



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE FLAVONOIDES

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. JAZMIN PINEDA LOPERENA

TUTOR:
ARTURO NAVARRO OCAÑA
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente Dra. Amelia Farrés González Sarabia

Vocal M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Vocal Dr. Edmundo Castillo Rosales

Vocal Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Secretario Dr. Miquel Gimeno Seco

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio 321, Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Congresos

XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2013 en la modalidad de cartel. Enzymatic Transesterification of Flavonoids. Cancún, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por haberme permitido construir nuevo conocimiento y forjarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios (Becario 273484).

Al apoyo económico de CONACyT 2012-CB180128.

Al Dr. Arturo Navarro por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y guiarme durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado de examen de grado, Dra. Amelia Farrés González Sarabia, M. en C. Emma Maldonado Jiménez, Dr. Edmundo Castillo Rosales, Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dr. Miquel Gimeno Seco por sus valiosas aportaciones para la corrección del trabajo de tesis.

A la Dra. Amelia Farrés y Dra. Carolina Peña por su apoyo en la realización de las pruebas enzimáticas.

Al Dr. Daniel Arrieta del Centro de Nanociencias y Micro y NanoTecnología por el apoyo en los análisis de CLAR-EM.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 321 por su apoyo y aportaciones a este trabajo.

CON INFINITO AMOR Y AGRADECIMIENTO

*A mi padre por todo lo que me enseñaste y forjarme como la persona que ahora soy
A mi madre por ser mi ejemplo y apoyarme incondicionalmente cada paso de mi
vida.*

A mi hermano Gustavo por todo lo que hemos compartido, el apoyo y el cariño.

A Oscar por apoyarme siempre y compartir esta etapa de mi vida.

A todos aquellos que directa e indirectamente formaron parte de este trabajo

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE GRÁFICOS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 Flavonoides.....	3
1.1.1 Estructura y clasificación de flavonoides.....	3
1.1.2 Biosíntesis	5
1.1.3 Funciones de los flavonoides	6
1.1.4 Propiedades de los flavonoides	6
1.1.5 Naringina	7
1.1.6 Rutina	8
1.2. Generalidades de la reacción de transesterificación.	9
1.2.1 Transesterificación química	10
1.2.2 Transesterificación enzimática.....	11
1.3. Transesterificación enzimática de flavonoides	11
1.3.1 Factores que afectan la transesterificación enzimática.	12
1.3.1.1 Tipo de enzima	12
1.3.1.1.1 Lipasas	14
1.3.1.1.2 Condiciones de reacción.....	15
1.3.1.1.3 Estructura del flavonoide y el donador de acilo	16
1.4 Lipasas vegetales	18
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. OBJETIVOS.....	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
5.1 Materiales y Equipos.....	23
5.2 Diagrama General.....	24

5.3 Procedimiento	25
5.3.1 Reacciones de esterificación y transesterificación	25
5.3.2 Obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos vía enzimática	25
5.3.3 Purificación de ésteres metílicos de ácidos grasos	25
5.3.4 Identificación de ésteres metílicos mediante CG-MS	26
5.3.5 Análisis por CLAR-IES ⁻	26
5.3.6 Purificación de ésteres de naringina y rutina.....	26
5.3.7 Caracterización de los productos por RMN.....	26
5.3.8 Preparación de los materiales vegetales para la obtención de lipasas .	27
5.3.9 Evaluación cualitativa de actividad enzimática.....	28
5.3.10 Cuantificación de la actividad enzimática.....	28
5.3.11 Evaluación de lipasas vegetales en la reacción de transesterificación de flavonoides	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Selección de las condiciones de reacción.....	30
6.2 Reacciones de transesterificación de naringina y rutina con ácidos grasos presentes en aceites.....	33
6.2.1 Análisis mediante CLAR-IES ⁻	34
6.2.2 Purificación de los productos de reacción	37
6.2.3 Identificación de los ésteres de flavonoides por RMN	40
6.3 Obtención de ésteres metílicos de los ácidos grasos	56
6.4 Reacciones de transesterificación de naringina y rutina con los ésteres metílicos de ácidos grasos.....	60
6.5 <i>Screening</i> de fuentes vegetales para la obtención de lipasas	63
6.6 Transesterificación de flavonoides catalizada por enzimas vegetales	67
VII. CONCLUSIONES	71
VIII. REFERENCIAS	72
IX. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de flavonoides y su estructura	4
Tabla 2. Métodos para llevar a cabo la reacción de transesterificación.	10
Tabla 3. Algunas enzimas utilizadas para la esterificación de flavonoides	13
Tabla 4. Algunos disolventes utilizados como medios de reacción para la modificación de flavonoides.....	16
Tabla 5. Sitio potencial de acilación de rutina, esculina y hesperidina con CALB	17
Tabla 6. Métodos experimentales para la esterificación de flavonoides.....	30
Tabla 7. Aceites seleccionados para la reacción de transesterificación.....	33
Tabla 8. Resultados obtenidos de la purificación de los productos de reacción	37
Tabla 9. Datos espectroscópicos de 6''-O-caproato de naringina.....	41
Tabla 10. Datos espectroscópicos de 4'''-O-caproato de rutina	44
Tabla 11. Datos espectroscópicos de 6''-O-miristato de naringina	47
Tabla 12. Datos espectroscópicos de 4'''-O-miristato de rutina	48
Tabla 13. Datos espectroscópicos de 6''-O-oleato de naringina	50
Tabla 14. Datos espectroscópicos de 4'''-O-oleato de rutina.....	52
Tabla 15. Datos espectroscópicos de los productos de naringina y rutina obtenidos con los ácidos linoleico y linolénico	54
Tabla 16. Datos espectroscópicos de los productos de naringina y rutina obtenidos con el aceite de ricino.....	55
Tabla 17. Resultados del análisis CG-EM para los ésteres metílicos de ácidos grasos....	59
Tabla 18. Rendimientos obtenidos para la esterificación de flavonoides utilizando como agentes acilantes a los ésteres metílicos de los ácidos grasos	62
Tabla 19. Productos obtenidos utilizando los ésteres metílicos de ácidos grasos para la transesterificación.....	62
Tabla 20. Cuantificación de actividad enzimática de esterasa y lipasa	64
Tabla 21. Resultados obtenidos para para la transesterificación de flavonoides con lipasas vegetales.....	67
Tabla 22. Datos espectroscópicos de naringina.....	80
Tabla 23. Datos espectroscópicos de rutina.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general del esqueleto flavonólico.....	3
Figura 2. Estructuras de los tres grupos principales de flavonoides.....	4
Figura 3. Formación biosintética de flavonoides	5
Figura 4. Estructura de la naringina	8
Figura 5. Estructura de la rutina	8
Figura 6. Ecuación general para la reacción de transesterificación.....	9
Figura 7. Reacción de esterificación y transesterificación de flavonoides	12
Figura 8. Mecanismo de reacción CALB	15
Figura 9. Cromatoplaqueta obtenida de las reacciones de transesterificación con 3 diferentes concentraciones de enzima.....	31
Figura 10. Cromatoplaqueta obtenida para la reacción de transesterificación en 3 diferentes disolventes.....	32
Figura 11. Cromatografía en capa fina para la reacción de transesterificación de naringina con diferentes ácidos grasos.....	34
Figura 12. Cromatograma de la reacción de naringina utilizando los ácidos grasos del aceite de coco como agente acilante.....	35
Figura 13. Espectros de masas obtenidos para los compuestos de la mezcla de reacción naringina/aceite de coco.	35
Figura 14. Cromatograma de la reacción de naringina utilizando los ácidos grasos del aceite de chía como agente acilante	36
Figura 15. Espectro de masas obtenido para el compuesto 3 de la mezcla de reacción naringina/aceite de chía.	36
Figura 16. Estructura de naringina y rutina.....	39
Figura 17. Espectro de RMN- ¹ H de 6''-O-caproato de naringina	42
Figura 18. Espectro de RMN- ¹³ C de 6''-O-caproato de naringina	43
Figura 19. Cromatografía en capa fina de la obtención de metil ésteres vía enzimática ...	57
Figura 20. Análisis por el método CG-EM de la transesterificación de aceite de olivo	58
Figura 21. Patrón de fragmentación del metil oleato.....	58
Figura 22. Rearreglo de McLafferty	59
Figura 23. Espectro de masas obtenido para el metil ricinoleato	60
Figura 24. Cromatografía en capa fina para la reacción de naringina con diferentes agentes acilantes.....	61

Figura 25. Resultados obtenidos de la prueba rápida de actividad enzimática.....	64
Figura 26. CCF Reacción de transesterificación catalizada por semillas de ricino	68
Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H del 6''-O-oleato de naringina	82
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C del 6''-O-oleato de naringina	83
Figura 29. Espectro de RMN- ¹ H de 4'''-O-oleato de rutina	84
Figura 30. Espectro de RMN- ¹³ C de 4'''-O-oleato de rutina	85
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H del 6''-O-linoleato de naringina	86
Figura 32. Espectro de RMN- ¹³ C del 6''-O-linoleato de naringina	87
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H de 4'''-O-linoleato de rutina	88
Figura 34. Espectro de RMN- ¹³ C de 4'''-O-linoleato de rutina	89

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad enzimática durante la germinación del grano de maíz	66
Gráfico 2. Actividad enzimática durante la germinación del grano de frijol	66
Gráfico 3. Actividad enzimática durante la germinación del grano de trigo	66

LISTA DE ABREVIATURAS

aw	Actividad acuosa
°C	Grados centígrados
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipasa B
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
CLAR-IES ⁻	Cromatografía de líquidos de Alta Resolución acoplada a masas
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DMSO-d ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
e.V.	Electrón voltio
h	Horas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
THF	Tetrahidrofurano
U	Unidad de actividad enzimática

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad la modificación de flavonoides, en específico naringina y rutina, mediante reacciones catalizadas por lipasas en medios no acuosos, utilizando como agentes acilantes ácidos grasos y sus ésteres metílicos, de diferente longitud de cadena y grado de insaturación (C10, C14 y C18:1, C18:2 y C18:3).

La selección del disolvente y la cantidad de enzima para llevar a cabo la reacción, se realizó cualitativamente por medio de CCF, evaluando tres métodos, en las condiciones de reacción evaluadas el disolvente que brindó los mejores resultados fue el 2-metil-2-butanol.

Se logró transesterificar a los flavonoides con la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada, utilizando distintos aceites como fuente de ácidos grasos para llevar a cabo la reacción, obteniendo como resultado la modificación de ambos flavonoides, siendo el producto mayoritario el de la esterificación con el ácido graso presente en mayor proporción para la mayoría de los aceites (aceite de coco, nuez moscada, olivo, almendra, uva, calabaza, chía, linaza y ricino).

Mediante RMN (^1H y ^{13}C) se logró identificar el sitio de acilación de la naringina que se llevó a cabo en la posición 6 de la fracción de glucosa, mientras que para la rutina el sitio tuvo lugar en la posición 4 de la ramnosa.

Los rendimientos más altos para ambos flavonoides se alcanzaron con el ácido decanoico y con los de tamaño de cadena de 18 carbonos (36-40% para naringina y entre 30-36% para rutina). Los rendimientos fueron determinados con base en el producto puro obtenido.

Se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos por medio de una reacción catalizada por la lipasa de *C. antarctica* y su identificación se realizó mediante CG-EM; posteriormente fueron utilizados para la transesterificación de los flavonoides. Con el uso de los ésteres metílicos no se observó diferencia en los rendimientos respecto a los obtenidos con los ácidos grasos.

Se realizó una búsqueda de fuentes vegetales para la obtención de lipasas, utilizando como parámetro de selección su actividad enzimática de lipasa. Con base en los

resultados se eligieron los polvos cetónicos de los germinados de maíz (14.45 U/g de semilla), trigo (14.34 U/g de semilla) y frijol (7.25 U/g de semilla) además de las semillas de ricino (46.45 U/g de semilla) y papaya (10.02 U/g de semilla)

Los resultados mostraron que únicamente las semillas de *Ricinus communis* fueron capaces de llevar a cabo la reacción de modificación de la naringina con ácido láurico y los ácidos oleico y ricinoleico, bajo las condiciones analizadas.

I. ANTECEDENTES

1.1 Flavonoides

1.1.1 Estructura y clasificación de flavonoides

El término flavonoide denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Éstos juegan un papel trascendental dentro del reino vegetal ya que tienen funciones muy importantes dentro del desarrollo de las plantas en donde se encuentran.

Químicamente se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general $C_6-C_3-C_6$ o, más específicamente, un fenilbenzopirano funcionalizado (Figura 1) (Oyvind & Kenneth 2006).

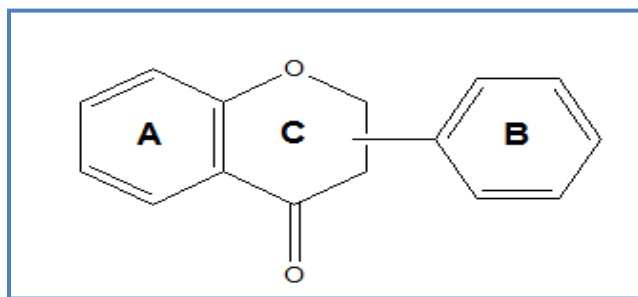


Figura 1. Estructura general del esqueleto flavonólico (Oyvind & Kenneth 2006)

Dependiendo de la posición del anillo aromático (B) con respecto al resto del benzopirano (A y C), este grupo de productos naturales puede dividirse en tres clases: 1) los flavonoides (2-fenilbenzopiranos), 2) isoflavonoides (3-benzopiranos), y 3) los neoflavonoides (4-benzopiranos) (Figura 2). Los tipos de flavonoides están relacionados por una ruta biosintética común, que incorpora precursores de la ruta del shikimato y del acetato-malonato. Posteriores modificaciones incluyen reacciones de metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación (Grotewold 2006).

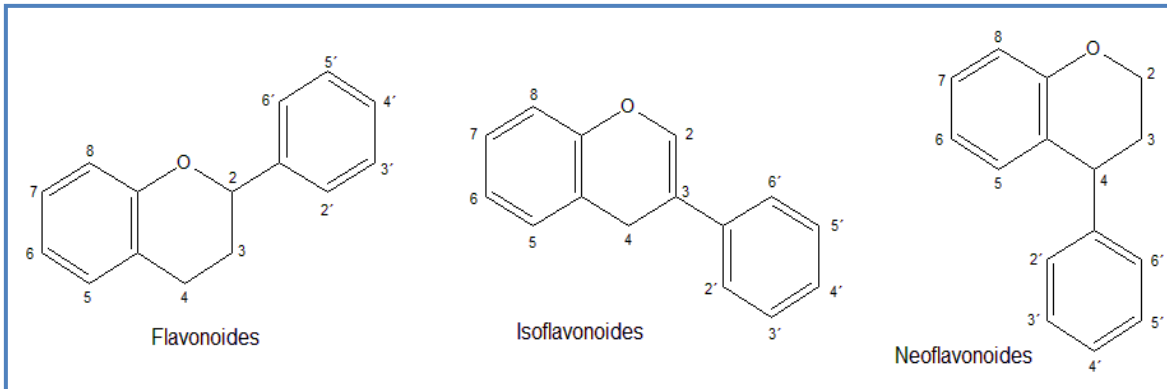


Figura 2. Estructuras de los tres grupos principales de flavonoides (Grotewold 2006)

Con base en el grado de oxidación y saturación que presenta el heterociclo (C) los flavonoides (2-fenilbenzopiranos) pueden subdividirse a su vez en varios grupos, que se muestran en la Tabla 1 con algunos ejemplos.

Tabla 1. Ejemplos de flavonoides y su estructura (Cartaya & Reynaldo 2001)

Nombre	Ejemplos	Estructura
Antocianidinas	Luteolinidina Cianidina	
Flavanonas	Hesperidina Naringina	
Flavonas	Luteolina Apigenina	
Flavonoles	Kaemferol Rutina	

1.1.2 Biosíntesis

Los flavonoides han sido asignados al grupo de compuestos de origen metabólico mixto ya que se ha demostrado mediante experimentos de marcaje isotópico que los 6 carbonos del anillo B y 3 carbonos del anillo C (C-2, C-3 y C-4) provienen del ácido shikímico. En cambio, los 6 carbonos del anillo A provienen de la vía del acetato.

Según se sabe actualmente, la construcción del esqueleto flavonoide comienza como una cadena policetídica en la que el ácido cinámico, o más a menudo, el *p*-cumárico actúan como la unidad iniciadora, lo que explica que las posiciones 5, 7 y 4' estén casi siempre ocupadas por grupos OH, aunque existen procesos de oxigenación posterior.

La unidad iniciadora es alargada posteriormente con tres fragmentos de malonato, que subsecuentemente sufre un plegamiento mediante aldolización intramolecular que lleva a la estructura de chalcona, esta etapa del proceso es catalizada por una enzima llamada chalcona sintetasa. Posteriormente las chalconas experimentan una adición intramolecular, que es catalizada de manera estereoespecífica por una chalcona isomerasa, lo que da origen a las flavanonas (Figura 3), éstas experimentan posteriormente procesos de oxidación o deshidrogenación para dar lugar a las demás clases de flavonoides. (Marco 2006). Además de estos procesos básicos se suelen producir otras transformaciones adicionales tales como su alquilación, glicosilación, prenilación, etc.

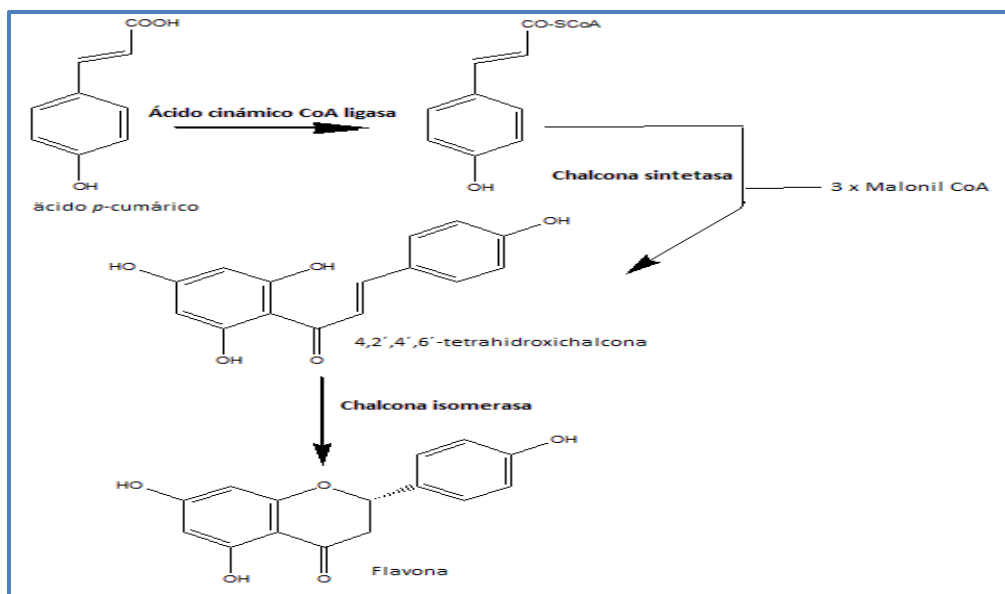


Figura 3. Formación biosintética de flavonoides (Marco 2006)

1.1.3 Funciones de los flavonoides

Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas. Se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos y sus funciones se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa, papel de señal química y efecto sobre las enzimas.(Cartaya & Reynaldo 2001)

Los flavonoides juegan un papel en la defensa de las plantas frente a agentes externos, como la radiación UV, los microorganismos, tanto bacterias como hongos así como insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas y el entorno. También actúan como señales químicas o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando la polinización (Peters, Frost & Long 1996).

Se piensa que los flavonoides participan en la fase luminosa de la fotosíntesis como catalizadores del transporte electrónico y/o como reguladores de canales de iones en la fotofosforilación. Cuando las células fotosintetizadoras mueren, los flavonoides son excretados y aparecen en la savia de las plantas, en la miel y en la resina. De ahí que los propóleos fabricados por las abejas sean materiales ricos en compuestos flavonoides (Rice-evans et al. 1995).

1.1.4 Propiedades de los flavonoides

Así como se han estudiado los efectos benéficos que aportan los flavonoides en las plantas, existen diversas investigaciones para observar la relación que tienen con otros organismos. En su relación con el hombre se han observado principalmente propiedades farmacológicas.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto mediante su inclusión en la dieta su importancia como antioxidantes naturales y su papel benéfico, en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer actuando a diferentes niveles dentro del proceso de inducción y proliferación de los tumores (Benavente-García et al. 1997).

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Numerosas evidencias apuntan hacia la protección del ADN ejercida por los flavonoides,

al inhibir los efectos oxidativos que provocan las especies reactivas de oxígeno sobre esta biomolécula (Martínez-Flores et al. 2002).

Se han realizado análisis del incremento en el consumo de flavonoides en relación con las enfermedades cardiovasculares y se estima que la incidencia en la tasa de infarto al miocardio disminuyó en un 11% cuando se realizó un incremento en el consumo de flavonoides. Además se ha relacionado con un menor riesgo de accidente cerebrovascular y mortalidad (Hodgson & Croft 2010).

También se ha evaluado su capacidad de inhibir ciertos patógenos como los que se pueden localizar en la cavidad oral, donde se ha observado que los flavonoides, en particular cierto grupo de antocianidinas presentes en el arándano, son capaces de inhibir la formación de biopelículas que es lo que les proporciona resistencia a este tipo de bacterias (Riihinen et al. 2014).

Debido a los efectos benéficos que producen estos compuestos ha sido de gran interés poder utilizarlos en la industria, aunque existe un inconveniente al respecto ya que presentan baja solubilidad tanto en sistemas polares como no polares lo que reduce su espectro de uso (Ardhaoui et al. 2004). Se ha buscado la modificación de estas moléculas para aumentar su lipofilicidad y potenciar algunas de sus propiedades, la principal herramienta para alcanzar estos objetivos ha sido el uso de reacciones de esterificación y transesterificación de estas moléculas con una amplia gama de compuestos.

1.1.5 Naringina

La naringina es un flavonoide 7-O-glicósido entre la flavanona naringenina y el disacárido formado por L-ramnosa y D-glucosa (Figura 4) que se encuentra en el zumo de cítricos, con su presencia les da su sabor amargo característico. Esta molécula tiene muchas aplicaciones farmacológicas, que incluyen actividad anti-microbiana, anti-hipercolesterémica, anti-cancerígena, etc. (Zhang et al. 2012).

En la industria de alimentos es utilizada para dar sabor y su estudio sigue vigente por su propiedad antioxidante como estabilizante de aceites.

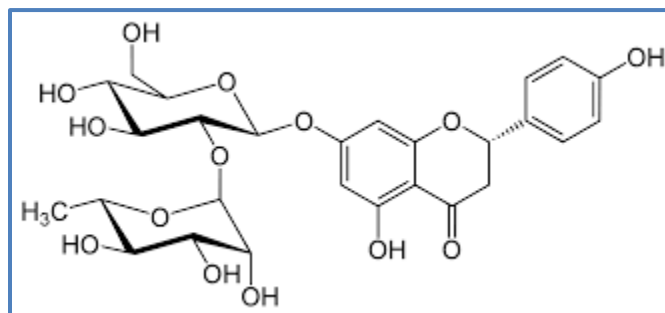


Figura 4. Estructura de la naringina (Passicos, Santarelli & Coulon 2004)

El espectro de usos de este flavonoide conlleva a realizar estudios para mejorar su solubilidad en medios no polares, para ello se han realizado trabajos de su esterificación con ácidos grasos de diferentes tamaños de cadena (Kontogianni et al. 2001).

1.1.6 Rutina

La rutina es el glucósido conformado por el flavonol quercetina y el disacárido rutinosa formado por D-glucosa y L-ramnosa (Figura 5) que se encuentra en varias plantas como en algunas especies del género *Asparagus* así como en la cebolla, manzana, té y vino (Chua 2013).

Se ha reportado que la rutina tiene varias propiedades farmacológicas tales como antioxidante, citoprotectora, vasoprotectora, antiproliferativa y cardioprotectora (de Araújo et al. 2013). Esta molécula ha sido biotransformada para mejorar sus propiedades antioxidantes y su solubilidad en disolventes no polares para ampliar su uso (Kontogianni et al. 2003).

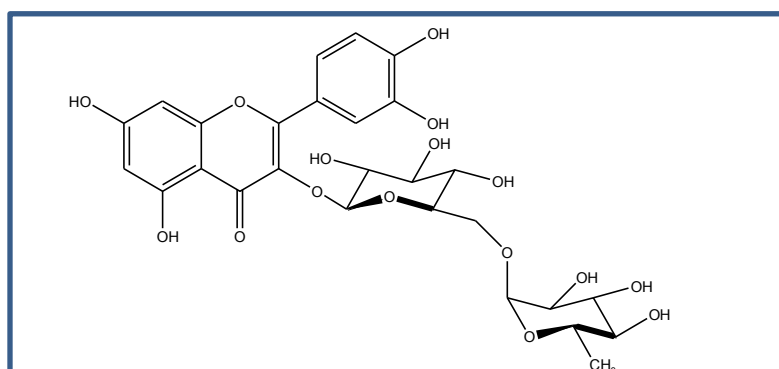


Figura 5. Estructura de la rutina (Viskupicova, Sturdik & Ondrejovic 2009)

1.2. Generalidades de la reacción de transesterificación.

La transesterificación es el término general utilizado para describir una clase importante de reacciones orgánicas en donde un éster es transformado en otro a través de intercambiar el grupo acilo de un éster con el grupo acilo de un alcohol u otro éster (Figura 6) (Schuchardt, Sercheli, & Matheus 1998).

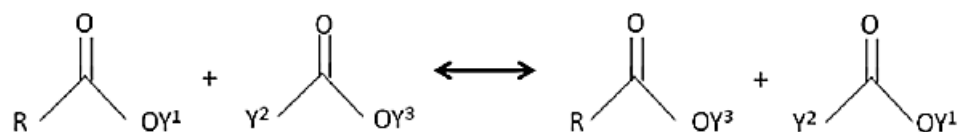


Figura 6. Ecuación general para la reacción de transesterificación

Esta reacción se utiliza para diferentes propósitos, ya que los ésteres poseen diferentes atributos que son de interés industrial. Uno de los mejores ejemplos del uso de esta reacción es la obtención de biodiesel por medio de la transesterificación de ácidos grasos presentes en fuentes renovables de lípidos, el cual aparece como una alternativa biodegradable y no contaminante para su uso como combustible de vehículos automotores (Gog et al. 2012).

