

# Informe final publicable de proyecto

## Síntesis enzimática de lípidos complejos en solventes de eutéctico profundo

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_156293

30/08/2022

**JACHMANIÁN ALPUY, Iván** (Responsable Técnico - Científico)

**CALLEJAS CAMPIONI, Nicolas** (Investigador)

**FIGUEROA ESPINOZA, María Cruz** (Investigador)

**SEGURA HERRERA, Nadia** (Investigador)

**VILLENEUVE, Pierre** (Investigador)

**VOLONTERIO FABIANO, Elisa** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\  
U.M.R.- INGÉNIERIE DES AGROPOLYMÈRES ET DES TECHNOLOGIES EMERGENTES (I.A.T.E.) UM/INRA/CIRAD/  
MONTPELLIER SUPAGRO

## Resumen del proyecto

Los ésteres de ácidos grasos con azúcares y con fitoesteroles constituyen dos grupos de lípidos complejos atractivos para la industria alimentaria por sus propiedades bioactivas (beneficiosas para la salud) y su capacidad de modificar convenientemente las propiedades de las fases grasas que los contienen. Por este motivo pueden incorporarse a alimentos como margarinas o grasas de diferente tipo, mejorando sus propiedades de textura, estabilidad, untabilidad, etc. Su producción mediante métodos tradicionales varios inconvenientes ya que la alta temperatura de reacción requerida desencadena procesos de degradación que generan que, además de generarse los compuestos de interés, se generen también subproductos tóxicos.

En este proyecto se exploró una alternativa consistente en la síntesis enzimática a temperatura moderada de este tipo de compuesto, evitando los procesos de descomposición indeseables. Adicionalmente, se utilizó un tipo de solventes "verdes" llamado "Solvente de Eutéctico Profundo" (o DES), los cuales se constituyen por la mezcla de dos componentes sólidos que al ponerse en contacto interactúan fuertemente generando un fluido que puede utilizarse como medio de reacción. Los fluidos obtenidos de esta manera pueden generarse a partir de la combinación de muy diversos materiales, siendo muy común la utilización de "cloruro de colina" combinado con urea, glucosa u otros azúcares, y alcoholes de diverso origen.

Como resultado del proyecto se evaluaron diferentes solventes tipo DES, se estudió la conveniencia de su utilización para este tipo de proceso y se evaluó el rendimiento de las reacciones de síntesis de los diferentes compuestos de interés.

El proyecto permitió además la interacción con un grupo de investigación con el equipo dl Dr. Pierre Villeneuve, del CIRAD, Montpellier, grupo de investigación de primer nivel en esta área.

## Ingeniería y Tecnología / Ingeniería Química / Ingeniería Química (plantas, productos) / Ingeniería de Alimentos

**Palabras clave:** lípidos complejos / síntesis enzimática / solventes de eutéctico profundo /

### Introducción

#### Solventes alternativos para catálisis enzimática

Son conocidos los diferentes problemas que representan el uso de solventes orgánicos tradicionales típicos a escala industrial. Además de ser en su mayoría derivados del petróleo (no renovables), según su naturaleza presentan en diferente grado algún tipo de inconveniente como ser alta volatilidad, inflamabilidad, toxicidad y baja biodegradabilidad. Adicionalmente la huella de carbono de los mismos es significativa si se considera su proceso de fabricación, reciclado y destrucción final [Amelio et al., 2014].

Por esto el estudio de nuevos solventes seguros y sostenibles ha sido un área de investigación del mayor interés [Moity et al., 2012]. Entre estos, los fluidos supercríticos, principalmente el dióxido de carbono, ha despertado mucho interés [Zhang et al., 2014], pero el alto costo de equipamiento requerido para alcanzar las presiones de trabajo necesarias y la baja polaridad de este solvente hacen que su aplicabilidad sea muy limitada. Otra alternativa que ha encontrado numerosas aplicaciones son los llamados líquidos iónicos, formados por sales con una temperatura de fusión por debajo de los 100 °C. Son muy comunes los formados por un catión de amonio, como puede ser de imidazolio o piridonio, y un anión con una baja nucleofilia. Se trata de solventes térmicamente estables, de presión de vapor prácticamente nula, no inflamables, inmiscibles con muchos solventes orgánicos típicos y, lo más importante, sus propiedades se pueden modular en función de su síntesis [García-Verdugo et al., 2015]. Pese a esto presentan varios inconvenientes: alto costo, toxicidad intrínseca, baja biodegradabilidad, síntesis compleja y, paradójicamente, muy poco amigable con el ambiente, ya que involucra el uso de solventes orgánicos y derivados del petróleo y genera una alta proporción de residuos [Welton, 2011]. Por lo que estos solventes han sido muy cuestionados dentro de la química verde.

