

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



**SEP**

## **TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

# **INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**DANIEL ALBERTO GRAJALES HERNÁNDEZ**

**CON EL TEMA:**

**“SÍNTESIS HETEROGÉNEA DE DERIVADOS DEL ÁCIDO FERÚLICO  
DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR DEL NEJAYOTE”**

**MEDIANTE:**

**OPCIÓN VII  
(MEMORIA DE EXPERIENCIA PROFESIONAL)**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**NOVIEMBRE 2012**

## **INFORME TÉCNICO FINAL**

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN, DE DESARROLLO O DE  
INNOVACIÓN TECNOLÓGICA 2011

MODALIDAD: PROINNOVA

OPCIÓN DE TITULACIÓN VII:  
MEMORIA DE EXPERIENCIA PROFESIONAL

# **SÍNTESIS HETEROGÉNEA DE DERIVADOS DEL ÁCIDO FERÚLICO DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR DEL NEJAYOTE**

Presenta:

Daniel Alberto Grajales Hernández

**Supervisor técnico:**

Dr. Juan Carlos Mateos Díaz

**Instituciones involucradas**

BIOKAB S.A. DE C.V.

MINKAB S.A. DE C.V.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO

DEL ESTADO DE JALISCO (CIATEJ)

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN

Y DESARROLLO A.C. (CIAD)

Periodo de Ejecución De **01/01/ 2011 a 21/ 06/2012**

Responsable Técnico del proyecto Dr. Ángel Emilio Aceves Diez

Sujeto de Apoyo (Empresa)

**BIOKAB S.A. DE C.V.**

Fecha de elaboración **21/06/2012**

# AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Industrial en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ A. C.) bajo la tutoría y supervisión del Dr. Juan Carlos Mateos Díaz a quien agradezco profundamente por la oportunidad que me brindó para desarrollarme profesionalmente y tener fe en mi, por el apoyo incondicional que me brindó en los momentos más difíciles, por su orientación y sus valiosas enseñanzas a lo largo del desarrollo de todo este trabajo.

Agradezco sinceramente a mi comité tutorial por facilitarme el proceso de revisión y dedicarme parte de su valioso tiempo cuando más lo necesité, por sus comentarios acertados y sugerencias. Así mismo al personal del departamento de titulación y servicios escolares por llevarme de la mano en el trámite y permitir que esa etapa de mi desarrollo profesional culminara en tiempo y forma.

A mi familia, Jorge, Mireya y Mariana, por estar siempre en mis momentos de debilidad y ayudarme a sacarme adelante como humano y como profesional, por guiarme mas allá de lo que alguna vez creí posible alcanzar y por su amor incondicional.

A todos mis compañeros que participaron directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo, ya sea con una enseñanza, con un consejo o con una simple sonrisa.

Al Dr. Angel Aceves y el Dr. Alí Assaf por permitirme ser miembro de este increíble grupo de trabajo que tantas cosas tiene aún por dar.

Y finalmente al CIATEJ A. C. por permitirme ingresar y hacer posible que mi desarrollo profesional siga adelante.

# RESUMEN

---

Un total de 158 cepas fueron estudiadas. A partir de estos cultivos se seleccionaron 8 cepas con el objetivo de cuantificar sus actividades feruloil esterasa, esterasa y lipasa. Las cepas candidatas fueron cultivadas por Fermentación en Medio Sólido. Se empleó cascarilla de maíz, como inductor de feruloil esterasas, y triburina, como inductor de esterasas y lipasas. Al emplear la CM como sustrato, se tuvo una mayor inducción de enzimas con actividad feruloil esterasa, que al emplear TC4. Los extractos enzimáticos conteniendo actividad feruloil esterasa y esterasa/lipasa fueron inmovilizados en una resina de catiónica, logrando en algunos casos rendimientos de inmovilización cercanos al 90%. Por último, el fermento sólido proveniente de los diferentes hongos seleccionados, fue secado. Los inmovilizados, fermentos sólidos secos y las lipasas/esterasas comerciales disponibles en nuestro laboratorio, fueron utilizados como biocatalizadores en la síntesis de etil ferulato (EF) y dodecil ferulato (DF), designadas como reacciones modelo. Los mejores catalizadores heterogéneos encontrados fueron A15 para la síntesis de EF por esterificación directa y LLI, para la síntesis de DF por transesterificación. Por **esterificación directa** empleando **A15**, se lograron sintetizar exitosamente derivados del ácido ferúlico de alcoholes primarios, secundarios y terciarios con conversiones **>68%** en tan solo **24 h** de reacción, en el caso de la **alcoholisis del EF** empleando **LLI**, igualmente se lograron sintetizar todos los derivados del ácido ferúlico propuestos. Obteniendo conversiones **>85%** en tan solo **96 h** de reacción. Finalmente se implementaron protocolos sencillos de purificación del EF y DF, empleando extracción con solventes a partir de la mezcla de reacción. Se logró purificar exitosamente el **EF** y **DF** con una **pureza >98%**. Por el alto grado de pureza logrado, fue posible emplearlas para evaluar su actividad antioxidante y anti inflamatoria *in vitro*. Los resultados mostraron que todas las moléculas de síntesis poseen una actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria. Los ésteres de cadena corta (C1-C4), resultaron los más interesantes con una mayor inhibición del 70 al 85% ante el agente secuestrante ABTS. Con referencia a la actividad anti-inflamatoria, destacaron lo ésteres de cadena corta, inhibiendo de manera selectiva la enzima COX-2.

# ÍNDICE

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Introducción .....                           | 1  |
| 2     | Revisión bibliográfica.....                  | 3  |
| 2.1   | Proceso de nixtamalización.....              | 3  |
| 2.1.1 | Composición del nejayote.....                | 3  |
| 2.2   | Compuesto fenólicos.....                     | 4  |
| 2.2.1 | Clasificación.....                           | 5  |
| 2.2.2 | Ácidos cinámicos.....                        | 6  |
| 2.2.3 | Usos y actividad biológica.....              | 9  |
| 2.2.4 | Síntesis de derivados .....                  | 10 |
| 2.3   | Catálisis.....                               | 10 |
| 2.3.1 | Características.....                         | 11 |
| 2.3.2 | Catálisis y energía de reacción .....        | 11 |
| 2.3.3 | Catalizadores heterogéneos.....              | 12 |
| 2.3.4 | Reacciones de esterificación.....            | 16 |
| 2.4   | Síntesis de ésteres de ácidos cinámicos..... | 18 |
| 2.4.1 | Síntesis química.....                        | 18 |
| 2.4.2 | Síntesis enzimática.....                     | 18 |
| 3     | Objetivos.....                               | 21 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.1 | Objetivo general .....  | 21 |
| 3.2 | Objetivos específicos.....  | 21 |
| 3.3 | Delimitación de los objetivos y actividades a realizar dentro del proyecto. ....  | 23 |
| 4   | Diagrama metodológico .....   | 25 |
| 4.1 | Técnicas cromatográficas.....   | 26 |
| 5   | Resultados y discusión.....   | 28 |
| 5.1 | Sección I Búsqueda de microorganismos productores de esterasas y lipasas en las colecciones disponibles en CIATEJ A.C. .... | 28 |
| 5.2 | Sección II. Síntesis de derivados del ácido ferúlico a nivel laboratorio. ....  | 29 |
| 5.3 | Sección III. Evaluación de la actividad biológica de los derivados obtenidos. ....  | 31 |
| 6   | Conclusión general .....  | 33 |
| 7   | Perspectivas.....   | 34 |
| 8   | Bibliografía .....  | 35 |
| 9   | Anexos.....   | 39 |

# Índice de figuras

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química del fenol.....   | 4  |
| Figura 2. Ruta biológica para la síntesis de ácidos cinámicos a partir de fenilalanina... 6   | 6  |
| Figura 3. Ácidos cinámicos encontrados más frecuentemente en la naturaleza.....   | 7  |
| Figura 4. Estructura de la pared celular del maíz.....  | 8  |
| Figura 5. Estructura química del ácido clorogénico. ....  | 9  |
| Figura 6. Diagrama genérico de energía potencial mostrando el efecto de un catalizador en una hipotética reacción química exotérmica X + Y para producir Z..... | 12 |
| Figura 7. Reacción clásica de esterificación.....   | 16 |
| Figura 8. Protonación del grupo carboxilo.....  | 17 |
| Figura 9. Ataque nucleofílico del metanol al carbono del grupo carboxilo.....   | 17 |
| Figura 10. Eliminación de agua.....   | 17 |
| Figura 11. Sustitución nucleofílica, utilizando como nucleófilo el ion carboxilato .....  | 17 |
| Figura 12. Síntesis química de derivados de AC's de bajo peso molecular. ....   | 18 |
| Figura 13. Desarrollo de cromatografía en capa fina.....  | 27 |
| Figura 14. Cromatografía por columna.....   | 27 |

# Índice de tablas

---

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.....   | 5  |
| Tabla 2. Clasificación de enzimas de acuerdo a la Comisión Internacional de Enzimas (Enzyme Comision, E.C.) ..... | 14 |
| Tabla 3. Responsables y distribución de las actividades designadas a CIATEJ, A.C. ....                            | 23 |

