



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE NUEVOS ÉSTERES DE
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

REBECA LIZBETH CORTÉS GONZÁLEZ



México D.F.

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: DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: DRA. REINA GARCÍA SÁNCHEZ

SECRETARIO: DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

1er. SUPLENTE: DR. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

2do. SUPLENTE: DR. MIQUEL GIMENO SECO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CON EL APOYO ECONÓMICO DEL PROYECTO CONACYT CB-2012/180128

ASESOR DEL TEMA:

ARTURO NAVARRO OCANA

SUSTENTANTE:

REBECA LIZBETH CORTÉS GONZÁLEZ

INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES	7
Ácidos Hidroxicinámicos.....	7
Ácido Ferúlico	8
Ácido <i>p</i> -Cumárico.....	9
Ácido Sinápico	10
Ácido Cafeico	11
Alcoholes	12
Ácido Kójico	12
Alcohol Vainíllico	13
Alfa-amirina	14
Esterificación.....	15
Transesterificación.....	16
Métodos de Esterificación.....	18
Método de Esterificación de Fisher.....	18
Método de Esterificación en Medio Básico	19
Método de Esterificación Biológico	19
Método de Esterificación Enzimático	19
Otros Métodos de Esterificación	20
Hidroxicinamatos	20
Ésteres del ácido Ferúlico.....	21
Ésteres del ácido <i>p</i> -Cumárico.....	22
Ésteres del ácido sinápico	22
Ésteres del ácido Cafeico	23
Lipofilización	24
Enzimas: Lipasas.....	25
Lipasa B <i>Candida antarctica</i>	26
Lipasa Vegetal, extraída de la semilla de <i>Ricinus communis</i>	28
Cromatografía.....	29
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
HIPÓTESIS	30

MATERIALES.....	31
METODOLOGÍA.....	32
Diagrama general	32
Esterificación Química	33
Esterificación de Fisher	33
Ésteres de metilo	33
Diagrama de Proceso de la Esterificación de Fisher.....	34
Preparación del alcohol Vainíllico.....	35
Diagrama de Proceso de preparación del alcohol Vainíllico	36
Transesterificación Enzimática	37
Transesterificación Enzimática con Lipasa Comercial	37
Diagrama de proceso de la Transesterificación Enzimática con Lipasa Comercial	38
Preparación de la lipasa vegetal, extraída de la semillas <i>Ricinus communis</i>	39
Diagrama de Proceso de Preparación de la lipasa vegetal, <i>Ricinus communis</i>	40
Transesterificación Enzimática con Lipasa Vegetal	41
Diagrama de proceso de la Transesterificación Enzimática con Lipasa Vegetal	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
Esterificación de Fisher	43
Actividad Enzimática.....	44
Transesterificación Enzimática	44
Purificación de las reacciones de transesterificación	48
Análisis de Espectros de RMN 1H Y 13C	54
Análisis de Espectros de RMN 1H de Vainillil Cafeato.....	55
Análisis de Espectros de RMN 13C de Vainillil Cafeato	59
Análisis de Espectros de RMN 1H de Vainillil Ferulato	64
Análisis de Espectros de RMN 13C de Vainillil Ferulato	66
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71
Referencias Electrónicas	76
APÉNDICE	77

RESUMEN

La producción de los alimentos tradicionales de México, como los compuestos generados durante su procesamiento pueden ser una fuente importante de compuestos químicos usados en diferentes industrias. Sin embargo, poco se ha explorado su potencial como fuente de compuestos bioactivos para alimentos, como es el caso de los ácidos hidroxicinámicos que son compuestos antioxidantes. Los ácidos hidroxicinámicos son un tipo de compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, principalmente en la pared celular de los vegetales, desafortunadamente, el uso de algunos de ellos está limitado por su baja solubilidad y estabilidad en medios lipófilos. La naturaleza hidrófila de estos antioxidantes reduce su eficacia en la estabilización de las grasas y aceites y esto ha sido reportado como una desventaja cuando una fase acuosa está presente.

El presente proyecto tuvo como objetivo llevar a cabo reacciones de lipofilización, como primer paso, por el método de Fisher, se realizaron reacciones de esterificación de ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, sinápico, *p*-cumárico y caféico) con alcoholes de cadena corta para la obtención de ésteres métilicos y etílicos; en el segundo paso se obtuvieron los alcoholes (alcohol vainíllico, ácido kójico, alfa-amirina) y se preparó la lipasa vegetal extraída de las semillas *Ricinus communis*, en el tercer paso se obtuvieron los nuevos hidroxicinamatos de alquilo usando reacciones de transesterificación enzimática utilizando los alcoholes antes mencionados y los metil y etil hidroxicinamatos preparados en el primer paso, para este último paso, primero se probó la catálisis con lipasa comercial *Candida antarctica*, y después con la lipasa vegetal *Ricinus communis*.

Se purificaron los productos de transesterificación por el método de la columna cromatográfica, se seleccionaron a los compuestos que obtuvieron una conversión notable de reactivos a productos y un R_f diferente al de sus precursores. Mediante resonancia magnética nuclear (RMN) se logró identificar a los productos purificados debido a los valores de desplazamientos (¹H y ¹³C) mostrados en el espectro, los cuales fueron comparados con los valores de sus precursores consultados en la literatura.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos que en los alimentos retardan la rancidez causada por autooxidación y fotooxidación, protegiendo así a los lípidos y los compuestos liposolubles como las vitaminas o los carotenoides. Muchos de los antioxidantes naturales de interés son de origen vegetal y pertenecen a la clase de compuestos fenólicos y polifenólicos. La actividad de los antioxidantes y su mecanismo de acción está dictada por las características estructurales de las moléculas implicadas, el sistema en el que están presentes, así como las condiciones de procesamiento y de almacenamiento, entre otros (Shahidi, 2015).

Los ácidos hidroxicinámicos, son compuestos fenólicos, que a su vez son antioxidantes naturales presentes en la naturaleza, generalmente por su poca solubilidad en medios no polares su uso es limitado. Una solución para mejorar su naturaleza hidrofóbica consiste en su esterificación, esta reacción química conduce a una mezcla de productos. Para superar este problema, la catálisis enzimática es una opción por su regioselectividad. Las lipasas son capaces de promover la síntesis del enlace éster cuando la reacción se lleva a cabo en una baja actividad de agua (Stalmach, 2014).

La modificación de los ácidos hidroxicinámicos a través de la esterificación con alcoholes puede ser utilizado como una herramienta para producir derivados con mayor lipofilicidad y mayor poder antioxidante. Además, la lipofilización de estos compuestos naturales puede mejorar su solubilidad y miscibilidad en las fórmulas y emulsiones en base aceite y por lo tanto pueden ser utilizados como antioxidantes eficaces en productos alimenticios y farmacéuticos multifásicos (Katsoura *et al.*, 2009).

La transesterificación es un proceso químico a través del cual, aceites reaccionan con alcohol (etanol o metanol) para generar ésteres grasos de étil o métil éster respectivamente (Dizge y Keskinler, 2008).

El desarrollo de nuevos procesos catalíticos pueden también reducir los costos de producción, con catalizadores que están disponibles y/o fáciles de preparar, ahorrando agua y reduciendo el impacto ambiental en todo el proceso. Los procesos enzimáticos relacionados con lipasas derivadas de microorganismos, animales o

plantas, que pueden ofrecer una excelente alternativa en la obtención de nuevos productos. Las lipasas vegetales son fáciles de usar con o sin la purificación parcial del extracto de planta (Moussavou *et al.*, 2013).

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica y como biocatalizadores presentan grandes ventajas sobre los catalizadores químicos más comunes como son su mayor especificidad y selectividad, lo cual principalmente se debe a que son catalizadores ópticamente selectivos, además de trabajar en condiciones de reacción cercanas a las que se encuentran en medios fisiológicos, al contrario de la mayoría de reacciones químicas convencionales (Sánchez, 1998).

Las lipasas vegetales están presentes con una alta actividad en el tejido de reserva de muchas plantas oleaginosas. En contraste con la mayoría de las semillas oleaginosas que desarrollan actividad lipasa durante la germinación, la semilla de ricino tiene lipasas activas incluso en la etapa de dormancia. Algunas lipasas catalizan reacciones de hidrólisis de grasas y aceites, otras muestran actividad catalítica en reacciones de hidrólisis y reacciones de esterificación. (Tüter, 1998).

ANTECEDENTES

Ácidos Hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son componentes fenólicos estructurales de la pared celular de plantas y frutas, son compuestos bioactivos y precursores de aromas. Raramente se encuentran como ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con otras moléculas. (Pérez *et al.*, 2009). Los más comunes son los ácidos ferúlico, sinápico, cafeico y p-cumárico. (Fenemma, 2000). Los ácidos hidroxicinámicos poseen una considerable actividad antioxidante. (Garrido, *et al.*, 2012).

Ácido Ferúlico

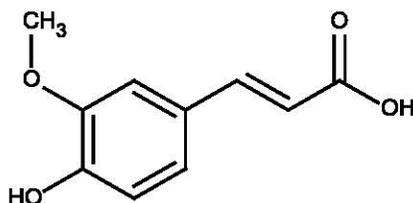


Figura 1. Estructura química del ácido ferúlico.

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) es una molécula antioxidante con masa molecular de 194.18 g/mol y un perfil endotérmico de 175.2 °C (Tmax) correspondiente al punto de fusión de la forma cristalina, seguido de un efecto exotérmico de fusión debido a fenómenos de descomposición a temperaturas más altas (Anselmi *et al.*, 2006).

El ácido ferúlico se encuentra en las capas externas del grano del maíz, usualmente está vinculado a los polímeros de la pared celular por enlaces ésteres debido a la unión del grupo carboxílico con el hidroxilo de α -L-arabinosil de las cadenas laterales de los xylanos. El mayor contenido de ácido ferúlico se puede encontrar en el salvado de maíz, aunque también se encuentra en frutas y verduras como el tomate y cereales como el maíz dulce. Es un compuesto que tiene varias funciones fisiológicas, como actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatoria, efecto neuroprotector y captación de radicales libres (Zhao *et al.*, 2014; Gortzi *et al.*, 2015).

El ácido ferúlico se utiliza ampliamente en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas. Por ejemplo, en ésta última es utilizado en formulaciones para la protección cutánea como fotoprotector, el cual ayuda a retrasar el proceso de envejecimiento prematuro de la piel. Sin embargo aplicaciones del ácido ferúlico en las industrias mencionadas, están limitadas debido a su escasa solubilidad en medios hidrofílicos y medios hidrofóbicos (Anselmi *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2014).

Ácido *p*-Cumárico

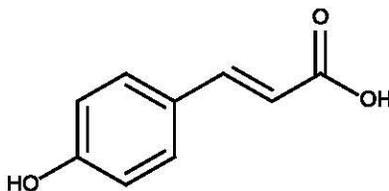


Figura 2. Estructura química del ácido *p*-cumárico.

El ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) es un derivado hidroxilado del ácido cinámico y se produce naturalmente en tres isómeros (orto, meta, y para-); el ácido *p*-cumárico es el isómero más común que existe en la naturaleza, esta molécula tiene una masa molecular de 164.16 g/mol, punto de fusión de 210°C-213°C, dos valores de pKa: pKa1=4.6 basado en el oxígeno del ácido carboxílico y pKa2= 9.3 basado en el oxígeno fenólico (Ravikumar et al., 2013).

El ácido *p*-cumárico se encuentra ampliamente en algunos tejidos vegetales y está unido por enlaces ésteres a polisacáridos y éster o éter a componentes de lignina. Esta molécula también está presente en una gran cantidad de alimentos, tales como uvas, vino blanco y vino rojo, tomate, espinaca, café, zanahoria y ajo (Cunha et al., 2012).

El ácido *p*-cumárico tiene actividad antioxidante, anticancerígena y antimutagénica, además es agente quimioprotector debido a la eliminación de agentes nitrosantes cancerígenos que se encuentran en compartimientos biológicos, incluyendo la saliva y fluidos gástricos (Strazisar et al., 2008).

Tomando en cuenta los amplios efectos terapéuticos del ácido *p*-cumárico y sus propiedades significativas de farmacocinética, este biofenol es un químico potencial para ser utilizado en la prevención o tratamiento de enfermedades. Sin embargo su uso es limitado debido a sus propiedades fisicoquímicas desfavorables como baja solubilidad en agua y baja estabilidad oxidativa (Cunha et al., 2012; Strazisar et al., 2008).

Ácido Sinápico

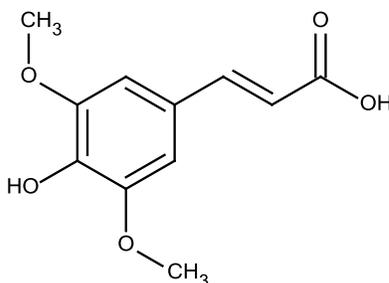


Figura 3. Estructura química del ácido sinápico.

El ácido sinápico es un compuesto fenólico derivado de ácido cinámico, el cual posee tres sustituciones en el grupo fenilo (3,5-dimetoxil y 4-hidroxil). Su masa molecular es de 224.21 g/mol y su punto de fusión es de 203°C-205°C, se descompone a temperaturas superiores de su punto de fusión, es soluble en agua a 25°C y 1 atm (Roy *et al.*, 2012).

Es un compuesto fenilpropanoide natural que se encuentra en el salvado de trigo y en diversas plantas como *Sinapis alba*, canola, semilla de mostaza y colza, también se encuentra en frutas y verduras (Lee *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2012).

El ácido sinápico tiene actividad neuroprotectora debido a que es un eliminador de radicales altamente eficaz ya que cuenta con una fuerte actividad antioxidante y antibacteriana, también el ácido sinápico es anti-inflamatorio e impide la hipertrofia cardiaca (Lee *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2013).

El ácido sinápico se usa en el tratamiento de ratas que tienen ataque al miocardio, inducido por la sustancia isoproterenol, la función del ácido sinápico es modular la actividad de la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol, impidiendo así la dislipidemia, la cual es una serie de alteraciones en los niveles de lipoproteínas que causan el ataque al miocardio. (Roy *et al.*, 2013).

Ácido Cafeico

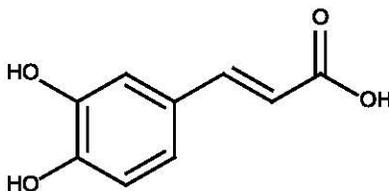


Figura 4. Estructura química del ácido cafeico.

El ácido cafeico (ácido 3, 4-dihidroxicinámico), es un antioxidante que posee en su molécula la estructura 4-propenilfenol, tiene una masa molar de 180.16 g/mol y un punto de fusión de 224°C (Kawashima *et al.*, 2011).

Este compuesto es un ácido fenólico que está presente en muchas plantas, ya que es un intermediario clave en la biosíntesis de lignina, uno de los principales componentes de la biomasa vegetal y de sus residuos (Chao *et al.*, 2014).

Esta molécula tiene propiedades antioxidantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras y anti-inflamatorias (Valentini *et al.*, 2015).

El ácido cafeico ha sido ampliamente utilizado como antioxidante en formulaciones para alimentos, cosméticos y farmacéuticos. Sin embargo el ácido cafeico es un orto-dihidroxifenol el cuál se oxida fácilmente en un derivado de o-quinona. Por lo tanto, la estabilización del ácido cafeico es de importancia para las aplicaciones en las industrias antes mencionadas. En estudios anteriores, se han preparado y caracterizado complejos de ácido cafeico con ciclodextrinas para mejorar la solubilidad del ácido cafeico (Chao *et al.*, 2014).

Alcoholes

Ácido Kójico

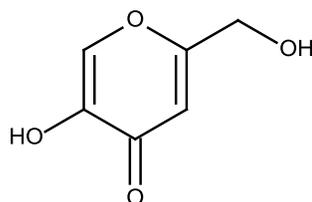


Figura 5. Estructura química del ácido Kójico.

El ácido Kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-1,4-pirona) es soluble en agua e inestable a alta temperatura cuando se almacena a largo plazo. Su masa molecular es de 142.11 g/mol y su punto de fusión es de 152°C-155°C (El- Boulifi, *et al.*, 2014)

El ácido Kojico es un metabolito fúngico que se produce por muchas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acetobacter*, hecho de carbohidratos particularmente de glucosa y almidón. También el ácido kójico es un subproducto común en la fermentación de salsa de soya y de sake (Bingi *et al.*, 2015; Ogiwara *et al.*, 2015).

Las propiedades biológicas de este compuesto son actividad antimicrobiana, prevención del pardeamiento oxidativo, entre otras, sin embargo se han realizado varios estudios que demuestran que este compuesto puede actuar como carcinogénico en tiroides (Ogiwara *et al.*, 2015).

El ácido Kójico se utiliza ampliamente como aditivo en alimentos para evitar la reacción de pardeamiento o en cosméticos como un agente blanqueador de la piel. Para mejorar las propiedades del ácido kójico, tales como el almacenamiento, compatibilidad y solubilidad en aceite, los derivados del ácido kójico han sido sintetizados por lo general mediante la modificación del grupo hidroxilo C-5 para formar éteres hidroxifeniles o ésteres, o mediante el uso de este grupo se forma glúcidos o derivados de péptidos. La razón principal es que los derivados del ácido kójico fueron más estables que el propio ácido kójico (El- Boulifi, *et al.*, 2014).

Alcohol Vainílico

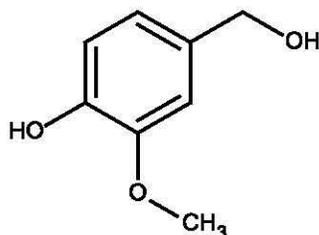


Figura 6. Estructura química del alcohol vainílico.

El alcohol vainílico (4-hidroxi-3-metoxibencilalcohol), pertenece al grupo de los alcoholes bencílicos metoxi-sustituídos. Esta molécula es soluble en agua caliente, en etanol frío ó caliente, y en éter frío ó caliente. Es relativamente insoluble en agua fría y tiende a formar soluciones supersaturadas en agua (Morales, 2005; Lecher, 2007).

Esta molécula se hace por la reducción de la vainillina, debido a que ésta última capta dos electrones del medio durante el proceso de oxidación del alcohol (Rozniecka *et al.*, 2010).

En un estudio hecho con ratas (Sprague-Dawley), se demostró que el alcohol vainílico posee actividad anticonvulsiva y actividad antioxidante (Hsieh *et al.*, 2000).

El alcohol vainílico es un material renovable prometedor de partida para la síntesis de moléculas biológicamente activas e ingredientes aromatizantes (Lecher, 2007).

Alfa-amirina

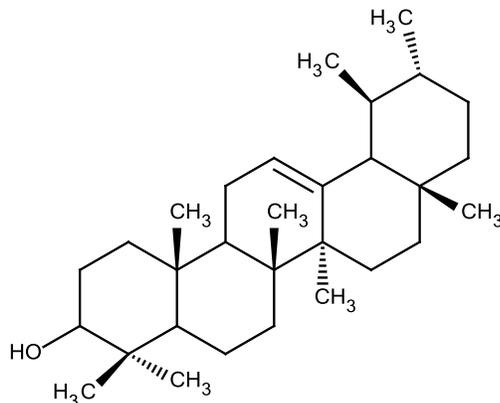


Figura 8. Estructura química de la alfa-amirina.

La α/β -amirina, caracterizada estructuralmente como triterpenoides pentacíclicos, se forma a través de la ciclación de 2,3-oxidoescualeno catalizada por la triterpeno ciclasa. Son isómeros estructurales en relación y poseen esqueletos básicos de dos diferentes subgrupos de triterpenos pentacíclicos, es decir, ursano y oleanana, respectivamente. La única variación estructural en ellos reside en el grupo metilo del anillo E, que ocupa la posición ya sea en C-19 (α -amirina) con punto de fusión de 186-188°C ó C-20 (β -amirina) con punto de fusión de 187.5-190°C (Haldar *et al.*, 2014).

Los triterpenoides son conocidos por sus diversas propiedades bioquímicas y farmacéuticas. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal formando parte de los diferentes órganos de las plantas (frutos, raíces, látex, semillas, hojas y partes áreas en general) (Mangas, 2008).