#### Solventes de eutéctico profundo

En este escenario han ido ganando interés las mezclas eutécticas de muy bajo punto de fusión (DES, del inglés "Deep Eutectic Solvents"), constituidas por mezclas de sólidos inmiscibles que sufren un cambio de fase sólido-líquido a una temperatura determinada, llamado punto eutéctico, comportándose como si fuese un líquido puro.

Estos solventes se forman mediante la asociación de dos o más componentes cuyas moléculas son capaces de interactuar (ya sea por fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o fuerza iónica) para formar una mezcla con una temperatura

de transición sólido-líquido significativamente menor a la de sus componentes individuales. Por este motivo, junto con los líquidos iónicos, se los conoce como "mezclas de baja temperatura de transición" (LTTM por su nombre en inglés "Low Transition Temperature Mixtures).

Existen cuatro tipos distintos de DES, clasificados en base a su propiedades y composición [Smith et al., 2014]. Los DES del tipo III son los más importantes desde el punto de vista de su aplicación en química orgánica, debido a su facilidad de preparación y a su potencial uso como disolventes sostenibles. Están formados, generalmente, por una sal de amonio cuaternaria que interactúa con compuestos que tienen carácter dador de hidrógeno. Este tipo de DES son obtenidos generalmente al mezclar un compuesto con carácter aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), típicamente una sal con alto punto de fusión, como el cloruro de colina (ChCl), con una sustancia que actúe como dadora de enlaces de hidrógeno (HBD). La adición de esta última a la sal hace que se establezcan enlaces de hidrógeno entre los dos componentes de manera que la carga del anión de la sal se deslocaliza, disminuyendo la fuerza del enlace iónico entre el catión y el anión de la sal y, por tanto, la energía de la red cristalina, generando una distorsión que conduce a la disminución del punto de fusión de la mezcla. Cuanto más fuerte es la interacción entre los componentes, mayor es la depresión del punto de fusión. Por ejemplo, uno de los primeros DES usado en síntesis se formó por la combinación de cloruro de colina (P.f. 302 °C) y urea (P.f. 134 °C) en una proporción 1:2, cuya interacción

es tan fuerte que el punto de fusión en el eutéctico es de 12 °C, lo que supone una disminución de 122 °C respecto al ideal.

Algunas de estas mezclas no presentan un verdadero punto eutéctico, sino que presentan una zona similar a la zona de transición vítrea, por lo que hay autores que prefieren utilizar otras terminologías como mezclas de bajo punto de fusión [Russ y König, 2012] o de bajo punto de transición [Francisco et al., 2013].

#### Los DES como medio para biocatálisis

Comúnmente la mayoría de las reacciones enzimáticas se realizan en solventes orgánicos tradicionales o mezclas convenientes de los mismos a los efectos de solubilizar los sustratos manteniendo un adecuado nivel de actividad y estabilidad de la enzima. Sin embargo, esta estrategia presenta numerosos inconvenientes cuando se pretende la síntesis de compuestos de alguna complejidad estructural que involucren reactivos de diferente polaridad, dado que aquellos medios capaces de mantener en solución los diferentes tipos de moléculas involucrados suelen afectar negativamente la actividad del catalizador [Villeneuve, 2007]

Sumado a esto, el creciente interés en la aplicación de procesos que involucren solventes ambientalmente amigables, alternativos a los solventes orgánicos tradicionales, ha despertado el interés de la comunidad académica por el estudio y desarrollo de sistemas nuevos y más eficientes para conducir estos procesos enzimáticos. En este escenario se han instalado con creciente interés los DES, dadas sus propiedades particulares que los diferencia de los solventes convencionales: alta estabilidad térmica, no-inflamabilidad, no tóxicos y totalmente amigables con el medio ambiente.

