



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



Síntesis enzimática de derivados lipídicos en solventes de eutéctico profundo

Ing. Alim. Lorena Maurente

Tesis de Maestría en Química

Presentada como uno de los requisitos para el título de
Magíster en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Diciembre de 2024

Síntesis enzimática de derivados lipídicos en solventes de eutéctico
profundo

Tribunal:

Dra. Ana Paula Badan Ribeiro

Dra. Sonia Rodríguez

Dra. Nadia Segura

Dr. Iván Jachmanián, Director

Agradecimientos

A mi director de Tesis Dr. Iván Jachmanián quien me dio la oportunidad de realizar esta tesis, por brindarme su conocimiento en la materia, su apoyo y su excelente disposición para todo lo relativo al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Nicolás Callejas por su acompañamiento y ayuda a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al Área de Grasas y Aceites y a las personas que la integran quienes me permitieron trabajar con ellos siempre dispuestos a ayudarme.

Al Dr. Pierre Villeneuve, de la Unité Mixte de Recherche QualiSud del CIRAD, Montpellier, Francia, por recibirme para realizar una pasantía de investigación en su laboratorio, particularmente a Nathalie Barouh y a Bruno Baréa quienes me acompañaron en el desarrollo de la misma.

A la Facultad de Química de la Universidad de la República que me brindó la oportunidad de realizar la Maestría en Química.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas y en particular al Área Química del programa (PEDECIBA_Química).

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme una Beca de Posgrado (POS_FCE_2020_1_1009206).

Síntesis enzimática de derivados lipídicos en solventes de eutéctico profundo

Lorena Maurente, Mag

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Iván Jachmanián

Área Grasas y Aceites - CYTAL
Facultad de Química - Universidad de la República (UDELAR)

Los solventes de eutéctico profundo o DES (del inglés “*Deep Eutectic Solvents*”), están constituidos por la combinación de sólidos inmiscibles que, mezclados en determinada proporción (mezcla eutéctica), sufren un cambio de fase sólido-líquido comportándose como un líquido puro a temperatura ambiente. 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.

Al igual que los líquidos iónicos, los DES presentan muy baja presión de vapor, alta estabilidad térmica y no son inflamables, pero a diferencia de los primeros, salvan holgadamente los requerimientos de la Química Verde, por lo que resultan atractivos como solventes ambientalmente amigables.

En particular, para diversas aplicaciones han ganado gran interés los DES basados en cloruro de colina (ChCl), sal de amonio cuaternario que combinada en una proporción conveniente con diversos compuestos con capacidad de generar enlaces de hidrógeno

(HBD, del inglés “*Hydrogen bond donor*”) puede dar lugar a una mezcla eutéctica líquida a temperatura ambiente.

Entre las diversas aplicaciones que se han encontrado para este tipo de solvente, ha resultado atractiva su aplicación como medio de reacción para procesos catalizados por enzimas. Además de sus propiedades diferenciales como solventes, permitiendo en varios casos solubilizar sustratos y productos complejos de muy diferente naturaleza, se ha reportado que la capacidad de estas mezclas para formar enlaces de hidrógeno les permite generar enlaces con las propias enzimas, confiriéndoles una estabilidad conformacional superior.

Los ésteres alquílicos de azúcares y fitoesteroles son dos tipos de lípidos complejos para cuya síntesis puede resultar conveniente la aplicación de procesos enzimáticos en medios DES. Ambos tipos de compuestos resultan atractivos para la industria alimentaria por sus propiedades bioactivas y su capacidad de modificar convenientemente las propiedades fisicoquímicas de las fases grasas que los contienen. Sin embargo, su producción mediante métodos tradicionales utilizando catálisis alcalina implica varios inconvenientes debido a la alta temperatura de reacción requerida, lo que desencadena procesos de degradación que generan subproductos tóxicos. Por este motivo, su síntesis enzimática a temperatura moderada ha demostrado ser una alternativa atractiva, con la ventaja adicional de la selectividad propia de estos catalizadores. Sin embargo, la selección del medio de reacción sigue siendo un problema a resolver, ya que la muy diferente polaridad de los reactivos y productos involucrados obliga a recurrir a mezclas de solventes que permitan la disolución total de los compuestos involucrados, lo que frecuentemente resulta negativo para la actividad enzimática.

En este trabajo de tesis se propuso estudiar el desempeño de diferentes lipasas comerciales en la catálisis de reacciones de esterificación y transesterificación en varios DES basados en ChCl, y en particular su aplicación a la síntesis de derivados lipídicos, entre ellos los dos tipos de lípidos complejos de interés tecnológico mencionados: ésteres de esteroides y ésteres de azúcares.

El plan de trabajo involucró las siguientes etapas: 1.- estudiar la capacidad de varias lipasas comerciales en la catálisis de las reacciones de interés en solventes orgánicos

convencionales, 2.- evaluar el efecto del medio DES sobre la actividad de las enzimas seleccionadas, 3.- determinar la capacidad de los componentes HBD de los diferentes DES para competir con las reacciones de interés y 4.- estudiar la eficiencia de las de síntesis de diversos compuestos lipídicos mediante la aplicación de diferentes estrategias.

El trabajo realizado pretende contribuir a entender el comportamiento de estos sistemas solventes novedosos y la viabilidad de conducir en ellos procesos de síntesis enzimática de derivados lipídicos de diferente naturaleza. Asimismo, los resultados sugieren que si bien se trata de solventes atractivos por su bajo costo, baja toxicidad, biodegradabilidad y economía, la conveniente aplicación de los mismos a los procesos de interés estudiados requiere del diseño de estrategias específicas en cada caso.

Enzymatic synthesis of lipid derivatives in deep eutectic solvents

Lorena Maurente, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Iván Jachmanián

Área Grasas y Aceites - CYTAL
Facultad de Química - Universidad de la República (UDELAR)

Deep Eutectic Solvents (DES) are composed of a combination of immiscible solids that, when mixed in a specific proportion (eutectic mixture), undergo a solid-to-liquid phase transition, behaving as a pure liquid at room temperature. These solvents are formed through the association of two or more components whose molecules are capable of interacting (via Van der Waals forces, hydrogen bonds, or ionic forces) to form a mixture with a significantly lower solid-to-liquid transition temperature than that of the individual components.

Like ionic liquids, DES exhibit very low vapor pressure, high thermal stability, and are non-flammable; however, unlike ionic liquids, they easily meet the criteria of Green Chemistry, making them attractive as environmentally friendly solvents.

In particular, DES based on choline chloride (ChCl), a quaternary ammonium salt, have gained significant interest for various applications. When combined in an appropriate ratio with compounds capable of forming hydrogen bonds (Hydrogen Bond Donors, HBD), these can form a liquid eutectic mixture at room temperature.

Among the various applications found for these solvents, their use as a reaction medium for enzyme-catalyzed processes has been particularly attractive. In addition to their differential properties as solvents, which allow the solubilization of complex substrates and products of very different natures, it has been reported that the ability of these mixtures to form hydrogen bonds enables them to interact with the enzymes themselves, conferring them greater conformational stability.

Alkyl esters of sugars and phytosterols are two types of complex lipids whose synthesis may benefit from enzyme-catalyzed processes in DES media. Both are of interest to the food industry due to their bioactive properties and ability to modify the physicochemical properties of the fat phases they are contained in. However, their production via traditional methods using alkaline catalysis involves several drawbacks due to the high reaction temperatures required, which lead to degradation processes generating toxic by-products. For this reason, enzymatic synthesis at moderate temperatures has proven to be an attractive alternative, with the additional advantage of the inherent selectivity of these catalysts. However, selecting the appropriate reaction medium remains a challenge, as the very different polarities of the reactants and products involved require solvent mixtures that can completely dissolve the compounds, which often negatively impacts enzyme activity.

This thesis proposes studying the performance of various commercial lipases in catalyzing esterification reactions in different ChCl-based DES, specifically applying them to the synthesis of lipid derivatives, including the two types of complex lipids of technological interest: sterol esters and sugar esters.

The work plan involved the following stages: 1. Study the catalytic capacity of several commercial lipases in the reactions of interest using conventional organic solvents; 2. Evaluate the effect of the DES medium on the activity of the selected enzymes; 3. Determine the ability of the HBD components of the different DES to interfere with the

reactions of interest; and 4. Study the efficiency of lipid compound synthesis using various strategies.

The work aims to contribute to understanding the behaviour of these novel solvent systems and the feasibility of conducting enzymatic synthesis processes of lipid derivatives of different natures. Moreover, the results suggest that while DES are attractive due to their low cost, low toxicity, biodegradability, and economic viability, their effective application in the studied processes requires the design of specific strategies for each case.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Lipasas	1
1.2 Solventes orgánicos alternativos para catálisis enzimática	3
1.3 Solventes de eutéctico profundo (DES).....	5
1.3.1 Propiedades de los DES.....	8
1.4 Los DES como solventes en biocatálisis	10
1.5 Síntesis de derivados lipídicos.....	12
1.5.1 Esteres de fitoesteroles	13
1.5.2 Esteres de ácidos grasos con azúcares	14
2.1 Objetivo General	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 3 DESEMPEÑO DE LIPASAS EN LAS REACCIONES DE INTERES EN SOLVENTES ORGÁNICOS.....	18
3.1 Introducción	18
3.2 Materiales y métodos.....	20
3.2.1 Materiales	20
3.2.2 Determinación de la actividad de las diferentes enzimas en hexano	20
3.2.3 Síntesis de laurato de coleslerilo en hexano.....	22
3.2.4 Síntesis de alquilatos de coleslerilo de diferente largo de cadena en hexano	22
3.2.5 Síntesis de ésteres de fitoesteroles en hexano	23
3.2.6 Síntesis de laurato de glucosilo en solventes orgánicos convencionales	24
3.3 Resultados y discusión	25
3.3.1 Actividad de las diferentes enzimas en hexano.....	25
3.3.2 Síntesis de laurato de coleslerilo en hexano.....	28

3.3.3	Síntesis de alquilatos de colesterilo de diferente largo de cadena en hexano	30
3.3.4	Síntesis de ésteres de fitoesteroles en hexano	31
3.3.5	Síntesis de laurato de glucosilo en solventes orgánicos convencionales	35
3.4	Conclusiones	36
CAPÍTULO 4 DESEMPEÑO DE LAS LIPASAS DE INTERÉS EN MEDIO DES		38
4.1	Introducción	38
4.2	Materiales y métodos.....	39
4.2.1	Materiales	39
4.2.2	Síntesis de los DES.....	40
4.2.3	Transesterificación de laurato de vinilo con metanol en DES 2.....	40
4.2.4	Desempeño de la lipasa iCAL-B en la síntesis de ésteres de colesterol en los diferentes DES	41
4.2.5	Efecto de la concentración de agua en el DES 4 en el desempeño de la lipasa iCAL-B en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol	42
4.2.6	Desempeño de la lipasa iCAL-B en la esterificación de ácido láurico con colesterol en DES 4 43	
4.3	Resultados y discusión	44
4.3.1	Transesterificación de laurato de vinilo con metanol en DES 2.....	44
4.3.2	Desempeño de la lipasa iCAL-B en la síntesis de ésteres de colesterol en los diferentes DES	47
4.3.3	Efecto de la concentración de agua en el DES 4 en el desempeño de la lipasa iCAL-B en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol	50
4.3.4	Desempeño de la lipasa iCAL-B en la esterificación de ácido láurico con colesterol en DES 4 52	
4.4	Conclusiones	53
CAPÍTULO 5 REACTIVIDAD DE LOS COMPONENTES DEL DES Y EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGUA		54
5.1	Introducción	54
5.2	Materiales y métodos.....	56
5.2.1	Materiales	56
5.2.2	Síntesis de DES	56
5.2.3	Síntesis de estándares de los ésteres láuricos de los HBD de interés	56
5.2.4	Reactividad de los componentes HBD de los diferentes DES.....	57

5.2.5	Efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al medio DES 4 sobre su actividad catalítica	58
5.3	Resultados y discusión	59
5.3.1	Reactividad de los componentes HBD de los diferentes DES	59
5.3.2	Efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al medio DES4 sobre su la actividad catalítica	64
5.4	Conclusiones	68
CAPÍTULO 6 EFECTO DEL LARGO DE CADENA DEL ÁCIDO GRASO EN LA EFICIENCIA DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN EN MEDIO DES 4		70
6.1	Introducción	70
6.2	Materiales y métodos	71
6.2.1	Materiales	71
6.2.2	Reacción de esterificación	71
6.3	Resultados y discusión	74
6.4	Conclusiones	81
CAPÍTULO 7 SÍNTESIS DE ESTERES DE FITOESTEROLES		83
7.1	Introducción	83
7.2	Materiales y métodos	84
7.2.1	Materiales	84
7.2.2	Esterificación de fitoesteres con ácido láurico	84
7.2.3	Transesterificación de fitoesteres con laurato de vinilo	85
7.2.4	Transesterificación de la mezcla de fitoesteres con laurato de vinilo agregado en adiciones sucesivas	86
7.3	Resultados y discusión	87
7.3.1	Esterificación de fitoesteres con ácido láurico	87
7.3.2	Transesterificación de fitoesteres con laurato de vinilo	87
7.3.3	Transesterificación de fitoesteres con laurato de vinilo suministrado en adiciones sucesivas	90
7.4	Conclusiones	95
CAPÍTULO 8 SÍNTESIS DE GLUCOLÍPIDOS		97

8.1	Introducción	97
8.2	Materiales y métodos.....	98
8.2.1	Materiales	98
8.2.2	Síntesis de DES	98
8.2.3	Síntesis de laurato de glucosilo en DES 4.....	99
8.2.4	Síntesis de laurato de glucosilo en DES formado por ChCl:glucosa.....	100
8.3	Resultados y discusión	100
8.3.1	Síntesis de laurato de glucosilo en DES 4.....	100
8.3.2	Síntesis de laurato de glucosilo en DES 5.....	101
8.4	Conclusiones	105
	CAPÍTULO 9 CONCLUSIONES GENERALES	106
	ANEXO I. DIFUSIÓN DE RESULTADOS DE LA TESIS	109
	ANEXO II. CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE GLUCOSA.....	110
	BIBLIOGRAFIA	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa, las hojas β se muestran con flechas azules (1-8) y hélices α como cilindros rojos (A-F), la posición de los aminoácidos de la triada catalítica se indica con círculos (Bornscheuer, 2002).....	2
Figura 1.2. Diagrama general de fases sólido-líquido de la mezcla binaria, siendo $T_m(A)$ y $T_m(B)$ las temperaturas de fusión de los compuestos A y B respectivamente. El punto eutéctico está representado por la mínima temperatura de fusión de la mezcla (El Achkar et al., 2021).....	5
Figura 1.3. Síntesis de un DES formado por cloruro de colina como HBA y un componente HBD genérico.....	7
Figura 1.4. Síntesis de ésteres de glucosa en medio no acuoso catalizada por lipasas (Yang & Huang, 2012).....	15
Figura 3.1. Transesterificación de laurato de vinilo con metanol.....	26
Figura 3.2. Cromatogramas correspondientes al análisis de dos muestras recogidas a diferentes períodos durante la transesterificación de laurato de vinilo con metanol catalizada por la lipasa comercial Lipozyme RM-IM: (A) 40 min de incubación, (B) 300 min de incubación (reacción completa).....	26
Figura 3.3. Evolución de la conversión de laurato de vinilo a laurato de metilo durante su incubación con metanol en medio hexano, catalizada por las lipasas comerciales de <i>Candida rugosa</i> , Lipozyme TL-IM, iCAL-B y Lipozyme RM-IM.....	27
Figura 3.4. Estructura de química del colesterol y fitoesteros.....	28
Figura 3.5. Cromatograma obtenido en el análisis por GC de la muestra recogida luego de 72 h de la mezcla de reacción en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol llevada a cabo en hexano, catalizada por la lipasa iCAL-B.....	29
Figura 3.6. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con colesterol catalizada por la lipasa i-CALB en medio hexano.....	31
Figura 3.7. Evolución de la conversión de una mezcla de fitoesteros a sus respectivos lauratos durante su incubación con laurato de vinilo catalizada por las lipasas iCAL-B, Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM y <i>Candida rugosa</i>	32
Figura 3.8. Estructuras del brassicasterol, β -sitosterol y campesterol.....	33
Figura 3.9. Composición de la fracción de ésteres de fitoesteros durante la reacción de esterificación de la mezcla de fitoesteros con laurato de vinilo catalizada por las cuatro lipasas estudiadas: laurato de β -sitosterilo (\circ), laurato de campesterilo (Δ), laurato de brassicasterilo (\diamond).....	34
Figura 3.10. Cromatograma obtenido en el análisis por cromatografía gaseosa de los productos obtenidos luego de 72 h de incubación de laurato de vinilo con glucosa en 2-metil-2-butanol (deshidratado) catalizada por la lipasa iCAL-B.....	36