La α/β -amirina y sus derivados poseen un amplio espectro de actividades biológicas y farmacológicas, incluyendo actividades anti-inflamatorias, anti-insecticidas, anti-depresivas, anti-artríticas, gastroproctetoras, anti-hipoglucémicas, anti-microbianas y actividades citotóxicas (Haldar, *et al.*, 2014; Matos, *et al.*, 2013).

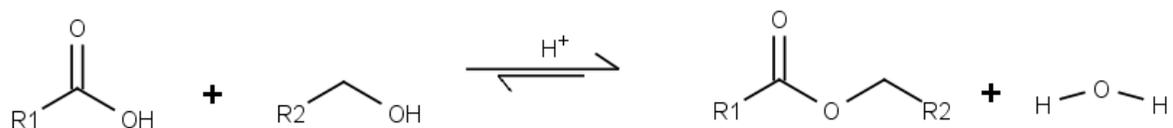
En la última década α/β -amirina y sus derivados semi-sintetizados se han investigado extensivamente por sus bioactividades. El triterpeno pentacíclico, α/β -amirina ha sido reportado anteriormente como un componente efectivo en el tratamiento de varias condiciones inflamatorias. La evidencia reciente indica que α/β -amirina muestra sus efectos a través de la interacción con la vía cannabinoide (Haldar, *et al.*, 2014).

Esterificación

Los ésteres y los procesos de obtención de los mismos son conocidos desde hace mucho tiempo. La demanda mundial de éstos ha crecido enormemente, adicionalmente se empiezan a utilizar ésteres muy específicos de estructura compleja para emplearlos en materiales muy definidos. También se han comenzado a obtener ésteres de materias primas antes no utilizadas, dado que se ha superado la dificultad para hacerlas reaccionar bajo las condiciones de esterificación tradicionales. Los conceptos y fundamentos de éstas reacciones no han cambiado; se ha profundizado en ellos y proyectado su conceptualización al diseño de procesos buscando formas más eficientes para esterificar, logrando condiciones menos drásticas, mayores conversiones y mejores selectividades (Sánchez y Rodríguez, 1995).

Para lograr un buen diseño en la obtención de un éster, es de suma importancia la eficiencia y optimación de las diferentes variables: materias primas, consumo de energía, tiempo de proceso, menores requerimientos en los sistemas de purificación de productos y reciclo de materiales, disminución de productos indeseados, buena calidad y rendimiento del producto deseado.

La reacción de esterificación entre un ácido carboxílico y un alcohol, es reversible en medio ácido y termodinámicamente factible:



(Sánchez y Rodríguez, 1995).

Los diversos ésteres de ácidos hidroxicinámicos se han sintetizado en los últimos años y son generalmente más lipófilos en comparación con sus compuestos originales, algunos de ellos han demostrado algunas ventajas sobre sus compuestos precursores (Garrido, *et al.*, 2012).

Transesterificación

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster, y se distinguen dos tipos de transesterificaciones, glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor (Sánchez, 1998).

La transesterificación con aceites vegetales puede ser catalizada ya sea por catalizadores químicos o por enzimas. Los ésteres de alcoholes de cadena media y cadena larga tienen una amplia variedad de aplicaciones en sectores industriales como textil, plásticos, cosméticos y lubricantes (Malhotra, *et al.*, 2014).

Los ésteres reaccionan con alcoholes en medios ácidos reemplazando su grupo alcoxi por el alcohol correspondiente, como puede observarse en la siguiente reacción (McMurry, 2008).

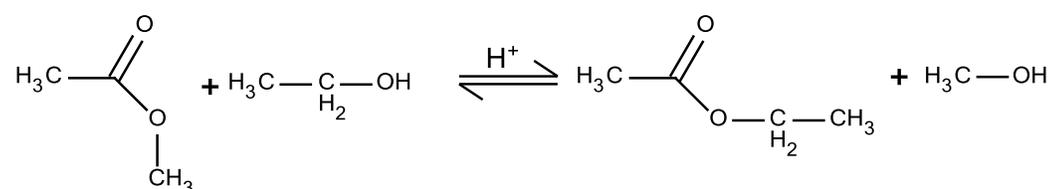


Figura 9. Ejemplo de reacción de transesterificación en medio ácido

El mecanismo de transesterificación ácida transcurre en las siguientes etapas:

Primera etapa.

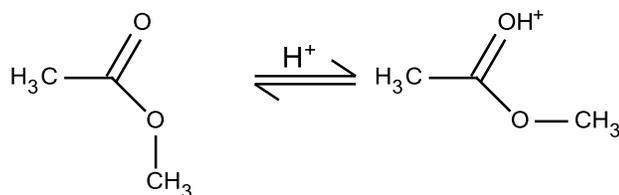


Figura 9.1. Protonación del éster.

Segunda Etapa.

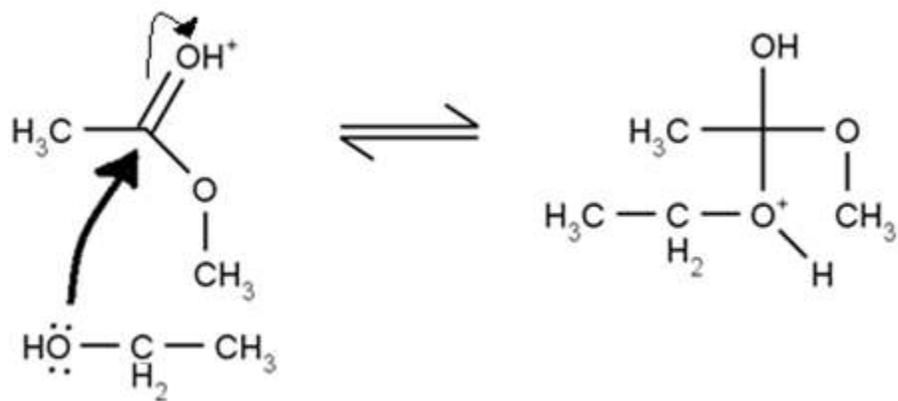


Figura 9.2. Adición nucleófila del alcohol al carbonilo.

Tercera Etapa.

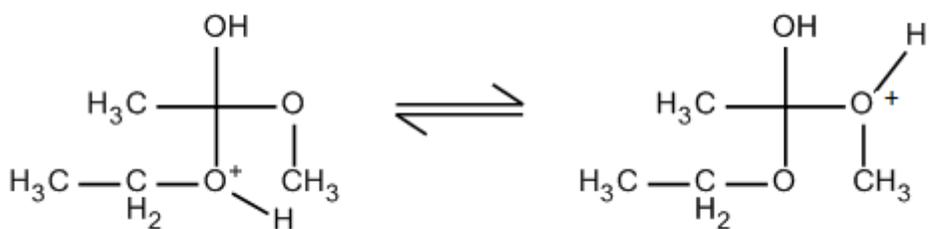


Figura 9.3. Equilibrio ácido-base, que transforma el metóxido en buen grupo saliente (metanol).

Cuarta Etapa.

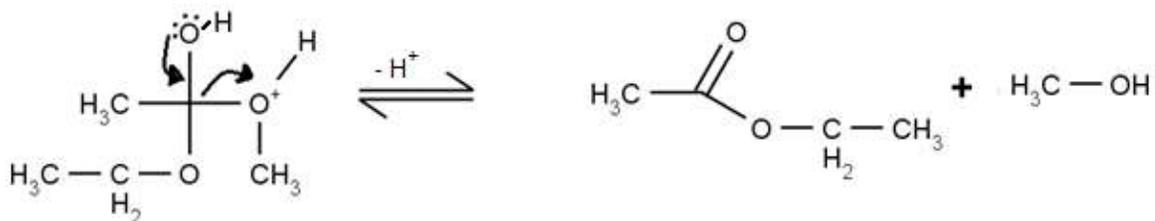


Figura 9.4. Eliminación del Metanol.

Métodos de Esterificación

Existen muchos métodos para efectuar la transformación, incluyendo la reacción S_N2 , de un anión carboxilato con un haluro de alquilo primario (McMurry, 2008).

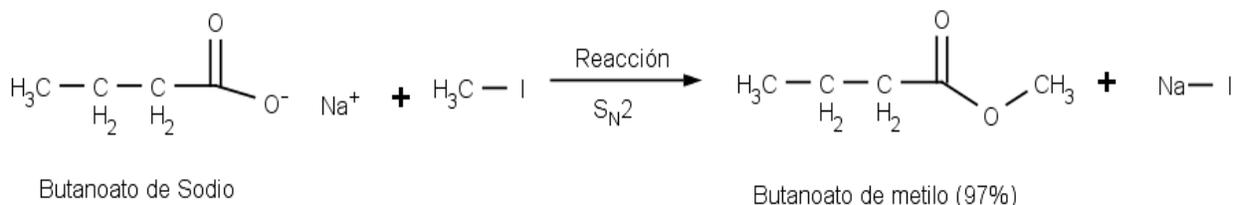


Figura 10. Reacción S_N2 . Las reacciones S_N2 están involucradas en casi todas las metilaciones biológicas, en las cuales se transfiere un grupo $-\text{CH}_3$ de un donador electrofílico a un nucleófilo.

Los ésteres también pueden sintetizarse por una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo catalizada por ácido de un ácido carboxílico con un alcohol, un proceso llamado reacción de esterificación de Fischer. Desafortunadamente, la necesidad de utilizar un exceso de alcohol líquido como disolvente limita el método a la síntesis de ésteres de metilo, etilo, propilo y butilo (McMurry, 2008).

Método de Esterificación de Fisher

Los ácidos carboxílicos no son los suficientemente reactivos como para experimentar directamente la adición nucleofílica, pero su reactividad se incrementa en gran medida en presencia de un ácido fuerte como ácido clorhídrico o ácido sulfhídrico. Éstos protonan el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, por lo que le da una carga positiva al ácido carboxílico y lo vuelve mucho más reactivo. La posterior pérdida de agua del intermediario tetraédrico genera el producto éster.

El efecto neto de la esterificación de Fisher es la sustitución de un grupo $-\text{OH}$ por $-\text{OR}'$. Todos los pasos son reversibles, y la reacción puede conducirse en cualquier dirección por la elección de las condiciones de reacción. La formación de ésteres es favorecida cuando un exceso de alcohol es usado como disolvente, pero la formación de ácido carboxílico es favorecida cuando está presente un gran exceso de agua (McMurry, 2008).

Método de Esterificación en Medio Básico

Las amidas son difíciles de preparar mediante la reacción de los ácidos carboxílicos con aminas debido a que éstas son bases que convierten a los grupos carboxilo ácidos en sus aniones carboxilato no reactivos. Así que debe reemplazarse el –OH por un mejor grupo saliente no ácido. En la práctica, las aminas se preparan generalmente tratando al ácido carboxílico con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) para activarlo, seguido por la adición de la amina. El ácido se adiciona primero a un enlace C=N de la DCC, y después se efectúa la sustitución nucleofílica en el grupo acilo por la amina. Alternativamente, y dependiendo del disolvente de la reacción, el intermediario acilo reactivo también podría reaccionar con un segundo equivalente de ion carboxilato para generar un anhídrido de ácido que reacciona con la amina (McMurry, 2008).

Método de Esterificación Biológico

La conversión directa de un ácido carboxílico a un derivado de acilo por la sustitución nucleofílica en el grupo de acilo no ocurre en bioquímica. En el laboratorio, el ácido primero debe de activarse. Con frecuencia se efectúa esta activación en los organismos vivos por la reacción del ácido con ATP para dar un grupo fosfato de acil adenosina o *acil adenilato*. Por ejemplo, en la biosíntesis de grasas, un ácido carboxílico de cadena larga reacciona por la sustitución nucleofílica en el grupo acilo subsecuente de un grupo tiol en la coenzima A para dar la acil CoA (McMurry, 2008).

Método de Esterificación Enzimático

Las lipasas son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas (función natural), la transesterificación, la alcoholisis y la esterificación, entre otras reacciones. Debido a su alta actividad, selectividad y las condiciones moderadas en las cuales ellas operan, las lipasas tienen una amplia aplicación en varios procesos de alimentos, papel, textiles. La alta selectividad de lipasas es una característica clave de estos biocatalizadores que se utilizan en la resolución de mezclas racémicas para la preparación de compuestos ópticamente puros para industrias farmacéuticas y agroquímicas (Foresti *et al.*, 2007).

Otros Métodos de Esterificación

Aunque la acción de la lipasa inicialmente se consideró estar restringida a medios acuosos, hoy en día las lipasas son empleadas no solamente en los sistemas tradicionales a base de agua, sino también en sistemas no acuosos con sustratos disueltos y enzimas inmovilizadas.

Algunos medios de reacción no convencionales que se utilizan actualmente incluyen disolventes orgánicos, sales y líquidos iónicos, fluidos supercríticos, y sistemas libres de disolvente. La reducción de costos, la alta concentración de sustrato y la gran producción volumétrica son algunas de las ventajas de los sistemas libres de disolventes (Foresti *et al.*, 2007).

El reciente interés en líquidos iónicos es debido a su baja presión de vapor y alta estabilidad térmica, así como sus propiedades fisicoquímicas ampliamente relacionadas de una manera favorable (polariadad, hidrofobicidad, miscibilidad del disolvente), dependiendo de la naturaleza del catión y anión utilizado. La toxicidad reducida de algunos líquidos iónicos es otra ventaja importante para su uso como medios para la modificación biocatalítica de compuestos que pueden ser utilizados como aditivos alimentarios o en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. Además las enzimas presentan una mejor estabilidad y una mayor selectividad en estos medios líquidos iónicos (Katsoura *et al.*, 2009).

Hidroxicinamatos

Los hidroxycinamatos se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales, están presentes en sus formas libres y en enlaces conjugados solubles e insolubles. A pesar de que son abundantes en cereales, leguminosas, oleaginosas, frutas, verduras y bebidas, se localizan en casi todos los grupos de alimentos otorgando actividad antioxidante por la habilidad de captar los radicales hidro-xilo, superóxido, peróxilo, peroxinitrito, oxígeno singulete, entre otros (Shahidi y Chandrasekara, 2009).

Ésteres del ácido Ferúlico

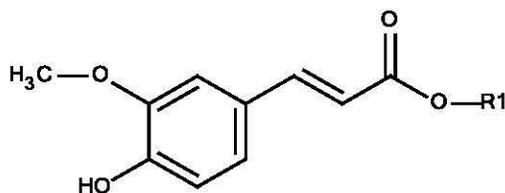


Figura 11. Estructura química del éster alquil ferulato (Laguerre et al, 2013).

El ácido ferúlico se esterifica a la posición C-5 del arabinofuranosilo de las cadenas laterales de arabinoxilano en el salvado de maíz y salvado de trigo. Por otro lado, el ácido ferúlico se adhiere principalmente a la posición C-2 de la sección α -1,5 unida a los residuos de arabinofuranosa o en la posición C-6 de la sección β -1,4 unida a los residuos de galactopiranososa en la pectina de dicotiledóneas tales como la remolacha azucarera y espinacas (Tscuchiyama, 2006).

La habilidad de captar radicales libres de la estructura química del 1-gliceril ferulato es más bajo que la del ácido ferúlico así como el tocoferol, el cual es usado como control positivo (Tscuchiyama, 2006).

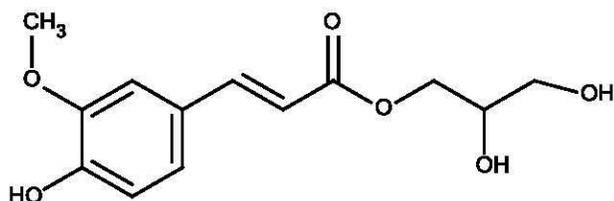


Figura 12. Estructura química del gliceril ferulato.

Los lípidos feruloilatos estructurados, tipos de ésteres del ácido ferúlico, se pueden preparar mediante la esterificación de aceite de ricino con ácido ferúlico. Esta estructura lipídica puede ofrecer propiedades combinadas benéficas tanto del aceite de ricino como del ácido ferúlico (Sun *et al.*, 2014).

Ésteres del ácido *p*-Cumárico

Los ésteres de cumarato de alquilo inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad de manera más eficiente y exhiben una actividad antioxidante mayor que el ácido cumárico. Además, estos ésteres son aplicados en las industrias química, farmacéutica y cosmética (Sharma *et al.*, 2014).

Los ésteres de *p*-cumarato son modelos muy importantes para la síntesis de compuestos naturales. El *p*-cumarato de metilo ha sido posible obtenerlo por reacción de Heck en altas conversiones y selectividades en ausencia de fosfinas. La reacción de Heck consiste en optimizar la reacción mediante sistemas libres de fosfina, utilizando fuentes homogéneas y heterogéneas de paladio. La reacción de Heck se ha convertido en uno de los protocolos estándar en la síntesis orgánica, así como un punto de referencia para estimar la eficiencia de un sistema (Duque *et al.*, 2008).

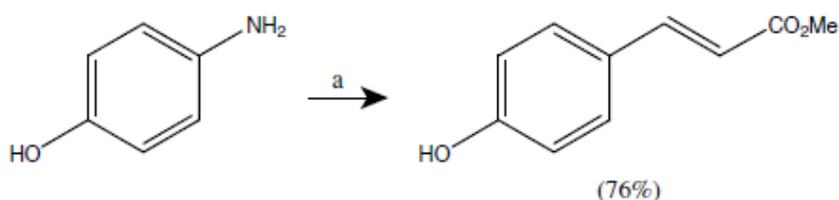


Figura 13. Reacción de Heck. Reactivos y condiciones: a, 42% HBF₄, -5°C, 1 h, después CH₂=CHCO₂Me, 1 mol% PdCl₂, 60°C, 3h (Duque *et al.*, 2008).

Ésteres del ácido sinápico

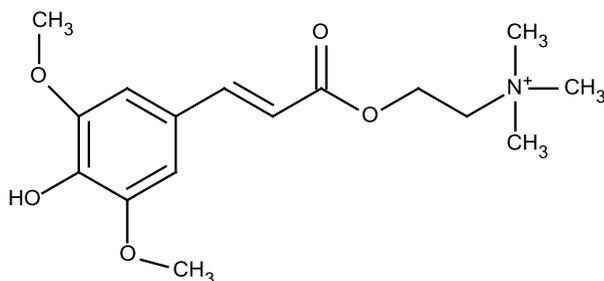


Figura 14. Estructura química de sinapoil colina. Una de las estructuras de los compuestos aislados a partir de semillas de *Brassica napus* (Baumert *et al.*, 2005).

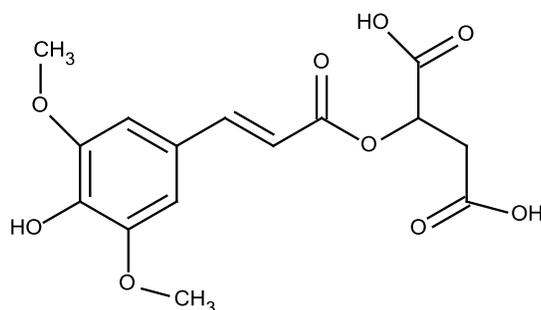


Figura 15. Estructura química del sinapoil malato. Una de las estructuras de los compuestos aislados a partir de semillas de *Brassica napus* (Baumert *et al.*, 2004).

En las semillas oleaginosas (*Brassica napus* L. var. *napus*) se acumulan grandes cantidades de sinapina (sinapoilcolina). El complejo patrón de ésteres sinapato en las semillas de *Brassica napus* es dependiente de la formación de 1-O-sinapoil- β -glucosa. Esto da lugar a la suposición de que las enzimas de la familia Serina carboxipeptidasa con actividad de aciltransferasa (SCPL), reconocen este éster de glucosa como donador de acilo, catalizando la formación de múltiples ésteres. Los donantes de acilo en la formación del éster catalizada por la aciltransferasa son en su mayoría tioésteres-CoA (Baumert *et al.*, 2004).

Los fitosteril sinapatos originados a partir de una síntesis enzimática, poseen un gran potencial para ser utilizados como antioxidantes, aunque se requiere de más estudios toxicológicos para determinar su seguridad, así como su presencia natural en fuentes alimenticias (Tan y Shahidi, 2013).

