



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**LIPOFILIZACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS  
MEDIANTE REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN QUÍMICA Y  
TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA**

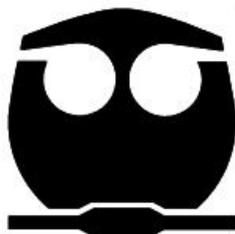
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**LAURA MICHELLE MORENO GÓMEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: Raúl Genaro Aguilar Caballero

VOCAL: Arturo Navarro Ocaña

SECRETARIO: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

1<sup>ER</sup> SUPLENTE: Jorge Arturo Aburto Anell

2<sup>DO</sup> SUPLENTE: Miquel Gimeno Seco

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA.**

Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM

Laboratorio 321, Conjunto E. Edificio de Alimentos y Química Ambiental.

### **NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Arturo Navarro Ocaña

\_\_\_\_\_

### **NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:**

Moreno Gómez Laura Michelle

\_\_\_\_\_

**ÍNDICE**

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	3
Ácidos hidroxicinámicos	3
Ácido ferúlico	3
Ésteres de ácido ferúlico	4
Ácido <i>p</i> -cumárico	6
Ésteres de ácido <i>p</i> -cumárico	6
Ácido cafeico	8
Ésteres de ácido cafeico	8
Ácido sinápico	10
Ésteres de ácido sinápico	10
Lipofilización	12
Lipofilización de ácidos hidroxicinámicos	12
Lipofilización química	13
Esterificación de Fischer	13
Lipofilización catalizada con Arcillas súper ácidas	15
Arcilla montmorillonita	16
Lipofilización enzimática	17
Lipasas	18
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	21
Lipofilización enzimática de ácidos hidroxicinámicos	23
Arcillas	26
Usos de las arcillas	27

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS _____	28
Objetivo general _____	28
Objetivos particulares _____	29
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS _____	30
Materiales _____	30
Desarrollo experimental _____	31
Esterificación de Fischer de ácidos hidroxicinámicos _____	32
Esterificación de ácidos hidroxicinámicos catalizada por arcillas súper ácidas _____	34
Lipofilización enzimática con lipasa B de <i>Candida antarctica</i> comercial _____	36
-Transesterificación de hidroxicinamatos con butanol _____	36
-Transesterificación de cafeatos con alcohol bencílico y piperonílico _____	38
CAPÍTULO 4. RESULTADOS _____	40
Esterificación de Fischer de ácidos hidroxicinámicos _____	40
Esterificación de ácidos hidroxicinámicos catalizada por arcillas súper ácidas _____	43
Lipofilización enzimática con lipasa comercial de <i>Candida antarctica</i> _____	48
-Transesterificación de hidroxicinamatos con butanol _____	48
Ésteres de ácido ferúlico _____	49
Ésteres de ácido <i>p</i> -cumárico _____	51
Ésteres de ácido sinápico _____	53
Ésteres de ácido cafeico _____	55
a) <i>Transesterificación de alquil cafeatos con butanol</i> _____	55
b) <i>Transesterificación de cafeatos con alcohol bencílico y piperonílico.</i> _____	58
Éster bencílico de ácido cafeico _____	58
Éster piperonílico de ácido cafeico _____	60

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS	65
CAPÍTULO 7. ANEXOS	66
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	74
Referencias electrónicas	78

## RESUMEN

Los ácidos hidroxicinámicos son un tipo de compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Entre éstos se encuentran los ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y sinápico. Debido a sus propiedades antioxidantes, estos compuestos se utilizan como aditivos en alimentos; sin embargo los ácidos hidroxicinámicos por sí solos poseen una baja solubilidad en medios lipofílicos, lo cual reduce sus propiedades antioxidantes en las reacciones de oxidación de grasas y aceites.

Este trabajo propone la ampliación estructural de los ácidos hidroxicinámicos por medio de reacciones de esterificación y transesterificación (lipofilización), lo cual aumenta su solubilidad en medios lipofílicos y hace factible su aplicación en alimentos que contengan lípidos.

Empleando dos métodos de esterificación: Fischer y catálisis con arcillas súper ácidas; se obtuvieron los metil y etil hidroxicinamatos, una vez obtenidos, se realizaron las reacciones de transesterificación, mediadas por lipasa B comercial de *Candida antártica*, en disolventes orgánicos ecológicos para obtener compuestos de uso en alimentos, y n-butanol como alcohol sustituyente para todos los metil y etil ésteres. Además en el caso de los ésteres (metil y etil) de ácido cafeico se realizó la reacción de transesterificación con alcohol piperonílico y alcohol bencílico. Finalmente todos los productos se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (RMN).

## **INTRODUCCIÓN**

Los antioxidantes son sustancias que en alimentos retardan la rancidez causada por oxidación atmosférica protegiendo así a los lípidos y los compuestos liposolubles como las vitaminas o los carotenoides.

Los ácidos fenólicos son antioxidantes naturales que están presentes en frutas, vegetales, hierbas aromáticas y especias; lo cual los convierte de gran interés por dicha actividad. Los ácidos fenólicos, particularmente los ácidos hidroxicinámicos, generalmente son solubles en agua, por lo que su carácter hidrofílico reduce su efectividad en la estabilización de grasas y aceites.

La lipofilización en términos generales es la modificación química de moléculas para aumentar su hidrofobicidad, en el caso de los ácidos hidroxicinámicos (AH), es la modificación de éstos vía esterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes).

La lipofilización se puede emplear como una herramienta para modificar su solubilidad, es decir, dando cierta lipofilidad a los compuestos manteniendo sus propiedades funcionales originales (Castro-Ochoa, et al, 2010).

Las reacciones de transesterificación realizadas en este trabajo, se llevaron a cabo con lipasa comercial de *Candida antarctica*, en trabajos anteriores se han realizado dichas reacciones de lipofilización de ácidos hidroxicinámicos con alcoholes de cadena corta y larga; en este trabajo se realizó la ampliación estructural de los AH con butanol como alcohol sustituyente; previamente los AH se esterificaron por dos métodos con metanol y etanol. Adicionalmente a los cafeatos, se les realizó una transesterificación con alcohol bencílico y piperonílico.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos o derivados del ácido cinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, incluyendo muchos alimentos y bebidas. Entre ellas, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con otras moléculas. Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico. (García, 2005).

### Ácido ferúlico

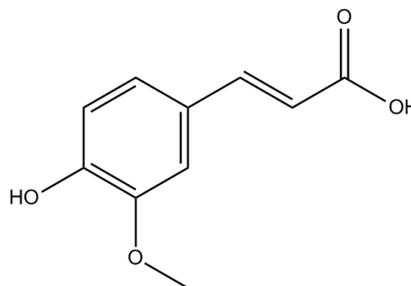


Figura 1. Estructura química del ácido ferúlico.

El ácido ferúlico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico, es un derivado de ácido cinámico de fórmula molecular: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, está ampliamente distribuido en la naturaleza.

Es un componente de la pared celular, formando ésteres con algunos polisacáridos y pectinas, y entrecruzando cadenas de pentosanos, arabinosilanos y hemicelulosa. Se encuentra presente en pastos, flores, nueces, betabel, espinaca, café, fibra de remolacha azucarera, semillas de plantas como: arroz, trigo, avena, maíz y frijol, entre otros.

Se ha demostrado que el ácido ferúlico y sus derivados tienen diversas propiedades, entre las cuales destaca la actividad antioxidante, sin embargo

posee una baja solubilidad en medios lipofílicos, lo cual reduce tales propiedades en las reacciones de oxidación de grasas y aceites.

### Ésteres de ácido ferúlico

Se ha encontrado que los derivados hidrófobos, alquil ferulato, tienen una mayor actividad antioxidante que el ácido ferúlico para la prevención de la oxidación del ácido linoleico en grandes volúmenes de éste. (Li, et. al., 2009). Además, se ha demostrado que la actividad antioxidante del metil ferulato es mayor que la del ácido ferúlico (Karamac, et. al., 2005).

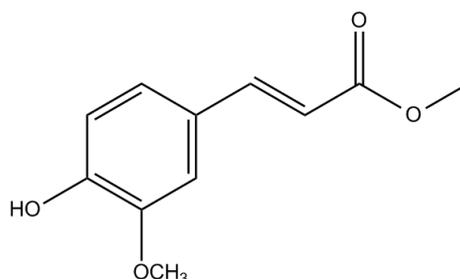


Figura 2. Estructura química del metil ferulato

Los ésteres de ácido ferúlico son fáciles de aplicar sobre la piel y muestran una actividad antioxidante mayor en lugar de uso de ácido ferúlico que tiene una naturaleza ácida y, como tal, no se puede extender sobre la piel. La actividad del alquil ferulato está influenciada por la longitud de cadena de la parte alcohólica, una cadena mayor a 6 carbonos tienen mayor actividad antioxidante.

Se ha demostrado que el etil ferulato tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. La presencia del grupo etilo hace a este compuesto más lipófilo, lo que aumenta su capacidad para atravesar las membranas celulares, que son ricas en lípidos. Especialmente en el caso del cerebro es útil al permitir un mejor transporte del etil ferulato a través de la barrera hematoencefálica, también se ha demostrado que puede secuestrar los radicales hidroxilo y superóxido. (Sultana, 2012)

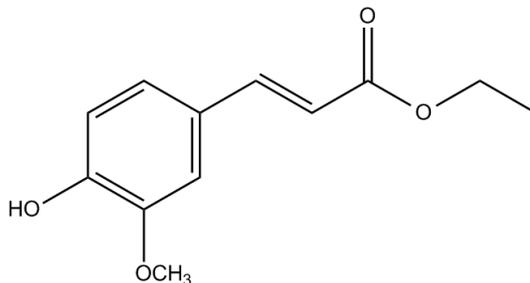


Figura 3. Estructura química del etil ferulato

El butil ferulato exhibe una actividad “atrapadora” de radicales libres, además se ha encontrado que desarrolla un papel importante en el cáncer, como agente quimioprotector, ya que induce la apoptosis de las células tumorales de mamíferos; además es utilizado como antioxidante, agente antibacteriano y antifúngico. (Chandel, et. al., 2011).

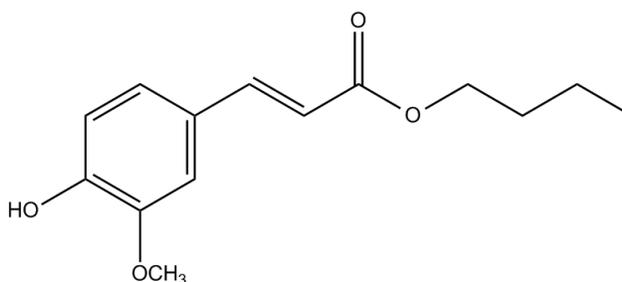


Figura 4. Estructura química del butil ferulato

### Ácido *p*-cumárico

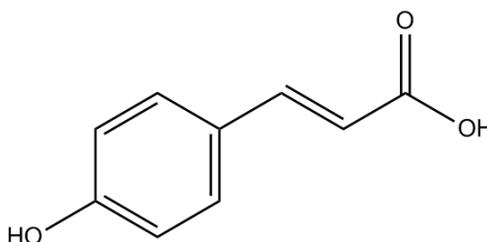


Figura 5. Estructura química del ácido *p*-cumárico.

Los ácidos cumáricos son compuestos orgánicos que son hidroxi derivados del ácido cinámico. Existen tres isómeros, ácido *o*-cumárico, ácido *m*-cumárico y ácido *p*-cumárico, que se diferencian por la posición de la sustitución del grupo hidroxi fenil. El ácido *p*-cumárico es el isómero más abundante de los tres en la naturaleza. (Casares, 2010).

Se puede encontrar en una gran variedad de plantas comestibles tales como: cacahuete, tomate, zanahoria, espinaca, fibra de remolacha azucarera, ajo, cereales y otros. Este ácido ha sido ampliamente estudiado porque tiene propiedades antioxidantes, por ejemplo, Castelluccio y colaboradores, reportaron que el ácido *p*-cumárico mejora la resistencia de LDL a la oxidación (Zang, et al, 2000) además se ha reportado que es un agente anticáncer. (Bowden, 2007).

### Ésteres de ácido *p*-cumárico

En estudios anteriores se ha demostrado que el metil *p*-cumarato inhibe la actividad catalítica de la tirosinasa en hongos (la tirosinasa es una enzima presente en tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos de la tirosina por oxidación, como el ennegrecimiento de una papa pelada o cortada expuesta al aire [Badui, 1990]), además inhibe la síntesis de melanina basal de células de melanoma en ratas. (Song, et. al., 2011)

Además se ha demostrado que el metil *p*-cumarato tiene propiedades antifúngicas e insecticidas. (Kapteyn, et al., 2007)

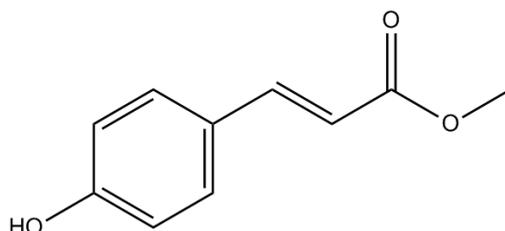


Figura 6. Estructura química del metil *p*-cumarato

También se ha encontrado que el éster 3-metoxi de ácido cumárico, como butil y etil-3-metoxi *o*-cumarato tienen la propiedad de absorber radiaciones solares, de ahí que se utilicen en protectores solares. (Poizat, et al., 1940)

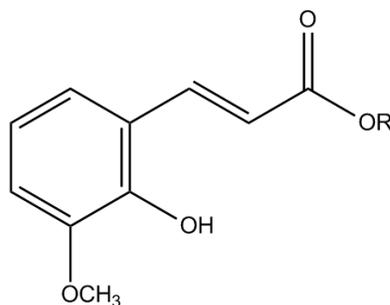


Figura 7. Estructura química del alquil-3-metoxi *o*-cumarato, donde R corresponde a butilo o etilo.

## Ácido cafeico

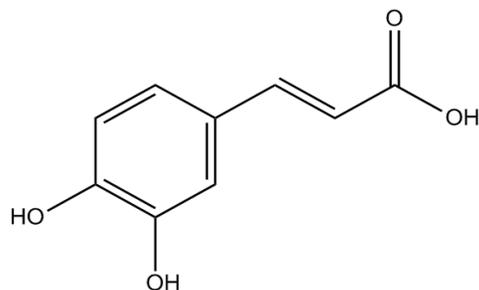


Figura 8. Estructura química del ácido cafeico.

El ácido cafeico es un compuesto orgánico de origen natural, se compone de dos grupos funcionales, fenólico y acrilato. Se encuentra en todas las plantas, ya que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales fuentes de biomasa.

Ácido cafeico (libre y conjugado) se ha encontrado en concentraciones superiores a 1000 ppm (mg / kg) en tomillo, albahaca, anís, comino, romero, mejorana, salvia, eneldo y ajeno. Otros productos agrícolas que contienen ácido cafeico y conjugados son café, papas, semillas de girasol, harina de soya, frijol, espinaca, pimiento rojo, albaricoques, coco, avena laminada, entre muchas otras fuentes. (IARC, 1993)

Se ha demostrado que éste inhibe la carcinogénesis, al impedir la formación de compuestos carcinógenos, además de inhibir la formación de mutágenos (Olthof, et al., 2000). También actúa como antiinflamatorio y tiene actividad inmunomoduladora.

## Ésteres de ácido cafeico

En estudios anteriores se observó que los ésteres del ácido cafeico tenían mayor actividad antioxidante y una mayor lipofiliidad en comparación con el ácido cafeico, además de tener la capacidad de proteger a las células PC12 contra el daño oxidativo (efecto neuroprotector), esto dependiendo de la dosis, además se sugiere que los cafeatos son buenos candidatos para el desarrollo de agentes

terapéuticos contra la oxidación y enfermedades relacionadas con el estrés. (Garrido, et. al., 2012).

El éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) es un componente del propóleo que se ha descubierto tiene propiedades antitumorales en diversos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Domínguez, 2008), antiinflamatorias, antivirales, inmunomoduladoras y modelos para inhibir la fibrosis pulmonar. (Choi, et al., 2010)

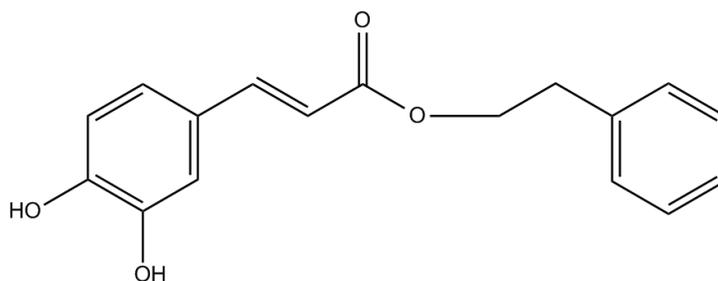


Figura 9. Estructura química del éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE)

El ácido cafeico se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico (ácido 3- cafeoilquínico), que está presente en el café, y en muchas frutas y verduras (García, 2005). Este ácido tiene la capacidad de reducir la presión arterial, por tanto se usa en el tratamiento de pacientes con hipertensión. (Gil, 2010)

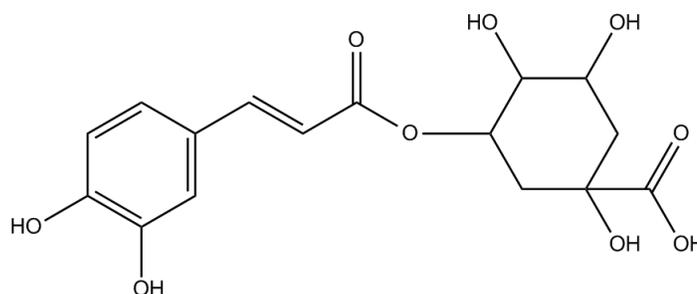


Figura 10. Estructura química del ácido 3- cafeoilquínico

## Ácido sinápico

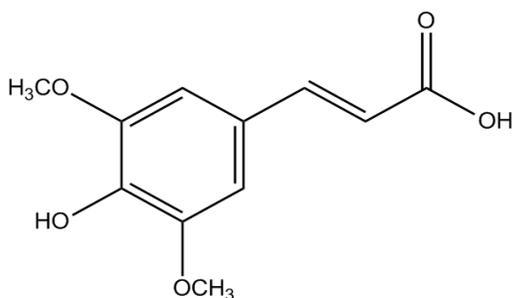


Figura 11. Estructura química del ácido sinápico

El ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) es un miembro de la familia de los fenilpropanoides, es característico de hortalizas de las Crucíferas (coles, brócoli, etc.) (Fruit & Veg. Project, 2012). Se han reportado ésteres de glucosa de ácido sinápico en tomate y en *Boreava orientalis* el cual se encuentra junto a un glucosinolato. Se ha encontrado sólo como trazas en frutas, en cambio llega a ser abundante en hortalizas del género *Brassicas*. (Rice, 2005)

El aceite de canola contiene un alto porcentaje de compuestos derivados del ácido sinápico, el ácido sinápico constituye más del 73% de los ácidos fenólicos libres mientras la sinapina, éster de colina del ácido sinápico, es el éster fenólico principal en semillas de canola (aproximadamente 80% de los fenólicos totales). El componente antioxidante más activo de la harina de canola fue identificado como 1 - O - $\beta$ - D -glucopiranosil sinapato, un derivado de ácido sinápico. (Khattab, et. al., 2009)

## Ésteres de ácido sinápico

Recientemente se ha demostrado que la esterificación del ácido sinápico tiene un impacto positivo en su coeficiente de partición y puede mejorar su actividad antioxidante en medios lipofílicos (Garrido, et. al., 2012), sin embargo la actividad antioxidante es menor que la del ácido.

Se han encontrado ésteres de ácido sinápico en la familia de las *Brassicaceae*, los ésteres mejor conocidos son sinapoil malato (éster malato de ácido sinápico) y sinapoil colina (éster colina de ácido sinápico), los cuales se encuentran acumulados en hojas y semillas respectivamente. El sinapoil malato juega un papel importante en la protección contra rayos ultravioleta y el sinapoil colina se puede utilizar como una forma de almacenamiento de la colina en semillas. (Vermerris, et al., 2008)

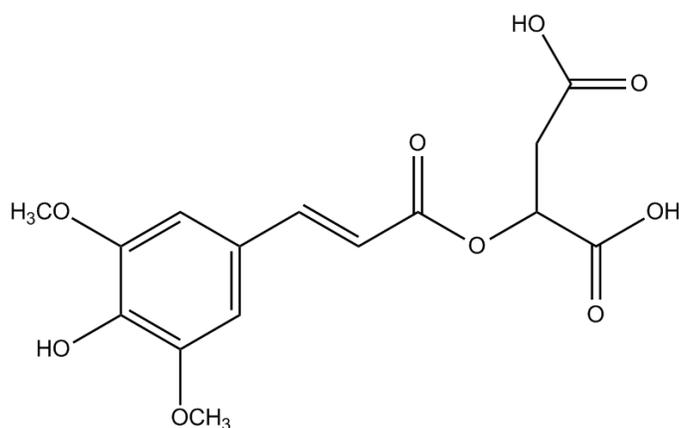


Figura 12. Estructura química de sinapoil malato.

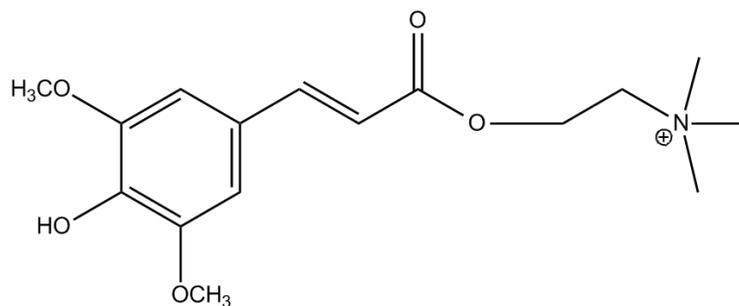


Figura 13. Estructura química de sinapoil colina.

