



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN Y ESTERIFICACIÓN DE DÍMEROS DE
ÁCIDO FERÚLICO

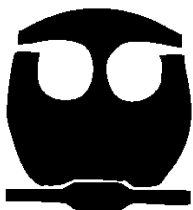
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

KARLA ERIKA GONZÁLEZ VÁZQUEZ



MÉXICO D.F.,

2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
Vocal HERMILO LEAL LARA
Secretario ARTURO NAVARRO OCAÑA
1er Suplente JORGE ARTURO ABURTO ANELL
2do Suplente SANDRA PAOLA SANCHEZ RODRIGUEZ

Sitio en donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO 321, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA. CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA

Asesor Dr. Arturo Navarro Ocaña
Asesor

Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez
Supervisor técnico

Karla Erika González Vázquez
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la formación profesional que me permite enfrentarme a los retos del presente y el futuro

Al Doctor Arturo Navarro por su la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto, por toda su ayuda y sus consejos y lo mucho que aprendí trabajando a su lado.

A la Doctora Hilda Calderón por toda la ayuda que me brindo para el manejo de los equipos de laboratorio y la interpretación de resultados.

Al Doctor Francisco Ruiz Terán, por su apoyo, sus consejos y la atención que me brindo siempre.

A los Doctores Manuel Jiménez y Daniel Arrieta así como a los compañeros del Instituto de Química por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A los sinodales que revisaron este trabajo por sus correcciones y consejos.

DEDICATORIAS

A mis padres José e Isabel por haberme dado las bases para ser la mujer que soy hoy en día, por ser la piedra angular de mi vida e impulsarme siempre a lograr mis metas, sin ellos este trabajo no habría sido posible. Los amo.

A mis hermanas Katya y a Karen, mis mejores amigas, mis cómplices, porque la vida es mejor solo porque ustedes están presentes.

A mis abuelos, por su cariño y su apoyo que ha estado presente en cada momento de mi vida.

A mis tíos y tías, porque me han consentido, apapachado, apoyado y querido toda mi vida, su presencia es fundamental para mí.

A todos mis primos, porque ustedes saben bien que más que primos son hermanitos y que los quiero profundamente, ustedes le dan a mi vida la diversión y los mejores momentos.

A Sofía y Mariana, porque han estado ahí en las buenas y en las malas desde hace ya mucho tiempo y sé que estarán ahí para lo que venga.

A mis locas amigas de la facultad, por los instantes tan divertidos que hemos pasado y porque sé que siempre vamos a estar juntas.

A mis amigos de primer semestre, que me ayudaron a dar ese primer paso dentro de la carrera, con quienes he pasado grandes momentos y que me han ayudado mucho.

A los compañeros y amigos de la carrera de Química de Alimentos, con los que pase los últimos semestres y de los que guardo y guardare hermosos recuerdos.

A mis amigas y amigos del laboratorio 321, gracias a ustedes las dificultades de este trabajo pasaron más ligeras.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
Capítulo 1. Antecedentes.....	5
1.1 Compuestos polifenólicos.....	5
1.2 Ácido ferúlico.....	7
1.2.1 Historia.....	7
1.2.2 Síntesis.....	8
1.2.3 Propiedades físicas.....	8
1.2.4 Fuentes.....	8
1.2.5 Métodos de extracción.....	9
1.2.6 Biosíntesis.....	10
1.2.7 Función biológica.....	10
1.2.8 Capacidad antioxidante.....	10
1.3 Aplicaciones del ácido ferúlico.....	11
1.3.1 Aplicaciones en alimentos.....	11
1.3.2 Obtención de vainillina a partir de ácido ferúlico.....	13
1.3.3 Aplicaciones en farmacia.....	14
1.4 Dímeros de ácido ferúlico.....	14
1.4.1 Síntesis de dímeros de ácido ferúlico.....	17
1.4.2 Función biológica de los dímeros de ácido ferúlico.....	17
1.4.3 Mecanismo de formación de los dímeros de ácido ferúlico.....	18
1.5 Ésteres de ácido ferúlico.....	19
1.5.1 Síntesis de ésteres fenólicos.....	19
1.6 Lipasas.....	22
1.6.1 Lipasas de <i>Candida</i> sp.....	27
1.6.2 Reacciones de esterificación.....	29
1.7 Peroxidasas.....	31
1.7.1 Clasificación de las enzimas redox.....	31
1.7.2 Importancia, fuentes y función de las peroxidasas.....	32
1.7.3 Mecanismos de catálisis de las peroxidasas.....	33
1.7.4 Reacciones catalizadas por peroxidasas.....	34
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	38
2.1 Primera parte.....	38
2.2 Segunda parte.....	38
2.3 Tercera parte.....	39

2.4	Reactivos.....	39
2.5	Equipos.....	39
2.6	Diagrama de procedimiento.....	40
Capítulo 3. Desarrollo experimental.....		41
3.1	Obtención de ácido ferúlico.....	41
3.2	Esterificación de ácido ferúlico con etanol.....	43
3.3	Transesterificación de etil ferulato con alcoholes alifáticos.....	45
3.4	Obtención de peroxidasa de nopal.....	47
3.5	Dimerización de etil ferulato con peroxidases de nopal y de rábano..	49
3.6	Transesterificación del producto de dimerización de etil ferulato.....	51
3.7	Cuantificación por cromatografía de gases.....	53
Capítulo 4. Resultados y discusión.....		54
4.1	Obtención de ácido ferúlico.....	54
4.2	Esterificación de ácido ferúlico.....	55
4.2.1	Rendimiento promedio.....	55
4.3	Transesterificación de etil ferulato.....	56
4.3.1	Transesterificación de etil ferulato con propanol.....	56
4.3.2	Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol a 45°C.....	57
4.3.3	Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol a 45°C.....	57
4.3.4	Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol a 60°C.....	58
4.3.5	Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol a 60°C.....	59
4.3.6	Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol.....	59
4.4	Transesterificación de etil ferulato con butanol.....	60

4.4.1 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 45 °C.....	60
4.4.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 45 °C.....	61
4.4.3 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 60 °C.....	61
4.4.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 60 °C.....	62
4.4.5 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol.....	62
4.5 Transesterificación de dietil diferulato con decanol.....	63
4.5.1 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 45 °C.....	63
4.5.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 45 °C.....	64
4.5.3 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 60 °C.....	64
4.5.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 60 °C.....	65
4.5.5 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol.....	65
4.6 Dimerización de etil ferulato.....	67
4.6.1 Reacción de dimerización con respecto a H ₂ O ₂	67
4.6.2 Reacción de dimerización con respecto al tiempo.....	68
4.6.3 Rendimiento promedio de dimerización probando dos peroxidasas.....	69
4.6.4 Rendimiento promedio de dos pruebas utilizando peroxidasa de rábano.....	70
4.7 Reacciones de transesterificación de dietil diferulato.....	70
4.7.1 Transesterificación de dietil diferulato con propanol.....	71
4.7.2 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con propanol a 45 °C.....	71

4.7.3 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con propanol a 45°C.....	72
4.7.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con propanol a 60°C.....	73
4.7.5 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con propanol.....	73
4.8 Transesterificación de dietil diferulato con butanol.....	74
4.8.1 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol a 45°C.....	74
4.8.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol a 45°C.....	75
4.8.3 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol a 60°C.....	75
4.8.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol a 45°C.....	76
4.8.5 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol.....	76
4.9 Transesterificación de dietil diferulato con decanol.....	77
4.9.1 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol a 45°C.....	77
4.9.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol a 45°C.....	78
4.9.3 Cromatografía en capa fina de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol a 60°C.....	78
4.9.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol a 60°C.....	78
4.9.5 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol.....	79
Capítulo 5 Conclusiones.....	81
Capítulo 6 Anexos.....	83
6.1 Anexo 1. Actividad de peroxidasa de nopal.....	83
6.1.1 Peroxidasa de rábano.....	83

6.1.2 Peroxidasa de nopal.....	85
6.2 Anexo 2. Curvas estándar para la cuantificación por cromatografía de gases.....	87
6.2.1 Curva estándar de etil ferulato.....	87
6.2.2 Curva estándar de dietil diferulato.....	89
Bibliografía.....	91

RESUMEN

El ácido ferúlico es el ácido hidroxicinámico más abundante en la naturaleza, se ha demostrado que tiene varias propiedades de relevancia para las industrias farmacéutica y alimenticia; la más conocida de sus propiedades es su capacidad antioxidante.

A pesar de sus múltiples y benéficas propiedades, el ácido ferúlico es un ácido hidrofílico, esto limita su uso en sistemas a base de grasas y aceites, por lo tanto restringe su uso en alimentos. Para disminuir esta problemática existen principalmente dos alternativas: la esterificación del ácido ferúlico y la esterificación de los dímeros de ácido ferúlico.

En este trabajo se propuso la obtención de algunos de estos compuestos sintetizando, primero por vía química, el ester etílico del ácido ferúlico, posteriormente se transesterificó, por vía enzimática utilizando la lipasa de *C. antarctica*, el etil ferulato para obtener los ésteres propílico, butílico y decílico del ácido ferúlico. En otra etapa del trabajo se sintetizó, también por vía enzimática usando peroxidasas, el dímero esterificado del ácido ferúlico identificado como el 8 – 5 dietil diferulato. Una vez que se obtuvo este producto se procedió a transesterificar, por vía enzimática utilizando lipasas, los ésteres propílico, butílico y decílico del dímero del ácido ferúlico.

Los porcentajes de transformación de etil ferulato que se obtuvieron fueron: 75.57% con propanol a 45°C; 93.04% con propanol a 60°C; 54.02% con butanol a 45°C; 88.75% con butanol a 60°C; 86.03% con decanol a 45°C y 95.10% con decanol a 60°C.

Sin embargo, los resultados obtenidos para la transesterificación de dietil diferulato fueron menores: 50.84% para propanol a 45°C; 35.49% para propanol a 60°C; 82.45% para butanol a 45°C; 1.96% para butanol a 60°C; 33.22% para decanol a 45°C y 0.5% para decanol a 60°C.

Se puede concluir que el método de transesterificación es una buena alternativa para obtener ésteres del ácido ferúlico y de sus dímeros.

INTRODUCCIÓN

El ácido ferúlico es un ácido hidroxicinámico de gran importancia; se encuentra naturalmente en el trigo, el arroz y el maíz, ya sea en forma libre, esterificada o dimerizada. A pesar de su abundancia, su extracción no es del todo fácil, por lo que se han probado diversos métodos tanto químicos como enzimáticos para lograr extraer la mayor cantidad posible.

Diferentes trabajos se han llevado a cabo para estudiar los distintos usos y aplicaciones del ácido ferúlico; por sus propiedades es utilizado, desde hace tiempo, como ingrediente para proteger alimentos de la degradación, principalmente la que se da por causa de reacciones oxidativas. Entre sus aplicaciones para la salud se ha encontrado que ayuda a contrarrestar el cáncer, enfermedades cardiovasculares y puede inhibir los rayos UV, y comercialmente se encuentra como ingrediente en lociones fotoprotectoras.

En la actualidad se realizan diversas investigaciones sobre el ácido ferúlico, en varias de ellas se estudian métodos de modificación de este ácido, ya que se sabe que tanto los ésteres como los dímeros de ácido ferúlico pueden potencializar sus propiedades.

Los antecedentes de este trabajo se ubican en textos ya publicados, en los que se reportan síntesis de ésteres de ácido ferúlico con rendimientos muy bajos, todos por vía enzimática; por otra parte, también se han sintetizado dímeros de ácido ferúlico.

El propósito de este trabajo es buscar la síntesis principalmente por vía enzimática de diferentes ésteres de ácido ferúlico. Posteriormente la síntesis, de igual forma por vía enzimática, de un dímero esterificado de ácido ferúlico y a continuación incursionar en la transesterificación del mismo.

En otros trabajos ya publicados se reportan síntesis de ésteres de ácido ferúlico con rendimientos muy bajos, todos también por vía enzimática; por otra parte, se han sintetizado también dímeros de ácido ferúlico; sin embargo la

esterificación o transesterificación de los dímeros de ácido ferúlico es algo que aún no se ha reportado.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Obtener el éster etílico de ácido ferúlico y su dímero esterificado para transesterificar ambos compuestos utilizando como alcoholes receptores propanol, 1 – butanol y n – decanol y como catalizador la lipasa de *Candida antarctica*.

Objetivos particulares:

- Obtener el ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz.
- Preparar el éster etílico del ácido ferúlico por vía química.
- Transesterificar el éster etílico de ácido ferúlico con propanol, butanol y decanol.
- Obtener el extracto crudo de la peroxidasa de nopal.
- Dimerizar el éster etílico del ácido ferúlico con peroxidasas de nopal y de rábano.
- Transesterificar el dímero esterificado del ácido ferúlico con propanol, butanol y decanol.
- Cuantificar los resultados de las reacciones de transesterificación del éster etílico del ácido ferúlico y del dímero esterificado del ácido ferúlico por cromatografía de gases.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Compuestos polifenólicos

Existe un gran y diverso grupo de compuestos químicos producidos por las plantas, los cuales incluyen a los alcaloides, antraquinonas, antocianinas, flavonoides, hidroxicinamatos, saponinas y terpenos; estos compuestos tienen un papel importante en las industrias de cosméticos, perfumería, colorantes y alimenticia. Las plantas los producen como metabolitos secundarios, que no son esenciales para el crecimiento de la planta y por ello se originan en pequeñas cantidades; generalmente, se acumulan en tejidos especializados, esto hace difícil su extracción y posterior purificación. Algunos de estos compuestos tienen estructuras complicadas o exhiben quiralidad. Esto a veces dificulta su síntesis.

Se sabe que los flavonoides y los hidroxicinamatos son compuestos con una elevada actividad antioxidante que pueden favorecer a la salud y también utilizarse para preservar alimentos. Algunos ejemplos de flavonoides son las quercetinas y las catequinas. Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados como los ácidos ferúlico, caféico, sinápico y cumárico son ejemplos de derivados de hidroxicinamatos.

Los flavonoides y los hidroxicinamatos son compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas como defensa contra diferentes tipos de ataques, por ejemplo la invasión de microorganismos y las plagas de insectos.

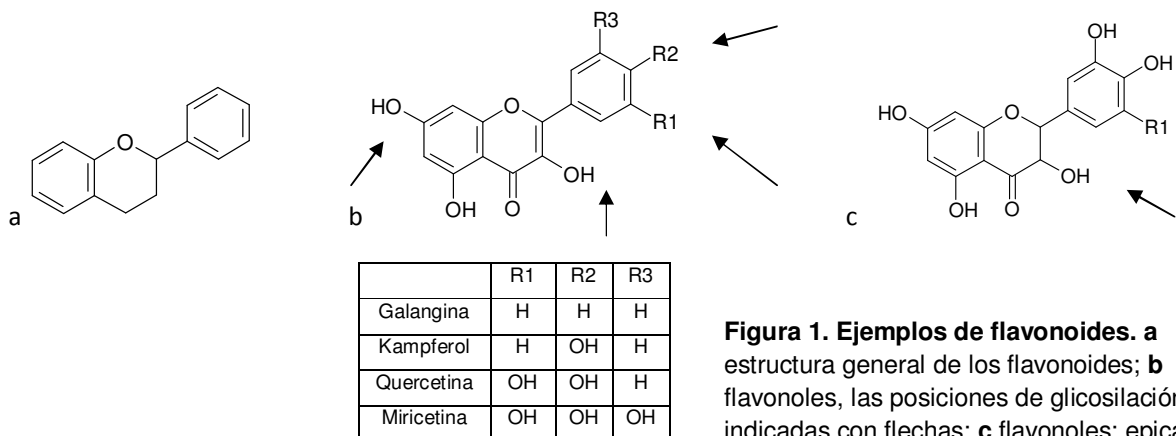


Figura 1. Ejemplos de flavonoides. **a** estructura general de los flavonoides; **b** flavonoles, las posiciones de glicosilación están indicadas con flechas; **c** flavonoles: epicatequina y epigallocatequina (R1 = OH). La posición de galoilación está señalada con la flecha.

Los ácidos hidroxicinámicos son un grupo de compuestos encontrados ampliamente en plantas y semillas, conocidos principalmente por su función antioxidante.

Los principales ácidos hidroxicinámicos son:

Ácido caféico (Ácido (3-3, 4 dihidroxifenil) – propenóico): Se encuentra principalmente conjugado en forma de ácido clorogénico. El ácido caféico tiene actividad antioxidante, propiedades anti inflamatorias y anti carcinogénicas. Se halla ampliamente distribuido en frutas y verduras, maíz, avena y arroz.

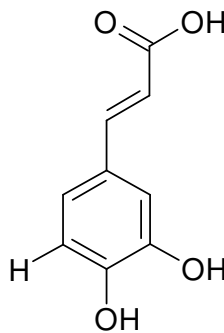


Figura 2. Ácido caféico.

Ácido cumárico (Ácido 3(-4-hidroxifenil)-2-propenóico): Se encuentra en formas orto, meta y para, de las cuales la última es la más abundante. Se sabe que puede prevenir el cáncer de estómago al reducir la formación de nitrosaminas. Está presente en forma abundante en tomates, zanahoria y principalmente ajo.

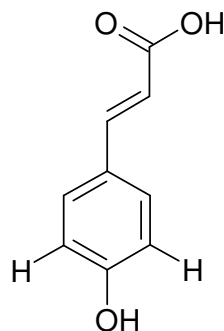


Figura 3. Ácido cumárico

Ácido ferúlico (Ácido 3-(4 – hidroxí – 3 – metoxi – fenil) 2 – propenóico): El más abundante de los ácidos hidroxicinámicos, se encuentra en las paredes

celulares. Sus principales fuentes son el maíz y el trigo, se puede encontrar en el nejayote, residuo de la nixtamalización del maíz, en importantes cantidades.

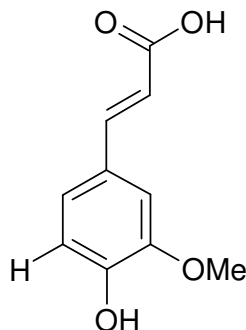


Figura 4. Ácido ferúlico

1.2 Ácido Ferúlico.

1.2.1 Historia

En 1866 Hlasiwetz y Barth en Innsbruck, Austria, aislaron ácido protocatecuico y resorcinol de la resina comercial de una planta conocida como *Ferula foetida*; al mismo tiempo, obtuvieron un precipitado ligeramente amarillo después de la adición de plomo divalente a una solución alcohólica de la resina, luego de que la sal de plomo fue lavada con alcohol y reconstituido el ácido libre, se determinó su composición como $C_{10}H_{10}O_4$, lo nombraron ácido ferúlico (Graf, 1992)

Poca investigación al respecto se realizó sobre este recién descubierto ácido durante los siguientes 60 años; en 1925 fue sintetizado químicamente por la condensación de vainillina con ácido malónico catalizada con amina. Los isómeros cis y trans fueron separados en 1957 y la estereoquímica del ácido ferúlico fue revelada por RMN de carbono-13 y confirmada por cristalografía de rayos X en 1988.

1.2.2 Síntesis

Para su síntesis química se utilizó la condensación de Knoevenagel, en 1932 se demostró que el ácido malónico se condensaba muy fácilmente con aldehídos aromáticos y alifáticos en presencia de pequeñas cantidades de piridina y piperpiridina. La condensación del ácido malónico con vainilla en presencia de 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. Otra vía de síntesis es la condensación de Perkin de vainillina con anhídrido acético; donde éstos, más acetato de sodio anhidro, son calentados por 5 horas a 150 – 170°C. La reacción se detiene con agua fría, el precipitado filtrado, extraído con éter y recristalizado de agua caliente.

1.2.3 Propiedades físicas

Ácido Ferúlico es el nombre común del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico. Aislado de plantas generalmente existe como el isómero trans; las agujas ortorrómbicas de este isómero pueden ser cristalizadas de agua caliente. Su masa molecular es de 194 y su punto de fusión de 174°C; es soluble en etanol, acetato de etilo y agua caliente; moderadamente soluble en éter y ligeramente soluble en benceno y éter de petróleo.

Es un fuerte ácido dibásico; la disociación del primer protón produce el anión carboxilato, la del segundo protón genera el anión fenolato. El isómero trans absorbe fuertemente en el UV a una longitud de onda de 248 nm y 307 nm en solución acuosa pH=6; también exhibe una fuerte fluorescencia.

1.2.4 Fuentes

Se encuentra presente en maíz, arroz, trigo, avena, sorgo, forraje, café tostado, tomate, espárragos, olivos, moras, chícharos, frutos cítricos y hojas, en las semillas generalmente se halla en la fracción de la fibra. En sus fuentes

naturales es difícil encontrarlo en forma libre, generalmente se encuentra como ésteres, covalentemente conjugado con mono y disacáridos, polisacáridos de la pared celular, glicoproteínas, lignina, betacianinas y otros carbohidratos y biopolímeros insolubles de la pared celular. Ha sido identificado también como una fracción lipídica. Los esteril ferulatos han sido aislados de maíz, trigo, centeno y triticale.

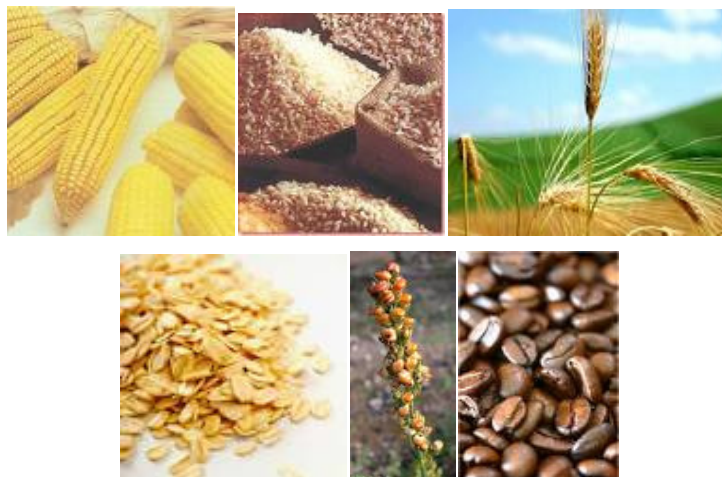


Figura 5. Algunas fuentes de ácido ferúlico: maíz, arroz, trigo, avena, sorgo y café

Es uno de los principales compuestos polifenólicos en el maíz, éste puede encontrarse en forma de dímeros, ésteres o dímeros esterificados.

1.2.5 Métodos de extracción

El ácido ferúlico puede extraerse de diferentes maneras, las más conocidas son mediante el uso de resinas de absorción o por medio de hidrólisis alcalina, utilizando más comúnmente NaOH a concentraciones de 0.5 a 2.0 N y tiempos de hidrólisis de 6 a 1 o 2 horas respectivamente, sin embargo se debe ser muy cuidadoso con el tratamiento, ya que condiciones muy suaves pueden no separar del todo el ácido ferúlico de los componentes de la pared celular, pero condiciones muy severas pueden oxidarlo. Algunos autores sugieren el uso de NaHSO₃ para prevenir la oxidación del ácido ferúlico.

Es posible también extraer el ácido ferúlico utilizando medios enzimáticos, usar esterasas es el método más común.

1.2.6 Biosíntesis

Este ácido se deriva del ácido *p*-cumárico a través de la hidroxilación seguida de la metilación con metionina actuando como el donador de metilo. Las siguientes reacciones de oxidación y metilación dan lugar a un adicional di- y trihidroxi cinamato que se convierte en el material inicial en la formación de la lignina. La degradación oxidativa del ácido ferúlico conduce a vainillina y guayacol (Graf, 1992).

1.2.7 Función biológica

Se han propuesto diversos roles fisiológicos para el ácido ferúlico; en las cadenas de pentosas, arabinoxilanos y hemicelulosas en la pared celular, lo cual incrementa la extensibilidad de la pared durante la elongación celular. En pastos, el ácido ferúlico acetila la cadena primaria C₅ – OH de las fracciones a – L – arabinosil de los arabinoxilanos; en algunas dicotiledóneas el ácido ferúlico está ligado a las pectinas. También se piensa que tiene un rol defensivo en contra de los depredadores naturales de las plantas, protegiendo por ejemplo al maíz de la infestación del gorgojo. Otro de sus papeles es promover la liberación reductiva del ion ferritina, lo cual representa un proceso importante en el metabolismo de los minerales; sin embargo, el mayor rol fisiológico parece ser su actividad antioxidante.

1.2.8 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del ácido ferúlico deriva en su mayoría de su habilidad de estabilizar a los radicales, también puede actuar como antioxidante, ya que disminuye los efectos de la radiación UV (Graf, 1992).

Cualquier radical que se encuentre cercano al ácido ferúlico, fácilmente atrae un átomo de hidrógeno para formar un radical fenoxi, el cual está altamente estabilizado por resonancia, dado que el electrón sin par puede localizarse en toda la molécula; una estabilización extra proviene de la conjugación en la cadena lateral insaturada.

Por su elevado grado de insaturación conjugada, el ácido ferúlico también absorbe fuertemente la radiación UV, que inicia la formación del radical fenoxi que conduce a la isomerización cis-trans, esta absorción UV ha demostrado inhibir otras reacciones de radicales libres.