También se ha utilizado para mejorar características tales como la capacidad antioxidante, la polaridad, la actividad farmacológica, etc., de diversas moléculas como por ejemplo ácidos fenólicos para aumentar su lipofilia y, en consecuencia, para obtener antioxidantes multifuncionales con mayor bioactividad y biodisponibilidad (Hernandez et al. 2009).

La transesterificación puede ser catalizada por la adición de un ácido o base pero también puede llevarse a cabo con la ayuda de enzimas (biocatálisis). Las estrategias más utilizadas para llevar a cabo este tipo de reacciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos para llevar a cabo la reacción de transesterificación.

Método	Ejemplos
Químico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Síntesis de Fischer ✓ Catálisis heterogénea
Biocatalítico	Utilizando enzimas como: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Lipasas ✓ Feruloilesterasas ✓ Esterasas

1.2.1 Transesterificación química

Existen varios métodos para llevar a cabo las reacciones de esterificación y transesterificación vía catálisis química. Para llevar a cabo estas reacciones se utilizan diversos disolventes (THF, Dioxano, etc.) además de ácidos o bases como catalizadores el mejor ejemplo de estas reacciones es la esterificación de Fischer que consiste en la formación de un éster por reflujo de un ácido carboxílico y un alcohol, en presencia de un catalizador ácido, que generalmente es ácido sulfúrico o ácido clorhídrico concentrado (Smith & March 2007).

Estas reacciones químicas poseen serias desventajas ya que además de no ser consideradas amigables para el medio ambiente son poco selectivas.

Dentro de la catálisis heterogénea el uso de las arcillas súper ácidas es una de las principales alternativas para esterificar moléculas, aunque para la activación de estas también se requiere el uso de ácidos, como el trifluorometansulfónico (Vargas-Rodríguez et al. 2008).

El uso de disolventes como THF o dioxano, catalizadores como la piridina, ácidos y bases fuertes y que estos no sean renovables son las causas principales por las que se han buscado alternativas más verdes para llevar a cabo reacciones de esterificación y transesterificación.

1.2.2 Transesterificación enzimática

La síntesis de moléculas orgánicas usando como catalizadores de la reacción a las enzimas se denomina como biotransformación. Las biotransformaciones de las moléculas orgánicas no se limitan únicamente al uso de enzimas aisladas, también pueden ser catalizadas por otros sistemas biológicos, incluyendo células y anticuerpos específicos (Wells 2012).

Las enzimas presentan a menudo una quimio- regio- y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química brindando así una alternativa a los métodos químicos convencionales. Las biotransformaciones han llegado también al campo de las reacciones de esterificación y transesterificación, el mejor ejemplo es la producción de biodiesel (Gog et al. 2012).

A pesar de ser una excelente alternativa para la síntesis orgánica el uso de la biocatálisis tiene varios aspectos que hay que considerar como el tipo de enzima, las condiciones de reacción y el tipo de sustratos.

1.3. Transesterificación enzimática de flavonoides

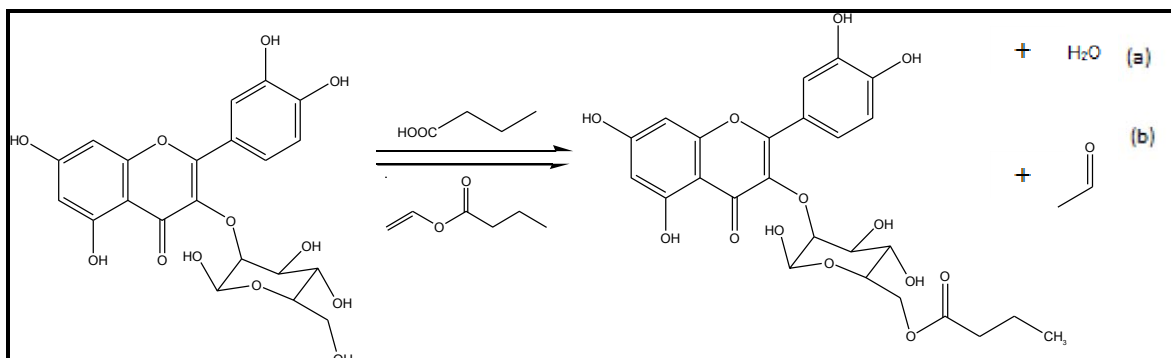
Además de aumentar su lipofiliidad, se ha observado que los flavonoides que se encuentran altamente acilados son más estables a factores ambientales como luz, pH y presencia de oxígeno (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos 2004), por lo que la esterificación de estas moléculas resulta muy atractiva.

Los flavonoides han sido acilados con diferentes compuestos, principalmente con ácidos orgánicos de diferente longitud de cadena y aromáticos, sustituidos o no. Aunque se ha dado un enfoque especial al uso de ácidos grasos y los ésteres metílicos de algunos de ellos para llevar a cabo la esterificación y la transesterificación de los flavonoides (Figura 7) (Viskupicova, Ondrejovic, & Maliar 2012).

Un ejemplo de estas biotransformaciones es la acilación de isoquercitina con ácidos grasos de diferente tamaño (C4-C18) catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada, esto para observar la actividad biológica de cada uno de estos ésteres,

donde también se observó un aumento en su solubilidad en disolventes orgánicos (Salem et al. 2010).

Figura 7. Reacción de a) esterificación y b) transesterificación de flavonoides (Viskupicova, Sturdik, & Ondrejovic 2009)



1.3.1 Factores que afectan la transesterificación enzimática.

Los factores clave que influyen en la esterificación y transesterificación enzimática, incluyen el tipo y concentración de enzima, la estructura y concentración de los sustratos, la naturaleza del medio de reacción, contenido de agua en el medio y temperatura de reacción (Chebil et al. 2006).

1.3.1.1 Tipo de enzima

Naturalmente la acilación de los flavonoides se lleva a cabo por las enzimas aciltransferasas, pero a nivel de laboratorio resulta complicado trabajar con estas enzimas ya que como agentes de síntesis tienen un inconveniente, requieren su correspondiente cofactor (acil coenzima A), que debe estar en cantidades estequiométricas o tiene que ser regenerada *in situ*.

Se han buscado alternativas para llevar a cabo este tipo de reacciones, ya que existen algunas enzimas que tienen la capacidad de catalizarlas en disolventes no acuosos, existen principalmente tres grupos de enzimas que han sido utilizadas para este propósito: 1) proteasas, 2) esterasas y 3) lipasa. A pesar de que su principal función es la de llevar a cabo la hidrólisis de sus sustratos, en condiciones especiales estas son capaces de promover la formación del éster.

Algunos de los estudios que se han realizado para modificar los flavonoides se presentan en la Tabla 3. Las proteasas tienen un amplio campo de aplicación en la industria pero en la modificación de flavonoides han sido poco utilizadas. Se reportó el uso de subtilisina para la modificación de naringina, rutina y hesperidina pero no se obtuvieron buenos porcentajes de conversión. (Danieli, De Bellis, Carrea, & Riva, 1990)

Las esterasas han sido poco utilizadas para llevar a cabo estas reacciones debido a su afinidad por sustratos de cadena corta y en este caso lo que se prefiere es incrementar lo mayormente posible la lipofilicidad de los compuestos de estudio.

Tabla 3. Algunas enzimas utilizadas para la esterificación de flavonoides (Modificado de Chebil et al., 2006)

Enzima	Recurso de la enzima	Flavonoide	Donador de acilo	Rendimiento (%)	Referencias
Subtilisina (proteasa)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Isoquercetina Rutina Naringina	Trifluoroetil butirato	24-77	(Danieli et al. 1997)
Lipasa B	<i>Candida antarctica</i>	Isoquercetina Rutina Naringina	Ácidos esteárico, palmítico y láurico	70	(Otto et al. 2001)
Carboxilesterasa	<i>Streptomyces rochei</i>	Catequina	Acetato de etilo Palmitato de etilo	----	(Chebil et al. 2006)
Extracto celular	<i>Ipomoea batatas</i>	Isoquercetina	Ácido cafeíco, <i>p</i> -cumárico, ferúlico y cinámico	11-68	(Nakajima et al. 2000)

1.3.1.1.1 Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3 triacilglicerol hidrolasas) se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza ya que pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano y tienen la capacidad de promover la síntesis de ésteres en condiciones de baja actividad de agua, estas se han convertido en el grupo más utilizado de enzimas para la acilación de diversos compuestos en particular las de origen microbiano. (Villeneuve 2007)

Las lipasas a pesar de que pueden variar en su tamaño poseen características similares ya que se pliegan de una manera análoga y poseen sitios activos parecidos. Ellas comparten la triada catalítica (serina, histidina, aspártico o glutámico) que es la que les confiere su capacidad de catálisis.

La lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (CALB) es uno de los biocatalizadores más utilizados en síntesis orgánica tanto en el laboratorio y escala comercial esto debido a su capacidad de aceptar una amplia gama de sustratos, su tolerancia a medios no acuosos y resistencia a la desactivación térmica.

CALB está siendo utilizada con frecuencia en la acilación de varios compuestos naturales tales como sacáridos, esteroides y glucósidos naturales, entre ellos flavonoides. La esterificación de glicósidos de prunina, una flavanona, con acetato de vinilo se llevó a cabo con CALB y la lipasa de *Rhizomucor miehei*, con ello se pudo observar que *C. antarctica* resultó un biocatalizador más eficiente para llevar a cabo esta reacción obteniendo conversiones cercanas al 100%. (Céliz & Daz 2011)

Las lipasas tienen una especificidad por ácidos grasos de cadena larga a diferencia de las esterasas que prefieren los de cadena corta, por esta razón también se incrementa el uso de lipasas para esta reacción para incrementar el largo de la cadena con la que los flavonoides serán acilados. El mecanismo de reacción de CALB consiste básicamente en la reacción de la molécula de sustrato con la serina que se encuentra en el sitio activo de la enzima formando un intermedio tetraédrico que se estabiliza mediante los residuos de Histidina y Aspártico. En la siguiente etapa se libera el alcohol y se crea el complejo de acil-enzima. Un ataque nucleofílico (agua en la hidrólisis, el alcohol en la transesterificación) provoca la formación del intermediario tetraédrico. En la última etapa, el intermedio se divide en producto y enzima y se recupera para el próximo ciclo catalítico. (Figura 8) (Lutz 2004).

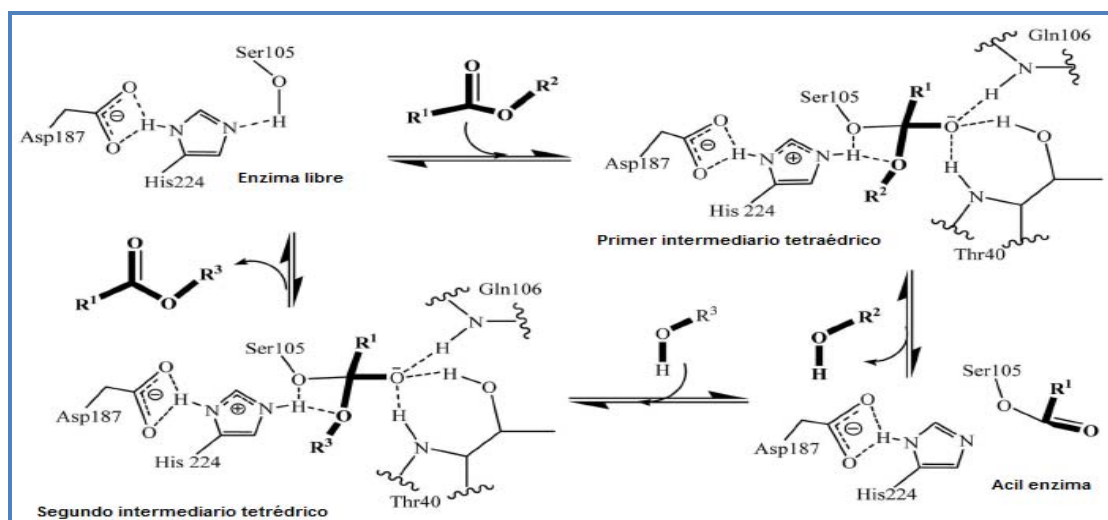


Figura 8. Mecanismo de reacción CALB (Viskupicova, Ondrejovic, & Maliar 2012)

1.3.1.2 Condiciones de reacción

Las condiciones de reacción juegan un papel muy importante para llevar a cabo la transformación de flavonoides ya que se busca un medio adecuado que permita la solubilidad apropiada del flavonoide (polar) y donador de acilo (no polar) así como la actividad enzimática más alta posible. Aunque en estos casos no se puede hablar de disolventes específicos se han estudiado varios para la reacción con flavonoides (Tabla 4), en los cuales se ha observado que la actividad de las lipasas fue mayor en disolventes hidrófobos que en los hidrófilos.

Se ha observado que el uso de disolventes como THF, DMSO y DMF que son de naturaleza polar aprótica, disminuyen considerablemente la actividad enzimática impactando directamente en los porcentajes de conversión (Nakajima et al. 1999).

Recientemente también se han empleado líquidos iónicos para brindar una alternativa más verde al uso de disolventes, su potencial radica en sus propiedades físico-químicas únicas, tales como que no son volátiles, no inflamables, estabilidad térmica y buena solubilidad para muchos compuestos orgánicos (Katsoura et al. 2006).

Tabla 4. Algunos disolventes utilizados como medios de reacción para la modificación de flavonoides

Disolvente	Flavonoide/donador de acilo	Aw del sistema
Acetona	Naringina/ácido octanoico, decanoico y dodecanoico (Kontogianni et al., 2001)	0.1
Tertbutanol	Rutina/ácido octanoico, decanoico y dodecanoico (Kontogianni et al., 2001)	0.1
2-metil-2butanol	Esculina/ ácido esteárico, láurico, mirístico y palmítico (Ardhaoui et al. 2004)	0.15

Además del tipo de disolvente es importante la actividad de agua (A_w) que posea el sistema de reacción, ya que la cantidad de agua presente puede alterar el equilibrio termodinámico de la reacción frente a la hidrólisis o la síntesis.

Para la acilación de flavonoides se ha encontrado que la actividad de agua que brinda buenos resultados se encuentra en los 200 ppm (Gayot, Santarelli, & Coulon 2003).

Dentro de las condiciones de reacción la temperatura siempre juega un papel muy importante y no es la excepción dentro de las biotransformaciones de los flavonoides, la elección de la temperatura dependerá del tipo de enzima y disolvente que se utilice. Para la lipasa de *C. antarctica* la mayoría de los autores manejan una temperatura de 60°C ya que encontraron una buena actividad enzimática y una buena solubilidad de los sustratos en el medio (Viskupicova, Sturdik & Ondrejovic 2009).

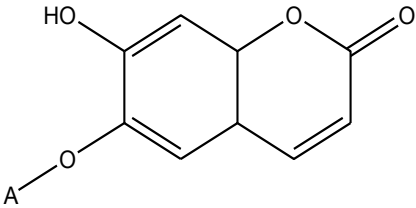
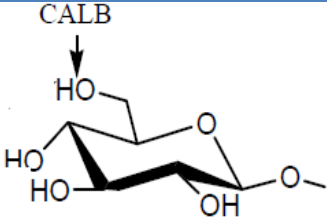
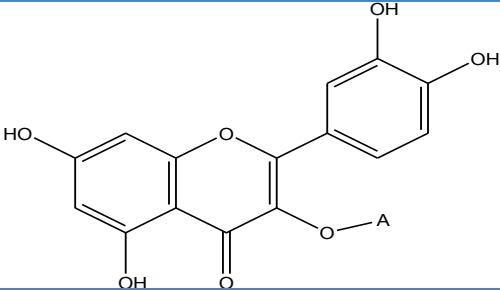
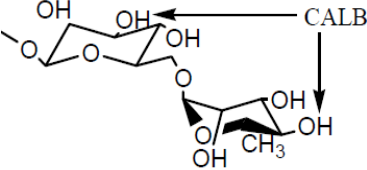
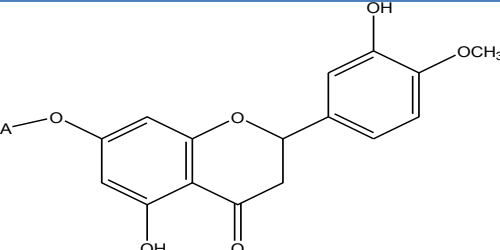
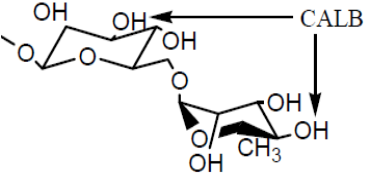
1.3.1.3 Estructura del flavonoide y el donador de acilo

La estructura del flavonoide desempeña un papel importante en la acilación de flavonoides, las diferencias estructurales, tales como el número y posición de los grupos hidroxilo, la naturaleza del resto de sacárido, así como la posición de los enlaces glicosídicos, influye en la solubilidad de flavonoides, y por lo tanto afecta el rendimiento de conversión (Chebil et al. 2007).

Diversos autores reportan que la regioselectividad depende del flavonoide en cuestión por lo que se ha reportado el sitio donde se lleva a cabo la esterificación para varios de estos compuestos. La esterificación de diferentes flavonoides (esculina, rutina y hesperidina) con ácido palmítico promovida por CALB indicó que los mejores rendimientos fueron obtenidos con esculina, debido a la presencia de un OH primario y una obstrucción estérica más débil (monosacárido), seguida por rutina y hesperidina (Tabla 5)

Esto depende tanto de la naturaleza del flavonoide como de la enzima que se utilice como catalizador ya que puede llegar a variar el sitio de acilación con el uso de una u otra lipasa.

Tabla 5. Sitio potencial de acilación de rutina, esculina y hesperidina con CALB (Modificada (Viskupicova, Sturdik & Ondrejovic 2009)

Flavonoide	Estructura	Sitio de acilación
Esculina		
Rutina		
Hesperidina		

A= Azúcar

La selección del donador de acilo adecuado puede influir significativamente no sólo en las propiedades fisicoquímicas, sino también biológicas de los ésteres resultantes. Por lo que se han utilizado ácidos de cadena corta, larga y aromáticos para llevar a cabo la modificación de los flavonoides.

Una forma sencilla de aumentar la velocidad de reacción y la conversión en la acilación es usar un exceso de donador de acilo. Muchos autores han tratado de determinar la relación molar óptima de flavonoide y donante de acilo a fin de lograr los rendimientos más altos posibles. El relaciones molares 1: 1 a 1:15 (flavonoide / donador de acilo) han sido investigados, mientras que el mayoría estuvo de acuerdo en la relación de 1: 5 para ser el más adecuado para el mejor rendimiento de reacción.(Mellou et al. 2006) (Ishihara & Nakajima 2003)

El efecto de la longitud de cadena del ácido graso en la acilación de flavonoides todavía permanece en debate ya que existen estudios donde se observó que la lipasa CALB tiene afinidad por los ácidos grasos de cadena larga (Ardhaoui et al. 2004) (Salem et al. 2010) pero también algunos trabajos presentan resultados contradictorios encontrando mayor afinidad de esta enzima hacia los ácidos grasos de cadena corta (Pleiss, Fischer, & Schmid 1998)

1.4 Lipasas vegetales

Recientemente las lipasas vegetales han sido foco de atención para ser utilizadas como biocatalizadores. En algunos casos, estas enzimas presentan ventajas sobre las de origen animal y microbianas debido a características tales como bajo costo, la disponibilidad y facilidad de purificación (Barros, Fleuri & Macedo 2010).

Las lipasas vegetales de mayor interés son aquellas que se encuentran en las semillas de las oleaginosas y de algunos granos, estas enzimas tienen funciones fisiológicas específicas en estos materiales vegetales. Las enzimas lipolíticas catalizan la primera etapa de la movilización de lípidos, para ser utilizados durante y después del período de germinación, por lo que se han realizado estudios para determinar en qué etapa de maduración de la semilla están mayormente presentes las lipasas (Salihu et al. 2012).

De 20% a 50% del peso seco de semillas oleaginosas es básicamente triacilglicéridos almacenados. Durante el período de germinación, los triacilglicéridos almacenados en los "oleosomas" se utilizan rápidamente en la producción de la energía para la síntesis de los azúcares, aminoácidos y cadenas de carbono requerido para el crecimiento embrionario por lo que se ha visto que las enzimas se encuentran más activas en las primeras etapas del crecimiento de la planta.

Generalmente las lipasas de semillas muestran selectividad para los ácidos grasos dominantes en la semilla de origen. Por ejemplo, las lipasas de ricino muestran selectividad para la triricinoleína, lo que ha llevado a realizar estudios donde se pone a prueba su capacidad de llevar a cabo la hidrólisis de otros sustratos, y se ha observado que son capaces de actuar frente a otro tipo de triacilgliceroles (Lombard, Helmy, & Piéroni 2001).

A pesar de que aún es poco lo que se ha estudiado en el campo de las enzimas de origen vegetal existen diversos estudios para la extracción, purificación y caracterización de diversas fuentes vegetales, tales como las semillas de ricino (Zheng et al. 2013), de avena (Mohamed et al. 2000), de semillas y residuos de *Carica papaya* (Domínguez de María et al. 2006), etc.

Pocas enzimas vegetales han sido utilizadas para la síntesis de compuestos orgánicos: Un ejemplo es el uso de polvos cetónicos de los germinados de trigo, cebada, maíz, linaza y canola como catalizadores para sintetizar ésteres de bajo peso molecular de interés industrial, en los que se observaron conversiones alrededor del 50% (Liquat & Owusu 1998). Las semillas de ricino fueron utilizadas como biocatalizador de la esterificación de ácidos grasos a glicerol, obteniendo así los parámetros adecuados para que estas lipasas llevaran a cabo la reacción, como su temperatura adecuada (40°C) y los pretratamientos que debe de tener la semilla para poder realizar la síntesis. (Tüter 1998).

También ha surgido la posibilidad de utilizar las semillas para llevar a cabo la reacción de transesterificación para generar biodiesel, produciendo los ésteres metílicos o etílicos de los ácidos grasos de aceites (Moussavou et al. 2013). Aún con estos estudios es poca la investigación que se ha realizado para su uso en la síntesis, en el caso de la modificación de flavonoides no existe un reporte en el que fuese utilizada alguna fuente vegetal como catalizador de estas reacciones.

II. JUSTIFICACIÓN

Los flavonoides comprenden un grupo de polifenoles presentes en una amplia variedad de plantas, que poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Debido a estas propiedades antioxidantes y anticancerígenas su uso en la industria farmacéutica y alimenticia es de gran interés, desafortunadamente su uso se ve limitado por su baja solubilidad y estabilidad en medios lipofílicos. Una solución para mejorar la naturaleza hidrofóbica y su estabilidad consiste en su esterificación.

La reacción de esterificación puede llevarse a cabo ya sea químicamente o enzimáticamente. Sin embargo, debido a la naturaleza polihidroxilada de los flavonoides, el método enzimático puede brindar una mayor selectividad.

Las lipasas son enzimas capaces de promover la síntesis de ésteres bajo ciertas condiciones de reacción. Aunque las lipasas que se han estudiado para llevar a cabo reacciones de esterificación se obtienen principalmente de los animales y fuentes microbianas, las lipasas vegetales hoy en día pueden ser una alternativa para la síntesis orgánica.

Por lo que la finalidad de este trabajo es estudiar la esterificación y transesterificación de dos flavonoides: naringina y rutina, utilizando como agentes acilantes ácidos grasos de diferentes tamaños de cadena y sus metil ésteres. La reacción se llevó a cabo con la lipasa de *C antarctica*, además de evaluar diferentes fuentes de lipasas vegetales.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Transformar flavonoides (naringina y rutina) vía una reacción de transesterificación con ácidos grasos (triacilgliceroles de aceites vegetales) y sus metil ésteres activados con lipasa de *Candida antarctica* (CALB) y lipasas vegetales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar las condiciones de reacción (disolvente, cantidad de enzima y tipo de agente acilante) para la transesterificación con ácidos grasos presentes en aceites vegetales y sus metil ésteres de naringina y rutina

- ✓ Purificar e identificar los productos de reacción obtenidos

- ✓ Evaluar diferentes extractos enzimáticos de fuentes vegetales (semillas y germinados principalmente de oleaginosas) en la reacción de transesterificación de naringina y rutina

- ✓ Determinar si la reacción de transesterificación enzimática con *Candida antarctica* y las lipasas vegetales se llevan regioselectivamente con los flavonoides naringina y rutina

IV. HIPÓTESIS

Los alcoholes presentes en moléculas del tipo flavonoide (naringina y rutina) pueden ser transesterificados con los ácidos grasos de aceites (triacilgliceroles) y sus ésteres metílicos.