# 1 INTRODUCCIÓN

La problemática que representan los efluentes industriales vertidos a los cursos naturales de agua o al drenaje municipal, generalmente sin tratamiento alguno, se ha convertido en un tema de preocupación ambiental entre los sectores industriales, gubernamentales y la sociedad en general. En el caso de la industria del nixtamal se eliminan entre 16 a 22 millones de m<sup>3</sup>/año de aguas de desecho conocidas como nejayote, 40% de los cuales corresponden a las grandes empresas productoras. El nejayote es considerado un desecho altamente contaminante debido a su carga inorgánica y orgánica elevada que genera demandas bioquímicas de oxígeno del orden de 7000 a 10000 mg O<sub>2</sub>/L, mientras que la normativa ambiental (NOM-002-ECOL 1996) señala un límite máximo de descarga de 200 mg O<sub>2</sub>/L. El material contenido en el nejayote está compuesto principalmente por residuos y pericarpio del maíz, sólidos en solución entre los que se incluyen arabinosilanos, almidones, dextrinas, calcio y compuestos fenólicos como el ácido cumárico y el ácido ferúlico, por citar algunos. Sin embargo, debido a la elevada complejidad de estos efluentes, la problemática ambiental que generan ha sido muy difícil de resolver. Hasta la fecha se han probado sin éxito diversos sistemas de tratamiento de aguas residuales por lo que resulta urgente generar alternativas que permitan enfrentar esta problemática que pone en serio riesgo la actividad de las empresas del rubro. Dados los inconvenientes que ocasionan estos efluentes, la mayor parte de los esfuerzos se ha centrado en generar tecnologías alternas a la nixtamalización tradicional en las que se reduce drásticamente la producción de efluentes y consumo de agua (solicitudes de patente MX PA05011797, WO 2009143416, WO 2004023892, EP 0883999, MX PA05011797). Pese a estos esfuerzos, el producto resultante de estos procesos no es aceptado por el consumidor final y las empresas dedicadas al rubro mantienen el proceso tradicional y consecuentemente continúan generando nejayote. La solución al problema parece estar en la recuperación de productos de interés biotecnológico contenidos en el nejayote que por sí mismos tienen un alto valor, como es el caso de los ácidos fenólicos. Nuestro grupo de trabajo, que involucra a investigadores de empresas y centros de investigación, viene promoviendo el tratamiento integral del nejayote a través de procesos que recuperan y aprovechan los compuestos que

contiene. La empresa BOKAB licenció los derechos de la patente MEX 259521 para la obtención de compuestos fenólicos de alto valor a partir del nejayote a la empresa MINKAB, que recibe el nejayote de la empresa MINSA, productora de harina nixtamalizada, coadyuvando de esta manera en el escalamiento industrial de una tecnología innovadora que permite la remoción de los compuestos fenólicos antimicrobianos del nejayote, siendo el principal compuesto el ácido ferúlico. Aunque este último es en la actualidad un producto de alto valor en el mercado, un análisis "FODA" de la tecnología, mostró la necesidad de establecer una estrategia que permita diversificar la cartera de productos a mediano plazo. Para lograr este objetivo, se decidió conformar una AERI (N° 127257) entre empresas y centros de investigación (CIAD-CIATEJ) que reúnan la experiencia tecnológica y el conocimiento fundamental requerido. Gracias al trabajo que hemos estado realizando en esta alianza estratégica, hemos detectado que el ácido ferúlico puede ser transformado mediante tecnologías emergentes (catálisis o biocatálisis heterogénea), en productos de mayor valor agregado, como los ésteres del ácido ferúlico.

En el presente informe se dan a conocer los resultados más importantes, conclusiones y perspectivas de la sección dentro del proyecto global, realizada en el CIATEJ A.C. donde el objetivo general y específicos se detallan en la sección siguiente. Dentro del marco de estos objetivos mi contribución se describe a detalle en la sección 3.3 del presente documento.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN.

El paso clave para la transformación de maíz en harina de maíz es la cocción de los granos en una solución de alcalina calentada a temperaturas cercanas a la ebullición, tal proceso es conocido como nixtamalización.

Este proceso consta de tres etapas principales, primero el maíz es cocido en una solución saturante de  $\text{Ca(OH)}_2$  a temperaturas entre los 95 a 100°C, posteriormente los granos cocidos son dejados en reposo por periodos muy variados de tiempo que pueden ir desde una hora hasta 15, para finalmente ser lavados y de esta forma remover el exceso de calcio y materia orgánica y así obtener el nixtamal.

Sin embargo, este proceso utiliza grandes cantidades de agua que usualmente es descartada como un efluente de alta alcalinidad, conocido como nejayote. De acuerdo con Salmeron-Alcocer *y col.* (2003) una planta con capacidad cercana a 600 toneladas de maíz al día, comúnmente genera entre 1,500 a 2,000 m<sup>3</sup> de nejayote [1]. Basado en estas cantidades el nejayote generado en México es de aproximadamente 16 a 22 millones de m<sup>3</sup> anuales. Estos efluentes causan serios problemas de contaminación debido al alto pH y la demanda bioquímica de oxígeno proporcionada por los sólidos solubles e insolubles. Estudios previos han establecido que el maíz pierde del 5.5% al 12.5% de sólidos durante esta de cocción en la operaciones comerciales para la obtención de tortillas [2-4]. Estas pérdidas varían de acuerdo con el genotipo del maíz y las condiciones de operación tales como la concentración del hidróxido de calcio, duración de la cocción y el lavado del nixtamal [5-8].

#### 2.1.1 COMPOSICIÓN DEL NEJAYOTE

La mayor cantidad de sólidos asociados al nejayote son insolubles cuando provienen del pericarpio y solubles cuando provienen del endospermo y el germen [2].

Recientemente, se ha analizado la composición de compuestos fenólicos en ambas fracciones de diferentes nejayotes [5] y se concluyó que los sólidos contenidos están de 53 a 125 veces más libres en la masa cocida que en los granos crudos. A su vez en la fracción con tratamiento fue encontrada de 40 a 90 veces más actividad antioxidante. El potencial antioxidante del maíz está principalmente ejercido por compuestos como ácido ferúlico, antocianinas flavonoides y otros compuestos fenólicos los cuales tienen el potencial de prevenir el estrés oxidativo, cáncer y enfermedades cardiovasculares [9-12]. Es en este último en el cual se centrará la atención para las secciones siguientes debido a su potencial biológico.

## 2.2 COMPUESTO FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático. El fenol (*Figura 1*) es la estructura sobre la cual el grupo entero está basado. El anillo aromático en este caso, es por supuesto, el benceno [13].

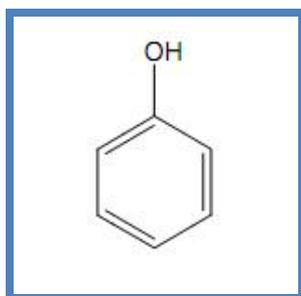


Figura 1. Estructura química del fenol

Los fenoles son, de muchas maneras, similares a las estructuras de los alcoholes alifáticos donde el grupo hidroxilo está unido a una cadena de carbonos. El grupo hidroxilo fenólico, sin embargo, es influenciado por la presencia del anillo aromático. Debido a este, el hidrógeno de hidroxilo fenólico es lábil, lo cual hace a los fenoles ácidos débiles [13].

Por otra parte los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno. El término es de alguna forma

confundido desde que se tiende a hacer pensar a las personas que son polímeros de moléculas individuales de fenol.

Los compuestos fenólicos son característicos de plantas y como grupo son usualmente encontrados como ésteres o glucósidos en vez de ser encontrados como compuestos libres. Es importante tener en cuenta esto si lo que se desea es extraer compuestos fenólicos a partir de plantas [13].

### 2.2.1 CLASIFICACIÓN

El término "fenólico" cubre un grupo muy grande y diverso de compuestos químicos. Estos compuestos pueden ser clasificados en un gran número de formas. Harborne y Simmonds (1964) clasificaron a estos compuestos (Tabla 1) en grupos basados en el número de carbonos en la molécula [14].

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

| <b>Estructura</b>   | <b>Clase</b>   |
|---|--|
| <b>C<sub>6</sub></b>  | Fenólicos simples  |
| <b>C<sub>6</sub>- C<sub>1</sub></b>   | Ácidos Fenólicos y compuestos relacionados               |
| <b>C<sub>6</sub>- C<sub>2</sub></b>   | Acetofenonas y ácidos fenilacéticos                      |
| <b>C<sub>6</sub>- C<sub>3</sub></b>   | Ácidos cinámicos, cinamoil aldehídos, cinamoil alcoholes |
| <b>C<sub>6</sub>- C<sub>3</sub></b>   | Cumarinas, isocumarinas y cromonas                       |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Chalcones, aurones, dihidrochalcones                     |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Flavanos   |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Flavones   |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Flavononas   |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Flavonoles   |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Antocianidinas   |
| <b>C<sub>15</sub></b>   | Antocianinas   |
| <b>C<sub>30</sub></b>   | Biflavoniles   |
| <b>C<sub>6</sub>- C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>- C<sub>2</sub>- C<sub>6</sub></b> | Benzofenonas, xantonas, Estilbenos                       |
| <b>C<sub>6</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub></b>  | Quinonas   |
| <b>C<sub>18</sub></b>   | Betacianinas   |
| <b>Lignanós, neolignanós</b>  | dímeros u oligómeros                                     |
| <b>Lignina</b>  | polímeros  |
| <b>Taninos</b>  | oligómeros o polímeros                                   |

También se ha usado una clasificación alternativa establecida por Swain y Bate-Smith (1962), esta agrupa a los fenoles en 2 categorías, "comunes" y "menos comunes" [15]. Ribéreau-Gayon (1972) agrupó a los fenoles en 3 familias [16] como sigue:

1. Fenoles ampliamente distribuidos: Ubiquitina de todas las plantas, o de importancia específica en las plantas.
2. Fenoles que están menos distribuidos: Número limitado de compuestos conocidos.
3. Constituyentes fenólicos presentes como polímeros.

### 2.2.2 ÁCIDOS CINÁMICOS

Los ácidos cinámicos (AC's) son un grupo de compuestos que entran en la clasificación de los ácidos fenólicos. Un intermediario en la síntesis de los AC's es el ácido cinámico, que se deriva del ácido shikímico, el cual es precursor de muchos alcaloides y compuestos amino-aromáticos así como de derivados del indol [17]. Así, el ácido shikímico es transformado a fenilalanina a través de la ruta del ácido shikímico para después ser convertido por una liasa en ácido *trans*-cinámico, donde posteriores hidroxilaciones y metoxilaciones en el anillo bencénico dan lugar a los diversos elementos de la familia de los ácidos cinámicos (*figura 2*) [13].

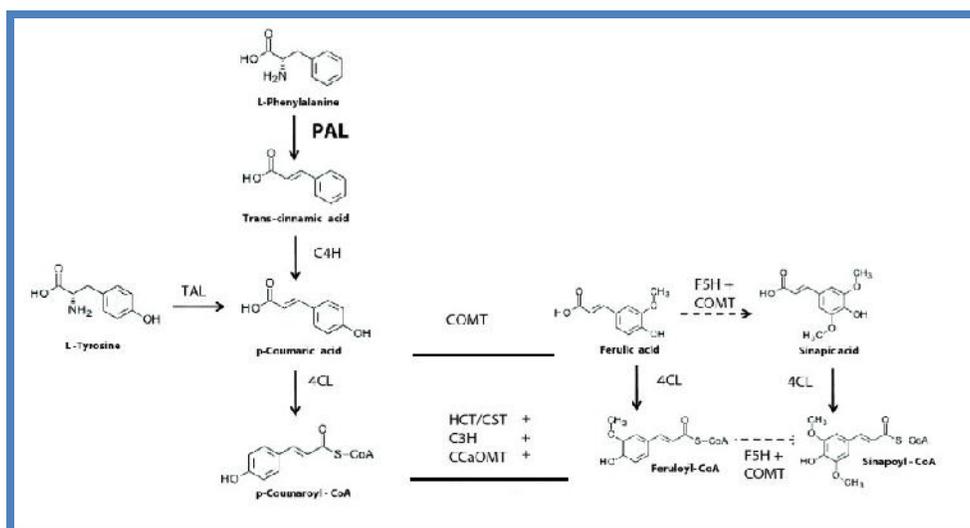


Figura 2. Ruta biológica para la síntesis de ácidos cinámicos a partir de fenilalanina.