1.3 Aplicaciones del ácido ferúlico

1.3.1 Aplicaciones en alimentos

El ácido ferúlico ha sido usado desde 1975 en Japón para proteger naranjas de ataques microbiano, y así evitar que se pudran y prevenir la auto oxidación del aceite de linaza (Graf, 1992); desde entonces, se ha utilizado para estabilizar el aceite de soya. Un derivado sintético, el tocoferol ferulato, ha demostrado tener incluso mejores propiedades antioxidantes que el mismo ácido ferúlico. Mezclas de ácido ferúlico y aminoácidos o ácido ferúlico y di péptidos (como gliciglicina o alanialanina) tienen un efecto sinérgico en la inhibición de la oxidación del ácido linoleico. Es materia prima para la obtención de vainillina.

Puede inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. El ácido ferúlico, en la naturaleza mantiene unidos los polisacáridos de la pared celular, por eso es usado para mejorar las propiedades de las biopelículas de proteína. Se ha reportado también que una concentración de 5.5 mmol/L mejora marcadamente la estabilidad de la leche a 140°C. Por ser un potente antioxidante, se cree que estimula la hormona de la secreción, por lo que podría tener aplicaciones en alimentos para deportistas (Ou, Kwok, 2004).

Un grupo de ésteres de ácido ferúlico forman el γ - orizanol, llamado así por ser un aceite que se extrae de la fibra del arroz (*Oryza sativa*). Las altas propiedades antioxidantes de este aceite han sido ampliamente reconocidas. Diversos estudios han mostrado varios roles fisiológicos relacionados al γ – orizanol. Se incluyen su habilidad para reducir el colesterol en el plasma, aminorar la absorción del mismo, disminuir la aterosclerosis temprana, inhibir la agregación de plaquetas e incrementar la excreción de bilis fecal ácida.

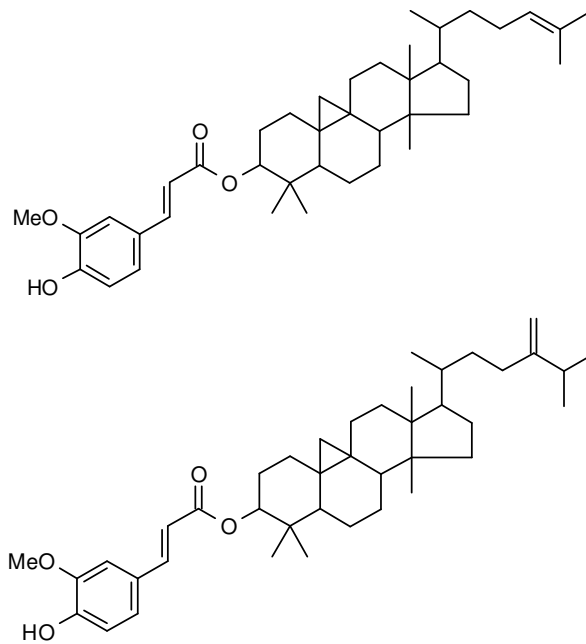


Figura 6. Principales alcoholes triterpénicos presentes en el γ – orizanol; cicloartenil ferulato y 24 – metilencicloartenil ferulato (Graf, 1992)

El γ – orizanol puede refinarse para aislarse del aceite de arroz; sin embargo, el aceite de arroz ya tiene sus aplicaciones en alimentos, por ejemplo, exhibe excelente desempeño en el freído y contribuye a dar un mejor sabor a la comida frita, puede ser almacenado porque es muy estable; puede adicionarse a la margarina por su facilidad de formar enlaces que permiten la cristalización, también, por su contenido de ácido palmítico, consiente un buen balance entre la plasticidad, la cremosidad y untabilidad.

Sin embargo, a pesar de sus múltiples beneficios, el ácido ferúlico no es compatible con algunos sistemas alimentarios, por ejemplo, los que son a base de grasas y aceites, ya que es hidrofílico. Para su uso en bases de grasas y aceites, necesita aplicarse de una manera modificada, por ejemplo, en forma esterificada.

1.3.2 Obtención de vainillina a partir de ácido ferúlico

A partir de este ácido se puede obtener la vainillina, que es un aditivo muy importante para impartir aroma y sabor, por bioconversión, lo cual convierte a la vainillina en un aditivo natural, característica muy valorada en estos días. La síntesis de vainillina a partir de ácido ferúlico se lleva a cabo utilizando cultivos de hongos filamentosos, por ejemplo el *Pycnoprus cinnabarinus*, que convierte el ácido ferúlico a vainillina a través de la reducción de la cadena de ácido propenóico via β – oxidación que da como resultado el ácido vainílico, para posteriormente reducir este a vainillina. *Aspergillus niger* puede solamente llegar hasta la conversión de ácido ferúlico en ácido vainílico, ya que carece de las enzimas necesarias para llegar hasta vainillina. Otros hongos que pueden convertir el ácido ferúlico a vainillina son: *Polyporus versicolor* y *Fomes fomentarius*. *E. Coli*, es una bacteria que logra convertir el ácido ferúlico en vainillina, ésta en ácido vainílico y éste en ácido protocatecuico. *Cornybacterium glutamicum* produce una mezcla de vainillina (10 – 15% de rendimiento) y ácido vainílico a partir del ácido ferúlico. Se ha encontrado también que la conversión de ácido ferúlico a vainillina utilizando *C. glutamicum*, *Aspergillus niger* y *Pseudomonas putida* tiende a incrementarse añadiendo compuestos sulfhídrico al medio, aunque el mecanismo de esta transformación aun no es claro (Sindhu, T Emilia, 2004).

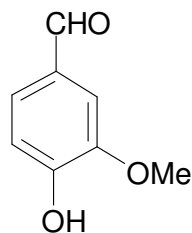


Figura 7. Vainillina

1.3.3 Aplicaciones en farmacia

Otras aplicaciones del ácido ferúlico son las terapéuticas, se ha comprobado que tiene propiedades que pueden ayudar a combatir los efectos de los padecimientos relacionados con el estrés oxidativo, como el Alzheimer, diabetes, cáncer, aterosclerosis e hipertensión; también se piensa que posee características contra enfermedades inflamatorias. Por su excelente absorción de la radiación UV, ya es usado como ingrediente en las lociones foto protectoras (Faulds, Clarke, Williamson).

Se ha sugerido que el ácido ferúlico sea usado como estimulante para la movilidad del espermatozoide en tratamientos de fertilidad o durante la fertilización *in vitro*, este efecto estimulante se debe, al parecer, a la habilidad del ácido ferúlico de limpiar los compuestos reactivos al oxígeno que oxidan las membranas lipídicas de las células de los espermatozoides e impartirles movilidad (Faulds, Clarke, Williamson).

En 1997 otro estudio demostró que el derivado de ácido ferúlico O – tocoferol – succinil – O – etil ferulato reduce la replicación del virus del VIH, HIV – I en células infectadas *in vitro* en un 80%.

Los efectos preventivos y terapéuticos del ácido ferúlico son dependientes de sus concentraciones fisiológicas, que están dadas por sus propiedades farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y eliminación).

1.4 Dímeros de ácido ferúlico

El ácido ferúlico puede encontrarse en plantas en su forma de dímeros. El primero en ser identificado fue el ácido 5,5' – diferúlico (5,5' – DiFA). Fue aislado de la pared celular de pasto por saponificación, después se demostró que enlaza arabinosilanos en bamboo; este enlace provee un mecanismo bioquímico para controlar las propiedades mecánicas de la pared celular, ya

sea al final de o después de la fase de extensión. El alto contenido de ácido ferúlico en las paredes celulares de tallos de plantas también se ha asociado con una reducción de la facilidad de digestión de tejido en rumiantes.

Se sabe ahora que los dihidrodímeros de ácido ferúlico están presentes en mayor cantidad y que contribuyen mucho más al enlazamiento de la pared celular de lo que se pensaba.

Los dímeros de ácido ferúlico pueden entrelazar diferentes cadenas de polisacáridos y en algunos casos, polisacáridos con lignina.

En plantas han sido identificados mayoritariamente los dímeros 8 - O - 4 - DiFA, 8 - 5 - benzofuran- DiFA, 5 - 5 - DiFA, 8 - 8 - aryl - DiFA y el 8 - 8 - DiFA; siendo el primero generalmente el más abundante. In vitro, el primero en ser sintetizado fue el 8 - 5 - benzofuran- DiFA utilizando el sistema biomimético de peroxidasa - peróxido de hidrógeno, sin embargo, usando algún tipo de control se pueden producir dímeros regio específicos. Los dímeros de ácido ferúlico en las plantas también se encuentran en su forma esterificada; el enlace de los polisacáridos de la pared celular, lo cual puede influenciar el comportamiento fisicoquímico de la fibra dietética y sus propiedades fisiológicas, por ejemplo, tamaño, fermentabilidad y capacidad de absorción.

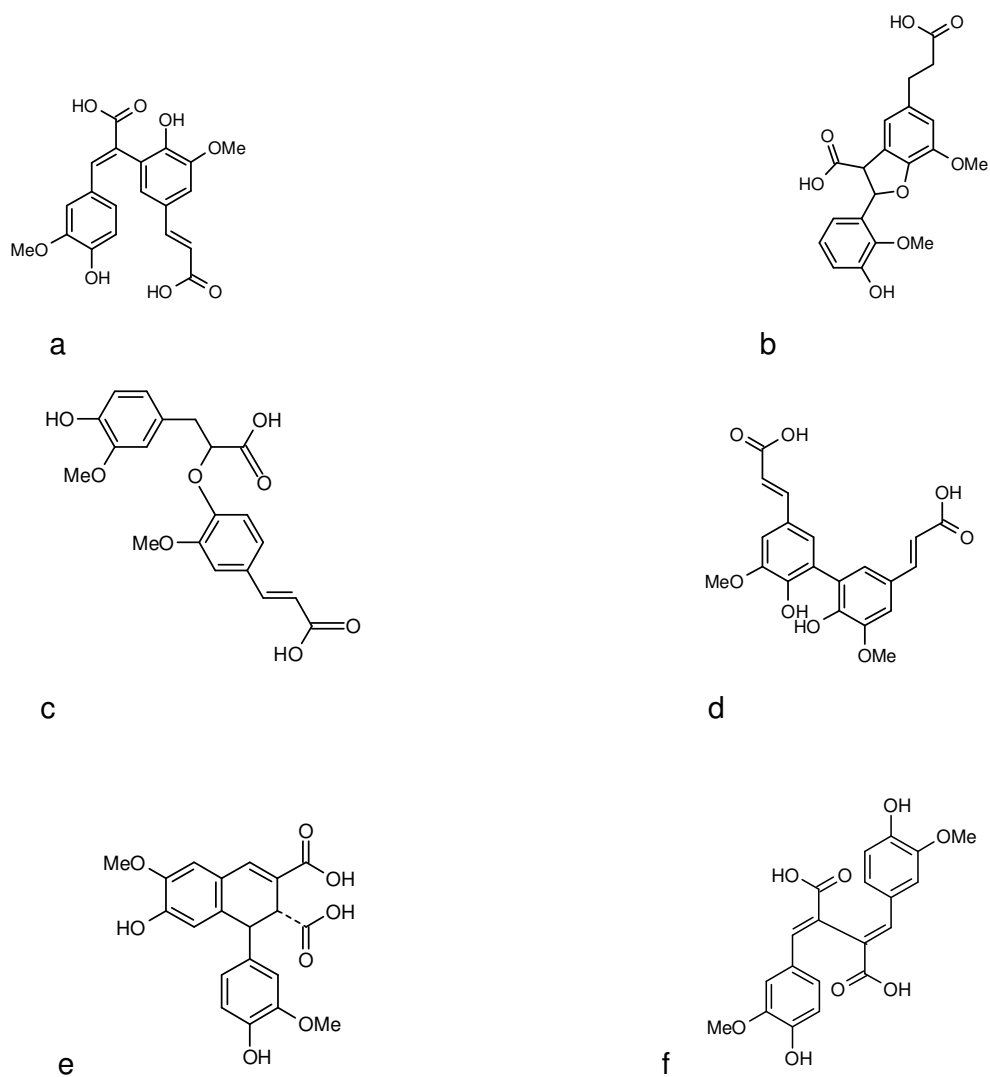


Figura 8. Ejemplos de dímeros de ácido ferúlico; a 8 - 5 - diFA; b 8 - 5 - benzofurano - diFA; c 8 - O - 4 - diFA; d 5 - 5 - diFA; e 8 - 8 - aril - diFA; e 8 - 8 diFA

1.4.1 Síntesis de dímeros de ácido ferúlico

La formación de los dímeros de ácido ferúlico tiene dos vías; la primera es el acoplamiento oxidativo que puede ser llevado a cabo por varios sistemas, como el de peroxidasa – peróxido de hidrógeno o el de polifenol oxidasa (incluidas las lacasas). El otro mecanismo es una ciclo adición foto inducida entre los carbonos de etileno de dos ácidos fenólicos conduciendo a la formación de dímeros de tipo de ciclobutano como los ácidos truxílico y truxínico (Larsen, Andreasen, Christensen, 2001)

Se sabe, por ejemplo, que el uso de sales cuaternarias de amonio o surfactantes amino N – oxido pueden controlar la fotodimerización de ácidos cinámicos; estos surfactantes forman micelas en soluciones acuosas con la parte iónica en la superficie del agua, en presencia de estos agregados, los ácidos carboxílicos se organizan alrededor de ellas con la parte ácida hacia adentro (Larsen, Andreasen, Christensen, 2001).

De este modo, se sintetizaron en diferentes condiciones algunos dímeros de ácido ferúlico, obteniéndolos en diversos rendimientos, concluyendo que la dimerización de los ácidos hidroxicinámicos en general depende tanto de la naturaleza geométrica como de la electrónica de un agente controlado, pero el uso de compuestos surfactantes parece ser un forma de síntesis de dímeros sólo a escala preparativa.

1.4.2 Función biológica de los dímeros de ácido ferúlico

Es posible que los dímeros de ácido ferúlico tengan un papel importante al proteger al maíz de que se pudra la mazorca por el hongo conocido como *Fusarium graminearum Schwabe*, que es muy grave en los campos de maíz porque éste produce micotoxinas como tricótesenos y zearalenona, que afectan la calidad del grano y representan un riesgo a la salud humana. El ácido ferúlico es el compuesto polifenólico más abundante en el maíz.

Así también, se sabe que los dímeros de ácido ferúlico son factores de resistencia contra varios insectos, evitando la penetración inicial y contra la propagación (Bily, Rerd, et. al., 2003).

Las paredes celulares de las plantas pueden estar expuestas a cambios extremos de pH que llegan a romper ciertos enlaces dentro de la misma pared celular. Un tratamiento alcalino, por ejemplo, puede romper el enlace éster que liga la pared celular a los ácidos fenólicos; un tratamiento ácido rompe los enlaces glicosídicos y solubiliza los azúcares, pero deja los enlaces éster intactos. Ambos tratamientos requieren altas concentraciones de ácido o base y puede haber otras modificaciones no deseadas en la pared celular, lo cual hace de la hidrólisis enzimática un mejor método, sin embargo; existe la posibilidad de utilizar residuos industriales de procesos que usaron tratamientos alcalinos como fuente de obtención de ácidos fenólicos, particularmente de ácido ferúlico.

1.4.3 Mecanismo de formación de dímeros de ácido ferúlico

El mecanismo más importante para el enlace de los polisacáridos en la pared celular es la dehidrodimerización de los ferulatos vía acoplamiento radical; sin embargo, por la vía de la saponificación no han podido obtenerse los dímeros esterificados. Por hidrólisis enzimática se consiguieron 5 – 5 – diferuloil oligosacáridos; siendo esto la primera evidencia estructural de que la dimerización de ferulatos da como resultado unidades de azúcares enlazadas para formar los polisacáridos de la pared celular, pero no prueba como tal el enlace intramolecular entre dos cadenas diferentes de polisacáridos. También ha podido aislarse el éster diarabinosil del ácido 8 – O – 4 – dihidroferúlico, que es también un dihidroferulato ligado a sacáridos; la existencia de este éster sí puede probar que los dihidroferulatos pueden actuar como agentes enlazadores intramoleculares en la pared celular (Allerdings, Ralph, et. al., 2004)

El enlace intramolecular tiene efectos muy importantes en la estructura de la pared celular, influenciando las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de la fibra de los cereales en general.

1.5 Ésteres de ácido ferúlico

Por la baja solubilidad de los ácidos fenólicos en medios hidrofóbicos, las aplicaciones de los mismos se ve limitada en productos cosméticos y sistemas alimenticios cuya base sea oleosa. La hidrofobicidad de estos compuestos puede aumentarse por esterificación del grupo funcional carboxilo con un alcohol para obtener una molécula anfifílica que mantenga las propiedades de la original (potencial antioxidante principalmente).

El ahora éster fenólico se podría acumular en una interface aceite – agua o agua – aceite donde ocurre la oxidación incrementando la protección del aceite o sistema oleoso.

1.5.1 Síntesis de ésteres fenólicos

La síntesis de ésteres fenólicos se puede lograr por vía química o enzimática. La síntesis química es complicada debido a lo fácil que los ácidos fenólicos se oxidan en medios alcalinos; además, la reacción química no es selectiva lo cual generalmente lleva a reacciones secundarias no deseadas, involucran muchas etapas intermedias y generan productos de desecho extra en la purificación del producto deseado. Las reacciones enzimáticas, en cambio, se pueden llevar a cabo en condiciones de temperatura y pH menos severas, se minimizan las etapas intermedias y por lo tanto la obtención de productos secundarios son específicas, las enzimas tienen una amplia variedad de sustratos que pueden utilizar, hay pocos pasos de purificación, por lo tanto generan menor cantidad de residuos y ocasiona que este tipo de reacciones sean amigables con el medio ambiente.

El ácido acético se ha esterificado con alcoholes monoterpénicos como geraniol y citronelol utilizando la lipasa de *Candida antarctica*; el ácido propiónico se ha esterificado con etanol usando la lipasa de *Candida cylindraceae*; los ésteres de ácidos butíricos con geraniol, n – butanol y glicidol se sintetizaron recurriendo a lipasas de *M. miehei* y páncreas de cerdo. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* se ha utilizado para sintetizar los ésteres de ácido oléico con azúcares; por transesterificación se han formado ésteres de citronelol y geraniol a partir de triacil glicerol.

También se han obtenido octil ésteres del ácido hidroxicinámico y del p – hidroxí ácido hidroxicinámico utilizando las lipasas de *C. antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* y Liposima (Priya, Chadha, 2002).

Los derivados hidrofóbicos del ácido ferúlico, los alquil ferulatos, tienen una actividad antioxidante más grande que el ácido ferúlico en la prevención de la oxidación del ácido linoléico en un sistema voluminoso (Yoshida, Kimura, et. al., 2006)

La reacción de esterificación del ácido ferúlico con algún sustrato alcohólico da un rendimiento muy bajo debido a que el ácido ferúlico tiene una conjugación de un grupo carboxilo con una región no carboxílica que es muy voluminosa.

Algunas maneras de aumentar el rendimiento de estas reacciones son: utilizar alcoholes lineales con cadenas de hasta 12 carbonos que son líquidos a temperatura ambiente, ya que la misma condensación del sustrato es una manera de acelerar la reacción por la alta concentración de sustrato. Otra manera es aumentar la temperatura de la reacción, pero altas temperaturas pueden desnaturalizar la enzima.

Los resultados de esterificación de ácido ferúlico que se han reportado hasta el momento, todos con diferentes condiciones de temperatura, alcohol, tiempo y enzima, muestran rendimientos diversos, que van desde el 11 hasta el 60 % de rendimiento, dependiendo por supuesto de las condiciones.

Tabla 1. Resultados de esterificaciones de ácido ferúlico (Figuroa – Espinoza, Villeneuve, 2005)

Referencia	Condiciones	Alcohol	Rendimiento (%)
Guyot et al.	Ácido ferúlico 100 mg Alcohol 7.5 ml Lipasa (2.5 % p/p según la mezcla de reacción) 60°C 15 días	n - butanol	Trazas
Stamatis et al.	Ácido ferúlico (50 – 500 mg) Alcohol 5 ml Lipasa 150 mg 50°C 12 días	1 – octanol con <i>C. antarctica</i> o <i>R. miehei</i>	11 o 30
Compton et al.	Ácido ferúlico 0.1 M Alcohol 0.1 M Disolvente 2 - metil – 2 propanol 5 ml Lipasa 100 mg 60°C en atmosfera de nitrógeno 13 días	1 - octanol	14
Giuliani et al.	Ácido ferúlico 220 mM Alcohol 9 ml CTAB (100mM)/hexano/pentano (0.86 M) micro emulsión agua en aceite Berilio esterase 135 ni 40°C, pH 6.0	n - pentano	60

	8 h		
Topakas et al.	<i>F. oxysporum</i> feruloil esterasa Microemulsión n – hexano / 1 – propanol / agua (47.2:50.8:2.0 v/v/v) 30°C 224 h (9.33 días)	1 - propanol	16

Se ha observado que el efecto inhibitor de la lipasa que provoca los sustituyentes electrodonadores conjugados con grupos carboxilos en derivados hidroxilados del ácido cinámico es fuerte, pero si la cadena lateral es saturada, no se observa inhibición y la esterificación puede llevarse a cabo.

1.6 Lipasas

Uno de los objetivos de este trabajo fue la síntesis de ésteres de ácido ferúlico y de ésteres de un dímero de ácido ferúlico, para ello se empleó la lipasa de *Candida antarctica*, a continuación se describen aspectos generales de las lipasas.

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol; actualmente, juegan un papel muy importante en biotecnología en las industrias alimenticias y de producción de combustibles, también se usan para producir intermediarios quirales. Como las esterasas y proteasas, pueden hidrolizar y formar ésteres a partir de ácidos carboxílicos; sin embargo, su mecanismo molecular es diferente de las otras dos, lo cual le da a las lipasas propiedades únicas.

La principal diferencia entre las lipasas y las esterasas es la interacción fisicoquímica con sus sustratos. Las esterasas muestran una cinética regular, es decir, de tipo Michaelis – Menten donde a mayor cantidad de sustrato se incrementa la actividad; las lipasas en cambio, exponen casi nada de actividad

mientras el sustrato esté disuelto en un estado monomérico. Cuando la concentración de sustrato aumenta gradualmente, hasta llegar más allá de su límite de solubilidad formando una segunda fase (lipofílica), ocurre un incremento considerable en la actividad de la enzima.

El que las lipasas no hidrolicen sustratos antes de una concentración crítica (que se conoce como Concentración micelar crítica, CMC), pero muestren una gran actividad pasada ésta es conocida como “activación interfacial”.

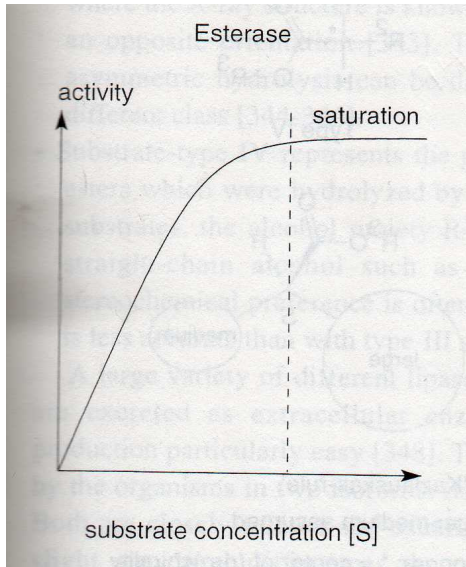
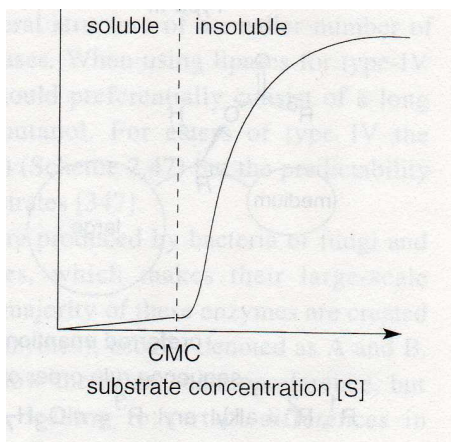


Figura 9. Esquema de la cinética Michaelis - Menten para una enzima común (izquierda) y esquema de la cinética de una lipasa (derecha)



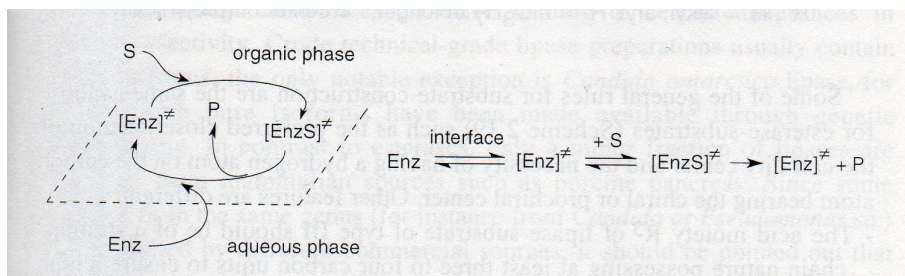


Figura 10. Activación interfacial de una lipasa

Esto ocurre porque al cambiar la fase sucede un re arreglo con la enzima. Una lipasa libremente disuelta en ausencia de una interfase acuosa/lipídica se mantiene en estado inactivo porque una parte de la misma enzima cubre el sitio activo; cuando la enzima hace contacto con la interfase de un sistema bifásico agua – aceite una pequeña α – hélice es “desdoblada”; esto abre el sitio activo de la lipasa, provocando el re arreglo a su estado activo.