Si bien se trata de sistemas muy conocidos, no es sino hasta principio de siglo que comenzaron a ser consideradas como posibles medios de reacción [Abbott et al., 2001 y 2003].

Considerando estas ventajas, en este proyecto se propone la obtención de lípidos bioactivos mediante procesos de acilación catalizados por lipasas utilizando este tipo de solvente "verde" no convencional, a los efectos de ofrecer una vía alternativa a la síntesis de diferentes compuestos de alto valor agregado, con varias aplicaciones en el área alimentaria

#### Esteres de esteroides y de azúcares.

Es conocido que la inclusión en la dieta de ésteres de esteroides (y estanoles) impacta positivamente en el metabolismo del colesterol, contribuyendo a minimizar la ocurrencia de desórdenes metabólicos y sus efectos como el sobrepeso y la aparición de enfermedades cardiovasculares [Villeneuve, 2007; El Boulifi et al., 2010]. Este efecto se ha asociado a la capacidad de estos lípidos complejos de reducir los niveles de colesterol LDL mediante un mecanismo intraluminal de reducción de la absorción intestinal de colesterol [Villeneuve, 2007; Villeneuve et al., 2002]. Como respuesta a esta reducción de aporte de colesterol exógeno, se favorece el consumo de colesterol de las lipoproteínas. Productos como las margarinas enriquecidas con ésteres de esteroides/estanoles de plantas, se encuentran entre los primeros alimentos funcionales con impacto efectivo sobre los niveles de colesterol LDL. Se ha reportado que una ingesta diaria recomendada de 2 a 2.5 g de estos compuestos puede reducir eficientemente los niveles de colesterol LDL [Villeneuve et al., 2002].

El otro grupo de compuestos de nuestro interés, los ésteres de azúcares, también presentan numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, como la cosmética y farmacéutica [Hayes, 2004; Neta et al., 2012]. Además de poseer propiedades surfactantes y emulsificantes, por lo que resultan de utilidad en la estabilización de una gran cantidad de emulsiones comestibles (margarinas, shortengns, cremas, untables en general), son biocompatibles, biodegradables y medioambientalmente amigables. Adicionalmente, exhiben actividad antimicrobiana, contribuyendo en la preservación de los alimentos, y aún a algunos se les ha atribuido actividad antitumoral y actividad antiinmunodeficiencia humana (HIV)

[Bachan et al, 2011; Ferrer et al., 2005].

### Desafíos de la catálisis enzimática

Para la síntesis de estos tipos de lípidos complejos las estrategias químicas resultan muy poco convenientes, debido que su inestabilidad a altas temperaturas y en medios alcalinos, así como por catálisis estocástica, suelen producirse subproductos no deseados.

Por este motivo la vía enzimática aparece con varias ventajas: condiciones moderadas de reacción, selectividad, menor producción de productos secundarios, menos etapas de purificación y posibilidad de implementar procesos ambientalmente amigables, de acuerdo a las nuevas tendencias en química verde.

Una de las dificultades de la biocatálisis de este tipo de reacción recae en la optimización de la síntesis (rendimiento y cinética) a partir de dos sustratos de diferente polaridad (carbohidratos y ácidos grasos de cadena larga, o esteroides y ácidos grasos, en cada caso). En este contexto resulta fundamental la selección de un medio de reacción en el cual ambos sustratos, polar y apolar, sean solubles (al menos parcialmente) y en el que la actividad de la enzima pueda ser mantenida en un nivel satisfactorio.

En efecto, en solventes no-polares como el hexano, los compuestos hidrofílicos presentan muy baja solubilidad, mientras que una enzima como la lipasa suele ser activa. Contrariamente, en un solvente polar esos compuestos presentarían muy buena solubilidad, pero la enzima puede ser desactivada o presentar muy baja actividad [Shi et al., 2011].

