

**SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO POR CONDENSACIÓN ENZIMÁTICA CON  
NOVOZYM 435**



Universidad  
del Cauca

**MARINO CHAVARRO CORDOBA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2024**

**SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO POR CONDENSACIÓN ENZIMÁTICA CON  
NOVOZYM 435®**

**TRABAJO DE GRADO EN LA MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO  
COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO**

**MARINO CHAVARRO CORDOBA**

**DIRECTOR  
RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ Ph.D.**

**CO-DIRECTOR  
JAIME MARTIN FRANCO Ph.D.**

**GRUPO DE INVESTGACIÓN  
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES (QPN)**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2024**

### **Nota de aceptación**

El director y los jurados han leído el presente documento, han escuchado la sustentación de este por su autor y lo encuentran satisfactorio.

**Director:** \_\_\_\_\_

**Ph.D. Ricardo Benítez Benítez**

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Ph.D. Diana María Chito**

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Ph.D. Juan Carlos Argotí**

**Lugar y Fecha de sustentación: Popayán, 10 de mayo del 2024**

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi madre Lucila Córdoba Bolaños, quien con mucha fortaleza me formo como persona, este trabajo y futuro título es reconocimiento al esfuerzo y dedicación de una madre al ver a su hijo siendo un profesional. Reconozco su gran fortaleza y ganas de salir adelante en los años difíciles que vivimos juntos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por acompañarme en este proceso, en especial a mi Hermana Vianney Benavides y mi cuñado Alexander Valderrama quienes han sido personas muy importantes en mi vida, siendo quienes me han apoyado, motivado y guiado en mi formación.

A Luisa Fernanda, a quien expreso mi más profundo agradecimiento por su amor, tiempo, paciencia y apoyo incondicional en momentos difíciles.

A los profesores Ricardo Benítez y Jaime Martín por su guía, su amistad, confianza, guía y ayuda ante las dificultades.

A mis amigos y compañeros Daniel Alexander Fajardo, Ana María Delgado, Juan José Tovar, Arfelly Donato, Andrés Parra, Diana Carolina Gómez quienes han sido compañía incondicional en momentos difíciles.

Al profesor Oscar Marino por el préstamo de las instalaciones de su laboratorio en la Universidad Tecnológica de Pereira

A los docentes German Cuervo Ochoa, José Antonio Gallo y Tania Milena.

A los profesores y estudiantes de QPN por la amistad y el apoyo.

## CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	4
4.1. ÉSTERES .....	4
4.2. SÍNTESIS DE ÉSTERES .....	5
4.3. BIOSÍNTESIS DE ÉSTERES .....	7
4.4. BIOCATÁLISIS .....	8
4.4.1. Lipasas .....	10
4.4.2. Características de las lipasas en síntesis de ésteres .....	11
4.5. CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL DE ÉSTERES .....	14
4.5.1. Espectroscopía infrarroja .....	14
4.5.2. Cromatografía de gases (CG) .....	15
4.5.3. Espectrometría de masas .....	16
4.5.4. Polarimetría .....	17
4.6. SUSTRATOS Y PRODUCTO .....	17
4.6.1. Ácido láctico .....	18
4.6.2. Mentol .....	19
4.6.3. Lactato de mentilo .....	21
5. OBJETIVOS .....	22
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	22
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ADICIONAL .....	22
6. METODOLOGÍA .....	23
6.1. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS .....	23
6.1.1. Reactivos y solventes .....	23
6.1.2. Equipos .....	23
6.2. SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO .....	23
6.2.1 Respuesta del diseño: Conversión, Selectividad, Rendimiento .....	25

6.2.2	Análisis estadístico .....	26
6.3.	CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE MENTILO .....	26
6.3.1.	Caracterización de espectroscopia Infrarroja .....	26
6.3.2.	Cromatografía de gases.....	26
6.3.3.	Purificación del producto .....	26
6.3.4.	Polarimetría.....	27
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
7.1.	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA IR-ATR DE LOS PATRONES.....	28
7.2.	SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO .....	30
7.3.	ANÁLISIS DE CROMATOGRFÍA DE GASES .....	32
7.4.	ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	33
7.5.	RESPUESTAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL .....	37
7.6.	CICLOS DE USO DE LA ENZIMA .....	41
7.7.	ANÁLISIS POLARIMÉTRICO.....	43
7.8.	EVALUACIÓN DE CRITERIOS: QUÍMICA VERDE .....	44
8.	APLICACIONES .....	49
9.	CONCLUSIONES .....	50
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	51
11.	DIVULGACIÓN .....	55

## Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Ésteres relacionados con esencias .....	4
Figura 2. Ésteres de interés industrial como aromatizantes y esencias .....	5
Figura 3. Energía de activación de reacción catalizada enzimática y sin catalizador $E_U > E_C$ .....	9
Figura 4. Representación de la lipasa B de la <i>Candida antártica</i> .....	12
Figura 5. Favorabilidad de los isómeros en presencia de lipasa .....	14
Figura 6. Funcionamiento del FT-IR ATR .....	15
Figura 7. Estructura química del ácido láctico .....	18
Figura 8. Mercado del ácido láctico a nivel global .....	18
Figura 9. Predicción del crecimiento del mercado del ácido láctico a nivel global .....	19
Figura 10. Demanda de ácido láctico en Colombia .....	19
Figura 11. Estructura química del mentol. A corresponde a (L)- mentol, B corresponde a (D)-mentol.....	20
Figura 12. Mercado de la importación de mentol en Colombia.....	20
Figura 13. Estructura química del (L)-Lactato de (L)-mentilo (LL-LM) .....	21
Figura 14. Espectro infrarrojo (ATR) del mentol .....	28
Figura 15. Espectro infrarrojo del ácido láctico .....	29
Figura 16. Espectro infrarrojo del lactato de mentilo.....	30
Figura 17. Espectro infrarrojo del crudo de reacción. ....	30
Figura 18. Comparación del espectro IR-ATR del crudo de reacción.....	31
Figura 19. Aumento en la señal $1134\text{ cm}^{-1}$ .....	31
Figura 20. Cromatograma de crudo de reacción. ....	33
Figura 21. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para conversión .....	38
Figura 22. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para selectividad .....	39
Figura 23. Gráfico normal de efectos estandarizados para selectividad.....	40
Figura 24. Gráfica de contorno para selectividad contra: A) temperatura y carga enzimática B) tiempo de reacción y relación molar.....	40
Figura 25. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para rendimiento .....	40
Figura 26. Gráfico normal de efectos estandarizados para rendimiento.....	41
Figura 27. Gráfica de contorno para rendimiento contra temperatura y relación molar .....	41
Figura 28. Gráfico de deseabilidad .....	42
Figura 29. Cromatograma de enriquecimiento del lactato de mentilo .....	43
Figura 30. Gráficas de barra entre el ciclo de uso y exceso enantiomérico.....	44



## Índice de ecuaciones

	<b>Pág.</b>
Ecuación 1. Conversión de mentol .....	25
Ecuación 2. Selectividad de reacción .....	25
Ecuación 3. Rendimiento de producto .....	25
Ecuación 4. Rotación específica .....	27
Ecuación 5. Pureza enantiomérica .....	27
Ecuación 6. Exceso enantiomérico .....	27
Ecuación 7. Determinación de ecoscale .....	45

## Índice de esquemas

	Pág.
Esquema 1. Mecanismos de esterificación de Fisher .....	6
Esquema 2. Mecanismos de reacción de haluros de acilo .....	6
Esquema 3. Mecanismos de reacción de anhídridos de ácidos .....	7
Esquema 4. Biosíntesis de ésteres de acetato y ésteres de etilo .....	8
Esquema 5. Formación del triacilglicérido catalizado por lipasa .....	10
Esquema 6. Principales reacciones químicas catalizadas por lipasas .....	11
Esquema 7. Mecanismo de reacción de las lipasas .....	13
Esquema 8. Partes del cromatógrafo de gases .....	16
Esquema 9. Cromatografía de gases acoplada a masas .....	16
Esquema 10. Funcionamiento del polarímetro .....	17
Esquema 11. Subproducto de reacción .....	32
Esquema 12. Patrón de fragmentación del mentol .....	34
Esquema 13. Patrón de fragmentación del lactato de mentilo .....	35
Esquema 14. Patrón de fragmentación del subproducto (MLL) .....	36
Esquema 15. Método 1 para síntesis de lactato de mentilo según Erman .....	46
Esquema 16. Método 2 para síntesis de lactato de mentilo según Erman .....	47

## Índice de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Clasificación de ésteres según el ácido precursor .....	4
Tabla 2. Metabolitos producidos por fermentación mixta de levaduras .....	7
Tabla 3. Grupos de enzimas según la reacción catalizada.....	9
Tabla 4. Características del Diseño Experimental. ....	23
Tabla 5. Factores y niveles considerados para realización de diseño experimental Box- Behnken (DBB).....	24
Tabla 6. Diseño experimental Box-Behnken para la síntesis del lactato de mentilo. ....	24
Tabla 7. Respuesta del diseño experimental.....	37
Tabla 8. Condiciones óptimas para la síntesis .....	41
Tabla 9. Ciclos sucesivos de la enzima para la síntesis en condiciones optimas.....	42
Tabla 10. Rotación óptica, pureza óptica y exceso enantiomérico .....	43
Tabla 11. Criterios de la Ecoscale .....	44
Tabla 12. Ecoscale para el proceso de síntesis .....	46
Tabla 13. Ecoscale para el proceso de Erman et al .....	47
Tabla 14. Comparación de metodología .....	47

## Lista de abreviaturas y siglas

<b>AAT</b>	Alcohol acetiltransferasa
<b>E<sub>u</sub></b>	Energía de activación sin catalizador
<b>E<sub>c</sub></b>	Energía de activación con catalizador
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada
<b>m/z</b>	Relación masas carga
<b>M/AL</b>	Mentol / ácido láctico
<b>DBB</b>	Diseño Box Behnken
<b>DES</b>	Solvente eutéctico profundo
<b>NADES</b>	Solvente eutéctico profundo natural
<b>RM<sup>2</sup></b>	Relación molar x relación molar

## 1. RESUMEN

Se realizó la síntesis de productos de condensación de mentol y ácido láctico catalizada por la enzima Novozym 435®, una lipasa comercial de *Candida antarctica* libre de solvente. Las reacciones se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo con agitación magnética, adaptado a un condensador recto y usando calentamiento convencional. Se aplicó un diseño experimental tipo Box-Behnken con 29 experimentos, utilizando como factores: la temperatura (60, 90 y 120 °C), el tiempo de reacción (1, 6.5 y 12 horas), la relación molar mentol: ácido láctico (M/AL) (1, 2 y 3) y el porcentaje de enzima en peso (5, 27.5 y 50); las variables respuestas fueron conversión, selectividad y rendimiento. Se evaluaron por medio de GC-MS, relacionadas directamente con la concentración de mentol y lactato de mentilo. Los datos fueron analizados con Minitab 18 Statistical Software y los productos obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopía FTIR, espectrometría de masas y polarimetría.

La respuesta conversión no tuvo asociado un factor significativo, pero la relación molar al cuadrado ( $RM^2$ ) fue el que más cerca estuvo del valor  $p \leq 0.05$  teniendo un efecto positivo en la conversión, mientras que, para la selectividad y rendimiento, la temperatura es el factor que estadísticamente afecta la formación del producto. Las condiciones óptimas: temperatura (90 °C), relación molar (2.3), carga enzimática (25%) y tiempo (1 h), arrojaron una conversión del 64.528%, una selectividad del 19.338% y un rendimiento de 64.528%, usando sustratos comerciales. Además, el proceso llevado a cabo fue analizado mediante la métrica de ecoscale, logrando un puntaje de 79, estando por encima de otras metodologías.

Se determinó mediante GC-MS la presencia de un subproducto denominado MLL, el cual se pudo eliminar del medio de reacción mediante hidrólisis controlada. Se realizó el uso sucesivo de la enzima, encontrando que la lipasa presenta una estabilidad en más de 8 ciclos, y el lactato de mentilo un porcentaje de exceso enantiomérico del 98%.

Se concluye que la metodología usada para el desarrollo de esta investigación promueve el cumplimiento de los criterios de la química verde, a través de la eliminación del uso de sustancias auxiliares, el empleo materia prima renovable, y la generación de un producto no tóxico para la salud humana y el ambiente.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los ésteres y sus procesos de obtención son conocidos desde hace mucho tiempo. La creciente demanda mundial en los sectores de la farmacia, cosmética, biocombustibles y automotriz ha generado la búsqueda de nuevas metodologías a través de las cuales se puedan sintetizar de manera más eficiente y económica. Estos compuestos se encuentran en diversas fuentes naturales, por lo que se suelen extraer a partir de diferentes tipos de vegetación. Otra manera para obtener este tipo de productos en las últimas décadas, es mediante las reacciones de esterificación en presencia de catalizadores<sup>1</sup>.

Los productos cosméticos, farmacéuticos y alimenticios, entre otros, tienen en sus formulaciones un alto requerimiento de ésteres de mentol, lo que ha generado el interés de estos sectores en obtenerlos de manera rápida y eficiente de forma sintética. En la reacción de esterificación a escala industrial, se destaca el uso de catalizadores como: (1) ácidos inorgánicos, como el

<sup>1</sup>. Estos catalizadores presentan buen rendimiento y también promueven reacciones secundarias de polimerización en la esterificación del ácido láctico y el mentol, como se ha demostrado en la fabricación de uno de los principios activos del aditivo FrescoLab, que se utiliza ampliamente en muchos productos como enjuagues bucales, cremas tópicas, desodorante en spray, cremas dentales, ente otras. Otros catalizadores probados en reacciones de esterificación son las enzimas lipasas, las cuales presentan alta selectividad en estas reacciones<sup>2</sup>.

Las lipasas producidas por la empresa Novozymes se han estudiado ampliamente y cuentan con características únicas; entre ellas la enantioselectividad reportada recientemente por Sun y colaboradores<sup>2</sup>. Esta investigación se centra en la obtención de lactato de mentilo catalizada por Novozym 435<sup>®</sup> mediante un protocolo eficiente con tiempo de reacción corto y ausencia de subproductos; el cumplimiento de estas características enmarcaría los resultados en el contexto de la Química Verde. La enzima lipasa B de *Candida antarctica* (*C. antarctica*) registrada como Novozyme 435<sup>®</sup> es notablemente termoestable y está disponible comercialmente en sus formas soluble e inmovilizada.

La alta actividad y estabilidad de Novozym 435<sup>®</sup> ha permitido usar esta enzima en reacciones sin disolventes y con distintos medios de reacción, incluyendo los bifásicos de agua y disolvente orgánico. Aunque inicialmente fue orientada hacia la industria alimentaria, también se han encontrado aplicaciones en diferentes áreas industriales, desde la producción de biodiesel, hasta la síntesis fina de sustancias químicas<sup>2</sup>. A nuestro conocimiento, en la literatura no hay reportes sobre la síntesis de lactato de mentilo mediante condensación enzimática con Novozyme 435<sup>®</sup>. Adicionalmente, se anticipa que esta enzima podría aportar valor agregado al proceso por la alta enantioselectividad registrada.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria química colombiana es muy diversa y de gran impacto en la economía del país, especialmente, por la interconexión que tiene con un gran número de sectores productivos. En la actualidad presenta dificultades y una muy sustancial es la pobre generación de reactivos de partida o de materia prima que cumplan los niveles de calidad exigidos en los procesos industriales, por lo que se acude con frecuencia a la importación, una vía que no resuelve la totalidad de los casos por los elevados aranceles, lentitud en los procesos de importación y de nacionalización <sup>3</sup>, en concomitancia con los cambios sociopolíticos habituales a nivel mundial que generan escasez de materias primas y el alza de precios de los insumos para el sector químico <sup>4</sup>.

El lactato de mentilo, un éster derivado del ácido láctico y el mentol es una materia prima del sector cosmético con gran demanda, pero con incidencia notable en la industria farmacéutica y alimenticia. La demanda en cosmética obedece a la sensación de frescura que produce, y por ello, es común en el uso en productos faciales; así mismo, disminuye la inflamación, la hinchazón y aumenta la circulación sanguínea de la zona irritada<sup>5</sup>. El lactato de mentilo posee una actividad 15 veces mayor frente al mentol y menos contraindicaciones <sup>5</sup>, por lo que se requiere menor cantidad que su homólogo en la mayoría de las formulaciones y podría reemplazarlo en las aplicaciones industriales.

Recientemente la comercialización del lactato de mentilo se ha limitado por su escasez y el precio de importación se ha incrementado como consecuencia de la devaluación del peso colombiano. Al interior del grupo Química de Productos Naturales (QPN) surge la siguiente pregunta de investigación ¿Es posible generar un protocolo para la producción de lactato de mentilo, que sea eficiente, económico, escalable y de bajo impacto ambiental?. Con esta propuesta de investigación se pretende fortalecer el desarrollo de materias primas de interés cosmético a nivel industrial.

## 4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1. ÉSTERES

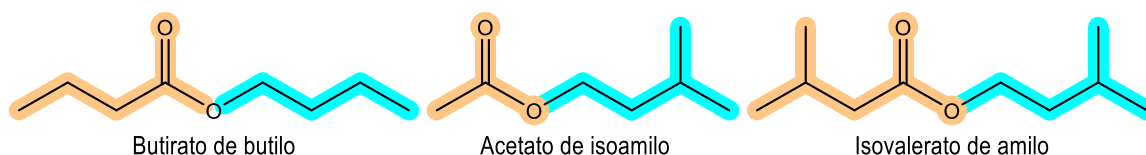
Los ésteres son el resultado de la mezcla de reacción de alcoholes, ácidos carboxílicos y los cloruros de acilo, a los cuales se denomina ésteres de ácidos carboxílicos<sup>6</sup>. Los alcoholes también pueden reaccionar con halogenuros de sulfonilo lo que dan origen a los sulfonatos. También se pueden originar por las reacciones con ácido inorgánicos como el ácido fosfórico formando diéster fosfórico<sup>6</sup>. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de ésteres según el ácido precursor.

**Tabla 1. Clasificación de ésteres según el ácido precursor**

Ácido Precursor	Ejemplo
Ácidos orgánicos	Triglicéridos, ceras, fosfolípidos, etc.
Ácidos inorgánicos	Nitroglicerina, sulfato de dimetilo, diéster fosfórico, etc.

Fuente: Elaboración propia.

Estas sustancias son de gran importancia tanto a nivel biológico como industrial. En la naturaleza se puede encontrar gran variedad de ésteres, por ejemplo, en las plantas se producen los olores característicos; en las células para la formación de fosfolípidos un tipo de éster importante para la membrana celular<sup>6,7</sup>. A nivel industrial la reacción de un alcohol de peso molecular bajo o medio con un ácido graso de peso molecular también bajo o medio, da origen a una gama de esencias como lo son el butirato de butilo (aroma a pino), isovalerato de isoamilo (aroma a manzana) o acetato de isoamilo (aroma a banano); es de recalcar que en la naturaleza los aromas de las plantas y/o frutas son producto de la combinación de varias sustancias<sup>8</sup>, en la Figura 1 se presenta las estructuras de los ésteres mencionados.

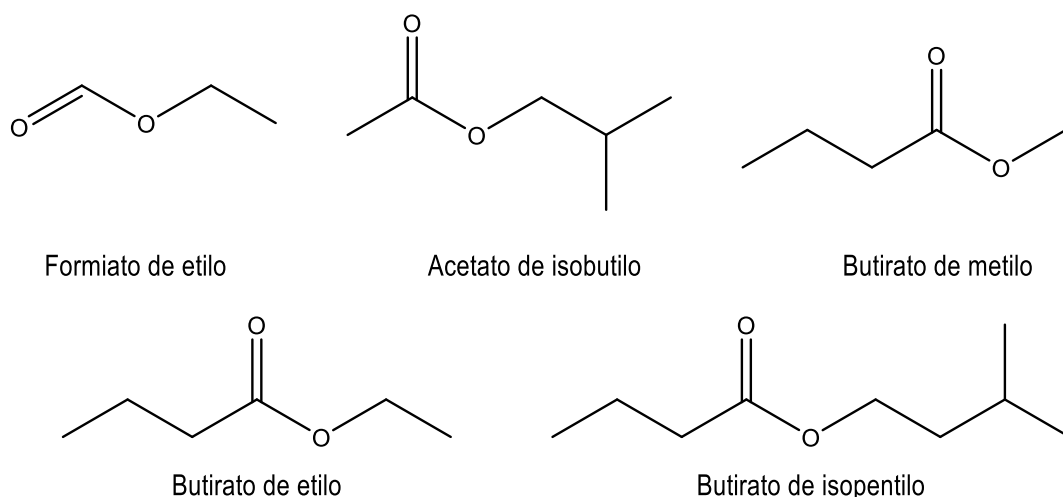


**Figura 1. Ésteres relacionados con esencias**

Fuente: Elaboración propia.

Algunos ésteres son usados como disolventes de resinas como el acetato de etilo y el acetato de butilo, los cuales disuelven la nitrocelulosa. También se puede encontrar ésteres que se usan como aromatizantes y esencias artificiales para la repostería de las cuales se destacan el formiato de etilo (ron, aguardiente de arroz), acetato de isobutilo (plátano), butirato de metilo (manzana), butirato de etilo (piña) y butirato de isopentilo (pera)<sup>8</sup>, los cuales son ilustrados en la Figura 2.





**Figura 2.** Ésteres de interés industrial como aromatizantes y esencias

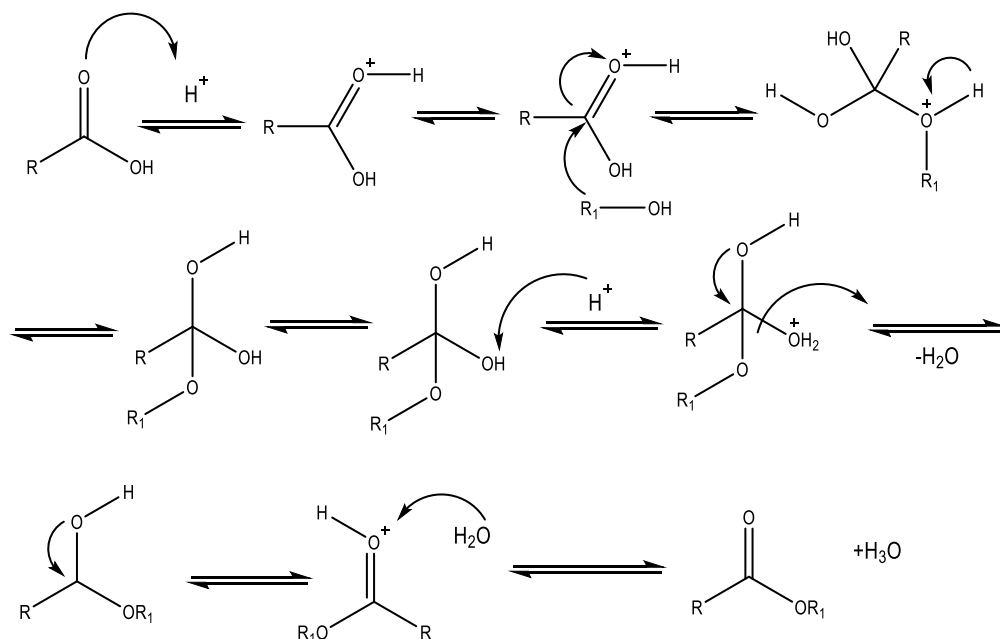
Fuente: Elaboración propia.