Figura 4.1. Evolución de la conversión del laurato de vinilo durante su transesterificación con metanol en medio DES 2, catalizada por la lipasa lipozyme TL-IM, utilizando dos modalidades de agitación (magnética y orbital).....	45
Figura 4.2. Evolución de la conversión del laurato de vinilo durante su transesterificación con metanol en medio DES 2, catalizada por las lipasas Lipozyme TL-IM, <i>Candida rugosa</i> e iCAL-B.....	46
Figura 4.3. Evolución de la conversión de colesterol durante su transesterificación con laurato de vinilo en medio DES 1, 2, 3, y 4, catalizada por la lipasa iCAL-B	49
Figura 4.4. Evolución la hidrólisis del laurato de vinilo y de la conversión del colesterol durante la transesterificación en medio DES 4 catalizada por la lipasa iCAL-B	50
Figura 4.5. Evolución del porcentaje de hidrólisis del laurato de vinilo durante su incubación con colesterol en medio DES 4 con agregado de agua a niveles R = 1, 1,5 o 2, en presencia de la lipasa iCAL-B.....	51
Figura 5.1. Cromatogramas correspondientes al análisis por GC de los productos obtenidos luego de 24 horas de incubación de ácido láurico con n-butanol en presencia de la lipasa iCAL-B en los solventes DES 1 (a), DES 2 (b), DES 3 (c) y DES 4 (d).....	61
Figura 5.2. Suma de los porcentajes de área de los picos correspondientes a los lauratos de los diferentes HBD en el análisis por GC de los productos de reacción obtenidos luego de 24h de incubación de ácido láurico con n-butanol en los diferentes DES en presencia de la lipasa iCAL-B.....	63
Figura 5.3. Conversión del ácido láurico a laurato de butilo luego de su incubación durante 24h con n-butanol, catalizada por la enzima iCAL-B sometida a diferentes períodos de preincubación (0, 24 y 48 h) en el DES 4 conteniendo agua a valores de R= 0, 1, 2, y 3.....	66
Figura 6.1. Cromatograma obtenido en el análisis de los productos de la incubación en hexano de ácidos grasos de distinto largo de cadena con n-butanol, catalizada por la lipasa iCAL-B, luego de 48 h de reacción.....	73
Figura 6.2. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con n-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en el DES 4 anhidro (R = 0).....	74
Figura 6.3. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con n-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para R = 1.....	75
Figura 6.4. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con n-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para R = 2.....	76
Figura 6.5. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con n-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para R = 3.....	77
Figura 6.6. Velocidades iniciales correspondientes a la esterificación catalizada por la lipasa iCAL-B de los ácidos grasos de diferente largo de cadena con n-butanol en medio DES 4 con diferentes contenidos de agua (R).....	80
Figura 7.1. Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa luego de 24 h de reacción de síntesis de ésteres de esteroles en medio DES 4 catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i>	86

Figura 7.2. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteroles e hidrólisis del LV luego de 24 h de transesterificación catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en medio de reacción DES 4, conteniendo agua a los niveles R=0, 1, 2, y 3.....	88
Figura 7.3. Composición de la mezcla de fitoesteroles utilizada como sustrato y de la fracción de ésteres de fitoesteroles obtenida luego de 24 h de transesterificación de dicha mezcla con LV, catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en medio de reacción DES 4 conteniendo agua a los niveles R=0, 1, 2, y 3.....	89
Figura 7.4. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteroles luego de 24, 48 y 72 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 µL o (65/3) µL de LV, catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en medio de reacción DES 4 con un nivel de agua de R=3.....	91
Figura 7.5. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteroles luego de 2, 4, 6 y 24 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 µL o (65/3) µL de LV, catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en medio de reacción DES 4 con R=3.....	93
Figura 7.6. Porcentaje de hidrólisis del LV luego de 2, 4, 6 y 24 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 µL de LV, catalizada por la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en medio de reacción DES 4 con R=3.....	94
Figura 8.1. Diagrama de fases de mezclas de ChCl:polioles (Harris, 2008).....	98
Figura 8.2. Micromoles totales de lauratos de glucosilo generados durante la incubación de laurato de vinilo en medio DES5 conteniendo agua en relaciones R = 0, 1 y 2, en presencia de la lipasa iCAL-B.....	102
Figura 8.3. Micromoles totales de ésteres de glucosa y micromoles de mono-, di- y trilaurato de glucosilo (MLG, DLG y TLG, respectivamente) generados durante la incubación de laurato de vinilo y glucosa en medio DES 5 catalizada por la lipasa iCAL-B.....	103
Figura 8.4. Micromoles de monolaurato de glucosilo generados durante la incubación de laurato de vinilo en los medios DES 5 y DES 5* en presencia de la lipasa iCAL-B.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

2M2BuOH: 2-Metil-2-butanol

BSA: N,O-bis (trimetilsilil) Acetamida

CALB: lipasa B de *Candida antártica*

ChCl: cloruro de colina

DES: (Deep Eutectic Solvents) solventes de eutéctico profundo

DMF: N, N-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

ELSD: (evaporative light scattering detector) detector evaporativo de dispersión de luz

FID: (flame ionization detector) detector de ionización de llama

GC: (gas chromatography) cromatografía de gases

HBA: (hydrogen bond acceptor) aceptor de enlaces de hidrógeno

HBD: (hydrogen bond acceptor) donador de enlaces de hidrógeno

HPLC: (High Performance Liquid Chromatography) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

iCALB: lipasa B de *Candida antártica* inmovilizada

IS: (internal standard) estándar interno

LM: laurato de metilo

LV: laurato de vinilo

TLC: (thin layer chromatography) cromatografía de capa fina

TMCS: Trimetilclorosilano

tr: tiempo de retención

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3), capaces de catalizar la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos, son los catalizadores más utilizados en la síntesis orgánica en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Estas enzimas preservan su actividad fuera de su ambiente natural y por esta propiedad han sido utilizadas para catalizar reacciones en diversos solventes orgánicos (Cvjetko Bubalo et al., 2015; Sharma et al., 2001). Son enzimas regioespecíficas y estereoselectivas, que también pueden catalizar reacciones heterogéneas en la interfaz de sistemas solubles e insolubles en agua, resistiendo altas temperaturas y sin requerir de cofactores (Bornscheuer, 2002; Pérez et al., 2017).

Mediante el estudio de la estructura tridimensional de las lipasas con cristalografía de rayos X se demostró que las mismas comparten una estructura central nombrada “plegamiento α/β hidrolasa” que se compone de un núcleo de 8 hojas β rodeadas de hélices α , en el que se ubica el centro activo conocido como “la triada catalítica” formada en general por los aminoácidos serina-aspartato-histidina, aunque algunas lipasas presentan glutamato en lugar de aspartato (en la Figura 1.1 se muestra representación esquemática de esta estructura). El sitio activo se encuentra cubierto por una estructura hidrofóbica de “tapa” móvil que se abre en presencia de una mínima concentración de sustrato. Este movimiento provoca lo que se conoce como la activación interfacial de las lipasas (Bornscheuer, 2002; Kapoor & Gupta, 2012). La conformación del sitio activo varía con la enzima y es determinante su actividad, regioselectividad y estereoselectividad (Gumel et al., 2011).

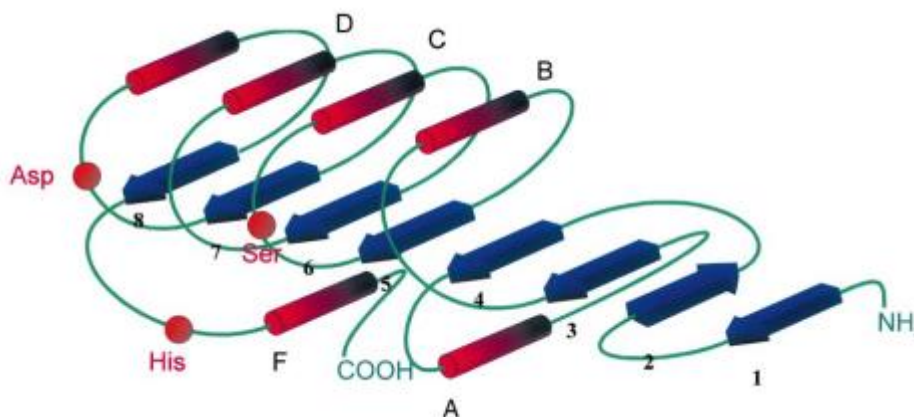


Figura 1.1. Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa, las hojas β se muestran con flechas azules (1-8) y hélices α como cilindros rojos (A-F), la posición de los aminoácidos de la triada catalítica se indica con círculos (Bornscheuer, 2002)

La actividad catalítica y estabilidad de las lipasas están ligadas a su conformación tridimensional, y esta se ve afectada por la actividad de agua en el medio. Esto se debe a las interacciones polares y por enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua con la enzima (Durand et al., 2014).

Las lipasas más utilizadas en la síntesis de ésteres en medio no acuoso son las provenientes de microorganismos, entre ellos *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizomucor miehei*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus licheniformis* (Gumel et al., 2011).

Se han destacado por su referencia en gran cantidad de publicaciones la lipasa B de *Candida antarctica* y la de *Candida rugosa*. La primera se caracteriza por la alta regioselectividad que presenta en reacciones de transesterificación y esterificación de azúcares y ha mostrado buenos resultados en varios solventes orgánicos (Grüniger et al., 2019; Poojari & Clarson, 2013). Mientras que la segunda mostró altas conversiones con respecto a las lipasas de *Carica papaya*, *Ricinus communis*, *Rhizomucor miehei*, y la lipasa B de *Candida antártica* en la síntesis de oleato de fitoesteros en medio hexano (Villeneuve et al., 2005).

Las lipasas pueden ser inmovilizadas, esto favorece la estabilidad de las mismas y facilita su separación, aunque este mecanismo presenta ventajas con respecto a la enzima libre, puede ocurrir que disminuya su actividad dado que los sitios activos pueden ser bloqueados

por el propio soporte. Sin embargo, se ha reportado que la actividad de la lipasa B de *Candida antarctica* en la síntesis de glucolípidos se incrementó cuando la misma se la utilizaba inmovilizada (Grüninger et al., 2019). Es destacable la estabilidad térmica de esta lipasa cuando se encuentra inmovilizada sobre una resina acrílica, capaz de permanecer activa expuesta a temperaturas de hasta 80 °C en solventes como el tolueno durante un mes, lo que se ha atribuido a las características de la resina utilizada como soporte (Poojari & Clarson, 2013).

1.2 Solventes orgánicos alternativos para catálisis enzimática

La utilización de solventes orgánicos convencionales se ha extendido a un sinnúmero de aplicaciones industriales lo que implica el uso de grandes cantidades de los mismos. Estos solventes generalmente poseen propiedades tales como alta volatilidad, inflamabilidad y toxicidad. Asimismo, su reutilización suele representar un costo considerable en el proceso global y, si no se los reutiliza, constituyen un problema medioambiental (Amelio et al., 2014).

Si bien por estos motivos sería deseable prescindir del uso de solventes orgánicos convencionales en la industria, en línea con los principios de la Química Verde (Mohammed et al., 2020), su utilización mejora varios aspectos vinculados con la eficiencia de las reacciones químicas. Por ejemplo, el uso de solventes en los procesos enzimáticos siempre resulta conveniente, dado que mejora los procesos de transferencia de calor y masa, suele reducir los fenómenos de inhibición producida por sustrato o producto, y facilita la separación y purificación de productos de reacción (Nian & Li, 2022).

Sin embargo, la aplicación de catálisis enzimática a escala industrial implica un gran desafío dado por la inherente inestabilidad de las enzimas y la desnaturalización provocada por los solventes orgánicos (Cao et al., 2022a). A su vez, estos solventes pueden penetrar en el sitio activo de las enzimas, cambiar la estructura secundaria de las mismas y competir por los sitios activos (Nian & Li, 2022).

Es en este contexto que se han investigado alternativas al uso de solventes orgánicos, entre ellas la utilización de fluidos supercríticos. Los fluidos supercríticos se mantienen en una única fase mientras las condiciones se encuentren por encima de su temperatura y presión críticas. Particularmente el dióxido de carbono por su temperatura y presión críticas

moderadas y su no toxicidad se volvió de gran interés para la industria alimentaria (Zhang et al., 2014). Sin embargo, entre los mayores inconvenientes se encuentra la limitada solubilidad en este tipo de solventes de gran variedad de compuestos de interés, así como el alto costo de inversión en equipamiento que requiere su manipulación (C. G. Pereira & Meireles, 2009).

Otra alternativa a los solventes tradicionales ya ampliamente estudiada la constituyen los líquidos iónicos. Estos solventes son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperaturas menores a 100 °C. Son comunes los líquidos iónicos formados por un catión amonio como imidazolio, piridonio o fosfonio y un anión de baja nucleofilia, dependiendo de la naturaleza de sus componentes se puede disponer de líquidos iónicos de muy diferentes propiedades (García-Verdugo et al., 2015). Se los ha considerado “solventes verdes”, ya que cuentan con propiedades tales como no inflamabilidad, baja volátilidad y alta reciclabilidad, además de su capacidad de solvatar solutos complejos, su estabilidad térmica y su versatilidad, por lo que se han destacado como medio para reacciones químicas (Ghandi, 2014).

Estas propiedades motivaron la realización de varias investigaciones en aplicaciones de los líquidos iónicos en el campo de la síntesis catalítica, química analítica, materiales poliméricos y nanotecnología, entre otras. Sin embargo, se ha cuestionado su carácter “verde” debido a la toxicidad de sus precursores (D. Zhao et al., 2007). Por otro lado, si bien estos solventes no son volátiles y no contribuyen a la contaminación del aire, al ser altamente solubles podrían contaminar ambientes acuáticos (Docherty & Kulpa, 2005). Además del impacto en el medio ambiente, su alto costo y baja disponibilidad constituyen limitantes para el uso masivo de los mismos (Shamsuri & Abdullah, 2010).

Hace algo más de dos décadas comenzó a crecer el interés en la utilización como solventes de las mezclas eutécticas de muy bajo punto de fusión, conocidas como “solventes de eutéctico profundo” (o DES, del inglés “*Deep Eutectic Solvents*”).

Entre las publicaciones más tempranas focalizadas en este tipo de solventes se encuentra el reporte de Abbott et al. (2001), enmarcado en la identificación de nuevos solventes que cumplan con los principios de la química verde y no presenten los inconvenientes de los líquidos iónicos tradicionales, entre ellos la baja tolerancia a la humedad y el alto costo

(Abbott et al., 2001). Los DES pueden ser formados por la combinación de compuestos orgánicos de bajo costo, renovables y biodegradables, capaces de asociarse fuertemente mediante enlaces de hidrógeno, generando una mezcla (mezcla eutéctica) de punto de fusión mucho menor al de sus componentes individuales. Estos solventes despertaron gran interés. Numerosas investigaciones sobre los DES en los últimos años han demostrado que poseen propiedades similares a las de los líquidos iónicos, tales como baja volatilidad, estabilidad térmica y alta conductividad, pero a diferencia de éstos, su obtención es mucho menos costosa, más sencilla y limpia (Karimi et al., 2015).

1.3 Solventes de eutéctico profundo (DES)

Los DES se han considerado como una nueva clase de líquidos iónicos, dado que comparten muchas de sus propiedades, aunque obviamente se diferencian de aquellos por su composición. Están compuestos por al menos dos sólidos con capacidad de interactuar fuertemente mediante la formación de enlaces de hidrógeno.

