

**OBTENCIÓN DE UN ÉSTER DE SACAROSA A PARTIR DE LA
ESTERIFICACIÓN DEL AZÚCAR, VÍA CATÁLISIS ENZIMÁTICA CON
LAURATO DE VINILO.**

CARLOS ESTEBAN CLEMENT OLIVEROS



**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**OBTENCIÓN DE UN ÉSTER DE SACAROSA A PARTIR DE LA
ESTERIFICACIÓN DEL AZÚCAR, VÍA CATÁLISIS ENZIMÁTICA CON
LAURATO DE VINILO.**

CARLOS ESTEBAN CLEMENT OLIVEROS

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

DIRECTOR: GIOVANNI ROJAS Ph.D.

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
SANTIAGO DE CALI
2014**

Aprobado por:

Evaluador.

Evaluador.

Director del proyecto.

Santiago de Cali, Enero 22 del 2015

AGRADECIMIENTOS:

- A mis padres, quienes han sido mis amigos y mis guías, de ellos he recibido los consejos más útiles y su acompañamiento más tierno.
- A mis profesores Dr. Giovanni Rojas, por el acompañamiento y asesoría durante la elaboración de este proyecto. Y al Dr. Guillermo León Montoya por su ayuda para lograr culminar este proyecto.
- A todas aquellas personas que de alguna u otra manera han estado pendientes de este proyecto y han mostrado interés por él.
- Especiales agradecimientos a Proenzimas S.A quienes nos suministraron la enzima empleada para llevar a cabo la reacción.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN	11
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	13
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	14
2.2.1. Ésteres de sacarosa.....	14
2.2.2. Síntesis enzimática	15
2.2.3. Lipasas para la síntesis de ésteres de sacarosa	16
2.2.4. Condiciones de reacción.....	18
2.3.1. Objetivo general	20
2.3.2. Objetivos específicos	20
2.4.1. Materiales y equipos	23
2.4.2. Síntesis del éster de sacarosa.....	23
2.4.3. Purificación del compuesto.....	24
2.4.3.1. Lauratos de sacarosa.....	24
2.4.3.2. Palmitato de sacarosa.....	24
2.4.4. Caracterización del compuesto.....	24
2.5.1. Síntesis, purificación y caracterización de los lauratos de sacarosa.	26
2.5.1.1. Síntesis de los lauratos de sacarosa.....	26
2.5.1.2. Purificación de los lauratos de sacarosa.....	28
2.5.1.2. Caracterización de los lauratos de sacarosa.....	30
2.5.1.2.1. Caracterización por IR de P1.....	30
2.5.1.2.2. Caracterización por ¹ H-RMN de P1.....	32
2.5.1.2.3. Caracterización por ESI-MS.....	34
2.5.1.2.4. Caracterización por ¹³ C-RMN de P1.....	39
2.5.1.2.5. Caracterización por IR del P2.....	40
2.5.1.2.6. Caracterización por ¹ H-RMN de P2 (anhídrido dodecanoico).	42
2.5.1.2.7. Análisis por DSC de P2 (anhídrido dodecanoico).	44
2.5.2. Síntesis, purificación y caracterización del palmitato de sacarosa.	45
2.5.2.1. Síntesis del palmitato de sacarosa.....	45

2.5.2.2. Purificación del palmitato de sacarosa.	46
2.5.2.3. Caracterización del palmitato de sacarosa.	48
2.6. CONCLUSIONES	51
2.7. RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA.	53

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Matriz de marco lógico.....	21
Tabla 2. Reactivos y equipos necesarios para la síntesis y purificación del laurato de sacarosa.	23
Tabla 3. Cantidades empleadas de reactivos para llevar a cabo la reacción con laurato de vinilo.	26
Tabla 4. Proporciones de las mezclas de solventes estudiadas para la cromatografía de columna.	28
Tabla 5. Parámetros instrumentales para ESI-MS.....	34
Tabla 6. Cantidades empleadas de reactivos para llevar a cabo la reacción con palmitato de isopropilo.	45
Tabla 7. Tipos de señales y sus grupos correspondientes en la caracterización por FTIR del palmitato de sacarosa.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del monolaurato de sacarosa.....	14
Figura 2. Estructura química del laurato de vinilo.....	14
Figura 3. Estructura química del palmitato de isopropilo.	14
Figura 4. Reacciones de transesterificación adaptado de Aliseda, 2003.	15
Figura 5. Estructura química de la sacarosa	16
Figura 6. Estructura secundaria de la lipasa en su forma cerrada (izquierda) y abierta (derecha) imagen obtenida de (Fernandez-Lafuente, 2010).	18
Figura 7. Avance de la reacción de síntesis de los lauratos de sacarosa a lo largo de 24 horas de reacción.	27
Figura 8. Purificación del producto 2 (P2).	29
Figura 9. Placas de cromatografía de la purificación de P1.....	29
Figura 10. Espectros infrarrojos del P1 (Azul), laurato de vinilo (Rojo) y Sacarosa (Negro).	31
Figura 11. Espectro ^1H -RMN de P1 en CDCl_3 , a 27°C , 400 MHz (se omite señal del solvente).	33
Figura 12. Espectro ESI-MS de $[M - \text{H}]^-$ de P1.	35
Figura 13. Espectro ESI-MS de $[M - \text{H}]^-$ de P1 entre m/z 625 y 700.	36
Figura 14. Esquema de fragmentación de P1, pérdida de grupo hidroxilo.	37
Figura 15. Esquema de fragmentación de P1, rompimiento anillo piránico.	37
Figura 16. Espectro ESI-MS de $[M - \text{H}]^-$ de P1 entre m/z 220 y 390.	38
Figura 17. Espectros de ^{13}C -RMN del laurato de vinilo (abajo) DEPT, sacarosa (medio) DEPT y P1 (arriba) modo normal. El laurato de vinilo y P1 fueron tomados en CDCl_3 y la Sacarosa en D_2O	39
Figura 18. Espectros infrarrojos de P2 (Azul), laurato de vinilo (Rojo) y Sacarosa (Negro).	41
Figura 19. Espectros infrarrojos de los productos 1 (rojo) y 2 (negro).	42
Figura 20. Espectro ^1H -RMN del P2 en CDCl_3 , a 27°C , 400 MHz (se omite señal de disolvente).	43
Figura 21. Termograma de DSC del anhídrido dodecanoico (P2).	44
Figura 22. Avance de la reacción de síntesis del palmitato de sacarosa a lo largo de 24 horas de reacción.	46
Figura 23. TLC obtenida con mezcla de cloroformo/metanol 9:1.	47
Figura 24. Placas de cromatografía de la purificación del palmitato de sacarosa (P3).	47
Figura 25. Espectros de P3 (azul), sacarosa (roja) y palmitato de isopropilo (negra).	48
Figura 26. Espectros infrarrojos de los productos obtenidos P1 (Rojo) y P3 (azul)	50

RESUMEN.

En este proyecto se obtuvo ésteres de sacarosa vía catálisis enzimática, empleando para esto dos ésteres de ácido graso: laurato de vinilo y palmitato de isopropilo, los cuales se encargan de aportar la cadena alquílica de la molécula final por medio de una reacción de transesterificación. La reacción en este caso se realizó con una lipasa obtenida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus*, que en varios estudios ha demostrado una muy buena esterificación de la sacarosa.

Después de llevar a cabo la síntesis y el seguimiento de dicha reacción, lo cual se verificó por medio de cromatografía de capa fina, se prosiguió a realizar la purificación del compuesto. En el caso de los lauril ésteres de sacarosa primero se realizó una separación por medio de solventes para posteriormente purificar el producto mediante cromatografía de columna, mientras que el palmitoil éster de sacarosa se llevó a cabo por medio de la cromatografía de columna. Al obtener un compuesto puro, en TLC, se prosiguió a la caracterización de dichos compuestos, para lo cual se emplearon las técnicas espectroscópicas de Infrarrojo (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). De esta manera se obtuvo espectros para el caso de los lauril ésteres de sacarosa que sugerían una exitosa transesterificación de la sacarosa y una posible politransesterificación excesiva de los grupos hidroxilo de la sacarosa. Mientras que para el palmitoil éster de sacarosa solo se realizó la caracterización por infrarrojo por lo que aún se requerirán caracterizaciones más profundas.

Palabras clave: Ésteres de sacarosa, sacarosa, síntesis enzimática, espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia de RMN.

ABSTRACT

This project shows the synthesis of sucrose esters via enzymatic catalysis using, two fatty acid esters, vinyl laurate and isopropyl palmitate, which are the alkyl chain of the final molecule through a transesterification reaction. In this case the reaction was carried out with a lipase obtained from the microorganism *Thermomyces lanuginosus*, which in several studies have shown a very good esterification of sucrose.

After conducting the synthesis and monitoring the reaction, using thin layer chromatography (TLC), then purification of the compound was conducted, in the case of lauryl sucrose esters the separation was performed by subsequently extracting solvents followed by column chromatography, while palmitoyl sucrose ester was purified only by column chromatography. Once a pure product by TLC was obtained the characterization of such compounds were carried out by, infrared spectroscopic (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Mass Spectrometry (MS) and differential scanning calorimetry (DSC). The spectra from lauryl sucrose esters suggested successful transesterification of sucrose and a possible excessive transesterification of the hydroxyl groups of sucrose. While for palmitoyl sucrose ester only infrared characterization was performed and further experiments are required.

Key words: Sucrose esters, sucrose, enzymatic synthesis, infrared spectroscopy, RMN spectroscopy.

1. INTRODUCCION

Debido al agotamiento inminente de los recursos fósiles y a la presión ejercida por el endurecimiento del ambiente en algunos sectores del planeta, se ha planteado un cambio progresivo en la industria dirigido a la utilización de recursos renovables. De hecho uno de los principios básicos de la química verde es el desarrollar procesos que usan materiales de partida renovables como alternativa a los recursos fósiles. La biomasa de las plantas representa una de las fuentes renovables más dominantes para procesos biotecnológicos. Para su mejor aprovechamiento, la biomasa primero debe ser separada entre sus principales componentes como: celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, carbohidratos, aceites vegetales y esenciales, etc. (Ballésteros, Plou, Alcalde, & Ferrer, 2006)

Los ésteres de sacarosa de ácidos grasos, comúnmente conocidos como sucroésteres, son un grupo único de surfactantes, su principal función en la industria es como emulsificantes y estabilizantes. Estos son obtenidos mediante la esterificación de la sacarosa con ésteres de ácidos grasos. Variando el nivel de esterificación de la sacarosa es posible obtener surfactantes con valores de balance hidrófilo-lipofilo (HLB) que varíen entre 1 y 16.

Los sucroésteres son usados en muchas categorías alimenticias como panadería, confitería, cereales, productos lácteos, helados y salsas. Los fabricantes de dichos productos tienen múltiples razones para trabajar con estos ésteres de sacarosa, las cuales se fundamentan en que el proceso de producción puede mejorar mediante la reducción de tiempo de mezcla al obtener o mantener viscosidades bajas. Además los ésteres de sacarosa pueden ser utilizados como alternativas bajas en grasa. (European Food Safety Authority (EFSA), 2010).

La sacarosa es uno de los principales productos de la agricultura vallecaucana, en esta región hay 223905 hectáreas sembradas en caña para azúcar, de las cuales el 24% pertenecen a los ingenios azucareros mientras que el 76% a más de 2000 cultivadores de caña. El clima privilegiado de la región posibilita la siembra y cosecha de caña durante todos los meses del año. Esta condición climática sumada con los esfuerzos en investigación ha logrado que la región sea especialista en el cultivo y líder a nivel mundial. (Asocaña, 2011)

La industria colombiana se ha limitado en los últimos años a producir grandes cantidades de productos derivados del azúcar, los cuales venden a diferentes países de América, Europa y Asia. No obstante, la gran mayoría no se ha percatado de la oportunidad que tienen, puesto que partiendo de dichos productos básicos pueden producir otros más especializados con un valor

agregado mucho más significativo y evidentemente con mayores ganancias. De esta manera aportarían al desarrollo del país y la región.

Al llevar a cabo con éxito la síntesis del éster de sacarosa, se espera lograr un avance tecnológico que aportará un mayor valor agregado al azúcar, el cual es uno de los productos con mayor producción en el país y en la región del Valle del Cauca, con más de 2,3 millones de toneladas métricas en su equivalente a volumen de azúcar crudo (tmvc) (Asocaña, 2011). Además al ser sintetizado a partir de recursos renovables y biodegradables como lo son el azúcar y el éster del ácido graso obtenido de aceite vegetal, muy posiblemente el compuesto final tenga características compatibles con el ambiente y los organismos vivos y con posibles usos como surfactante no-iónico biodegradable y biocida biodegradable ya que algunos de estos ésteres de sacarosa han demostrado inhibir el crecimiento de *E. coli* y otras bacterias. (Tomita, 1998)

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

Esta investigación surge a partir de la posibilidad de proporcionar un valor agregado a un producto como el azúcar, el cual se produce en grandes cantidades y representa uno de los ejes principales de la agricultura vallecaucana. En el año 2011 el 38,55 % del producto producido fue exportado (Asocaña, 2011), lo que permite inferir que al darle un alto valor agregado es posible generar mayores ingresos, lo cual según el DANE el aprovechamiento de dicho recurso, en Colombia ha ido disminuyendo, finalmente este producto entraría a competir en el campo de la química fina.

Hoy en día los productos elaborados a partir de recursos renovables han recibido cada vez mayor atención y han adquirido importancia creciente en el marco de trabajo de una economía de base biológica. Los ésteres de ácidos grasos de carbohidratos están hechos de materias primas naturales, como la sacarosa y grasa/aceite, además en lugar de utilizar un enfoque químico las enzimas como lipasas y proteasas se pueden utilizar para la síntesis de dichos productos. Esto dará lugar a un producto "verde" que basado en su estructura primaria sería biodegradable y puede ser usado por ejemplo como agente surfactante no-iónico. Sin embargo, no hay procesos comerciales todavía para la producción enzimática de los ésteres de ácidos grasos de carbohidratos. La investigación en la última década, por otro lado, demuestra el alto potencial de las enzimas para sintetizar una amplia gama de ésteres de hidratos de carbono.(van den Broek & Boeriu, 2013)

Por último, la esterificación regioselectiva de azúcares y compuestos relacionados catalizada por lipasa, ofrece una alternativa a la escasa selectividad de síntesis químicas, que sufre de muchos inconvenientes como las altas temperaturas de reacción que causan la polimerización de los productos y por lo tanto un bajo rendimiento, la coloración de los productos finales e inversión de la sacarosa. Además, la síntesis química regioselectiva de estos ésteres de ácidos grasos sólo puede lograrse mediante técnicas de protección de grupos, que son procesos complejos. (Kennedy, 2006).

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

2.2.1. Ésteres de sacarosa

Los ésteres de sacarosa son surfactantes no iónicos que consisten en un carbohidrato como grupo hidrófilo y uno o más ácidos grasos como componente lipófilo (Figura 1). Al controlar el grado de esterificación y la naturaleza del ácido graso y del azúcar, es posible sintetizar ésteres de azúcar dentro de una amplia gama de HLB y, en consecuencia, se encontrará una gran variedad de propiedades como surfactante.(Plou et al, 2002)

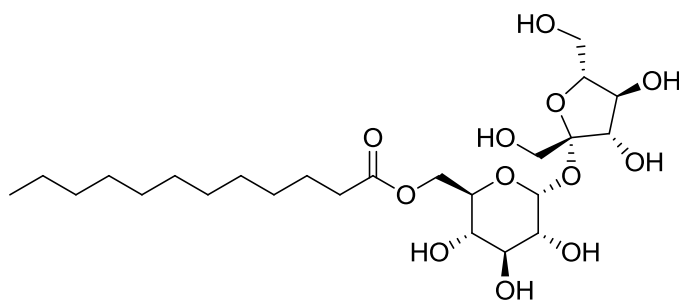


Figura 1. Estructura química del monolaurato de sacarosa.