Por este fenómeno, las hidrólisis catalizadas con lipasas deben llevarse a cabo en un medio bifásico, para lo cual es suficiente utilizar el sustrato sólo a altas concentraciones para que el sustrato mismo constituya la segunda fase I, puede ser disuelto en un disolvente orgánico inmiscible en agua como hexano, éter de petróleo o algún disolvente aromático.

Por la presencia de una interfase, los parámetros físicos que influyen la transferencia de masa del sustrato y el producto entre la fase acuosa y la fase orgánica, tales como la agitación del sistema, tienen gran importancia en la acción de las lipasas.

Los triacil gliceroles son usados como sustratos estándar para la determinación de la actividad de lipasa, para las esterasas, el p – nitrofenil acetato es el estándar común. La adición de solventes orgánicos inmiscibles en agua en reacciones catalizadas por lipasas es una técnica muy útil para mejorar actividades catalíticas. Por otro lado, los disolventes orgánicos solubles en agua son más usados en reacciones catalizadas por esterasas.

Por su capacidad para hidrolizar ésteres además de glicéridos, las lipasas son muy útiles en síntesis orgánica; algunas lipasas también aceptan tioésteres como sustratos. Al contrario de las esterasas, las lipasas se han usado para la resolución de mezclas racémicas. Dado que sus sustratos naturales son ésteres de un alcohol quiral (glicerol) con un ácido aquiral, se puede esperar que las lipasas sean más útiles para hidrolizar ésteres de alcoholes quirales que para hidrolizar ésteres de ácidos quirales. Aunque esta suposición es cierta para la mayoría de los sustratos, algunas lipasas, aunque muy pocas, también muestran alta selectividad para reconocer la quiralidad de una fracción ácida.

Algunas de las reglas generales para la interacción con el sustrato son:

- Las lipasas prefieren una localización más cercana al centro quiral.
- Necesitan un átomo de hidrógeno en el átomo de carbono localizado junto al centro quiral o proquiral.
- La fracción ácida R3 de un sustrato de lipasa tipo III debe ser una cadena lineal de al menos 3 o 4 unidades de carbono para asegurar una alta lipofilidad del sustrato. Al mismo tiempo que los sustratos de cadena larga como los oleatos son mejores para una reacción rápida, causan problemas operacionales como el alto punto de ebullición del sustrato y que facilitan la formación de espumas y emulsiones durante la extracción del producto. Por ello, generalmente se usan n – butanoatos, ya que éstos son de cadena lo suficientemente corta para manejarlos fácilmente y lo adecuadamente largas para una gran velocidad de reacción.
- El hecho de que la mayoría de las lipasas muestren la misma preferencia estereoquímica por ésteres de alcoholes secundarios se conoce como la “Regla de Kazlauskas”. Esto es, asumiendo que el orden de secuencia de los sustituyentes R1 y R2 es largo > mediano, el enantiomero preferiblemente aceptado tiene la configuración – ⊕ del centro alcohólico.

- Muchas proteasas y la esterasa de hígado de cerdo tienen una preferencia estereoquímica opuesta a la de las lipasas. Esto es porque la “tríada catalítica” de las lipasas y proteasas (donde se conoce la estructura por rayos X) frecuentemente se encuentra en una orientación opuesta. El resultado estereoquímico de una hidrólisis asimétrica puede ser directa eligiendo una hidrolasa de diferente clase.
- Los sustratos de tipo IV representan la estructura general de un número más pequeño de ésteres que pueden ser hidrolizados por lipasas. Cuando se usan lipasas para sustratos de tipo IV, la fracción alcohólica R3 debe consistir preferentemente en una larga cadena lineal de alcohol como el n – butanol. Para ésteres de tipo IV la preferencia estereoquímica es frecuentemente (S), pero son menos predecibles que sustratos de tipo III.

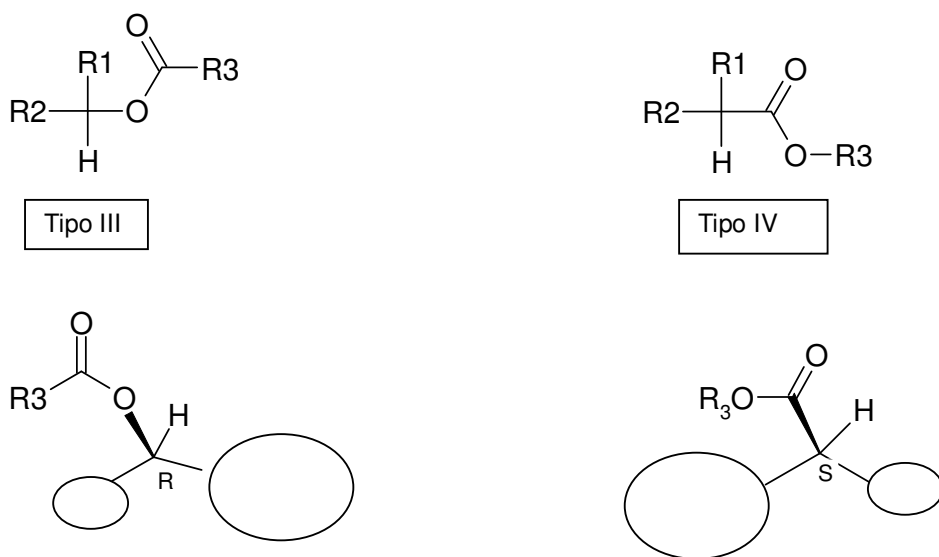


Figura 11. Sustratos tipo de una lipasa. Eneantmero preferido: “Regla de Kazlauskas” se asume la regla de la secuencia largo > mediano. R1, R2 = alquil, aril; R3 = n – C₃H₇ o más larga

Una amplia variedad de lipasas son producidas por bacterias u hongos y son excretadas como enzimas extracelulares, por ello, la producción a gran escala es sencilla. La mayoría de estas enzimas son producidas en dos isoformas,

generalmente conocidas como A y B. Ambas están muy relacionadas y usualmente muestran la misma eneanto preferencia; sin embargo, las mínimas diferencias que existen entre ambas isoformas conllevan ciertas diferencias en eneanto selectividad.

Las lipasas crudas grado técnico generalmente contienen ambas isoformas, con excepción de la lipasa de *Candida antarctica*, cuyas isoformas puras se han producido utilizando ingeniería genética.

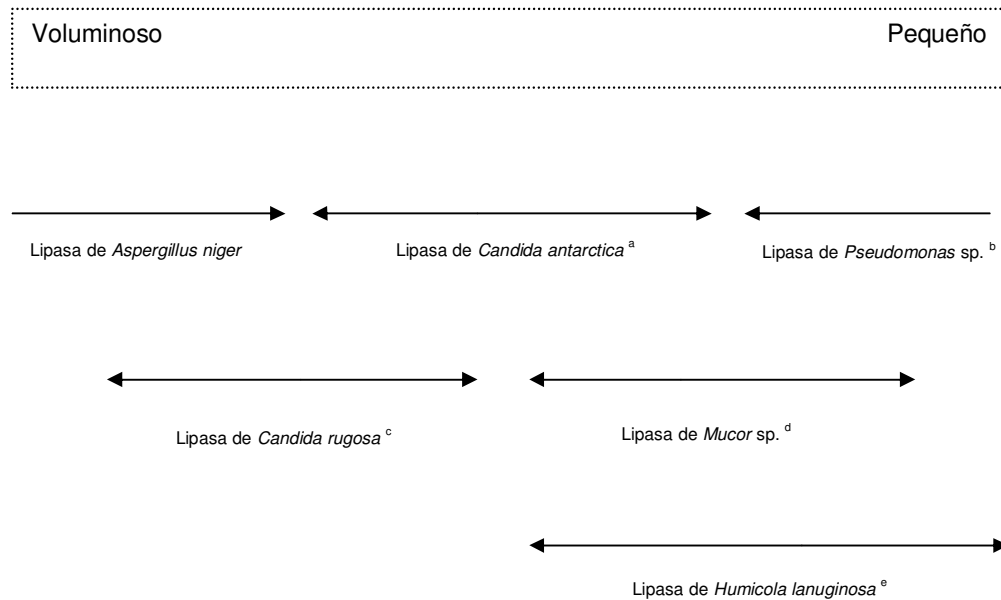


Figura 12. Ejemplos de lipasas y el tamaño de sustratos que aceptan. ^a Isoenzima B es usada más frecuentemente; ^b las siguientes lipasas están en esta categoría: *Pseudomonas cepacia*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *Chromobacterium viscosum*; ^c formalmente clasificada como *C. cylindracea*; ^d *Mucor miehei* (*Rhizomucor miehei*), *M. javanicus* (*Rh. Javanicus*); ^e Idéntica a *Thermomyces lanuginosus*

1.6.1 Lipasas de *Candida* sp.

Las lipasas crudas que forman este grupo provienen de *Candida lipolytica*, *Candida antarctica* (CAL) y *C. rugosa* (CRL); esta última se ha usado frecuentemente para la resolución de ésteres de alcoholes secundarios y también para la resolución de carboxilatos α – sustituidos. Las preparaciones de CRL de diferentes fuentes comerciales que contienen arriba del 16% de proteína difieren un poco en actividad, aunque su selectividad es muy parecida.

Como esta lipasa puede acomodar ésteres relativamente voluminosos en su sitio activo, es la lipasa elegida para la hidrólisis selectiva de ésteres que provengan de alcoholes cíclicos secundarios.

La lipasa de *Candida rugosa* ocasionalmente muestra una moderada selectividad en ésteres carboxílicos α – sustituidos, puede atribuirse a la presencia de ambas isoformas en preparaciones crudas. Ambas formas consiguen separarse por cromatografía con Sephadex y se sabe que poseen una estereoselectividad idéntica cualitativamente, pero diferente cuantitativamente.

La lipasa más versátil para biotransformaciones preparativas se obtiene de la levadura *Candida antarctica* (CAL). Como su nombre lo indica, fue aislada en la Antártica con otras enzimas de propiedades extremas que fueron utilizadas en formulaciones de detergentes.

Este microorganismo produce las isoformas A y B, que difieren de la siguiente manera: la fracción A es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que la lipasa B es menos termotolerante e independiente de los metales.

Para fines preparativos, las diferencias son aún más importantes, ya que varía la especificidad que tienen para el sustrato. La lipasa A es altamente activa de manera no específica, mostrando una preferencia por el grupo éster sn^{-2} y no es muy útil para ésteres simples no naturales.

Ambas isoformas se han producido puras por clonación y sobre expresión en *Aspergillus oryzae* como organismo huésped.

La lipasa de *Candida antarctica* es una proteína excepcionalmente grande que se desactiva a 50 – 60°C y también muestra incrementar su resistencia en contacto con disolventes orgánicos. A diferencia de otras enzimas, ésta parece ser un tanto “rígida” y no muestra un efecto pronunciado de activación interfacial, lo que la hace un intermedio entre esterasa y lipasa. Ésta puede ser muy bien la razón por la cual su selectividad logra ser predicha por modelos computacionales. También, con la adición de co – disolventes orgánicos miscibles en agua como el *t* – butanol o la acetona se puede mejorar la selectividad.

Todas estas propiedades convierten a la lipasa de *Candida antarctica* en la enzima favorita tanto en la hidrólisis como en la síntesis de ésteres.

Aunque la mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales provienen de microorganismos, también se debe considerar que las lipasas pueden obtenerse de las plantas. Estas lipasas se encuentran en semillas oleosas y en cereales; en la mayoría de los casos, la actividad enzimática está presente en la etapa de pos – germinación. Las lipasas de semillas oleosas frecuentemente tienen tiposelectividad más allá de los ácidos grasos dominantes en la misma semilla de la planta. Algunas lipasas también se han hallado en la fracción de fibra del arroz y en trigo.

Las lipasas de plantas parecen muy atractivas dado su bajo costo, fácil purificación y el que están ampliamente disponibles en fuentes naturales sin requerir tecnología genética para producirlas. Sin embargo, también es cierto que la cantidad en la que se encuentran dentro de sus fuentes naturales es muy baja lo cual representa una desventaja para su uso extensivo o a nivel industrial.

Una manera de contrarrestar esa desventaja es enfocarse en la investigación de nuevas fuentes de lipasas de plantas y el desarrollo de nuevas aplicaciones en materiales de desecho que provengan de procedimientos industriales que aún conserven sus propiedades, como la actividad lipolítica.

1.6.2 Reacciones de esterificación

Todas las reacciones de síntesis donde se forme agua, tales como la formación de ésteres a partir de alcoholes y ácidos carboxílicos, tienen problemas fisicoquímicos; esto porque el disolvente lipofílico no puede disolver el agua que se produce gradualmente formando una fase acuosa que finalmente separa a la enzima del sustrato por una interface polar; esta interfase es difícil que sea penetrada por las moléculas lipofílicas de sustrato/producto. Entonces, la reacción ya no se lleva a cabo de igual manera e incluso puede terminar antes de alcanzar el nivel de conversión deseado.

Dos técnicas pueden utilizarse para disminuir este problema:

- Remover el agua que se forma en el sistema, ya sea por destilación azeotrópica, evaporación, adición de malla molecular como desecador o sales inorgánicas.
- Evitar la formación de agua empleando un paso de transferencia de acilo, en vez de una esterificación como tal.

Algunos de estos métodos tienen sus desventajas, por ejemplo, la evaporación puede utilizarse siempre y cuando el punto de ebullición del alcohol y el ácido sean mayores al del agua. Por otro lado la recuperación de la enzima, a partir de los disolventes orgánicos, se puede volver problemática en presencia de sales inorgánicas o malla molecular.

Las trans o interesterificaciones no producen agua durante la reacción, por lo que la actividad acuosa se mantiene constante a lo largo de toda la reacción, lo

cual ocasiona que la actividad de la enzima permanezca constante. Entonces, la actividad acuosa debe ajustarse sólo al comienzo de la reacción. La desventaja de estas reacciones es que son generalmente reversibles; pero pueden aplicarse estrategias para mantener el equilibrio de la reacción:

- Exceso de donador de acilo; pero esto puede ser caro y no siempre compatible con la idea de mantener la enzima en su más alta actividad.
- Otra solución, y quizá mejor aún, es usar donadores de acilo especiales que aseguren un tipo de reacción más irreversible.

La reversibilidad de las reacciones de transesterificación es causada por la nucleofilicidad del nucleófilo atacante (Nu1) y la del grupo del donador de acilo (Nu2), y ambos completan el intermediario enzima – acilo tanto en la reacción de avance y en la de reversa. Si la nucleofilicidad del grupo saliente Nu2 es disminuida, por ejemplo, por la introducción de un sustituyente que atraiga electrones, la reacción es conducida hacia la derecha hasta completarse. Este concepto se ha verificado con la introducción de ésteres “activados”. Aunque la transferencia de acilo utilizando ésteres activados es reversible al principio, el equilibrio hacia productos se alcanza de una manera que para propósitos preparativos puede considerarse como irreversible.

1.7 Peroxidasas

Para obtener el dímero del ácido ferúlico en este trabajo se utilizaron dos peroxidasas, una comercial de rábano, (HRP) y un extracto crudo proveniente de espinas de nopal. A continuación se describen generalidades de las peroxidasas.

1.7.1 Clasificación de las enzimas redox

Las reacciones de óxido – reducción son catalizadas por enzimas redox, clasificadas como óxido – reductasas y divididas en cuatro categorías con respecto al oxidante que utilizan y las reacciones que catalizan

- Deshidrogenasas (reductasas)
- Oxidasas
- Oxigenasas (mono y desoxigenasas)
- Peroxidasas

1.7.2 Importancia, fuentes y función de las peroxidasas

Las peroxidasas son importantes sobre todo en años recientes debido a sus aplicaciones sintéticas. Catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, oxidación de compuestos heteroátomo, epoxidación y reducción en tanto selectiva de hidroperóxidos racémicos.

Las peroxidasas se encuentran comúnmente en plantas, microorganismos y animales; son nombradas ya sea por su fuente o de acuerdo con su sustrato. La mayoría de las peroxidasas estudiadas hasta ahora son hemo enzimas con protoporfirina férrica IX (protohemo) como grupo prostético. Sin embargo, los centros activos de algunas peroxidasas también contienen selenio (glutación peroxidasa), vanadio (bromo peroxidasa), manganeso (manganeso peroxidasa) y flavina (flavin peroxidasa).

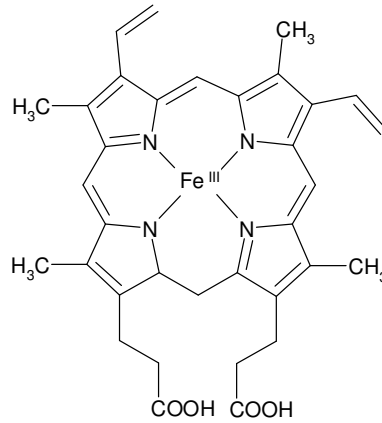


Figura 13. Estructura de ferriprotoporfirina III (protohemina)

Tabla 2. Tipos de peroxidasas (Faber, 2001)

Peroxidasa	Fuente	Reacción catalizada	Funciones biológicas
Peroxidasa de rábano (HRP)	Raíces de Armoracia rusticana	$2AH + H_2O_2 \rightarrow 2A' + H_2O$	Biosíntesis de hormonas de plantas
Catalasa	Hígado de bovino	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Detoxificación de peróxido de hidrógeno
Citocromo c Peroxidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2Cc(II) + H_2O_2 \rightarrow 2Cc(III) + 2H_2O$	Reducción de H ₂ O ₂ y oxidación de Citocromo c
Ligninperoxidasa	<i>Phanerochaete</i>	$2HA + H_2O_2 \rightarrow 2A' + 2H_2O$	Degradación de

	<i>chrysosporium</i>		lignina
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>	$2RH + 2Cl^- + H_2O_2 \rightarrow 2RCl + 2H_2O$	Biosíntesis de caldariomicina
Mieloperoxidasa	Leucocitos humanos	$H_2O_2 + Cl^- + H_3O^+ \rightarrow HClO + 2H_2O$	Antimicrobial
Lactoperoxidasa	Leche de bovino	$2HA + H_2O_2 \rightarrow 2A^- + 2H_2O$	Antimicrobial

1.7.3 Mecanismos de catálisis de las peroxidases

Se ha estudiado ampliamente el mecanismo de reacción para la peroxidasa de rábano. El primer paso, involucra la adición de H_2O_2 al estado basal del Fe^{III} para formar derivado oxo – hierro conocido como Compuesto I, que es formalmente dos equivalentes de oxidación arriba del estado Fe^{III} . El compuesto I contiene una estructura $Fe^{IV} = O$ un catión radical p. En el siguiente paso, el Compuesto I es reducido al Compuesto II con una estructura $Fe^{IV} = O$. La reducción del catión radical por un fenol o enol está acompañada por una transferencia de electrón al Compuesto I y una transferencia de protón a un grupo básico distal, probablemente His 42. El estado nativo es entonces regenerado en una reducción de un electrón del Compuesto II por un fenol o un enol. En este proceso, la transferencia de electrón y de protón ocurre en el grupo ferril con reducción simultánea de Fe^{IV} a Fe^{III} y la formación de agua como grupo saliente.

La ruptura del enlace O – O del hidroperóxido es promovido por un mecanismo en el cual la HRP nativa reacciona con la forma no ionizada del hidroperóxido. Entonces, el hidroperóxido es convertido en un mucho mejor nucleófilo transfiriendo su protón al grupo básico distal (His42).

La carga positiva del proximal His 170 facilita la formación del enlace ion – peróxido. Entonces, la inversión de la carga en el sitio activo de la peroxidasa de rábano facilita la ruptura heterocíclica del enlace O – O. Las cargas positivas

en His 42 y Arg 38 y la carga negativa en His 170 tienen participación en la formación de las especies $Fe = O$.

1.7.4 Reacciones catalizadas por peroxidasas

Las transformaciones catalizadas por peroxidasas se clasifican como:

- Reacciones de peroxidación
- Reacciones de peroxigenación
- Reacciones de oxidación

Tabla 3. Reacciones catalizadas por peroxidasas (Faber, 2001)

Reacción		Sustratos típicos	Peroxidasa
Transferencia de electrones	$2AH + ROOH \rightarrow A-A + ROH + H_2O$	H_2O_2 , ROOH, fenoles, aminas aromáticas	HRP, LiP
Desproporción	$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	H_2O_2	HRP, CPO
Halogenación	$AH + HX + H_2O_2 \rightarrow AX + 2H_2O$	Tirosina, H_2O_2	CPO, LPO
Sulfoxidación	$R_1-S-R_2 + ROOH \longrightarrow$ $R_1-S(=O)-R_2 + ROH$	Tianisol, H_2O_2 , ROOH	CPO, HRP
Epoxidación	$R_1-CH=CH-R_2 + H_2O_2 \longrightarrow$ $R_1-CH(O)-CH(O)-R_2 + H_2O$	Alquenos, H_2O_2	CPO, HRP
Demetilación	$ROOH + R^1R^2NCH_3 \rightarrow ROH +$	N, N -	HRP

	$R'R''NH + HCHO$	dimetilalanina. ROOH	
Deshidrogenación		Ácido dihidroxifumarico	HRP
Hidroxilación		L- Tirosina, adrenalina	HRP
α - Oxidación		Aldehídos	HRP

En una reacción de peroxidasa sustratos ricos en electrones como los fenoles o aminas aromáticas, así como el NADPH y NADH son oxidadas por H_2O_2 o hidroperóxidos a través de una transferencia de un electrón para formar productos de acoplamiento radical. Las peroxidases y en particular la catalasa también descomponen hidroperóxidos y perácidos en ausencia de un donador de electrones. La catalasa descompone el H_2O_2 en oxígeno y agua; las cloroperoxidasa y mieloperoxidasa que contienen el grupo hemo también son conocidas por usar el peróxido de hidrógeno para oxidar iones haluro (Cl^- , Br^- o I^- , no F^-) a especies reactivas halogenantes. En la halogenación, el ion haluro puede interactuar directamente con el ligante oxo del Compuesto I para producir un hipoclorito férrico aducto.

Las peroxidases, particularmente CPO, pueden catalizar también reacciones de mono oxigenación que incluyen sulfoxidación de tioéter, epoxidación de olefinas y N – dealquilación de alquilaminas aromáticas. El átomo de oxígeno que se incorpora al producto en las oxi funcionalizaciones catalizadas por CPO se deriva primariamente o exclusivamente del peróxido. El proceso de dos electrones procede con un átomo de oxígeno directamente transferido del Compuesto I al sustrato.

Este tipo de transferencia de oxígeno catalizada por peroxidasas es conocida como reacción de peroxigenasa. La peroxidasa de rábano cataliza algunas reacciones que incorporan oxígeno en presencia de H_2O_2 , donde la fuente del átomo de oxígeno incorporado no sea H_2O_2 . La incorporación del átomo de oxígeno requiere un cosustrato (co – oxidación), el cual por la transferencia de un electrón se convierte en un carbono radical (reacción de peroxidasa). Este último reacciona con oxígeno molecular para convertirse en un radical peroxi ($ROO\cdot$), que es responsable de la formación del producto de oxidación. Una excepción a esta vía de reacción son las oxigenaciones de tioanisoles catalizadas por HRP.

En ausencia de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos, las peroxidasas muestran actividad de oxidasas; en presencia de oxígeno molecular, aldehídos, dihidroxiácidos o NADH son oxidados por peroxidasas.

La peroxidasa de rábano se obtiene de las raíces de *Armoracia rusticana*, que es una planta originaria de Europa; por ser la primera que fue cristalizada, es la más estudiada. Está conformada por 40 isoformas con pH óptimo de 4.2 y 5. Otras fuentes de peroxidasas son la *Momordica charantia*, la de *Papaver somniferum*.

Otra fuente importante de peroxidasas es el nopal, *Opuntia ficcus indica*; se ha encontrado que este género presenta hasta 9 isoformas; éstas varían en su peso molecular que va de 40 a 60kDa; tiene un pH óptimo de 5.75 y una actividad específica de 11900 U (Aguilar, 2007)

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se dividió en tres partes:

2.1 Primera parte

La primera parte consistió en la obtención de las materias primas; la primera etapa fue la obtención de ácido ferúlico que se extrajo a partir del residuo de nixtamalización del maíz, llamado nejayote utilizando dos adsorbentes, la resina comercial Amberlita y carbón activado.

Por otro lado, se obtiene la peroxidasa de nopal en la etapa cuatro a partir del residuo de desespinado de nopal, las espinas de nopal se licuaron en buffer de fosfatos y posteriormente se le midió cantidad de proteína y actividad enzimática.

2.2 Segunda parte

Una vez que se obtuvieron las materias primas necesarias para la realización del trabajo se procedió a la parte de reacciones.

En la etapa dos se realizó la síntesis del éster etílico del ácido ferúlico por el método de Fieser descrito por Ralph en 1998, que consiste en la reacción química de ácido ferúlico con etanol absoluto anhidro y ácido clorhídrico. Ya que se obtuvo este producto se purificó y caracterizó por RMN.

Una vez sintetizado y caracterizado este producto, se procedió a la etapa tres: transesterificar enzimáticamente el mismo con propanol, butanol y decanol. La enzima utilizada para esto fue la lipasa de *Candida antarctica*; los productos de estas reacciones se cuantificaron por cromatografía de gases.

Posteriormente se sintetizó el dietil diferulato (etapa cinco), utilizando para esto el método enzimático descrito por Ralph en 1998, que consiste en la reacción de acoplamiento oxidativo del etil ferulato con peroxidasa de rábano, para objeto de este trabajo se utilizó además de la peroxidasa de rábano el extracto de peroxidasa de nopal obtenido en la primera parte. El producto que se obtuvo se purificó y caracterizó por RMN.

