoción de esa agua requeriría cantidades

elevadas de temperatura que propiamente la enzima empezaría a sufrir modificaciones químicas. El agua que no está ligada a la enzima se le llama agua libre o disponible; es disponible porque es el agua que se va a utilizar para propiciar las reacciones enzimáticas. Esa agua disponible, es el agua que nos crea la disponibilidad de propiciar las reacciones enzimáticas que van a degradar o en nuestro caso propiciar la síntesis del ácido ferúlico. La suma del agua ligada con la del agua libre o disponibles es lo que da el agua total del sistema, es decir, el porcentaje de agua, de humedad o de contenido de agua en el sistema, por lo que el término de actividad de agua (A_w) se refiere únicamente al agua disponible o libre para que se den reacciones microbiológicas o para que se den las reacciones enzimáticas. La actividad de agua es un parámetro dimensional que va de 0 a 1, siendo 1 el valor de actividad de agua del agua pura y se define como la medida del estado de energía del agua en un sistema.

$$A_w = \frac{P_{sistema}}{P_{agua\ pura}^o} = \frac{l_w}{x_w} = \frac{HR}{100} = \frac{m_a}{m_a + m_s}$$

Donde P es la presión de vapor de agua en el sistema o matriz, P^0 es la presión de vapor de agua pura, l_w es el coeficiente de actividad del agua, x_w es la fracción molar del agua en la fracción acuosa, HR es la humedad relativa, m_a = moles de agua (g/18) y m_s = moles de soluto (g/pm). Por lo anterior, el contenido de agua o agua total del sistema, se considera un factor muy importante en la reacción enzimática porque afecta la selectividad y actividad de las enzimas. El control de este parámetro demostró ser vital. Por lo que, se asentó en este diseño experimental el medio de reacción más adecuado, de acuerdo a lo ya reportado (Jian-Ping *et al*, 2013). Para optimizar el porcentaje de agua o de agua total en la reacción de condensación malónica catalizada por las principales hidrolasas, existen diversas técnicas de análisis para la obtención de actividad de agua o agua libre, que se basan en conceptos de psicrometría, higrometría mecánica y eléctrica, mediciones del punto de rocío, conductividad térmica, índice de refracción, mediciones de presión y volumen entre otros. Sin embargo, también existen programas que calculan con valores estimados el valor de actividad de agua. El programa Moisture Analysis Toolkit 1.0, se empleó para determinar la actividad de agua dependiente del origen de la enzima ya sea proteasa o lipasa, de su cantidad empleada en la reacción (75 mg) y de la cantidad de agua agregada al medio (0.15 mL) e independiente del disolvente con el que se mezcló MeCN (0.85 mL). De este modo la actividad de agua o agua libre en donde se empleó la lipasa de ricino fue de 0.97 y de las proteasas de papaína y pepsina de 0.93. En las actividades de agua superiores a 0.8 ocurren

cambios químicos como reacciones hidrolíticas, oxidación lipídica y actividad enzimática. En sistemas con actividad de agua media, ocurren reacciones enzimáticas, hidrolíticas y oxidación lipídica, aunque en menor proporción. Los sistemas con actividad de agua por debajo de 0.4 son estables a casi todos los cambios químicos excepto la oxidación lipídica. El entorno catalítico donde participa la cantidad de agua libre, tiene una gran influencia en el producto que se requiere de interés, dado que por ejemplo las lipasas, en medios acuosos, propician la generación de reacciones de hidrólisis y en medio de reacción completamente orgánicos, generan reacciones de esterificación, solo por contar algunas de sus más importantes reacciones conocidas, por lo que la influencia del medio de reacción es fundamental para la obtención del producto deseado (ácido ferúlico) además de los sustratos que propician su síntesis. Lo anterior es base de un estudio más profundo y de un reconocimiento molecular en la interacción enzima sustrato, con su entorno catalítico. En la investigación inicial de la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina, se utilizó la reacción malónica modificada entre vainillina y el ácido malónico como reacción modelo (Figura 63).

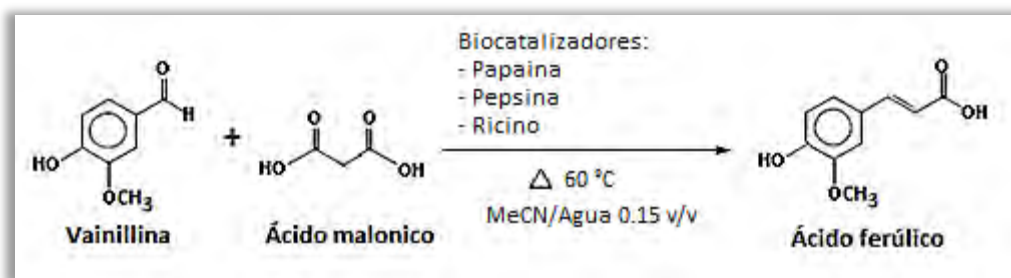


Figura 63. Ecuación general de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico a partir de vainillina.

Del mecanismo de reacción propuesto que se ilustra en la Figura 64 es una aproximación de la función que siguen las hidrolasas, siendo un símil del mecanismo de reacción de la síntesis química, salvo que el catalizador es una hidrolasa considerada enzima promiscua. El sitio activo de la enzima reacciona en un entorno catalítico adecuado formado por una parte orgánica (MeCN) y una actividad de agua determinada, tomando un protón del carbono α del ácido malónico y con esto crea resonancia en el ácido malónico, dando lugar a un ion malonato, el cual se convierte en un nucleófilo que ataca al carbono más desprotegido de la vainillina, en este caso al del grupo funcional aldehído, propiciando de este modo la formación del ácido ferúlico.

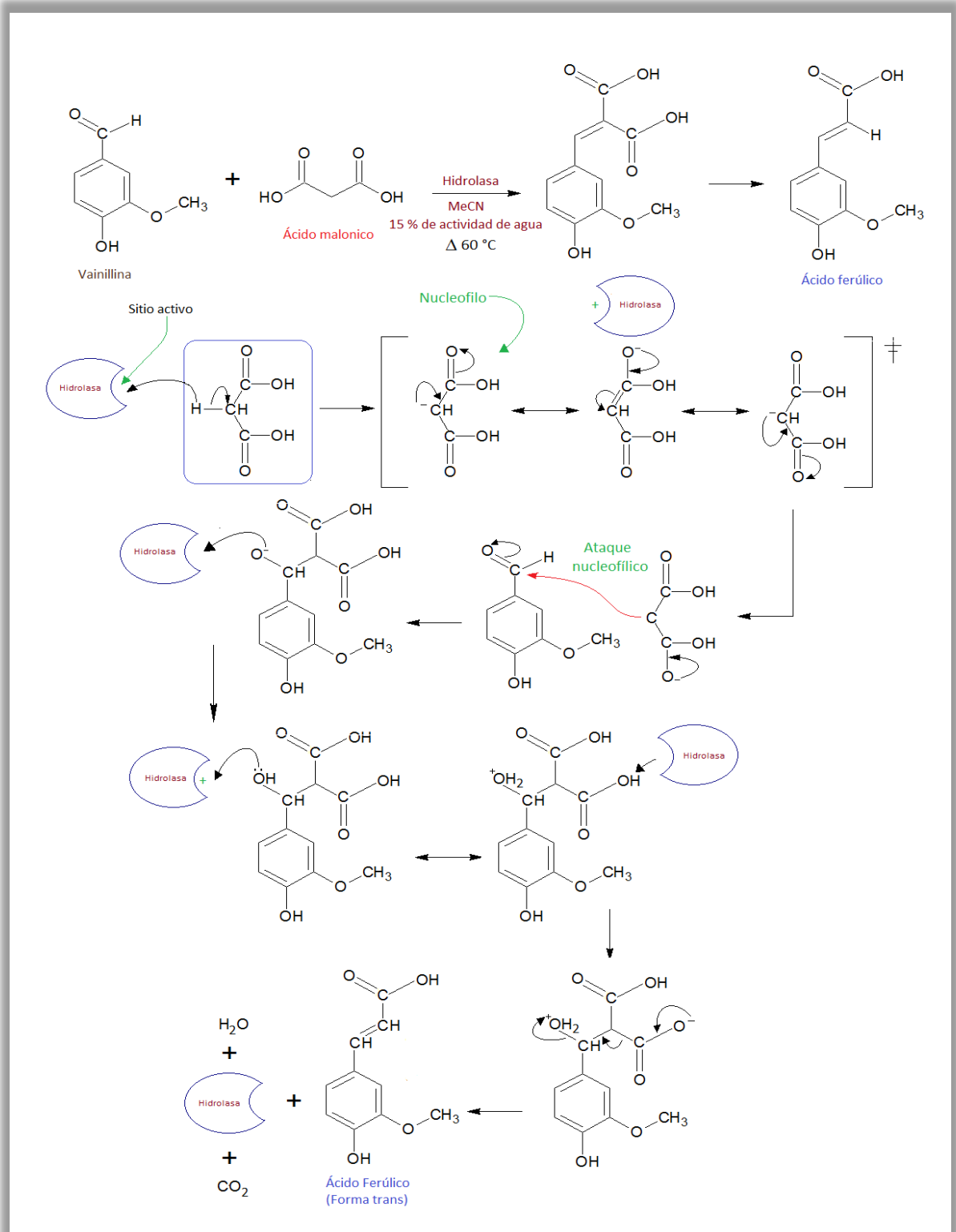


Figura 64. Mecanismo de reacción propuesto de la condensación malónica para la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, empleando hidrolasas como lipasas y proteasas como enzimas promiscuas. Fuente: Elaboración propia.

Para la síntesis de ácido ferúlico a partir de vainillina se propuso evaluar diversas hidrolasas disponibles en un screening con proteasas, lipasas y neutrasas, y determinar de este modo las mejores enzimas que pudiesen dar mejores rendimientos. Las bioconversiones usaron concentraciones de vainillina en el rango de 0.20 a 2.0 g/L de acuerdo a la cantidad estequiométrica de 0.5 mmol visto en la sección metodológica y se realizaron para evidenciar la ocurrencia posible de inhibición por exceso de sustrato, así como para seleccionar el mejor rango de concentraciones, la temperatura más adecuada y pH para futuras aplicaciones y buscar una mejor optimización. Dado que el entorno catalítico de las reacciones enzimáticas ha sido reconocido como uno de los factores más importantes que influyen en las reacciones enzimáticas, estos pueden dar mejores rendimientos estereoselectivos. (Jian-Ping *et al*, 2013). Por lo que, para mejorar la selectividad, se seleccionó como porción orgánica el MeCN y la actividad de agua dependiendo de la enzima para la reacción malónica biocatalizada.