Uno de los principales determinantes en la reacción de síntesis de ésteres de sacarosa es el ácido graso a emplear, en este caso se utilizaron dos; el laurato de vinilo el cual tiene una cadena de 12 carbonos (Figura 2) y el palmitato de isopropilo con una cadena un poco más larga (16 Carbonos) (Figura 3). Estos dos aportarán la cadena alquílica al éster de sacarosa. Se decidió emplear dichos ésteres de ácidos grasos debido a que promueven el equilibrio de la reacción para que esta se lleve a cabo, formando productos secundarios que se eliminan fácilmente.

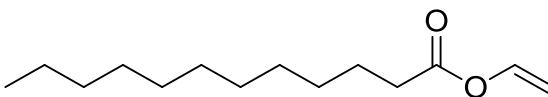


Figura 2. Estructura química del laurato de vinilo.

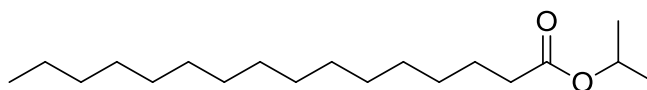


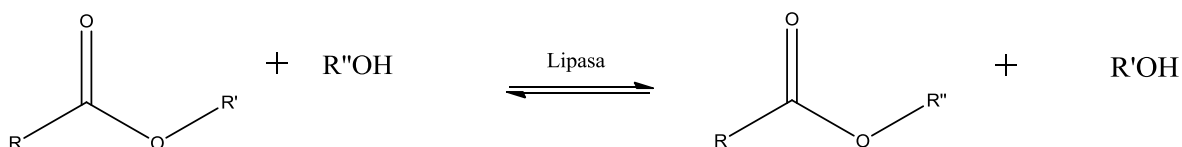
Figura 3. Estructura química del palmitato de isopropilo.

2.2.2. Síntesis enzimática

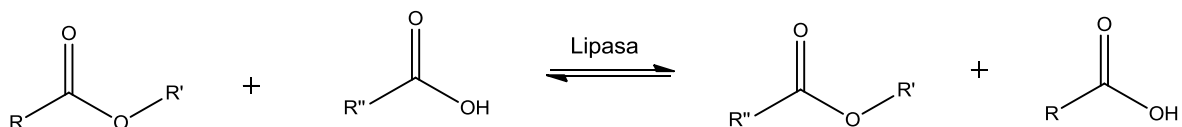
Para llevar a cabo la síntesis enzimática de los ésteres de sacarosa se requiere una reacción entre el éster de un ácido graso, que será quien aporte el grupo acilo, la sacarosa y la enzima que hará el papel de catalizador. Las proteasas y lipasas son las enzimas con mayor aplicación en este tipo de reacciones.

Dicha síntesis enzimática se lleva a cabo por medio de una reacción de transesterificación, la cual consiste en tres clases distintas de mecanismos de reacción (Figura 4). Los cuales se clasifican según el tipo de compuestos que reaccionen, es decir, según un éster reaccione con un alcohol lo cual se conoce como alcoholólisis, acidólisis cuando reacciona el éster con un ácido carboxílico y por último interesterificación cuando reacciona un éster con otro éster (Aliseda, 2003).

Alcoholólisis



Acidólisis



Interesterificación

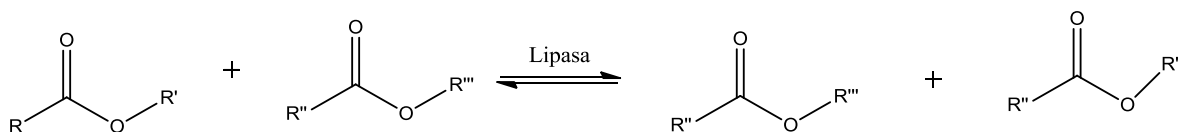


Figura 4. Reacciones de transesterificación adaptado de Aliseda, 2003.

El azúcar contiene múltiples grupos hidroxilos (Figura 5), los cuales pueden ser acilados por electrófilos. La acilación selectiva del azúcar puede impactar considerablemente en la síntesis de surfactantes, endulzantes, ingredientes alimentarios (emulsificantes), e intermediarios químicos y farmacéuticos.

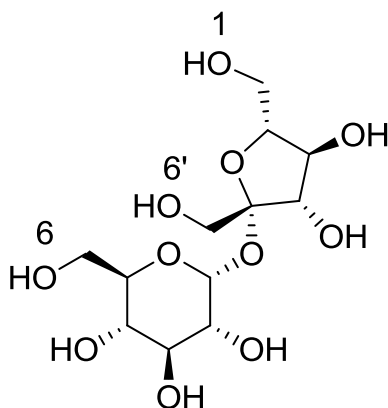


Figura 5. Estructura química de la sacarosa

La acilación química de la sacarosa se realiza principalmente en sus grupos hidroxilos primarios en las posiciones: 6-OH, 6'-OH y 1'-OH. La síntesis enzimática de ésteres de sacarosa sobre la síntesis química presenta la ventaja de ser más específica y se lleva a cabo a condiciones más suaves. El enfoque sintético más común para preparar ésteres de sacarosa implica la transesterificación de azúcares con carboxilato de vinilo catalizada por lipasa. Este método siempre requiere de un largo tiempo de reacción (24 h) (Du & Luo, 2012).

En particular, los lauratos de sacarosa con diferentes grados de esterificación se están utilizando hoy día en los alimentos y formulaciones del cuidado personal. Además, también se han reportado propiedades de actividad anti-tumoral (Nishikawa et al, 1976), anti-bacteriana (Kato & Arima, 1971), e insecticida (Chortyk et al, 1996), indicando de este modo su gran versatilidad. El laurato de sacarosa es especialmente adecuado como un potenciador de la absorción transdérmica para la administración de fármacos tópicamente (Vermeire et al, 1996), siendo no irritante y no se degrada rápidamente. Por otro lado el los ésteres de palmitato tienen como principal aplicación en el campo de la industria alimenticia sin embargo se ha encontrado que en sinergia junto con otros ésteres de sacarosa su actividad antibacteriana se incrementa (Thomas, 1998)

2.2.3. Lipasas para la síntesis de ésteres de sacarosa

El descubrimiento de que las enzimas son capaces de trabajar en medios no acuosos, le ha ofrecido a las enzimas hidrolíticas la oportunidad de catalizar de manera eficiente una amplia variedad de reacciones de síntesis. Las enzimas se aplican a las transformaciones regioselectivas de mono y disacáridos, incluyendo acilaciones selectivas, desacilaciones y reacciones de oxidación. Por lo tanto, varias lipasas y proteasas catalizan regioselectivamente la transesterificación de azúcares usando ésteres activados en disolventes orgánicos anhidros. (Ferrer et al, 1999)

Para la transesterificación de azúcares catalizada por enzimas, diferentes regioisómeros pueden obtenerse con una elección apropiada del biocatalizador. Esto es notable porque, por ejemplo, las propiedades de diferentes monoésteres de azúcar varían significativamente respecto al hidroxilo en el cual se lleve a cabo la transesterificación (Husband et al, 1998)

Como se mencionó anteriormente la enzima que se usó en este trabajo es de tipo lipasa, estas son enzimas que son responsables principalmente de la hidrólisis de acilglicéridos y es obtenida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus*. Sin embargo, otro número de ésteres de bajo y alto peso molecular son aceptados como sustratos por este grupo de enzimas. La amplia aplicabilidad en una variedad de reacciones, dotada por esta especificidad de sustratos, se extiende aún más por el hecho de que las mismas lipasas son capaces de catalizar la reacción inversa a la hidrólisis, es decir son capaces de sintetizar los ésteres o grasas, e incluso algunas lipasas son más adecuadas para la síntesis que para las reacciones de hidrólisis (Gandhi, 1997). Las reacciones que puede llevar a cabo esta enzima, aparte de la hidrólisis, son la esterificación, interesterificación alcoholólisis y acidólisis, estas tres últimas como ya se mencionó se agrupan en los tipos de reacciones de transesterificación.

La actividad catalítica y la estabilidad de las lipasas dependen de su conformación tridimensional. El estado de hidratación de la enzima influencia su actividad y estabilidad. El sitio activo de la enzima involucra una región-tapa móvil, dicha tapa se abre, cuando la enzima se encuentra en la interfase entre un solvente hidrofóbico y un medio acuoso, por lo que se activa. Las lipasas obtenidas de diferentes microorganismos difieren entre sí en estructura, incluyendo la estructura del centro catalítico y la tapa móvil, estas diferencias afectan la actividad de la lipasa y su regioselectividad (Gumel, Annuar, Heidelberg, & Chist, 2011).

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es una proteína de cadena sencilla que consiste en 269 aminoácidos. Su peso molecular es 31.700 g/mol y su punto isoeléctrico es 4,4. Es más o menos de forma esférica, con un tamaño de 35Åx45Åx50Å, y contiene ocho hebras predominantemente de láminas betas paralelas con cinco hélices alfa interconectadas. La figura 6 muestra las estructuras abiertas y cerradas de esta enzima. La tapa es un bucle móvil de hélice alfa que comprende los aminoácidos 86 a 93, que cubre el sitio activo. El sitio activo está conformado por la típica tríada catalítica Ser-His-Asp (Fernandez-Lafuente, 2010)

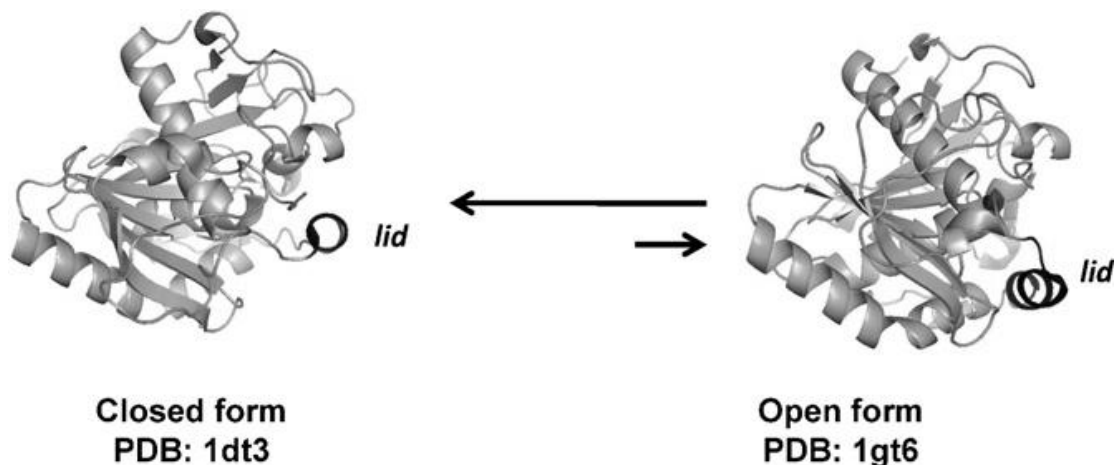


Figura 6. Estructura secundaria de la lipasa en su forma cerrada (izquierda) y abierta (derecha) imagen obtenida de (Fernandez-Lafuente, 2010).

2.2.4. Condiciones de reacción.

Como es de esperarse las reacciones enzimáticas, como cualquier otro tipo de reacción, deben cumplir ciertas condiciones para que puedan llevarse a cabo eficazmente y dependen de ciertos factores para su éxito. En cuanto a estos factores se pueden encontrar: el largo de la cadena del ácido graso (donador de grupo acilo), la relación molar de los sustratos, los solventes a emplear y la temperatura. (Ferrer et al, 1999)

El efecto de la longitud de cadena del ácido graso (el donador de grupo acilo) sobre la actividad de la lipasa es difícil de generalizar. Algunas lipasas comúnmente usadas, que son obtenidas de otros microorganismos tienen una mayor especificidad hacia los ácidos grasos de cadena larga no ramificados. Por otro lado, se ha informado de un aumento de la actividad con el incremento de la longitud de la cadena de carbono del donador de acilo de lipasas de *Staphylococcus Warneri* y *Staphylococcus xylosus* (Kumar, Modak, & Madras, 2005). En cambio, para la lipasa obtenida de *Thermomyces lanuginosus*, un aumento de la longitud de la cadena del donante de acilo lleva a tasas reducidas de esterificación.

La relación molar de los dos sustratos en la reacción influencia significativamente la esterificación de estos. Esto es debido a que la solubilidad de un sustrato en el medio de reacción es afectada por la concentración del otro sustrato de la misma manera en la que la disolución de un sustrato afecta la polaridad del medio de reacción.

En cuanto a los solventes lo primordial es el que no sean acuosos, un solvente adecuado debería disolver suficientes cantidades de los dos sustratos, en este caso, el ácido graso y la sacarosa, presentan generalmente solubilidades muy diferentes y esto complica la reacción de esterificación, adicionalmente el solvente no debe afectar la estabilidad de la enzima y su actividad (Wescott & Klivanov, 1994)

La temperatura de la reacción afecta la estabilidad de la enzima, la solubilidad de los reactantes y la del producto, la velocidad y la posición del equilibrio de reacción (Gumel, Annuar, Heidelberg, & Chist, 2011).

2.2.5. Purificación de los ésteres de sacarosa

La purificación es un paso muy importante en este proyecto para la caracterización de los productos para esto se deben tener en cuenta algunos procesos de purificación que pueden ser utilizados, para este caso los más empleados son las extracciones y las separaciones por cromatografía de columna (Ferrer et al, 1999) (Chortyk et al, 1996) (Plou et al, 2002).

En la cromatografía en capa fina la fase estacionaria es una capa fina de gel de sílice o alúmina en un vidrio, metal o placa de plástico. La cromatografía en columna funciona en una escala mucho más grande por el embalaje de los mismos materiales en una columna de vidrio vertical.

La cromatografía en columna se utiliza con frecuencia por los químicos orgánicos para purificar líquidos y sólidos. Una muestra impura se carga en una columna con un adsorbente, tal como gel de sílice o alúmina. Un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes (eluyente) fluye hacia abajo a través de la columna. Los componentes de la muestra se separan unos de otros mediante el particionamiento entre la fase estacionaria (sílice o alúmina) y el eluyente móvil. Moléculas con diferentes polaridades se mueven a través de la columna a diferentes velocidades. El eluyente se recoge en fracciones. Las fracciones se analizan típicamente por cromatografía en capa fina para ver si la separación de los componentes se ha realizado correctamente. (Murphy, 2014).

Por otro lado está la combinación de la extracción líquido-líquido con la evaporación de solventes, la primera remueve la impureza o recupera el producto deseado disolviendo el material crudo en el cual otros componentes del material son insolubles, una vez que se tengan el producto deseado en el solvente escogido se procede a la evaporación de los solventes con presión reducida. (J. M. Sánchez, 1999).

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general:

Lograr la síntesis enzimática de un éster de sacarosa a partir de azúcar comercial y el laurato de vinilo.