## **Lipofilización**

Lipofilización es la adición de un resto lipófilo a un sustrato que es hidrofílico como los azúcares, aminoácidos, proteínas y compuestos fenólicos. (Figueroa-Espinoza, et al., 2005) Esta reacción se puede conseguir químicamente o de manera enzimática. (Villeneuve, 2007)

Juega un papel importante en la Química Orgánica, ya que es útil en diversos campos, tanto en laboratorio como en la industria. (Otera, 2003)

Los ácidos fenólicos poseen interesantes propiedades biológicas (antioxidante, agente quelante, secuestrante de radicales libres, filtro UV, antimicrobiano, etc.), pero debido a su solubilidad que es relativamente baja en medios apróticos, su aplicación en productos basados en aceite es limitado. Por lo tanto, la esterificación del grupo funcional ácido carboxílico con un alcohol graso mejora su hidrofobicidad lo que resulta en una molécula anfifílica multifuncional. (Villeneuve, 2007). La esterificación química y enzimática es una forma de lipofilización de compuestos fenólicos, la cual ha sido reportada por diversos autores.

### **Lipofilización de ácidos hidroxicinámicos**

Es la modificación de los ácidos hidroxicinámicos vía esterificación o transesterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes), es una herramienta para modificar su solubilidad en interfaces agua-aceite, aire-aceite, manteniendo o aumentando sus propiedades originales. (Castro-Ochoa, et al., 2010)

Dada la importancia de los ésteres se han desarrollado numerosos procesos para la obtención de los mismos. A continuación se mencionan algunos procesos de obtención de ésteres de ácidos hidroxicinámicos.

## Lipofilización química

### Esterificación de Fischer

La esterificación directa de un ácido carboxílico con un alcohol primario o secundario da resultados satisfactorios si se realiza refluendo un exceso de alcohol (que actúa como reactivo y disolvente) con el ácido carboxílico catalizada con ácido sulfúrico o de ácido clorhídrico concentrados. Emil Fischer fue quién descubrió que un éster se puede preparar de esa forma, de ahí que se llame **esterificación de Fischer**.

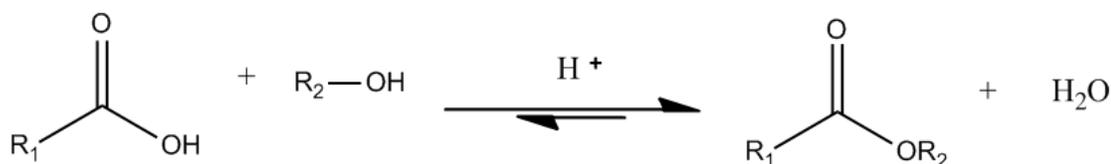


Figura 14. Reacción de esterificación de Fischer.

Puesto que el mecanismo de la esterificación de Fischer es reversible por la formación de agua durante la reacción, se recurre, para obtener rendimientos máximos, a procedimientos que desplacen el equilibrio del lado del éster, como puede ser utilizar un exceso de alcohol o el de eliminar el agua a medida que se forma. (Griffin Jr., 1981)

Esta reacción es especialmente adecuada cuando el alcohol usado como disolvente y reactivo es barato y volátil.

### Esterificación de Fischer asistida con microondas

En estudios anteriores se ha realizado la esterificación de Fisher utilizando microondas para disminuir el tiempo de reacción. A continuación se muestran algunos ejemplos (Tabla 1) de esterificación de Fisher utilizando microondas. (Li, et. al., 2009)

Tabla 1. Síntesis de alquil ferulatos con calentamiento convencional y con microondas.

Alcohol utilizado	Calentamiento convencional			Calentamiento con microondas		
	T	t (h)	R (%)	T (°C)	t (min)	R (%)
Metanol	Reflujo	8	79	75	3	95
Etanol	Reflujo	8	81	88	3	94
1-propanol	Reflujo	14	77	107	4	94
Isopropanol	Reflujo	20	69	92	4	93
1-butanol	Reflujo	18	73	128	4	93
Isobutanol	Reflujo	24	63	118	4	92
1-pentanol	Reflujo	22	58	148	5	93
isopentanol	Reflujo	28	46	142	5	91

T (temperatura), t (tiempo), R (rendimiento).

En otros estudios también se ha realizado la esterificación de Fisher de ácido cafeico asistida con microondas, donde los rendimientos y los alcoholes utilizados se muestran en la tabla 2. (Li, et. al., 2012)

Tabla 2. Rendimiento de la reacción de ácido cafeico con los alcoholes respectivos asistida con microondas.

Alcohol utilizado	Rendimiento (%)
Metanol	75
Etanol	73
1-propanol	72
Isopropanol	71
1-butanol	68
isobutanol	64
1-pentanol	70
isopentanol	69

El tiempo de reacción corresponde a 3 min.

### **Lipofilización catalizada con Arcillas súper ácidas**

Estudios recientes han demostrado que las arcillas ácidas son catalizadores de alto valor y amigables con el medio ambiente, que inducen numerosas reacciones, tales como halogenación, oligomerización, formación de éteres, compuestos heterocíclicos y macrocíclicos, entre otras, lo cual las convierte en un gran interés científico e industrial por su alta selectividad. (Ruiz, et. al., 2006)

Las importantes aplicaciones industriales en la esterificación y oxidación de las arcillas radican en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales derivan de su tamaño de partícula (inferior a 2  $\mu\text{m}$ ) y su morfología laminar (filosilicatos). (De Jesús, 2008)

Las sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de carga en las láminas y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio interlaminar. Como consecuencia de estos factores, presentan un área superficial mayor y por tanto la presencia de gran cantidad de superficie activa con enlaces no saturados, por esta razón pueden interaccionar con diversas sustancias. (De Jesús, 2008)

Las arcillas activadas con ácido han sido usadas como fuente efectiva de protones por un período considerable y se han encontrado particulares aplicaciones en procesos industriales, tales como la alquilación de fenoles, la polimerización de hidrocarburos insaturados, la clarificación de aceites comestibles y la elaboración de papel de fotocopiado libre de carbón. El tratamiento ácido incrementa el área superficial de las arcillas minerales mediante la disgregación de partículas, eliminación de impurezas minerales, remoción de cationes metálicos intercambiables e intercambio protónico, razones por las cuales ellas son comúnmente conocidas como tratamiento de activación ácida. (Molina, et al., 2008)

En estudios anteriores se han utilizado arcillas como catalizadores en reacciones de esterificación, tales como: esterificación de *ter*-butanol con

anhídrido acético, esterificación de 14 diferentes ácidos carboxílicos (aromáticos y alifáticos) utilizando una montmorillonita de la India con rendimientos de alrededor del 90%, generación de ésteres como biodiesel, preparación de ésteres de ácidos *p*-hidroxibenzoicos, esterificación con microondas sin disolventes y un 95% de arcilla (Bergaya, F., 2010).

### **Arcilla montmorillonita**

Las arcillas más utilizadas en el campo de la esterificación han sido las montmorillonitas, que son comúnmente nombradas como bentonitas, estas arcillas son comunes en suelos y sedimentos, se presentan con iones sodio, calcio, magnesio o combinación de éstos, normalmente éstas son acidificadas con ácidos de Brøsted para aumentar su actividad. (Bergaya, F., 2010).

La especie que se ocupó fue una montmorillonita de Durango, la cual es predominantemente sódica y baja en calcio (Vargas-Rodríguez, et. al, 2008).

Las propiedades catalíticas de las montmorillonitas se incrementan con los tratamientos ácidos y varían dependiendo de la fuerza ácida, de los cambios en la estructura del aluminosilicato y de las propiedades superficiales (Vargas-Rodríguez, et. al., 2008).

En estudios anteriores se ha utilizado montmorillonita obtenida del estado de Durango, México, la cual fue activada con ácido trifluorometansulfónico para llevar a cabo la esterificación de ácido benzoico y obtener trifenil benceno (Ruíz, et. al., 2006).

En este trabajo se propone el uso de arcilla (montmorillonita) súper ácida activada con ácido trifluorometansulfónico para llevar a cabo las reacciones de esterificación de ácidos hidroxicinámicos con metanol.

## Lipofilización enzimática

Durante los últimos años, el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales. Las enzimas presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química. Los procesos biocatalíticos tienen menor peligrosidad, son más amigables con el ambiente y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales. (Pérez-Victoria, 2006)

El potencial catalizador de las enzimas es muy reconocido, sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está inhibido por una serie de consideraciones. La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, y en ella puede haber reacciones colaterales no deseadas. Por esta razón se utilizan disolventes orgánicos como medio de reacción. (Pérez-Victoria, 2006)

Las transformaciones biocatalizadas en disolventes orgánicos ofrecen, entre otras, las siguientes ventajas (Pérez-Victoria, 2006):

- Es posible la catálisis de reacciones que son desfavorables en agua (por ejemplo, la reversión de la reacción).
- Reacciones colaterales inducidas por la presencia de agua son evitadas al emplear un medio orgánico.
- Los sustratos hidrofóbicos se pueden solubilizar.
- Fácil recuperación de productos del medio de reacción.
- Los biocatalizadores se pueden recuperar fácilmente del medio de reacción por medio de una filtración, permitiendo en muchos casos su reutilización y reciclado.
- La termoestabilidad del biocatalizador se incrementa, al menos mientras el contenido de agua se mantenga suficientemente bajo.

Las lipasas se utilizan en: la industria farmacéutica, para la resolución de mezclas racémicas o como biocatalizadores para la síntesis de intermedios de síntesis quirales; en el sector de alimentos, se emplean principalmente en los procesos de restructuración de aceites y grasas en el que la regioselectividad de la lipasa permite la producción de triglicéridos específicos; también se utilizan en las reacciones de lipofilización. (Villeneuve, 2007)

Además las lipasas se utilizan también para reacciones de esterificación de otros sustratos no sólo de aceites y grasas. Por ejemplo la síntesis de ésteres de azúcar, esterificación de *L*-ácido ascórbico para obtener 6-*O*-palmitoil *L*-ácido ascorbico, alcoholisis de etil piroglutamato, esterificación de proteínas de soya, entre otras. (Villeneuve, 2007)

### **Lipasas**

Las lipasas son enzimas que pertenecen al grupo de las serin hidrolasas y que catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados por el glicerol y ácidos grasos de cadena larga.

Las lipasas tienen diversas funciones en la degradación de alimentos y grasas. Juegan un papel muy importante en biotecnología, en la industria alimentaria y de producción de combustibles. (Pérez-Victoria, 2006).

La mayoría de las lipasas son extracelulares y hay de diversos tamaños que van de 20 a 60 kDa. Dentro de las características estructurales (estructura primaria) de las lipasas se incluye un plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa, compuesto por un núcleo estructural de hebras  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$ ; como se muestra en la figura 15. Por lo general, las lipasas tienen una única estructura terciaria que expone al sitio catalítico sólo en presencia de una fase lipídica insoluble (interfase agua-aceite) o bien en un disolvente orgánico con propiedades hidrofóbicas, a este fenómeno se conoce como activación interfacial, sin embargo, algunas lipasas no presentan esta activación ya que el sitio catalítico está expuesto todo el

tiempo, tal es el caso de las lipasas de *P. glumae*, *P. aeruginosa* y la lipasa B de *Candida antarctica*, para estas enzimas se propone que la hélice móvil ( $\alpha 5$ ) tiene la función de enlazar o sujetar a la enzima a la interfase lipídica. (Torres, 2009).

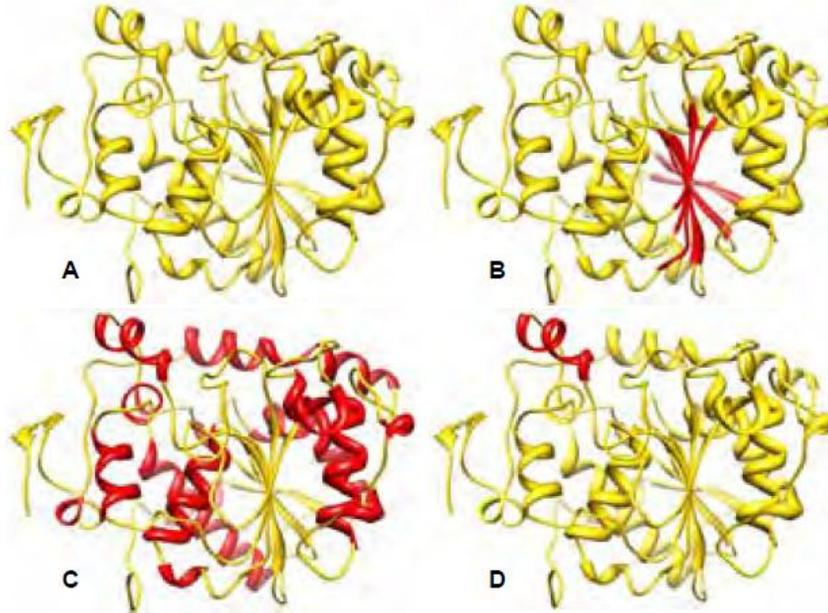


Figura 15. **A** Vista frontal de la estructura cristalográfica de la lipasa B de *Candida antarctica*. **B** (rojo) Núcleo estructural de hebras  $\beta$  rodeado por **C** (rojo) hélices  $\alpha$ . **D** Hélice móvil ( $\alpha 5$ ) responsable de la activación interfacial.

A diferencia de las esterasas, las lipasas pueden nombrarse como carboxil-esterasas, con afinidad preferente por ácidos carboxílicos de cadena larga, es decir, de 10 o más átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada. Cabe aclarar que aun así a expensas de decrementos en la afinidad, las lipasas son capaces de hidrolizar o sintetizar moléculas con residuos carboxílicos de menor tamaño. En términos de las características del sitio activo, las lipasas se clasifican como serín hidrolasas ya que se componen de una triada catalítica integrada por una serina nucleofílica, un aspartato o glutamato unido por un puente de hidrógeno a una histidina. (Torres, 2009).

Estas enzimas prosiguen un comportamiento catalítico que se ajusta al modelo Bi Bi Ping Pong (Figura 16). La reactividad de la enzima (Figura 17) se da cuando la serina nucleofílica es activada por la histidina y el ácido aspártico a través de una transferencia de protones. De esta manera la reacción comienza

cuando la serina activada actúa como nucleófilo en un ataque al grupo carbonilo del sustrato (S1) con la salida del primer producto (P1). Este intermediario tetraédrico se estabiliza mediante interacciones con el agujero oxianión. El primer producto de la reacción se genera cuando la histidina dona el protón, originario de la serina, al grupo saliente y se produce el complejo “acil-enzima” (AE). El segundo sustrato (S2), en un ataque nucleofílico, regenera un complejo tetraédrico formando un puente de hidrógeno con la histidina para entonces obtener el último producto (P2) de la catálisis cuando la serina recupera el protón, regresando así la enzima a su estado original. (Torres, 2009).

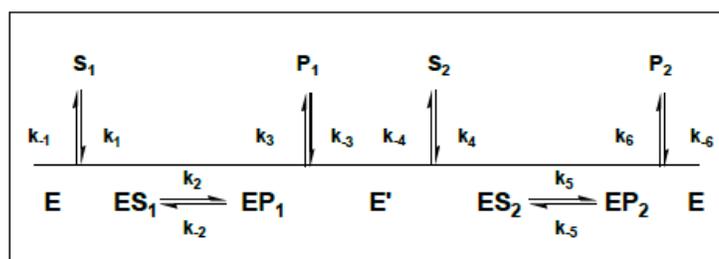


Figura 16. Modelo de Bi Bi Ping Pong

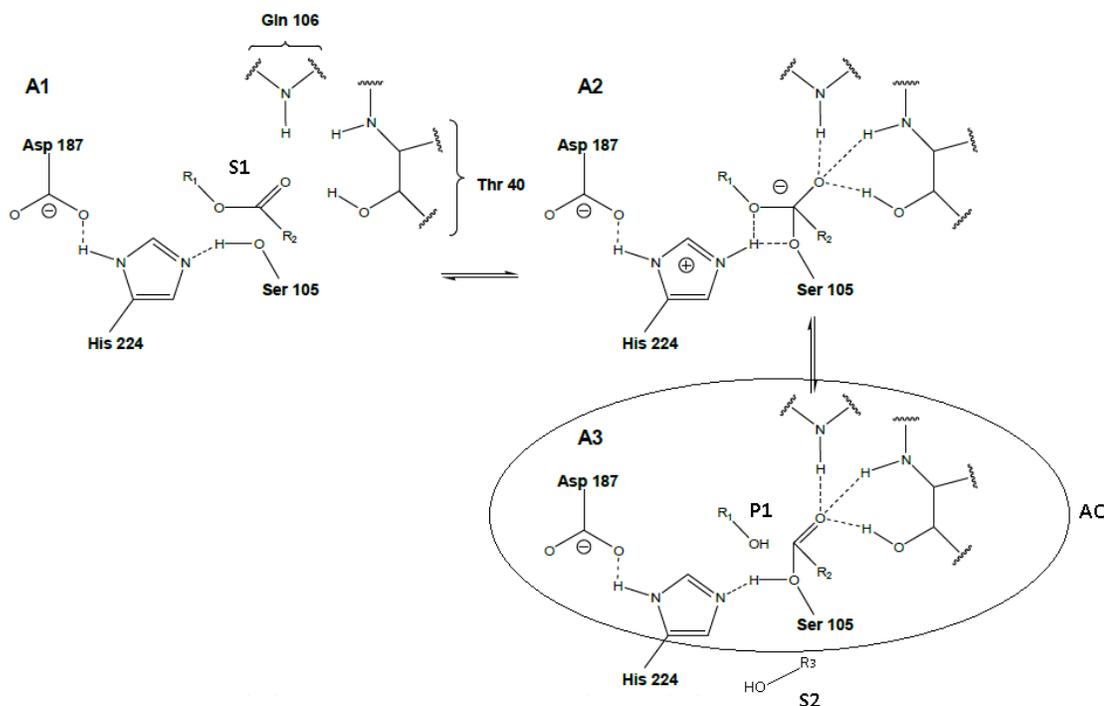


Figura 17. Mecanismo catalítico de la lipasa B de *Candida antarctica* basado en la triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser105), histidina (His224) y ácido aspártico (Asp187). (A1) Ataque nucleofílico a S1 por la serina nucleofílica. El intermediario tetraédrico (A2) es estabilizado mediante puentes de hidrógeno con lo que se conoce como el agujero oxianión, integrado por una tironina (Thr40) y una glutamina (Gln106). El complejo AC se rompe cuando un segundo sustrato (S2) lleva a cabo un ataque nucleofílico al carbonilo de este complejo. A partir de entonces se genera un nuevo intermediario (A2) para terminar con la liberación del segundo producto (P2) y regenerar el sitio activo (A1).

### Lipasa B de *Candida antarctica*

*Candida antarctica* es una levadura basidiomiceto que se aisló en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formaciones de detergentes. Su lipasa es de las más empleadas en biotransformaciones preparativas. Como otros microorganismos, produce dos isoenzimas (A y B) que difieren entre sí, dichas diferencias se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Diferencias entre isoenzimas A y B de la lipasa de *Candida antarctica*

Isoenzima A	Isoenzima B
Dependiente de cationes $\text{Ca}^{2+}$ .	No depende de cationes metálicos
Mayor termoestabilidad.	Menor termoestabilidad.
Muestra preferencia por el grupo éster en posición <i>sn</i> -2 respecto a los triglicéridos.	Presenta especificidad por el grupo éster en posición <i>sn</i> -1, 3 respecto a los triglicéridos.
Altamente activa de manera no específica.	Altamente activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales.

Ambas isoenzimas han sido producidas de manera pura a través del clonaje y sobreexpresión heteróloga en *Aspergillus orizae*.

La isoenzima B tiene un peso molecular en torno a los 33 KDa. En agua se activa a 50-60 °C, y también muestra una resistencia elevada a la desnaturalización por adición de disolventes orgánicos. (Pérez-Victoria, 2006).

Como se mencionó anteriormente, las lipasas están conformadas por una triada catalítica, la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) tiene esta conformación. (Figura 18) (Torres, 2009).

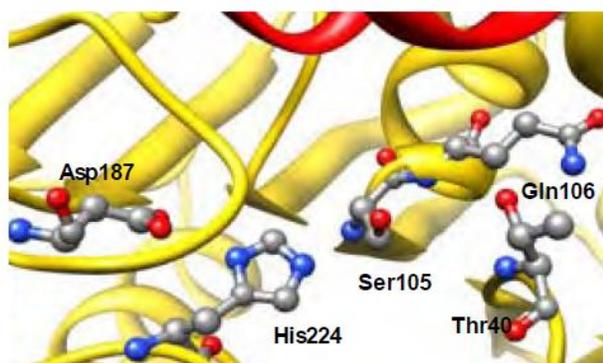


Figura 18. Sitio activo de CaL-B en donde se representa la triada catalítica (Ser105, Asp187 e His224) y el agujero oxianión (Thr40 y Gln106). La estructura secundaria en rojo es la hélice móvil ( $\alpha 5$ ).

## Lipofilización enzimática de ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos se han ampliado estructuralmente con diversos alcoholes para dar lipofilicidad a las moléculas, se han realizado por diferentes metodologías, entre las que se puede mencionar la lipofilización enzimática.

En la tabla 4 se muestran algunos ejemplos de reacciones de esterificación y transesterificación de ácidos hidroxicinámicos y sus respectivos ésteres.

Tabla 4. Reacciones de lipofilización enzimática.