Existen enzimas que en condiciones no acuosas pueden promover la síntesis de ésteres, como es el caso de las lipasas. Entonces al someter a estas condiciones a lipasas como la de *Candida antarctica* (CALB) así como de origen vegetal, éstas deben ser capaces de promover la reacción de transesterificación de los flavonoides.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

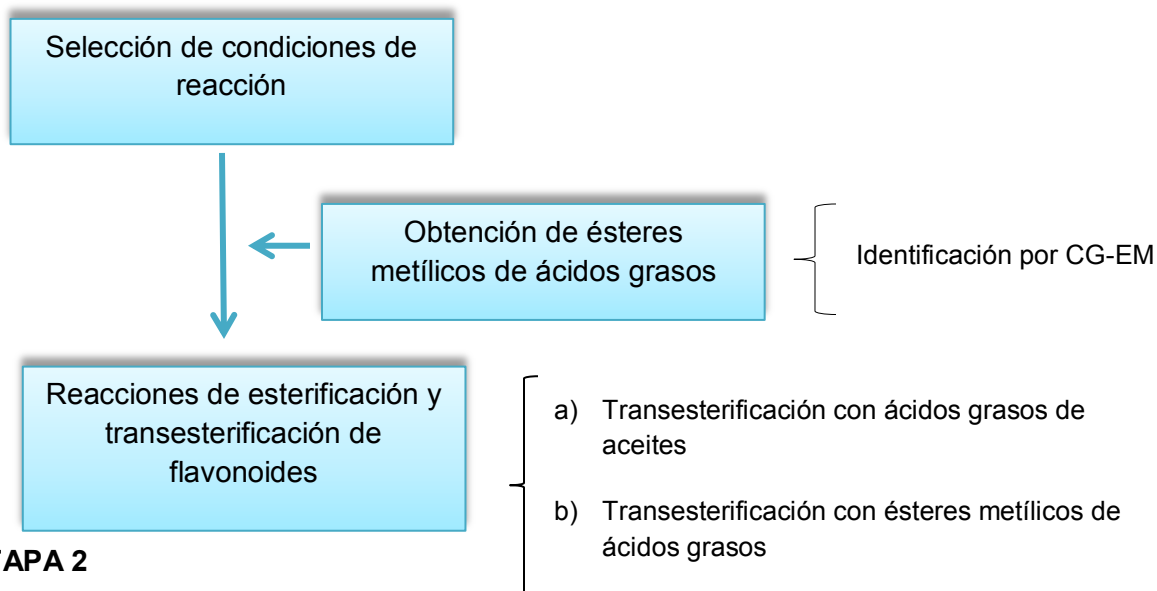
5.1 Materiales y Equipos

- ✓ Aceites: almendra, calabaza, chía, linaza, olivo, uva y ricino (Grado Alimenticio)
 - ✓ Disolventes: Acetona (High Purity), acetato de etilo (Baker), cloroformo (Sigma-Aldrich), hexano (Baker), metanol (High Purity), tert-butanol (Sigma-Aldrich), 2-metil-2-butanol (Sigma-Aldrich), metil-isobutilcetona (Sigma-Aldrich), isooctano (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Fast Red TR (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Fosfato dibásico de sodio (Baker)
 - ✓ Fosfato mono básico de sodio (Baker)
 - ✓ Flavonoides: naringina y rutina 99% (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Lipasa *Candida antártica* (Novozyme 435)
 - ✓ Malla molécula 5°A (Sigma-Aldrich)
 - ✓ Placas de sílice de 0.2mm
 - ✓ Placas de sílice de 1.0 mm
 - ✓ p-nitrofenil ésteres (Sigma-Aldrich)
-
- ✓ Agitador orbital con control de temperatura Lab-line Modelo 4629
 - ✓ Extractor de jugos convencional
 - ✓ Microbalanza AG245 Máx 41-410g / d= 0.01mg-0.1mg Mettler Toledo
 - ✓ Lector de microplacas Epoch Biotek
 - ✓ Rotavapor R-205 Büchi; Büchi Heating Bath B490
 - ✓ Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas
 - ✓ Espectrómetro de RMN (400MHz) Bruker

5.2 Diagrama General

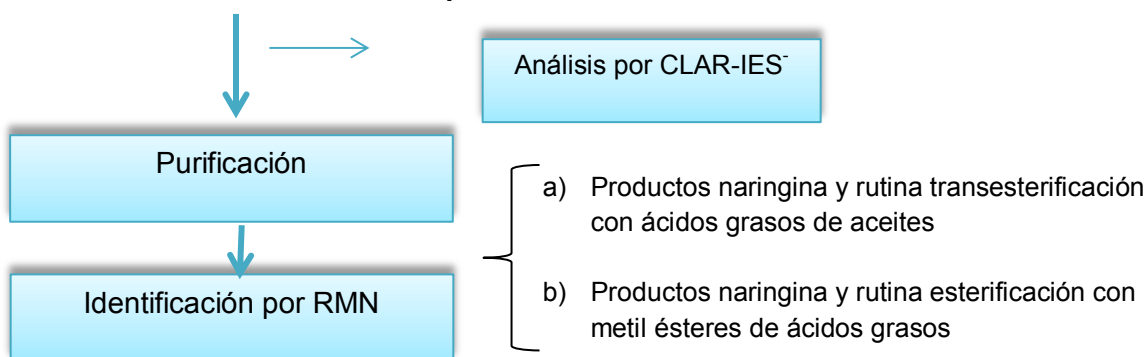
ETAPA 1

Reacciones de esterificación y transesterificación con CALB

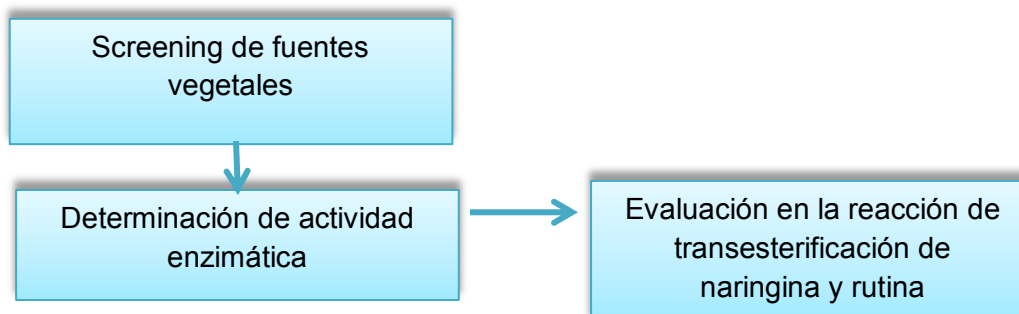


ETAPA 2

Purificación e identificación de los productos



ETAPA 3. Obtención y evaluación de extractos enzimáticos vegetales



5.3 Procedimiento

5.3.1 Reacciones de esterificación y transesterificación

En un experimento típico, 150 mg* de lipasa de *C. antarctica* (CALB) se agregaron a la mezcla de reacción la cual consistió en 70 mg de flavonoide, 3 mL del disolvente* y 250 mg del agente acilante.

La incubación se llevó a cabo bajo agitación magnética en presencia de malla molecular (100 g/L) a 60°C y 270 rpm. La reacción se siguió cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina, usando como sistema de elución cloroformo/metanol/agua (8:2:0.3) y como revelador sulfato cérico.

*En una primera etapa se evaluaron tres concentraciones distintas de enzima y tres disolventes para llevar a cabo la reacción.

5.3.2 Obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos vía enzimática

La reacción se llevó con el método reportado en (Kim, Song, & Kim 2013) el cual consistió en agregar 150 mg de lipasa de *C. antarctica* a la mezcla de reacción la cual contenía 6 mL de aceite con un 400 µL de agua y metanol. La incubación se llevó a cabo bajo agitación magnética a 37°C y 230 rpm por 48 h. La reacción se siguió cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina, usando como sistema de elución hexano/acetato de etilo (9:1) y como revelador sulfato cérico.

5.3.3 Purificación de ésteres metílicos de ácidos grasos

La purificación de los ésteres metílicos se realizó mediante cromatografía en capa fina preparativa, se colocaron en la placa de sílice 100 mg de la mezcla de reacción utilizando como sistema de elución hexano/acetato de etilo (9:1). Posteriormente se realizó la extracción del producto con hexano y se llevó a sequedad en un rotavapor a una temperatura de 40°C.

5.3.4 Identificación de ésteres metílicos mediante CG-MS

La identificación de ésteres metílicos se realizó por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, utilizando la técnica de impacto electrónico. Los productos se disolvieron en hexano y se inyectaron en un equipo cromatógrafico marca Agilent modelo 6890N donde se realizó la separación a través de una columna capilar (DB5). Los compuestos separados pasaron al espectrómetro de masas donde fueron bombardeados con una energía de 70eV.

5.3.5 Análisis por CLAR-IES⁻

Los productos se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de masas utilizando el método IES⁻

5.3.6 Purificación de ésteres de naringina y rutina

Los ésteres de flavonoides se purificaron en dos etapas. Primero la enzima y la malla molecular fueron filtradas de la mezcla, el disolvente de reacción se eliminó por evaporación. El polvo de la mezcla flavonoide/ éster se extrajo con 30 mL de isooctano / agua (04:01, v / v) a 45 ° C durante tres veces para eliminar los ácidos grasos en exceso (Lue et al. 2009).

Una segunda etapa se llevó a cabo por cromatografía de capa fina preparativa, mediante la cual se colocaron 50 mg del producto de la reacción en la placa de sílice utilizando como sistema de elución cloroformo/metanol/agua (8:2:0.3). Realizando la extracción del producto con metanol y posteriormente concentrando el disolvente en un rotavapor a una temperatura no mayor a 35 °C

5.3.7 Caracterización de los productos por RMN

La estructura de los productos purificados fue determinada por ¹H NMR y ¹³C NMR en DMSO-d₆ usando un espectrómetro Brucker AM 400.

5.3.8 Preparación de los materiales vegetales para la obtención de lipasas

Se eligieron las semillas de avena, girasol, papaya y ricino, así como los germinados de maíz, trigo y frijol, la sábila y el látex obtenido del árbol flor de mayo (*Plumeria rubra*) (Barros, Fleuri, & Macedo 2010).

a) Semillas

Las semillas fueron molidas** y tamizadas obteniendo una harina con tamaño de partícula malla 60. Se lavaron con acetona fría (4°C), se dejaron secar a temperatura ambiente y se conservaron en congelación hasta su uso.

** En el caso de las semillas que tienen cascarilla primero se les retiró y posteriormente se molieron (Sagiroglu & Arabaci 2005).

b) Germinados

Los germinados se prepararon con el método según (Liaquat 2011), que consistió en esterilizar las semillas superficialmente por inmersión en una solución al 0,1% (v/v) de hipoclorito de sodio durante 30 s, se enjuagaron con agua del grifo y se sumergieron durante 24 horas a 25 °C (designado como el primer día) en condiciones de oscuridad.

La germinación se logra mediante la colocación de las semillas sobre una cama de algodón húmedo dentro de bandejas de plástico de poca profundidad, cubriéndose con bolsas oscuras, manteniéndose a una temperatura de 25°C

Se extrajeron muestras de las plántulas en el día 4 después de la germinación, se lavaron con agua destilada, se equilibraron en un refrigerador a 4 °C durante 10 min, y se cortaron en trozos pequeños. Se homogeneizaron con 5 volúmenes de acetona fría durante 1 min y el sólido resultante se recuperó por filtración a vacío se secaron al aire bajo una campana durante 10 h. El polvo resultante se mantuvo en congelación hasta su uso.

c) Sábila

Con la ayuda de un extractor de jugos convencional se realizó la extracción del mucílago de la sábila para posteriormente liofilizarlo. El polvo obtenido se mantuvo en congelación hasta su uso.

d) Látex de Flor de mayo

El látex se obtuvo directamente del árbol, realizando pequeños cortes a la corteza del mismo. Se liofilizó y el polvo obtenido se conservó en congelación para su posterior uso.

5.3.9 Evaluación cualitativa de actividad enzimática

Para evaluar de una manera cualitativa la actividad de los materiales vegetales se realizó un ensayo en microplaca utilizando soluciones de α -naftil acetato como sustrato y Fast Red como revelador. En un pozo de la microplaca se adicionaron 75 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2, el cual sirvió de blanco. Se tomaron 75 μ L del extracto de la muestra (30 mg del material vegetal en 1 mL de buffer de fosfatos) y se adicionaron en los pozos siguientes. A todos los pozos se adicionó 75 μ L de la solución de α -naftil acetato y se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo se agregaron 75 μ L de la solución de Fast Red a cada pozo y se observó la aparición de color marrón que indica actividad.

5.3.10 Cuantificación de la actividad enzimática (con ésteres de *p*-nitrofenilo)

La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustrato *p*-nitrofenil ésteres (*p*-NPX) en el caso de actividad de esterasa (*p*-nitrofenil acetato) y para actividad de lipasa (*p*-nitrofenil laurato). Se preparó una solución stock de *p*-NPésteres 10 mM en etanol, de esta solución se tomaron 100 μ L y se añadieron 900 μ L de etanol para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM, se adicionaron para el blanco 180 μ L de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7 y 20 μ L de *p*-NPésteres en etanol a una concentración 1 mM y para el caso de la muestra se colocaron 170 μ L del mismo buffer, 10 μ L de enzima y 20 μ L de sustrato. La reacción se monitoreó durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Nawani, 2006). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto. La cantidad de *p*-nitrofenilésteres (*p*-NPésteres) se interpoló en una curva patrón de *p*-NP.

5.3.11 Evaluación de lipasas vegetales en la reacción de transesterificación de flavonoides

La mezcla de reacción consistió en 70 mg de flavonoide, 3 mL de 2-metil-2-butanol y el agente acilante en una relación molar 1:5 respecto al flavonoide. El material vegetal (biocatalizador) se agregó en un 20% en base al peso total.

La incubación se llevó a cabo bajo agitación magnética en presencia de malla molecular (100g/L) a 60°C y 270 rpm. La reacción se siguió cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina, usando como sistema de elución cloroformo/metanol/agua (8:2:0.3) y como revelador sulfato cérico.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los flavonoides presentan propiedades benéficas para la salud por lo que su aplicación en la industria parece muy atractiva, pero el uso de estos compuestos está seriamente limitado debido a su poca solubilidad en medios no polares. En este escenario surgió el presente proyecto de transesterificación enzimática de flavonoides en específico de naringina y rutina. Para su desarrollo se implementó la estrategia metodológica dividida en tres etapas principales y los resultados obtenidos durante la experimentación se presentan a continuación.

6.1 Selección de las condiciones de reacción

El proyecto en esta primera etapa tuvo como objetivo seleccionar las condiciones para llevar a cabo la reacción de transesterificación de flavonoides. Para esto se implementaron 3 métodos experimentales (Tabla 6) para la esterificación de flavonoides con ácidos grasos de diferente tamaño de cadena, donde el parámetro de variación es la concentración de enzima (CALB), utilizando como medio de reacción tert-butanol previamente deshidratado con malla molecular.

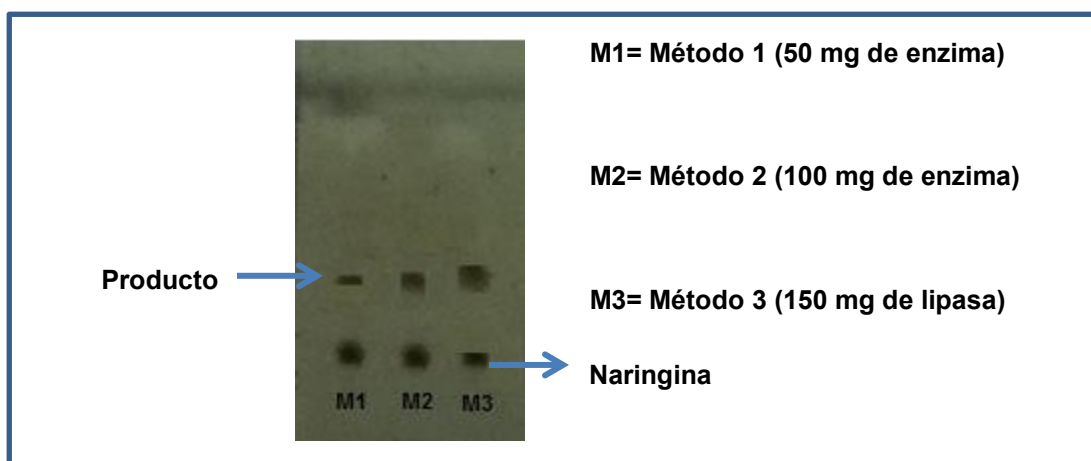
Tabla 6. Métodos experimentales para la esterificación de flavonoides

Condiciones de reacción	Método		
	1*	2*	3*
Cantidad de enzima soportada (mg)	50	100	150
Concentración de Flavonoide (mg)	70	70	70
Concentración agente acilante	1:3	1:5	1:3
Malla molecular (g/L)	100	100	100
Disolvente (ml)	3	3	3
Referencia	(Kontogianni et al., 2001)	(Mellou et al., 2005)	(Ardhaoui et al., 2004)
*Temperatura 60°C , Agitación de 270 rpm y 96 horas			

Como agentes acilantes se utilizaron ácido octanoico y ácido decanoico, que sirvieron como referencia por ya encontrarse reportados en la literatura para la esterificación de flavonoides, y el aceite de ricino para evaluar la reacción de transesterificación, esto se realizó para ambos flavonoides (naringina y rutina).

La elección del método se realizó de una forma cualitativa utilizando cromatografía en capa fina, las aplicaciones se llevaron a cabo con capilares graduados que permitieron controlar el volumen que se aplicó de cada una de las muestras. En la Figura 9 se muestra la cromatoplaqueta obtenida de la reacción de naringina con aceite de ricino, donde se aprecia que la reacción se lleva a cabo con las tres metodologías utilizadas, sin embargo el método 3 es el que muestra los mejores resultados ya que se observa la presencia de una mancha de mayor tamaño para el producto, comparada con las obtenidas con las otras dos condiciones evaluadas.

Figura 9. Cromatoplaqueta obtenida de las reacciones de transesterificación¹ con 3 diferentes concentraciones de enzima



¹La cromatoplaqueta muestra la reacción de transesterificación de naringina con aceite de ricino (tricinoleína) después de 96h

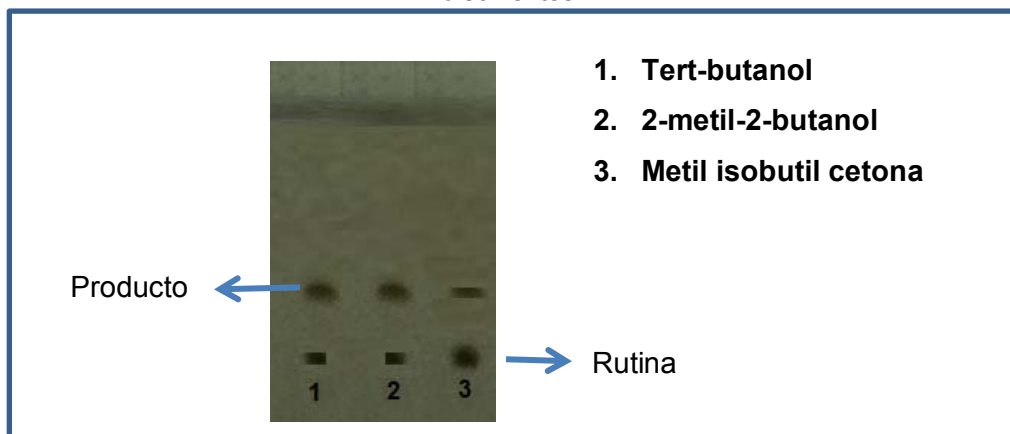
Lo anterior también se pudo apreciar para las reacciones donde se utilizó como agentes acilantes al ácido octanoico y decanoico. Debido a estos resultados se eligieron las condiciones del método 3 para posteriores experimentos, si bien la cantidad de enzima no es determinante para el rendimiento final de la reacción, a las 96 h que se ha reportado como el tiempo donde se observa la mayor conversión en este tipo de reacciones, fue el método que proporcionó los mejores resultados.

Se realizó una segunda prueba con tres disolventes distintos como medio de reacción. La elección de los disolventes se hizo con base en lo reportado por Chebil et al. (2007).

El efecto del disolvente se siguió cualitativamente mediante CCF, los disolventes probados fueron tert-butanol, 2-metil-2-butanol y metil isobutil cetona, estos fueron utilizados para la esterificación y transesterificación de ambos flavonoides.

La modificación de los flavonoides ocurrió en los tres medios de reacción que fueron evaluados, no mostrando diferencia evidente entre el tert-butanol y el 2-metil-2-butanol, mientras que con la metil isobutil cetona se observó una menor conversión (Figura 10).

Figura 10. Cromatoplaqueta obtenida para la reacción de transesterificación¹ en 3 diferentes disolventes.



¹ La cromatoplaqueta muestra la reacción de transesterificación de rutina con aceite de ricino (triricinoleína)

Con estos resultados se determinó el uso de 2-metil-2-butanol para llevar a cabo las reacciones posteriores. Esto debido a que se ha reportado el uso de éste disolvente para la esterificación de naringina con ácidos carboxílicos donde se han obtenido porcentajes de conversión del 80% (Stevenson et al. 2006) mientras que utilizando el tert-butanol se encuentran alrededor de un 50% (Kontogianni et al., 2001), ambos estudios manejaron condiciones de reacción similares a las utilizadas en este trabajo.

Los parámetros de temperatura, agitación y tiempo de la reacción no fueron estudiados en el presente trabajo tomando como referencia que en la revisión bibliográfica realizada se encontraron prácticamente constantes.

Con los datos obtenidos también se observó que la lipasa B de *C. antarctica* fue capaz de llevar a cabo la reacción de transesterificación con el aceite de ricino, es decir utilizando la triricinoleína, que es el triacilglicerol presente en mayor proporción en este aceite (mayor a un 80%) (Perdomo et al. 2013). Esto brinda una alternativa ya que según lo reportado por (Almeida et al. 2012) para la esterificación de la naringina con ácido ricinoleico, primero tuvo que llevarse a cabo la ruptura del triacilglicerol para la obtención del ácido graso

libre. Con este método se reduce un paso dentro de la metodología para llevar a cabo esta reacción y se pudo observar que con las condiciones utilizadas se obtuvo un solo producto.

En este ensayo cualitativo fue posible observar lo reportado por algunos autores para la esterificación de azúcares que indican una variación significativa en los porcentajes de conversión cuando se incrementa el tamaño de la cadena C12 a C18 y disminuyen cuando se utilizan ácidos grasos con una cadena menor a 12 carbonos.(Pedersen et al. 2002). Ya que con los ácidos octanoico y decanoico se observó una menor conversión en comparación con lo obtenido para la reacción con aceite de ricino (ácido ricinoleico C18:1).

6.2 Reacciones de transesterificación de naringina y rutina con ácidos grasos presentes en aceites

Tomando como punto de partida lo observado durante la primera etapa se planteó llevar a cabo la reacción de transesterificación de naringina y rutina con aceites vegetales que tuvieran un ácido graso en mayor proporción (mayor al 50%).

La elección de los aceites se realizó de acuerdo al ácido graso que se encontraba en mayor proporción comenzando por ácido láurico que se encuentra en el aceite de coco (Agyemang-Yeboah 2011) hasta el ácido linolénico que se encuentra en los aceites de linaza y chía (Atabani et al. 2012), además de que fueran de fácil acceso. Los aceites utilizados se enlistan en la Tabla 7 así como su ácido graso mayoritario y el porcentaje en el cual se encuentran en cada uno de los aceites.

Tabla 7. Aceites seleccionados para la reacción de transesterificación

Aceite	Ácido graso en mayor proporción	Porcentaje (%) en el que se encuentra
Aceite de coco	Ácido láurico (C12:0)	50
Aceite nuez moscada	Ácido mirístico (C14:0)	75
Aceite de olivo	Ácido oleico (C18:1)	71
Aceite de almendra	Ácido oleico (C18:1)	69
Aceite de uva	Ácido linoleico (C18:2)	73
Aceite de calabaza	Ácido linoleico (C18:2)	80
Aceite de linaza	Ácido linolénico (C18:3)	53
Aceite de chía	Ácido linolénico (C18:3)	60
Aceite de ricino	Ácido ricinoleico (C18:1)	85

Se realizó la reacción de transesterificación de naringina y rutina con cada uno de los aceites anteriormente mencionados y en todos los casos se observó la formación de un solo producto de reacción mediante CCF (Figura 11), lo que llevó a dos suposiciones: 1) que la lipasa de *C. antarctica* llevó a cabo la transesterificación de manera regioselectiva tanto con naringina como con rutina y 2) que la acilación tuvo lugar con un solo ácido graso de cada uno de los aceites evaluados.

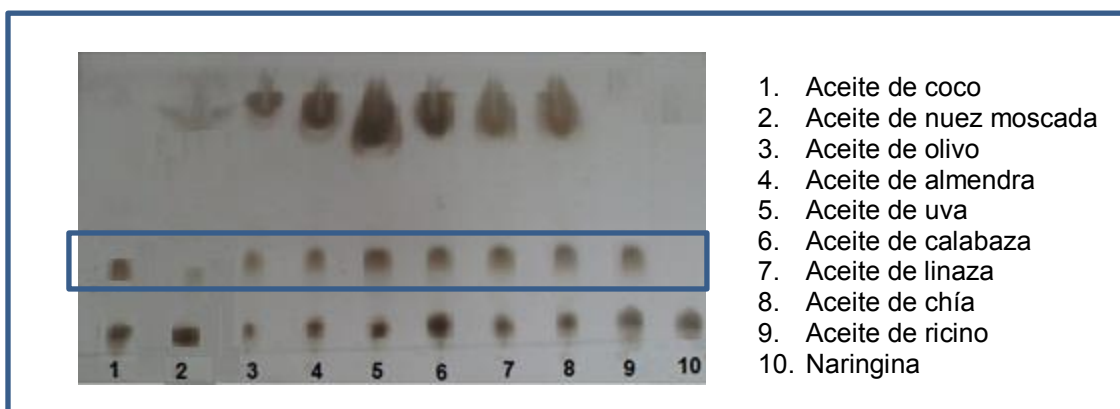


Figura 11. Cromatografía en capa fina para la reacción de transesterificación de naringina con diferentes ácidos grasos

Debido a estas observaciones se reprodujeron todas las reacciones a una mayor escala (300mg de flavonoide) para después purificar los productos obtenidos y determinar si la premisa, de que la enzima utilizaría el ácido graso mayoritario en el aceite, se estaba cumpliendo. Además de observar la regioselectividad que varios autores reportan para estos flavonoides cuando la reacción es biocatalizada por CALB.

6.2.1 Análisis mediante CLAR-IES⁻

El análisis mediante CLAR-IES⁻ se llevó a cabo para algunas de las muestras con el fin de verificar si durante la reacción se obtuvo un solo producto como se observó mediante la CCF y conocer su peso molecular, para llevar a cabo el análisis se utilizaron las mezclas de reacción obtenidas después de 96 h.

En el caso de la reacción de naringina utilizando como agente acilante el aceite de coco se muestran los resultados en la Figura 12 donde se observa la presencia de dos picos, el primero de ellos que eluye en el minuto 4.7 y su espectro de masas presenta una m/z

579 correspondiente al peso molecular de la naringina en modo negativo, atribuyéndolo de esta manera a la naringina que no reaccionó y se encontraba aún en el medio.