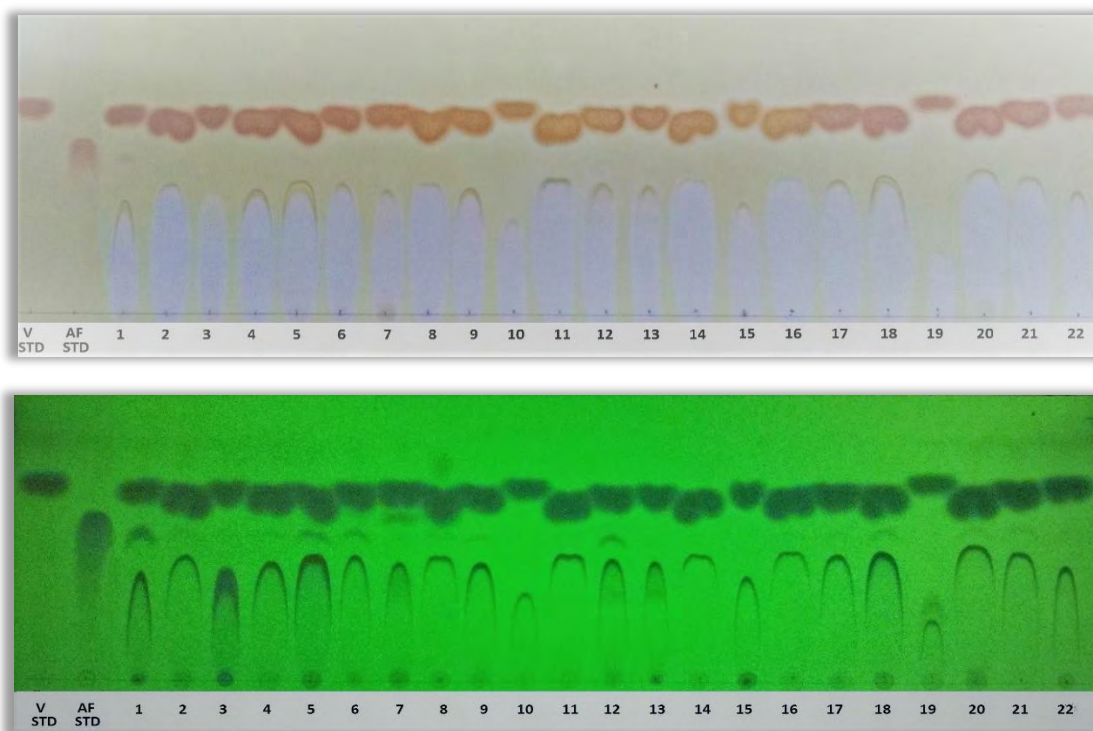


Figura 65. Cromatoplasmas (arriba por revelador de sulfato cérico y abajo por UV) de un screening de diversos biocatalizadores o enzimas (proteasa, lipasas y neutrasas) con numeración en las corridas del 1 al 23 en el proceso de condensación de la vainillina y ácido malónico en la obtención de ácido ferúlico a las 72 horas.

En la **Figura 65** se muestran las cromatoplasmas que denotan los resultados cuantitativos de las diversas hidrolasas disponibles (de las cuales solo se identificarían completamente si

mostraban resultados positivos), en comparación con los estándares de ácido ferúlico (AF Std) y vainillina (V Std). Se puede observar, que los mejores resultados en la cromatoplaaca se muestran en la cromatoplaaca revelada en UV, donde las corridas: 1, 5, 6, 9, 12 y 18, correspondientes a las enzimas de: papaína, pepsina de mucosa de cerdo, Depol-670L, lipasa de ricino, Depol-740L y lipasa tipo VII (de cándida cilindrase), respectivamente.

En menor proporción se observaron las corridas con las numeraciones: 2, 17, 20 y 21 que corresponden a las enzimas de: bromelaina, lipasa tipo II, neutrasa PWM10063 y lipozima comercial L9031, respectivamente, el resto de las enzimas no mostraron ninguna mancha en su corrida respectiva, por lo que no se consideraron. Las enzimas que aun en la cromatoplaaca revelada con sulfato cérico en la cual se distinguen menos las manchas, son norias las enzimas en las corridas: 1, 5 y 9, que como se mencionó corresponden a las enzimas de: papaína (proteasa), pepsina de cerdo (proteasa) y lipasa de ricino.

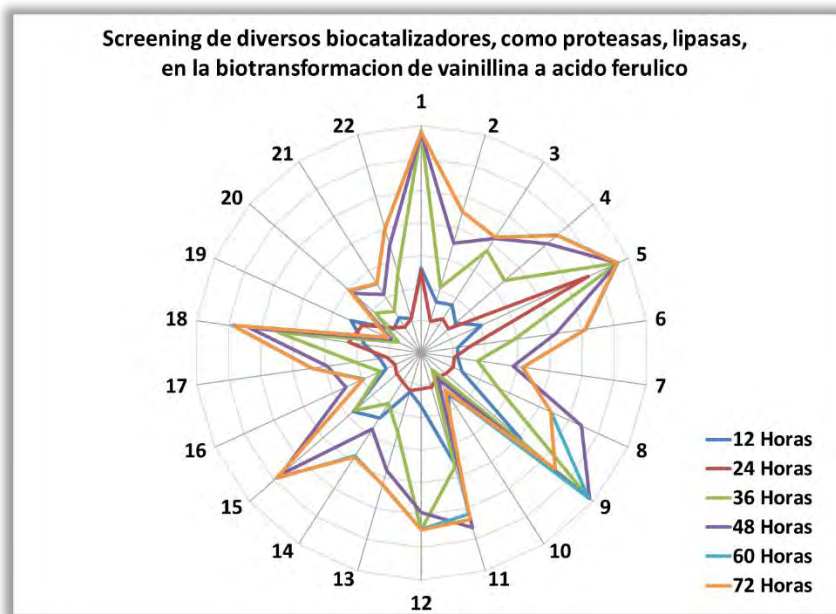


Figura 66. Análisis estadístico del screening de diversos biocatalizadores o enzimas (proteasas, lipasas y neutradas), en el proceso de hidrólisis de la vainillina y ácido malónico en la obtención de ácido ferúlico, después de 72 horas.

Para corroborar los resultados provistos en las placas cromatográficas de la [Figura 65](#), se recurrió a hacer un análisis de concentraciones de ácido ferúlico formado, por medio de sus absorbancias en el espectrofotómetro, tomando lecturas de cada una de las muestras cada 12 horas (72 horas en total; 6 lecturas por muestra), por lo que al ingresar los datos respectivos en una hoja de Excel, se planteó que dada la cantidad de enzimas, se recurrió

al cálculos estadísticos en una gráfica circular (Figura 66). Donde se puede observar de acuerdo al tiempo transcurrido que los picos más prominentes o sobresaliente en la gráfica circular corresponden a los mejores resultados que los mejores resultados comparados con los vistos en las cromatoplasmas están las enzimas en las corridas: 1, 5, 8, 9, 11, 12, 15 y 18, correspondientes a las enzimas: papaína, pepsina de mucosa de cerdo, Novozyme 435, lipasa de ricino, ficina, Depol 740-L, lipasa comercial, lipasa tipo VII (proveniente de *Cándida cylindracea*), respectivamente.

Tabla 24. Principales enzimas relacionadas en las cromatoplasmas con respecto a la gráfica circular. En letra azul se indican las enzimas con mayor formación de ácido ferúlico en menor tiempo y con más notoriedad en las cromatoplasmas.

Numeración de la corrida	Clave propuesta	Enzima
1	P-INA	Papaína
5	P-SME	Pepsina de cerdo
9	R-ICV	Lipasa de ricino
12	A-BSA	Depol-740L
18	L-ITS	Lipasa tipo VII (<i>Cándida cylindracea</i>)

Esto hace notar que, si se compara con los resultados obtenidos en las corridas vistas en las cromatoplasmas, se consigue conjugar que las mejores corridas están en 1, 5, 9, 12 y 18, sin embargo, los que dieron mejores resultados en menor tiempo fueron las corridas 1, 5 y 19, que se identifican con una clave propuesta como: P-INA, P-SME y R-ICV siendo las enzimas de papaína (proteasa), pepsina de cerdo (proteasa) y de ricino (lipasa) respectivamente (Tabla 24).

8.4.1 Optimización de los biocatalizadores seleccionados en la biosíntesis de ácido ferúlico.

Ya realizado el análisis de los mejores biocatalizadores seleccionados básicamente se procedió a realizar las pruebas planteadas con el fin de lograr mejores resultados.

8.4.1.2. Efecto de la temperatura y pH a distintas proporciones de biocatalizador con respecto al tiempo

Las Figuras 67, 68 y 69 muestra las gráficas de los efectos simultáneos de temperatura y el tiempo de reacción en la bioconversión de vainillina a ácido ferúlico. Se observa también la influencia de los biocatalizadores seleccionados, cada uno de ellos se hizo con tres

proporciones distintas de enzima, donde se tienen en una proporción propuesta, una con el doble de proporción y otra con el triple de proporción, lo anterior con el fin de determinar la mejor cantidad de biocatalizador a una temperatura dada. Siguiendo con lo observado en la gráfica de la **Figura 67**, la enzima P-INA (papaína) es la que mantiene la mayor proporción de formación de ácido ferúlico (0.0124 g/L) a partir de las 24 horas con el triple de proporción del biocatalizador, aunque en las otras proporciones donde actúa la papaína a las 72 horas existe una relevante formación de ácido ferúlico (entre 0.0138 g/L) Para el caso de la P-SME (pepsina de cerdo) que esta después del rendimiento con papaína, existe una formación de ácido ferúlico (aprox. 0.009 g/L) a partir de las 12 horas, sin mayores cambios en la proporción propuesta y doble, y en la triple proporción de P-SME tardo en la formación de mayor cantidad de ácido ferúlico (aprox. 0.01 g/L) a partir de las 48 horas, de lo cual no hubo mucha variación, salvo por que se formó aproximadamente la misma cantidad en 24 horas menos. A la temperatura fijada de 40 °C, se tiene que la influencia del biocatalizador R-ICV (Lipasa de ricino), es mucho menor que los vistos con las anteriores enzimas, incluso se observa que la formación de ácido ferúlico va disminuye con respecto al aumento de la proporción de dicha enzima de 0.007 g/L a 0.01 g/L, probablemente la temperatura a la que se encuentra (40 °C) afecta la solubilidad de los distintos solutos y por la disminución de la actividad del agua, al aumentar la proporción de la lipasa de ricino.