En el sector farmacéutico se encuentra al ácido acetilsalicílico, más conocido como la aspirina, el cual es usado para la disminución del dolor, también la novocaína (anestésico). Las fibras semisintéticas son el resultado de la esterificación de la celulosa (rayón), como derivado de la celulosa en la industria textil se encuentra triacetato de celulosa que, al mezclar con los plastificantes a base de ésteres de ácido ftálico se consiguen celuloideos resistentes a la combustión<sup>8</sup>. Así mismo también se encuentran muchos más ésteres en todo tipo de industrias, como lo son: colorantes, cosméticos, alimentos y polímeros<sup>9,10</sup>.

#### 4.2. SÍNTESIS DE ÉSTERES

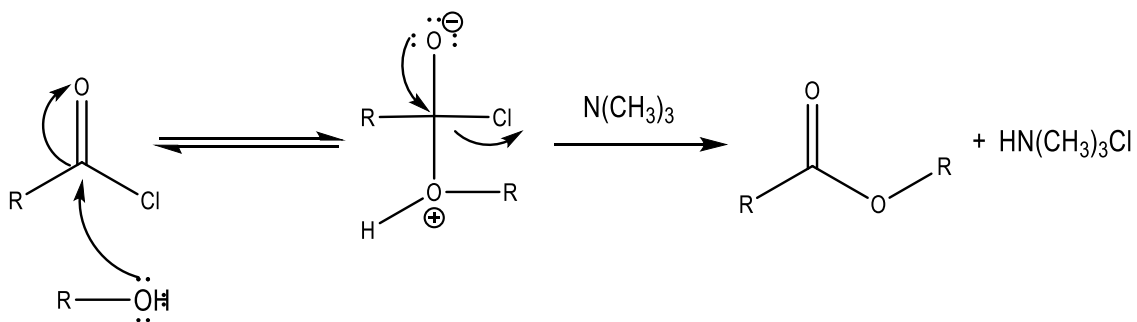
La síntesis de los ésteres se puede generar por la condensación de un alcohol con ácido carboxílico<sup>6</sup> (esterificación de Fisher), por la adición y eliminación en haluros de acilo o por la reacción en los anhídridos con alcoholes, estas dos últimas reacciones se destacan por generar mayor rendimiento debido a que consisten en reacciones directas, gracias a su reactividad, mientras que la esterificación de Fisher limitada su reversibilidad termodinámica, es decir que el producto puede reaccionar con el medio para generar los reactivos de partida, por lo cual se requiere mayor cantidad de materia prima para desplazar el equilibrio a la generación de productos.

Para entender la diferencia entre estas reacciones se presentan los mecanismos de reacción. La esterificación de Fisher inicia con la protonación del ácido carboxílico, generando que el oxígeno carbonílico sea más electrofílico, por tanto, es más propenso a sufrir un ataque electrofílico por parte del oxígeno del alcohol; se genera una reacción ácido-base, donde se extrae el protón del alcohol. La salida del OH del medio se da por la incorporación un protón para formar agua siendo este un buen grupo saliente, finalmente se da la reconstitución del ácido catalizador y la formación del éster<sup>6</sup>. A continuación, se presenta en el esquema 1.



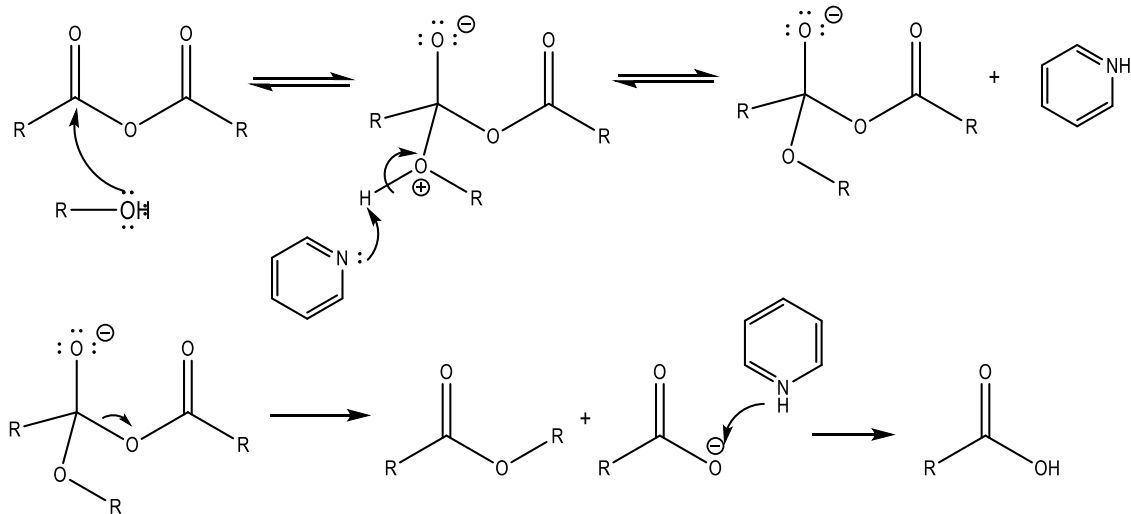
**Esquema 1.** Mecanismos de esterificación de Fisher <sup>6</sup>

En la reacción de los haluros de acilo, se requiere la presencia de una base, siendo la trietilamina o la piridina las más usadas. El mecanismo de reacción para la formación de éster es por medio de una reacción de adición y eliminación. En la primera etapa el alcohol produce un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del haluro, generando un desplazamiento de cargas, facilitando el segundo paso, el cual consiste en la eliminación del cloruro de hidrogeno, que en presencia de la amina es neutralizado (esquema 2), este paso es importante, debido a que no se genera una especie acida que genere equilibrios químicos, dirigen la reacción a mayor producción del éster.



**Esquema 2.** Mecanismos de reacción de haluros de acilo <sup>6</sup>

En la reacción de los anhídros de ácidos frecuentemente se usa la piridina como solvente, el mecanismo de reacción inicia con el ataque nucleofílico sobre el carbonilo electrofílico, posteriormente la piridina retira el protón del alcohol, promoviendo la eliminación del ion carboxilato, que retira el protón de la piridina formando el ácido correspondiente, como se detalla en el esquema 3.



**Esquema 3.** Mecanismos de reacción de anhídridos de ácidos <sup>6</sup>

La ventaja de la esterificación de Fisher sobresale sobre las otras metodologías de síntesis, debido a que no se requiere sustancias tóxicas como la piridina, los reactivos de partida son más estables y menos sensibles al agua.

#### 4.3. BIOSÍNTESIS DE ÉSTERES

En los organismos vivos la síntesis de ésteres se da mediante la intervención de enzimas. Las lipasas que reconocen el ácido orgánico y el alcohol <sup>7</sup>, para la formación de los triglicéridos. Necesariamente se precisa de los ácidos grasos libres y la glicerina.

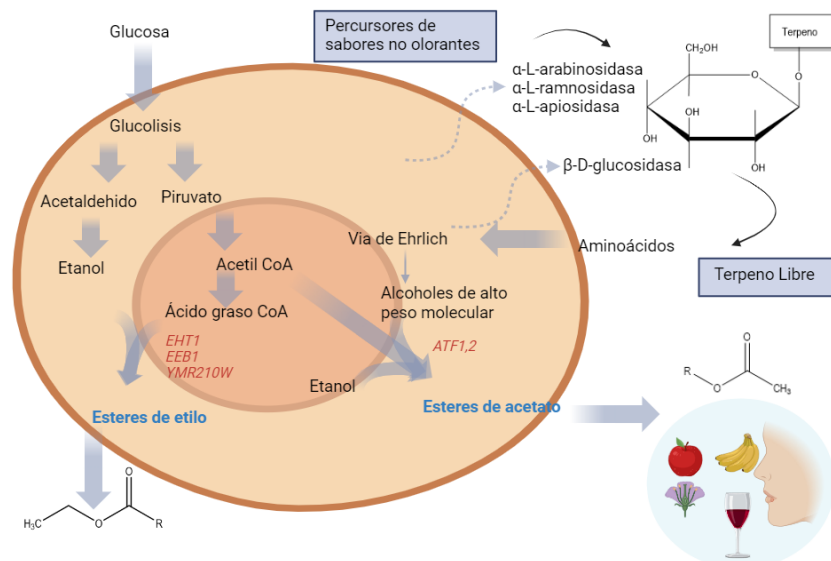
En la biosíntesis de ésteres la participación de la alcohol acetiltransferasa (AAT) conlleva a la condensación del etanol con el acetil-CoA para la formación de ésteres, con ello se puede obtener más de 100 ésteres<sup>11</sup>; sin embargo, rutas metabólicas de microorganismos presentes en las bebidas alcohólicas como el vino intervienen en la producción de diversos ésteres<sup>12</sup>, por lo cual diversos estudios se han centrado en mejorar la producción y calidad de este tipo de bebidas, se han usado diversos tipos de levaduras, en combinaciones para aumentar la producción de diversos metabolitos entre ellos los ésteres<sup>12</sup> (tabla 2).

**Tabla 2.** Metabolitos producidos por fermentación mixta de levaduras <sup>12</sup>

Especie	Metabolitos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acetaldehído, ésteres etílicos (caprilato)
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Ésteres frutales, propanoato de etilo, isobutanoato de etilo, dihidrocinnamato de etilo, tioles, terpenos, glicerol 3-metil-1-propanol, 4-msp
<i>Kluyveromyces spp.</i>	Ácido láctico, ésteres, alcoholes monoterpénicos, 2-feniletanol, ácidos carboxílicos, cetonas, furanos, acetato de isoamilo
<i>K. marxianus</i>	Poligalacturonasas 2-feniletanol, acetato de fenetilo, acetato

	de etilo
<i>Hanseniaspora spp.</i>	Ácido acético, éster acetato, acetato de etilo, sulfuro de hidrógeno
<i>H. guilliermondii</i>	Éster de acetato
<i>H. vineae</i>	Acetato y éster etílico, acetato de 2-feniletilo, $\beta$ -damascenona, acetato de isoamilo, fenilacetaldehído
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Terpenos libres, linalol, geraniol, nerol, citronerol, alfa-terpineol, aminas biogénicas (histamina, tiramina y putrescina), ésteres de acetato de $\beta$ -damascenona, alcoholes superiores (isobutanol y feniletanol)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Fenoles volátiles (4-etilfenol), 2-acetil-3,4,5,6-tetrahidropiridina, 2-acetil-1,2,5,6-tetrahidropiridina, 2-etil-3,4,5,6-tetrahidropiridina, alcohol isoamílico, acetato de isoamilo, ésteres

La producción de ésteres en este tipo de microorganismos se da por la condensación de alcoholes de alto peso molecular con el acetil-CoA, en la que interviene una acetiltransferasa codificada por dos genes ATF 1 y 2. La producción de ésteres de etilo se da por medio del metabolismo de la glucosa, la cual luego se da por la condensación de la acetil-CoA y el etanol mediado por una acetiltransferasa monoacilglicerol lipasa codificada por los genes EHT2, EEB1 y YMR210W<sup>12</sup> (esquema 2).



**Esquema 4.** Biosíntesis de ésteres de acetato y ésteres de etilo <sup>12</sup>

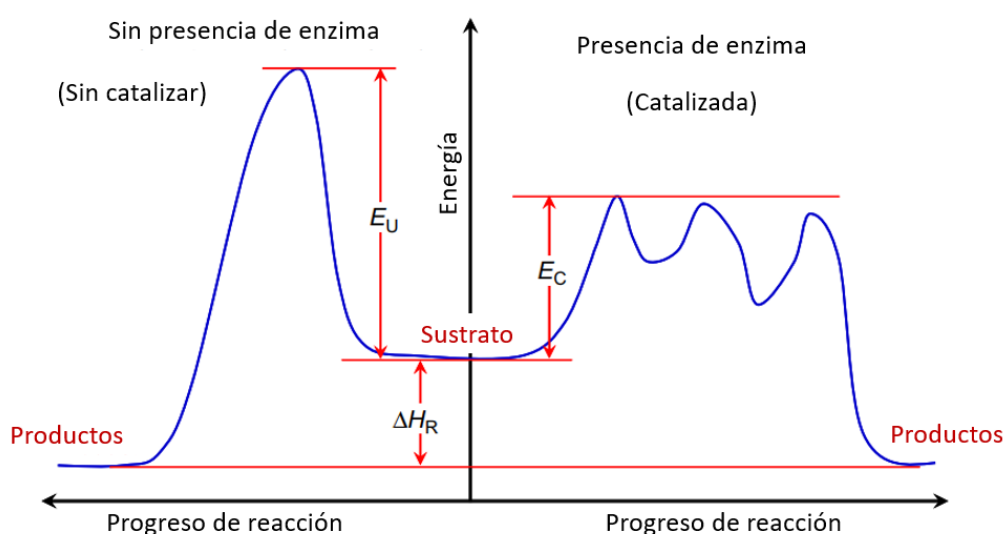
#### 4.4. BIOCATÁLISIS

La biocatálisis se define como la disciplina en la que se usan enzimas aisladas o células enteras, denominadas biocatalizadores, para la conversión química de compuestos orgánicos<sup>13</sup> denominados sustratos.

Las enzimas son biomoléculas mayormente de naturaleza proteica y de elevado peso molecular que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio<sup>7</sup>. Son las encargadas de cumplir funciones (producción de cambios químicos) en prácticamente todos los procesos metabólicos que ocurren en el interior de la célula<sup>7</sup>.

Las enzimas tienen la capacidad de acelerar reacciones, poseen además características de especificidad (regioselectividad y enantioselectividad) en los sustratos<sup>14</sup> y versatilidad para actuar en diferentes medios de reacción. A diferencia de las enzimas, los catalizadores químicos convencionales producen un aumento en la velocidad de reacción mayor, sin embargo, en la mayor parte de los casos no son específicos<sup>15</sup>.

La enzima y el sustrato entran en contacto, en el sustrato entra al sitio activo de la enzima, en este será retenido por fuerzas no covalentes. Estas fuerzas no covalentes son las responsables de la disminución de la energía de activación<sup>16</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Energía de activación de reacción catalizada enzimática y sin catalizador  $E_U > E_C$ <sup>17</sup>

Las enzimas se nombran añadiendo el sufijo -asas, según el sustrato sobre el que trabajan, por ejemplo: Lipasas, glucosidasas, etc.; el nombre también se asocia a la reacción que catalizan ejemplo: piruvato deshidrogenasa. La clasificación según la reacción que manejan es la más empleada y con base en ella se han establecido 6 grupos de enzimas<sup>14</sup> (tabla 3). En la clasificación internacional se asigna un código de cuatro dígitos a cada enzima, según la reacción que cataliza<sup>16</sup>.

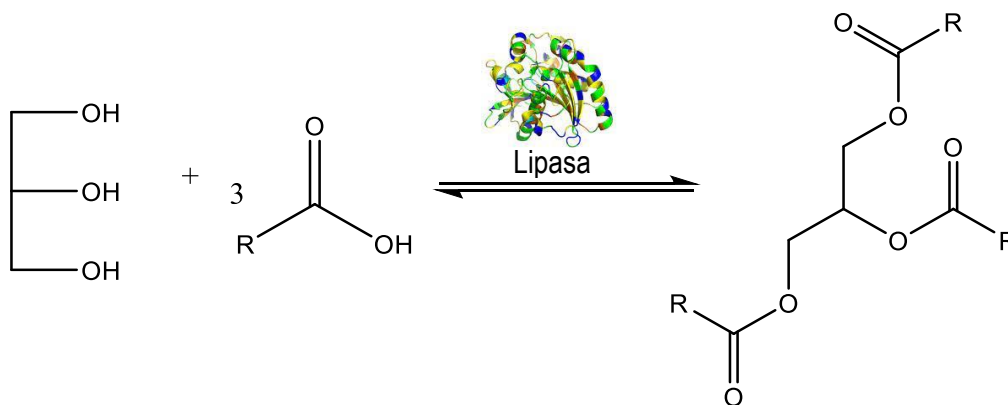
**Tabla 3.** Grupos de enzimas según la reacción catalizada<sup>14</sup>

Nombre del grupo de enzimas	Reacción que catalizan
Oxidorreductasas	Transferencia de hidrógeno, oxígeno o electrones de un sustrato a otro.
Transferasas	Transferencia de un grupo funcional, excluyendo hidrógeno y oxígeno.

Hidrolasas	Hidrólisis de enlaces en éster, éter, glicosídicos, peptídicos, C-C, entre otros.
Liasas	Remoción no hidrolítica de grupos funcionales. (Usualmente produce un doble enlace).
Isomerasas	Convierte un isómero en otro (racemización, transferencia de grupos funcionales intramolecular, cis/trans).
Ligasas	Formación de enlaces mediante utilización de ATP u otro nucleótido fosforilado.

#### 4.4.1.Lipasas

Dentro del grupo de las hidrolasas, existe un grupo de enzimas encargadas de la hidrólisis (rompimiento) de los triacilglicéridos, denominadas lipasas (esquema 3). Son enzimas que actúan en el interior de los organismos en el proceso de digestión de las grasas; normalmente rompen enlaces en posiciones específicas de un triglicérido como es el caso de la principal lipasa en humanos (lipasas pancreáticas) que hidroliza el triacilglicérido y produce un monoacilglicérido y dos ácidos grasos <sup>7,16</sup>.

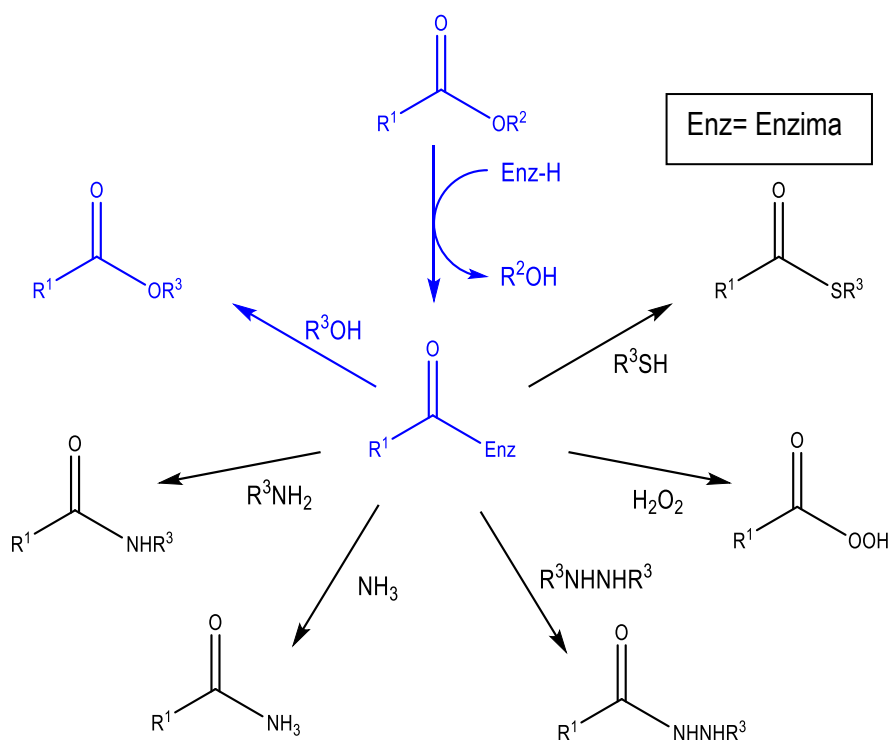


**Esquema 5.** Formación del triacilglicérido catalizado por lipasa

Fuente: Elaboración propia

Las lipasas, sin embargo, poseen capacidades particulares tales como: catalizar tanto la reacción directa, como la reacción inversa (reacción reversible) y la posibilidad de ser empleadas tanto en medios acuosos como orgánicos, incluso en reacciones sin solventes<sup>18</sup>.

La importancia de las lipasas en el sector industrial debido a que en los últimos años se ha logrado realizar grandes avances en la producción, extracción y purificación de estas enzimas por medio de la modificación de microorganismos<sup>19,20</sup>, ha proporcionado una diversidad de lipasas que poseen las ventajas mencionadas, además pueden emplearse a pH más ácido o básico que sus congéneres de otros organismos, también pueden soportar temperaturas elevadas (bajo ciertas condiciones) <sup>21</sup>, lo que ha permitido el uso en diversas reacciones como se muestra ilustra en el esquema 4.



**Esquema 6.** Principales reacciones químicas catalizadas por lipasas <sup>21</sup>

El uso de enzimas en procesos industriales presenta una serie de ventajas comparado con los catalizadores convencionales (quimocatalizadores), tales como: son muy activos a temperatura ambiente y presión ambiental, sin embargo, la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo, al ser solubles en agua, su recuperación es difícil y no es fácil de reutilizar<sup>22</sup>. La inmovilización de las enzimas se ha podido superar estos últimos inconvenientes, permite que los procesos que involucren enzimas inmovilizadas sean económicamente más rentables<sup>22</sup>.

#### 4.4.2. Características de las lipasas en síntesis de ésteres

El uso de las enzimas soportadas en los procesos de biotransformación es una de las técnicas más usadas porque su separación de los productos se puede realizar por técnicas sencillas y esto disminuye los costos de producción<sup>17</sup>. Los productos generados tienen mayor valor agregado, por la manera de obtención, teniendo mayor aceptación dentro de la industria. Las lipasas intervienen en reacciones de transesterificación, hidrólisis y esterificación en medios convencionales y en medio libres de solventes<sup>18</sup>, es una buena alternativa para obtener diversos productos<sup>17</sup>.

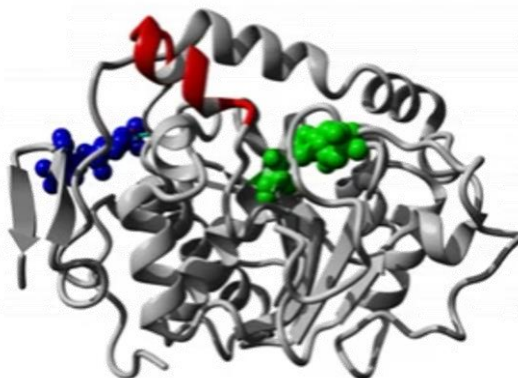
Diversos estudios realizados han demostrado el potencial de las enzimas de las lipasas para la producción de diversos ésteres, como los ésteres terpénicos, presentan varias propiedades organolépticas deseadas para la industria <sup>23</sup> Así mismo, en la industria tradicionalmente la obtención de algunos aromatizantes y sabores naturales se realizaban mediante una extracción directa de las plantas o por síntesis química <sup>24</sup>. Sin embargo, no pueden suplir con la demanda de estos compuestos debido a que el aislamiento y purificación conlleva costos elevados <sup>23</sup>.

Entre las alternativas desarrolladas por la biotecnología se implementa el uso de lipasa para superar los desafíos anteriormente descritos.

Los estudios realizados para la obtención de ésteres usados como aditivos aromáticos, se centran en los aspectos que influyen entre el tipo de lipasas, su porcentaje, los sustratos empleados y la relación molar, la temperatura, entre otros<sup>25,26</sup>. Dentro de estos estudios se destaca el uso de las enzimas producidas por Novozymes, ofrece diferentes lipasas que ha sido estudiadas para la síntesis de estos y muchos más compuestos<sup>27</sup>. Dentro de las lipasas más usadas son procedentes de *Candida antártica*, *Rhizomucor miehei* y *Thermomyces lanuginosu*, siempre se comparan entre ellas, siendo la primera presenta la mayor obtención de ésteres aromáticos<sup>23,24,27-29</sup>. Esto está relacionado con la variación configuracional de las lipasas, que, según su procedencia, presentan especificidades distintas, esto haciendo referencia a hacia las cadenas de triglicéridos que pueden hidrolizar, por ejemplo, las lipasas de la *Candida antarctica*, no es específica, pero *Rhizomucor miehei* y *Thermomyces lanuginosu* son estereoselectivas de las cadenas en posición 1,3 de un triglicérido<sup>30</sup>.