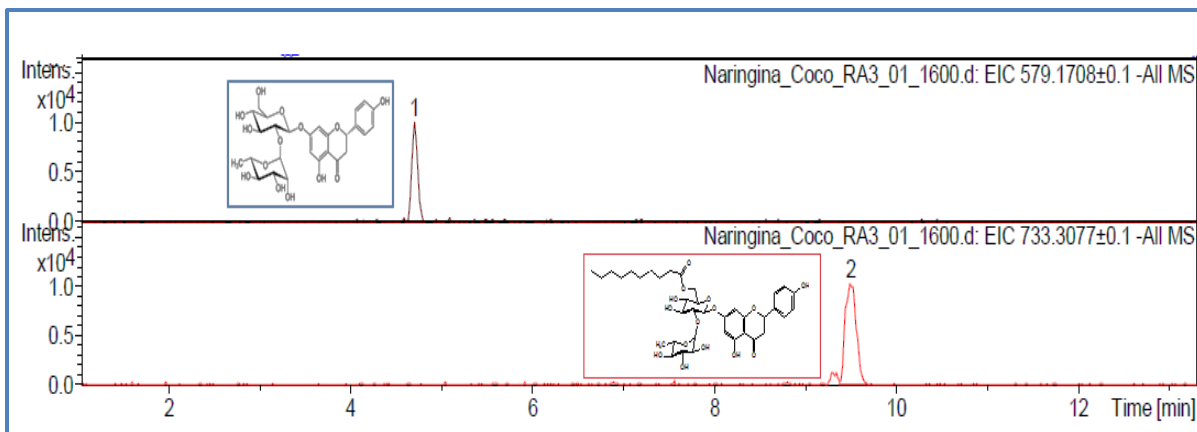


Figura 12. Cromatograma de la reacción de naringina utilizando los ácidos grasos del aceite de coco como agente acilante

El segundo pico que se presenta a los 9.5 minutos de la elución y su espectro de masas presenta una m/z 733 (Figura13) que fue asignado al éster formado mediante la reacción de la naringina y el ácido decanoico, que si bien no es el que se reporta como el mayoritario en el aceite de coco, si es parte de su composición (10%). Con estos resultados se confirmó lo observado para este caso por medio de CCF que fue la formación de un producto de reacción que sirvió para posteriormente purificarlo y elucidar su estructura por RMN

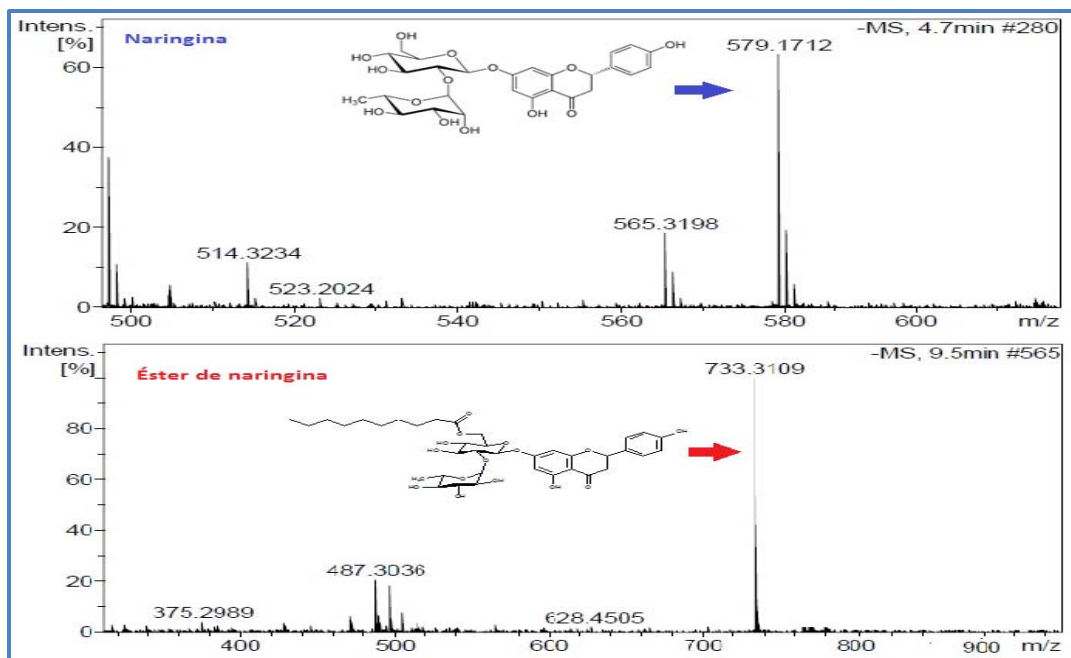


Figura 13. Espectros de masas obtenidos para los compuestos de la mezcla de reacción naringina/aceite de coco.

En el caso de las reacciones con los otros aceites se presentó un caso distinto como por ejemplo la reacción de la naringina con los acilgliceroles del aceite de chía. Su cromatograma se presenta en la Figura 14, donde se observa la aparición de cuatro compuestos, el primero (4.7 min) nuevamente corresponde a la naringina (m/z 579) y los picos 2 al 4 a otros compuestos. De ellos el pico 3 (9.8 min), que se encuentra en una proporción mayor al 80% de acuerdo a sus áreas relativas, presenta en su espectro de masas un ión molecular m/z 839 (Figura 15) que se asignó al compuesto resultante de la esterificación de la naringina con el ácido linolénico, en este caso éste ácido graso es el de mayor proporción en el aceite de chía. Con estos resultados se pudo observar que si bien mediante la CCF no se observó la separación de todos los compuestos, existe uno en mayor proporción por lo que era viable purificarlo para su posterior identificación por RMN.

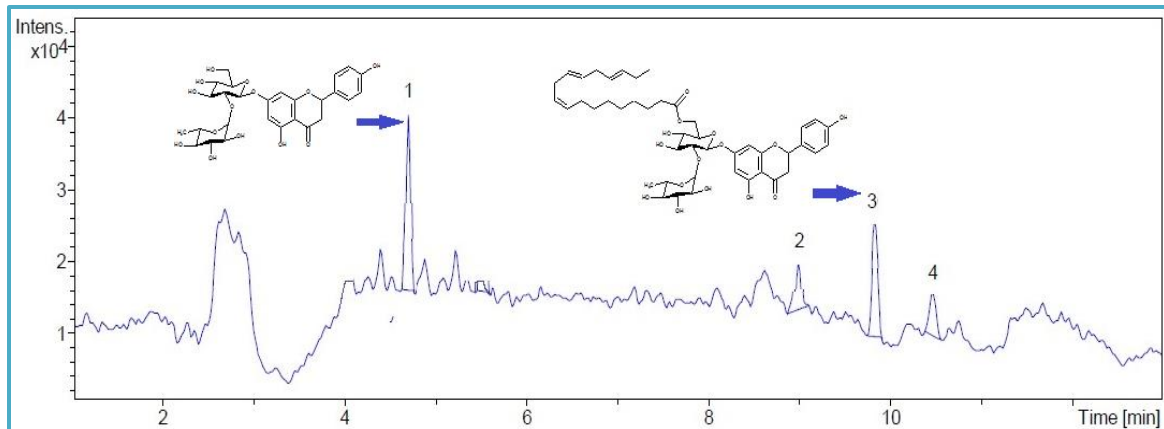


Figura 14. Cromatograma de la reacción de naringina utilizando los ácidos grasos del aceite de chía como agente acilante

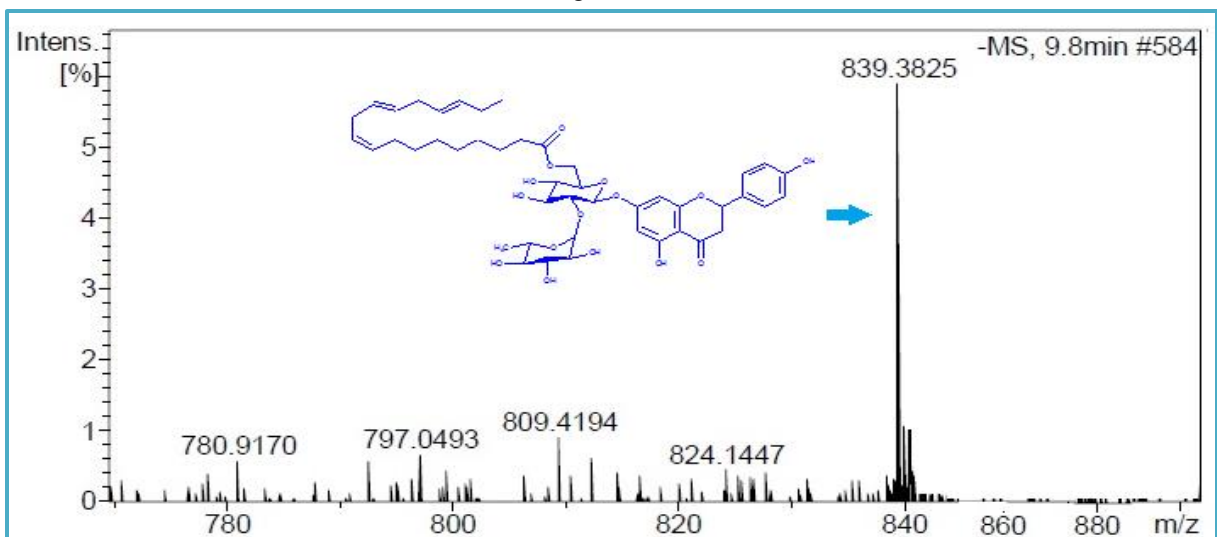


Figura 15. Espectro de masas obtenido para el compuesto 3 de la mezcla de reacción naringina/aceite de chía.

También para las reacciones de naringina utilizando a los aceites de olivo y uva para llevar a cabo la reacción resultó un producto de reacción en mayor proporción (>80%) siendo éste el producto de transesterificación con el ácido graso mayoritario en cada uno de estos aceites, así se obtuvo la esterificación de la naringina con el ácido oleico (*m/z* 843) para el caso del aceite de olivo y con el ácido linoleico (*m/z* 841) con el aceite de uva. Los resultados para el caso de los productos de la rutina los resultados no se incluyen en el presente trabajo pero se continúan obteniendo los respectivos análisis.

6.2.2 Purificación de los productos de reacción

Con la purificación de los productos además de obtenerlos para su posterior identificación mediante RMN, se logró tener un indicativo de la conversión de la reacción.

En la Tabla 8 se muestran los miligramos para cada producto de reacción puro y utilizando este dato, el porcentaje de conversión de la reacción, tomando como base los 50 miligramos de la mezcla de reacción utilizados para la purificación y los miligramos de producto puro obtenidos

Tabla 8. Resultados obtenidos de la purificación de los productos de reacción

Agente acilante	Ácido graso en mayor proporción	Naringina		Rutina	
		Producto puro (mg)	% de rendimiento	Producto puro (mg)	% de rendimiento
Aceite de coco	Ácido láurico (C12:0)	18	36	15	30
Aceite de nuez moscada	Ácido mirístico (C14:0)	15	30	10	20
Aceite de olivo	Ácido oleico (C18:1)	20	40	15	30
Aceite de almendra	Ácido oleico (C18:1)	18	36	16	32
Aceite de uva	Ácido linoleico (C18:2)	20	40	17	34
Aceite de calabaza	Ácido linoleico (C18:2)	18	36	18	36
Aceite de linaza	Ácido linolénico (C18:3)	19	38	17	34
Aceite de chía	Ácido linolénico (C18:3)	19	38	15	30
Aceite de ricino	Ácido ricinoleico (C18:1)	20	40	18	36

Con los resultados se pudieron realizar dos observaciones importantes, la primera de ellas es el efecto del largo de la cadena del agente acilante en la conversión de la reacción y la segunda el efecto de la naturaleza del flavonoide.

Con los rendimientos calculados no se observa una diferencia en la conversión para los productos obtenidos utilizando el aceite de coco (ácido decanoico) y con los aceites que contienen en mayor proporción ácidos grasos con un tamaño de cadena de 18 carbonos, ya que sus porcentajes se encuentran entre 36% y 40% para el caso de naringina mientras que para la rutina están entre 30% y 36%, en el caso de las reacciones en las cuales se utilizó el aceite de nuez moscada (ácido mirístico) se observa un decremento en los porcentajes en comparación con los otros productos encontrándose en 30% para la naringina y 20% para rutina.

Lo obtenido en este trabajo es concordante con lo reportado por Ardhaoui et al., (2004) donde para la acilación de rutina con ácidos grasos de diferente tamaño de cadena (C6-C18) los productos obtenidos con los ácidos láurico hasta el oleico son los que presentan buenos rendimientos y no se observa diferencia importante entre ellos (alrededor del 70%) con la excepción del ácido mirístico que fue menor, mientras que para el ácido caproico (C6) se obtuvo el rendimiento de la reacción más bajo (40%).

El efecto puede ser atribuido a la naturaleza de la lipasa de *Candida antarctica*, debido a la forma que posee en su sitio de unión, ya que es una hendidura elíptica donde los ácidos grasos de cadena de 13 carbonos son los que se unen de manera completa. Según Pleiss, Fischer & Schmid (1998) es por esta razón que se observa diferencia en las conversiones para los ácidos grasos de cadena corta (<C13) pero conforme se incrementa el número de carbonos (>C13) no existe diferencia entre los rendimientos y velocidades iniciales de estas reacciones.

Realizando una comparación únicamente entre los productos esterificados con ácidos grasos C18, no se observa diferencia en las conversiones a pesar de que presentan en su estructura distinto número de insaturaciones (C18:1, C18:2 y C18:3). Otros autores también han reportado que no se observa diferencia significativa para los ácidos grasos con grado de insaturación diferente (oleico, linoleico y linolénico) (Ardhaoui et al., 2004)

Entre los flavonoides se observan diferencias en el rendimiento de conversión, siendo la naringina con la que se obtienen ligeramente mayores rendimientos (30-40%) mientras

que con la rutina se encuentran entre 20% y 36%. Esto puede explicarse por la presencia de un alcohol primario en la estructura de la naringina que suele ser más reactivo, mientras que en la molécula de azúcar de la rutina solo se encuentran alcoholes secundarios (Figura 16).

Se ha observado que cuando existe un alcohol primario se lleva a cabo la reacción en esa posición de manera preferente. (Chebil et al. 2007), además de que se han evaluado las velocidades iniciales en la reacción de esterificación de naringina y rutina siendo mayores para la primera, atribuyendo estos resultados al efecto del tipo de alcohol presente en estas moléculas. (Passicos, Santarelli, & Coulon 2004).

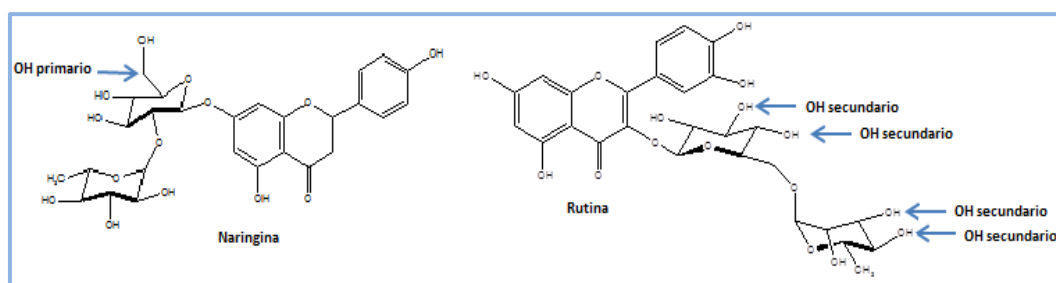


Figura 16. Estructura de naringina y rutina

Además del efecto de la estructura del flavonoide en los rendimientos, también se pueden atribuir las diferencias entre ambos flavonoides a que la solubilidad de la naringina es mayor en 2-metil-2-butanol a 60°C (temperatura de reacción) que la que presenta la rutina en estas mismas condiciones, siendo 50mM y 5mM respectivamente. Por lo que esto puede ser un factor importante ya que para que se lleve a cabo la reacción es necesario que los reactivos se encuentren disueltos en el medio.

En otros trabajos donde se han llevado a cabo la esterificación de estos flavonoides con ácido láurico y los ácidos oleico, linoleico y linolénico se reportan porcentajes de conversión alrededor del 80% (Zheng et al. 2013) (Kontogianni et al., 2003), mientras que los porcentajes reportados en este estudio se encuentran en un 40%, las diferencias entre ellos pueden atribuirse en primera instancia a que en este caso los rendimientos se calcularon con base en el producto purificado por lo que se asume que durante la purificación existe cierto porcentaje de pérdidas.

Otro factor a considerar es que durante las reacciones, la actividad de agua sólo se controló adicionando malla molecular, por lo que no se realizó un control minucioso de este parámetro, según lo realizado por (Gayot, Santarelli, & Coulon 2003) en la

esterificación de naringina con un medio no controlado se obtuvo un 18% de conversión mientras que con un A_w controlado se elevan hasta un 50%. Por lo que esto puede ser un factor a considerar posteriormente para llevar a cabo las reacciones de transesterificación.

Se conoce que uno de los efectos del A_w en el sistema de reacción es en el equilibrio termodinámico ya que puede desplazar el equilibrio hacia la reacción de hidrólisis y no hacia la reacción de síntesis. Además de que la actividad acuosa también tiene un efecto en la actividad enzimática lo que impacta en las reacciones de biocatálisis.

Con los productos puros se pudo llevar a cabo la elucidación estructural la cual se explicará ampliamente más adelante, pero con ello se pudo observar que la reacción fue regioselectiva.

Debido a que la reacción de transesterificación mostró buenos resultados con ambos flavonoides se decidió utilizar los ésteres metílicos de los ácidos grasos ya que se ha reportado que el uso de estos suelen favorecer las reacciones y se ve reflejado en los porcentajes de conversión (Chebil et al. 2006). Además de observar si el tener el éster metílico de forma más disponible, en comparación de los ácidos grasos que se encontraban en su forma de triacilglicerol, se veía reflejado en el rendimiento de la reacción.

6.2.3 Identificación de los ésteres de flavonoides por RMN

La identificación de los ésteres se llevó a cabo utilizando Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C), además se obtuvieron los espectros de los estándares de ambos flavonoides (naringina y rutina) que sirvieron para determinar los cambios que se presentan con la transesterificación de los flavonoides (Anexo A).

Para el caso de la modificación de naringina con el aceite de coco, se observó que la reacción de transesterificación se llevó a cabo con el ácido decanoico tal como se había observado con la espectrometría de masas.

Los datos espectroscópicos obtenidos para este producto se muestran en la Tabla 9, para la resonancia de RMN- ^1H se observa en la región aromática un sistema AB [dos dobletes ($J= 2$ Hz en δ_{H} 6.08 y δ_{H} 6.06)] que es característico para el anillo A sustituido en la posición C5 y C7 mientras que para el anillo B se observa un sistema similar [dos

dobletes ($J = 8.4$ Hz en δ_H 7.30 y δ_H 6.76)] para los carbonos (H-2'/H-6') y (H-3'/H-5') que indica la sustitución en las posiciones C4' y C1' (Figura 17)

Tabla 9. Datos espectroscópicos de 6''-O-caproato de naringina

6-O-caproato de naringina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.03	s	H-5''	3.70	m
OH-4'	9.67	s	H-azúcares	3.15 a 3.65	m
H-2'/H-6'	7.30	d,(8.4)	H-3a	3.40	dd,(17.0,13.2)
H-3'/H-5'	6.76	d,(8.4)	H-3b	2.73	dd (17.0,3.4)
H-8	6.08	d(2.0)	2H-2''''	2.48	t, (8.48)
H-6	6.06	d,(2.0)	2H-3''''	2.20	m
H-2	5.46	dd,(13.2,3.4)	H Cadena alifática	1.39 a 2.10	m
H-1''	5.13	d,(8.2)	3H-6''''	1.18	d,(6.2)
H-1''''	5.08	d,(2.4)	3H-10''''	0.84	t,(7.15)
2H-6''	4.29	m			
RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	197.64	C-6	96.52	C-6''	63.74
C=O	173.24	C-8	95.80	C-3	42.71
C-7	164.79	C-2	79.19	C-2''''	31.61
C-5	163.66	C-3''	77.33	C-5''''/ C-4''''	29.05
C-9	162.94	C-2''	76.30	C-6''''/ C-7''''	28.68
C-4'	158.15	C-5''	74.05	C-3''''	25.38
C-2'/C-6'	128.64	C-4''''	72.22	C-8''''	24.65
C-3'/C-5'	115.69	C-2''''	70.71	C-9''''	22.42
C-10	103.96	C-3''''	70.37	C-6''''	18.73
C-1''	101.00	C-4''	69.97	C-10''''	14.67
C-1''''	97.63	C-5''''	68.54		

En la región comprendida entre 3.15 y 3.70 ppm se localizan los protones correspondientes a la región del glucósido, incluida la señal que se encuentra en 4.29 ppm, que integra para dos protones, la cual fue asignada a la posición H-6'' que se encuentra desplazada hacia campo bajo en comparación del desplazamiento que presentan en la molécula de naringina antes de su modificación (3.70 ppm) lo que sugiere que en esta posición se llevó a cabo la reacción de transesterificación por CALB.

En la zona correspondiente a δ_H 1.39 y 2.48 ppm aparecen las señales asignadas para la cadena alifática del fragmento correspondiente al ácido graso, además de la señal que se presenta en un δ_H 0.84 correspondiente al CH₃ de esta misma fracción de la molécula.

En el caso de los datos para la RMN-¹³C se obtuvo la señal con un δ_C 173.24 ppm asignada para el éster formado. En el caso de la señal de C-6'' exhibe un cambio de 2.6 ppm hacia campo bajo (63.74 ppm) en comparación con la molécula de la naringina (61.08 ppm), por otra parte la señal en 74.05 ppm (asignada a C-5'' de la fracción de glucosa) muestra un desplazamiento de 2.58 ppm hacia campo alto comparado con lo obtenido para la naringina (δ_C 76.63), estos resultados sugieren la presencia de un éster en el C-6 de la fracción de glucosa (Figura 18).

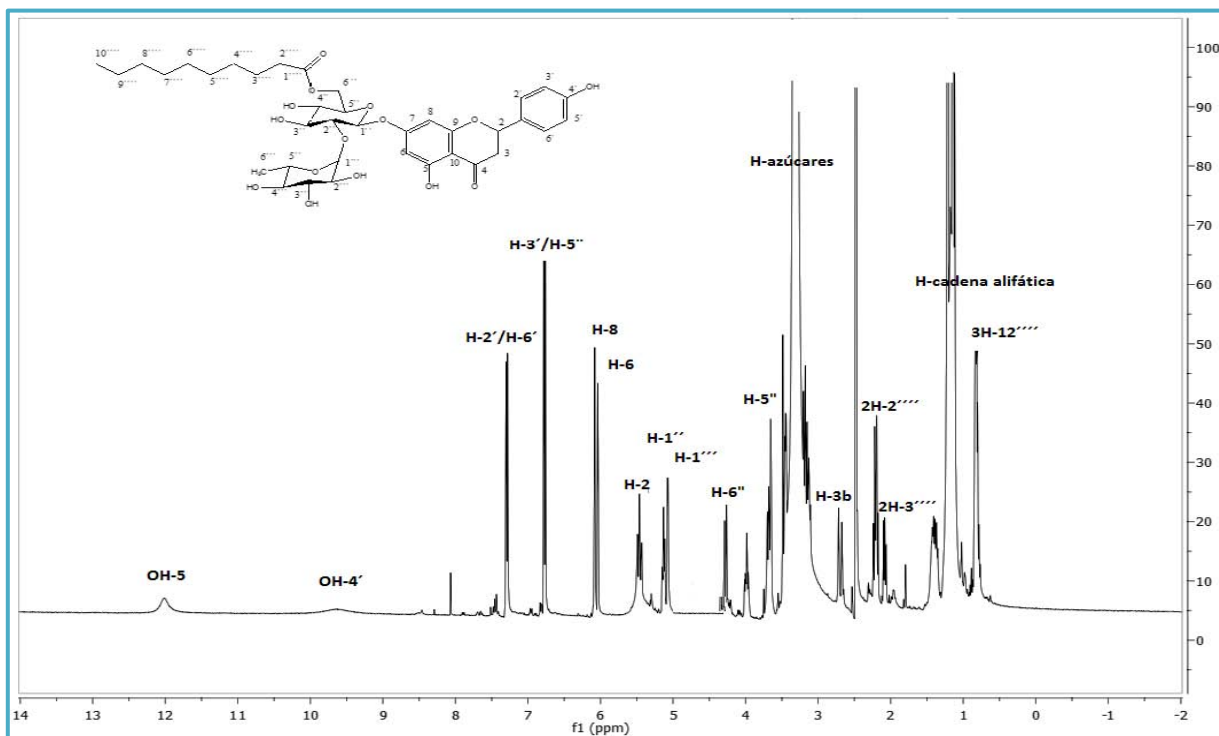


Figura 17. Espectro de RMN-¹H de 6''-O-caproato de naringina

Con los resultados obtenidos mediante la RMN-¹H y RMN-¹³C se observó que la transesterificación catalizada por la lipasa de *C. antártica* se lleva a cabo en la fracción de glucosa de la naringina en la posición 6, esto también de acuerdo con lo reportado por otros autores (Kontogianni et al., 2003) (Almeida et al. 2012) (Nakajima et al. 1999) para este mismo flavonoide.

En el caso del ácido graso con el cual fue modificada la naringina, en el espectro de RMN-¹³C se observaron la señales en la zona de carbonos alifáticos de δ_C 14.67 a 31.61 ppm correspondiente a la inserción de este fragmento a la molécula de naringina lo que indica la presencia del ácido cáprico (C=10) que confirma lo observado mediante la CLAR-IES[®].