Cuando se tuvo caracterizado el producto, se realizó la etapa seis: se transesterificó enzimáticamente el mismo con propanol, butanol y decanol; usando también la lipasa de *C. antarctica*; estos productos también se cuantificaron por cromatografía de gases.

2.3 Tercera parte

La tercera parte y etapa siete consistió en la cuantificación del porcentaje de transformación de sustratos a productos de transesterificación utilizando la cromatografía de gases.

2.4 Reactivos

Disolventes orgánicos grado analítico: Hexano, acetato de etilo, tolueno, etanol, ácido clorhídrico, propanol, 1 – butanol y n – decanol y ácido acético.

Disolventes orgánicos grado HPLC: Metanol, acetona, acetato de etilo, hexano y etanol absoluto anhidro.

Reveladores: Sulfato cérico y vainillina.

Adsorbentes: Sílica gel, carbón activado.

Enzimas: Peroxidasa de rábano, lipasa de *Candida antarctica* isoforma B.

Reactivos: H₂O₂, guayacol, sulfato de cobre, fosfatos monobásico y dibásico de sodio, acetato de sodio, tartrato de sodio y potasio, NaOH.

2.5 Equipos

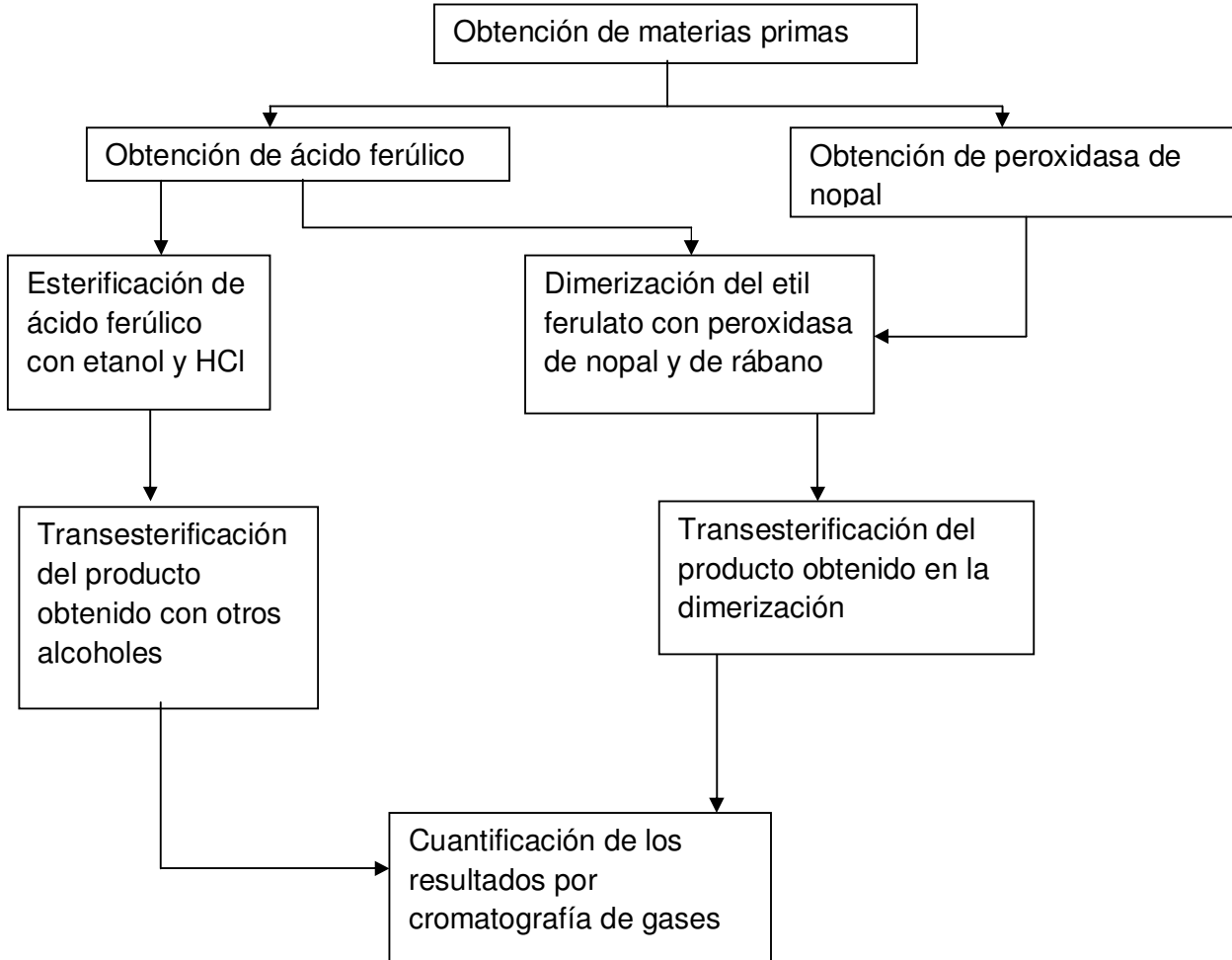
Rotavapor Poly Science

Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890N que cuenta con un inyector automático Agilent Technologies modelo 7683 series.

Columna Capital J&W de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y 0.25 μm de recubrimiento

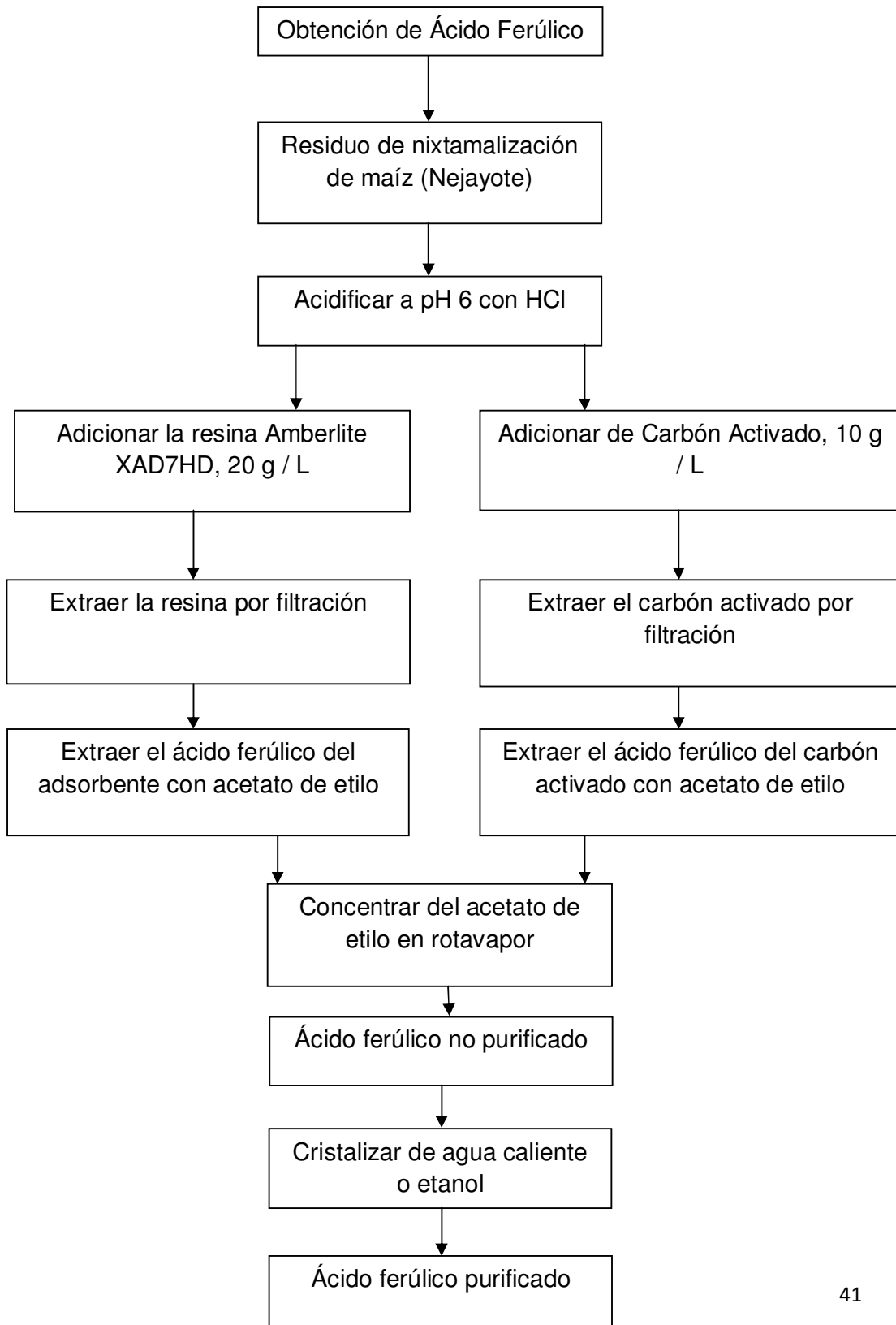
Espectrofotómetro GNC de doble haz Cintral 101

2.6 Diagrama de procedimiento



CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Obtención de ácido ferúlico

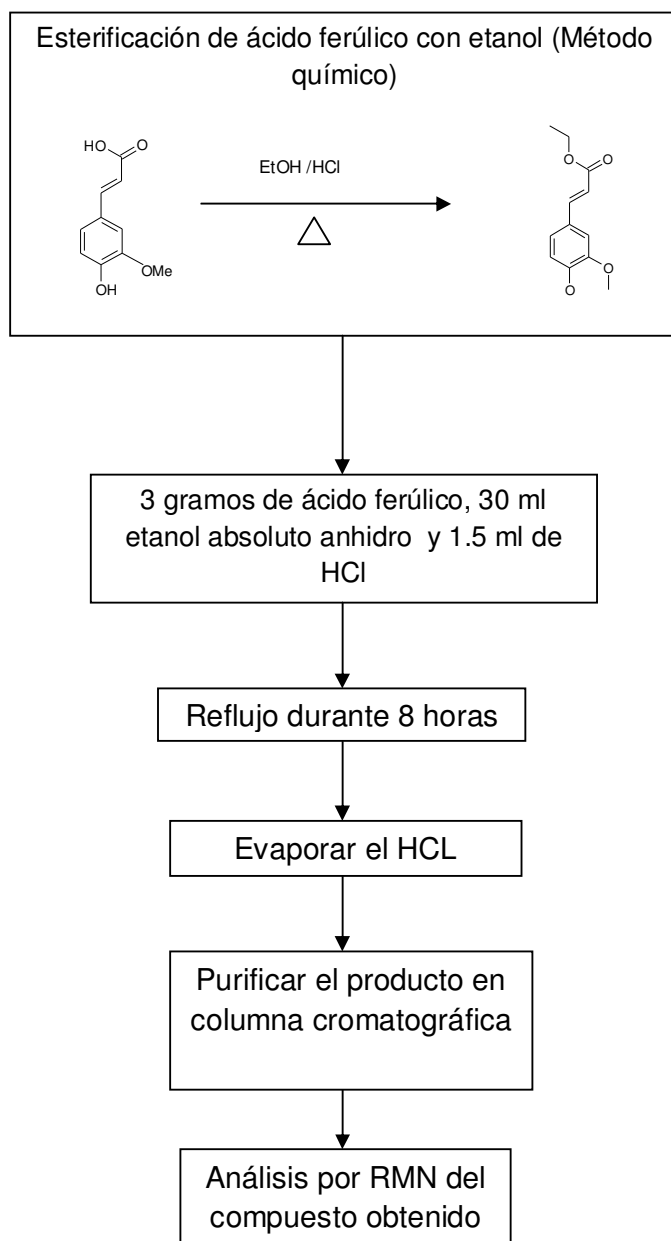


Obtención de ácido ferúlico

Se coloca un litro de nejayote en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se acidifica con HCl concentrado hasta pH 6 (aprox. 6 ml), se adicionó a tres matraces 20 g de resina Amberlite XAD7HD (Sigma – Aldrich) y a otros 3 matraces 10 g de carbón activado. Los matraces se agitan durante una hora en un agitador orbital a 200 rpm y se dejan reposar hasta que la resina o el carbón sedimenten; posteriormente se filtra el adsorbente y se deja secar. Una vez seco el adsorbente se extrae el ácido ferúlico con acetato de etilo y se concentra. El ácido ferúlico se recristaliza de agua caliente o de etanol.

Este procedimiento se realizó también para un lote de 60 L de nejayote, utilizando como adsorbente la resina Amberlita; en el caso de lotes grandes se procede de la misma forma, aumentando las cantidades según el número de litros de nejayote que pretendan usarse.

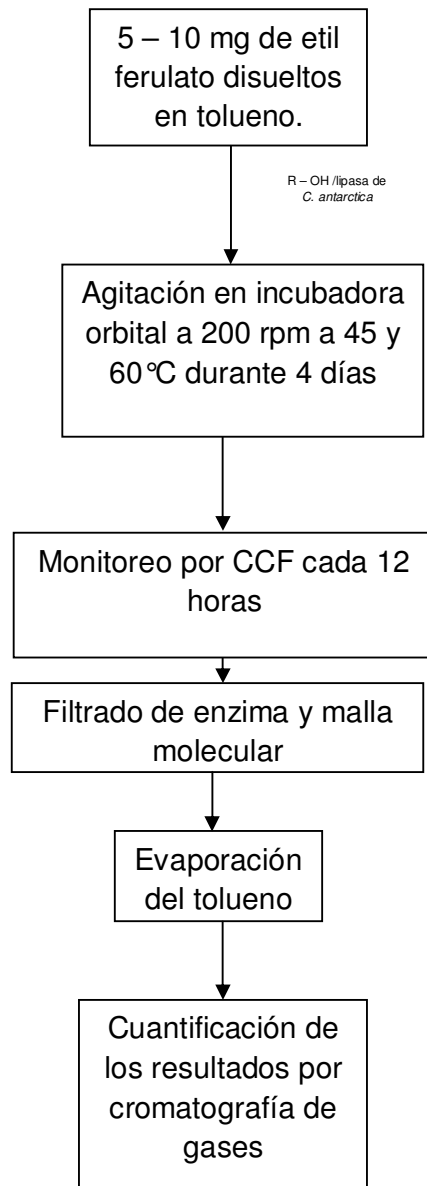
3.2 Esterificación de ácido ferúlico con etanol



Esterificación de ácido ferúlico con etanol

Se colocaron aproximadamente 3g de ácido ferúlico en un matraz bola al que se adicionaron 30 ml de etanol absoluto anhidro y 1.5 ml de HCL, la reacción se mantuvo a reflujo durante aproximadamente 8 horas. Posteriormente se retiró del reflujo; se evaporó el HCl por arrastre de vapor con etanol. Una vez evaporado el HCl se empacó una columna cromatográfica de sílica gel y se purificó el producto utilizando como eluyente una mezcla de hexano: acetato de etilo (70: 30). Se corrieron placas cromatográficas usando el mismo eluyente y se colectaron las partes que contenían al etil ferulato. Se concentraron estas mismas partes en el rotavapor y se mandó una parte de este concentrado a un análisis de RMN.

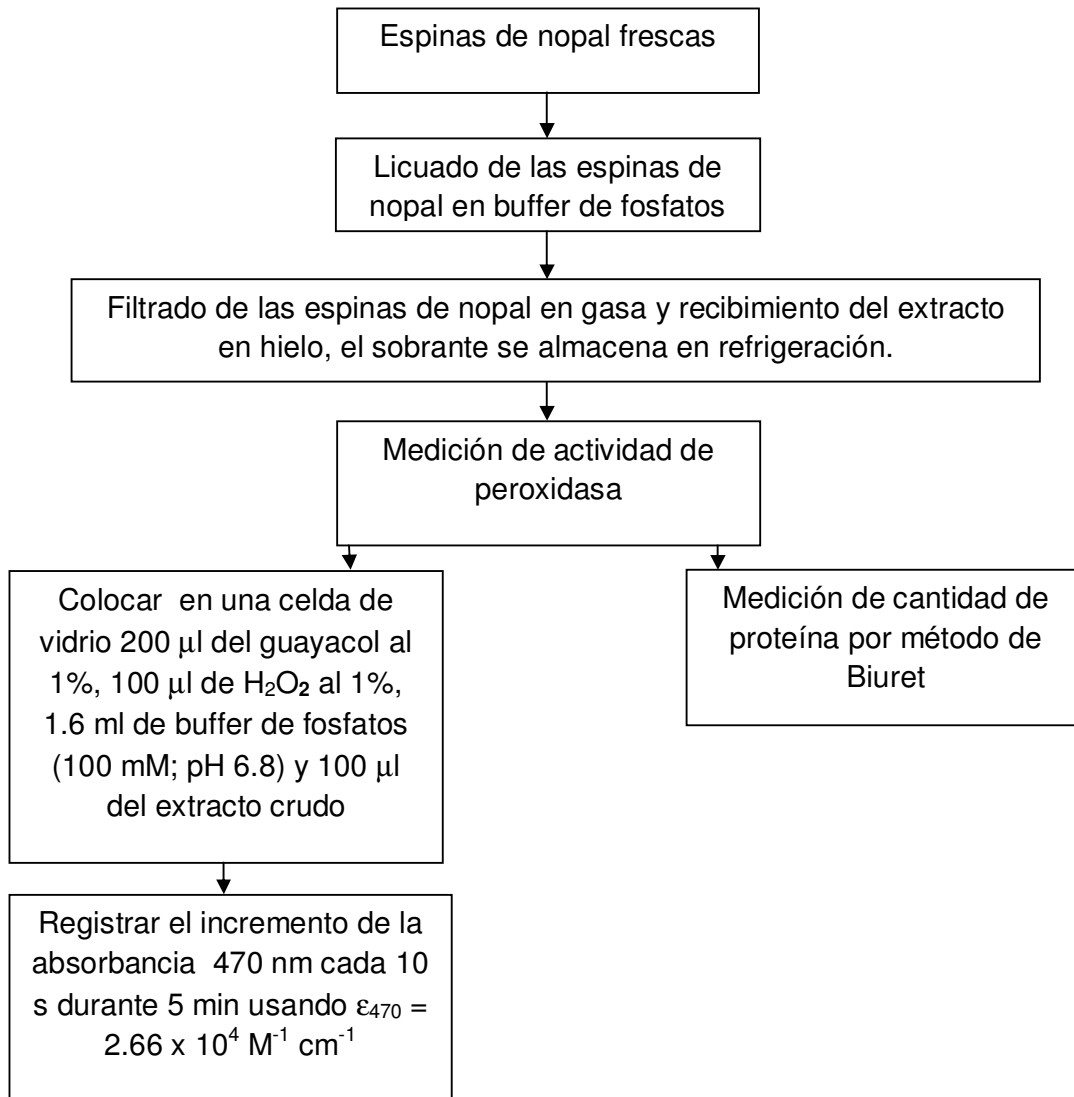
3.3 Transesterificación de etil ferulato con alcoholes alifáticos



Transesterificación de etil ferulato con alcoholes alifáticos

En un matraz de 25 ml se colocaron entre 5 y 10 mg de etil ferulato y se disolvieron en 5 ml de tolueno. Se adicionó el alcohol aceptor (propanol, butanol o decanol) en una proporción de 2:1 con respecto a los moles de etil ferulato; 150 mg de la lipasa de *Candida antarctica* isoforma B. Se agregaron también 20 mg / ml de malla molecular para controlar el agua en la reacción. Ésta se llevó a cabo en una incubadora con agitación orbital a 45°C y 60° a 200 rpm. Se monitoreó por CCF cada 12 horas por 4 días en placas de sílica gel (por duplicado), aplicando 10 µl de muestra en cada punto de la placa. Al final del experimento se eluyeron las placas con una mezcla de hexano: acetato de etilo (50: 50) y se revelaron con vainillina y sulfato cérico. Una vez terminada la reacción, se filtró a vacío para retirar la enzima y la malla molecular, se eliminó el tolueno por evaporación y se tuvieron los productos secos en viales y se guardó hasta su cuantificación por cromatografía de gases.

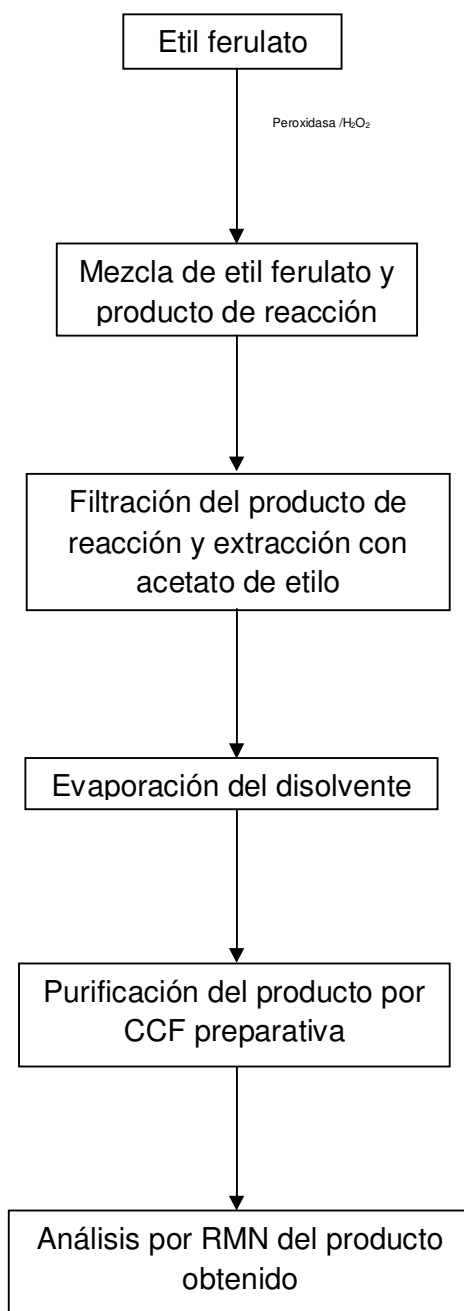
3.4 Obtención de peroxidasa de nopal



Obtención de peroxidasa de nopal

- a. **Preparación del extracto enzimático de peroxidasa de nopal.** Se pesaron 100 g de residuo fresco de desespinado de nopal chico y se licuaron con 100 ml de buffer de fosfatos pH 7. Esta preparación se filtró con manta de cielo y se recibió en hielo. Este procedimiento se realizó por triplicado.
- b. **Determinación de la actividad de peroxidasa.** Se pueden utilizar cuatro sustratos (guayacol, ABTS, pirogalol y bencidina) En una celda de vidrio se colocaron 200 μl de un stock del donador de protones al 1% v/v, 100 μl de H_2O_2 al 1%, 1.6 ml de buffer de fosfatos (100 mM; pH 6.8) y 100 μl del extracto crudo. Al final se registra el incremento en la absorbancia a 470, 415, 590 y 340 nm (para guayacol, ABTS, bencidina y pirogalol respectivamente) cada 10 s durante 5 minutos, usando $\epsilon_{470} = 2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (guayacol), $\epsilon_{415} = 3.11 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ABTS), $\epsilon_{590} = 3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (bencidina) y $\epsilon_{340} = 2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- c. **Determinación de proteína en extracto enzimático.** Se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Biuret. Se coloca 1 ml de la solución problema en un tubo de ensayo y se agregan 4 ml del reactivo de Biuret. Se deja reposar 30 minutos y se mide la formación de color azul a 540 nm.

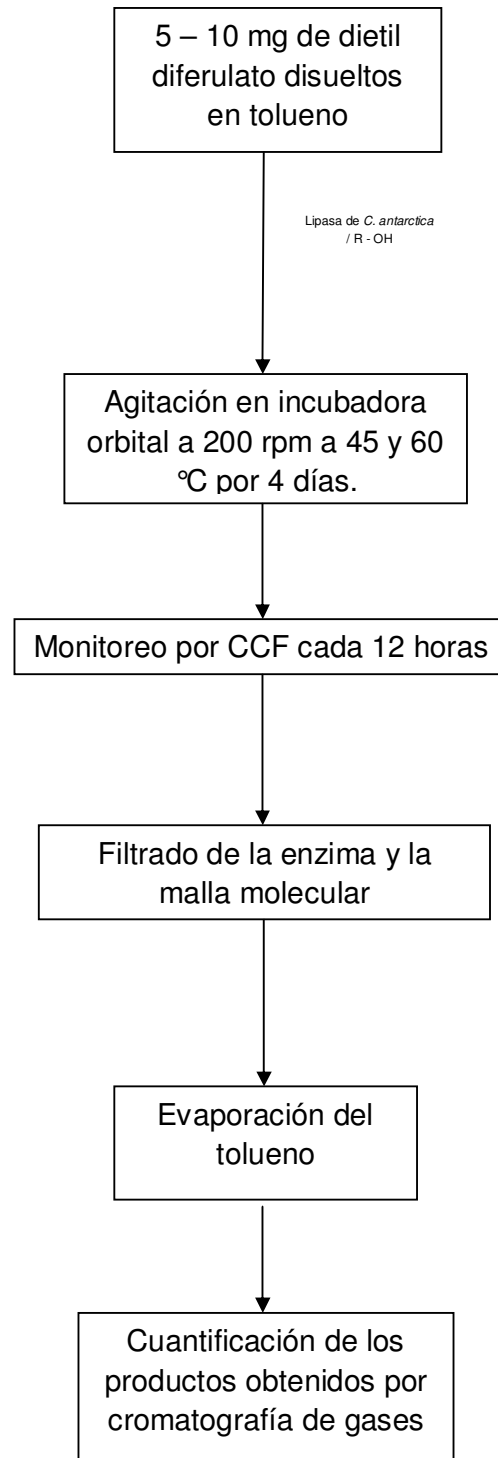
3.5 Dimerización de etil ferulato con peroxidasa de nopal y de rábano



Dimerización del etil ferulato con peroxidasa de nopal y de rábano

El etil ferulato obtenido anteriormente fue dimerizado disolviendo aproximadamente 250 mg de etil ferulato en 250 ml de buffer de acetatos pH 4 a 60°C; una vez disuelto, se enfrió la solución a 40°C y se adicionaron 95 ml de H₂O₂, después 1.25 mg de peroxidasa de rábano disuelta en 0.25 ml de buffer de fosfatos pH 7 (Ralph et. al., 1998) o bien 27.1 ml de extracto enzimático de espinas de nopal. Al terminar la reacción el producto asentado en el fondo del matraz fue filtrado al vacío; la mezcla de reacción restante fue extraída con acetato de etilo para obtener la mayor cantidad de producto posible; el acetato de etilo se evaporó y junto con el polvo secado al vacío se purificó por medio de cromatografía de capa fina en placas preparativas de sílica gel de 20 x 20 cm y 2 mm de ancho; se corrieron las placas 2 veces en cámaras de vidrio con una mezcla de elución hexano: acetato de etilo (50:50). El producto purificado fue enviado a RMN para su análisis.