Ésteres del ácido Cafeico

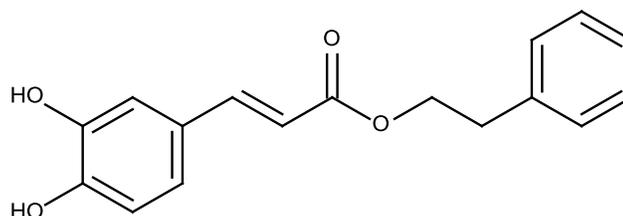


Figura 16. Estructura química del éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) (Park *et al.*, 2014).

El éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) es un componente activo de los extractos de propóleos de miel de abeja. Es un compuesto químico natural y antioxidante

superior fenólico. Además tiene un efecto anti-inflamatorio, antimicrobiano, inmunomodulador y anti-carcinogénico. Se ha utilizado en la medicina popular desde hace muchos años, y recientemente, muchos estudios experimentales han mostrado su efecto antioxidante. CAPE se conoce por la reducción de radicales libres derivados del oxígeno (Park *et al.*, 2014).

Lipofilización

La lipofilización consiste en injertar uno o varios restos lipófilos a la molécula para hacerla más tensoactiva. Las moléculas preparadas así, con lipofilicidad afinada han mejorado la biodisponibilidad *in vivo* comparado con sus antioxidantes precursores. También muestran una mayor miscibilidad, y la incorporación en fases lipídicas y en lipo-portadores ofrecen una ventaja para su uso en fármacos, alimentos y formulaciones cosméticas. Estos antioxidantes funcionales se pueden preparar con un amplio rango de estrategias de lipofilización utilizando lipasas o resinas ácidas para llevar a cabo la esterificación, transesterificación, amidación y la eterificación (Laguerre *et al.*, 2013).

Los productos alimenticios son sistemas complejos que contienen diferentes fases y componentes (aire, agua, lípidos, proteínas, entre otros). Los sistemas alimentarios heterofásicos como la leche y la mayonesa, son consumidos ampliamente. La leche y la mayonesa son emulsiones aceite en agua (O/W), las cuales se componen de 3 fases: fase oleosa, fase acuosa y una interfase, como su nombre lo indica, se encuentra entre la fase acuosa y la fase oleosa. La eficacia de un antioxidante es altamente influenciado por sus interacciones con otros componentes y su capacidad para situarse en el entorno donde toma lugar la oxidación lipídica (Alemán *et al.*, 2015).

La lipofilicidad de un compuesto es un factor crucial que determina su eficiencia como antioxidante en compartimientos lipofílicos y que tiene un gran impacto en su capacidad para atravesar las membranas celulares y alcanzar su objetivo (Garrido, *et al.*, 2012).

La lipofilización de compuestos fenólicos con diferentes longitudes de cadenas alquiladas reducirá su polaridad y en consecuencia cambian su distribución entre las

diferentes fases en la emulsión. Por lo tanto la lipofilización mejora la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos polares (Alemán *et al.*, 2015).

Enzimas: Lipasas

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica y como biocatalizadores presentan grandes ventajas sobre los catalizadores químicos más comunes como son su mayor especificidad y selectividad, principalmente debido al hecho de que son catalizadores ópticamente selectivos, además de trabajar en condiciones de reacción cercanas a las que se encuentran en medios fisiológicos, al contrario de la mayoría de reacciones químicas convencionales.

Por el contrario, las enzimas presentan una serie de inconvenientes como son su elevado coste y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas de las fisiológicamente habituales, en particular, es marcada la dependencia de la actividad de una enzima con factores ambientales como temperatura, presión o pH y operacionales como agitación, aireación entre otros. Por otro lado, la presencia de inhibiciones que modifican la actividad enzimática, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de sustratos y productos bajas, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de purificación del producto de interés (Sánchez, 1998).

Lipasas a partir de microorganismos depende en gran medida de factores ambientales, como temperatura o pH, composición del medio de fermentación: fuentes de carbono, nitrógeno, concentración de sales inorgánicas, así como porcentaje de oxígeno disuelto, pudiendo estos factores alterar la estructura de la enzima y la relación lipasa extracelular/intracelular. Las condiciones habitualmente utilizadas son: temperatura alrededor de los 30°C, pH en zona neutra y condiciones aerobias. Como fuente de carbono se utiliza una fuente mixta compuesta por un glúcido y un lípido, actuando este último como inductor para la producción de lipasas. Como fuente de nitrógeno se utiliza urea o sales inorgánicas de amonio (Sánchez, 1998).

Las lipasas se caracterizan por una tríada catalítica que consiste en serina, histidina y aspartato (Ser105, His224 y Asp187 en *Candida antarctica* tipo B). El mecanismo general aceptado de reacciones catalizadas por lipasa implica dos pasos. La primera etapa de la reacción es la adición del grupo acilo a la serina catalítica de la enzima,

produciendo el acil-enzima (etapa de acilación). En el segundo paso, el grupo acilo puede reaccionar con varios nucleófilos, tales como agua, alcoholes, aminas o peróxidos. (Etapa de desacilación) (Escorcia *et al.*, 2014).

La acilación como la desacilación se desarrolla a través de un complejo inicial enzima-sustrato no covalente (Complejo Michaelis; MCC) y un intermediario tetraédrico (IT). Este último se estabiliza por funciones NH y OH en la cavidad oxianionica de la enzima, constituido por los residuos Thr40 y Gln106 en *Candida antarctica* Tipo B (CalB) (Escorcia *et al.*, 2014).

Se ha reportado que pueden existir lipasas libres en dos formas estructurales diferentes. En una forma, el sitio activo de la lipasa se aísla del medio mediante una cadena oligopeptida helicoidal llamada “tapa”. En la otra forma, la estructura presenta la tapa desplazada y el sitio activo está expuesto al medio de reacción, y esto se considera para que la lipasa esté en su forma activa (abierta). En medios homogéneos acuosos, la lipasa está en equilibrio entre estas dos estructuras. Tras la interacción con una superficie hidrófoba la forma abierta de la lipasa se absorbe sobre la superficie y el equilibrio se desplaza hacia la forma abierta, éste fenómeno es llamado activación interfacial, el cual es necesario para que la lipasa despliegue al máximo su actividad catalítica incrementando la afinidad por sustratos lipídicos y la estabilidad del estado de transición durante el ciclo catalítico. (Poojari y Clarson, 2013; González-Bacerio *et al.*, 2010).

Lipasa B *Candida antarctica*

Candida es un género de levaduras, que producen lipasas que han sido aisladas de varias especies. También se han reportado las secuencias del genoma de un determinado número de especies de *Candida*. Es relevante señalar que *Candida antarctica* ha proporcionado lipasas que son de importancia industrial. La Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) ha sido explotada por muchos investigadores para la síntesis de una variedad de compuestos orgánicos a través de reacciones de esterificación o transesterificación (Poojari y Clarson, 2013).

CAL B ha llamado la atención debido a sus propiedades de alta estabilidad, estereoselectividad y enantiopreferencia que la hacen superior a otras lipasas en la biotransformación. CALB es utilizado en una amplia variedad de campos industriales y

también está disponible comercialmente. Sin embargo, a pesar de la estabilidad intrínseca de CALB, la termoestabilización es necesaria para mejorar la eficiencia de los procesos biocatalíticos a altas temperaturas (Jun *et al.*, 2013).

CALB pertenece a la superfamilia de plegamiento α/β hidrolasa con una tríada catalítica conservada que consiste en Ser105-His224-Asp187. Se compone de 317 residuos de aminoácidos. El sitio activo contiene una cavidad oxianión, la cual estabiliza el estado de transición y el oxianión en la reacción intermedia. La molécula de sustrato reacciona con la serina del sitio activo formando un intermedio tetrahédrico el cual se estabiliza por los residuos catalíticos de His y Asp. En la siguiente etapa el alcohol se libera y se crea el complejo acil-enzima. Un ataque nucleófilo (agua en hidrólisis, alcohol en transesterificación) causa otra formación intermedia tetrahédrica. En la última etapa, el intermediario se divide en producto y enzima y se recupera para el próximo ciclo catalítico (Viskupicova *et al.*, 2012).

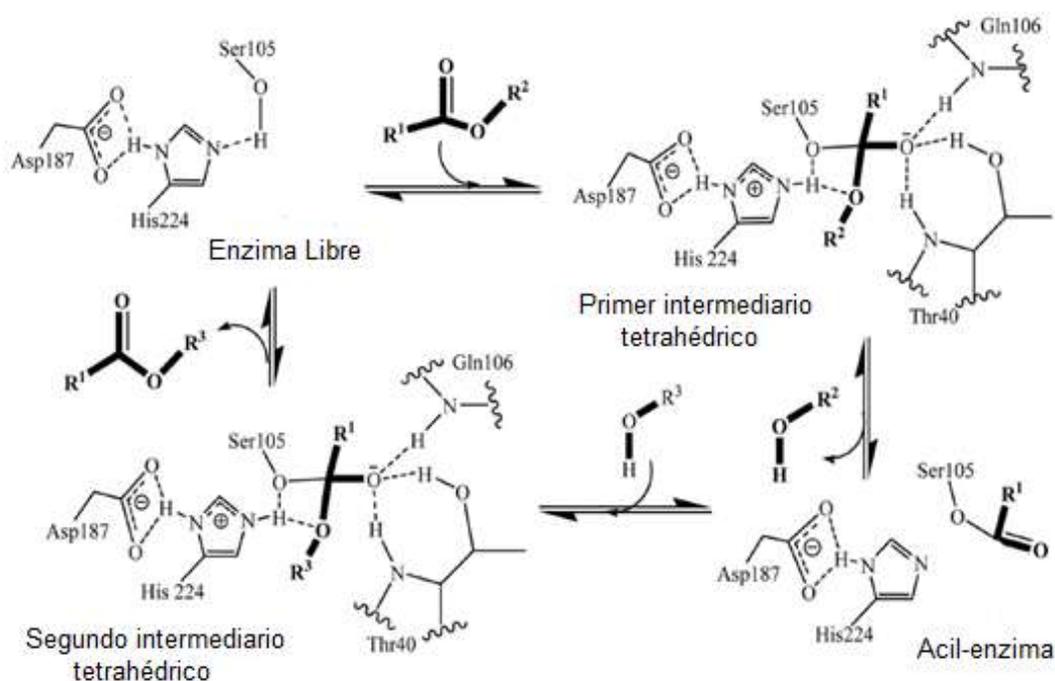


Figura 17. Mecanismo de reacción catalizado por la lipasa *Candida antarctica* (Viskupicova *et al.*, 2012).

El sitio activo de CALB consta de un sitio de unión acil-sustrato no específico y un sitio de unión alcohol-sustrato específico. Este es selectivo para alcoholes secundarios. En contraste con la mayoría de las lipasas, CALB no tiene “tapa” que

cubra la entrada al sitio activo y no muestra activación interfacial (Viskupicova *et al.*, 2012).

El costo de la enzima es un factor determinante en la viabilidad económica de las biotransformaciones. La ventaja de utilizar enzimas inmovilizadas es que permite su reutilización impactando en el costo del proceso de biosíntesis (Jun *et al.*, 2013).

Lipasa Vegetal, extraída de la semilla de *Ricinus communis*

El Ricino se utiliza tradicionalmente como una planta medicinal. Es la única especie del género *Ricinus*. Esta planta es conocida como “kharouâa” en árabe, “ricina” en francés y “castor bean” en Inglés. Es un arbusto, anual, perenne, robusta y cuya altura puede variar de 3 a 12 m. El Ricino se ha extendido a través de los trópicos y las regiones con temperaturas cálidas del mundo. En Túnez, el ricino crece espontáneamente en tierras degradadas, fue introducido y naturalizado de norte a sur del país. Esta especie posee diversas actividades biológicas tales como hepatoprotector, antiinflamatorio, diurético, anticancerígeno, antibacteriano, insecticida, hipoglicémico, y la captación de radicales libres. Anteriormente, se informó de que esta planta es demasiado rica en metabolitos secundarios, especialmente en compuestos fenólicos y alcaloides. El papel de estos compuestos se muestra en la protección contra ciertas enfermedades debido a su posible interacción con varias enzimas y sus receptores antioxidantes (Wafa *et al.*, 2014).

Las semillas son muy tóxicas, por la presencia de albúmina llamada ricina. Basta la ingestión de tan solo 0,03g (25 g de semillas); para producir un cuadro de gastroenteritis fuerte con deshidratación; puede dañar gravemente el hígado y el riñón e incluso producir la muerte; contiene grasas hasta un 70%, de los cuales el 68% es un glicérido del ácido ricinoléico; proteínas hasta un 20%, ricina, enzimas, con presencia de lipasa; vitamina E (Martínez, 2013).

La lipasa de Ricino es investigada como biocatalizadora en la esterificación de ácidos grasos con glicerol. La semilla de ricino contiene una lipasa triacilglicerol activa, incluso en las semillas en estado latente. Las preparaciones de lipasa de ricino se han utilizado para hidrolizar las grasas para la preparación de ácidos grasos (Tüter, 1998).

La lipasa ácida obtenida a partir de semillas de aceite de ricino ha sido estudiada desde el comienzo de siglo, y aunque se ha publicado mucho sobre sus propiedades enzimáticas, la proteína de esta lipasa aún no se ha purificado. La lipasa ácida de las semillas de ricino tiene un pH óptimo cerca de 4.2 y es muy activa, que cataliza la hidrólisis de prácticamente todo el TAG contenida dentro de los cuerpos oleosos en aproximadamente 30 minutos. Esta lipasa ácida se encuentra en el endospermo de las semillas y se une a la capa de oleosina/ fosfolípido que rodea el depósito de los cuerpos oleosos. La lipasa ácida se sintetiza durante el desarrollo del endospermo y, después de la germinación de la semilla, su actividad disminuye al mismo tiempo que el aceite almacenado es metabolizado. En las otras dos tipos de lipasas encontradas, se ha mostrado que son sintetizadas en el endospermo de la semilla de ricino. Una de estas lipasas se encuentra en la membrana glioxisomal y tiene un pH óptimo de aproximadamente 9.0 y la otra lipasa está asociada con los cuerpos oleosos y tiene un pH óptimo de aproximadamente de 7.5 (Fuchs *et al.*, 1995).

Cromatografía

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos ó más compuestos diferentes ó iones que están distribuidos entre dos fases, una de las cuales se le conoce como fase estacionaria y la otra como fase móvil. Existen diferentes tipos de cromatografía que dependen de la naturaleza de las fases involucradas: sólido-líquido (columna, placa y papel), líquido-líquido, (líquido de alta resolución), y gas-líquido (fase vapor), estos métodos son los que se utilizan comúnmente en laboratorios e industrias (Martins *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar nuevas reacciones de lipofilización de ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, *p*-cumárico, sinápico, cafeico) con alcoholes (Tipo vainilloide, benzoico, fenil propenoide y triterpenoide) utilizando una estrategia de dos etapas, comenzando con un método químico (Fisher) seguido de un método enzimático, probando con dos lipasas, una comercial *Candida antarctica* (CALB) y otra vegetal *Ricinus communis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Esterificar los ácidos hidroxicinámicos por el método de Fisher con alcoholes de cadena corta (etanol y metanol).
- Realizar la transesterificación enzimática con los alcoholes (ácido Kójico, alcohol Vainíllico y Alfa-amirina), utilizando lipasa comercial *Candida antarctica* tipo B y lipasa vegetal *Ricinus communis* para obtener los hidroxicinamatos de alcoholes.
- Observar por cromatografía de capa fina productos posibles.
- Purificar los productos por columna cromatográfica.
- Caracterizar los productos por Resonancia Magnética Nuclear.

HIPÓTESIS

Si se combinan métodos de esterificación: químico (esterificación de Fisher) y enzimático (enzima comercial y vegetal), se favorecerá la síntesis de nuevos ésteres lipofílicos de ácidos hidroxicinámicos.

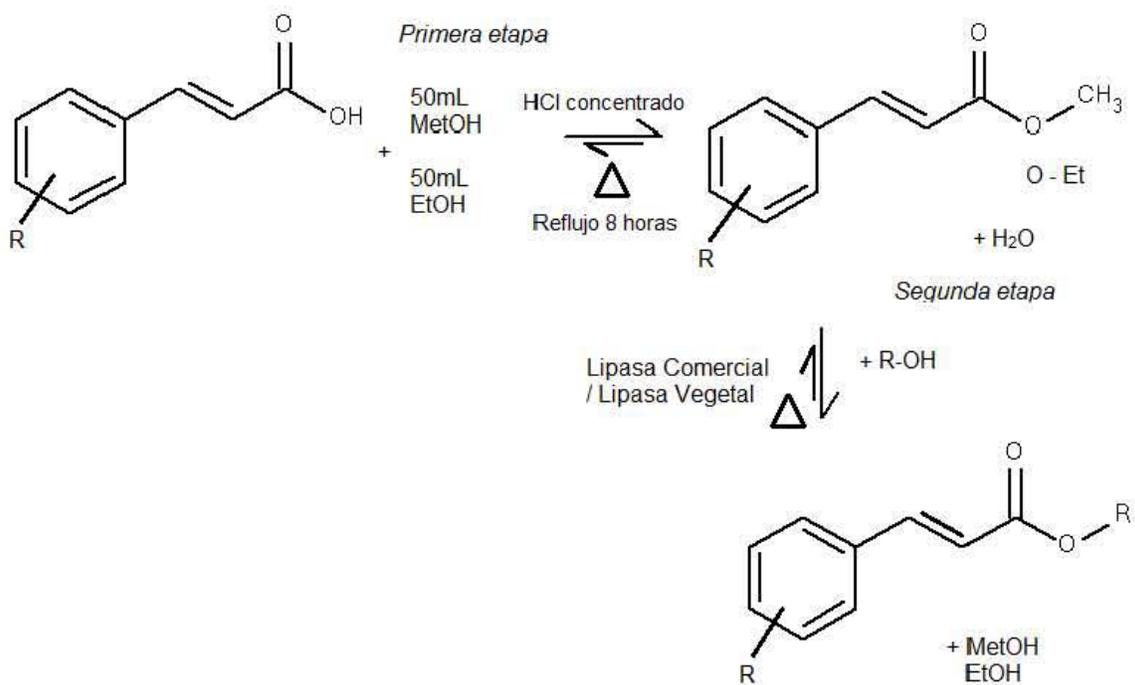
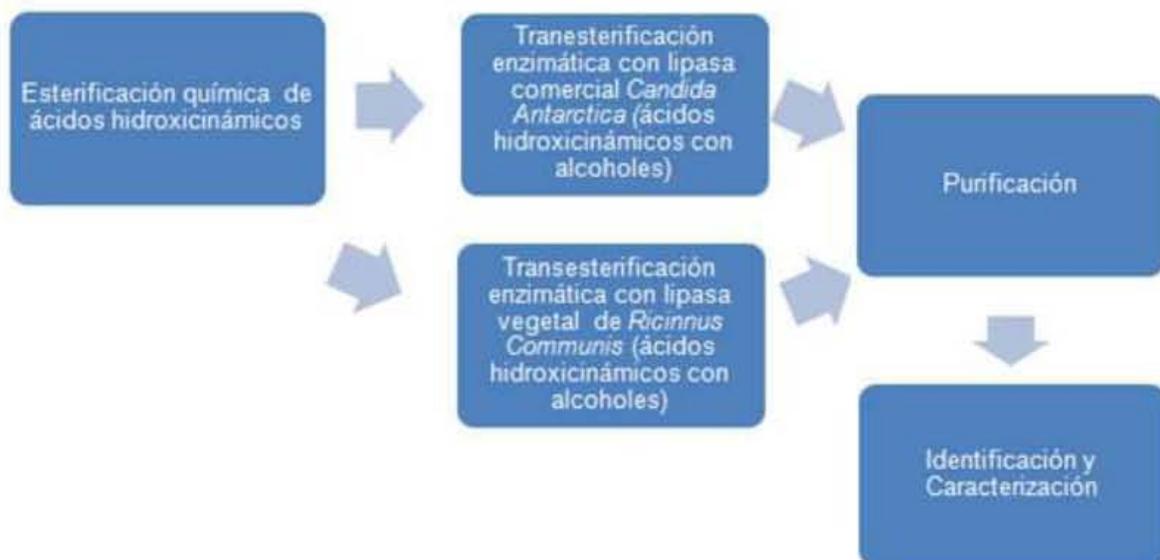
MATERIALES

- ✓ Reactivos: Ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$) grado HPLC (Sigma-Aldrich), Ácido sinápico ($C_{11}H_{12}O_5$) grado HPLC (Sigma-Aldrich), Ácido *p*-cumárico ($C_9H_8O_3$) grado HPLC (Sigma-Aldrich), Ácido cafeico ($C_9H_8O_4$) grado HPLC (Sigma-Aldrich), Ácido clorhídrico concentrado (HCl) (Baker), Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (Baker), Borohidruro de Sodio ($NaBH_4$) (Baker)
- ✓ Disolventes: Acetato de etilo (Baker), Etanol (EtOH) grado HPLC, Metanol (MetOH) grado HPLC, Metilisobutilcetona ($C_6H_{12}O$) grado HPLC
- ✓ Adsorbentes: Malla molecular 5°A (Sigma-Aldrich)
- ✓ Enzima: Lipasa Comercial *Candida antártica* (Novozyme 435)
- ✓ Cromatografía de capa fina: Placas de aluminio con gel de sílice 0.2 mm, Reveladores: solución de sulfato cérico, solución de Anisaldehido y solución metanólica de DPPH.
- ✓ Columnas: Gel de sílice: MACHEREY-NAGEL kieselgel

- ✓ Equipos: Rotavapor R-205 Büchi Switzerland: Büchi Helating Bath B490, incubadora de agitación orbital Thermo Scientific Modelo: SHKE4000 Benchtop Orbital Shaker, parilla eléctrica, equipo de reflujo, lámpara UV, balanza analítica: *ANALYTICAL PLUS*, OHAUS
- ✓ Equipo de Resonancia Magnética Nuclear: 400-MR, 400-S. Bruker

METODOLOGÍA

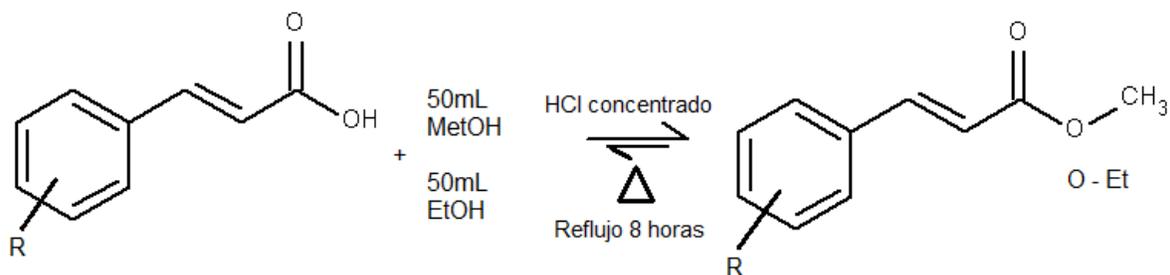
Diagrama general



Esquema 1. Ruta sintética de las etapas de los métodos de esterificación.

