

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUIL ÉSTERES
DEL ÁCIDO 3-4 DIHIDROXIHIDROCINÁMICO POR EL MÉTODO ORAC
LIPOFÍLICO Y EFECTO DE SU DOSIFICACIÓN EN ACEITE DE PALMA
COMERCIAL**

JOSÉ LUIS GARCÍA CUBIDES

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2015

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUIL ÉSTERES
DEL ÁCIDO 3-4 DIHIDROXIHIDROCINÁMICO POR EL MÉTODO ORAC
LIPOFÍLICO Y EFECTO DE SU DOSIFICACIÓN EN ACEITE DE PALMA
COMERCIAL**

JOSÉ LUIS GARCÍA CUBIDES

Tesis de grado para optar al título de Químico

Director: Luis Javier López Giraldo

Ingeniero Químico

Ph.D Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Co-director: Arley René Villamizar Jaimes

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2015

DEDICATORIA

A Dios que permite que los hombres juguemos con sus átomos

A Dios que infunde en las mentes la curiosidad y la imaginación

A Dios que se expresa en las personas que anidan en nuestro corazón

A Dios que es universo macroscópico

A Dios que está presente en lo infinitamente pequeño

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por su apoyo económico a través del proyecto 1318. Al profesor Luis Javier López Giraldo por su instrucción a lo largo del proceso de aprendizaje.

A Arley Villamizar por sus aportes y sugerencias en el proceso experimental, además de actuar como facilitador en la búsqueda de herramientas y materiales que fueron necesarios para la investigación.

A los miembros del Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos por su apoyo a lo largo de la ejecución de este trabajo.

A Saceites por su colaboración en suministrar el aceite de palma así como como el antioxidante, además de sus aportes en la dosificación.

Finalmente a todos los compañeros con los que he tenido la posibilidad de aprender y compartir desde que inicie esta carrera y que han hecho aportes no solo académicos sino también para la vida.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	18
1. OBJETIVOS.....	21
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)	22
2.1.1 Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	22
2.1.2. Radicales Peroxilo (RO_2^{\bullet}) y alcoxilo (RO^{\bullet})	22
2.1.3. Radical hidroxilo ($\bullet OH$).....	22
2.2. LIPOFILIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	23
2.3. PAPEL DEL AGUA EN LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA.....	25
2.4. CANDIDA ANTARCTICA LIPASA B.....	25
2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS	26
2.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	28
2.6.1. Método ORAC lipofílico (Oxygen Radical Absorbance Capacity) para evaluar capacidad antioxidante.....	30
2.6.2. Capacidad antiradicalaria medida por el método DDPH	33
2.7. ENRIQUECIMIENTO Y PROTECCIÓN DE ALIMENTOS.....	34
2.8. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	35
2.9. MERCADO DE ACEITE DE PALMA.....	37
3. MATERIALES Y METODOS.....	39
3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	39

3.2. SÍNTESIS DE ÉSTERES DEL DHCA.....	40
3.2.1. Actividad del agua.....	40
3.2.2. Esterificación enzimática catalizada por C. antarctica.....	41
3.2.3. Seguimiento por HPLC	41
3.2.4. Purificación de ésteres	42
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	43
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	43
3.4.1. Capacidad antioxidante ORAC lipofílico	44
3.4.2. Capacidad antirradicalaria DDPH.....	45
3.5. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS COEFICIENTES DE DISTRIBUCIÓN OCTANOL / AGUA.....	46
3.6. DOSIFICACIÓN DEL ÉSTER DEL ÁCIDO DHCA EN ACEITE DE PALMA Y ENSAYO ORAC-FL LIPOFÍLICO	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1. RENDIMIENTOS DE REACCIÓN DE ÉSTERES DEL DHCA	48
4.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA CADENA CARBONADA SOBRE EL RENDIMIENTO DE ESTERIFICACIÓN DEL DHCA	48
4.3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.....	50
4.4. CARACTERIZACIÓN DE ÉSTERES DEL DHCA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	52
4.4.1. RMN 1H Y 13C.....	52
4.5. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ORAC LIPOFÍLICO	55

4.6. EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA CADENA CARBONADA SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA A TRAVÉS DEL ENSAYO ORAC LIPOFÍLICO.....	57
4.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA POR DDPH	59
4.8. COEFICIENTE DE PARTICIÓN	61
4.9. EFECTOS DE LA FORMULACIÓN DEL ANTIOXIDANTE SOBRE LAS PROPIEDADES DEL ACEITE	63
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de esterificación catalizado por lipasas. Modificado por Ghandi et al. y Kokkinou et al. (2012)	26
Figura 2. Estructuras resonantes del radical fenoxilo	27
Figura 3. Mecanismo propuesto por Ou et al. (2001) para la oxidación de la fluoresceína en presencia de AAPH	31
Figura 4. Estructuras químicas de las α , β y γ ciclodextrinas.....	32
Figura 5. Área neta bajo la curva (AUC neta) definida como (AUC Trolox®- AUC del blanco)	33
Figura 6. Proceso de disminución del color del DDPH en presencia del antioxidante.....	34
Figura 7. Cromatógrafo de líquidos Grupo de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA UIS)	42
Figura 8. Purificación de ésteres del DHCA a través de cromatografía en columna	43
Figura 9. Espectrofluorímetro. Fluoroskan Ascent. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA UIS).....	45
Figura 10. Espectrofotómetro UV-Vis. Grupo de Investigación en Ciencia y tecnología de Alimentos (CICTA UIS).....	46
Figura 11. Reacción de esterificación del dihidrocafeato de butilo con Candida antártica lipasa B.....	48
Figura 12. Porcentaje de esterificación del DHCA, después de 96 horas de reacción a 60°C y 300 rpm	49
Figura 13. Identificación de compuestos a través de cromatografía de capa delgada	51
Figura 14. Espectros de RMN ^1H del DHCA y el dihidrocafeato de butilo.....	52
Figura 15.. Espectros de RMN ^{13}C del DHCA y el dihidrocafeato de butilo	52

Figura 16. Comportamiento cinético de disminución de la fluorescencia en presencia del Trolox® para concentraciones comprendidas entre (3,12 y 15 μM)	55
Figura 17. Cinética de disminución de la fluorescencia en presencia de antioxidantes sintetizados. Concentración (12,5 μM).....	56
Figura 18. Comparación de valores Trolox® equivalentes para los diferentes ésteres del DHCA sintetizados	57
Figura 19. Capacidad antioxidante DDPH del DHCA y sus ésteres sintetizados ..	60
Figura 20. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite formulado con dihidrocafeato de dodecilo	64
Figura 21. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite formulado con dihidrocafeato de butilo	64
Figura 22. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite formulado con TBHQ y los ésteres del DHCA	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de lipofilización de ácidos cinámicos e hidroxinámicos con alcoholes grasos catalizada por lipasas.....	24
Tabla 2. Métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante, basados en transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones.....	27
Tabla 3. Lista de materiales, reactivos y equipos.....	39
Tabla 4. Coeficientes de reparto para el DHCA y sus ésteres.....	62
Tabla 5. Resumen de las propiedades del DHCA y sus ésteres, medidas en el laboratorio.....	63

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. CROMATOGRAMA HPLC DE ESTERES DEL DHCA.....	79
ANEXO B. CURVAS PATRÓN DEL DHCA Y SUS ÉSTERES.....	80
ANEXO C. RESULTADOS GRÁFICOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO ORAC LIPOFÍLICO.....	83
ANEXO D. ESPECTRO DE RMN ^1H Y ^{13}C PARA ÉSTERES DEL DHCA.....	89

ABREVIATURAS

ORAC Oxygen radical antioxidant capacity (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

DHCA Dihydrocaffeic Acid (ácido dihidrocafeico)

ROS Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno)

DDPH 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

AAPH 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro

AUC Área bajo la curva

BHA Butylated hydroxyanisole (butilhidroxianisol)

BHT Butylated hydroxytoluene (butilhidroxitolueno)

ET Reaction and assay based on electron transfer (reacciones basadas en la transferencia de electrones)

AH Antioxidant (antioxidante)

HAT Assays based on hydrogen atom transfer (reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno)

μM Micromolar

TBHQ Ter-butylhydroquinone

a_w water activity (actividad del agua)

HPLC High performance liquid chromatography

TE Trolox®, equivalente

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RMN ¹H Resonancia Magnética Nuclear de protones

RMN ¹³C Resonancia Magnética Nuclear del Carbono 13

(s) Singulete

(d) Doblete

(t) Triplete

(m) Multiplete

CICTA Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos

UIS Universidad Industrial de Santander

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALQUIL ÉSTERES DEL ÁCIDO 3-4 DIHIDROXIHIDROCIÁMICO POR EL MÉTODO ORAC LIPOFÍLICO Y EFECTO DE SU DOSIFICACIÓN EN ACEITE DE PALMA COMERCIAL*

AUTOR: JOSÉ LUIS GARCÍA CUBIDES**

PALABRAS CLAVES: Lipofilización, capacidad antioxidante, ORAC, DDPH

DESCRIPCION:

Se estudió el efecto que tiene sobre la capacidad antioxidante la modificación del ácido 3-4 dihidroxihidrocinámico (DHCA) a través de esterificación enzimática con *C. antártica* lipasa B. La reacción se llevó a cabo en botellas con cierre hermético a una temperatura de 60°C y 300 rpm utilizando como solvente una mezcla binaria hexano butanona (65:35) (v:v). El seguimiento de esterificación se hizo a través cromatografía líquida de alta precisión y la purificación se realizó a través de cromatografía en columna. Los rendimientos finales en la purificación fueron de 53% (dihidrocafeato de octilo), 60,5% (dihidrocafeato de dodecilo) y 66,3% para (dihidrocafeato de hexadecilo).

La capacidad antioxidante se midió a través de los métodos ORAC lipofílico y DDPH. Los resultados mostraron que el dihidrocafeato de butilo incrementó la capacidad antioxidante del DHCA por un valor de 45.7 % mientras que en los demás ésteres (C8-C12-C16 en longitud de cadena agregada) se presentó una disminución de 26,63%, 70,14% y 67,86% respectivamente. En contraste, por el método DDPH la mayor capacidad antioxidante la presentó el dihidrocafeato de hexadecilo superando a la del precursor por un valor de 10,1 %.

El dihidrocafeato de butilo y hexadecilo se incorporaron en aceite de palma para evaluar el efecto de estos antioxidantes en una matriz lipídica a través del ensayo ORAC lipofílico. Los resultados mostraron que los antioxidantes formulados incrementan la capacidad de captación de radicales en 1,63 y 1,15 veces más que el aceite sin formular y además tienen una efectividad superior de 1,56 y 1,10 más que la TBHQ utilizada actualmente en esta industria como agente antioxidante.

* Trabajo de investigación

** Facultad de ciencias, Escuela de Química, director: Luis Javier Lopez Giraldo. PhD. Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos. Codirector: Arley René Villamizar Jaimes. Químico

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF DIHIDROXIHIIDROCINÁMICO 3-4 ALKYL ESTERS OF ACID BY THE LIPOPHILIC ORAC METHOD AND EFFECT OF DOSING IN COMMERCIAL PALM OIL*

AUTHOR: JOSÉ LUIS GARCÍA CUBIDES**

KEYWORDS: lipophilization, antioxidant, free radical, ORAC

DESCRIPTION:

The effect on the antioxidant capacity of acid modification 3-4 dihydroxyhydrocinnamic acid (DHCA) through enzymatic esterification with *C. antarctica* lipase B. The reaction was carried out in bottles with closure sealing at a t at a temperature of 60 ° was studied C and 300 rpm using butanone as solvent one binary mixture hexane (65:35) (v: v). Tracking esterification was done through high Accuracy liquid chromatography and purification was performed by column chromatography. Final yields were 53% (octyl dihydrocaffeate), 60,5% (dodecyl dihydrocaffeate) and 66,3% for (hexadecyl dihydrocaffeate).

The antioxidant capacity was measured through the lipophilic ORAC and DDPH methods. The results showed that the butyl dihydrocaffeate increase the antioxidant capacity of AHD worth 45.7% while other esters (C8-C12-C16 chain length aggregate) was a decrease of 26.63%, 70, 14% and 67.86% respectively. In contrast, by the DPPH method the highest antioxidant capacity was presented by hexadecyl dihydrocaffeate beating the precursor to a value of 10,1 %.

The butyl and hexadecyl dihydrocaffeate incorporated in palm oil to evaluate the effect of these antioxidants in a lipid matrix through the lipophilic ORAC assay. The results showed that the formulations antioxidants increase the ability to capture radicals in 1,63 and 1,15 times the oil without asking and they have an TBHQ of 1,56 and 1,10 greater than the presently used in this TBHQ industry.

* Research Work

** Faculty Sciences. Chemistry School. Director: Luis Javier Lopez Giraldo. PhD. Chemistry, Biochemistry and Food Science. Codirector: Arley René Villamizar Jaimes. Chemist

INTRODUCCIÓN

El uso y demanda de antioxidantes muestra un comportamiento creciente en los mercados actuales ^[1], siendo de vital importancia en industrias como cosméticos y alimentos. Este tipo de compuestos poseen propiedades muy importantes tales como antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, etc; y se encuentran de manera natural en muchas plantas, frutas y verduras, cumpliendo una función protectora contra el estrés oxidativo.

Si bien los antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) y ter-butilhidroquinona (TBHQ) han dominado el mercado desde hace ya varios años, se ha desatado una serie de interrogantes acerca de su seguridad y toxicidad, por lo tanto algunos países como Japón o Estados Unidos han optado por retirarlos directamente de su legislación alimentaria y/o controlar su dosificación.

De esta manera los antioxidantes naturales aparecen como los nuevos candidatos para suplir las necesidades de las industrias, ya que a través del tiempo han sido consumidos por el hombre sin presentar efectos adversos comprobados. Cuando están presentes en los alimentos ayudan a definir y preservar las propiedades organolépticas y su efecto protector se ha relacionado con la prevención de muchas enfermedades incluidas las de tipo cardiovascular y el cáncer ^[3]

Entre los antioxidantes naturales más importantes se encuentra el grupo perteneciente a los polifenoles. Estas moléculas cuya estructura está definida principalmente por la presencia de uno o varios grupos OH unidos a uno o más anillos bencénicos han desatado gran interés por la búsqueda de fuentes promisorias de obtención y estudio de sus aplicaciones prácticas. Sin embargo la naturaleza polar de la mayoría de estos compuestos genera una limitación importante cuando requieren ser utilizados en matrices lipídicas ^[3], razón por la

cual se siguen utilizando los antioxidantes sintéticos, que presentan ventajas significativas en cuanto a la solubilidad y estabilidad de grasas y aceites.

En los últimos años se han realizado estudios para mejorar la afinidad hacia compuestos grasos mediante la inclusión de fragmentos lipofílicos, con el fin de obtener moléculas más adaptables a cualquier matriz [4]. Para tal fin se ha preferido la biosíntesis, para guardar en primera medida la relación con su origen natural y, por otro lado, aprovechar la capacidad que tienen las biomoléculas para producir antioxidantes de manera selectiva. Así, se evita la generación de subproductos indeseables que bajan los rendimientos de la reacción y dificultan la purificación.

De la misma manera se han creado diversas técnicas para evaluar la capacidad de este tipo de compuestos sin que se haya llegado a ningún consenso, ya que los mecanismos por los cuales ocurre la actividad antiradicalaría varían de un ensayo a otro, además de utilizarse diferentes tipos de radicales que no necesariamente se encuentran en los sistemas biológicos [5]. Por lo tanto no basta simplemente con relacionar la capacidad antioxidante de un compuesto, sino también dirigir su estudio hacia su aplicación práctica y/o formulación, y conocer en campo su utilidad real.

Este trabajo se basó en la producción de alquil ésteres del ácido dihidrocafeico, en un proceso concatenado que partió desde la biosíntesis enzimática catalizada por *C. antártica* lipasa B; seguimiento de productos de esterificación por HPLC; purificación por cromatografía en columna y caracterización del compuesto por Resonancia Magnética Nuclear. La medición de la capacidad antioxidante se efectuó a través del ensayo ORAC lipofílico y se realizó una segunda medición por ensayo con DDPH.

Finalmente se completó el estudio realizando una dosificación del compuesto con mayor capacidad antioxidante (dihidrocafeato de butilo) en aceite de palma

comercial, verificando su afinidad con la matriz lipídica y su capacidad protectora contra radicales.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto que tiene la adición de cadenas carbonadas de alcoholes grasos, sobre la capacidad antioxidante y protectora del ácido 3,4 dihidroxihidrocinámico y sus alquil ésteres sintetizados mediante catálisis enzimática.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar mediante catálisis enzimática ésteres del ácido dihidrocaféico (DHCA) con cadenas de alcoholes grasos (C4-C8-C12-C16)
- Medir la capacidad antioxidante de los ésteres sintetizados por el método ORAC lipofílico y la capacidad antirradicalaria por el método DPPH.
- Establecer cuál de las nuevas moléculas tiene mayor potencial antioxidante
- Realizar la dosificación del alquil-éster con mejor capacidad antioxidante y evaluación de su efecto en un aceite de palma comercial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

2.1.1 Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

Uno de los radicales libres de oxígeno más común e importantes es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El oxígeno molecular tiene una única configuración electrónica y es en sí mismo un di-radical con dos electrones desapareados [7]. Al agregarse un electrón a la molécula de oxígeno se da la formación de este producto ($O_2^{\bullet-}$). Estos radicales pueden tener una alta toxicidad pero a su vez cumplen una acción protectora destruyendo organismos invasores y son producidos biológicamente por enzimas oxidasas. Cuando son reducidos con ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}) producen especies reactivas más peligrosas, incluyendo el oxígeno singulete y el radical hidroxilo.

2.1.2. Radicales Peroxilo (RO_2^{\bullet}) y alcoxilo (RO^{\bullet})

Gracias a su capacidad para aceptar electrones estas especies son buenos agentes oxidantes y por lo tanto pueden incluso reducirse a sí mismos [7]. Se forman usualmente por efecto de la luz, el calor y las irradiaciones con trazas de metales y a su vez experimentan un rápido reordenamiento molecular produciendo otras especies de radicales libres. Son eficientes para producir reacciones en cadena estimulando principalmente la peroxidación lipídica en los sistemas biológicos.

2.1.3. Radical hidroxilo ($\bullet OH$)

Es el más reactivo de todas las especies de radicales de oxígeno. Se forma principalmente a causa de la escisión del enlace oxígeno-oxígeno produciendo radicales hidroxilo. Tiene la suficiente reactividad para escindir enlaces covalentes de proteínas e hidratos de carbono, y produce además peroxidación lipídica

afectando las membranas celulares. No tiene selectividad y reacciona con casi todo tipo de molécula que se encuentra en las células vivas incluyendo azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ADN, ácidos orgánicos y ácidos grasos [8].

2.2. LIPOFILIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La lipofilización es la esterificación de un resto lipófilo (ácido graso o alcohol graso) en diferentes sustratos (ácido fenólico, azúcar, proteínas), lo que resulta en nuevas moléculas con carácter anfifílico. Aunque los ácidos fenólicos poseen interesantes propiedades biológicas (antioxidante, quelante, captador de radicales libres, Filtro UV, antimicrobiano) debido a su baja solubilidad en medios lipofílicos, su aplicación en productos a base de aceite es limitada. Por lo tanto, la esterificación de la función ácido carboxílico con una alcohol graso mejora su hidrofobicidad y produce moléculas anfifílicas multifuncionales [4], cuya síntesis puede llevarse a cabo por métodos químicos o enzimáticos.

De manera general, existen numerosos estudios sobre la síntesis de moléculas funcionalizadas, con el objeto de preservar y mejorar las características fisicoquímicas del componente. En consecuencia, los procesos de biorreestructuración de lípidos y antioxidantes han sido catalizados químicamente, o enzimáticamente por lipasas, en presencia o ausencia de solventes. En efecto, se han lipofilizado compuestos bioactivos por medio de lipasas microbiales empleando técnicas como a) esterificación, b) transesterificación, c) amidación, d) interesterificación y e) eterificación [6]. En la **Tabla 1** se enumeran algunos de los trabajos más sobresalientes en términos de lipofilización de ácidos fenólicos.