Existen numerosos estudios vinculados a la esterificación de moléculas hidrofílicas con alcoholes grasos en solventes orgánicos o en sistemas sin solvente [Rahman et al., 2012; Lu et al., 2013; Habulin et al., 2008]. De acuerdo con los mismos, la catálisis con lipasas en solventes orgánicos es preferida a los sistemas sin solvente dado que éstos mejoran la solubilidad de las moléculas involucradas y favorecen el desplazamiento de la reacción de equilibrio en el sentido de la síntesis. Dada la diversa hidrofobicidad de reactivos y productos involucrados, la utilización de mezclas binarias de solventes orgánicos resulta una alternativa atractiva, dado que permite un ajuste fino de la solubilidad manteniendo una adecuada actividad enzimática. De todas maneras, aun así estas reacciones enzimáticas resultan muy dificultosas dados los prolongados tiempos de reacción requeridos y la baja productividad. Además, en general debe recurrirse al uso de una cantidad significativa de catalizador y muy alta relación molar sustrato apolar/sustrato polar, lo que resulta en una muy pobre transferencia de masa y muy compleja separación y purificación de los productos de interés.

Sumado a esto, el creciente interés en la aplicación de procesos enmarcados en los principios de la Química Verde estimula el diseño de procesos novedosos, atendiendo aspectos vinculados al costo, riesgo, toxicidad, biodegradabilidad, etc., lo que conduce al estudio y desarrollo de sistemas nuevos y más eficientes para conducir estos procesos enzimáticos. Generalmente la mayoría de los procesos no siguen estos principios, siendo común el uso de gran cantidad de energía y solventes y reactivos, lo que abre una oportunidad para el estudio y desarrollo de investigaciones para el diseño e implementación de nuevas estrategias.

Durante las últimas décadas la comunidad científica ha mostrado creciente interés por dos tipos de solventes relativamente novedosos, denominados Líquidos Iónicos (IL) y Solventes Eutécticos Profundos Naturales (NADES por sus siglas en inglés). Esto debido a que ambos solventes comparten varias características ventajosas como una baja presión de vapor, alta estabilidad térmica y no-inflamabilidad, lo que los convierte en alternativas atractivas para implementar procesos químicos e ingenieriles sustentables.

Si bien los IL fueron la primera opción para la sustitución de los solventes orgánicos [Ye y Hayes, 2012], su uso como medio de reacción tanto para procesos químicos como enzimáticos presentó varios inconvenientes. En efecto, su controvertida ecotoxicológica característica y seguridad ambiental [Camino y Pilosof, 2011], asociada con su elevado costo y su dificultosa síntesis y purificación, ha limitado considerablemente su implementación a escala industrial.

A diferencia de los IL, los DES salvan holgadamente los requerimientos de Química Verde, tanto en relación al mínimo riesgo en su manipulación como por su no-toxicidad y alta biodegradabilidad. Por estos motivos estos son los solventes objeto de estudio de esta propuesta, enfocándose en la aplicabilidad de los mismos a la síntesis de dos tipos de lípidos complejos de alto valor agregado y del mayor interés tecnológico.

El objetivo general del trabajo fue diseñar métodos eficientes para la síntesis enzimática de dos tipos de lípidos complejos: ésteres de esteroides y ésteres de azúcares, en diferentes solventes de eutéctico profundo Tipo III basados en cloruro de colina.

### Metodología/diseño del estudio

En primer lugar se pusieron a punto los métodos analíticos específicos para la extracción y análisis de los productos de interés (ésteres de esteroides y ésteres de azúcares). Para ello se trabajó con estándares de ésteres de esteroides, algunos adquiridos a

proveedores como Sigma-Aldrich y otros fueron sintetizados en solventes convencionales, a los efectos de disponer de las estructuras más representativas de los productos de interés. Estos estándares se incorporaron en concentración conocidas a los diferentes DES de interés y se estudiaron las diferentes alternativas para extracción y determinación de las concentraciones de los mismos, a los efectos de determinar el % de recuperación y elegir un método de conveniente.

Una vez definidos los métodos analíticos se procedió a evaluar el desempeño de varias lipasas comerciales, identificadas en trabajos previos como las más convenientes, frente a las reacciones de interés (todas de origen microbiano y provenientes de *Thermomices lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antártica* y *Candida rugosa*). En primer lugar se evaluó la actividad de las mismas en los diferentes DES utilizando como reacción modelo la esterificación de ácido láurico con n-butanol, dado la simplicidad de la misma y la rapidez del método de análisis de productos. Luego se comenzó a trabajar con estándares de fitoesteres de los más comunes como Brasicasterol, Campesterol y beta-sitoesterol, los que se incubaron en los diferente DES en presencia de ácido láurico o laurato de vinilo, a los efectos de evaluar la eficiencia de la esterificación o transesterificación, respectivamente. En todos los casos se evaluó el efecto de las condiciones de reacción sobre el rendimiento de las mismas: Temperatura, contenido de agua del DES, relación entre sustratos, período de reacción.