3.6 Transesterificación del producto de dimerización de etil ferulato



Transesterificación del producto de dimerización de etil ferulato

En un matraz de 25 ml se colocaron entre 5 y 10 mg del dietil diferulato (producto obtenido a partir de la dimerización enzimática del etil ferulato) y se disolvieron en 5 ml de tolueno. Se adicionó el alcohol receptor (propanol, butanol, decanol) en una proporción de 2:1 con respecto a los moles del dietil diferulato, 150 mg de la lipasa de *Candida antarctica* isoforma B y se adicionaron también 20 mg/ml de malla molecular. La reacción se llevó a cabo en una incubadora de agitación orbital a 45°C y 200 rpm. Se monitoreó por CCF cada 12 horas por 4 días (por duplicado), aplicando 10 µl de muestra en cada punto de la placa; al finalizar los cuatro días se eluyeron las placas con una mezcla de hexano: acetato de etilo (50:50) y se revelaron con vainillina y sulfato cérico. Terminado el experimento se filtró la enzima y la malla molecular de la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente. Las muestras limpias y secas se guardaron en viales hasta su cuantificación en cromatógrafo de gases.

3.7 Cuantificación por cromatografía de gases

En esta etapa del experimento se cuantificó la cantidad restante de etil ferulato después de llevar a cabo la reacción de transesterificación del mismo, así como el remanente de dietil diferulato en las muestras después de la reacción de transesterificación con este sustrato.

Para esto se empleó el cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890N, que cuenta con un inyector automático Agilent Technologies modelo 7683 series. La columna empleada fue una Columna Capital J&W de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y 0.25 μm de recubrimiento; el intervalo de temperatura de la columna es de -60 a 350 °C.

Se elaboró una curva estándar del etil ferulato obtenido en la etapa dos del procedimiento, para ello se pesaron en viales limpios, secos y a peso constante diferentes cantidades de etil ferulato, para tener concentraciones en la curva patrón de entre 0 y 14 mg de etil ferulato por mililitro; el etil ferulato fue disuelto en acetona grado HPLC, una vez disuelto, se filtró la muestra en filtros millipore, para eliminar la turbidez. Las muestras se colocaron en viales de 1 ml y se inyectaron por duplicado.

Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo de gases fueron: temperatura inicial 200 °C, temperatura media 269 °C y temperatura final 300 °C. El inyector tenía una temperatura de 220 °C.

También se preparó e inyectó una curva estándar de dietil diferulato, siguiendo el procedimiento anterior.

Una vez inyectadas ambas curvas estándar, se procedió a inyectar las muestras; la cantidad previamente pesada de cada una de ellas, tanto de las transesterificaciones de etil ferulato como las de dietil diferulato, se disolvieron también en acetona grado HPLC y se filtraron en un filtro millipore, el volumen final fue de 1 mililitro. Posteriormente se dejaron correr las muestras, el tiempo para las muestras de transesterificación de etil ferulato fue de 20 minutos y el tiempo para las muestras de transesterificación de dietil diferulato fue de 30 minutos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de ácido ferúlico a partir de Nejayote

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la extracción de ácido ferúlico a partir de residuo de nixtamalización del maíz utilizando dos diferentes adsorbentes, la resina comercial Amberlita y el carbón activado.

Tabla 1. Extracción de ácido ferúlico a partir de nejayote de maíz utilizando dos adsorbentes.

	Amberlita (g/L)	Carbón activado (g/L)
1	0.67	0.87
2	0.82	0.66
3	0.54	0.51
Promedio	0.67	0.68

Con los dos métodos se obtuvo una cantidad muy similar de ácido ferúlico, 0.67 g/L con la resina comercial y 0.68 g/L con el carbón activado. Según experimentos realizados previamente en el laboratorio (Chavarría, 2007) se puede encontrar hasta 1g /L de ácido ferúlico en el nejayote.

En este caso, se desconoce el tipo de maíz del que proceden estos nejayotes, así como el proceso de nixtamalización utilizado; por ello se presenta una variación de los resultados obtenidos en este trabajo con los conseguidos anteriormente. Sin embargo se prueba que ambos adsorbentes son útiles para la extracción del ácido ferúlico.

En la literatura se reportan otros métodos de obtención de ácido ferúlico, algunos a partir de métodos alcalinos y otros enzimáticos. De acuerdo con Ou, et. al. (2006), utilizando NaOH para extraer el ácido ferúlico, a partir del bagazo de caña de azúcar, se puede obtener hasta 71.3 mg de ácido ferúlico por cada litro de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar; este método requiere de carbón activado como adsorbente.

Un ejemplo de los métodos enzimáticos utilizados para la extracción de ácido ferúlico fue el que usaron Benoit, Navarro, et. al. (2006) utilizando feruloil esterasas de *Aspergillus Niger*. En este trabajo las materias primas y el ácido ferúlico que se obtuvo a partir de cada una fueron: pulpa de café, 0.24 mg /g;

bagazo de manzana 0.18 mg/g; varas de trigo 1.35 mg / g; fibra de maíz 31.22 mg/g y pulpa de caña de azúcar 6.4 mg / g.

Por los resultados obtenidos en este trabajo se puede ver que el nejayote de maíz es una buena fuente de ácido ferúlico; los resultados reportados en la literatura indican que los residuos agro – industriales son buena fuente de este material, sin embargo, por los procesos a que cada material es sometido, la cantidad de ácido ferúlico disminuye.

4.2 Esterificación de ácido ferúlico

En esta parte del trabajo se llevó a cabo la reacción de esterificación de ácido ferúlico según el esquema presentado a continuación.



4.2.1 Rendimiento promedio

La reacción se llevó a cabo por el método de Fieser (Ralph, 1998), utilizando HCl como catalizador de la reacción. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de etil ferulato obtenido por este procedimiento, el método usado para calcular la cantidad obtenida de producto después de la purificación por columna fue la diferencia de masa.

Tabla 2. Obtención de etil ferulato por el método de Fieser

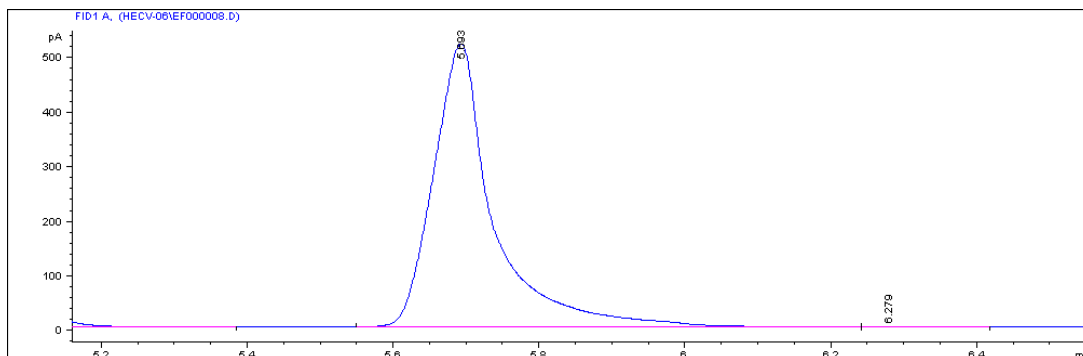
Repetición	Ácido ferúlico (mol)	Etil Ferulato (mol)	Rendimiento (%)
1	0.0155	0.0107	68.79
2	0.0155	0.0124	79.68
Promedio			74.24

Se obtuvo un rendimiento de 74.24%, mayor del esperado, ya que como se había dicho, las esterificaciones por métodos químicos pueden generar productos secundarios y disminuir el rendimiento de la reacción; además ya se había hablado también del impedimento estérico del ácido ferúlico. Sin embargo, el alto rendimiento puede deberse a que se usó una elevada temperatura en el reflujo y ocho horas de reacción. En este caso, al no ser una reacción enzimática, la temperatura elevada no afecta la reacción, al contrario, permite aumentar su rendimiento. La caracterización por resonancia magnética nuclear indica que el producto obtenido es el éster etílico del ácido ferúlico.

4.3 Transesterificación de etil ferulato

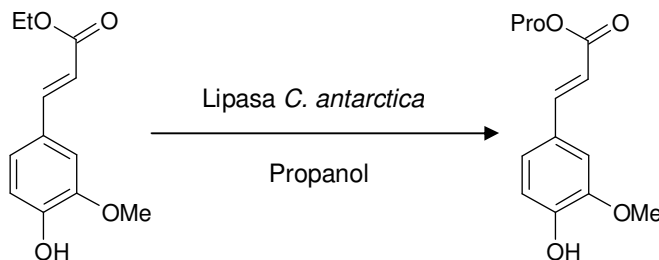
En esta etapa del desarrollo experimental se llevó a cabo la transesterificación del etil ferulato, como ya se había descrito previamente utilizando tres diferentes alcoholes alifáticos, la lipasa de *Candida antarctica* isoforma B y dos diferentes condiciones de temperatura, 45 y 60 °C.

A continuación se observa el cromatograma de la muestra de etil ferulato pura.



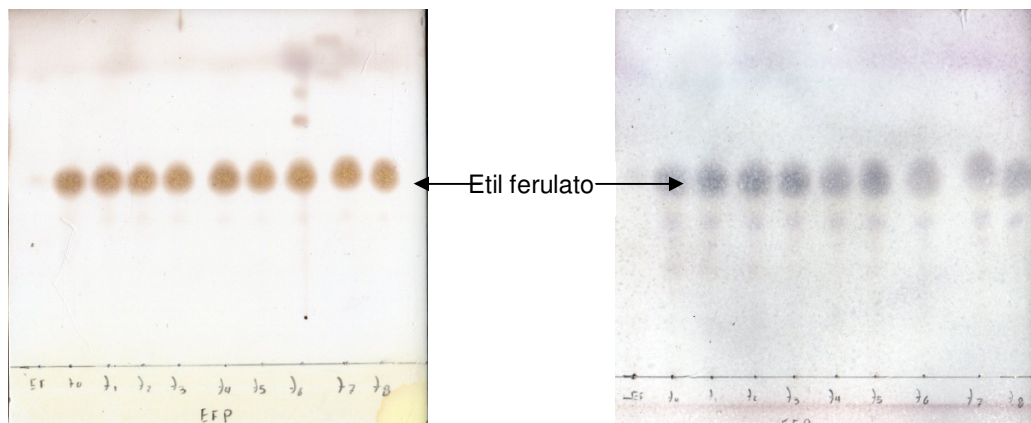
4.3.1 Transesterificación de etil ferulato con propanol

El primer alcohol utilizado para la transesterificación fue el propanol, la reacción que se realizó se esquematiza a continuación.



4.3.2 Cromatografía en capa fina de la reacción a 45°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días.

Se corrieron las placas por duplicado del muestreo realizado a la reacción durante los 4 días que ésta se llevó a cabo; a continuación se presentan las placas cromatográficas de ese monitoreo.

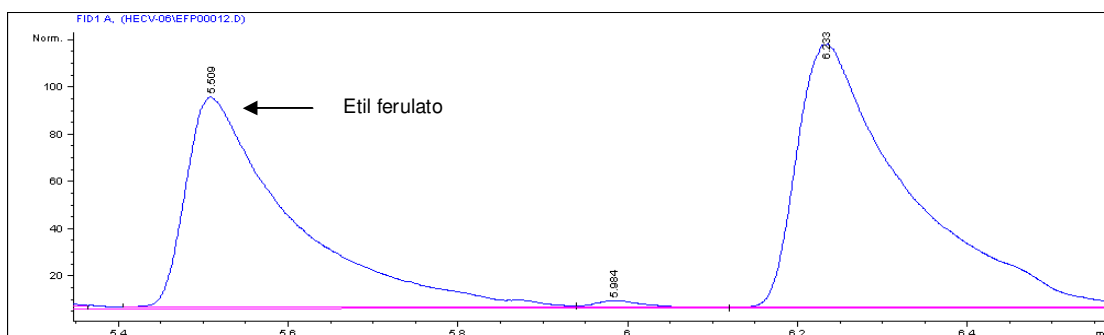


Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

En las placas anteriores no se puede observar la diferencia entre el sustrato y el producto; esto puede deberse a que como el producto esperado es muy parecido al sustrato, la polaridad no es la suficiente como para que se vea la separación.

4.3.3 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol a 45°C

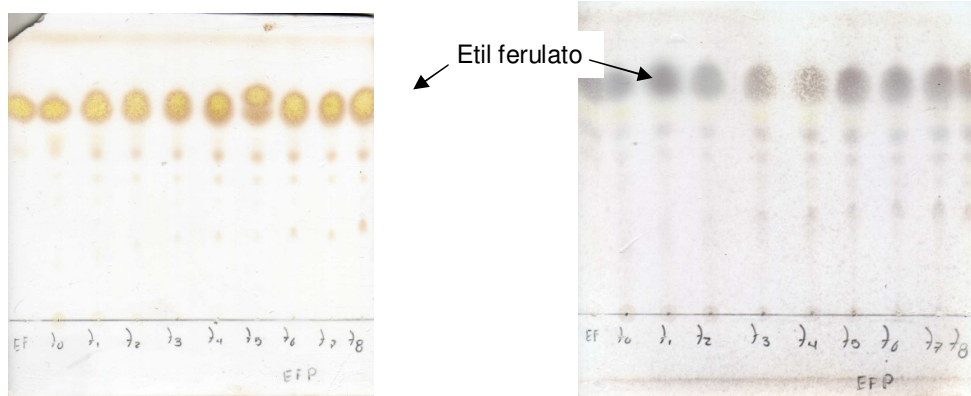
El siguiente cromatograma es el que se obtiene como resultado en el cromatógrafo de gases.



En la figura anterior se puede observar, de lado izquierdo, el pico que corresponde al etil ferulato según el análisis de la muestra pura; a la derecha se distingue un pico a un tiempo de 6.233 minutos, lo cual indica que se llevó a cabo una transformación de etil ferulato. Aunque no es claro por CCF, el resultado del cromatógrafo de gases revela que si hubo una transformación.

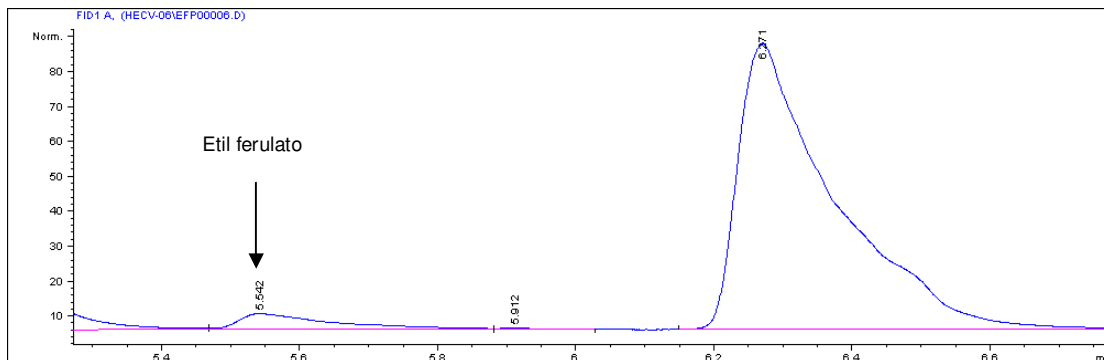
4.3.4 Cromatografía en capa fina de la reacción a 60°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

En el siguiente juego de placas tampoco se puede observar un producto, esto refuerza la hipótesis de que el producto no se separa por ser de polaridad muy similar a la del sustrato.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

4.3.5 Cromatograma del producto de esterificación de etil ferulato con propanol a 60 °C



En este cromatograma se puede observar el pico del etil ferulato en muy baja cantidad, a los 5.542 minutos, de lado derecho se ve un pico en 6.271 minutos, el pico de la derecha se distingue mucho más grande, esto se debe probablemente a que el aumento de temperatura de 45 a 60 °C provoca que se presente mayor actividad de la lipasa y por lo tanto la transformación sea mayor.

4.3.6 Cuantificación por cromatografía de gases de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol

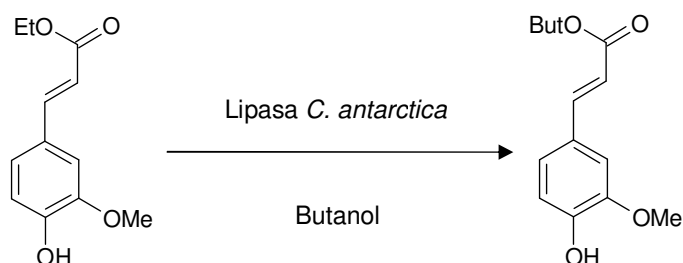
Alcohol receptor	Temperatura	% Transformación	σ
Propanol	45	75.6	9.07
Propanol	60	93.0	7.9

En la tabla anterior se ve el promedio del porcentaje de transformación del etil ferulato, se puede ver que a 45 °C el porcentaje de transformación es de 75.5%, menor que 93.04% que se obtuvo a 60 °C; esto es, como ya se había dicho, debido a que el aumento de temperatura provoca que el equilibrio de la reacción tienda a productos. La literatura reporta (Figuroa – Espinoza, Villeneuve, 2005) la esterificación directa del ácido ferúlico con propanol

utilizando una feruloil esterasa de *F. oxysporum* tuvo un rendimiento de 16%, la temperatura utilizada fue de 30°C en un lapso de 224h. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo es posible decir que el método de transesterificación es una mejor alternativa a la esterificación directa.

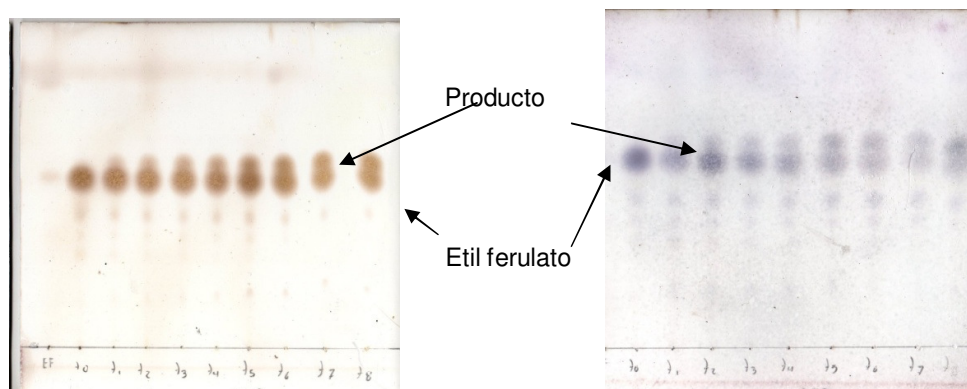
4.4 Transesterificación de etil ferulato con butanol

El siguiente alcohol utilizado para la transesterificación fue el butanol, el esquema de la reacción es el siguiente



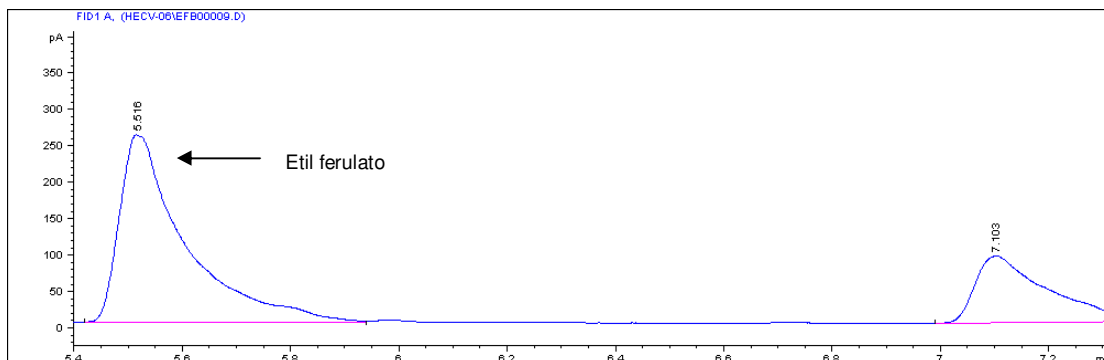
4.4.1 Cromatografía en capa fina de la reacción a 45°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

A continuación se muestran las placas eluidas al final del experimento, en ellas se puede ver una separación del producto y el sustrato.



Mezcla de elución
 Hexano 50: Acetato de etilo 50
 Izquierda, revelada con sulfato cérico
 Derecha, revelada con vainillina

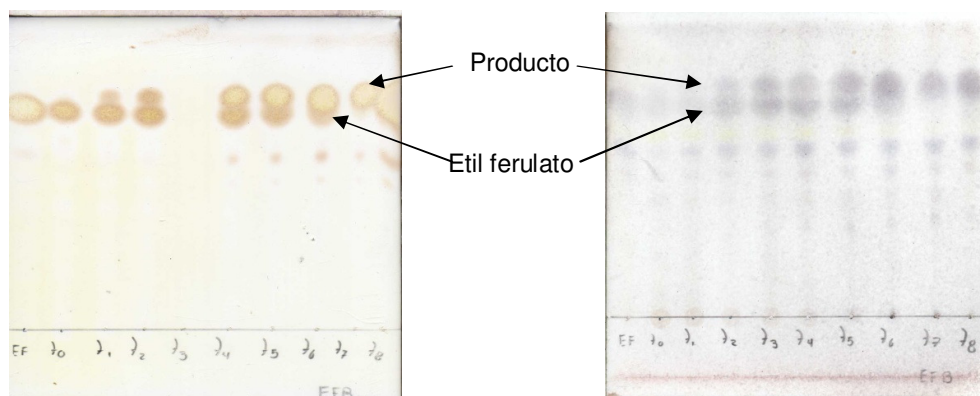
4.4.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 45°C



En este cromatograma se observa un pico a 5.515 minutos, que indica la presencia de etil ferulato, a los 7.103 minutos, esto dice que además del sustrato, se encuentra otro compuesto. Al mismo tiempo en las placas se ve, además del etil ferulato, un producto de reacción justo arriba del sustrato. Esto quiere decir que sí hay un producto de la transformación de etil ferulato con butanol.

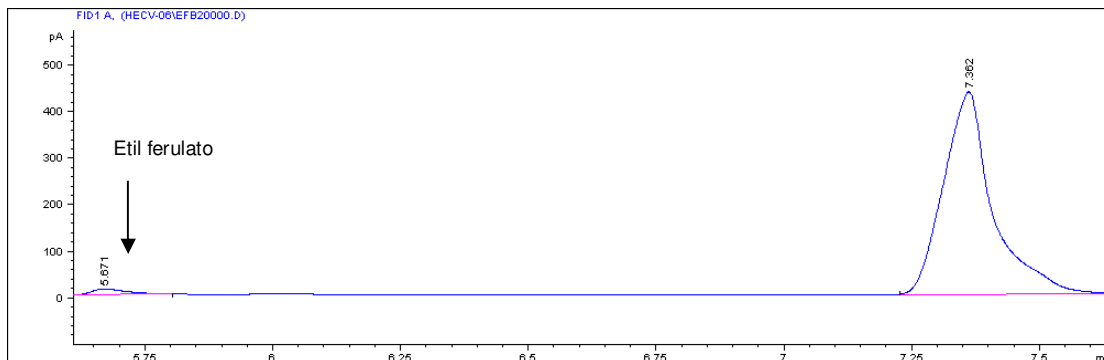
4.4.3 Cromatografía en capa fina de la reacción a 60°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

Estas placas muestran más claramente la transformación de sustrato a producto; de hecho puede observarse que en las últimas 24 horas de reacción la desaparición del sustrato es prácticamente total.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico

4.4.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol a 60°



En este cromatograma se observa la casi total desaparición del etil ferulato, a la derecha del mismo se percibe un pico en 7.362. Esto concuerda con lo que se ve en las placas, la desaparición casi completa del sustrato que da paso a un producto muy abundante.