La biocatálisis es un medio que genera importantes ventajas debido a que se pueden controlar el equilibrio termodinámico para favorecer la obtención de productos. Las lipasas fúngicas son las enzimas que en la actualidad tienen mayor uso en reacciones de esterificación de ácidos grasos libres y alcoholes, figurando

entre ellas Lipozyme RM-IM de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme TL-IM (de *Thermomyces lanuginosus*), Novozym 435 (*Candida antártica*), *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, y *Penicillium cyclopium*; las cuales muestran un gran potencial de estudio [47]. Actúan a través de un centro activo que comprende tres residuos de aminoácidos (serina, histidina y aspartato o glutamato) conocidos como triada catalítica que se unen al sustrato para realizar la determinada conversión de un producto.

Tabla 1. Estudios de lipofilización de ácidos cinámicos e hidroxinámicos con alcoholes grasos catalizada por lipasas

Tipo de enzima	Acido fenólico	Cadena agregada	Rendimiento	Tiempo de reacción	Referencia
C. antártica.	Cinámico	C4-C8-C12-C18	97%	15 días	<i>Guyot et al. (1997)</i>
	Cumárico	C4-C8-C12-C18	21%	12 días	<i>Guyot et al. (1997)</i>
	Ferúlico	C5	60%	8 horas	<i>Giuliani et al. (2001)</i>
	Ferúlico	C8	14%	13 días	<i>Compton et al. (2000)</i>
	Clorogénico	C4-C8-C12-C18	40-60 %	30 días	<i>Guyot et al. (1997)</i>
	Clorogénico	C4-C8-C12-C16	61-93 %	96 h	<i>López Giraldo et al. (2007)</i>
	Cafeico	C8	90,34%	55 h	<i>Chen et al. (2010)</i>
	Cafeico	C8	trazas	12 días	<i>Stamatis et al. (1999)</i>
	Dihidrocafeico	C8	50%	8 días	<i>Fedderm et al. (2011)</i>
	Dihidrocafeico	C4-C6-C12	78%	15 días	<i>Buisman et al. (1998)</i>
	Dihidrocafeico	C4-C8-C12-C16-C18:1	30%	44 horas	<i>Vosmann et al. (2006)</i>

Tipo de enzima	Acido fenólico	Cadena agregada	Rendimiento	Tiempo de reacción	Referencia
<i>Rhizomucor miehei</i>	Cinámico	C8	82%	12 días	<i>Stamatis et al. (1999)</i>
	Cafeico	C8	trazas	12 días	
	Cumárico	C8	18-32%	12 días	
	Ferúlico	C8	30%	12 días	
<i>Candida cylindraceae</i>	Cinámico	C4-C6-C12-C16	2- 68%	5 días	<i>Buisman et al. (1998)</i>
<i>C. Rugosa</i>	Ferúlico.	C8	3-30%	12 días	<i>Stamatis et al. (1999)</i>

2.3. PAPEL DEL AGUA EN LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA

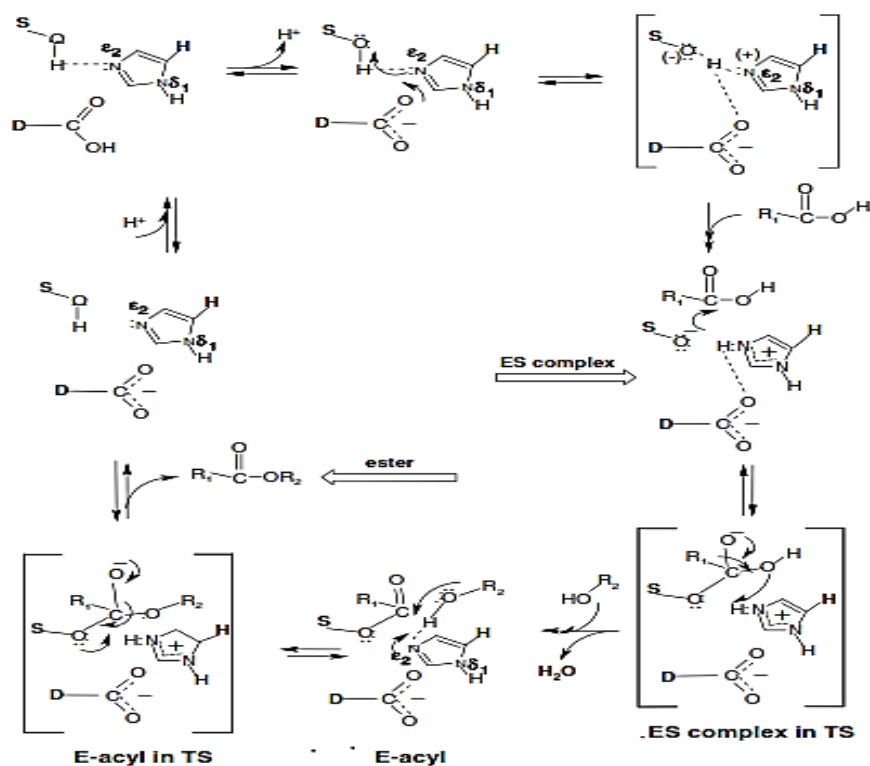
Durante la esterificación se produce agua que va quedando dispersa en el medio y si no se retira se presenta una reacción competitiva desplazando los productos hacia la hidrólisis y disminuyendo los productos de esterificación. Diversas técnicas se han utilizado con el fin de tratar el efecto del agua durante una reacción de esterificación; generalmente, el exceso de agua se retira mediante la adición de tamices ^[17], o su destrucción química. Los mejores resultados para la mayoría de las esterificaciones con lipasas ocurre con valores de actividad del agua (a_w) que oscilan entre 0,25 y 0,45 lo que corresponde a un intervalo de contenido de agua de 0,5% a 1%, pero puede variar hasta valores tan altos como 11% ^[18].

2.4. CANDIDA ANTARCTICA LIPASA B

Candida antártica es una proteína que consta de 317 ácidos aminoácidos con un peso molecular de 33 kDa. La adsorción de los sustratos en el sitio activo, se hace después de que pasan a través de un canal hidrófobo de 9,5 x 4,5 Å en forma de embudo. La maquinaria catalítica, empleada para reacciones de esterificación,

interesterificación y transesterificación (**Figura 1**), comprende una tríada catalítica (responsable de la catálisis básica) y un agujero oxaniónico (responsable de la catálisis ácida) formado durante los estados de transición. La tríada catalítica se forma por Ser105, Asp187 y His224, mientras que el agujero de oxanión se forma por la Gly106 y Thr40

Figura 1. Mecanismo de esterificación catalizado por lipasas. Modificado por Ghandi y Kokkinou *et al.* (2012) [19]



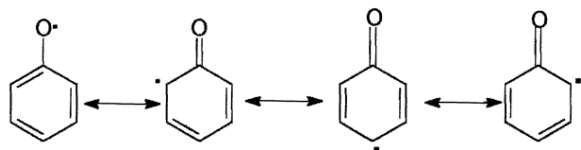
2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los antioxidantes encontrados naturalmente en plantas son en su mayoría compuestos mono o polifenólicos que cumplen un papel fundamental en la prevención de la oxidación. Generalmente los más estudiados y utilizados en componentes industriales son flavonoides, tocoferoles, derivados del ácido cinámico entre otros. La influencia de la estructura química del compuesto fenólico

ejerce una notable importancia en su actividad como antioxidante. En general, los orto-difenoles, como son el ácido cafeico, el hidrotirosol y la oleuropeina, presentan una elevada capacidad antioxidante si se les compara con ácidos fenólicos con menor impedimento estérico como es el tirosol debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto, también llamado catecólico.

El radical fenoxilo formado al reaccionar un fenol con un radical lipídico, es estabilizado por deslocalización del par de electrones alrededor del anillo aromático (**Figura 2**), tal y como lo indica sus estructuras resonantes.

Figura 2. Estructuras resonantes del radical fenoxilo



El radical fenoxilo (ArO) formado es estabilizado por resonancia y no continúa la cadena de reacción, o puede ser destruido al interactuar con un segundo radical peroxilo para formar productos moleculares, interrumpiendo la cadena oxidativa. Cuvelier *et al.* (1992) ^[20] encontraron que los ácidos ortodifenólicos como el protocatecuico, tienen mayor actividad antioxidante que los respectivos monofenoles (p-hidroxibenzoico y p-cumárico), además el ácido gálico con 3 grupos hidroxilos, es más activo que el protocatecuico. Sin embargo Pokorny *et al.* (1987) reporta que la presencia de más de 3 grupos hidroxilos sobre un núcleo aromático, no mejora la eficiencia antioxidante.

Los sustituyentes donadores de electrones, en posiciones orto o para al grupo hidróxilo, aumentan la actividad antioxidante. Por ejemplo, el ácido sinápico tiene mayor actividad que el ácido ferúlico, y este a su vez mayor que el ácido p-

hidroxibenzoico. En el grupo de los ácidos fenólicos, en general se encuentra que los grupos sustituyentes dadores de electrones mejoran la actividad antioxidante.

2.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

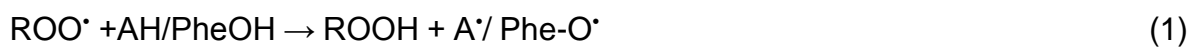
Los ensayos se desarrollaron para medir captación de radicales y comparar y clasificar los antioxidantes en diferentes alimentos y materiales naturales. Se han propuesto y validado diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, sin embargo, las determinaciones realizadas *in vitro* no ofrecen un resultado claro acerca de su eficacia en aplicaciones reales.

Los ensayos antioxidantes generalmente se han desarrollado para medir tres propiedades diferentes [5]:

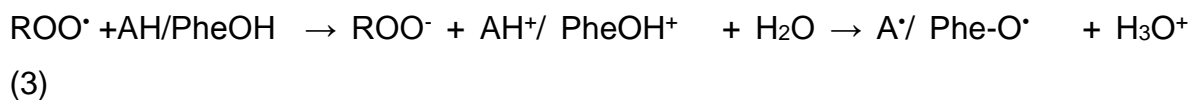
- (i) Capacidad antioxidante: el número total de electrones donados o convertidos, por mol de antioxidante en una reacción completa bajo determinadas condiciones. Esto por lo general se aproxima al número de grupos -OH fenólicos, o a dos electrones por grupo -OH, aunque no siempre.
- (ii) La actividad antioxidante: la concentración de antioxidante requerido para producir el cierre total de la reacción.
- (iii) Potencial Antioxidante: término utilizado para describir la expectativa que presenta un antioxidante para atrapar radicales en condiciones específicas.

Los mecanismos de reacción más comunes para la producción de radicales estables ocurren principalmente a través de transferencia de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones, así:

Mecanismo HAT (Transferencia de átomos de hidrógeno) Ec. 1 y 2, la formación del radical ROO[•] se explica en las Ec. 9 y 10



Mecanismo SET (Transferencia de un electrón) ^[18] Ec. 3, 4 y 5:



Donde AH es el antioxidante, PheOH es el fenol y M el metal implicado en la reacción Redox.

En la **(Tabla 2)** se muestran los métodos más empleados para determina capacidad antioxidante, clasificados según su mecanismo de reacción.

Tabla 2. Métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante, basados en transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones

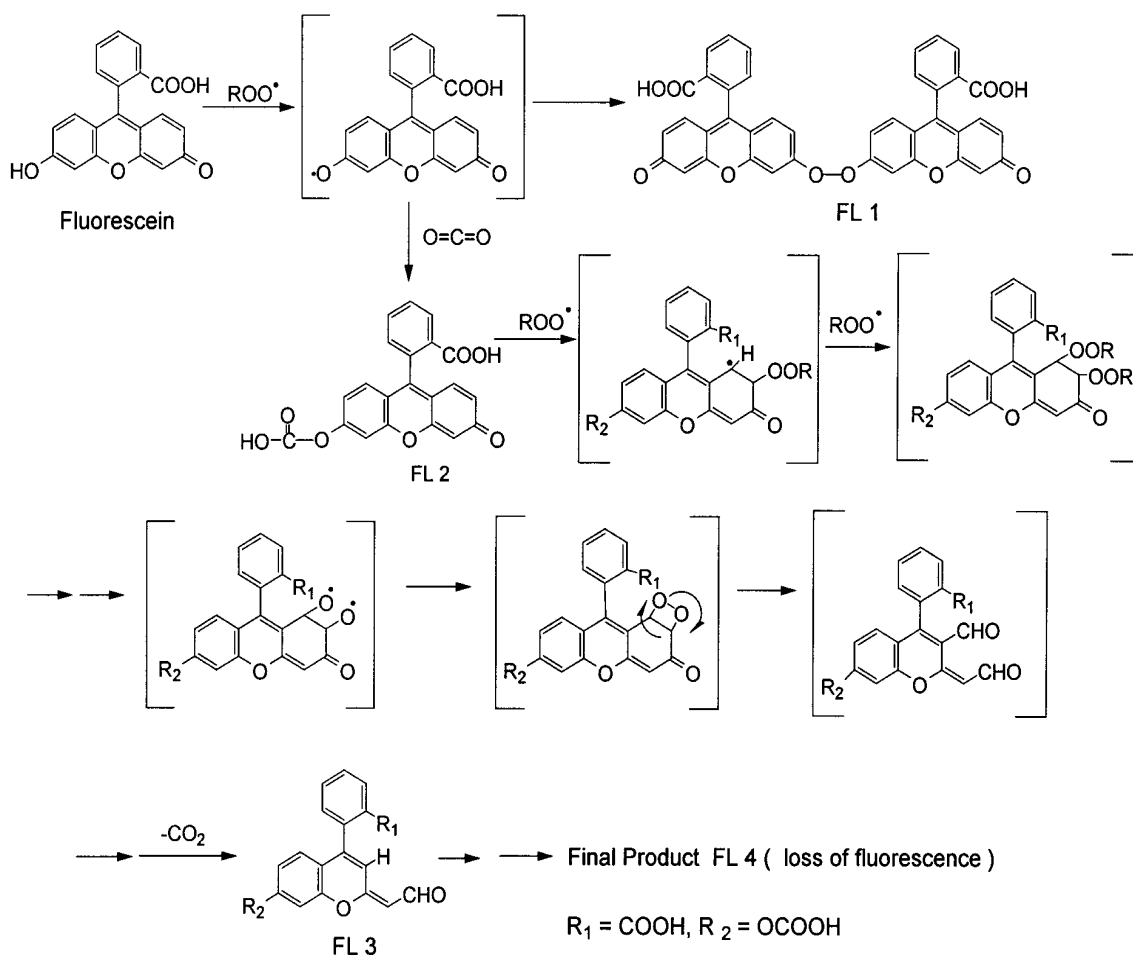
Ensayos que implican reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno	
$\text{ROO}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\bullet$	ORAC (capacidad de absorción de oxígeno radical)
$\text{ROO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{L}^\bullet$	TRAP (Potencial antioxidante de captura total de radicales)
	Ensayo de blanqueamiento crocina
	IOU (Inhibición de consumo de oxígeno)
	Inhibición de la oxidación de LDL
Ensayos por reacción de transferencia de electrones	
$\text{M}(n) + e \text{ (de AH)} \rightarrow \text{AH}^{\bullet+} + \text{M}(n - 1)$	TEAC (capacidad antioxidante Trolox equivalente)
	FRAP (Capacidad de reducción del ión férrico)
	Capacidad de reducción del cobre (II)

2.6.1. Método ORAC lipofílico (Oxygen Radical Absorbance Capacity) para evaluar capacidad antioxidante

Dentro de los métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante, el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) es considerado uno de los mejores indicadores para evaluar dicha propiedad en un alimento. ORAC integra y cuantifica la capacidad de todos los antioxidantes (polifenoles, carotenos y otros) como agente protector contra los radicales libres ^[4] y su uso está bien documentado para realizarse tanto en moléculas hidrofílicas como lipofílicas ^[22].

En éste ensayo, los radicales son generados por el calentamiento de un azocompuesto, 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH). El AAPH produce radicales peroxilo por calentamiento, que oxidan la molécula fluorescente. Inicialmente, la reacción se llevaba a cabo con beta-ficoeritrina (β -PE), una proteína aislada de *Porphyridium cruentum*, como fuente de radicales peroxilo. Sin embargo, la β -PE no proporciona resultados reproducibles y presentaba poca fotoestabilidad, por lo cual se buscó una alternativa utilizándose la molécula de fluoresceína ^[23] la cual se oxida para neutralizar los radicales libres. Cuando la fluoresceína es atacada por los radicales peroxilo (**Figura 3**), la fluorescencia se pierde. Un antioxidante retarda la pérdida de fluorescencia reaccionando con los radicales peroxilo a través de transferencia de átomos de hidrógeno o adición de radicales.

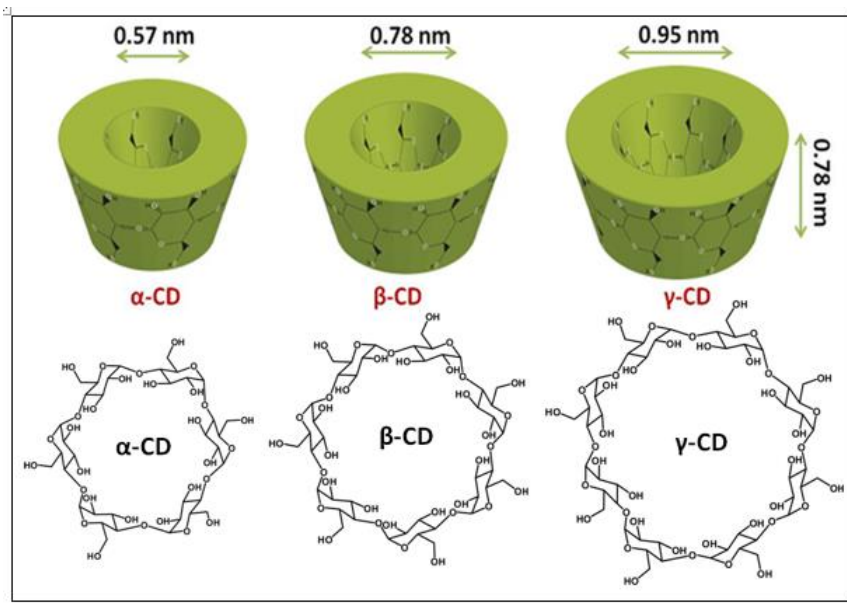
Figura 3. Mecanismo propuesto por Ou *et al.* (2001) para la oxidación de la fluoresceína en presencia de AAPH



Cuando se añaden cadenas alifáticas a los ácidos polifenólicos su polaridad cambia y su afinidad hacia matrices acuosas disminuye. Este problema se resuelve mediante la utilización de beta-ciclodextrina metilada que facilita la disolución de los compuestos para determinar su capacidad antioxidante. Estas moléculas son polisacáridos cíclicos formados principalmente en procesos de transformación del almidón llevado a cabo por bacterias tales como *Bacillus macerans*; las unidades de glucopiranosas están unidas a través de enlaces (α), (β) ó (γ) unidades de α -D-[1,4] glucosa, que dan lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad

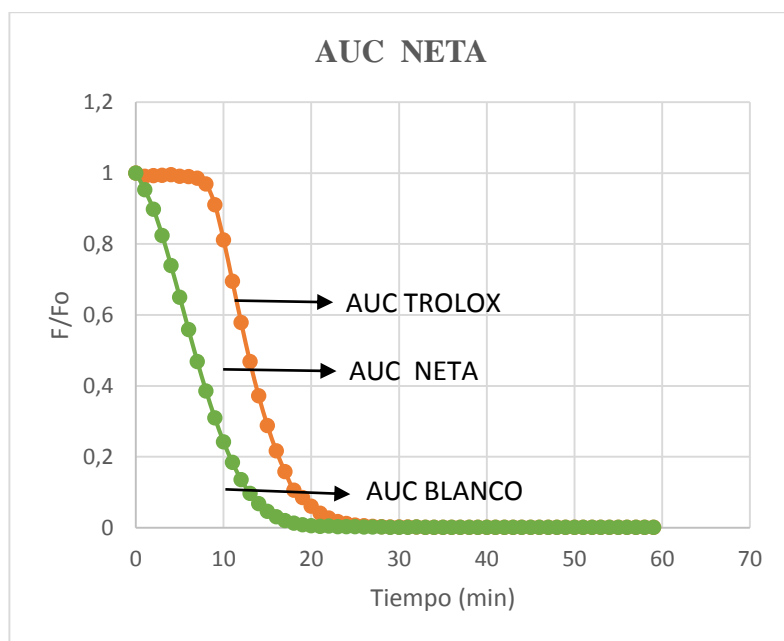
interior de volumen específico. Su estructura permite que moléculas insolubles en fases acuosas puedan solubilizarse en disoluciones de ciclodextrina sin que el compuesto tenga un cambio en la conformación de su estructura química, ya que no hay formación de enlaces covalentes durante su interacción [24].