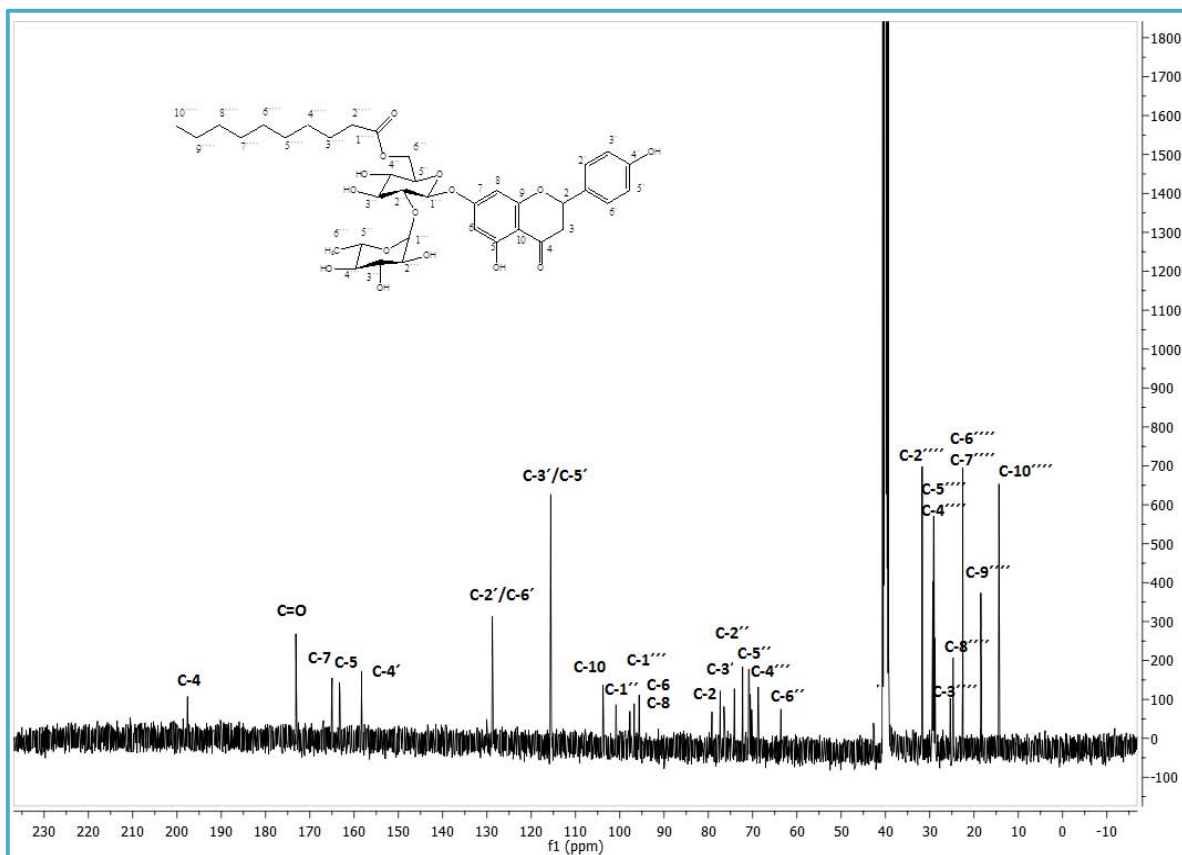


Figura 18. Espectro de RMN-¹³C de 6''-O-caproato de naringina

En el caso de la transesterificación de la rutina con el aceite de coco se obtuvieron los datos espectroscópicos que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de 4'''-O-caproato de rutina

4'''-O-caproato de rutina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d ₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.57	s	OH-4''	5.07	m
OH-7	10.79	s	OH-3''	5.03	d(6.67)
OH-3'	9.64	s	H-4'''	4.36	d,(3.05)
OH-4'	9.15	s	H-azúcares	3.05 a 3.67	m
H-2'	7.51	d,(6.72)	2H-2''''	1.72	m
H-6'	6.81	s	2H-3''''	1.40	m
H-8	6.36	d,(2.02)	H Cadena alifática	1.17	m
H-6	6.17	d, (2.02)	3H-6'''	0.96	d,(6.32)
H-1''	5.33	d,(7.33)	3H-10''''	0.79	t,(7.05)
OH-2''	5.31	m			
RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d ₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	178.10	C-10	104.67	C-4/C-3'''	67.42
C=O	173.67	C-1''''	101.30	C-6''/ C-5''''	67.00
C-7	164.42	C-1''	101.00	C-2''''	37.22
C-9	161.45	C-6	99.14	C-4''''/ C-5''''	31.70
C-2/C-5	157.05	C-8	93.94	C-8''''/ C-7''''	29.57
C-4'	148.98	C-3''	77.00	C-3''''	25.54
C-3'	145.21	C-5''	76.28	C-9''''	22.63
C-3	133.79	C-2''	74.75	C-11''''	18.29
C-6'	122.01	C-4'''	74.35	C-6'''	17.90
C-1'	121.60	C-4''	72.20	C-10''''	14.26
C-5'	116.83	C-2'''	70.69		
C-2'	115.71				

Para la resonancia de RMN-¹H se observa en la región aromática un sistema AB [dos dobletes ($J= 2.02$ Hz en δ_H 6.36 y δ_H 6.17)] que es característico para el anillo A sustituido en la posición C5 y C7. Hacia campo bajo (δ_C 12.57, 10.79, 9.64, 9.15) se encuentran los protones de los grupos hidroxilo que sustituyen a los anillos bencénicos del esqueleto flavano.

En la región comprendida entre 3.15 y 3.70 ppm se localizan los protones correspondientes a la región del glucósido, asignando la señal que se encuentra en 4.36 ppm a los protones del C-4''' en el cual se observa un desplazamiento de 1.3 ppm hacia campo bajo respecto al presentado en el espectro del estándar de rutina (3.06 ppm) lo que sugiere la presencia del éster en esa posición.

En la zona correspondiente a δ_H 1.17 ppm aparece una señal singulete ancho que se asignó a los protones pertenecientes a la cadena alifática del fragmento correspondiente al ácido graso que se transesterificó a la molécula del flavonoide. En un δ_H 0.79 se tiene un triplete ($J= 7.05$ Hz) asignado al CH₃ de la cadena (C-10''').

En el caso de los datos para la RMN-¹³C se obtuvo la señal con un δ_C 173.67 ppm asignada para éster formado. En el caso de la señal de C-4''' exhibe un desplazamiento hacia campo bajo (74.35 ppm) en comparación con la molécula de la rutina (72.20 ppm), estos resultados sugieren la presencia de un éster en el C-4 de la fracción de ramnosa

Con los resultados obtenidos mediante la RMN-¹H y RMN-¹³C se sugiere que la transesterificación catalizada por la lipasa de *C. antártica* se lleva a cabo en la molécula de ramnosa de la rutina en la posición 4, estos datos corresponden a los obtenidos por Ardhaoui et al., (2004).

En el caso de la modificación de la rutina se ha reportado también la acilación del sitio C-3'' (Danieli et al. 1997), esto se suele atribuir a la enzima que está catalizando la reacción y la actividad de agua en el medio de la reacción. Esta discrepancia surge a partir de que la rutina solo posee solo grupos OH secundarios.

En el caso de la cadena alifática la integración en el espectro sugiere que la esterificación se lleva a cabo con el ácido decanoico aunque aún no se cuenta con los resultados concluyentes de la espectrometría de masas.

Los datos espectroscópicos para los productos obtenidos de la reacción con el aceite de nuez moscada y naringina se muestran en la Tabla 11, donde se observa la transesterificación con el ácido mirístico que es el de mayor proporción en este aceite y que es concordante con el compuesto que se encontró mayoritariamente por medio de CLAR-IES.

En los datos se observa un patrón similar al encontrado para 6''-O-caproato de naringina en la región aromática en la RMN-¹H mostrando las sustituciones en los anillos A y B, además de la zona de δ_H 3.17 a 3.65 asignada a los protones correspondientes a los azúcares (glucosa y ramnosa).

La señal que aparece en δ_H 4.25 ppm muestra un desplazamiento de 0.55 ppm hacia campo bajo en comparación de la señal que se encuentra en la naringina (3.7 ppm) es la asignada a los hidrógenos de la posición H-6'', lo que apunta a que la reacción se está llevando a cabo en esta posición de la molécula de glucosa.

En la RMN-¹³C se identificó el sitio de la acilación de la naringina con el desplazamiento que presenta el C-6'' en comparación con el que se muestra en el espectro del estándar del flavonoide, ya que se encuentra desplazado 2.63 ppm hacia campo bajo. Al igual que en el caso de 6-O-laúrate de naringina los resultados indican que la lipasa de *C. antarctica* lleva la acilación del flavonoide en la fracción de glucosa en la posición 6.

La señal del éster formado a partir de la biotransformación se localizó en 173.24 ppm que es una zona característica para este tipo de carbonos cuaternarios.

En la región de los carbonos alifáticos se observa la aparición de las señales δ_C 22.42 a 32.20 ppm las cuales fueron asignadas a los carbonos de la cadena del ácido graso con el que fue esterificada la naringina, en el caso de señales como la que aparece en 29.72 ppm la cual corresponde a los carbonos C-7'''' y C-6'''' se asignaron ambos carbonos debido a la intensidad que presenta la señal y la similitud en sus desplazamientos esperados.

Con estos resultados se determinó que la transesterificación de la naringina agregando el aceite de nuez moscada se llevó a cabo con el ácido mirístico (C=14), que es el de mayor proporción en el aceite, obteniendo el 6''-O-miristato de naringina.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de 6''-O-miristato de naringina

6''-O-miristato de naringina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.03	s	H-5''	3.67	dd,(5.65)
OH-4'	9.65	s	H-azúcares	3.17 a 3.65	m
H-2'/H-6'	7.20	d,(8.4)	H-3a	3.40	dd,(17.0,13.2)
H-3'/H-5'	6.78	d,(8.4)	H-3b	2.73	dd (17.0,3.4)
H-8	6.08	s	3H-6''''	1.18	d,(6.2)
H-6	6.06	d,(2.4)	2H-2''''	2.36	t, (11.79)
H-2	5.48	dd,(13.2,3.4)	H Cadena alifática	1.31 a 1.64	m
H-1''	5.13	d,(8.2)	3H-14''''	0.89	t,(4.38)
H-1''''	5.08	d,(2.4)			
2H-6''	4.25	m			

RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	197.61	C-6	96.52	C-3	42.69
C=O	173.24	C-8	95.78	C-2''''	32.20
C-7	164.57	C-2	79.20	C-12''''	30.99
C-5	163.66	C-3''	77.35	C-7''''/ C-6''''	29.72
C-9	162.94	C-2''	76.29	C-5''''/ C-4''''	29.55
C-4'	158.18	C-4''''	72.20	C-9''''/C-10''''	29.31
C-2'/C-6'	128.70	C-2''''	70.68	C-11''''/C-3''''	29.13
C-3'/C-5'	115.73	C-3''''	70.35	C-11''''	24.65
C-10	103.96	C-4''	69.87	C-13''''	22.42
C-1''	101.05	C-5''''	68.50	C-6''''	18.73
C-1''''	97.59	C-6''	63.71	C-14''''	14.12

En el caso de la transesterificación de la rutina con el aceite de nuez moscada se llegó a los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos espectroscópicos de 4'''-O-miristato de rutina

4'''-O-miristato de rutina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.55	s	OH-4''	5.05	m
OH-7	10.81	s	OH-3''	5.01	d(6.68)
OH-3'	9.63	s	H-4'''	4.38	d,(3.05)
OH-4'	9.16	s	H-azúcares	3.05 a 3.65	m
H-2'	7.52	d,(6.72)	2H-2''''	1.70	m
H-6'	6.82	s	2H-3''''	1.42	m
H-8	6.37	d,(2.00)	H Cadena alifática	1.20	m
H-6	6.18	d,(2.00)	3H-6'''	0.96	d,(6.32)
H-1''	5.35	d,(7.33)	3H-12''''	0.84	t,(7.05)
OH-2''	5.34	s			

RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	178.00	C-10	104.67	C-4/C-3'''	67.42
C=O	173.70	C-1'''	101.30	C-6''/ C-5'''	67.04
C-7	164.44	C-1''	101.00	C-12''''	31.99
C-9	161.43	C-6	99.14	C-7''''/ C-6''''	29.88
C-2/C-5	157.05	C-8	93.94	C-5''''/ C-4''''	29.70
C-4'	149.00	C-3''	77.00	C-9''''/C-10''''	29.15
C-3'	145.23	C-5''	76.28	C-11''''/C-3''''	29.03
C-3	133.77	C-2''	74.75	C-11''''	25.15
C-6'	122.03	C-4'''	73.94	C-13''''	22.33
C-1'	121.63	C-4''	71.20	C-6'''	15.73
C-5'	116.83	C-2'''	70.73	C-14''''	14.12
C-2'	115.71				

La RMN-¹H muestra las 3 zonas características para estas moléculas, la región aromática que muestra los protones en los anillo del esqueleto flavano (señales entre 6.18 y 12.55 ppm) , la zona de los protones de los azúcares en la región comprendida entre 3.05 y 3.65 ppm, además de un doblete ($J=13.05$ Hz) que se encuentra en 4.38 ppm asignada a los protones del C-4''' en el cual se observa un desplazamiento de 1.32 ppm hacia campo bajo respecto al desplazamiento presentado en el espectro del estándar de rutina (3.06 ppm) lo que sugiere la presencia del éster en esa posición.

Se observa un incremento en las señales en la zona de alifáticos respecto al espectro obtenido para el estándar de rutina, existiendo una señal singulete ancho en 1.20 ppm asignado a los protones de la cadena correspondiente al ácido graso.

En el caso de los datos para la RMN-¹³C la señal con un δ_c 173.70 ppm fue asignada para el éster. En el caso de la señal de C-4''' exhibe un desplazamiento hacia campo bajo (73.94 ppm) en comparación con la molécula de la rutina (72.20 ppm), estos resultados sugieren la presencia de un éster en el C-4 del fragmento de la ramnosa.

En la región alifática se observan las señales correspondientes al ácido graso, en este caso el ácido mirístico, con el que fue transesterificada la rutina. La asignación se realizó con base en la integración que presentan las señales lo que nos sugiere el número de carbonos que se observan.

El producto obtenido a partir de la biotransformación de la naringina utilizando los aceites de olivo y almendra (ácido oleico) fue el mismo (6''-O-oleato de naringina) y sus datos se resumen en la Tabla 13.

Para la RMN-¹H se observó en las zonas de protones aromáticos y los protones pertenecientes a la parte del glucósido, comparte las características descritas anteriormente para los ésteres de naringina. Por lo que cabe resaltar la aparición de la señal en 5.44 ppm que se asignó a los protones de la posición 9'''' y 10'''' que son los protones olefínicos, y la señal en 2.20 ppm correspondiente a los protones alílicos.

El sitio de la acilación se sugiere su presencia en la posición 6'' con el desplazamiento hacia campo bajo de los protones ubicados en esta posición de la molécula.

Tabla 13. Datos espectroscópicos de 6''-O-oleato de naringina

6''-O-oleato de naringina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d₆) (Anexo B)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.03	s	H-5''	3.67	dd,(5.65)
OH-4'	9.65	s	H-azúcares	3.17 a 3.65	m
H-2'/H-6'	7.20	d,(8.4)	H-3a	3.40	dd,(17.0,13.2)
H-3'/H-5'	6.78	d,(8.4)	H-3b	2.73	dd (17.0,3.4)
H-8	6.08	s	3H-6'''	1.18	d,(6.2)
H-6	6.06	d,(2.4)	2H-2''''	2.36	t, (11.79)
H-2	5.48	dd,(13.2,3.4)	H Cadena alifática	1.31 a 1.64	m
H-1''	5.13	d,(8.2)	3H-18''''	0.89	t,(4.38)
H-1'''	5.08	d,(2.4)			
2H-6''	4.25	m			

RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	197.71	C-1''	100.66	C-5'''	68.76
C=O	173.29	C-1'''	97.76	C-6''	63.53
C-7	167.43	C-6	96.77	C-3	42.66
C-5	165.17	C-8	95.50	C-2''''	36.85
C-9	163.18	C-2	79.18	C-16''''	35.56
C-4'	158.33	C-3''	77.21	C-14''''/C-7''''/C-6''''	33.59
C-2'/C-6'	131.93	C-2''	76.37	C-15''''/C-5''''/C-4''''	31.97
C-9''''	130.02	C-4'''	73.97	C-13''''/C-12''''/C8''''	28.99
C-10''''	127.69	C-2'''	71.70	C-11''''/C-3''''	23.79
C-3'/C-5'	115.69	C-3'''	70.72	C-17''''	22.50
C-10	103.98	C-4''	70.24	C-6''''	18.63
				C-18''''	14.39

Para la RMN-¹³C hay que resaltar tres aspectos, 1) la señal que se encuentra en 173.29 ppm característica del éster producto de la transesterificación, 2) las señales asignadas a los carbonos 9'''' y 10'''' donde se presenta la insaturación del ácido oleico que aparecen en un δ_C 131.93 y 130.02, que es una zona característica para los carbonos de dobles enlaces y 3) la señal en 63.53 ppm que es la correspondiente al sitio de la esterificación en el carbono 6 de la molécula de la glucosa lo que se aprecia por el desplazamiento hacia campo bajo que presenta esta señal, como ya se mencionó para los ésteres anteriormente analizados. Con estos datos fue posible determinar que la CALB llevó a cabo la reacción de transesterificación de la naringina con el ácido oleico que es el que se encuentra presente en mayor proporción en el aceite de olivo (71%) y en el aceite de almendra (69%). Esto en concordancia con lo obtenido para estas reacciones con la espectrometría de masas que muestra el producto mayoritario con una m/z 843 en modo negativo.

En el caso de la biotransformación de la rutina con ácido oleico (aceite de olivo y almendra) se muestran los datos obtenidos para este producto por medio de RMN en la Tabla 14. En la RMN-¹H se observaron las señales en la zona de aromáticos, ya descritas anteriormente para el producto del 6''-O-caproato de rutina, además en la región comprendida entre 3.03 y 3.70 ppm se localizan los protones correspondientes a la región del glucósido, asignando la señal que se encuentra en 4.36 ppm a los protones del C-4'''' en el cual se observa un desplazamiento de 1.3 ppm hacia campo bajo respecto al presentado en el espectro del estándar de rutina (3.06 ppm) lo que sugiere la presencia del éster en esa posición. En la zona de protones alifáticos se asignó la señal de 1.29 ppm a los protones correspondientes a la zona alifática del ácido graso.

En el caso de los datos para la RMN-¹³C se obtuvo la señal con un δ_C 167.53 ppm asignada para el éster formado. En el caso de la señal de C-4'''' exhibe un desplazamiento hacia campo bajo de 2.3 ppm respecto al desplazamiento obtenido con la rutina.

Tabla 14. Datos espectroscópicos de 4'''-O-oleato de rutina

4'''-O-oleato de rutina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d₆) (Anexo C)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.57	s	OH-4''	5.05	m
OH-7	10.79	s	OH-3''	4.49	d(6.68)
OH-3'	9.63	s	H-4'''	4.36	d,(3.05)
OH-4'	9.14	s	H-azúcares	3.03 a 3.70	m
H-2'	7.51	d,(5.72)	2H-2''''	1.75	m
H-6'	6.81	s	2H-3''''	1.42	m
H-8	6.36	d,(2.00)	H Cadena alifática	1.29	m
H-6	6.17	d,(2.00)	3H-6'''	0.96	d,(6.32)
H-1''	5.31	d,(7.33)	3H-18''''	0.91	t,(7.05)
H-9''''/H-10''''	5.24	s			

RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	177.78	C-5'	116.68	C-2'''	70.80
C=O	167.53	C-2'	115.64	C-4/C-3'''	68.67
C-7	164.48	C-10	104.39	C-6''/ C-5''''	68.51
C-9	161.64	C-1'''	101.60	C-2''''	39.98
C-2/C-5	157.02	C-1''	101.17	C-16''''	39.77
C-4'	156.83	C-6	99.09	C-14''''/C-7''''/C-6''''	39.56
C-3'	148.83	C-8	94.00	C-15''''/C-5''''/C-4''''	31.72
C-3	145.17	C-3''	76.87	C13''''/C12''''/C8''''	29.42
C-6'	133.72	C-5''	76.33	C-11''''/C-3''''	29.13
C-9''''	130.71	C-2''	74.50	C-17''''	22.52
C-10''''	127.90	C-4''	72.27	C-6'''	18.17
C-1'	122.01	C-4'''	70.98	C-18''''	14.38

Las señales que sugieren la presencia del ácido oleico son los que presentan el C-9'''' (130.71 ppm) y el C-10'''' (127.90 ppm) correspondientes a los carbonos de la insaturación, además de los presentes en la zona de carbonos alifáticos (14.38-39.98 ppm).

En el caso de los productos obtenidos con los aceites de uva, calabaza, chía y linaza, en la Tabla 15 se muestran los datos espectroscópicos más sobresalientes para estos productos, (que no se han analizado para los productos descritos anteriormente) que permitieron su identificación.

Para la reacción de transesterificación de naringina utilizando los ácidos grasos del aceite de uva y de calabaza como agentes acilantes, se obtuvo como único producto el 6''-O-linoleato de naringina (Anexo D), para este producto es importante resaltar la aparición en la RMN-¹H las señales en la región entre 5.08-5.58 ppm pertenecientes a los hidrógenos de las insaturaciones que presenta el ácido linoleico, que es el que se encuentra en mayor proporción en los aceites utilizados para la transesterificación. Además del desplazamiento de los hidrógenos de la posición 6'' (4.43 ppm) que indican la regioselectividad con que se lleva a cabo la reacción en la molécula de naringina.

En el caso de la RMN-¹³C es importante resaltar las señales asignadas a los carbonos sp² presentes en la molécula del ácido graso insaturado que se encuentran en un δ_c 128.04-130.10 asignadas a los carbonos C-9''''', C-10''''', C-12''''' y C-13'''''

Así mismo para el caso de la rutina con los ácidos grasos del aceite de uva y de calabaza, un solo producto de reacción fue identificado (Anexo E), y los datos obtenidos por medio de la RMN sugieren que el sitio de acilación se llevó a cabo en la posición 4''''' y el ácido graso con el que llevó a cabo la transesterificación la lipasa de *C. antarctica* fue el mayoritario para estos aceites, en este caso el ácido linoleico.

En el caso de la transesterificación de naringina y rutina con el ácido linolénico (C18:3) presente en los aceite de chía y de linaza. Con la RMN se observó la presencia de las tres insaturaciones características de este ácido graso.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de los productos de naringina y rutina obtenidos con los ácidos linoleico y linolénico

Compuesto	Estructura	Datos espectroscópicos
6''-O-linoleato de naringina (Anexo D)		¹ H 5.08-5.58 (m) H-9''''/H-10''''/H 12''''/H13'''' 4.43 (m) H-6'' 1.19-2.20 H cadena alifática ¹³ C 130.15 C-13'''' 128.97 C-9'''' 128.75 C-10'''' 128.66 C-12'''' 63.47 C-6''
4'''-O-linoleato de rutina (Anexo E)		¹ H 5.17-5.54 H-9''''/H-10''''/ H 12''''/H13'''' 4.38 H-4''' 1.18 H cadena alifática ¹³ C 130.03 C-13'''' 128.04 C-9''''/C-10'''' 127.03 C-12'''' 74.35 C-4'''
6''-O-linolenato de naringina		¹ H 5.15-5.53 (m) H dobles enlaces 4.25 (m) H-6'' 1.30 H cadena alifática ¹³ C 131.84 C-9''''/C-16'''' 129.90 C-13'''' 128.04 C-12'''' 127.87 C-10''''/C-15'''' 63.35 C-6''
4'''-O-linolenato de rutina		¹ H 5.16-5.50 (m) H dobles enlaces 4.37 H-4''' 1.29 H cadena alifática ¹³ C 131.93 C-9''''/C-16'''' 129.80 C-13'''' 128.16 C-12'''' 127.62 C-10''''/C-15'''' 74.35 C-4'''

Para el caso de la reacción utilizando el aceite de ricino (ácido ricinoleico) para ambos flavonoides los resultados de la RMN ^1H y ^{13}C sobresalientes se muestran en la Tabla 16.

En estos productos lo que hay que resaltar además del sitio de acilación es la presencia del doble enlace en la posición 9'''' y 10'''' y la presencia del grupo hidroxilo en el carbono 12 de la cadena alifática del ácido graso, que se observa más claramente en la RMN- ^{13}C para ambos productos en el caso del 6''-O-ricinoleato de naringina con una señal que a parece en δ_{C} de 70.21 ppm y en el 4''''-O-ricinoleato de rutina con un δ_{C} en 71.23 ppm.

Tabla 16. Datos espectroscópicos de los productos de naringina y rutina obtenidos con el aceite de ricino

Compuesto	Estructura	Datos espectroscópicos
6''-O-ricinoleato de naringina		^1H 5.08-5.38 (m) H-9''''/H-10'''' 4.35 (m) H-6'' 0.85-2.17 H cadena alifática
4''''-O-ricinoleato de rutina		^1H 5.11-5.34 H-9''''/H-10'''' 4.36 (m) H-4'''' 1.20 H cadena alifática
		^{13}C 130.15 C-9'''' 128.97 C-10'''' 70.21 C-12''''(OH) 63.37 C-6''
		^{13}C 130.03 C-9'''' 128.04 C-10'''' 71.23 C-12''''(OH) 74.35 C-4''''

Los datos espectroscópicos obtenidos para el producto de la naringina fueron correlacionados con lo obtenido por Almeida et al. (2012) que utilizaron al ácido ricinoleico como agente acilante donde se observó que los datos son similares a los reportados en el trabajo anteriormente citado.

De este modo se determinó la regioselectividad con que la CALB lleva a cabo la transesterificación de naringina (en la posición C-6'') y rutina (en la posición C-4'''). Además de que fue capaz de realizar la transesterificación con los ácidos grasos (triacilgliceroles) que se encuentran en mayor proporción en los aceites utilizados.

El interés de obtener los ésteres de los flavonoides radica en mejorar su lipofilicidad, en este caso se observó que existe una disminución en la polaridad de los compuestos ya que por medio de la CCF se observó un mayor desplazamiento del éster (afinidad a la fase móvil (no polar) en comparación del flavonoide que se retiene fuertemente en la fase estacionaria de naturaleza polar (sílice). (Figura 11)

Se ha observado que la modificación de los flavonoides sobre todo con los ácidos grasos insaturados, además de mejorar su lipofilicidad, puede llegar a potenciar su capacidad antioxidante. (Zheng et al. 2013)

6.3 Obtención de ésteres metílicos de los ácidos grasos

La transesterificación de los ácidos grasos con metanol se llevó a cabo por vía enzimática utilizando la lipasa de *C. antártica*, en la Figura 19 se muestra la cromatoplaqueta obtenida para estas reacciones. Con la CCF se observó la presencia de los ésteres metílicos, utilizando placas de sílice con una fase móvil hexano/acetato de etilo (9:1), ya que los ésteres presentan un R_f de 0.75 mientras que para los aceites se encuentra alrededor de 0.5, con esto se observa la diferencia en la polaridad de los compuestos, pues la formación del grupo éster y el incremento de un carbono en la molécula se ve reflejado en una mayor lipofilicidad.

Además de utilizar la cromatografía en capa fina se realizó el análisis de los productos obtenidos por medio de CG-EM, para corroborar que el éster metílico del ácido graso de interés (el de mayor proporción en el aceite) estuviese presente y llevar a cabo la reacción de transesterificación con naringina y rutina.