Existen 6 ácidos cinámicos comunes, los cuales tienen un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Todas las plantas contienen al menos tres de ellos. En la figura 3 se muestran los principales.

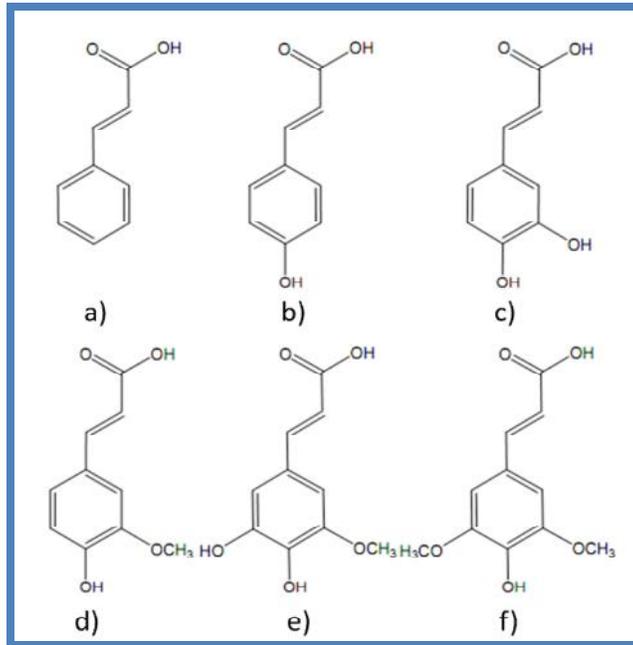


Figura 3. Ácidos cinámicos encontrados más frecuentemente en la naturaleza. a) Ácido cinámico, b) Ácido *p*-cumárico, c) Ácido caféico, d) Ácido ferúlico, e) Ácido 5-hidroxiferúlico y f) Ácido sinapínico [13].

Los AC's están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se ha reportado cantidades considerables en frutas y algunos granos como el maíz y el café. Un ejemplo es el ácido ferúlico que constituye más del 90% de los compuestos fenólicos en la alcachofa, berenjena y salvado de maíz [17, 18]. Sin embargo, la mayoría de las veces esta gama de compuestos se encuentra en forma esterificada y de acuerdo a la naturaleza del compuesto al que está unido, los AC's pueden presentar mayor o menor estabilidad a la oxidación. Así cuando son esterificados con los polisacáridos de la pared celular su estabilidad es mayor [19].

Un ejemplo clásico es el ácido ferúlico cristalino en su forma *trans* [20], que está esterificado de forma monomérica y dimérica a unidades de arabinosa presentes en la pared celular (5-O-feruloil-L-arabinofuranosa FAA y 5-O-feruloil-arabinoxilano FAX<sub>n</sub>, son las formas más comunes de ácido ferúlico en los cereales [20-22]. Estos enlaces

con compuestos lignocelulósicos sirven de conexión entre la lignina y la hemicelulosa [23] y ayudan a fortalecer la estructura de la pared (Figura 4) celular [24].

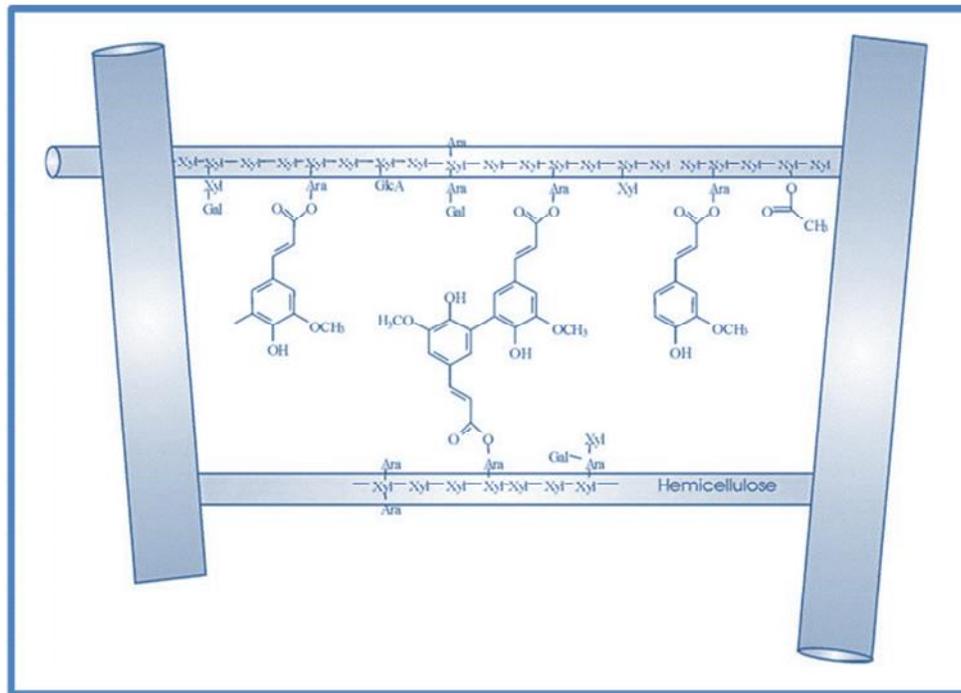


Figura 4. Estructura de la pared celular del maíz. Xyl: Xilosa, Ara: Arabinosa.

Cabe resaltar que cuando estos compuestos cumplen con funciones estructurales como la mencionada anteriormente, presentan una baja biodisponibilidad por organismos superiores [21]. Esto se ha comprobado a través de estudios donde alimentos con alto contenido de AH's (unidos a la pared celular) han sido sometidos a imitaciones del sistema gástrico a bajos pH's, y después de cierto tiempo los AHs se mantienen intactos [25]. Sin embargo, cuando es suministrado en ratas en su forma libre (soluble) y ligada (insoluble), solo la forma libre (soluble) desaparece [25], indicando de este modo que la biodisponibilidad incrementa de manera considerable cuando los AHs se encuentran en su forma libre (soluble). De hecho, cuando los AH's se unen a compuestos de carácter más hidrofílico como el ácido quínico, shikímico y tartárico, que se encuentran naturalmente libres en el citoplasma de la célula vegetal, la biodisponibilidad es comparable a la observada en su forma libre [26]. Un ejemplo de ello es el ácido clorogénico (ester del ácido caféico y quínico; figura 5) presente en la cereza del cafeto, manzana, mate, jamaica, entre otros.

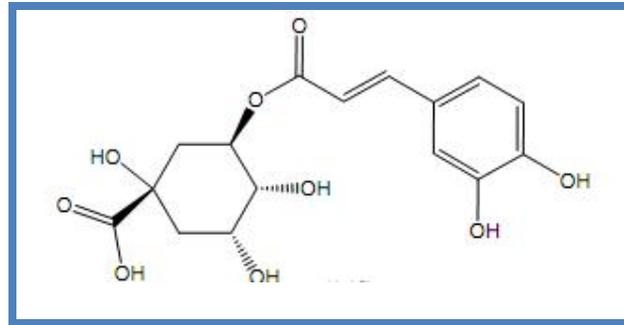


Figura 5. Estructura química del ácido clorogénico.

Los ésteres de los ácidos cinámicos también son encontrados como de una gran variedad de ácidos orgánicos. Por ejemplo los sinapoil esterres representan una clase de compuestos absorbentes al UV in la familia de *Brassicaceae*. Ejemplos incluyen al sinapoil malato presente en hojas y la sinapoil colina presente en las raíces [27].

### 2.2.3 USOS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Debido a lo anterior, diversos estudios se han enfocado a evaluar los efectos biológicos de los ácidos fenólicos libres así como de ciertos bioconjugados de estos últimos, reportando principalmente actividades anti fúngica, fotoprotectora [28], antiinflamatoria [29], anti adipogénica [30], y para la prevención de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo ocasionado por radicales libres, como desordenes neurodegenerativos, cáncer, inflamaciones crónicas, agudas e incluso el envejecimiento [18, 22].

En un trabajo previo Kikuzaki *et al* (2002) encontraron que la habilidad para atrapar radicales libres de los ácidos hidroxicinámicos, va de la mano con la cantidad de hidroxilos en el anillo bencénico [31], también se ha observado que algunos bioconjugados de AH's pueden mejorar su actividad antioxidante en comparación con el ácido libre, por ejemplo, el estearil ferulato del salvado de trigo es más efectivo para captar radicales DPPH [32], el 2 etil-1-hexil ferulato y el 3,5,5-trimetil-1hexil ferulato es más efectivo para la inhibición de la generación de superóxido *in vivo* [33]. Del mismo modo, se ha encontrado que estos compuestos hidroxilados y algunos flavonoides pueden inhibir la adipogénesis, siendo más efectivos los isómeros del ácido cumárico que pueden inhibir hasta en un 60% la formación de adipositos 3T3-L1.

## 2.2.4 SÍNTESIS DE DERIVADOS

Por lo anterior, en la actualidad las investigaciones se han enfocado a modificar dichas moléculas generando una gama de nuevos bioconjugados bajo la expectativa de mejorar estas actividades o elucidar nuevas. Por ejemplo se ha demostrado que la actividad antioxidante se puede incrementar cuando el ácido se esterifica con alcoholes alifáticos, aromáticos y ciertos flavonoides.

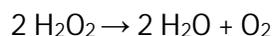
## 2.3 CATÁLISIS

La catálisis interviene en muchos procesos industriales. Así mismo, la mayoría de los procesos “biológicamente” significativos son catalizados. Las reacciones catalíticas son las preferidas en la química verde para un medioambiente amigable debido a la reducida cantidad de residuos que genera en lugar de las reacciones estequiométricas en las que se consumen todos los reactivos y se forman más productos secundarios. El catalizador más común es el protón (H<sup>+</sup>).

Muchos metales de transición y los complejos de los metales de transición se utilizan en la catálisis.

El catalizador funciona proporcionando un camino de reacción alternativo al producto de reacción. La velocidad de la reacción aumenta a medida que esta ruta alternativa tiene una menor energía de activación que la ruta de reacción no mediada por el catalizador.