Figura 4. Estructuras químicas de las α , β y γ ciclodextrinas



El ensayo ORAC se realiza en placas oscuras de múltiples pozos para poder medir varias muestras a la vez. La reacción se sigue mediante el registro de fluorescencia en el tiempo [25] y los resultados se calculan como el área total bajo las curvas de reacción (**Figura 5**), para cada muestra del antioxidante, menos el área del blanco (sin antioxidante). La capacidad antioxidante se expresa en equivalentes de Trolox®, compuesto que se utiliza como referencia.

Figura 5. Área neta bajo la curva (AUC neta) definida como (AUC Trolox® - AUC del blanco)



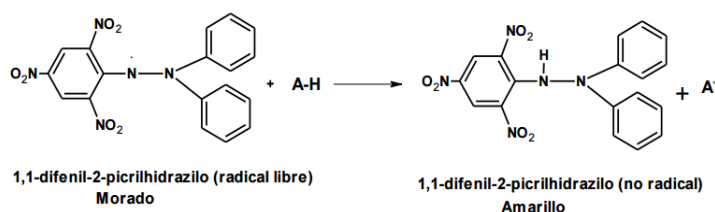
2.6.2. Capacidad antiradicalaria medida por el método DPPH

Este método fue desarrollado por Blois (1958) para determinar la capacidad antioxidante de mediante el uso de una α radical libre estable, α -difeníl- β -picrilhidrazil (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$). El ensayo se basa en el registro de la pérdida de coloración del radical DPPH cuando acepta un átomo de hidrógeno proveniente del antioxidante (**Figura 6**). El electrón impar de átomo de nitrógeno en DPPH se reduce mediante la recepción de un átomo de hidrógeno a la hidrazina correspondiente a partir de los antioxidantes [27].



El radical DPPH se caracteriza por su estabilidad debido a la deslocalización del electrón libre en su estructura. Al mezclar solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida con la pérdida de color violeta.

Figura 6. Proceso de disminución del color del DPPH en presencia del antioxidante



Este método es limitado debido a que el DPPH interactúa con otros radicales y la curva de respuesta para alcanzar el estado estacionario no es lineal con diferentes relaciones de DPPH/antioxidante [28]. DPPH es sensible a algunas bases de Lewis y tipos de disolventes, así como de oxígeno. DPPH sólo puede ser soluble en disolvente orgánico y la interferencia de la absorbancia a partir de los compuestos de la muestra podría ser un problema para el análisis cuantitativo [29].

2.7. ENRIQUECIMIENTO Y PROTECCIÓN DE ALIMENTOS

Uno de los aceites comestibles más utilizados actualmente es el aceite de palma. Éste se extrae del mesocarpio de color rojo anaranjado carnoso de los frutos del árbol de palma (*Elaeis guineensis*). Los triglicéridos de aceite de palma sin refinar contienen aproximadamente 50% de ácidos grasos saturados, de los cuales el ácido palmítico (C16: 0) representa el 41.8 a 48.8% (p/p) [30]; los ácidos oleico y linoleico son los principales contribuyentes de los ácidos grasos insaturados. El aceite de palma crudo contiene entre 500 y 700 mg/kg de carotenoides (principalmente las formas α y β), y 600-1000 mg /kg de tocoferoles (principalmente tocotrienoles). Los procesos de oxidación hacen que muchos de sus componentes sufran un proceso

de degradación y el aceite cambie sus propiedades con el tiempo, lo que repercute en la disminución de los efectos funcionales asociados con dichos compuestos.

El enriquecimiento (o fortificación) consiste en aumentar de forma controlada el contenido de micronutrientes esenciales, es decir, de vitaminas y minerales (incluidos los oligoelementos) en un alimento, a fin de mejorar la calidad nutricional de éste con un riesgo mínimo para la salud. Moléculas antioxidantes individuales o sus mezclas se utilizan actualmente en la industria de alimentos para proteger los productos de la oxidación. Esta estrategia tiene por objeto limitar (i) la generación de productos indeseables, especialmente los procedentes de la oxidación de lípidos, que tienen un impacto a nivel organoléptico (enranciamiento) y (ii) la disminución de los valores nutricionales (pérdida de ácidos grasos esenciales). La modificación de los compuestos polifenólicos agrega cadenas de tipo alifático que contribuyen a una mejor interacción entre las fases del componente lipídico y el agente protector eliminando los problemas de homogenización de componentes en las formulaciones y potencializando el uso y su efecto antioxidante.

La biodisponibilidad de los polifenoles depende de su estructura química, la cual determina su absorción intestinal y metabolización ^[4]. Una vez ingeridos, la mayoría de los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular, como pueden ser algunos ácidos fenólicos y polifenoles monoméricos y diméricos, se mantienen estables en condiciones ácidas resistiendo la hidrólisis ácida del estómago. Así llegan intactos al intestino delgado donde son absorbidos de manera parcial o total o metabolizados y excretados rápidamente ^[31].

2.8. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La oxidación de las grasas es la forma más común de deterioro de los alimentos después de las alteraciones producidas por microorganismos. Con la oxidación, aparecen olores y sabores indeseables, se altera el color y la textura, y desciende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados.

Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud.

La reacción de oxidación es una reacción en cadena, que una vez iniciada, continúa acelerándose hasta la oxidación total de las sustancias sensibles. El mecanismo de peroxidación lipídica es iniciado por un radical suficientemente reactivo que ataca al enlace RH sensible. Ec. 9:



El oxígeno molecular reacciona rápidamente con el producto de la reacción 1 (R^\bullet) dando como producto el radical peroxilo (ROO^\bullet). Ec. 10:



La formación de radicales peroxilo conduce a la producción de hidroperóxidos orgánicos, los cuales a su vez pueden abstraer hidrógenos de otra cadena lipídica, de la misma manera en que ocurre la reacción de iniciación Ec. 11:



Esta etapa es conocida como propagación implicando que los radicales iniciadores reactivos produzcan otras especies de radicales (alquilo, alcoxilo y peroxilo) causantes de la peroxidación de lípidos

El radical alquilo se estabiliza por reordenamiento en un dieno conjugado que es producto relativamente estable. Hidroperóxido de lípidos ($ROOH$) es el primer producto estable de la reacción de peroxidación de lípidos. En condiciones en que se inicia de forma continua la peroxidación lipídica, la etapa de terminación conduce a la destrucción de dos radicales libres a la vez Ec. 12.



En presencia de iones de metales de transición, ROOH tienden a aumentar la generación de radicales e iniciar la peroxidación de lípidos por mecanismos redox. Ec. 13 y 14. ^[32]:



2.9. MERCADO DE ACEITE DE PALMA.

Según la revista portafolio ^[45] Colombia se ubica como el primer productor de aceite de palma en América y el cuarto en el mundo. La industria del aceite de palma es actualmente líder a nivel mundial en la provisión de aceites y grasas y uno de los sectores con mayor potencial por la versatilidad de usos y aplicaciones de sus productos, tales como aceite de cocina, grasas especiales, sustitutos de manteca de cacao y de grasas animales, margarinas, productos de aseo, jabones, detergentes, cosméticos, cremas dentales, velas, lubricantes, pinturas, biocombustibles y energía eléctrica, entre muchos otros. El país cuenta con 58 núcleos palmeros distribuidos en las cuatro zonas palmeras: la zona norte la componen la Costa y el Cesar; en la zona central se encuentran el Sur del Cesar, Bucaramanga y Norte de Santander; la zona oriental está compuesta por el Meta y Casanare; y el suroccidente abarca Tumaco y Caquetá.

El cultivo de la palma de aceite ha tenido un considerable crecimiento reportándose un aumento de producción que pasó de 6,6 millones de hectáreas en 2000 a 10,5 millones en 2007. El mayor crecimiento se registró en países como Indonesia, Tailandia y Ecuador. Colombia participa con el 1,9% del área total sembrada y

también muestra que Indonesia y Malasia ocupan el primero y segundo lugares, con un 78,8% del total del área en producción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Tabla 3. Lista de materiales, reactivos y equipos

NOMBRE DEL REACTIVO O EQUIPO	ESPECIFICACIONES
REACTIVOS	
Acido 3-4 dihidroxihidrocinamico	Sigma Aldrich, 98%
Butanol	Merck, analítico.
Octanol	Merck ,analítico
Dodecanol	Merck 98%
Hexadecanol	Sigma Aldrich 99%
<i>Candida antártica</i> lipasa B	Sigma Aldrich
Trolox®	Merck 99%
Butanona	Merck 99%
Acetona	Merck, analítico
Hexano	Merck, analítico
Fosfato sódico monobásico	JT Baker 99,6%
Fosfato sódico dibasico	JT Baker
Fluoresceína	Sigma Aldrich
AAPH	Sigma Aldrich
Silica gel	Merck (0,2-0,5 mm)
Acetato de etilo	Merck 99,8 %
MATERIALES	

Tubos de ensayo	7 mL
Balones	5-10-25-100-1000 mL)
Columna	Columna RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)
Micropipetas	200-2000-5000 μ L
Transferpette multicanal	30-300 μ L

EQUIPOS

Estufa	Marca Binder
Baño de ultrasonido	LC-30H marca Ultrasonic,
Agitador Vortex	SchottGerate
Balanza analítica	AB204-S marca Mettler-Toledo
Espectrofotómetro	Espectrofotómetro Genesys 20 marca Thermo Spectronic
HPLC	HPLC Dionex UltiMate 3000. Thermo Scientific con detector UV-Vis
Espectrofluorímetro	Fluoroskan Ascent Thermo Scientific

3.2. SÍNTESIS DE ÉSTERES DEL DHCA

3.2.1. Actividad del agua

La actividad del agua de la lipasa *Candida antártica* se equilibró a un valor de 0,33 empleando un desecador en el cual se puso una solución saturada de MgCl₂ y seguidamente se selló de manera hermética durante 15 días. Durante este tiempo, se garantiza que el sistema alcanza el equilibrio y que las partículas de lipasa alcanzan la actividad requerida [33]. El valor de 0,33 se fijó con base en trabajos realizados por López – Giraldo et al. (2007) [33], en los cuales se demostró que esta

actividad es la más apropiada para llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica empleando este tipo de catalizador.

3.2.2. Esterificación enzimática catalizada por *C. antártica* lipasa B

La esterificación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Sabally *et al.* (2005) [35] y tomando como referencia las condiciones óptimas de reacción propuestas por Yang *et al.* (2012). La reacción de lipofilización de DHCA con alcoholes grasos se llevó a cabo en botellas herméticas de 50 ml, equipadas con un tapón de rosca para evitar la evaporación de disolvente. La reacción se llevó a cabo mezclando 0,5 mmol de DHCA y 1,8 mmol de alcohol graso (C4, C8, C12, C16) en 10 ml de mezcla de disolventes orgánicos hexano: 2-butanona en relación (65:35; v/v). DHCA se preparó como una solución fresca 500 mM en 2-butanona antes de añadir al hexano. La reacción se inició mediante la adición de 238 mg de Novozym 435 y 100 mg de tamices moleculares de 3 Å (valores que se mantuvieron constantes para todas las esterificaciones). La reacción se realizó a 60 °C dentro de una estufa, con agitación de 300 rpm durante un periodo de 96 horas.

3.2.3. Seguimiento por HPLC

El análisis por HPLC se realizó empleando un cromatógrafo de alta eficiencia Dionex U-3000 equipado con un detector UV-vis (**Figura 7**). La fase estacionaria empleada fue una columna RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Cada 12 horas se tomaron 10 µL de mezcla de reacción y se disolvieron en 990 µL acetonitrilo, las impurezas fueron retiradas utilizando filtros de PTFE de 0,45 µm antes de inyectarse al equipo. Seguidamente se eluyeron en modo isocrático utilizando como fase móvil acetonitrilo durante un periodo 20 minutos y con flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 284 nm.

Figura 7. Cromatógrafo de líquidos Grupo de investigación en Ciencia y tecnología de alimentos (CICTA UIS)



3.2.4. Purificación de ésteres

Para la purificación de los ésteres se utilizó una columna cromatográfica (18 mm x 25 cm) utilizando como eluyente una mezcla de hexano/ acetato de etilo (80:20 v:v) y se recogieron fracciones consecutivas de aproximadamente 7 mL (**Figura 8**), el empaquetamiento de la columna se realizó disolviendo la sílica gel en hexano hasta una altura aproximada de 4 veces su diámetro . Posteriormente se realizó la identificación de los compuestos por cromatografía de capa delgada en placas de sílica gel (Kieselgel 60 F254) usando como fase móvil una mezcla de solventes (hexano/acetato de etilo/metanol) (80:15:5). Las placas se revelaron utilizando una solución en spray al 5% (v/v) de ácido sulfúrico en etanol, mediante calentamiento por 10 minutos a 150°C, y revelado con yodo para el caso del dihidrocafeato de butilo. Una vez fueron identificadas las fracciones, se reunió el producto de esterificación y se retiró el exceso de solvente utilizando rotoevaporación a 40°C y presión de 360 mbar.

Figura 8. Purificación de ésteres del DHCA a través de cromatografía en columna



3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los análisis de RMN ^1H y ^{13}C , se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker con avance de 400 MHz. El ácido de partida (DHCA) se disolvió en agua deuterada y sus ésteres se disolvieron en cloroformo deuterado utilizando una cantidad aproximada de 30 mg de cada compuesto. El análisis de espectros se realizó a través del programa MestreNova.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los ésteres se midió principalmente por el método ORAC lipofílico y se contrastó por medio de DDPH radical. Las muestras fueron

conservadas en refrigeración y protegidas de la luz antes de su medición y su capacidad antioxidante se expresó en equivalentes Trolox®

3.4.1. Capacidad antioxidante ORAC lipofílico

Los esteres purificados y secados en atmósfera de nitrógeno se disolvieron en 250 μ l de acetona y aforados a 1 ml empleando una solución al 7% (p/v) de β -ciclodextrina metilada en acetona-agua (1:1 v/v). La solución de β -ciclodextrina se usó así mismo para disolver tanto el Trolox como el blanco. A continuación se adicionaron los reactivos en los pozos de una microplaca oscura de 96 lugares, en el siguiente orden: 150 μ l de solución de fluoresceína [8.16×10^{-5} mM], 25 μ l de Trolox® [3.125 – 15 μ M] (curva patrón) y éster en las mismas concentraciones [3.125 – 15 μ M] y finalmente se agregó 25 μ L de solución de AAPH [153mM]. La fluoresceína y el AAPH se prepararon en solución buffer de fosfato pH 7,4; el total de cada pozo fue 200 μ L. Antes de añadir el AAPH, la microplaca con la fluoresceína y el antioxidante fue calentada a 37°C durante 10min.

Inmediatamente después de la adición del iniciador de radicales libres (AAPH), se midió la disminución de la fluorescencia en espectrofluorímetro (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific **(Figura 9)** cada minuto durante 1 hora, con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520nm, respectivamente. El tratamiento estadístico de los datos fue analizado mediante una plantilla diseñada con programa excel.

Figura 9. Espectrofluorímetro. Fluoroskan Ascent. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA UIS)



3.4.2. Capacidad antirradicalaria DDPH

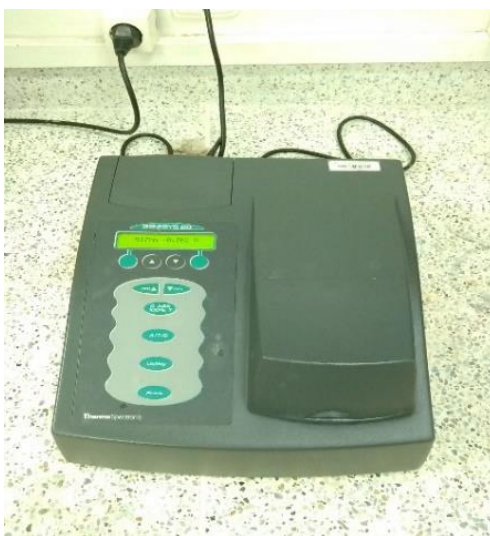
El procedimiento para la determinación de parámetros fijos de actividad antirradical se realizó mediante espectrometría visible siguiendo el procedimiento propuesto por Brand-Williams et al (1995), con ligeras modificaciones.

En este ensayo se monitoreo la disminución de la absorbancia del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) a 517 nm en presencia de los alquil ésteres del DHCA. Las soluciones se prepararon como sigue: 100 μ l de compuesto a analizar (ésteres del ácido dihidrocafeico, disueltos en metanol) se agregaron en una cubeta de plástico y se completó con 3900 μ L de solución DDPH 60 μ M disuelto en metanol; estas muestras fueron puestas en la oscuridad a 25°C durante media hora; seguidamente se realizó la medición de la absorbancia a 517 nm empleando un espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic (**Figura 10**).

El porcentaje de disminución de la absorbancia se calculó mediante la siguiente expresión: % Inibición = $[(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}) / \text{A blanco}]$ y su valor fue expresado en relación a una curva de calibración con Trolox® preparado bajo las

mismas condiciones de la muestra en concentraciones comprendidas entre 0,0625 y 1mM.

Figura 10. Espectrofotómetro Genesys 20, Thermo Spectronic. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA UIS)



3.5. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS COEFICIENTES DE DISTRIBUCIÓN OCTANOL / AGUA

La determinación experimental de los coeficientes de partición octanol / agua se realizó de la siguiente manera:

En un tubo Eppendorf se adicionan 750 uL de octanol y 750 uL de agua. El sistema se agitó usando un mezclador vórtex durante 30 minutos (5 minutos de agitación y 10 minutos de reposo), seguidamente la mezcla se centrifugó a 10000 g durante 30 minutos a 4 °C. Después de esta centrifugación se añadieron cantidades de antioxidante sobre la fase superior cuyas concentraciones estuvieron comprendidas entre 0 y 10 mM y la mezcla se agitó en vórtex siguiendo el procedimiento inicial, (5 minutos de agitación y 10 minutos de reposo) durante una hora, y se centrifuga a 10000 g durante 30 minutos. Finalmente cada una de las fases líquidas fueron

separadas y analizadas por HPLC. El coeficiente de distribución se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$p = \frac{\frac{g \text{ antioxidante fase octanol}}{g \text{ octanol}}}{\frac{g \text{ antioxidante fase acuosa}}{g \text{ agua}}} \quad (15)$$

3.6. DOSIFICACIÓN DEL ÉSTER DEL ÁCIDO DHCA EN ACEITE DE PALMA Y ENSAYO ORAC-FL LIPOFÍLICO

Luego de realizar las respectivas pruebas de capacidad antioxidante de los ésteres sintetizados, se escogió la molécula que presentó mayor potencial protector y se procedió a la dosificación en aceite de palma comercial. La dosis a emplear se determinó según parámetros del Codex alimentario y tomando como referencia la cantidad máxima utilizada con antioxidantes artificiales (BHT, BHA, BTHQ) cuya formulación está entre 100 -200 mg/kg para uso en aceites comestibles.