Referencia	González K. E. (2009)			Ramírez, G. (2010)		
<b>Reactivos</b>	Etil ferulato con <i>n</i> -propanol	Etil ferulato con butanol	Etil ferulato con decanol	Etil ferulato con butanol	Etil ferulato con decanol	
<b>Enzima Utilizada</b>	LCA	LCA	LCA	LCA	LCA	
<b>% de conversión y condiciones</b>	93% / 60° C / 200 rpm	88.75% / 60° C / 200 rpm	95.10% / 60° C / 200 rpm	32.32% / 60° C / 200 rpm	44.62% / 60° C / 200 rpm	
<b>Tiempo de reacción</b>	4 días	4 días	4 días	4 días	4 días	
<b>Relación Enzima: Sustrato (p/p)</b>	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15	
<b>Ventajas</b>	Tiempo de reacción es relativamente bajo, condiciones de temperatura y rpm son adecuadas, pues e pueden alcanzar fácilmente en laboratorio			Tiempo de reacción es relativamente bajo, condiciones de temperatura y rpm son adecuadas, pues e pueden alcanzar fácilmente en laboratorio		
<b>Desventajas</b>	La cantidad de enzima es excesiva, por lo que no es efectiva en cuanto a costos, y los rendimientos son aproximados, ya que se realizaron por cromatografía de gases			La cantidad de enzima es excesiva y los rendimientos son bajos, (menores al 50%)		

Referencia	Weitkamp, P. et. al. (2006)				Compton, D. et. al. (2000)
Reactivos	Metil ferulato con 1-dodecanol	Metil <i>p</i> -cumarato con cis-9-octadecen-1-ol	Etil cafeato con cis-9-octadecen-1-ol	Metil sinapato con cis-9-octadecen-1-ol	Ácido ferúlico con etanol en <i>t</i> -butanol
Enzima Utilizada	LCA	LCA	LCA	LCA	LCA
% de conversión y condiciones	98% / 80 kPa / 80°C / agitación magnética	95% / 80 kPa / 80°C / agitación magnética	59% / 80 kPa / 80°C / agitación magnética	69% / 80 kPa / 80°C / agitación magnética	1, 5 y 20 % a 25, 40 y 60° C respectivamente / agitación
Tiempo de reacción	1 día	3 días	3 días	3 días	13 días
Relación Enzima: Sustrato (p/p)	1:1.6	1:1	1:1.7	1:1.4	1:1
Ventajas	El tiempo de reacción es bajo, la proporción de enzima baja comparada con los estudios antes mencionados, rendimientos altos con alcohol sustituyente de cadena larga		El tiempo de reacción y la proporción de enzima es baja, el rendimiento es más bajo comparado con los 2 anteriores		La proporción de enzima es baja, se puede alcanzar la temperatura y rpm fácilmente. No se requiere de una esterificación previa del ácido
Desventajas	La temperatura de reacción es alta, se requiere de equipo especial porque se necesita la aplicación de vacío parcial, con trampa de agua (pellets de KOH) y se lleva a cabo en oscuridad.		La temperatura de reacción es alta, se requiere de equipo especial, (aplicación de vacío parcial), con trampa de agua (pellets de KOH) y se lleva a cabo en oscuridad		El tiempo de reacción es muy alto y se obtienen rendimientos bajos, además al añadir los alcoholes se utilizó nitrógeno en contra flujo

Tabla 4 (Continuación). Reacciones de lipofilización enzimática.

Tabla 4 (Continuación). Reacciones de lipofización enzimática.

Referencia	Compton, D. et. al. (2000)	Vafiadi, C. et. al (2007)			Priya, K., Chadha A. (2003)
Reactivos	Etil ferulato con 1-octanol	Metil sinapato con 1-butanol	Metil ferulato con 1-butanol	Metil <i>p</i> -cumarato con 1-butanol	Etil hidroxici-namato con <i>n</i> -butanol
Enzima Utilizada	LCA	AnFaeA	AnFaeA	AnFaeA	LCP
% de conversión y condiciones	45 % / 60° C / agitación	78 % / 35° C	42 % / 35° C	2 % / 35° C	92% / 60° C / 250 rpm
Tiempo de reacción	13 días	5 días	5 días	5 días	2 días
Relación Enzima: Sustrato (p/p)	1:1	--	--	--	1:1
Ventajas	La proporción de enzima es baja, se pueden alcanzar las condiciones de temperatura y rpm fácilmente	Tiempo de reacción relativamente bajo, temperatura de reacción baja y no se necesita de agitación			Temperatura y agitación alcanzables en laboratorio, tiempo de reacción bajo, cantidad de enzima baja comparada con la utilizada por Gonzalez, en 2009 y por Ramirez, en 2010
Desventajas	El tiempo de reacción es alto y se obtienen rendimientos bajos, además al añadir los alcoholes utilizaron N <sub>2</sub> en contra flujo	Es otro tipo de enzima, la cual requiere de un tratamiento previo de inmovilización, lo cual no permite una fácil determinación de la relación sustrato: enzima.			Enzima utilizada no es lipasa de <i>Candida antarctica</i> , el sustrato es etil hidroxicinamato, el cual no tiene sustituyentes en el anillo aromático que provoquen un impedimento estérico.

LCA -> Lipasa de *Candida antarctica*. AnFaeA -> Ferulolil esterasa tipo A de *Aspergillus niger*. LPC -> Lipasa de *Pseudomonas cepacia*

Aunque, la síntesis enzimática también tiene muchas desventajas, incluyendo los bajos rendimientos, el consumo de tiempo, requerimientos de disolventes, etc. (Li, et. al., 2009), también tiene ventajas, entre las que se pueden mencionar la especificidad de la enzima por el sustrato, la “amigabilidad” con el ambiente, menor generación de residuos, la fácil de recuperación de los productos y de los biocatalizadores, las enzimas son de origen natural y por tanto no deben ser tóxicas, actúan a bajas concentraciones, entre otras. (Badui, 1990).

### **Arcillas**

Las arcillas son, desde el punto de vista mineralógico, un grupo de minerales (minerales de arcilla), filosilicatos en su mayor parte, cuyas propiedades fisico-químicas dependen de su estructura y de su tamaño de grano, muy fino. (García, 2012)

Se consideran arcillas todas las fracciones con un tamaño de grano inferior a 2 mm. De acuerdo con la definición anterior, todos los filosilicatos (subclase de los silicatos que incluye minerales comunes en ambientes muy diversos y que presentan, como rasgo común, un hábito hojoso [*phylon* = hoja] o escamoso derivado de la existencia de una exfoliación basal perfecta) pueden considerarse verdaderas arcillas si se encuentran dentro de dicho rango de tamaños, incluso minerales no pertenecientes al grupo de los filosilicatos (cuarzo, feldespatos, etc.) pueden ser considerados partículas arcillosas cuando están incluidos en un sedimento arcilloso y sus tamaños no superan las 2 mm. (Domínguez, Schifter, 2012)

Las arcillas son constituyentes esenciales de gran parte de los suelos y sedimentos debido a que son, en su mayor parte, productos finales de la meteorización de los silicatos que, formados a mayores presiones y temperaturas, en el medio exógeno se hidrolizan. (García, 2012)

### **Usos de las arcillas**

Se han utilizado las arcillas principalmente como catalizadores en investigación a nivel de laboratorio, a continuación se mencionan algunas de las reacciones en las que se han utilizado: Reacciones de adición, reacciones de condensación, reacciones de Diels-Alder y relacionadas, reacciones de Friedel-Crafts, reacciones de isomerización, reacciones de oxidación, reacciones de esterificación. (Bergaya, F., 2010).

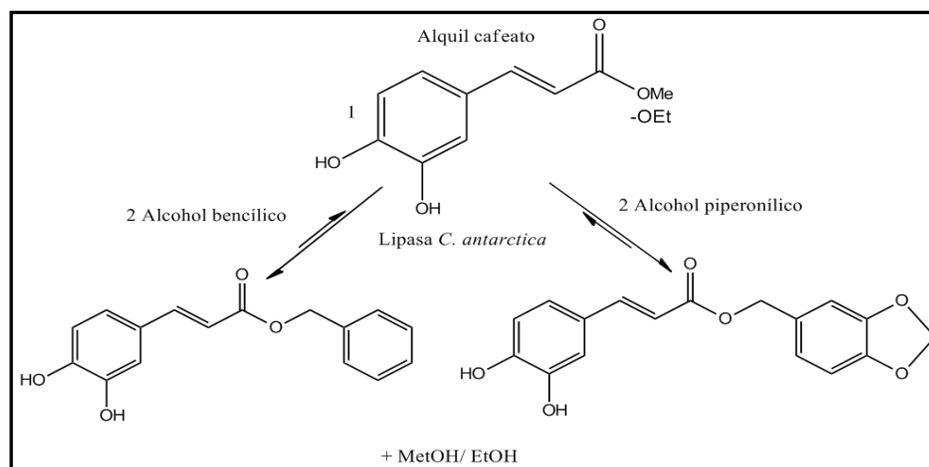
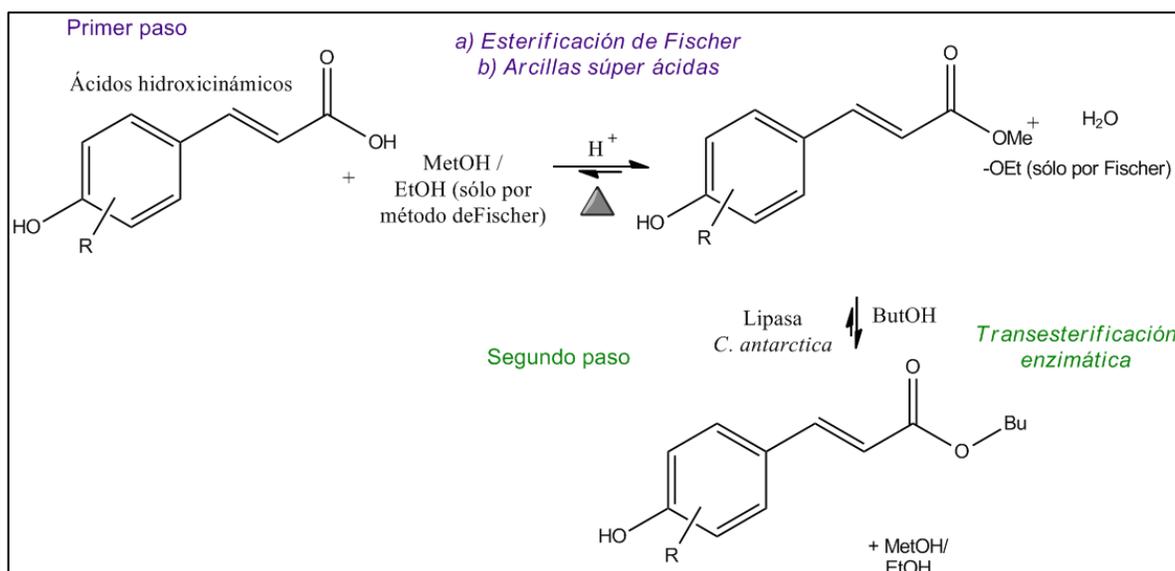
La más utilizada en las reacciones de esterificación es la reacción de alcoholes con ácidos carboxílicos (esterificación de Fischer), la cual utiliza ácido sulfúrico como catalizador, que trae desventajas en su uso tales como corrosión, dificultad en la manipulación, riesgos ambientales; dichas desventajas abren una oportunidad a las arcillas para remplazar al ácido.

La montmorillonita tiene diversas aplicaciones, entre las que se puede mencionar: como uso de decolorantes de aceites (previamente tratados con ácidos minerales); como plastificante; en la granulación de magnetita; como adsorbentes de pesticidas o metales pesados en aguas residuales; como catalizadores en diversas reacciones orgánicas; como ligante en la fabricación de alimentos pelletizados de animales; en ingeniería civil para cementar fisuras y grietas de rocas absorbiendo la humedad para impedir derrumbamiento de túneles o excavaciones; en la industria farmacéutica, porque no son tóxicas, ni irritantes y no pueden ser absorbidas por el cuerpo humano se utilizan para la elaboración de preparaciones tanto de uso tópico como oral; en agricultura, para mejorar las propiedades de suelos arenosos o ácidos; en la obtención de membranas de ósmosis inversa, para la desalinización de aguas; entre otras.

## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

## Objetivo general

Llevar a cabo la lipofilización de ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sinápico) mediante una estrategia de dos pasos, esterificación química seguida de una transesterificación enzimática. Primer paso, reacciones de esterificación de Fischer y usando arcillas súper ácidas para obtener los metil y etil *p*-hidroxicinamatos; segundo paso, los *p*-hidroxicinamatos se sometieron a reacciones de transesterificación enzimática con butanol y lipasa B de *Candida antarctica*. Adicionalmente aplicar la metodología desarrollada para preparar los bencíl y piperonil cafeatos.



Esquema 1. Ruta sintética del objetivo general

### Objetivos particulares

- ☛ Llevar a cabo la esterificación de Fischer (convencional) de ácidos hidroxicinámicos con metanol y etanol, identificar y caracterizar los productos.
- ☛ Utilizar arcillas súper ácidas activadas con ácido trifluorometansulfónico para esterificar ácidos hidroxicinámicos con metanol.
- ☛ A partir de los productos obtenidos por esterificación de Fischer realizar las reacciones de transesterificación enzimática (con lipasa de *Candida antarctica* comercial) con butanol, para obtener los butil hidroxicinamatos.
- ☛ Realizar las reacciones de transesterificación enzimática (con lipasa comercial de *Candida antarctica*) de alquil ésteres de ácido cafeico con alcohol bencílico y alcohol piperonílico.
- ☛ Identificar con Cromatografía de Capa Fina (CCF), cuantificar y caracterización de productos por resonancia magnética nuclear (RMN)
- ☛ Caracterización de productos de reacción de Fischer por Rf y punto de fusión.

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## Materiales

## Reactivos

Ácido ferúlico (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ) grado HPLC (Sigma- Aldrich)	Ácido <i>p</i> -cumárico (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ) grado HPLC (Sigma- Aldrich) CAS Number 501-98-4
Ácido cafeico (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ) grado HPLC (Sigma- Aldrich) CAS Number 331-39-5	Ácido sinápico (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> ) grado HPLC (Sigma- Aldrich) CAS Number 530-59-6
Ácido clorhídrico concentrado (HCl)	Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )
Metanol (MetOH)	Etanol (EtOH)
Butanol (ButOH)	Alcohol piperonílico (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )
Alcohol bencílico (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> OH)	

**Solventes:** Agua destilada, Tolueno, Diclorometano, Acetato de etilo, hexano, cloroformo

**Adsorbentes:** Malla molecular

**Arcilla:** Montmorillonita (Arcilla súper ácida activada con ácido trifluorometansulfónico).

**Enzima:** Lipasa de *Candida antarctica* isoforma B (Sigma-Aldrich)

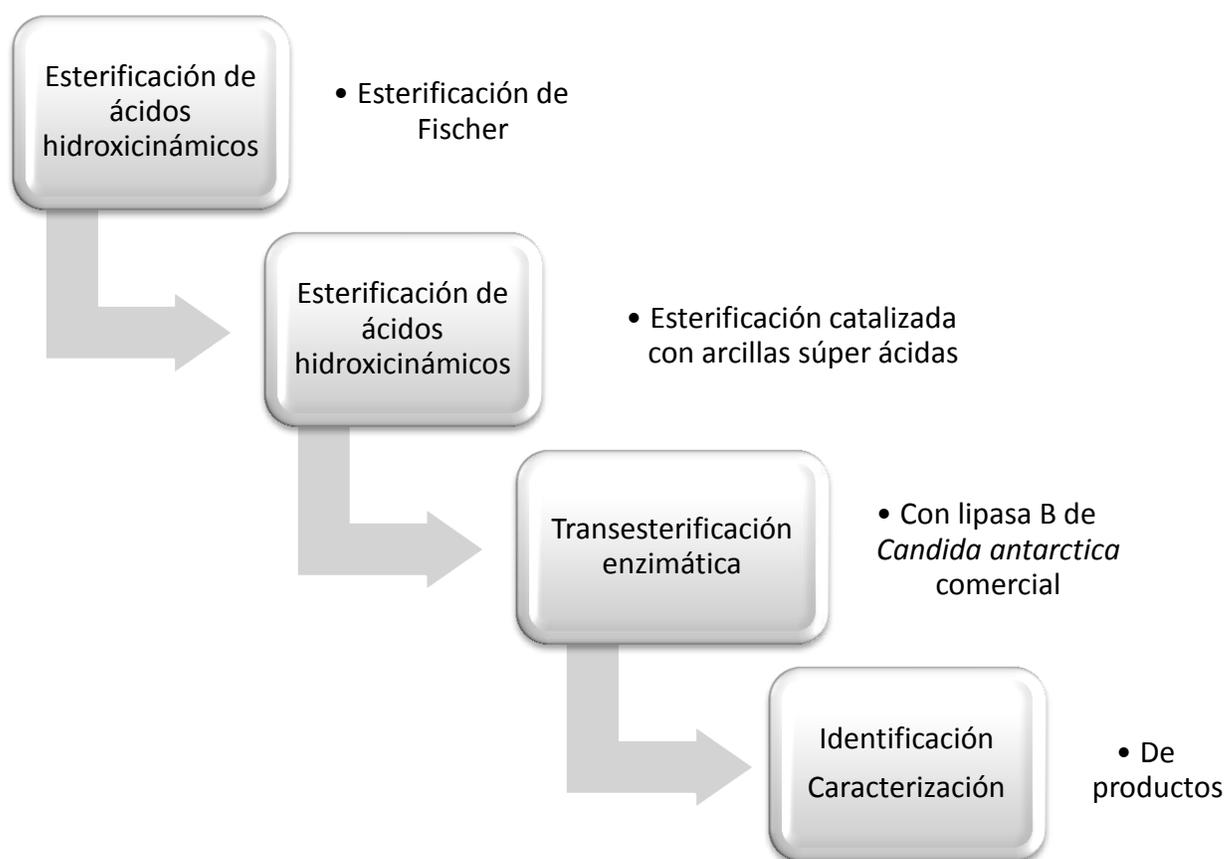
**Materiales para cromatografía de capa fina:** Placas de aluminio con gel de sílice. Reveladores: Sulfato cérico y solución metanólica de DPPH.

## Aparatos

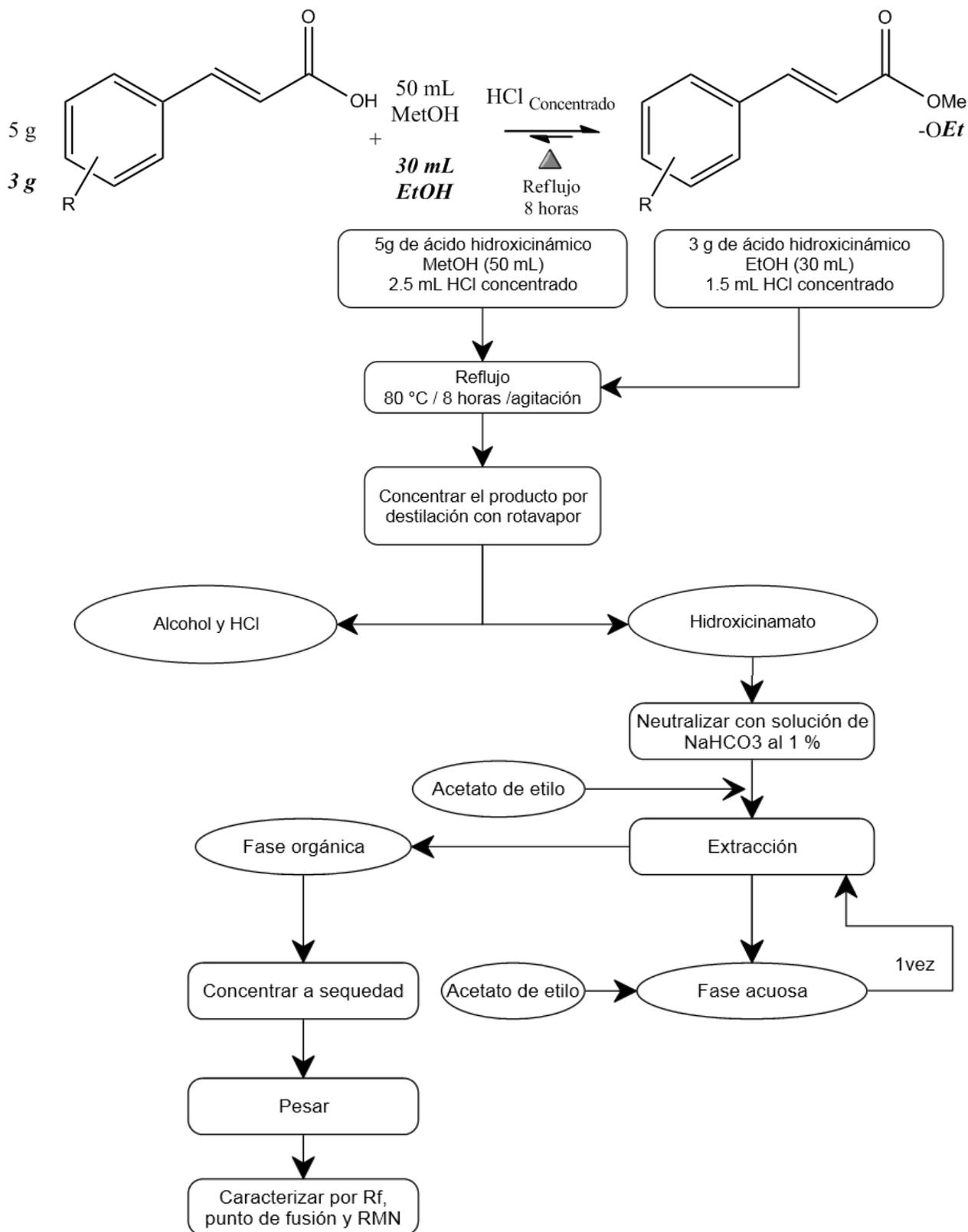
Rotavapor Poly Science, Incubadora de agitación orbital. Thermo Scientific, Modelo: SHKE4000 Benchtop Orbital Shaker, parrilla eléctrica, equipo de reflujo

## Desarrollo experimental

### Diagrama de procedimiento general



Esterificación de Fischer de ácidos hidroxicinámicos



## **Esterificación de Fischer**

### **Metil ésteres**

Se pesaron 5 g de ácido hidroxicinámico (ferúlico, cafeico, cumárico y sinápico) en matraz bola de fondo plano de 100 mL al que se adicionaron 50 mL de metanol y 2.5 mL de HCl concentrado, se instaló el equipo para reflujo, la reacción se llevó a 80 °C y con agitación magnética durante 8 horas, posteriormente se quitó el matraz cuando éste se encontró a temperatura ambiente, se evaporó el HCl y el metanol por destilación en rotavapor.