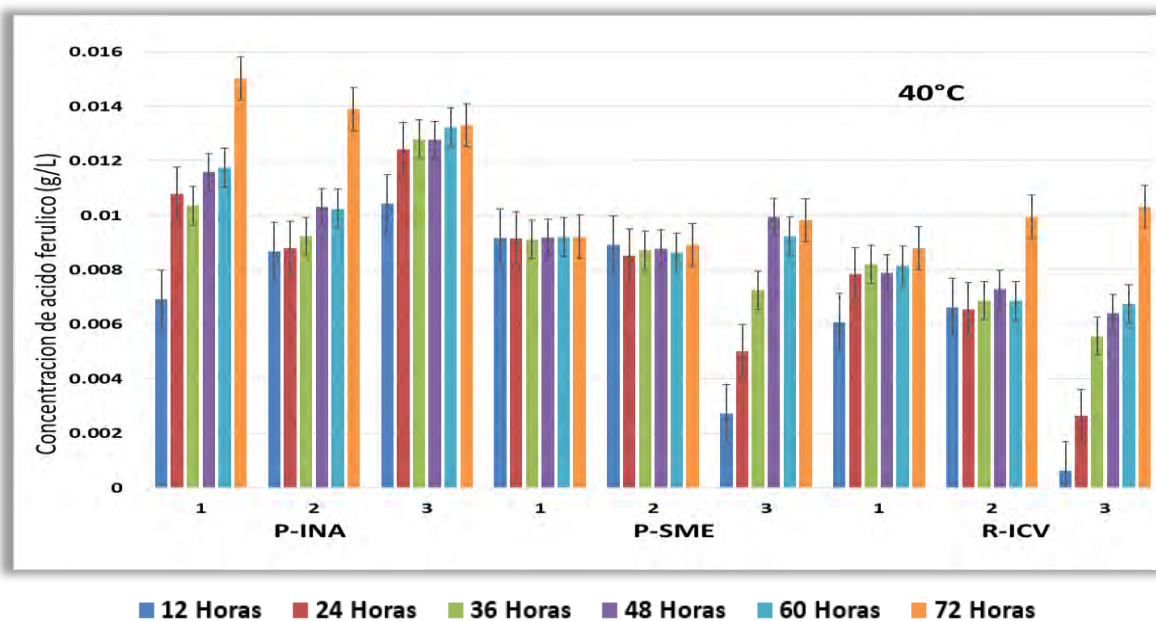


Figura 67. Influencia de la proporción del biocatalizador seleccionados en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina, con respecto al tiempo y a 40 °C de temperatura para optimización del producto.

En la **Figura 68**, se muestra un aumento de temperatura a 50 °C, la cual mejoro las proporciones de formación de ácido ferúlico, con respecto a cada una de las enzimas seleccionadas, incluso la P-SME a las 72 horas supero a la P-INA, con el triple de proporción de la enzima con un rendimiento aproximado de ácido ferúlico de 0.013 g/L, seguida de la enzima R-ICV a la misma proporción con rendimiento aproximado de 0.0119 g/L, esto denota que dichas enzimas actúan mejor a dicha temperatura, aunque la P-INA tuvo mejor rendimiento (0.0118 g/L) en menor tiempo (12 horas) o incluso antes con el doble de proporción de biocatalizador.

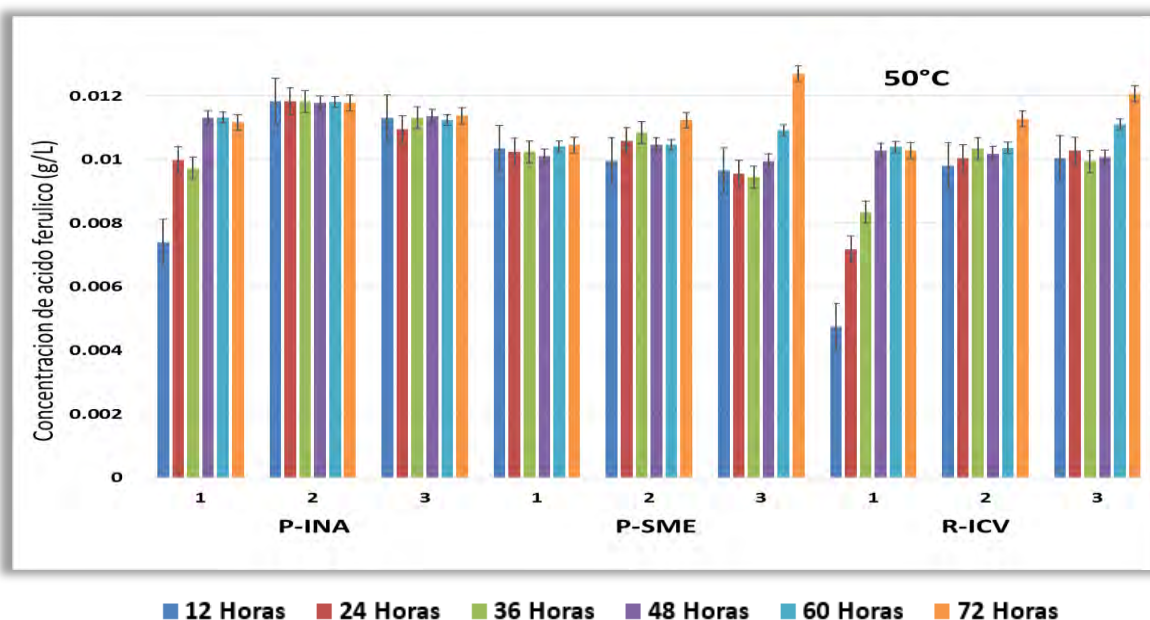


Figura 68. Influencia de la proporción del biocatalizador seleccionados en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina, con respecto al tiempo y a 50 °C de temperatura para la optimización del producto.

Los mejores rendimientos en producto se obtuvieron a 60°C (**Figura 69**). Caso contrario, después de un tiempo ($t \approx 72$ h), la biotransformación se ve más afectada a temperaturas inferiores (40° C y 50 °C). A los 60 °C una formación marcada de ácido ferúlico producido fue observado después de 24 horas principalmente en la triple proporción de P-INA probablemente debido a un aumento de la velocidad de reacción, generando un rendimiento de hasta 0.032 g/L, siendo desfavorable para la formación de ferúlico con la enzima R-ICV, donde tiene mejores resultados a 50 °C. La P-SME, alcanzo su mejor resultado con el doble de proporción en la formación de ácido ferúlico (0.016 g/L), por lo que a 60 °C aumenta considerablemente de entre las 24 a las 72 horas.

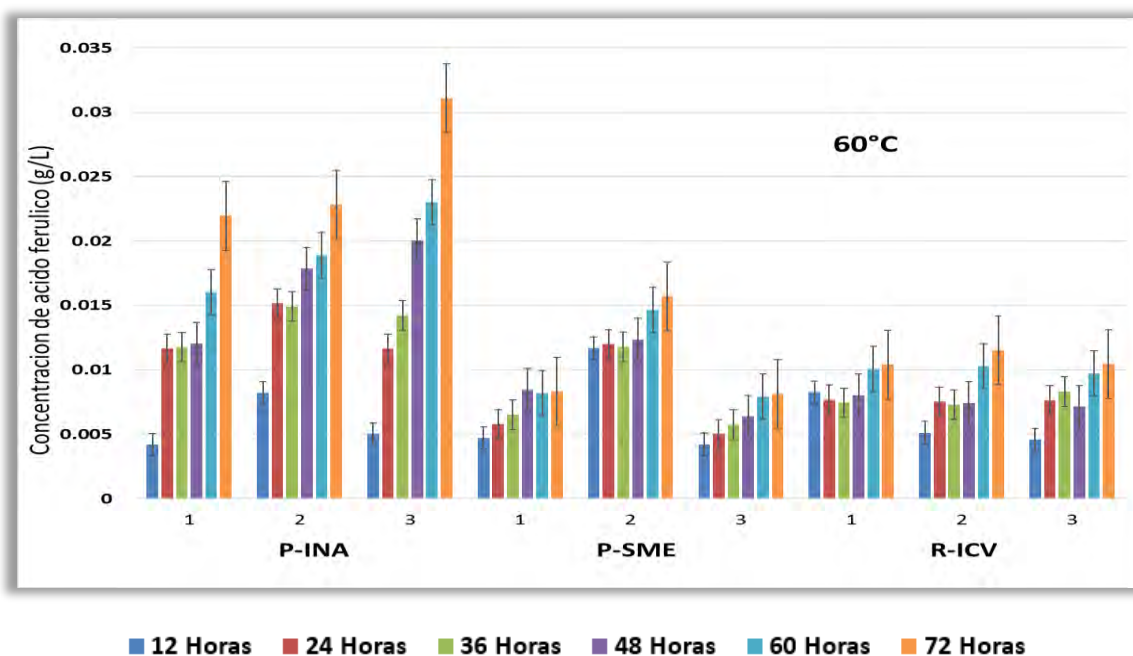


Figura 69. Influencia de la proporción del biocatalizador seleccionados en la formación de ácido ferúlico a partir de vainillina, con respecto al tiempo y a 60 °C de temperatura para la optimización del producto.