Si se analiza el comportamiento de la mezcla de ambos componentes en un diagrama de equilibrio de fases (Figura 1.2), las curvas de temperatura de fusión convergen generando una depresión en la temperatura de fusión, o punto eutéctico, donde la composición de la mezcla es única (Vigier & Jérôme, 2019).

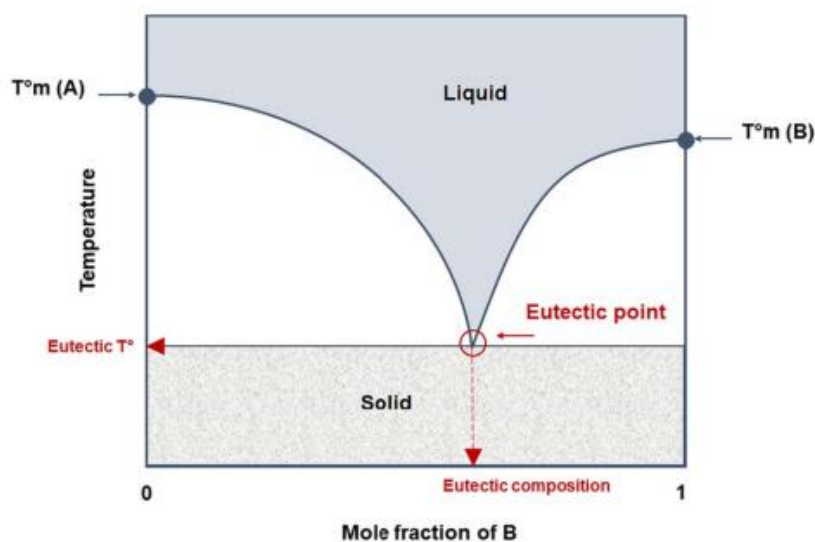


Figura 1.2. Diagrama general de fases sólido-líquido de la mezcla binaria, siendo $T_m(A)$ y $T_m(B)$ las temperaturas de fusión de los compuestos A y B respectivamente. El punto eutéctico está representado por la mínima temperatura de fusión de la mezcla (El Achkar et al., 2021)

La fórmula general de los DES podría ser descripta como Cat^+X^zY , siendo Cat^+ un catión amonio, fosfonio o sulfonio, X una base de Lewis, generalmente un anión haluro, Y un ácido de Lewis o de Brønsted y z el número de moléculas de Y que interactúan con el anión. Pueden ser clasificados en cuatro tipos (Smith et al., 2014), los DES tipo I, formados por una sal cuaternaria y un haluro metálico, los tipo II, compuestos por una sal cuaternaria y un haluro metálico hidratado, los tipo III, integrados por una sal cuaternaria y un donador de enlaces de hidrógeno (HBD) y los tipo IV, constituidos por un haluro metálico y un HBD (Brett, 2018). Además algunos autores definen el término “solventes de eutéctico profundo naturales” (NADES) como los DES formados por metabolitos primarios como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, polioles y derivados de la colina (El Achkar et al., 2021).

Los DES más estudiados son los del tipo III, los cuales son formados por fuertes interacciones de enlaces de hidrógeno entre un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) y un HBD (Brett, 2018). En estos tipos de DES usualmente constituidos por una sal de amonio cuaternaria y un HBD, se establecen 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 (Smith et al., 2014). Cuanto más fuerte es la interacción entre los componentes, mayor es la depresión del punto de fusión (Brett, 2018). Uno de los primeros DES de este tipo estudiado fue el obtenido por la combinación de cloruro de colina (P.f. 302 °C) y urea (P.f. 133 °C) en una proporción molar 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 (Abbott et al., 2002).

Los DES del tipo III formados por cloruro de colina ganaron gran interés por su capacidad de solvatar metales de transición (Smith et al., 2014), esto sumado a que el cloruro de colina, conocido también como vitamina B4, es una sal de amonio cuaternaria de bajo costo y de fácil obtención a partir de biomasa (Brett, 2018; K. Xu et al., 2015) biodegradable y no tóxica (Karimi et al., 2015) y que la combinación del cloruro de colina y donadores de enlaces de hidrógeno amigables con el medio ambiente tales como urea, etilenglicol o

glicerol pueden formar fácilmente una mezcla eutéctica (llamadas relina, etalina y glicelina, respectivamente) a temperatura ambiente (Brett, 2018; Durand et al., 2014), motivó el estudio de los DES formados por cloruro de colina en varias aplicaciones.

Algunas de las aplicaciones de estos DES estudiadas incluyen: desulfurización de combustibles, cromatografía, solubilización de drogas de uso farmacéutico y extracción de proteínas en sistemas bifásicos acuosos. Estas investigaciones responden además a inconvenientes de los procesos con solventes convencionales tales como baja solubilidad, complejidad y altos costos (Cai & Qiu, 2019; Makoś & Boczkaj, 2019; Soltanmohammadi et al., 2020; K. Xu et al., 2015).

Los dos métodos más usados para la obtención de DES son el de calentamiento con agitación y la molienda de los componentes combinados. Existen también en la literatura otros métodos tales como la liofilización de las soluciones acuosas de los componentes y la disolución de los componentes en agua con posterior evaporación a 50°C (El Achkar et al., 2021). Además han surgido estudios en métodos novedosos de formación de DES a partir de la premisa de optimización de energía de la química verde, tales como preparación de DES asistida por microondas y por ultrasonido (Gomez et al., 2018; Santana et al., 2019).

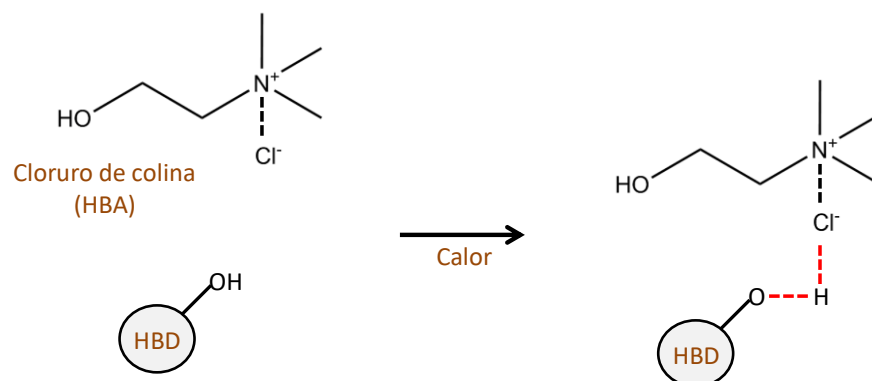


Figura 1.3. Síntesis de un DES formado por cloruro de colina como HBA y un componente HBD genérico

El método más común de síntesis consiste en combinar ambos componentes del DES en la proporción correspondiente a la mezcla eutéctica y someterlos a calentamiento y agitación (Figura 1.3), usualmente a temperaturas de entre 60°C y 100°C, hasta que se forma una

mezcla homogénea (Rodriguez Rodriguez et al., 2019). Se ha investigado además la posibilidad de formar DES mediante extrusión de doble tornillo con buenos resultados, lo que facilitaría su disponibilidad para uso a gran escalas (Crawford et al., 2016). Es destacable que si bien el método de síntesis puede afectar algunas propiedades de los DES, la composición eutéctica no se verá afectada por el mismo (El Achkar et al., 2021).

1.3.1 Propiedades de los DES

Las propiedades fisicoquímicas de los DES, como densidad, viscosidad, tensión superficial, conductividad, temperatura de fusión, miscibilidad y polaridad, dependen de su composición y la relación molar entre los componentes. Esto hace posible que pueda obtenerse un gran número de DES distintos con propiedades a medida (Vigier & Jérôme, 2019).

Los DES pueden ser clasificados como hidrofílicos e hidrofóbicos, siendo los hidrofílicos los que han tomado mayor relevancia en las investigaciones sobre DES en los últimos años. Dentro de los DES hidrofílicos se encuentran los DES del tipo III, los DES naturales y los DES terapéuticos. Estos últimos se encuentran constituidos por un ingrediente farmacéutico activo tales como ácido acetil salicílico, ibuprofeno, o ácido fenilacético y se han estudiado aplicaciones muy prometedoras de los mismos en el campo farmacéutico (Dwamena, 2019).

El concepto de DES hidrofóbico se introdujo en 2015 y derivó de distintas combinaciones de sales de amonio cuaternarias con ácido decanoico. Entre sus aplicaciones se encuentra la extracción de componentes orgánicos insolubles en agua, donde han demostrado una alta eficiencia (Dwamena, 2019).

El punto de fusión de los DES se encuentra entre los -69 y los 149 °C, pudiendo variar tanto en función de la naturaleza de sus componentes, así como de la relación entre ellos. Se ha mencionado también que método aplicado para su obtención puede afectar levemente su punto de fusión (El Achkar et al., 2021; Vigier & Jérôme, 2019). Entre los relativamente pocos DES líquidos a temperatura ambiente, se destacan la combinación de glicerol o urea con cloruro de colina, dada su capacidad de formar fuertes enlaces de hidrógeno.

La densidad de los DES también depende de los componentes del mismo, la relación molar entre estos y el método de preparación utilizado. La mayoría de los DES estudiados presentan densidades de entre 1,0 y 1,3 g/cm³, aunque los DES hidrofóbicos presentan menores densidades que el agua. Obviamente la densidad de un DES es también función de la temperatura, y decrece en general linealmente con el aumento de la misma (El Achkar et al., 2021; Ijardar et al., 2022).

En cuanto a la viscosidad, los DES en general presentan valores relativamente altos, mayores a 100 cp, aunque se han reportado viscosidades menores para DES hidrofóbicos. Esta propiedad obviamente depende también del tipo de componentes del DES, la relación molar entre estos y el método de preparación utilizado. La alta viscosidad se atribuye a la fuerte interacción entre los componentes, lo que limita su movilidad. Como es de esperarse, la viscosidad decrece con el aumento de la temperatura. Por ejemplo, la viscosidad del DES ChCl/urea disminuye de 750 a 169 cp cuando la temperatura se incrementa de 25 a 40 °C. La viscosidad de los DES también se ve afectada en forma significativa por el contenido de agua de los mismos, lo que es relevante ya que varios tipos de DES son altamente higroscópicos. Además, cabe destacar que es deseable para numerosas aplicaciones que la viscosidad del solvente sea la menor posible (El Achkar et al., 2021; Ijardar et al., 2022; Vigier & Jérôme, 2019).

Debido a que los componentes de algunos de los DES son altamente higroscópicos, la presencia de agua en los mismos es casi inevitable y, si bien se la puede considerar un contaminante, en muchos casos resulta conveniente su agregado al medio, ya que puede provocar cambios en sus propiedades fisicoquímicas que resulten ventajosas para el proceso de interés. El agua es capaz de formar enlaces de hidrógeno con cada uno de los componentes del DES, distorsionando el ordenamiento original del solvente “puro”, y se ha demostrado que en muchos casos esto produce mejoras en el rendimiento de las reacciones que se desarrollan en el DES. Sin embargo, obviamente existe una cantidad límite de agua que el DES puede admitir, por encima de la cual se desencadena la disrupción del solvente en sus componentes, pasando a formar una solución acuosa (El Achkar et al., 2019, 2021).

1.4 Los DES como solventes en biocatálisis

Se ha demostrado que los DES pueden disolver una gran cantidad de compuestos utilizados como sustratos de procesos enzimáticos, tales como aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, etc. Asimismo, varias enzimas han mostrado un excelente desempeño en medio DES, a veces superior al mostrado en solventes orgánicos convencionales. Se ha evaluado el desempeño de varios tipos de enzimas en estos solventes, tales como lipasas, catalasas, deshidrogenasas, hidrolasas, oxidasas. Sin embargo, en la mayoría de los casos con foco en reacciones de descomposición en lugar de en reacciones de síntesis (Nian & Li, 2022).

El trabajo de Gorke et al. (2008) es uno de los primeros estudios sobre aplicación de la catálisis enzimática en medio DES. En el mismo se comparó los rendimientos de la reacción de transesterificación de valerato de etilo con 1-butanol en diversos DES y en tolueno, catalizado por las lipasas de *Candida antarctica* (CALB), de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B), lipasa A de *Candida antarctica* (CALA) y de *Pseudomonas cepacia* (PCL). Dentro de los resultados obtenidos se destaca que todas las lipasas mostraron actividad en el DES ChCl:glicerol y que sólo con CALA se obtuvo una conversión menor que con tolueno. Se constató además la ocurrencia de reacciones secundarias en las que participaron los propios componentes de los DES. Se demostró que tanto el etilenglicol como el glicerol competieron en la transesterificación, verificándose en el caso de la reacción en ChCl:etilenglicol catalizada por CALB, la formación de una cantidad muy similar de los valeratos de etilenglicol y de butilo. Por lo tanto, estas investigaciones iniciales no sólo demostraron que las lipasas como catalizadores en medio DES, sino que también mostraron resultados inconvenientes como la existencia de reacciones secundarias (Gorke et al., 2008).

Posteriormente, en el trabajo de Durand et al. (2012), se estudió la transesterificación de laurato de vinilo con tres alcoholes de distinto largo de cadena (1-butanol, 1-octanol y 1-octodecanol) catalizada por la lipasa B de *Candida antártica* inmovilizada en siete tipos de DES, formados por colina o etilamonio de colina. Los resultados mostraron rendimientos similares para la reacción llevada a cabo en tolueno y en los DES ChCl:urea y ChCl:glicerol.

Al igual que en el trabajo Gorke et al. (2008), reportaron la existencia de reacciones secundarias que involucraron a los HBD. Entre éstos, la urea y el glicerol mostraron ser poco reactivos, mientras que el etilenglicol fue muy reactivo. Este fenómeno es relevante, ya que no sólo implica la generación de productos no deseados, sino que a medida que los HBD reaccionan ocurren cambios en la constitución del DES y por ende en sus propiedades (Durand et al., 2012).

Se ha demostrado que en general en medios DES formados por ácidos o alcoholes, éstos componentes son capaces de competir en procesos de transesterificación, si bien la reactividad de los mismos puede ser en algunos casos reducida dada su incorporación en la red de enlaces de hidrógeno que forma al DES (Pätzold et al., 2019).

Obviamente uno de los aspectos de mayor interés radica en el efecto del medio de reacción sobre el catalizador enzimático, lo cual dependerá de varios factores como el tipo de componentes del DES, la actividad de agua del medio, la temperatura, etc. Dadas las características particulares de estos solventes, es interesante notar que algunos factores que podrían suponerse negativos para la actividad enzimática, a juzgar por su efecto en solventes convencionales, pueden resultar indiferentes o incluso beneficiosos en este medio. Por ejemplo, es conocido el efecto desnaturizante de la urea sobre las enzimas cuando se las expone ésta en medio acuoso, sin embargo cuando la urea se encuentra asociada como componente del DES, tal efecto desnaturizante no se manifiesta (Cao et al., 2022a).

Se estudió por medio de simulación de dinámica molecular la interacción entre la relina (ChCl/urea) y la lipasa B de *Candida antarctica*, demostrándose que el mecanismo por el cual la urea desnaturiza a esta lipasa no ocurre, debido a que la urea permanece “atrapada” por su fuerte interacción con el cloruro de colina, lo que no permite su difusión hacia la enzima. No sólo se demostró que el DES no desnaturiza la enzima, sino que se verificó además que los componentes del DES pueden formar enlaces de hidrógeno con la lipasa, lo que le conferiría una mayor estabilidad conformacional (Monhemi et al., 2014).

Al igual que en los solventes convencionales, las enzimas necesitan una mínima actividad de agua en el medio de reacción para mantener su estabilidad y actividad. Esto se suma al efecto del agua sobre las propiedades del DES antes mencionado, por lo que en particular

tanto la disminución de la viscosidad como la preservación de la actividad enzimática parecen ser los roles determinantes del agua en este medio de reacción.