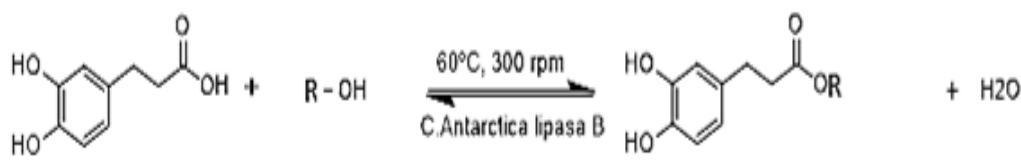
Los antioxidantes se incorporaron mediante ultrasonido por un periodo de 30 minutos y a una concentración de 200 ppm. Posteriormente se disolvieron en solución de ciclodextrina y se les realizó el ensayo ORAC para determinar el efecto de la dosificación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTOS DE REACCIÓN DE ÉSTERES DEL DHCA

La reacción general de esterificación se observa en la Figura 11. El tiempo total de la reacción fue de 96 horas, tomando como base los parámetros optimizados para el dihidrocafeato de octilo propuesto por Yang et al. (2012) [35]. Bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento, para el dihidrocafeato de octilo, del 78% frente a un 94,5 % reportado por el mismo autor.

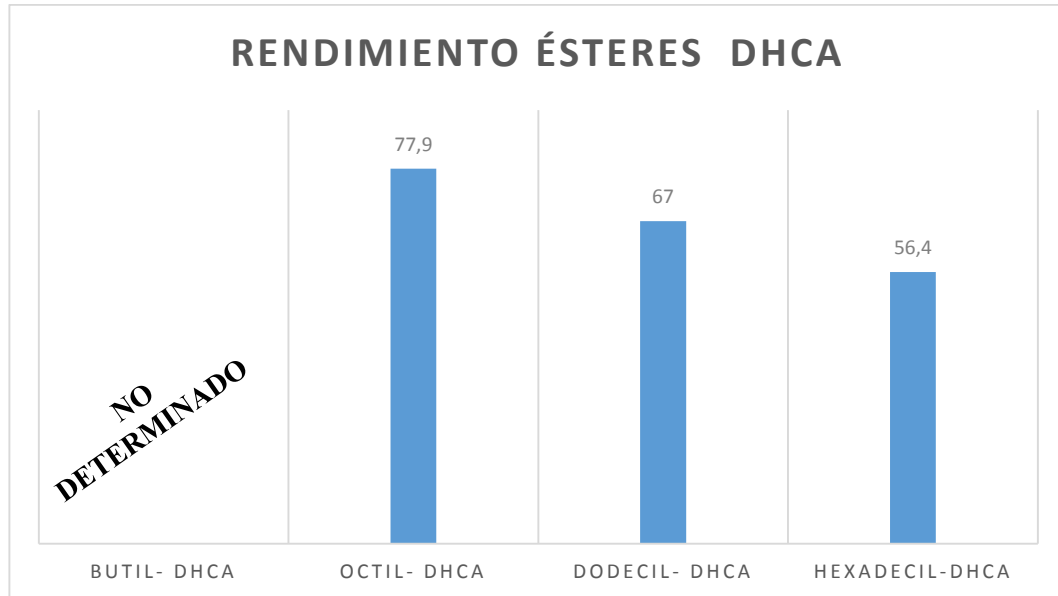
Figura 11. Reacción de esterificación del DHCA con alcoholes alifáticos R= (C4-C8-C12-C16)



4.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA CADENA CARBONADA SOBRE EL RENDIMIENTO DE ESTERIFICACIÓN DEL DHCA

Se observó una disminución en los rendimientos de esterificación a medida que se aumentó la longitud de la cadena del alcohol adicionado (**Figura 12**). En el caso del dihidrocafeato de butilo no fue posible determinar el rendimiento de esterificación ya que existió solapamiento de picos cromatográficos, sin embargo la identificación de este producto se hizo a través cromatografía de capa delgada (**Figura 13**).

Figura 12. Porcentaje de esterificación del DHCA, después de 96 horas de reacción a 60°C y 300 rpm



Entre las posibles explicaciones para la tendencia en la disminución del rendimiento se encuentran las siguientes:

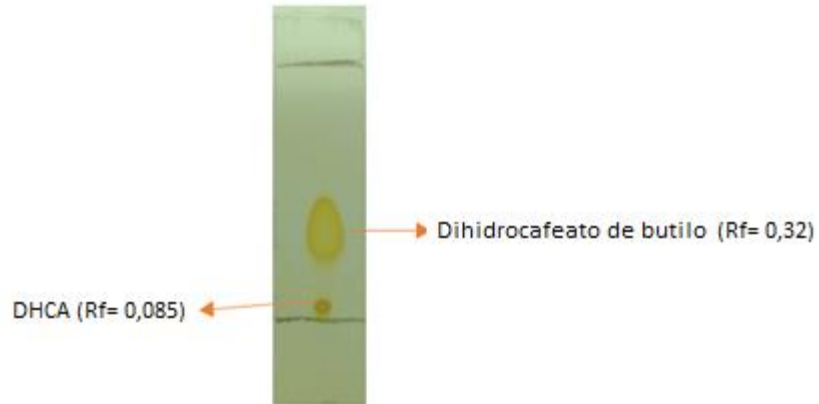
(i) Sitio activo de la enzima: De acuerdo con Uppenberg *et al.* (1994) ^[36], el sitio activo de la lipasa *C. antártica* B es accesible al disolvente y al sustrato a través de un estrecho canal hidrófobo. Las lipasas poseen un complejo mecanismo de reacción, en medios acuosos homogéneos se encuentran en un cierto equilibrio con un sitio activo abierto y uno cerrado, ligeramente desplazado hacia este último. Sin embargo, en presencia de una interface hidrofóbica, sufren un fenómeno de activación interfacial, proceso mediante el cual se desplaza el equilibrio conformacional dando lugar a la fijación de la conformación abierta de la lipasa sobre dicha interface ^[37]. Es posible que el incremento estérico de las moléculas disminuya la interacción del sustrato con el sitio activo de la lipasa e incremente la conformación cerrada de la *lid*, indispensable para que ocurra la esterificación.

(ii) Uso del solvente binario: Según Yang *et al.* (2012)^[35] quien investigó el uso del solvente binario en reacciones de esterificación con *Candida antártica* lipasa B los mejores rendimientos se obtenían cuando la proporción del solvente hexano/butanona estaba alrededor de (65:35) (v:v), cuando el hexano aumentaba en relación con la butanona los rendimientos tendían a disminuir por efecto de la poca solvatación del solvente hacia el sustrato. Cuando se agrega el alcohol, este ejerce un papel dual de sustrato y solvente, por lo tanto la balanza existente entre la mezcla binaria se ve modificada por la sinergia que se establece entre las fases no polares. A medida que se incrementa la cadena del alcohol graso (sin que se cumpla en todos los casos) el rendimiento se verá disminuido ya que el solvente polar estará en menor proporción en el medio reaccionante y la solubilidad del sustrato baja considerablemente.

4.3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA

Las fracciones recogidas por cromatografía en columna se identificaron a través de capa delgada (**Figura 13**). Los valores de referencia para cada uno de los compuestos fueron los siguientes: DHCA ($R_f = 0,085$), dihidrocafeato de butilo ($R_f = 0,32$), dihidrocafeato de octilo ($R_f = 0,42$), dihidrocafeato de dodecacilo ($R_f = 0,45$) y dihidrocafeato de hexadecacilo ($R_f = 0,51$).

Figura 13. Identificación de compuestos a través de cromatografía de capa delgada



A partir de los valores de relación frontal (Rf) se observa una disminución de la polaridad a medida que aumenta la cadena carbonada lo que hace que los compuestos sean absorbidos por la fase estacionaria (polar) a distancias cada vez mayores del punto de siembra

4.4. CARACTERIZACIÓN DE ÉSTERES DEL DHCA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

4.4.1. RMN ¹H Y ¹³C

En las Figuras 14 y 15 se muestran comparativamente los espectros de RMN ¹H y ¹³C del DHCA y el dihidrocafeato de butilo. El aumento en la cadena carbonada produce la aparición de nuevas señales correspondientes a carbonos metílicos y metilénicos que confirman la presencia del éster. La adición de la cadena carbonada produce una aparición de señales continuas (multipletes) en el espectro RMN ¹H causada por la interacción de los espines magnéticos de estos dos tipos de protones diferentes que interactúan entre sí.

Figura 14. Espectros de RMN ¹H del DHCA y dihidrocafeato de butilo

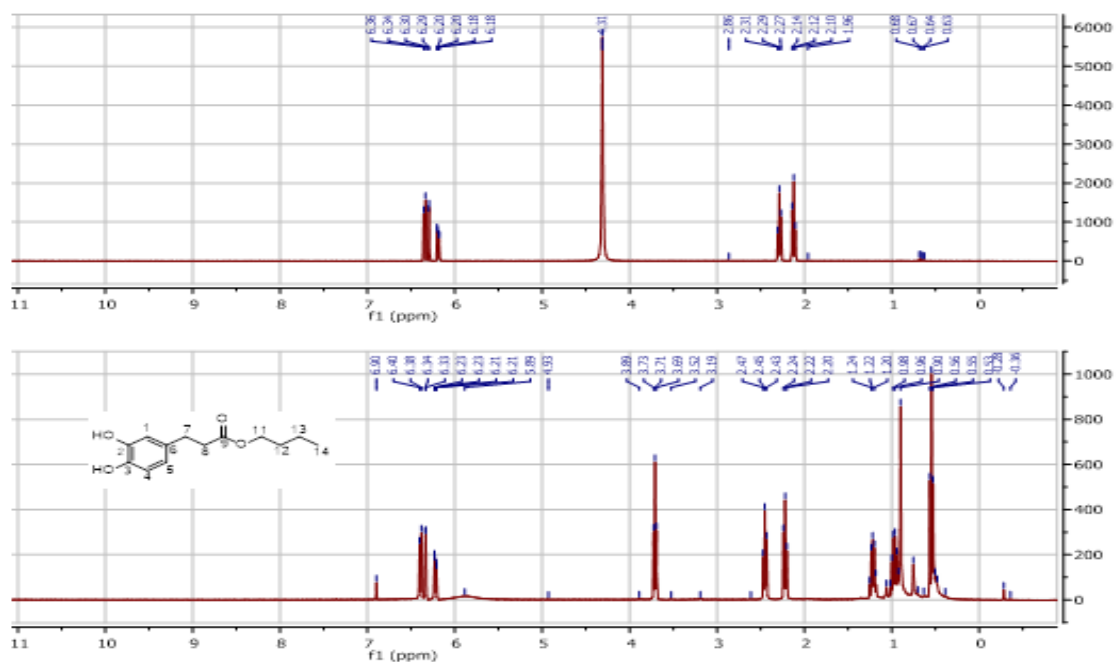
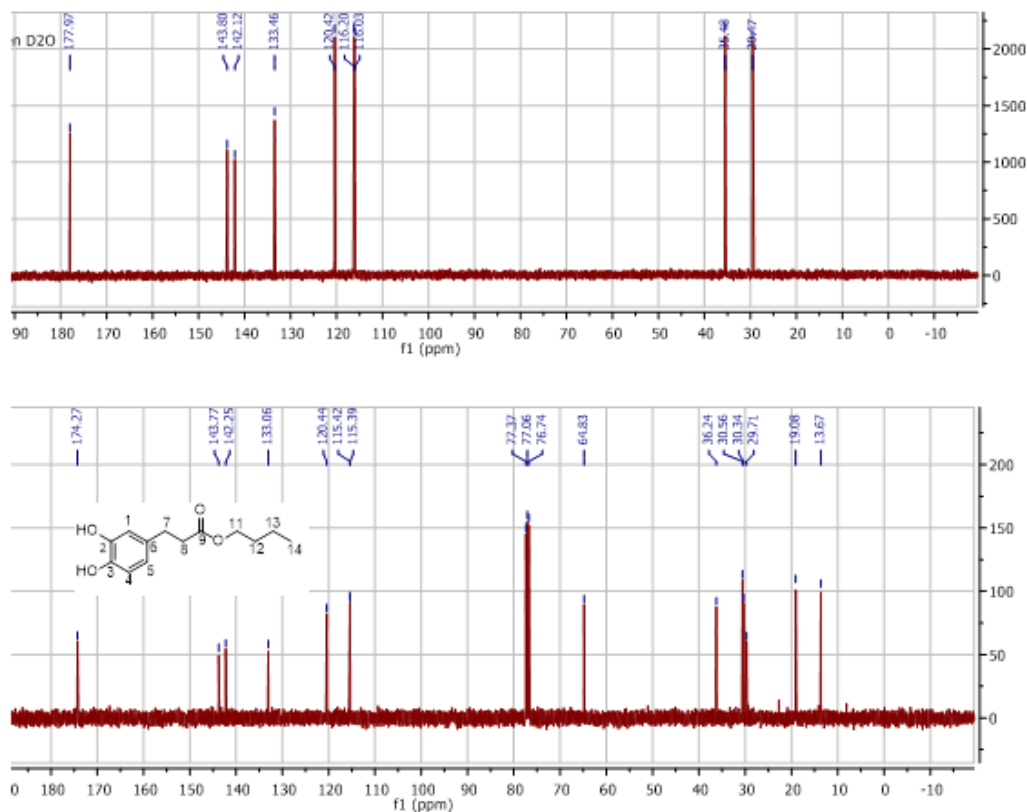


Figura 15. Espectros de RMN ^{13}C del DHCA y dihidrocafeato de butilo



4.4.1.1. Ácido dihidrocafeico. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.32, 6.34 (ArH), 6.30 (ArH), 4,31 (ArOH) 2.29 (t, $J = 7.4$ Hz, CH_2), 2.12 (t, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 177.97, 143.80 (C-9), 142.12 (C-6), 133.46 (C-1), 120.42 (C-5), 116.11 (d, $J = 17.5$ C-4), 35.48 (C-7), 29.47 (CH_3)

4.4.1.2. Dihidrocafeato de butilo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.90, 6.22 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, -ArH), 5.89, 3,71 (ArOH), 3.31 (t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{OCH}_2$), 2.45 (t, $J = 7.6$ Hz, $-\text{CH}_2$), 2.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 8H $-\text{CH}_2$) 1.22 – 0.83 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.50 (t, $J = 46.2, 22.0$ Hz, CH_3) ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.27 (s), 143.77 (C-9), 142.25 (C-6), 133.06 (C-1-4), 120.44 (C-5), 115.40 (d, $J = 2.6$ Hz C-4), 77.37 (C-10), 76.74 (C-12), 64.83 (C-8), 19.08 (C-10), 13.67 (CH_3).

4.4.1.3 Dihidrocafeato de octilo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.36, 6.21 (dd, $J = 8.1\text{-ArH}$ 1.8 Hz), 3.70 (t, $J = 6.7$ Hz, 39H $-\text{CH}_2$), 3.70 (ArOH), 3.33 (t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{OCH}_2$), 2.45 (t, $J = 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2$), 2.22 (t, $J = 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2$), 1.4 – 0.45 (m, $-\text{R-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.52 (t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.41 (s), 143.82 (C-9), 142.30 (C-6), 132.99 (C-1), 120.39 (C-5), 115.41 (d, $J = 1.4$ Hz C-4), 77.40 (s), 77.08 (s), 76.77 (C-12), 65.21 (C-8), 36.26 (15), 31.79 (C-8), 30.34 (C-7), 29.71 (s), 29.19 (d, $J = 3.1$ Hz), 28.53 (s), 25.88 (s), 22.65 (s), 14.09 (C- H_3).

4.4.1.4 Dihidrocafeato de dodecilo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.36, 3.70 (t, $J = 6.7$ Hz, CH_2), 3.70 (ArOH), 2.46 (t, $J = 7.7$ Hz, CH_2), 2.22 (t, $J = 7.7$ Hz, CH_2), 1.25 (dd, $J = 17.9$, CH_2), 1.07 (d, $J = 5.3$ Hz, 26H), 0.90 (260 CH_2CO), -0.05 (m, $\text{R-CH}_2\text{-CH}_3$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.96 (s), 143.77 (C-9), 142.24 (C-6), 133.12 (C-1), 120.41 (C-5), 115.32 (d, $J = 4.7$ Hz C-4), 77.35 (C-12), 77.03 (s), 76.72 (s), 65.02 (C-13), 63.27 (C-8), 59.54 (C-7), 38.16 (s), 36.22 (s), 32.61, 31.93 (s), 31.24 (C-7), 30.35 (s), 29.86 – 29.16 (C-17), 28.57 (C-19), 22.70 (C-18), 14.12 (C- H_3).

4.4.1.4. Dihidrocafeato de hexadecilo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.37, 3.69 (t, $J = 6.7$ Hz, CH_2), 3.31 (t, $J = 6.7$ Hz, CH_2), 2.46, 3, 71 (ArOH), (t, $J = 7.7$ Hz, CH_2), 2.22 (t, $J = 7.7$ Hz, CH_2), 1.18 0.89 CH_2CO), 0.75 (s, 3H), 0.52 (t, $J = 6.7$ CH_3), ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.41 (s), 143.82 (C-9), 142.30 (C-6), 132.99 (C-1), 120.39 (C-5), 115.41 (d, $J = 1.4$ Hz C-4), 77.40 (C-13), 77.08 (s), 76.77 (C-12), 65.21 (C-8), 36.26 (C-15), 31.79 (C-8), 30.3 (C-7), 29.71 (C-17), 29.19 (d, $J = 3.1$ Hz (22-24), 28.53 (C-19), 25.88 (C-21), 22.65 (C-25), 14.09 (CH_3).

4.5. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ORAC LIPOFÍLICO

Se midió la capacidad antioxidante de cada uno de los ésteres sintetizados de manera independiente. Los resultados se expresaron en relación a curva de calibración de Trolox® que se utiliza como parámetro de comparación utilizando valores comprendidos entre (3,25 y 15 μM), intervalo en el cual las curvas llegaban hasta valores cercanos a cero asegurando el cierre total de la cinética de reacción. Además, tanto el Trolox® como los antioxidantes estudiados presentaban patrones de linealidad en el intervalo estudiado.

Cada uno de los 60 puntos que se utilizaron para modelar la cinética de la disminución de la fluorescencia por acción del AAPH, corresponde al promedio de cuatro mediciones, analizadas estadísticamente por medio de una plantilla de análisis de datos diseñada mediante el programa Excel.

En las Figuras (16) y (17) se muestra el comportamiento del Trolox® y cada uno de alquil ésteres estudiados.