De lo descrito anteriormente se confirma que la temperatura afecta la selectividad y califica a las reacciones catalizadas por enzimas de reacción. El efecto de la temperatura sobre la reacción malónica modelo como se ve en la [Figura 69](#), afecta positivamente la reacción catalizada con papaína alcanzando la mejor concentración del producto de reacción en 60 °C. Una vez que la temperatura superó los 40 °C, el rendimiento aumento considerablemente. Además, los posibles subproductos que se formaron posiblemente por la eliminación de una molécula de agua a partir del producto correspondiente, es posible que aumentaran junto con la temperatura creciente. Por lo tanto, se seleccionaron 60 °C como la temperatura óptima para la reacción. Por otro lado, dado que tenemos una temperatura con mejores rendimientos a 60 °C, y observando dicha gráfica podemos notar que para las distintas proporciones agregadas de enzimas, de forma propuesta, duplicada y triplicada, los mejores resultados se dan cuando se triplica la cantidad de enzima, siendo la papaína la que da mejores resultados en estas condiciones (aprox. 0.032 g/L), seguida de la lipasa de ricino, pero más al duplicar su cantidad de enzima que al triplicarla (aprox. 0.016 g/L), tal vez por el hecho de que la enzima termine inhibiendo la reacción. La pepsina dio mejores resultados a 50 °C con el doble de biocatalizador ([Figura 68](#)), demostrando con esto que, tanto la papaína como la lipasa de ricino, pueden soportar temperaturas límite de degradación, comparables

tal vez a enzimas extremofilas, para el caso de la pepsina, el aumento de la temperatura posiblemente si causo la degradación de la enzima.

Las condiciones de pH se monitorearon con tiras de pH, cada 12 horas y no variaron manteniéndose a un pH de 4, para cada una de las reacciones a distintas temperaturas. Teniendo condiciones de reacción óptimas establecidas, se examinó la generalidad de esta reacción catalizada con papaína, lipasa de ricino y pepsina. Se llevaron a cabo las reacciones entre la vainillina y el ácido malónico en las condiciones optimizadas, y los resultados se resumen en la [Figura 70](#). Se puede observar que los productos deseados se obtuvieron con rendimientos de 23 a 40 % aprox. Por otra parte, se observó la formación de vainillina, tal vez porqué lleva grupos donantes de electrones. Esto se explica en que los grupos donantes de electrones mejorar la electrofilia de carbonos de carbonilo en aldehídos que facilita la reacción, mientras que los grupos donantes de electrones disminuyen la electrofilia. La reacción entre la vainillina y el ácido malónico de acuerdo con las cantidades estequiométricas propuestas en la obtención de ácido ferúlico teóricamente se obtienen 0.99 g de ácido ferúlico, y del cual se determinan los rendimientos reales y el respectivo ácido ferúlico recuperado, con las diversas enzimas empleadas ([Tabla 25](#)).

Tabla 25. Resultado de la síntesis enzimática de ácido ferúlico recuperado y su rendimiento real.

<i>Enzima</i>	<i>Ácido ferúlico recuperado (g)</i>	<i>Rendimiento real (%)</i>
<i>Papaína</i>	0.40	40.36
<i>Lipasa de ricino</i>	0.23	23.49
<i>Pepsina de cerdo</i>	0.32	32.01

En la [Figura 70](#) se muestra que, en ausencia de enzima, se observó una reacción menos eficiente entre la vainillina y el ácido malónico en MeCN (acetonitrilo) a la temperatura donde sobre todo se mostró mejores rendimientos (60 °C), incluso después de 5 días, lo que indica que el catalizador es esencial para la reacción. La reacción catalizada por la proteína de pepsina de cerdo dio un producto con un rendimiento del 32.01% que mostró que una proteína de origen animal también tenía la capacidad de catalizar la reacción malónica. De este modo se podría confirmar que la reacción tipo aldólico se lleva a cabo de una manera regioespecífica con enzimas hidrolíticas, dado que en la vainillina existen varios grupos funcionales de un tipo determinado y solo se ve afecta una posición específica, es decir, en el carbono aldólico de la vainillina.

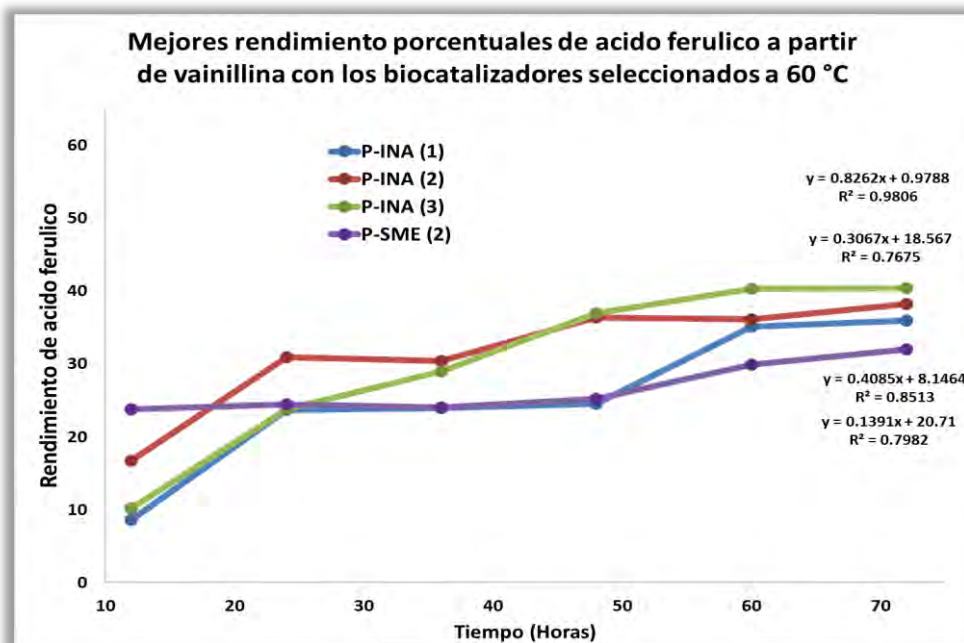


Figura 70. Obtención de los biocatalizadores seleccionados en la obtención de ácido ferúlico.

Adicionalmente, de la [Figura 70](#) se pueden observar los rendimientos en relación al tiempo transcurrido en la síntesis de ácido ferúlico, cuyo principal catalizador dentro de las enzimas propuestas se identificó como P-INA proveniente de la enzima llamada papaína, las otras dos enzimas propuestas también dieron resultados positivos, pero no comparables a la de papaína, la cual dio mejores resultados en menor tiempo, de acuerdo a la gráfica de rendimiento porcentual, donde a las 72 horas la papaína superó en sus tres proporciones (propuesta, duplicada y triplicada) los máximos rendimientos seguida de la enzima de pepsina de cerdo al doble de proporción de biocatalizador propuesto, por lo anterior, se puede pensar que la papaína se ajustó mejor a las condiciones de temperatura mayores, aumentando el rendimiento del producto a mayor temperatura (60 °C), esto probablemente debido a que la papaína soporta esas condiciones de temperatura sin desnaturalizarse a diferencia de los otros dos biocatalizadores. De este modo el uso de otro tipo de enzimas hidrolíticas: proteasas, lipasas o neutrasas, que soporten condiciones de temperatura elevadas podrían actuar como potenciales enzimas promiscuas. Por otro lado, también se vio determinante la proporción de biocatalizador agregado a la síntesis, donde como se vio en las gráficas de barras de las figuras 59, 60 y principalmente 61 donde se condicionó a una temperatura de 60 °C se puede comparar a lo monitoreado en capa fina ([Figura 71](#)). En el caso de la papaína (P-INA), se observa formación de ácido ferúlico, que intensifica la mancha desde la corrida 1 donde hay menor cantidad de enzima hasta la corrida 3 que se

observa en mayor proporción y en donde se triplico la cantidad de enzima. No obstante, es menor en los otros casos, donde es imperceptible dichas manchas, salvo la corrida 2, correspondiente a la mancha de ácido ferúlico de acuerdo al estándar del ferúlico correspondiente a la enzima de pepsina de cerdo (P-SME). En todos los casos se observa aun la presencia de vainillina a la mancha de su estándar. Dado el análisis anterior, las condiciones propuestas en el mecanismo de reacción modelo para cada enzima son diferentes, comenzando por diferencias en las proporciones de enzima, así como de temperatura.

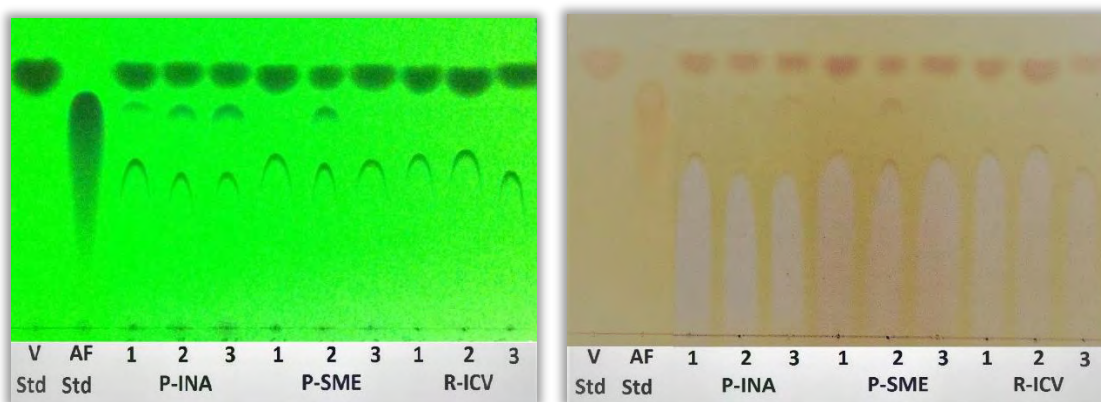


Figura 71. Cromatoplasas en revelador UV y sulfato sérico de las principales enzimas empleadas: Papaína (P-INA), Pepsina de cerdo (P-SME) y Lipasa de ricino (R-ICV), en la reacción de la vainillina (V) con ácido malónico en la obtención de ácido ferúlico (AF).

Condiciones: Acetonitrilo con actividad de agua de más de 0.9 y temperatura de 60 °C. Proporciones: propuesto (1), doble (2) y triple (3) de enzima y para el blanco con vainillina en exceso (1), equimolar (2) y con malónico en exceso (3).

8.4.2. Identificación de ácido ferúlico por HPLC obeido a partir de vainillina empleando los mejores biocatalizadores propuestos.

Como se sabe por la Figura 59 se muestra que cromatogramas para el ácido ferúlico estándar es de 19.437 min, y en las reacciones con las mejores enzimas se obtuvieron a 18.987 min, 19.205 min y 18,961 min, para las síntesis de ácido ferúlico con los biocatalizadores de papaína (Figura 72), lipasa de ricino (Figura 73) y pepsina de cerdo (Figura 74) respectivamente, inyectados por triplicado al HPLC.