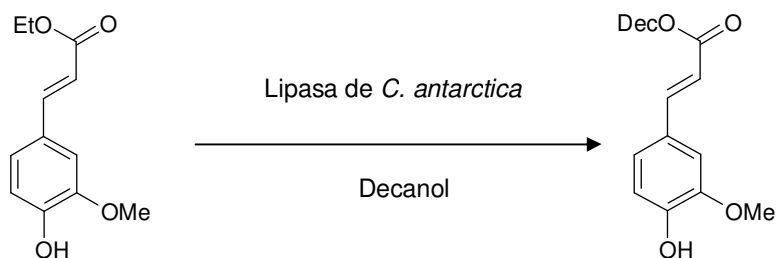
4.4.5 Cuantificación por cromatografía de gases

Alcohol receptor	Temperatura (°C)	% Transformación	σ
Butanol	45	54.02	11.49
Butanol	60	88.75	7.09

En la tabla anterior puede verse que el porcentaje de transformación de etil ferulato a 45°C fue de 54.02%, al aumentarse la temperatura a 60°C, se incrementó también el porcentaje de transformación, a 88.7%. Los resultados reportados en literatura (Figueroa – Espinoza, Villeneuve, 2005) indican que la esterificación directa del ácido ferúlico con butanol se realizó a 60°C por 15 días, no se dice cuál es la lipasa que fue utilizada; pero el rendimiento se reporta de trazas. La transesterificación de rendimientos de más del 50% quiere decir que el método de transesterificación es mejor alternativa que la vía directa.

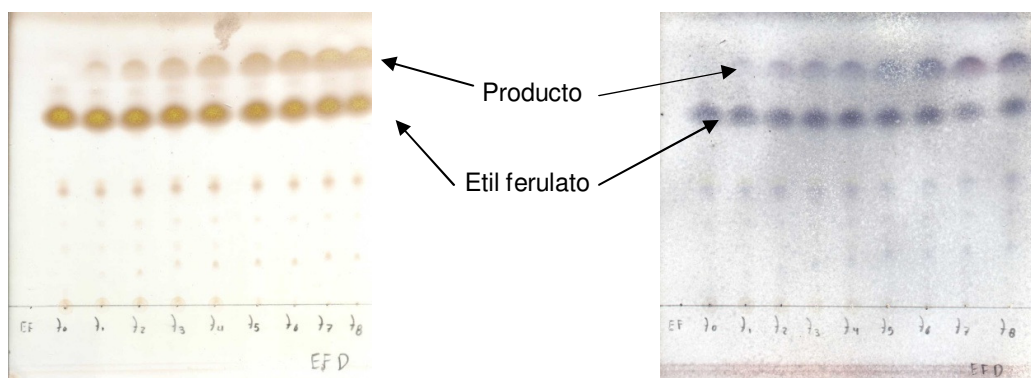
4.5 Transesterificación de etil ferulato con decanol

El último alcohol utilizado para la transesterificación fue el decanol, el esquema de la reacción se presenta a continuación



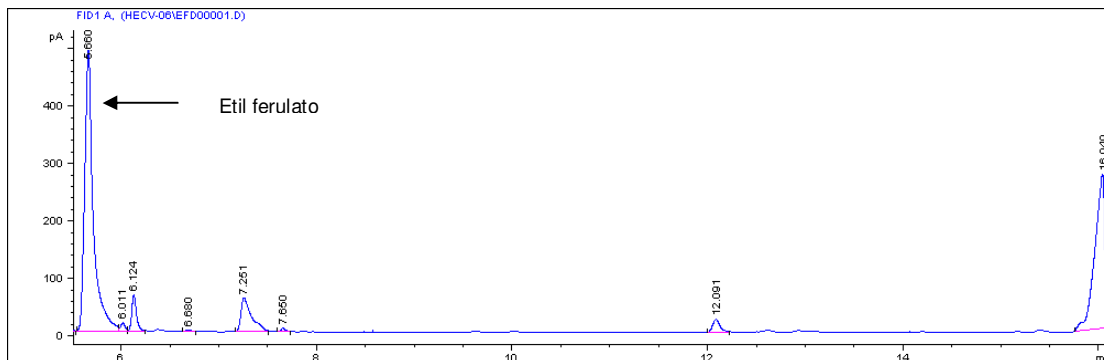
4.5.1 Cromatografía en capa fina de la reacción a 45° C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

A continuación se muestran las placas de la reacción, como puede verse, por encima del sustrato se puede distinguir claramente un producto.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

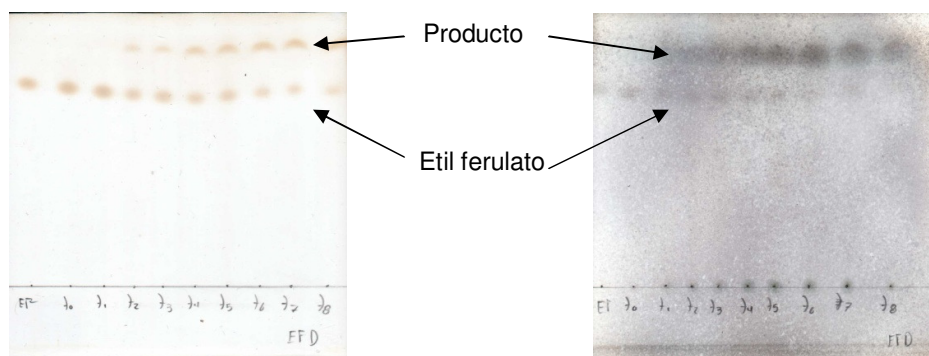
4.5.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 45°C



En este cromatograma se observa el pico correspondiente al etil ferulato, al mismo tiempo que se ven algunos picos a la derecha, siendo el más considerable el de 16.049 minutos; este pico muy probablemente corresponde al producto de transesterificación de etil ferulato con decanol, que se muestra consistente con lo encontrado en las placas.

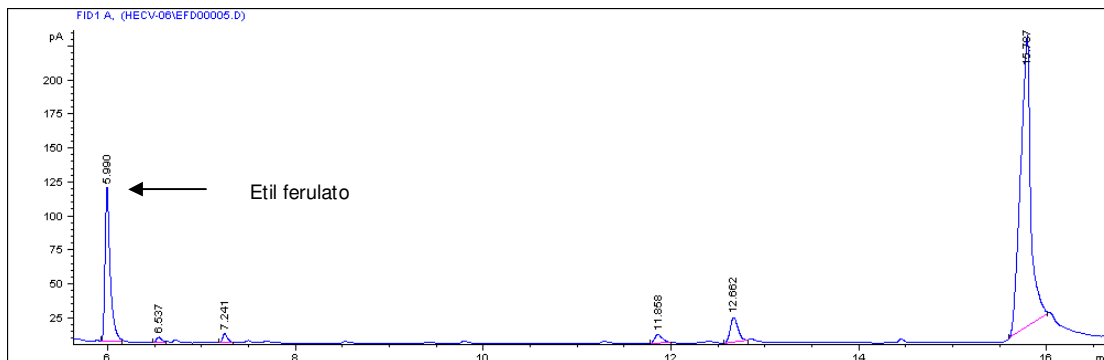
4.5.3 Cromatografía en capa fina de la reacción a 60°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

En estas placas se puede observar algo muy similar a lo que muestran las placas anteriores, hay un producto que puede verse claramente por encima del etil ferulato.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico

4.5.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación de etil ferulato con decanol a 60 °C



El cromatograma de esta reacción muestra el pico correspondiente al etil ferulato en 5.990 y un pico considerable a los 15.797 minutos, esto indica que sí hay una transformación; de nuevo, el pico se observa mayor al aumentar la temperatura. En las placas puede observarse un producto por encima del etil ferulato.

4.5.5 Cuantificación por cromatografía de gases

Alcohol receptor	Temperatura (°)	% Transformación	σ
Decanol	45	86.03	3.23
Decanol	60	95.10	

En la tabla anterior se muestran los resultados de la transformación de etil ferulato utilizando decanol como alcohol receptor; el porcentaje de transformación a 45 °C es de 86.02%, y a 60 °C de 95.10%, esto indica que para las transformaciones de etil ferulato se mantiene la tendencia de que al aumentar la temperatura incrementa también el porcentaje de transformación de sustrato a producto.

Otros resultados reportados (Figuroa – Espinoza, Villeneuve, 2005) indican otros alcoholes utilizados para la esterificación directa, los resultados que se

reportan son: para la esterificación directa con octanol usando lipasas de *C. antarctica* o de *R. miehei*, a 50 °C por 12 días el rendimiento fue de 11 o 30%; en otro trabajo citado en la misma referencia, la esterificación directa con octanol utilizando una temperatura de 60 °C bajo nitrógeno por 13 días obtuvo un rendimiento del 14%. Un tercer trabajo de esterificación con octanol recurriendo a 45 °C por 12 días tuvo un rendimiento de 3 – 30%.

Otro resultado que se tuvo utilizando pentanol como alcohol receptor usando una esterasa a 40 °C por 8 horas fue un rendimiento de 60%.

Se puede observar en estos resultados que la esterificación directa ha utilizado condiciones muy elevadas de temperatura y de tiempo, y se obtienen muy bajos rendimientos. La ventaja y diferencia de este trabajo al realizar la transesterificación en vez de la reacción directa es que el tiempo disminuye y el rendimiento aumenta.

Según todos los resultados que se presentan en la transesterificación del etil ferulato, es posible decir que el aumento de temperatura favorece la transformación del sustrato, que la actividad de la enzima asciende sin desnaturalizarse debido a la presencia del disolvente orgánico (tolueno).

Aunque el rendimiento de las reacciones es elevado, se debe mencionar que aun cuando el éster etílico se guarde en condiciones de vacío, tiene una consistencia semilíquida y no es completamente estable, después de algún tiempo, ya muestra cierta degradación, lo cual ocasiona que al hacer la reacción de transesterificación ya no esté completamente puro, éste puede ser un factor que disminuya el rendimiento, incluso si éste es muy elevado.

La reacción de esterificación del ácido ferúlico generalmente da muy bajos rendimientos, la estructura del ácido ferúlico al parecer es lo que provoca que el rendimiento sea bajo al no permitir la interacción del alcohol y la lipasa con el mismo ácido; ésta es la razón por la que en este trabajo se sintetizó sólo un éster por esterificación directa y los demás por transesterificación, probando así que la transesterificación de un éster de ácido ferúlico puede ser una mejor manera de obtener este tipo de compuestos, en el sentido de que se obtienen mejores rendimientos, además de que la reacción no libera agua, lo cual quiere

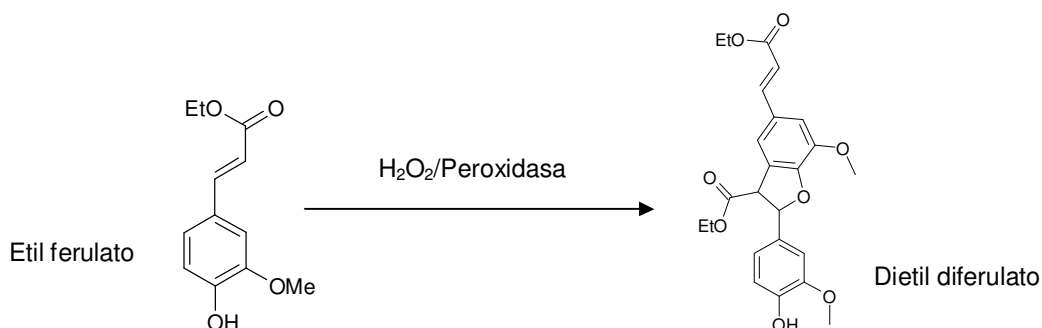
decir que ése no es un factor que tenga que monitorearse constantemente, ya que permanece igual durante toda la reacción.

El poder sintetizar ésteres de ácido ferúlico es de gran importancia por el número de aplicaciones que pueden tener, la manera más fácil de obtener estos ésteres es utilizando alcoholes de cadena lineal, sin embargo, en otros trabajos se han sintetizado ésteres donde el grupo carboxilo es sustituido por compuestos no lineales. Este tipo de ésteres también son propensos a otras aplicaciones.

En el caso de los ésteres de cadena lineal, aún puede trabajarse en la obtención directa, sin emplear la transesterificación como intermediario, intentando otros métodos para conseguir ésteres de ácido ferúlico con diferente tamaño de cadena.

4.6 Dimerización de etil ferulato

A partir del etil ferulato se sintetizó el dímero esterificado del mismo; utilizando para ello el método descrito por Ralph en 1998; se utilizaron dos peroxidasas, la comercial de rábano y la obtenida a partir del residuo de desespinado de nopal. El esquema de la reacción se presenta a continuación.

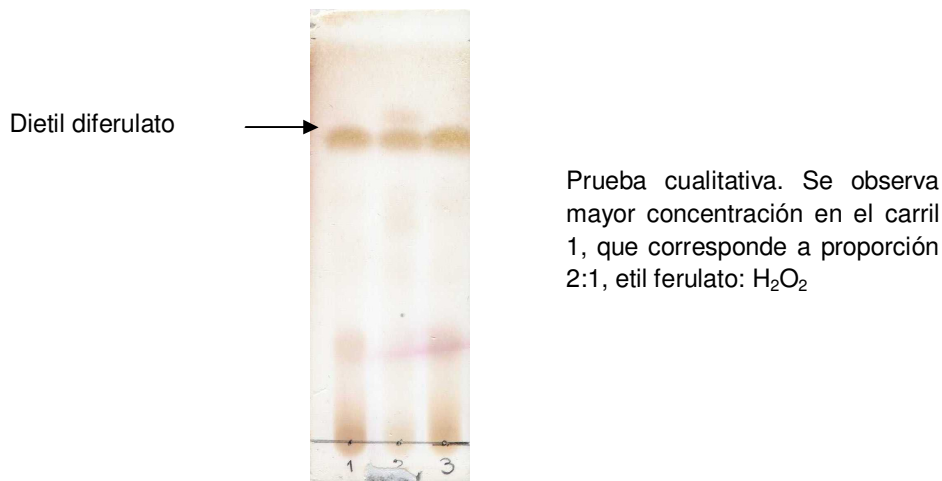


4.6.1 Reacción de dimerización con respecto a H_2O_2

Para llevar a cabo esta parte del experimento, se probaron 3 diferentes condiciones de reacción con utilizando 3 diferentes proporciones de H_2O_2 , esto con el fin de aumentar lo más posible el rendimiento de la reacción. Se ha reportado en la literatura (Sánchez Carbajal, 2008) que una concentración de peróxido de hidrógeno cercana a la equimolaridad aumenta el rendimiento de la reacción. Las tres condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- a) 2 mol de etil ferulato: 1 mol de H_2O_2
- b) 1 mol de etil ferulato: 1 mol de H_2O_2
- c) 1 mol de etil ferulato: 2 mol de H_2O_2

Esta parte del trabajo fue solo cualitativa, a continuación se presenta la placa cromatográfica de las tres reacciones realizadas.

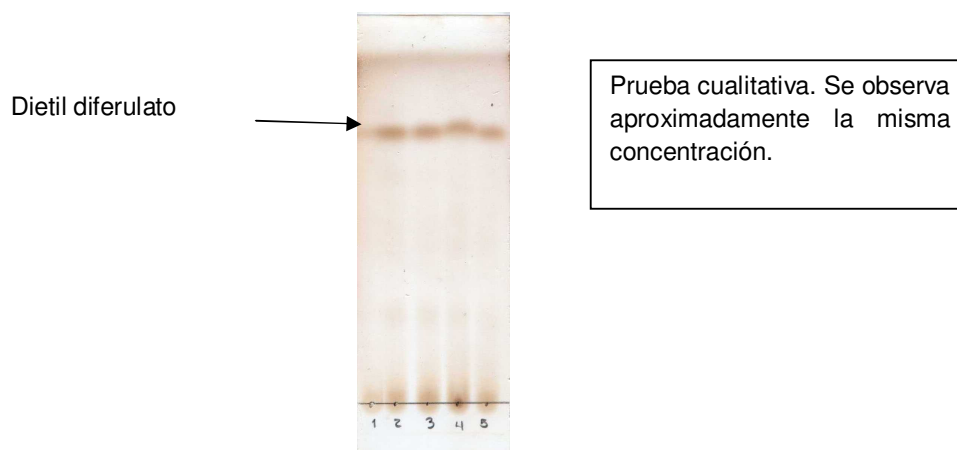


4.6.2 Reacción de dimerización con respecto al tiempo

Una vez definido que la mayor concentración de producto se obtenía al utilizar la proporción de 2 mol de etil ferulato y 1 mol de H_2O_2 ; se procedió a probar cual era el tiempo más adecuado para obtener mayor cantidad de producto; una vez más la prueba fue cualitativa. A continuación se presentan los diferentes intervalos de tiempo a los que se llevo a cabo la reacción.

- a. 10 min
- b. 15 min
- c. 20 min
- d. 25 min
- e. 30 min

A continuación se presenta la placa correspondiente al experimento utilizando diferentes intervalos de tiempo



Al no observarse diferencia en la concentración del producto en la placa, se utilizó el intervalo de 10 minutos que es el que se utilizó en el método citado.

4.6.3 Rendimiento promedio de dimerización de etil ferulato probando las dos peroxidasas

En la siguiente tabla se muestra el rendimiento de la transformación de etil ferulato a dietil diferulato, utilizando dos peroxidasas.

Peroxidasa	Rendimiento promedio (%)
Nopal	9.13
Rábano	19.11

Como puede observarse, el rendimiento de la reacción utilizando el extracto crudo de peroxidasa de nopal es de 9.13%, menor al 19.11% que se obtiene utilizando la peroxidasa de rábano. Esto es lógico considerando que la peroxidasa de nopal proviene de un extracto crudo, es decir, no toda la proteína que se encuentra en el extracto puede considerarse peroxidasa, por lo que aunque la cantidad de extracto colocado en la reacción correspondía a la actividad de la peroxidasa de rábano que se agregó, en realidad no hubo la misma actividad.

Sin embargo, la caracterización por RMN del producto que se obtuvo utilizando peroxidasa de rábano y la caracterización por RMN del producto que se obtuvo utilizando la peroxidasa de nopal indican que el producto de reacción en ambos casos es el 8-5-dietil diferulato.

El residuo de desespinado de nopal es en sí una excelente fuente de peroxidasa, sin embargo, el extracto obtenido de esas espinas con contiene 100% peroxidasa, contiene además otros componentes del nopal, entre ellos otras proteínas; y aunque esta peroxidasa ya ha sido estudiada, para que pueda utilizarse de la misma manera que la peroxidasa de rábano, aun debe trabajarse mucho sobre su purificación.

Así mismo, otros factores pueden influir en el bajo rendimiento de la reacción, por ejemplo, el peróxido de hidrogeno añadido a la reacción y el tiempo de la misma, que aunque en este trabajo fueron factores que se consideraron no se consideraron a profundidad, sino solo cualitativamente.

4.6.4 Rendimiento promedio de dos pruebas utilizando peroxidasa de rábano.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de dietil diferulato posible, se realizo un segundo ensayo con peroxidasa de rábano, se obtuvieron las siguientes cantidades del producto.

Repetición	Etil ferulato (mmol)	Dietil diferulato (mmol)	Rendimiento (%)
1	1.1040	0.1272	11.52
2	1.0675	0.1096	10.27
Promedio			10.90

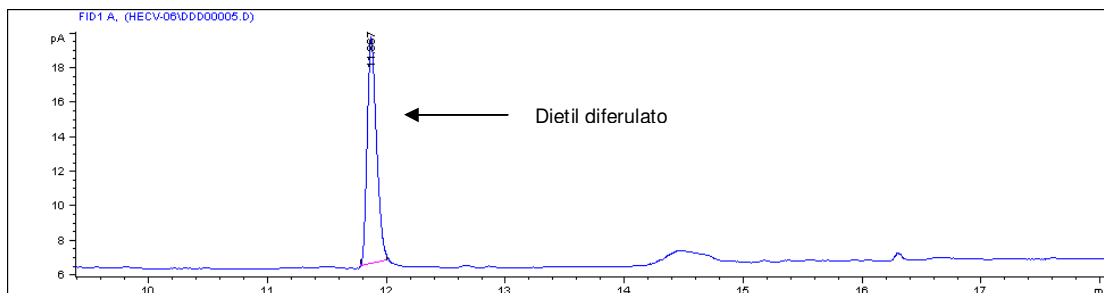
En el articulo consultado para obtener este método, dice que el rendimiento de la reacción es del 50%, los resultados obtenidos aquí son menores; sin embargo, el producto de obtuvo después de limpiarlo a través de la cromatografía de capa fina preparativa; lo cual puede disminuir considerablemente el rendimiento de la reacción.

4.7 Reacciones de transesterificación de dietil diferulato

En esta parte del trabajo se llevo a cabo la reacción de transesterificación del dímero del ácido ferúlico que se obtuvo a partir de la reacción de acoplamiento oxidativo del etil ferulato con peroxidasa de rábano, el 8 – 5 dietil diferulato.

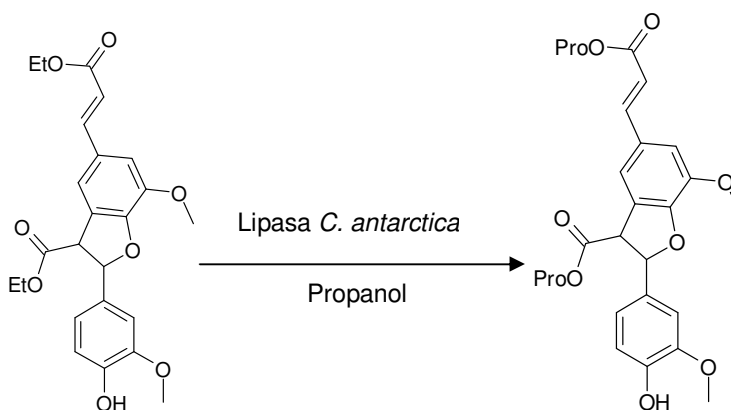
Para las reacciones de transesterificación se utilizaron 3 alcoholes alifáticos: propanol, 1 – butanol y n – decanol, y como catalizador, la lipasa de *C. antarctica*.

A continuación se presenta el cromatograma que se obtuvo al inyectar la muestra de 8 – 5 dietil diferulato sola.



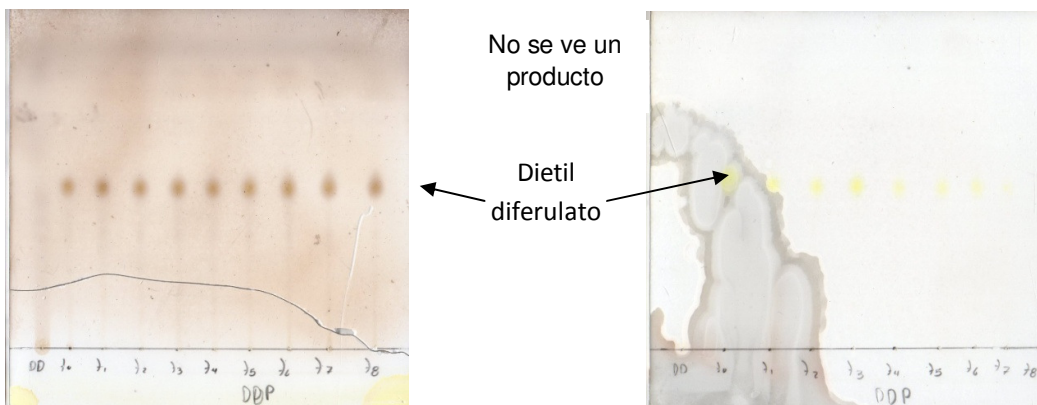
4.7.1 Transesterificación de dietil diferulato con propanol

El primer alcohol utilizado fue el propanol, el esquema de la reacción se presenta a continuación.



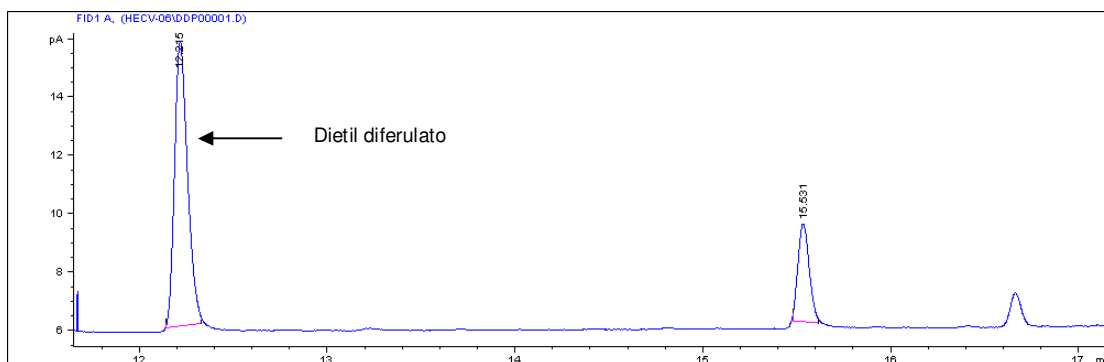
4.7.2 Cromatografía en capa fina de la reacción de a 45°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

A continuación se presentan las placas de la reacción de transesterificación de etil ferulato con propanol; en ella puede observarse solo el sustrato, el dietil diferulato; la placa no muestra la aparición de ningún producto.