Figura 16. Comportamiento cinético de disminución de la fluorescencia en presencia del Trolox® para concentraciones comprendidas entre (3,12 y 15 μM)

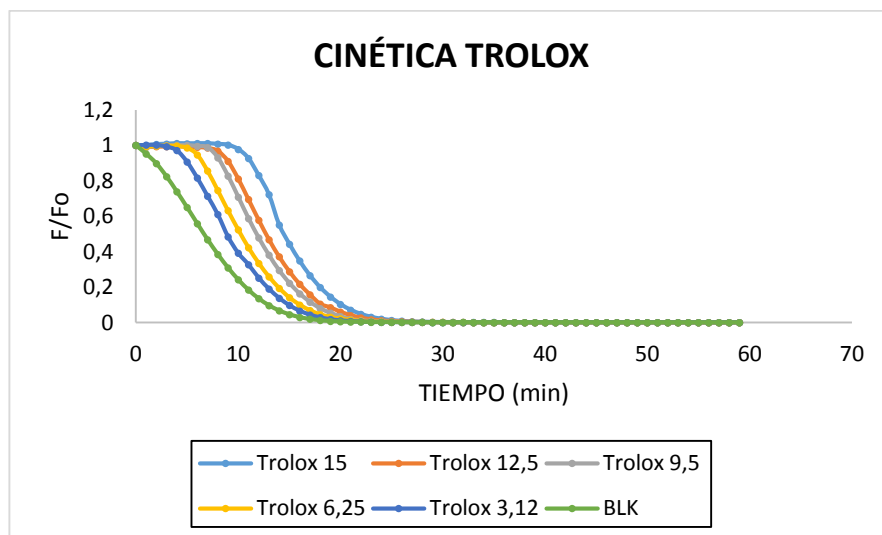
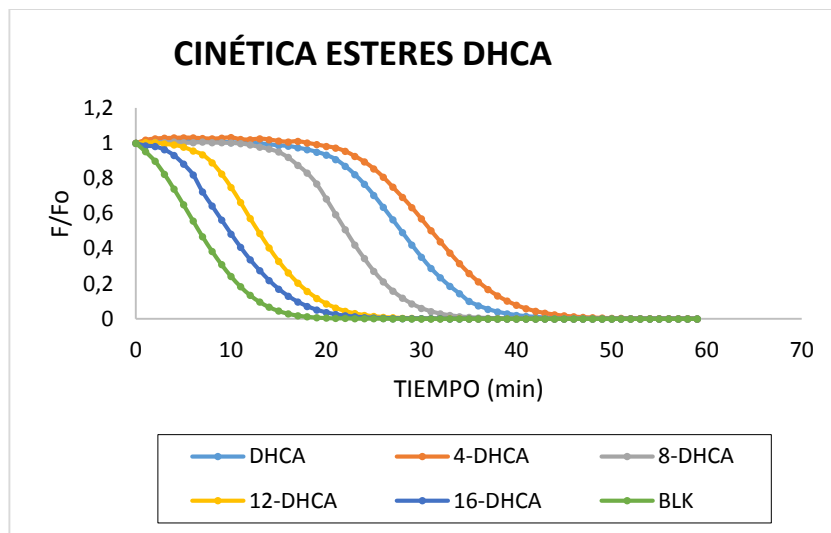


Figura 17. Cinética de disminución de la fluorescencia en presencia de antioxidantes sintetizados. Concentración (12,5 µM).

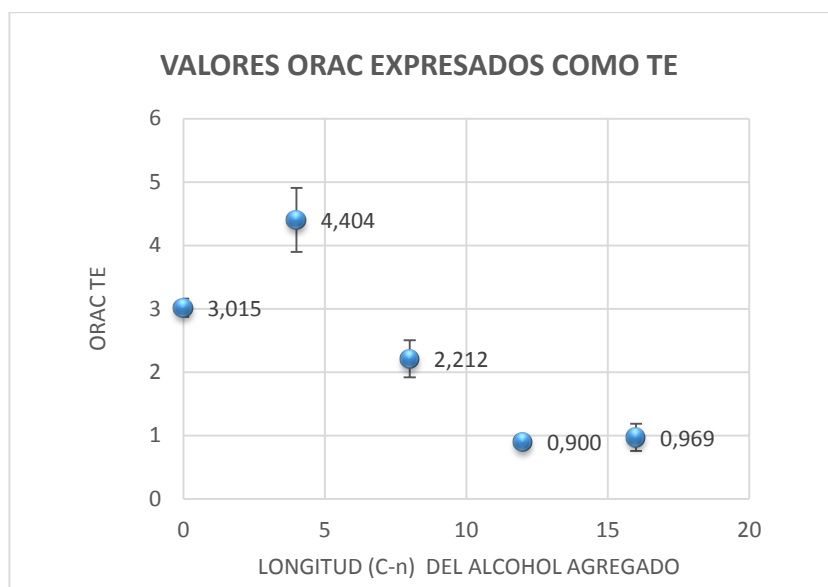


Las áreas bajo la curva fueron calculadas empleando el método de integración de Simpson y la capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación: (Huang et al. 2002) [38]

$$\text{Valor ORAC} = \frac{AUC \text{ muestra} - AUC \text{ blanco}}{AUC \text{ trolox} - AUC \text{ blanco}} * \frac{\text{Molaridad trolox}}{\text{Molaridad de la muestra}} \quad (16)$$

Los resultados mostraron que solo el dihidrocafeato de butilo superó en un 45.7% la capacidad antioxidante del precursor. A su vez el aumento en la longitud de la cadena carbonada agregada (C8- C12- C16) disminuyó la capacidad antioxidante en 26,63%, 70,14 % y 67,86 %, respectivamente.

Figura 18. Comparación de valores Trolox® equivalentes para los diferentes ésteres del DHCA sintetizados



Las desviaciones estándar muestran una diferencia significativa entre el valor de la capacidad antioxidante del DHCA y sus respectivos ésteres. A su vez muestran que los ésteres de mayor peso molecular (cadena agregada de 12 y 16 carbonos) presentan valores muy cercanos entre sí sin que haya una diferencia significativa en sus mediciones.

4.6. EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA CADENA CARBONADA SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA A TRAVÉS DEL ENSAYO ORAC LIPOFÍLICO

Desde un punto de vista estructural, las propiedades de los polifenoles son esencialmente las de fenol en sí. El fenol tiene una capacidad antioxidante baja, pero las sustituciones por grupos alquílicos en las posiciones 2,4,6 producen un aumento de la densidad electrónica por efecto inductivo aumentando la capacidad de reactividad hacia radicales lipídicos (*Macfaul et al. 1996*)^[39]

En el caso del dihidrocafeato de butilo la inclusión de una cadena alquílica de cuatro carbonos produce una estabilización por efecto inductivo, contribuyendo a la estabilización de la densidad electrónica y aumentando la capacidad antioxidante de la molécula. Por otro lado cuando el sustituyente es muy voluminoso (a partir del dihidrocafeato de octilo), aunque se produce una estabilización por efecto inductivo también ocurre un aumento del efecto estérico impidiendo que la molécula tenga mejor acceso hacia las especies oxidables.

Otro factor determinante a tener en cuenta en la medición de la capacidad antioxidante por el método ORAC lipofílico es el papel que cumple la β -ciclodextrina metilada en la homogenización de las disoluciones. El comportamiento de inclusión de antioxidantes en ciclodextrina es diferente para cada compuesto a pesar de sus similitudes estructurales (Jullian, 2009)^[40]. El DHCA y sus ésteres de bajo peso molecular (hasta 8 carbonos en longitud) presentan una buena solubilidad ya que las moléculas interaccionan adecuadamente con la parte hidrófoba de las ciclodextrinas sin que se generen mayores repulsiones con la parte hidrofílica. Estas afirmaciones están sustentadas en estudios realizados por Pawel et al. (2009)^[41] donde demostraron que la parte aromática de los ácidos cafeico y clorogénico era la que interactuaba con la cavidad interior de las cilodextrinas mientras que la parte menos polar de la molécula se proyectaba hacia el exterior. Cuando se produce la disolución en el medio acuoso de buffer fosfato la distribución de las moléculas de antioxidante es homogénea en su totalidad o en su gran mayoría ya que los compuestos están incluidos casi de manera total en la hidrófoba de las ciclodextrinas.

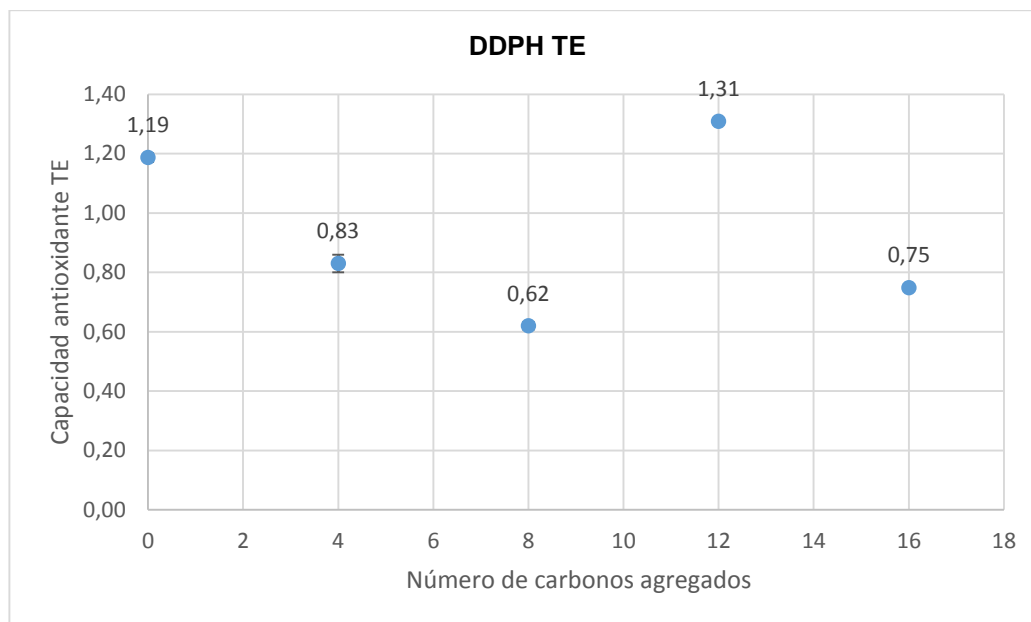
Por otro lado, cuando la molécula crece en tamaño e hidrofobicidad se generan repulsiones hidrofílicas al incrementarse la diferencia de polaridades. El aumento en la conformación estructural del antioxidante hace que la parte hidrófoba quede más expuesta hacia el exterior donde se generan repulsiones con el medio acuoso. Esto hace que las ciclodextrinas sean menos eficientes en trasportar las moléculas

del antioxidante a través del medio y que ocurra una saturación del antioxidante que no formó complejos de inclusión. A su vez la disolución con buffer fosfato produce un aumento significativo en las fuerzas de repulsión creando micropartículas dispersas que tienden a formar agregados o *cluster* (López Giraldo 2008). Por lo tanto como ocurre con el dihidrocafeato de dodecilo y de hexadecilo la capacidad antioxidante tiende a ser baja y a no presentar diferencias significativas ya que su disolución no ocurre de una manera homogénea presentándose problemas de linealidad en las pruebas.

4.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA POR DDPH

Como se ha expresado con anterioridad, no existe un consenso en lo que se refiere a métodos para determinar el potencial antioxidante de los compuestos, así que es de suma importancia poder evaluar un conjunto de moléculas empleando diferentes métodos. Con este fin, se empleó el método DDPH, que a diferencia del método ORAC, cuantifica la capacidad que tiene un compuesto a atrapar radicales libres. Para este ensayo, la mayor capacidad antirradicalaria fue obtenida para el dihidrocafeato de dodecilo (**Figura 19**). Sin embargo se observó que el dihidrocafeato de butilo (**Figura 19**) presentó el segundo valor más alto, guardándose una relación cercana con el ensayo ORAC lipofílico para esta molécula como agente protector contra radicales. Los demás ésteres no mostraron ninguna tendencia que pueda relacionarse directamente con la longitud de la cadena pero se observó que su capacidad antioxidante estuvo por debajo del valor del compuesto de partida (DHCA).

Figura 19. Capacidad antioxidante DDPH del DHCA y sus ésteres sintetizados



Según López Giraldo *et al.* (2009) ^[32] quien estudio la esterificación del ácido clorogénico y sus esteres además de la cinética del mecanismo DDPH, encontraron que al parecer durante las primeras etapas de reacción pueden verse implicados más de dos mecanismos que estabilizarían de manera diferente al DHCA y sus ésteres. Al igual que en la presente investigación, estos autores encontraron que el clorogenato de dodecilo presentó una capacidad antirradicalaria mayor en comparación con los demás ésteres sintetizados y este valor fue el más cercano a la actividad antirradicalaria presentada por el precursor (ácido clorogénico). Propusieron que los valores más altos podían deberse a la donación de múltiples grupos hidroxilo; además podría estar implicado un mecanismo de transferencia de electrones ^[43] que se sumaría al efecto sobre la capacidad antirradicalaria. Por lo tanto es posible que la estructura conformacional del dihidrocafeato de dodecilo permita que el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno sea más eficiente.

4.8. COEFICIENTE DE PARTICIÓN

El coeficiente de partición se determinó mediante la relación de las cantidades de antioxidante encontradas en las fases octanol/agua, medidas a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (**Tabla 4**).

Tabla 4. Coeficientes de reparto para el DHCA y sus ésteres.

Antioxidante	Fase polar (Agua) Cantidad (g)	Fase no polar (Octanol) Cantidad (g)	Coeficiente de reparto
DHCA	0,00162	0,00059	0,448
Dihidrocafeato de butilo	0,00015	0,00411	33,171
Dihidrocafeato de octilo	0,00008	0,00289	438,410
Dihidrocafeato de dodecilo	Trazas	0,0020	ND
Dihidrocafeato de hexadecilo	Trazas	0,0018	ND

El coeficiente de reparto presenta una idea clara de la interacción de los componentes hacia matrices acuosas o lipofílicas. La naturaleza polar del DHCA permite que tenga mayor afinidad hacia componentes hidrofílicos (esta una de las principales limitantes en la incorporación de matrices grasas) por lo tanto aunque la capacidad antioxidante es superior a otros ácidos polifenólicos e incluso a muchos antioxidantes sintéticos su uso es restringido por su solubilidad.

En el caso del dihidrocafeato de butilo la adición de una cadena carbonada de cuatro carbonos cambia drásticamente la polaridad del precursor produciendo una nueva

molécula con características anfifílicas, aunque con mayor afinidad hacia matrices lipídicas (**Tabla 4**), resolviendo el inconveniente para formularse en este tipo de medios. Esto se suma a que la inclusión de la cadena de cuatro carbonos produce un aumento en la capacidad antioxidante que la presentada por el precursor.

En el caso de los ésteres de cadena más larga (12 y 16 carbonos agregados), se observa una afinidad completa hacia la fase lipídica ya que la parte apolar de la molécula es mucho mayor restringiendo su afinidad hacia matrices acuosas. No obstante aunque no tendrían problemas para solubilizarse en aceites, los ensayos ORAC muestran una notable disminución en su capacidad antioxidante y por lo tanto su formulación debería hacerse en una mayor concentración para obtener buenos efectos de protección. En el caso del dihidrocafeato de dodecilo es necesario realizar pruebas complementarias para establecer su capacidad antioxidante de una manera más clara ya que el ensayo por DDPH muestra una notable respuesta de acción contra radicales. En la **Tabla 5** resumen las características principales para el DHCA y sus ésteres medidas a través del transcurso del trabajo.

Tabla 5. Resumen de las propiedades del DHCA y sus ésteres, medidas en el laboratorio

Compuesto	Rendimiento de esterificación	Capacidad antioxidante ORAC lipofílico	Ensayo con DDPH	Coefficiente de partición
DHCA	ND	3,015 ± 0,146	1,271± 0,014	0,4480
Dihidrocafeato de butilo	ND	4,404 ± 0,505	0,873 ±0,030	33,171
Dihidrocafeato de octilo	77,9	2,212 ± 0,293	0,601 ± 0,013	438,410
Dihidrocafeato de dodecilo	67,00	0,900 ± 0,075	1,313 ± 0,002	ND
Dihidrocafeato de hexadecilo	56,4	0,969± 0,216	0,740 ± 0,006	ND

4.9. EFECTOS DE LA FORMULACIÓN DEL ANTIOXIDANTE SOBRE LAS PROPIEDADES DEL ACEITE

Los ésteres que presentaron mayor capacidad antioxidante por las diferentes técnicas (ORAC lipofílico y DDPH) fueron el dihidrocafeato de butilo y el dihidrocafeato de dodecilo. Estos ésteres se formularon en una matriz de aceite de palma comercial en una concentración de 200 ppm (cantidad aprobada por el Codex alimentario) según lo sugerido por la empresa suministradora del aceite.

Se midió la capacidad antioxidante de las muestras de aceite dosificadas con los ésteres sintetizados, comparadas con la capacidad antioxidante de la TBHQ, aditivo sintético empleado normalmente para evitar la oxidación lipídica en este tipo de alimentos. Los resultados se muestran en las **Figuras 20, 21 y 22.**

Figura 20. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite dosificado con dihidrocafeato de dodecilo

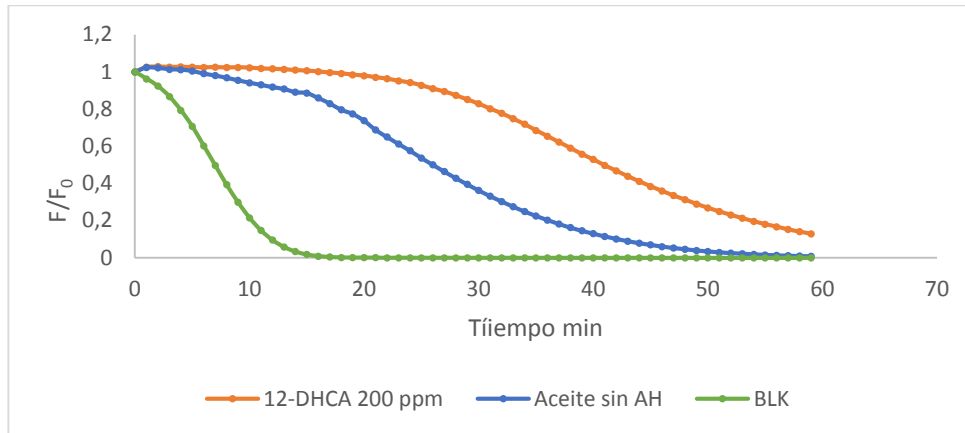


Figura 21. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite dosificado con dihidrocafeato de butilo

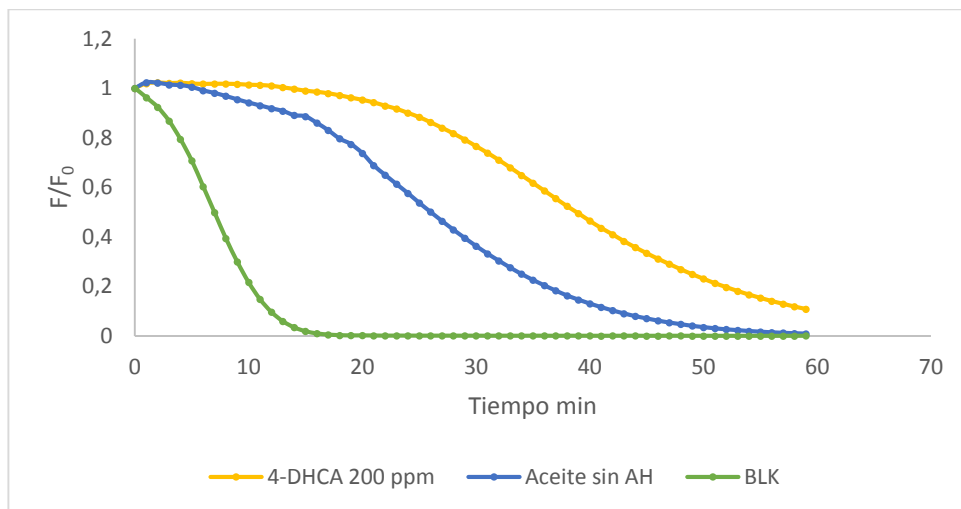
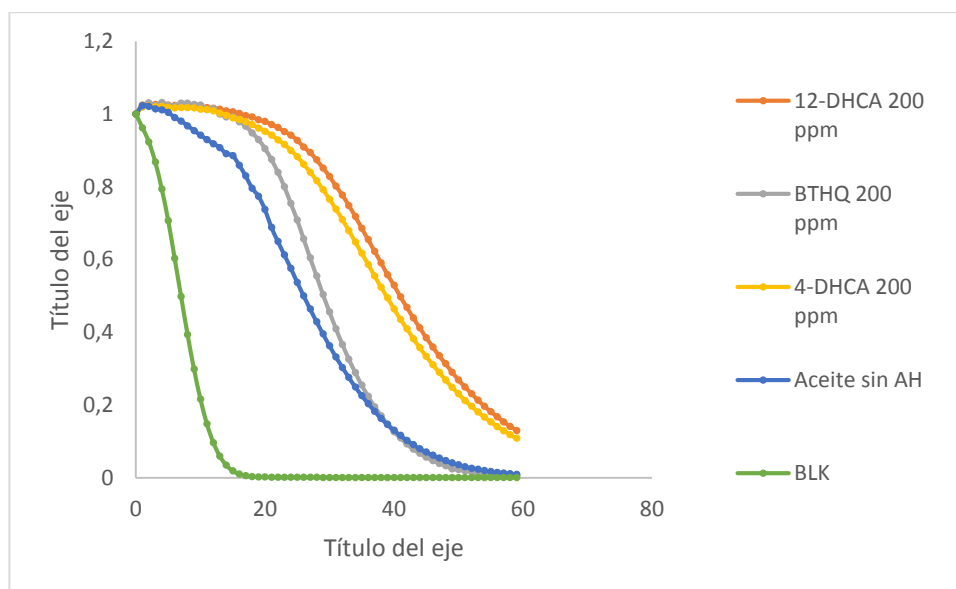


Figura 22. Cinética de disminución de la fluorescencia, en presencia del aceite dosificado con TBHQ y los ésteres del DHCA



La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto, produciendo efectos sinérgicos o inhibitorios ^[44]. Inicialmente puede decirse que la presencia del antioxidante en el aceite formulado es efectivo en la estabilización de los radicales libres. Sin embargo con el ensayo ORAC lipofílico no es posible determinar si el antioxidante ejerce una capacidad protectora que permita mantener inalteradas las propiedades físicas y químicas del aceite.