Como se observa y de manera similar los tiempos de retención son casi idénticos a los propuestos para la síntesis química, por lo que, dado los resultados obtenidos en las cromatoplasas y en el punto de fusión se mostró una disposición positiva en la identificación de ácido ferúlico. Por otro lado, analizando los cromatogramas respectivos para el caso en

el que se utilizó papaína se obtuvo una conversión de 39.32 %, muy similar al que se obtiene con la lipasa de ricino que fue de 37.75 % y de pepsina en menor proporción de 33.42 %.

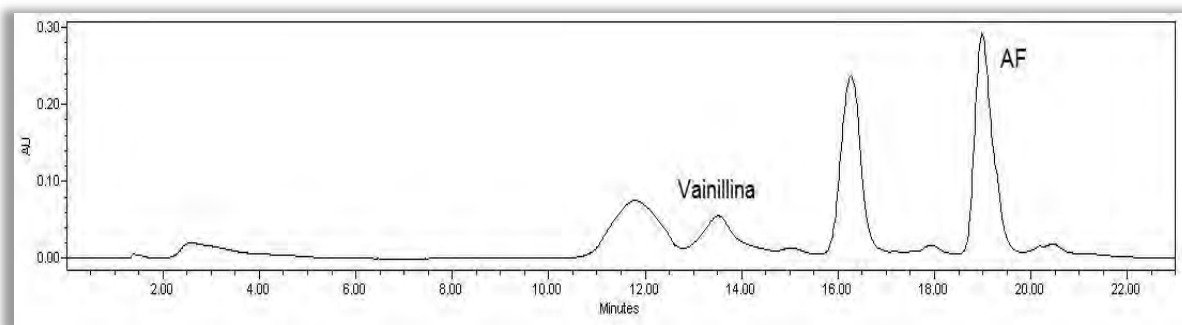


Figura 72. Cromatograma de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina con papaína (P-INA) empleado como biocatalizador o enzima.

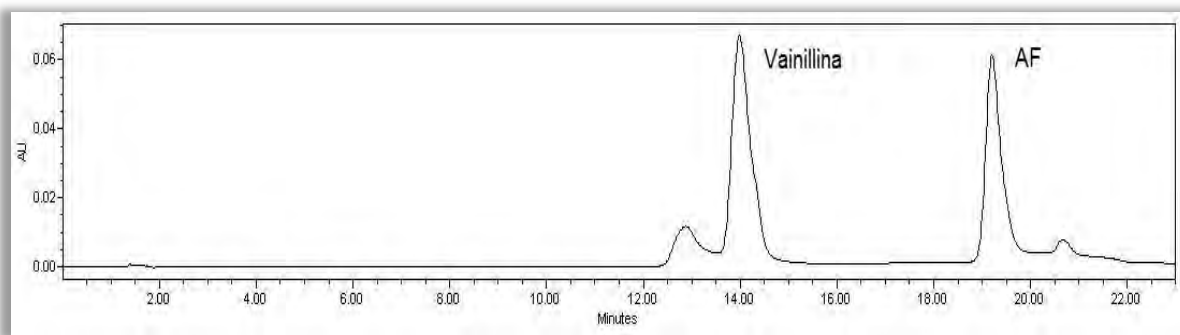


Figura 73. Cromatograma de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina con Pepsina de cerdo (P-PSME) empleado como biocatalizador o enzima.

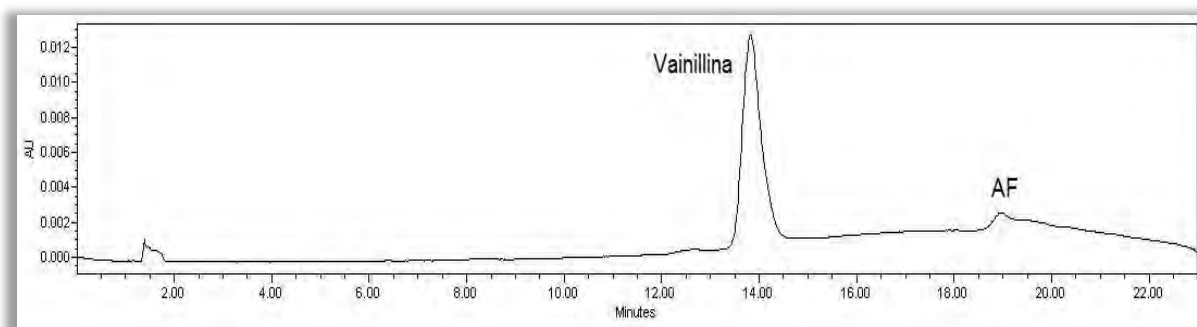


Figura 74. Cromatograma de la biosíntesis enzimática de ácido ferúlico (AF) a partir de vainillina con lipasa de ricino (R-ICV) empleado como biocatalizador o enzima.

Dichos resultados con comparados con los resultados obtenidos en la gráfica de rendimientos son muy similares, dando la caracterización mínima pertinente y haciendo viable la identificación del producto. Hasta el momento no se han reportado resultados, con respecto a este tipo de biocatalizadores con respecto a la obtención y rendimientos de ácido

ferúlico a partir vainillina por medios enzimáticos. Algunos investigadores (Yi-Feng *et al*, 2010; Vlaar *et al*, 2011; Zhi *et al*, 2014) en sus publicaciones de síntesis química avanzada, proponen la síntesis química vía condensación de Knoevenagel-Doebner de ácidos cinámicos, en los que incluyen enzimas como: Lipasa de páncreas porcina (PPL) y lisina, los cuales pueden conseguir buenos rendimientos en poco tiempo. Esto presupone pensar que las lipasas juegan un papel importante en la generación de productos provenientes de reacciones de condensación malónicas.

Al final de la bioconversión se mostró una disminución notable y progresiva de vainillina, sin embargo, se mantiene en gran proporción donde se emplearon los principales biocatalizadores, como se observa en los cromatogramas, donde con la lipasa de ricino resultó mayor cantidad de vainillina sin reaccionar. La bioconversión en el que se empleó como biocatalizador la papaína, resultó con otro tipo de subproductos preponderantes, en este caso posiblemente algunos compuestos vainilloides como intermediarios (Figura 67). De acuerdo en lo descrito en la literatura (Lira-Parada, 2014) se puede decir que el tiempo de retención de 16.26 ± 0.01 minutos probablemente fue a favor de la formación de ácido vainillínico, el cual se calculó en un rendimiento de 29.76 % en masa antes de la extracción, esta observación se puede atribuir al aumento progresivo de la actividad oxidásica no específica, posiblemente por la oxidación de una porción significativa de vainillina a ácido vainillico. El cual puede ser considerado un “subproducto” o producto secundario, ampliamente conocido, que también es útil y comercializable y por lo tanto con valor agregado, que puede resultar de dicha síntesis enzimática, o en su defecto la obtención de mayor rendimiento del producto principal como lo es el ácido ferúlico, manipulando las condiciones de la enzima, como está el hecho de inmovilizarla en diversos soportes.

9. CONCLUSIONES

- La recuperación de ácido ferúlico en una columna de adsorción con amberlita a partir de *nejayote*, obtuvo buenos rendimientos comparado con los resultados de extracción convencional y de referencias conocidas. Identificando cualitativamente por CCF la presencia de ácido ferúlico. Sin embargo, presento impurezas provenientes de la recuperación del mismo, por lo que la aplicación de los métodos de purificación permitió obtener cristales de ácido ferúlico con mayor grado de pureza, así como la identificación de algunas de sus impurezas. De este modo la identidad plena del ácido ferúlico recuperado se verificó satisfactoriamente mediante la técnica de análisis HPLC.
- La recuperación de vainillina de los residuos de vainas de vainilla, se obtuvo con un buen rendimiento, considerando también que la capacidad máxima de adsorción de vainillina obtenida es superior a los resultados reportados en referencias. La identificación cualitativa por CCF demuestro la presencia de vainillina extraída por adsorción. Sin embargo, presento un cierto grado de impurezas, por lo que se sometió a un proceso de purificación, obteniendo vainillina con un mayor grado de pureza. La identidad plena de la vainillina recuperada se verificó satisfactoriamente mediante la técnica de análisis HPLC.
- Se lograron avances en la obtención de ácido ferúlico a partir de vainillina, en la medida de obtener mejores catalizadores químicos con características más generosas con el medio ambiente y mejorando en algunos casos a los ya reportados. Así mismo se identificaron nuevas enzimas hidrolíticas como biocatalizadores que fungen como enzimas promiscuas, con lo cual, una amplia gama de enzimas podría ser aceptada por el sistema de reacción modelo en la condensación de ácido ferúlico o de otros ácidos hidroxicinámicos. Al desarrollar la cinética de la síntesis química y enzimática por medio de la cuantificación espectrofotométrica, arrojo resultados satisfactorios y acordes con lo identificado en CCF y en HPLC.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abková, M. Z., Borges da Silva, E. A., Rodrigues, A. E. (2007) Recovery of vanillin from Kraft lignin oxidation by ion-exchange with neutralization. *Separation and Purification Technology*. 55 56–68.
- Abková, M. Z., Otero, M., Minceva, M., Zabka, M. Rodrigues, A. E. (2006). Separation of synthetic vanillin at different pH onto polymeric adsorbent Sepabeads SP206. *Chemical Engineering Process*. 45, 598–607.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldíva, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 46-55.
- Ayala-Zavala, J. F., *et al.* (2011). "Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives". *Food Research International*. Vol. 44, no. 7, pp. 1866–1874.
- Alam, M. A., Sernia, C., Brown, L. (2013). Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 61. 240–248.
- Anvar U. B., Mazza G. (2009). Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*. 115. 1542–1548.
- Aragno, M., Parola S., Tamagno, E., Brignardello, E., Manti, R., Danni, O., Boccuzzi, G., (2000). Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. *Biochemistry Pharmacology*. 60. 389–395.
- ASERCA: La vainilla en México, una tradición con un alto potencial, (2002). Disponible: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/101/ca101.pdf>. Adquirido: 17/04/07.
- Bagheri-Kalmarzi, Masoomeh, Reza H Sajedi, Elham Asadollahi, O Nosrat, Reza Hajhosseini. (2012). "Effect of Vanillin and Its Acid and Alcohol Derivatives on the Diphenolase Activity of Mushroom Tyrosinase." *Molecular Biology Research Communications* 1 (2): 74–82.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 191-203.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., Menon, V. P., (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research Journal*. 18. 310–314.
- Baqueiro-Peña, I., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Augur, C., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G. (2010). "Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiaicol by a Wild and a Diploid Strain of *Aspergillus Niger*." *Bioresource Technology* 101 (12). Elsevier Ltd: 4721–24.
- Barone, E., Calabrese, V., Mancuso, C. (2009). Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontology* 10. 97–108.
- Barrett, A. J., Rawlings N. D., Woessner, J. F. (2004) "Handbook of Proteolytic Enzymes". (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, London, UK.