Asimismo, el tipo de reacción a desarrollar debe considerarse a la hora de ajustar el contenido de agua del DES, ya que en procesos de esterificación o interesterificación un exceso de agua puede promover una reacción competitiva de hidrólisis que afecte el rendimiento del proceso de interés. Por lo tanto, la concentración óptima de agua dependerá tanto del tipo de DES, como de la enzima, y de la naturaleza de la reacción de interés (Cao et al., 2022b).

1.5 Síntesis de derivados lipídicos

Por “derivados lipídicos” podría aludirse a un muy extenso número de compuestos vinculados estructuralmente con los lípidos, los que a su vez incluyen múltiples estructuras ya que se los suele definir muy genéricamente como aquellas sustancias insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos. Si dentro de esta diversidad nos restringimos a aquellos derivados de interés tecnológico y, particularmente, a los que encuentran aplicación en la industria alimentaria, el espectro se restringe a derivados de los triglicéridos, ácidos grasos y sus ésteres, fosfolípidos y esteroides y algunos otros pocos grupos.

Si bien varios de ellos se aíslan de fuentes naturales, otros como los ésteres de ácidos grasos específicos o los ésteres de fitoesteroides o fitoestanoles o de azúcares, suelen ser sintetizados mediante diferentes tipos de procesos. Muchas veces estos procesos conducidos mediante catálisis química tradicional presentan varios inconvenientes, tales como la generación de productos de oxidación, pardeamiento de productos, deshidratación y baja selectividad, lo que conduce a productos de muy baja pureza que deben ser sometidos a costosos procesos de refinación.

El creciente interés por procesos más limpios y sostenibles, enmarcados en los principios de la química verde, ha llevado a la búsqueda de métodos alternativos de síntesis que permitan superar dichas dificultades. En este marco, la catálisis enzimática se ha señalado como una alternativa viable para sustituir la catálisis química tradicional, dadas las características de alta especificidad de las enzimas, su eficiente acción a temperaturas moderadas y la

posibilidad de diseñar procesos capaces de preservar la actividad catalítica, reduciendo el peso del costo del catalizador en el proceso.

Sin embargo, cuando se trata de la síntesis de cierto tipo de derivados lipídicos complejos, como los ésteres de ácidos grasos con fitoesteroles o azúcares, se presentan dificultades adicionales, vinculadas fundamentalmente a las diferentes propiedades de sustratos y productos. La síntesis de este tipo de compuestos involucra a sustratos de muy diferente polaridad (fitoesteroles y ácidos grasos o carbohidratos y ácidos grasos, respectivamente). Por lo que uno de los mayores desafíos radica en la selección de un medio de reacción conveniente, en el cual ambos sustratos sean solubles (al menos parcialmente) y en el que la actividad de la enzima se mantenga en un nivel satisfactorio.

1.5.1 Esteres de fitoesteroles

El estudio de los esteroides y sus derivados ha sido objeto de interés en las últimas décadas a partir del hallazgo de que la incorporación en la dieta de esteroides, estanoles, y sus derivados contribuye al descenso del colesterol en sangre. Este efecto se ha relacionado a mecanismos de inhibición de la absorción de colesterol en el intestino delgado (Miao et al., 2014). Particularmente, se ha demostrado que la ingesta de fitoesteroides puede reducir el nivel de colesterol y lipoproteínas de baja densidad en sangre, ambos asociados al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que una ingesta diaria de 0,8 g de fitoesteroides contribuye al mantenimiento de valores normales de colesterol en sangre (Santanatoglia et al., 2023).

El potencial beneficio para la salud demostrado por el consumo de esteroides y estanoles, llevó a que los mismos fueran incluidos en alimentos funcionales, por ejemplo las margarinas enriquecidas con fitoesteroides comercializadas en Europa (Villeneuve et al., 2005). Si bien los esteroides y estanoles pueden ser agregados en su forma libre en alimentos, su baja solubilidad y su alto punto de fusión representan un inconveniente, que se puede evitar si se los incorpora bajo la forma de ésteres (Villeneuve et al., 2005).

Los esteroides de fitoesteroides son comúnmente obtenidos por síntesis química mediante esterificación en medio alcalino. Esta reacción se realiza a temperaturas mayores a 130 °C por períodos prolongados, estas condiciones implican un alto consumo de energía y pueden

generar la oxidación de los ácidos grasos insaturados, deshidratación de los fitoesteroles y pardeamiento de productos (Feng et al., 2021; Miao et al., 2014).

Alternativamente se puede aplicar catálisis enzimática, mediante la cual los esteres de esteroides pueden generarse a partir de la esterificación de ácidos grasos con fitoesteroides o por medio de la transesterificación de los fitoesteroides con triglicéridos o con ésteres metílicos de ácidos grasos. Esta alternativa permite obtener altos rendimientos y, en comparación con la síntesis química, implica condiciones de reacción moderadas y más amigables con el medio ambiente (Feng et al., 2021; Villeneuve et al., 2005).

1.5.2 Esteres de ácidos grasos con azúcares

Los surfactantes son moléculas anfífilas capaces de reducir la tensión superficial en medios acuosos, por lo que se los destina a muy diversas aplicaciones tecnológicas. La mayoría de estos compuestos son de origen sintético obtenidos a partir del petróleo, no biodegradables y tóxicos, lo que los convierte en un problema para el medioambiente ya que se acumulan en aguas y suelos, además de representar un inconveniente para su uso en el área alimentaria (Grüniger et al., 2019).

Los esteres de ácidos grasos con azúcares, también conocidos como glucolípidos, se presentan como una alternativa atractiva, ya que además de poseer también naturaleza anfífila, son inodoros, biodegradables, no tóxicos, no irritantes, y se ha demostrado que poseen actividad antitumoral y antimicrobiana, entre otras. Estas propiedades hacen que los mismos sean utilizados en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y biomédica.

La síntesis de glucolípidos puede llevarse a cabo por reacciones químicas o enzimáticas. La síntesis química de los esteres de ácidos grasos con azúcares se realiza a altas temperaturas en medio alcalino. Esta síntesis implica grandes requerimientos energéticos, uso de solventes orgánicos convencionales y la generación de subproductos no deseados. El uso de altas temperaturas acarrea inconvenientes tales como decoloración, polimerización, ciclación y deshidratación de producto lo que genera bajos rendimientos de reacción (Pérez et al., 2017). Además, esta síntesis no es regioselectiva debido a la cantidad de grupos hidroxilos que poseen los carbohidratos y aunque es posible lograr un proceso regioselectivo, esto implica el uso de técnicas de protección lo cual es inviable a grandes escalas (Kennedy et al., 2006).

La catálisis enzimática de ésteres de ácidos grasos con azúcares puede realizarse mediante la esterificación de azúcares con ácidos grasos o por medio de transesterificación de azúcares con ésteres vinílicos de ácidos grasos (Figura 1.4), con la cual se obtienen mejores rendimientos. Estos rendimientos son mayores debido a que en la reacción de transesterificación ocurre una tautomerización del producto enol (Yang & Huang, 2012).

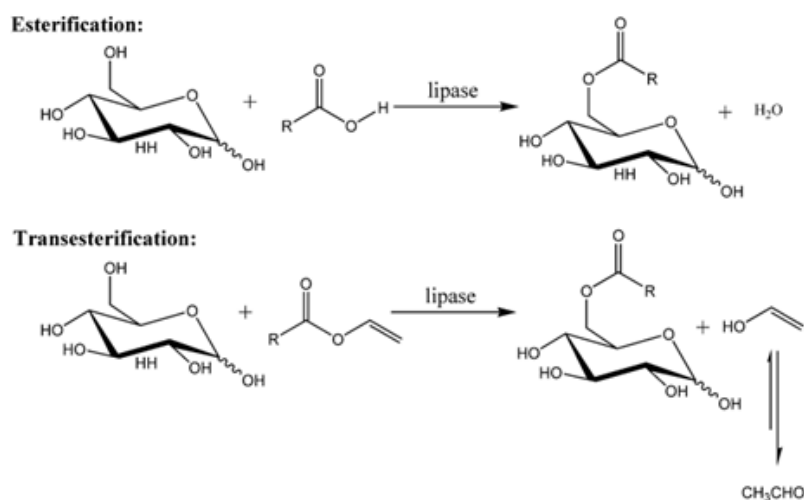


Figura 1.4. Síntesis de ésteres de glucosa en medio no acuoso catalizada por lipasas (Yang & Huang, 2012)

La catálisis enzimática, además de presentar ventajas en cuanto a la regioselectividad, se lleva a cabo en condiciones de reacción moderadas. Se ha estudiado la síntesis enzimática de varios ésteres de ácidos grasos con azúcares en diversos solventes orgánicos convencionales, tales como hexano, acetonitrilo, acetona, 2-Metil-2-butanol, piridina, DMF, DMSO, aunque sólo en algunos de estos los azúcares son solubles. El uso de estos solventes, además, ha sido cuestionado por su toxicidad y por la disminución de la actividad catalítica mostradas por las enzimas expuestas a ellos (Kennedy et al., 2006).

La baja solubilidad de los azúcares en solventes orgánicos es también una de las causas por las que se alcanzan bajos rendimientos en la síntesis de ésteres alquílicos por catálisis enzimática, lo que ha llevado a la investigación de estas reacciones en distintos medios tales como los líquidos iónicos. Si bien los líquidos iónicos tienen la capacidad de solubilizar compuestos de polaridad variable como proteínas y carbohidratos, la actividad enzimática se ve muy disminuida en estos solventes (Yang & Huang, 2012).

Por lo tanto, se ha señalado que el desafío en este campo es la identificación de solventes en los que carbohidratos y los ácidos grasos sean solubles y que a su vez no inhiban la actividad enzimática y favorezcan la regioselectividad (Yang & Huang, 2012).

En 2015 se estudió la síntesis de hexanoato de glucosilo a partir de hexanoato de vinilo y glucosa, catalizada por la lipasa iCAL-B en seis tipos de DES (Pöhnlein et al., 2015), reportándose resultados positivos en los DES ChCl:urea y ChCl:glucosa. En el caso del medio ChCl:glucosa, no fue necesario el agregado de glucosa adicional a la aportada por el propio DES, sin embargo a medida que la glucosa se consumió, el cambio en la relación molar entre los componentes del DES produjo la solidificación del mismo (Pöhnlein et al., 2015).

La ventaja que representa utilizar donadores de enlaces de hidrógeno del DES que además funcionen como sustratos de la reacción para la síntesis de glucolípidos también ha sido reportada por Siebenhaller et al. (2018) en un ambicioso trabajo aplicaron un hidrolizado de fibra de celulosa de madera de haya como sustrato y también como componente del medio DES de reacción. Los resultados mostraron que fue posible generar mono- y diésteres de los azúcares mediante catálisis con la lipasa B de *Candida antártica*.

Pese a estos resultados positivos, no se han reportado altas conversiones en las reacciones de formación de glucolípidos llevadas a cabo en el medio ChCl:glucosa. Esto puede explicarse por varios factores, por un lado destacan la alta viscosidad del DES, lo que enlentece los procesos de transferencia de masa, así como la baja disponibilidad del sustrato, dado que la glucosa forma parte de la red de enlaces de hidrógeno que forma al DES (Hoyos et al., 2021). Sin embargo, también en los trabajos mencionados se evidencia alguna dificultad para cuantificar mediante un método confiable la cantidad de productos generados o los porcentajes de conversión de los sustratos.

Hollenbach et al. (2020) reportan resultados cuantitativos obtenidos en la síntesis de hexanoato de glucosilo en los DES ChCl/urea y ChCl/glucosa, aplicando un método analítico por HPLC con detector ELSD.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar el desempeño de diferentes lipasas comerciales en la catálisis de reacciones de esterificación y transesterificación en varios solventes de eutéctico profundo basados en ChCl, y en particular su aplicación a la síntesis de derivados lipídicos, entre ellos los dos tipos de lípidos complejos de interés tecnológico mencionados: ésteres de esteroides y ésteres de azúcares.

2.2 Objetivos específicos

- a. Poner a punto de métodos analíticos para la extracción y análisis de los productos de interés (derivados lipídicos entre ellos ésteres de esteroides y ésteres de azúcares).
- b. Estudiar el desempeño en solventes orgánicos convencionales de diferentes catalizadores enzimáticos en reacciones de esterificación y transesterificación de derivados lipídicos que involucren ácidos grasos, fitoesteroides y azúcares.
- c. Estudiar el desempeño en diferentes DES basados en cloruro de colina de las lipasas evaluadas en el punto anterior y verificar la eventual participación de los componentes del DES en las reacciones de interés.
- d. En función de los resultados obtenidos en el punto anterior, seleccionar un DES conveniente para estudiar los parámetros determinantes sobre la eficiencia de la síntesis enzimática de ésteres alquílicos en dicho medio.
- e. Seleccionar un DES conveniente para sintetizar ésteres alquílicos de monosacáridos mediante catálisis enzimática en dicho solvente y estudiar los parámetros determinantes en su eficiencia.

CAPÍTULO 3

DESEMPEÑO DE LIPASAS EN LAS REACCIONES DE INTERES EN SOLVENTES ORGÁNICOS

3.1 Introducción

Aunque es conocido que la actividad catalítica de las lipasas varía con el medio de reacción (Y. Liu et al., 2009), resultó de interés verificar el desempeño de las mismas en la catálisis de las reacciones de interés en solventes orgánicos “convencionales”, comúnmente utilizados como medio de reacción para procesos de esterificación y transesterificación catalizados por estas enzimas (Kennedy et al., 2006). Estos ensayos se tomaron como punto de partida para los posteriores ensayos en medio DES, ya que es de esperar que aquellas enzimas que presenten baja actividad frente a determinados sustratos en solventes relativamente “amigables”, encuentran mayor dificultad para actuar en medios de reacción más complejos como los DES.

Para esto se identificaron varias lipasas comerciales, tres inmovilizadas producidas por la empresa Novozymes (la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme[®] TL-IM), la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym[®] 435: iCAL-B) y la de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®] RM-IM)) y la lipasa soluble de *Candida rugosa*. Estas enzimas se hayan dentro de las más utilizadas en trabajos científicos, estando disponibles a nivel comercial desde hace varios años (Bornscheuer, 2014).

La utilización de enzimas inmovilizadas siempre resulta ventajosa dado que facilita su recuperación del medio de reacción para volver a usarlas, además de que mejora su estabilidad y también su actividad catalítica (Sharma et al., 2001). Comúnmente se utilizan varias técnicas de inmovilización entre las que se encuentran la adsorción en soportes sólidos, unión covalente y el atrapamiento en matrices inorgánicas (Poojari & Clarson, 2013).

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es inmovilizada mediante adsorción iónica sobre un soporte de sílica hidrofílica granulada (Fernandez-Lafuente, 2010). Si bien esta lipasa es

relativamente estable en su forma libre, la inmovilización logra otorgarle aún más estabilidad. Se han estudiado varias aplicaciones de esta enzima tales como esterificación de ácidos grasos con diferente tipo de alcoholes así como procesos de transesterificación, por ejemplo para la producción de biodiesel (Fernandez-Lafuente, 2010; Peng et al., 2002).

En el caso de la Lipozyme[®] RM-IM (de *Rhizomucor miehei*) es inmovilizada sobre Duolite ES 562, una resina de intercambio iónico macroporosa formada a base de un copolímero de fenol-formaldehído (Jenab et al., 2014).

Mientras que la mayoría de las lipasas son estables a temperaturas de entre 30 y 40°C estas dos últimas son altamente activas y estables aún a temperaturas entre 60 y 80 °C (Kourist et al., 2010).