2.3.2. Objetivos específicos

- Llevar a cabo la reacción de síntesis enzimática de los ésteres de sacarosa.
- Purificar los ésteres de sacarosa de la solución de reacción.
- Caracterizar el éster de sacarosa obtenido por medio de espectroscopia de infrarrojo y ^1H -RMN y ^{13}C RMN.

2.4. Matriz de marco lógico

Tabla 1. Matriz de marco lógico.

Objetivo general: Lograr la síntesis enzimática de un éster de sacarosa a partir de azúcar comercial y el laurato de vinilo.			
Objetivos específicos	Actividades	Indicador	Supuestos
Llevar a cabo la reacción de síntesis enzimática del éster de sacarosa.	<ul style="list-style-type: none"> - Establecer los implementos de laboratorio, los reactivos y las proporciones necesarias para llevar a cabo la síntesis. - Establecer la técnica de purificación del éster de sacarosa después de llevar a cabo la reacción. 	Obtención cromatoplacas de TLC con manchas características del éster de sacarosa.	<ul style="list-style-type: none"> - Encontrar las condiciones requeridas para llevar a cabo la reacción. - Disponibilidad de los equipos y reactivos requeridos. En caso de no contar con el laurato de vinilo se debe preparar.
Purificar el éster de sacarosa de la solución de la reacción.	<ul style="list-style-type: none"> - Establecer la metodología necesaria para eliminar cada compuesto de la solución obtenida. - Emplear la técnica de TLC para 	Obtención de una única mancha característica del éster de sacarosa.	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación del solvente correcto o la metodología más adecuada para la eliminación de los subproductos

	monitorear la purificación.		presentes
Caracterizar el éster de sacarosa obtenido por medio de espectroscopia de infrarrojo y ¹ H-RMN y ¹³ CRMN.	Obtener espectros de los compuestos de partida y los productos puros de reacción para la caracterización del material obtenido	Espectros o resultados que coincidan con los presentados en la literatura o en bases de datos.	- Disponibilidad de las herramientas y equipos para la caracterización.

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. Materiales y equipos

Para realizar la síntesis se requerían algunos reactivos y equipos, además de los instrumentos de laboratorio, estos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Reactivos y equipos necesarios para la síntesis y purificación del laurato de sacarosa.

Reactivo	Proveedor (pureza)
Sacarosa (al 99%)	Azúcar grado reactivo (>99.5%)
Laurato de vinilo	Aldrich (99.0%)
Lipasa (Lipase XX-L))	Proenzimas S.A.
tertbutanol	Aldrich (99.0%)
DMSO	Aldrich (>99.9%)
Equipos	
Espectrofotómetro IR	Universidad Icesi
Espectrofotómetro RMN	Universidad del Valle

2.5.2. Síntesis del éster de sacarosa.

Para llevar a cabo la síntesis de los ésteres de sacarosa se mezclaron la sacarosa y el laurato de vinilo o palmitato de isopropilo, se adicionó la enzima que actúa como el catalizador de la reacción. La enzima que se empleó para todos los experimentos fue, una lipasa obtenida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus*, **Lipasa XX-L**, generosamente donada por Proenzimas S.A. El azúcar fue de grado reactivo y el laurato de vinilo y palmitato de isopropilo fueron obtenidos de Sigma Aldrich S.A

Los reactivos, se agregaron a 50 mL de una mezcla de solventes, la cual permite una buena disolución del azúcar y además evita la inactivación de la enzima, dicha mezcla de solventes estaba compuesta por tertbutanol/DMSO (4:1). El DMSO no se usó en un porcentaje mayor al 20% de toda la mezcla para asegurar que no se inactivará la enzima y asegurar la solubilidad del azúcar, además de reducir las características tóxicas de la mezcla. La cantidad de enzima que se adicionó fue de 1250 mg, de sacarosa fue de 500 mg (1,5 mmol) y 4,75 mL (15 mmol) de palmitato de isopropilo. Para el caso del laurato de vinilo la reacción se aumentó 5 veces más, debido a que se quería producir mayor cantidad de producto para la caracterización, de esta manera se emplean 6250 mg de enzima, 2,5 g de sacarosa (7,3 mmol) y 19 mL (73 mmol) de laurato de vinilo. Cabe anotar que las reacciones para los distintos ésteres de ácidos grasos se realizaron por separado.

La reacción se llevó a 40°C durante 24 horas, reportes han demostrado que a esta temperatura la enzima no se desnaturaliza y se han obtenido los mejores

rendimientos (Ferrer et al, 1999). Además se realizó un seguimiento del avance de la reacción mediante cromatografía de capa fina en cromatoplasmas de sílice, como fase móvil se utilizó una mezcla de cloroformo/metanol cuyas relaciones variaban entre 5:1 y 9:1. Para la identificación de las señales se empleó como revelador una cámara con yodo.

2.5.3. Purificación del compuesto.

2.5.3.1. Lauratos de sacarosa:

El tertbutanol se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador, posteriormente se filtró al vacío para separar la enzima la cual se encontraba precipitada. Para eliminar el residuo de laurato de vinilo se realizó una cromatografía de columna, utilizando como solvente cloroformo y sílica gel de tamaño de partícula de 0,040 – 0,063 mm como fase estacionaria. Se debe tener en cuenta que antes de dicho procedimiento se logró la separación de los dos subproductos de la reacción se logró por medio de la extracción con ciclohexano/butanol (1:1), por lo que se eluyeron por separado. El cloroformo se evaporó y el residuo aceitoso se examinó por TLC, para esto el producto se eluyó con cloroformo.

2.5.3.2. Palmitato de sacarosa

El tertbutanol se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador, para eliminar el residuo de palmitato de isopropilo se realizó una cromatografía de columna, utilizando como solvente cloroformo/metanol 9:1 y sílica gel de tamaño de partícula de 0,040 – 0,063 mm. Por último el producto se recristalizó en acetona.

2.5.4. Caracterización del compuesto.

La caracterización se llevó a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y espectrometría de masas (MS). Para el análisis por IR y MS las muestras se enviaron al laboratorio de instrumentación química (LIQ) de la Universidad Icesi, por otro lado para RMN las muestras se enviaron a la Universidad del Valle para su respectivo análisis, sin embargo es de aclarar que debido al limitado acceso para la realización de los análisis en la universidad del Valle, solo se logró obtener los espectros de RMN para los palmitatos de sacarosa.

El análisis por Infrarrojo se llevó a cabo en un espectrofotómetro marca Thermo Fisher Scientific, modelo Nicolet 6700.

Adicionalmente, se realizó la caracterización del compuesto P1 de los lauratos de sacarosa por medio de Espectrometría de masas con fuente de ionización ESI (Electrospray-ionization), se empleó el espectrómetro de masas marca Waters, de la Universidad Icesi, operando en modo negativo.

El análisis por Resonancia Magnética Nuclear se llevó a cabo en un espectrómetro marca Bruker Spectrometer empleando como solvente cloroformo-D a 400 MHz y 27 °C.

2.5.5. Información del proveedor sobre la enzima.

La **Lipasa XX-L** es una enzima estearasa producida mediante fermentación sumergida del *Thermomyces lanuginosus* modificado genéticamente. La proteína enzimática, que no está genéticamente modificada, se separa y purifica del microorganismo. Es de aspecto líquido, de color amarillo hasta ámbar tenue con ligero olor a fermentación, soluble en agua y con actividad de 3000 U/g ($\pm 3\%$). Su rango efectivo de temperatura está entre los 30 y 40°C y el de pH está comprendido entre 5,0 y 8,0 siendo su óptimo a 7,5.

2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.6.1. Síntesis, purificación y caracterización de los lauratos de sacarosa.

2.6.1.1. Síntesis de los lauratos de sacarosa.

La síntesis de los lauratos de sacarosa se llevó a cabo mezclando los reactivos en una combinación de solventes que permitieran la disolución de dichos compuestos, sin inhabilitar la función de la enzima catalizadora de la reacción. La mayoría de las enzimas son inactivadas por solventes polares capaces de disolver con facilidad la sacarosa como el dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), entre otros. (Plou et al, 2002).

Por tal motivo, se ha empezado a involucrar el uso de solventes mucho más benignos como los alcoholes terciarios o cetonas, sin embargo, no se debe descuidar la baja solubilidad de la sacarosa y otros disacáridos u oligosacáridos en dichos solventes, por lo cual una combinación que mejore la solubilidad es lo que se buscó emplear en estos experimentos.

Tabla 3. Cantidades empleadas de reactivos para llevar a cabo la reacción con laurato de vinilo.

Reactivos	Sacarosa	Laurato de vinilo	Lipasa XX-L
Peso molecular (g)	342,30	226,36	-
Peso solución de reacción (g)	2,5	-	6,250
Volumen (mL)	-	19	
Moles reactantes (mmol)	7,30	73	0,2

Como se puede observar en la Tabla 2 las cantidades del éster de ácido graso son 10 veces más a las de sacarosa, se podría pensar que dicha relación promoviera la poliesterificación de la sacarosa, sin embargo como es una reacción catalizada por una enzima este caso sería muy poco probable.

Se decidió llevar a cabo la reacción a 40 °C debido a que a esta temperatura se encuentra dentro de los límites en los cuales la enzima esta activa, se tuvo precaución en este parámetro debido a que la reacción se llevó a cabo por 24

horas y se corría el riesgo de que el tertbutanol se evaporará con el paso de las horas, (debido a que su punto de ebullición es de 82,2 °C), para evitar el evaporamiento del solvente se empleó una columna de enfriamiento. Por otro lado el pH no se controló debido a que se empleaban solventes orgánicos. Se debe mencionar que este trabajo apunta a determinar si la esterificación de la sacarosa es posible y no optimizar las condiciones de trabajo para obtener un mayor rendimiento.

El avance de la reacción se siguió tomando muestras las cuales se analizaron por cromatografía de placa fina usando para esto una mezcla de cloroformo/metanol (9:1) y una cámara de yodo como revelador, comparando con los reactivos de partida para poder diferenciar los productos de dichos reactivos. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Figura 7.

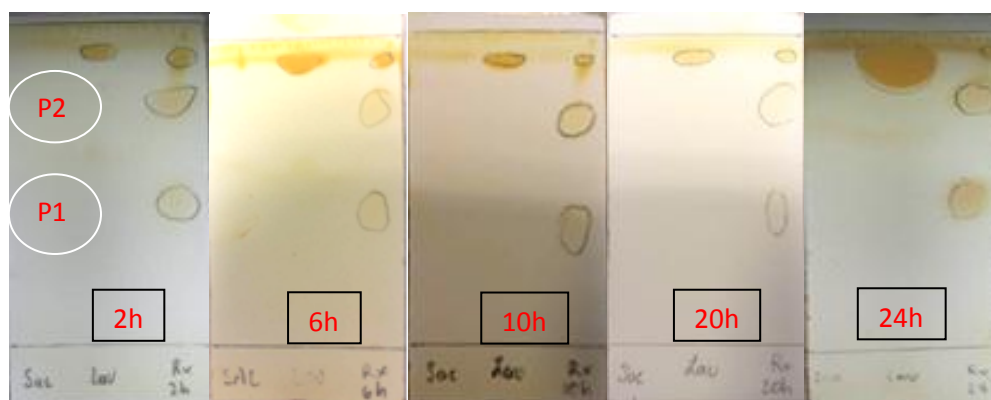


Figura 7. Avance de la reacción de síntesis de los lauratos de sacarosa a lo largo de 24 horas de reacción.

En la figura 7 podemos observar las señales del laurato de vinilo en el medio de la placa de cromatografía ($R_f = 0,91$), se empleó como referencia y de esta manera poder diferenciar los productos obtenidos de los reactivos.

Se hizo el seguimiento de la reacción a las 2, 6, 10, 20 y 24 horas, en la figura 7 se observan dos marcas con R_f distintos, donde, $R_{f1} = 0,75$ que se denominara P2 (producto 2) y $R_{f2} = 0,44$ que se denominara P1 (producto 1), diferentes a la del laurato de vinilo ($R_f = 0,91$) lo cual posiblemente nos indica la formación de dos productos de la reacción que posteriormente se purificaron y caracterizaron para poder determinar si lo que se obtuvo es un éster de sacarosa monosustituido, disustituido o polisustituido.

2.6.1.2. Purificación de los lauratos de sacarosa.

La purificación de los productos obtenidos en la síntesis se llevó a cabo mediante separación por cromatografía de columna. En una primera instancia se trató de realizar la purificación por medio de extracciones con solventes, la cual ya ha sido lograda con anterioridad en investigaciones reportadas en la literatura (Ferrer et al, 1999, Plou et al, 2002, Pérez-Victoria, 2006), en este caso no se logró llevar a cabo y por tal motivo se decidió separar los residuos de laurato de vinilo, que normalmente se extraían con n-hexano, de los productos obtenidos.

Cuando se estaba realizando la purificación por medio de las extracciones con solventes se logró separar los dos subproductos de la reacción. De esta manera se obtuvieron dos crudos, los cuales contenían residuos de laurato de vinilo que se eliminaron por cromatografía de columna, para esto se determinó que el solvente más indicado a utilizar sería cloroformo. Para llegar a esta conclusión primero se eluyeron las muestras en mezclas de cloroformo/metanol en proporciones variadas (ver tabla 4).

Tabla 4. Proporciones de las mezclas de solventes estudiadas para la cromatografía de columna.

	Cloroformo	Metanol
Proporciones (% v/v)	100	0
	80	20
	60	40
	40	60
	20	80
	0	100

En las mezclas cuyas proporciones de cloroformo eran superiores a las de metanol se observó buena separación de las señales de los subproductos y el laurato de vinilo, pero cuando se usó en 100% v/v cloroformo el laurato de vinilo corría casi que con el frente del solvente por lo que se decidió escoger esta opción.

Se recolectaron para el producto 2 (ver figura 8) 140 fracciones en tubos de ensayo de 10 mL. Para determinar si se había logrado con éxito la separación de los componentes del crudo se realizó cromatografía de capa fina, empleando igualmente cloroformo como solvente y la cámara de yodo como revelador, cada 5 tubos de ensayo, (es decir los tubos de ensayo 1, 5, 10, 15 hasta 40), para que de esta manera se lograra identificar cuales fracciones se procederían a llevar al rotaevaporador y eliminar el cloroformo obteniendo así el producto puro

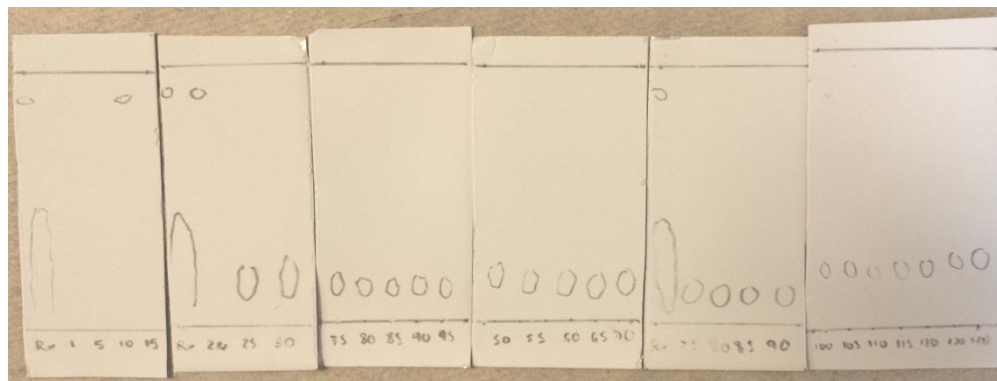


Figura 8. Purificación del producto 2 (P2).