Esterificación Química

Para la preparación de la esterificación de los ácidos hidroxicinámicos se empleó el método de Fischer



Esquema 2. Ruta sintética de la esterificación de los ácidos hidroxicinámicos

Esterificación de Fisher

Ésteres de metilo

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

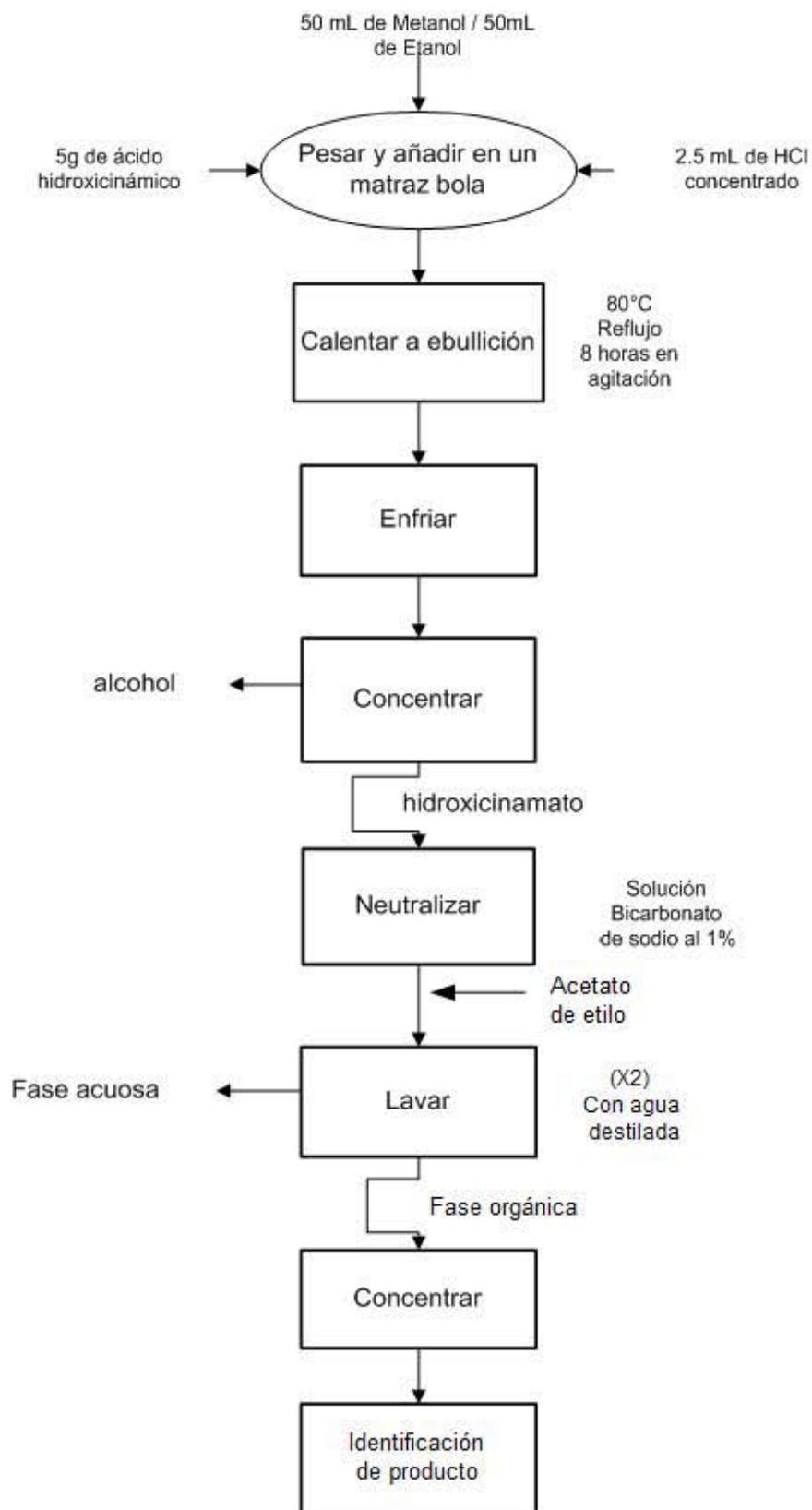
Una vez evaporado el disolvente, el ácido clorhídrico aún presente en el producto se neutralizó con una solución de bicarbonato de sodio al 1%, se agregó hasta que no hubo producción de CO₂, se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo para extraer el producto y se realizaron 2 lavados con agua destilada.

Posteriormente, se le adicionó sulfato de sodio anhidro a la fase orgánica para su deshidratación, una vez que éste sulfato absorbió las trazas de agua, se filtró y se concentró a sequedad en rotavapor.

Para comprobar su pureza, se realizó placa cromatográfica con placas de aluminio con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (1:1) (Moreno, 2013).

Ésteres de metilo: Para la esterificación de Fischer con etanol se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de ésteres de metilo (Moreno, 2013).

Diagrama de Proceso de la Esterificación de Fisher



(Moreno, 2013)

Preparación del alcohol Vainílico

Se pesaron 2.6 g de vainillina y se transfirió a un matraz de bola de 25 mL. Se vertió 5 mL de etanol al matraz, se agitó con una barra magnética hasta que la vainillina se disolvió completamente. La reacción se puso en un baño de hielo.

Se prepararon 5 mL de una solución de NaBH_4 3.42 M* y posteriormente a la mezcla de vainillina con etanol, se agregaron los 5 mL de esta solución, gota a gota durante un periodo de 10 minutos. Se mantuvo esta reacción en agitación y con una temperatura inferior de los 25 °C.

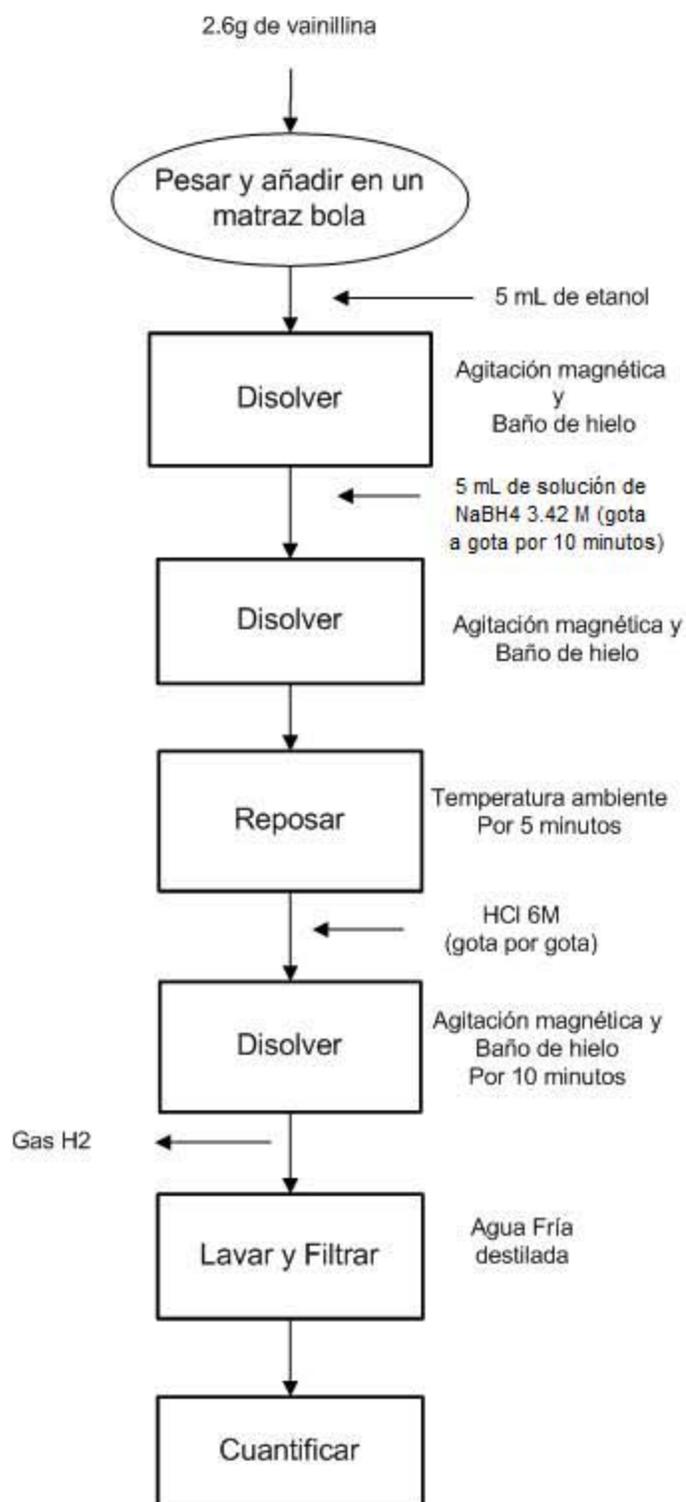
Después de que la solución de NaBH_4 se añadió por completo, se retiró del baño de hielo y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 5 minutos para asegurar que la reacción se haya completado.

La reacción se retornó al baño de hielo. Se añadió ácido clorhídrico 6 M, gota a gota hasta que el gas H_2 no estuvo presente. La agitación y el baño de hielo se mantuvieron por 10 minutos.

Finalmente el precipitado se colectó, se lavó con agua fría y se filtró al vacío por 2 minutos. El producto se dejó secar en la campana de vacío por 24 horas y se cuantificó. (Lecher, C., 2007).

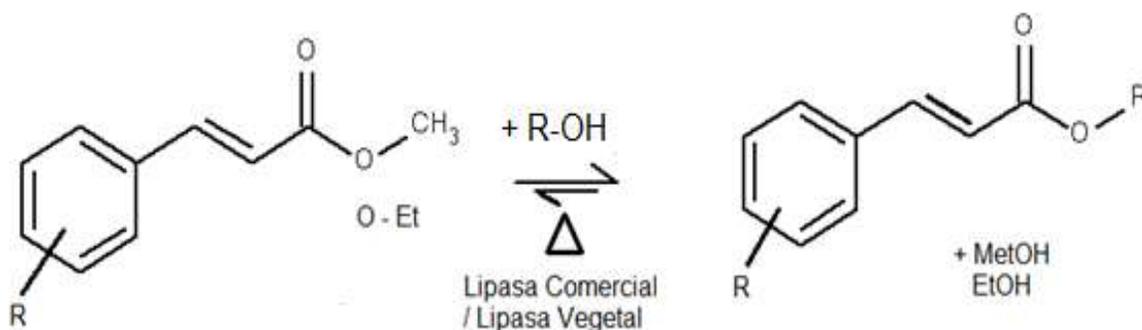
Solución NaBH_4 3.42 M*: para preparar 5 mL de esta solución se pesaron 642.89mg de Borohidruro de Sodio (NaBH_4), se vertieron a un matraz aforado de 5 mL y se aforó con una solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.

Diagrama de Proceso de preparación del alcohol Vainílico



(Lecher C., 2007)

Transesterificación Enzimática



Esquema 3. Ruta sintética de la Transesterificación enzimática

Transesterificación Enzimática con Lipasa Comercial

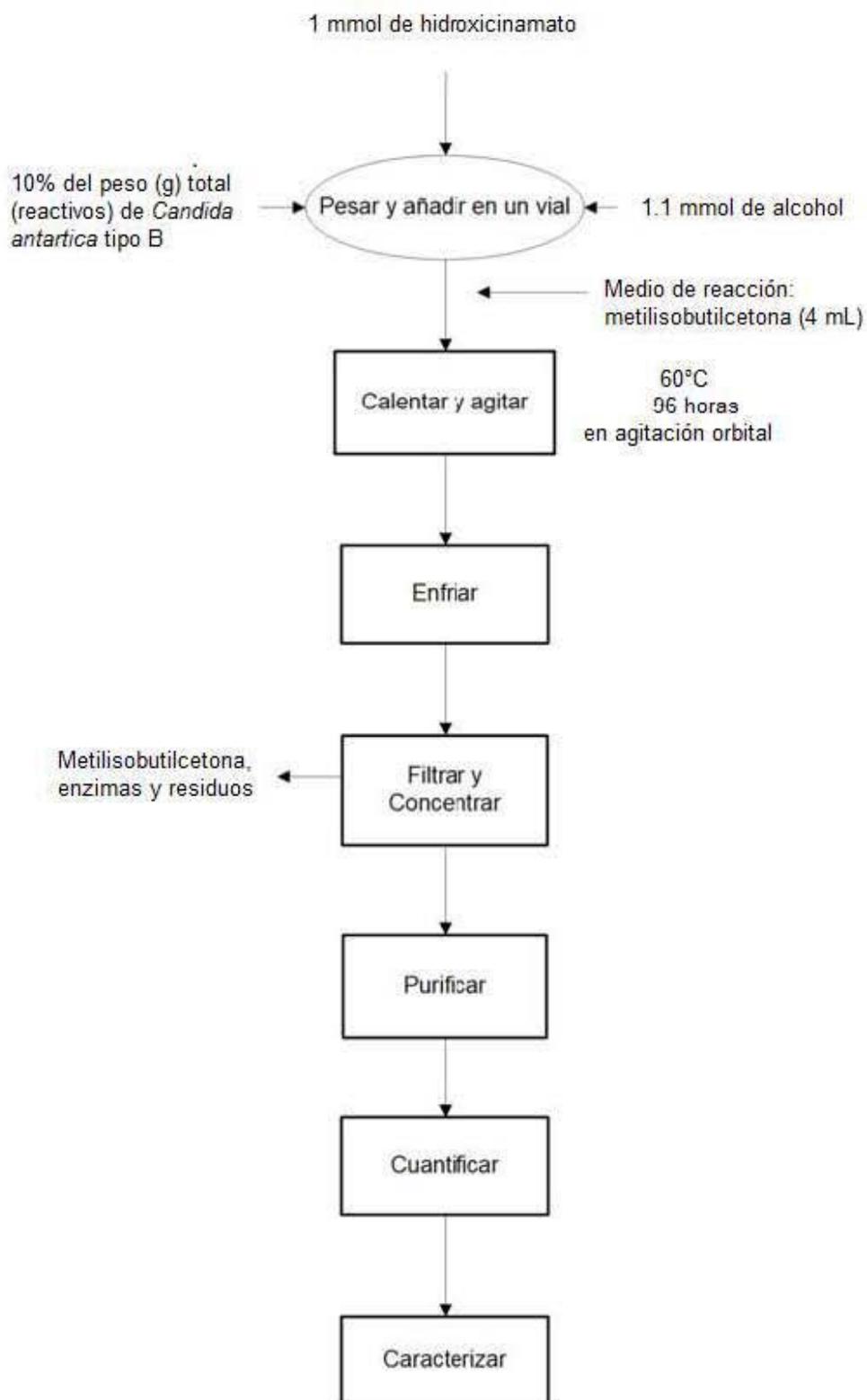
Se adicionó 1 mmol de hidroxinamato de metilo/etilo (ferulato, cafeato, cumarato, sinapato) , se agregó 1.1 mol de alcohol (ácido kójico, alcohol Vainíllico, alfa-amirina), 10% del peso total de lipasa *Candida antárctica* tipo B en un vial de 10 mL al que se adicionó 4 mL de metilisobutilcetona por cada 0.010 g de lipasa y 0.4 g malla molecular (100 g/L). La reacción se llevó a cabo a 60 °C en agitación a 250 rpm durante 96 horas.

Posteriormente la reacción se quitó de la incubadora, una vez que llegó a temperatura ambiente se filtró y se concentró a sequedad en un rotavapor, se pesó para calcular el rendimiento de la reacción.

La reacción se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice, proporción (1:20), se empacó la columna con hexano y se eluyó con una mezcla de Hexano: Acetato (7:3)

A la muestra purificada se le realizó cromatografía en capa fina. Se tomó 5 mg de muestra de la reacción, se diluyó en 100 μ L de etanol, se aplicó con un capilar y se corrió en placas cromatográficas de capa fina (fase estacionaria) con un eluyente (fase móvil) hexano: acetato de etilo (1:1), se reveló con ácido cérico y/o DPPH. Finalmente, se caracterizó por RMN.

Diagrama de proceso de la Transesterificación Enzimática con Lipasa Comercial



Preparación de la lipasa vegetal, extraída de la semillas *Ricinus communis*

Se pesaron 20 g de semillas de ricino (*Ricinus communis*), se molieron en un mortero con pistilo, se hizo una pasta, la cual se puso en un matraz de 100 mL y se añadieron 50 mL de hexano, se sonicó por 30 minutos a temperatura ambiente, la extracción del aceite de ricino se repitió una vez más.

Una vez que se obtuvo la muestra desengrasada, se filtró a vacío hasta que no hubo residuos de hexano en la muestra, se le añadió 50 mL de buffer de citratos 0.1 M, pH 4.2 y se mantuvo por 24 horas a 4°C. Se filtró a vacío (Fuch, 1996).