Luego de la experiencia adquirida en el trabajo con fitoesteres, se comenzó a estudiar las reacciones más complejas vinculadas a los azúcares. Para esto se realizó un "barrido" similar al descripto en el caso anterior (mismas enzimas, ácidos grasos y DES). Como azúcares se ensayaron tres monosacáridos comunes: xilitol, glucosa y fructosa. De la misma manera que en el caso de la síntesis de ésteres de esterole, se estudió el efecto de las variables operativas sobre los porcentajes de conversión.

Principales métodos experimentales:

Incubaciones:

Se realizaron generalmente en viales de 15 mL con tapa de rosca en un agitador orbital con control de temperatura, a diferentes rpm y temperatura según el tipo de enzima y características fisicoquímicas del DES a utilizar. Para la extracción de los producto de reacción se adiciono agua al sistema, de manera de generar la disrupción del DES, y posteriormente se extrajeron los productos mediante repetidas extracciones con hexano.

Análisis de productos:

Luego de evaluar varias alternativas analíticas se optó por el uso de cromatografía gas-líquido como la más conveniente. Se utilizó un GC Shimadzu GC2010 con detector FID e inyector on-column para el análisis tanto de los ésteres de esterole como de los ésteres de azúcares. En este último caso los productos fueron previamente silanizados mediante el uso de MSTFA. Alternativamente se utilizaron diferentes métodos de cromatografía en capa delgada (TLC) para una evaluación rápida del avance de las reacciones.

## Resultados, análisis y discusión

Puesta a punto de métodos analíticos

De acuerdo a lo propuesto en el plan de trabajo se sintetizaron diferentes solventes de eutéctico profundo (DES) basados en el cloruro de colina (ChCl), combinado con cuatro donadores de enlace de hidrógeno (HBD). En la Tabla 1 se muestran los diferentes DES y las proporciones molares en la que fueron constituidos, correspondientes a cada composición eutéctica. En la última columna se indica la posibilidad de que el propio componente HBD pueda reaccionar en las reacciones de síntesis de interés, compitiendo con los sustratos objetivo de los procesos a estudiar, aspecto que resultó de gran importancia como se describe más adelante.

Para los ensayos de puesta a punto de métodos de incubación y métodos analíticos se realizaron ensayos de transesterificación de laurato de vinilo con metanol en exceso en los diferentes DES de interés. El avance de la reacción se realizó por cromatografía gaseosa en un equipo Shimadzu 14B equipado con columna Supelco SP-2330 de 30 metros, detector FID e inyección tipo split, programando la temperatura del horno desde 160 hasta 220 °C a 4°C/min. La Figura 1 muestra el avance de esta reacción en medio DES 2, catalizada por la lipasa comercial Lipozyme TL-IM inmovilizada (de *Thermomices lanuginosus*, producida por Novozymes) a 45 °C con agitación orbital a 200 rpm, en cuatro incubaciones independientes. Se observó que la reacción prácticamente se completó luego de 24 h de incubación y que la reproducibilidad del método fue muy buena, por lo que se adoptaron estas condiciones de reacción para las siguientes actividades del proyecto. Los mismos ensayos se realizaron con las enzimas Novozym 435 (lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada sobre un soporte acrílico) y la lipasa de *Candida rugosa*, ambas adquiridas a Sigma-Aldrich. En el caso de la primera se observó una muy buena actividad catalítica, similar a la mostrada por la Lipozyme TL-IM (Figura 1), mientras que la segunda no presentó actividad ninguna en idénticas

condiciones.

#### Síntesis de ésteres de esteroides

Para la síntesis de ésteres de esteroides se realizaron ensayos previos en medio hexano, a los efectos de verificar el desempeño de diferentes lipasas en la catálisis de la reacción de transesterificación de una mezcla de fitoesteroides (obtenida de COGNIS, Alemania, conteniendo brasicasterol 10,1 %, campesterol 39,4 % y beta-sitosterol 50,5 %).