El catalizador Novozym[®] 435 está compuesto por la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B) en la resina macroporosa Lewatit[®] VP OC 1600, un copolímero de poli(metacrilato de metilo-co-divinilbenceno) que tiene valores medios de tamaño de partícula, área superficial y diámetro de poro de 315-1000 μ , 130 m²/g y 150 Å, respectivamente (Tambe et al., 2015). Por su alta actividad en reacciones de esterificación ha sido aplicada en la catálisis de procesos muy diversos, incluso en reacciones de esterificación y transesterificación que involucran azúcares, donde demostró muy alta regioselectividad (Poojari & Clarson, 2013). Se ha reportado que su estabilidad térmica en solventes orgánicos es muy superior cuando está inmovilizada que cuando se la utiliza libre. Sin embargo, en algunos casos su actividad en algunos solventes orgánicos puede verse afectada por el hinchamiento de la resina acrílica macroporosa. A su vez, otro inconveniente es la posibilidad de desorción de la enzima de este soporte, lo que puede dificultar su reutilización (Poojari & Clarson, 2013)

Además de estas tres lipasas inmovilizadas resultó interesante evaluar el desempeño de una lipasa “libre”, sin inmovilizar, para lo cual se seleccionó una lipasa comercial de *Candida rugosa*. En general los preparados comerciales de esta lipasa no son homogéneos, conteniendo una mezcla de isoenzimas, una cantidad variable de proteínas, y algún pequeño porcentaje de lactosa. Aunque esta variabilidad en las proporciones de isoenzimas y las diferentes propiedades biocatalíticas de las mismas han sido señaladas como causantes de irreproducibilidad en estudios en medios orgánicos de poca hidratación, se la ha utilizado

para diversas aplicaciones en el campo de la biocatálisis (Domínguez De María et al., 2006).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad enzimática de las diferentes lipasas comerciales descritas en reacciones modelo y en la síntesis de los diferentes compuestos de interés (ésteres de esteroides y ésteres de azúcares) en distintos solventes orgánicos convencionales.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, estándares analíticos y las enzimas comerciales fueron adquiridas a la firma Sigma–Aldrich. Se utilizaron las enzimas lipasa de *Candida rugosa*, lipasa inmovilizada de *T. lanuginosus* (Lipozyme[®] TL-IM), lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B) y la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®] RM-IM).

Para la síntesis de ésteres de fitoesteroides se utilizó una mezcla comercial conteniendo brassicasterol, campesterol y β -sitosterol suministrada por la empresa COGNIS GmbH.

3.2.2 Determinación de la actividad de las diferentes enzimas en hexano

Para la evaluación de la actividad de las diferentes lipasas en hexano se diseñó un método basado en la transesterificación de laurato de vinilo con metanol como reacción modelo. Para ello se preparó una solución madre en hexano conteniendo ambos reactivos: laurato de vinilo (43 mM) y metanol en exceso (157 mM), más un estándar interno no reactivo (hexadecano, 44 mM).

Los ensayos de actividad se realizaron colocando 20 mg de enzima en un vial de 15 mL al que se transfirió 5 mL de la solución madre de reactivos. Inmediatamente el vial fue colocado en un agitador orbital Lab Companion SI-600 termostaticado a 45 °C, dándose inicio al período de incubación ajustando la velocidad de agitación a 150 rpm. Transcurridos diferentes periodos de incubación se retiró el vial del agitador orbital, se lo dejó en reposo durante 15 seg a los efectos de decantar la enzima y se realizó una toma de 1 μ L de la mezcla de reacción, la que fue analizada por cromatografía de gases.

Los análisis se realizaron en un equipo Shimadzu GC-14B, equipado con detector FID y columna capilar Supelco SP 2330 (25 m x 0.5 mm x 0.25 μ m). La temperatura del horno se programó desde 160 hasta 230 °C a una velocidad de calentamiento de 4 °C/min.

A partir de la relación entre las áreas de los picos correspondientes al laurato de metilo (LM) y al hexadecano (IS) obtenidas en el análisis de las muestras recogidas a diferentes períodos de incubación y de la misma relación cuando la reacción se completó (ver ejemplo en Figura 3.1) se determinó el porcentaje de conversión del laurato de vinilo (LV).

$$C_{LV,t} = 100 \cdot \frac{(A_{LM}/A_{IS})_t}{(A_{LM}/A_{IS})_f} \quad [\text{Ec. 3.1}]$$

$C_{LV,t}$: Porcentaje de conversión del laurato de vinilo a tiempo “t”

$(A_{LM}/A_{IS})_t$: Cociente entre las áreas de los picos de laurato de metilo (LM) y hexadecano (IS) obtenidas en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo “t” de reacción.

$(A_{LM}/A_{IS})_f$: Cociente entre las áreas de los mismos picos pero obtenidas en el análisis de la muestra final “f”, correspondiente a la conversión completa del laurato de vinilo.

Asimismo, a partir de la conversión determinada a los 10 min de reacción, se estimó la actividad específica inicial de la lipasa, como se indica a continuación.

$$AE_o = \frac{10000 \cdot [LV]_o \cdot V \cdot (C_{LV10})}{m_L \cdot t} \quad [\text{Ec. 3.2}]$$

AE_o : Actividad específica inicial de la lipasa (μ mol.mg⁻¹.min⁻¹).

$[LV]_o$: Concentración inicial de laurato de vinilo (mM).

V : Volumen de solución (L).

C_{LVo} : Conversión del laurato de vinilo a los 10 min de reacción (%).

m_L : Masa de lipasa (mg)

t : Período de reacción (10 min)

3.2.3 Síntesis de laurato de colesterol en hexano

Se estudió la eficiencia de la transesterificación de colesterol con laurato de vinilo. Para ello se agregaron 50 mg de laurato de vinilo (74 mM, exceso), 10 mg de colesterol (9 mM), 3 mL de hexano y 10 mg de lipasa en un vial de 15 mL. El vial se incubó a 45 °C con agitación orbital a 200 rpm y por un período total de 72 h. Periódicamente se tomaron muestras de 200 µL las que se diluyeron en 2 mL de hexano previo a su análisis por GC.

1 µL de la muestra preparada como se describió anteriormente se analizó en un equipo Shimadzu GC-2010, equipado con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (14 m × 0.53 mm x 0.16 µm, con una precolumna integrada de 2 m x 0.53 mm I.D.). Las temperaturas del inyector y el horno siguieron el mismo programa, que se inició en 80 °C seguido de un calentamiento a 10 °C/min hasta 350 °C. Se utilizó N₂ como gas portador a 70 kPa.

La conversión de colesterol fue determinada a partir de las áreas de los picos del laurato de colesterol y del colesterol residual, tal como se muestra a continuación.

$$\text{Conversión}_{Col} = 100 \cdot \frac{(A_{LC})_t}{(A_{LC} + A_C)_t} \quad [\text{Ec. 3.3}]$$

Conversión_{Col}: Porcentaje de conversión de colesterol a tiempo “t”

(A_{LC})_t : Área de pico de laurato de colesterol (LC) obtenida en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo de reacción “t”.

(A_{LC} + A_C)_t : Suma de las áreas de picos de laurato de colesterol y colesterol obtenidas a tiempo “t”.

3.2.4 Síntesis de alquilatos de colesterol de diferente largo de cadena en hexano

Se evaluó la eficiencia de la reacción de esterificación de colesterol con ácidos grasos y el efecto del largo de cadena de éstos sobre el rendimiento de la misma. Para ello se incubó una mezcla equimolar los ácidos grasos saturados de largo de cadena C6, C8, C10, C12, C14, C16, y C18, cada uno a una concentración 18 mM, colesterol (26 mM) y un estándar interno no reactivo (tricosano 12 mM).

A los efectos de evitar interferencia en el análisis de los productos por GC, las incubaciones se realizaron en dos viales independientes. En un vial de 15 mL se colocó 0,090 milimoles de cada uno de los siguientes ácidos: caproico (C6:0), cáprico (C8:0), mirístico (C14:0) y esteárico (C18:0). En otro vial idéntico se colocó la misma cantidad de cada uno de los siguientes ácidos: caprílico (C10:0), láurico (C12:0) y palmítico (C16:0). A ambos viales se agregaron 20 mg de tricosano (como estándar interno), 30 mg de la lipasa iCAL-B y 5 mL de hexano y fueron incubados a 45 °C y 200 rpm en agitador orbital.

Periódicamente se tomaron muestras de 200 µL de cada vial, las que se transfirieron a un vial con 2 mL de hexano, de donde se extrajo 1 µL para su análisis por GC como se describe en 3.2.3

La identificación de los picos se realizó mediante el análisis de estándares analíticos comerciales y considerando el orden de elución de los picos, correspondiendo mayor tiempo de retención cuanto más largo el ácido graso esterificado al colesterol.

$$C_i = 100 \cdot \frac{A_{Ei}}{(A_{Ei} + A_i)} \quad [\text{Ec. 3.4}]$$

C_i : Porcentaje de conversión del ácido graso i.

A_{Ei} : Área del pico del cromatograma correspondiente al éster de colesterol del ácido graso i.

A_i : Área del pico del cromatograma correspondiente al ácido graso i libre.

3.2.5 Síntesis de ésteres de fitoesteres en hexano

Para la síntesis de ésteres de fitoesteres se realizó la transesterificación de laurato de vinilo con la mezcla de fitoesteres comercial mencionada en el punto 3.2.1.

Para ello se preparó una solución madre en hexano conteniendo los reactivos: 5,00 mg/mL (aproximadamente 12 mM) de la mezcla de fitoesteres y laurato de vinilo en exceso (53 mM) más tricosano (6 mM) utilizado como estándar interno. Se colocó 30 mg de lipasa a un vial de 15 mL en el que se agregó 5 mL de la solución anterior procediéndose a su incubación en las mismas condiciones mencionadas en el punto anterior. Se tomaron muestras de 200 µL a diferentes períodos de incubación, las que se diluyeron mediante el

agregado de 2 mL de hexano. 1 μ L de esta solución fue analizada por GC como se describió en 3.2.3.

El porcentaje de conversión de los esteroides fue calculado a partir de la relación de la suma de las áreas de los picos correspondientes a los esteroides de los fitoesteroides y el estándar interno al período de incubación en que se tomó la muestra con la misma relación cuando se alcanzó la conversión completa, como se muestra a continuación.

$$CEF_t (\%) = 100 \cdot \frac{(\sum A_{EE}/A_{IS})_t}{(\sum A_{EE}/A_{IS})_f} \quad [\text{Ec. 3.5}]$$

CEF_t : Porcentaje de conversión de los fitoesteroides a tiempo “t”

$(\sum A_{EE}/A_{IS})_t$: Cociente entre la suma de las áreas de los picos de esteroides de fitoesteroides (EE) y el pico del tricosano (IS) obtenidas en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo de reacción “t”.

$(\sum A_{EE}/A_{IS})_f$: Misma relación obtenidas del el análisis de la muestra final “f”, correspondiente a la conversión completa.

Asimismo, se determinó la composición de la mezcla comercial de fitoesteroides mediante el análisis por GC de una solución en hexano (0,72 mg/ml) de dicha mezcla mediante el método ya descrito.

3.2.6 Síntesis de laurato de glucosilo en solventes orgánicos convencionales

Se evaluó el desempeño de la lipasa iCAL-B en la reacción de transesterificación de laurato de vinilo con glucosa en tres solventes orgánicos diferentes: acetonitrilo, acetona o 2-metil-2-butanol; dado que la diferente solubilidad de sustratos y productos le confiere mayor complejidad a esta reacción. Para ello se prepararon tres viales de 15 mL conteniendo 200 mg de laurato de vinilo (0,88 milimoles), 150 mg de glucosa (0,83 milimoles), 20 mg de lipasa iCAL-B y 10 mL de solvente. Los viales se incubaron a 50 °C y 250 rpm en agitador orbital. Transcurridas 24 h de la reacción se detuvo la agitación y se tomaron muestras de cada solución para su análisis por cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó una placa de sílica gel G, la que se desarrolló con la mezcla de solventes cloroformo/metanol/ácido

acético/agua (70:20:8:2 vol), según método descrito por Degn et al. (1999). Como referencia se sembró una solución conteniendo la mezcla de glucosa, laurato de vinilo y ácido láurico. Luego de desarrollada, la placa se asperjó con la mezcla metanol/ác. sulfúrico/anisaldehído (50:50:0.5 vol) y se colocó en estufa a 140 °C para su revelado.

Alternativamente se repitió la incubación en 2-metil-2-butanol al que previamente se lo desecó mediante el agregado de tamices moleculares y 24 h de almacenamiento en esas condiciones.

En este caso se tomaron muestras de 200 µL a diferentes períodos, las que se transfirieron a un vial de 15 mL y este se llevó a sequedad bajo una corriente de N₂ para posteriormente proceder a la silanización de los productos y su análisis por GC. Para ello, al vial seco se agregó 100 µL de piridina, 100 µL de reactivo silanizante (N,O-bis(trimetil)silil acetamida (BSA)) y trimetilclorosilano (TMCS) y fue llevado a 70 °C durante 30 min. Posteriormente se agregó 7 mL de hexano y se tomó 1 µL para su análisis por GC.

El análisis se realizó en un equipo Shimadzu GC-2010, con inyector oncolumn PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco METbiodiesel (15 m × 0.32 mm x 0.1 µm). La temperatura inicial del programa fue de 160 °C seguida de un aumento de la temperatura hasta 230 °C a 4 °C/min. Se utilizó N₂ como gas portador a 70 kPa.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Actividad de las diferentes enzimas en hexano

En primer lugar, se procedió a determinar la actividad de las diferentes lipasas comerciales disponibles utilizando una reacción “modelo” (transesterificación de laurato de vinilo y metanol) en un medio orgánico relativamente “amigable” como el hexano. Se eligió laurato de vinilo como sustrato ya que esto permite generar alcohol vinílico como producto de la transesterificación, el que se tautomeriza a acetaldehído, cuya temperatura de ebullición es inferior a la de la incubación, lo que permite su evaporación confiriéndole un carácter irreversible a la reacción (Figura 3.1).

La Figura 3.2 muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a las muestras recogidas a los 40 y 300 min de incubación en el caso de la catálisis con la lipasa Lipozyme RM-IM. La desaparición del pico correspondiente al laurato de vinilo a los 300 min de incubación demuestra que la conversión de este a laurato de metilo se completó.

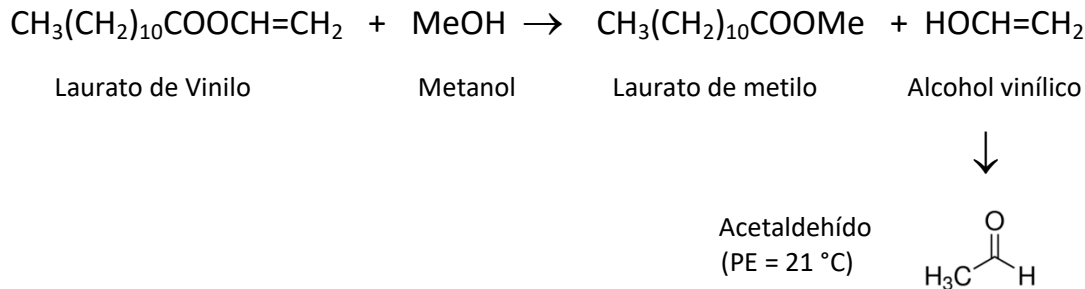


Figura 3.1. Transesterificación de laurato de vinilo con metanol

Dado que todas las incubaciones se realizaron a partir de una misma solución madre de sustratos y estándar interno, la relación de áreas entre el laurato de metilo y el estándar interno correspondientes a la reacción completa $(A_{LM}/A_{IS})_f$ es la misma para cualquier incubación. Esto resultó muy conveniente dado que fue suficiente que la incubación con cualquiera de las lipasas estudiadas alcance el 100 % de conversión para determinar dicho cociente y poder aplicar la Ec. 3.1 para cualquier otro caso, incluida la incubación catalizada por alguna otra lipasa en la que no se alcance la conversión completa.