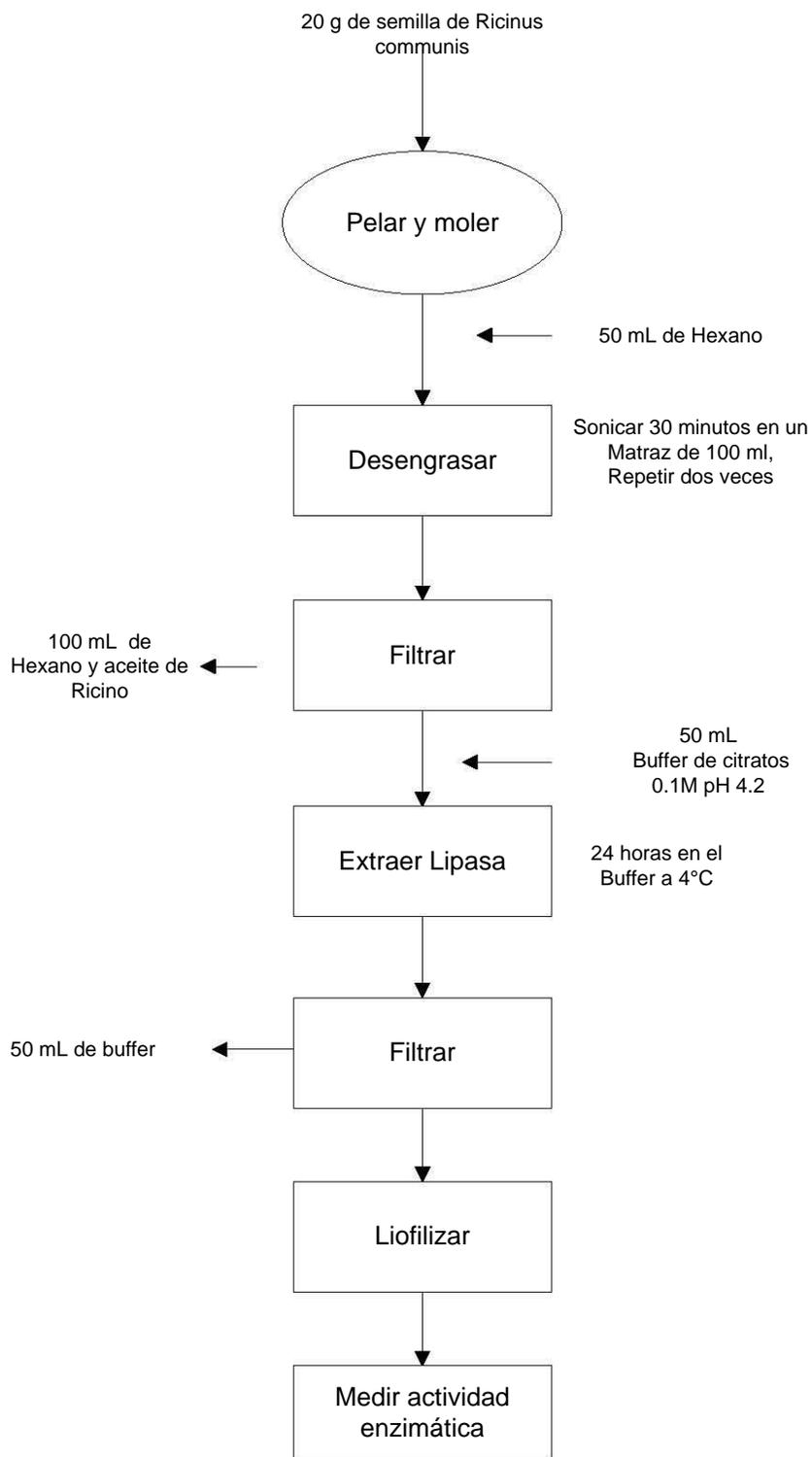
Cuando la lipasa vegetal de ricino se extrajo, se liofilizó para extraer residuos acuosos. Finalmente se midió la actividad enzimática.

Medición de la Actividad enzimática de la lipasa vegetal *Ricinus communis*

Para medir la actividad enzimática, Se pesaron 10 mg de la semilla de Ricino y se colocaron en un tubo eppendorf al cual se le adicionó 900 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 y 100 μ L de sustrato *p*-nitrofenil butirato, la reacción en agitación se llevó a cabo durante 15 minutos a 50°C junto con un blanco de reacción. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se tomó una alícuota de 200 μ L y se midió en el 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*-nitrofenilbutirato se interpoló en una curva patrón de *p*-NP.

Diagrama de Proceso de Preparación de la lipasa vegetal, *Ricinus communis*



(Fuch, 1996).

Transesterificación Enzimática con Lipasa Vegetal

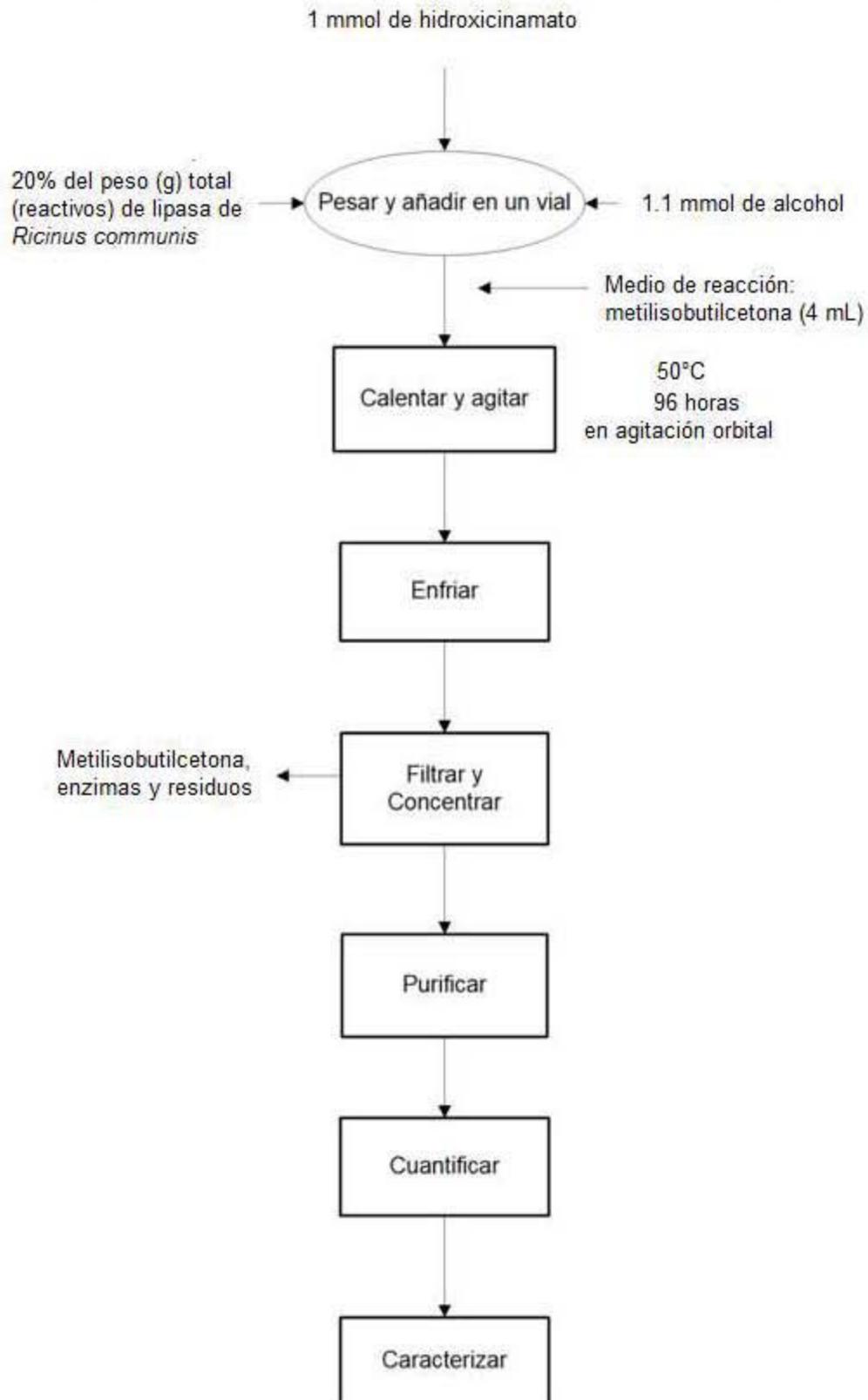
Se adicionaron 1mmol de hidroxinamato de metilo/etilo (ferulato, cafeato, cumarato, sinapato), se agregó 1.1 mmol de alcohol (ácido kójico, alcohol Vainílico, alfa-amirina), 20% del peso total de lipasa *Ricinus communis* en un vial de 10 g al que se adicionó 4 mL de metilisobutilcetona por cada 0.010 g de lipasa y 0.4 g malla molecular (100 g/L). La reacción se llevó a cabo a 50 °C en agitación a 250 rpm durante 96 horas (Moussavou, M., et al., 2013).

Posteriormente la reacción se quitó de la incubadora, una vez que llegó a temperatura ambiente se filtró y se concentró a sequedad en un rotavapor, se pesó para calcular el rendimiento de la reacción.

La reacción se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice, proporción (1:50), la columna se empacó con hexano y se eluyó con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (7:3).

A la muestra purificada se le realizó cromatografía en capa fina. Se tomó 5 mg de muestra de la reacción, se diluyó en 100 µl de etanol, se aplicó con un capilar y se corrió en placas cromatográficas de capa fina (fase estacionaria) con un eluyente (fase móvil) hexano: acetato de etilo (1:1), se reveló con ácido cérico y/o DPPH. Finalmente, se caracterizó por RMN.

Diagrama de proceso de la Transesterificación Enzimática con Lipasa Vegetal



(Moussavou et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esterificación de Fisher

La esterificación de Fisher, como primera etapa, se efectuó con los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido sinápico, ácido cafeico), y alcoholes de cadena corta metanol y etanol, midiendo el Rf y punto de fusión de cada uno de los productos puros de la transesterificación. En las Tabla 1 y Tabla 2 se muestran los rendimientos obtenidos de la esterificación de Fisher.

Tabla 1. Rendimientos de las reacciones de hidroxicinamatos de metilo realizadas con el método químico Esterificación de Fisher.

Esterificación de Fisher			
Compuesto	Rendimientos (%) Metil éster	Rf.*	p.f* (°C)
Ácido ferúlico	85.46	0.71	L*
Ácido Cafeico	91.07	0.69	159-161
Ácido <i>p</i> -cumárico	79.66	0.76	139-143
Ácido sinápico	80.33	0.72	79-81

Rf.*: Cociente entre la distancia recorrida por la muestra y la distancia recorrida por el eluyente (Hexano:Acetato de etilo 1:1). p.f.*: punto de fusión. L*: estado líquido a Temperatura Ambiente.

Tabla 2. Rendimientos de las reacciones de hidroxicinamatos de etilo realizadas con el método químico Esterificación de Fisher.

Esterificación de Fisher			
Compuesto	Rendimientos (%) Etil éster	Rf.*	p.f* (°C)
Ácido ferúlico	72.45	0.77	L*
Ácido Cafeico	89.01	0.68	139-141
Ácido <i>p</i> -cumárico	61.59	0.73	L*
Ácido sinápico	74.87	0.66	60-62

Rf.*: Cociente entre la distancia recorrida por la muestra y la distancia recorrida por el eluyente (Hexano:Acetato de etilo 1:1). p.f.*: punto de fusión. L*: estado líquido a Temperatura Ambiente.

De acuerdo con estos resultados, los rendimientos de las reacciones obtenidos por el método de Fisher fueron similares a los que obtuvo Moreno (2013), quien menciona que un aumento en la cadena carbonada disminuye notablemente los rendimientos, pues en todas las reacciones que se llevaron a cabo con metanol, los rendimientos fueron mayores a los obtenidos por las reacciones con etanol. Moreno (2013), también hace estas esterificaciones con otro método en el que se utilizaron arcillas

ácidas y en el que se obtuvieron rendimientos superiores a 90%, sin embargo, en este último método las reacciones tardaron 5 días y en el de Fisher sólo 8 horas.

Actividad Enzimática

La enzima vegetal, fue un extracto crudo que se extrajo de las semillas *Ricinus communis* el cual no se purificó, sin embargo, se le midió actividad enzimática para utilizarlo en la siguiente etapa de transesterificación. La actividad del extracto crudo fue de 752.51 U/g de semilla frente al sustrato *p*-nitrofenilbutirato a pH 7 y a temperatura ambiente, esta actividad se comparó con la actividad de la enzima comercial *Candida antarctica tipo B*, la cual dio un resultado de 388.48 U/g de semilla frente al mismo sustrato y mismas condiciones de pH y temperatura.

Transesterificación Enzimática

Como segunda etapa, los hidroxicinamatos de metilo e hidroxicinamatos de etilo, productos de la primera etapa, se transesterificaron enzimáticamente con los alcoholes (ácido kójico, alcohol vainílico, alfa-amirina), utilizando las enzimas comercial y vegetal. El aw se controló con malla molecular, la cual se añadió en los disolventes utilizados y en todas las reacciones de transesterificación. En las tablas 3 y 4 se indica solamente si hubo una reacción o no.

Tabla 3. Reacciones de Transesterificación de hidroxicinamatos de metilo con alcoholes utilizando enzima comercial *Candida antarctica tipo B* y vegetal *Ricinus communis*.

Transesterificación Enzimática			
Hidroxicinamato	Alcohol	Enzima	
		<i>Candida antarctica</i>	<i>Ricinus communis</i>
ferulato de metilo	ácido Kójico	No	No
	alcohol vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si
cumarato de metilo	ácido Kójico	Si	Si
	alcohol vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si
sinapato de metilo	ácido Kójico	Si	Si
	alcohol vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si
cafeato de metilo	ácido Kójico	Si	No
	alcohol vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si

Si: si dió reacción, No: no dió reacción.

Tabla 4. Reacciones de Transesterificación de hidroxicinamatos de etilo con alcoholes utilizando enzima comercial *Candida antarctica* tipo B y vegetal *Ricinus communis*.

Transesterificación Enzimática			
Hidroxicinamato	Alcohol	Enzima	
		<i>Candida antarctica</i>	<i>Ricinus communis</i>
ferulato de etilo	ácido Kójico	No	No
	alcohol Vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si
cumarato de etilo	ácido Kójico	Si	No
	alcohol Vainílico	Si	No
	alfa-amirina	Si	Si
sinapato de etilo	ácido Kójico	No	No
	alcohol Vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si
cafeato de etilo	ácido Kójico	No	Si
	alcohol Vainílico	Si	Si
	alfa-amirina	Si	Si

Si: si dió reacción, No: no dió reacción.

A continuación, se muestran las imágenes de algunos ejemplos de reacciones de transesterificación no purificadas corridas en placas cromatográficas y reveladas con diferentes longitudes de onda y/o reactivos.

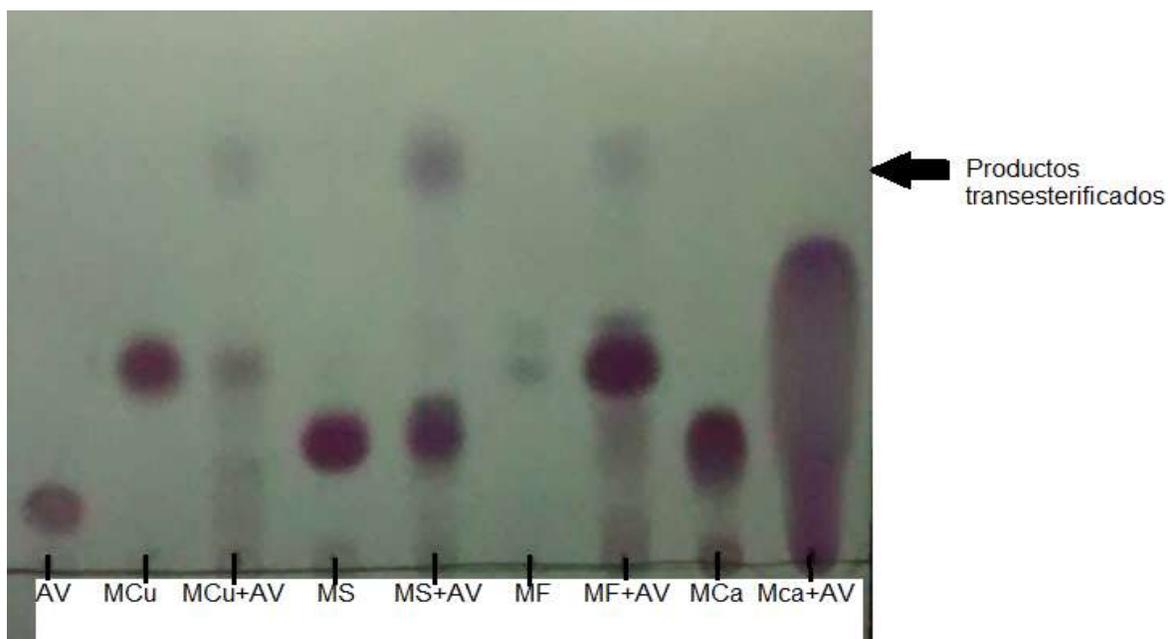


Figura 17. Transesterificación de alcohol vainílico (AV) con hidroxicinamatos de metilo; cumarato de metilo (MCu), sinapato de metilo (MS), ferulato de metilo (MF), cafeato de metilo (Mca), utilizando la enzima comercial *Candida antarctica*. Placa revelada con luz UV. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo (7:3).

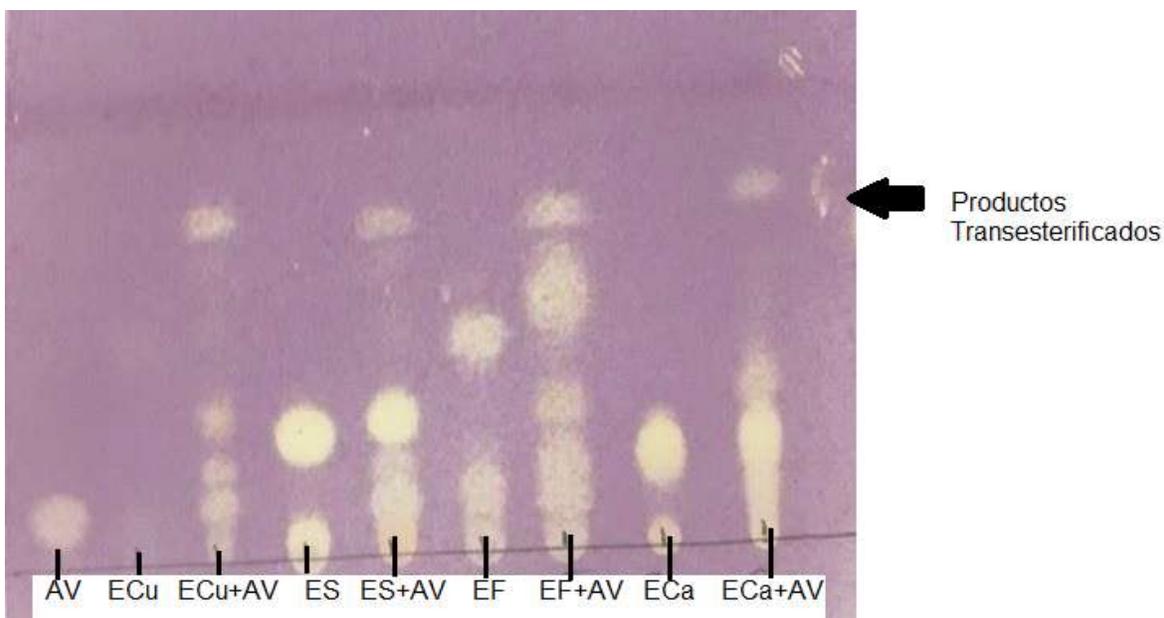


Figura 18. Transesterificación de alcohol vainílico (AV) con Hidroxicinamatos de etilo; cumarato de etilo (ECu), sinapato de etilo (ES), ferulato de etilo (EF), cafeato de etilo (ECa), utilizando la enzima comercial *Candida antarctica*. Placa revelada con DPPH. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo (7:3).