Las reacciones se realizaron en las condiciones indicadas en el punto anterior, colocándose en el vial de incubación 25 mg de la mezcla de fitoesteroides, 60 mg de laurato de vinilo (130 % de exceso), 10 mg de estándar interno (tricosano) y 20 mg de enzima en 5 mL de hexano. Las enzimas utilizadas fueron: *Candida rugosa*, Lipozyme TL-IM (*Thermomices lanuginosus*), Novozym 435 (*Candida antarctica*) y Lipozyme RM-IM (*Rhizomucor miehei*).

Las muestras recogidas a diferente tiempo de incubación se analizaron por cromatografía gaseosa en un GC 2010 equipado con detector FID, inyector on-column y columna Supelco MET-Biodiesel (14m × 0.53mm x 0.16µm), utilizando una temperatura de horno convenientemente programada.

La Figura 2A muestra la eficiente separación de los tres fitoesteroides componentes de la mezcla sustrato y sus respectivos productos de reacción (lauratos de cada fitoesterol) alcanzada mediante el método analítico por cromatografía gaseosa. También se aprecia el pico correspondiente al estándar interno, el del laurato de vinilo y, junto a éste último, el del ácido láurico. La aparición de ácido láurico es del mayor interés ya que indica que pese a la baja actividad de agua del medio, tiene lugar la reacción de hidrólisis del laurato de vinilo, reacción paralela a la reacción de interés y frente a la cual las enzimas presentan un grado de actividad.

La Figura 2B muestra los resultados obtenidos al catalizar el proceso con las diferentes enzimas, donde se observa que la más activa fue la Lipozyme TL-IM, seguida por la de *Candida rugosa* y la Lipozyme RM-IM, mientras que la Novozym 435 fue muy poco activa.

Obviamente el comportamiento de las enzimas no es el mismo en los diferentes medios ni frente a diferentes reacciones.

Posteriormente se realizaron las incubaciones en medio DES. Al principio las conversiones fueron muy bajas y, adicionalmente, se observó en los cromatogramas la aparición de varios picos importantes no correspondientes con los productos esperados, lo que sugirió la posibilidad de que se pudieran estar produciendo ésteres de los diferentes HBD constituyentes de los DES 1, 2, y 3. Éstos presentan funciones hidroxilo libres en su estructura, capaces de dar origen a enlaces tipo éster con el grupo alquilo (laurato) presente en el medio de reacción.

Para verificar esto se realizaron incubaciones en cada uno de estos medios DES, en presencia de laurato de vinilo y enzima Novozym 435 y en ausencia del sustrato de interés (mezcla de fitoesteroides). La Figura 3 muestra los resultados obtenidos luego de 48 horas de incubación, donde se verifica la aparición de los lauratos de los diferentes HBD en cantidad importante, lo que indica la existencia de fuertes fenómenos competitivos con participación de dichos compuestos. La cantidad de productos generados se corresponden con la cantidad de funciones hidroxilo de los HBD (según se ilustra en la Tabla 1), generándose mono-, di- y/o trilauratos según el caso. Esto representó un problema importante, ya que implica el consumo del reactivo donador del grupo acilo (laurato) por parte de un compuesto con alta capacidad de aceptar grupos acilo como los HBD, debido a que se encuentran en muy alta concentración en tanto se tratan de uno de los constituyentes del solvente.

Adicionalmente, este fenómeno implicó una mayor complejidad desde el punto de vista analítico, dado que algunos de los picos de los sustratos y productos de interés se superponen total o parcialmente con los de los ésteres de los componentes del DES, lo que dificulta en gran medida la cuantificación de los mismos. La Figura 4 muestra la reactividad determinada para los HBDs de los diferentes DES. En base a estos resultados se decidió trabajar mayormente en el DES 4 (ChCl/urea), el cual no mostró la aparición de productos derivados de la urea.