Una vez evaporado el disolvente se agregó una solución de bicarbonato de sodio al 1% para lavar el producto que se obtuvo, hasta que se ya no hubo producción de CO<sub>2</sub>, a esta solución se le adicionó acetato de etilo para extraer el producto, se separó la fase orgánica de la acuosa y se lavó con agua destilada, la extracción se repitió 2 veces más.

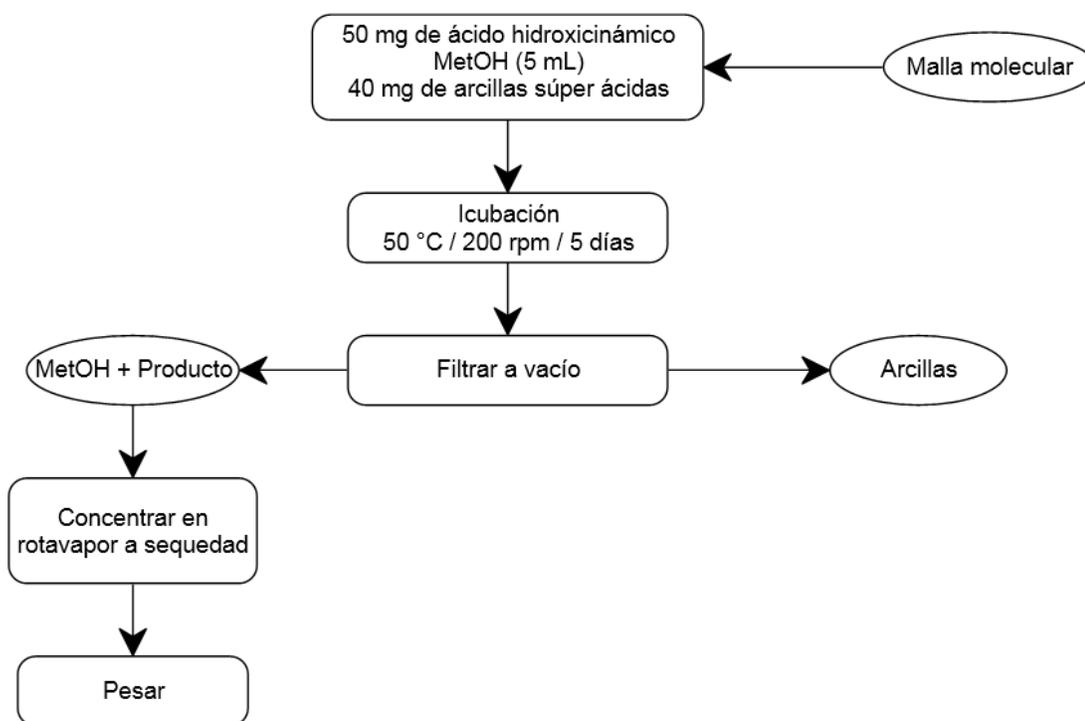
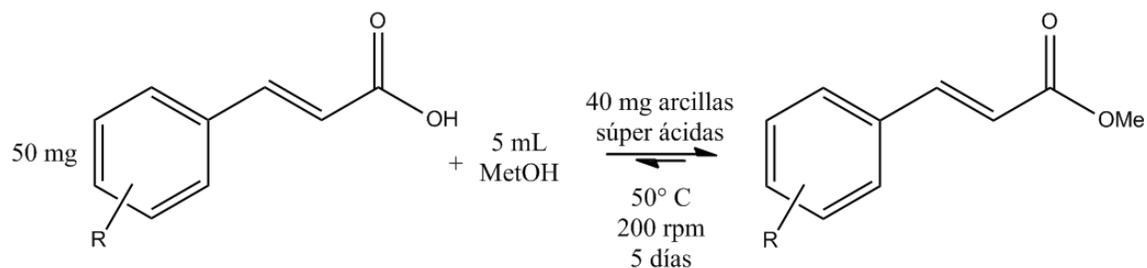
A la fase orgánica total se deshidrato con sulfato de sodio anhidro, posteriormente se filtró a vacío y finalmente se concentró a sequedad en un rotavapor, se pesó el producto para calcular el rendimiento de la reacción.

Se realizó placa cromatográfica con placas de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (1:1), se obtuvo el R<sub>f</sub>, se midió el punto de fusión y se caracterizó por RMN.

### **Etil ésteres**

Para la esterificación de Fischer con etanol se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de metil ésteres, sólo se modificó las cantidades de reactivos y catalizador por: 3 g de ácido hidroxicinámico, 30 mL de etanol anhidro y 1.5 mL de HCl concentrado.

**Esterificación de ácidos hidroxicinámicos catalizada por arcillas súper ácidas**



### **Esterificación de ácidos hidroxicinámicos catalizada por arcillas súper ácidas**

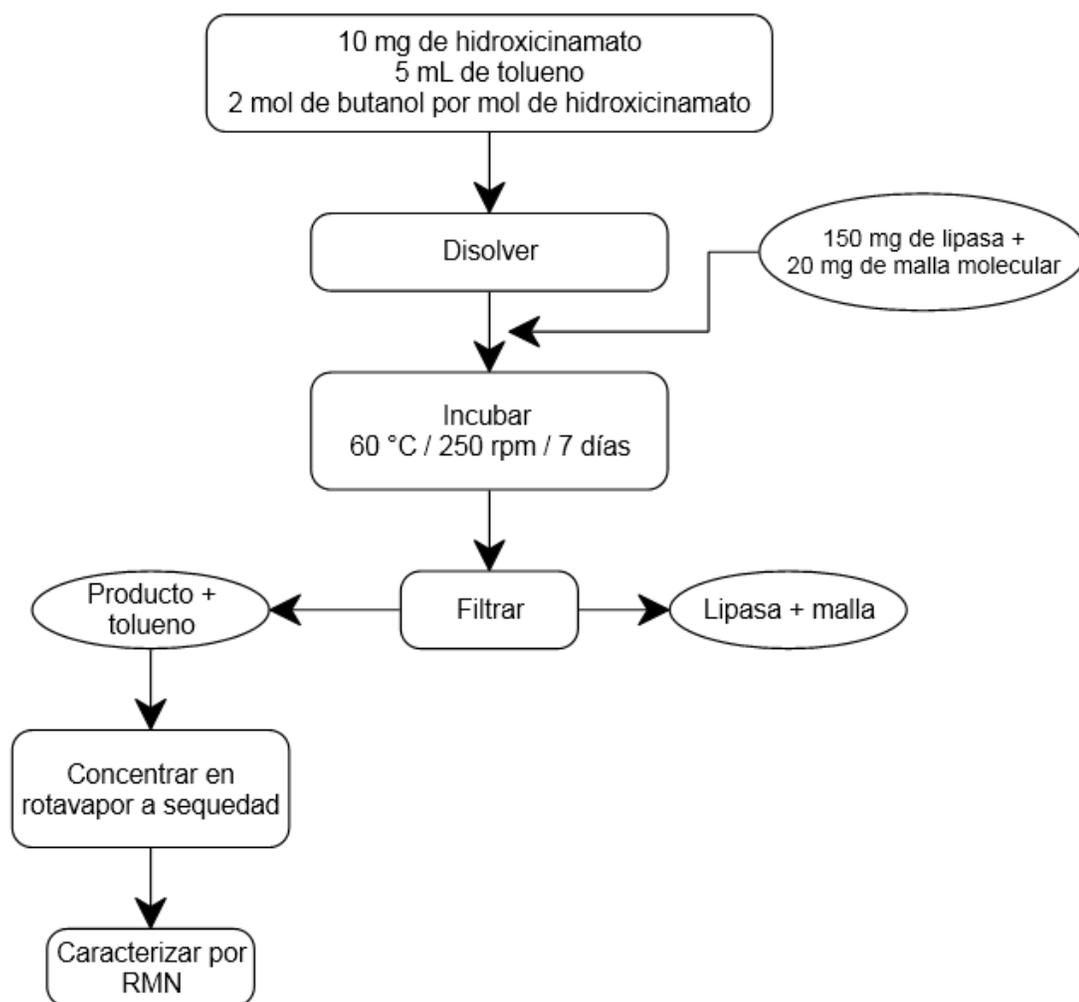
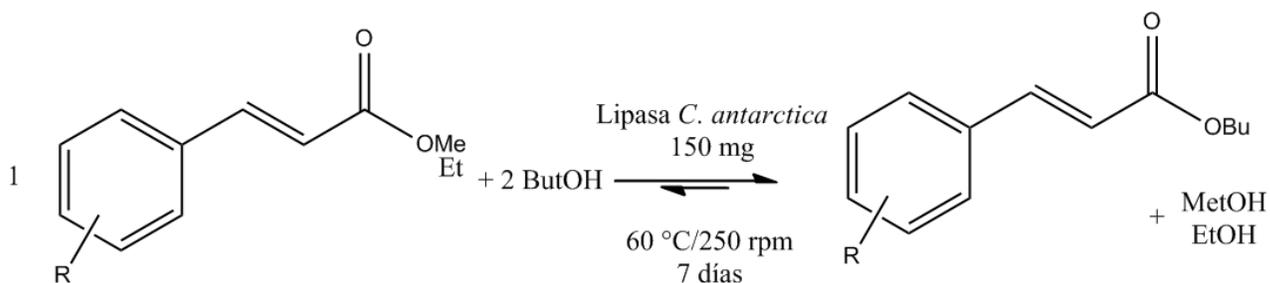
Se pesó en viales, 50 mg de ácido hidroxicinámico (ferúlico, cafeico, cumárico y sinápico), con 5 mL de metanol, 40 mg de arcillas y 20 mg de malla molecular

La mezcla de reacción se puso en agitación orbital (200 rpm) a 50 °C, se realizó placa cromatográfica diaria para observar el avance de reacción, donde se utilizó placas de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol (9:1).

Después de 5 días de reacción se retiró de la agitación y se disminuyó la temperatura, posteriormente se filtró a vacío la mezcla de reacción para retirar las arcillas y la malla molecular, finalmente se concentró el producto evaporando el metanol que no reaccionó por destilación en rotavapor con vacío y se pesó el producto obtenido para calcular el rendimiento.

Lipofilización enzimática con lipasa B de *Candida antarctica* comercial

☛ Transesterificación de hidroxicinamatos con butanol



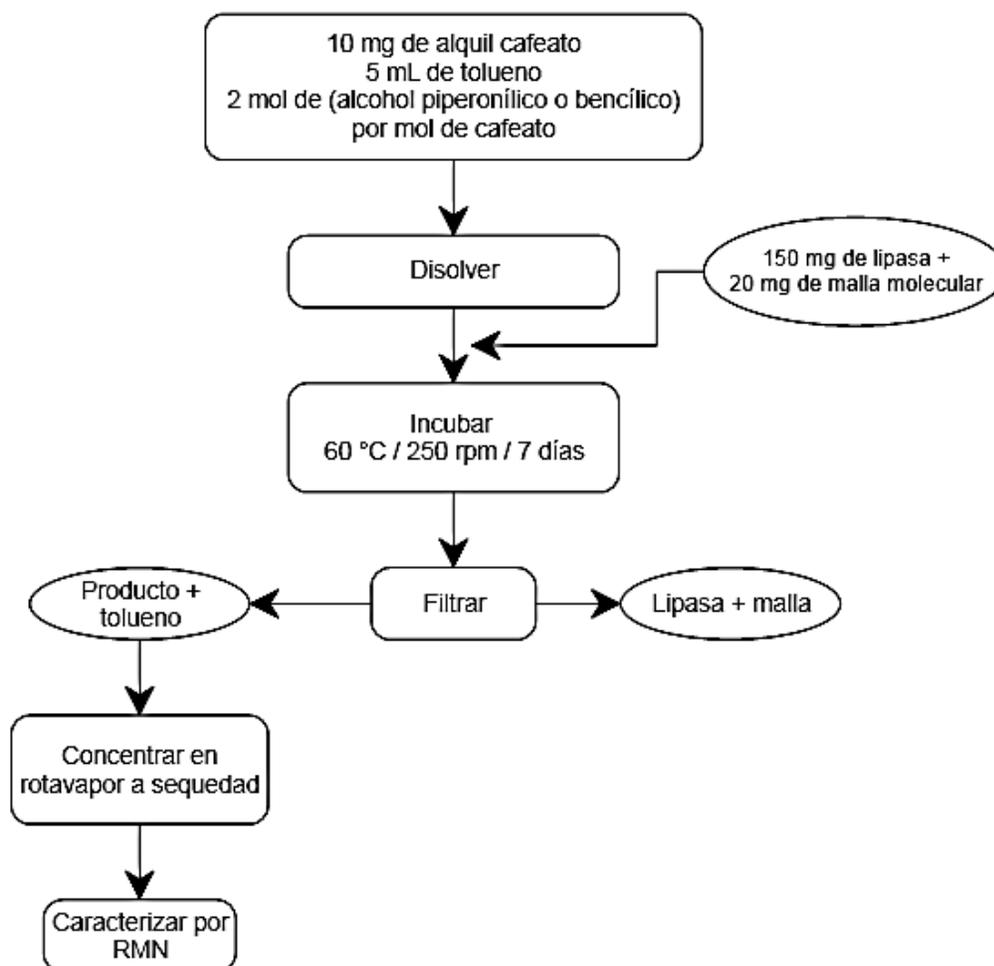
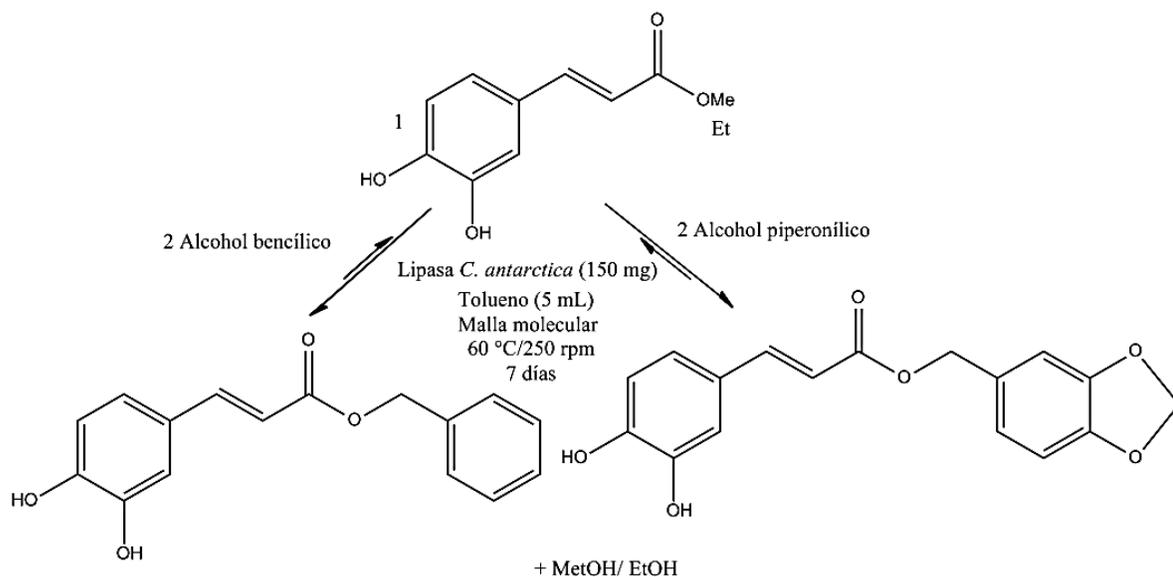
### **☛ Transesterificación de hidroxycinamatos con butanol**

Se pesó en viales 10 mg de metil/etil hidroxycinamato a los cuales se añadieron 5 mL de tolueno, y 2mol de butanol por cada mol de hidroxycinamato y se mezcló hasta disolver los hidroxycinamatos, a la mezcla de reacción se añadieron 20 mg/ mL de tolueno de malla molecular y 150 mg de lipasa B comercial de *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich), posteriormente se incubó a 60 °C y 250 rpm durante 7 días.

Posteriormente se realizó CCF a la mezcla de reacción donde la fase estacionaria son placas de aluminio con gel de sílice y se filtró a vacío la mezcla de reacción para retirar la lipasa y la malla molecular.

Finalmente se concentraron los productos a sequedad evaporando el tolueno por destilación en rotavapor y se caracterizaron por RMN.

☛ Transesterificación de cafeatos con alcohol bencílico y piperonílico



☛ **Transesterificación de cafeatos con alcohol bencílico y piperonílico.**

Se pesó en viales 10 mg de metil/etil cafeato a los cuales se adicionó 5 mL de tolueno, y 2 mol de alcohol (bencílico, piperonílico) por cada mol de metil/etil cafeato, se mezcló hasta que se disolvieron los cafeatos, posteriormente a la mezcla de reacción se adicionaron 20 mg/mL de tolueno de malla molecular y 150 mg de lipasa comercial de *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich), a continuación se incubaron a 60 °C y 250 rpm durante 7 días.

Posteriormente se realizó CCF a la mezcla de reacción donde la fase estacionaria son placas de aluminio con gel de sílice y diferentes mezclas de fase móvil que se muestran en los resultados, pues depende de la separación de los productos, se filtró a vacío la mezcla de reacción para retirar la lipasa y la malla molecular.

Finalmente se concentraron los productos a sequedad evaporando el tolueno por destilación en rotavapor con vacío y se caracterizaron por RMN.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Para llevar a cabo la ampliación estructural de los ácidos hidroxicinámicos con butanol, se llevó a cabo una esterificación previa de los ácidos hidroxicinámicos, para esta se eligieron dos métodos: 1) Esterificación de Fischer y 2) Esterificación catalizada por arcillas súper ácidas.

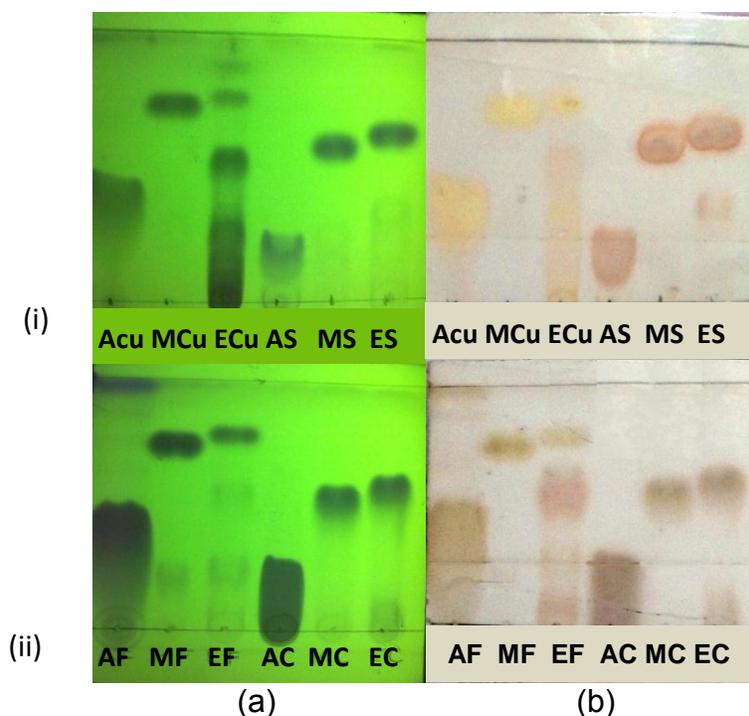
A continuación se presentan los resultados obtenidos para la esterificación de Fischer.

### Esterificación de Fischer de ácidos hidroxicinámicos

Se llevó a cabo la esterificación por método de Fischer de ácidos hidroxicinámicos con metanol y etanol, después de 8 horas de reacción, se realizaron CCF de los productos, los cuales se muestran en la figura 19.

En la figura 19(i) se muestran las placas correspondientes a los metil/etil *p*-cumaratos y sinapatos, se observa, cualitativamente, que para el caso de metil *p*-cumarato (MCu), el ácido reaccionó en su totalidad con el metanol para formar el producto, en el caso de la reacción de esterificación de Fischer de ácido *p*-cumárico con etanol, se observa que después de las 8 horas de reacción queda parte del ácido y parte de etil *p*-cumarato (ECu) se degradó, lo cual se ve reflejado en los rendimientos obtenidos, ya que el etil *p*-cumarato se obtuvo un rendimiento menor, los cuales corresponden a 82.33% para el metil *p*-cumarato (MCu) y 67.39 % para el etil *p*-cumarato.

Dentro de la misma figura se observan los productos de las reacciones de ácido sinápico con metanol y etanol, para formar metil sinapato (MS) y etil sinapato (ES) respectivamente; cualitativamente, para ambos casos, se observa que el ácido reaccionó en su totalidad para formar el respectivo éster, lo cual se ve reflejado en los rendimientos obtenidos, que corresponden a 99.63 % para MS y de 82.06 % para ES.



**Figura 19.** (a) Placas cromatográficas reveladas con luz UV, (b) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor. **AF** (ácido ferúlico) **MF** (metil ferulato) **EF** (etil ferulato) **AC** (ácido cafeico) **MC** (metil cafeato) **EC** (etil cafeato) **ACu** (ácido *p*-cumárico) **MCu** (metil cumarato) **ECu** (etil cumarato) **AS** (ácido sinápico) **MS** (metil sinapato) **ES** (etil sinapato). Eluyente utilizado -> Hexano: acetato de etilo (1:1).

En la figura 19(ii) se muestran los resultados para la reacción de esterificación de ácido ferúlico para obtener metil ferulato (MF) y etil ferulato (EF) en la placa revelada con luz UV se observan impurezas para ambos casos, sin embargo los rendimientos son aceptables, siendo de 90.25% para MF y de 74.72% para EF, González en 2009 obtuvo un rendimiento de 74.24% en la producción de ferulato de etilo por método de Fischer de manera convencional el cual es muy semejante al de este trabajo, además, para el caso de MF el rendimiento obtenido en este trabajo es superior al obtenido por Li y colaboradores en 2009 los cuales obtuvieron un rendimiento de 79% para MF y 81% para EF, a pesar de ser la misma técnica utilizada en ambos trabajos, Li, N. y colaboradores cuando utilizaron un alcohol de mayor peso molecular, el rendimiento de la reacción aumento.