Los resultados muestran que tanto el dihidrocafeato de butilo como el dihidrocafeato de dodecilo generan una capacidad protectora contra los radicales que causan la oxidación de lípidos. En contraste con el antioxidante comercial (BTHQ), la formulación de antioxidantes polifenólicos modificados superó significativamente la capacidad antioxidante medida a través del ensayo ORAC lipofílico.

Los antioxidantes BTHQ, dihidrocafeato de butilo y dihidrocafeato de hexadecilo produjeron un aumento en la capacidad antiradical de 1,04; 1,63 y 1,15 veces mayor que el aceite sin ninguna formulación. De igual manera el dihidrocafeato de butilo fue el más efectivo superando la capacidad protectora del antioxidante sintético en 1,56 veces. Por lo tanto esta molécula presenta las mejores características para una aplicación práctica en la industria de grasas y aceites.

5. CONCLUSIONES

Se comprobó que la catálisis enzimática es una buena ruta para la obtención de ésteres del DHCA ya que no generó productos secundarios de reacción y además se alcanzaron buenos rendimientos.

Se encontró que el dihidrocafeato de butilo sintetizado mediante catálisis enzimática, es un posible candidato para ser utilizado como agente protector contra la oxidación en aceite de palma comercial y/o en matrices grasas similares. Además se necesitaría una cantidad menor para las dosificaciones, ya que sobrepasa significativamente la capacidad antioxidante del compuesto sintético utilizado actualmente (TBHQ) según lo muestran los ensayos ORAC.

Se estableció que el dihidrocafeato de dodecilo tiene una alta capacidad antiradical, según lo indicó el análisis hecho por DDPH. Por lo tanto este compuesto también podría ser objeto de estudio para aplicaciones reales en matrices lipídicas ya que además de su capacidad antioxidante, tiene buena afinidad hacia componentes grasos.

Se comprobó que los ésteres dosificados en el aceite son eficiente para estabilizar radicales libres, sin embargo no es posible establecer de manera clara con los ensayos realizados si ejercen un efecto protector sobre el aceite que permita mantener de manera prolongada las propiedades químicas y organolépticas sin alteraciones.

6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios que permitan conocer la eficiencia de la enzima y del solvente si se someten a procesos de reutilización lo que ayudaría a bajar los costos de producción y el impacto de los productos de desecho.

Realizar estudios que permitan evaluar la posibilidad de producir el dihidrocafeato de butilo a una mayor escala de manera sostenible, para que pueda competir directamente con los antioxidantes sintéticos.

Continuar con los estudios de seguridad y termoestabilidad del antioxidante, para poder utilizarlo en la industria alimentaria según las reglamentaciones establecidas.

Es necesario realizar estudios para establecer niveles adecuados de dosificación del antioxidante ya que en ocasiones su exceso puede ocasionar que la molécula actúe como prooxidante y potencie la formación de radicales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ceresana Market study. Antioxidants. [En línea]. http://www.ceresana.com/upload/Marktstudien/brochueren/Ceresana__Brochure_Market_Study_Antioxidants_UC-705E.pdf [Citado 20 de junio de 2014]
- [2] WILLIAMSON, Gary; MANACH, Claudine. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*, 2005, vol. 81, no 1, p. 243S-255S.
- [3] MANACH, Claudine, et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 2005, vol. 81, no 1, p. 230S-242S.
- [4] VILLENEUVE, Pierre. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, 2007, vol. 25, no 6, p. 515-536.
- [5] SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 2015, vol. 14, p. 111-125.
- [6] LAGUERRE, Mickaël, et al. Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of “phenolipids” in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, vol. 58, no 5, p. 2869-2876.
- [7] BÖHM, Fritz; EDGE, Ruth; GEORGE TRUSCOTT, T. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, vol. 59, no 1, p. 27.

- [8] GUTOWSKI, Mariusz; KOWALCZYK, Sławomir. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 2013, vol. 60, no 1, p. 1-16.
- [9] 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, vol. 19, no 6, p. 529-532.
- [10] COMPTON, David L.; LASZLO, Joseph A.; BERHOW, Mark A. Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000, vol. 77, no 5, p. 513-519.
- [11] STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F. N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, vol. 76, no 12, p. 1505-1510.
- [12] VOSMANN, Klaus; WEITKAMP, Petra; WEBER, Nikolaus. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of long-chain alkyl phenylpropanoates and phenylpropyl alkanoates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, vol. 54, no 8, p. 2969-2976.
- [13] FEDDERN, Vivian, et al. Synthesis of octyl dihydrocaffeate and its transesterification with tricaprylin catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011, vol. 50, no 12, p. 7183-7190.
- [14] CHEN, Hsiao-Ching, et al. Optimized synthesis of lipase-catalyzed octyl caffeate by Novozym® 435. *Industrial Crops and Products*, 2010, vol. 32, no 3, p. 522-526.

- [15] BUETTNER, Garry R.; JURKIEWICZ, Beth Anne. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation research*, 1996, vol. 145, no 5, p. 532-541.
- [16] GUTOWSKI, Mariusz; KOWALCZYK, Sławomir. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 2013, vol. 60, no 1, p. 1-16.
- [17] AKOH, Casimir C. Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. *Biotechnology letters*, 1993, vol. 15, no 9, p. 949-954.
- [18] MALCATA, F. Xavier, et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, vol. 14, no 6, p. 426-446.
- [19] STERGIU, Panagiota-Yiolanda, et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, 2013, vol. 31, no 8, p. 1846-1859.
- [20] CUVELIER, Marie-Elisabeth; RICHARD, Hubert; BERSET, Claudette. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1992, vol. 56, no 2, p. 324-325.
- [21] SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 2015, vol. 14, p. 111-125.
- [22] PRIOR, Ronald L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 2014.

- [23] OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen; PRIOR, Ronald L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, vol. 49, no 10, p. 4619-4626.
- [24] GÓMEZ, Marian A. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2007, vol. 8, no 4, p. 301-313.
- [25] PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, no 10, p. 4290-4302.
- [26] Estructura de las ciclodextrinas. [en Línea]. <http://scientiablog.com/2014/02/19/el-comienzo-de-una-edad> [Citado 23 de agosto de 2015]
- [27] CONTRERAS-GUZMAN, E. S.; STRONG III, F. C. Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion [Foods, feeds, chemical analysis, methods]. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (USA)*, 1982.
- [28] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, vol. 28, no 1, p. 25-30.

- [29] ARNAO, Marino B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, vol. 11, no 11, p. 419-421.
- [30] BASIRON, Yusof. Palm oil. *Bailey's Industrial oil and fat Products*, 2005.
- [31] DONOVAN, Peter J.; GEARHART, John. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, vol. 414, no 6859, p. 92-97.
- [32] REPETTO, Marisa; BOVERIS, Alberto; SEMPRINE, Jimena. *Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [33] GIRALDO, Luis J. López, et al. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 41, no 6, p. 721-726.
- [34] SABALLY, Kebba, et al. Lipase-catalyzed esterification of selected phenolic acids with linolenyl alcohols in organic solvent media. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2005, vol. 127, no 1, p. 17-27.
- [35] YANG, Zhiyong; GUO, Zheng; XU, Xuebing. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. *Food Chemistry*, 2012, vol. 132, no 3, p. 1311-1311
- [36] UPPENBERG, Jonas, et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 1994, vol. 2, no 4, p. 293-308.

- [37] GROCHULSKI, Pawel, et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no 17, p. 12843-12847.
- [38] HUANG, Dejian, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, vol. 50, no 16, p. 4437-4444.
- [39] MACFAUL, Philip A.; INGOLD, K. U.; LUSZTYK, J. Kinetic Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction from Phenol, Aniline, and Diphenylamine. The Importance of Hydrogen Bonding on Their Radical-Trapping (Antioxidant) Activities¹. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, vol. 61, no 4, p. 1316-1321.
- [40] MATTHAEI, Carolina Jullian. Estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con flavonoides: efecto sobre su actividad antioxidante. 2009. Tesis Doctoral. Universidad de Chile, Santiago.
- [41] GROCHULSKI, Pawel, et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no 17, p. 12843-12847.
- [42] LÓPEZ-GIRALDO, Luis J., et al. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, vol. 57, no 3, p. 863-870.
- [43] LITWINIENKO, Grzegorz; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2, 2-diphenyl-

1-picrylhydrazyl (dpph) in alcohols. *The Journal of organic chemistry*, 2003, vol. 68, no 9, p. 3433-3438.

[44] ALONSO, P., et al. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Alim Nutric*, 1999, vol. 13, no 2, p. 104-11.

[45] Mercado de aceite de palma. [En línea].
<http://www.portafolio.co/especiales/portafolio-21-aniversario/colombia-productor-aceite-palma-2014> [Citado 20 abril de 20015]

[46] RUSSELL, Nicholas J. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 2000, vol. 4, no 2, p. 83-90.

BIBLIOGRAFÍA

ASHIDA, Shinya, et al. Chemiluminescent method for the evaluation of antioxidant activity using lipid hydroperoxide-luminol. *Analytical sciences*, 1991, vol. 7, no 1, p. 93-96.

BELŠČAK, Ana, et al. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 2009, vol. 42, no 5, p. 707-716.

BÖHM, Fritz; EDGE, Ruth; TRUSCOTT, George. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health. *Molecular nutrition & food research*, 2012, vol. 56, no 2, p. 205-216.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, 1981, vol. 103, no 21, p. 6472-6477.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto, et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, 1998, vol. 93, no 1, p. 185-197.

FOTI, Mario C.; DAQUINO, Carmelo; GERACI, Corrada. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *The Journal of organic chemistry*, 2004, vol. 69, no 7, p. 2309-2314.

GANAPATHI, Mahalaxmi R., et al. Free electron transfer from several phenols to radical cations of non-polar solvents. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000, vol. 2, no 21, p. 4947-4955.

GUTOWSKI, Mariusz; KOWALCZYK, Sławomir. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 2013, vol. 60, no 1, p. 1-16.

HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N. G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews*, 2002, vol. 44, no 4, p. 499-591.

JEANG, Chii-Ling; LIN, Da-Gin; HSIEH, Shu-Hui. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, no 16, p. 6301-6304.

JEROMIN, Günter E.; ZOOR, Annegreth. A new irreversible enzyme-aided esterification method in organic solvents. *Biotechnology letters*, 2008, vol. 30, no 5, p. 925-928.

KEDARE, Sagar B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 2011, vol. 48, no 4, p. 412-422.

LEE, Jeung Hee, et al. Optimized synthesis of 1, 3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *New biotechnology*, 2010, vol. 27, no 1, p. 38-45.

LITWINIENKO, Grzegorz; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *The Journal of organic chemistry*, 2005, vol. 70, no 22, p. 8982-8990.

LIUPING Fan · N.A. Michael Eskin (2015). The use of antioxidants in the preservation of edible oils. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 373-378.

MOO-HUCHIN, Víctor M., et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 2015, vol. 166, p. 17-22

MUDERHWA, Jean M.; SCHMID, Patricia C.; BROCKMAN, Howard L. Regulation of fatty acid oxygen-18 exchange catalyzed by pancreatic carboxylester lipase. 1. Mechanism and kinetic properties. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, no 1, p. 141-148.

PADMANABHAN, P.; JANGLE, S. N. Evaluation of DPPH radical scavenging activity and reducing power of four selected medicinal plants and their combinations. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2012, vol. 4, no 2, p. 143-6.

REPETTO, M. G.; BOVERIS, A. Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2010, vol. 10, no 7, p. 615-623.

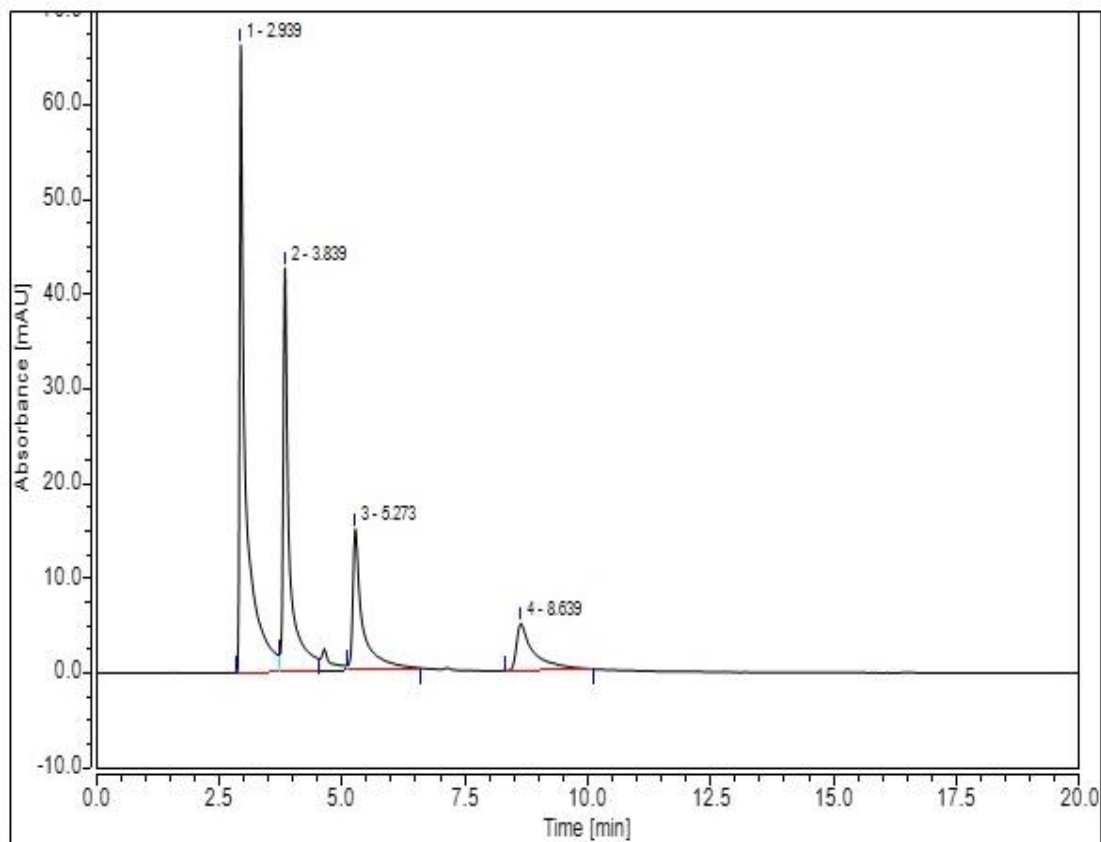
ROBARDS, Kevin, et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 1999, vol. 66, no 4, p. 401-436.

TOMÀS, Xavier; CUADROS, Jordi; GONZÁLEZ, Lucinio. *Introducción al cálculo numérico*. IQS, 2006.

ANEXOS

ANEXO A. CROMATOGRAMA OBTENIDO POR HPLC PARA LOS ESTERES DEL DHCA

Figura A1. Cromatograma que muestra los tiempos de retención del DHCA y sus ésteres. De menor a mayor (DHCA, dihidrocafeato de octilo, dihidrocafeato de dodecilo, dihidrocafeato de hexadecilo)