La dismutación del peróxido de hidrógeno para dar agua y oxígeno es una reacción que está fuertemente afectada por los catalizadores:



Esta reacción está favorecida, en el sentido de que los productos de reacción son más estables que el material de partida, sin embargo, la reacción no catalizada es lenta. La descomposición del peróxido de hidrógeno es de hecho tan lenta que las soluciones de peróxido de hidrógeno están disponibles comercialmente.

Tras la adición de una pequeña cantidad de dióxido de manganeso, el peróxido de hidrógeno reacciona rápidamente de acuerdo a la ecuación anterior. Este efecto se ve fácilmente por la efervescencia del oxígeno. El dióxido de manganeso puede ser recuperado sin cambios, y volver a utilizarse de forma indefinida, y por lo tanto no se consume en la reacción. En consecuencia, el dióxido de manganeso *cataliza esta reacción*.

### **2.3.1 CARACTERÍSTICAS**

La característica general de la catálisis es que la reacción catalítica tiene un menor cambio de energía libre de la etapa limitante hasta el estado de transición que la reacción no catalizada correspondiente, resultando en una mayor velocidad de reacción a la misma temperatura.

Cinéticamente, las reacciones catalíticas se comportan como las reacciones químicas típicas, es decir, la velocidad de reacción depende de la frecuencia de contacto de los reactivos en la etapa determinante de velocidad. Normalmente, el catalizador participa en esta etapa lenta, y las velocidades están limitadas por la cantidad de catalizador. En catálisis heterogénea, la difusión de los reactivos a la superficie de contacto y la difusión de los productos desde dicha superficie puede ser la etapa determinante de la velocidad. Eventos similares relacionados con la unión del sustrato y la disociación del producto se aplican en la catálisis homogénea.

Aunque los catalizadores no son consumidos por la propia reacción, pueden resultar inhibidos, desactivados o destruidos por procesos secundarios. En la catálisis heterogénea, procesos secundarios típicos incluyen el coque, donde el catalizador se cubre por productos secundarios poliméricos. Además, los catalizadores heterogéneos pueden disolverse en la solución en un sistema sólido-líquido o evaporarse en un sistema sólido-gas.

### **2.3.2 CATÁLISIS Y ENERGÍA DE REACCIÓN**

Los catalizadores funcionan proporcionando un mecanismo (alternativo) que involucra un estado de transición diferente y una menor energía de activación. Por lo tanto, más colisiones moleculares tienen la energía necesaria para alcanzar el estado

de transición. En consecuencia, los catalizadores permiten reacciones que de otro modo estarían bloqueadas o ralentizadas por una barrera cinética. El catalizador puede aumentar la velocidad de reacción o de la selectividad, o permitir que la reacción ocurra a menores temperaturas. Este efecto puede ser ilustrado con una distribución de Boltzmann y un diagrama de perfil de energía (figura 6).

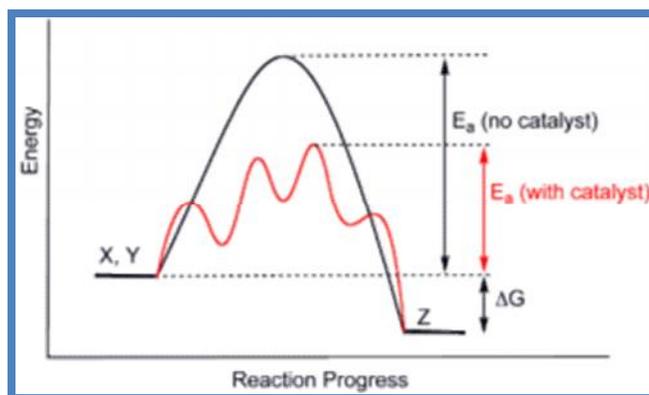


Figura 6. Diagrama genérico de energía potencial mostrando el efecto de un catalizador en una hipotética reacción química exotérmica  $X + Y$  para producir  $Z$ . La presencia del catalizador abre un camino de reacción diferente (mostrado en rojo) con una energía de activación menor. El resultado final y la termodinámica global son la misma.

### 2.3.3 CATALIZADORES HETEROGÉNEOS

Los catalizadores heterogéneos son aquellos que actúan en una fase diferente que los reactivos. La mayoría de los catalizadores heterogéneos son sólidos que actúan sobre sustratos en una mezcla de reacción líquida o gaseosa. Se conocen diversos mecanismos para las reacciones en superficies, dependiendo de cómo se lleva a cabo la adsorción (Langmuir-Hinshelwood, Eley -Rideal, y Mars-van Krevelen). El área superficial total del sólido tiene un efecto importante en la velocidad de reacción. Cuanto menor sea el tamaño de partícula del catalizador, mayor es el área superficial para una masa dada de partículas.

Los catalizadores heterogéneos suelen estar "soportados", que significa que el catalizador se encuentra disperso en un segundo material que mejora la eficacia o minimiza su costo, un ejemplo claro de ello son las enzimas inmovilizadas de las cuales se abundará más adelante.

A veces el soporte es más que una superficie sobre la que se transmite el catalizador para aumentar el área superficial. Más a menudo, el soporte y el catalizador interactúan, afectando a la reacción catalítica.

### **2.3.3.1 CATALIZADORES QUÍMICOS**

Los ácidos próticos son probablemente los catalizadores más ampliamente usados, especialmente para muchas reacciones que involucran agua, incluyendo la hidrólisis y su inversa. Los sólidos multifuncionales a menudo suelen ser catalíticamente activos, por ejemplo las zeolitas, la alúmina y ciertas formas de carbono grafitico. Los metales de transición son utilizados a menudo para catalizar reacciones redox (oxigenación, hidrogenación). Muchos procesos catalíticos, especialmente los que involucran hidrógeno, requieren metales del grupo del platino.

Las especies químicas que mejoran la actividad catalítica son denominadas **co-catalizadores** o **promotores**, en la **catálisis cooperativa**.

### **2.3.3.2 CATALIZADORES BIOLÓGICOS (ENZIMAS).**

Las enzimas son proteínas especializadas que se distinguen por tener una actividad catalítica. Usualmente las células de todos los organismos vivos las sintetizan, ya que están involucradas en la catálisis de diversas reacciones del metabolismo, por lo que se les llama de forma genérica "biocatalizadores". Con los experimentos de Payne y Persoz, descubridores de la primer enzima, se demostró que también son capaces de llevar a cabo reacciones *in vitro* y, posteriormente, se comprobó que pueden catalizar tanto sustratos naturales como no naturales [34, 35]

Tras el descubrimiento de las enzimas, surgió la necesidad de desarrollar un método sistemático de clasificación y nomenclatura. Así la Comisión Internacional de Enzimas (Enzyme Comision, E.C.) desde 1956 se ha encargado de esta tarea, tomando como criterio la reacción que cataliza cada enzima y coenzima [36]. De acuerdo a ésta, existen seis clases principales (Tabla 2), divididas de tal forma que cada enzima pueda reconocerse con un código único de cuatro dígitos conocido como número E.C, en donde se indica la clase, subclase, sub-subclase y finalmente un número de serie.

Tabla 2. Clasificación de enzimas de acuerdo a la Comisión Internacional de Enzimas (Enzyme Comision, E.C.)

| <b>Clase (Tipo de reacción)</b>  | <b>Subclase (Enlace sobre el que actúan)</b> |
|--|--|
| <b>1. Oxido reductasas</b><br><i>(Reacciones de oxido-reducción)</i>   | 1.1 Alcoholes $>-\text{OH}$                  |
|  | 1.2 Cetonas $>\text{C}=\text{O}$             |
|  | 1.3 Alquenos $>=\text{CH}-$                  |
|  | 1.4 Grupos amino $-\text{NH}_2$              |
|  | 1.5 Grupos iminos $=\text{NH}$               |
| <b>2. Transferasas</b><br><i>(Transferencia de grupos funcionales)</i> | 2.1 Grupos de un átomo de C                  |
|  | 2.2 Grupos aldehídicos o cetónicos           |
|  | 2.4 Grupos glucosilo                         |
|  | 2.7 Grupos fosfato                           |
| <b>3. Hidrolasas</b><br><i>(Reacciones de hidrólisis)</i>              | 2.8 Grupos que contienen azufre              |
|  | 3.1 Ésteres                                  |
|  | 3.2 Enlaces glucosídicos                     |
|  | 3.4 Enlaces peptídicos                       |
|  | 3.5 Otros enlaces C-N                        |
|  | 3.6 Anhídridos de ácido                      |
| <b>4. Liasas</b><br><i>(Adición a dobles enlaces)</i>                  | 4.1 $>\text{C}=\text{C}<$                    |
|  | 4.2 $>\text{C}=\text{O}$                     |
|  | 4.3 $>\text{C}=\text{N}-$                    |
| <b>5. Isomerasas</b><br><i>(Reacciones de isomerización)</i>           | 5.1 Racemasas                                |
| <b>6. Ligasas</b><br><i>(Formación de enlaces con escisión de ATP)</i> | 6.1 Entre átomos de C y O                    |
|  | 6.2 Entre átomos de C y S                    |
|  | 6.3 Entre átomos de C y N                    |
|  | 6.4 Entre átomos de C y C                    |

### **2.3.3.3 HIDROLASAS, ESTERASAS/LIPASAS.**

Las esterasas (E.C. 3.1.1.1) y lipasas (E.C. 3.1.1.3) son carboxiléster hidrolasas que actúan sobre el enlace éster, ambas son elementales por su versatilidad para trabajar con sustratos naturales o sintéticos [37].

#### **2.3.3.3.1 FUENTES DE ESTERASAS Y LIPASAS.**

Las esterasas y lipasas están presentes de forma intra y extracelular en microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), animales y plantas donde el rol biológico general de las lipasas es probablemente de digestión mientras que el de muchas esterasas aún se desconoce. Generalmente se obtienen carboxilesterasas por extracción de cultivos microbianos o celulares (tejidos animales y vegetales), a nivel industrial provienen principalmente de cultivos microbianos. Por otra parte el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha abierto la posibilidad de generar cepas recombinantes sobreproductoras, incrementando la producción y variedad. Por ejemplo, la formulación de muchos detergentes contienen a la lipasa del hongo *Humicola lanuginosus* cuya producción no cubre la demanda, por lo tanto el gene se expresó en *Aspergillus orizae*, así se logra producir más de 100 ton/año de la lipasa clonada [37].