En la figura 19(ii) también se muestran los resultados obtenidos para las reacciones de ácido cafeico con metanol y etanol, para obtener el metil cafeato (MC) y el etil cafeato (EC) respectivamente, se observa que sólo para el caso del EC quedaron trazas del ácido, las cuales fueron eliminadas con la solución de bicarbonato de sodio al 1%, lo cual se ve reflejado en el rendimiento obtenido, que corresponde a 86.07% para MC y 83.7% para EC; Li y colaboradores en 2012 realizaron la reacción de esterificación de Fischer asistida con microondas de ácido cafeico con metanol y etanol, donde obtuvieron un rendimiento de 75% y 74% respectivamente, lo que indica que la metodología utilizada fue la mejor para la obtención de metil y etil cafeatos.

Tabla 5. Rendimientos de reacción de Fischer para la obtención de metil ésteres.

<b>Muestra</b>	<b>Muestra (g)</b>	<b>Metil éster esperado (g)</b>	<b>Metil Éster obtenido (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>Ácido ferúlico</b>	5	5.36	4.8372	90.25
<b>Ácido cafeico</b>	5	5.39	4.6393	86.07
<b>Ácido <i>p</i>-cumárico</b>	5	5.43	4.4704	82.33
<b>Ácido sinápico</b>	5	5.31	5.2902	99.63

Tabla 6. Rendimientos de la reacción de Fischer para la obtención de etil ésteres.

<b>Muestra</b>	<b>Muestra (g)</b>	<b>Etil éster esperado (g)</b>	<b>Etil éster obtenido (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>Ácido ferúlico</b>	3	3.4367	2.5679	74.72
<b>Ácido cafeico</b>	3	3.4667	2.9017	83.70
<b>Ácido <i>p</i>-cumárico</b>	3	3.5122	2.3670	67.39
<b>Ácido sinápico</b>	3	3.375	2.7694	82.06

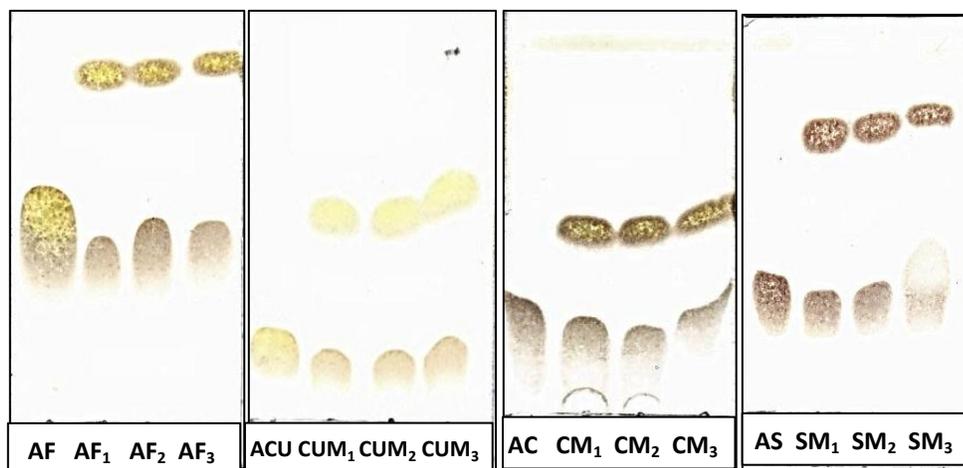
En las tablas 5 y 6 se puede observar que un aumento en la cadena carbonada disminuye notablemente los rendimientos, pues en todas las reacciones que se llevaron a cabo con metanol, los rendimientos fueron mayores a los obtenidos por las reacciones con etanol. Los productos se caracterizaron por su punto de fusión (tabla 11), R<sub>f</sub> (Tabla 12) y por RMN (Anexos)

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la esterificación de ácidos hidroxicinámicos por el método de arcillas súper ácidas, el cual se eligió con base en que recientemente se utilizan las arcillas como catalizador en reacciones de esterificación.

**Esterificación de ácidos hidroxicinámicos catalizada por arcillas súper ácidas**

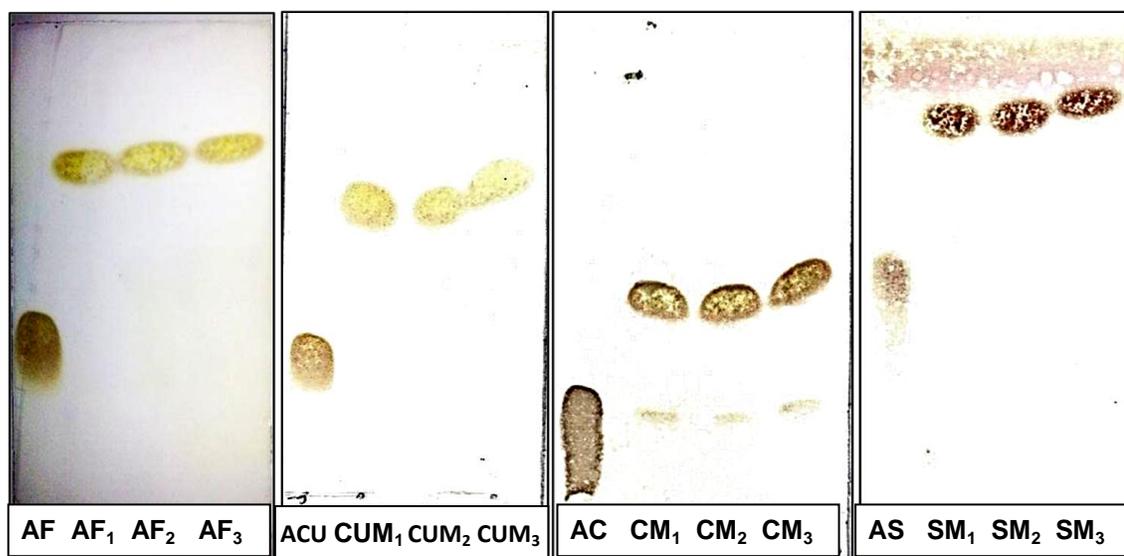
Se llevó a cabo la esterificación de ácidos hidroxicinámicos con metanol catalizada por arcillas súper ácidas, acidificadas con ácido trifluoro metansulfónico. Se colocó en viales 50 mg de cada ácido con 5 mL de metanol, 40 mg de arcillas súper ácidas y malla molecular para retener el agua que se forme como producto de la reacción. Se incubaron las reacciones a 50° C a 200 rpm.

A continuación se realizaron placas cromatográficas del avance de reacción de esterificación de ácidos hidroxicinámicos, la figura 20 muestra dicho avance después de 2 días de reacción, se puede observar en las placas que aún hay presencia del ácido hidroxicinámico, por lo que se dejó más tiempo la reacción.



**Figura 20.** Cromatografía de capa delgada después de dos días de reacción, reveladas con sulfato cérico. **AF** (ácido ferúlico), **MF** (metil ferulato), **ACU** (Ácido cumárico), **CUM** (metil cumarato), **AC** (ácido cafeico), **CM** (metil cumarato), **AS** (ácido sinápico), **SM** (éster metil sinápico) reveladas con sulfato cérico. Eluyente utilizado -> cloroformo : metanol (9:1)

En la figura 21 se muestran las placas cromatográficas después de 5 días de reacción, donde se observa que ya no hay presencia de ácido hidroxicinámico en tres casos (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico), excepto en el caso de ácido cafeico, que aún quedan trazas del mismo.



**Figura 21.** Cromatoplaqa al final de la reacción, 5 días después. **AF** (ácido ferúlico), **MF** (metil ferulato), **ACU** (Ácido cumárico), **CUM** (metil cumarato), **AC** (ácido cafeico), **CM** (metil cumarato), **AS** (ácido sinápico), **SM** (éster metil sinápico). Placas reveladas con sulfato cérico. Eluyente utilizado -> cloroformo: metanol (9:1)

En la tabla 7 se muestran los rendimientos obtenidos para cada una de las reacciones catalizadas con arcillas súper ácidas, en el caso de metil sinapato y metil *p*-cumarato, los rendimientos fueron los más altos, de 97.30 % y 97.27 % respectivamente, seguidos del metil ferulato (96.69%) y finalmente de metil cafeato (91.55%) el cual es congruente con los que se mencionó anteriormente, ya que en las placas cromatográficas mostradas en la figura 21, se observó que el ácido cafeico no reaccionó en su totalidad.

Tabla 7. Determinación de rendimiento de obtención de metil ésteres con arcillas súper ácidas

Determinación de rendimiento de obtención de metil ésteres con arcillas súper ácidas		Masa del ácido (g)	Masa del producto obtenido (g)	Masa metil éster esperada (g)	Rendimiento (%)
Ferúlico	Prueba 1	0.0527	0.0558	0.0565	98.76
	Prueba 2	0.0523	0.0533	0.0561	95.05
	Prueba 3	0.05	0.0516	0.0536	96.25
	<b>Promedio</b>		<b>0.0536 ± 0.0021</b>		<b>96.69</b>
Sinápico	Prueba 1	0.0515	0.0531	0.0547	97.04
	Prueba 2	0.0521	0.0529	0.0554	95.56
	Prueba 3	0.0509	0.0537	0.0541	99.30
	<b>Promedio</b>		<b>0.0532 ± 0.0004</b>		<b>97.30</b>
<i>p</i> -cumárico	Prueba 1	0.0502	0.0521	0.0545	95.62
	Prueba 2	0.0524	0.0558	0.0569	98.11
	Prueba 3	0.0513	0.0546	0.0557	98.06
	<b>Promedio</b>		<b>0.0542 ± 0.0019</b>		<b>97.27</b>
Cafeico	Prueba 1	0.0499	0.0486	0.0538	90.37
	Prueba 2	0.0506	0.0501	0.0545	91.87
	Prueba 3	0.051	0.0508	0.0550	92.42
	<b>Promedio</b>		<b>0.04983 ± 0.0011</b>		<b>91.55</b>

A continuación se realizó una comparación entre los métodos químicos para esterificación de ácidos hidroxicinámicos utilizados en este trabajo, los cuales se muestran en la tabla 8, en la cual se puede observar que el mejor método químico utilizado es el de esterificación catalizada por arcillas súper ácidas, ya que el rendimiento para este método es superior al de la esterificación de Fischer convencional, sin embargo se empleó mucho más tiempo con éste método pero las condiciones de temperatura de reacción no son drásticas como en el método convencional de esterificación de Fischer.

Tabla 8. Comparación de los rendimientos de la reacción de Fischer convencional y con arcillas súper ácidas.

Muestra	Esterificación de Fischer		Arcillas ácidas
	Rendimiento <b>Etil éster</b> obtenido (%)	Rendimiento <b>Metil Éster</b> obtenido (%)	Rendimiento <b>Metil éster</b> obtenido (%)
Ácido ferúlico	74.72	90.25	96.69
Ácido cafeico	83.70	86.07	91.55
Ácido <i>p</i> -cumárico	58.38	82.33	97.27
Ácido sinápico	82.06	99.63	97.30

En estudios anteriores Li y colaboradores, en 2009 utilizaron la metodología de Fischer de manera convencional para obtener ésteres de ácido ferúlico en donde los rendimientos para metil ferulato a penas alcanza el 79 %, además utilizaron calentamiento con microondas, donde, para el mismo producto obtuvieron 95 % de rendimiento, aunque el rendimiento obtenido por catálisis con arcillas sigue siendo mayor, el tiempo de microondas es de tan sólo 3 minutos, que es mucho menor que el de 5 días con las arcillas.

En la tabla 9 se muestra una comparación entre resultados de otros autores y los obtenidos en este trabajo. Se puede observar que los rendimientos obtenidos en este estudio son superiores a los reportados por Li y colaboradores en 2009 y Li y colaboradores en 2012, sin embargo, como se había mencionado con anterioridad, el tiempo juega un papel muy importante en estas reacciones y por optimización del método se requiere que el tiempo de reacción sea menor.

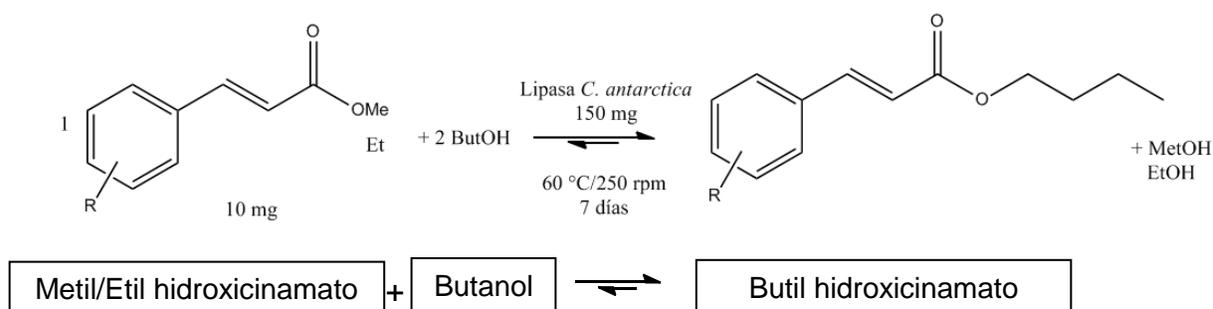
Tabla 9. Comparación de resultados obtenidos por otros autores y los de este trabajo.

Producto	Li en 2009 y Li en 2012		Resultados obtenidos	
	Microondas tiempo y R.	Fisher tiempo y R	Fischer tiempo y R	Arcillas tiempo y R
Metil ferulato	3 min / 95 %	8 h / 79 %	8 h / 90.25%	5 días / 96.69 %
Etil ferulato	3 min / 94 %	8 h / 81 %	8 h / 74.72 %	-- <sup>a</sup>
Metil cafeato	3 min / 75%	---	8 h / 86.07 %	5 días /91.55 %
Etil cafeato	3 min / 74%	---	8 h / 83.70 %	-- <sup>a</sup>

<sup>a</sup> No se llevaron a cabo estas reacciones.

Además, las arcillas como catalizador en reacciones de lipofilización de ácidos hidroxicinámicos son mejores, ya que la cantidad utilizada de éste es baja comparada con otros catalizadores, como las enzimas, pues la relación generalmente ocupada de enzima (catalizador): sustrato es de 10:10 y en este trabajo se utilizó una proporción de 8:10 de arcillas (catalizador): sustrato, además de la ventaja que tiene el uso de las arcillas como sustituyente de ácidos (sulfúrico y clorhídrico concentrados) en la reacción de Fischer, los cuales tienen desventajas como: son corrosivos, dificultad en la manipulación, riesgos ambientales.

### Lipofilización enzimática con lipasa comercial de *Candida antarctica*



En el esquema anterior se muestra la estrategia para llevar a cabo la ampliación estructural de los ácidos hidroxicinámicos con butanol; en esta se observa que se parte de metil y/o etil hidroxicinamato (los cuales fueron sintetizados previamente en este trabajo), los cuales son sometidos a una reacción de transesterificación catalizada por lipasa B comercial de *Candida antarctica* con butanol como alcohol sustituyente.

Se llevó a cabo una transesterificación con el fundamento de que en estudios anteriores se ha visto que la esterificación directa de ácidos hidroxicinámicos, catalizada por enzimas, da rendimientos bajos, por ejemplo, Compton y colaboradores en 2000, realizaron la esterificación directa de ácido ferúlico con etanol en *ter*-butanol catalizada con lipasa de *Candida antarctica* a distintas temperaturas y obteniendo distintos rendimientos, donde el máximo fue a la temperatura de 60° C con un rendimiento de 20%, además de que el tiempo de reacción es de 13 días a pesar de que la relación sustrato enzima es 1:1 (p/p), el rendimiento es muy bajo. (Compton, et. al., 2000). Además una esterificación directa de los ácidos hidroxicinámicos con butanol, da rendimientos bajos por ser un alcohol con cadena carbonada más larga.

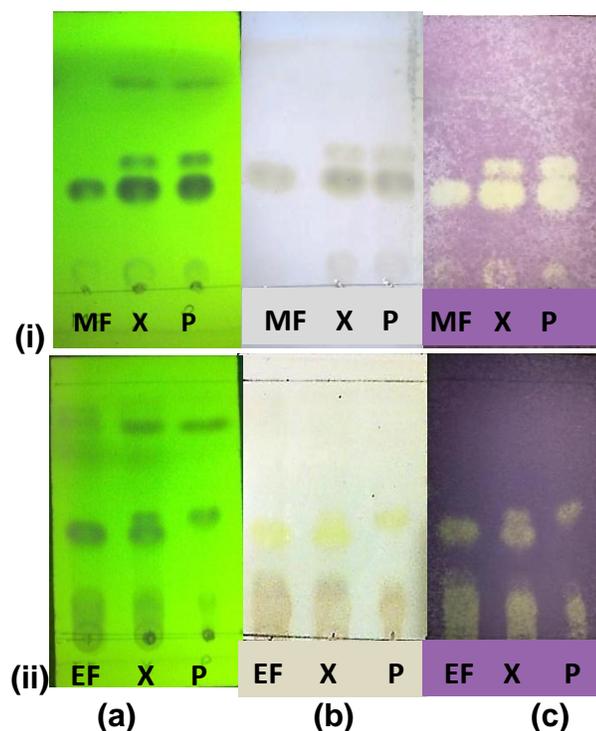
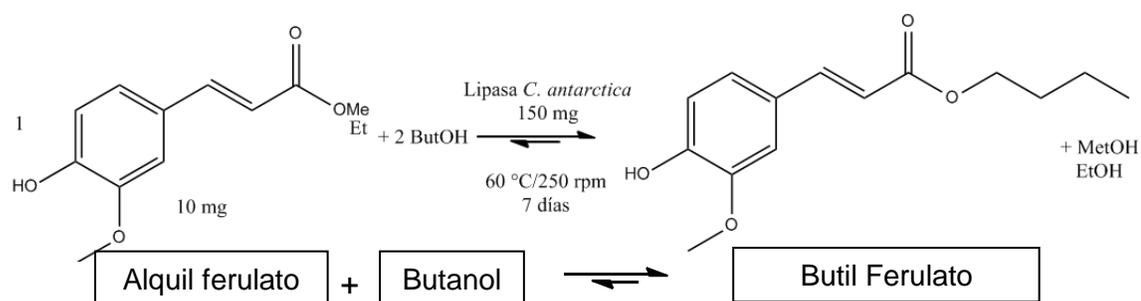
#### ☛ Transesterificación de hidroxicinamatos con butanol

Primero se llevó a cabo la transesterificación o alcoholólisis catalizadas por lipasa B comercial de *Candida antarctica* de metil y etil hidroxicinamatos con *n*-butanol, las reacciones se incubaron durante 7 días a 60° C y 250 rpm, se realizó placa cromatográfica diaria de cada una de las reacciones para observar el

avance de reacción, sin embargo, sólo se muestran las placas cromatográficas al término de los 7 días.

### Ésteres de ácido ferúlico

Se pesaron 10 mg de alquil ferulato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular para retener el agua que pudiera existir en el medio de reacción, finalmente se adicionaron 9 µL de butanol. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.



**Figura 22.** (a) Placas cromatográficas reveladas con luz UV, (b) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor, (c) Placas reveladas con DPPH. MF(metil ferulato), EF (etil ferulato), X (metil/etil ferulato + producto de reacción) P (producto de reacción con butanol). Hexano: acetato de etilo (1:1)

En la figura 22(i) se muestran las placas cromatográficas correspondientes a la reacción de transesterificación de metil ferulato con butanol, en dichas placas se observa cualitativamente que después de 7 días sólo hay una transformación parcial del metil ferulato a butil ferulato, la cual coincide con el rendimiento obtenido el cual corresponde a 50.4%, sin embargo, para el caso de la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol, se obtuvo un rendimiento de 87.1% que es mayor y coincide con lo que se observa en la figura 22(ii) ya que a pesar de tener impurezas, la transformación del sustrato es cualitativamente completa.

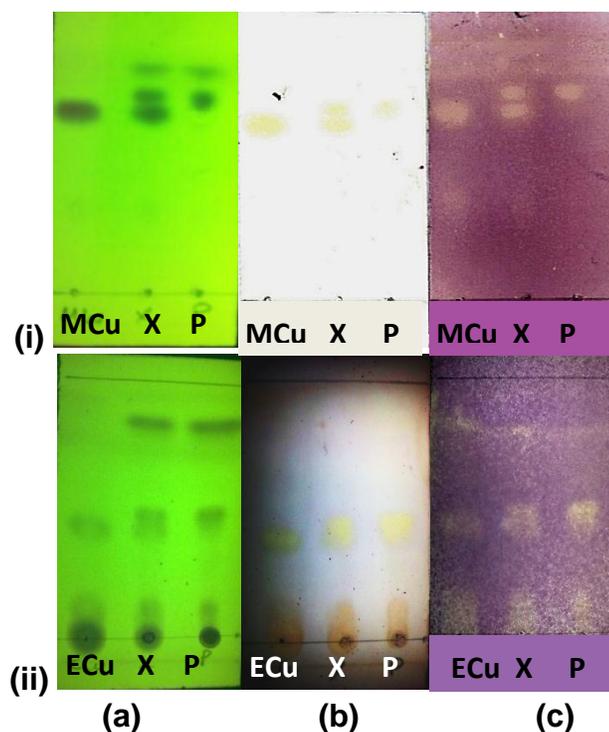
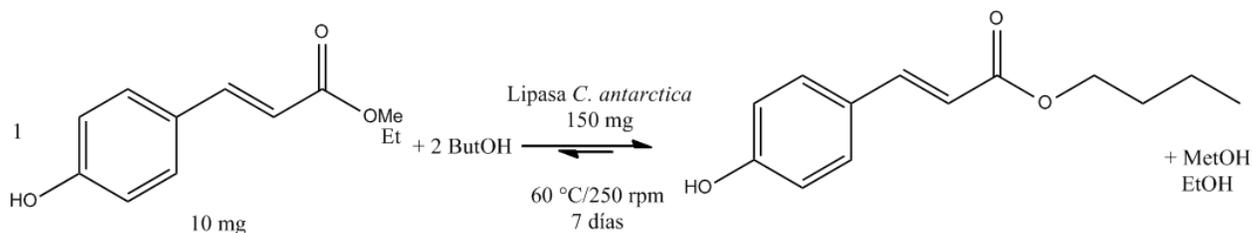
De acuerdo con los resultados obtenidos por Ramírez en 2010 con la reacción de transesterificación de etil ferulato con butanol obtuvo un rendimiento de 32.32 % por lo que los obtenidos en el presente trabajo son superiores, lo cual puede deberse al tiempo de reacción, ya que Ramírez dejó la reacción durante un periodo de 4 días y en este trabajo fue de 7 días, sin embargo el resultado es muy parecido al obtenido por González en 2009, el cual es de 88.75 %.