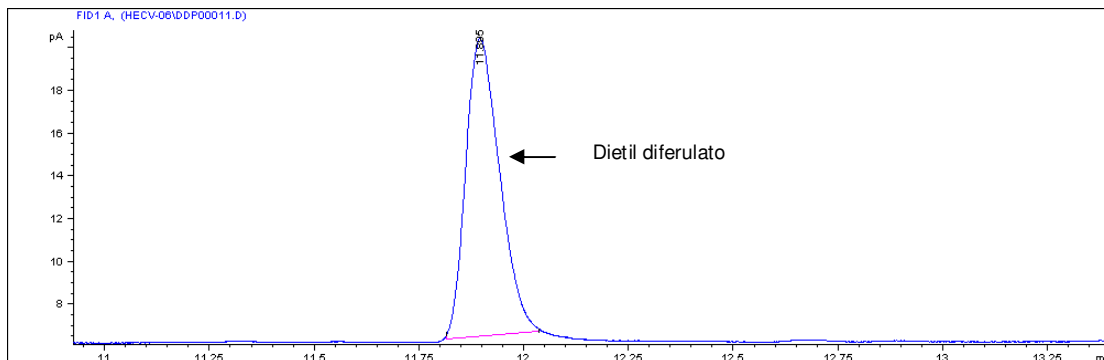
Mezcla de elución
 Hexano 50: Acetato de etilo 50
 Izquierda, revelada con sulfato cérico
 Derecha, revelada con vainillina

4.7.3 Cromatograma del producto de transesterificación de dietil diferulato con propanol a 45 °C.



En este cromatograma se observa un pico en 12.215 minutos, el correspondiente a el dietil diferulato, poco después, en 15.531 se observa otro pico, que se puede presumir sea el producto. En este caso, se puede ver que la enzima no convierte la mayoría del sustrato en producto.

4.7.4 Cromatograma del producto de transesterificación de dietil diferulato con propanol a 60 °C



A 60 °C se observa solo el pico correspondiente al dietil diferulato, esto puede deberse a que para este caso, la enzima no pueda llevar a cabo la reacción, ya que el sustrato es muy voluminoso, es posible que la lipasa no sea afín a este sustrato en esta condición de temperatura.

4.7.5 Cuantificación por cromatografía de gases

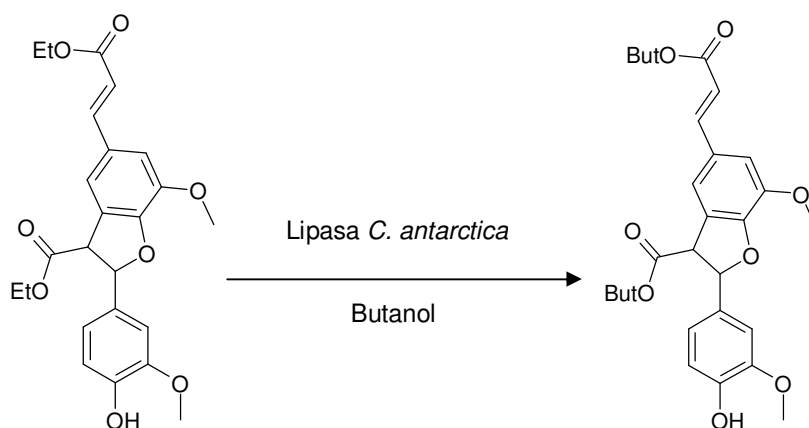
En la siguiente tabla se muestran los resultados de las reacciones anteriores, cuantificando el porcentaje de transformación en el cromatógrafo de gases.

Alcohol receptor	Temperatura (°C)	% Transformación	σ
Propanol	45	50.8427	10.8808
Propanol	60	35.4935	

Como puede observarse, para el caso de estas reacciones, el porcentaje de transformación disminuye al aumentar la temperatura, a 45 °C es de 50%, mientras que a 60 °C es de 35%. Además como se ve en los cromatogramas, a 60 °C no parece haber un producto, por lo que este porcentaje de transformación puede deberse simplemente a descomposición del sustrato.

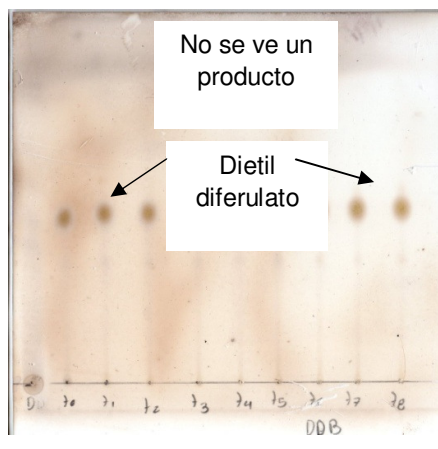
4.8 Transesterificación de dietil diferulato con butanol

El siguiente alcohol utilizado para la transesterificación fue el 1 – butanol, el esquema de la reacción se presenta a continuación. En los tres cromatogramas de transesterificación de dietil diferulato se puede observar un pico que aparece aproximadamente a los 15 minutos, por eso es mas factible pensar que sea un producto de descomposición de sustrato que alguno de los productos esperados en la reacción.

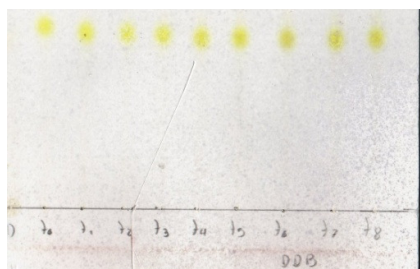


4.8.1 Cromatografía en capa fina de la reacción a 45°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

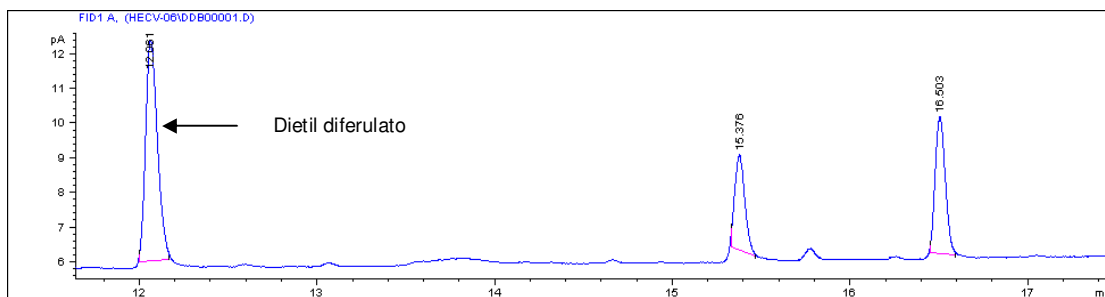
A continuación se presentan las placas del experimento de transesterificación de dietil diferulato con butanol, como puede verse en estas placas tampoco se ve un producto.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina



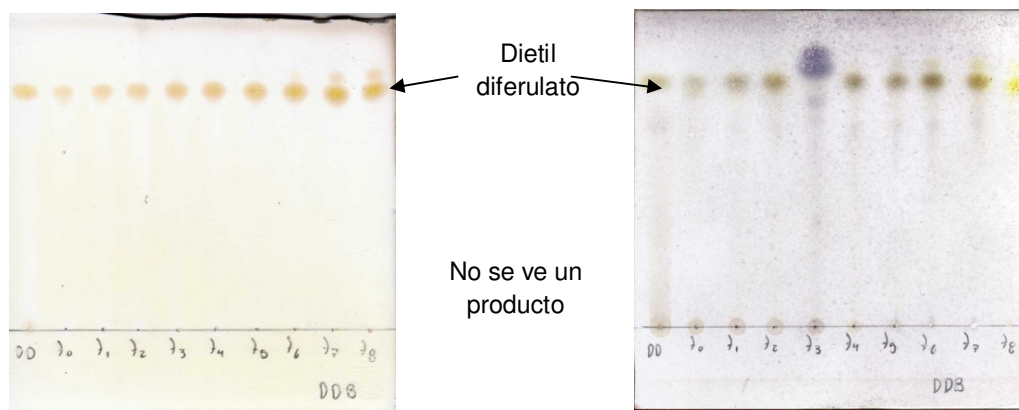
4.8.2 Cromatograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con butanol a 45 °C.



En este cromatograma se observan además del pico correspondiente a dietil diferulato, dos picos más de los cuales se podría decir que alguno sea el producto esperado o que correspondan a productos de descomposición del dietil diferulato.

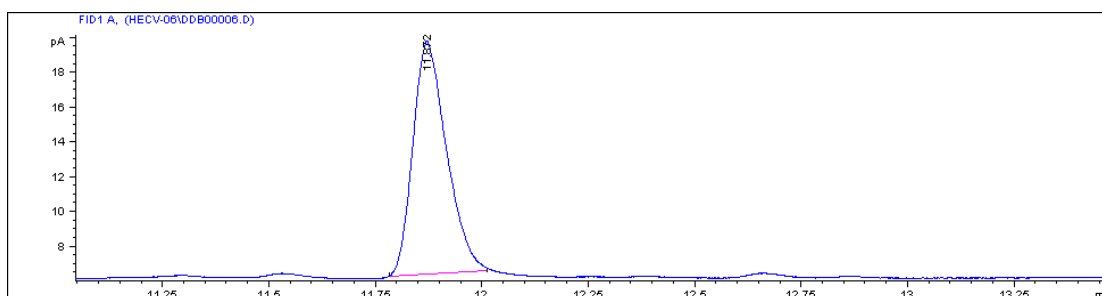
4.8.3 Cromatografía en capa fina de la reacción a 60°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

En estas placas puede verse la aparición de un producto en las etapas finales de la reacción, por encima del sustrato en los tiempos 7 y 8 de la placa revelada con sulfato cérico.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

4.8.4 Cromatograma de la reacción de transesterificación del dietil diferulato con butanol a 60°C.



Nuevamente este cromatograma no muestra más que el pico correspondiente a etil ferulato; sin embargo en la placa revelada con sulfato cérico se ve un pequeño producto en las últimas aplicaciones; por lo que es posible que el producto no se pueda cuantificar por este método.

4.8.5 Cuantificación de los resultados por cromatografía de gases

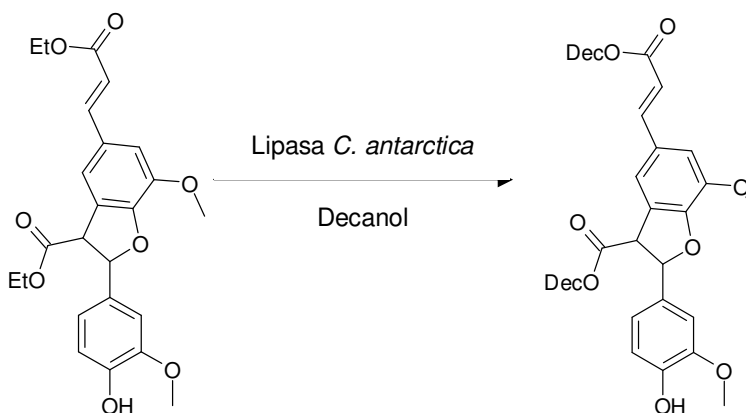
En la siguiente tabla se muestran los resultados de la cuantificación del porcentaje de transformación del sustrato, utilizando el cromatógrafo de gases.

Alcohol receptor	Temperatura (°C)	% Transformación	σ
Butanol	45	82.46	-
Butanol	60	1.96	-

Como puede verse en la tabla, el porcentaje de transformación a 45°C es de 82%, muy elevado, mientras que a 60°C, el porcentaje es de solo 2%, esto concuerda con lo que se presenta en los cromatogramas, sin embargo, no se tienen datos reportados que puedan ayudar a aclarar esta situación.

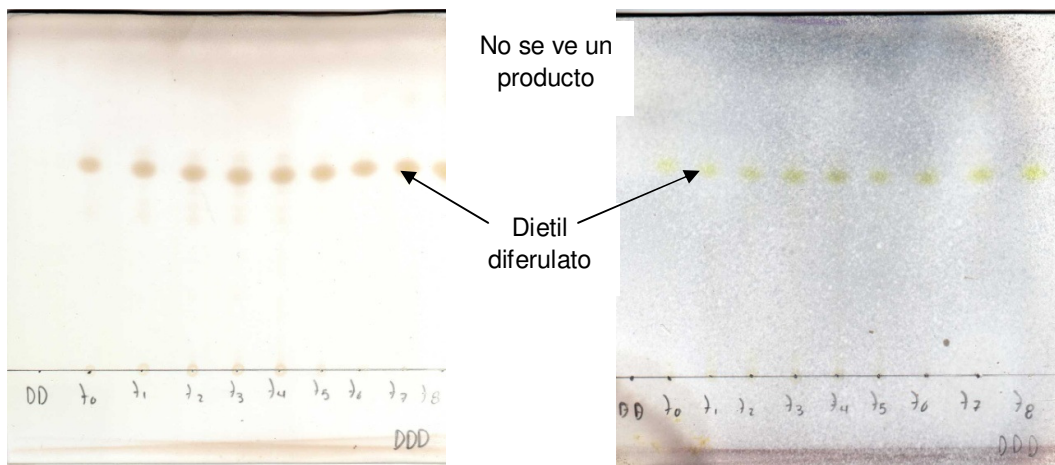
4.9 Transesterificación de dietil diferulato con decanol

La siguiente reacción de transesterificación se llevo a cabo utilizando decanol como alcohol receptor, el esquema de la reacción es el que se presenta a continuación



4.9.1 Cromatografía en capa fina de la reacción a 45°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

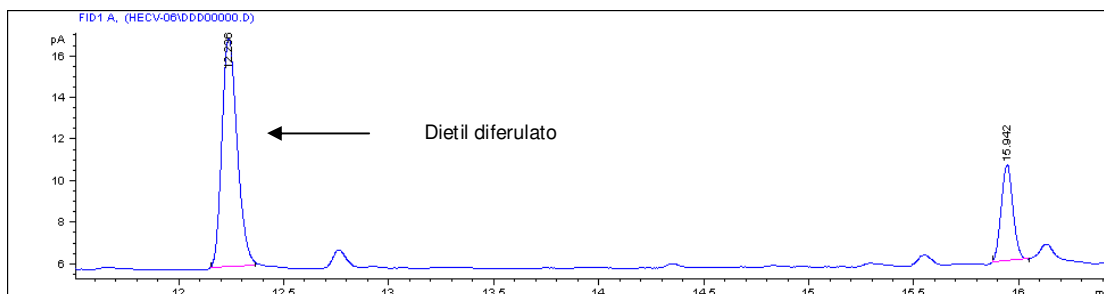
A continuación se presentan los resultados de la CCF de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol, se puede observar la leve aparición de un producto.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

4.9.2 Cronograma de la reacción de transesterificación de dietil diferulato con decanol a 45°C.

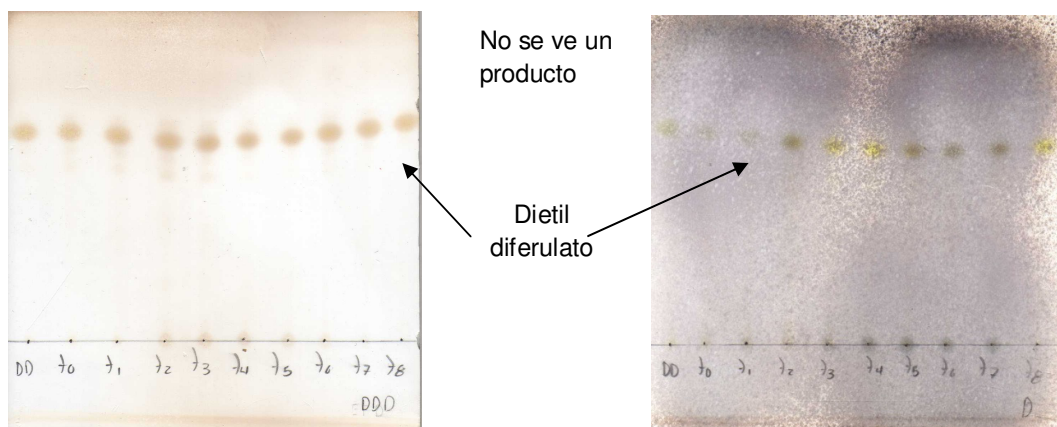
Monitoreo de dietil



En este cromatograma se observa además del pico del dietil diferulato; un pico a la derecha en 15.942 minutos, que como ya se había dicho, se presenta también en el cromatograma de la reacción con propanol a la misma temperatura por lo que podría decirse que es un producto de descomposición o alguna impureza.

4.9.3 Cromatografía en capa fina de la reacción a 60°C monitoreada cada 12 horas durante 4 días

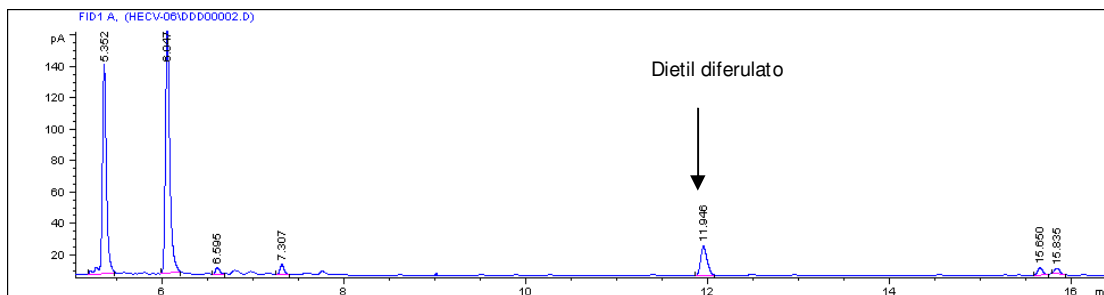
Las placas presentadas a continuación, corresponden a la reacción de transesterificación de dietil diferulato con propanol, aumentando la temperatura a 60°C, en las placas no puede observarse claramente la aparición de un producto.



Mezcla de elución
Hexano 50: Acetato de etilo 50
Izquierda, revelada con sulfato cérico
Derecha, revelada con vainillina

4.9.4 Cromatografía de dietil diferulato con acetato de etilo 50: Hexano 50.

4.9.5 Cromatografía de dietil diferulato con acetato de etilo 50: Hexano 50.



Además del pico del dietil diferulato en 11.946 minutos, en este cromatograma se ven varios picos incluso antes del dietil diferulato y dos picos pequeños después; por lo que lo más probable es la descomposición del sustrato.

4.9.5 Cuantificación de los resultados por cromatografía de gases

Alcohol receptor	Temperatura (°C)	% Transformación	σ
Decanol	45	33.22	19.55
Decanol	60	0.50	-

La cuantificación del rendimiento en estas reacciones fue muy difícil. Los rendimientos que se presentan son diversos, aunque por el método, no son de todo confiables además de que no se puede establecer un patrón como en el caso de las transesterificaciones del etil ferulato, es decir, que no se puede afirmar por ejemplo, que la temperatura sea un factor que favorezca la reacción; muy al contrario, parece disminuirla. Como se puede ver en las placas de cromatografía en capa fina, en todos los casos lo único que se observa es el dietil diferulato, no se observa ningún producto, lo que contrasta con las placas de transesterificación de etil ferulato, donde es claro que además del sustrato se encuentra un producto mayoritario, que presumiblemente sería el otro ester. Al no ser así para el caso de dietil diferulato, se esperaba que el rendimiento al cuantificar en el cromatógrafo de gases sería muy bajo, sin embargo se observan resultados muy diversos, lo cual indica que la reacción de transesterificación es posible de llevar a cabo, sin embargo los rendimientos aun no son los esperados, por lo que se ve en la placa, y aunque el porcentaje de transformación parezca elevado en el caso de la reacción con butanol a 45°C, esto puede ser en realidad el porcentaje de transformación del sustrato (dietil diferulato) sin que esto necesariamente pase a el producto esperado (en este caso el ester de butanol). En este caso, el hecho de que la temperatura de 60°C disminuya el rendimiento de la reacción podría deberse a la desnaturalización de la enzima, sin embargo esto es difícil de pensar ya que las reacciones se llevaron a cabo al mismo tiempo que las del etil ferulato y en estas la enzima parece funcionar mejor al elevarse la temperatura así que o bien la enzima no se acopla a este sustrato para llevar a

cabo la reacción exitosamente o simplemente se debe a que el cromatógrafo de gases no puede registrar una señal adecuada de este compuesto y los diferentes productos de su transesterificación.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El ácido ferúlico puede conseguirse en cantidades importantes a partir del residuo de nixtamalización de maíz conocido como nejayote, en un momento de crisis como el que atraviesa el país, es importante revalorizar los productos del campo mexicano, por lo que obtener un producto de gran relevancia científica y nutricional como el ácido ferúlico a partir de un producto, que generalmente se desecha, le da un valor agregado al mismo.

La obtención del éster etílico del ácido ferúlico puede llevarse a cabo químicamente con buenos rendimientos, sin embargo, valdría la pena realizar la reacción de manera enzimática probando condiciones que ya estén establecidas en bibliografía, pero experimentando también con condiciones nuevas que aumenten el rendimiento de esta reacción.

Los dímeros de ácido ferúlico, sintetizados vía directa con peroxidasas, son difíciles de separar, el método de dimerización utilizado en este trabajo permite la obtención de un solo dímero esterificado en un rendimiento de 20%, con lo que se consigue una cantidad considerable del producto para sus reacciones posteriores.

La síntesis de ésteres de los dímeros de ácido ferúlico de esta manera da rendimientos menores a los obtenidos por vía de la transesterificación de un derivado esterificado del ácido, en este caso, el etil ferulato.

El residuo de desespinado de nopal es una buena fuente de peroxidasa y si se le da el tratamiento adecuado en su purificación tiene un gran potencial para ser industrializada y utilizada en síntesis, que además daría a las espigas de nopal un valor y uso agregado.

Los compuestos obtenidos en este trabajo, los ésteres de ácido ferúlico y los de diferúlico, deben mantener las mismas o incluso mejores propiedades antioxidantes; sin embargo, esto aún debe ser analizado en un estudio

posterior, ya que las pequeñas cantidades sintetizadas para este trabajo impidieron una separación de los compuestos para la realización de más pruebas, en el sentido de las propiedades de los compuestos conseguidos.

CAPÍTULO 6. ANEXOS

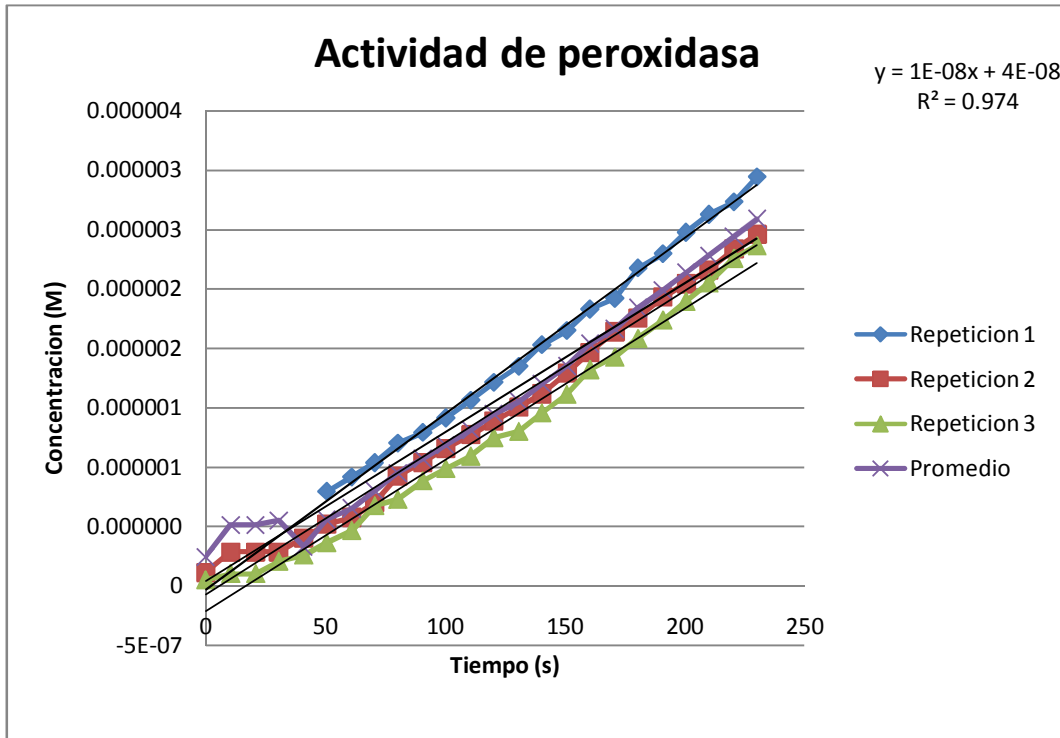
6.1 Anexo 1. Actividad de peroxidasa de nopal

En una celda de vidrio se colocan 200 ml de un stock del donador de protones al 1% v/v, 100 ml de H₂O₂ al 1%, 1.6 ml de buffer de fosfatos (100 mM; pH =6.8) y 100 ml del extracto crudo. Al final se registra el incremento en la absorbancia a 470, 415, 590 y 340 nm (para guayacol, ABTS, bencidina y pirogalol respectivamente) cada 10 segundos durante 5 minutos, usando $e_{470}= 2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (guayacol), $e_{415}= 3.11 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ABTS), $e_{590}= 3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (bencidina) y $e_{340}= 2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (pirogalol).