- Bermúdez, E., Ventura, O. N., Saenz-Méndez, P. (2010). Mechanism of the Organocatalyzed Decarboxylative Knoevenagel-Doebner Reaction. A Theoretical Study. *Journal of Physical Chemistry*. 13086-13092.
- Bjørsvik, H. R., Liguori, L. (2002). Organic processes to pharmaceutical chemicals based on fine chemicals from lignosulfonates. *Organic Process Research and Development*. 6, 279–290.
- Blume, G. (2013). Novel Carrier System for the Transport of Active Substances into the Skin. United States Patent: 20,130,011,455.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. (2004). Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angewandte Chemie International Edition*. 43, 6032-604.
- Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Steinhart, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of Science Food Agriculture*. 81, 653–660.
- Bradshaw, B., Bonjoch, (2015). Eficiencia en la síntesis total de productos naturales. *Anales de Química*. 111 (4), 203-211.
- Bruice, P. (2008). *Química Orgánica* (5ta. ed.). Naucalpan de Juárez, México: Editorial Pearson Educación.
- Buranov, Anvar U., and G. Mazza. (2009). “Extraction and Purification of Ferulic Acid from Flax Shives, Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurised Solvents.” *Food Chemistry* 115 (4). Elsevier Ltd: 1542–48.
- Busto, E., Gotor-Fernández, V., y Gotor, V. (2010). Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical society*. 39, 4504.
- Carvajal, M., Marquez-Escalante, J. A., Martínez-López, A. L. (2015) Antioxidant capacity of enzymatically modified ferulated arabinoxilans and their gels, *Ferulic Acid Nova Science publishers*. Chapter 6.
- Chandrasekaran, M., Bahkali, A.H. (2013). Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology - Review. *Saudi journal of biological sciences*. Vol. 20, no. 2, pp. 105–20.
- Chavarría, C. E. (2007). Dímeros de ácido ferúlico de nejayote de maíz: evaluación de la actividad antioxidante de extractos enriquecidos en dímeros/hidrodímeros de ácido ferúlico. Tesis Licenciatura-UNAM, Facultad de Química. México, D. F.
- Chung, S. Y., Champagne, E. T. (2011). Ferulic acid enhances IgE binding to peanut allergens in western blots. *Food Chemistry*. 124. 1639–1642.
- Crittenden, B. D., Thomas, W. J. (1998) *Adsorption Technology and Design*, first ed., Butterworth and Heinemann, Oxford.
- Cronquist, A. (1987). A botanical critique of cladism. *Botanical Review*. 53: 1-52.
- Davidson, P. M., Naidu, A. S. (2000) Phyto-phenols, in: A.S. Naidu (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Florida, pp. 265–294.
- Dávila-Guzmán, N. E., Cerino-Córdova, F. J., Diaz-Flores, P. E., Rangel-Mendez, J. R., Sánchez-González, M. N., Soto-Regalado, E. (2012). “Equilibrium and Kinetic Studies of Ferulic Acid Adsorption by Amberlite XAD-16.” *Chemical Engineering Journal* 183. Elsevier B.V.: 112–16.

- De la Cruz, P., Díez, E., Loupy, A., y Langa, F. (1996). Silica Gel Catalysed Knoevenagel Condensation in Dry Media under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Letters*, 37 (7), 1113 – 1116.
- Delisi, R., Ciriminna, R., Parrino, F., Palmisano, M., Yi-Jun, X., Pagliaro, M. (2016). “One-Pot, Clean Synthesis of Vanillic Acid from Ferulic Acid.” *Chemistry Select* 1 (3): 626–29.
- Duong, D. D. (1998), *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*. Imperial College Press, London.
- El Khatib, M., Porta, N., Prieto, A. (2007). Reacción de Knoevenagel: Obtención de Ácido cinámico. <http://muammar.me/files/Reacci%C3%B3n%20de%20Knoevenagel.pdf> (diciembre, 2016)
- Fache, M., Auvergne, R., Boutevin, B., Caillol, S. (2015). “Vanillin, a Key-Intermediate of Biobased Polymers.” *European Polymer Journal* 68. Elsevier Ltd: 488–502.
- Fache, M., Auvergne, R., Boutevin, B., Caillol, S. (2015). “New Vanillin-Derived Diepoxy Monomers for the Synthesis of Biobased Thermosets.” *European Polymer Journal* 67. Elsevier Ltd: 527–38.
- FAO/STAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. (2015).
- Farooq, S., Ruthven, D. M. (1990), Heat effects in adsorption column dynamics. 2. Experimental validation of the one-dimensional model. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 29 1084–1090.
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D. (2009). "Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters". *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*. Vol. 84, no. 6, pp. 895–900.
- Financiera Nacional de Desarrollo, Agropecuario, rural, forestal y pesquero. (2014). Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de Información. Panorama de la Vainilla. Secretaría de Hacienda y Crédito Público. Julio 2014.
- Flander, L., Rouau, X., Morel, M. H., Autio, K., Seppanen-Laakso, T., Kruus, K., Buchert, J. (2008). Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. *Journal of Agriculture Food Chemical*. 56, 5732–5742.
- Flores, M. A., Quintanar, J. L. (1982). Tesis de licenciatura: Obtención de vainillina a partir de aceite esencial de clavo (IPN).
- Frenkel, C., Havkin-Frenkel, D., (2006). The physics and chemistry of vanillin. *Perfumer Flavorist* 31, 28–36.
- Freundlich, H. M. F. (1909) *Kapillarchemie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Galanakis, C. M. (2012) "Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications". *Trends in Food Science y Technology*. Vol. 26, no. 2, pp. 68–87.
- Ghosh, S., Ashish, S., Adinpunya, M. (2006). “Formation of Vanillic Acid from Ferulic Acid by *Paecilomyces Variotii* MTCC 6581.” *Current Science* 90 (6): 825–29.
- Glueckauf, E., Coates, J. L. (1947), 241. Theory of chromatography. Part IV. The influence of incomplete equilibrium on the front boundary of chromatograms and on the effectiveness of separation. *Journal Chemical Society*. (Resumed) 1315–1321.

- González-Álvarez, D. O. (2013) Tesis de licenciatura: Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas – Antioquia.
- Graf, E. (1992). "Antioxidant Potential of Ferulic Acid." *Free Radical Biology and Medicine*. 13 (4): 435–448.
- Guiochon, G., Felinger, A., Shirazi, D., Katti, A. (2006), *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Second edition. Elsevier Academic Press, New York.
- Guo, T., Sun, Y., Sui, Y. (2003). Determination of ferulic acid and adenosine in *Angelicae radix* by micellar electrokinetic chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 375. 840–843.
- Heravi, M. M., Asadi, S., Azarakhshi, F. (2014). Recent Applications of Doebner, Doebner-von Miller and Knoevenagel-Doebner Reactions in Organic Syntheses. *Current Organic Synthesis*, 701-731 701
- Hingse, S. S., Shraddha, B. D., Uday S. A. (2014). "Method Development for Simultaneous Detection of Ferulic Acid and Vanillin Using High-Performance Thin Layer Chromatography." *Journal of Analytical Science and Technology* 5 (1): 21.
- Hocking, M. B. (1997), Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *Journal of Chemical Education*. 74, 1055–1059.
- Holladay, J. E., Bozell, J. J, White, J. F., Johnson. (2007) Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin, in *Top Value-Added Chemicals from Biomass*, Pacific Northwest National Laboratory and National Renewable Energy Laboratory, Richland, WA.
- <http://iss.jaxa.jp/en/kiboexp/theme/first/ferulate/> (revisado febrero 2017)
- Huang, J., Yang, L., Wu, X., Xu, M., Liu, Y. N, Deng, S. (2013). Phenol adsorption on a, a-dichloro-p-xylene (DCX) and 4,40-bis(chloromethyl)-1,10-biphenyl (BCMBP) modified XAD-4 resins from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*. 222, 1–8.
- Huang, J., Jin, X., Deng, S. (2002). Phenol adsorption on an N-methylacetamide-modified hypercrosslinked resin from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*. 192 192–200.
- Huang, J., Yan, C., Huang, K. (2009) Removal of p-nitrophenol by a water-compatible hypercrosslinked resin functionalized with formaldehyde carbonyl groups and XAD-4 in aqueous solution: a comparative study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 332, 60–64.
- Ibrahim, M. N. M., Sriprasanthi, R. B., Shamsudeen, S., Adam, F., Bhawani, S. A. (2012), A concise review of the natural existence, synthesis, properties, and applications of syringaldehyde. *Bioresources* 7, 1–23.
- IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version, <http://goldbook.iupac.org/C01238.html>. (febrero 2017)
- Jadhav, D., Rekha, B. N., Parag, R. Gogate., Virendra, K., Rathod. (2009). "Extraction of Vanillin from Vanilla Pods: A Comparison Study of Conventional Soxhlet and Ultrasound Assisted Extraction." *Journal of Food Engineering* 93 (4): 421–26.