Posteriormente, considerando reportes relativos al efecto favorable de la presencia de agua para la actividad de enzimas en este tipo de solvente, se procedió a evaluar el efecto del contenido de agua en el DES 4 sobre la actividad de la lipasa Novozym 435. En la Figura 5 se muestra el porcentaje de conversión alcanzado en la síntesis de ésteres butílico al trabajar en este DES con diferentes relaciones molares  $R = \text{moles de agua} / \text{moles de ChCl}$ . Los resultados indicaron que la ausencia de agua ( $R=0$ ) impactó muy negativamente sobre la actividad enzimática, mientras que a partir de un valor de  $R=1$  la enzima recupera sensiblemente la actividad. Asimismo, períodos prolongados de incubación con un contenido elevado de agua produjeron un gradual descenso en los porcentajes de conversión, aspecto a tener en cuenta para incubaciones prolongadas.

Realizados estos ensayos previos y ajustes de las condiciones de reacción se llegó a obtener una conversión máxima de la mezcla de esteroides en la transesterificación con laurato de vinilo a los correspondientes ésteres láuricos del 55 %. Las condiciones de reacción fueron: lipasa de *Candida rugosa*, medio DES 4, relación molar  $R = (\text{agua} / \text{ChCl}) = 3$ , 45 °C de temperatura, agitación a 300 rpm.

Síntesis de ésteres azúcares.

En el caso de los ésteres de azúcares los ensayos se iniciaron en los DES ya descritos en la sección anterior, en los que se evaluó la actividad de varias de las enzimas disponibles en la catálisis de la esterificación de diferentes monosacáridos con ácido láurico o laurato de vinilo. Nuevamente se volvió a apreciar una fuerte competencia de los componentes HBDs de los diferentes DES, por lo que se continuó trabajando mayormente con el DES 4, al igual que en el caso de los fitoesteres.

En esta etapa se destinó un tiempo considerable al análisis del efecto de las diferentes variables operativas sobre el avance de la reacción (temperatura, adición de agua al sistema, velocidad de agitación, etc.) Pese a esto las conversiones obtenidas, en todos los casos, fueron extremadamente bajas, aún luego de tiempos extremadamente prolongados de reacción (p. ej. 5 días).

Estos resultados condujeron a ensayar una estrategia diferente, consistente en generar un DES tal donde el componente HBD sea precisamente el sustrato "objetivo".

En base a información bibliográfica sobre este tipo de solvente y nuestros objetivos se sintetizó un nuevo DES constituido por ChCl y glucosa combinados a relaciones molares 1:1 o 2:1, a los que se denominó DES 5 y DES 5\*, respectivamente. En estos nuevos sistemas, la eventual reacción del componente HBD no resultaría competitiva sino que, por el contrario, la generación de ésteres de glucosa constituía el objetivo principal de esta etapa del proyecto.

Luego de varios ajustes en las condiciones de reacción se observó clara la aparición de monolaurato de glucosilo y, en menor grado, de dilaurato de glucosilo, al incubar en DES 5 al laurato de vinilo en presencia de la lipasa Novozym 435 (la única que mostró actividad). La Figura 6 muestra la velocidad de generación de monolaurato de glucosilo (principal producto) a lo largo de un prolongado período de incubación en DES 5. En idénticas condiciones de reacción en el DES 5\* se observó también la generación de los productos de interés, a velocidades levemente superiores a las observadas en el DES 5 (Figura 7).

Actualmente se continúa el trabajo focalizado en maximizar los rendimientos de la síntesis de ésteres de azúcares, ya que la línea de investigación se continuará aún luego de finalizado formalmente este proyecto.

## Conclusiones y recomendaciones

A modo de resumen, se pueden realizar las siguientes puntualizaciones:

- 1.- Los sistemas de solventes DES basados en cloruro de colina estudiados pueden resultar medios de reacción conveniente para la síntesis de lípidos complejos como los ésteres de fitoesteres o ésteres de glucosa obtenidos.
- 2.- Los mayores desafíos de estos sistemas involucran la generación de un medio capaz de preservar la actividad enzimática por períodos de reacción prolongados.
- 3.- Entre los factores determinantes de que se consiga lo indicado en el punto anterior se destacan la temperatura de reacción y la actividad de agua en el medio.
- 4.- En particular la presencia de agua en el medio de reacción resulta decisiva sobre la viabilidad de este tipo de proceso, afectando la efectividad de los mismos mediante dos efectos combinados: mantener un medio adecuado para que el catalizador se manifieste con una alta actividad y disminuyendo en forma importante la viscosidad del sistema, mejorando los fenómenos de transporte necesarios para el progreso de las reacciones de interés.