En la figura 8 se puede observar que las fracciones 5, 10 y 15 contenían aun el laurato de vinilo, mientras que en las fracciones a partir del tubo de ensayo 25 la presencia del producto se observó sin ningún otro tipo de contaminación, por lo tanto, las fracciones restantes se mezclaron y se rotaevaporaron obteniendo un sólido cristalino de color blanco el cual se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas.

Para el producto 1 (Rf_2 en la figura 9) también se realizó la purificación por medio de la cromatografía de columna, en este caso se empleó de igual manera el cloroformo como solvente, sin embargo se decidió que se tomarían menos fracciones pero con mayor volumen por lo que se recogieron en tubos de ensayo de 25 mL. Para determinar si se había logrado con éxito la separación de los componentes del crudo se realizó cromatografía de capa fina, empleando así mismo cloroformo como solvente y la cámara de yodo como revelador, fracciones iguales se combinaron y rotaevaporaron para eliminar el cloroformo obteniendo así el producto puro.



Figura 9. Placas de cromatografía de la purificación de P1.

En la figura 9 se puede evidenciar la separación de los dos componentes presentes en la mezcla, el primero en ser eluido por el cloroformo es el laurato de

vinilo, el cual se observó en las fracciones 12 a 22, en las fracciones 23 a 39 no se apreció ninguna señal. Posteriormente en las fracciones 40 a 50 se logra percibir la señal del producto deseado sin la presencia del laurato de vinilo, por lo que se procedió a combinar las fracciones y la posterior rotaevaporación del cloroformo. Finalmente se obtuvo un líquido incoloro listo para su caracterización, sin embargo el producto (monolaurato de sacarosa) esperado es sólido en consecuencia se sospecha que a pesar de observar una sola señal en la placa de TLC el producto se encuentra impuro o el producto de reacción difiere de lo esperado.

2.5.1.2. Caracterización de los lauratos de sacarosa.

La caracterización estructural de los lauratos obtenidos se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y de Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y para el caso de P1 se empleó también la espectrometría de masas con Ionización por electrospray (ESI-MS).

2.5.1.2.1. Caracterización por IR de P1.

Para poder lograr un buen análisis de los productos obtenidos se realizó, tanto para el producto obtenido como para los productos de partida, la caracterización por infrarrojo. En la figura 10 se presentan los espectros de los reactivos de partida y uno de los productos obtenidos de la síntesis (P1). Al realizar la comparación de los espectros se puede observar que la banda de absorción fuerte que se encuentra en la región de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ caracteriza el estiramiento O-H de los grupos hidroxilo libres tanto de la sacarosa como del laurato de sacarosa. Las bandas de estiramiento en 2996 y 2915 cm^{-1} se asignan a los grupos metileno y metilos terminales de la cadena del laurato de sacarosa y laurato de vinilo, respectivamente. La banda que se observa a 1654 cm^{-1} corresponde al estiramiento característico de los enlaces C=O los cuales se pueden encontrar tanto en el espectro del producto P1 como el de uno de sus precursores. El C=O del laurato de vinilo se observa a 1770 cm^{-1} , esta diferencia se debe a la existencia de los dobles enlaces del grupo vinilo lo cual desplaza a valores más bajos la señal observada. Cuando el doble enlace se encuentra sobre el grupo alcoxi (-OR) del éster se observa un desplazamiento hacia valores más altos. Además se observa en la figura 10, para el espectro de P1 señales (1045 y 752 cm^{-1}) que nos advierten de la posible presencia de DMSO el cual presenta señales típicas a 1000 cm^{-1} .

En el espectro del laurato de vinilo se observan señales propias a su estructura que deben ser nombradas, la banda a 3091 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de C-H del doble enlace, seguidamente se puede observar una banda a 2971 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de los enlaces C-H de los enlaces sencillos la

cual es ancha debido a la cadena alquílica del laurato, la banda a 1770 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del carbonilo (C=O) y a 1650 cm^{-1} vibraciones de enlaces dobles entre carbonos como los que se encuentran en el sustituyente vinilo (C=C), posteriormente las bandas de vibración correspondientes a los enlaces C-O del éster los cuales típicamente se encuentran entre 1400 y 1100 cm^{-1} .

En el espectro de la sacarosa se puede observar principalmente la banda ancha perteneciente a los grupos hidroxilos de esta el cual se encuentra entre 3000 y 3500 cm^{-1} , además se observan bandas más pequeñas antes de los 3000 cm^{-1} que corresponde a la vibración de los enlaces C-H pertenecientes a la sacarosa.

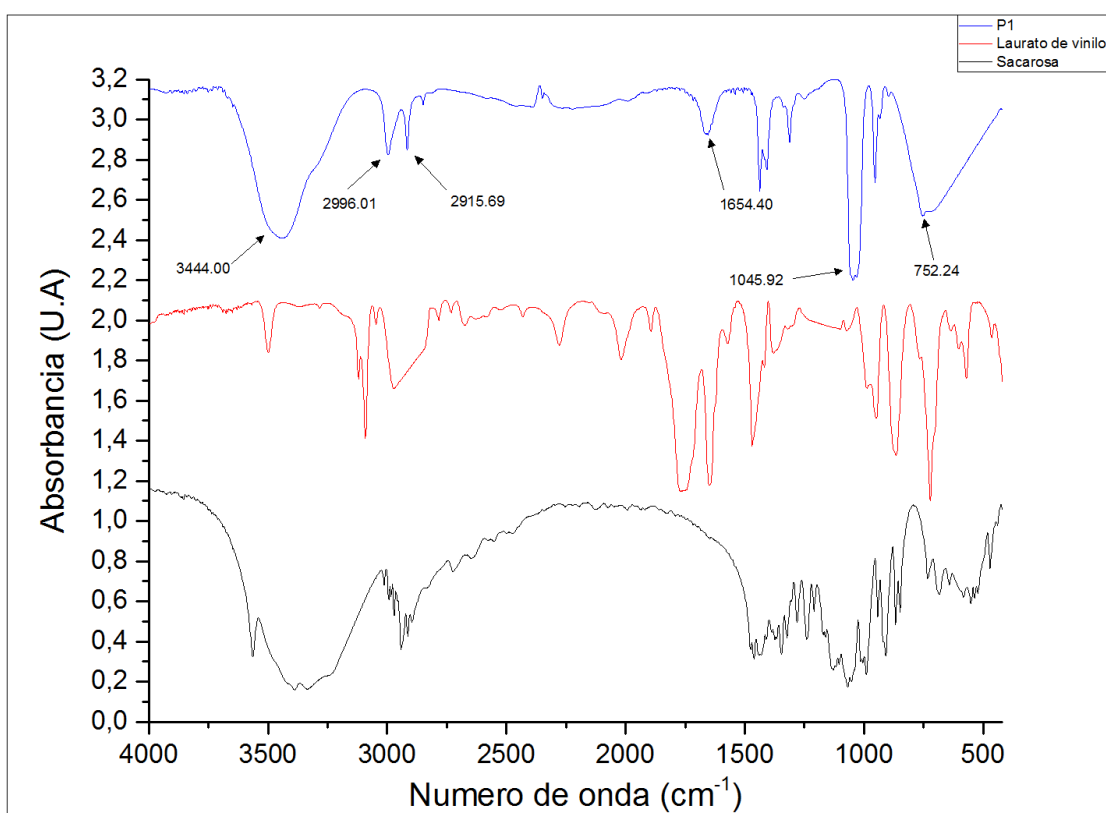


Figura 10. Espectros infrarrojos del P1 (Azul), laurato de vinilo (Rojo) y Sacarosa (Negro).

Estos resultados sugieren que muy posiblemente se logró llevar a cabo la síntesis de un sacaroéster compuesto por la estructura polar de la sacarosa, cuya polaridad está determinada en gran parte por sus grupos hidroxilo y por la cadena apolar donada por el laurato de vinilo, sin embargo la espectroscopia en infrarrojo no es concluyente y no se puede afirmar con certeza que lo que se obtuvo es en realidad el producto monosustituido, disustituido o polisustituido, ni tampoco el

lugar donde ocurrió la ésterificación. Por lo que como complemento se realizó al mismo producto obtenido un análisis de RMN y de espectrometría de masas.

2.5.1.2.2. Caracterización por ^1H -RMN de P1.

La caracterización por ^1H -RMN se realizó en cloroformo-D a 400 MHz y 27 °C, la señal del solvente se ve representada por un singulete a 7.27 ppm. En la estructura de la sacarosa se diferencian dos anillos, el de 6C (piranosa o glucosa) y de 5C (furanosa o fructosa), unidos por un enlace O-glucosídico, adicionalmente uno o más de los grupos hidroxilo del anillo de glucosa que se ha unido con el laurato de vinilo, formando un éster.

Para dicha estructura descrita anteriormente se reporta en la literatura que el protón anomérico del anillo de glucosa de la sacarosa, está presente en el espectro como un doblete, con un desplazamiento entre 5 y 5.5 ppm dependiendo del ambiente en el que se encuentre, dicha señal en el espectro de P1 no se observa (ver figura 11), esto se debe posiblemente a que el producto obtenido no está completamente puro y se presentan interferencias en algunas señales como la mencionada anteriormente. Por otro lado se deberían observar, las señales correspondientes a sus hidroxilos a un desplazamiento químico de 2,4 y 2,8 ppm pero no se logran observar debido a la presencia de un contaminante, muy posiblemente DMSO con un singulete intenso a 2,4 ppm.

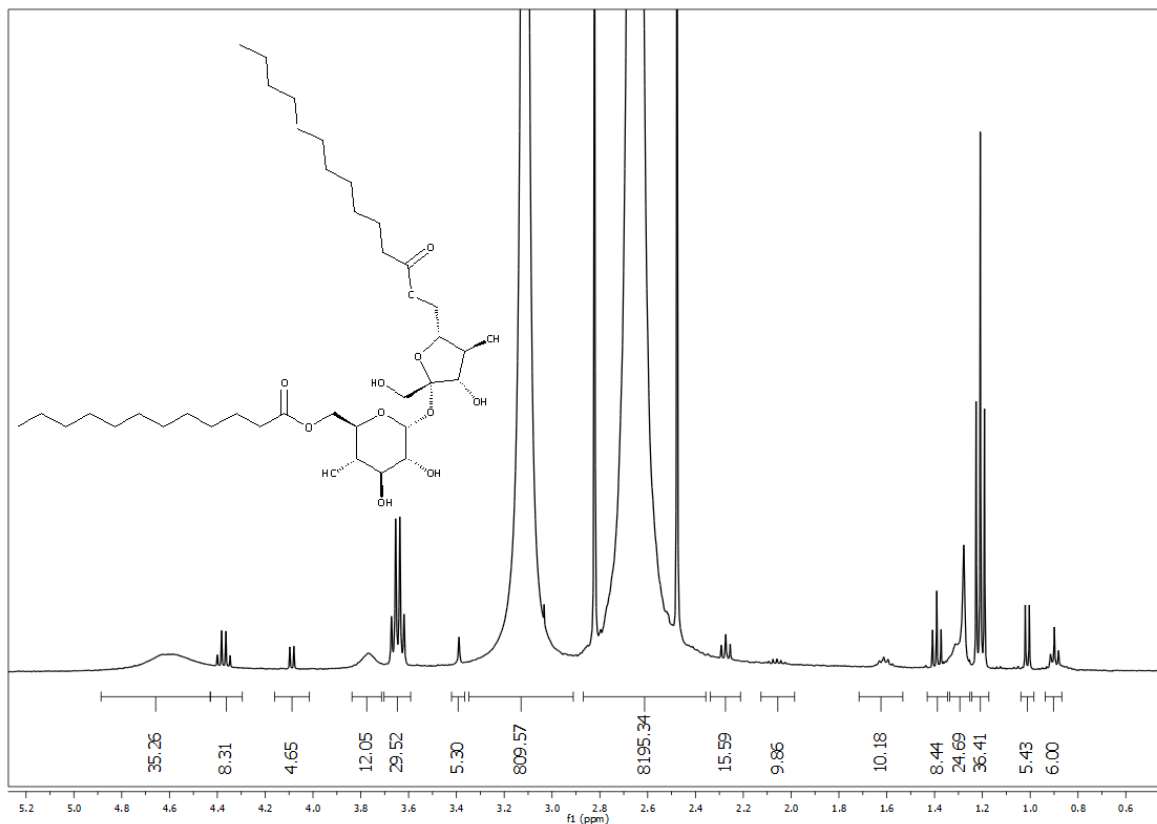


Figura 11. Espectro ¹H-RMN de P1 en CDCl₃, a 27°C, 400 MHz (se omite señal del solvente).

Por otro lado las señales del grupo laurato están presentes en el espectro obtenido, y se identifican de la siguiente manera: a 0.83 ppm aparece un triplete que corresponde al grupo metilo (CH₃) de cada cadena de laurato e integra para seis protones, seguidamente a 1.21 ppm respectivamente, aparece un multiplete, que se debe a los grupos metileno (CH₂) de la molécula del laurato, ahora a 1.54 ppm, aparece otro multiplete, debido al penúltimo grupo metileno (CH₂), a 2.20 ppm aparece un triplete correspondiente al último grupo metileno (CH₂) adyacente al grupo carbonilo del laurato.

Adicionalmente se encuentra un singulete a 3.36 ppm que integra para 5 protones debido a los hidrógenos de los grupos hidroxilos del producto en cuestión. Sin embargo, se presentan algunas señales a 2.62 y 3.08 ppm que corresponden a impurezas que no se lograron separar en el paso anterior de purificación. Es por esto que posteriormente se realizó como forma complementaria la caracterización por espectrometría de masas.

2.5.1.2.3. Caracterización por ESI-MS.

El análisis por espectrometría de masas (ESI-MS) se realizó en metanol. El espectro del producto se obtuvo con una fuente de ionización por electrospray (ESI) en el laboratorio de instrumentación química de la Universidad Icesi, obteniendo el espectro en modo negativo. Los parámetros instrumentales para el análisis de ESI-MS están resumidos en la tabla 4.

Tabla 5. Parámetros instrumentales para ESI-MS.

Voltaje capilar (kV).	3.12
Voltaje de cono (V).	50
Temperatura de desolvatación de la fuente (°C).	399
Flujo del gas de desolvatación (L/h).	599
Ion Energy (V)	0.4

En la figura 12 se presenta el espectro de masas obtenido en modo negativo, en el cual se observa principalmente un ion a m/z 339 el cual describe la escisión de los ésteres sustituyentes de la sacarosa, obteniendo el ion de fragmentación para la sacarosa, el cual es el ion más estable dado la intensidad de la señal.