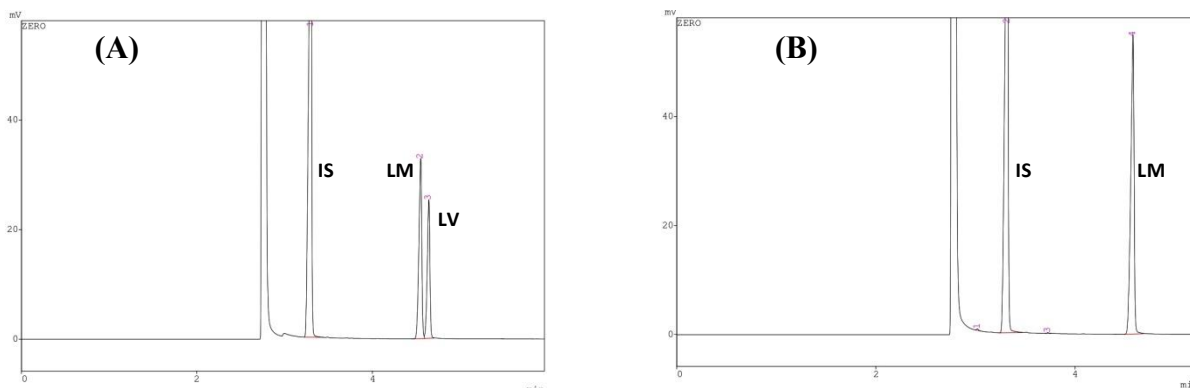


Figura 3.2. Cromatogramas correspondientes al análisis de dos muestras recogidas a diferentes periodos durante la transesterificación de laurato de vinilo con metanol catalizada por la lipasa comercial Lipozyme RM-IM: (A) 40 min de incubación, (B) 300 min de incubación (reacción completa)

La Figura 3.3 muestra el progreso de la conversión del laurato de vinilo al éster metílico ([Ec. 3.1]) durante su transesterificación con metanol en medio hexano, catalizada por las lipasas comerciales de *Candida rugosa*, Lipozyme TL-IM, iCAL-B y Lipozyme RM-IM.

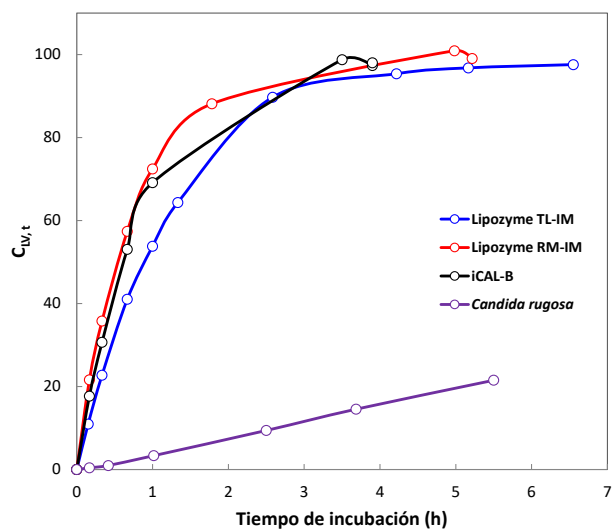


Figura 3.3. Evolución de la conversión de laurato de vinilo a laurato de metilo durante su incubación con metanol en medio hexano, catalizada por las lipasas comerciales de *Candida rugosa*, Lipozyme TL-IM, iCAL-B y Lipozyme RM-IM

Se observa que las tres últimas fueron las que mostraron mayor actividad catalítica, permitiendo alcanzar conversiones a laurato de metilo de 53,8, 69,1 y 72,4 % a los 60 min de reacción, respectivamente, y superando en los tres casos el 90 % de conversión luego de 4 h de reacción. En cambio, la lipasa de *Candida rugosa* evidenció una actividad muy inferior.

La Tabla 3.1 muestra los valores de actividad específica inicial (en μmol de laurato de vinilo esterificado por mg de lipasa por minuto) para cada una de las enzimas, determinada a partir de la conversión alcanzada a los 10 min de incubación.

Tabla 3.1: Actividad específica inicial (AE_0) determinada para las diferentes lipasas en la catálisis de la transesterificación de laurato de vinilo con metanol

Lipasa	AE_0 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
Lipozyme RM-IM	0.24
iCAL-B	0.20
Lipozyme TL-IM	0.13
<i>Candida rugosa</i>	4.3×10^{-3}

Estos resultados muestran que las tres lipasas inmovilizadas fueron las que permitieron alcanzar la conversión completa o casi completa del laurato de vinilo, mostrando actividades específicas del mismo orden frente a esta reacción. En cambio, la lipasa no inmovilizada resultó mucho menos activa, si bien mantuvo una actividad constante durante todo el período de incubación (Figura 3.3). Esto resulta coherente con el mejor desempeño que suelen presentar las enzimas inmovilizadas en solventes orgánicos frente al que presentan las enzimas en su estado libre, dado que es conocido que la inmovilización aumenta su estabilidad y en general potencia su actividad permitiendo una mayor accesibilidad al sitio activo de la proteína (Rodrigues et al., 2013).

3.3.2 Síntesis de laurato de colesterilo en hexano

Si bien es del mayor interés la síntesis de ésteres de la mezcla comercial de fitoesteroles, se optó por realizar los primeros ensayos utilizando un estándar de colesterol como sustrato, dada su similitud estructural con aquellos (Figura 3.4) y a los efectos de evitar la diversidad de productos y sustratos y simplificar la identificación de los mismos al momento del análisis.

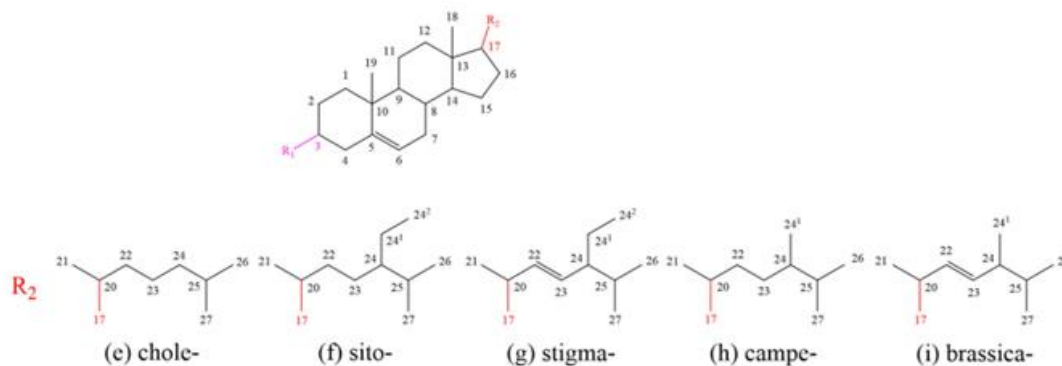


Figura 3.4. Estructura de química del colesterol y fitoesteroles

Se evaluó la eficiencia de la síntesis de laurato de colesterilo mediante la transesterificación de laurato de vinilo y colesterol en medio hexano, utilizando como catalizador la lipasa iCAL-B, dado que fue una de las que mostró alta actividad catalítica en los ensayos anteriores.

Los resultados obtenidos mostraron una velocidad de conversión del colesterol muy lenta. Mientras que en la transesterificación con metanol catalizada por la lipasa iCAL-B el laurato de vinilo alcanzó una conversión de casi 80 % a las 2 h de reacción (ver 3.3.1) en este caso y en condiciones similares el colesterol alcanzó una conversión de tan solo 0,9 % luego del mismo período de incubación. Prolongada la incubación por un período de 72 h, la conversión del colesterol alcanzada fue de tan sólo el 14 %. Esta baja velocidad de reacción puede explicarse por la mayor complejidad de la molécula que contiene la función hidroxilo que participa del proceso (Figura 3.4) y un elevado impedimento estérico para acceder al sitio activo de la enzima.

La Figura 3.5 muestra el cromatograma correspondiente al análisis por GC de la muestra obtenida a las 72 h de incubación, donde se verifica la presencia de ambos reactivos aún sin reaccionar y del laurato de colesterilo generado, pero también un pico adyacente al del laurato de vinilo, el cual se verificó que correspondía al ácido láurico. Este último obviamente sólo puede ser resultado de la hidrólisis de laurato de vinilo catalizada por la enzima, lo cual, si bien en principio podría sorprender ya que se trata de un medio anhidro, puede explicarse por la actividad de agua propia del solvente que no fue deshidratado, así como las trazas de agua aportadas por el catalizador enzimático.

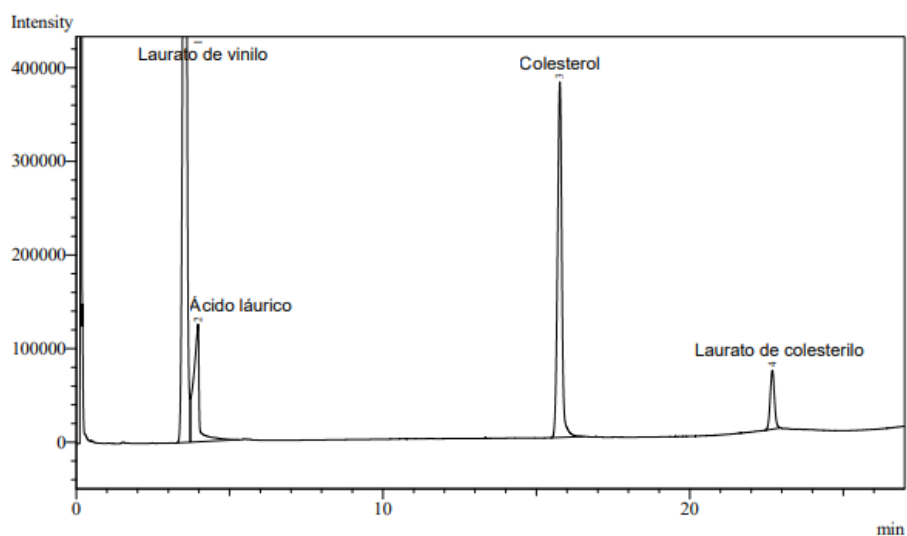


Figura 3.5. Cromatograma obtenido en el análisis por GC de la muestra recogida luego de 72 h de la mezcla de reacción en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol llevada a cabo en hexano, catalizada por la lipasa iCAL-B

Pese a su eventual baja concentración, el agua es un nucleófilo potente, lo cual sumado a la eventual facilidad de acceso del laurato de vinilo al sitio activo del catalizador explica el 15,4 % de hidrólisis alcanzado, prácticamente el mismo valor que el porcentaje de conversión del colesterol.

3.3.3 Síntesis de alquilatos de colesterilo de diferente largo de cadena en hexano

Dada la baja velocidad de formación de laurato de colesterilo verificada en la incubación de colesterol con laurato de vinilo, debida posiblemente a la dificultad del colesterol para acoplarse y alcanzar el centro activo del catalizador enzimático, se decidió explorar el efecto sobre la velocidad de reacción del largo de cadena del otro sustrato, el grupo alquilo participante del proceso. Dado que no se dispuso de una serie de alquilatos de vinilo, se optó por comparar la eficiencia de la reacción de esterificación del colesterol con ácidos grasos saturados de diferente largo de cadena par (de C6:0 a C18:0), en idénticas condiciones que en el caso anterior (solvente, catalizador, temperatura, etc).

Si bien la naturaleza de la reacción cambia con respecto al caso anterior, en que se estudió la transesterificación con un alquilato de vinilo, la esterificación con ácidos grasos libres presenta la ventaja de que la ocurrencia en forma simultánea de la hidrólisis del sustrato no tiene lugar, proceso que compite con el proceso de interés y modifica las condiciones de reacción a lo largo del período de incubación.

La Figura 3.6 muestra la evolución de la conversión de cada uno de los ácidos grasos durante 312 h de incubación. Puede observarse que todas las conversiones aumentaron conforme transcurrió el tiempo de incubación, lo que demuestra que la lipasa se mantuvo activa durante todo el período de incubación. Se observan además claras diferencias entre las velocidades de conversión de los diferentes ácidos grasos, mientras que al final del período de incubación las mayores conversiones fueron las alcanzada por los ácidos caproico (C6:0) y cáprico (C8:0), con valores de 36,3 y 32,3 %, respectivamente, el ácido esteárico (C18:0) se convirtió en sólo 10,4 % en el mismo lapso.

Si bien esto podría sugerir que los ácidos grasos más cortos reaccionan más eficientemente que los más largos, esto no se cumple en todo el rango de largos de cadena, por lo que en principio no se puede afirmar que exista una relación directa clara entre el nivel de conversión alcanzado y el largo de cadena del ácido graso. Sin embargo, si se considera por

separado cada uno de los viales de incubación, uno conteniendo los ácidos C6:0, C10:0, C14:0 y C18:0 y el otro los ácidos C8:0, C12:0 y C16:0, en cada serie sí se verifica que los ácidos grasos más cortos reaccionaron más eficientemente. Esto sugiere que efectivamente tal tendencia existe y que podría ser resultado del más eficiente acceso de los ácidos grasos más cortos al sitio activo de la lipasa. Tal efecto competitivo se manifiesta en cada una de las mezclas incubadas por separado, por lo que los resultados de una y otra no serían comparables dado que son el resultado de dos incubaciones independientes.

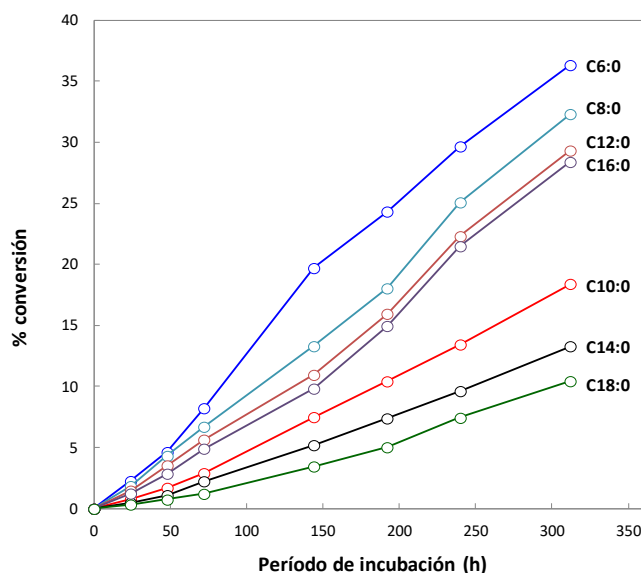


Figura 3.6. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con colesterol catalizada por la lipasa i-CALB en medio hexano

Finalmente, resulta llamativo la baja velocidad del aumento de las conversiones en todos los casos, lo que puede explicarse porque la esterificación con ácidos grasos libres, a diferencia de la transesterificación con alquilatos de vinilo, no cuenta con el efecto potenciador de la eliminación del alcohol vinílico generado, como se explicó anteriormente (Figura 3.1).

3.3.4 Síntesis de ésteres de fitoesteres en hexano

Una vez verificada la actividad de las diferentes lipasas en hexano en la transesterificación de laurato de vinilo con metanol y estudiada la síntesis de ésteres de colesterol catalizada por la lipasa iCAL-B como reacciones modelo, se procedió a estudiar la actividad de las

cuatro lipasas utilizadas en el mismo medio, pero frente a una reacción destinada a la obtención de los ésteres de esteroides de interés. Se optó por la transesterificación con laurato de vinilo dada la ventaja ya mencionada para este proceso frente a la esterificación con el ácido graso libre.

En la Figura 3.7 se muestra la evolución de la conversión total de los fitoesteroides contra el período de incubación en la reacción de transesterificación de la mezcla de los mismos con laurato de vinilo en exceso en medio hexano, catalizada por las enzimas comerciales mencionadas anteriormente.

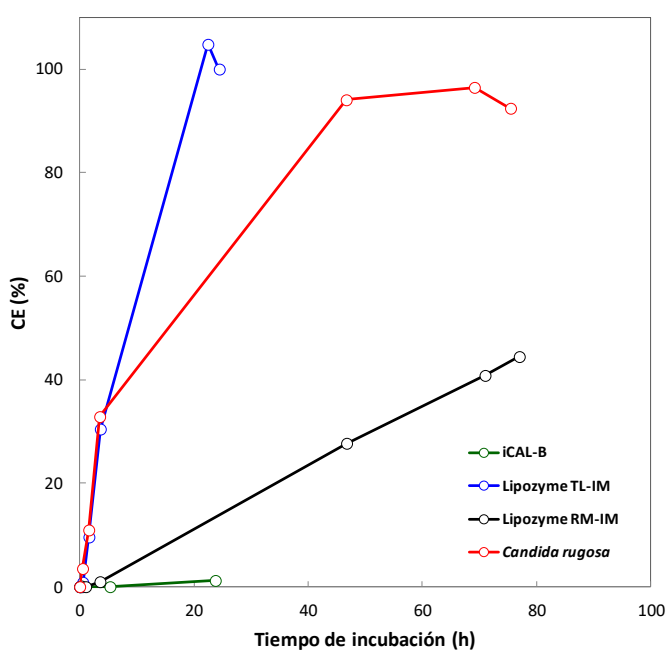


Figura 3.7. Evolución de la conversión de una mezcla de fitoesteroides a sus respectivos lauratos durante su incubación con laurato de vinilo catalizada por las lipasas iCAL-B, Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM y Candida rugosa

Se observa que la lipasa que resultó más activa fue la Lipozyme TL-IM, que permitió alcanzar prácticamente la conversión completa de los fitoesteroides luego de unas 20 h de reacción. Este resultado es coherente con su desempeño en la transesterificación de laurato de vinilo con metanol, ya que esta lipasa fue también una de las más activas en la catálisis de dicho proceso.