- Jiang, Z.M., Li, A. M., Cai, J.-C., Wang, C., Zhang, Q. X. (2007). Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by aminated hypercrosslinked polymers. *Journal of Environmental Sciences*. 19,135–140.
- Jian-Ping, F., Na-Gao, Y., Yang, Z. G., Yan-Hong, He. (2013). Ficin-catalyzed asymmetric aldol reactions of heterocyclic ketones with aldehydes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* Volume 97, P 1–4
- Jin, X., Huang, J. (2013). Adsorption of vanillin by an anisole-modified hyper-crosslinked polystyrene resin from aqueous solution: equilibrium, kinetics, and dynamics. *Advances In Polymer Technology*. 32, E221–E230.
- Kabir, M., Wang, H., Lau, K., Cardona, F. (2012). Chemical treatments on plant-based natural fibre reinforced polymer composites: An overview. *Composites: Part B* 43, 2283-2292.
- Kamm, B., Kamm M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 (2004) 137–145.
- Kappatos, T., Gordon, M.H., Birch, C.G., (1996). Solution properties of vanillin and diacetyl in aqueous ethanol solutions. *Food Chemistry* 57, 275–282.
- Kerrigan, I. (2001). Knoevenagel Reaction. Recuperado de http://www.chem.shef.ac.uk/level-3/project-2001/knoevenagel_reaction.html (abril, 2011).
- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., Gnu, S.W. (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chemistry*. 95. 466–473.
- Kumar, N., Pruthi, V. (2014). “Potential Applications of Ferulic Acid from Natural Sources.” *Biotechnology Reports* 4 (1). Elsevier. 86–93.
- Kumar, R., Sharma, P. K., Mishra Prem Shanker. (2012). A Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *International Journal of PharmTech Research*. Vol.4, No.1, pp 266-279.
- Kunin, R. (1991) 1.11 Polymeric Adsorbents, in: K. Dorfner (Ed.), *Ion Exchangers*, De Gruyter, New York.
- Lesage-Meessen, Delattre, M., Haon, M., Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P., Asther, M. (1996). “A Two-Step Bioconversion Process for Vanillin Production from Ferulic Acid Combining *Aspergillus Niger* and *Pycnoporus Cinnabarinus*.” *Journal of Biotechnology* 50 (2–3): 107–13.
- Limayem, A., Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467.
- Lina, C. M., Chiuc, J. H., Wu, I. H., Wang, B. W., Pan, C. M., Cheng, Y. H. (2010). Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1^a. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21. 627–633.
- Lira-Parada, P. A. (2014). Tesis de Maestria: Expandiendo la diversidad estructural del ácido ferúlico mediante reacciones de oxidación química y enzimática para la obtención de compuestos de valor agregado (UNAM).
- Logt, V., Roelofs, E. M., Nagengast, H.M., and Peters, F.M. (2003). Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis* 24. 1651–1657.

- López-Simeon, R., Arrieta-Baez, D., Beltran, H. I., Reyes-Duarte, D. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales. <https://www.researchgate.net/publication/235855937> (revisado abril 2017)
- Long C., Li, A., Sun Y., Zhang Q., Liu F., Chen J. (2002). A new phenolic hydroxyl modified polystyrene adsorbent for the removal of phenolic compounds from their aqueous solutions. *Separation Science and Technology*. 37, 3211–3226.
- Loupy, A. (2003). *Microwaves in Organic Synthesis*. (1ra. ed.) París, Francia: Wiley-vch.
- Magnusson, A. O., Takwa, M., Hamberg, A., Hult, K. (2005). An S-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperatura. *Angewandte Chemie International Edition*. 44, 4582-4585.
- Mancuso, C., and Santangelo, R. (2014). "Ferulic Acid: Pharmacological and Toxicological Aspects." *Food and Chemical Toxicology* 65. Elsevier Ltd: 185–95.
- Maoka, F., Tanimoto, M., Sano, K., Tsurukawa, T., Tsuno, S., Tsujiwaki, K., Ishimaru, K. (2008). Effects of dietary supplementation of ferulic acid and gammaoryzanol on integument color and suppression of oxidative stress in cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Journal of Oleo Science*. 57. 133–140.
- Mañach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005) The bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. Ene; 81 (Supl 1): 230S-242S.
- Mattila, P., Hellstrom, J., (2007) Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20. 152–160.
- Mc Cabe, W. (2014). *Unit Operations of Chemical Engineering*. 7ma edición. Mc Graw Hill.
- Méndez-Montevalvo, G., García-Suárez, F. J. (2008). Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. *Journal of Cereal Science* 48, 420-425.
- Menéndez, J. A., *et al.* (2008). Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reversephase protein microarrays. *International Journal of Molecular Medicine*. 22. 433–439.
- Michailof, C., Stavropoulos, G. G., Panayiotou, C. (2008). Enhanced adsorption of phenolic compounds, commonly encountered in olive mill wastewaters, on olive husk derived activated carbons. *Bioresource Technology*. 99, 6400–6408.
- Min, J. Y., Knag, S. M., Park, D. J., Kim, Y. D., Jung, H. N., Yang, J. K., Seo, W. T., Kim, S. W., Karigar, C. S., Choi, M. S., (2006). Enzymatic release of ferulic acid from *Ipomoea batatas* L. (Sweet Potato) stem. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 11. 372–376.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. (2014). "Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review". *Journal of Cleaner Production*. Vol. 65, pp. 28–41.
- Mori, T., Koyama, N., Guillot-Sestier, M.V., Tan, J., Town, T. (2013). Ferulic acid is a nutraceutical b-secretase modulator that improves behavioral impairment and Alzheimer-like pathology in transgenic mice, *PLoS ONE* 8. 1–15.
- Mota, M. I. F., Rodrigues-Pinto P. C., Loureiro, J.M., Rodrigues A. E. (2016). "Adsorption of Vanillin and Syringaldehyde onto a Macroporous Polymeric Resin." *Chemical Engineering Journal* 288: 869–79.

- Motedayen, N., Maznah, B. T., Ismail, and Forough, N. (2013). "Bioconversion of Ferulic Acid to Vanillin by Combined Action of *Aspergillus Niger* K8 and *Phanerochaete Crysosporium* ATCC 24725." *African Journal of Biotechnology* 12 (47): 6618–24.
- Natalia, N. R., Claire D., Lullien P. V., Valerie, M. (2013). Exposure or release of ferulic acid from wheat aleurone: impact on its antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 141. 2355–2362.
- Oosterveld, A., Pol, I. E., Beldman, G., Voragen, A. G. J., (2010). Isolation of feruloylated arabinans and rhamnogalacturonans from sugar beet pulp and their gel forming ability by oxidative cross-linking. *Carbohydrate Polymers*. 44. 9–17.
- Ou, S., Kwok K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of food and Agriculture*. 84. 1261–1269.
- Pan, B. C., Xiong, Y., Su, Q., Li, A. M., Chen, J. L, Zhang, Q. X. (2003). Role of amination of a polymeric adsorbent on phenol adsorption from aqueous solution, *Chemosphere* 51, 953–962.
- Partington, S. (1949), *An Advanced Treatise on Physical Chemistry, Vol. I, Fundamental Principles: The Properties of Gases*, first edition. Longmans, Green y Company., London.
- Peng, C., Lin, Y., Zhengrong, W., Suyue, L., Zhongtian, B., Xiaojuan, Y., Ningbo, W., Ning, L., Hongyu, L. (2016). "Microbial Transformation Using *Bacillus Subtilis* B7-S to Produce Natural Vanillin from Ferulic Acid." *Nature Publishing Group*, no.1. Nature Publishing Group: 1–10.
- Piedrafita, G., Keller, M. A., Ralser, M. (2015). The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions *Biomolecules*, 5(3), 2101-2122.
- Pion, F., Reano, A.F., Ducrot, P-H., Allais, F. (2013). "Chemo-Enzymatic Preparation of New Bio-Based Bis- and Trisphenols: New Versatile Building Blocks for Polymer Chemistry." *Royal Society of Chemical Advances*. 3 (23): 8988–97.
- Pras, N., Wondenbag, H., Van Uden, W. (1994); *Bioconversion of Naturally Occurring Precursors and Related Synthetic Compounds Using Plant Cell Cultures*. Edit Macek and Vanek; 37 – 45.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Steinhart, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal Science Food Agriculture*, 81, 653.
- Ramachandra, R., Ravishankar, G. (2000). "Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (September 1999): 289–304.
- Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D., Vogel, A. (2005). Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angewandte Chemie International Edition*. 44, 4192-4196.
- Reetz, M. T.; Plus, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. (2007). Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *A European Journal of Chemical Biology*, 8, 106-112.

- Retes-Mantilla, R. F., Torres-Mancera, M. T., Lugardo-Bravo, M. T. (2015). Ventajas económicas para la industria de alimentos y bebidas en México con el uso de la vainillina obtenida del nejayote. *Custos e @gronegocio on line*, v. 11, n. 3 Jul. ISSN 1808-2882
- Rodrigues, A. E., Levan, M. D., Tondeur, D. (1989), *Adsorption: Science and Technology*, first edition. Kluwer Academic Publishers, London.
- Rukkumani, R., Aruna, K., Suresh, V. P., Padmanabhan, M. V. (2004). Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose-dependent study. *Journal Medical Food* 7. 456–461.
- Run-Cang, S., Xiao-Feng, S., Shi-Hong, Z. (2001). Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood. *Journal Agriculture Food Chemical*. 49, 5122–5129.
- Ruthven, D.M. (1984), *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*, John Willey and Sons, New York.
- Salas-Pérez, L. (2014). Tesis de licenciatura: Recuperación y cuantificación de los ácidos dehidrodiferúlicos más abundantes de nejayotes de diferentes maíces. México, DF.: UNAM.
- Salgado, J. M., Max B., Rodríguez-Solana, R., Domínguez. J. M. (2012). "Purification of Ferulic Acid Solubilized from Agroindustrial Wastes and Further Conversion into 4-Vinyl Guaiacol by *Streptomyces Setonii* Using Solid State Fermentation." *Industrial Crops and Products* 39 (1). Elsevier B.V.: 52–61.
- Samah, R. A., Zainol, N., Yee, P. L. Pawing, C. M., Abd-Aziz, S. (2013) Adsorption of vanillin using macroporous resin H103. *Adsorption Science and Technology*. 31, 599–610.
- Sarekha, W., Rangrong, Y. (2013). Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 96. 495–502.
- Saulnier, L. C., Marot, M., Elgorriaga, E., Bonnin, J. F., Thibault. (2001). "Thermal and Enzymatic Treatments for the Release of Free Ferulic Acid from Maize Bran." *Carbohydrate Polymers* 45 (3): 269–75.
- Saval, S. (2012) "Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro". *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, A.C. Vol. 16, no. 2.
- Scalbert, A., *et al.* "Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw". *Journal of Phytochemistry*. 1985, vol. 24, no. 6, p. 1359-1362.
- Shreve, R., Norns, Joseph A., Bnng, J. R. "Chemical Process Industries", 4th. Edition, 455-456, Edit. Me. Graw-Hill, Book Company.
- Singh, R., Kapoor, V., Kumar, V. (2012). Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1545–1552.
- Sigma – Aldrich Corporation. (2008). *Handbook of Fine Chemicals – Aldrich Advancing Science*. (Ed. 2007 – 2008). Missouri – St. Louis, USA: Sigma– Aldrich Chemical Company.
- Sindhu, M., Abraham, T. E., Sudheesh, S. (2007). "Rapid Conversion of Ferulic Acid to 4-Vinyl Guaiacol and Vanillin Metabolites by *Debaryomyces Hansenii*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44 (2): 48–52.