## Referencias bibliográficas

1. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Munro HL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem. Commun.* 2001, 2010-2011.
2. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. *Chem. Commun.* 2003, 1:70-71.
3. Amelio A, Genduso G, Vreysen S, Luis P, Van der Bruggen B. Guidelines based on life cycle assessment for solvent selection during the process design and evaluation of treatment alternatives. *Green Chem.* 2014, 16: 3045-3063.
4. Bachan S, Fantini J, Joshi A, Garg H, Mootoo DR. Synthesis, gp120 binding and anti-HIV activity of fatty acid esters of 1,1-linked disaccharides. *Bioorgan Med Chem* 2011, 19:4803-4811.
5. Camino NA, Pilosof AM. Hydroxypropyl methylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected pH. *Food Hydrocoll* 2011, 25:1051-1062
6. Durand E, Lecomte J, Barea B, Dubreucq E, Lortie R, Villeneuve P. Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chemistry.* 2013, 15:2275-2282.
7. Durand E, Lecomte J, Baréa B, Piombo G, Dubreucq E, Villeneuve P. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry* 2012, 47:2081-2089.
8. Durand E, Lecomte J, Baréa B, Villeneuve P. Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2014, 116:16-23.
9. El Boulifi N, Aracil J, Martínez M. Lipase-catalyzed synthesis of isosorbide monoricinoleate: process optimization by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 2010, 101:8520-8525.
10. Ferrer M, Perez G, Plou FJ, Castell JV, Ballesteros A. Antitumour activity of fatty acid maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis. *Biotechnol Appl Biochem* 2005, 42:35-39.
11. Francisco M, Van den Bruinhorts A, Kroon MC. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52: 3074-3085.
12. García-Verdugo E, Altava B, Burguete MI, Lozano P, Luis SV. Ionic liquids and continuous flow processes: a good marriage to design sustainable processes. *Green Chem.* 2015, 17:2693-2713.
13. H. Zhang, S. Heinonen, E. Levänen, Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis. *RSC Adv.* 2014, 4:61137-61152.
14. Habulin M, Sabeder S, Knez Z. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *J Supercrit Fluids* 2008, 45:338-345.
15. Hayes DG. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *J Am Oil Chem Soc* 2004, 81:1077-1103
16. Lu YY, Yan R, Ma X, Wang Y. Synthesis and characterization of raffinose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. *Eur Food Res Technol* 2013, 237:237-244
17. Moity L, Durand M, Benazzouz A, Pierlot C, Molinier V, Aubry JM. Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach. *Green Chem.* 2012, 14:1132-1145.
18. Neta NDS, dos Santos JCS, Sancho SD, Rodrigues S, Goncalves LR, Rodrigues LR, Teixeira JA. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocoll* 2012, 27:324-331.
19. Rahman MBA, Arumugam M, Khairuddin NSK, Abdulmalek E, Basri M, Salleh A. Microwave assisted enzymatic synthesis of fatty acid sugar ester in ionic liquid-tert-butanol biphasic solvent system. *Asian J Chem* 2012, 24:5058-5062
20. Russ C, König B. Glycerol: a biorenewable solvent for base-free Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azides with terminal and 1-iodoalkynes. Highly efficient transformations and catalyst recycling. *Green Chem.* 2012, 14:2969-2975.
21. Shi YG, Cai Y, Li JR, Chu YH. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of carbohydrate fatty acid esters in ionic liquids. *Progress Chem* 2011, 23:2247-2257.
22. Smith E, Abbott A, Ryder K. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* 2014, 114, 21:11060-11082
23. Villeneuve P, Hills G, Bachain P, Pina M, Caro Y, Baréa B, Guyot B, Grüning B, Graille J. Lipase-catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, 104:394-401.
24. Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25: 515-536.
25. Welton T. Ionic liquids in green chemistry. *Green Chem.* 2011, 13: 225-225.
26. Ye R, Hayes DG. Solvent-free lipase-catalysed synthesis of saccharide-fatty acid esters: closed-loop bioreactor system with in situ formation of metastable suspensions. *Biocatal Biotransform* 2012, 30:209-216

## Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)