#### **2.3.3.4 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.**

A pesar de las claras ventajas del empleo de enzimas, son pocos los casos de aplicación a escala industrial; ya que en medios convencionales, la enzima es soluble, dificultando la remoción de la mezcla de reacción y en medios orgánicos se incrementan los problemas difusionales. La tecnología de inmovilización permite adaptar a los biocatalizadores a procesos industriales, ya que al volverse insolubles se recupera y utiliza de nuevo en el proceso.

Las técnicas frecuentemente empleadas de inmovilización son la adsorción en polímeros base, inclusión en membranas, unión covalente a soportes químicos, reticulado, encapsulación, entre otros; siendo el primer método el de mayor demanda [38, 39]. Generalmente, el soporte altera indirectamente el comportamiento de la proteína, provocando una estabilización conformacional por la presencia de múltiples uniones de la enzima al soporte, que vuelve más rígida la estructura terciaria,

incrementando la resistencia a la desactivación térmica o química, que al igual sirve de protección frente a las proteasas del medio. Por otra parte cuando se trabaja en un sistema acuoso la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo, donde los componentes del proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase, provocando una alteración en la actividad enzimática por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno, siendo así uno de los inconvenientes del proceso de inmovilización, puesto que pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte. Además, siempre existe una pérdida de actividad durante el proceso, lo que conlleva a que la enzima inmovilizada siempre sea más costosa que la forma nativa, haciendo el proceso poco atractivo a escala industrial [40]. Sin embargo, si se logrará establecer un proceso de producción robusto, reproducible y económico de biocatalizadores inmovilizados, existe la posibilidad de diseñar reactores de fácil manejo y control a escala industrial, que permitan el empleo de cargas elevadas de enzima, para el desarrollo de procesos continuos.

### 2.3.4 REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN

Los ésteres se obtienen por reacción de ácidos carboxílicos y alcoholes en presencia de un ácido, o en algunos casos en la presencia de una enzima (hidrolasa). La reacción generalmente se realiza con el sustrato alcohólico en exceso en un medio libre de agua para desplazar los equilibrios a la derecha. La presencia de agua es perjudicial ya puede hidrolizar el éster sintetizado.

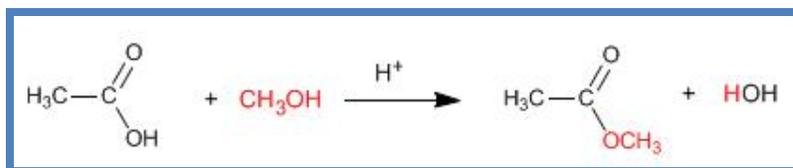


Figura 7. Reacción clásica de esterificación. En la figura los reactantes son ácido acético y metanol y el producto formado es metil acetato mas agua.

La reacción que prepara ésteres a partir de ácidos carboxílicos recibe el nombre de esterificación y tiene el siguiente mecanismo de 3 etapas:

### Etapa 1.

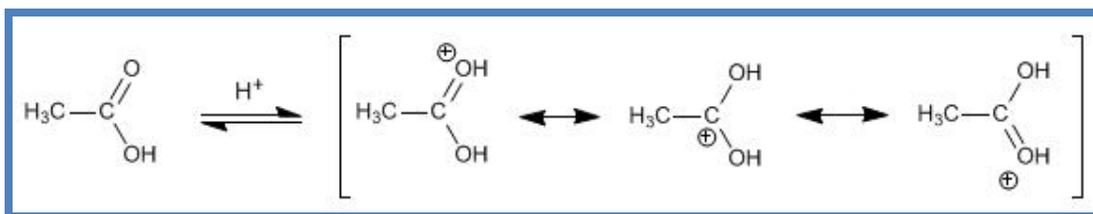


Figura 8. Protonación del grupo carboxilo.

### Etapa 2.

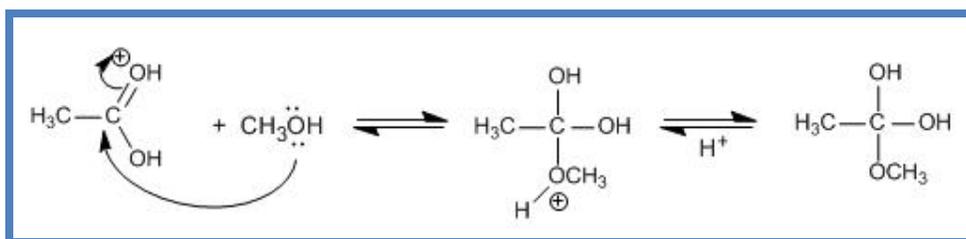


Figura 9. Ataque nucleofílico del metanol al carbono del grupo carboxilo (Adición).

### Etapa 3.

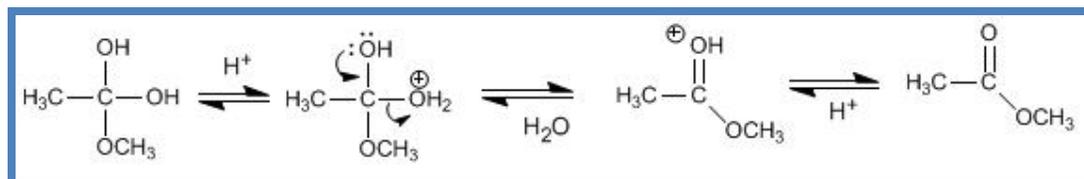


Figura 10. Eliminación de agua.

Otro método de síntesis consiste en una sustitución nucleófila, utilizando como nucleófilo el ion carboxilato. Esta reacción funciona bien con sustratos primarios y secundarios.

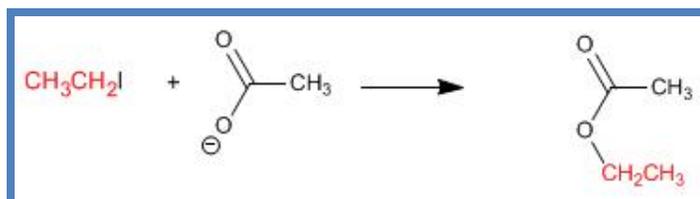


Figura 11. Sustitución nucleofílica, utilizando como nucleófilo el ion carboxilato.

## 2.4 SÍNTESIS DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CINÁMICOS

### 2.4.1 SÍNTESIS QUÍMICA

La síntesis de este tipo de moléculas se lleva generalmente por catálisis química, con buenos resultados al utilizar alcoholes con un solo hidroxilo y de bajo peso molecular (figura 12).

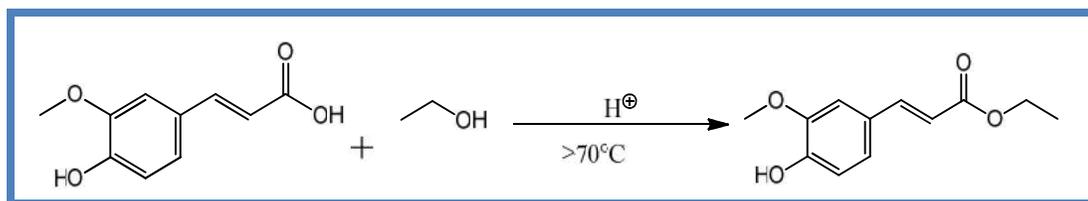


Figura 12. Síntesis química de derivados de AC's de bajo peso molecular. A) Ácido ferúlico; B) Etanol; C) Etil ferulato.

Sin embargo, al incrementar la longitud de la cadena alquilo o utilizar alcoholes más complejos como flavonoides, la reacción debe llevarse en condiciones más severas lo que vuelve más compleja la síntesis y puede dar lugar a una gran cantidad de subproductos o degradación de las moléculas de interés, dificultando la purificación y reduciendo enormemente los rendimientos.

### 2.4.2 SÍNTESIS ENZIMÁTICA

Por los motivos expuestos anteriormente varios grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar métodos enzimáticos para síntesis de este tipo de ésteres.

#### 2.4.2.1 ENZIMAS EN LA SÍNTESIS DE ÉSTERES DE ÁCIDOS CINÁMICOS

Debido a los inconvenientes que trae consigo la síntesis química, como ya se ha mencionado anteriormente, los grupos de investigación han buscado la síntesis enzimática de este tipo de ésteres entre los que destacan el de Guyot (1997), Stamatidis (1999) y Topakas (2003) que han empleado lipasas [41-43]. Debido a las características intrínsecas de este tipo de enzimas se requieren condiciones suaves de reacción, el proceso puede ser incluso más eficiente y en algunos casos regioselectivo; además de ser una tecnología considerada como amigable con el medio ambiente e

innovadora. Sin embargo estas investigaciones no han sido del todo exitosas debido a los bajos rendimientos y largos tiempos de reacción. Por tal motivo surge la necesidad de encontrar biocatalizadores con una mayor capacidad de aceptar los ácidos fenólicos como sustratos y que permitan por ende, realizar esta clase de reacciones con mayor eficiencia.

Trabajos anteriores han reportado que algunas lipasas (E.C. 3.1.1.3) y cinamoil esterasas de origen fúngico como las feruloil esterasas (E.C. 3.1.1.73) y las clorogenato esterasas (E.C. 3.1.1.43) representan una alternativa interesante que pudiera solventar este problema [44, 45], sin embargo los estudios realizados hasta el momento son aislados.

#### **2.4.2.2 LIPASAS**

Las lipasas son catalizadores ampliamente empleados en reacciones de esterificación y transesterificación en solventes con poca actividad acuosa; por ejemplo, la lipasa B de *Candida antarctica* puede realizar la transesterificación de metil y etil ferulato con alcoholes de distinta longitud de cadena en solventes no polares como hexano e isooctano [41], otro ejemplo es la síntesis de ésteres del glicerol [46]. Asimismo existen otros trabajos en donde lipasas son utilizadas para realizar este tipo de reacciones, pero a medida que los sustratos utilizados se vuelven más complejos los rendimientos en las reacciones se reducen o no se llevan a cabo.

#### **2.4.2.3 FERULOIL ESTERASAS**

Por otra parte, solo un número limitado de estudios han examinado la síntesis enzimática de ésteres de hidroxicinámicos con feruloil esterasas (FEAs), tal es el caso de reacciones de transesterificación con *Fusarium oxysporum* FoFAE-I [43], *Sporotrichum thermophile* StFAE-A [44] y *Humicola insolens* FAE [47].

Actualmente existen estudios que analizan la esterificación de ácido ferúlico usando FAEs (*Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*, [43, 45]). La meta de la mayoría de estos estudios ha sido incrementar la hidrofobicidad de los compuestos ferulados. Sin embargo, también existe la necesidad de incrementar la solubilidad de estos compuestos en agua, para aplicaciones en bebidas, alimentos y cosméticos.