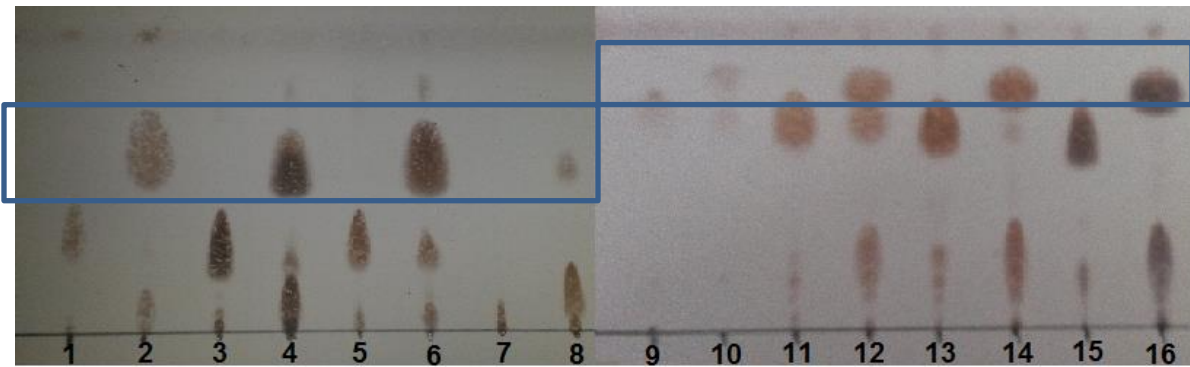


Figura 19. Cromatografía en capa fina de la obtención de ésteres metílicos vía enzimática

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Aceite de olivo | 9. Aceite de coco |
| 2. Metil éster de aceite de olivo | 10. Metil éster de aceite de coco |
| 3. Aceite de linaza | 11. Aceite de almendra |
| 4. Metil éster de aceite de linaza | 12. Metil éster de aceite de almendra |
| 5. Aceite de calabaza | 13. Aceite de uva |
| 6. Metil éster de aceite de calabaza | 14. Metil éster de aceite de uva |
| 7. Aceite de ricino | 15. Aceite de chía |
| 8. Metil éster de aceite de ricino | 16. Metil éster de aceite de chía |

El análisis por el método CG-EM para el producto de transesterificación del aceite de olivo con metanol (Figura 20), mostró el pico más abundante (porcentaje de área de 82%) en un tiempo de retención de 8.2 min (492 s), con un ión molecular m/z 296 el cual corresponde al éster metílico del ácido oleico (éster del ácido *cis*-9-octadecenoico), este resultado es concordante con lo esperado ya que el ácido oleico es el reportado como el más abundante en el aceite de olivo.

Los iones más representativos son: 1) el de la pérdida de los elementos de metanol (m/z 264 o $[M-32]^+$), es decir, un grupo metoxilo más un átomo de hidrógeno, y 2) la pérdida del ión del rearrreglo de McLafferty (m/z 222) que es característico de los ácidos carboxílicos y sus derivados. Otro fragmento característico de la ionización de ácidos grasos es $[M-116]^+$ (m/z 180 en este caso), que se forma por la pérdida de un fragmento que contiene el grupo carboxilo mediante escisión entre los carbonos 5 y 6 con adición de un átomo de hidrógeno reordenado (Figura 21).

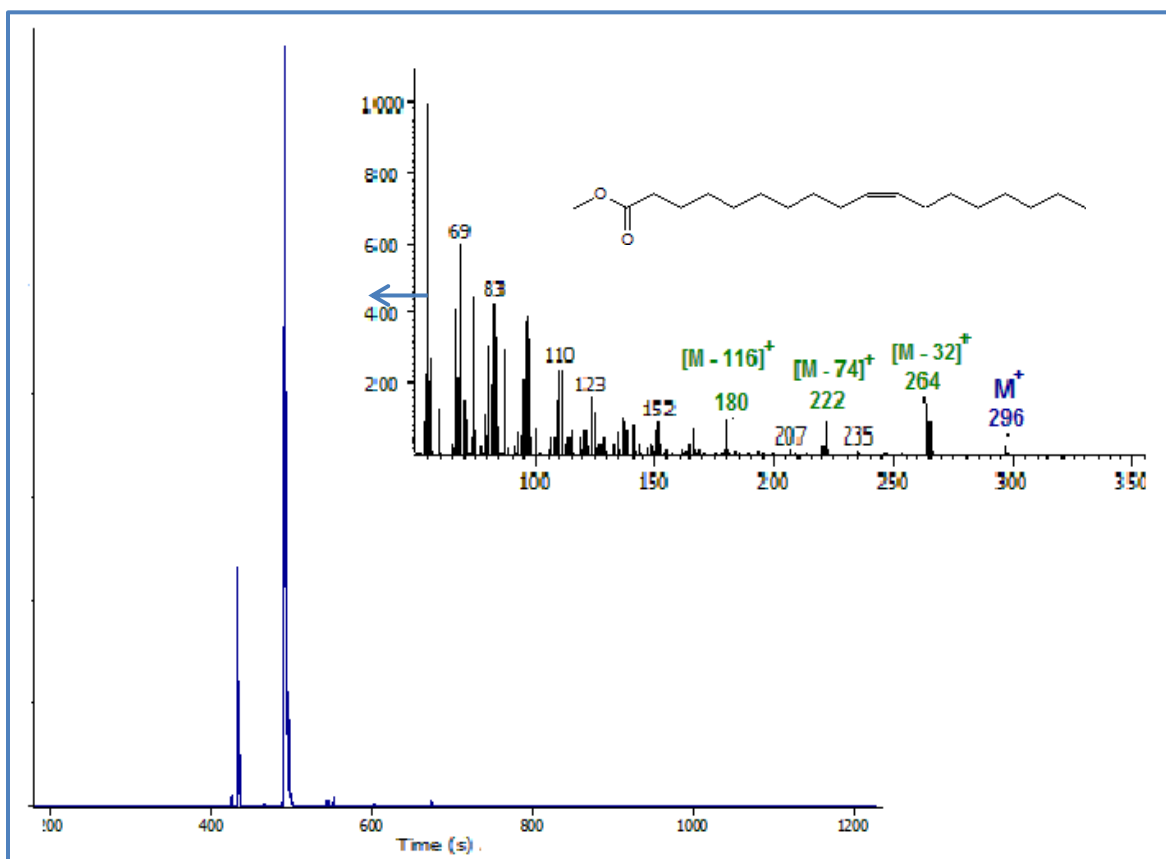


Figura 20. Análisis por el método CG-EM de la transesterificación de aceite de olivo

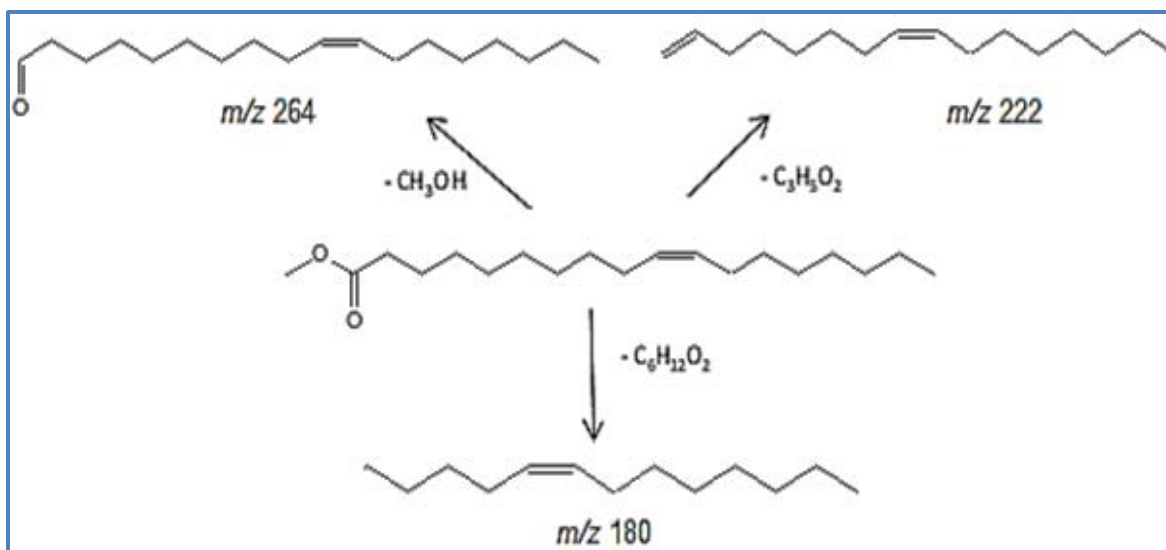


Figura 21. Patrón de fragmentación del oleato de metilo

Los otros picos que aparecen en la cromatografía de gases pertenecen a ésteres metílicos de ácidos grasos que están presentes en el aceite de olivo en menor proporción, con áreas relativas menores al 10% como el éster metílico del ácido hexadecanoico ($C_{17}H_{34}O_2$).

Los datos obtenidos para los demás aceites se muestran en la Tabla 17. En todos los casos se encontró que el éster metílico mayoritario era el esperado por ser el proveniente del ácido graso predominante en cada uno de los aceites.

Tabla 17. Resultados del análisis CG-EM para los ésteres metílicos de ácidos grasos

Aceite sometido a la reacción de transesterificación	Producto encontrado mayoritariamente	t_R (min)	% Área relativa	Ión molecular m/z	Fragmentos representativos m/z
Aceite de coco	Laurato de metilo	4.3	30	214	182 141 74
Aceite nuez moscada	Mirístato de metilo	7.6	74	242	211 87 74
Aceite de olivo	Oleato de metilo	8.2	82	296	264 222 180
Aceite de almendra	Oleato de metilo	8.2	69	296	264 222 180
Aceite de uva	Linoleato de metilo	8.1	72	294	263 220 178
Aceite de calabaza	Linoleato de metilo	8.1	57	294	263 220 178
Aceite de linaza	Linolenato de metilo	8.0	62	292	261 217 176
Aceite de chía	Linolenato de metilo	8.0	53	292	261 217 176
Aceite de ricino	Ricinoleato de metilo	9.1	79	312	294 198 166

Los ésteres metílicos analizados comparten características en su patrón de fragmentación encontrándose principalmente tres rupturas representativas: 1) la pérdida del metoxilo que indica la presencia del éster $[M-32]^+$, 2) la pérdida del ión del rearrreglo de McLafferty $[M-74]^+$ y 3) el fragmento de m/z 74 correspondiente al fragmento del rearrreglo de McLafferty (Figura 22) que ya se mencionaron para la fragmentación del metil éster del ácido oleico. El patrón que se presenta para los ésteres metílicos corresponde también al encontrado por (Hallgren, Ryhage, & Stenhagen 1959) que indica los mismos picos representativos que se mencionan en la tabla anterior.

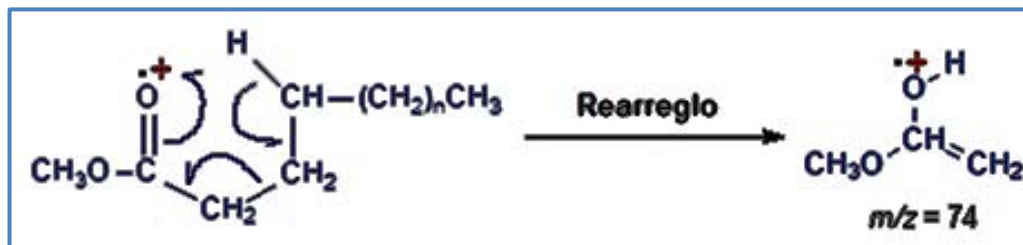


Figura 22. Rearreglo de McLafferty (Wilson & Sargent 2001)

El éster metílico que no comparte las características de fragmentación es el ricinoleato de metilo, por poseer un grupo hidroxilo en la cadena del ácido graso, en este caso no es posible distinguir el ión molecular, y el único ión significativo en la región de masas de altas es para la pérdida de agua, a m/z 294. Sin embargo, el fragmento de m/z 198 representa probablemente la ruptura entre los carbonos 11 y 12, y el ión a m/z 166 una pérdida adicional de metanol a partir del grupo carboxilo. (Figura 23). Esto en concordancia con lo reportado por otros autores (Kleiman & Spencer 1973)

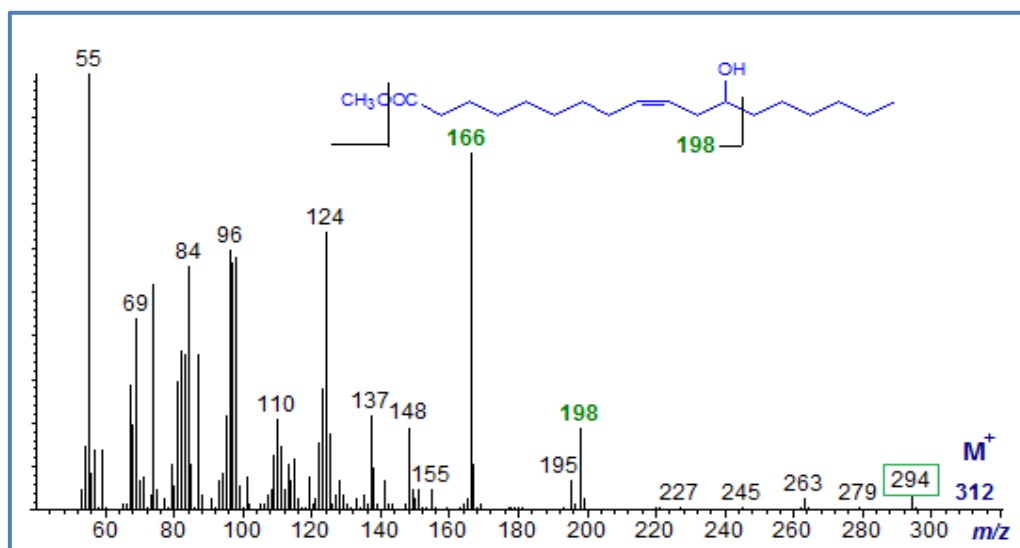


Figura 23. Espectro de masas obtenido para el ricinoleato de metilo

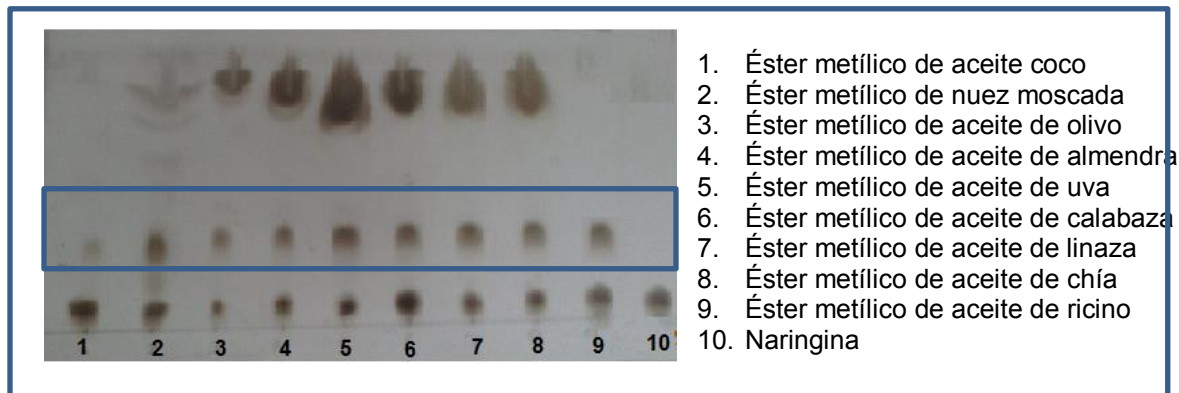
Con estos resultados se determinó que los ésteres metílicos de interés (los del ácido graso mayoritario) se había obtenido mediante la reacción de transesterificación catalizada por la lipasas de *C. antarctica*, y era posible utilizarlos para la modificación de los flavonoides.

6.4 Reacciones de transesterificación de naringina y rutina con los ésteres metílicos de ácidos grasos.

La reacción de transesterificación de rutina y naringina con los ésteres metílicos de los ácidos grasos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que las utilizadas para los aceites, su monitoreo se realizó por medio de CCF donde se observó que todas las

reacciones evaluadas presentaron un solo producto de reacción para cada agente acilante (Figura 24).

Figura 24. Cromatografía en capa fina para la reacción de naringina con diferentes agentes acilantes



Para realizar una comparación de los rendimientos respecto a los obtenidos utilizando a los aceites como agentes acilantes, se llevó a cabo la purificación de los productos, con ello se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 18 con los que fue posible apreciar que no existía alguna diferencia en la conversión ya sea utilizando los ésteres metílicos o el aceite.

Cabe mencionar que para realizar las transesterificaciones no se sometieron a ningún tipo de purificación los ésteres metílicos por lo que se utilizaron las mezclas crudas de la reacción, al igual que con el uso de los aceites se purificó el único producto que se observó en placa y para verificar que la esterificación se estaba dando con el éster presente en mayor proporción también se llevó a cabo la identificación de algunos de estos compuestos.

Tabla 18. Rendimientos obtenidos para la esterificación de flavonoides utilizando como agentes acilantes a los ésteres metílicos de los ácidos grasos

Agente acilante	Naringina		Rutina	
	Producto puro (mg)	% de rendimiento	Producto puro (mg)	% de rendimiento
E.M. de aceite de coco	18	36	15	30
E.M. de aceite de nuez moscada	14	28	10	20
E.M. de aceite de olivo	20	40	15	30
E.M. de aceite de almendra	17	34	16	32
E.M. de aceite de uva	20	40	17	34
E.M. de aceite de calabaza	18	36	18	36
E.M. de aceite de linaza	19	38	17	34
E.M. de aceite de chía	19	38	15	30
E.M. de aceite de ricino	20	40	18	36

La identificación de los productos obtenidos con los ésteres metílicos se llevó a cabo por medio de RMN (^1H y ^{13}C), con lo cual se observó que los productos correspondían a los obtenidos con cada uno de los ácidos grasos (sección 5.2.2), los resultados se resumen en la Tabla 19. Así por ejemplo las reacciones utilizando al éster metílico del aceite de olivo se obtuvo como producto de reacción el 6''-O-oleato de naringina (Tabla 13) y el 4'''-O-oleato de rutina (Tabla 14), respectivamente para cada uno de los flavonoides, al igual que lo obtenido para el ácido oleico.

Tabla 19. Productos obtenidos utilizando los ésteres metílicos de ácidos grasos para la transesterificación

Agente acilante	Naringina	Rutina
	Producto obtenido	Producto obtenido
E.M. de aceite de coco	6''-O-caproato de naringina	4'''-O-caproato de rutina
E.M. de aceite de nuez moscada	6''-O-miristato de naringina	4'''-O-miristato de rutina
E.M. de aceite de olivo	6''-O-oleato de naringina	4'''-O-oleato de rutina
E.M. de aceite de almendra	6''-O-oleato de naringina	4'''-O-oleato de rutina
E.M. de aceite de uva	6''-O-linoleato de naringina	4'''-O-linoleato de rutina
E.M. de aceite de calabaza	6''-O-linoleato de naringina	4'''-O-linoleato de rutina
E.M. de aceite de linaza	6''-O-linolenato de naringina	4'''-O-linolenato de rutina
E.M. de aceite de chía	6''-O-linolenato de naringina	4'''-O-linolenato de rutina
E.M. de aceite de ricino	6''-O-ricinoleato de naringina	4'''-O-ricinoleato de rutina

E.M. = Éster metílico

Con estos resultados fue posible determinar que la lipasa de *C. antarctica* fue capaz de llevar a cabo las reacciones de transesterificación de los flavonoides utilizando indistintamente como sustrato tanto a los ésteres metílicos como a los aceites (triacilglicerol).

En otros estudios se ha comparado el uso de los ácidos grasos y sus vinil ésteres como agentes acilantes, donde se ha observado que la reacción con los ésteres de los ácidos grasos refleja mejores conversiones (Mellou et al., 2005) dando lugar a conclusiones como que la reacción de transesterificación se lleva de mejor manera con la enzima CALB. En este caso no se obtuvieron resultados distintos lo que se atribuye a que en los dos casos estudiados la reacción que estaba ocurriendo era de transesterificación.

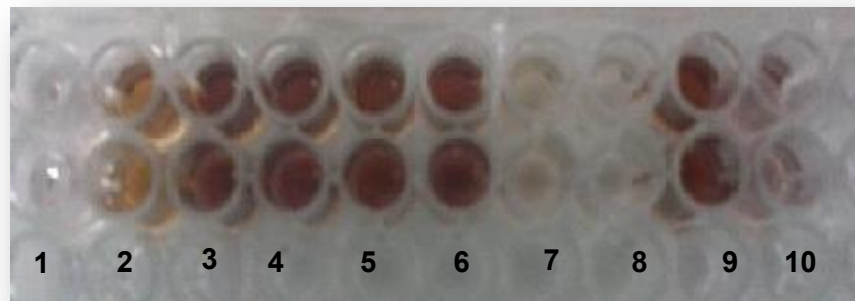
6.5 Screening de fuentes vegetales para la obtención de lipasas

La selección del material vegetal utilizado para el *screening* preliminar de lipasas vegetales, se basó en lo reportado con anterioridad por (Barros, Fleuri, & Macedo 2010) ya que estas enzimas pueden estar presentes tanto en granos, como semillas y algunos otros fluidos de las plantas como el látex de algunos árboles. Además se tomaron en cuenta fuentes vegetales en las que el uso de sus lipasas hayan sido reportadas para la síntesis de otros compuestos, como los germinados de maíz, trigo y linaza utilizados en la síntesis de ésteres de bajo peso molecular (Liquat & Owusu 1998) o el uso de residuos de *Carica* papaya para la transesterificación de alcoholes secundarios (Chen, Wang, & Tsai 2009).

El primer filtro de selección se llevó a cabo evaluando la actividad enzimática de manera rápida, realizando ensayos en microplaca utilizando soluciones de α -naftil acetato como sustrato y Fast Red como revelador, para observar de una manera cualitativa los materiales que presentaban mayor actividad.

Los materiales fueron seleccionados con base en lo reportado en la literatura por lo que se trabajó con: germen de maíz (*Zea mays*), germen de linaza (*Linum usitatissimum*), germen de frijol (*Phaseolus vulgaris*), germen de trigo (*Triticum spp*) semillas de papaya (*Carica papaya*), semillas de ricino (*Ricinus communis*), semillas de girasol (*Heliantus annuus*), sábila (*Aloe vera*) y látex del árbol de Flor de mayo (*Plumeria rubra*). En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos para esta prueba, donde se observa la coloración que presentó cada uno de los extractos.

Figura 25. Resultados obtenidos de la prueba rápida de actividad enzimática



- | | |
|---------------------|---------------------------|
| 1. Control | 6. Semillas de papaya |
| 2. Germen de linaza | 7. Semillas de girasol |
| 3. Germen de maíz | 8. Mucilago de sábila |
| 4. Germen de trigo | 9. Semillas de ricino |
| 5. Germen de frijol | 10. Látex de Flor de mayo |

La intensidad del color marrón es proporcional a la actividad enzimática que poseen los extractos, ya que las enzimas capaces de hidrolizar el enlace éster que posee el α -naftil acetato, liberan el acetato y α -naftol, el Fast Red el cual es una sal de diazolio reacciona con el α -naftol formando un cromógeno de color rojo-marrón. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron aquellas fuentes que presentaron cualitativamente la mayor actividad (germen de maíz, trigo y frijol además de las semillas de papaya y ricino)

Posteriormente se cuantificó la actividad enzimática de esterasa utilizando como sustrato el *p*-nitrofenil acetato y de lipasa con el *p*-nitrofenil laúrate, en este caso los datos obtenidos se muestran en la Tabla 20, la cuantificación se llevó a cabo a pH=7 a temperatura ambiente.

Tabla 20. Cuantificación de actividad enzimática de esterasa y lipasa

Material vegetal	Actividad de esterasa (U/g de semilla)	Actividad de lipasa (U/g de semilla)
Germen de maíz	15.05	14.45
Germen de frijol	12.85	7.25
Germen de trigo	3.99	14.34
Semillas de papaya	NP	10.02
Semillas de ricino	2.10	46.45

El germen de trigo y el de maíz, así como las semillas de papaya y ricino presentaron una mayor actividad de lipasa mientras que el germen de frijol mostró una mayor actividad de esterasa. La principal diferencia entre estas enzimas es que las esterasas

preferentemente utilizan sustratos de cadena corta mientras que las lipasas se inclinan a sustrato de cadena más larga.

En el caso de los germinados la actividad enzimática fue medida en el día cinco de germinación, pero en estos casos es importante conocer en cuál de las etapas de crecimiento es donde se posee la mayor actividad ya que se ha observado que las lipasas aparecen en las primeras etapas de la germinación pues es cuando se requiere la liberación de ácidos grasos almacenados en la semilla para ser utilizados en el desarrollo de la planta.(Barros, Fleuri, & Macedo 2010). Debido a estas consideraciones se llevó a cabo el seguimiento de la actividad enzimática de los germinados durante 5 días, para determinar la mayor actividad en cada uno de estos materiales.

Los resultados muestran que para el caso de las semillas de maíz el día de germinación en el que presenta una mayor actividad de lipasa es en el día 3 (21.5 U/g de semilla), para el germen de trigo se presenta en el día 5 (15.8 U/g de semilla).y para el germen de frijol en el día 4 (14.51 U/g de semilla). Los resultados muestran en general como se incrementa con el paso de los días la actividad y en el caso del germen de maíz y frijol se logra observar el decremento posterior (Gráfico 1y 2), esto como ya se mencionó por los cambios que se presentan durante el crecimiento de la planta, las enzimas lipolíticas catalizan la primera etapa de la movilización de lípidos, con la posibilidad de posteriormente ser controlado durante y después del período de germinación para suministrar energía para el crecimiento embrionario.

Datos similares se han encontrado para germinados de *Jatropha curcas* donde se observó su mayor actividad de lipasa en el tercer día de germinación y decrece para el quinto día (Hidayat et al. 2014).

En el caso de los germinados de semilla de trigo no se logró observar el decremento de la actividad (Gráfico 3) en los días analizados por lo que no se puede concluir que el día cinco es donde se encuentra la mayor actividad de lipasa. Para la evaluación en la prueba de la transesterificación de flavonoides se seleccionaron los germinados que presentaron en este estudio la mayor actividad

El orden de magnitud de la actividad enzimática que presentan los materiales vegetales seleccionados se encuentran en concordancia para las reportadas para otras semillas

como las de avena(U/g de semilla) (Mohamed et al. 2000) o para las semillas de girasol 16.3 (U/g de semilla) (Sagirolgu & Arabaci 2005).