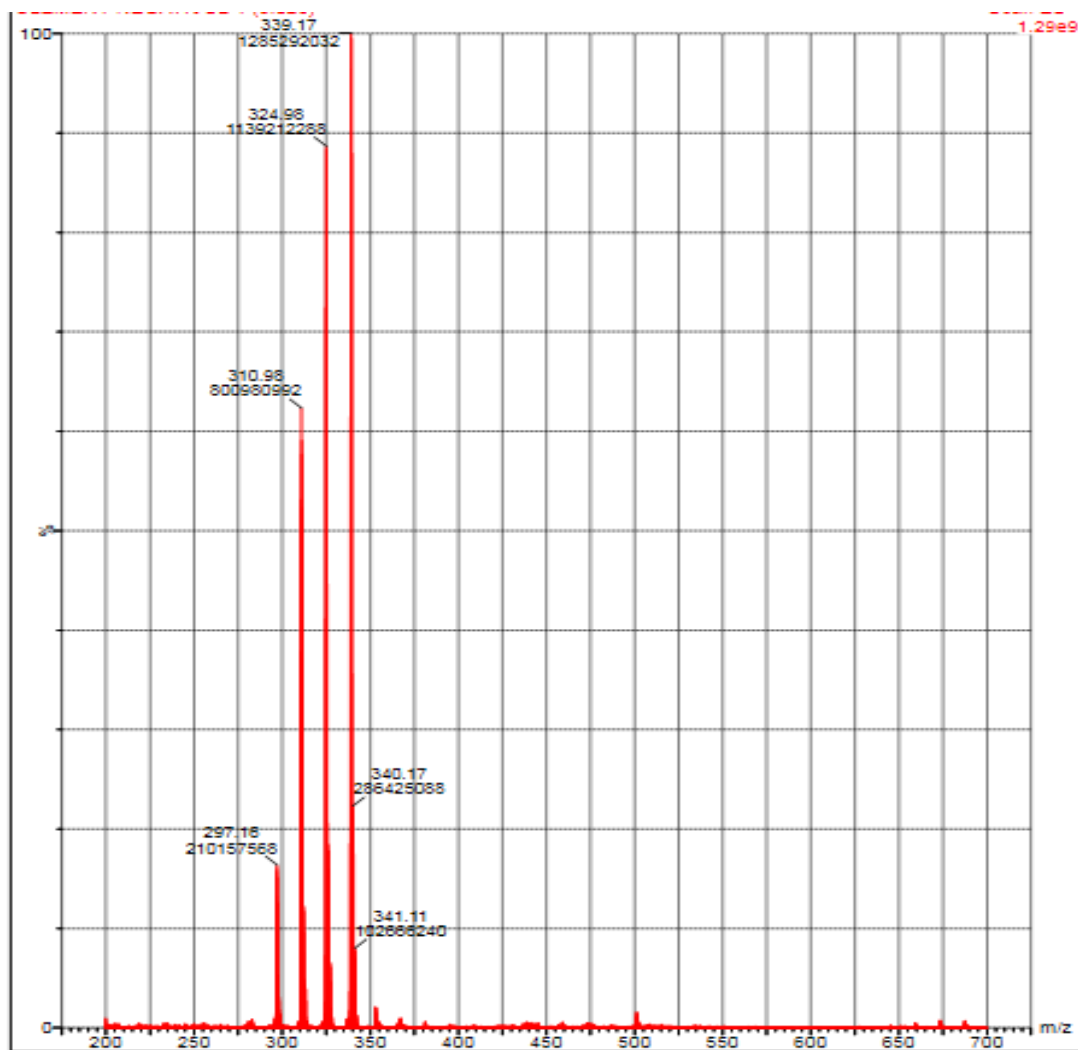


Figura 12. Espectro ESI-MS de $[M - H]^-$ de P1.

Para poder analizar otros tipos de fragmentaciones de la molécula se realizaron ampliaciones del espectro las cuales se presentan a continuación.

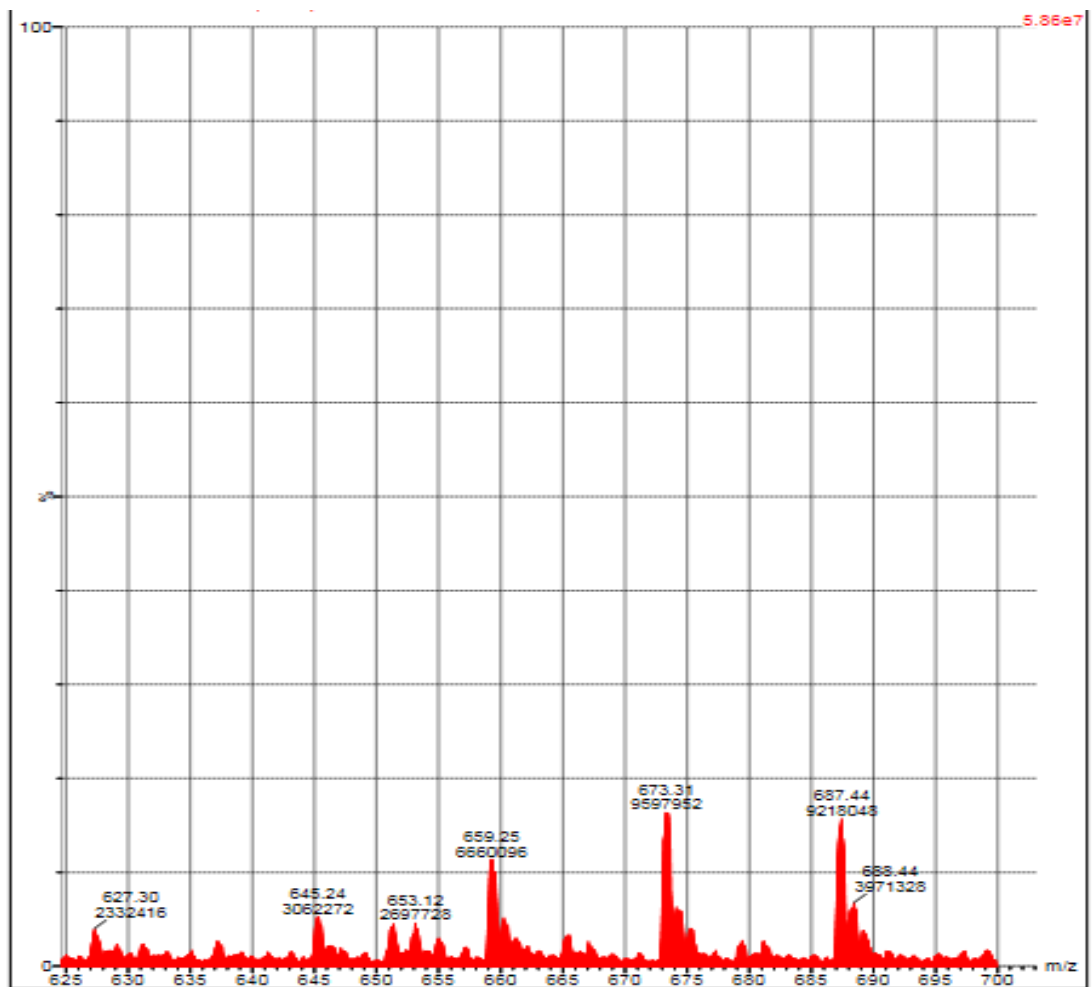


Figura 13. Espectro ESI-MS de $[M - H]^-$ de P1 entre m/z 625 y 700.

No se logró encontrar el ion molecular del producto obtenido, el cual podría haberse obtenido disminuyendo la energía de fragmentación, sin embargo en este espectro Figura 13 se observa un ion con m/z 687 el cual muy posiblemente corresponde a la perdida de agua es decir la deshidratación de un $-OH$ de la sacarosa como se representa en la figura 14, el cual corresponde a una pérdida de 17 m/z.

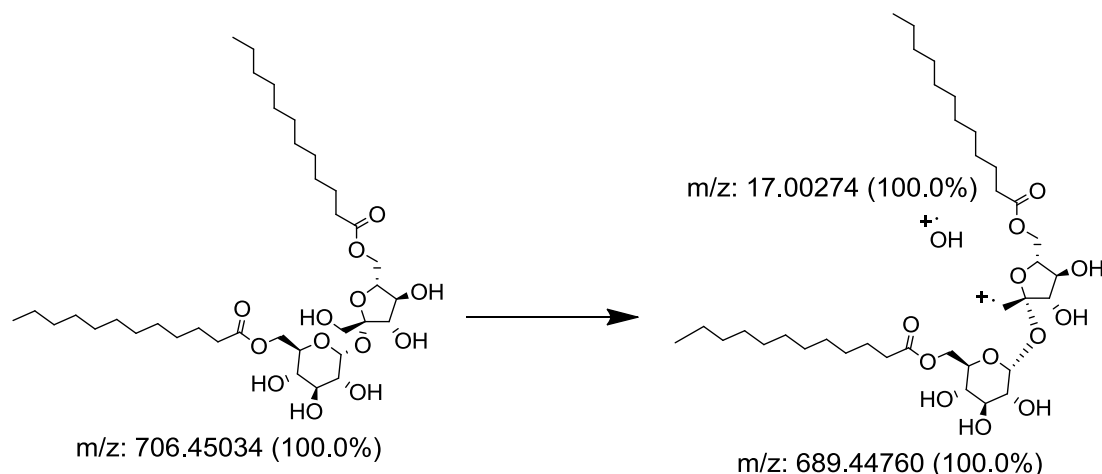


Figura 14. Esquema de fragmentación de P1, pérdida de grupo hidroxilo.

A continuación se observan pérdidas consecutivas de iones correspondientes a m/z 14 lo que sigue a una pérdida consecutiva de grupos metileno (CH_2) de la cadena del laurato.

Otro tipo de fragmentación que se podría encontrar son el resultado del rompimiento del anillo piránico de la sacarosa como se ilustra en la siguiente figura.

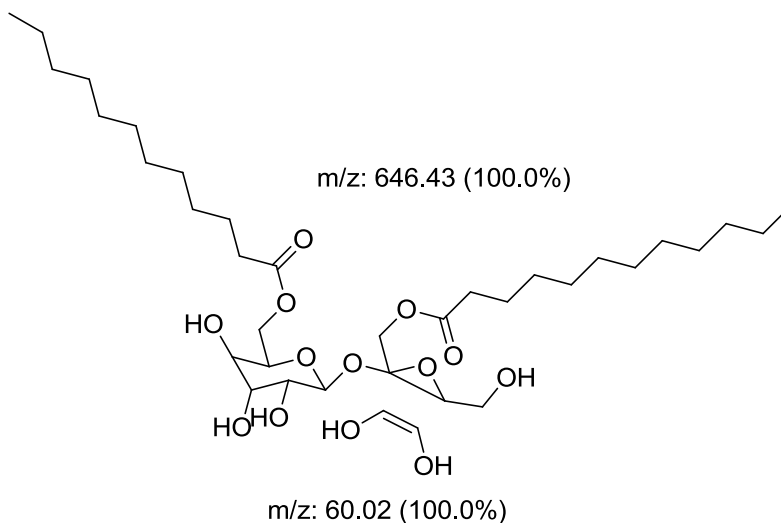


Figura 15. Esquema de fragmentación de P1, rompimiento anillo piránico.

Sin embargo un posible rompimiento del enlace glucosídico de la sacarosa no se logra observar en el espectro de masas, esta fragmentación en la mayoría de los casos se ve favorecida, pero posiblemente la existencia de los sustituyentes laurato en la estructura de P1 y también por las bajas energías de fragmentación empleadas este rompimiento se pudo ver desfavorecido. En la siguiente

ampliación se muestra la zona que comprende entre m/z 345 y 370, donde se debería encontrar el ion resultante del rompimiento del enlace glucosídico.

En la figura 16 se observan señales muy intensas que corresponden a pérdidas de m/z de 14 lo cual sugeriría de nuevo la pérdida de grupos metilenos de la segunda cadena del laurato que se sospecharía pertenece al producto obtenido.

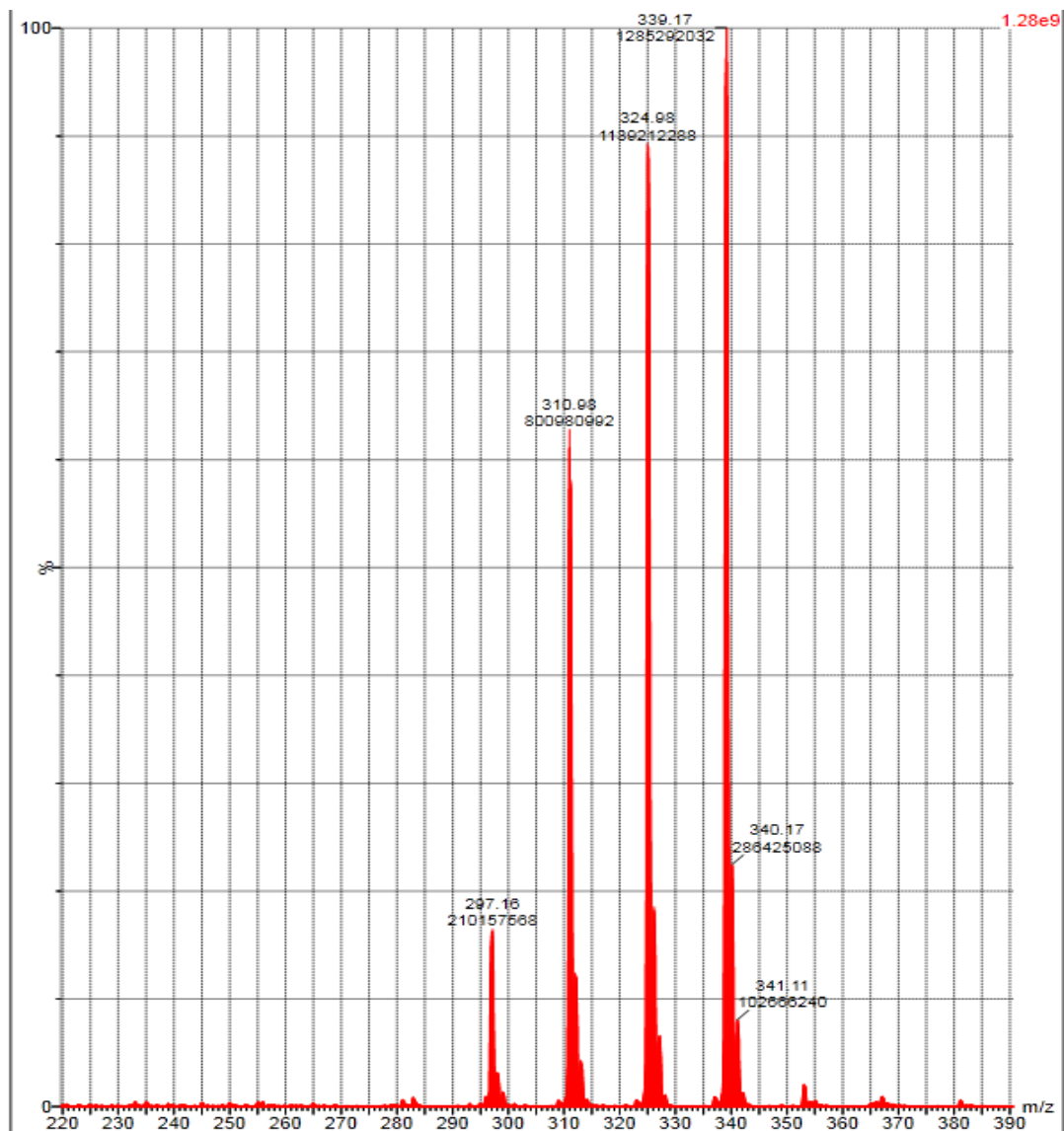


Figura 16. Espectro ESI-MS de $[M - H]^-$ de P1 entre m/z 220 y 390.

2.5.1.2.4. Caracterización por ^{13}C -RMN de P1.

Se decidió que la elucidación de P1 no era concluyente con los métodos y pruebas mencionadas anteriormente por lo que se decidió realizar la resonancia magnética nuclear del Carbono 13 (^{13}C -RMN), obteniendo los resultados que se presentan en la Figura 17.