Tsuchiyama et al. (2007), encontraron que la feruloil esterasa tipo A de *Aspergillus niger* puede sintetizar a través de esterificación directa ésteres del glicerol, tal como el 1-sinapoil glicerol y el 1-*p*-cumaroil glicerol [46], permitiendo de esta forma aumentar la solubilidad en agua.

Por todo lo anterior, surge la imperante necesidad de ampliar la variedad de enzimas que puedan realizar esta gama de compuestos, o incluso nuevos, y de esta forma generar nuevos biocatalizadores para la obtención de derivados de ácidos hidroxicinámicos de interés biológico.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Generar un proceso de catálisis heterogénea técnicamente factible que permita llevar a cabo la síntesis de al menos un éster del ácido ferúlico y que tenga posibilidad de escalarse a nivel piloto para evaluar su factibilidad económica.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) **Buscar microorganismos productores de Esterasas y Lipasas en las colecciones disponibles en CIATEJ A.C.**

#### ACTIVIDADES

- a. Implementar un método de búsqueda y selección de Esterasas y Lipasas
- b. Implementar un método rápido de inmovilización y/o liofilización de los biocatalizadores con actividad Esterasa/Lipasa pre-seleccionados
- c. Encontrar catalizadores heterogéneos (químicos)
- d. Seleccionar las reacciones modelo como criterio de selección (batch)
- e. Seleccionar el catalizador heterogéneo más promisorio (catalizador químico y/o enzimático para cada reacción modelo) en base a su conversión y tiempo de reacción.
- f. Optimizar las condiciones de reacción con los catalizadores heterogéneos seleccionados

## **2) Sintetizar derivados del ácido ferúlico a nivel laboratorio**

### ACTIVIDADES

- a. Llevar a cabo la esterificación directa de una serie (C2-C18) de esteres del ácido ferúlico, con el mejor catalizador y condiciones de reacción
- b. Llevar a cabo la alcoholólisis de etil ferulato en dodecil ferulato (C2-C18) con el mejor catalizador y condiciones de reacción
- c. Optimizar la esterificación directa del etil ferulato empleando un reactor empacado
- d. Implementar técnicas analíticas necesarias para el seguimiento de la reacción
- e. Implementar un protocolo de purificación del producto que se acuerde sintetizar a nivel piloto

## **3) Evaluar actividad Biológica de los derivados obtenidos**

### ACTIVIDADES

- a. Determinar actividad antioxidante in vitro mediante los métodos (DPPH, ABTS), de los productos de síntesis
- b. Determinar actividad anti-inflamatoria in vitro mediante inhibición de COX-1 Y COX-2, de los productos de síntesis

### 3.3 DELIMITACIÓN DE LOS OBJETIVOS Y ACTIVIDADES A REALIZAR DENTRO DEL PROYECTO.

Para el desarrollo en tiempo y forma de los entregables planteados en el proyecto “Síntesis heterogénea de derivados del ácido ferúlico de alto valor agregado a partir del Nejayote” las actividades se distribuyeron como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Responsables y distribución de las actividades designadas a CIATEJ, A.C.

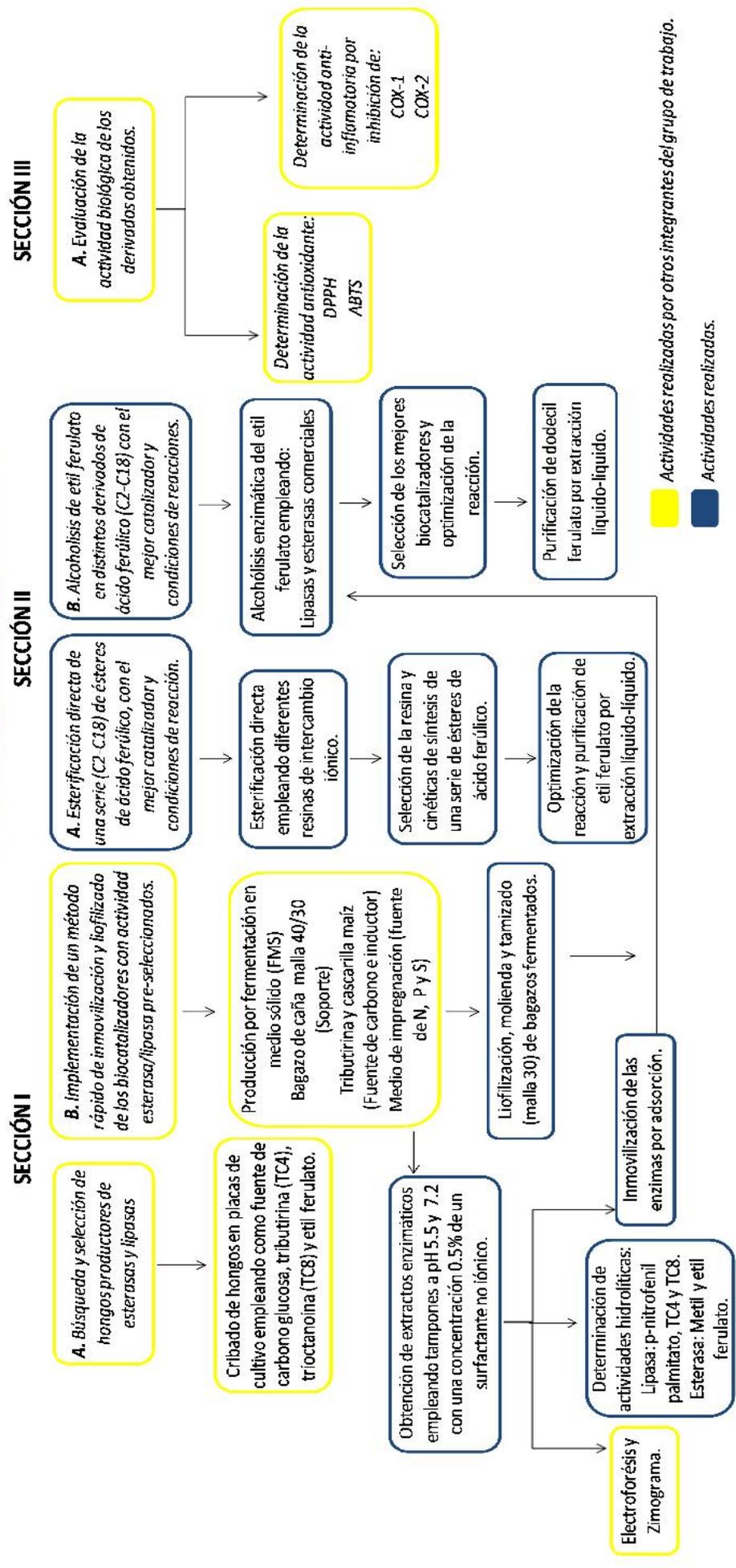
| NOMBRE                       | ACTIVIDADES  |
|------------------------------|--|
| Dr. Juan Carlos Mateos Díaz  | <p><b>Supervisión técnica como responsable del Proyecto en CIATEJ A.C.</b></p> <p>Revisión y validación de aspectos técnicos</p> <p>Planeación, desarrollo y seguimiento de actividades relacionadas el proceso de obtención y de catalizadores heterogéneos así como su aplicación en las distintas reacciones de síntesis.</p> <p>Integración de reportes de las actividades desarrolladas.</p> <p>Análisis prospectivo y del estado de arte en aspectos técnicos</p> <p>Co-Dirección de Tesis del M.C. Javier Bécame.</p> |
| Dr. Jorge Rodríguez González | <p>Búsqueda y selección de catalizadores heterogéneos: Prospección de cepas fúngicas de las colección del CIATEJ A.C. con potencial biotecnológico para la producción de enzimas de interés</p>  |
| Dra. Rosa Camacho Ruíz       | <p>Apoyo durante la Integración de reportes de las actividades desarrolladas Colaboración durante la coordinación de trabajos en redes, proyectos de I+D+i</p>   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Dr.<br>Alejandro<br>Canales | Ensayos de capacidad anti-oxidante (DPPH y ABTS) anti-inflamatoria (inhibición COX-I y COX-II)de los distintos derivados del ácido ferúlico obtenidos a nivel laboratorio |
| C. Daniel<br>Grajales       | Ensayos de síntesis de los derivados del ácido ferúlico a nivel laboratorio. Implementación de los protocolos de purificación del etil y dodecil ferulato.                |

Como integrante del equipo de trabajo de CIATEJ A.C. colaboré con el desarrollo del primer objetivo particular, específicamente del apartado **b** hasta el **f** y se me designó el desarrollo completo del segundo objetivo particular. Como se puede apreciar en la Tabla 3 corresponde al desarrollo de los ensayos de síntesis de los derivados de ácido ferúlico a nivel laboratorio. Además de la implementación de los protocolos de purificación de etil y dodecil ferulato.

# 4 DIAGRAMA METODOLÓGICO.

## Diagrama metodológico de CIATEJ, A. C.



## 4.1 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Durante el desarrollo experimental de este trabajaron con técnicas cromatográficas las cuales se emplearon como una herramienta para monitorear cualitativamente las reacciones de síntesis y para la purificación de diversas moléculas.

En especial, la cromatografía de capa fina (CCF) se empleó para el monitoreo, esta es una técnica analítica rápida y sencilla que permite la separación de los componentes de mezclas complejas. Se fundamenta en las diferentes fuerzas de atracción química (polaridad) de cada compuesto por el solvente (fase móvil) o las partículas fijas de la placa (fase estacionaria). Los compuestos que se unen con mayor fuerza a la placa se mueven con menor velocidad que los compuestos que tienen mayor afinidad por el solvente, en consecuencia estos últimos se mueven a mayor velocidad. De esta manera los componentes de la muestra se distribuyen de forma diferente, la migración se registra con el índice  $R_f$  (Retention factor), que es la relación entre la distancia de migración a partir del depósito del componente y el solvente (*figura 13*), este valor depende de las condiciones a las que se corre la muestra (temperatura, cantidad de muestra depositada, sistema de solventes, grosor y tipo de adsorbente). El  $R_f$  puede corroborar la identidad de un compuesto si se emplean estándares puros. Cabe resaltar que CCF es exclusivamente una técnica cualitativa, por lo tanto no se puede determinar la concentración de cada especie, solamente su naturaleza.