Para los casos de González y en este estudio se puede decir que la metodología empleada es adecuada para llevar a cabo una transesterificación de etil ferulato con butanol porque el rendimiento de las reacciones es mayor a 85 %, en la síntesis de butil ferulato a partir de etil ferulato.

En los resultados obtenidos para este trabajo se puede concluir que el mejor reactivo para llevar a cabo una transesterificación catalizada con lipasa comercial de *Candida antarctica* (isoforma B) es el etil ferulato ya que el metil ferulato es un producto muy estable y reacciona en poca cantidad, obteniendo rendimientos bajos.

### Ésteres de ácido *p*-cumárico

Se pesaron 10 mg de alquil *p*-cumarato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular para retener el agua que pudiera existir en el medio de reacción, finalmente se adicionaron 10  $\mu$ L de butanol. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.



**Figura 23.** (a) Placas cromatográficas reveladas con luz UV, (b) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor, (c) Placas reveladas con DPPH. **MCu** (Metil *p*-cumarato), **ECu** (etil *p*-cumarato), **X** (metil/etil *p*-cumarato + producto de reacción) **P** (producto de reacción con butanol). Eluyente utilizado= (i) Hexano: acetato de etilo (7:3); (ii) Hexano: acetato de etilo (1:1).

Al término de los 7 días se realizaron placas cromatográficas, las cuales se muestran en la figura 23.

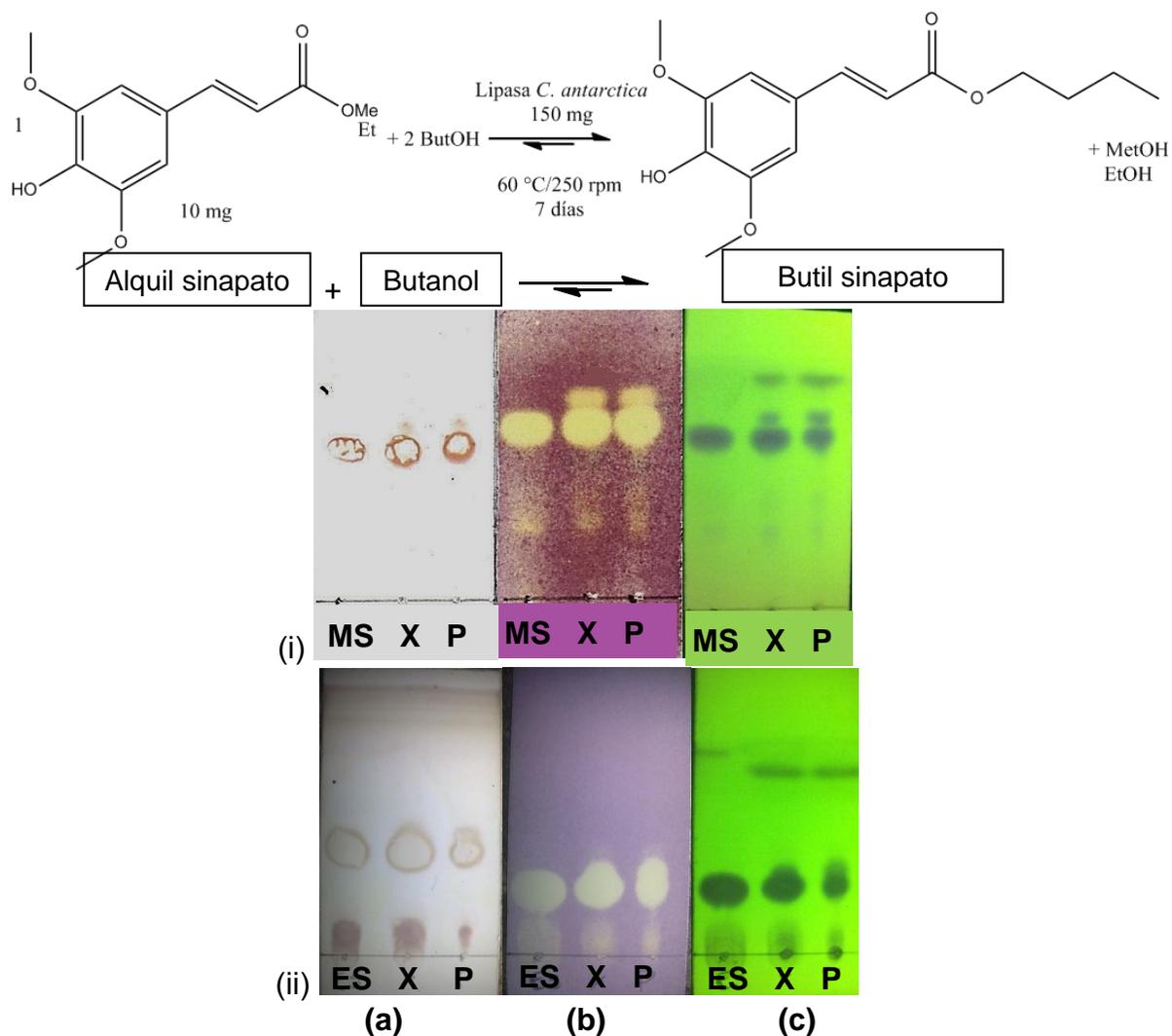
La figura 23(i) muestra las placas correspondientes a la reacción de transesterificación de metil *p*-cumarato con butanol, se observa cualitativamente que hay una transformación completa de metil *p*-cumarato hacia butil *p*-cumarato, por lo que se decidió calcular el rendimiento que se encuentra en la tabla 10, y corresponde a 73.4 %.

La figura 23(ii) muestra las placas obtenidas de la reacción de transesterificación de etil *p*-cumarato con butanol, en estas placas se observa que a pesar de no encontrarse totalmente puro el etil *p*-cumarato, la transformación de productos a reactivos fue completa, esto en términos cualitativos, posteriormente se determinó el rendimiento (tabla 10) de la reacción el cual corresponde a 92.2%.

En investigaciones anteriores llevadas a cabo por Vafiadi y colaboradores en 2007 llevaron a cabo una reacción de transesterificación de metil *p*-cumarato utilizando como catalizador una feruloil esterasa tipo A de *Aspergillus niger*, en la cual obtuvieron un rendimiento de 2 % a una temperatura de incubación de 35° C durante 5 días, por lo que se puede determinar que la metodología empleada para la ampliación estructural de ácido *p*-cumárico con butanol, a través de una transesterificación con lipasa comercial de *Candida antarctica* es eficiente pues el rendimiento fue superior, a pesar de haber sido 7 días de reacción.

### Ésteres de ácido sinápico

Se pesaron 10 mg de alquil sinapato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular para retener el agua que pudiera existir en el medio de reacción, finalmente se adicionaron 8  $\mu$ L de butanol. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.



**Figura 24.** (a) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor, (b) Placas reveladas con DPPH, (c) Placas cromatográficas reveladas con luz UV. **MS** (Metil sinapato), **ES** (etil sinapato), **X** (meti/etil sinapato + producto de reacción) **P** (producto de reacción con butanol). (i) Hexano: acetato de etilo (7:3); (ii) Hexano: acetato de etilo: diclorometano (8:1:1) y después hexano: acetato de etilo (7:3).

Después de llevar a cabo las reacciones de transesterificación de ésteres metil y etil de ácido sinápico con butanol durante 7 días e realizaron placas cromatográficas reveladas con luz UV, sulfato cérico y DPPH, las cuales se muestran en la figura 24.

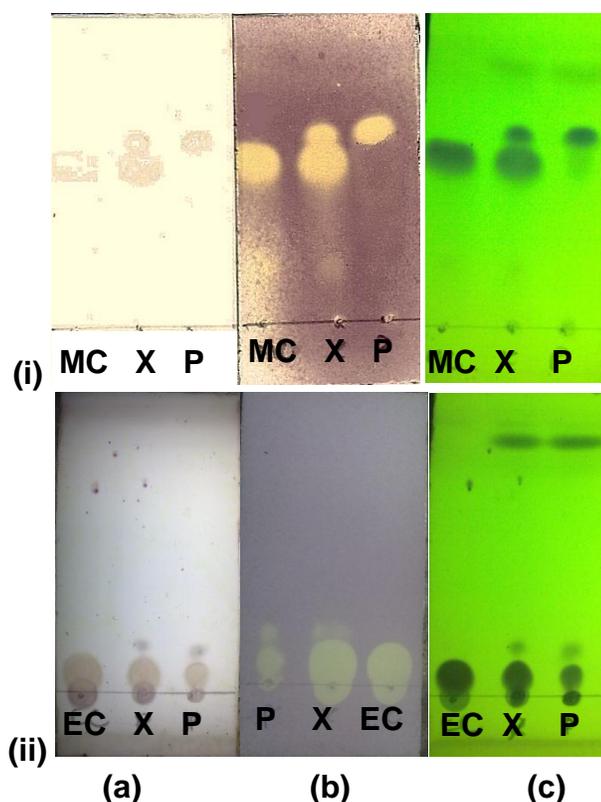
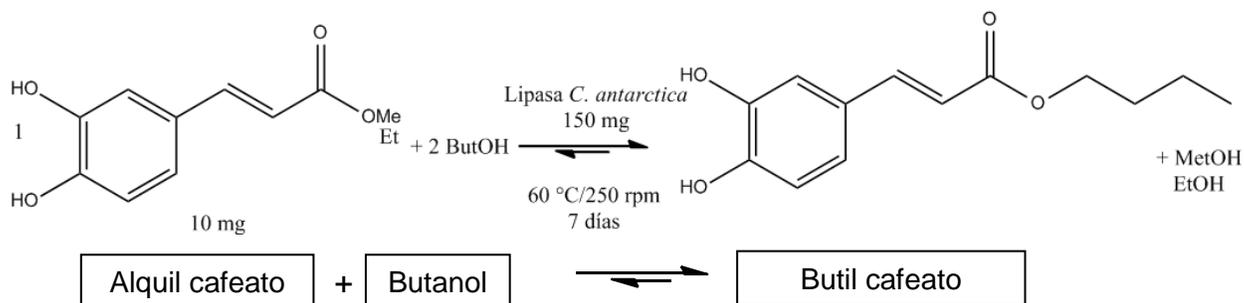
En la figura 24(i) se observan las placas cromatográficas correspondientes a la reacción de transesterificación de metil sinapato con butanol, en las cuales se aprecia que la transformación de metil sinapato sólo es parcial, además de que la separación de metil sinapato y el producto es baja, por lo que se decidió realizar una separación distinta en las placas de la reacción de transesterificación de etil sinapato con butanol, esto es cambiando el eluyente, éstas placas se muestran en la figura 25(ii), sin embargo, la separación del reactivo y producto no fue mejor, lo cual demuestra que los metil, etil y butil ésteres de ácido sinápico tienen un  $R_f$  muy semejante y se requieren de otros eluyentes u otras formas de separación de los productos y reactivos. Posteriormente se determinó el rendimiento para ambos casos, obteniendo 31.3% a partir de metil sinapato y 29.4% a partir de etil sinapato.

Vafiadi, y colaboradores en 2007 llevaron a cabo la reacción de transesterificación de metil sinapato con *n*-butanol utilizando como catalizador una feruloil esterasa tipo A de *Aspergillus niger*, en la cual obtuvieron un rendimiento de 78 % a una temperatura de incubación de 35° C durante 5 días, por lo que se puede determinar que la lipasa comercial de *Candida antarctica* no es la óptima para llevar a cabo reacciones de transesterificación de metil y etil sinapato.

Ésteres de ácido cafeico

a) *Transesterificación de alquil cafeatos con butanol*

Se pesaron 10 mg de alquil cafeato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular para inhibir la reacción de hidrólisis, finalmente se adicionaron 9  $\mu$ L de butanol. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.



**Figura 25.** (a) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor, (b) Placas reveladas con DPPH, (c) Placas cromatográficas reveladas con luz UV. **MC** (Metil cafeato), **EC** (etil cafeato), **X** (metil/etil cafeato + producto de reacción) **P** (producto de reacción con butanol). (i) Hexano: acetato de etilo (1:1); (ii) Hexano: acetato de etilo: diclorometano (8:1:1)

Al término de los 7 días de reacción se realizaron placas cromatográficas, las cuales se muestran en la figura 25.

En la figura 25(i) se muestran las placas cromatográficas de la reacción de transesterificación de metil cafeato con butanol, en éstas placas se observa que hay una transformación completa hacia butil cafeato por lo que se determinó el rendimiento de la reacción (tabla 10), el cual fue de 85.5% .

En la figura 25(ii) se muestran las placas cromatográficas de la transesterificación de etil cafeato con butanol, se observa que no hay una transformación completa en la reacción, debido a que aún hay presencia de etil cafeato, lo que impacta directamente en el rendimiento obtenido, pues corresponde a 26.9%

En estudios anteriores hechos por Li y colaboradores en 2012, llevaron a cabo la esterificación directa de ácido cafeico con 1-butanol, el tratamiento utilizado fue por microondas, con un tiempo de reacción de 3 minutos, obtuvieron un rendimiento de 68 %, con lo que se puede decir que el método de transesterificación de metil cafeato con butanol, catalizado por lipasa comercial de *Candida antarctica*, es óptimo para llevarse a cabo, ya que se obtiene un rendimiento superior al utilizado por Li y colaboradores.

Tabla 10. Rendimientos de las reacciones de transesterificación de metil y etil hidroxicinamatos con butanol catalizadas con lipasa comercial de *Candida antarctica*.

Hidroxicinamato utilizado	Butil hidroxicinamato esperado (g)	Butil hidroxicinamato obtenido (g)	Butil hidroxicinamato obtenido (%)
Metil ferulato	0.012	0.0103	50.4*
Etil ferulato	0.011	0.0098	87.1
Metil <i>p</i> -cumarato	0.012	0.0091	73.4
Etil <i>p</i> -cumarato	0.011	0.0106	92.2
Metil sinapato	0.012	0.0102	31.3*
Etil sinapato	0.011	0.0101	29.4*
Metil cafeato	0.012	0.0104	85.5
Etil cafeato	0.011	0.0082	26.9*

\* Rendimientos estimados de CCF

En la tabla 10 se observan los rendimientos obtenidos para las reacciones de transesterificación de metil y etil hidroxicinamatos con butanol, se puede observar que el mejor rendimiento se obtuvo con el butil *p*-cumarato a partir de etil *p*-cumarato.

Los sustratos utilizados para las reacciones de transesterificación con butanol catalizada por lipasa de *Candida antarctica* reportaron diferentes rendimientos; el de mayor rendimiento fue el etil *p*-cumarato con 92.2%, seguido por el etil ferulato con 87.1%, luego el metil cafeato con 85.5%, después el metil *p*-cumarato con 73.4%, enseguida el metil ferulato con 50.4%, lo sigue el metil sinapato con 31.3%, posteriormente el etil sinapato con 29.4% y, finalmente, el sustrato que dio menor rendimiento fue el etil cafeato con 26.9%.

Con estos resultados se puede determinar que los mejores sustratos en la reacción de transesterificación con butanol catalizada por lipasa de *Candida antarctica* son el metil *p*-cumarato, el etil ferulato, el metil cafeato y el etil *p*-cumarato.

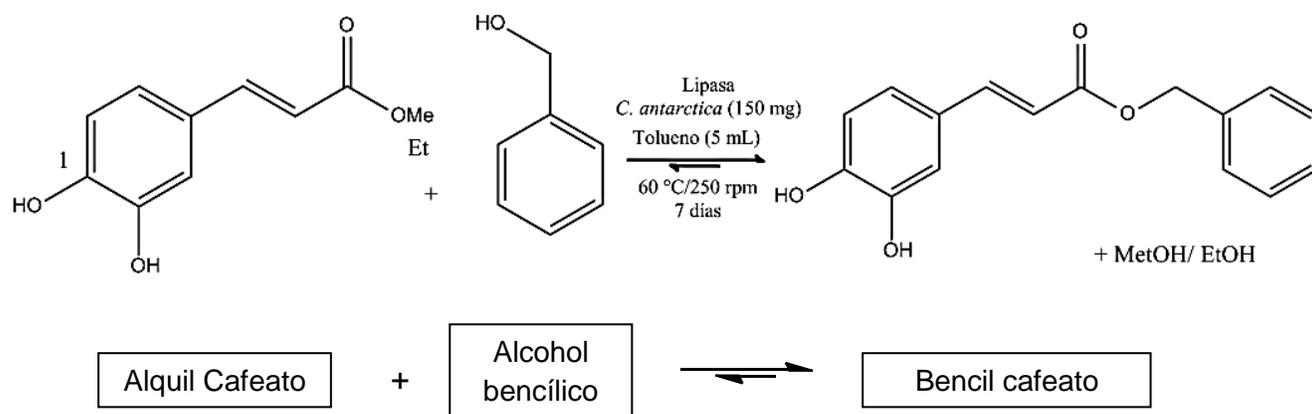
### b) Transesterificación de cafeatos con alcohol bencílico y piperonílico.

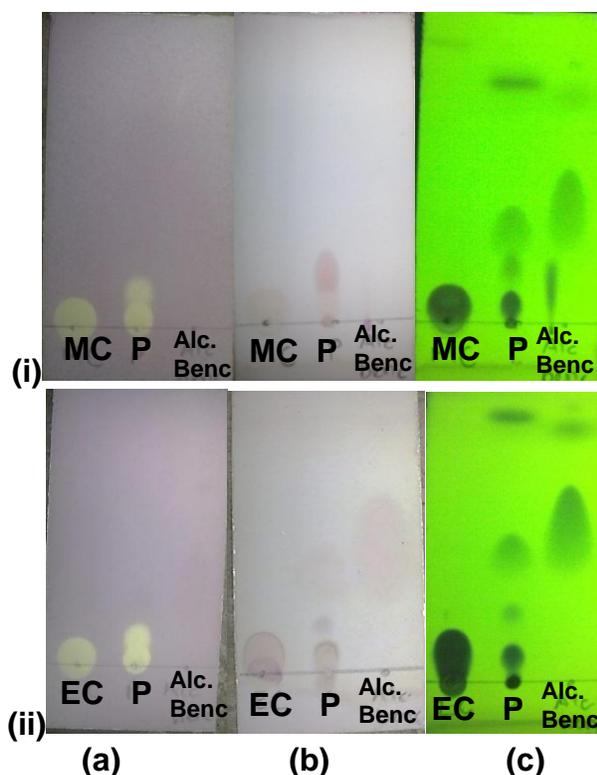
Como parte de este trabajo se determinó llevar a cabo la reacción de transesterificación de metil/etil cafeato con otros alcoholes, además del butanol, esto con el fin de observar si la lipasa comercial de *Candida antarctica* es capaz de llevar a cabo la reacción con alcoholes de otra estructura, tal es el caso de los alcoholes bencílico y piperonílico.

A continuación se muestran los resultados de la reacción de transesterificación de metil y etil cafeato con alcohol bencílico.

#### Éster bencílico de ácido cafeico

Se pesaron 10 mg de metil/etil cafeato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular para retener el agua que pudiera existir en el medio de reacción, finalmente se adicionaron 10  $\mu$ L de alcohol bencílico. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.





**Figura 26.** (a) Placas reveladas con DPPH, (b) Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor, (c) Placas cromatográficas reveladas con luz UV. **MC** (Metil cafeato), **EC** (etil cafeato), **P** (producto de reacción con alcohol bencílico), **Alc. Benc.** (Alcohol bencílico)  
Placas eluidas con hexano: acetato de etilo: diclorometano (8:1:1) 5 veces y después en Hexano: Acetato de etilo (7:3)

Se llevó a cabo la reacción de transesterificación de metil y etil cafeato con alcohol bencílico, siendo éste último un alcohol aromático, después de 7 días de reacción con catalizador (lipasa comercial de *Candida antarctica*), a 60° C y 250 rpm se realizaron placas cromatográficas, las cuales se muestran en la figura 26.

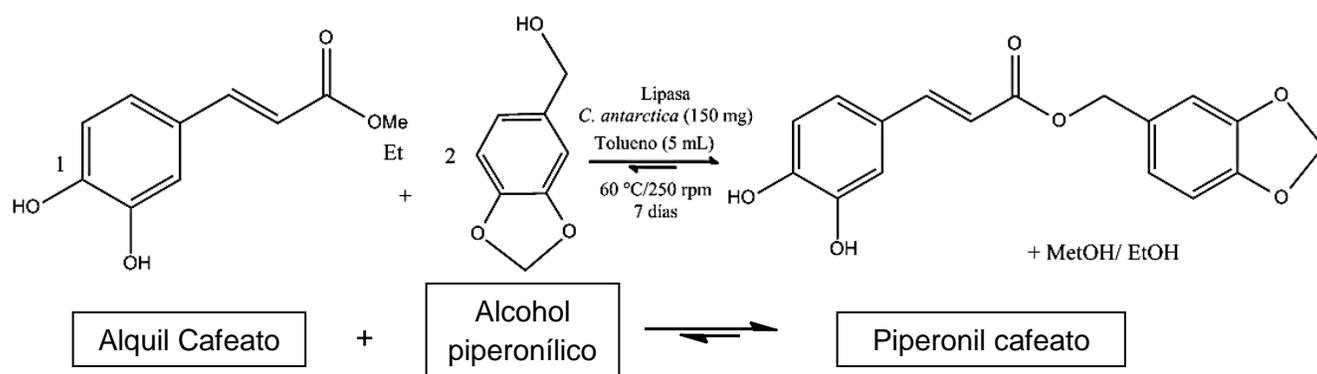
En la figura 26(i) se muestran las placas de la reacción de transesterificación de metil cafeato con alcohol bencílico y la figura 26 (ii) muestra las placas de la reacción de transesterificación de etil cafeato con alcohol bencílico, en ambos casos se observa que sí se llevó a cabo la reacción, además de que el producto posee actividad antioxidante, pues en la placa revelada con DPPH se muestra una huella del producto de reacción, que indica la actividad antioxidante del mismo. Por lo que se puede determinar que la transesterificación de metil cafeato con alcohol bencílico sí se lleva a cabo.