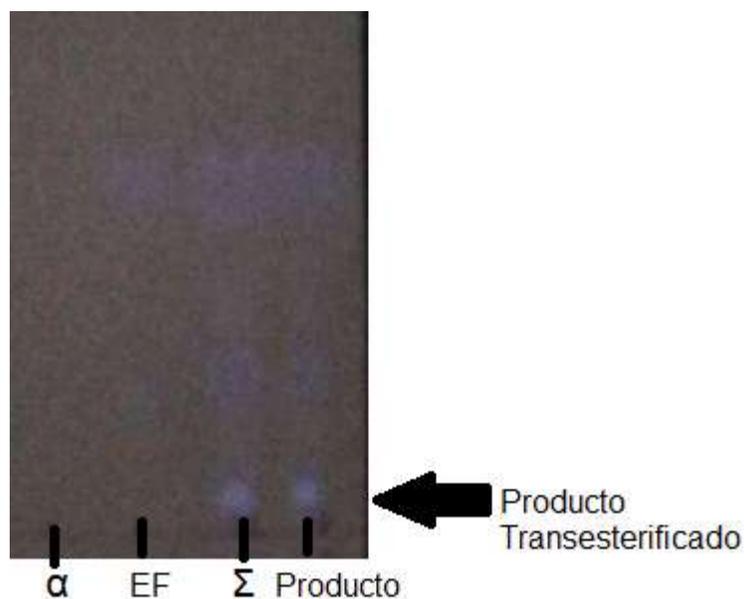


Figura 19. Transesterificación de α -amirina (α) con ferulato de etilo (EF), utilizando la enzima vegetal *Ricinus communis*. La tercera columna (Σ) es la suma del alcohol, el hidroxicinamato de metilo y el producto. Placa revelada con luz UV onda larga. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo (1:1).

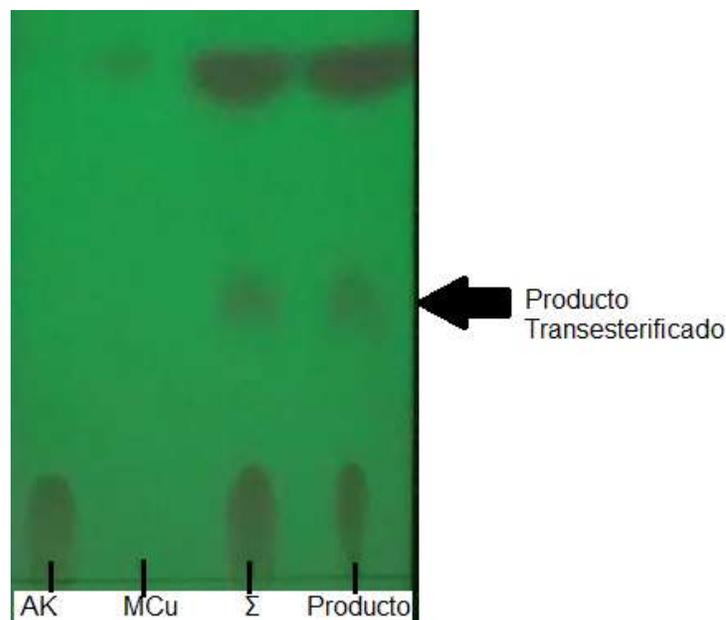


Figura 20. Transesterificación de ácido kójico (AK) con cumarato de metilo (MCu), utilizando la enzima vegetal *Ricinus communis*. La tercera columna (Σ) es la suma del alcohol, el hidroxicinamato de metilo y el Producto. Placa revelada con luz UV onda corta. Eluyente: Hexano: Acetato de etilo (1:1).

Como se observa en las tablas 3 y 4, las reacciones con el ácido Kójico no son favorables, en especial menos favorables con los etiles hidroxicinamatos, El- Boulifi y colaboradores (2014), describen al ácido Kójico como soluble en agua e inestable a altas temperaturas cuando se almacena a largo plazo. Es posible que durante el proceso de transesterificación, el solvente utilizado como medio de reacción no haya estado lo suficientemente seco y que el agua que estuviera presente aún en el medio solubilizara el ácido Kójico.

Findrik y colaboradores (2012), mencionan que el exceso de agua en el ambiente de la lipasa reduce su actividad, como se sabe, las lipasas requieren sólo una cantidad mínima de agua para la actividad óptima. Por lo tanto eliminando el agua producida a partir del medio de reacción es posible lograr una mayor productividad, mayor conversión de equilibrio, así como mayores velocidades de reacción.

La combinación de un sustrato lipofílico con uno hidrofílico es la mayor dificultad que hay que superar en estas reacciones catalizadas por la lipasa. Varios parámetros clave son considerados a fin de lograr que la reacción cinética y los rendimientos sean satisfactorios y para superar el hecho de que los dos sustratos difieran en gran medida en términos de polaridad y afinidad por el disolvente (Villanueva, 2007).

Purificación de las reacciones de transesterificación

En la purificación de los productos de la reacción de transesterificación, primero se seleccionó a los productos no purificados de la segunda etapa que tuvieran un Rf diferente a sus precursores y que se visualizara en la placa cromatográfica una buena conversión de reactivos a productos, después se realizó la purificación de éstos productos seleccionados por el método de columna cromatográfica, con una relación de 1:50, en la cual se utilizó como fase estacionaria gel de sílice (TLC) empacada con hexano, y como fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3).

En la Tabla 5 se muestran los rendimientos de las reacciones de transesterificación enzimática purificadas, de cada producto purificado se obtuvo Rf y punto de fusión.

Tabla 5. Productos purificados de las Reacciones de Transesterificación de hidroxycinamatos de etilo y metilo con alcoholes utilizando enzima comercial *Candida antarctica* tipo B y vegetal *Ricinus communis*.

Transesterificación Enzimática: Productos Purificados				
Metil hidroxycinamato + Alcohol	Enzima	Rendimiento (%)	Rf	p.f.* (C°)
metil ferulato + alcohol vainíllico	<i>Candida antarctica</i>	52.20	0.88	L*
metil ferulato + alfa-amirina	<i>Candida antarctica</i>	12.90	0.31	L*
metil cumarato + ácido Kójico	<i>Ricinus communis</i>	14.40	0.78	140-144
metil sinapato + alfa-amirina	<i>Candida antarctica</i>	6.00	0.25	115-119
metil cafeato + alcohol vainíllico	<i>Candida antarctica</i>	59.40	0.95	152-157
metil cafeato + alfa-amirina	<i>Candida antarctica</i>	24.00	0.18	L*
metil cafeato + alcohol vainíllico	<i>Ricinus communis</i>	34.64	0.71	156-160
etil cumarato + ácido Kójico	<i>Candida antarctica</i>	22.70	0.97	97-101
etil cafeato + alcohol Vainíllico	<i>Candida antarctica</i>	36.45	0.75	134-137

p.f.*: punto de fusión. L*: estado líquido a Temperatura Ambiente.

En las siguientes imágenes, se muestran algunos ejemplos de purificación de los productos transesterificados corridas en placas cromatográficas y reveladas con diferentes longitudes de onda y/ó reactivos.

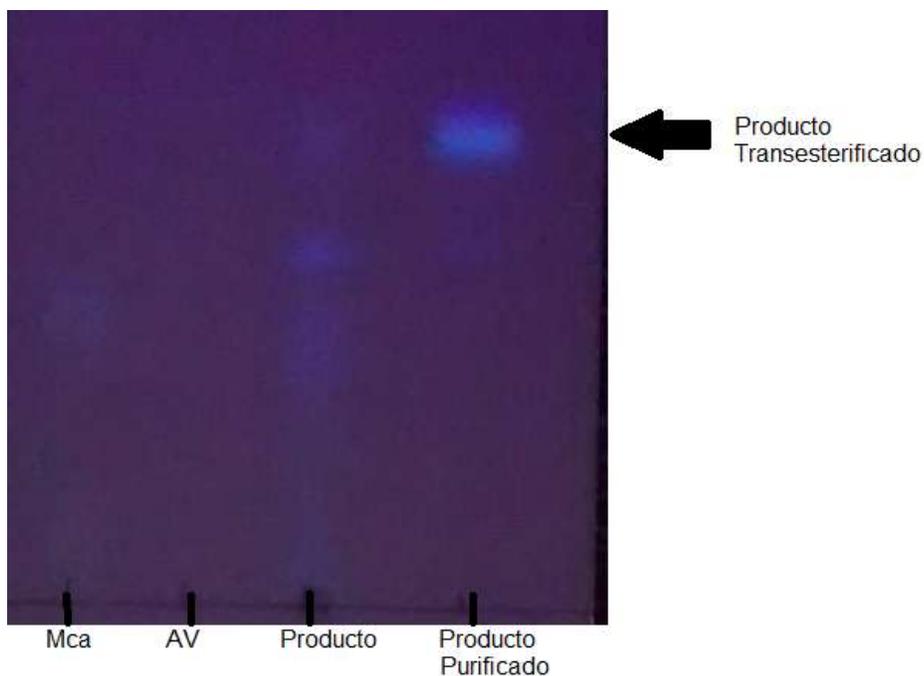


Figura 21. Purificación de la reacción de transesterificación de alcohol vainílico (AV) con cafeato de metilo (Mca), catalizada por la enzima comercial *Candida antarctica*. Placa revelada con luz UV onda larga. Eluyente: Hexano: acetato (1:1).

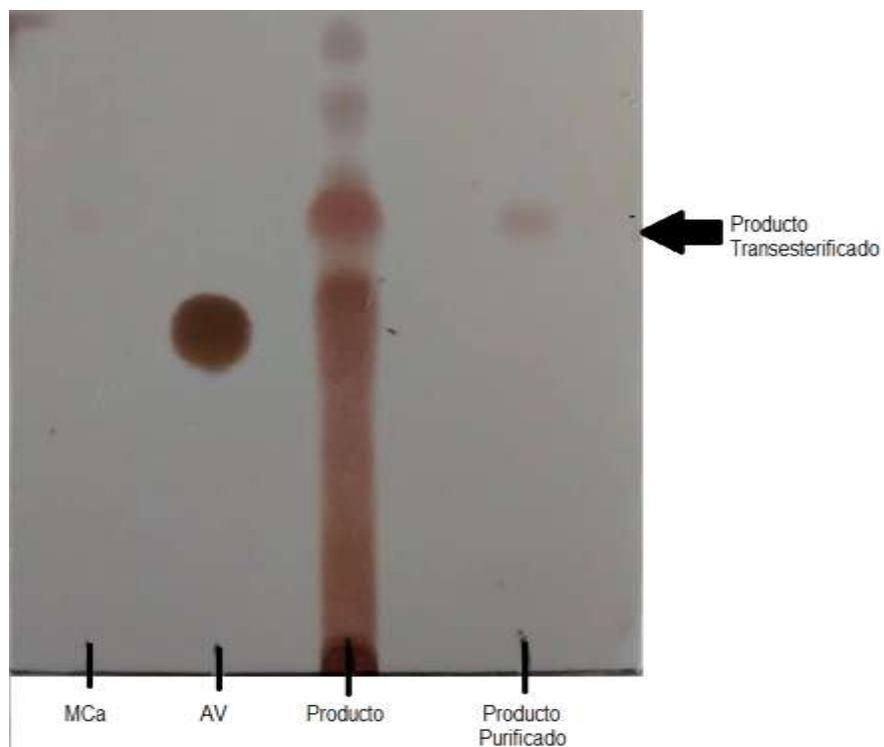


Figura 22. Purificación de la reacción de transesterificación de alcohol vainílico (AV) con cafeato de metilo (Mca), catalizada por la enzima vegetal *Ricinus communis*. Placa revelada con sulfato cérico. Eluyente: Hexano: acetato (1:1).

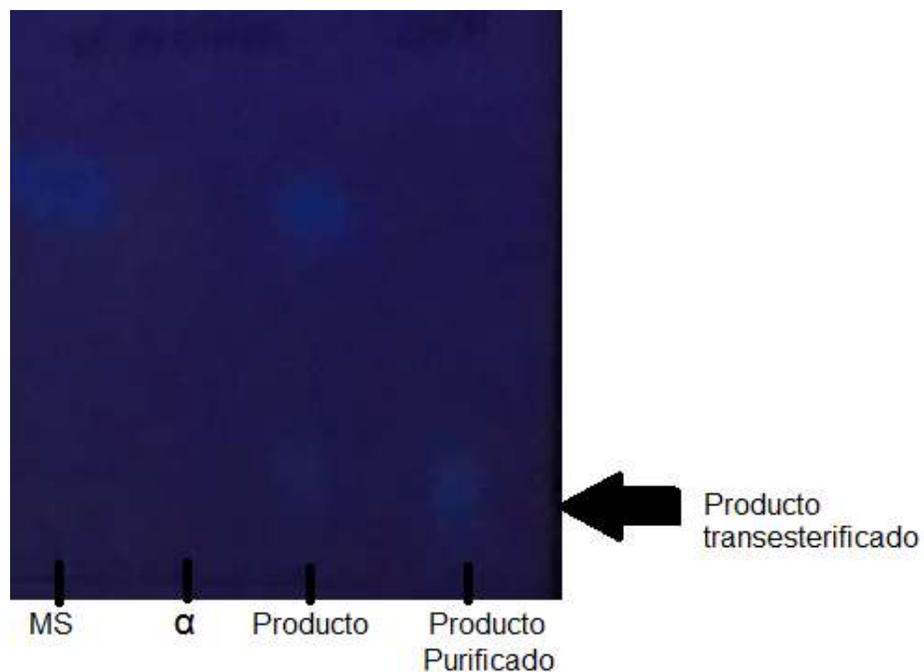


Figura 23. Purificación de la reacción de transesterificación de alfa-amirina (α) con sinapato de metilo (MS), catalizada por la enzima comercial *Candida antarctica*. Placa revelada con luz UV onda larga. Eluyente: Hexano: acetato (1:1).

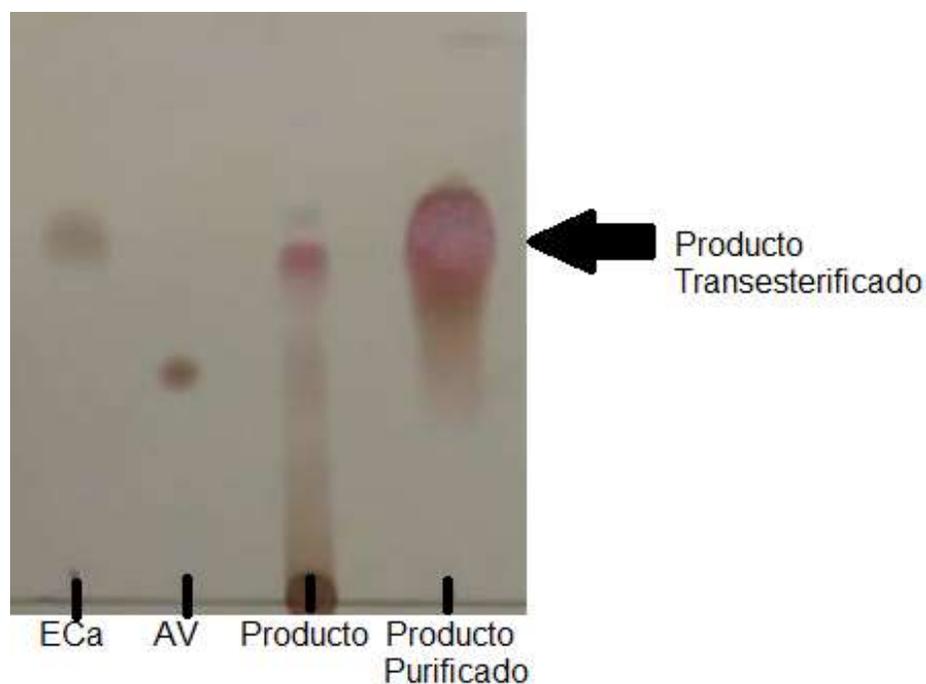


Figura 24. Purificación de la reacción de transesterificación de Ácido Vainílico (AV) con Cafeato de Etilo (ECa), catalizada por la enzima *Candida antarctica*. Placa revelada con Sulfato cérico. Eluyente: Hexano: acetato (1:1).

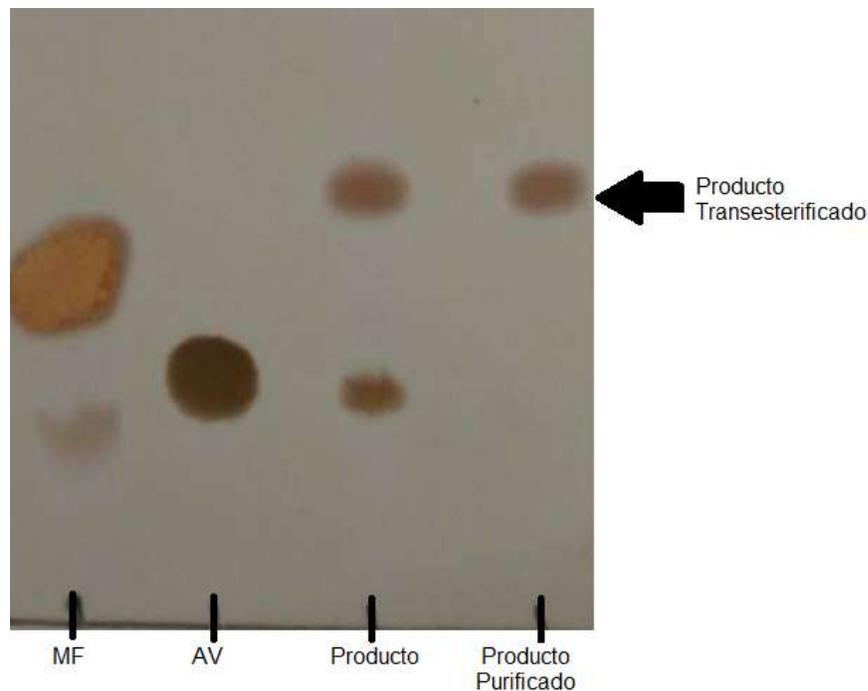


Figura 25. Purificación de la reacción de transesterificación de alcohol vainílico (AV) con ferulato de metilo (MF), catalizada por la enzima comercial *Candida antarctica*. Placa revelada con sulfato cérico. Eluyente: Hexano: acetato (1:1).

En la figura 21 se muestra la purificación del producto cafeato de vainillilo a partir de una reacción catalizada por la enzima comercial *Candida antarctica*, proveniente de la reacción de cafeato de metilo y alcohol Vainílico, en la cual se obtuvo un rendimiento del 59.40%, en comparación con la figura 24, en la que se muestra la purificación del mismo producto catalizada también por la enzima comercial *Candida antártica*, pero proveniente de la reacción de cafeato de etilo y alcohol vainílico, se observa un rendimiento menor del 51.20%, por lo que las reacciones de metil hidroxicinamatos tienen un mejor rendimiento.

En la figura 21 se muestra la purificación del cafeato de vainillilo a partir de una reacción catalizada por la enzima comercial *Candida antarctica*, en la cual se obtuvo un rendimiento del 59.40%, en comparación con la figura 22, en la cual se muestra la purificación del mismo producto, pero ahora catalizada por la enzima vegetal *Ricinus communis*, en la cual se obtuvo un rendimiento menor del 34.64%, se observa que en ésta reacción, la relación de enzima comercial y enzima vegetal es 1:0.58.

Los mejores resultados fueron los obtenidos en los productos de vainillil cafeato, proveniente de la reacción de etil/metil cafeato con alcohol vainílico catalizada por la

enzima comercial y vegetal respectivamente. Sin embargo con los otros tipos de alcoholes, ácido Kójico y alfa-amirina, hubo variaciones en el rendimiento. Por ejemplo, se observan rendimientos bajos en las reacciones con alfa-amirina e incluso en ocasiones no hubo reacción en el caso de las reacciones con ácido Kójico. Villanueva (2007), hace una compilación sobre los avances tecnológicos de lipasas en reacciones de lipofilización donde evaluaron los efectos del índice de esterificación del ácido cafeico con diferentes tipos de alcoholes (etanol, butanol, octanol, decanol y oleico) catalizadas por la lipasa *Candida antarctica* tipo B, en el que se demostró que la esterificación de ácido cafeico no es posible con cualquier alcohol y que los rendimientos de esterificación dependían del tipo de ácido y su estructura, por ejemplo, para el ácido cinámico los rendimientos más altos se alcanzaron con butanol y octanol. Para el hidrocafeico los rendimientos siempre fueron superiores a 80% independientemente de la naturaleza del alcohol. Sin embargo en la esterificación del ácido ferúlico sólo era posible con alcoholes de longitud de cadena larga igual o superior a ocho átomos de carbono, aunque los rendimientos fueron bajos, alrededor del 10 y 14%. Con esto último comparamos los bajos rendimientos, que fueron alrededor del 7.10 y 25.00% obtenidos de las reacciones de metil/etil ferulato con alcoholes, a excepción de la reacción con alcohol vainillíco que obtuvo un rendimiento del 52.20%.