Gráfico 1. Actividad enzimática durante la germinación del grano de maíz

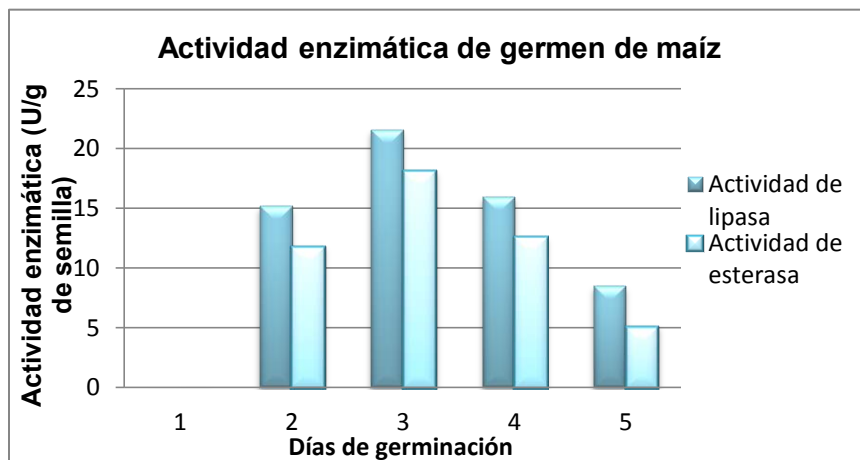


Gráfico 2. Actividad enzimática durante la germinación del grano de frijol

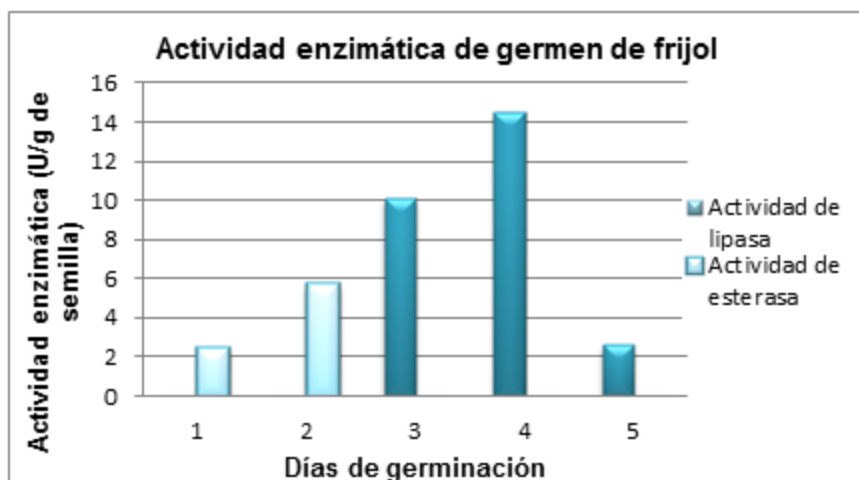
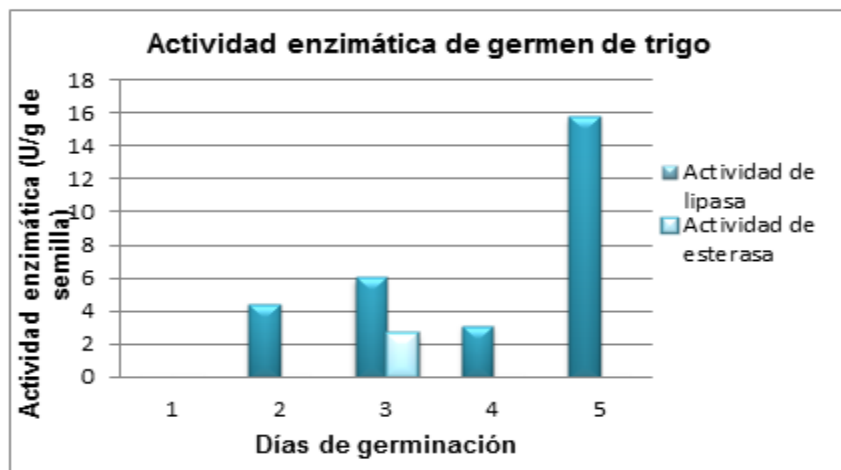


Gráfico 3. Actividad enzimática durante la germinación del grano de trigo



6.6 Transesterificación de flavonoides catalizada por enzimas vegetales

Una vez seleccionadas las fuentes de lipasas se evaluaron para la reacción de transesterificación de flavonoides con el ácido láurico, el aceite de olivo (ácido oleico) y el aceite de ricino (ácido ricinoleico). Se evaluaron estos aceites para observar el comportamiento de estas enzimas frente a diferentes largos de cadena y estructura de los ácidos grasos,

Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 50°C bajo agitación orbital por 96 h siguiendo las reacciones por CCF. (Tabla 21)

Al evaluar los materiales vegetales en la reacción de transesterificación de rutina y naringina, únicamente la naringina reaccionó con todos los agentes acilantes utilizando como catalizador las semillas de ricino. (Figura 26)

Tabla 21. Resultados obtenidos para para la transesterificación de flavonoides con lipasas vegetales

Flavonoide	Agente acilante	Fuente vegetal de lipasas				
		Germen de maíz	Germen de frijol	Germen de trigo	Semillas de papaya	Semillas de ricino
Naringina	Ácido láurico	No	No	No	No	Si
	Aceite de olivo	No	No	No	No	Si
	Aceite de ricino	No	No	No	No	Si
Rutina	Ácido láurico	No	No	No	No	No
	Aceite de olivo	No	No	No	No	No
	Aceite de ricino	No	No	No	No	No

No= No hubo reacción Si= Se llevó a cabo la reacción

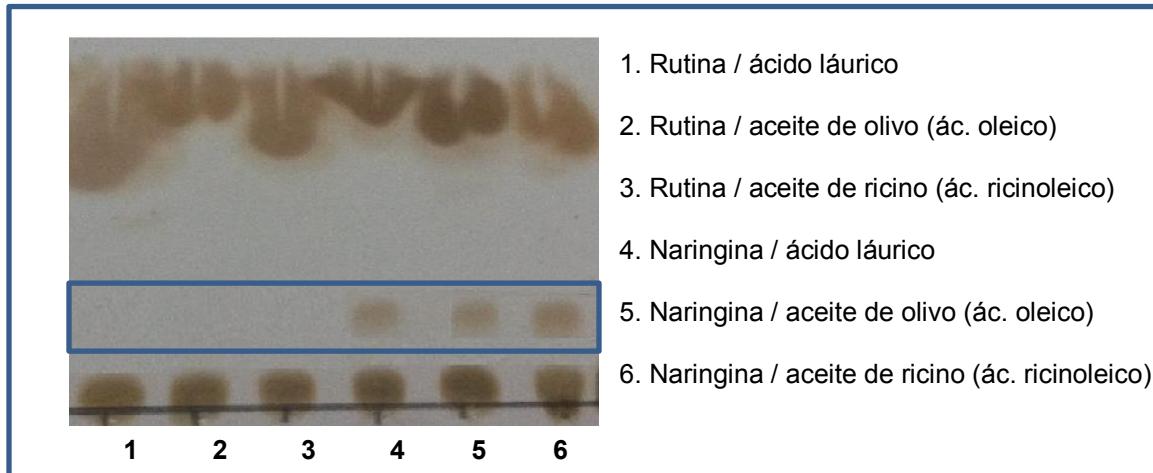


Figura 26. CCF Reacción de transesterificación catalizada por semillas de ricino

Respecto a los otros materiales vegetales evaluados, no puede concluirse que no sean capaces de llevar a cabo la reacción de síntesis ya que existen varios factores que impactan en las reacciones de biocatálisis debido a que cada enzima posee sus características como su temperatura óptima, su estabilidad en disolventes orgánicos es variable y pueden existir ciertos inhibidores en el medio como la presencia de ciertas sales, metales, etc.

En este trabajo no se llevó a cabo la caracterización para cada una de las enzimas por lo que no se puede conocer las condiciones de reacción que pueden estar afectando a las enzimas. Como por ejemplo se ha reportado para la lipasa encontrada en las semillas de avena, que su temperatura óptima se encuentra alrededor de 40°C y su actividad disminuye conforme se incrementa este parámetro (Mohamed et al. 2000) , así pues se sugiere que puede ocurrir algo similar con las lipasas de estos materiales al no conocer su temperatura donde éstas conservan su actividad, debido a que en las reacciones se utiliza una temperatura de 50°C, tomando en cuenta que la cuantificación de la actividad enzimática se realizó a temperatura ambiente (25°C)

Lo mismo puede estar ocurriendo con el disolvente utilizado (2-metil-2-butanol) ya que si bien no existe una guía para la selección del medio de reacción si es necesario tener en cuenta que la enzima conserve su actividad y sea estable en él. Se ha observado que conforme se incrementa la polaridad del disolvente la actividad se ve disminuida (Páez et al. 2003), esto a causa de que las enzimas presentan una monocapa de agua que les permita mantener su estructura y cuando un disolvente es mayormente hidrofílico

presenta afinidad por esta capa y puede llegar a retirarla afectando la flexibilidad de la enzima. (Chua & Sarmidi 2004)

Para la semilla de ricino cabe mencionar que se logró llevar a cabo la reacción de síntesis después de someter a la semilla desengrasada a un pretratamiento con buffer de citratos pH=4 durante 4 horas para su posterior uso en la reacción con los flavonoides, ya que sin ser sometida a este procedimiento la semilla de ricino no era capaz de llevar a cabo la reacción de transesterificación.

Lo anterior puede deberse a que en la semilla de *Ricinus communis* pueden observarse dos tipos de lipasas 1) la lipasa ácida que se encuentra en la semilla en reposo y 2) una lipasa alcalina cuya actividad se evidencia al comienzo de la germinación (Arribére & Caffini 1988). La primera de estas se manifiesta cuando el material se encuentra a un pH ácido por lo que al utilizar la semilla, se puede inferir que la lipasa ácida es la que se encuentra presente lo que hace necesario someterla primero a un pH bajo para que esta pueda manifestar su actividad.

Se ha reportado el uso de la lipasa de ricino para la síntesis de otros compuestos como la esterificación de los ácidos grasos para obtener el glicerol, con rendimientos cercanos al 50%, teniendo como temperatura óptima de reacción de 40°C, pero se observó que la actividad enzimática disminuía a partir de los 45°C.(Tüter 1998)

En este caso la lipasa fue capaz de catalizar la acilación de la naringina con los agentes acilantes evaluados pero no así con la rutina esto puede deberse a que la estructura posee solo grupos OH secundarios y esto represente una dificultad para la enzima al momento de llevar a cabo la reacción de transesterificación.

En este caso no se apreció una diferencia importante entre los agentes acilantes utilizados, a pesar de que el aceite de ricino, que es el sustrato natural de esta enzima, fue utilizado para llevar a cabo la reacción. La conversión que se observó de manera cualitativa mediante la CCF, muestra conversiones pequeñas, por lo que es necesario optimizar las condiciones para mejorar los rendimientos con esta enzima.

Se observó que esta enzima es capaz de llevar a cabo la reacción de una manera regioselectiva, ya que sólo se obtuvo un solo producto de reacción en todos los casos.

Estos resultado sugieren que las lipasas vegetales pueden ser un recurso para llevar a cabo reacciones de síntesis ya que puede no ser necesaria su total purificación, además de encontrarse inmovilizadas naturalmente en los materiales vegetales. Por esta razón queda para futuros trabajos la caracterización de estas enzimas para poder seleccionar las condiciones de reacción adecuadas.

VII. CONCLUSIONES

La lipasa de *C. antártica* es capaz de llevar a cabo la transesterificación de los flavonoides (naringina y rutina) con los ácidos grasos mayoritarios, presentes en los aceites que fueron evaluados (aceite de coco, nuez moscada, olivo, almendra, calabaza, uva, chía, linaza y ricino)

La reacción enzimática con CALB es regioselectiva ya que en todos los casos se obtuvo un solo producto de reacción. Para el caso de naringina en la posición 6 de la fracción de glucosa mientras que para rutina en la posición 4 de la ramnosa, esto se determinó con la identificación de los productos purificados mediante RMN (^1H y ^{13}C).

Al llevar a cabo la transesterificación con los ésteres metílicos de los ácidos grasos, los productos que se obtienen son los mismos a los obtenidos con los aceites y no se observó diferencia en los rendimientos.

La reacción se ve influenciada por la naturaleza del flavonoide, ya que se obtuvieron mejores rendimientos con naringina que con rutina, atribuyendo el efecto a que en la molécula de naringina existe un alcohol primario mientras que la rutina sólo posee alcoholes del tipo secundario.

Para el efecto del tipo de agente acilante no se observó diferencia entre los ácidos grasos de C10 y C18, mientras que la reacción con ácido mirístico (C14) fue la que presentó el menor rendimiento para ambos flavonoides. Entre los ácidos grasos C18 no se observó diferencia asociada con el número de insaturaciones entre C18:1, C18:2 y C18:3.

La lipasa de la semilla de *R. communis* fue capaz de llevar a cabo la reacción de transesterificación de naringina con los aceites de olivo y ricino, mientras que los germinados de maíz, trigo y frijol así como las semillas de papaya en las condiciones que fueron evaluadas no lograron llevarla a cabo.

VIII. REFERENCIAS

- Agyemang-Yeboah, F. (2011). *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier (pp. 361–367).
- Almeida, V. M., Branco, C. R., Assis, S. a, Vieira, I. J., Braz-Filho, R., & Branco, A. (2012). Synthesis of naringin 6"-ricinoleate using immobilized lipase. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-7.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A, Ognier, S., Engasser, J. M., Moussou, P., Pauly, G., & Ghoul, M. (2004). Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology*, 110(3), 265–271.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G., & Ghoul, M. (2004). Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29(6), 63–67.
- Arribére, M. C., & Caffini, N. (1988). Enzimas Lipolíticas de Plantas Superiores II. Lipasas de Semillas de Ricino (*Ricinus cornrnunis* L .). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 7(3), 215–223.
- Atabani, A. E., Silitonga, S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., & Mekhilef, S. (2012). A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070–2093.
- Barros, M., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2010). Seed Lipases : Sources , applications and properties – A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), 15–29.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4505–4515.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides : Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.

- Céliz, G., & Daz, M. (2011). Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media. *Process Biochemistry*, 46(1), 94–100.
- Cevallos-Casals, B., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86(1), 69–77.
- Chebil, L., Anthony, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M., & Ghoul, M. (2007). Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9496–9502.
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., & Ghoul, M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, 41(11), 2237–2251.
- Chen, H.-M., Wang, P.-Y., & Tsai, S.-W. (2009). Carica papaya lipase-catalyzed transesterification resolution of secondary alcohols in organic solvents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(5), 549–554.
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 805–817.
- Chua, L. S., & Sarmidi, M. R. (2004). Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28(2-3), 111–119.
- Danieli, B., De Bellis, P., Carrea, G., & Riva, S. (1990). Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Flavonoid Disaccharide Monoglycosides. *Helvetica Chimica Acta*, 73(7), 1837–1844.
- Danieli, B., Luisetti, M., Sampognaro, G., & Riva, S. (1997). Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Noozym 435) in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 177(96), 193–201.

- De Araújo, M. E. M. B., Moreira Franco, Y. E., Alberto, T. G., Sobreiro, M. A., Conrado, M. A., Priolli, D. G., de Oliveira Carvalho, P. (2013). Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chemistry*, 141(1), 266–273.
- Domínguez de María, P., Sinisterra, J. V, Tsai, S.-W., & Alcántara, A. R. (2006). Carica papaya lipase (CPL): an emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology Advances*, 24(5), 493–499.
- Gayot, S., Santarelli, X., & Coulon, D. (2003). Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *Journal of Biotechnology*, 101(1), 29–36.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., & Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39(1), 10–16.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids* (pp. 275). USA: Springer.
- Hallgren, B., Ryhage, R., & Stenhagen, E. (1959). The mass spectra of methyl oleate, methyl linoleate and methyl linolenate. *Acta Chemica Scandinavica*, 13, 845–847.
- Hernandez, C. E., Chen, H.-H., Chang, C.-I., & Huang, T.-C. (2009). Direct lipase-catalyzed lipophilization of chlorogenic acid from coffee pulp in supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 359–365.
- Hidayat, C., Hastuti, P., Utazmi, S., Wardhani, A. K., & Pradipta, D. S. (2014). Enhancing indigenous lipase activity of germinated *Jatropha curcas* L. Seeds for the enzymatic degradation of phorbol ester. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 71–76.
- Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 495–502.

- Ishihara, K., & Nakajima, N. (2003). Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2-6), 411–417.
- Katsoura, M. H., Polydera, C., Tsironis, L., Tselepis, D., & Stamatis, H. (2006). Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology*, 123(4), 491–503.
- Kim, S., Song, J. K., & Kim, H. K. (2013). Cell surface display of *Staphylococcus haemolyticus* L62 lipase in *Escherichia coli* and its application as a whole cell biocatalyst for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 54–61.
- Kleiman, R., & Spencer, G. F. (1973). Gas chromatography-mass spectrometry of methyl esters of unsaturated oxygenated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50(2), 31–38.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., & Kolisis, F. N. (2001). Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *European Journal Lipid Science Technology*, 103, 655–660.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., & Kolisis, F. N. (2003). Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 59–62.
- Liaquat, M. (2011). Optimized synthesis of (Z)-3-hexen-1-yl caproate using germinated rapeseed lipase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 59–65.
- Liaquat, M., & Owusu Apenten, R. K. (1998). Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters Using Plant Seedling Lipases in Organic Media. *Food Chemistry and Toxicology*, 65(2), 295–299.
- Lombard, S., Helmy, M. E., & Piéroni, G. (2001). Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *The Biochemical Journal*, 358(3), 773–81.

- Lue, B.-M., Guo, Z., Glasius, M., & Xu, X. (2009). Scalable Preparation of High Purity Rutin Fatty Acid Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(1), 55–61.
- Lutz, S. (2004). Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(18), 2743–2748.
- Marco, J. A. (2006). *Química de los productos naturales* (pp. 149–161). Editorial Síntesis.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271–278.
- Mbatia, B., Kaki, S. S., Mattiasson, B., Mulaa, F., & Adlercreutz, P. (2011). Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7021–7027.
- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, a D., Kolisis, F. N., & Stamatis, H. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*, 116(3), 295–304.
- Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C., & Kolisis, F. N. (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry*, 41(9), 2029–2034.
- Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A., & Fahmy, A. S. (2000). Distribution of lipases in the Gramineae . Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73, 227–234.
- Moussavou MOUNGUENGUI, R. W., BRUNSCHWIG, C., BARÉA, B., VILLENEUVE, P., & BLIN, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in Energy and Combustion Science*, 39(5), 441–456.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Hamada, H., Kawabe, S., & Furuya, T. (2000). Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system

- from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 347–9.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T., & Hamada, H. (1999). Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 105–107.
- Otto, R., Geers, B., Weiss, A., Petersohn, D., Schlotmann, K., & Schroeder, K.-L. (2001). Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals. *Patent CA 2491027 A1*.
- Oyvind, M. A., & Kenneth, Rm. (2006). *Flavonids.Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group.
- Páez, B. C., Medina, A. R., Rubio, F. C., Moreno, P. G., & Grima, E. M. (2003). Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 845–853.
- Passicos, E., Santarelli, X., & Coulon, D. (2004). Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnology Letters*, 26(13), 1073–1076.
- Pedersen, N. R., Wimmer, R., Emmersen, J., Degn, P., & Pedersen, L. H. (2002). Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydrate Research*, 337(13), 1179–1184.
- Perdomo, F. A., Acosta-Osorio, A. a., Herrera, G., Vasco-Leal, J. F., Mosquera-Artamonov, J. D., Millan-Malo, B., & Rodriguez-Garcia, M. E. (2013). Physicochemical characterization of seven Mexican *Ricinus communis* L. seeds & oil contents. *Biomass and Bioenergy*, 48, 17–24.
- Peters, N. K., Frost, J. W., & Long, S. (1996). A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233, 977–980.
- Pleiss, J., Fischer, M., & Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), 67–80.

- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research Group*, 22(375-383).
- Riihinen, K. R., Ou, Z. M., Gödecke, T., Lankin, D. C., Pauli, G. F., & Wu, C. D. (2014). The antibiofilm activity of lingonberry flavonoids against oral pathogens is a case connected to residual complexity. *Fitoterapia*, 97, 78–86.
- Sagiroglu, A., & Arabaci, N. (2005). Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 35, 37–51.
- Salem, J. H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F., & Fick, M. (2010). Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry*, 45(3), 382–389.
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36–44.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., & Matheus, R. (1998). Transesterification of Vegetable Oils : a Review. *Journal Brazilian Chemical Society*, 9(1), 199–210.
- Smith, M. B., & March, J. (2007). *March's advanced organic chemistry* (p. 1419).
- Stevenson, D. E., Wibisono, R., Jensen, D. J., Stanley, R. a., & Cooney, J. M. (2006). Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1236–1241.
- Tüter, M. (1998). Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(3), 417–420.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Alissandratos, A., Faulds, C. B., & Christakopoulos, P. (2008). Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *Journal of Biotechnology*, 133(4), 497–504.

- Vargas-Rodríguez, Y. M., Gómez-Vidales, V., Vázquez-Labastida, E., García-Bórquez, A., & Aguilar-Sahagún, G. (2008). Caracterización espectroscópica , química y morfológica y propiedades superficiales de una montmorillonita mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 25(1), 135–144.
- Villeneuve, P. (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, 25(6), 515–36.
- Viskupicova, J., Ondrejovic, M., & Maliar, T. (2012). Enzyme-Mediated Preparation of Flavonoid Esters and Their Applications. *Biochemistry* (pp. 263–286).
- Viskupicova, J., Sturdik, E., & Ondrejovic, M. (2009). Enzymatic transformation of flavonoids. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 88–106.
- Wells, A. (2012). Industrial Applications of Biocatalysis: An Overview. *Comprehensive Chirality*, 9, 253–287.
- Zhang, J., Sun, C., Yan, Y., Chen, Q., Luo, F., Zhu, X. Chen, K. (2012). Purification of naringin and neohesperidin from Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit and their effects on glucose consumption in human HepG2 cells. *Food Chemistry*, 135(3), 1471–1478.
- Zheng, M.-M., Wang, L., Huang, F.-H., Guo, P.-M., Wei, F., Deng, Q.-C. Wan, C.-Y. (2013). Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 82–88.

IX. ANEXOS

ANEXO A. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS ESTÁNDARES DE NARINGINA Y RUTINA

Tabla 22. Datos espectroscópicos de naringina

Naringina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d ₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.07	s	H-1'''	5.11	d,(2.4)
OH-4'	9.68	s	2H-6''	3.70	m
H-2'/H-6'	7.34	d,(8.4)	H-5''	3.68	dd,(5.65)
H-3'/H-5'	6.81	d,(8.4)	H-azúcares	3.20 a 3.65	m
H-8	6.11	d(2.0)	H-3a	3.40	dd,(17.0,13.2)
H-6	6.09	d,(2.0)	H-3b	2.73	dd (17.0,3.4)
H-2	5.51	dd,(13.2,3.4)	3H-6'''	1.18	d,(6.2)
H-1''	5.16	d,(8.2)			
RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d ₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	197.70	C-1''	100.84	C-4'''	72.27
C-7	165.32	C-1'''	97.85	C-2'''	70.93
C-5	163.41	C-6	96.77	C-3'''	70.85
C-9	163.16	C-8	95.58	C-4''	70.03
C-4'	158.60	C-2	79.32	C-5'''	68.78
C-2'/C-6'	129.08	C-3''	77.59	C-6''	61.08
C-3'/C-5'	116.94	C-5''	76.63	C-3	42.71
C-10	103.70	C-5'''	74.05	C-6'''	18.73

Tabla 23. Datos espectroscópicos de rutina

Rutina					
RMN-¹H (400MHz,DMSO-d ₆)					
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
OH-5	12.59	s	H-1''	5.34	d,(7.33)
OH-7	10.74	s	OH-2''	5.28	s
OH-3'	9.63	s	OH-4''	5.07	d,(6.43)
OH-4'	9.14	s	OH-3''	5.03	d(5.67)
H-2'	7.50	d,(5.72)	H-4'''	3.06	d,(13.05)
H-5'	6.83	d,(9.30)	H-azúcares	3.06 a 3.70	m
H-8	6.36	d,(2.02)	3H-6'''	0.98	d,(6.32)
H-6	6.17	d,(2.02)			

RMN-¹³C (100MHz,DMSO-d ₆)					
#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
C-4	177.41	C-5'	116.20	C-2''	74.08
C-7	164.21	C-2'	115.15	C-4''	73.94
C-9	161.27	C-10	103.86	C-4''	72.20
C-2/C-5	156.52	C-1'''	100.93	C-2'''	70.69
C-4'	148.38	C-1''	100.49	C-4/C-3'''	68.14
C-3'	144.36	C-6	98.68	C-6''/ C-5'''	66.77
C-3	133.10	C-8	93.46	C-6'''	17.08
C-6'	121.45	C-3''	76.51		
C-1'	121.11	C-5''	75.51		