Sin embargo, a diferencia de lo observado en la reacción con metanol, la lipasa de *Candida rugosa* fue la segunda en actividad catalítica, permitiendo superar el 90 % de conversión de

los fitoesteres luego de 45 h de reacción. Este resultado fue muy llamativo dado que por ser una lipasa no inmovilizada se esperaba un desempeño menos eficiente. Sin embargo, también debe tenerse en cuenta que la lipasa de *Candida rugosa* no está inmovilizada, por lo que al carecer de soporte que “aporta peso” al catalizador, una muy elevada proporción de la masa de catalizador corresponde a la masa de enzima propiamente dicha (proteína), por lo que la masa “real” de catalizador utilizada en las incubaciones con esta lipasa es superior a la utilizada en las incubaciones donde se usaron las enzimas inmovilizadas.

Por el contrario, la lipasa iCAL-B, que había mostrado una muy alta actividad catalítica en la reacción de transesterificación de laurato de vinilo con metanol, permitiendo alcanzar prácticamente la conversión completa a laurato de metilo en 3 h de reacción (Figura 3.3), mostró una mínima actividad en este caso, no alcanzándose el 1 % de conversión luego de 30 h de reacción.

En el caso de la catálisis con Lipozyme RM-IM la conversión aumentó más lentamente que en los casos de las lipasas Lipozyme TL-IM y *Candida rugosa*, pero mostró un aumento prácticamente lineal en todo el período de incubación, lo que sugiere que, si bien su actividad catalítica fue relativamente moderada, esta se mantuvo constante.

Obviamente no es de esperarse que en la transesterificación frente a sustratos como los fitoesteres las lipasas manifiesten una actividad similar a la determinada en transesterificación con metanol, pero las grandes diferencias en cuanto a la eficiencia relativa entre las cuatro enzimas estudiadas resultaron llamativas.

Dada la característica de especificidad de los catalizadores enzimáticos, un aspecto adicional que resulta interesante verificar se relaciona con la existencia de algún grado de preferencia de las diferentes lipasas estudiadas por alguno de los fitoesteres de la mezcla, considerando que las diferencias estructurales (Figura 3.8) podrían tener algún impacto sobre este parámetro.

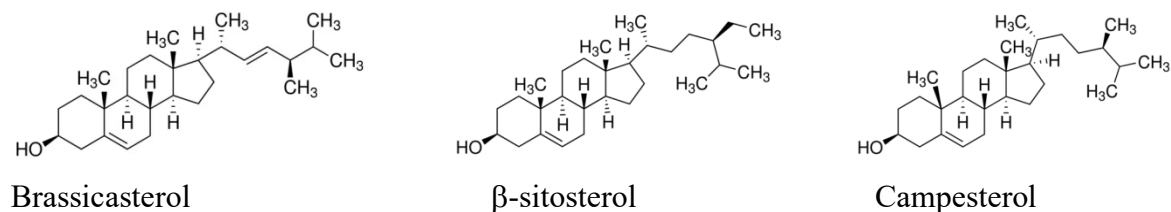


Figura 3.8. Estructuras del brassicasterol, β -sitosterol y campesterol

La Figura 3.9 muestra la composición porcentual de la fracción de ésteres de fitoesteroles durante el período de la reacción catalizada por cada una de las lipasas. Los resultados muestran que el porcentaje de cada uno de los ésteres se mantiene prácticamente constante durante todas las incubaciones y en valores similares a los porcentajes de los correspondientes fitoesteroides en la mezcla de partida: 50,5 % β -sitosterol, 39,4 % Campesterol y 10,1 % brassicasterol. Esto demuestra que ninguna de las enzimas presentó preferencia por alguno de los sustratos. Lo anterior puede relacionarse con las diferencias estructurales que presentan los sustratos, que involucran el extremo de la molécula diametralmente opuesto al hidroxilo, que es esterificado en la reacción, por lo que la interacción de cualquiera de ellos con el centro activo de la lipasa tendrá una probabilidad proporcional a su concentración en el medio de reacción.

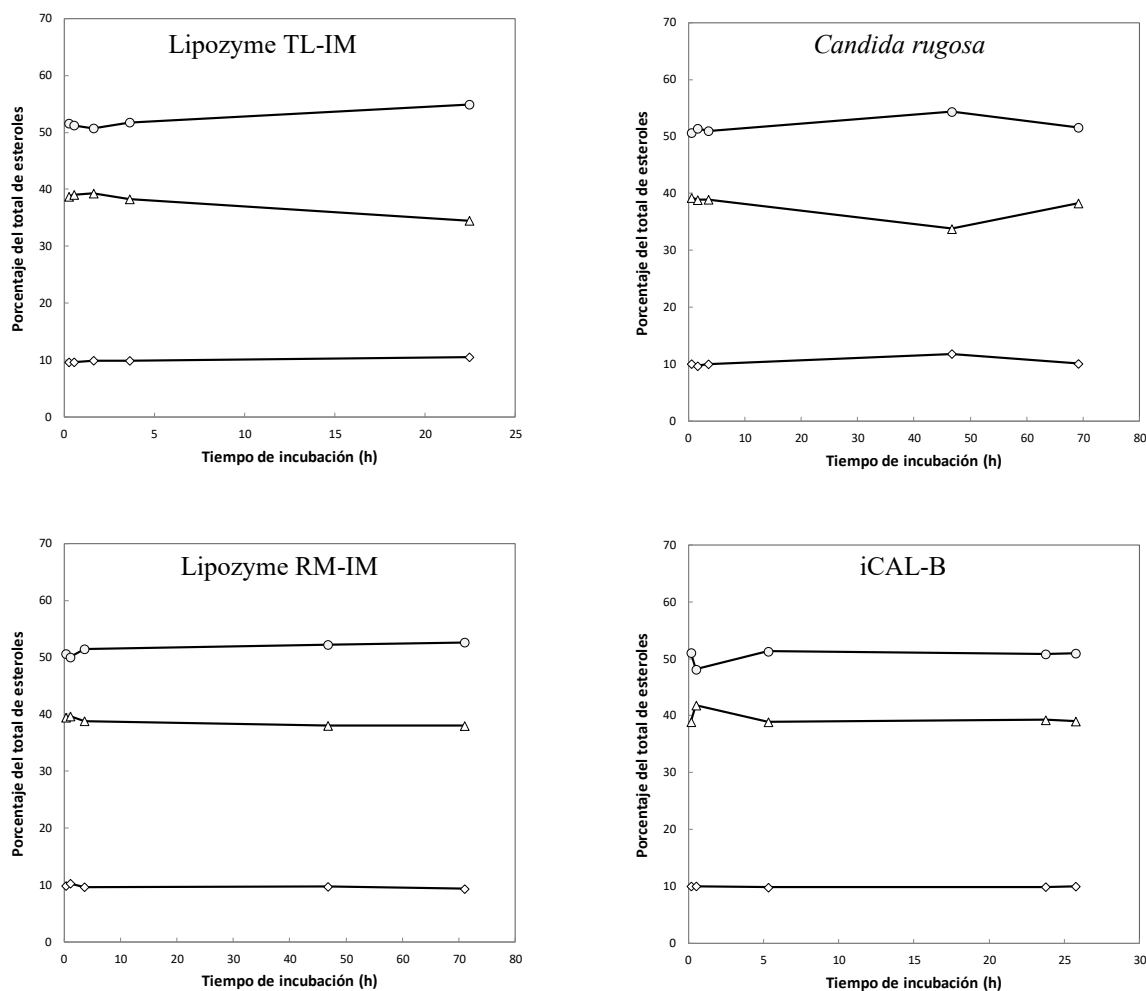


Figura 3.9. Composición de la fracción de ésteres de fitoesteroides durante la reacción de esterificación de la mezcla de fitoesteroides con laurato de vinilo catalizada por las cuatro lipasas estudiadas: laurato de β -sitosterilo (\circ), laurato de campesterol (Δ), laurato de brassicasterilo (\diamond)

Si bien estos ensayos permitieron verificar el nivel de actividad de las diferentes enzimas comerciales disponibles, también dejó en evidencia que la actividad relativa de las mismas puede modificarse drásticamente según el tipo de reacción y la naturaleza de los sustratos, como era de esperar. Asimismo, el cambio de medio de reacción seguramente jugará un rol determinante sobre la actividad enzimática, por lo que resulta imprescindible evaluar también el nivel de actividad en los diferentes DES de interés.

3.3.5 Síntesis de laurato de glucosilo en solventes orgánicos convencionales

Así como se verificó que las lipasas fueron activas en reacciones que tienen como producto ésteres de esteroides y ésteres de ácidos grasos en solventes convencionales, resultó interesante verificar su desempeño en la síntesis de ésteres de azúcares. En este caso se optó por sustituir el hexano por solventes donde los azúcares presenten una mayor solubilidad, como acetonitrilo, acetona y 2-metil-2-butanol, los que ya fueron reportados por Arcens et al. (2020) como posibles medios para reacciones que involucran a carbohidratos.

Se procedió entonces a verificar la posibilidad de sintetizar laurato de glucosilo en cada uno de los solventes mencionados, mediante la transesterificación de laurato de vinilo con glucosa. Como catalizador se optó por la lipasa iCAL-B, dado que varias referencias la describen como activa en la catálisis de la síntesis de diferentes ésteres de azúcares, tanto en solventes orgánicos (Grüninger et al., 2019) como en DES (Pöhnlein et al., 2015; Siebenhaller, Hajek et al., 2017; Siebenhaller et al., 2017).

Luego de 24 h de reacción el análisis de los productos por TLC mostró una incipiente generación de productos correspondientes a los lauratos de glucosilo de interés, siendo relativamente más intensa la mancha correspondiente a dichos productos en el sembrado de la muestra incubada en 2M-2BuOH.

Habiéndose verificado que la lipasa iCAL-B fue activa en la síntesis de lauratos de glucosilo y su relativo mejor desempeño en 2M-2BuOH, se procedió a ensayar diferentes métodos analíticos que permitieran cuantificar el grado de avance de la reacción: HPLC, TLC-escáner y GC). Entre ellos se optó por la cromatografía gaseosa, previa derivatización de los productos de reacción mediante silanización, como se describió en el punto “3.2.6”.

Asimismo, dado que por su polaridad el solvente elegido es capaz de contener agua en cantidad importante que puede interferir en la reacción de interés, se procedió a repetir la

incubación, pero con el solvente previamente deshidratado mediante su almacenamiento con tamices moleculares.

La Figura 3.10 muestra el análisis por GC de los productos obtenidos en la incubación de glucosa y laurato de vinilo catalizada por iCAL-B en 2M-2BuOH deshidratado a las 72 h de reacción.

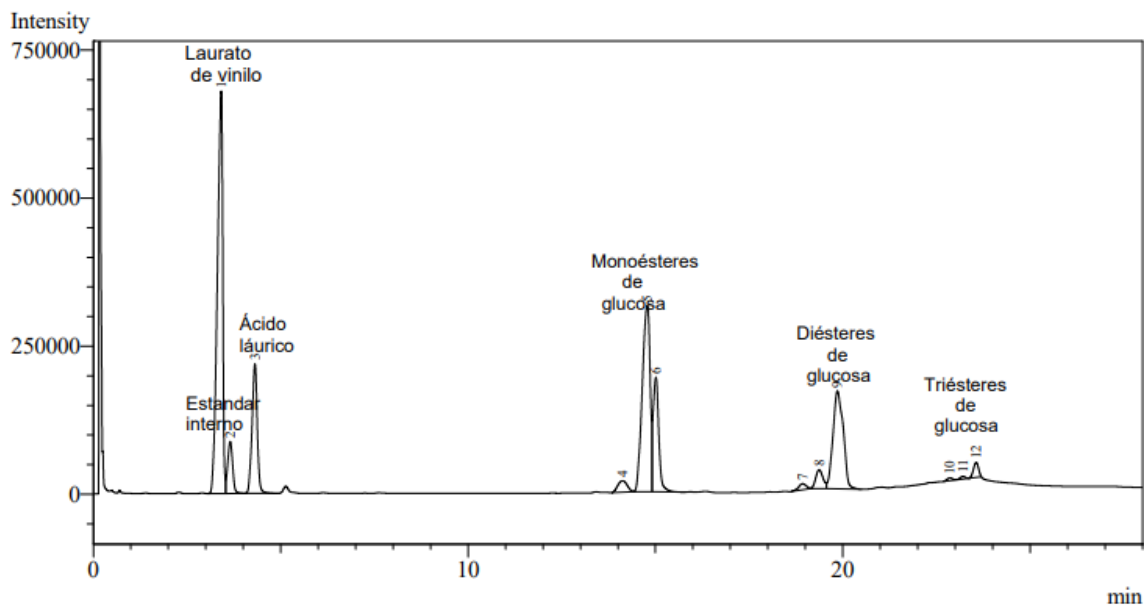


Figura 3.10. Cromatograma obtenido en el análisis por cromatografía gaseosa de los productos obtenidos luego de 72 h de incubación de laurato de vinilo con glucosa en 2-metil-2-butanol (deshidratado) catalizada por la lipasa iCAL-B

Los resultados indicaron que la glucosa fue esterificada totalmente y que se produjeron mono-, di- y trilauratos de glucosilo, de mayor a menor proporción en este orden.

Esto permitió verificar que la enzima fue activa en la síntesis de interés y además, diseñar una herramienta analítica que permitirá medir el grado de conversión en los ensayos de interés en medio DES.

3.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron determinar y comparar la actividad de diferentes lipasas comerciales en hexano en reacciones modelo y en varias de las reacciones de interés a estudiar en esta tesis.

En la transesterificación de laurato de vinilo con metanol, como era de esperarse, las tres lipasas inmovilizadas (Lipozyme RM-IM, iCAL-B y Lipozyme TL-IM) mostraron una mayor actividad catalítica que la lipasa soluble de *Candida rugosa*. Sin embargo, esta última mostró una muy alta actividad catalítica en la transesterificación de laurato de vinilo con una mezcla de fitoesteres, comparable a la desarrollada por la inmovilizada Lipozyme TL-IM.

Una de las enzimas que aparece como la más atractiva es la iCAL-B, ya que mostró un muy buen desempeño en la mayoría de las reacciones estudiadas. Particularmente, en el caso de la esterificación de ácidos grasos libres con colesterol catalizada por esta enzima se verificó una mayor eficiencia en la esterificación con los ácidos de menor largo de cadena.

Si bien debe esperarse un comportamiento diferente de estas lipasas cuando en lugar de utilizarlas en solventes orgánicos se las exponga a un medio DES, los resultados obtenidos constituyen un punto de partida fundamental para conocer el desempeño de las mismas frente a las diferentes reacciones de interés.

CAPÍTULO 4

DESEMPEÑO DE LAS LIPASAS DE INTERÉS EN MEDIO DES

4.1 Introducción

Se ha demostrado la viabilidad del uso de solventes tipo DES como medio de reacción en catálisis enzimática y que en algunos casos incluso potencian la actividad, estabilidad, enantioselectividad y regioestabilidad de ciertas enzimas (Cao et al., 2022a).