6.1.1 Peroxidasa de rábano

Tiempo (s)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	σ
0	5,78195E-07	1,15789E-07	5,18797E-08	2,48622E-07	2,87203E-07
10,426	1,15677E-06	2,89098E-07	1,04135E-07	5,16667E-07	5,62004E-07
20,852	1,15677E-06	2,89098E-07	1,04135E-07	5,16667E-07	5,62004E-07
30,476	1,15677E-06	2,89098E-07	2,08271E-07	5,51378E-07	5,25837E-07
40,902		4,04887E-07	2,6015E-07	3,32519E-07	1,02344E-07
50,52601	7,96992E-07	5,20677E-07	3,64286E-07	5,60652E-07	2,19106E-07
60,95201	9,17293E-07	5,78195E-07	4,68421E-07	6,54637E-07	2,33996E-07
70,57601	1,03759E-06	7,00752E-07	6,76692E-07	8,05013E-07	2,0178E-07
80,20001	1,20301E-06	9,25564E-07	7,28571E-07	9,52381E-07	2,38352E-07
90,62601	1,29323E-06	1,04098E-06	8,84962E-07	1,07306E-06	2,06017E-07
100,25001	1,41353E-06	1,15677E-06	9,89098E-07	1,18647E-06	2,13771E-07
110,67601	1,56391E-06	1,27256E-06	1,09323E-06	1,3099E-06	2,3755E-07
120,30001	1,71429E-06	1,38797E-06	1,24925E-06	1,4505E-06	2,38742E-07
130,72601	1,84962E-06	1,50376E-06	1,3015E-06	1,55163E-06	2,77178E-07
140,35001	2,03008E-06	1,61955E-06	1,45752E-06	1,70238E-06	2,95129E-07
150,77602	2,15038E-06	1,79286E-06	1,61353E-06	1,85226E-06	2,73306E-07
160,40002	2,33083E-06	1,96654E-06	1,8218E-06	2,03972E-06	2,62284E-07
170,82602	2,42105E-06	2,13985E-06	1,92594E-06	2,16228E-06	2,48317E-07
180,45002	2,67669E-06	2,25564E-06	2,08195E-06	2,3381E-06	3,05822E-07
190,87602	2,79699E-06	2,42932E-06	2,23835E-06	2,48822E-06	2,83942E-07
200,50002	2,97744E-06	2,54474E-06	2,39436E-06	2,63885E-06	3,02719E-07
210,12402	3,12782E-06	2,66053E-06	2,55075E-06	2,7797E-06	3,06437E-07
220,55002	3,23308E-06	2,83383E-06	2,75865E-06	2,94185E-06	2,54997E-07
230,17402	3,44361E-06	2,95639E-06	2,86278E-06	3,08759E-06	3,1185E-07

240,60002	3,50376E-06	3,12331E-06	3,01917E-06	3,21541E-06	2,55085E-07
250,22403	3,6391E-06	3,23872E-06	3,17519E-06	3,351E-06	2,51512E-07
260,65003	3,78947E-06	3,4703E-06	3,33158E-06	3,53045E-06	2,34799E-07
270,27403	3,92481E-06	3,64361E-06	3,48759E-06	3,68534E-06	2,21576E-07
280,70003	4,04511E-06	3,87519E-06	3,64361E-06	3,85464E-06	2,01539E-07
290,32403	4,19549E-06	3,93308E-06	0,0000038	3,97619E-06	2,01238E-07
300,75003	4,34586E-06	4,0485E-06	3,95602E-06	4,11679E-06	2,03701E-07



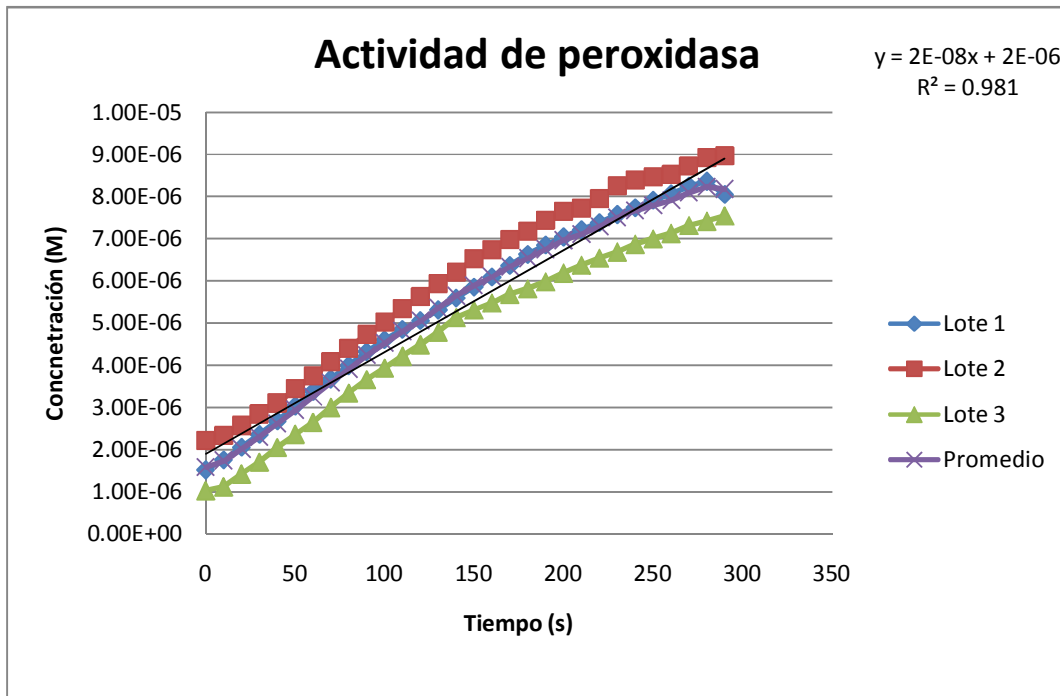
Pendiente 1×10^{-8} M/s

$$\frac{1 \times 10^{-8} \text{ mol}}{\text{L s}} * \frac{2 \times 10^{-4} \text{ L}}{100 \mu\text{L}} * \frac{1}{0.23 \text{ mg}} * \frac{1}{1 \text{ L}} * \frac{1 \times 10^6 \mu\text{L}}{1 \text{ L}} * \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} = \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} = \frac{5.2174 \mu\text{mol}}{\text{min mg}}$$

5.2174U/mg

6.1.2 Peroxidasa de nopal

Tiempo	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	σ
0	1,51664E-06	2,21204E-06	1,01876E-06	1,58248E-06	5,99359E-07
10	1,75089E-06	2,32924E-06	1,11411E-06	1,73141E-06	6,07799E-07
20	2,05182E-06	2,56038E-06	1,41826E-06	2,01015E-06	5,72199E-07
30	2,35408E-06	2,84354E-06	1,70054E-06	2,29938E-06	5,73462E-07
40	2,67442E-06	3,10474E-06	2,04369E-06	2,60762E-06	5,33669E-07
50	3,03082E-06	3,43435E-06	2,35883E-06	2,94133E-06	5,43316E-07
60	3,37357E-06	3,7431E-06	2,64257E-06	3,25308E-06	5,6007E-07
70	3,67059E-06	4,08628E-06	2,99599E-06	3,58429E-06	5,50246E-07
80	3,98998E-06	4,40167E-06	3,33811E-06	3,90992E-06	5,36283E-07
90	4,3158E-06	4,72764E-06	3,65785E-06	4,23376E-06	5,39592E-07
100	4,5976E-06	5,0258E-06	3,93104E-06	4,51815E-06	5,51686E-07
110	4,84725E-06	5,34401E-06	4,21177E-06	4,80101E-06	5,67534E-07
120	5,05405E-06	5,63012E-06	4,48408E-06	5,05609E-06	5,73022E-07
130	5,3046E-06	5,94551E-06	4,78053E-06	5,34355E-06	5,83466E-07
140	5,58721E-06	6,21687E-06	5,12778E-06	5,64395E-06	5,46756E-07
150	5,84626E-06	6,52006E-06	5,30957E-06	5,89196E-06	6,06536E-07
160	6,08704E-06	6,7368E-06	5,47499E-06	6,09961E-06	6,30999E-07
170	6,35899E-06	6,97775E-06	5,68234E-06	6,33969E-06	6,47921E-07
180	6,62295E-06	7,1837E-06	5,81366E-06	6,5401E-06	6,88765E-07
190	6,84564E-06	7,44093E-06	5,9777E-06	6,75475E-06	7,35837E-07
200	7,03716E-06	7,65225E-06	6,18314E-06	6,95752E-06	7,37782E-07
210	7,20596E-06	7,72724E-06	6,37115E-06	7,10145E-06	6,84061E-07
220	7,37666E-06	7,95846E-06	6,53933E-06	7,29148E-06	7,13392E-07
230	7,56613E-06	8,25913E-06	6,68512E-06	7,50346E-06	7,88877E-07
240	7,72843E-06	8,39463E-06	6,86828E-06	7,66378E-06	7,65225E-07
250	7,90429E-06	8,46288E-06	6,99878E-06	7,78865E-06	7,38868E-07
260	8,05649E-06	8,52798E-06	7,12479E-06	7,90309E-06	7,14063E-07
270	8,24461E-06	8,72929E-06	7,30981E-06	8,09457E-06	7,21534E-07
280	8,35771E-06	8,92973E-06	7,41324E-06	8,23356E-06	7,65827E-07
290	8,04151E-06	8,96745E-06	7,53761E-06	8,18219E-06	7,25228E-07



Pendiente 2×10^{-8} M/s

$$\frac{2 \times 10^{-8} \text{ mol}}{\text{L s}} * \frac{2 \times 10^{-4} \text{ L}}{100 \mu\text{L}} * \frac{1}{1 \times 10^{-3} \text{ ml}} * \frac{1 \text{ ml}}{57.9905 \text{ mg prot.}} * \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}}$$

$$\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} = \frac{4.1386 \times 10^{-3} \text{ mmol}}{\text{mg min}}$$

$$\frac{4.1386 \times 10^{-3} \text{ U}}{\text{mg}} * \frac{57.9905 \text{ mg proteína}}{\text{ml extracto}} = \frac{0.24 \text{ U}}{\text{ml}}$$

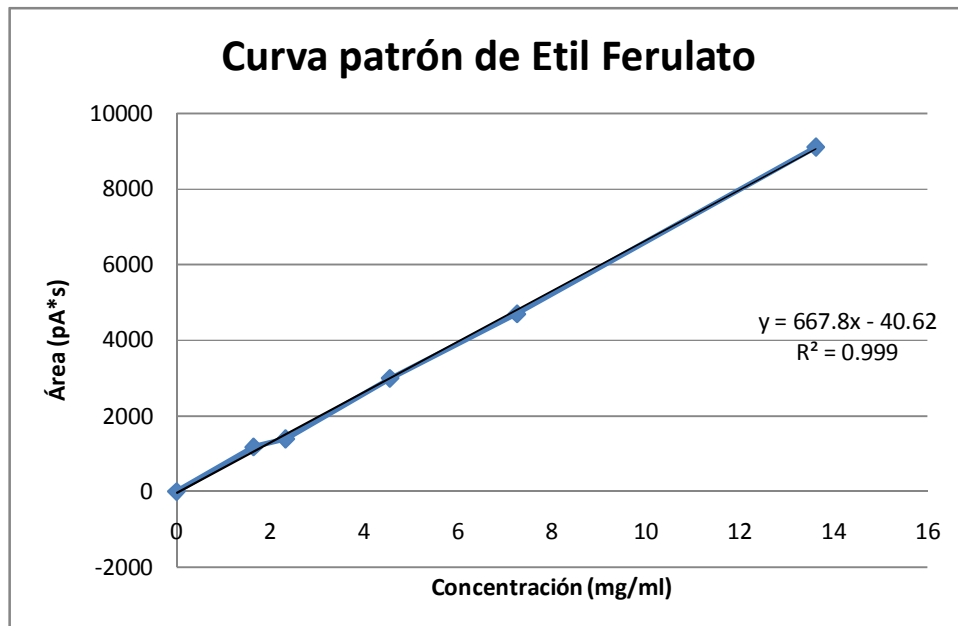
$$\frac{4.1386 \times 10^{-3} \text{ U}}{\text{mg}} * \frac{57.9905 \text{ mg proteína}}{\text{ml extracto}} = \frac{0.24 \text{ U}}{\text{ml}}$$

Si en 1mg de peroxidasa de rábano hay 5.2174 U, 21.7392 ml de extracto de nopal tendrán la misma cantidad de unidades.

6.2 Anexo 2. Curvas estándar para la cuantificación por cromatografía de gases

6.2.1 Curva patrón de Etil Ferulato

Concentración EF (mg/ml)	Área (pA*s)
0	0
1,6422	1180,1
2,324	1390
4,5461	2993
7,2491	4699,45
13,6174	9114,1

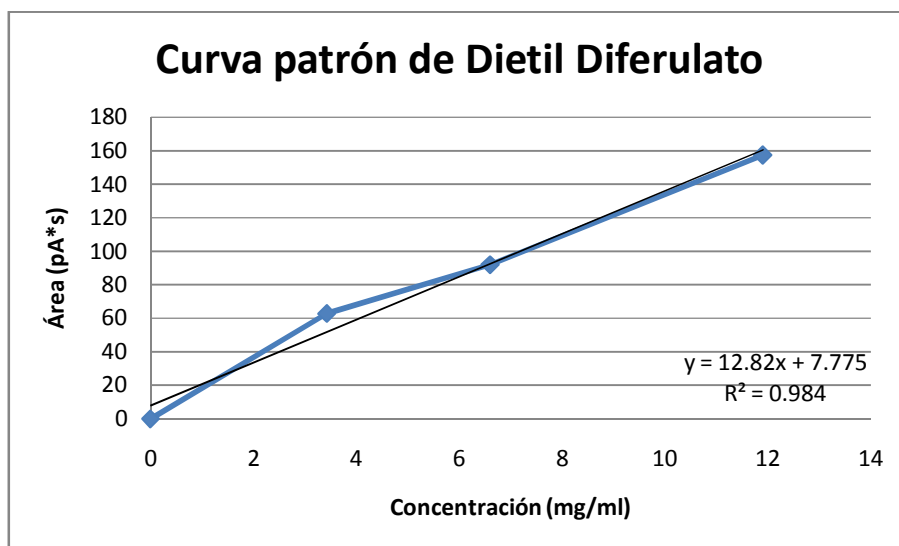


En la tabla siguiente se muestran los promedios de cada muestra inyectada dos veces; también se puede ver que se inyectaron las muestras de las reacciones con diferente cantidad de sustrato inicial; se puede ver el porcentaje de la transformación.

Tipo de compuesto	Temperatura (°C)	Concentración	T. retención	Desv. Estándar	Area promedio	Desv. Estándar	Remanente (mg/ml)	% Conversión
EFP	45	18,3	5,681	6,90E-03	3242,9	183,8	4,93453892	73,0353
			6,401	7,90E-02	1460,15	96,85		
EFP	45	8,8	5,5145	5,00E-03	1859,8	18,7	2,85456418	67,561
			6,2365	1,50E-03	1627,25	0,75		
EFP	45	9,3	5,51	2,00E-03	681,3	26,7	1,08227713	88,362
			6,233	1,00E-03	962,6	0,8		
EFP	60	10,7	5,2185	8,50E-03	36,4	0,2	0,11244436	98,949
			6,261	1,00E-02	1084,55	374,95		
EFP	60	10,1	5,202	3,00E-03	66,35	0,15	0,15748466	98,440
			6,2505	3,50E-03	1445,8	13,7		
EFP	60	7,1	5,689	3,00E-03	787,75	4,65	1,24236195	82,501
			6,463	4,00E-03	3032,55	9,65		
EFB	45	9,9	5,516	0	2163,65	18,65	3,31150896	66,550
			7,0995	3,50E-03	839,6	4,4		
EFB	45	11,6	5,56	1,10E-02	4262,25	64,35	6,46748827	44,245
			7,121	9,00E-03	613,3	1,6		
EFB	60	3,6	5,669	2,00E-03	60,05	0,75	0,14801041	95,888
			7,359	3,00E-03	2912,35	0,15		
EFB	60	8,2	5,531	1,00E-03	903,2	3,1	1,41598141	82,731
			7,134	3,00E-03	1254,45	4,65		
EFB	60	6,5	5,52	2,00E-03	749,55	15,65	1,18491488	81,770
			7,1245	5,00E-04	1864,65	9,55		
EFB	60	5,5	5,507	1,00E-03	102,1	1,1	0,21124729	96,159
			7,1175	1,50E-03	1826,4	17,3		
EFD	45	46,6	5,675	1,50E-02	3069,7	79,4	4,67407212	89,969
			16,0695	2,05E-02	1997,75	12,05		
EFD	45	10	5,758	2,39E-01	823,8	98,3	1,29657573	87,034
			15,7595	2,50E-03	1329,05	34,75		
EFD	45	7,7	5,5145	2,50E-03	863,4	13,9	1,35612819	82,387
			15,7275	4,50E-03	825,6	16,7		
EFD	60	14,8	5,9895	5,00E-04	427,2	1	0,70014888	95,269
			15,7865	5,00E-04	1632,25	2,15		

6.2.2 Curva patrón de dietil diferulato

Concentración DD (mg/ml)	Área (pA*s)
0	0
3,425	62,8875
6,6	92
11,9	157,42



Muestras inyectadas de reacciones de transesterificación de dietil diferulato. En la tabla siguiente muestran las diferentes condiciones de las reacciones de transesterificación del dietil diferulato, con las temperaturas utilizadas y los diferentes alcoholes que se usaron para la transesterificación con sus promedios.

Tipo de compuesto	Temperatura (°C)	Concentración (mg/ml)	T. retención	Desv. Estándar	Area promedio	Desv. Estándar	Remanente (mg/ml)	% Conversión
DDP	45	8	12,22	5,00E-04	47,05	0,45	3,062	61,723
			15,535	4,00E-03	13,95	0,05		
DDP	45	9,6	11,899	4,00E-03	81,7	0,5	5,763	39,961
DDP	60	7,4	11,9045	5,00E-04	69	0,4	4,773	35,493

DDB	45	8,9	12,166	1,05E-01	27,8	1,8	1,561	82,457
			15,376		10,6			
DDB	60	11,9	12,252	2,25E-02	157,42	4,25	11,667	1,9555
DDD	45	8,9	12,215 5	2,05E-02	53,7	1,7	3,580	59,768
			15,921 5	2,05E-02	17,05	0,95		
DDD	45	3,8	5,296	6,00E-03	334,8	0,7		
			5,99	2,00E-03	382,6	0,4		
			11,856 5	5,00E-04	49,85	0,15	3,280	13,673
DDD	45	3,2	5,2965	5,00E-04	323,1	2,1		
			5,9855	5,00E-04	394	0,1		
DDD	60	6,6	5,3425	9,50E-03	414,5	3,7		
			6,037	1,00E-02	515,5	5,55		
			11,930 5	1,55E-02	92	0,9	6,566	0,504
			15,634 5	1,55E-02	15,95	0,15		
			15,822	1,30E-01	13,7	0,3		

BIBLIOGRAFÍA

- Graf, E. *Antioxidant potencial of ferulic acid*. Free radical biology and medicine. 13:435 – 448, 1992.
- Rosazza, J.P.N., Huang, Z., Dostal L., Volm, T., Rousseau, B. Review: *Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product*. Journal of industrial microbiology. 15: 457 – 471, 1995.
- Sindhu, M., Emilia, A. *Ferulic acid, an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications*. Critical reviews in biotechnology. 24(2 - 3): 59 – 83, 2004.
- Shiyi, O., Kwork, K. Review, *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods*. Journal of science of food agriculture. 84: 1261 – 1269, 2004.
- Montgomery, R. *Development of biobased products*. Bioresource technology. 91: 1 – 29, 2004.
- Priya, K. Chadha, A. *Synthesis of hydroxycinnamic esters by Pseudomonas cepacia lipase*. Enzyme and microbial technology. 6256: 1 – 6, 2003.
- Figueroa – Espinoza, M. C., Villeneuve, P. *Phenolic acids enzymatic Lipophilization*. Journal of agricultural and food chemistry. 53: 2779 – 2787, 2005.
- Sabally. K Karboune, S. Yebaho, K. Kermasha, S. *Enzymatic esterification of dyhydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media*. Biocatalysis and biotransformation. 23 (1): 37 – 44, 2005.
- Yoshida, Y., Kimura, Y., Kadota, M., Tsuno, T. Adachi, S. *Continuos synthesis of alkyl ferulate by immobilized Candida antarctica lipase at high temperature*. Biotechnology letters. 28: 1471 – 1474, 2006.
- Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. A textbook. Springer, 5th edition, Germany, pp. 94 – 98, 2004.
- Villeneuve, P. *Plant lipases and their applications in oils and fats modifications*. European journal of lipid science technology. 105: 308 – 317, 2003.

- Zhaohui Zhao, Mohammed H. Moghadasian, *Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review*. Food Chemistry 109 (2008) 691–702.
- Allerdings, E. Ralph, J., Schatz, P. F., Gniechwitz, D., Steinhart, H., Bunzel, M. *Isolation and structural identification of diarabinosyl 8 – O – dehydroferulate from maize bran insoluble fiber*. Phytochemistry 66:113 – 124, 2005.
- John Ralph, Maria Teresa Garcia Conesa, and Gary Williamson. *Simple Preparation of 8-5-Coupled Diferulate*. Journal of agricultural and food Chemistry. 1998, 46, 2531-2532.
- Bily, A.C., Reid, L.M., Taylor, J., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A.J., Bakan, B., Regnault – Roger, C., Pauls, K.P., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R. *Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: Resistance factor to fusarium graminearum*. Genetics and resistance. 1 – 8, 2003.
- Waldron, Keith W., Parr, Adrian J., Ng, Annie, Ralph John. *Cell wall esterified phenolic dimmers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection*. Phytochemical analysis. Vol. 7, 305 – 312 (1996).
- Funk, Carola; Ralph, John; Steinhart, Hans; Bunzel Mirko. *Isolation and structural characterization of 8 – O – 4/ 8 – O – 4 – y 8 – 8/ 8 – O – 4 – coupled dehydrotriferulic acids from maize bran*. Phytochemistry, 66 (2005) 363 – 371.
- Kiso, Taro; Shizuma, Motohiro; Murakami, Hiromi; Kiryu, Takaaki; Hozono, Kenji; Terai, Tadamasa; Nakano, Hirofumi. *Oxidative coupling reaction of arbutin and gentsiate catalyzed by horseradish peroxidase*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic. 45 (2007) 50 – 56.
- Sgalla, Simona; Fabrizi, Giancarlo; Cacchi, Sandro; Macone, Alberto; Bonamore, Alessandra; Boffi, Alberto. *Horseradish peroxidase in ionic liquids. Reactions with water insoluble phenolic substrates*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic. 44 (2007) 144 – 148.

- Mabinya, Leonard; Mafunga, Tungamirai; Morgan, John. *Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography*. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (13), pp. 1271 – 1273, 2006.
- Gross, George G. et. al. *Plant Polyphenols 2. Chemistry, biology, pharmacology, ecology*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999.
- Hua, Dongliang; Ma, Cuiqing; Song, Lifu; Lin, Shan; Zhang, Zhaobin; Deng, Zixin; Xu, Ping. *Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorben resin*. Applied Microbiology Biotechnology (2007) 74: 783 – 790.
- Kikuzaki Hiroe, Hisamoto Masashi, Hirose Kanae, Akiyama Kayo, Taniguchi Hisaji. *Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50, 2161 – 2168.
- Larsen Erik, Andreasen Mette, Christensen Lars. *Regioselective dimerization of ferulic acid in a micellar solution*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, 49, 3471 – 3475.
- Srivastava Smita, Srivastava Ashok. *Hairy root culture for mass – production of high – value secondary metabolites*. Critical reviews in biotechnology, 27: 29 – 43, 2007.
- Sultana Rukhsana, Ravagna Agrippino, Mohmmad – Abdul Hafiz, Calabrese Vittorio, Butterfield Allan. *Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β - peptide (1 – 42) – induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity*. Journal of neurochemistry, 2005, 92, 749 – 758.
- Klepacka Joanna, Fornal Lucja. *Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat*. Critical reviews in food science and nutrition, 46: 639 – 647 (2006).
- Centini Marisanna, Maggiore Maria, Casolaro Mario, Andreasi Marco, Maffei Facino, Anselmi Cecilia. *Cyclodextrins as cosmetic delivery systems*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry (2007) 57: 109 – 112.

- McCaskill Don, Zhang Fan. *Use of rice bran oil in foods. Food Technology*. Vol. 53 No. 2 50 – 52, 1999.
- Chang Su – Feng, Hsieh Chiu – Lan, Yen Gow – Chin. *The protective effect of Opuntia dillenii Haw fruit against low – density lipoprotein peroxidation and its active compounds*. Food chemistry 106 (2008) 569 – 575.
- Carrasco - Alberto Esteban, Zapata José Miguel, Lopez – Serrano Matías, Sabater Bartolomé, Martín Mercedes. *Purification of two peroxidase isoenzymes of Aloe barbadensis which oxidize p-coumaric acid*. Plant physiology and biochemistry 40 (2002) 127 – 132.
- Paolo Torre, Bahar Aliakbarian, Beatriz Rivas, José Manuel Domínguez, Attilio Converti. *Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis*. Biochemical Engineering Journal, 2008.
- Isabelle Benoit, David Navarro, Nathalie Marnet, Nnjara Rakotomanomana, et. al. *Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products*. 341 (2006) 1820–1827.
- Carbajal Sánchez Ana Laura, *Obtención de compuestos diméricos mediante acoplamiento oxidativo de fenoles promovido por peroxidasa de nopal*. Tesis de Maestría. Instituto tecnológico de Veracruz, 2008.