ANEXO B. CURVAS PATRON DEL DHCA Y SUS ÉSTERES

Figura B1. Curva de calibración DHCA

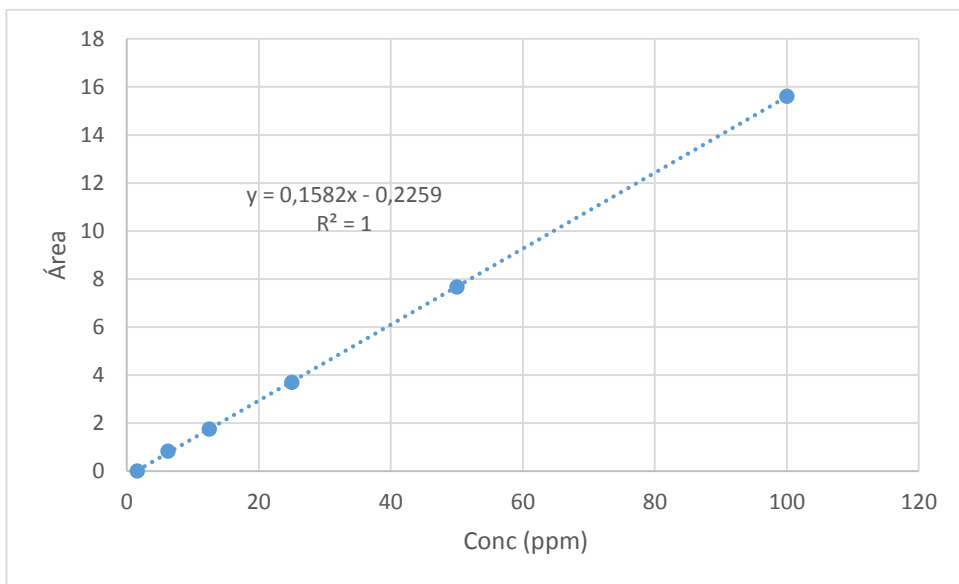


Figura B2. Curva de calibración del dihidrocafeato de butilo

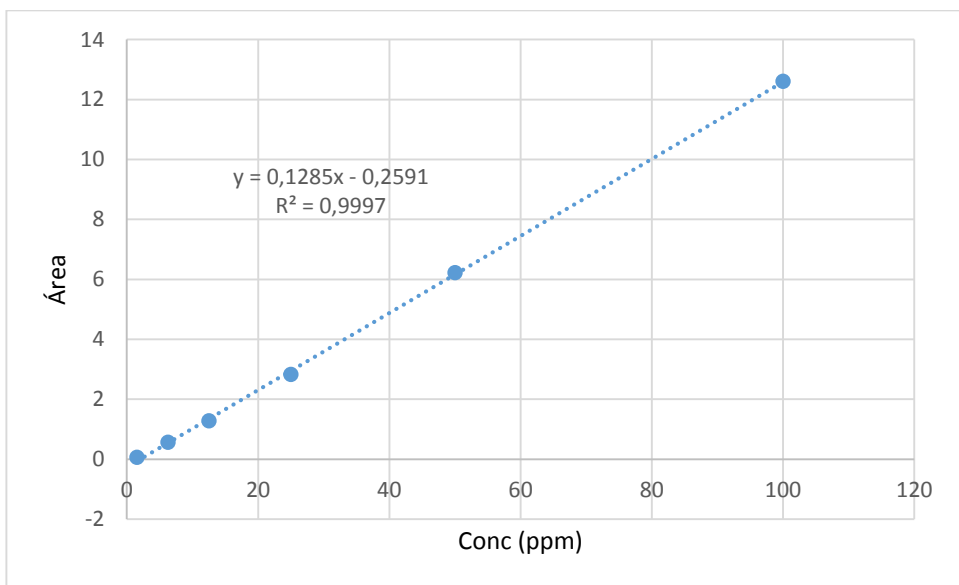


Figura B3. Curva de calibración del dihidrocafeato de dodecilo

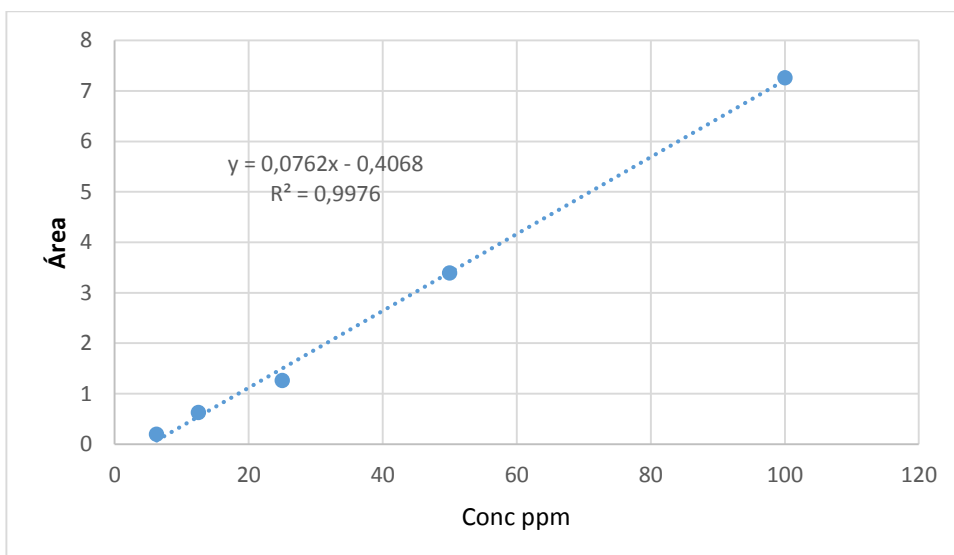


Figura B4. Curva de calibración del dihidrocafeato de hexadecilo

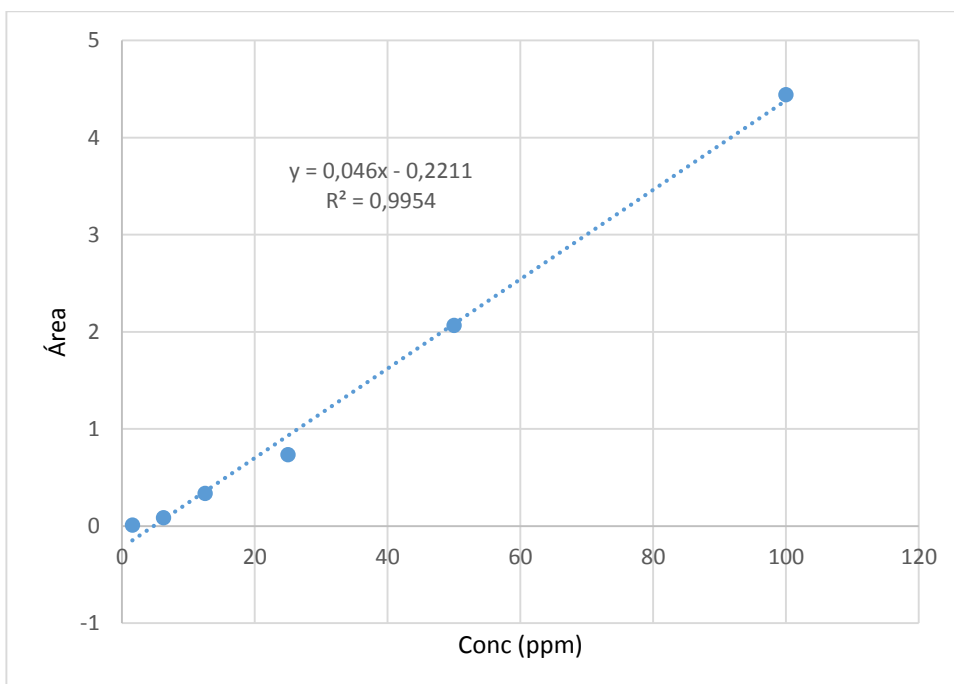
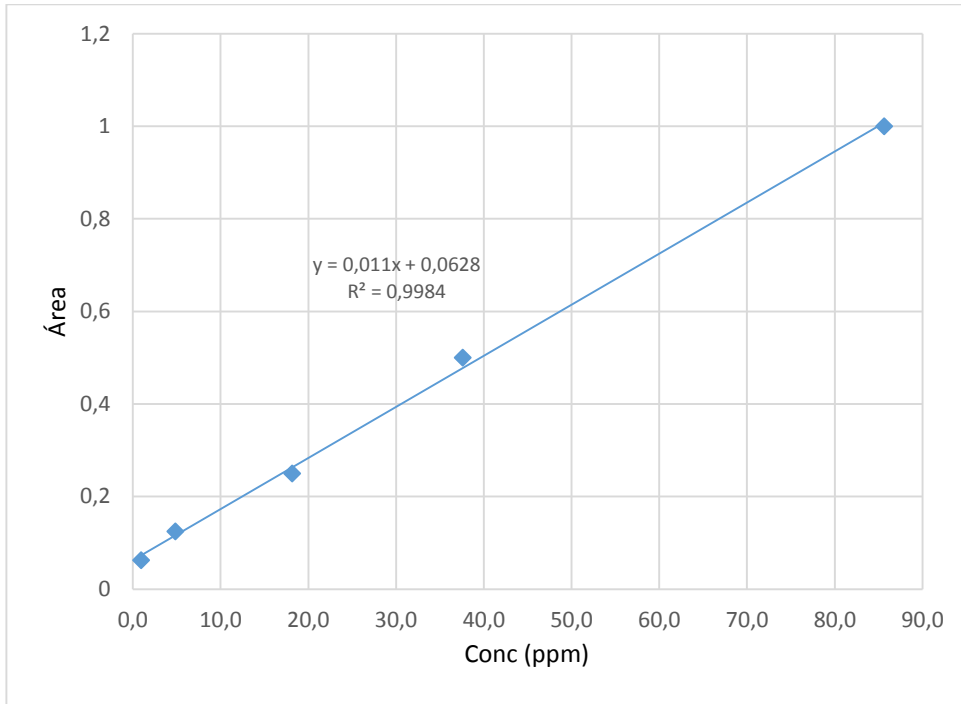


Figura B5. Curva de calibración del Trolox® obtenida por el método DDPH



ANEXO C. RESULTADOS GRÁFICOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO ORAC LIPOFILICO

Figura C1. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de Trolox®

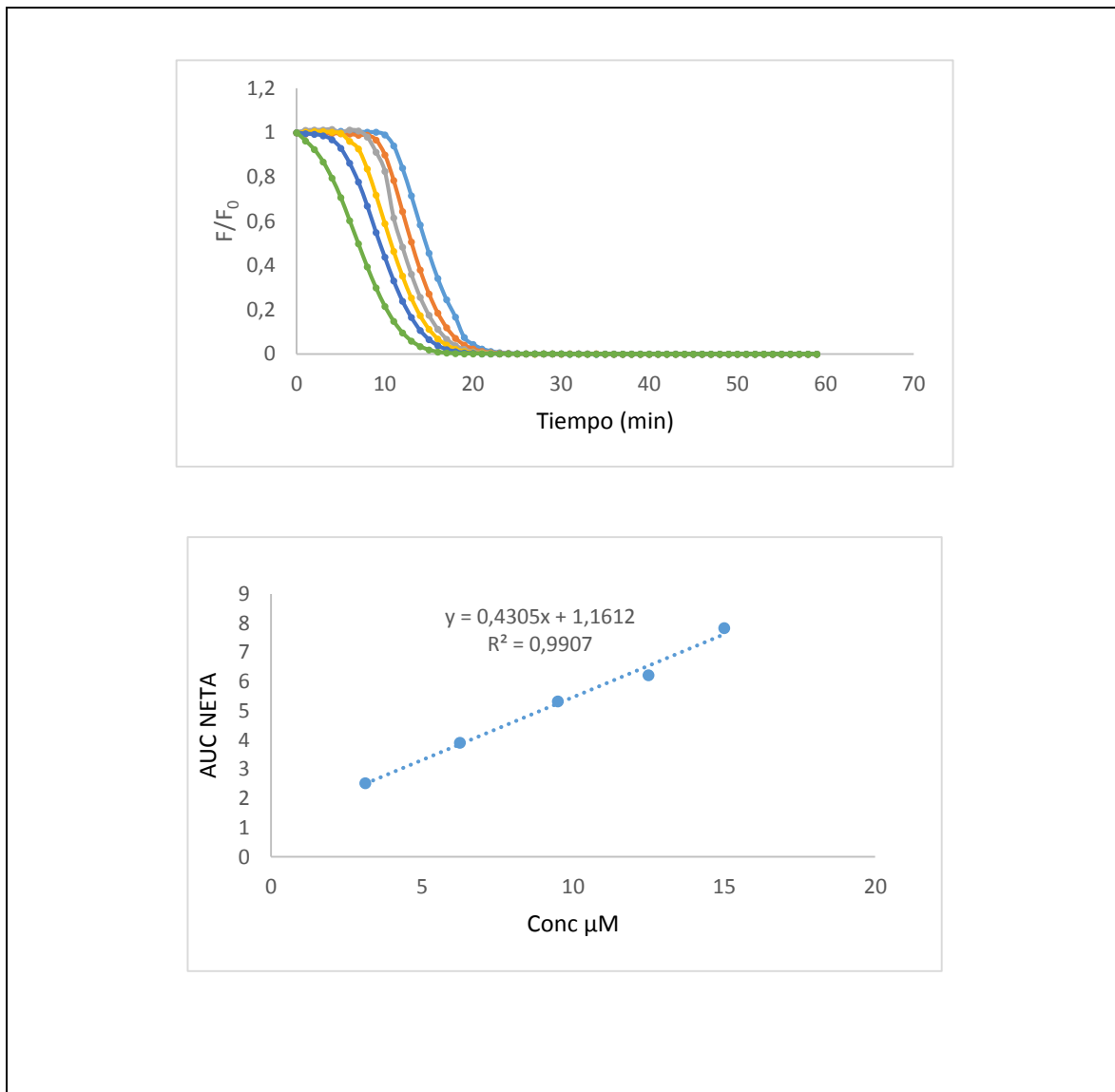


Figura C2. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de DHCA

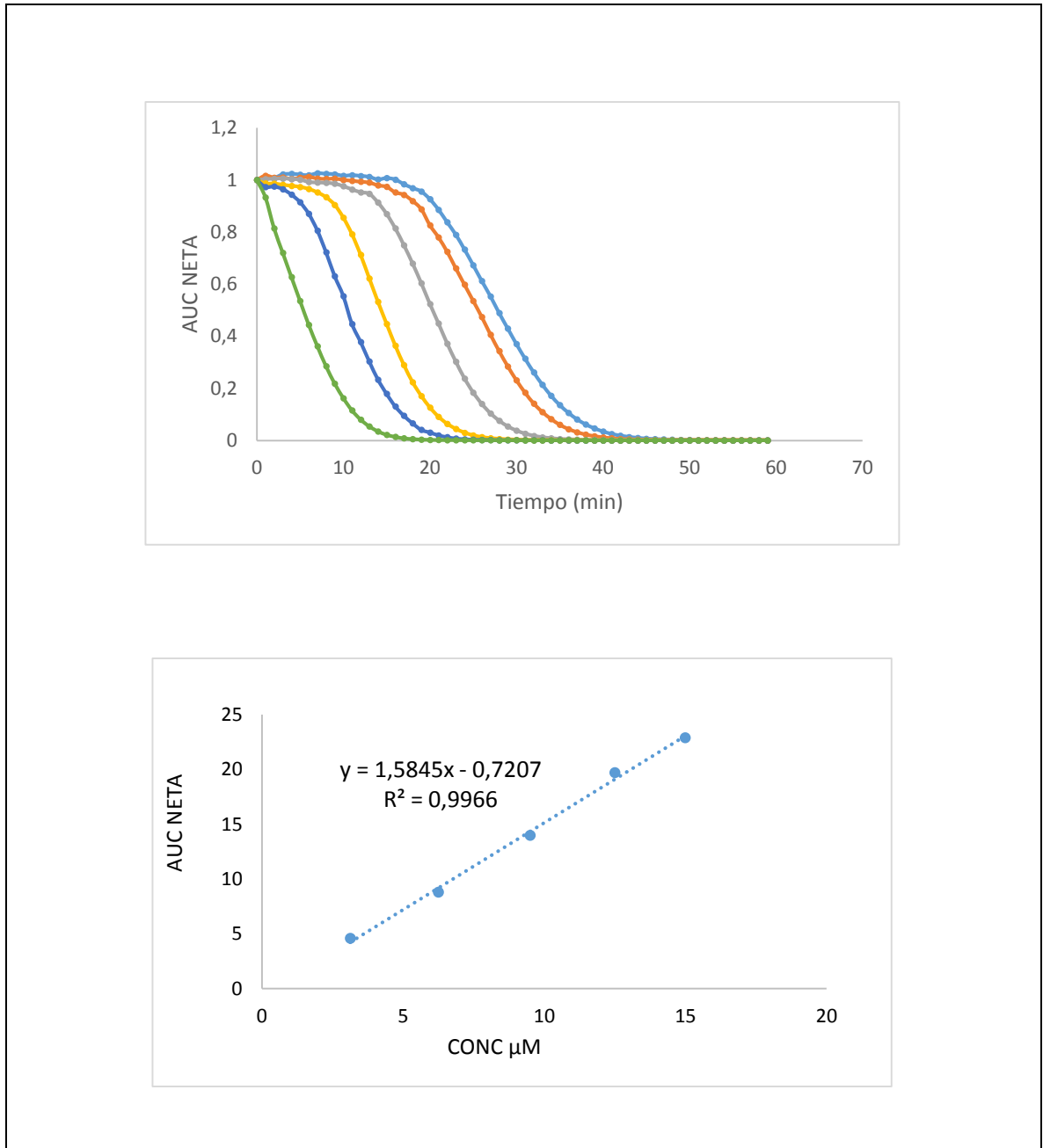


Figura C3. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de dihidrocafeato de butilo

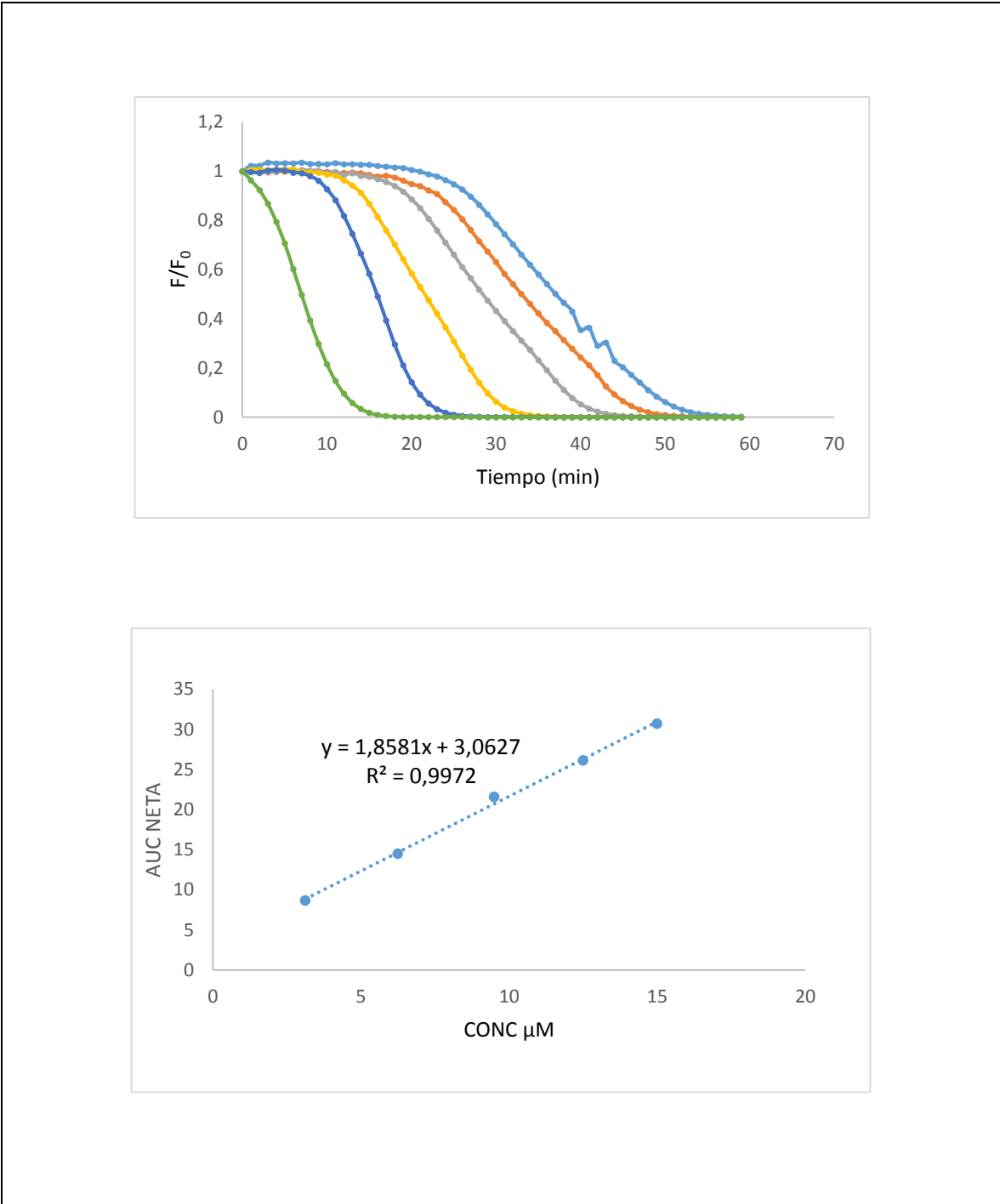


Figura C4. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de dihidrocafeato de octilo