La reutilización de las enzimas en ciclos sucesivos también es fuente de interés en los procesos industriales, ya que se determina si se pierde la eficacia en el empleo de la enzima, tras ser lavada y acondicionada<sup>18,23</sup>. El porcentaje de enzima a usar es un factor fundamental, existe un óptimo de concentración de enzima que se puede emplear, al superar ese punto, no se obtendrán mayores rendimientos en la reacción, debido a que hay una disminución de los centros activos accesibles para los reactivos<sup>31</sup> o también a la falta de sustrato<sup>32</sup>.

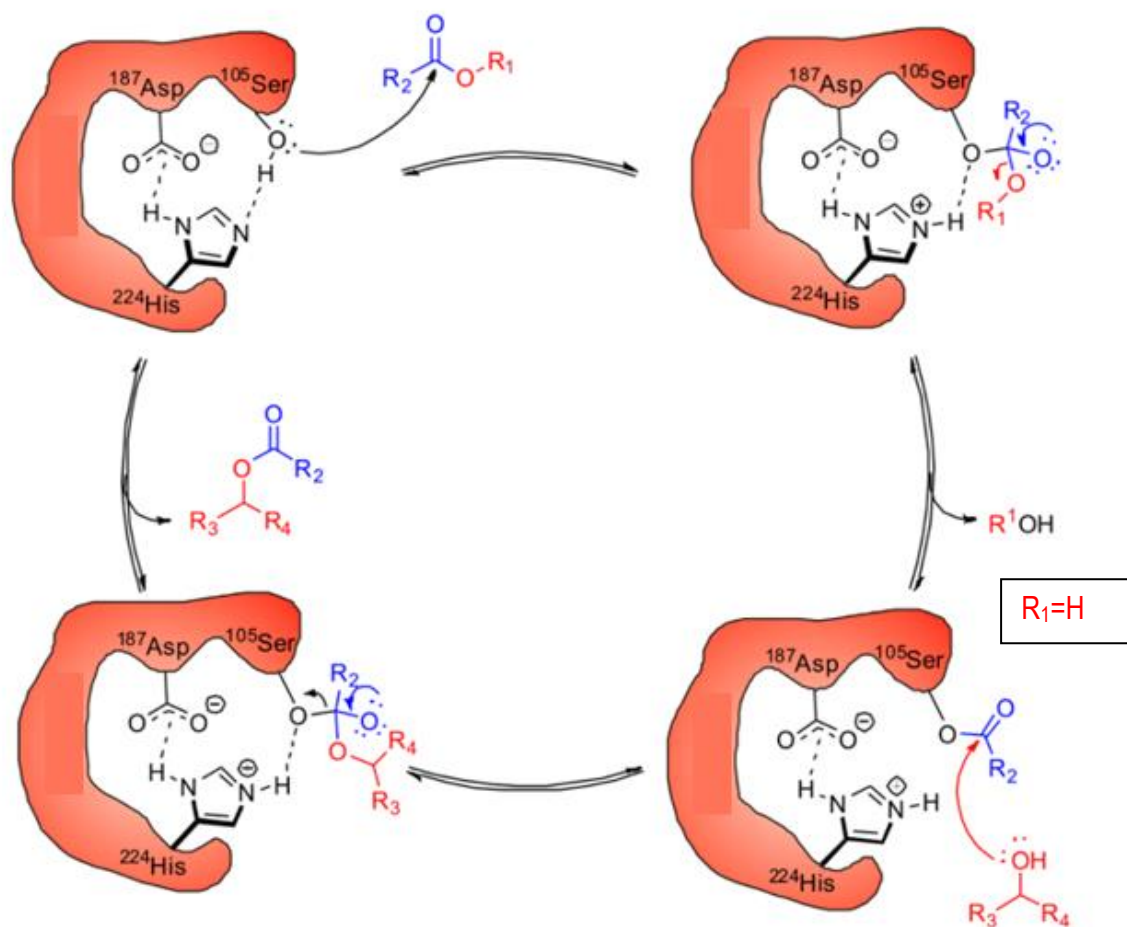
Paralelamente la lipasa B de la *Candida antártica*, tiene como triada catalítica los aminoácidos serina 105 (Ser 105), Histidina 224(His 224) y el ácido aspártico187 (asp 187). La Figura 4 se representa en color verde, el centro de glicosilación formado por Asparagina en azul (Asn74) y la hélice de unión en rojo<sup>33</sup>, como se ilustra en la figura 4.



**Figura 4.** Representación de la lipasa B de la *Candida antártica*<sup>33</sup>

La lipasa B de *Candida antártica*, no requiere cofactores, se basa en la formación de dos intermediarios tetraédricos entre los sustratos y el sitio activo de la enzima. El proceso inicia con el ataque nucleofílico de la serina. Se estabiliza por la formación de enlaces de puentes de hidrógeno en la región denominada "Hueco oxoaniónico" formando el primer intermedio. Seguidamente de estos, se libera el grupo OH, dando lugar a un complejo covalente entre la lipasa y el radical acilo. Posteriormente, se genera un nuevo ataque nucleofílico para constituir el segundo intermedio tetraédrico, finalmente colapsa liberando el producto y la enzima<sup>34</sup>. Se presenta el mecanismo de reacción en el esquema 7.

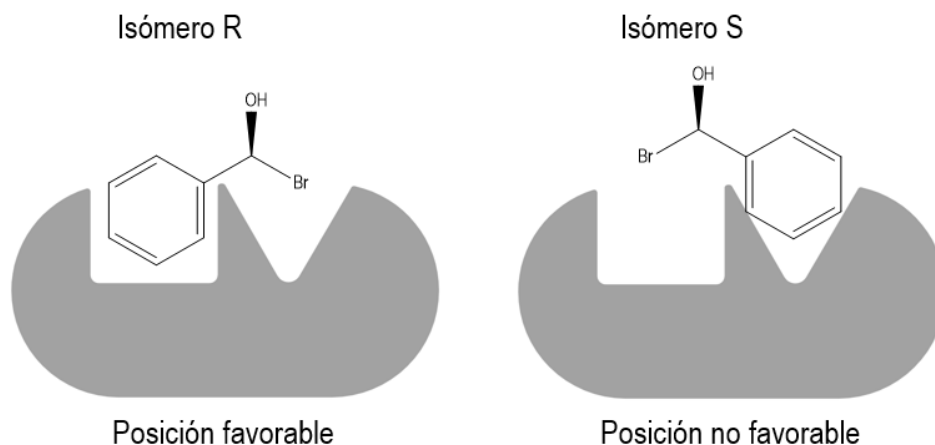




Esquema 7. Mecanismo de reacción de las lipasas <sup>34</sup>

En la mayoría de las reacciones de hidrólisis se produce agua, su acumulación puede causar el desplazamiento del equilibrio hacia la izquierda (sustratos). En los reactores se suele usar tamices moleculares<sup>35</sup>. Así mismo se ha explorado como la presencia de agua en el medio puede disminuir la conversión, el uso de solventes orgánicos apolares han contribuido a superar estas dificultades, sin embargo, usar el propio acil donador como medio de reacción, da a lugar a procesos conocidos como “solvent-free” o libre de solvente que también presentan buenos resultados <sup>36-38</sup>.

La estereoselectividad de las lipasas es un aspecto muy importante para tener en cuenta, si se usan sustratos con características quirales. Las lipasas presentan preferencia por la fracción del isómero R, por lo que limita la posibilidad de catalizar completamente los sustratos si hay presencia de mezclas racémicas<sup>34</sup>. A continuación, se presenta la figura 5, donde se ejemplifica la favorabilidad para los isómero R.



**Figura 5.** Favorabilidad de los isómeros en presencia de lipasa <sup>34</sup>

Las lipasas se han usado para la producción de polímeros a base de reacciones de poliesterificación. En 1983 ocurrió la primera polimerización, surgió de casualidad, debido a que se investigaba la hidrólisis enzimática del aceite de castor con la lipasa *Geotrichum candidum*, se evidenció la presencia de dímeros y trímeros del ácido ricinoleico<sup>39</sup>. La incursión en la modificación genética del organismo para la producción de enzimas específicas, con características como mayores rangos de pH, termófilas, entre otras. En la universidad del Cauca, se realizó la esterificación de xilitol y ácido succínico<sup>40</sup>, en condiciones extremas (140 °C), evidenciando que la enzima aún sigue presentando actividad en dicha condición debido probablemente al soporte de la enzima.

#### 4.5.CARACTERIZACIÓN INSTRUMENTAL DE ÉSTERES

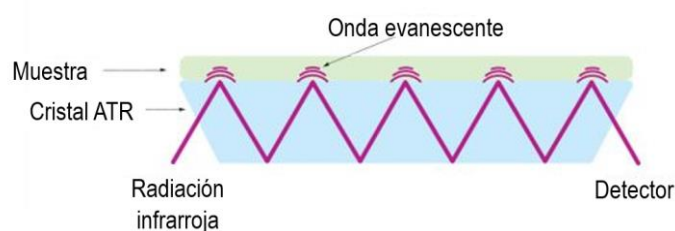
En los procesos de síntesis, la caracterización instrumental de los productos, ya que se puede corroborar la obtención de la molécula objetivo. Para la caracterización de obtenidos de los ésteres, se tiene: la espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases, espectrometría de masas y polarimetría. La espectroscopia infrarroja permite conocer los grupos funcionales que se encuentran en la muestra a analizar, mientras que la polarimetría solo interactúa con moléculas ópticamente activas, permitiendo determinar su rotación específica siempre y cuando la muestra sea pura, finalmente la cromatografía de gases acoplada a masas permite la separación, determinar y cuantificar de los analitos de interés, además la espectrometría de masas es de vital importancia para la elucidación de moléculas, mediante la fragmentación asociada a cada señal en el cromatograma.

##### 4.5.1.Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja es una espectroscopia vibracional, que consiste en irradiar una muestra con fotones de energía  $h\nu$ . Cuando la frecuencia  $\nu$  es igual a la frecuencia de vibración de un modo normal ( $w$ ), causando la absorción de energía de la frecuencia de vibración normal del enlace de una molécula, las vibraciones moleculares producen oscilaciones en las cargas eléctricas de la molécula<sup>41</sup>. Una condición necesaria para que se produzca la vibración, es que debe existir la presencia de momentos dipolares, si el momento dipolar es nulo, no hay absorción de la energía infrarroja<sup>41</sup>.

Esta técnica es conveniente para la identificación de los grupos funcionales que están presentes en una sustancia. Ya que cada grupo funcional requieren energías de excitación distintas para que experimente los cambios de tensión en sus enlaces<sup>41</sup>. Para la medición de muestras mediante esta técnica se pueden usar varios accesorios, entre los más comunes se tiene el accesorio de transmitancia, en la muestra puede estar líquida o sólida, según su estado se pueden ajustar para desarrollar la medición; este accesorio permite la recolección de datos en poca cantidad, en este caso el haz de radiación atraviesa el porta muestras (por ende también la muestra), a la hora de medir se debe tener en cuenta que debe ser translúcida, para no causar saturación en el detector<sup>41</sup>.

Así mismo se tiene el accesorio de ATR, el cual resulta ser más versátil la muestra no requiere ser preparada, el haz de radiación índice sobre la superficie de la muestra, donde se aprovecha la onda evanescente por lo que la radiación incide sobre el cristal de ATR y posteriormente por lo menos una vez sobre la superficie de la muestra <sup>41</sup> (figura 6).



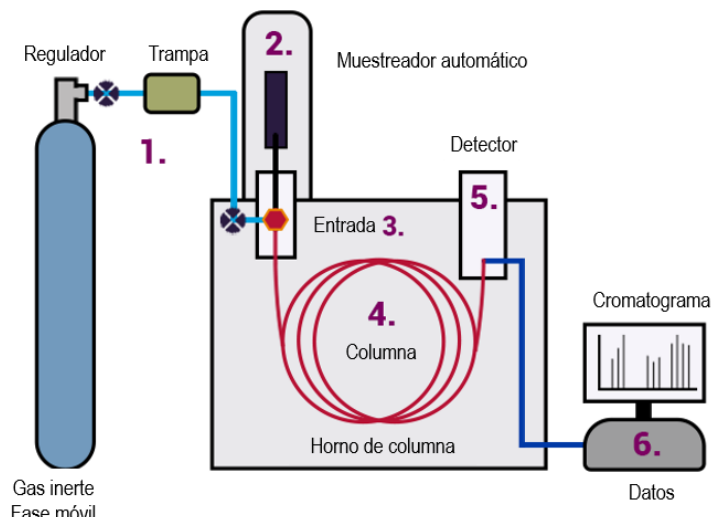
**Figura 8.** Funcionamiento del FT-IR ATR <sup>42</sup>

#### 4.5.2. Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía es una técnica de separación, resulta muy útil para la determinación y cuantificación de analitos en muestras complejas. Dentro del área de la cromatografía tenemos: cromatografía líquida (CL) y cromatografía de gases (CG)<sup>41</sup>. La cromatografía de gases (GC), es la técnica de más amplio uso, ofrece una gran capacidad de separación y sensibilidad al momento de analizar compuestos volátiles, los únicos requisitos que debe presentar los analitos, es que sean estables térmicamente, pesos moleculares menores a 1000 u y que su rango de trabajo este por debajo de los 400 °C<sup>41</sup>.

Para realizar el proceso de separación por CG, se inyecta una pequeña cantidad de muestra, es volatilizada en el puerto de inyección, arrastrada por un gas inerte a través de una columna cromatográfica, los cuales son liberados dependiendo de su interacción con la columna donde finalmente llega al detector. Dentro de los gases inertes se tiene helio, nitrógeno y argón, sin embargo, en casos especiales se usa hidrógeno como gas portador<sup>41</sup>(esquema 8). Las columnas más usadas actualmente son las columnas capilares que son un tubo de sílice fundida, donde la fase estacionaria se une químicamente o recubre el interior de la columna, estas columnas ofrecen mayor resolución y eficiencia al separar, ya que proporcionan más platos teóricos por metro cuadrado, por lo que se puede encontrar columnas de diversas longitudes<sup>41</sup>.

Los detectores que se le pueden adaptar a un cromatógrafo de gases dependen de las necesidades que se tenga a la hora de realizar el análisis. Entre ellos tenemos detectores de conductividad térmica, detección de ionización de llama, detector de captura electrónica, detector fotométrico de llama y detección de masas. Este último siendo de los usados para la investigación, identificación y cuantificación de moléculas desconocidas<sup>41</sup>.

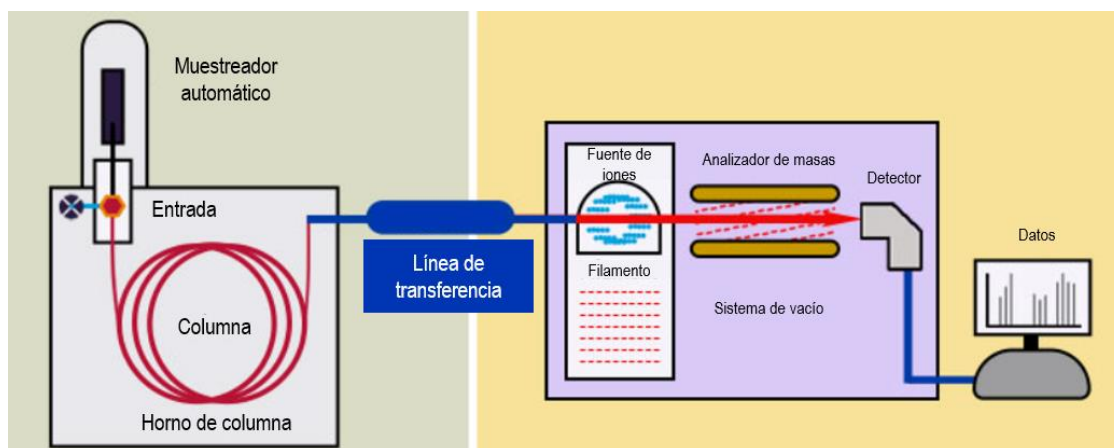


**Esquema 8.** Partes del cromatógrafo de gases <sup>43</sup>

#### 4.5.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es la técnica analítica que permite la identificación de compuestos desconocidos, la cuantificación de los compuestos conocidos y una herramienta de apoyo para la elucidación de estructuras y propiedades de las moléculas. La técnica se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, posteriormente hay una separación de los iones de acuerdo con su masa y carga ( $m/z$ ), que finalmente llega al detector<sup>41</sup>.

Esta herramienta se puede usar de dos maneras, por inyección directa o acoplado a diversos equipos como son los de cromatografía líquida o de gases. El acople a un cromatógrafo permite la separación y cuantificación de los analitos; las columnas se encargan de separar los analitos, para finalmente llegar a la fuente de ionización. La fuente de ionización pueden ser blandas o fuertes<sup>41</sup>. En la cromatografía de gases se suele usar fuentes de iones fuertes como lo es el impacto electrónico. Al interior del espectrómetro, los analitos son sometidos a campos electromagnéticos por los analizadores de masas que discriminan por la relación  $m/z$  si es necesario o permite el paso total de los iones de la muestra<sup>41</sup> (esquema 9).

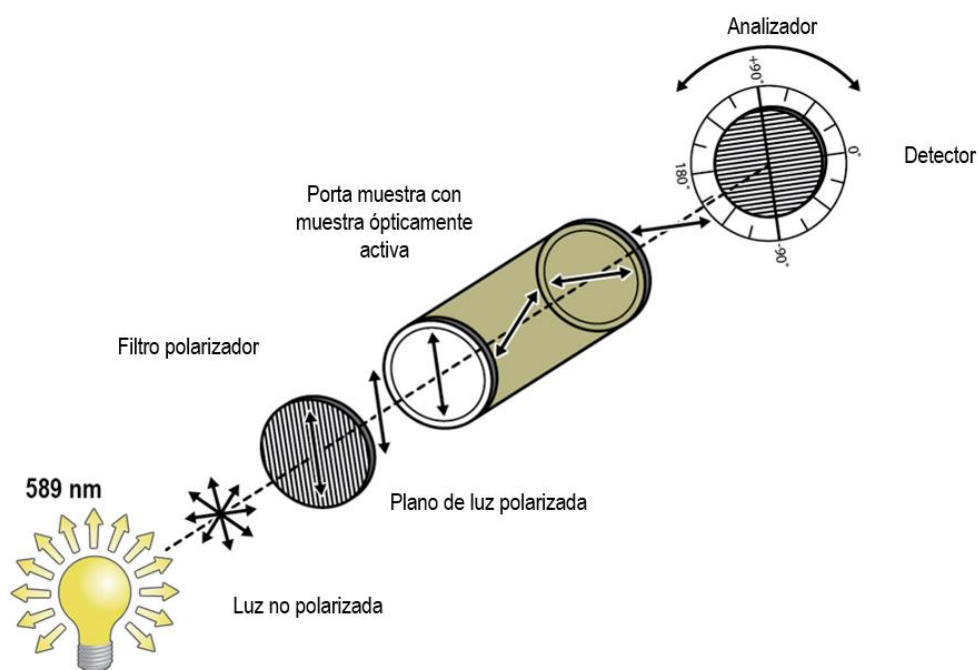


**Esquema 9.** Cromatografía de gases acoplada a masas <sup>44</sup>

#### 4.5.4. Polarimetría

La polarimetría es una técnica analítica que se fundamenta en la medición de la rotación óptica de un haz de luz polarizada al pasar a través de una sustancia ópticamente activa<sup>6,7</sup>. Es una técnica no destructiva ya que solo se requiere preparar una solución del analito a estudiar, se debe considerar la concentración de la molécula, propiedades del solvente y la temperatura estos influyen a la hora de realizar la medición<sup>41</sup>. El funcionamiento del polarímetro se presenta en el esquema 8.

Dentro de la polarimetría se deben tener en cuenta conceptos como la quiralidad, este tipo de moléculas se caracterizan por generar la rotación del plano de luz polarizada, por tal motivo se denominan ópticamente activos y dichos efectos generados se conoce como rotación óptica. Una molécula quiral no se puede superponer con su imagen especular, a lo que da a lugar a los enantiómeros, entre ellos tenemos los azúcares, aceites esenciales, ingredientes farmacéuticos, aminoácidos, entre otras<sup>6</sup>.



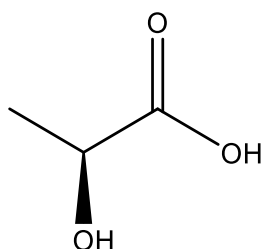
Esquema 10. Funcionamiento del polarímetro <sup>45</sup>

#### 4.6.SUSTRATOS Y PRODUCTO

Es importante conocer algunos aspectos de los sustratos y del producto de síntesis, ya que en la sección 4.4.2. se mencionó la preferencia de la lipasa por los isómeros con la configuración L de los enantiómeros, debido a ello en esta investigación se usan el mentol como mezcla de isómeros. A continuación, se presenta los sustratos (mentol, ácido láctico) y el producto esperado (lactato de mentilo).

#### 4.6.1. Ácido láctico

El ácido láctico (Figura 7) es un ácido orgánico de la familia de los AHA (alfa-hidroxiácidos), está presente en algunos jugos de frutas (tomate y guayaba), en la sangre y músculos de los seres vivos, es el componente más común en los productos fermentados de los lácteos y en bebidas como el vino. Presenta dos isómeros (L)-ácido láctico y (D)- ácido láctico, el isómero D es perjudicial para el metabolismo humano porque puede generar acidosis láctica y decalcificación<sup>46</sup>. Mientras que el isómero L, está clasificado por la FDA como una sustancia GRAS.



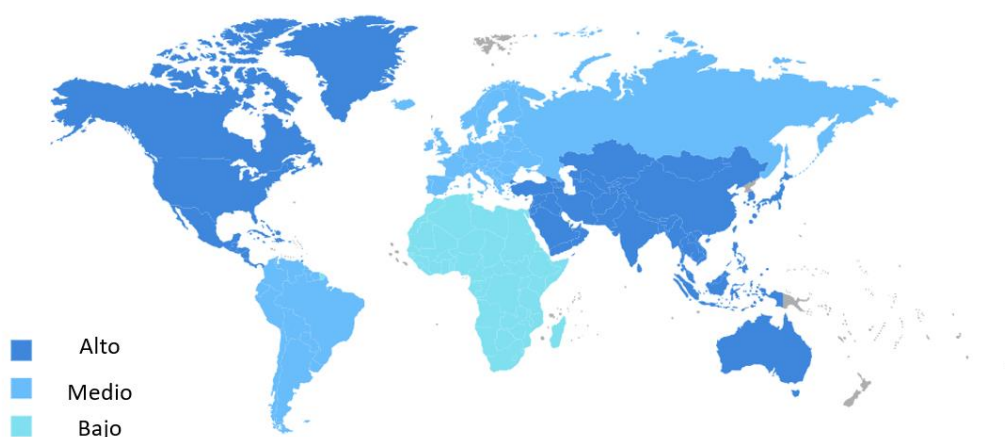
**Figura 7.** Estructura química del ácido láctico

Fuente: Elaboración propia

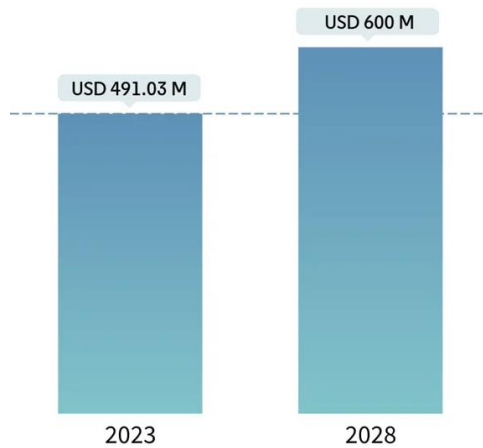
El ácido láctico, presenta un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia, química, farmacéutica, química y cosmética, entre otras. Sus usos pueden ir desde curtir cuero y teñir lana; como agente aromatizante y conservante en queso procesado, aderezos para ensaladas, encurtidos y bebidas carbonatadas; y como materia prima o catalizador en numerosos procesos químicos<sup>46</sup>.