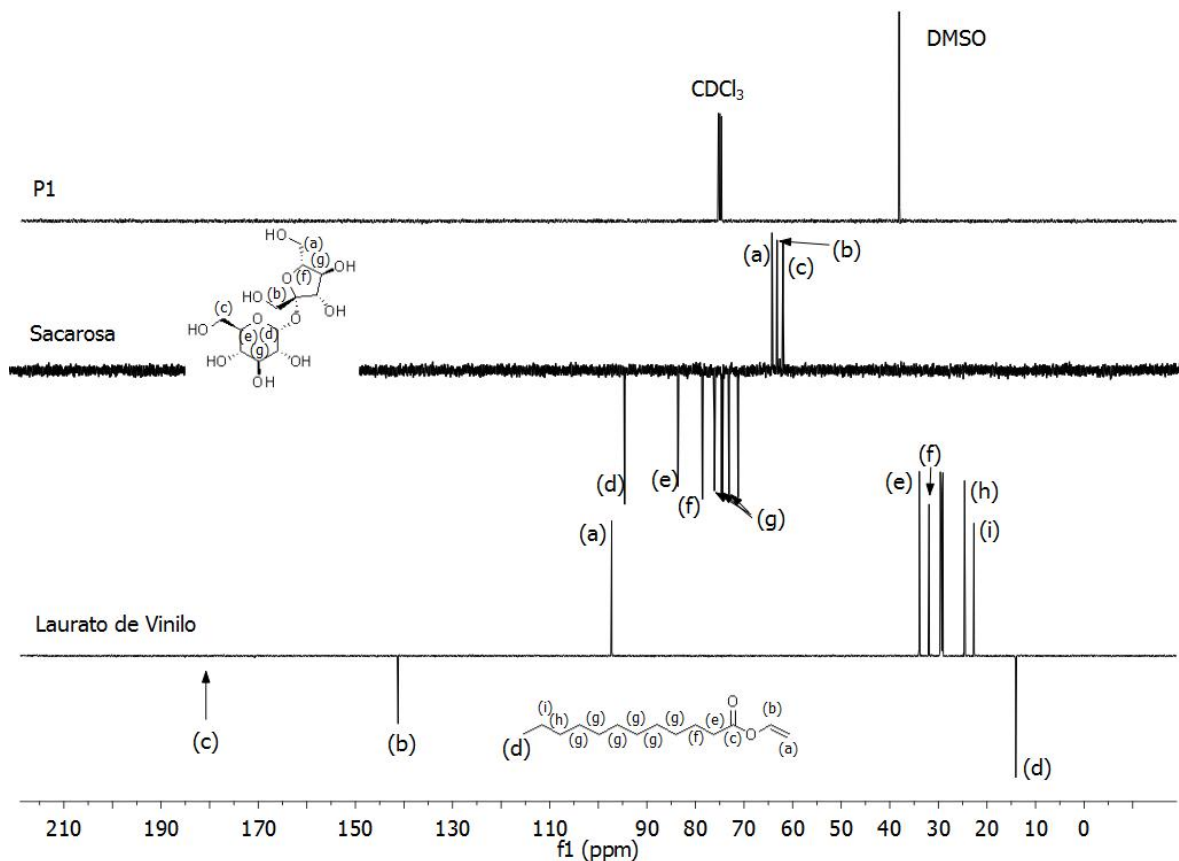


Figura 17. Espectros de ^{13}C -RMN del laurato de vinilo (abajo) DEPT, sacarosa (medio) DEPT y P1 (arriba) modo normal. El laurato de vinilo y P1 fueron tomados en CDCl_3 y la Sacarosa en D_2O .

La caracterización por ^{13}C -RMN se realizó en cloroformo-D para el laurato de vinilo y P1 mientras que para la sacarosa se realizó en agua-D 400 MHz y 27 °C. En la figura 17 se puede observar los espectros de ^{13}C -RMN de los reactivos de partida y del producto obtenido de la reacción, sin embargo no se logró realizar la comparación entre estos compuestos debido que para el P1 se obtiene una señal con desplazamiento de 38 ppm una señal típica de la presencia de DMSO en la muestra, dicha contaminación impide la obtención del espectro de P1 que posiblemente se encuentra disuelto en el DMSO, el cual no fue completamente eliminado en el paso de purificación del compuesto.

Por medio de los espectros de ^{13}C -RMN se quería comparar las diferencias en el desplazamiento químico de algunos carbonos característicos, por ejemplo el carbono del grupo carbonilo del laurato de vinilo, el cual no se logra observar en el espectro obtenido, tiene un desplazamiento de 170 ppm el cual es diferente al carbono del grupo carbonilo del laurato de sacarosa que se debería encontrar un poco más desplazado a campo alto, debido al efecto del enlace con el oxígeno de la sacarosa.

En el espectro de la sacarosa se observan todas las señales de los carbonos marcados como a, b y c correspondientes a los grupos metilenos adyacentes a los hidroxilos primarios de la sacarosa, los carbonos marcados como d y e corresponden al carbono con enlace glucosídico y el carbono adyacente el carbono metileno adyacente al grupo hidroxilo, el carbono f corresponde al carbono adyacente al metileno unido al grupo hidroxilo de la parte de la fructosa, los carbonos marcados como g corresponden a los carbonos adyacentes a los hidroxilos secundarios de la estructura de sacarosa.

En el espectro del laurato de vinilo se logran diferenciar los carbonos pertenecientes a la cadena alquílica, los cuales están marcados como: d, el cual corresponde al metilo externo de la cadena, el carbono i que hace referencia al adyacente al metilo h y los g corresponden a los metilenos internos de la cadena alquílica, e y f representan los carbonos α y β del carboxilo por ultimo están a y b que representan los carbonos del vinilo.

Como se mencionó anteriormente la comparación no se logró hacer por la presencia del DMSO, dicha presencia está justificada por la señal en el espectro de la figura 17 y además explica la presencia de algunas señales características del estiramiento del enlace S=O ($1030\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$) y la banda entre 790 y 570 cm^{-1} , la cual pertenece al estiramiento del enlace C-S y se observan en el espectro de infrarrojo de la Figura 10.

Se habría deseado llevar a cabo la eliminación del DMSO y realizar un nuevo análisis de espectroscopia sin embargo la falta de tiempo no permitió conseguirlo.

2.5.1.2.5. Caracterización por IR del P2.

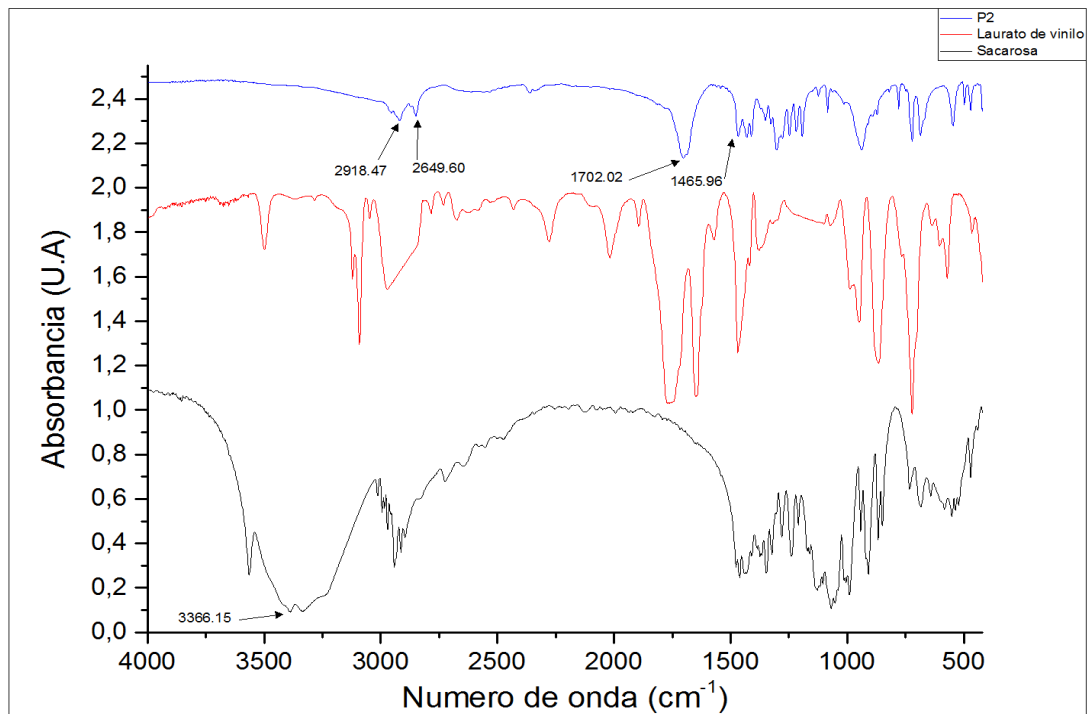


Figura 18. Espectros infrarrojos de P2 (Azul), laurato de vinilo (Rojo) y Sacarosa (Negro).

En este caso también se compararon los espectros de los reactivos de partida con el producto obtenido y se obtuvieron los espectros presentados en la figura 18. Para el Producto 2 (P2), se puede observar la ausencia de la banda característica de la vibración de los enlaces O-H ($3400-3000\text{ cm}^{-1}$) de la sacarosa lo cual sugiere que el producto obtenido muy posiblemente es un producto secundario de la reacción o por otro lado se esterificó en cada posición de los hidroxilos, sin embargo se puede asegurar que se trata igualmente de un éster, ya que se siguen observando las bandas características del estiramiento C=O (1702 cm^{-1}) y el estiramiento C-O del éster a 1465 cm^{-1} . Finalmente se puede observar que en realidad el producto purificado no es un laurato de sacarosa, debido a que no se presentan las bandas esperadas para la sacarosa pero si las de los ésteres, como por ejemplo la banda de vibración de los grupos OH, la banda de absorción asimétrica de los grupos metilo (CH_3), la banda de los grupos CH anómeros α y β sacáridos (1366 cm^{-1}) y la banda de absorción del éter cíclico O-O (1129 y 1105).

Cuando se realizó la comparación de los espectros de infrarrojo de los productos 1 y 2 se pudo observar que para P1 se observaba la presencia de la banda característica de la vibración de los enlaces O-H ($3400 - 3000\text{ cm}^{-1}$), sin embargo en el espectro de P2 no se pudo encontrar evidencia de dicha banda, por lo que se deduce que no existen grupos OH en la estructura de P2. Se pueden observar

bandas características que indican la presencia de grupo éster en ambos productos, las cuales se encuentran marcadas en la figura 19.

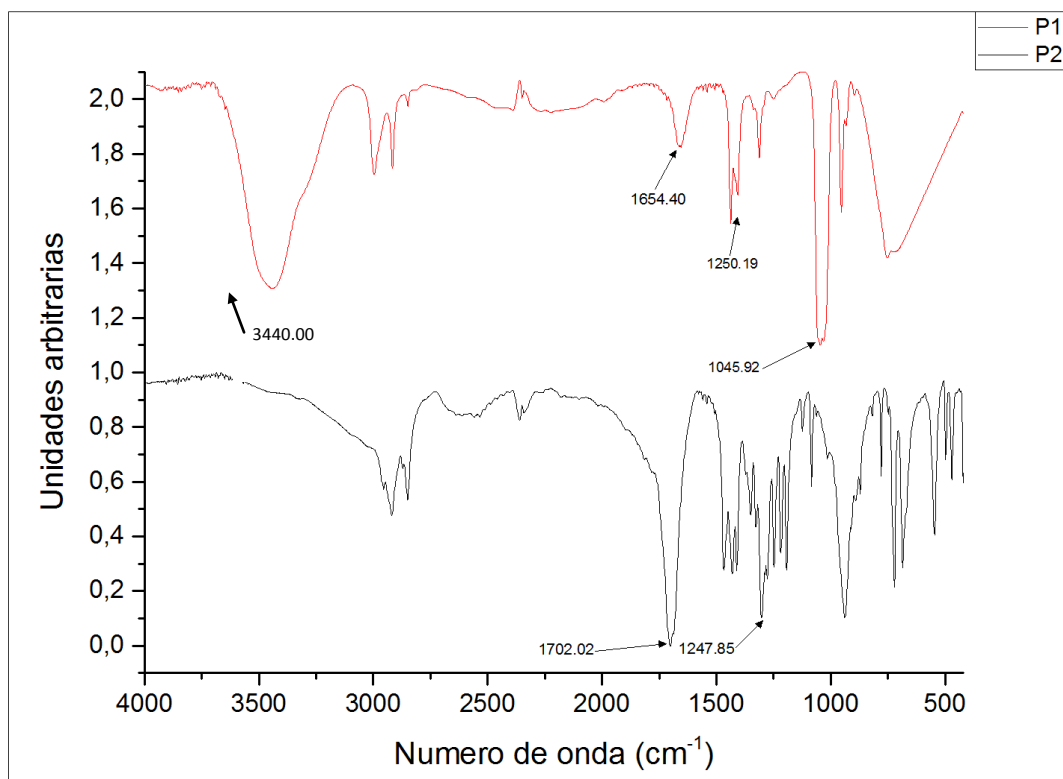


Figura 19. Espectros infrarrojos de los productos 1 (rojo) y 2 (negro).

2.5.1.2.6. Caracterización por ^1H -RMN de P2 (anhídrido dodecanoico).

Las señales de la Sacarosa se verán ligeramente desplazadas hacia campo alto, es decir con un mayor desplazamiento químico, por efecto de disolvente, con respecto de si se tomara en D_2O u otro solvente y las señales atribuidas a hidrógenos ácidos no se podrán apreciar.

A 0.91 ppm aparece un triplete que corresponde al grupo metilo (CH_3) que integra para seis protones, seguidamente en 1.29 ppm aparece un multiplete que integra para 32 protones (b), debido a 8 de los grupos metileno (CH_2) de la cadena alquílica del laurato, (a) aparece a 1.66 ppm como otro multiplete que integra para 4 protones debido al penúltimo grupo metileno (CH_2) de dicha cadena y finalmente, (c) aparece a 2.38 ppm como un triplete, que integra para cuatro protones, debido al último grupo metileno (CH_2) adyacente al grupo carboxilo del éster (d).

Debido a que no se encuentran señales que nos indiquen la existencia de hidrógenos pertenecientes a la sacarosa ni a los del grupo vinilo del reactivo de partida, se considera una esterificación entre dos moléculas de laurato obteniendo así un anhídrido dodecanoico.

La figura 20 muestra el espectro de resonancia completo.