Li y colaboradores (2015), mencionan que la lipasa *Candida antarctica* tipo B es una de las lipasas más efectivas en cuanto a la síntesis de esterés. Es una proteína globular compuesta de 317 aminoácidos con un peso molecular de 33 kDa. El único sitio activo de CALB ofrece a la enzima una excelente estereoselectividad con el sustrato.

Tüter (1998), prueba la lipasa de *Ricinus communis* como un biocatalizador en reacciones de esterificación de ácidos grasos y alcoholes. Determina los parámetros para la actividad óptima de la enzima durante estas reacciones y el mejor rendimiento obtenido en estas reacciones de esterificación fue de 53%, que comparado con los rendimientos de las reacciones de las Tablas 1 y 2, el rendimiento más alto fue de 34.64 % obtenida por la reacción de Metil Cafeato con Alcohol Vainillíco catalizada por la lipasa *Ricinus communis*. Mossavou et al. (2013), concluyen que los problemas encontrados actualmente cuando se utilizan lipasas vegetales en las reacciones de

transesterificación son la cinética lenta de transesterificación de lipasas vegetales y el bajo rendimiento de síntesis en comparación a lo obtenido con lipasas microbianas. Martínez (2013), concluye que las enzimas contenidas en las semillas de *Ricinus communis* catalizaron la reacción de hidrólisis con un rendimiento del 74% y que las lipasas contenidas en las semillas de *Ricinus communis* utilizadas en este estudio presentaron actividad biocatalítica en la reacción de transesterificación de triacilglicéridos y etanol, con y sin disolvente.

Seth y colaboradores (2014), hacen una recopilación sobre el enfoque global que ha tenido las lipasas vegetales tanto en el campo de la industria, como en el campo de la investigación. Señalaron que las lipasas vegetales tienen un mejor potencial para las aplicaciones comerciales en síntesis orgánica, como en alimentos, detergentes y fármacos. Sin embargo, la baja expresión, la purificación costosa y las dificultades relacionadas con su expresión recombinante han sido factores negativos que limitan su aplicación comercial.

Findrik y colaboradores (2012), mencionan que en el método enzimático, los procesos biocatalíticos son frecuentemente limitados por los rendimientos bajos y la eliminación del producto *in situ* puede ser bastante ventajoso. El problema de la inhibición del producto o del equilibrio termodinámico se puede resolver, y permitir la eliminación selectiva del producto desde el biocatalizador. Esto también puede proporcionar beneficios para los procesos posteriores y minimizar las pérdidas de producto evitando su degradación. El acoplamiento de la reacción y el proceso de separación del producto *in situ* ha sido cada vez más importante en los procesos industriales debido a la necesidad de hacerlos más productivos y menos demandantes en cuestión de energía.

Tan y colaboradores (2013), mencionan que se transesterificó sinapato de vinilo a través de una ruta química obteniendo buenos resultados, sin embargo probó una ruta enzimática con diez lipasas comerciales, pero ninguna tuvo éxito debido a la inhibición de la actividad enzimática por parte del ácido sinápico y del acetato de vinilo.

Análisis de Espectros de RMN 1H Y 13C

Finalmente, las muestras purificadas que se mandaron a analizar a la USAI (Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Facultad de Química, fueron en las que se obtuvo los rendimientos más altos, aunque también se consideró que hubiera suficiente muestra para mandar a analizar, evaluando estos parámetros se solicitó una resonancia de líquidos monodimensional con análisis de Núcleos 1H y 13C y cloroformo deuterado C13 (CDC13) como disolvente. Los resultados de los espectros se encuentran en el Apéndice de este documento.

Tabla 5. Productos purificados de las Reacciones de Transesterificación de hidroxicinamatos de etilo y metilo con alcoholes utilizando enzima comercial *Candida antarctica tipo B* y vegetal *Ricinus communis*.

Transesterificación Enzimática: Productos analizados por RMN (1H y 13C)				
Metil hidroxicinamato + Alcohol	Enzima	Rendimiento (%)	Rf	p.f.* (C°)
metil ferulato + alcohol vainílico	<i>Candida antarctica</i>	52.20	0.88	L*
metil cafeato + alcohol vainílico	<i>Candida antarctica</i>	59.40	0.95	152-157
metil cafeato + alcohol vainílico	<i>Ricinus communis</i>	34.64	0.71	156-160
etil cumarato + ácido Kójico	<i>Candida antarctica</i>	22.70	0.97	97-101
etil cafeato + alcohol vainílico	<i>Candida antarctica</i>	36.45	0.75	134-137

p.f.*: punto de fusión. L*: estado líquido a Temperatura Ambiente.

El producto purificado de Cumarato de ácido kójico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica tipo B* se mandó a analizar bajo las mismas condiciones que los productos mostrados en la tabla 5. Sin embargo su espectro de RMN, tanto de 1H y 13C, salió con mucho ruido de manera que no se distinguía las señales correspondientes de la muestra, así que se omitió.

A continuación se muestran los resultados de los desplazamientos de los productos seleccionados, medidos en partes por millón (ppm). Aunque no hay aún trabajos de transesterificación de ácidos hidroxicinámicos con alcoholes que hayan sido analizados para comparar con nuestros resultados de RMN, lo más cercano fue hacer un cuadro comparativo con desplazamientos de los reactivos y productos utilizados encontrados en la literatura.

Análisis de Espectros de RMN 1H de Vainillil Cafeato

Tabla 6. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H consultados en la literatura.

Desplazamientos de picos (pmm) en el espectro de RMN 1H			
ácido cafeico SDBD No.: 1631	cafeato de metilo (Wang, J., et al., 2015)	alcohol vainílico SDBS No.:4563	cafeato de vainillilo nmrdb.org
7.42	9.60	8.79	7.74
7.03	9.16	6.88	7.69
7.00	7.50	6.72	7.28
6.78	7.07	6.71	6.97
6.19	7.01	5.02	6.77
6.20	6.77	4.38	6.70
	6.28	3.75	6.64
	3.69		6.54
			5.03
			3.78

ID	Desplazamiento Químico 1H (Vainillil Cafeato)
1	7.78
2	7.69
3	7.29
4	7.05
5	6.90
6	6.77
7	6.74
8	6.49
9	4.46
10	3.79
A	5.02
B	6.20

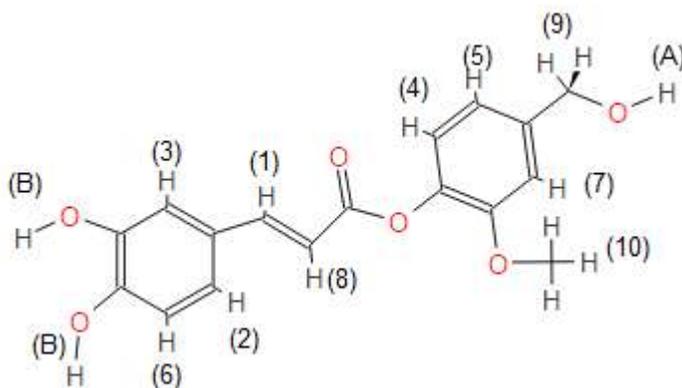


Figura 26. Desplazamientos químicos RMN 1H señalados en la molécula del cafeato de vainillilo, consultados en la literatura (Banfi, et al., 2008).

En la tabla 6 se muestran los desplazamientos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H de los precursores utilizados en la transesterificación del

cafeato de vainillilo consultados en la literatura, aunque en la cuarta columna indica el desplazamiento del producto obtenido, el cual no se encontró en ninguno de los trabajos previos consultados, se recurrió a un programa para visualizar sus probables desplazamientos, los cuales se muestran en la figura 26.

Tabla 7. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H de la transesterificación en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del compuesto AVMCaCal*

Comparación de Picos del Espectro de RMN 1H de la estructura AVMCaCal*			
ID (figura 26.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
1	7.74	7.78	7.60
2	7.69	7.69	7.55
3	7.28	7.28	7.26
4	6.97	7.05	7.06
5	6.77	6.90	6.97
6	6.70	6.77	6.88
7	6.64	6.74	6.85
8	6.54	6.49	6.32
9	5.03	4.46	
9	5.03	4.46	
10	3.78	3.79	3.97
10	3.78	3.79	3.80
10	3.78	3.79	3.80
A	5.02	5.02	
B	6.2	6.2	6.23
B	6.2	6.2	6.23

AVMCaCal*: cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 7 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN 1H cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Tabla 8. Desplazamientos de los Picos en el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H del espectro calculado en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del compuesto ECAVCal*

Comparación de Picos del Espectro de RMN 1H de la estructura ECAVCal*			
ID (figura 26.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
1	7.74	7.78	
2	7.69	7.69	
3	7.28	7.28	7.26
4	6.97	7.05	6.92
5	6.77	6.90	6.91
6	6.70	6.77	6.86
7	6.64	6.74	6.74
8	6.54	6.49	6.48
9	5.03	4.46	4.04
9	5.03	4.46	4.02
10	3.78	3.79	3.83
10	3.78	3.79	3.82
10	3.78	3.79	3.78
A	5.02	5.02	5.44
B	6.2	6.2	
B	6.2	6.2	

ECAVCal*: cafeato de etilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 8 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN 1H cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de etilo con Alcohol Vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Tabla 9. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H de la transesterificación en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del producto de reacción AVMCa^r*

Comparación de Picos del Espectro de RMN 1H de la estructura AVMCa ^r *			
ID (figura 26.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
1	7.74	7.78	7.59
2	7.69	7.69	7.55
3	7.28	7.28	7.26
4	6.97	7.05	7.05
5	6.77	6.90	6.86
6	6.70	6.77	6.84
7	6.64	6.74	
8	6.54	6.49	6.45
9	5.03	4.46	5.54
9	5.03	4.46	4.45
10	3.78	3.79	3.79
10	3.78	3.79	3.80
10	3.78	3.79	3.81
A	5.02	5.02	5.41
B	6.2	6.2	6.26
B	6.2	6.2	6.22

AVMCa^r*: cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima vegetal *Ricinus communis*.

En la tabla 9 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN 1H cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima vegetal *Ricinus communis*, se favorecen ambas posiciones C7 y C2.

Análisis de Espectros de RMN 13C de Vainillil Cafeato

Tabla 10. Desplazamientos de los Picos en el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear 13C consultados en la literatura.

Desplazamientos de Picos (pmm) en el Espectro de RMN 13C			
ácido cafeico SDBD No.: 1631	cafeato de metilo nmrdb.org	alcohol vainílico SDBS No.:4563	cafeato de vainillilo nmrdb.org
168.23	167.67	146.72	166.54
146.39	146.69	145.32	147.80
143.57	146.63	132.99	146.69
125.90	146.39	120.25	146.63
123.13	123.13	114.32	146.39
119.71	116.50	109.99	143.84
116.21	116.21	65.47	137.32
114.91	114.91	55.94	127.21
	51.57		123.13
			120.90
			116.21
			115.67
			115.33
			114.91
			106.34
			66.60
			56.16

En La Tabla 10 se muestran los desplazamientos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 13C de los precursores utilizados en la transesterificación del cafeato de vainillilo consultados en la literatura, aunque en la cuarta columna indica el desplazamiento del producto obtenido, el cual no se encontró en ninguno de los trabajos previos consultados, se recurrió a un programa para visualizar sus probables desplazamientos, los cuales se muestran en la figura 27.

ID	Desplazamiento Químico 13C (cafeato de vainillilo)
1	123.13
2	127.21
3	114.91
4	146.39
5	146.63
6	116.21
7	146.69
8	117.41
9	166.61
10	142.18
11	148.31
12	110.70
13	136.75
14	120.90
15	112.24
16	64.62
17	56.16

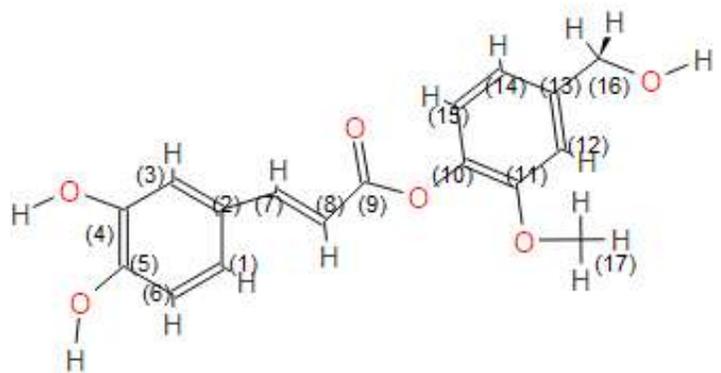


Figura 27. Desplazamientos químicos RMN 13C señalados en la molécula del cafeato de vainillilo, consultados en la literatura (Banfi, et al., 2008).

Tabla 11. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C de la transesterificación en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del compuesto AVMCaCal*

Comparación de Picos del Espectro de RMN ¹³ C de la estructura AVMCaCal*			
ID (figura 27.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
9	166.54	166.61	168.07
11	147.80	148.31	
7	146.69	146.69	146.34
5	146.63	146.63	144.98
4	146.39	146.39	
10	143.84	142.18	143.87
13	137.32	136.75	
2	127.21	127.21	127.52
1	123.13	123.13	125.02
14	120.90	120.90	122.42
8	116.21	117.41	115.50
6	115.67	116.21	115.29
3	115.33	114.91	114.34
15	114.91	112.24	109.63
12	106.34	110.70	108.80
16	66.60	64.62	56.13
17	56.16	56.16	51.73

AVMCaCal*: cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 11 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN ¹³C cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Tabla 12. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H del espectro calculado en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del compuesto ECAVCal*

Comparación de Picos del Espectro de RMN 13C de la estructura ECAVCal*			
ID (figura 27.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
9	166.54	166.61	174.46
11	147.80	148.31	
7	146.69	146.69	146.18
5	146.63	146.63	143.95
4	146.39	146.39	143.79
10	143.84	142.18	143.48
13	137.32	136.75	132.61
2	127.21	127.21	130.44
1	123.13	123.13	121.62
14	120.90	120.90	121.49
8	116.21	117.41	120.70
6	115.67	116.21	115.15
3	115.33	114.91	114.19
15	114.91	112.24	114.09
12	106.34	110.70	111.19
16	66.60	64.62	67.13
17	56.16	56.16	56.53

ECAVCal*: cafeato de etilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 12 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 13C calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN 13C cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de etilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Tabla 13. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C de la transesterificación en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del producto de reacción AVMCa^r*

Comparación de Picos del Espectro de RMN ¹³ C de la estructura AVMCa ^r *			
ID (figura 27.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
9	166.54	166.61	168.19
11	147.80	148.31	
7	146.69	146.69	146.54
5	146.63	146.63	145.15
4	146.39	146.39	144.03
10	143.84	142.18	
13	137.32	136.75	133.41
2	127.21	127.21	127.35
1	123.13	123.13	125.12
14	120.90	120.90	122.34
8	116.21	117.41	115.41
6	115.67	116.21	115.07
3	115.33	114.91	114.25
15	114.91	112.24	114.21
12	106.34	110.70	111.36
16	66.60	64.62	62.15
17	56.16	56.16	55.83

AVMCa^r*: cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima vegetal *Ricinus communis*.

En la tabla 13 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado cafeato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN ¹³C cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de cafeato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima vegetal *Ricinus communis*, se favorecen ambas posiciones C7 y C2.

Análisis de Espectros de RMN 1H de Vainillil Ferulato

Tabla 14. Desplazamientos de los Picos en el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H consultados en la literatura.

Desplazamientos de Picos (pmm) en el Espectro de RMN 1H			
Ácido ferúlico SDBD No.: 6671	Ferulato de metilo (Phuong, N., et al., 2014).	Alcohol vainílico SDBD No.: 4563	Ferulato de vainillilo nmrb.org
12.20	7.62	8.79	7.73
9.20	7.07	6.88	7.65
7.48	7.03	6.72	7.25
7.11	6.92	6.71	6.97
7.10	6.28	5.02	6.78
6.96	5.90	4.38	6.70
6.28	3.93	3.75	6.65
3.82	3.80		6.64
			5.03
			3.79
			3.78

ID	Desplazamiento Químico 1H (ferulato de vainillilo)
1	7.78
2	7.69
3	7.26
4	7.05
5	6.90
6	6.78
7	6.74
8	6.49
9	4.46
10	3.79
11	3.78
A	5.02
B	9.20

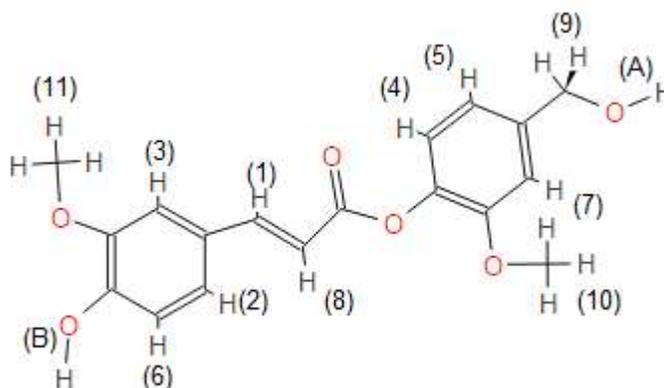


Figura 28. Desplazamientos químicos RMN 1H señalados en la molécula del Ferulato de vainillilo, consultados en la literatura (Banfi, et al., 2008).

En la tabla 14 se muestran los desplazamientos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H de los precursores utilizados en la transesterificación del

cafeato de vainillilo consultados en la literatura, aunque en la cuarta columna indica el desplazamiento del producto obtenido, el cual no se encontró en ninguno de los trabajos previos consultados, se recurrió a un programa para visualizar sus probables desplazamientos, los cuales se muestran en la figura 28.

Tabla 15. Desplazamientos de los Picos en el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H del espectro calculado en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del compuesto MFACal*

Comparación de picos del espectro de RMN 1H de la estructura MFaCal*			
ID (figura 28.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
1	7.73	7.78	7.64
2	7.65	7.69	7.60
3	7.25	7.26	7.27
4	6.97	7.05	7.05
5	6.78	6.90	6.92
6	6.70	6.78	6.90
7	6.65	6.74	6.31
8	6.64	6.49	6.27
9	5.03	4.46	4.61
9	5.03	4.46	4.10
10	3.79	3.79	3.92
10	3.79	3.79	3.91
10	3.79	3.79	3.90
11	3.78	3.78	3.89
11	3.78	3.78	3.80
11	3.78	3.78	3.79
A	5.02	5.02	5.02
B	6.2	6.2	6.03

MFACal*: ferulato de metilo con alcohol vainillilo catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 15 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 1H calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado ferulato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN 1H cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta

reacción de ferulato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Análisis de Espectros de RMN 13C de Vainillil Ferulato

Tabla 16. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 13C consultados en la literatura.

Desplazamientos de Picos (pmm) en el Espectro de RMN 13C			
Ácido Ferúlico SDBD No.: 6671	Metil Ferulato (Phuong, N., et al., 2014).	Alcohol Vainílico SDBD No.: 4563	Vainillil Ferulato nmrbd.org
167.66	167.67	146.72	166.54
149.81	148.00	145.32	148.81
146.66	146.80	132.99	147.84
144.09	145.00	120.25	147.83
127.09	126.90	114.32	147.80
120.86	123.00	109.99	146.69
116.24	115.20	65.47	137.32
114.09	114.70	55.94	127.84
111.99	109.40		123.13
55.58	55.90		120.90
	51.60		115.68
			115.67
			115.33
			111.69
			106.34
			66.60
			56.16
			56.16

En La Tabla 16 se muestran los desplazamientos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear 13C de los precursores utilizados en la transesterificación del Vainillil Cafeato consultados en la literatura, aunque en la cuarta columna indica el desplazamiento del producto obtenido, el cual no se encontró en ninguno de los trabajos previos consultados, se recurrió a un programa para visualizar sus probables desplazamientos, los cuales se muestran en la figura 29.