Presenta un mercado en crecimiento en Asia y el Pacífico (Figura 8), debido a la gran aplicación que tiene como aditivo para alimentos y fabricación de biomateriales de bajo costo. El mercado de este producto en el 2023 fue de 491.03 millones USD y la proyección para el 2028 se espera que sea de 600 millones USD (Figura 9), lo que se traduce en una tasa anual de crecimiento compuesta del 4.09%<sup>47</sup>.

Mercado del ácido láctico: Tamaño del mercado (%) por región, global 2022

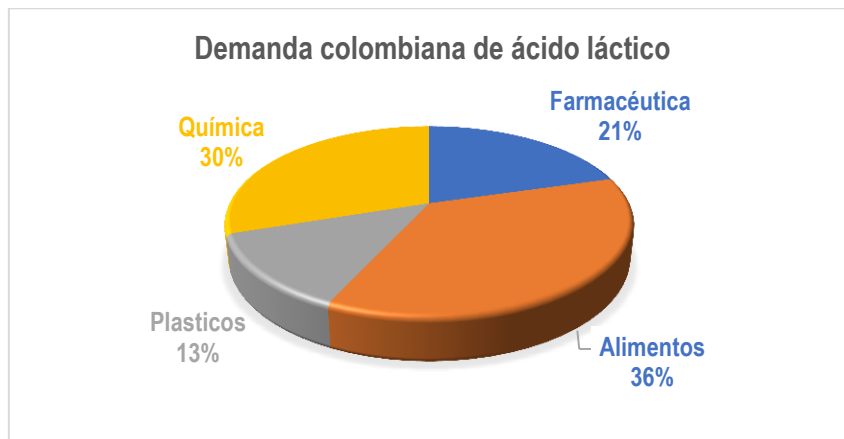


**Figura 8.** Mercado del ácido láctico a nivel global <sup>47</sup>



**Figura 9.** Predicción del crecimiento del mercado del ácido láctico a nivel global <sup>47</sup>

Se ha acelerado la investigación en L (+) y D (-), ácido láctico, por vía biotecnológica, con el objetivo de fomentar la producción del isómero L, además se enfoca en la disminución de costos para su producción. En Colombia diversas universidades han presentado propuestas para la generación ácido láctico de manera sostenible, donde se recalca que la mayor demanda está en el sector de alimentos y la industria química (Figura 10), resaltando que según su aplicación se requiere que esta sustancia sea pura o se encuentre en mezcla de isómeros, variando los costos de producción.



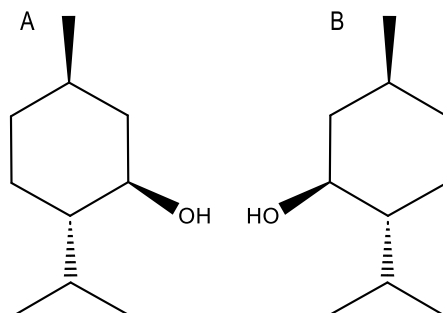
**Figura 10.** Demanda de ácido láctico en Colombia <sup>48</sup>

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos<sup>49</sup>.

#### 4.6.2. Mentol

El mentol (Figura 11) es un alcohol terpénico con un fuerte olor y sabor a menta refrescante. Se obtiene del aceite de menta o se produce sintéticamente mediante hidrogenación de timol. El mentol se usa con fines medicinales en ungüentos, pastillas para la tos e inhaladores nasales.

También se utiliza como aromatizante en alimentos, cigarrillos, licores, cosméticos y perfumes. La molécula de mentol puede existir como uno de dos enantiómeros<sup>50</sup>. El material natural es la forma levógira también conocida como (-)-mentol o (L)-mentol. El mentol sintético es racémico, que consta de cantidades iguales de (-)-mentol y (+)-mentol o (D)-mentol, siendo este último el isómero que hace girar el plano de luz polarizada hacia la derecha<sup>50</sup>.

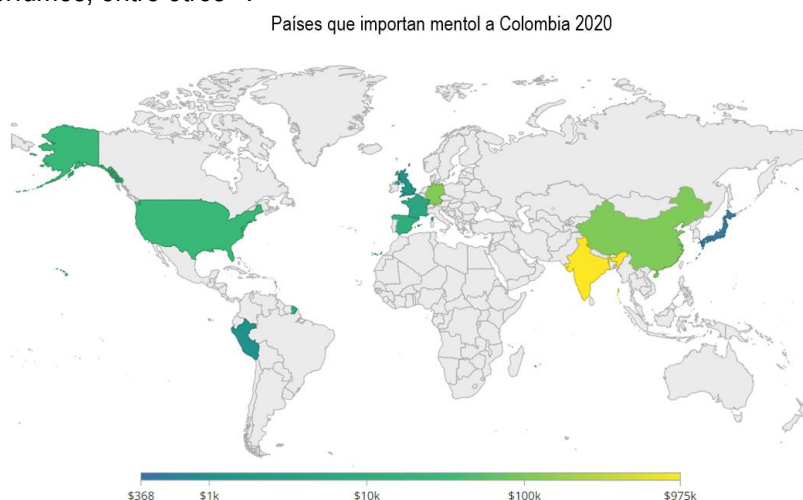


**Figura 11.** Estructura química del mentol. A corresponde a (L)- mentol, B corresponde a (D)- mentol

Fuente: Elaboración propia

Es de los principales componentes de la esencia de menta. Es un sólido blanco, su forma cristalina es de grandes prismas que funden entre 41 y 44 °C. El líquido ebulle a 212 °C. El mentol posee propiedades como anestésicas (ligeramente), refrescantes y también propiedades antisépticas<sup>50</sup>.

En Colombia la importación de mentol se da mayoritariamente desde Asia de países como India y China, y en el mismo continente desde Perú y Estados Unidos<sup>51</sup> (Figura 12). Las aplicaciones que tiene por sus propiedades en la industria farmacéutica son en analgésicos, descongestionantes, tratamiento de las quemaduras, parches para el dolor, ungüentos para tratar dolores, inhaladores, pastillas o ungüentos para tratar la congestión nasal, entre otros<sup>52</sup>. Otros usos como ingredientes en cremas dentales, chicle, aceite de menta, enjuagues bucales, shampoo, perfumes, entre otros<sup>52</sup>.



**Figura 12.** Mercado de la importación de mentol en Colombia <sup>51</sup>



### 4.6.3.Lactato de mentilo

El lactato de mentilo (Figura 13) es un éster artificial, producto de la reacción del ácido láctico con el mentol. Se usa ampliamente como saborizante homólogo a la menta, dulces de frutas, productos de cuidado bucal y bebidas. Sus propiedades sensoriales se han descrito como bajas de olor aparente, incorporado a cremas de uso tópico para atletas. En la aplicación de 25 mg/L se exhibe una sensación de refrescante persistente, por lo que se usa como alternativa al mentol debido a su poco aroma a menta<sup>53</sup>.

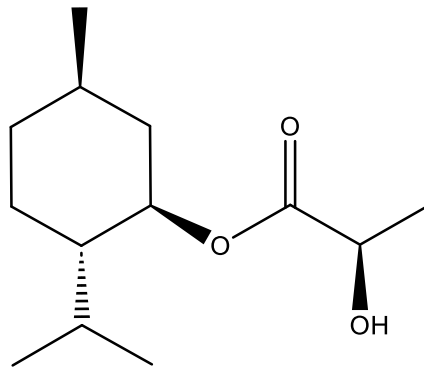


Figura 13. Estructura química del (L)-Lactato de (L)-mentilo (LL-LM)

Fuente: Elaboración propia

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1.OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la esterificación de ácido láctico y mentol con la participación de la enzima comercial Novozym 435®.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las condiciones (equivalentes sustrato – enzima, tiempo, temperatura), para llevar a cabo una reacción enzimática eficiente de mentol con ácido láctico, catalizada por Novozym 435®.
- Valorar el desarrollo de la reacción enzimática mediante cromatografía de gases-masas.
- Evaluar la estabilidad de la enzima Novozym 435® en la reacción de esterificación.

### **5.3.OBJETIVO ESPECÍFICO ADICIONAL**

- Estimar que tan verde es el proceso síntesis enzimático de lactato de mentilo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

#### 6.1.1. Reactivos y solventes

- Mentol grado analítico ( $\geq 99\%$ ) (Sigma-Aldrich).
- Ácido láctico grado reactivo ACS ( $\geq 99\%$ ) (Sigma-Aldrich).
- Etanol grado industrial (G&M química).
- Novozym 435<sup>®</sup> enzima lipasa (CA) (Novozymes, Brasil).
- Heptano
- Hidróxido de sodio

#### 6.1.2. Equipos

- Balanza analítica (60 g / 0,0001 g) (Unidad de Análisis Industriales, Departamento de química, Universidad del Cauca).
- Espectrofotómetro IR con transformada de Fourier Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR con corrección ATR (Unidad de Análisis Industriales, Departamento de química, Universidad del Cauca).
- Cromatógrafo de gases Thermo Scientific Trace 1300 Con detector de masas TSQ DUO (Laboratorio de instrumental, Escuela de química, Universidad Tecnológica de Pereira).
- Polarímetro ATAGO (Unidad de Análisis Industriales, Departamento de química, Universidad del Cauca).
- Bomba de vacío vacuubrand 2c modelo MZ 2C NT (Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio QPN, Universidad del Cauca).

### 6.2. SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO

A partir de la metodología reportadas por Sousa et al<sup>18</sup> y Shih et al<sup>54</sup> se definieron las variables de proceso y con ellas se estableció un diseño experimental para su optimización, cuyas condiciones se reportan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características del Diseño Experimental.

Tipo de diseño	Nombre del diseño	Factores experimentales	Bloque	Respuesta	Experimentos
Diseño compuesto superficie respuesta	Box- Behnken	(Tiempo, Relación de sustratos, Carga enzimática y Temperatura)	1	Conversión, Selectividad y Rendimiento	29 (5 puntos centrales)

La metodología de cada experimento se llevó a cabo como sigue: se usó un sistema de reflujo con agitación magnética en un balón de reacción conectado a un condensador recto, donde fueron añadidos el mentol (M) y el ácido láctico (AL) en relación molar para cada ensayo (1, 2 y 3 [M/AL]), se ajustó la temperatura (60, 90, 120 °C) y alcanzada la temperatura se adicionó la cantidad de enzima (en relación con el mentol) correspondiente para cada ensayo. Se destaca que ambos reactivos se funden a bajas temperaturas por lo que no es necesario la adición de solvente.

**Tabla 5. Factores y niveles considerados para realización de diseño experimental Box-Behnken (DBB).**

Factor	Nombre	Niveles		
		-1	0	1
A	Temperatura	60	90	120
B	Tiempo de reacción	1	6.5	12
C	Porcentaje de enzima*	5	27.5	50
D	Relación molar**	1	2	3

\* Porcentaje peso de enzima / peso de mentol

\*\*Relación mentol / ácido láctico

**Tabla 6. Diseño experimental Box-Behnken para la síntesis del lactato de mentilo.**

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	* Porcentaje de Enzima	** Relación M/AL
1	120	1.0	27.5	1
2	90	1.0	5.0	1
3	90	1.0	27.5	2
4	60	1.0	27.5	1
5	90	6.5	27.5	1
6	90	6.5	27.5	3
7	120	6.5	27.5	1
8	90	6.5	27.5	2
9	90	6.5	27.5	2
10	60	6.5	27.5	3
11	90	12.0	27.5	3
12	90	6.5	50.0	1
13	60	6.5	5.0	2
14	90	12.0	27.5	1
15	90	6.5	5.0	3
16	90	6.5	50.0	3
17	90	12.0	5.0	2
18	90	6.5	27.5	2
19	120	6.5	50.0	2
20	90	6.5	5.0	1

21	60	12.0	27.5	2
22	60	65	50.0	2
23	120	6.5	5.0	2
24	90	6.5	27.5	2
25	120	6.5	27.5	3
26	90	12.0	50.0	2
27	60	6.5	27.5	1
28	120	12.0	27.5	2
29	90	6.5	27.5	2

\* Porcentaje peso de enzima / peso de mentol

\*\*Relación mentol / ácido láctico

Concluido el tiempo de reacción, se adicionó metanol frio, para detener la reacción y separar la enzima de la mezcla obtenida. La enzima se extrae por medio de centrifugación y decantación; para ello, la mezcla se sometió a centrifugación, posteriormente se separó el sedimento (enzima) por decantación y se repitió el proceso 3 veces con volúmenes de 10 mL de metanol. Finalmente, las fases fueron reunidas y rota evaporadas.

### 6.2.1 Respuesta del diseño: Conversión, Selectividad, Rendimiento

La conversión del mentol se obtuvo por medio de la ecuación 1.

$$Conversion (\%) = \frac{(mol\ mentol_{inicial} - mol\ mentol_{final})}{mol\ mentol_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

**Ecuación 1.** Conversión de mentol

La selectividad del producto se obtuvo por medio de la ecuación 2.

$$Selectividad (\%) = \frac{mol\ lactato\ de\ mentilo_{obtenido}}{(mol\ mentol_{inicial} - mol\ mentol_{final})} \times 100 \quad (2)$$

**Ecuación 2.** Selectividad de reacción

El rendimiento del producto se obtuvo por medio de la ecuación 3.

$$Rendimiento (\%) = \frac{moles\ obtenidas\ de\ lactato\ de\ mentilo}{moles\ teoricas\ de\ lactato\ de\ mentilo} \quad (3)$$

**Ecuación 3.** Rendimiento de producto

## **6.2.2 Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron empleando medidas repetidas de ANOVA y técnicas de regresión de superficie de respuesta a un nivel de significancia del 5% usando Minitab 18 Statistical Software.

## **6.3. CARACTERIZACIÓN DEL LACTATO DE MENTILO**

### **6.3.1. Caracterización de espectroscopia Infrarroja**

Se realizó una caracterización de la mezcla obtenida, mediante espectroscopia IR-ATR. La adquisición de datos fue realizada en el equipo Nicolet™ iS™10 Thermo Scientific. Las condiciones de espectroscópicas para la recolección fueron de 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$ , 32 interferogramas y una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de muestra, recubriendo el cristal de ATR, la limpieza del cristal se realizó con isopropanol y entre cada medición de muestra se realizó la adquisición de fondo para eliminar la presencia de  $\text{CO}_2$ . Los datos son analizados con el Software OMNIC.

### **6.3.2. Cromatografía de gases**

La separación e identificación del crudo de reacción se llevó a cabo en los laboratorios de instrumental de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP). Para la preparación de las muestras se tomó 20  $\mu\text{L}$  y se diluyó a 20 mL, posteriormente se tomó una alícuota de 0.8 mL y se llevó a un volumen final de 10 mL. La solución final se pasó por filtro de nylon de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$ , se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases por Split. La columna usada corresponde a TR-5MS, con una longitud de 30 m, un diámetro de 0,25 mm y un grosor de película 0.25  $\mu\text{m}$ , la temperatura del puerto de inyección se fijó a 300 °C, Flujo de Helio 1 mL/min, la rampa se programó el horno a 60 °C por 1 min, posteriormente subió a 300 °C a 20 °C/min.

El detector de masas TSQ DUO inició la adquisición de datos a partir del minuto 2 hasta el minuto 11.5, la fuente se configuró a una temperatura de surco de iones y la línea de transferencia a 230 °C y el rango de masas fue de 50 m/z hasta 450 m/z.

Para la curva de calibración se usaron los estándares del mentol y lactato de mentilo, se emplearon 7 soluciones con las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg/L.

### **6.3.3. Purificación del producto**

La purificación del producto consistió en la adición del crudo de reacción a 10 mL de heptano, este se puso en agitación constante, se adicionó una solución de hidróxido de sodio al 25 % en volúmenes de 1 mL durante 10 min, durante el proceso se controló que la temperatura no superar los 30 °C, la agitación se deja por 30 min. La fase orgánica se separa por decantación y la separación del producto se realiza por destilación fraccionada al vacío con la bomba de vacío vacubrand 2c modelo MZ 2C NT, se detuvo el proceso al tener la temperatura estable y no

observar más destilación. El crudo sin destilar fue además caracterizado por cromatografía de gases

#### 6.3.4.Polarimetría

Para la determinación de la pureza enantiomérica del lactato producido, se tomó 2 g para preparar una solución al 10 % en etanol, de igual forma se prepararon soluciones de (L)-ácido láctico, (DL)(L) mentol y (L)-Lactato de (L)-mentilo. El equipo de polarimetría se usó en el modo de rotación específica, la celda de la muestra fue de 1 dm de largo. Se determinó la pureza enantiomérica mediante las siguientes ecuaciones.

$$\alpha_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (4)$$

#### Ecuación 4. Rotación específica

Donde T es la temperatura es igual a 20 °C,  $\lambda$  es la longitud de onda de la lámpara de sodio (589 nm),  $\alpha$  es igual a rotación óptica observada, l a longitud de la celda y c la concentración de la solución igual a 1 g/mL.

Para la pureza óptica y % ee se usó la ecuación 5 y 6 respectivamente.

$$\% \text{pureza óptica} = \frac{\text{rotación específica de la mezcla}}{\text{rotación específica del enantiómero puro}} \times 100 \quad (5)$$

#### Ecuación 5. Pureza enantiomérica

$$\% ee = \frac{(\% \text{ enantiómero abundante} - 50)}{50} \times 100 \quad (6)$$

#### Ecuación 6. Exceso enantiomérico

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA IR-ATR DE LOS PATRONES

En la síntesis del lactato de mentilo, los reactivos usados para dicha síntesis son sólidos cristalinos. Se realizó el seguimiento por espectroscopia infrarroja con el accesorio de ATR, para comparar cada una de las señales obtenidas en los precursores y en el producto. En las figuras 14 se presenta las señales asociadas del mentol.

El mentol tiene asociada dos señales:  $3246,37\text{ cm}^{-1}$  asociada a la tensión O-H del grupo OH,  $1023,97\text{ cm}^{-1}$  asociada a la tensión C-O del alcohol secundario, para su esqueleto carbonado se presentan la tensión de C-H a  $2944,29 - 2922,21 - 2864,79\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas con los grupos -CH<sub>2</sub> del anillo. Para los sustituyentes del ciclohexano la señal a  $1461,56\text{ cm}^{-1}$  debido a la flexión C-H del grupo metileno y para el gem di metilo se asocian las señales  $1171,86\text{ cm}^{-1}$ .

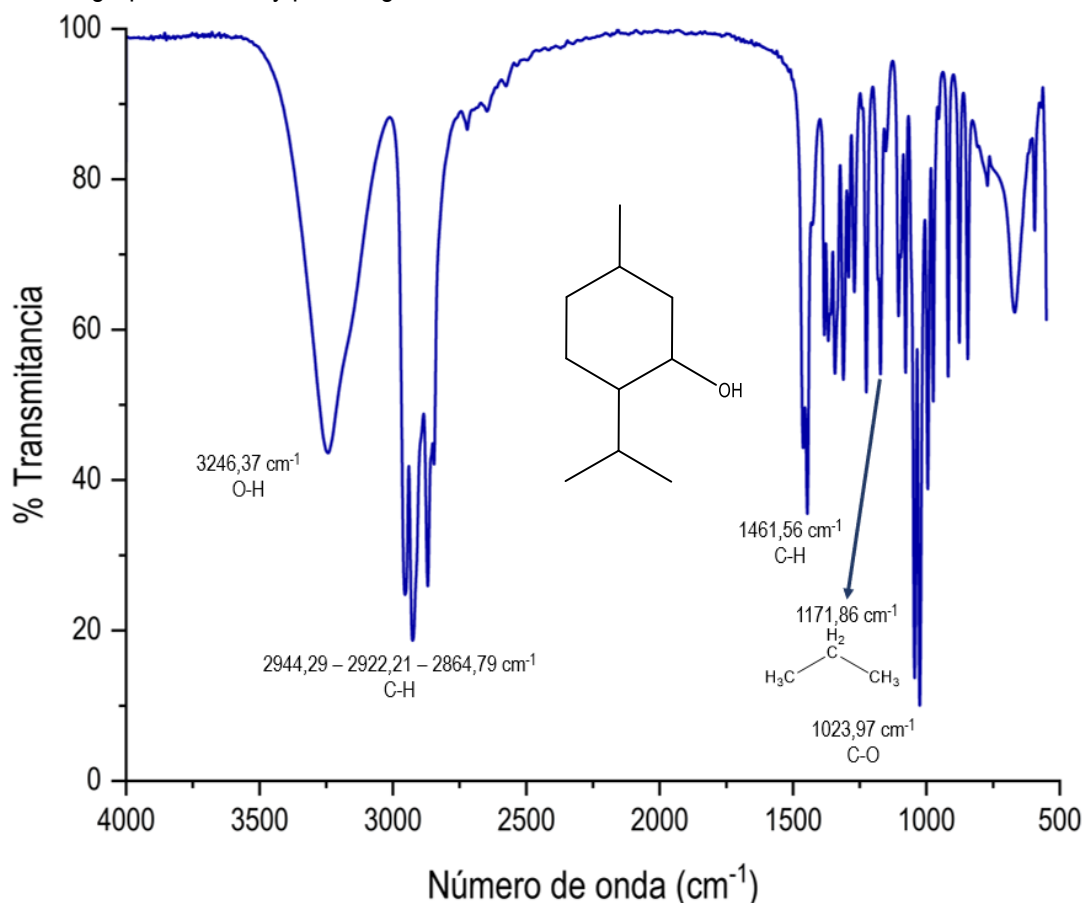
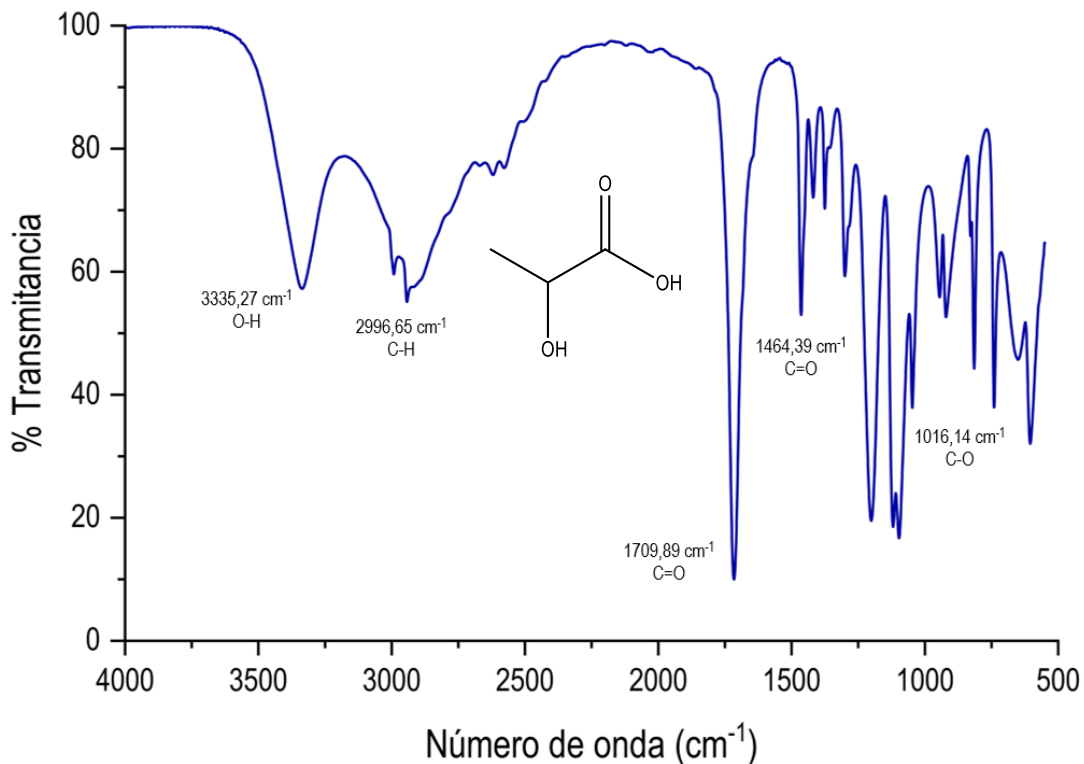


Figura 14. Espectro infrarrojo (ATR) del mentol

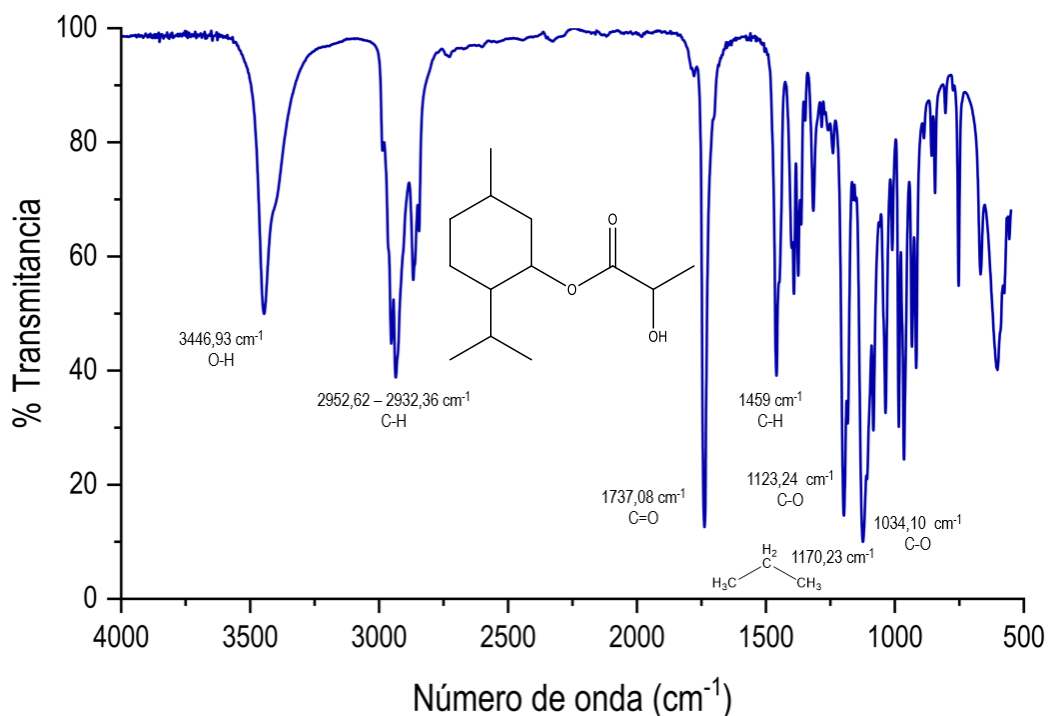
El ácido láctico, en la figura presenta las siguientes señales: para el grupo OH se asigna una señal en  $3335,27\text{ cm}^{-1}$  para la tensión O-H, a  $2996,65\text{ cm}^{-1}$  se da la tensión C-H del esqueleto carbonado;  $1709,89\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con la tensión C=O;  $1464,39\text{ cm}^{-1}$  es relacionada con la flexión C-H del metileno y finalmente  $1016,14\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la tensión C-O del alcohol secundario.