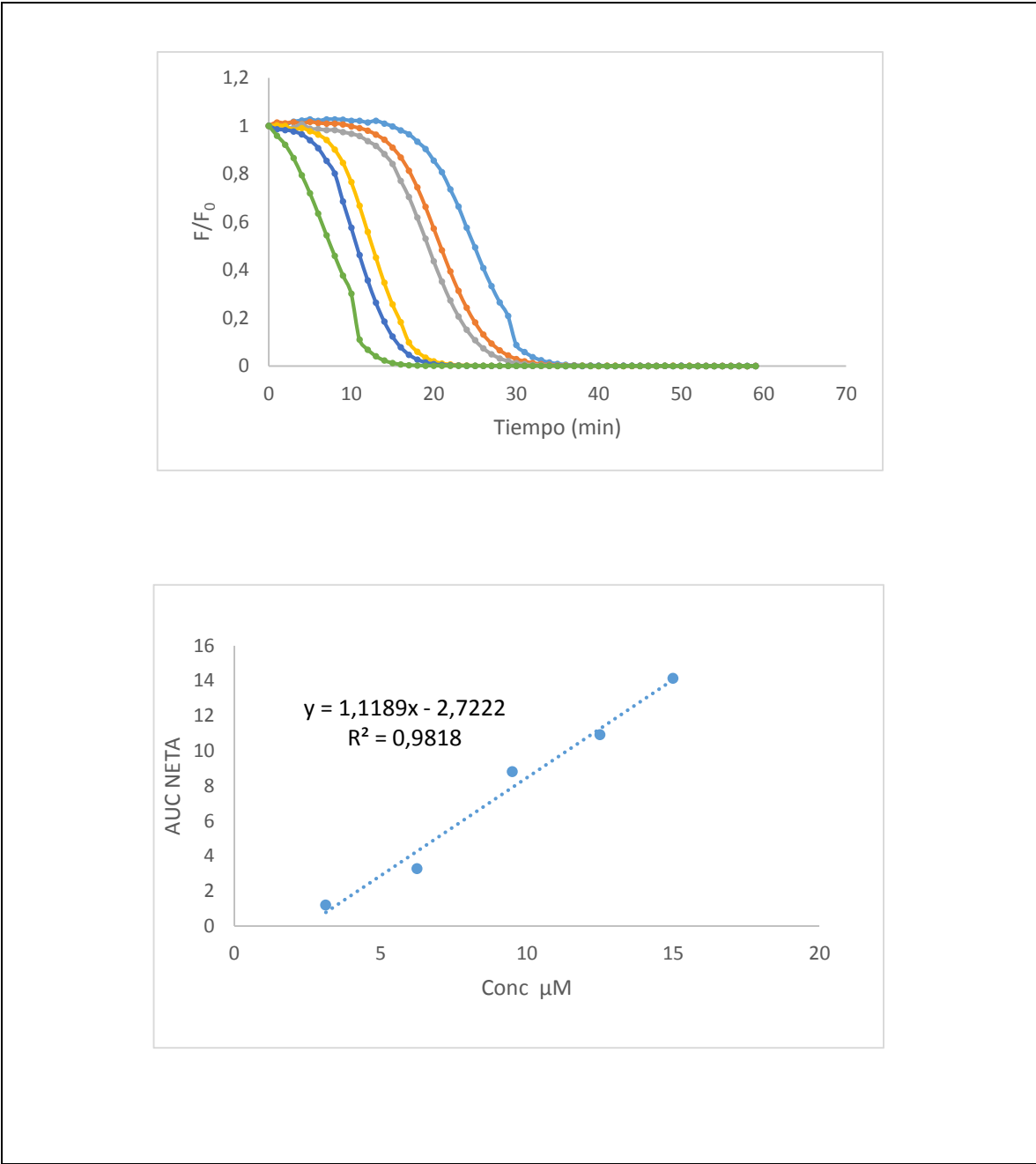


Figura C5. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de dihidrocafeato de dodecilo

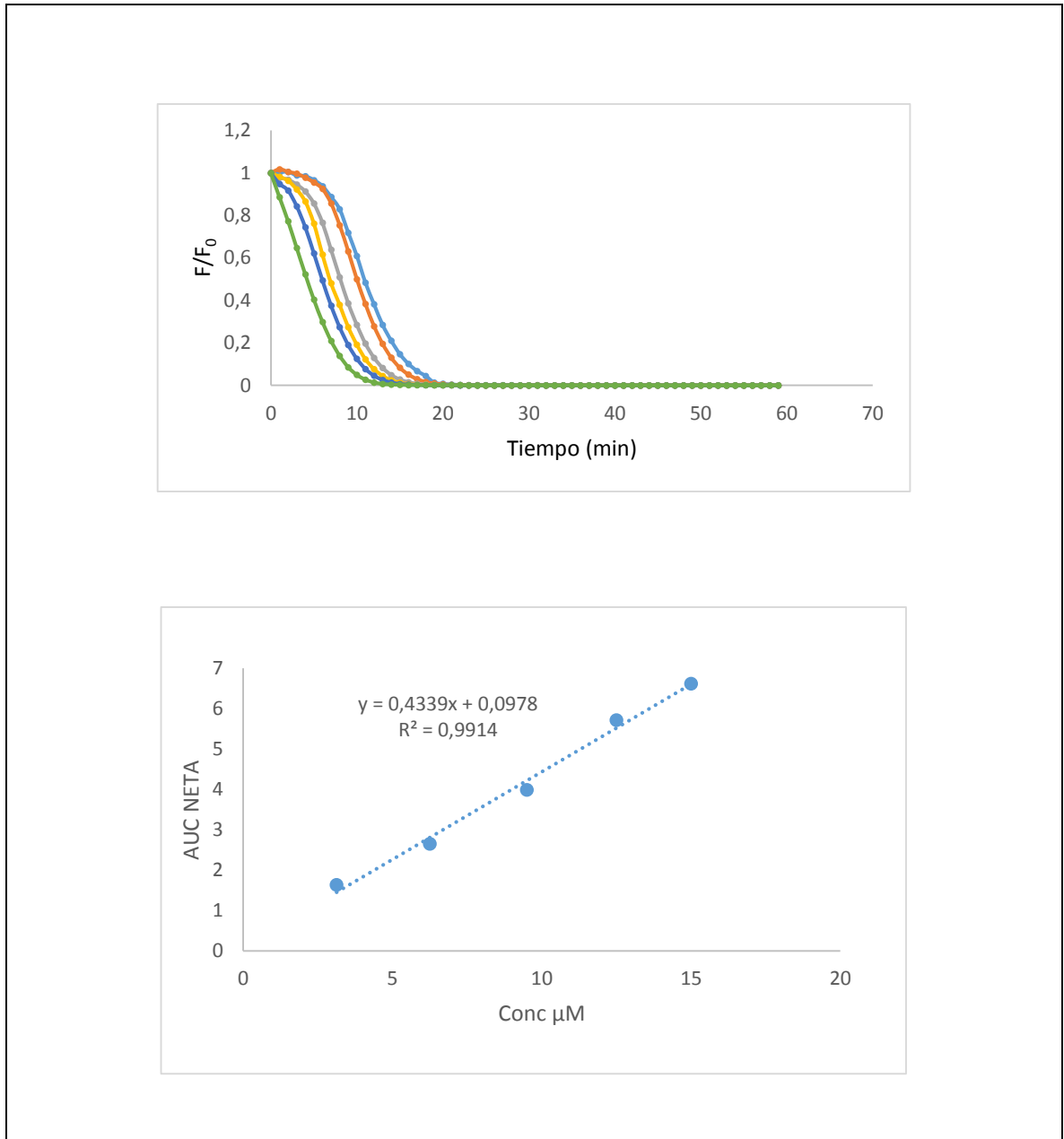
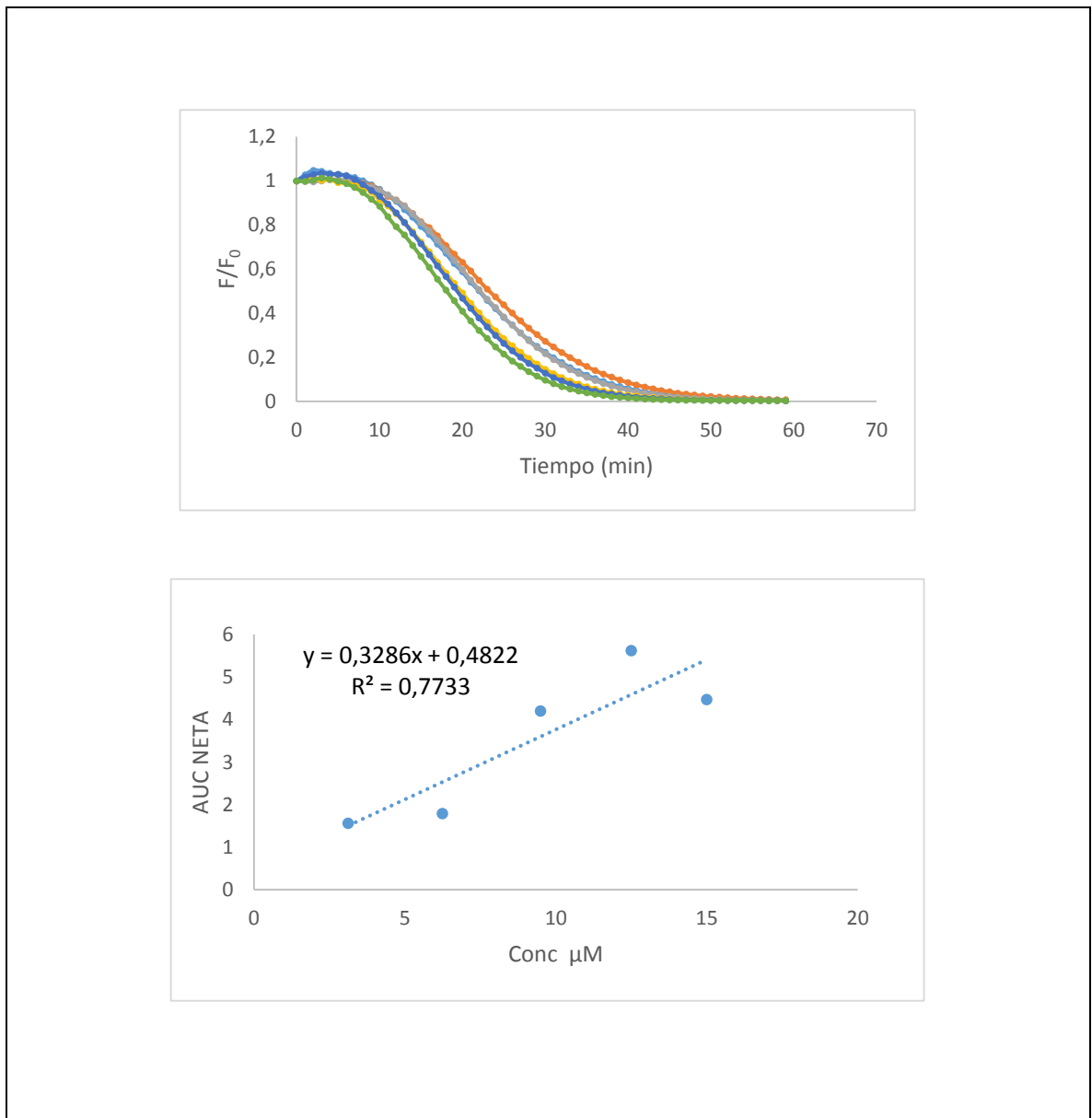


Figura C6. Cinética de disminución de la fluorescencia por efecto de AAPH, en presencia de dihidrocafeato de hexadecilo



ANEXO D. ESPECTRO DE RMN ^1H Y ^{13}C PARA ÉSTERES DEL DHCA

Figura D1. Espectro RMN ^1H del dihidrocafeato de octilo

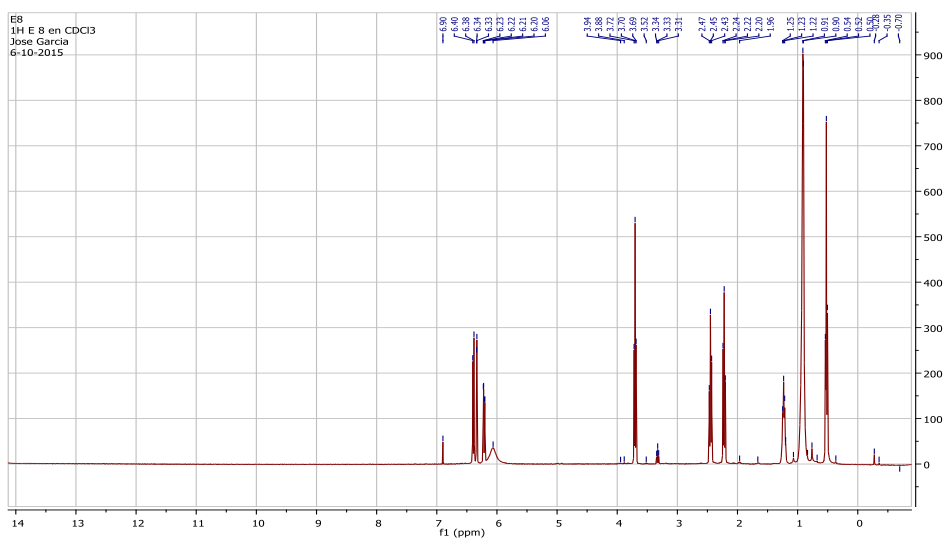


Figura D2. Espectro RMN ^{13}C del dihidrocafeato de octilo

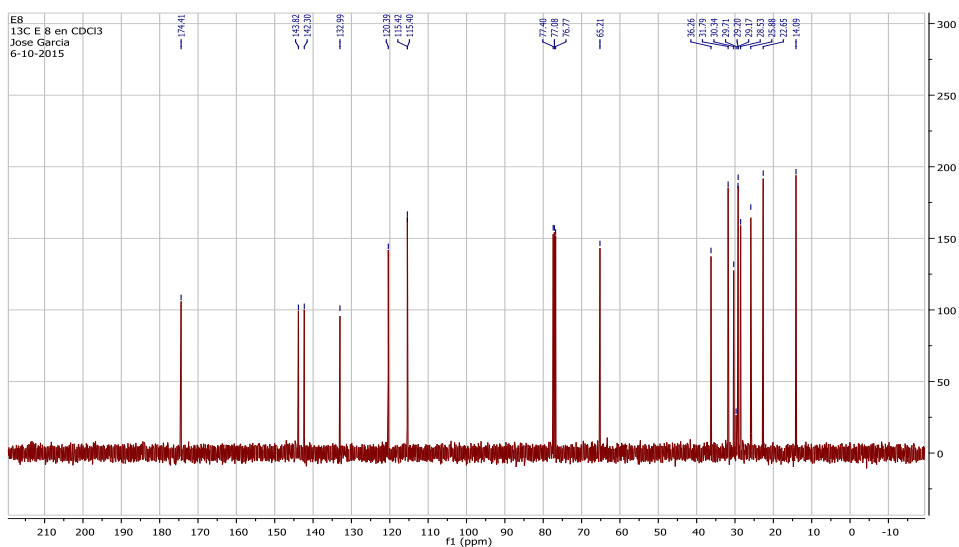


Figura D3. Espectro RMN ^1H del dihidrocafeato de dodecilo

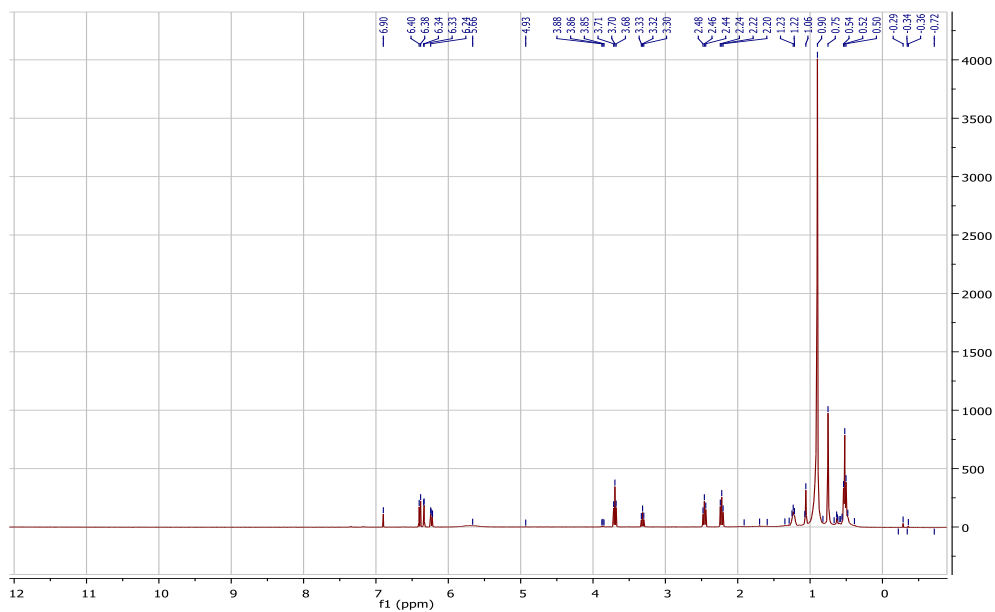


Figura D4. Espectro RMN ^{13}C del dihidrocafeato de dodecilo

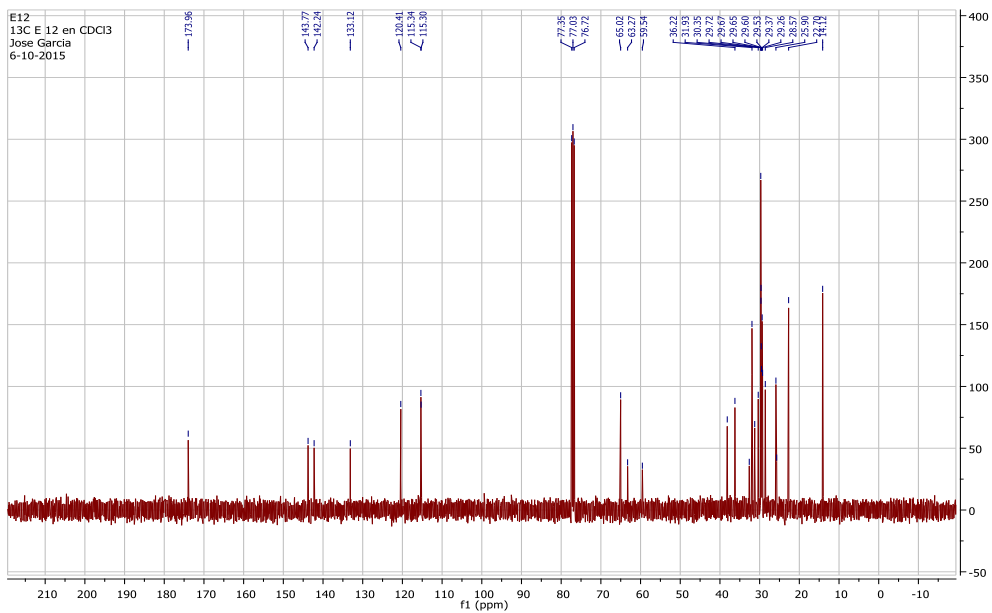


Figura D5. Espectro RMN ^1H del dihidrocafeato de hexadecilo

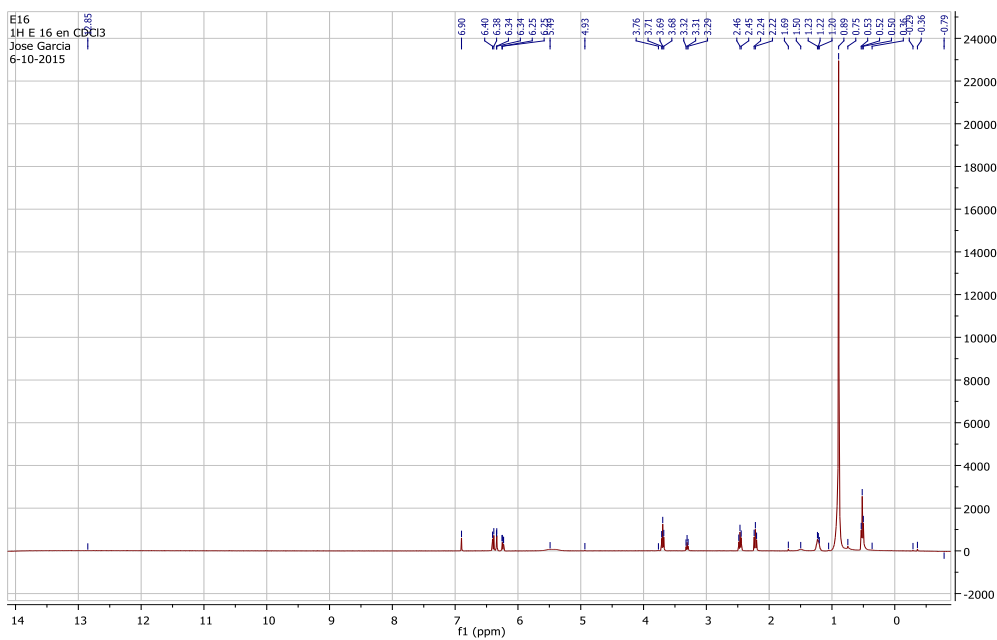


Figura D6. Espectro RMN ^{13}C del dihidrocafeato de hexadecilo