La técnica se desarrolla depositando la muestra en la base de la placa en forma de punto o línea, con el fin de concentrarla, la placa de cromatografía (fase estacionaria) se acomoda dentro de una cámara de vidrio que contiene el o la mezcla de solventes (fase móvil). El borde inferior de la placa se sumerge en la fase móvil, el flujo se crea por acción de capilaridad y se difunde (*Figura 13*). Posteriormente se evapora el excedente de solvente a temperatura ambiente y en caso de ser necesario se puede revelar con diferentes agentes químicos.

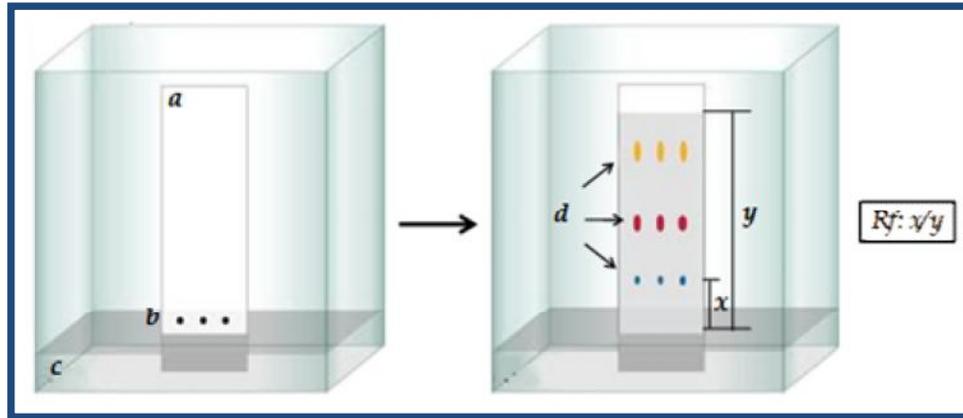


Figura 13. Desarrollo de cromatografía en capa fina. A la izquierda se muestra una cámara clásica de CCF en donde a: fase estacionaria, b: muestras depositadas, c: fase móvil. A la derecha después de la migración de la fase móvil se muestra d: componentes de la mezcla separados, x: migración de la muestra desde el punto de aplicación, y: migración del solvente.

Por otra parte, la cromatografía en columna se emplea para la purificación de estándares. Esta técnica se basa en el mismo principio que CCF, sólo que a diferencia de esta, en la cromatografía de columna las muestras se cargan en la cima de una columna empacada con la fase estacionaria, los solventes (eluyentes) fluyen a través de la columna, acarreado los componentes de la muestra a diferentes velocidades, permitiendo así la separación (Figura 14). El flujo se crea por efecto de gravedad o bien con presiones negativas, para evitar una resistencia al flujo, generalmente se emplea como fase estacionaria partículas con diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$ .

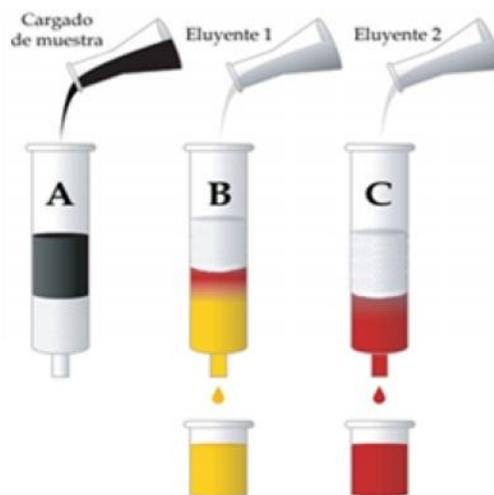


Figura 14. Cromatografía por columna. A: la muestra se carga en la superficie del empaque; B y C: diferentes solventes se hacen pasar por gravedad para la separación de los componentes de la mezcla.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este apartado se describen los resultados más sobresalientes de cada una de las secciones desarrolladas en CIATEJ A.C. como se planteó en el diagrama metodológico algunos resultados fueron obtenidos por otros integrantes del grupo de trabajo, sin embargo se describen de forma resumida porque anteceden al desarrollo logístico de la metodología y por ende a los resultados de las actividades de las cuales fui responsable.

### 5.1 SECCIÓN I. Búsqueda de microorganismos productores de Esterasas y Lipasas en las colecciones disponibles en CIATEJ A.C.

Con el propósito de identificar microorganismos productores de esterases y lipasas útiles en la modificación de compuestos fenólicos, se llevó a cabo un cribado de hongos filamentosos pertenecientes a la colección de CIATEJ A.C. en medios de cultivo químicamente definidos. Un total de 158 cepas fueron estudiadas empleando como sustratos etil ferulato (EF), tributirina (TC4) y trioctanoína (TC8) como únicas fuentes de carbono. A partir de estos cultivos se seleccionaron 8 cepas con el objetivo de cuantificar sus actividades feruloil esterasa, esterasa y lipasa. Entre las cepas seleccionadas se encontraron: 2 cepas (JOJO3 VERDE y ASIII) que mostraron halos de hidrólisis con EF, como candidatos para la producción de feruloil esterases; 3 cepas (2, 1-2R y RM.182.67) que mostraron halos de hidrólisis mayores en TC4, como candidatos para la producción de esterases; además se seleccionaron 3 cepas (MIII O (1), MIII 10F 2A y 20) debido a su capacidad para crecer en etil ferulato como única fuente de carbono (0.05%) y presentar un halo de hidrólisis intenso en TC4.

Las cepas candidatas fueron cultivadas por fermentación en medio sólido (FMS), empleando distintos sustratos como inductores para la producción de las actividades enzimáticas de interés. Se empleó cascarilla de maíz (CM), un sustrato rico en ácidos

fenólicos, como inductor de feruloil esterasas, y triburina (TC4), un triglicérido de cadena corta, como inductor de esterasas y lipasas. Todas las cepas tuvieron buen crecimiento en ambos sustratos, obteniendo el crecimiento más abundante al emplear CM. Para las cepas JOJO 3 VERDE, 20, PCS6, y ASIII, la actividad feruloil esterasa fue mayor al emplear CM como inductor. Para la actividad lipasa se empleó trioctanoína (TC8) como sustrato, obteniendo las mayores actividades para las cepas JOJO 3 VERDE, 20, RM 182.67 al emplear TC4 como inductor. Respecto a la actividad esterasa donde se empleó TC4 como sustrato, las mayores actividades fueron obtenidas para las cepas JOJO 3 VERDE Y 20 al emplear TC4 y RM182.67 al emplear CM, como inductores. Posteriormente se realizaron zimogramas con los distintos extractos obtenidos, con el fin de identificar el número de las bandas correspondientes a enzimas de distinto peso molecular, con actividad sobre EF y TC4. Se observó que al emplear la CM como sustrato, se tuvo una mayor inducción de bandas con actividad feruloil esterasa, que al emplear TC4 como sustrato. Respecto a la actividad esterasa/lipasa, se obtuvieron resultados diferentes al emplear extractos provenientes de los cultivos inducidos con CM y TC4. En general, se observó una mayor cantidad de bandas con actividad esterasa/lipasa, cuando se emplearon los extractos que fueron inducidos con CM. Los extractos enzimáticos conteniendo actividad feruloil esterasa y esterasa/lipasa fueron inmovilizados en la resina de intercambio catiónico, logrando en algunos casos rendimientos de inmovilización cercanos al 90%. Por último, el fermento sólido proveniente de los diferentes hongos seleccionados en ambos medios de cultivo, fue secado verificando que mantuvieran las actividades enzimáticas de interés.

## **5.2 SECCIÓN II. Síntesis de derivados del ácido ferúlico a nivel laboratorio.**

Los inmovilizados, fermentos sólidos secos y las lipasas/esterasas comerciales disponibles en nuestro laboratorio, fueron utilizados como biocatalizadores en la síntesis de etil ferulato (esterificación directa) y dodecil ferulato (transesterificación), designadas como reacciones modelo. Los mejores catalizadores heterogéneos

encontrados en este estudio fueron: Una resina de intercambio catiónico a la cual llamaremos A15, para la síntesis de etil ferulato por esterificación directa y una lipasa comercial de levadura inmovilizada (LLI), para la síntesis de dodecil ferulato por transesterificación.

Las mejores condiciones de reacción (logradas en este estudio) empleando los catalizadores heterogéneos seleccionados fueron:

- *Síntesis etil ferulato*: 500 mM de ácido ferúlico en etanol anhidro (Reacción libre de solvente); 70°C; con A15 como catalizador (80% de conversión en 24 h)
- *Síntesis dodecil ferulato*: 150 mM de etil ferulato y 100 mM de dodecanol; en un solvente hidrófobo como medio de reacción; 60°C; con LLI como catalizador (80 % de conversión en 48 h)

Posteriormente, se evaluó la capacidad de síntesis de ambos catalizadores heterogéneos, bajo las mejores condiciones encontradas en cada reacción, para obtener una serie de ésteres del ácido ferúlico con diferente longitud de cadena alquilo (C2-C18). Por esterificación directa empleando A15, se lograron sintetizar exitosamente derivados del ácido ferúlico de alcoholes primarios, secundarios y terciarios. Se lograron conversiones >68% en tan solo 24 h de reacción, para los derivados del ácido ferúlico de alcoholes primarios de cadena corta <C12, el fenetil, isobutil e isoamil ferulato. Como era de esperarse, la velocidad inicial de reacción fue mayor para el metil ferulato (3.4 U/g), seguida del etil ferulato (1.6 U/g) y decreció (<1.0 U/g) para el resto de los derivados.

En el caso de la alcoholisis del etil ferulato (transesterificación) empleando LLI, igualmente se lograron sintetizar exitosamente todos los derivados del ácido ferúlico propuestos. Se obtuvieron conversiones >85% en tan solo 96 h de reacción, para todos los ésteres propuestos. Además se demostró que es posible re-utilizar A15 por al menos 15 ciclos consecutivos de 24 h, para llevar a cabo la esterificación directa del etil ferulato con conversiones > 70%, empleando un sistema en lote. Se ensayó la

misma reacción en un reactor empacado con A15, logrando conversiones cercanas al 60%.

Finalmente se implementaron protocolos sencillos para la purificación del Etil ferulato (EF) y Dodecil ferulato (DF), empleando un sistema de extracción con solventes a partir de la mezcla de reacción. Se logró purificar exitosamente el EF, empleando un sistema de extracción con tolueno, seguida de lavados de agua para remover el ácido ferúlico remanente en la fase orgánica, a una relación agua:fase orgánica 1:1. En caso del DF, la purificación se logró empleando un sistema de extracción con propilenglicol, para remover el etil ferulato residual de la fase orgánica. En ambos casos obtuvieron productos con una pureza >98%.