**Figura 15.** Espectro infrarrojo del ácido láctico

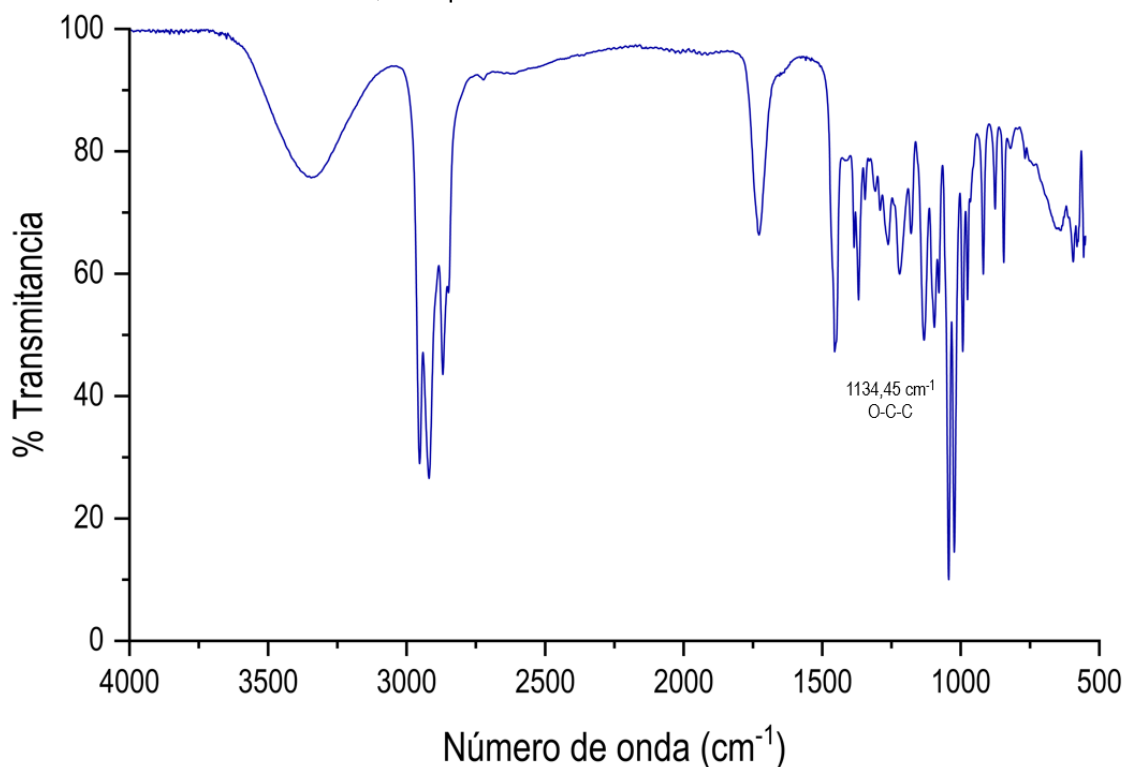
En la figura 16 se observa como el lactato de mentilo comparte algunas de las señales de los compuestos precursores. La presencia del grupo OH con una señal a 3446.93 cm<sup>-1</sup>, 2952.62 y 2932.36 cm<sup>-1</sup> correspondiente al esqueleto carbonado del mentol; 1737.08 cm<sup>-1</sup> corresponde a la tensión del grupo C=O del enlace éster, 1459 cm<sup>-1</sup> relacionado con la tensión C-H del metileno. Al isopropilo se relaciona las señales a 1170.23 cm<sup>-1</sup>, 1034.10 cm<sup>-1</sup> debidos al alcohol secundario, y finalmente la tensión O-C-C a 1123.24 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la formación del enlace éster.



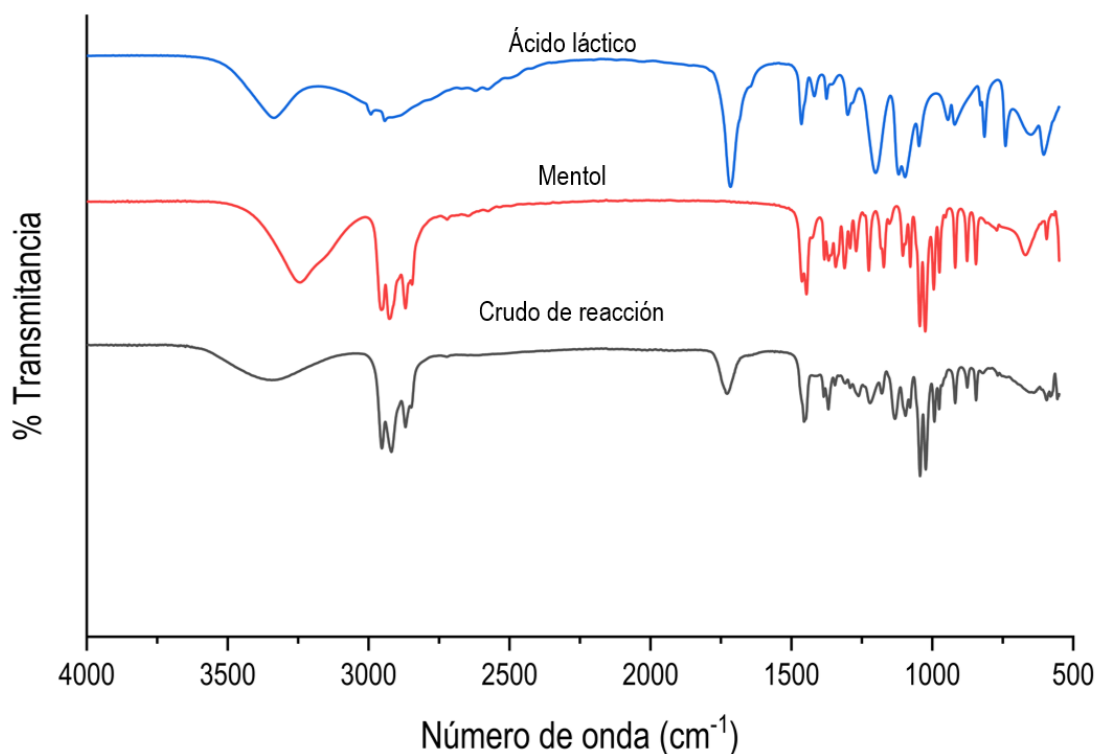
**Figura 16.** Espectro infrarrojo del lactato de mentilo

## 7.2. SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO

La figura 17 presenta el espectro IR del crudo de reacción, presenta las mismas señales relacionadas con el patrón (figura 16) del lactato mentilo. Se enfatiza la señal a  $1134.45\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la formación del enlace éster, sin embargo, para corroborar esta información se realizó la comparación entre los espectros del mentol y ácido láctico con el crudo como se observa en la figura 18. Se observa la presencia de una banda ancha a superior a los  $3300\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las interacciones de puente de hidrógeno entre el exceso de reactivos y el producto, la banda asignada al grupo  $\text{C}=\text{O}$ , presenta un desplazamiento a  $1730\text{ cm}^{-1}$  asociado a la formación del enlace éster, sin embargo, la presencia de la señal a  $1134.45\text{ cm}^{-1}$  la única presente en el crudo de reacción, a la que se asocia al enlace  $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ .

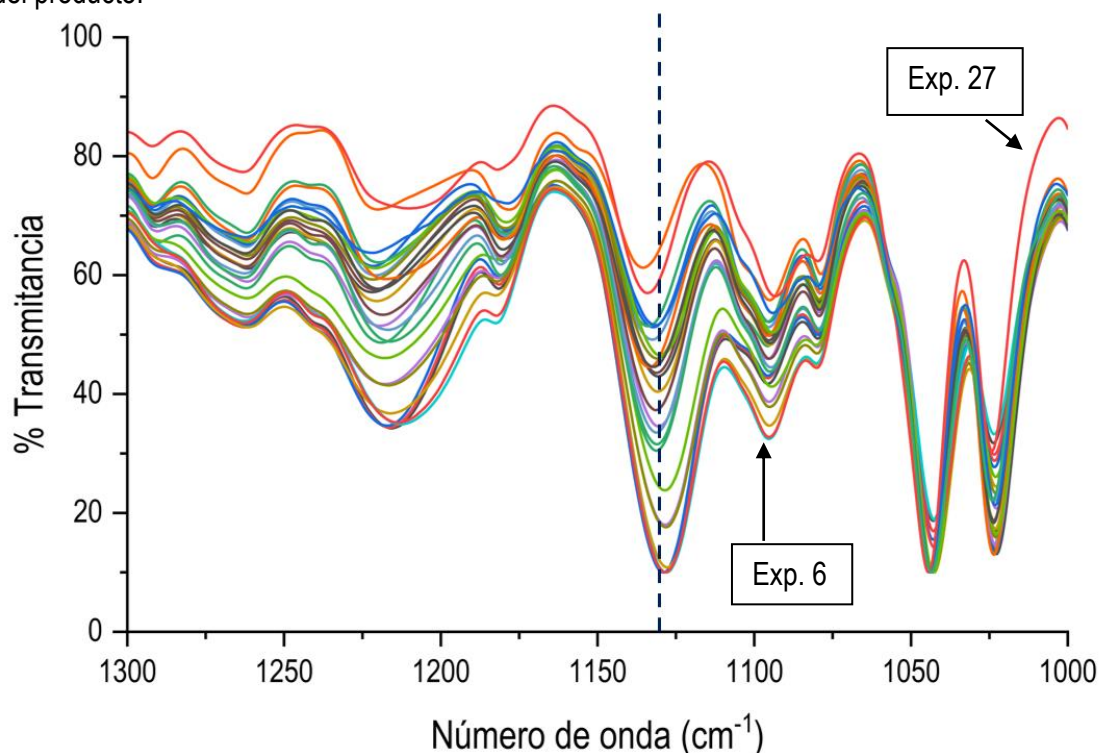


**Figura 17.** Espectro infrarrojo del crudo de reacción.



**Figura 18.** Comparación del espectro IR-ATR del crudo de reacción

Al realizar seguimiento al enlace O-C-C se evidencia en la figura 19 una variación entre cada uno de los experimentos realizados de la tabla 6, algunos presentan mayor intensidad que otros. Se puede asociar la intensidad de la banda con el avance de la reacción, se debe a que cuanto mayor sea la concentración de éster en la reacción, mayor será la interacción con la radiación aumentando la intensidad en la banda 1134 cm<sup>-1</sup>. Por lo que se puede corroborar la presencia del producto.

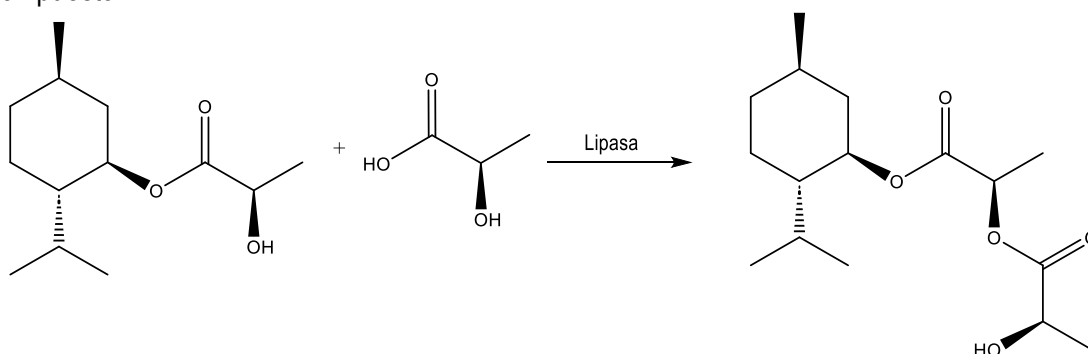


**Figura 19.** Aumento en la señal 1134 cm<sup>-1</sup>

En la síntesis se omite la adición de solventes, primero debido a que, cumpliendo con los principios de la química verde, se realiza la síntesis de una sustancia química segura y de bajo impacto ambiental y se eliminan sustancias auxiliares, debido a que los sustratos funden a temperaturas menores a los 50 °C y los reactivos cumplen la función de solvente. Esta decisión se apoya en la investigación de Pätzold et al<sup>26</sup>, quienes realizaron la esterificación del mentol con el ácido láurico obteniendo o logrando ¿?????. Este tipo de síntesis resulta ventajosa pues no implica la eliminación del solvente del medio para realizar la caracterización, además de disminuir los costos al momento de escalar el procedimiento a nivel industrial.

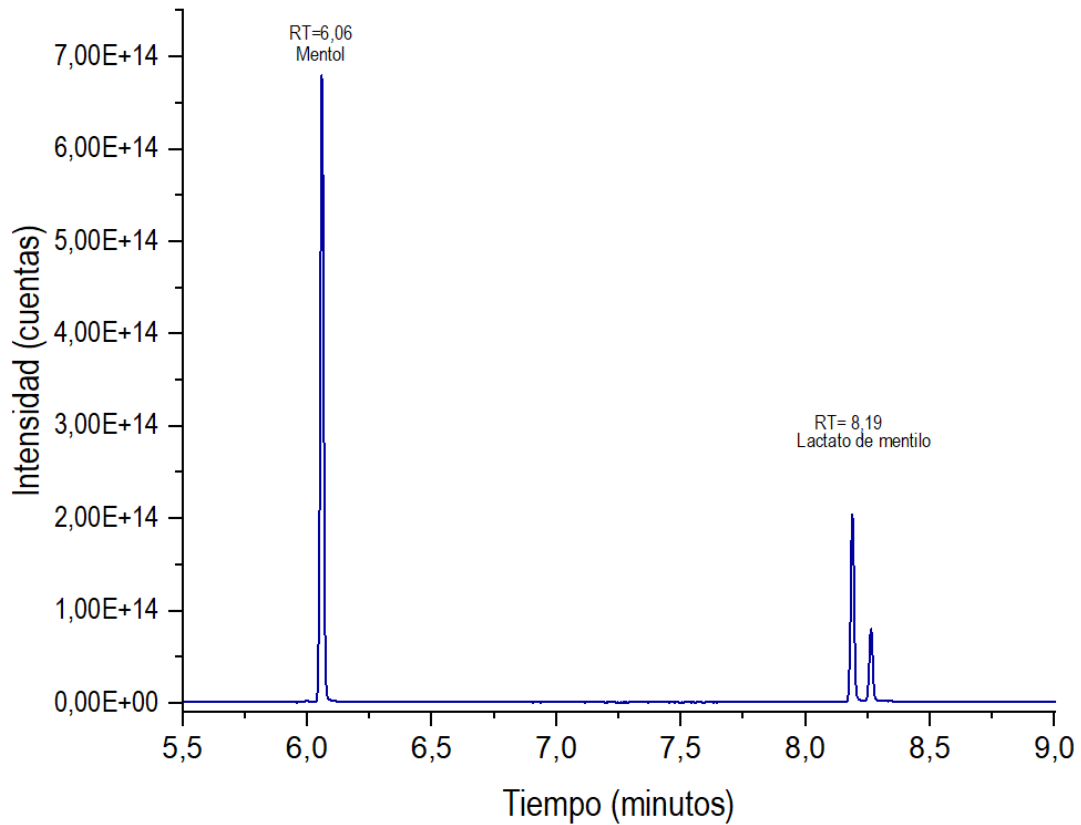
### 7.3. ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

El seguimiento de la reacción también se realizó mediante CG-MS, con el fin de identificar cada uno de los compuestos en la mezcla de reacción. Se pudo identificar el mentol con un tiempo de elución de 6.06 min, mientras que el lactato de mentilo eluye a 8.19 min. También se identificó otro compuesto con tiempo de retención de 8.26 min asociado al producto de la formación de ésteres de lactoílicos de mentilo superiores (MLL) (Figura 20), por la reacción del lactato de mentilo con ácido láctico disponible como se presenta en el esquema 11. En la sección 7.4 de análisis de espectrometría de masas se abordará de manera más detallada la formación de este compuesto.



**Esquema 11.** Subproducto de reacción

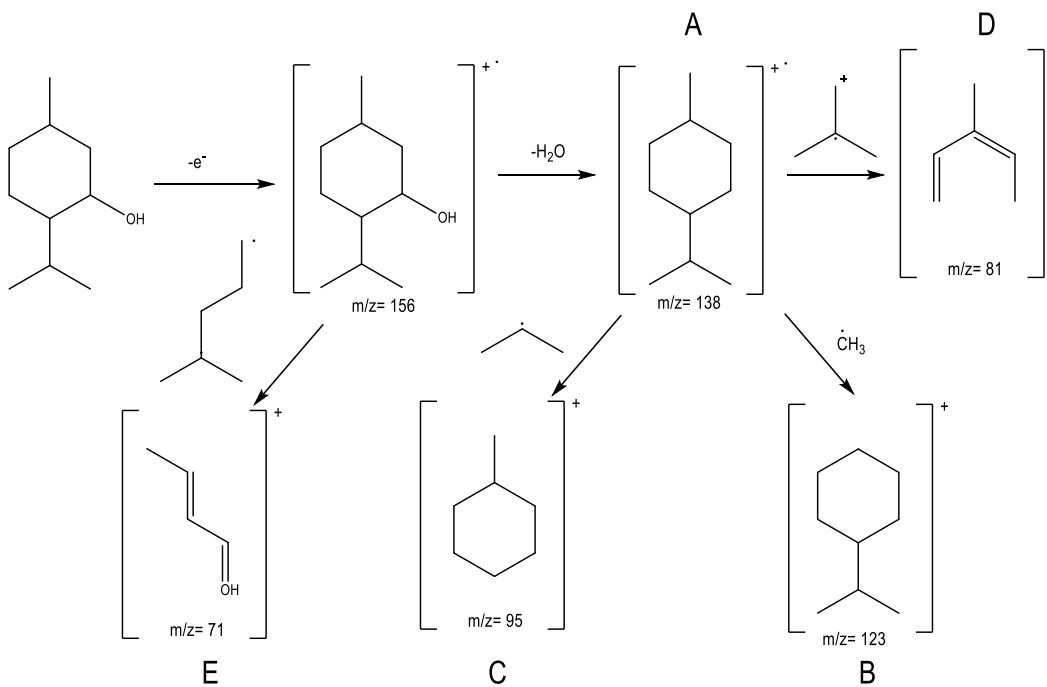
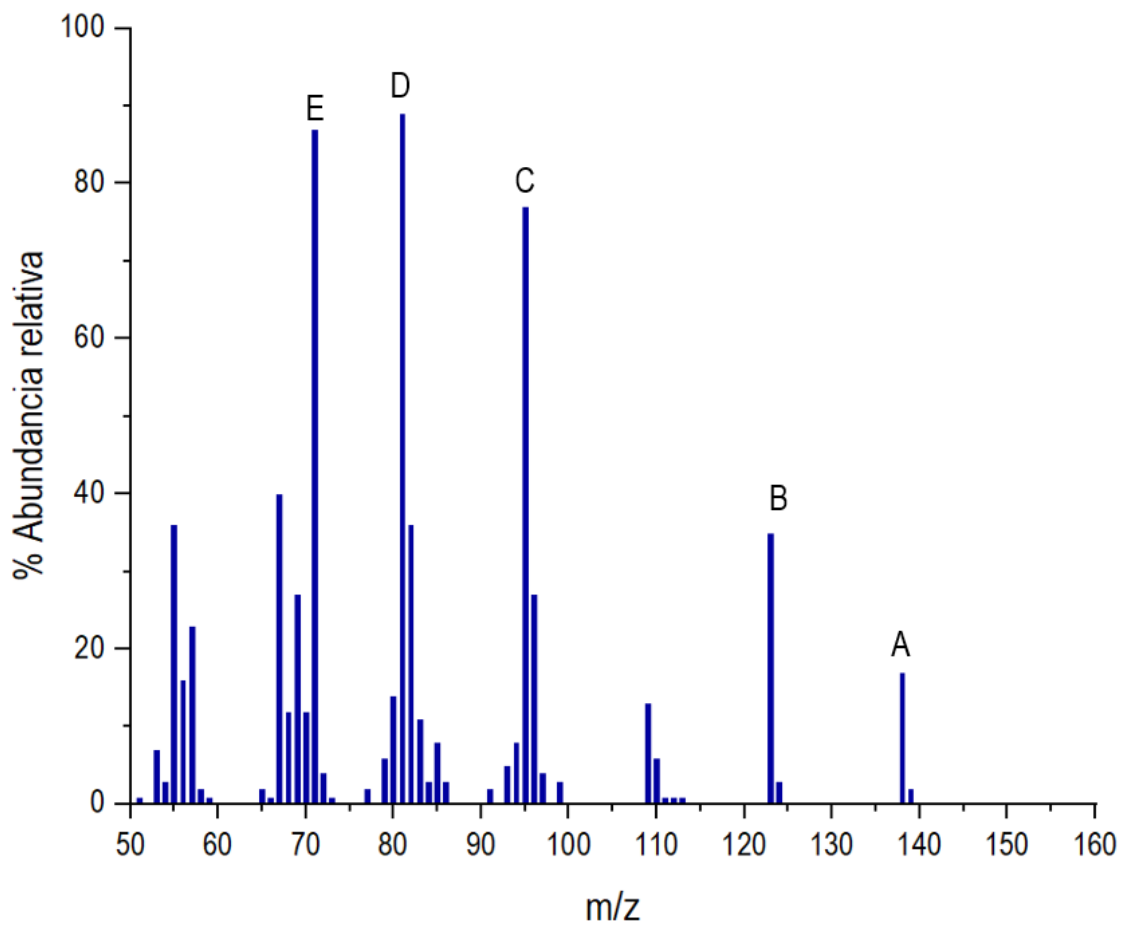
La diferencia en los tiempos de retención de los compuestos se debe a la masa molecular de cada uno, a mayor peso molecular se espera mayor tiempo de retención, ya que se favorece una mayor interacción con la fase estacionaria de la columna; así, si el mentol tiene un peso molecular de 156.26 g/mol, el lactato de mentilo 228.33 g/mol y el MLL uno de 301.19 g/mol, la interacción va a hacer menor para el mentol.