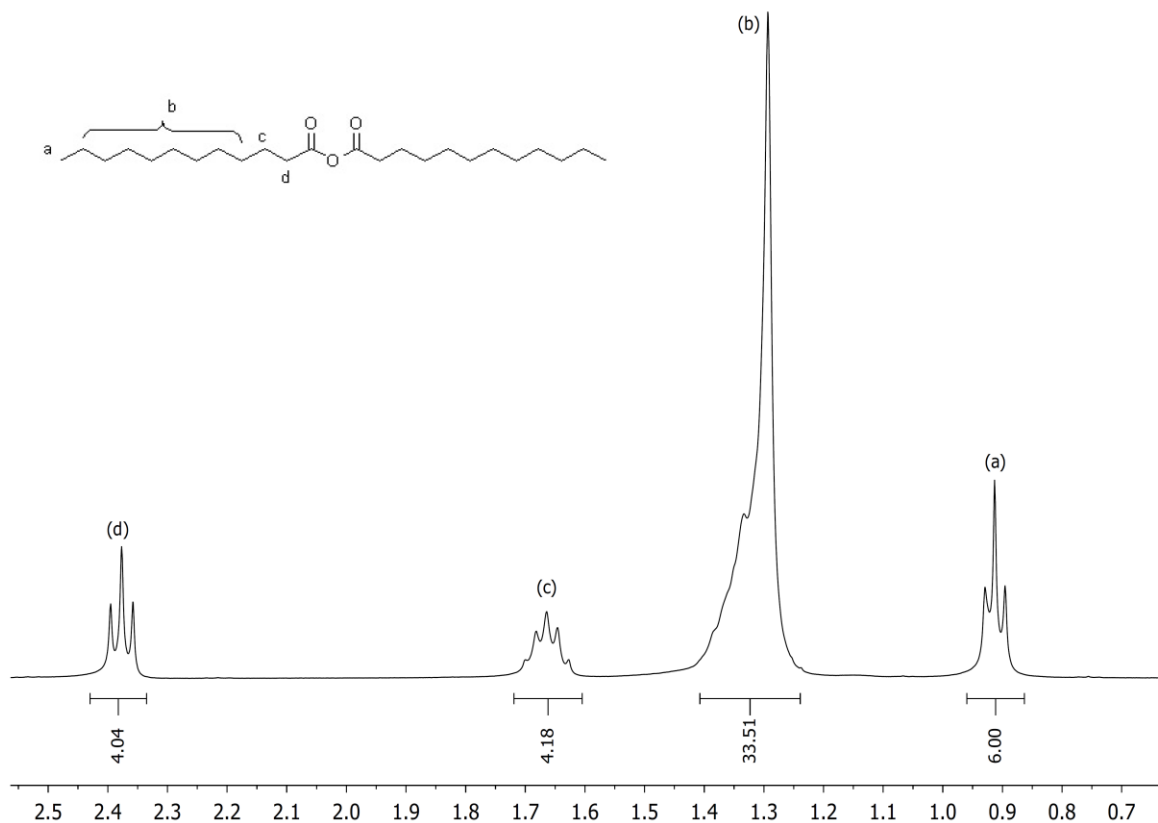


Figura 20. Espectro ¹H-RMN del P2 en CDCl₃, a 27 °C, 400 MHz (se omite señal de disolvente).

También se debe tener en cuenta la existencia de un acoplamiento entre el grupo metilo (CH₃) a 0.91 ppm y el último grupo metileno (CH₂) a 2.38 ppm, correspondiente para ambos a 8 Hz (JCH₃ y JCH₂), indicando así una remota vecindad. No fue posible calcular las constantes de acoplamiento para los multipletes, dado que no permitían observar una diferencia apreciable entre los picos de las señales.

El cálculo de J resulta de multiplicar la intensidad del campo magnético en MHz por el valor o diferencia entre las señales, cabe anotar que los valores son obtenidos a través del procesamiento de los datos usando MestReNova y ACDLab.

$$J_{\text{CH}_3} = 0.93 \cdot 400 - 0.91 \cdot 400 = 8 \text{ Hz}$$

$$J_{\text{CH}_2} = 2.40 \cdot 400 - 2.36 \cdot 400 = 8 \text{ Hz}$$

2.5.1.2.7. Análisis por DSC de P2 (anhídrido dodecanoico).

El punto de fusión del producto 2 (P2) se determinó por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para esto se realizó un barrido desde 0°C hasta 300°C, obteniendo así el Termograma que se presenta en la figura 21, en este se puede observar un pico endotérmico a 45°C correspondiente al subproducto obtenido de la reacción, lo cual confirma que el producto obtenido es el anhídrido dodecanoico ya que se reporta en la literatura un rango de fusión entre 41 y 43 °C lo cual no es muy distante a lo obtenido experimentalmente.

La obtención de dicho producto no deseado en la reacción, se debe al exceso de laurato de vinilo con la cual se llevó a cabo la reacción, por tal motivo se debe estudiar con mayor profundidad las proporciones de los reactivos a utilizar en próximos estudios.

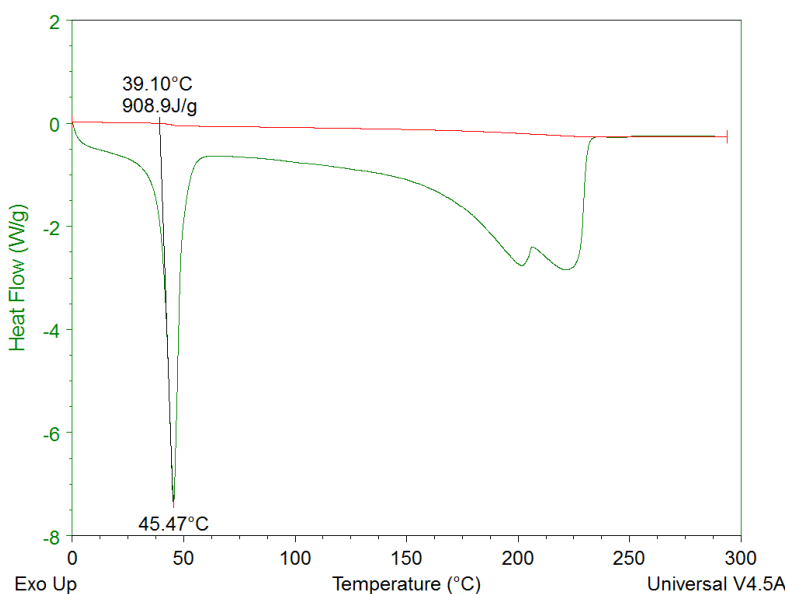


Figura 21. Termograma de DSC del anhídrido dodecanoico (P2).

Se calculó el porcentaje de rendimiento experimental del P2 de la reacción de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \text{Rendimiento teorico} \\ & = 19 \text{ mL} \times \frac{0.871 \text{ g}}{\text{mL}} \times \frac{\text{mol}}{226,36 \text{ g } C_{14}H_{22}O_2} \times \frac{1 \text{ mol } C_{24}H_{46}O_3}{2 \text{ mol } C_{14}H_{22}O_2} \times \frac{382.62 \text{ g } C_{24}H_{46}O_3}{\text{mol } C_{24}H_{46}O_3} \\ & = 13.98 \text{ g } C_{24}H_{46}O_3 \end{aligned}$$

$$\text{Rendimiento experimental} = 2.5 \text{ g}$$

$$\% \text{ de rendimiento experimental} = \frac{2.5 \text{ g}}{13.98 \text{ g}} \times 100 = 17\%$$

No es posible calcular el rendimiento de P1 ya que no se determina el peso verdadero de este producto al estar mezclado aun con el DMSO.

2.5.2. Síntesis, purificación y caracterización del palmitato de sacarosa.

2.5.2.1. Síntesis del palmitato de sacarosa (P3).

Además de realizar la síntesis con el laurato de vinilo se trató de llevar a cabo otra síntesis independiente, empleando en este caso el palmitato de isopropilo, el cual en su estructura presenta una cadena alquílica de 16 carbonos, 4 más que los que presenta el laurato de vinilo, esto le confiere características más apolares por lo cual propiedades distintas. Al igual que el laurato de vinilo, el palmitato de isopropilo es fácilmente biodegradable.

Tabla 6. Cantidades empleadas de reactivos para llevar a cabo la reacción con palmitato de isopropilo.

Reactivos	Sacarosa	Palmitato de isopropilo	Lipasa XX-L
Peso molecular (g)	342,30	298,29	-
Peso solución de reacción (g)	0,5	-	1,250
Volumen (mL)	-	4,75	
Moles reactantes (mmol)	1,5	15	0,03

Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción son las mismas que para el laurato de sacarosa, empleando la misma combinación de solventes, la misma temperatura e igual tiempo de reacción. Al igual que se llevó el control del avance de la reacción por TLC como se puede ver en la figura 23.

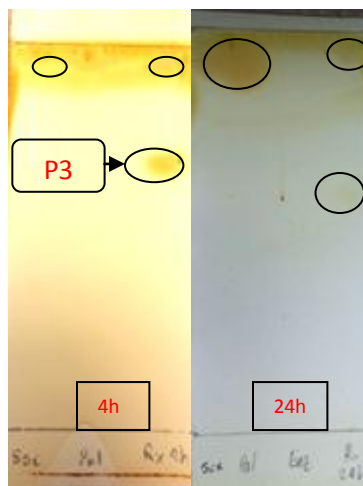


Figura 22. Avance de la reacción de síntesis del palmitato de sacarosa a lo largo de 24 horas de reacción.

En la figura 22 se pueden observar las señales del palmitato de isopropilo con un valor de R_f equivalente a 0,94, tanto para el reactivo puro como para la mezcla de reacción a las 4 y 24 horas de reacción. La señal del reactivo puro se empleó como referencia y de esta manera poder diferenciar los productos obtenidos de los reactivos. Como se explicó anteriormente la sacarosa no se observó debido a que la mezcla reveladora (yodo) no permite la visualización de la sacarosa o sacáridos. En cuanto a la solución de reacción se monitoreó el avance de la reacción a las 4 y 24 horas, como se ilustra en la figura 22. Se puede observar una señal ($R_{f1} = 0,62$) que no corresponde a la encontrada en la referencia del palmitato de isopropilo ($R_f = 0,94$) lo cual posiblemente nos indica la formación un producto de la reacción (P3).

2.5.2.2. Purificación de P3 (palmitato de sacarosa).

Para llevar a cabo la purificación del palmitato de sacarosa se empleó finalmente la técnica de separación por cromatografía de columna. En primera instancia se trató de realizar la purificación por medio de extracciones con solventes, la cual ya ha sido lograda con anterioridad por otros investigadores (Ferrer et al, 1999; Plou et al, 2002; Pérez-Victoria, 2006), en este caso no se logró conseguir y se purifico el producto obtenido del principal residuo en la solución de reacción, el cual era el palmitato de isopropilo, por medio de cromatografía de columna.

Para llevar a cabo la cromatografía de columna se empleó como solvente una mezcla de cloroformo/metanol 9:1, con la cual primero se realizó una elución por cromatografía de capa fina y se obtuvo una buena separación de las señales del palmitato de isopropilo ($R_f = 0,92$) y el palmitato de sacarosa ($R_f = 0,78$) (ver figura 24)



Figura 23. TLC obtenida con mezcla de cloroformo/metanol 9:1.

Luego de determinar la mezcla de solventes se pasó a realizar la cromatografía de columna, en la cual se recolectaron 10 fracciones en tubos de ensayo de 25 mL.

Para determinar si se había logrado con éxito la separación de los componentes del crudo, se realizó cromatografía de capa fina a cada una de las fracciones recolectadas, empleando igualmente cloroformo/metanol 9:1 como solvente y la cámara de yodo como revelador. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida.

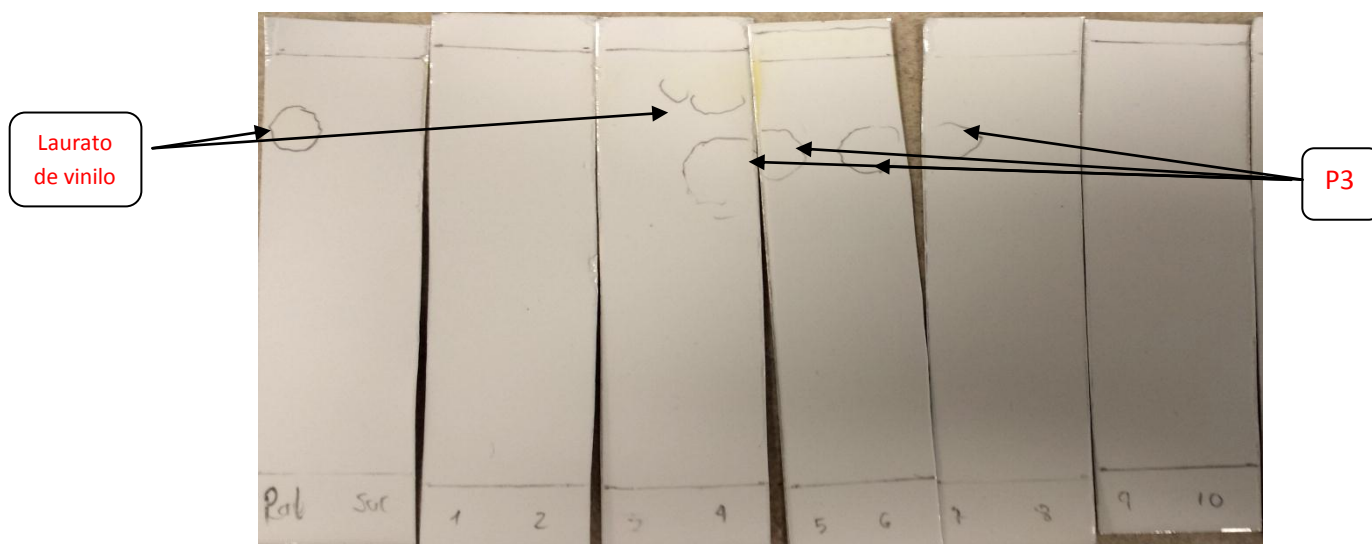


Figura 24. Placas de cromatografía de la purificación del palmitato de sacarosa (P3).

En la figura 24 se puede observar que las fracciones 4, 5, 6 y 7 contenían el palmitato de sacarosa, pero la fracción 4 contenía tanto el palmitato de sacarosa como el palmitato de isopropilo, por lo tanto las fracciones restantes se

combinaron y se rotaevaporaron. Finalmente se obtuvo un sólido cristalino de color blanco.

2.5.2.3. Caracterización de P3 (Palmitato de sacarosa).

La caracterización estructural de los surfactantes obtenidos se realizó mediante el empleo de la técnica instrumental de espectroscopia de infrarrojo (FTIR).