### **5.3 SECCIÓN III. Evaluación de la actividad Biológica de los derivados obtenidos.**

Por último se evaluó la actividad antioxidante y anti inflamatoria *in vitro* de los distintos derivados del ácido ferúlico obtenidos por catálisis heterogénea y purificados mediante los protocolos descritos anteriormente. Los resultados mostraron que todas las moléculas de síntesis poseen una actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria. Los ésteres de cadena corta (C1-C4), resultaron los más interesantes con una mayor inhibición del 70 al 85% ante el agente secuestrante ABTS, siendo inclusive superior que la inhibición encontrada para el ácido ferúlico libre (45 y 50% de inhibición respectivamente) y equiparable a la encontrada para el Trolox que se empleó como testigo positivo. Mediante el ensayo con DPPH, el efecto fue más marcado para los ésteres de cadena corta (C1-C4), particularmente para el etil ferulato con porcentajes de inhibición de 25% a 45% y superiores al BHT empleado como testigo positivo (<10 % de inhibición). Con referencia a la actividad anti-inflamatoria, de igual manera destacaron los ésteres de cadena corta, inhibiendo de manera selectiva la enzima COX-2. De los anteriores destaca el butil ferulato con una inhibición de COX-2 del 60 y 90% e inferior al 10% para COX-1. Los resultados *in vitro*, muestran que los ésteres del ácido ferúlico de cadena corta, son moléculas con

potencial anti-oxidante y anti-inflamatorio que pudieran eventualmente poseer otras actividades biológicas de interés, útiles en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas.

## 6 CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente proyecto fue posible implementar métodos rápidos y sencillos para la búsqueda y selección de nuevos biocatalizadores. Se desarrollaron exitosamente distintos protocolos que permitieron monitorear y llevar a cabo la síntesis de distintos derivados del ácido ferúlico. Se demostró a nivel laboratorio que las resinas de intercambio iónico, particularmente A15, son catalizadores heterogéneos idóneos para la esterificación directa de ésteres del ácido ferúlico de cadena corta, mientras que la lipasa LLI, pude llevar a cabo la reacción de transesterificación del etil ferulato en ésteres del ácido ferúlico de cadena larga, con muy buenos rendimientos. Se lograron implementar protocolos sencillos para la purificación de al menos 7 ésteres del ácido ferúlico, cuya actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria fue demostrada en ensayos *in vitro*. Los ésteres de cadena corta presentaron los resultados más promisorios en términos de actividad biológica, por lo que se decidió conjuntamente (empresas y Centros públicos de investigación), en base a los parámetros de los procesos ya existentes, escalar la síntesis del etil ferulato.

## 7 PERSPECTIVAS

Si bien en el primer escrutinio llevado a cabo no fue posible encontrar un biocatalizador propio capaz de llevar a cabo las reacciones de síntesis planteadas en este proyecto, es importante ensayar distintas condiciones de reacción, además de buscar nuevas aplicaciones para los biocatalizadores obtenidos. Cabe resaltar que el haber logrado la síntesis del etil ferulato (a nivel laboratorio y piloto) abre las puertas al diseño de moléculas mucho más complejas que puedan poseer actividades biológicas más interesantes, ya que éste es un excelente intermediario en síntesis orgánica catalizada por enzimas. Por lo anterior es indispensable continuar con la búsqueda de nuevos biocatalizadores mediante las técnicas implementadas a nivel laboratorio que permitan lograr este nuevo objetivo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Salmeron-Alcocer, A., et al., *Aerobic treatment of maize processing wastewater (nejayote) in a single stream multi stage reactor*. Journal of Environmental Engineering and Science, 2003. **2**(5): p. 401-406.
2. Pflugfelder, R.L., L.W. Rooney, and R.D. Waniska, *Dry matter losses in commercial corn masa production*. Cereal Chemistry, 1988. **65**: p. 127-132.
3. Jackson, D.S., et al., *Alkaline processing properties of stress cracked and broken corn (Zea mays L)*. Cereal Chemistry, 1988. **65**(133-137).
4. Sahai, D., et al., *Dry matter loss during nixtamalization of a white corn hybrid: Impact of processing parameters*. Cereal Chemistry, 2000. **77**: p. 254-258.
5. Gutiérrez-Urbe, J.A., et al., *Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas*. Journal of Cereal Science, 2010. **52**: p. 410-416.
6. Sahai, D., et al., *Alkaline processing (nixtamalization) of white Mexican corn hybrids for tortilla production: Significance of corn physicochemical characteristics and process conditions*. Cereal Chemistry, 2001. **78**: p. 116-120.
7. Martínez-Bustos, F., et al., *Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalization process*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001. **81**: p. 1455-1462.
8. Flores-Farías, R., et al., *Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalized Mexican maize flours for tortillas*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**: p. 657-664.
9. Lopez-Martinez, L.X., et al., *Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize*. LWT- Food Science and Technology, 2009. **42**: p. 1187-1192.
10. Figueroa-González, I., et al., *Probiotics and prebiotics—Perspectives and challenges*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011. **91**: p. 1341-1348.
11. Adom, K.K. and R.H. Liu, *Antioxidant activity of grains*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002. **50**: p. 6182-6187.

12. Del Pozo-Insfran, D., et al., *Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (Zea mays L.) products*. Food Research International, 2006. **39**(6): p. 696-703.
13. Vermeris, W. and R. Nicholson, *Biosynthesis of Phenolic Compounds*, in *Phenolic Compound Biochemistry*. 2006, Springer Netherlands. p. 63-149.
14. Harborne, J.B. and N.W. Simmonds, eds. *Biochemistry of Phenolic Compounds*. ed. A. Press. 1964: London. 101.
15. Swain, T. and E.C. Bate-Smith, *Comparative Biochemistry Vol. III*, in *Flavonoid compounds*, M. Florkin and H.S. Mason, Editors. 1962: New York. p. 755-809.
16. Ribéreau-Gayon, P., *Plant Phenolics*, ed. O.a. Boyd. 1972, Edinburgh.
17. Rechner, A.R., A.S. Pannala, and C.A. Rice-Evans, *Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo*. . Free Radical Research, 2001. **35**(2): p. 195-202.
18. D'Archivio, M., C. Filesi, and R. Di Benedetto, *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(348-361).
19. Gallardo, C., L. Jimenez, and M.T. Garcia-Conesa, *Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 455-463.
20. Ou, S. and K.C. Kwok, *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in food*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004. **84**(11): p. 1261-1269.
21. Bourne, L.C. and C.A. Rice-Evans, *Bioavailability of ferulic acid*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **253**: p. 222-277.
22. Clifford, M.N., *Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**(3): p. 362-372.
23. Lam, T.B., K. Kadoya, and K. Liyama, *Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls*. Phytochemistry, 2001. **57**(6): p. 982-992.
24. Wakabayashi, K., T. Hoson, and S. Kamisaka, *Suppression of cell wall stiffening along coleoptiles of wheat (Triticum aestivum L.) seedlings grown under osmotic stress conditions*. . Journal of Plant Research, 1997. **110**(3): p. 311-316.

25. Zhao, Z., Y. Egashira, and H. Sanada, *Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver*. Journal of Nutrition, 2004. **134**(11): p. 3083-3088.
26. Gonthier, M.-P., et al., *Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats*. The Journal of Nutrition, 2003. **133**(6): p. 1853-1859.
27. Ruegger, M. and C. Chapple, *Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in Arabidopsis thaliana define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism*. Genetics, 2001. **159**: p. 1741-1749.
28. Fang, X., et al., *Suppressive Effect of Alkyl Ferulate on the Oxidation of Linoleic Acid*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006. **70**(2): p. 457-461.
29. Chawla, A.S., et al., *Anti-inflammatory action of ferulic acid and its esters in carrageenan induced rat paw oedema model*. Indian Journal of Experimental Biology, 1987. **25**(3): p. 187-189.
30. Hsu, C.-L. and G.-C. Yen, *Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8404-8410.
31. Kikuzaki, H., et al., *Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(7): p. 2161-2168.
32. Nystrom, L., et al., *Antioxidant activity of steryl ferulate extracts from rye and wheat bran*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**: p. 2503-2510.
33. Murakami, A., et al., *Suppressive effects of novel ferulic acid derivatives on cellular responses induced by phorbol ester, and by combined lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$* . Cancer Letters, 2000. **157**: p. 77-85.
34. Payen, F. and J.F. Persoz, *Memoire sur la diastase, les principaux produits de ses reactions, et leurs applications aux arts industriels*. Annales de chimie et physique, 1833. **53**: p. 73-92.
35. Onuuffer, J.J. and T.B. T., *The use of natural and unnatural amino acid substrates to define the substrate specificity of Escherichia coli aspartate and tyrosine aminotransferases*. Protein Science, 1995. **4**: p. 1743-1749.

36. Tipton, K. and S. Boyce, *History of the enzyme nomenclature system*. Bioinformatics, 2000. **16**: p. 34-40.
37. Bornscheuer, U.T. and R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. 1999, Weinheim, New York: Wiley-VCH. 336.
38. Kirk, O. and M.W. Christensen, *Lipases from Candida Antarctica: Unique Biocatalysts from a unique origin*. Organic Process Research & Development 2002. **6**: p. 446-451.
39. Halling, P.J., *Enzymic conversions in organic and other low-water media*. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 2002, Weinheim: Wiley-VCH.
40. Arroyo, M., *Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*. Ars Pharmace, 1998. **39**(2): p. 23-39.
41. Guyot, B., et al., *Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from Candida antarctica in solvent-free medium*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(6): p. 529-532.
42. Stamatis, H., V. Sereti, and F. Kolisis, *Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999. **76**(12): p. 1505-1510.
43. Topakas, E., et al., *Purification and characterization of a feruloyl esterase from Fusarium oxysporum catalyzing esterification of phenolic acids in ternary waterorganic solvent mixtures*. Journal of Biotechnology, 2003. **102**: p. 33-34.
44. Topakas, E., et al., *Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **63**: p. 686-690.
45. Giuliani, S., et al., *Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from Aspergillus niger using water-in-oil microemulsions*. Biotechnology Letters, 2001. **23**: p. 325-330.
46. Tsuchiyama, M., et al., *Enzymatic Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Glycerol Esters Using Type A Feruloyl Esterase from Aspergillus niger*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2007. **71**(10): p. 2606-2609.
47. Hatzakis, N.S., D. Daphnomili, and I. Smonou, *Ferulic acid esterase from Humicola Insolens catalyzes enantioselective transesterification of secondary alcohols*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**: p. 309-311.

## **9 ANEXOS**

**9.1 Constancia de innovación y aportación técnica.**

**9.2 Constancia de antigüedad.**