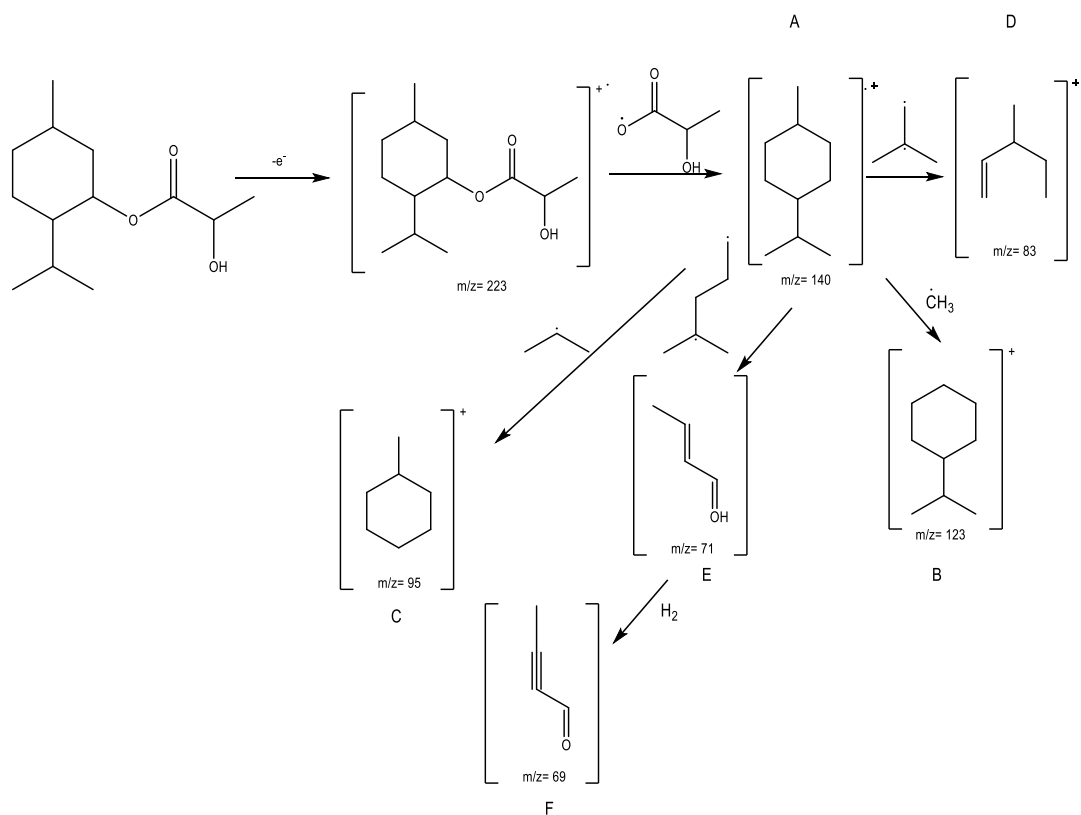
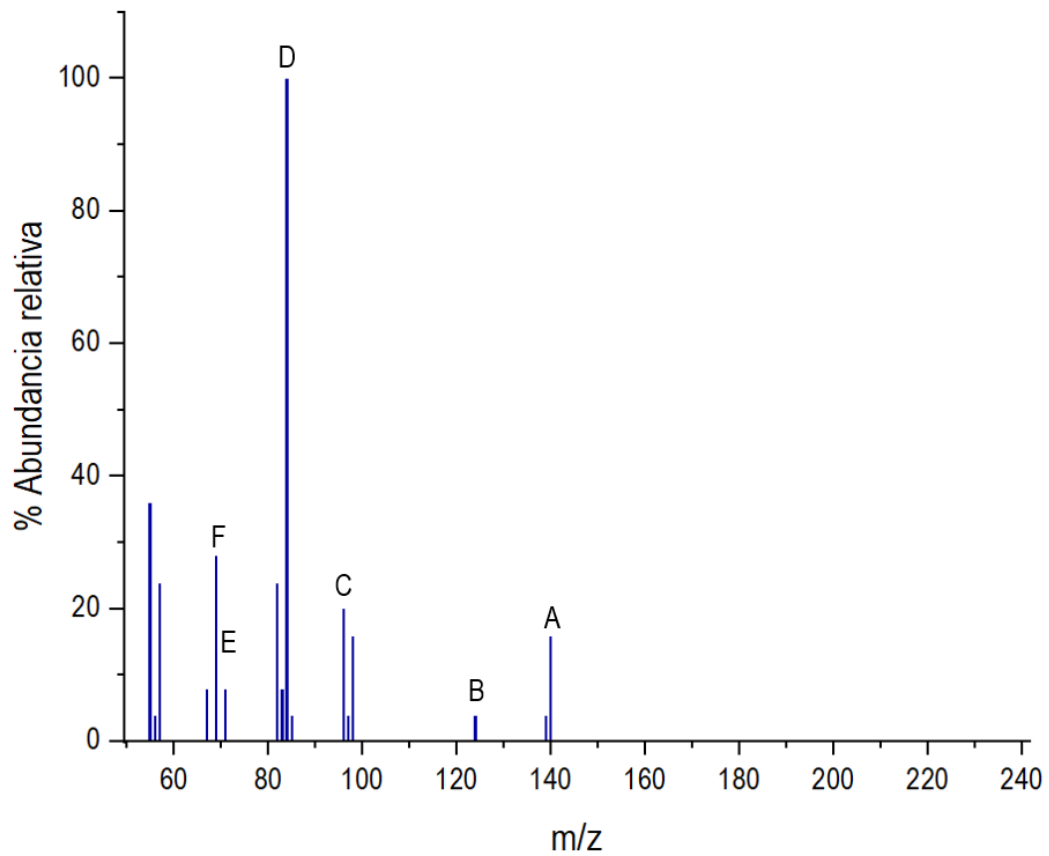
**Figura 20.** Cromatograma de crudo de reacción.

#### 7.4. ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

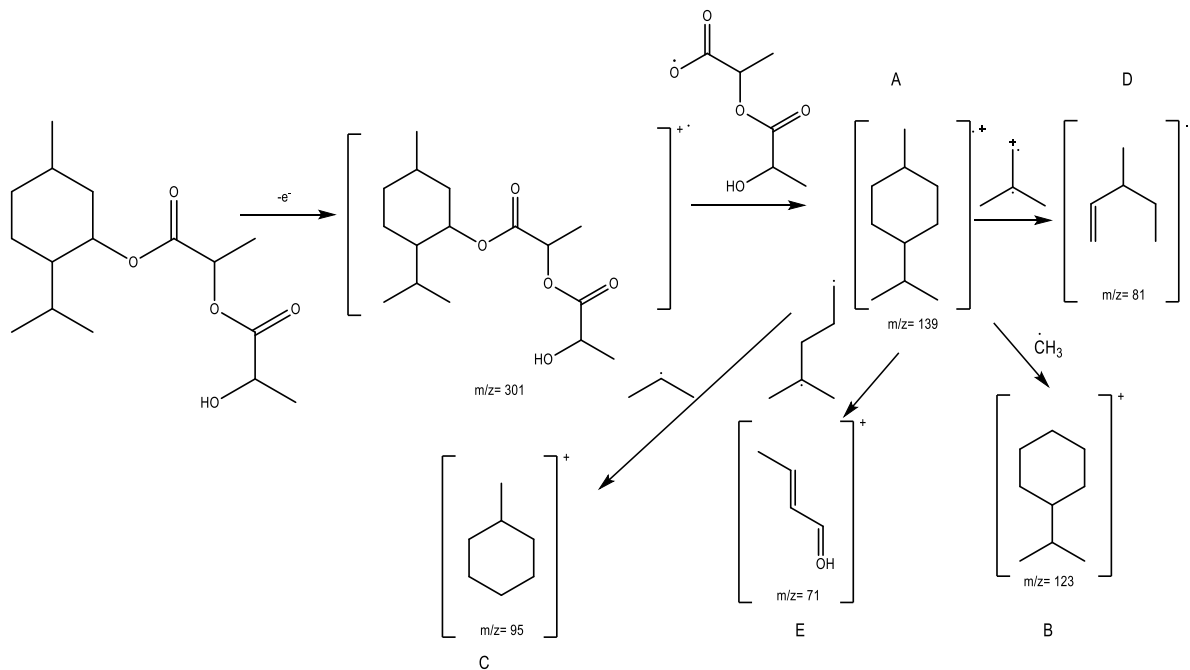
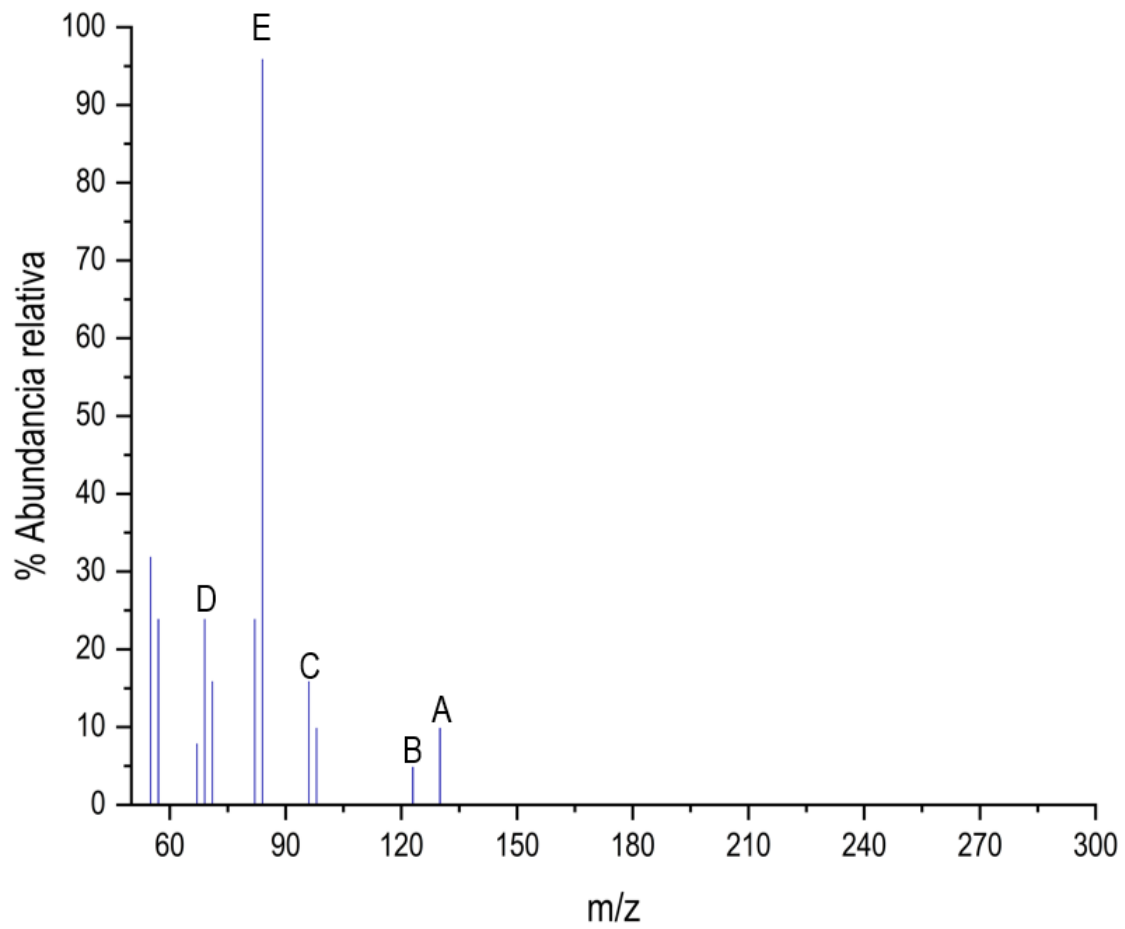
Cada una de la señal cromatográfica obtenidas, presentan un fragmentograma. Para el mentol, lactato de mentilo y el subproducto se presenta en los esquemas 12,13 y 14. La adquisición de datos se realizó en un rango de 50 hasta 400 m/z, debido a que es el rango en el que se encuentra el producto de reacción y el derivado.



Esquema 12. Patrón de fragmentación del mentol



Esquema 13. Patrón de fragmentación del lactato de mentilo



Esquema 14. Patrón de fragmentación del subproducto (MLL)



## 7.5. RESPUESTAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo principal del diseño experimental fue conocer las mejores condiciones de reacción para obtener la mayor conversión, selectividad y rendimiento del lactato de mentilo. Del mismo modo evalúa las interacciones que existen en el proceso de síntesis mencionada para cada experimento (tabla 5). Se plantea el diseño experimental DBB/SR, en la aplicación Minitab Statistical Software se presenta en la tabla 6. El porcentaje de enzima se definió con referencia en la cantidad de mentol adicionado según la investigación de Shih I et al<sup>54</sup>, ya que en el diseño se contempla el exceso de mentol en relación con el ácido láctico, debido a que el mentol presenta mezcla enantiomérica.

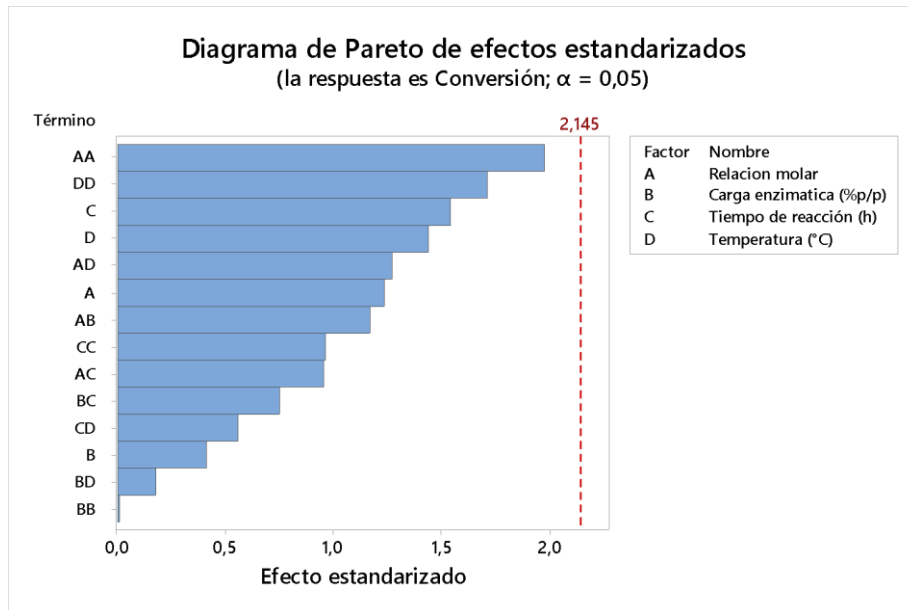
En la tabla 7 se presentan la respuesta del diseño experimental aplicado para la síntesis, para la conversión se analiza a partir del consumo de mentol; la selectividad hace referencia a la producción exclusiva de lactato de mentilo y el rendimiento a la obtención del producto por aplicación de las ecuaciones 1, 2 y 3.

**Tabla 7.** Respuesta del diseño experimental.

Experimento	Conversión (%)	Selectividad (%)	Rendimiento (%)
1	45.491	2.864	2.035
2	45.127	2.856	2.014
3	43.252	2.993	26.257
4	45.828	1.408	1.008
5	44.032	1.302	0.896
6	62.238	1.143	2.137
7	61.905	1.906	1.844
8	21.779	1.585	6.860
9	27.884	3.095	8.634
10	7.190	0.836	1.827
11	26.158	1.296	10.207
12	44.090	1.170	0.806
13	19.775	0.697	2.765
14	53.037	0.275	0.228
15	44.538	0.548	7.334
16	25.398	0.715	5.509
17	12.014	5.542	13.253
18	23.575	1.965	9.327
19	26.814	2.843	15.133
20	39.913	1.696	1.058
21	19.537	0.714	2.818
22	15.784	0.476	1.510
23	35.590	2.623	18.666
24	24.666	2.339	11.569
25	10.762	0.869	2.787
26	28.357	1.368	7.792
27	7.192	1.573	0.177
28	20.040	2.969	12.000

29	31.020	1.119	6.962
----	--------	-------	-------

En el análisis de varianza del porcentaje de conversión se tiene en cuenta que para que un término sea significativo el valor p debe ser  $p \leq 0.05$ . El modelo lineal del porcentaje de conversión arrojó un valor  $p=0.192$ , es decir, que ningún factor presentó un efecto significativo. Esto se puede explicar a que el mentol que se usó presentaba una mezcla de isómeros, por lo cual la conversión no supera el 65%, así mismo, el modelo cuadrado y de interacciones de 2 factores no presenta valores significativos ( $p=0.140$  y  $p=0.653$ ). Sin embargo, la interacción AA es la más cerca con  $p=0.068$  y se estimaría que si se usara (L) mentol se podría tener una mayor conversión (Figura 21)



**Figura 21.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para conversión

Para la selectividad (Figura 22), el factor de temperatura presentó un efecto significativo ( $p=0.020$ ), el modelo cuadrático la interacción de relación molar al cuadrado  $(RM)^2$  también presentó un valor significativo ( $p=0.011$ ) al igual que la interacción de 2 factores carga enzimática- tiempo de reacción ( $p=0.016$ ). La Figura 23 muestra el tipo de efecto que presenta cada una de las interacciones, donde los valores a la derecha del cero presentan efectos positivos, mientras que los valores a la izquierda son negativos. La temperatura mostró un efecto positivo, indicando que el aumento de la temperatura aumenta la selectividad, mientras que  $RM^2$  y carga enzimática con el tiempo de reacción disminuyen la selectividad, es decir a mayor relación molar, mayor carga enzimática y tiempo, la selectividad del lactato de mentilo disminuirá (Figura 24).

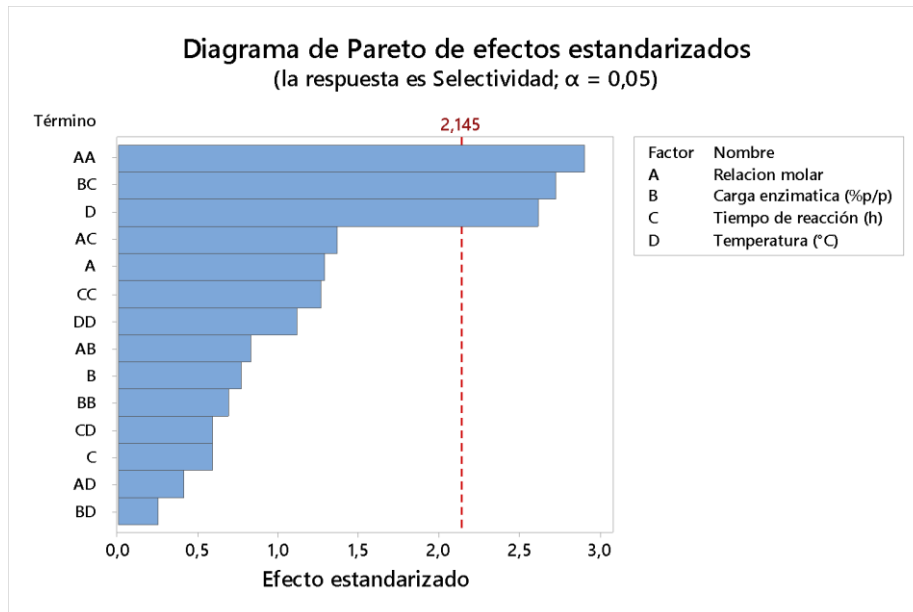


Figura 22. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para selectividad

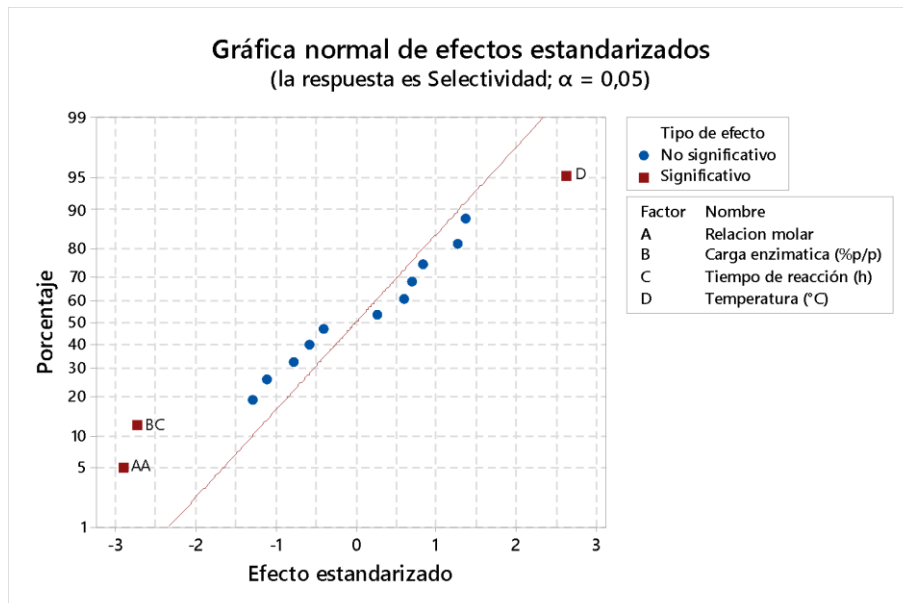
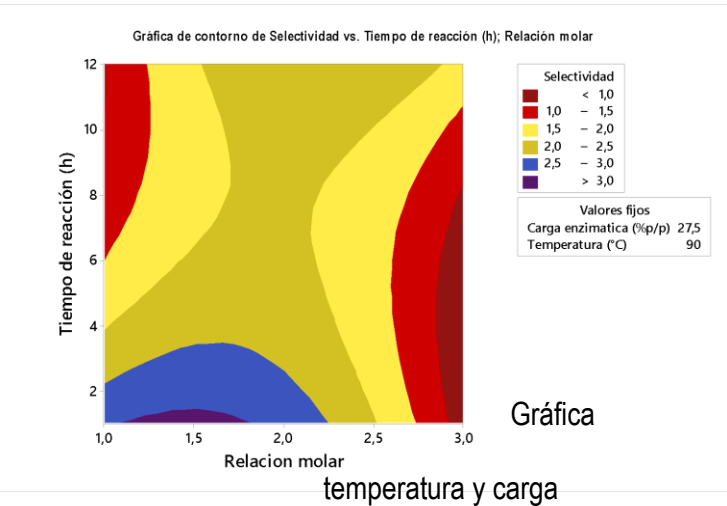
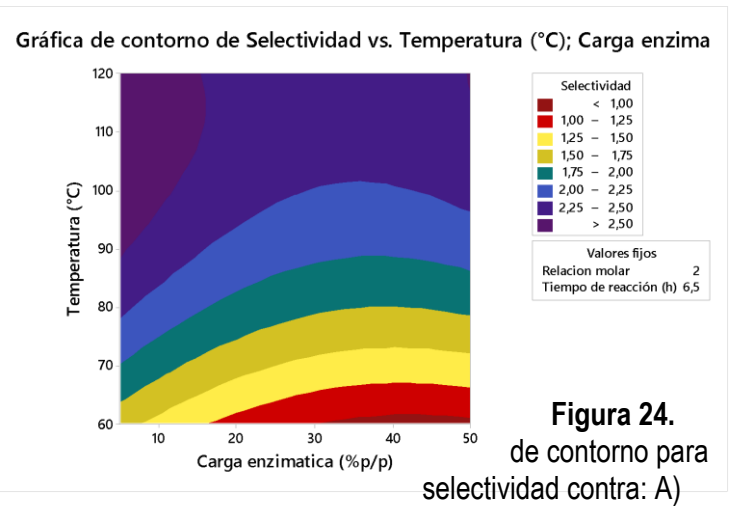
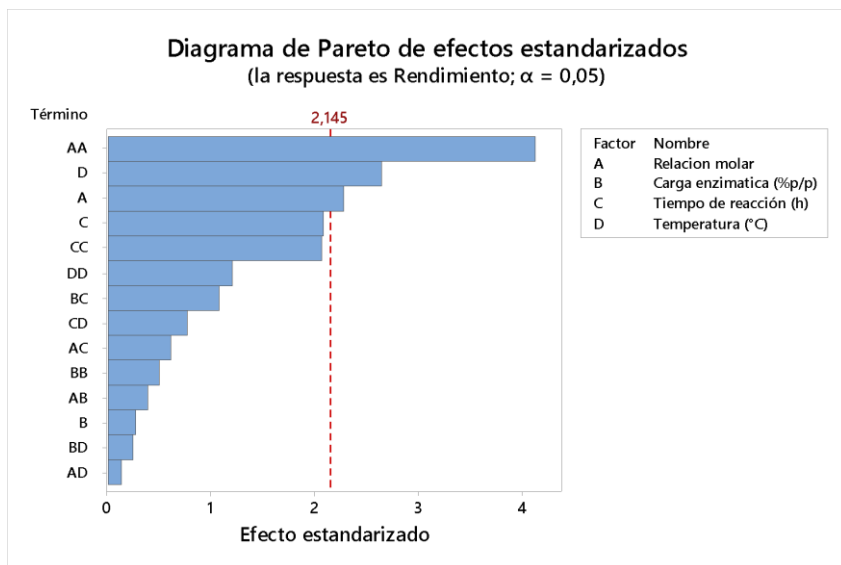