- Sindhu, M., Abraham, T. E. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical Reviews Microbiology*. 32. 115–125.
- Smith, J. M. (1981). *Chemical Engineering Kinetics*. McGraw-Hill Chemical Engineering Series, New York.
- Solvay (2014). Los procesos sintéticos hacia la vainillina. *Food Ingredients Brasil*. No 31. www.Revista.fl.com (enero 2015)
- Solvay, S. A. (2016), retrieved from: <<http://www.solvay.com/en/markets-andproducts/featured-products/rhovaniil-natural.html>> (septiembre 2016).
- Soto, M. L., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J. C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. *Journal of Food Engineering*. 105.1–26.
- Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Kalpana, C., Srinivasan, M., Menon, V. P. (2007). Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and celular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with Nacetylcysteine, *Toxicol. In Vitro* 21. 576–585.
- Stecker, F., Fischer, A., Kirste, A., Voitl A., Wong, C. H., Waldvogel, S., Regenbrecht, C., Schmitt, D., Hartmer, M. F. (2014). Method for obtaining vanillin from aqueous basic compositions containing vanillin, WO Patent 2014006108 A1 (January 09, 2014).
- Suresh, S., Srivastava, V., Mishra, I. (2012) Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *International Journal Energy Environmental Engineering*. 3, 1–19.
- Trejo, S. A. (2005) “Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepios fruticosa* L. (Apocynaceae)”, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., Annapure, U. (2008). Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: Its improved extraction and purification. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 56. 7644–7648.
- Tjostil Vlaar, Eelco Ruijter, Romano V.A. Orru (2011) Published in *Advanced Synthesis and Catalysis*. Wiley VCH. 353: 871-874.
- Thiel, L., Hendricks, F. (2004) Study into the establishment of an aroma and fragrance fine chemicals value chain in South Africa, part three: aroma chemicals derived from petrochemical_feedstocks. FRIDGE. Tender Number T79/07/03.
- Torres, O., Alfonso, I., Gotor, V. (2004). Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. *Chemistry Communications*. 15, 1724-1725.
- Uraji, M., Kimura, M., Inoue, Y., Kawakami, K., Kumagai, Y., Harazono, K., Hatanaka T. (2013). Enzymatic production of ferulic acid from defatted rice bran by using a combination of bacterial enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171. 1085–1093.
- Urbaniak, A., Szela, M., Molski, M. (2013). Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Computational and Theoretical Chemistry*, 33-40.

- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J., Hernández-Santiago, C. (2010). "Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 14, no. 7, pp. 2147–2153.
- Waldron, K. W., Parker, C. C., Parker, M. L., Smith, A. C. (2003). Thermal stability of texture in Chinese water chestnut may be dependent on 8,80 -diferulic acid (aryltetralyn form). *Journal of Agriculture Food Chemical*. 51, 2034–2039.
- Wang, L. K., Volodymyr, I., Joo-Hwa, T., Yung-Tse, H. (2010). *Handbook of Environmental Engineering Environmental Biotechnology*. Journal of Chemical Information and Modeling. Vol. 53.
- Wang, Z., Chen, K., Li, J., Wang, Q., Guo, J. (2010) Separation of vanillin and syringaldehyde from oxygen delignification spent liquor by macroporous resin adsorption. *Clean* 38, 1074–1079.
- Wang, B., Dong, F., Chen, M., Zhu, J., Tan, J., Fu, X. (2016). Advances in recycling and utilization of agricultural wastes in China: Based on environmental risk, crucial pathways, influencing factors, policy mechanism. In *Procedia environmental sciences*: Vol. 31. The tenth international conference on waste management and technology (ICWMT) (pp. 12–17).
- Warren, G. W., Singh, A. K. (2013). Nicotine and lung cáncer. *Journal of Carcinogenesis*. 12.1.
- Wilke, C. R., and Chang, P. (1955), Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 1 264–270.
- Wong, D. W., Chan, V. J., Batt, S. B., Sarath G., Liao, H. (2011). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce feruloyl ésterase for the release of ferulic acid from switchgrass. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38. 1961–1967.
- Xiao, G. Q., Xie, X. L., Xu, M. C. (2009). Adsorption performances for vanillin from aqueous solution by the hydrophobic-hydrophilic macroporous polydivinylbenzene /polyacrylethylenediamine IPN resin, *Acta Physico-Chimica Sinica*. 25, 97–102.
- Xuemei, L., Jinkui, Y., Xian, L., Wen, G., Jingwen, H., Zhang H. (2008). "The Metabolism of Ferulic Acid vía 4-Vinylguaicol to Vanillin by *Enterobacter* Sp. Px6-4 Isolated from Vanilla Root." *Process Biochemistry* 43 (10): 1132–37.
- Xu, Z., Cai, J., Pan, B. (2013). Mathematically modeling fixed-bed adsorption in aqueous systems*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 155-176.
- Yagi, K., Ohishi, N. (1979). Action of ferulic acid and is derivatives as antioxidants. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 25. 127–130.
- Yang, W., Hongzhi, T., Jun, N., Qiulin, W., Dongliang, Hu., Fei, T., Ping, Xu. (2013). "Characterization of Two *Streptomyces* Enzymes That Convert Ferulic Acid to Vanillin." *PLoS ONE* 8 (6).
- Yang, F., Zhou, B. R., Zhang, P., Zhao, Y. F., Chen, J., Liang, Y. (2007). Binding of ferulic acid to cytochrome c enhances stability of the protein at physiological pH and inhibits cytochrome c-induced apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*. 170. 231–243.

- Yi-Feng, L., Hui, Z., She-Jie, C., Peng-Fei, Z., Xin-Zhi, C. (2010). Lipase-catalysed tandem Knoevenagel condensation and esterification with alcohol cosolvents. *Green Chemistry*. 12, 1917–1918.
- Zhang, Q. F., Zi, T. J., Hong, J. G., Rong, L. (2008). “Recovery of Vanillin from Aqueous Solutions Using Macroporous Adsorption Resins.” *European Food Research and Technology* 226 (3): 377–83.
- Zhao, J., Tanaka, M. (2014). Ferulic acid enhances the vasorelaxant effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor- α -induced inflammatory rat aorta. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 807-814.
- Zhao, Z., and Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*. 109(4), 691-702.
- Zheng, L., Pu, Z., Zhihao, S., Yanbing, B., Jun W., Xinfu, G. (2007). “Production of Vanillin from Waste Residue of Rice Bran Oil by *Aspergillus Niger* and *Pycnoporus Cinnabarinus*.” *Bioresource Technology* 98 (5): 1115–19.
- Zhi, W., Chun-Yu, W., Hao-Ran, W., Hong, Z., Ya-Lun, S., Teng-Fei, J. Lei, W. (2014). Lipase-catalyzed Knoevenagel condensation between α , β -unsaturated aldehydes and active methylene compounds. *Chinese Chemical Letters*. 25. 802–804.

11. Anexo

Espectrofotometría

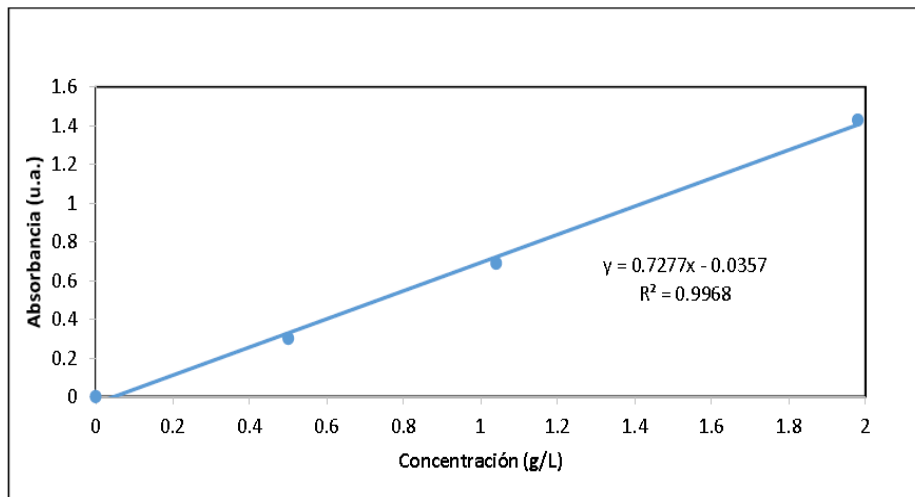


Figura A1. Curva patrón para la determinación espectrofotométrica en UV a 380 nm de ácido ferúlico en agua.

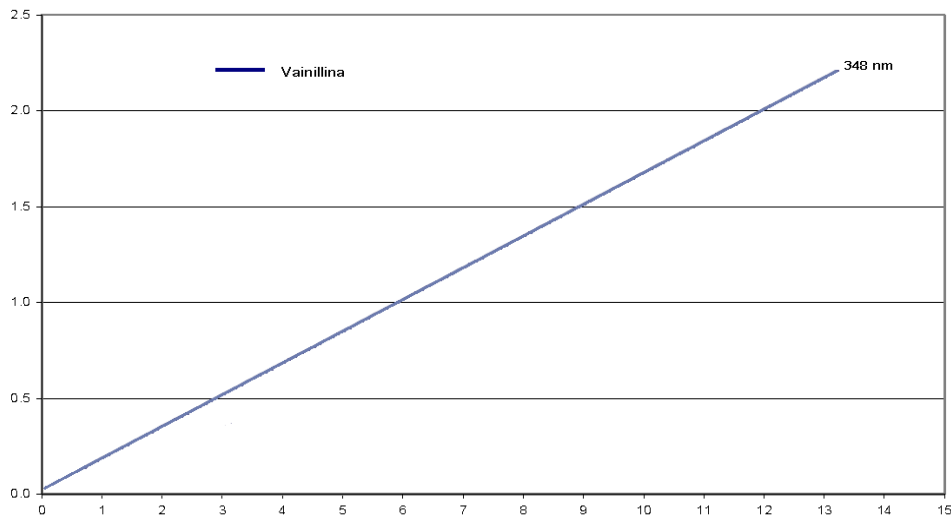


Figura A2. Curva patrón para la determinación espectrofotométrica en UV a 348 nm de vainillina en agua