Posteriormente se determinó el rendimiento de la reacción 63.5%\* cuando se parte de metil cafeato, y en el caso de etil cafeato, el rendimiento obtenido fue de 31.3%\*, a pesar de ser bajos los rendimientos, se puede establecer que el mejor sustrato a utilizar en reacciones de transesterificación con alcohol bencílico catalizada por lipasa comercial de *Candida antarctica* es el metil cafeato, el cual también fue el mejor sustrato en las reacciones de transesterificación de cafeatos con butanol.

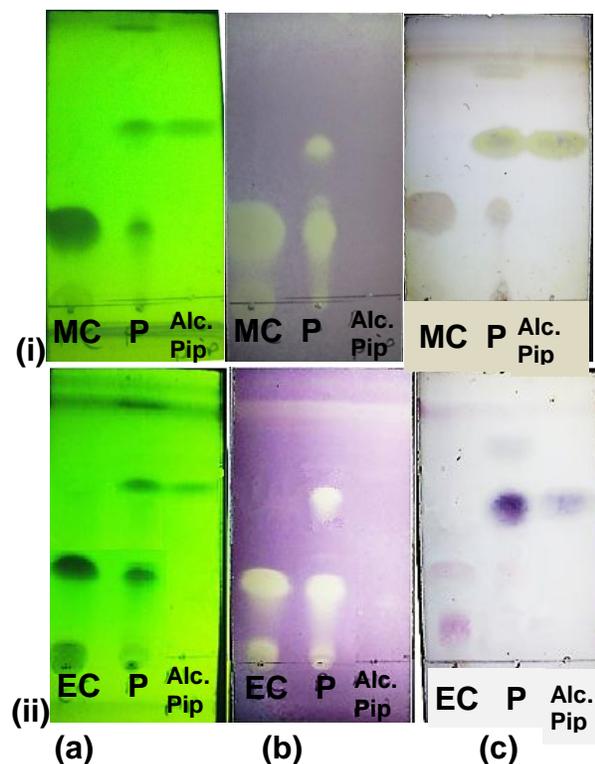
Una vez obtenidos los resultados de la reacción de transesterificación de alquil cafeatos con alcohol bencílico, se realizó la misma reacción pero con alcohol piperonílico, los resultados se muestran a continuación:

### Éster piperonílico de ácido cafeico

Se pesaron 10 mg de alquil cafeato en viales, se adicionaron 5 mL de tolueno, el cual actuó como disolvente, se adicionó malla molecular evitar la reacción de hidrólisis, finalmente se adicionaron 16 mg de alcohol piperonílico. Los viales se colocaron en incubadora a 60° C y agitación orbital (250 rpm) durante 7 días.



\*Rendimientos estimados de CCF



**Figura 27. (a)** Placas cromatográficas reveladas con luz UV, **(b)** Placas reveladas con DPPH, **(c)** Placas cromatográficas reveladas con sulfato cérico y calor. **MC** (Metil cafeato), **EC** (Etil cafeato), **P** (producto de reacción con alcohol piperonílico), **Alc. Pip.** (Alcohol Piperonílico). Placas eluidas en hexano: acetato de etilo: diclorometano (8:1:1) 5 veces y después en Hexano: Acetato de etilo (7:3)

Se llevó a cabo la reacción de transesterificación de metil y etil cafeato con alcohol piperonílico, se realizaron placas cromatográficas, las cuales se muestran en la figura 27, después de 7 días de reacción con catalizador (lipasa comercial de *Candida antarctica*), a 60° C y 250 rpm.

En la figura 27(i) se muestran las placas de la reacción de transesterificación de metil cafeato con alcohol piperonílico y la figura 26 (ii) muestra las placas de la reacción de transesterificación de etil cafeato con alcohol piperonílico, en ambos casos se observa que sí se llevó a cabo la reacción, ya que éste tiene actividad antioxidante y en la placa revelada con DPPH se muestra una huella del producto de reacción, que no corresponde al alcohol piperonílico, pues éste no tiene actividad antioxidante.

Posteriormente se determinó el rendimiento de la reacción, y se obtuvo lo siguiente: Para el caso en el que el sustrato fue metil cafeato, el rendimiento fue de 28.5%\* y en el caso en el que el sustrato fue el etil cafeato, se obtuvo un rendimiento de 24.8%\*, estos resultados confirman que el mejor sustrato para la lipasa de *Candida antarctica* entre metil y etil cafeato es el metil cafeato, porque se obtienen mejores rendimientos al utilizarlo.

Lo anterior indica que la transesterificación de metil cafeato con alcohol bencílico sí se lleva a cabo, sin embargo, para determinar el rendimiento de la reacción, se debe mejorar la técnica de separación porque el producto tiene el mismo Rf que el alcohol piperonílico.

\*Rendimientos estimados de CCF

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES**

Se llevó a cabo la ampliación estructural (lipofilización) de ácidos hidroxicinámicos con butanol y la metodología de la transesterificación catalizada por lipasa de *Candida antarctica*, permitió que los rendimientos fueran superiores a los que se obtienen por esterificación enzimática directa de los ácidos hidroxicinámicos.

Se realizaron las reacciones de esterificación de Fischer de ácidos hidroxicinámicos con metanol y etanol de manera convencional (reflujo), donde se determinó que el metanol como alcohol sustituyente es mejor grupo nucleófilo, pues los rendimientos fueron superiores a los de los productos con etanol, ya que un aumento en la cadena carbonada disminuye estos rendimientos.

Además se determinó que el método empleado en este trabajo para la esterificación de ácidos hidroxicinámicos es óptimo, ya que en casi todos los casos los rendimientos fueron superiores al 70%, excepto en el caso del etil *p*-cumarato, sin embargo, el rendimiento obtenido para este compuesto es casi del 60%.

Se llevó a cabo la ampliación estructural (lipofilización química) de los ácidos hidroxicinámicos con metanol, utilizando 40 mg de arcillas súper ácidas activadas con ácido trifluoro metansulfónico como catalizador, después de incubar las reacciones durante 5 días a 50 ° C, se obtuvieron rendimientos superiores a los que se obtienen de manera convencional (reacción de Fischer) en este trabajo y en otros; además, con las arcillas se puede sustituir el uso de ácido sulfúrico o clorhídrico que se utilizan en la reacción de Fischer los cuales tienen desventajas es su aplicación y manejo.

Los metil y etil hidroxicinamatos obtenidos por método de Fischer se identificaron por CCF y se caracterizaron determinando sus puntos de fusión, Rf y por RMN.

Los productos de la esterificación de ácidos hidroxicinámicos con metanol y etanol obtenidos por las dos metodologías (esterificación de Fischer y catalizada por arcillas súper ácidas) se emplearon para la reacción de transesterificación con butanol durante 7 días con lipasa comercial de *Candida antarctica* a 60° C y a 250 rpm; los butil hidroxicinamatos se identificaron por CCF y se caracterizaron por RMN, además se determinó el rendimiento de los productos y se estableció que los mejores sustratos en la reacción de transesterificación con butanol catalizada por lipasa comercial de *Candida antarctica*, son el etil ferulato, metil cafeato y metil y etil *p*-cumarato, en los cuales se obtuvo un rendimiento superior al 70%.

Adicionalmente se emplearon los cafeatos (metil y etil) y se sometieron a las reacciones de transesterificación con alcohol bencílico catalizada por lipasa comercial de *Candida antarctica*, de las cuales se pudo identificar el producto por CCF y por RMN; además se llevó a cabo la misma reacción de transesterificación utilizando alcohol piperonílico y el producto de las reacciones se identificó por CCF y caracterizó por RMN.

Se determinó que el metil cafeato es el mejor sustrato en las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasa comercial de *Candida antarctica* con butanol, alcohol bencílico y alcohol piperonílico, comparado con el etil cafeato, ya que con éste último se obtuvieron rendimientos menores.

## **CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS**

Es recomendable que se continúe la investigación en la ampliación estructural de ácidos hidroxicinámicos para aumentar la escala en la que se obtienen los productos, para su posterior aplicación en diversas industrias, pero resaltando la aplicación en la industria alimentaria, ya que puede ser de gran ventaja para alimentos en los que la composición principal es lipídica, y de esta manera aprovechar las propiedades antioxidantes de los ácidos hidroxicinámicos en dichos alimentos.

Se tiene la expectativa de que las reacciones de transesterificación de hidroxicinamatos se sigan aplicando y se puedan mejorar, además de que su aplicación en la ampliación estructural de ácidos hidroxicinámicos con alcoholes aromáticos, se continúe, para aprovecharse tanto las propiedades antioxidantes de los ácidos como las propiedades que le puedan conferir los alcoholes aromáticos en la molécula obtenida y así aplicarse en alimentos.

Se debe continuar con la investigación del uso de arcillas súper ácidas como catalizador en reacciones de esterificación de ácidos hidroxicinámicos, y se puede sugerir que en futuras investigaciones, se lleve a cabo la reacción de esterificación catalizada con arcillas súper ácidas asistida con microondas, ya que con microondas además de mejorar el tiempo de reacción, se mejora el rendimiento y se pueden esperar mejores resultados, además que se utilicen en la ampliación estructural directa de ácidos hidroxicinámicos con butanol, lo que puede sustituir el uso de enzimas y evitar ese paso en la obtención de butil hidroxicinamatos.

## CAPÍTULO 7. ANEXOS

## Punto de fusión de los productos de la esterificación de Fisher

Como parte de la caracterización de los productos de la esterificación de Fisher de manera convencional se determinó el punto de fusión de los mismos y se compararon con los que se encuentran reportados en la literatura.

Hidroxicinamato	Punto de fusión (°C)	
	Experimental	Teórico
Metil ferulato	52 – 54	62-65 (LookChem, 2012)
Metil <i>p</i> -cumarato	134 -136	138-140 (LookChem, 2012)
Metil sinapato	80 – 84	---
Metil cafeato	160 – 162	158-161 (Chemical book, 2012)
Etil ferulato	Líqu. @ T Lab.	63 – 65 (Sigma-Aldrich, 2012)
Etil <i>p</i> -cumarato	60-64	65-68 (Chemical book, 2012)
Etil sinapato	60 – 62	---
Etil cafeato	142 – 144	---

Tabla 11. Relación de puntos de fusión de metil y etil hidroxicinamatos

En la tabla 11 se observa que en todos los casos hay variaciones en los puntos de fusión obtenidos en este trabajo y los reportados en la literatura, los cuales fluctúan probablemente, por el equipo utilizado, por el ensayista, por las impurezas en algunos de los productos.

Como parte de la caracterización, también se determinó el R<sub>f</sub> de los productos de la reacción de Fischer, los cuales se muestran en la tabla 12.

<b>Hidroxicinamato</b>	<b>R.F</b>
Metil ferulato	0.76
Metil <i>p</i> -cumarato	0.75
Metil sinapato	0.61
Metil cafeato	0.57
Etil ferulato	0.81
Etil <i>p</i> -cumarato	0.77
Etil sinapato	0.66
Etil cafeato	0.76

Tabla 12. R<sub>f</sub> de metil y etil hidroxicinamatos

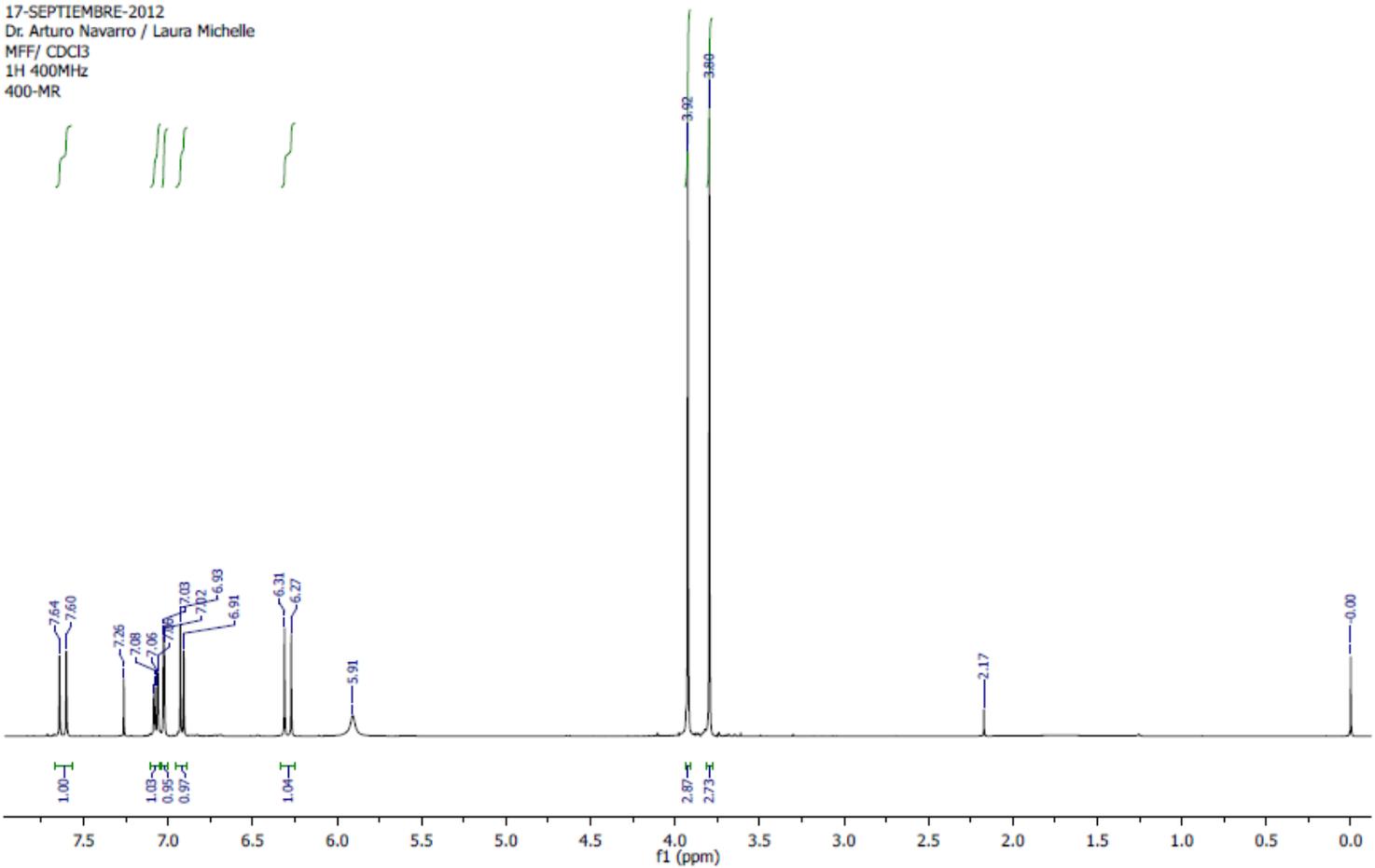
Nota: A continuación se presentan espectros seleccionados de RMN de algunos de los productos, los espectros de todos los productos se compararon/cotejaron con los datos espectroscópicos descritos en la literatura. (Li, et. al, 2009) (Xiang, et. al., 2011)

**Espectros de RMN**

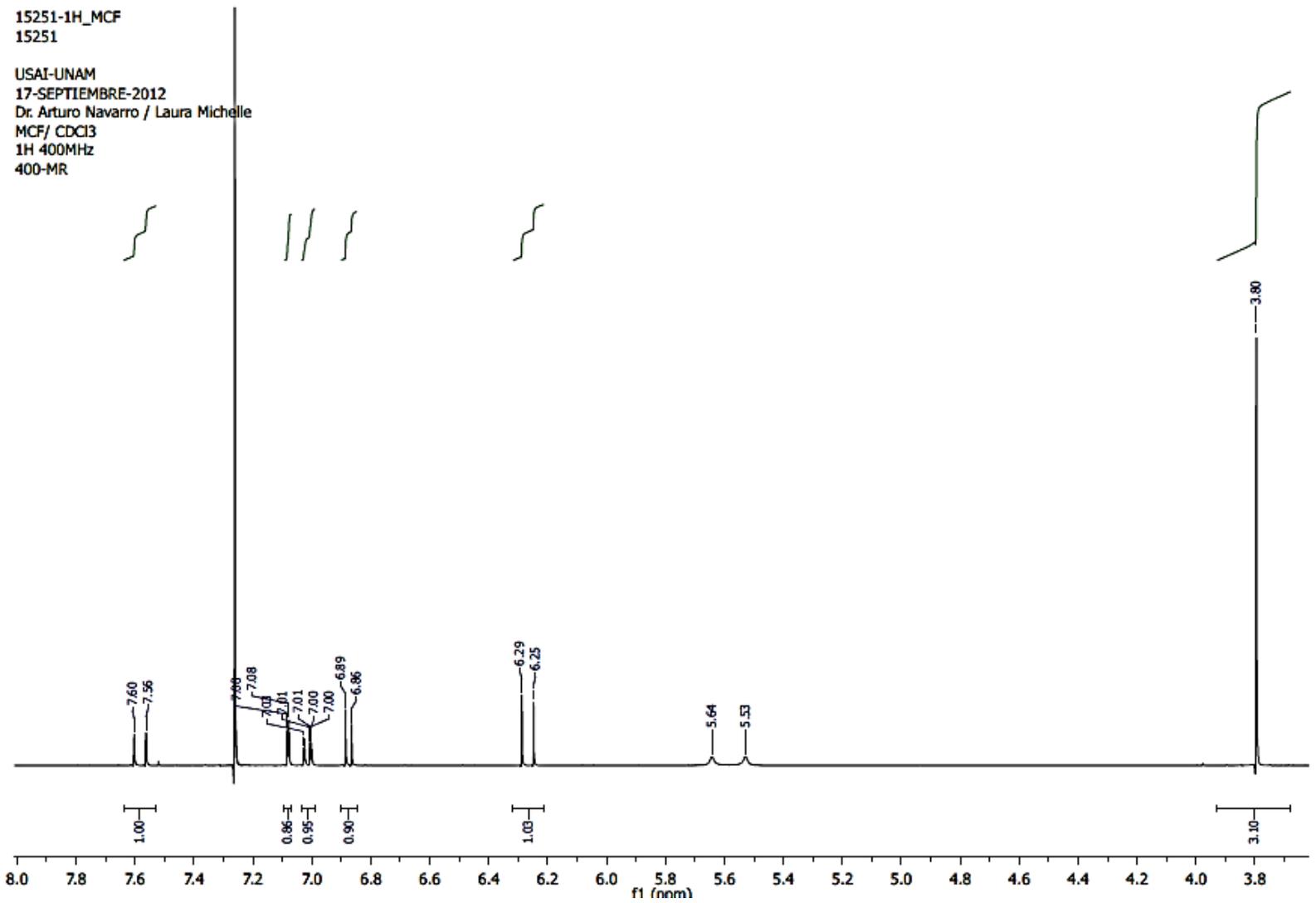
**Metil ferulato**

15252-1H\_MFF  
15252

USAI-UNAM  
17-SEPTIEMBRE-2012  
Dr. Arturo Navarro / Laura Michelle  
MFF/ CDCl3  
1H 400MHz  
400-MR