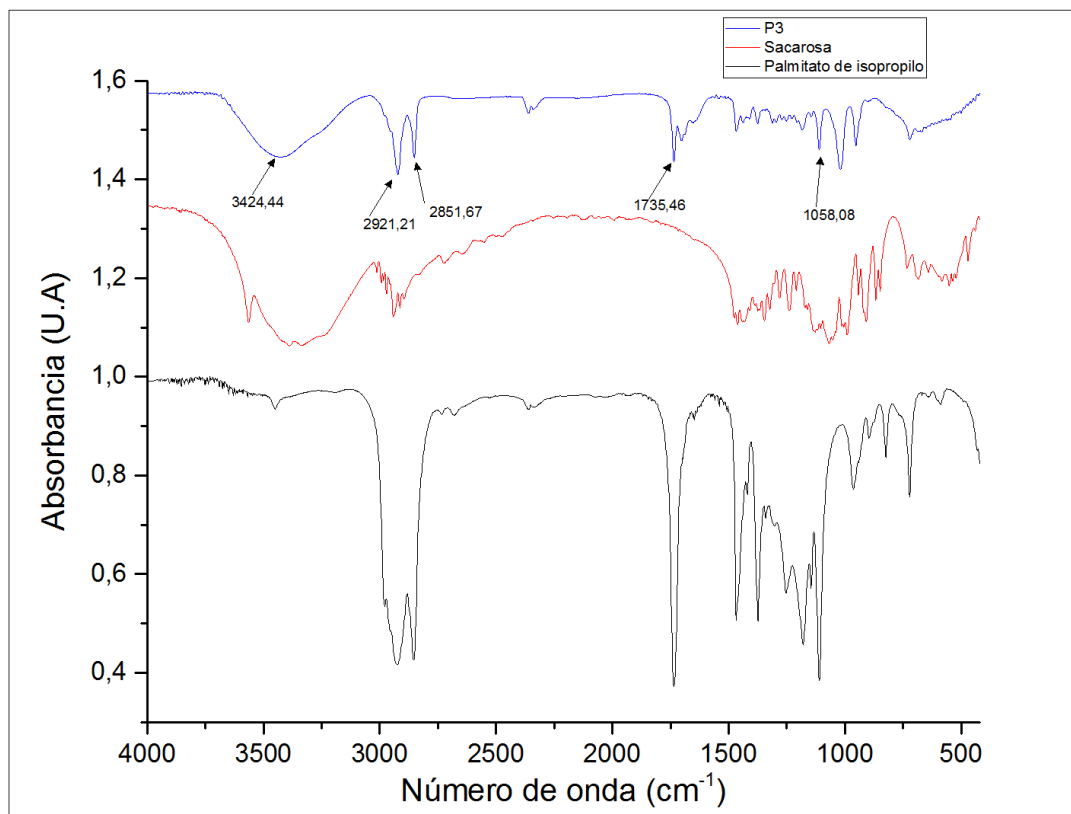


Figura 25. Espectros de P3 (azul), sacarosa (roja) y palmitato de isopropilo (negra).

En la figura 26 se presentan los espectros de los reactivos de partida y el producto final obtenido de la síntesis. Al realizar la comparación de los espectros se puede observar la presencia de una banda de absorción fuerte que se encuentra en la región de 3500-3200 cm⁻¹ la cual es característica del estiramiento O-H de los grupos hidroxilo libres tanto de la sacarosa como del palmitato de sacarosa. Las bandas de estiramiento en 2921 y 2851 cm⁻¹, se asignan a los grupos metileno y metilos terminales, respectivamente, de la cadena del palmitato de sacarosa y palmitato de isopropilo. La banda que se observa a 1735 cm⁻¹ corresponde al estiramiento característico de los enlaces C=O los cuales se pueden encontrar

tanto en el espectro de P3 como en el palmitato de isopropilo. La banda a 1058 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del C-O-C del palmitato de sacarosa y el palmitato de isopropilo. En la tabla 7 se resumen los tipos de vibraciones correspondientes al palmitato de sacarosa

Tabla 7. Tipos de señales y sus grupos correspondientes en la caracterización por FTIR del palmitato de sacarosa.

Señales (cm^{-1})	Vibración	Grupo
3421	Estiramiento	O-H
2921	Estiramiento	C-H
2851	Estiramiento	C-H
1735	Estiramiento	C=O
1058	Estiramiento	C-O-C

Como se puede observar en este conjunto de resultados no permite confirmar la obtención del palmitato de sacarosa, sin embargo la comparación con los resultados de P1 es prometedora, debido a que el producto se logró cristalizar con Acetona y el IR muestra tanto la presencia de grupos OH como de carbonilos.

Dado a que la reacción con palmitato de isopropilo no se contempló en los objetivos del proyecto pero si sirvió como reacción modelo durante la experimentación. Debido a la limitación de tiempo y recursos, este material no se caracterizó completamente, así que pruebas tales como RMN, MS y DSC, que se hicieron en los caso de P1 y P2 no se llevaron a cabo para P3. Sin embargo sería un punto de partida importante para futuras investigaciones, ya que por medio de un análisis de espectrometría de masas sabríamos el peso molecular más probable del producto (P3), por lo cual la cantidad de posibles esterificación es de la sacarosa. Por otro lado por medio, del DSC se podría determinar el punto de fusión y compararlo con el presentado en la literatura. Por último un análisis completo por RMN serviría para elucidar la estructura completa del producto obtenido.

A continuación se presenta en un gráfico comparativo de los espectros de infrarrojo de los productos obtenidos (P1 y P3). En el gráfico se aprecia que tanto para P1 como para P3 se presenta la banda característica del estiramiento O-H de la sacarosa. Además se puede observar como las bandas características de enlaces C-O (1250 y 1058) y C=O (1654 y 1735) están presentes en ambos productos sugiriendo que la reacción fue exitosa en términos de la esterificación de la sacarosa. Cabe anotar que la diferencia que existe entre las bandas de los

carbonilos del éster de laurato con el del palmitato que se puede explicar debido a que el grupo alquilo, es decir el grupo isopropilo y el vinilo les confiere distintas propiedades a cada compuesto que promueven una diferencia en el desplazamiento de la longitud de onda significativa (Bruice, 2008), sin embargo esta prueba no muestra cual fue el grado de esterificación ni la posición o posiciones esterificadas.

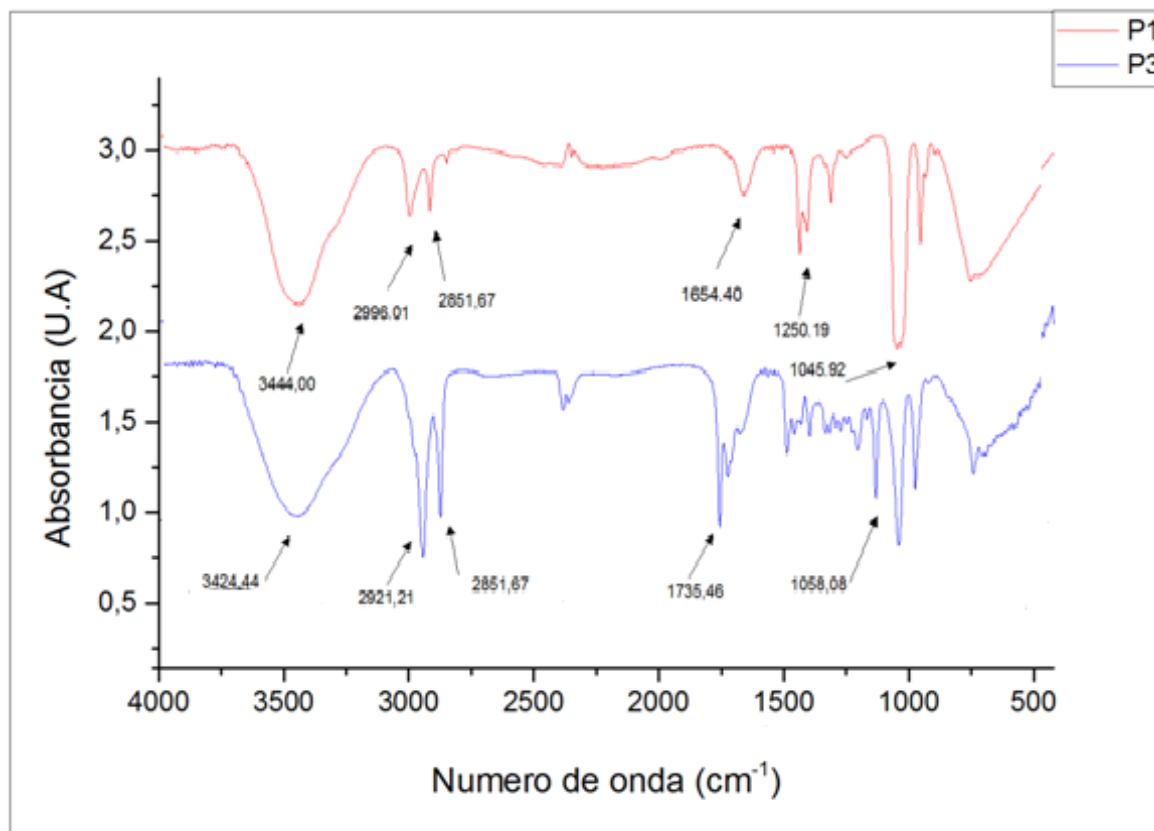


Figura 26. Espectros infrarrojos de los productos obtenidos P1 (Rojo) y P3 (azul)

2.6. CONCLUSIONES

Se realizó la reacción de esterificación de la sacarosa mediante catálisis enzimática con dos ésteres de ácidos grasos, laurato de vinilo y palmitato de isopropilo.

La cromatografía de capa fina demostró la desaparición de los reactivos de partida y formación de nuevos productos correspondientes a la reacción de síntesis enzimática.

Para el caso de P2 se logró obtener mediante cromatografía de columna productos purificados a escala de laboratorio. Para P1 se encontró que seguía contaminado con DMSO.

Las técnicas utilizadas sugieren que uno de los principales productos es el dilaurato de sacarosa (P1), mientras que el anhídrido dodecanoico (P2) obtenido con un porcentaje de rendimiento de 17% corresponde a un subproducto.

Por medio de infrarrojo se logró identificar la presencia de ésteres para ambos productos. En el producto P1 se encontró evidencia empleando las técnicas de espectroscopia (IR, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas) que el producto obtenido es el dilaurato de sacarosa, lo cual sugirió la esterificación de la sacarosa. En el segundo producto (P2), la ausencia de grupos OH por FTIR sugirió que es un subproducto de la reacción, lo cual pudo ser confirmado por $^1\text{H-RMN}$ al identificarse como el anhídrido dodecanoico.

Se logró la identificación de un éster de sacarosa sin precisar si es un éster de sacarosa mono di o polisustituido (P3), por espectroscopia de infrarrojo se observó la presencia de señales que sugerían tanto grupos OH como ésteres en la misma molécula con lo cual se sugiere en trabajos futuros llevar a cabo una caracterización profunda del compuesto obtenido.

2.7. RECOMENDACIONES

Para la continuación de esta línea de investigación, se recomienda realizar estudios para determinar las proporciones de reactivos, enzima y solventes que permitan lograr la síntesis de los compuestos de interés, analizar el tiempo de la reacción y la temperatura. Además se recomienda establecer una metodología estadística de diseño de experimentos que faciliten el manejo de datos y resultados.

Uno de los problemas que se encontró en el presente proyecto fue la eliminación del dimetilsulfoxido (DMSO), para tratar con este problema en futuras investigaciones se recomienda ya sea la aplicación de técnicas más eficientes de purificación o el uso de solventes con características que permitan una fácil eliminación como por ejemplo emplear solventes más volátiles.

Posteriormente también se deben completar los estudios de espectroscopia por RMN con experimentos de tipo COSY, HSQC y HMBC para obtener correlaciones Carbono-Hidrógeno y Carbono-Carbono para poder dar una elucidación estructural completa ya que el análisis de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para los productos P1 y P2, no permite distinguir cuales de los protones se correlacionan para el anillo de furanosa y piranosa, por lo cual no es posible realizar una asignación solo con la información de los espectros provistos.

Es igualmente importante que para los productos obtenidos se realicen estudios de sus propiedades como surfactantes, de esta manera se podrá tener alguna idea de las posibles aplicaciones.

Otro aspecto importante que debe estudiarse son las propiedades y características de la enzima y su influencia en la síntesis de surfactantes. Buscar nuevas enzimas que puedan realizar la síntesis con mayor productividad.

2.8. BIBLIOGRAFIA.

- Angéla Szűts, P. S.-R. (2012). Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—A mini-review,. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 433, 1-9.
- Araújo, S., Rocha, B., Murillo, F., Luna, T., Rola, E., Azevedo, D., y otros. (2011). FTIR assessment of the oxidation process of castor oil FAME submitted to PetroOXY and Rancimat methods. *Fuel Processing Technology*, 1152-1155.
- Asocaña. (2011). Sector azucarero colombiano. Recuperado el 15 de 04 de 2014, de <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Ballesteros, A., Plou, F., Alcalde, M., & Ferrer, M. (2006). *Enzymatic Synthesis of Sugar Esters and Oligosaccharides from Renewable Resources*. CRC Press.
- Borugadda, V., & Goud, V. (2014). Epoxidation of castor oil fatty acid methyl esters (COFAME) as a lubricant base stock using heterogeneous ion-exchange resin (IR-120) as a catalyst. *Energy Procedia*, 75-84.
- Bruice, P. (2008). *Química Organica*. Mexico: PEARSON EDUCACION.
- Chortyk et al, O. (1996). Synthesis and characterization of insecticidal sucrose esters. *J Agric Food Chem*, 1551-1557.
- Du, L.-H., & Luo, X.-P. (2012). Lipase-catalyzed regioselective acylation of sugar in microreactors. *RSC Advances*, 2663-2665.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2010). Scientific Opinion on the safety of sucrose esters of fatty acids prepared from vinyl esters of fatty acids and on the extension of use of sucrose esters of fatty acids in flavourings. *EFSA Journal*, 1512.
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 197-212.
- Ferrer et al, M. (1999). Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, VOL. 65, 10-16.

- Gandhi, N. (1997). Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 621-634.
- Gumel, A., Annuar, M., Heidelberg, T., & Chist, Y. (2011). Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, 2079-2090.
- Husband et al, F. (1998). Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations. *Food Hydrocoll*, 237-244.
- J. M. Sánchez, M. H. (1999). Solvent Extraction and Ion Exchange. *Publicacions Universitat Autònoma de Barcelona*, 455–474.
- Kato, A., & Arima, K. (1971). Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on. *Biochem Biophys Res Commun*, 596-601.
- Kennedy, J. (2006). Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 866-876.
- Kumar, R., Modak, J., & Madras, G. (2005). Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavours in supercritical carbon dioxide. *Biochemical Engineering Journal*, 199-202.
- Nicolau, A., Samios, D., Piatnick, C. M., Reiznautt, Q. B., Martini, D. D., & Chagas, A. L. (2012). On the polymerisation of the epoxidised biodiesel: The importance of the epoxy rings position, the process and the products. *European Polymer Journal*, 1266-1278.
- Nishikawa et al, Y. (1976). Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. II. Antitumor. *Chem Pharm Bull*, 387–393.
- Pérez-Victoria, I. M. (2006). Regioselectivity in acylation of oligosaccharides catalyzed by the metalloprotease thermolysin. *Tetrahedron*, 2361-2369.
- Plou et al, F. (2002). Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *Journal of Biotechnology*, 55-66.
- Thomas, L. D.-B. (1998). Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria. *Journal of Applied Microbiology Vol. 85*, 1013-1022.
- Tomita, M. (1998). Patente nº 10,070,971 Sucrose Fatty Acid Esters as Anti-Bacterial Agents for Preparation of Beverage. Japan.

- van den Broek, L. A., & Boeriu, C. (2013). Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate Polymers*, 65-72.
- Vermeire et al, A. (1996). Sucrose laurate gels as a percutaneous delivery system for oestradiol in rabbits. *J Pharm Pharmacol*, 463-467.
- Wescott, C., & Klibanov, A. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1206: 1-9.
- Yu, J., Zhang, J., Zhao, A., & Ma, X. (2008). Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *Catalysis Communications*, 1369-1374.
- Zhang, L., Zhang, M., Hu, L., & Zhou, Y. (2014). Synthesis of rigid polyurethane foams with castor oil-based flameretardant polyols. *Industrial Crops and Products*, 380-388.
- Aliseda, R.M. (2003). Estudio de la transesterificación de aceite vegetal con metanol. Tesis de pregrado ingeniería química, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.
- Murphy T. (s.f.). Column Chromatography. Recuperado el 15 de Diciembre de 2014, del Sitio web del Departamento de Química de la Universidad de Wake Forest: <http://www.wfu.edu/chemistry/courses/organic/CC/index.html>.