Figura 23. Gráfico normal de efectos estandarizados para selectividad



**Figura 24.** de contorno para selectividad contra: A) enzimática, B) tiempo de reacción y relación molar temperatura y carga

El análisis de varianza para el rendimiento se presenta en la Figura 25. Los factores temperatura ( $p=0.006$ ) y relación molar ( $p=0.001$ ) presentaron efectos estadísticamente representativos. En la Figura 26 se observa que la temperatura y la relación molar afectan de manera positiva. El aumento de la relación molar y la temperatura favorecen el rendimiento de la reacción ya que a mayor cantidad de mentol disponible disminuye la probabilidad de generar subproductos de polimerización del ácido láctico, además, es de aclarar que no todo el mentol reaccionara, solo la proporción del isómero L. Si la proporción de mentol efectivo (isómero L) es menor al ácido láctico se genera la polimerización del lactato como se observa en la Figura 20 y esquema 11. El gráfico de contorno permite ver el efecto de estas variables, ver la Figura 27.



**Figura 25.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para rendimiento

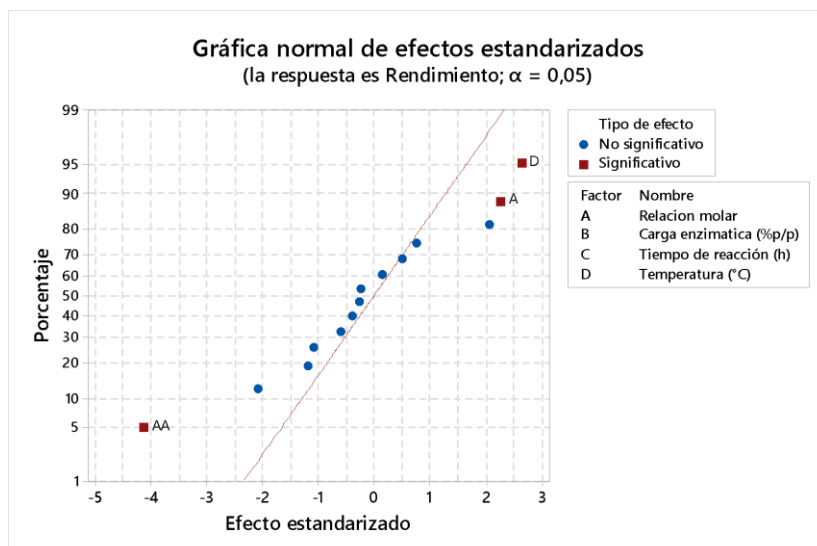


Figura 26. Gráfico normal de efectos estandarizados para rendimiento

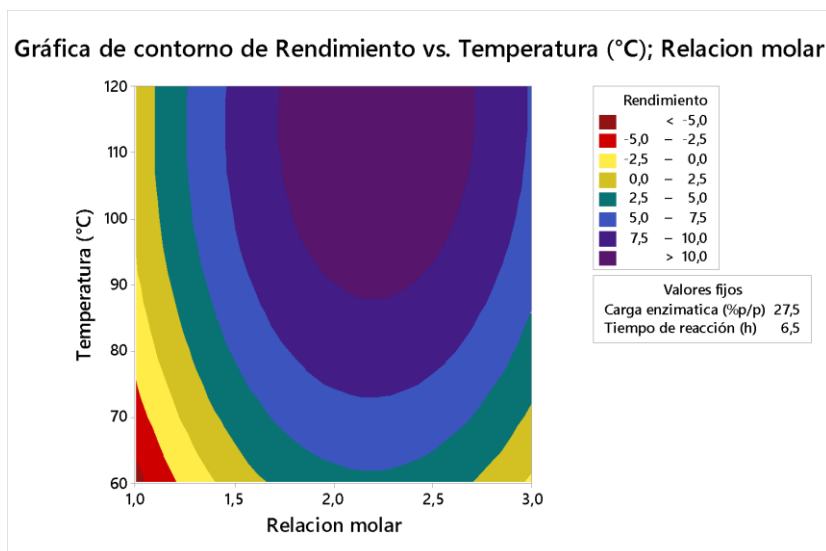


Figura 27. Gráfica de contorno para rendimiento contra temperatura y relación molar

## 7.6.CICLOS DE USO DE LA ENZIMA

Para la optimización del método mediante la predicción del software se toman las siguientes condiciones para la maximización de todas las respuestas según la tabla 8 y la Figura 28.

Tabla 8. Condiciones óptimas para la síntesis

	Relación molar** (M/AL)	Carga enzimática*(%)	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (°C)
<b>Alto</b>	3	50	12	120
<b>Optimo</b>	2.3	25	1	90
<b>Bajo</b>	1	5	1	60

\* Porcentaje peso de enzima / peso del mentol

\*\*Relación M/AL: Relación molar entre M(mentol):AL(Ácido láctico)

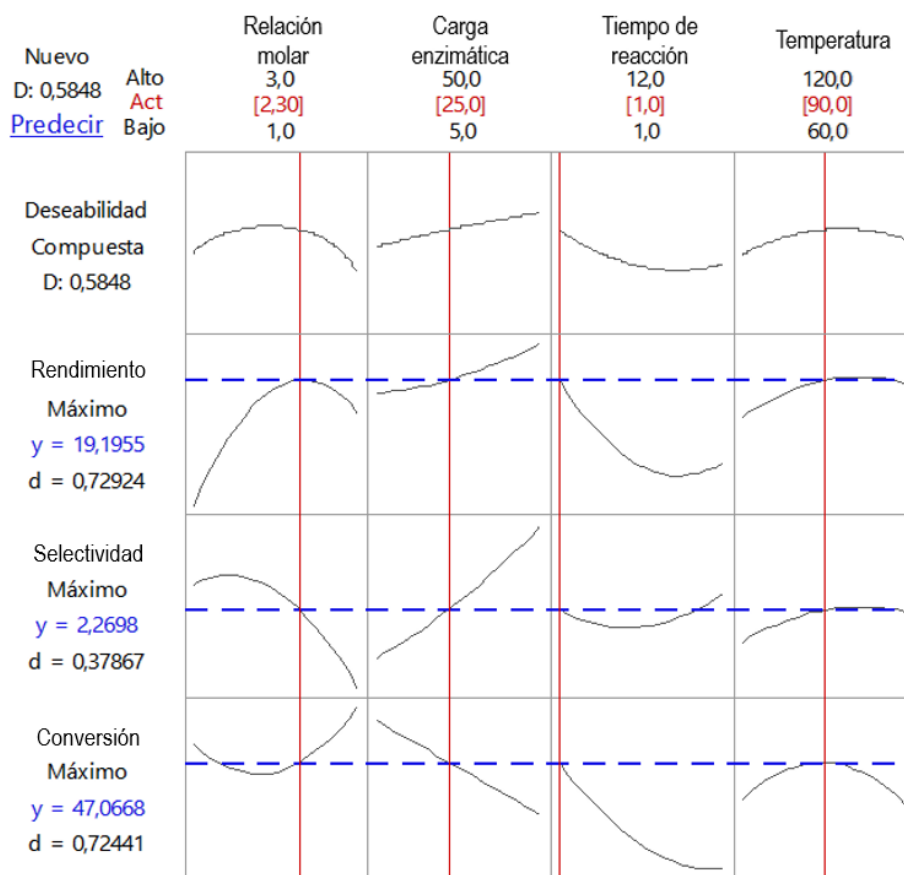


Figura 28. Gráfico de deseabilidad

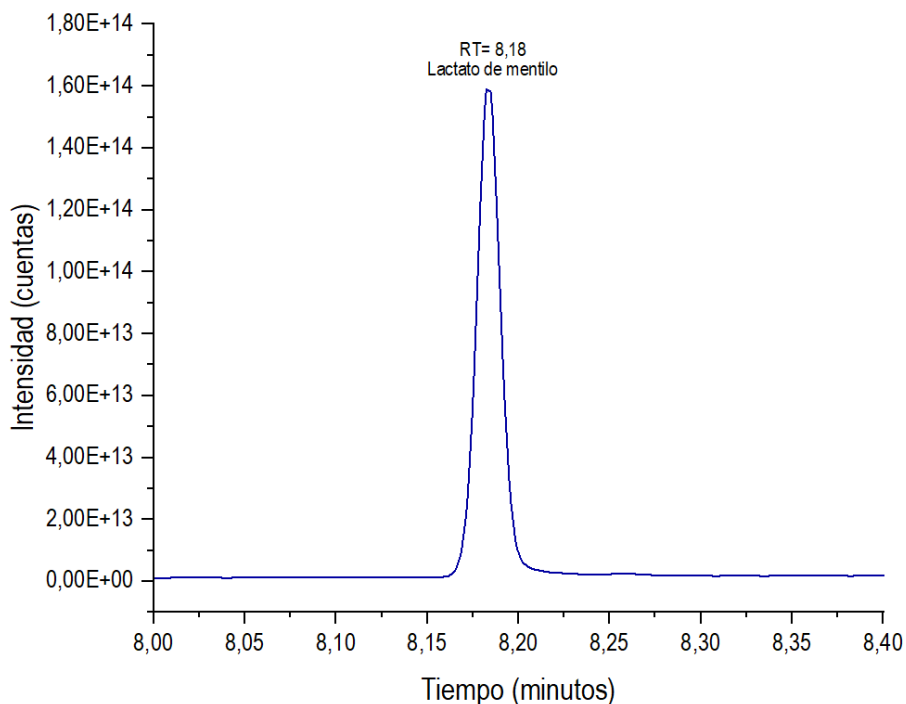
En la tabla 9 se presentan las respuestas a las condiciones óptimas por octuplicado. La lipasa inmovilizada Novozym 435® tras utilizarse en la reacción en 8 ciclos sucesivos tiene la posibilidad de recuperarse y acondicionarse nuevamente para su uso. La posibilidad de reusar un catalizador en la industria es de gran interés puesto que disminuye los costos asociados a la producción de los reactivos. La síntesis del lactato de mentilo en 8 ciclos sucesivos, se llevó a cabo con reactivos comerciales y mostraron valores prometedores en función de las respuestas del diseño, en el último ciclo realizado presenta una conversión de 58.18%. Una selectividad del 19.77% y un rendimiento del 53.687%.

Tabla 9. Ciclos sucesivos de la enzima para la síntesis en condiciones óptimas

Ciclo	Conversión	Selectividad	Rendimiento
1	64.528	19.338	64.611
2	63.492	19.297	63.466
3	62.346	19.280	62.623
4	61.948	19.987	62.016
5	60.720	19.298	60.309
6	60.597	19.956	58.237
7	58.458	19.260	57.198
8	58.183	19.774	53.687

## 7.7. ANÁLISIS POLARIMÉTRICO

La Novozym 435® presenta una enantioselectividad hacia los enantiómeros R o en este caso isómero L (Cabrera et al en el 2009<sup>55</sup>). Los experimentos de cada ciclo realizado son sometidos a purificación mediante una hidrólisis controlada para eliminar la presencia del subproducto para el análisis de polarimetría, como se registra en la Figura 29.



**Figura 29.** Cromatograma de enriquecimiento del lactato de mentilo

En la tabla 10 se presentan los resultados de la rotación óptica del mentol comercial, (L)-mentol y (LL)-lactato de mentilo. Se observó que la mezcla de isómeros presenta una pureza óptica del 65% del enantiómero L del mentol. Esta pureza óptica está relacionada a la máxima conversión obtenida en la tabla 9 que fue de 64.528%, y en términos del isómero L, la conversión fue del 99.07%. La Figura 30 relaciona los ciclos de usos vs. el exceso enantiomérico.

**Tabla 10.** Rotación óptica, pureza óptica y exceso enantiomérico

	<b>Rotación específica</b>	<b>% Pureza óptica</b>	<b>% exceso enantiomérico</b>
<b>Mentol comercial</b>	-34.5°	65.13*	30.26*
<b>(L)-Mentol</b>	-53 °	-	-
<b>(L)-Lactato de (L)-mentilo</b>	-75.6°	-	-
<b>Lactato de mentilo**</b>	-75.2	99.47*	98.94*

\*Valor de referencia del enantiómero L

\*\*Producto de síntesis purificado

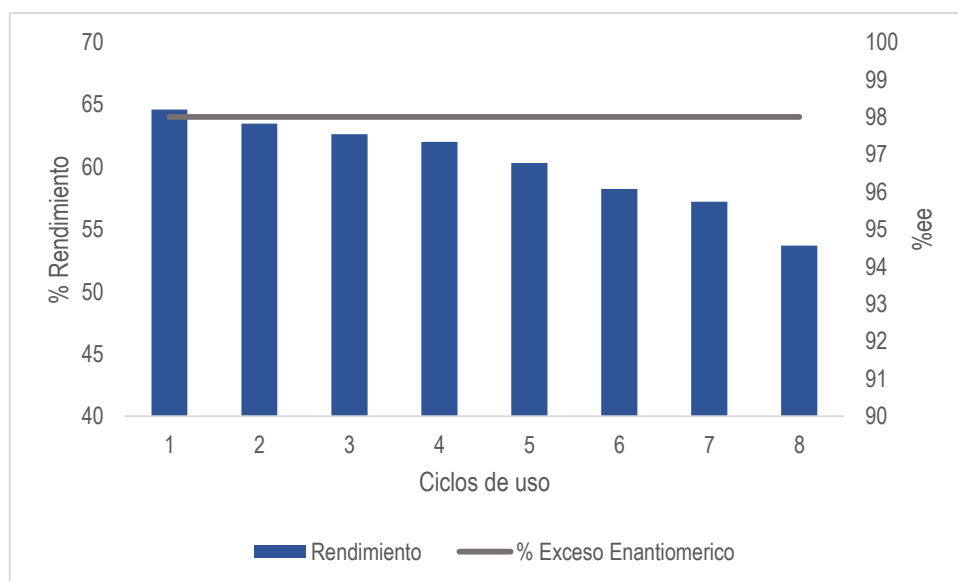


Figura 30. Gráficas de barra entre el ciclo de uso y exceso enantiomérico

## 7.8.EVALUACIÓN DE CRITERIOS: QUÍMICA VERDE

Los criterios para evaluar el proceso de síntesis propuesto respecto a la química verde y sus doce principios, es importante aclarar que no hay unas métricas establecidas que agrupen todos los factores, sin embargo, para esta investigación se toma como referencia la eco-escala (ecoscale), que aborda el criterio económico y ecológico. Los criterios de dicha métrica se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Criterios de la Ecoscale<sup>56</sup>

Parámetro	Puntos De Penalización
<b>1) Rendimiento</b>	$(100 - \% \text{ rendimiento}) / 2$
<b>2) Precios de los componentes de la reacción para obtener 10 mmol de producto final</b>	
Barato	0
Caro	3
Muy caro	5
<b>3) Seguridad<sup>a</sup></b>	
N (peligroso para el medio ambiente)	5
T (toxico)	5
F (altamente inflamable)	5
E (explosivo)	10
F+ (extremadamente inflamable)	10
T+ (extremadamente toxico)	10
<b>4) Configuración técnica</b>	
Configuración común	0



Instrumentos Para La Adición Controlada De Químicos <sup>b</sup>	1
Técnica De Activación No Convencional <sup>c</sup>	2
Presión a >1 atm <sup>d</sup>	3
Cualquier cristalería especial adicional	1
Atmósfera inerte	1
Guantera	3
<b>5) Tiempo/ temperatura</b>	
Temperatura Ambiente < 1h	0
Temperatura ambiente <24 h	1
Calefacción <1h	2
Calefacción < 2h	3
Enfriamiento A 0°C	4
Enfriamiento < 0°C	5
<b>6) Tratamiento y purificación</b>	
Ninguna	0
Enfriamiento a temperatura ambiente	0
Añadiendo disolvente	0
Fracción sencilla	0
Eliminación de disolvente con pb <150 °c	0
Cristalización y filtración	1
Eliminación de disolvente con pb >150 °c	2
Extracción en fase sólida	2
Destilación	3
Extracción líquido-líquido	3
Cromatografía líquida	3

<sup>a</sup> Basado en los símbolos de advertencia de peligro. <sup>b</sup> Embudo de goteo, bomba de jeringa, regulador de presión de gas, etc. <sup>c</sup> Irradiación por microondas, activación por ultrasonido o fotoquímica, etc. <sup>d</sup> sc CO<sub>2</sub>, equipo de hidrogenación de alta presión, etc. <sup>e</sup> Sí corresponde, el proceso incluye secado del solvente con desecante y filtración del desecante.

La sumatoria total de las penalizaciones se sustituye en la siguiente ecuación para determinar que puntaje tiene el proceso.

$$Ecoscale = (100 - \text{sumatoria de penalizaciones})$$

#### **Ecuación 7. Determinación de ecoscale**

Para este proceso se tiene en cuenta los resultados de las condiciones óptimas dado que la finalidad de este proceso es evaluar a posteriori su factibilidad a escala industrial. Los reactivos usados son comerciales de fácil adquisición, bajo costo, para obtener la mayor rentabilidad en la comercialización del producto final. A continuación, se presentan los criterios que aplicados al proceso:

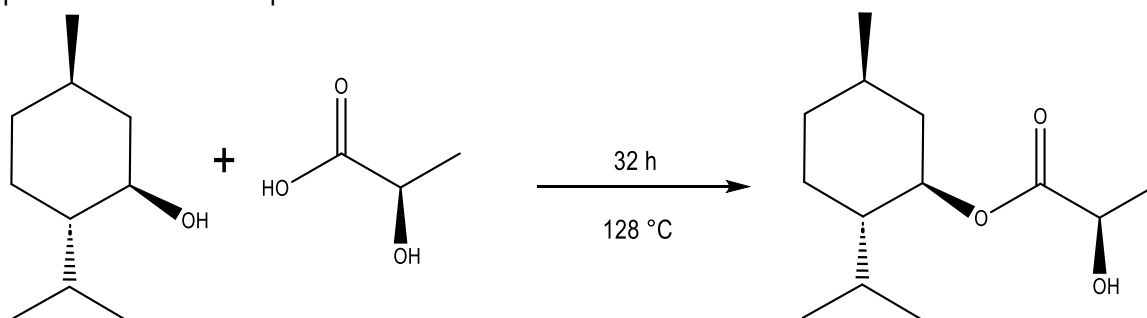
**Tabla 12.** Ecoscale para el proceso de síntesis

Parámetro	Puntos De Penalización
1) Rendimiento	(100- 64) /2
2) Precios de los componentes de la reacción para obtener 10 mmol de producto final	0
3) Seguridad <sup>a</sup>	0
4) Configuración técnica	0
5) Tiempo/ temperatura	
Calefacción <1h	2
6) Tratamiento y purificación	1
<b>Puntos totales de penalización</b>	<b>21</b>

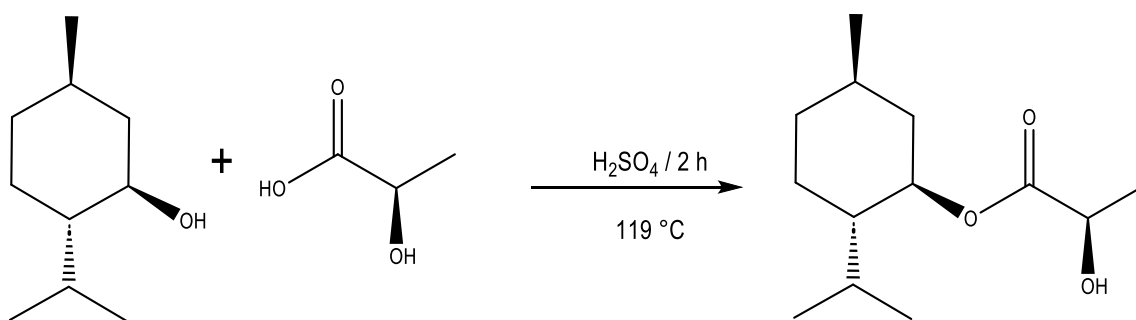
$$Ecoscale = (100 - 21) = 79$$

El proceso desarrollado se puede catalogar con una alta afinidad a los criterios considerados en la ecoscale. Su factibilidad de implementación a escala industrial podría ser valorada y se esperaría poca repercusión en el ambiente, además de la promoción de un bajo riesgo para la salud de las personas expuestas al proceso y del consumidor.