ID	Desplazamiento Químico ¹³ C (ferulato de vainillilo)
1	123.13
2	127.84
3	111.69
4	148.81
5	147.83
6	115.68
7	146.69
8	117.41
9	166.61
10	142.18
11	148.31
12	110.70
13	136.75
14	120.90
15	112.24
16	64.62
17	56.16
18	56.16

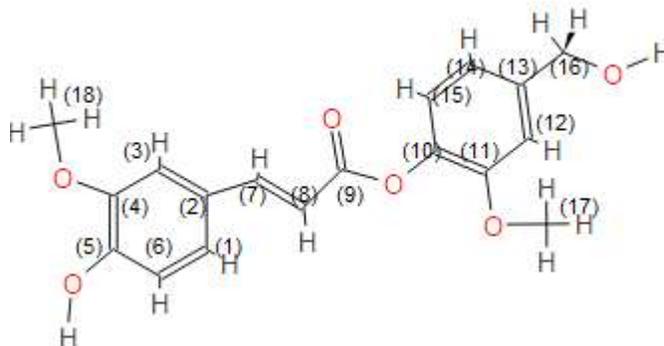


Figura 29. Desplazamientos químicos RMN ¹³C señalados en la molécula del ferulato de vainillilo, consultados en la literatura. (Banfi, et al., 2008).

Tabla 17. Desplazamientos de los picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del espectro calculado en la posición C7 y C2, consultados en la literatura, y del MFACal*

Comparación de Picos del Espectro de RMN ^{13}C de la estructura MFACal*			
ID (figura 29.)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C7. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro calculado en la posición C2. (nmrdb.org)	Valores de picos del espectro obtenido
9	166.54	166.61	167.73
4	148.81	148.81	
11	147.84	148.31	
5	147.83	147.83	147.99
7	147.80	146.69	146.77
10	146.69	142.18	144.95
13	137.32	136.75	133.31
2	127.84	127.84	126.91
1	123.13	123.13	125.17
14	120.90	120.90	122.99
8	115.68	117.41	
6	115.67	115.68	115.10
15	115.33	112.24	114.74
3	111.69	111.69	114.36
12	106.34	110.70	109.40
16	66.60	64.62	62.91
17	56.16	56.16	55.90
18	56.16	56.16	51.50

MFACal*: ferulato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*.

En la tabla 17 se muestran los valores de desplazamientos de picos en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C calculados en dos posiciones posibles donde se puede formar el enlace éster, C7 y C2, comparados con la tercera columna que muestra los valores del producto purificado ferulato de vainillilo, estos valores se obtuvieron mediante el análisis de RMN ^{13}C cuyo espectro se encuentra en el apéndice de este documento. De acuerdo con estos resultados, en esta reacción de ferulato de metilo con alcohol vainílico catalizado por la enzima comercial *Candida antarctica*, se favorece la posición C2.

Las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa comercial *Candida antarctica* tipo B se favorecieron en la posición C2 del Alcohol Vainílico, mientras que las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa vegetal *Ricinus communis* se favorecieron en la posición C7 y C2 del Alcohol Vainílico. Hong et al. (2012), mencionan que las moléculas de Alcohol Vainílico tienen dos grupos alcoholes que pueden ser esterificados. El impedimento estérico del sustrato puede tener la posibilidad de un impacto en la reactividad posicional, ellos informan que en la esterificación en presencia de un grupo hidroxilo fenólico libre es bastante rápida y no hay trazas del ester fenólico que está formado por un efecto estérico.

El protocolo de esterificación de ácido kójico con ácidos grasos de cadena larga en presencia de catalizadores ácidos o alcalinos, generalmente da lugar a una mezcla compleja y hace fácil la formación de ésteres en C-5, el grupo hidroxilo secundario del ácido kójico. El ácido kójico posee dos grupos hidroxilos diferentes: el grupo hidroxilo secundario en C-5 y la posición del grupo hidroxilo primario en C-7. El grupo hidroxilo en la posición C-5 del ácido kójico es esencial para la actividad de captación de radicales y para la actividad de interferencia de la tirosinasa. El uso de lipasas inmovilizadas elimina los problemas inherentes asociados con el uso de catalizadores químicos (El- Boulifi et al., 2014). Sin embargo, como se dijo anteriormente, la resonancia del producto de cumarato de ácido kójico salió con mucho ruido, así que no se comprobó la posición en la que se esterificó y tampoco se conoció si este producto tenía actividad antioxidante.

La actividad de ambas lipasas influyó de manera muy importante en la transesterificación de estas reacciones, la lipasa comercial *Candida antarctica* tipo B dio mejores resultados, sin embargo cuando se midió actividad enzimática de esta lipasa frente al sustrato *p*-nitrofenilbutirato, fue de 388.48 U/g de semilla, menor a la actividad de *Ricinus communis* que fue de 752.51 U/g de semilla, entonces se puede decir que la lipasa CALB tiene afinidad por sustratos de cadena larga, mientras que *Ricinus communis* por sustratos de cadena corta, por lo que se comprueba que CALB tiene mejor actividad en la lipofilización de nuevos ésteres de ácidos hidroxicinámicos con alcoholes de cadena larga.

CONCLUSIONES

- Se sintetizaron nuevos ésteres: cafeato de vainillilo y ferulato de vainillilo, a partir de ácidos hidroxicinámicos y alcoholes, combinando dos métodos: químico y enzimático.
- En las reacciones de transesterificación a partir de hidroxicinamatos de metilo y alcoholes, se obtuvieron rendimientos que están en un rango entre 24% y 59.40%. Éstos valores son mayores a las reacciones de transesterificación a partir de hidroxicinamatos de etilo y alcoholes, en las cuales se obtuvieron rendimientos bajos en un rango entre 22.70% y 36.45%.
- En las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa comercial *Candida antarctica*, se obtuvieron rendimientos que están en un rango entre 22.70% y 59.40%. Estos valores son mayores a las reacciones catalizadas por la lipasa vegetal *Ricinus communis*, en las cuales se obtuvieron rendimientos inferiores al 36.45%.
- Los mayores rendimientos obtenidos fueron: 52.20 %, 59.40% y 36.45%, que se obtuvieron de las reacciones donde se utilizó el alcohol vainíllico con hidroxicinamatos de etilo y metilo catalizadas por *Candida antarctica*.

PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto antioxidante de estos nuevos productos aplicados a una matriz alimenticia.
- Optimizar el proceso de síntesis de estos nuevos productos.
- Purificación y caracterización bioquímica de la enzima vegetal *Ricinus communis*.

REFERENCIAS

- Alemán, M., Bou, R., Guardiola., Durand, E., Villeneuve, P., Jacobsen, C., Moltke-Sorensen, A-D., 2015. Antioxidative effect of lipophilized caffeic acid in fish oil enriched mayonnaise and milk. *Food Chemistry*. 167, 236-244.
- Anselmi, A., Centini, M., Ricci, M., Bounocore, A., Granata, P., Tsuno, T., Facino, R., 2006. Analytical characterization of a ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 40, 875-881.
- Baumert, A., Wilowski, C., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., Strack, D., 2004. Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? *Phytochemistry*. 66, 1334-1345.
- Bingi, C., Emmadi, N.R, Chennapuram, M., Poornachandra, C., Kumar, G., Nanubolu, J.B., Atmakur, K., 2015. One-pot catalyst free synthesis of novel kojic acid tagged 2-aryl/alkyl substituted-4H-chromenes and evaluation of their antimicrobial and anti-biofilm activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25, 1915-1919.
- Chao, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, W., Zhang, B., 2014. Survey on the complexation character of *p*-sulfonatocalix[n] arenes and caffeic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 132, 152-159.
- Cunha, V., Vera, C., Ando, R., 2012. Raman spectroscopy and DFT calculations of *para*-coumaric acid and its deprotonated species. *Vibrational Spectroscopy*. 58, 139-145.
- Dizge, N. y Keskingler, B., 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*. 32, 1274-1278.
- Duque-Estrada, G.O., F. de Souza, A.L., Mendes-Silva, J.F., Antunes, O.A., 2008. Revisiting *p*-coumarate esters production by Heck reaction. *Catalysis Communications*. 9, 1734-1738.
- El-Boulifi, N., Ashari, S.E., Aracil, J., Martínez, M., 2014. Solvente-free lipase-catalyzed synthesis of a novel hydroxyl-fatty acid derivative of kojic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 55, 128-132.
- Escorcia, A., Daza, M., Doerr, M., 2014. Computational Study of the enantioselectivity of the *O*-acetylation of (*R,S*)- propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 108, 21-31.
- Fennema, O., 2000. *Química de los Alimentos*. 2da Ed. Zaragoza: Acribia, S.A. (pp. 354-360).
- Findrik, Z., Németh G., Vasic-Racki, D., Bélafi-Bakó, K., Csanádi, Z., Gubicza, L., 2012. Pre-vaporization-aided enzymatic esterifications in non-conventional media. *Process Biochemistry*. 47, 1715-1722.
- Foresti, M.L., Pedernera, M., Bucalá, V., Ferreira, M.L., 2007. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 62-70.

- Fuchs, C., Vine, N., Hills, M., 1996. Purification and Characterization of Acid Lipase from Endosperm of Castor Oil Seeds. *J. Pant Physiol.* 148, 23-29.
- García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R., López-Munguía, A., 2004. *Biotechnología Alimentaria*. 5ta Ed. Distrito Federal: Limusa, S.A. de C.V. (pp. 235-238).
- Garrido, J., Gaspar, A., Garrido, E-M., Miri, Ramin., Tavakkoli, M., Pourali, S., Saso, L., Borges, F., Firuzi, O., 2012. Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stresses. *Biochimie.* 94, 961-967.
- González-Bacerio, J., Rodríguez-Hernández, J., Del Monte-Martínez, A., 2010. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Colomb Biotechnol.* 12. 124-140.
- Gortzi, O., Christophoridou, S., Roussi, J., 2015. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chemistry*, 185, 33-40.
- Halder, S., Kale, B., Jadhav D., Thulasiram H., 2014. Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, α - and β amyrin. *Tetrahedron Letters.* 55, 3122-3125.
- Hong, S.I., Ma, M., Kim, I., Seo, J., Kim, I.H., 2012. Lipase-catalyzed synthesis of capsiate analog using vanillyl alcohol and conjugated linoleic acid under vacuum system. *Process Biochemistry.* 47, 2317-2322.
- Hsieh, C.L., Chang, C.H., Chiang, S.Y., Li, T.C., Tang, N.Y., Pon, C.Z., Hsieh, C.T., Lin, J.G., 2000. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. *Life Sciences.* 67, 1185-1195.
- Jun, C., Jeon, B.W., Joo, C.J., Le, Q.A., Gu, S.A., Byun, S., Cho, D.H., Kim, D., Sang, B.I., Kim, Y.H., 2013. Thermostabilization of *Candida Antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. *Process Biochemistry.* 48, 1181-1187.
- Kawashima, T., Nakanishi, I., Inami, K., Fukuhara, K., Fukuzumi, S., 2011. Radical-Scavenging Reactions of 4-Propenyl-Phenol Derivates. *Free Radical Biology and Medicine.* 51, S23.
- Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Chabi, B., Decker, E.A., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Villeneuve, P., 2013. How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie.* 95, 20-26.
- Katsoura, M.H, Polydera, A.C., Tsironis, L.D., Petraki, M.P., Rajacic, S.K, Tselepis, A.D., Stamatis, H., 2009. Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. *New Biotechnology.* 26, 83-91.
- Lecher, C., 2007. *Sodium Bromohydrate Reduction of Vanillin: A Low Solvent Synthesis of Vanillyl Alcohol*. GEMs. Marian College. Indianapolis, IN.
- Lee, H.E., Kim, D.H., Park, S.J., Kim, J.M., Lee, Y.W., Jung, J.M, Lee, C.H., Hong, J.G., Liu, X., Cai, M., Park, K.J., Jang, D.S., Ryu, J.H., 2012. Neuroprotective effect of sinapic acid

in a mouse model of amyloid β_{1-42} protein-induced Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 103, 260-266.

- Li, L., Ji, F., Wang, J., Li, Y., Bao, Y., 2015. Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida Antarctica* lipase B in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 69, 46-53.
- Malhotra, D., Mukherjee, J., Gupta, M., 2014. Lipase catalyzed transesterification of castor oil by straight chain higher alcohols. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 20, 1-4.
- Mangas, R., 2008. Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27, 747-751.
- Martins, C., Doumer, M-E., Gallice, W., Dauner, A-L., Cabral, A-C., Cardoso, F-D, Dolci, N., Camargo, L., Ferreira, P., Figueira, R., Mangrich, Antonio., 2015. Coupling spectroscopic and chromatographic techniques for evaluation of the depositional history of hydrocarbons in a subtropical estuary. *Environmental Pollution*. 205, 403-414.
- Martínez, M., 2013. *Lipasas contenidas en la semillas de Ricinus communis utilizadas como biocatalizador en la transesterificación de triacilglicéridos*. Tesis de Experiencia Educativa. Universidad Veracruzana. Facultad de Ingeniería y Ciencias Químicas. Xalapa.
- Matos, I., Freire, A., Marcon, R., Franco, R., Calixto, J., 2013. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. *Molecular Immunology*. 54, 482-492.
- McMurry, 2008. *Química Orgánica*. 7a. Ed. Distrito Federal: CENGAGE Learning Editores, S.A. (pp. 785-842).
- Morales, S., 2005. *Funcionalización Orgánica de Materiales Mesoestructurados con Grupos Sulfónicos para Procesos Catalíticos de Química Fina*. Tesis de Doctorado. Universidad Rey Juan Carlos. Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología. Madrid.
- Moreno, L., 2013. *Lipofilización de ácidos hidroxicinámicos mediante reacciones de esterificación química y transesterificación enzimática*. Tesis Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México D.F.
- Moussavou, R.W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., Blin, J., 2013. Are the plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production?. *Progress in Energy and Combustion Science*. 39, 441-456.
- Nawani, N., Singh, R., Kaur, J., 2006. Immobilization and stability Studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp. The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol*. 559-565.
- Ogiwara, Y., Sugiura, M., Watanabe, K., Tawara, J., Endo, E., Maruyama, H., Tsuji, H., Tsuji, S., Matsue, K., Yamada, H., Wako, Y., Kawasako, K., 2015. Evaluation of repeated-dose liver, bone marrow and peripheral blood micronucleus and comet assays using kojic

acid. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 780, 111-116.

- Park, M.K., Im, G.J., Chang, J., Chae, S.W., Yoo, J., Han, W., Hwang, G.H., Jung, J.Y., Choi, J., Jung, H.H., Chung, A.Y., Park, H.C., Choi, J., 2014. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against neomycin-induced hair cell damage in zebrafish. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 78, 1311-1315.
- Phuing, N-T., Cuong, T-T., Quang, D-N., 2014. Anti-inflammatory activity of methyl ferulate isolated from *Stemona tuberosa* Lour. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7, S327-S331.
- Poojari, J., Clarson S., 2013. Thermal stability of *Candida Antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2, 7-11.
- Ravikumar, N., Gaddamanugu, G., Solomon, K.A., 2013. Structural, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman) and theoretical studies of the 1:1 cocrystal of isoniazid with *p*-coumaric acid. *Journal of Molecular Structure*. 1033, 272-279.
- Roy, J., Mainzen, P.S., 2012. Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 3984-3989.
- Roy, J., Mainzen, P.S., 2013. Protective effects of sinápico acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoprotereno-induced myocardial infarcted rats. *European Journal of Pharmacology*. 699, 213-218.
- Rozniecka, E., Zawisza, I., Jawiczuk, M., Branowska, D., Opallo, M., 2010. Electrochemical and IR spectroscopic detection of oxidation products of the monomer and dimer of vanillyl alcohol in a sol-gel processed silicate matrix. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 645, 123-134.
- Sánchez, A., 1998. *Recuperación, Purificación y Caracterización de Lipasas producidas por Candida rugosa. Aplicación a la Resolución de Compuestos Quirales y Diseño del Reactor Enzimático*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Ingeniería Química. Barcelona.
- Seth, S., Chakravorty, D., Kumar, V., Patra, S., 2014. An insight into plant lipase research – challenges encountered. *Protein Expression and Purification*. 95, 13-21.
- Shahidi, F, 2015. Antioxidants: Principles and applications. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 1, 1-14.
- Shahidi, F. y Chandrasekara A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem Rev*. 9, 147-170.
- Sharma, S., Dogra, P., Chauhan, S., Kanwar, S., 2014. Synthesis of alkyl coumarate esters by celite-bound lipase of *Bacillus licheniformis* SCD11501. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 101, 80-86.

- Stalmach, A., 2014. Bioavailability of Dietary Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 42, 561-576.
- Strazisar, M., Andrensek, S., Smidovnik, A., 2008. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food chemistry*. 110, 636-642.
- Sun, S., Zhu, S., Bi, Y., 2014. Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated structured lipids by the transesterification of ethyl ferulate with castor oil. *Food Chemistry*. 158, 292-295.
- Tan, Z. y Shahidi, F., 2013. Phytosteryl sinapates and vanillates: Chemoenzymatic synthesis and antioxidant capacity assessment. *Food Chemistry*. 138, 1438-1447.
- Tsuchiyama, M., Sakamoto, T., Fujita, T., Murata, S., Kawasaki, H., 2006. Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica*. 1760, 1071-1079.
- Tüter, M. 1998. Castor Bean Lipase as a Biocatalyst in the Esterification of Fatty acids to Glycerol. *JAACS*. 75, 417-420.
- Valentini, F., Roscioli, D., Carbone, M., Conte, V., Floris, B., Bauer, E.M., Ditaranto, N., Sabbatini, L., Caponetti, E., Chillura-Martino, D., 2015. Graphene and ionic liquids new gel paste electrodes for caffeic acid quantification. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 212, 248-255.
- Villeneuve, P., 2007. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. 25, 515-536.
- Viskupicova, J., Ondrejovic, M., Maliar, T., 2012. Enzyme-Mediated Preparation of Flavonoid Esters and Their Applications, Biochemistry, Prof. Deniz Ekinci (Ed.), ISBN: 978-953-51-0076-8, In Tech.
- Wafa, G., Amadou, D., Larbi, K., Héla, E.L., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. *Industrial Crops and Products*. 56, 43-51.
- Wang, J., Wang, S., Li, Z., Gu, S., Wu, X., Wu, F., 2015. Ultrasound irradiation accelerates the lipase-catalyzed synthesis of methyl caffeate in an ionic liquid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 111, 21-28.
- Zhao, S., Yao, S., Ou, S., Lin, J., Wang, Y., Peng, X., Li, A., Yu, B., 2014. Preparation of ferulic acid from bran: Its improved extraction and purification by membrane separation. *Food and Bioproducts Processing*. 92, 309-313.

Referencias Electrónicas

- Banfi, D., et al., 2008. *NMR Predict. Resurrecting and processing NMR spectra on-line*. [En línea], disponible en URL : <<http://www.nmrdb.org>> [Consulta: 7 de Enero de 2015].
- Fernández, G., 2008. *Transesterificación ácida de ésteres, Química Orgánica*. [En Línea], disponible en URL: <<http://www.quimicaorganica.org/esteres/451-transesterificacion-acida-de-esteres.html>> [Consulta: 25 de Octubre de 2014].
- Pérez, G., Ramírez, A., Guzmán, O., Cruz, F., Saucedo, G., 2009. *Análisis de la Extracción de ácidos hidroxicinámicos no esterificados de la pulpa de café por superficie de respuesta, Congreso Nacional de biotecnología y Bioingeniería*, [En Línea], disponible en URL: <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/CV-70.pdf> [Consulta: 14 de Agosto de 2014].
- Sánchez, F. y Rodríguez, G., 1995. *Esterificación, Departamento de ingeniería Química, Universidad de Colombia*, [En Línea], disponible en URL: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/23827/1/20904-70673-1-PB.pdf>> [Consulta: 15 de Septiembre de 2014].

APÉNDICE