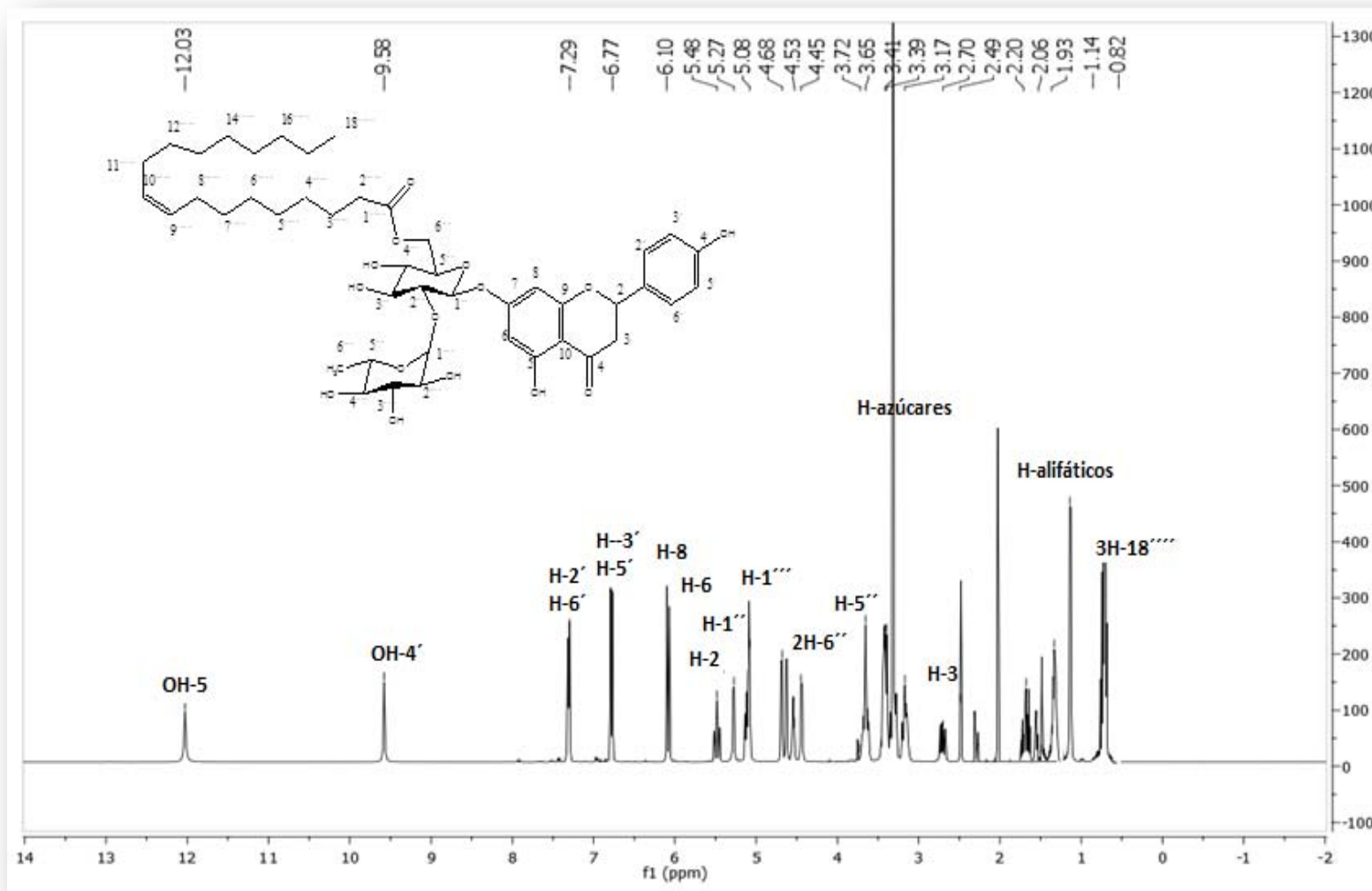
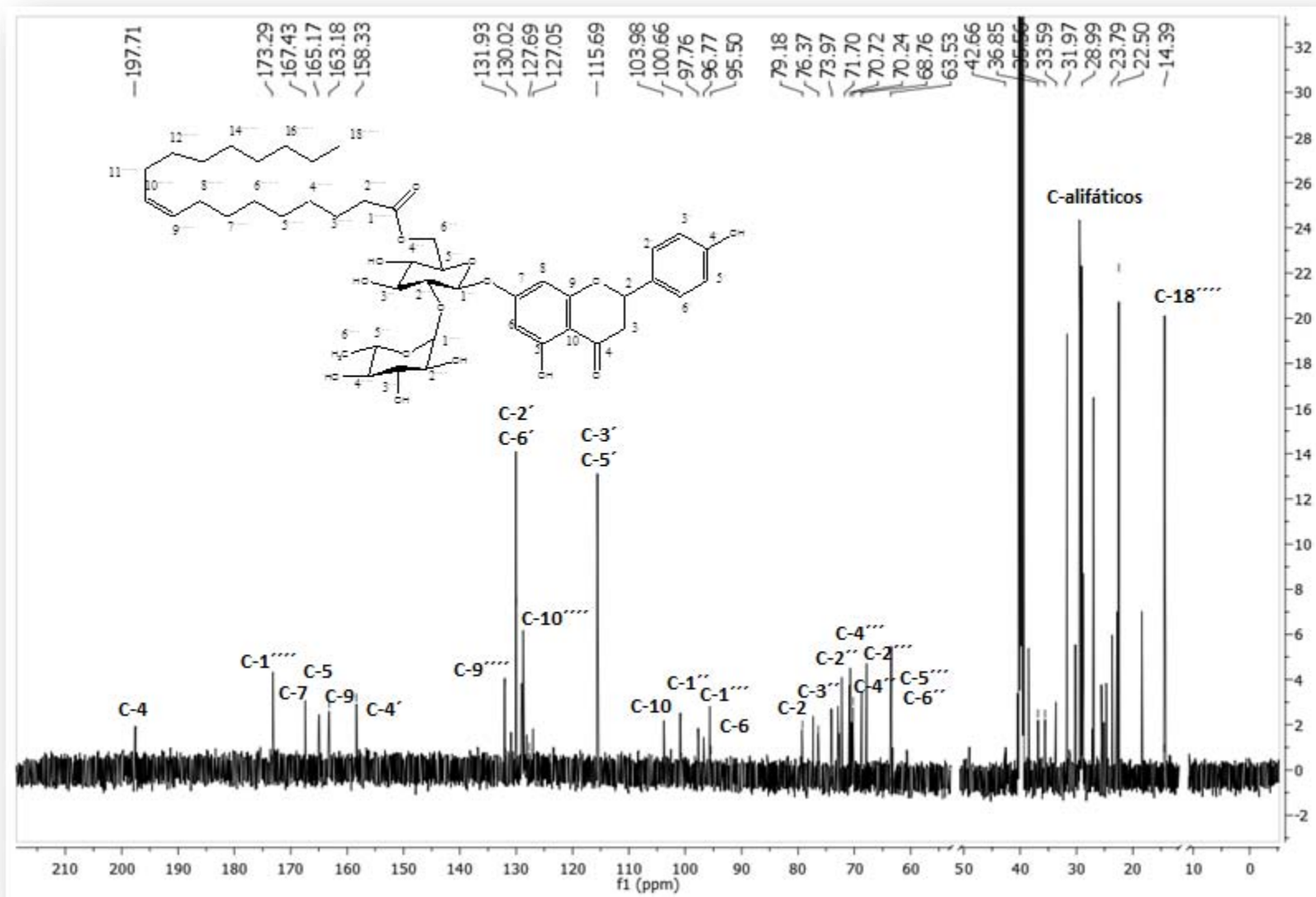
ANEXO B. ESPECTROS DE RMN (^1H Y ^{13}C) DE 6''-O-OLEATO DE NARINGINAFigura 27. Espectro de RMN- ^1H del 6''-O-oleato de naringina (400MHz, DMSO- d_6)

Figura 28. Espectro de RMN- ^{13}C del 6''-O-oleato de naringina (100MHz, DMSO- d_6)



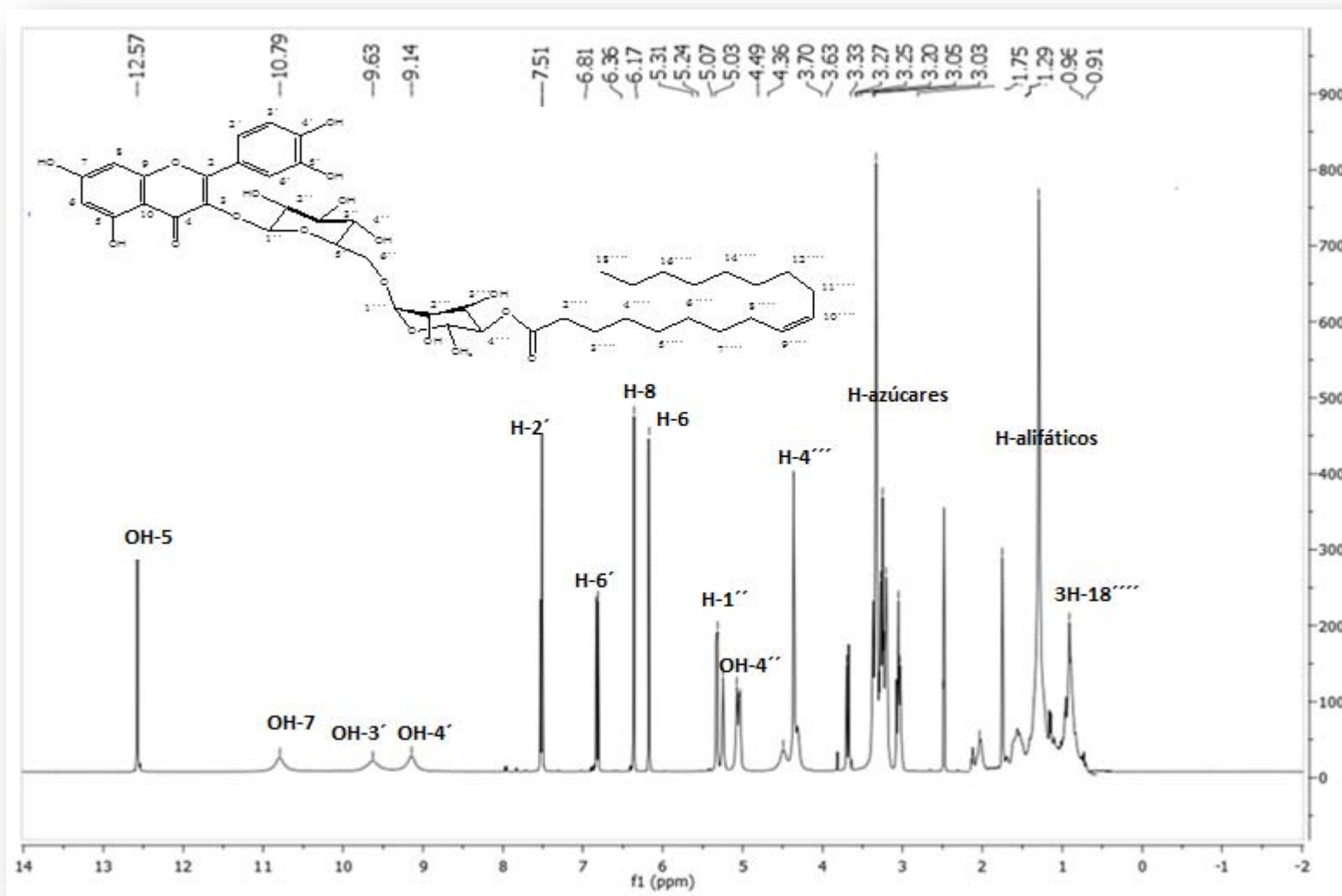
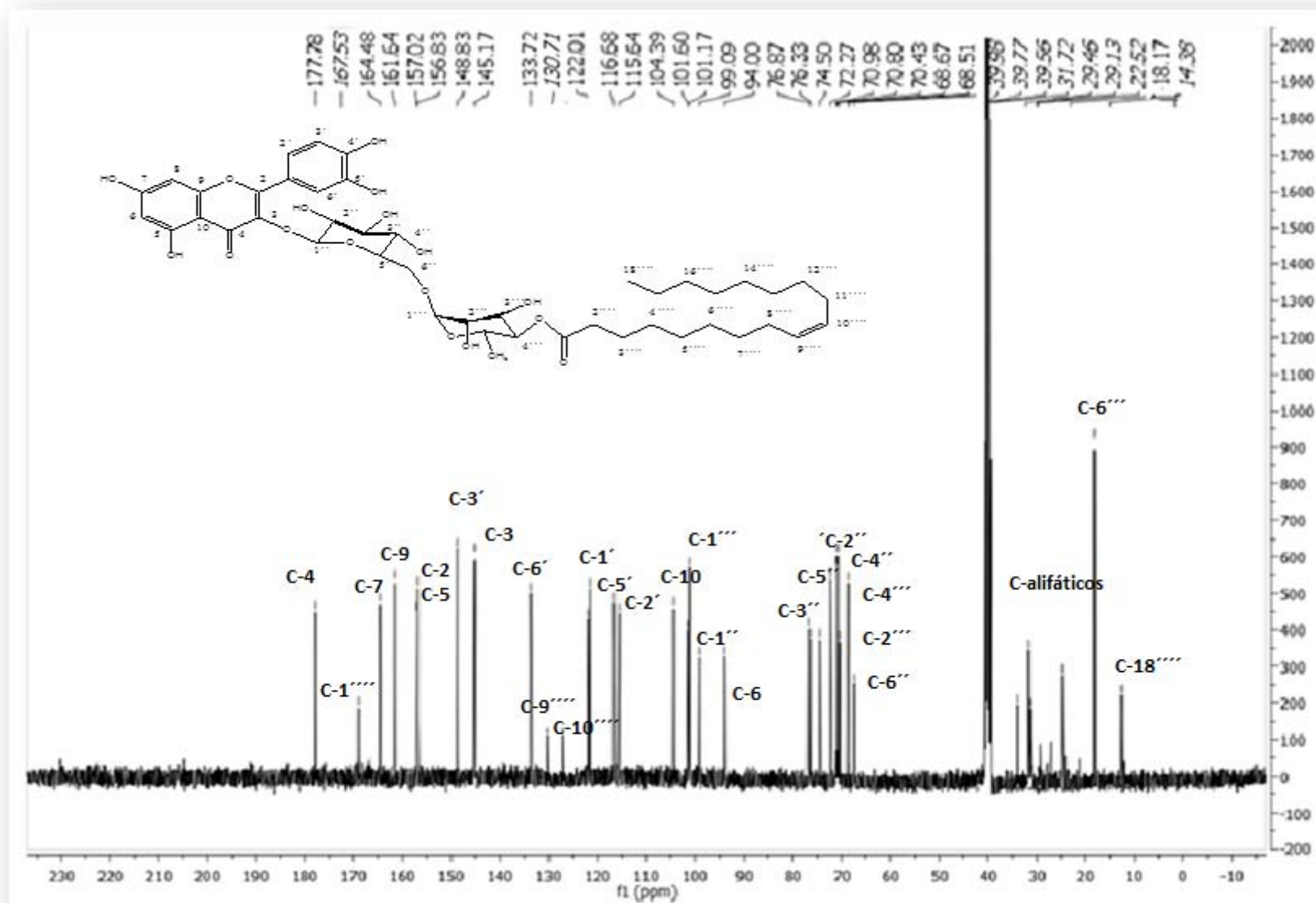
ANEXO C. ESPECTROS DE RMN (^1H Y ^{13}C) DE 4'''-O-OLEATO DE RUTINAFigura 29. Espectro de RMN- ^1H de 4'''-O-oleato de rutina (400MHz, DMSO- d_6)

Figura 30. Espectro de RMN-¹³C de 4'''-O-oleato de rutina (100MHz, DMSO-d₆)



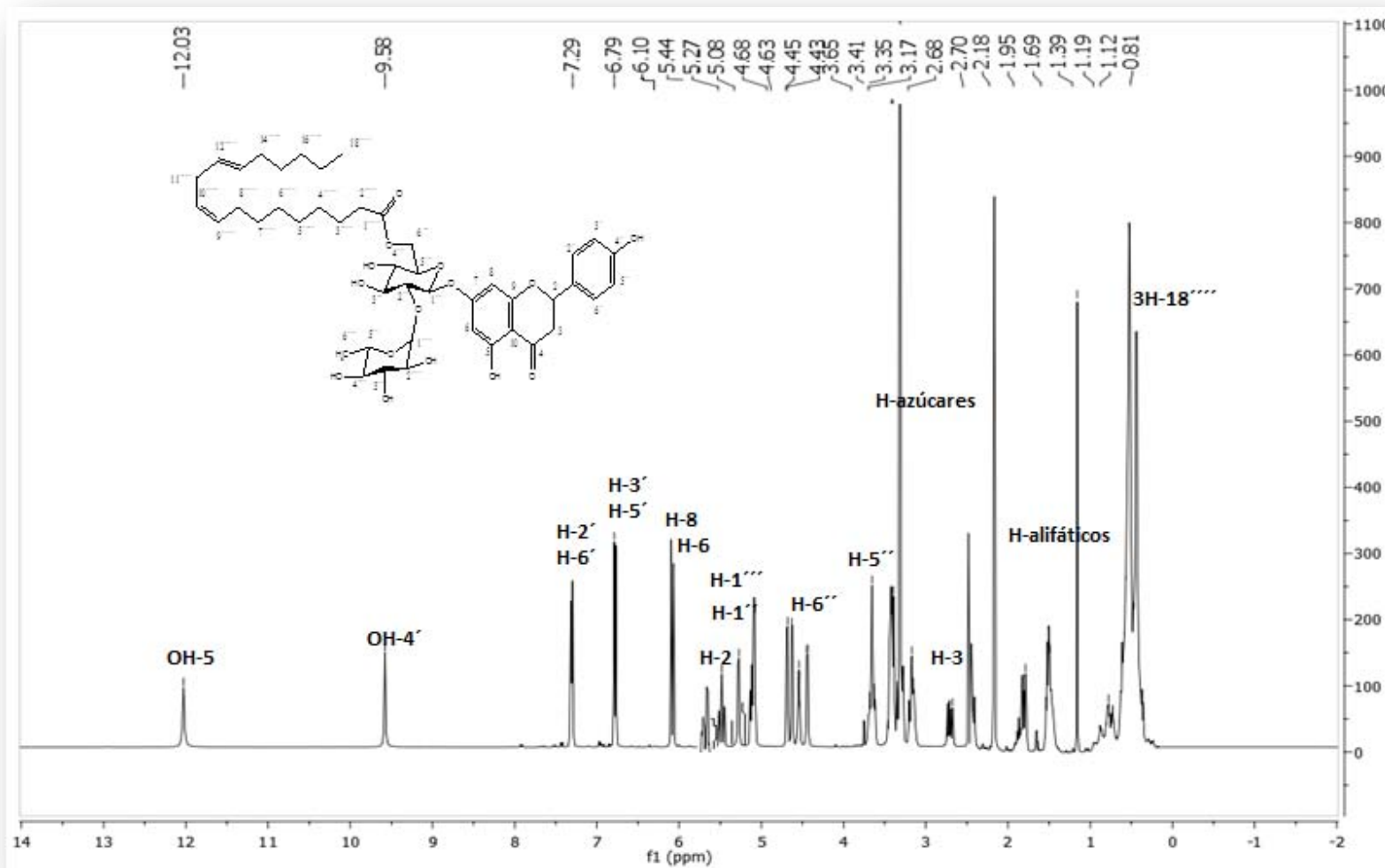
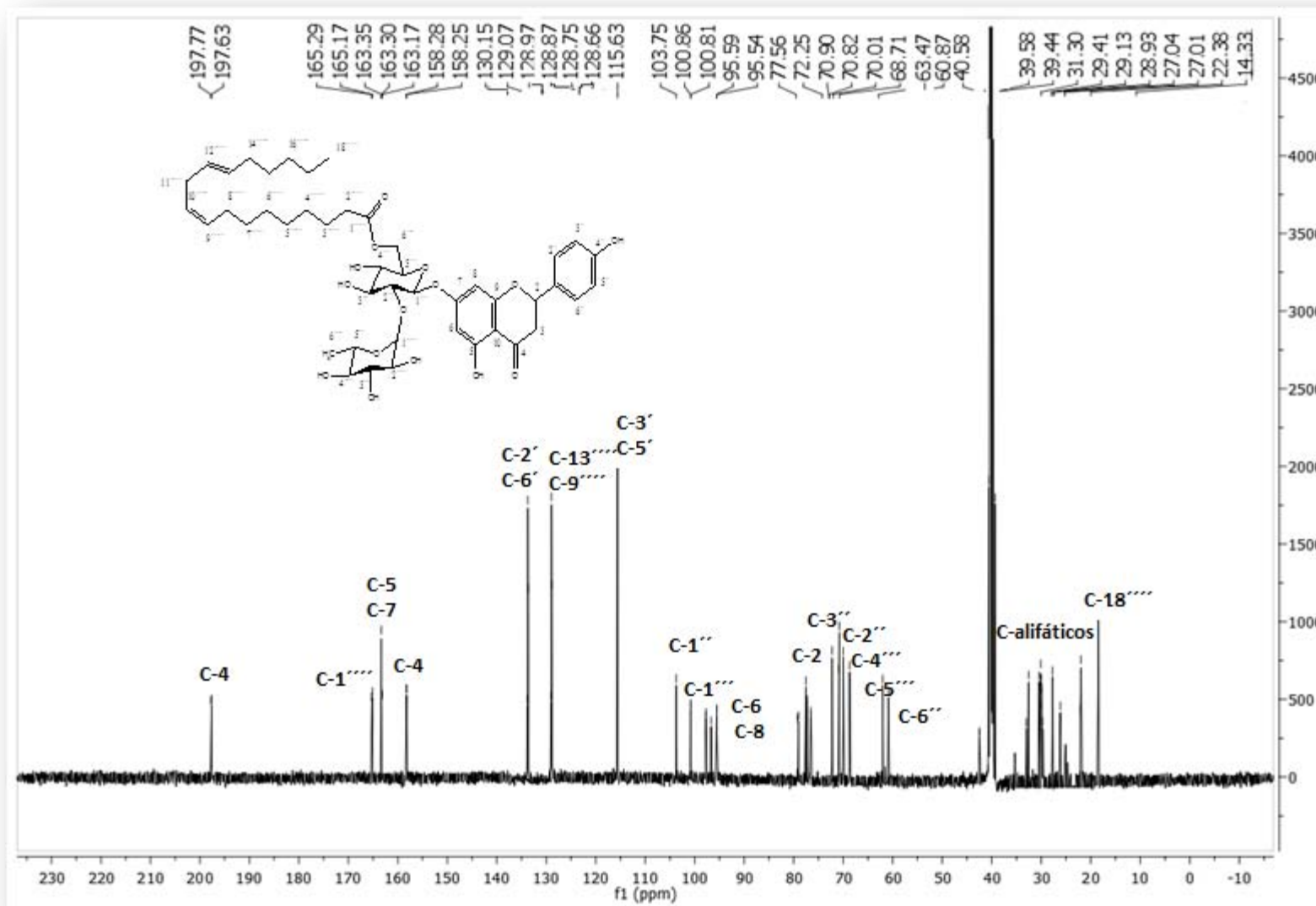
ANEXO D. ESPECTROS DE RMN (^1H Y ^{13}C) DE 6''-O-LINOLEATO DE NARINGINAFigura 31. Espectro de RMN- ^1H del 6''-O-linoleato de naringina (400MHz, DMSO- d_6)

Figura 32. Espectro de RMN-¹³C del 6''-O-linoleato de naringina (100MHz, DMSO-d₆)



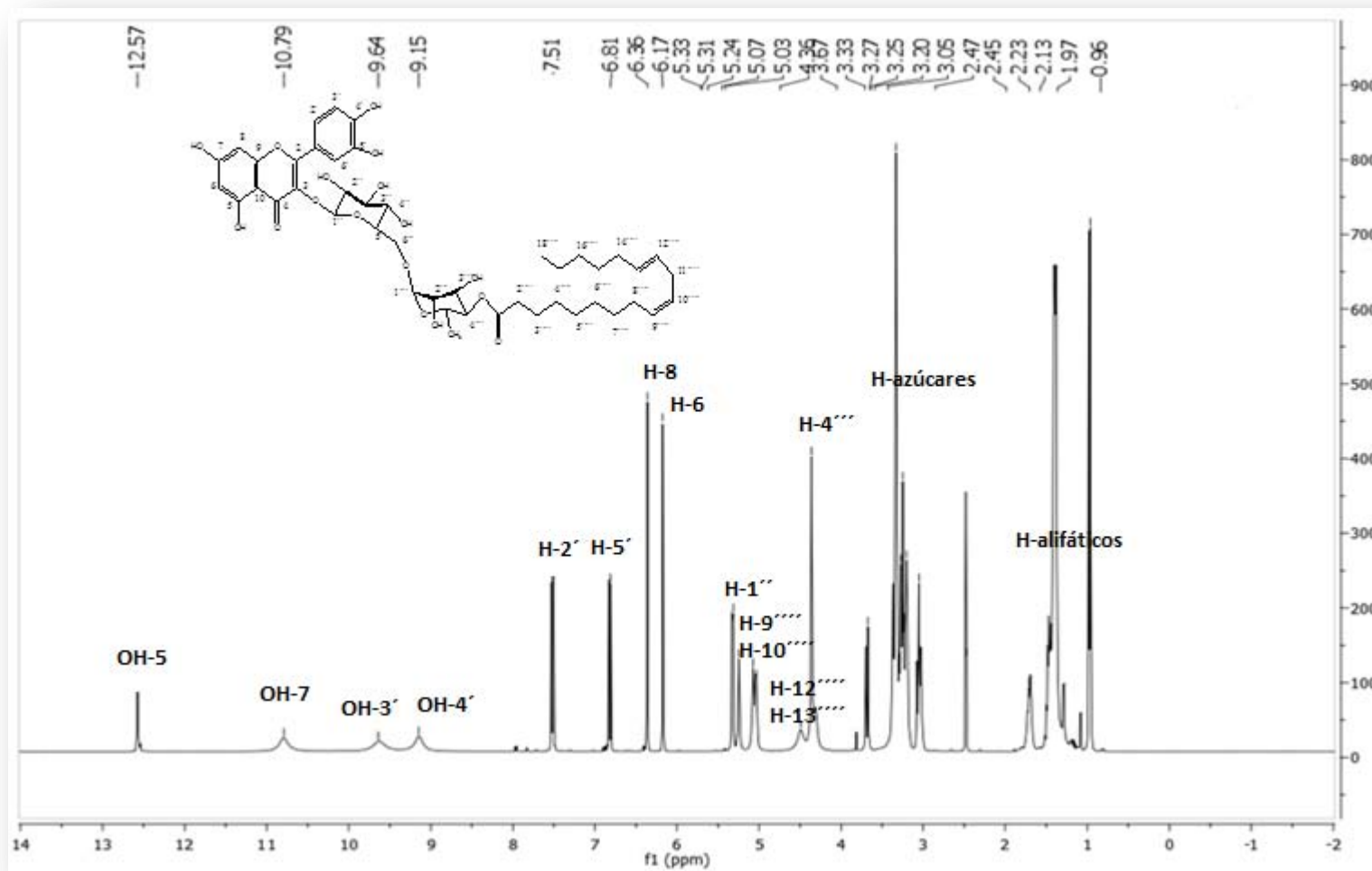
ANEXO E. ESPECTROS DE RMN (^1H Y ^{13}C) DE 4'''-O-LINOLEATO DE RUTINAFigura 33. Espectro de RMN- ^1H de 4'''-O-linoleato de rutina (400MHz, DMSO- d_6)

Figura 34. Espectro de RMN- ^{13}C de 4''-O-linoleato de rutina (100MHz, DMSO- d_6)