La patente desarrollada por Erman et al<sup>57</sup> reporta diversos métodos, de las cuales se tiene en cuenta dos de ellas para realizar la comparación con el método desarrollado en esta investigación. Se resalta que puede existir omisión de información por parte de los investigadores de dicha patente por lo que la aplicación de los criterios de la ecoscale podría incluir imprecisiones. En el método 1, los autores reportan el uso de un balón de 3 bocas, con una trampa Barret, hace uso de heptano como solvente y los reactivos de partida, son isómeros puros, sumado a ello se aplica una temperatura de 128 °C por 32 horas (ver esquema 15). Para el método 2 utilizaron el mismo sistema de reacción y reactivos similares, sin embargo, emplearon el ácido sulfúrico como catalizador, reduciendo el tiempo de reacción a 2 horas bajo una temperatura de 119 °C ((ver esquema 16); ambos métodos reportan un proceso de purificación similar al desarrollado en esta investigación. En la tabla 13 se presentan los parámetros evaluados para los dos métodos descritos anteriormente



Esquema 15. Método 1 para síntesis de lactato de mentilo según Erman<sup>57</sup>



Esquema 16. Método 2 para síntesis de lactato de mentilo según Erman<sup>57</sup>

Tabla 13. Ecoscale para el proceso de Erman et al<sup>57</sup>

Parámetro	Puntos De Penalización	
	Método 1	Método 2
1) Rendimiento	(100- 67.7) /2	(100- 57.6) /2
2) Precios de los componentes de la reacción para obtener 10 mmol de producto final	3	3
3) Seguridad <sup>a</sup>	0	5
4) Configuración técnica	1	1
5) Tiempo/ temperatura		
Calefacción >2h / Calefacción <2h	10	2
6) Tratamiento y purificación	1	1
Puntos totales de penalización	31.15	33.2

Método 1:

$$Ecoscale = (100 - 31.15) = 68.85$$

Método 2:

$$Ecoscale = (100 - 33.2) = 66.8$$

Al comparar la metodología desarrollada en esta investigación y la reportada en la patente se resaltan las siguientes ventajas en la tabla 14:

Tabla 14. Comparación de las variables de reacción por metodología

Parámetro	Metodologías		
	Esta investigación	Método 1	Método 2
Rendimiento	64%	67.7%	57.6%
Precio de reactivos de partida	Menor costo	Mayor costo	Mayor costo
Seguridad	Alta	Baja	Baja
Equipamiento	Básica	Complementos adicionales*	Complementos adicionales*
Tiempo/ temperatura	1 h /90°C	32 h/ 128 °C	2h /119 °C

<b>Tratamiento y purificación</b>	Hidrolisis controlada	Hidrolisis controlada	Hidrolisis controlada
-----------------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

\*Requiere material adicional (trampa Barret)

La metodología propuesta en esta investigación resulta ventajosa dado que emplea sustancias de menor costo, menores tiempo de reacción y temperatura respecto a lo reportado por Erman et al<sup>57</sup>; así como, propone la eliminación de sustancias auxiliares y el uso de equipamiento básico, y con ello, promueve la producción de lactato de mentilo a mayor escala con un menor costo de producción.

## 8. APLICACIONES

Los solventes de DES de precursores naturales como el mentol y el ácido láctico se denominan NADES<sup>58</sup>, Delgado Rodríguez reporta el uso de NADES para la extracción de cannabinoides. La mezcla de reacción presentó las características físicas de ser un líquido a temperatura ambiente, así que se puede usar como solventes DES para las extracciones verdes de analitos polares de plantas. Mediante el uso de metodología de síntesis se puede obtener diferentes NADES según las necesidades. Por ejemplo, la mezcla entre los analitos del cannabis y un solvente de este tipo, al no ser tóxicos, podrían usarse para la fabricación de ungüentos.

Esta metodología puede ser útil para la separación de la mezcla de isómeros del mentol, puesto que permite un enriquecimiento del isómero D. La incorporación del lactato de mentilo en productos cosméticos, ofrece las ventajas del ácido láctico (renovación celular, eliminación de células muertas, retención de hidratación) y el mentol (sensación de frescura, analgésico suave) útiles para la fabricación de cremas hidratantes, enjuagues bucales otorgando la sensación de frescura prolongada.

## 9. CONCLUSIONES

Se realizó la optimización del proceso de síntesis con ayuda del DBB encontrando que las mejores condiciones para la maximización de las respuestas fueron: Tiempo=1h, Carga enzimática= 25%, Relación molar= 2.3 y Temperatura= 90 °C, generando una conversión máxima del 64.53 %, una selectividad del 19.34% y un rendimiento de 64.11%.

En el diseño experimental Box-Behnken no se encontró que los factores (temperatura, tiempo, carga enzimática, relación molar) hubiesen aportado en términos de conversión. Sin embargo, la relación  $RM^2$  presentó un valor  $p=0.068$  afectando esta respuesta de manera positiva. Para la selectividad se determinó que  $RM^2$  y el tiempo de reacción afectaron de manera negativa la producción de lactato, mientras que la temperatura aumenta la concentración de lactato. Para el rendimiento se encontró que el factor tiempo de reacción no garantiza mayor rendimiento de reacción, mientras que la temperatura y la relación molar afectan de manera positiva la respuesta.

En la síntesis del lactato de mentilo se identificó la producción del subproducto denominado MLL, mediante espectrometría de masas, este fue eliminado en su totalidad mediante una hidrólisis básica controlada del crudo de reacción.

Se determinó que la enzima es estable hasta por 8 ciclos de uso continuos con un rendimiento de 64%. El exceso enantiomérico del producto es mayor al 98%, por lo cual se puede garantizar que la enzima presentó selectividad hacia el isómero L y el 2% de exceso enantiomérico se atribuye a impurezas.

Aplicando la métrica de ecoscale al proceso a escala de laboratorio de síntesis de lactato de mentilo se estimó un puntaje de 79, que comparado con las metodologías reportadas por Erman et al<sup>57</sup>, resulta ser más eficiente y económico. Por tanto, se concluye, que el método desarrollado en la presente investigación promueve el cumplimiento de los criterios de la química verde.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jin, J. Z.; Sun, N. B. Esterification of Menthol and Lactic Acid by Silicotungstic Acid Catalyst Supported on Bentonite. *Adv Mat Res* **2013**, 634–638 (1), 647–650. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.634-638.647>.
- (2) Sun, J.; Ding, C.; Zheng, J. Y.; Yu, X. J.; Zhao, M.; Wang, Z. Improved Enantioselective Esterification of DL-Menthol Catalyzed by Immobilized TL 100L Lipase. *J Mol Catal B Enzym* **2016**, 133, S271–S276. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.01.013>.
- (3) Díaz-Castillo, J. P.; Jhoana, H.; Giraldo, M.; Fernández Rodríguez, J. F.; Fernando, M.; Castro, S.; Suarez, Ó. J.; Mier, H.; Estefanía, K.; Méndez, L.; Pablo Díaz-Castillo, J. Supervisión y Coordinación GQSP Colombia-Programa de Calidad Para La Cadena Química.
- (4) Ministerio de Comercio Industria y Turismo. *Informe de Importaciones y Balanza Comercial de Colombia*; 2021.
- (5) Api, A. M.; Belsito, D.; Botelho, D.; Browne, D.; Bruze, M.; Burton, G. A.; Buschmann, J.; Dagli, M. L.; Date, M.; Dekant, W.; Deodhar, C.; Francis, M.; Fryer, A. D.; Joshi, K.; La Cava, S.; Lapczynski, A.; Liebler, D. C.; O'Brien, D.; Parakhia, R.; Patel, A.; Penning, T. M.; Ritacco, G.; Romine, J.; Salvito, D.; Schultz, T. W.; Sipes, I. G.; Thakkar, Y.; Theophilus, E. H.; Tiethof, A. K.; Tokura, Y.; Tsang, S.; Wahler, J. RIFM Fragrance Ingredient Safety Assessment, l-Menthyl Lactate, CAS Registry Number 59259-38-0. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, 115 (October 2017), S61–S71. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.041>.
- (6) Autino, J. C.; Romanelli, G.; Ruiz, D. M. *Introducción a La Química Orgánica*; 2013.
- (7) Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M. *Principios de Bioquímica*; Omega, 2009.
- (8) Cornejo Arteaga, P. M. de L. Principales Aplicaciones de Los Ésteres. *BOLETÍN CIENTÍFICO* **2017**, 4 (7).
- (9) SÁ, A. G. A.; Meneses, A. C. de; Araújo, P. H. H. de; Oliveira, D. de. A Review on Enzymatic Synthesis of Aromatic Esters Used as Flavor Ingredients for Food, Cosmetics and Pharmaceuticals Industries. *Trends Food Sci Technol* **2017**, 69, 95–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>.
- (10) Polaina, Julio.; MacCabe, A. P. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*; Springer, 2007.
- (11) Liu, G.; Huang, L.; Lian, J. Alcohol Acyltransferases for the Biosynthesis of Esters. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* **2023**, 16 (1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02343-x>.
- (12) Godoy, L.; Acuña-Fontecilla, A.; Catrileo, D. Formation of Aromatic and Flavor Compounds in Wine: A Perspective of Positive and Negative Contributions of Non-Saccharomyces Yeasts. In *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*; Cosme, F., Nunes, F. M., Filipe-Ribeiro, L., Eds.; IntechOpen: Rijeka, 2020; p Ch. 4. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92562>.
- (13) Bommarius, A. S. (Andreas S.; Riebel, B. R. (Bettina R.). *Biocatalysis*; Wiley-VCH, 2004.
- (14) Villavicencio Romero, D. J. Síntesis De Polímeros De Xilitol Y Ácido Succínico Por Condensación Enzimática Con Novozym® 435, Universidad del Cauca, Popayán, 2018.
- (15) Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem Rev* **2016**, 116 (4), 2307–2413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00472>.
- (16) Liu, S. Enzymes. In *Bioprocess Engineering*; Elsevier, 2017; pp 297–373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1>.

- (17) Anastas, P. T.; Bartlett, L. B.; Kirchoff, M. M.; Williamson, T. C. The Role of Catalysis in the Design, Development, and Implementation of Green Chemistry. *Catal Today* **2000**, *55* (1), 11–22. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00222-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00222-9).
- (18) Sousa, R. R.; Silva, A. S.; Fernandez-Lafuente, R.; Ferreira-Leitão, V. S. Solvent-Free Esterifications Mediated by Immobilized Lipases: A Review from Thermodynamic and Kinetic Perspectives. *Catal. Sci. Technol.* **2021**, *11* (17), 5696–5711. <https://doi.org/10.1039/D1CY00696G>.
- (19) Wong, H.; Schotz, M. C. The Lipase Gene Family. *J Lipid Res* **2002**, *43* (7), 993–999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.R200007-JLR200>.
- (20) Contesini, F. J.; Davanço, M. G.; Borin, G. P.; Vanegas, K. G.; Cirino, J. P. G.; de Melo, R. R.; Mortensen, U. H.; Hildén, K.; Campos, D. R.; Carvalho, P. de O. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts* **2020**, *10* (9), 1–33. <https://doi.org/10.3390/catal10091032>.
- (21) Salihi, A.; Alam, Md. Z. Solvent Tolerant Lipases: A Review. *Process Biochemistry* **2015**, *50* (1), 86–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>.
- (22) Arroyo, D. M. *Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones Immobilized Enzymes: Theory, Methods of Study and Applications*; 1998; Vol. 39.
- (23) Melo, L. L. M. M.; Pastore, G. M.; Macedo, G. A. Optimized Synthesis of Citronellyl Flavour Esters Using Free and Immobilized Lipase from *Rhizopus* Sp. *Process Biochemistry* **2005**, *40* (10), 3181–3185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.019>.
- (24) Domínguez de María, P.; Carboni-Oerlemans, C.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R. Biotechnological Applications of *Candida Antarctica* Lipase A: State-of-the-Art. *J Mol Catal B Enzym* **2005**, *37* (1), 36–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.09.001>.
- (25) He, L.; Sun, J.; Xu, Y.; Sun, Z.; Zheng, C. Novozyme 435-Catalyzed Efficient Acylation of 3-n-Butylphthalide in Organic Medium. *Prep Biochem Biotechnol* **2008**, *38* (4), 376–388. <https://doi.org/10.1080/10826060802325501>.
- (26) Pätzold, M.; Weimer, A.; Liese, A.; Holtmann, D. Optimization of Solvent-Free Enzymatic Esterification in Eutectic Substrate Reaction Mixture. *Biotechnology Reports* **2019**, *22*, e00333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00333>.
- (27) Martins, A. B.; da Silva, A. M.; Schein, M. F.; Garcia-Galan, C.; Záchia Ayub, M. A.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. Comparison of the Performance of Commercial Immobilized Lipases in the Synthesis of Different Flavor Esters. *J Mol Catal B Enzym* **2014**, *105*, 18–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>.
- (28) Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym* **2010**, *62* (3), 197–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>.
- (29) Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor Miehei* as a Biocatalyst in Fats and Oils Modification. *J Mol Catal B Enzym* **2010**, *66* (1), 15–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008>.
- (30) García Galán, C. *Diseño De Biocatalizadores De Lipasas Y Su Aplicación En Bioprocesos*; Madrid, 2014.
- (31) Kuo, C.-H.; Chiang, S.-H.; Ju, H.-Y.; Chen, Y.-M.; Liao, M.-Y.; Liu, Y.-C.; Shieh, C.-J. Enzymatic Synthesis of Rose Aromatic Ester (2-Phenylethyl Acetate) by Lipase. *J Sci Food Agric* **2012**, *92* (10), 2141–2147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.5599>.
- (32) Kim, H.; Park, C. Enzymatic Synthesis of Phenethyl Ester from Phenethyl Alcohol with Acyl Donors. *Enzyme Microb Technol* **2017**, *100*, 37–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.004>.



- (33) Höck, H.; Engel, S.; Weingarten, S.; Keul, H.; Schwaneberg, U.; Möller, M.; Bocola, M. Comparison of *Candida Antarctica* Lipase B Variants for Conversion of  $\epsilon$ -Caprolactone in Aqueous Medium-Part 2. *Polymers (Basel)* **2018**, *10* (5). <https://doi.org/10.3390/polym10050524>.
- (34) Bandeira, P. T.; Thomas, J. C.; de Oliveira, A. R. M.; Piovan, L. Lipase-Mediated Kinetic Resolution: An Introductory Approach to Practical Biocatalysis. *J Chem Educ* **2017**, *94* (6), 800–805. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00606>.
- (35) Bansode, S. R.; Hardikar, M. A.; Rathod, V. K. Evaluation of Reaction Parameters and Kinetic Modelling for Novozym 435 Catalysed Synthesis of Isoamyl Butyrate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2017**, *92* (6), 1306–1314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.5125>.
- (36) Sun, S.; Shan, L.; Liu, Y.; Jin, Q.; Song, Y.; Wang, X. Solvent-Free Enzymatic Synthesis of Feruloylated Diacylglycerols and Kinetic Study. *J Mol Catal B Enzym* **2009**, *57* (1), 104–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.07.010>.
- (37) Gawas, S. D.; Jadhav, S. V.; Rathod, V. K. Solvent Free Lipase Catalysed Synthesis of Ethyl Laurate: Optimization and Kinetic Studies. *Appl Biochem Biotechnol* **2016**, *180*, 1428–1445.
- (38) Xiong, J.; Huang, Y.-J.; Zhang, H. Lipase-Catalyzed Transesterification Synthesis of Citronellyl Acetate in a Solvent-Free System and Its Reaction Kinetics. *European Food Research and Technology* **2012**, *235* (5), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1819-3>.
- (39) Arslan, A.; Rancke-Madsen, A.; Brask, J. Enzymatic Synthesis of Estolides from Castor Oil. *Catalysts* **2020**, *10* (8). <https://doi.org/10.3390/catal10080835>.
- (40) Villavicencio, J.; Orozco, F.; Benitez, R.; Martin, J.; Rojas, G. A Greener Enzymatic Oligoesterification of Biobased Renewable Synthons. *J Braz Chem Soc* **2021**, *32*.
- (41) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.; Thomson: Australia, 2007.
- (42) Mettler Toledo. *Reflectancia total atenuada (ATR)*. [https://www.mt.com/es/es/home/applications/L1\\_AutoChem\\_Applications/ftir-spectroscopy/attenuated-total-reflectance-atr.html](https://www.mt.com/es/es/home/applications/L1_AutoChem_Applications/ftir-spectroscopy/attenuated-total-reflectance-atr.html) (visitada 2024-02-05).
- (43) PerkinElmer. *Gas Chromatography Explained: What It Is and How It Works*. <https://blog.perkinelmer.com/posts/gas-chromatography-explained-what-it-is-and-how-it-works/> (vistada 2024-02-05).
- (44) PerkinElmer. *Chromatography Explained: How Mass Spectrometry Adds Information to Your Analysis*. <https://blog.perkinelmer.com/posts/chromatography-explained-how-mass-spectrometry-adds-information-to-your-analysis/> (vistada 2024-02-05).
- (45) Vernier Science Education. *Understanding Polarimetry*. [https://www.vernier.com/experiment/chem-o-6\\_understanding-polarimetry/](https://www.vernier.com/experiment/chem-o-6_understanding-polarimetry/) (visitada 2024-02-05).
- (46) Panesar, P. S.; Kennedy, J. F.; Gandhi, D. N.; Bunko, K. Bioutilisation of Whey for Lactic Acid Production. *Food Chem* **2007**, *105* (1), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.
- (47) Mordor Intelligence. *Tamaño del mercado de ácido láctico y análisis de acciones tendencias de crecimiento y pronósticos (2023 - 2028)*. <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/lactic-acid-market> (visitada 2024-01-05).
- (48) López Salazar, J. A.; Cantor Rodríguez, L. F. Proyecto Produccion y Comercializacion de Ácido Láctico, Universidad de ciencias APlicadas y Ambientales, Bogotá, 2016.
- (49) Miller, C.; Fosmer, A.; Rush, B.; McMullin, T.; Beacom, D.; Suominen, P. 3.17 - Industrial Production of Lactic Acid. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*; Moo-Young,

- M., Ed.; Academic Press: Burlington, 2011; pp 179–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00177-X>.
- (50) Kamatou, G. P. P.; Vermaak, I.; Viljoen, A. M.; Lawrence, B. M. Menthol: A Simple Monoterpene with Remarkable Biological Properties. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 15–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>.
- (51) OEC. *Mentol en Colombia*. <https://oec.world/es/profile/bilateral-product/menthol/reporter/usa?redirect=true&tradeGrowth=flow1> (vistada 2024-02-05).
- (52) Dylong, D.; Hausoul, P. J. C.; Palkovits, R.; Eisenacher, M. Synthesis of (-)-Menthol: Industrial Synthesis Routes and Recent Development. *Flavour Fragr J* **2022**, *37* (4), 195–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ffj.3699>.
- (53) Erman, M. B.; Snow, J. W. Menthyl Lactate Process, 2005.
- (54) Shih, I. L.; Hung, S. H.; Chen, F. Y.; Ju, H. Y.; Shieh, C. J. Optimized Synthesis of Lipase-Catalyzed l-Menthyl Butyrate by *Candida rugosa* Lipase. *Food Chem* **2007**, *100* (3), 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.004>.
- (55) Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M. Novozym 435 Displays Very Different Selectivity Compared to Lipase from *Candida Antarctica B* Adsorbed on Other Hydrophobic Supports. *J Mol Catal B Enzym* **2009**, *57* (1), 171–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.012>.
- (56) Van Aken, K.; Streckowski, L.; Patiny, L. EcoScale, a Semi-Quantitative Tool to Select an Organic Preparation Based on Economical and Ecological Parameters. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2*, 3. <https://doi.org/10.1186/1860-5397-2-3>.
- (57) Erman, M. B.; Snow, J. W. MENTHYL LACTATE PROCESS, February 6, 2007. <https://patents.google.com/patent/US7173146B1/en> (accessed 2024-03-05).
- (58) Delgado Rodríguez, J. C.; Arango Romero, P. A.; Benítez Benítez, R. Extracción Verde y Eficiente de Cannabidiol, Tetrahidrocannabinol, Cannabinol y Cannabigerol de Cannabis Sativa Empleando Disolventes Eutécticos Profundos Naturales Basados En Mentol. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina* **2023**, *33* (1), 87–104. <https://doi.org/10.18359/rcin.6588>.

## 11.DIVULGACIÓN

Parte de los resultados obtenidos de esta investigación, han sido presentados en diversos congreso y eventos de carácter científico se presentan a continuación:

**Evento 1:** XVI Encuentro Departamental de Semilleros de Investigación – EDESI 2022. Realizado del 21 al 22 de septiembre 2022 en municipio de Santander de Quilichao – Cauca, Universidad Nacional Abierta Y A Distancia – UNAD. Título: Síntesis de lactato de mentilo por condensación enzimática con Novozym 435®. Modalidad poster.

**Evento 2:** V Congreso Colombiano De Electroquímica - VIII Seminario Internacional De Química Aplicada. Realizado del 3 al 7 de octubre del 2022, en la Ciudad de Florencia- Caquetá, Universidad de la Amazonia. Título: Evaluación de síntesis de lactato de mentilo catalizada por Novozym 435®, en modalidad poster.



Logo: CONGRESO COLOMBIANO DE VELECTROQUÍMICA  
VIII SEMINARIO INTERNACIONAL DE QUÍMICA APLICADA  
III ESCUELA ANDINO-AMAZÓNICA DE QUÍMICA  
WORKSHOP QUÍMICA Y BIOLOGÍA DE HONGOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

El comité organizador del:  
**V Congreso Colombiano de Electroquímica - V CCEQ,**  
**VIII Seminario Internacional de Química Aplicada - VIII SEQUIAMAZ,**  
Workshop Química y Biología de Hongos con Potencial Biotecnológico,  
III Escuela Andino - Amazónica de Química - III EAAQ.

Certifica que el trabajo titulado:  
*Evaluación de síntesis de lactato de mentilo catalizada por novozym 435®*

Fue presentado por:  
**Marino Chavarro Cordoba, Ricardo Benitez Benitez, Jaime Martin Franco**

En la modalidad de **Ponencia Poster**  
Llevado a cabo en n Florencia Caquetá del 3 al 7 de octubre del 2022.

Dra. Paola villegas Guzman  
Presidenta Comité Organizador

Dr. Jaime Fernando Martinez  
Presidente Comité Científico V CCEQ

Dra. Paula Liliana Galeano G.  
Presidenta comité científico  
VIII SEQUIAMAZ

Logo: Universidad de la Amazonia  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
40 años 1982-2022

**Evento 3:** XXV Encuentro Nacional y el XIX Encuentro Internacional de Semilleros de Investigación. Realizado del 12 al 15 de octubre del 2023, en la Ciudad de Medellín – Antioquia, Universidad de Medellín. Título: Síntesis de lactato de mentilo por condensación enzimática con Novozym 435®. Modalidad poster.



LA FUNDACIÓN RED COLOMBIANA DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN RedCOLSI

Del 12 al 15 de octubre de 2022

Hace constar que,

## MARINO CHAVARRO CORDOBA

Con número de identificación 1061801665

Participó en calidad de **PONENTE**

Con el proyecto  
**ESTRATEGIAS PARA EL APRENDIZAJE ACTIVO EN LA ENSEÑANZA DE NOMENCLATURA ORGÁNICA MEDIANTE EL USO DE HERRAMIENTAS VIRTUALES Y TRABAJO COLABORATIVO SÍNTESIS DE LACTATO DE MENTILO POR CONDENSACIÓN ENZIMÁTICA CON NOVOZYM 435®**

  
**LUZ MERY HERRERA GALEANO**  
 Coordinadora Nacional de RedCOLSI

  
**MARTHA LUCIA MONSALVE PERDOMO**  
 Secretaria Nacional de RedCOLSI

  
**DANIEL CARVAJAL TABARES**  
 Coordinador Nodo Antioquia RedCOLSI



**Evento 4:** XIX congreso colombiano de química. Realizado del 2 al 6 de octubre del 2023, en la ciudad de Bogotá D.C.- Cundinamarca, Universidad de los Andes. Título: Optimización de la síntesis del lactato de mentilo biocatalizada por Novozym 435®. En modalidad poster.