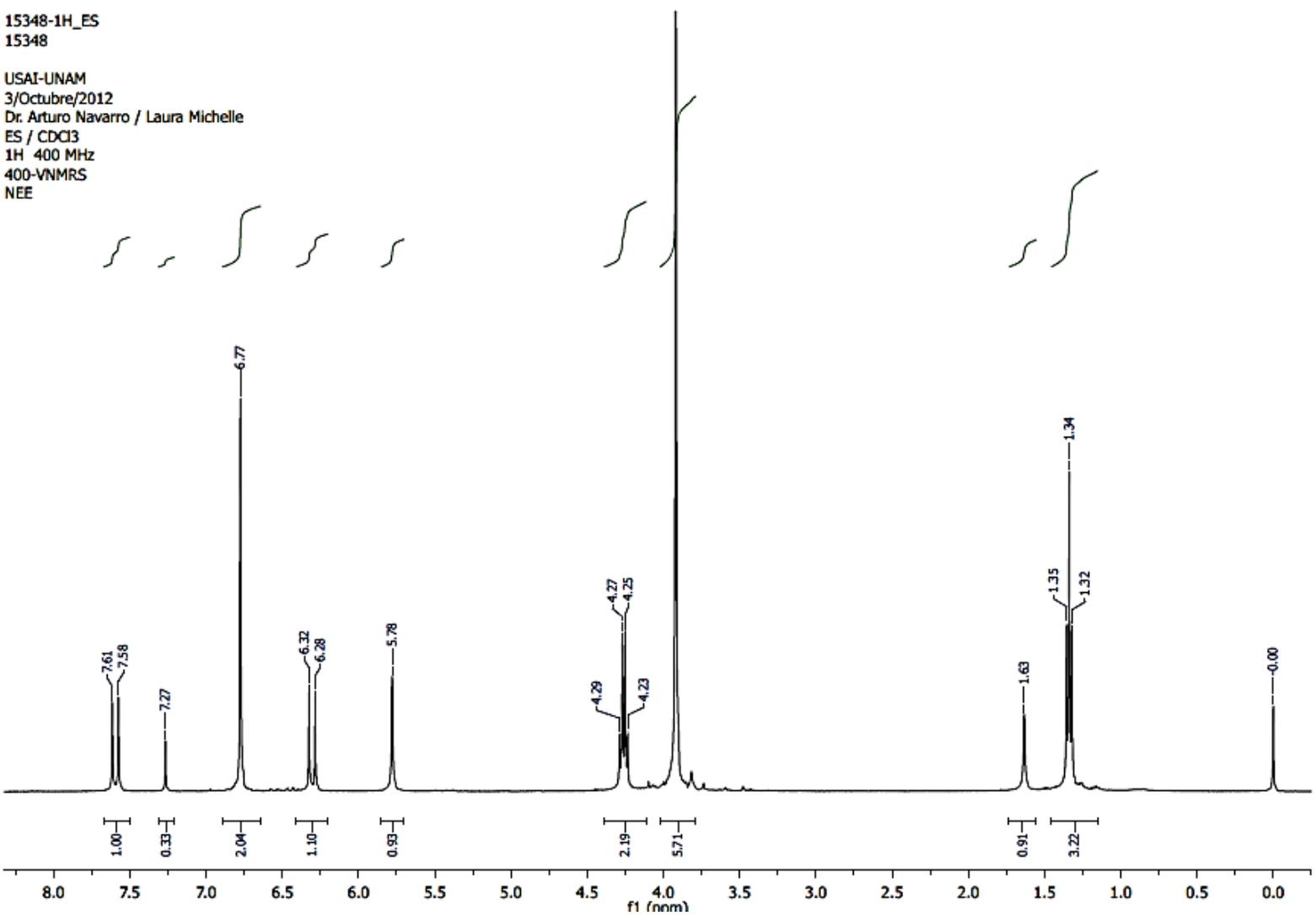
Metil cafeato

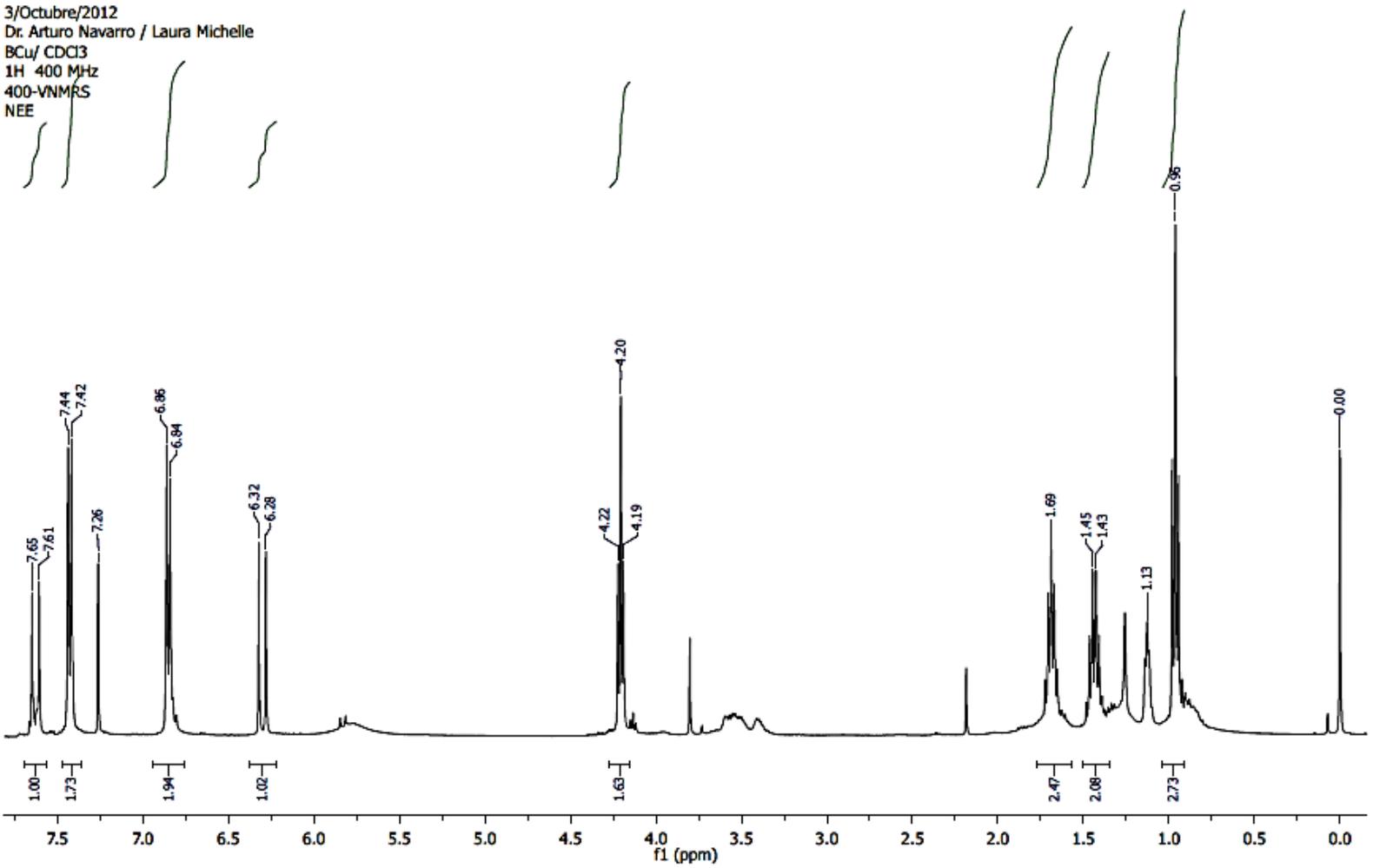


## Etil sinapato

15348-1H\_ES  
15348

USAI-UNAM  
3/Octubre/2012  
Dr. Arturo Navarro / Laura Michelle  
ES / CDCl<sub>3</sub>  
1H 400 MHz  
400-VNMRS  
NEE

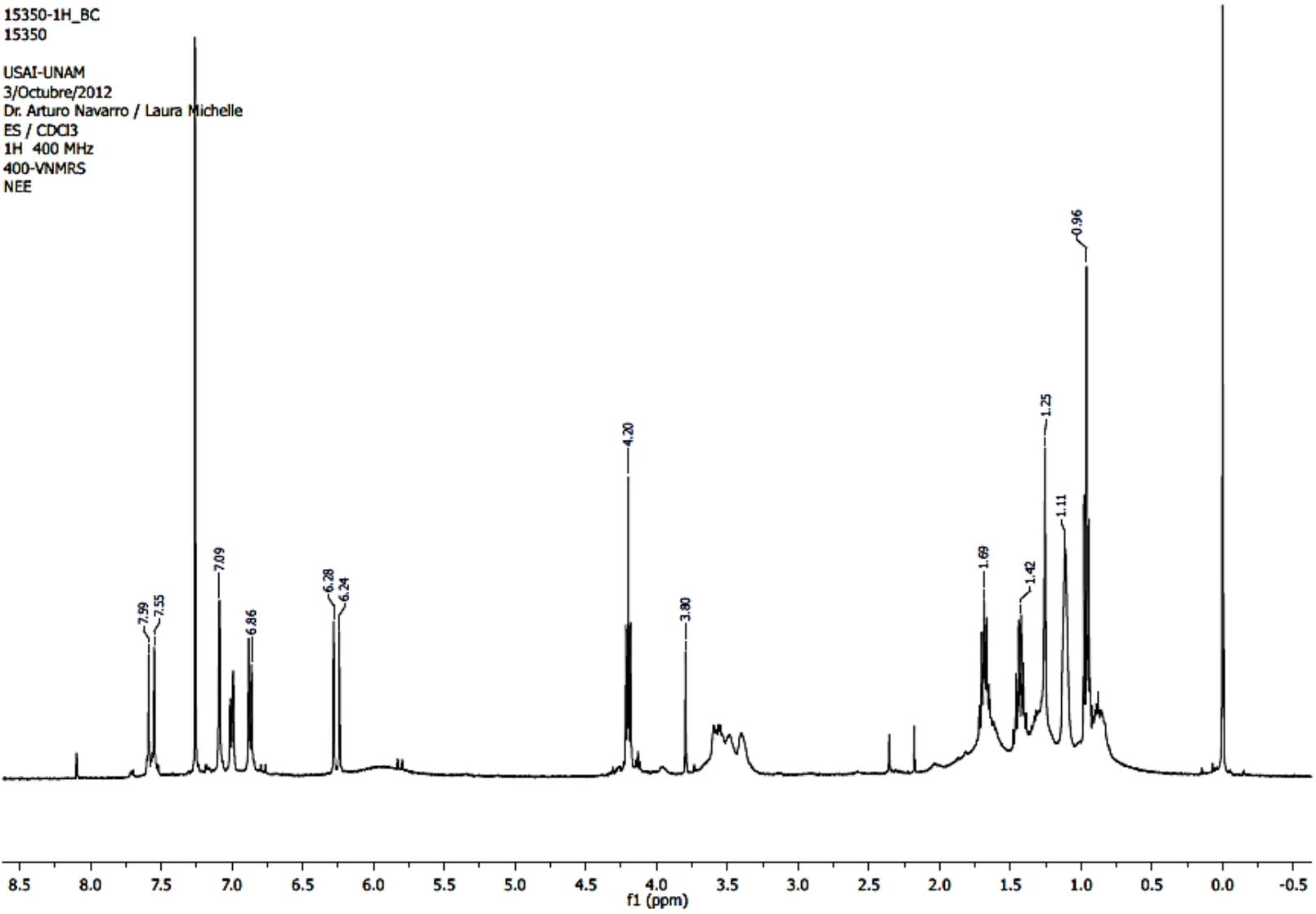


Butil *p*-cumarato15351-1H\_BCu  
15351USAI-UNAM  
3/Octubre/2012  
Dr. Arturo Navarro / Laura Michelle  
BCu/ CDCl<sub>3</sub>  
1H 400 MHz  
400-VNMRS  
NEE

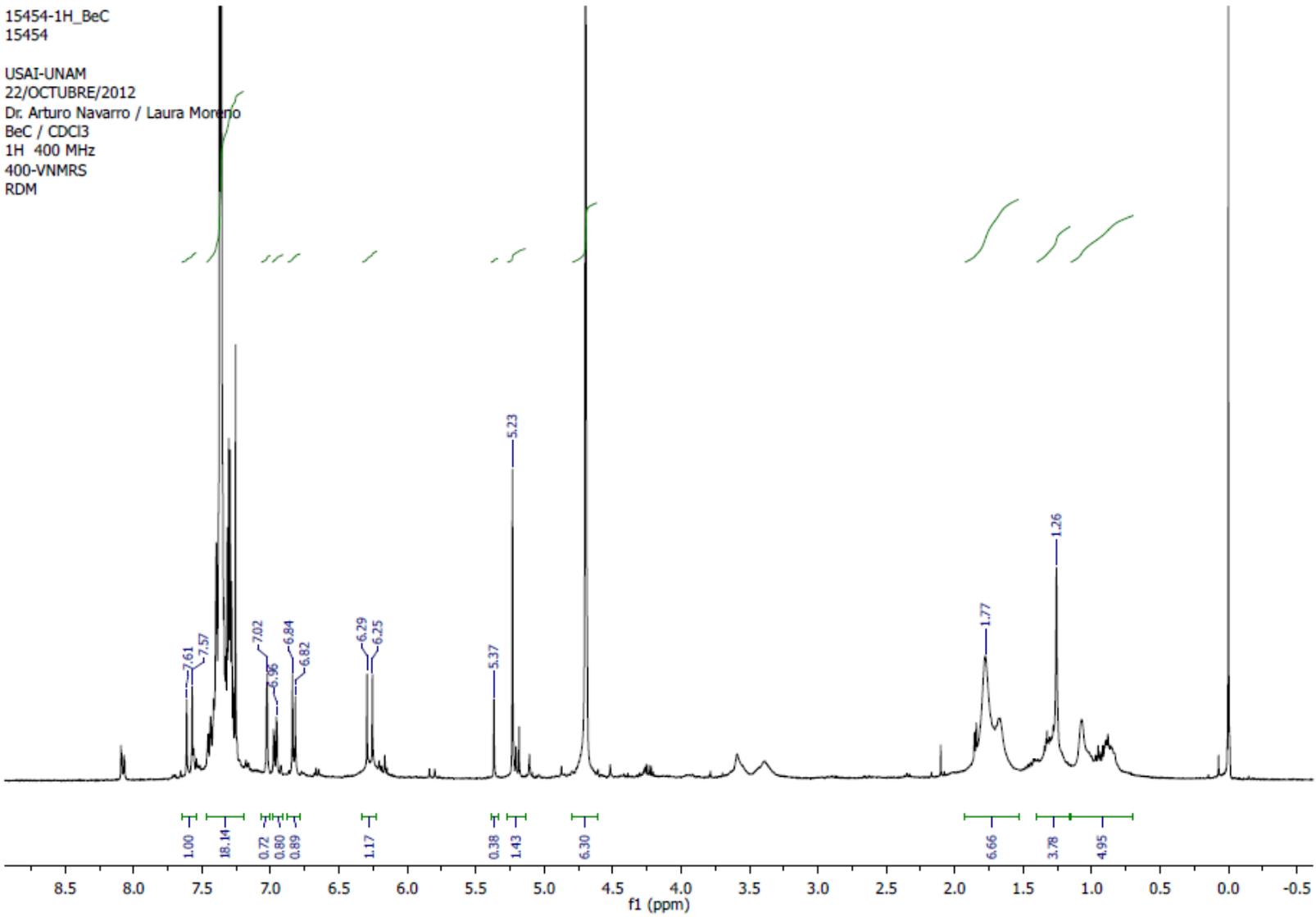
## Butil cafeato

15350-1H\_BC  
15350

USAI-UNAM  
3/Octubre/2012  
Dr. Arturo Navarro / Laura Michelle  
ES / CDCl<sub>3</sub>  
1H 400 MHz  
400-VNMRS  
NEE



Bencil cafeato



## CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

- Badui, S. (1990) *Química de los alimentos*. México. Editorial Alhambra Mexicana. p 311, 315.
- Bergaya, F. (2010), *Applied CLAY science*. Accepted manuscript. Elsevier Science. Recuperado de URL: <<http://www.journals.elsevier.com/applied-clay-science/>>
- Bruice, P. Y. (2008), *Química Orgánica*. 5ta Ed. México: Pearson (p 757)
- Casares, A. (2010). *Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación*. Tesis de maestría, Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Química, Barcelona, España.
- Castro-Ochoa, D.\ Peña-Montes, C.\ Farrés, A. (2010) *Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para Biocatálisis a nivel industrial*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, V: 13. pp: 16-25
- Chandel, C.\ Kumar, A.\ Kanwar, S. (2011) *Enzymatic synthesis of butyl ferulate by silica-immobilized lipase in a non-aqueous medium*, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, Vol. 2 No. 4, pp. 400-408.
- Choi, D. et al. (2010) *Caffeic acid phenethyl ester is a potent inhibitor of HIF prolyl hydroxylase: structural analysis and pharmacological implication*. Journal of Nutritional Biochemistry Vol: 21 pp. 809–817
- Clem A. G. & Doehler R. W. *Industrial applications of bentonite*. Recuperado de URL: <<http://www.clays.org/journal/archive/volume%2010/10-1-272.pdf>>
- Compton, D.\ Laszlo, J.\ Berhow, M. (2000). *Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters*. Journal of the American Oil Chemists' Society. V. 77, No 5, pp 513-519
- De Jesús, A. (2008) *Estudio sobre la aplicación de una arcilla superácida (SACS), para disminuir la contaminación ambiental causada por ácidos inorgánicos y minerales en síntesis y procesos*. Tesis Maestría. IPN. México D. F.

- Domínguez, M. (2008) *Efecto del éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro*. Tesis maestría. IPN. México D.F.
- Durst, H.D\ Gokel, G. W. (2007), *Química Orgánica Experimental*. Barcelona, España: Editorial Reverté. (p 209)
- Figueroa-Espinoza, M.\ Villeneuve, P. (2005) *Phenolic acids enzymatic lipophilization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 53 (8) pp: 2779-87
- García, F. J. (2005). *Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes*. Tesis doctoral europea, Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Murcia, España.
- Garrido, J. et al. (2012) *Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress*. Biochemie. V. 94, pp. 961-967
- Gil, A. (2010) *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Tomo II, Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. p 401
- González, K. E. (2009) *Obtención y esterificación de dímeros de ácido ferúlico*. Tesis Licenciatura (Químico de Alimentos) UNAM, Facultad de Química, México, D. F.
- Griffin Jr., R. W. (1981), *Química orgánica moderna*. Barcelona, España: Editorial Reverté. (p 380)
- Kapteyn, J. \ Qualley, A.\ Xie, Z.\ Fridman, E.\ Dudareva, N.\ Gang, D. (2007) *Evolution of cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate*. The Plant Cell, Vol. 19: pp: 3212–3229
- Karamać M.\ Buciński, A.\ Pegg, R.\ Amarowicz, R. (2005) *Antioxidant and antiradical activity of ferulates*. Czech J. Food Sci., V. 23 No 2: pp 64–68.

- Li, N.-G.\ Shi, Z.\ Tang, Y.\ Li, B.\ Duan, J. (2009) *Highly efficient esterification of ferulic acid under microwave irradiation*. *Molecules*. V. 14, no. 6: pp 2118-2126
- Li, W. et. al. (2012) *Biological activity evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. V. 22, pp 6085–6088.
- Molina, V.\ Moronta, A. (2008) *Isomerización de 1-buteno catalizada por nanoarcillas ácidas*. *CIENCIA* Vol. 16, pp: 344 – 353.
- Otera, J. (2003) *Esterification. Methods, reactions and applications*. Weinheim. Ed WILEY-VCH.
- Pérez-Victoria, I. (2006). *Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos*. (Tesis Doctoral, Universidad de Granada), recuperada de <http://digibug.ugr.es/handle/10481/971>
- Priya, K., Chadha, A. (2003). *Synthesis of hydrocinnamic esters by Pseudomonas cepacia lipase*. Elsevier. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 32 pp. 485–490
- Ramírez, G. (2010) *Química del ácido ferúlico: Cuantificación y obtención a escala preparativa a partir de nejayotes de maíces criollos y ampliación de su diversidad estructural*. Tesis Licenciatura (Químico de Alimentos) UNAM, Facultad de Química, México, D. F.
- Ruiz, R.\ Cárdenas, J.\ Bautista, L.\ Vargas, M.\ Vázquez, E.\ Salmón M. (2006), *Catalytic synthesis of 1,3,5-triphenylbenzenes,  $\beta$ -methylchalcones and 2,4,6-triphenyl pyrylium salts, promoted by a super acid triflouromethane sulfonic clay from acetophenones*. *Journal of the Mexican Chemical Society*. Vol. 50(3), pp: 114-118
- Song, K.\ Kim, M.\ Koh, J. (2011) *Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities*. *Journal of Dermatological Science*. V. 63, No 1, pp:17-22

- Sultana, R. (2012) *Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders*. Biochimica et Biophysica Acta. V. 1822, No 5, pp 748–752
- Torres A. (2009) *Estudio de la resolución enantio- y quimioselectiva de mezclas racémicas de moléculas bifuncionales*. Tesis de Doctorado en Ciencias. UNAM Cuernavaca, Morelos.
- Vafiadi, C.\ Topakas, E.\ Alissandratos, A.\ Faulds, C.\ Christakopoulos, P. (2008). *Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation*. Journal of biotechnology. V. 133 pp 497 – 504
- Vargas-Rodríguez, Y., et. al. (2008). *Caracterización espectroscópica, química y morfológica y propiedades superficiales de una montmorillonita mexicana*. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas, v. 25, núm. pp 135-144.
- Vermerris, W. \ Nicholson, R. (2008) *Phenolic compound biochemistry*. Ed. Springer pp 126 – 128.
- Villeneuve, P. (2007) *Lipases in lipophilization reactions*. Elsevier. Biotechnology Advances. Vol. 25, pp: 515–536
- Weitkamp, P.\ Vosmann, K.\ Weber, N. (2006). *Highly efficient preparation of lipophilic hydroxycinnamates by solvent-free lipase-catalyzed transesterification*. Journal of agricultural and food chemistry. V. 54, pp 7062 – 7068
- Xiang, M.\ Su, H.\ Hu, J.\ Yan, Y. (2011) *Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from Polygonum amplexicaule var. sinense*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(9), pp. 1685-1691
- Zang, L.\ Cosma, G.\ Gardner, H.\ Shi, X.\ Castranova, V.\ Vallyathan, V. (2000) *Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation*. American Journal of Physiology - Cell Physiology. V. 279. Pp C954-C960.

**Referencias electrónicas**

- Bowden, J. (2007) *The 150 healthiest food on earth: the surprising, unbiased truth about what you should eat and why*. pp. 151. Recuperado de URL: < <http://tinyurl.com/aqy5p7h>> [Consulta: Febrero 14, 2013]
- Chemical Book. [En línea] Base de datos disponible en URL: < <http://www.chemicalbook.com/>> [Consulta: Diciembre 16, 2012]
- Domínguez, J., Schifter, I. [En línea] *¿Qué son las arcillas?* Texto recuperado de URL: <[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/109/html/sec\\_6.html](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/109/html/sec_6.html)> [Consulta: 16 Noviembre 2012]
- García E. [En línea] *Las arcillas: Propiedades y usos*. Texto recuperado de URL: <<http://www.uclm.es/users/higueras/yymm/arcillas.htm>> [Consulta: 12 Noviembre 2012]
- IARC (1993) *IARC Monographs on the evaluation on carcinogenic risks to humans; Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxines*. Volume 56 pp 115 – 134. Recuperado de URL: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>> [Consulta: 7 Marzo 2013]
- Khattab, R. (Octubre, 2009) *Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography*. Journal of the American Oil Chemists' Society. Recuperado de URL : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815801/>> [Consulta: 5 Noviembre 2012]
- LookChem. [En línea] Look for Chemicals, Base de datos disponible en URL: < <http://www.lookchem.com/Methyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate/>> [Consulta: Diciembre 16, 2012]
- Olthof, M. et al. (2000) *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. The American Society for Nutritional Sciences. The Journal of Nutrition. Recuperado de URL: < <http://jn.nutrition.org/content/131/1/66.full>> [Consulta: 13 Enero 2013]

- Poizat, L. et al. (1940) *Alkiyl esters of 3-methoxy-coumaric acid and pharmaceutical compositions containing same*. United States Patent Office 2213717. Recuperado de URL: < <http://preview.tinyurl.com/ceezyrh>> [Consulta: 7 Marzo 2013]
- Rahman, A. (2003) *Studies in natural products chemistry. Bioactive natural products (part I)*. Ed. Elsevier. Vol 28. pp 262. Recuperado de URL: <<http://tinyurl.com/bhx2l44>> [Consulta: Febrero 14, 2013]
- Sigma-Aldrich. [En línea] Base de datos disponible en URL: < <http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>> [Consulta: Diciembre 16, 2012]