Existen variables que deben ser tenidas en cuenta a la hora de utilizar DES como solventes en este tipo de reacciones. Entre ellas la naturaleza de los donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) que componen al DES, ya que esto es determinante sobre las propiedades físicas de los mismos, entre ellas la viscosidad, la cual afecta los fenómenos de transferencia de masa de reactivos y productos y por ende la eficiencia de las reacciones (P. Xu et al., 2017).

Por estos motivos es esperable que existan combinaciones sustrato/lipasa/DES capaces de ofrecer un sistema conveniente para maximizar el rendimiento de un proceso de interés, mientras que existirán otras combinaciones menos eficientes.

Por lo tanto, así como se estudiaron reacciones “modelo” en un solvente orgánico convencional, resulta imprescindible estudiar el efecto de reemplazar este solvente por los DES de interés de este trabajo.

Uno de los parámetros relevantes sobre el desempeño de catalizadores enzimáticos en medio DES lo constituye la actividad de agua. Es conocido que el contenido de agua en el DES es determinante sobre la actividad y estabilidad de proteínas.

Naturalmente el agua puede actuar como donador y aceptor de enlaces de hidrógeno debido a su alta polaridad y es por este motivo que es capaz de interactuar con los distintos componentes higroscópicos de los DES (El Achkar et al., 2019). La red de enlaces de hidrógeno que compone a los DES hace que estos sean altamente higroscópicos y miscibles en agua, por lo que es inevitable su presencia en estos (Hammond et al., 2017). El agua en DES rompe los enlaces de hidrógeno que lo constituyen lo que provoca mayor movilidad

iónica de sus componentes. Este fenómeno condice a un descenso del punto de fusión, la densidad y la viscosidad del DES. Por lo tanto, el estudio del comportamiento de los DES en presencia de agua es relevante ya que además esta influye en la reproducibilidad de los resultados (Hammond et al., 2017).

Es de esperarse que exista un rango de hidratación de DES en el cual este pase de ser una mezcla eutéctica a una solución acuosa. En la investigación llevada a cabo por Hammond et al. (2017) se estudiaron distintas proporciones de agua en el DES ChCl:urea mediante dispersión total de neutrones y potencial empírico de refinamiento estructural. El trabajo demostró que relaciones molares de agua/ChCl menores o iguales a 1 fortalecían los enlaces entre el ChCl y la urea, valores entre 2 y 10 los debilitaban sin causar la disrupción del DES, mientras que una relación superior a 15 las interacciones entre los componentes del DES se anulaban y el sistema se convertía en una solución acuosa.

En el mismo sentido, Durand et al. (2014) demostraron que ese mismo DES puede integrar a su red de enlaces de hidrógeno una cantidad de agua correspondiente a la relación molar agua/ChCl de 1,75, la cual no estaría totalmente disponible para actuar en la necesaria hidratación de la enzima.

En este capítulo se estudió el desempeño en diferentes solventes DES tipo III basados en cloruro de colina de las lipasas comerciales mencionadas en el capítulo anterior. Por lo mencionado anteriormente, se estudió también el efecto de la concentración de agua en el medio de reacción.

4.2 Materiales y métodos

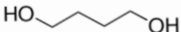
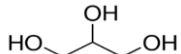
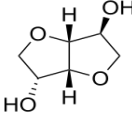
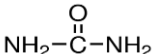
4.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, estándares analíticos y las enzimas comerciales fueron adquiridas a la firma Sigma–Aldrich (Burlington, MA, Estados Unidos). Se utilizaron las lipasas de *Candida rugosa*, de *T. lanuginosus* inmovilizada (Lipozyme[®] TL-IM, inmovilizada), y la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B).

4.2.2 Síntesis de los DES

El cloruro de colina (ChCl) y los diferentes HBD (1,4-butanodiol, glicerol, isosorbida y urea) fueron secados en desecador a vacío con sílica gel durante 48 h previo a su uso. Los componentes de los distintos DES se combinaron en un matraz hermético según la relación molar mostrada en Tabla 4.1. La mezcla se mantuvo en un agitador orbital a 60 °C y 250 rpm hasta que se verificó la integración de ambos componentes, evidenciada por la formación de una fase líquida límpida.

Tabla 4.1: Componentes HBD de los DES formados derivados del ChCl, y relación molar HBD/ChCl

Solvente	HBD	(HBD/ChCl) _{molar}
DES 1	1,4-Butanodiol	3
		
DES 2	Glicerol	2
		
DES 3	Isosorbida	2
		
DES 4	Urea	2
		

4.2.3 Transesterificación de laurato de vinilo con metanol en DES 2

Se agregó 50 mg (0,2 mmol) de laurato de vinilo, metanol en exceso 250 μ L (6,2 mmol), 5 g de DES 2 y 20 mg de enzima a un vial de 15 mL, el cual se incubó durante 5 h en un agitador orbital a 200 rpm y 45 °C. Se tomaron muestras de 400 μ L a diferentes períodos de incubación, las que se transfirieron a un vial conteniendo 2 mL de agua, el que se agitó en vortex, a los efectos de generar la disrupción del DES. Posteriormente se agregó 1 mL de hexano y se repitió la agitación. Se tomó 1 μ L de la fase orgánica para su análisis por GC.

Alternativamente se realizaron incubaciones en idénticas condiciones, pero utilizando agitación magnética, a los efectos de comparar la eficiencia de ambas modalidades de agitación.

Los análisis se realizaron en un equipo Shimadzu GC-14B, equipado con detector FID y columna capilar SP 2330 (25 m x 0.5 mm x 0.25 μ m). La temperatura del horno se programó desde 160 hasta 230 °C a una velocidad de calentamiento de 4 °C/min.

La conversión de laurato de vinilo fue determinada a partir de las áreas de picos de laurato de metilo y laurato de vinilo tal como se muestra a continuación.

$$\text{Conversión LV} = 100 \cdot \frac{(A_{LM})_t}{(A_{LM}+A_{LV})_t} \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

Conversión LV: Porcentaje de conversión del laurato de vinilo a tiempo “t”

$(A_{LM})_t$: Área de pico de laurato de metilo (LM) obtenida en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo de reacción “t”.

$(A_{LM} + A_{LV})_t$: Suma de las áreas de picos de laurato de metilo y laurato de vinilo obtenidas a tiempo “t”.

Las incubaciones con cada modalidad de agitación se realizaron por triplicado y se informaron los resultados promedio.

4.2.4 Desempeño de la lipasa iCAL-B en la síntesis de ésteres de colesterol en los diferentes DES

Se agregó laurato de vinilo en exceso 50 mg (0,2mmol), 10 mg (0,03 mmol) de colesterol, 10 mg de tricosano (0,03 mmol, utilizado como estándar interno), 3 g de DES (DES 1, 2, 3 o 4) y 10 mg de lipasa iCAL-B en viales de 15 mL, los cuales se incubaron a 45 °C durante 48 h en agitación orbital a 200 rpm.

Alternativamente se repitió la incubación en medio DES 4, en las mismas condiciones pero con un exceso mayor de laurato de vinilo (100 mg) y con el doble de lipasa, la que se prolongó por un período de 144 h.

En todos los casos se tomaron muestras de 200 μL a diferentes períodos de incubación. Las mismas se diluyeron en 1 mL de agua, se agitó, se agregó 2 mL de hexano y se repitió la agitación. Se tomó 1 μL de la fase orgánica para su análisis por GC.

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu GC-2010, equipado con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (14 m \times 0.53 mm \times 0.16 μm , con una precolumna integrada de 2 m \times 0.53 mm I.D.). Las temperaturas del inyector y el horno siguieron el mismo programa, que se inició en 80 $^{\circ}\text{C}$ seguido de un calentamiento a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 350 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó N_2 como gas portador a 70 kPa.

La conversión de colesterol fue determinada a partir de las áreas de picos de laurato de colesterilo y colesterol tal como se muestra a continuación.

$$\text{Conversión}_{Col} = 100 \cdot \frac{(A_{LC})_t}{(A_{LC}+A_C)_t} \quad [\text{Ec. 4.2}]$$

Conversión_{Col}: Porcentaje de conversión de colesterol a tiempo “t”

$(A_{LC})_t$: Área de pico de laurato de colesterilo (LC) obtenida en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo de reacción “t”.

$(A_{LC} + A_C)_t$: Suma de las áreas de picos de laurato de colesterilo y colesterol obtenidas a tiempo “t”.

4.2.5 Efecto de la concentración de agua en el DES 4 en el desempeño de la lipasa iCAL-B en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol

Se procedió de la misma manera que se describió en el punto anterior en el caso del medio de reacción DES 4 (ChCl/urea), pero realizando diferentes agregados de agua, correspondientes a las relaciones molares agua/ChCl (R) iguales a 1, 1,5 o 2.

El mismo análisis por GC descrito en el punto anterior permitió determinar el porcentaje de hidrólisis de laurato de vinilo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ hidrólisis} = 100 \times \frac{A_{AL}}{A_{LV}+A_{AL}} \quad [\text{Ec. 4.3}]$$

A_{AL} : Área del pico del cromatograma correspondientes al ácido láurico.

A_{LV} : Área de pico del cromatograma correspondientes al laurato de vinilo.

4.2.6 Desempeño de la lipasa iCAL-B en la esterificación de ácido láurico con colesterol en DES 4

Se agregó ácido láurico en exceso 50 mg (0,25 mmol), 10 mg de colesterol (0,03mmol), 10 mg de tricosano (0,03 mmol utilizado como estándar interno), 3 g de DES y 20 mg de lipasa a 3 viales de 15 mL. A cada uno de los viales se les agregó 1, 1,5, o 2 moles de agua por mol de $ChCl$. Los viales se incubaron a 45 °C durante 24 h en agitación orbital a 200 rpm. Se tomaron muestras de 200 μL a diferentes períodos de incubación. Las mismas se diluyeron en 1 mL de agua y se agitó con vortex, luego se agregó 2 mL de hexano y se repitió la agitación. Se dejó decantar unos segundos hasta separación de las fases y se tomó 1 μL de la fase orgánica para su análisis por GC.

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu GC-2010, equipado con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (14 m \times 0.53 mm \times 0.16 μm , con una precolumna integrada de 2 m \times 0.53 mm I.D.). Las temperaturas del inyector y el horno siguieron el mismo programa, que se inició en 80 °C seguido de un calentamiento a 10 °C/min hasta 350 °C. Se utilizó N_2 como gas portador a 70 kPa.

La conversión de colesterol fue determinada a partir de las áreas de picos de laurato de colesterilo y colesterol tal como se muestra a continuación.

$$\text{Conversión}_{Col} = 100 \cdot \frac{(A_{LC})_t}{(A_{LC}+A_C)_t} \quad [\text{Ec. 4.4}]$$

Conversión_{Col} : Porcentaje de conversión de colesterol a tiempo “t”

$(A_{LC})_t$: Área de pico de laurato de colesterilo (LC) obtenida en el análisis por GC de la muestra recogida al tiempo de reacción “t”.

$(A_{LC} + A_C)_t$: Suma de las áreas de picos de laurato de colesterilo y colesterol obtenidas a tiempo “t”.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Transesterificación de laurato de vinilo con metanol en DES 2

La viscosidad del medio de reacción puede ser un factor determinante sobre la eficiencia de una reacción dado su efecto sobre los fenómenos de transferencia de masa (H. Zhao et al., 2011a). Esto es especialmente importante en procesos que transcurren en sistemas heterogéneos, como en el caso de este trabajo en que se ensayaron varios catalizadores sólidos.

Dado que la viscosidad de los DES suele ser muy superior a la de los solventes convencionales, estos fenómenos deben ser considerados cuando se los pretende estudiar como medio de reacción. Asimismo, los valores de viscosidad son muy variables con la naturaleza del DES. Por ejemplo, la viscosidad del DES 2 (ChCl/glicerol) a 50 °C es algo inferior a 80 mPa.s, mientras que a la misma temperatura la viscosidad del DES 4 (ChCl:urea) es cercana a 120 mPa.s (H. Zhao et al., 2011b).

Para minimizar la resistencia a la transferencia de masa, deberá seleccionarse un sistema de agitación adecuado, que permita generar una eficiente turbulencia en el medio de reacción. Por este motivo se decidió ensayar dos modalidades de agitación, la agitación orbital que se usó en los ensayos en solventes orgánicos y agitación magnética.

Para esto se seleccionó el DES 2 ya que presenta una viscosidad moderada en comparación con los otros DES estudiados y la enzima comercial Lipozyme TL-IM, la cual mostró una elevada actividad en la reacción modelo de transesterificación de laurato de vinilo con metanol en hexano, (Capítulo 3, sección 3.3.1), que es la misma reacción modelo a estudiar en este caso.

En la Figura 4.1 se muestran los resultados de conversión de laurato de vinilo durante su transesterificación con metanol catalizada por Lipozyme TL-IM en medio DES 2, llevada a cabo con agitación magnética u orbital. En primer lugar, se observa que, independientemente de la forma de agitación utilizada, la enzima fue capaz de expresar su actividad catalítica en este solvente, de características muy diferentes a la de los solventes orgánicos convencionales.

Se observa también que se alcanzaron conversiones cercanas a 70 % en un período de 5 h de reacción y se verificó que el avance de la reacción fue similar con los distintos tipos de agitación.

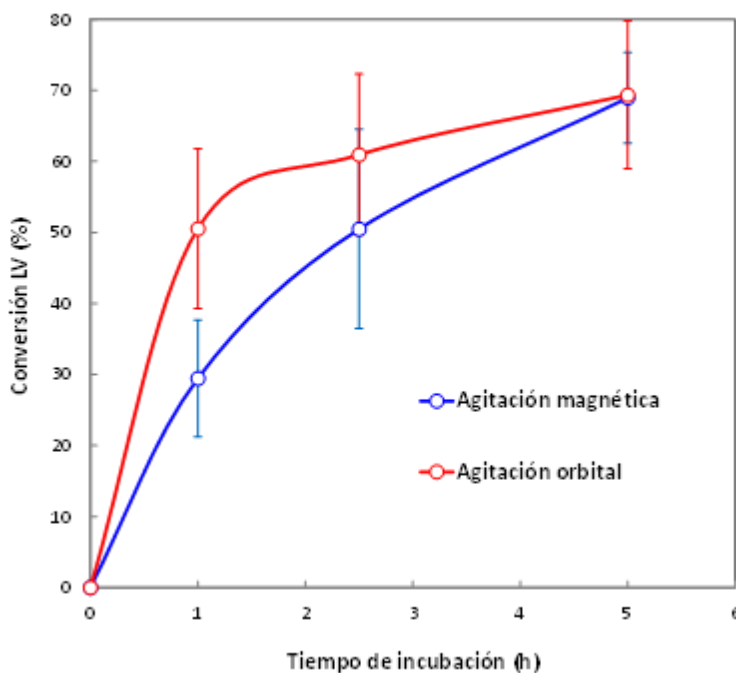


Figura 4.1. Evolución de la conversión del laurato de vinilo durante su transesterificación con metanol en medio DES 2, catalizada por la lipasa lipozyme TL-IM, utilizando dos modalidades de agitación (magnética y orbital)

Estos resultados demuestran que la agitación magnética no parece ofrecer una ventaja real frente a la agitación orbital. Esto, sumado a que el agitador orbital permite incubar un mayor número de viales en forma simultánea y que, a diferencia de la agitación magnética, no provoca ningún efecto erosivo sobre el soporte sólido de la enzima, determinó que en adelante las incubaciones en medio DES se continuaran realizando utilizando agitación orbital.

Definida la modalidad de agitación, se evaluó la actividad de las lipasas de *Candida rugosa* e iCAL-B en el DES 2 frente a la misma reacción, ya que ambas lipasas habían mostrado diferente actividad catalítica en medio hexano frente a esta reacción (3.3.1).

En la Figura 4.2 se muestra el progreso de la conversión del laurato de vinilo cuando su transesterificación se catalizó por estas dos lipasas, junto con el mostrado en la Figura 4.1 para la Lipozyme TL-IM. Se observa que la lipasa de *Candida rugosa* fue totalmente inactiva en las condiciones de reacción, mientras que la lipasa iCAL-B fue la más activa, permitiendo alcanzar una conversión del laurato de vinilo en de 80,4 % a las 6 h de incubación.

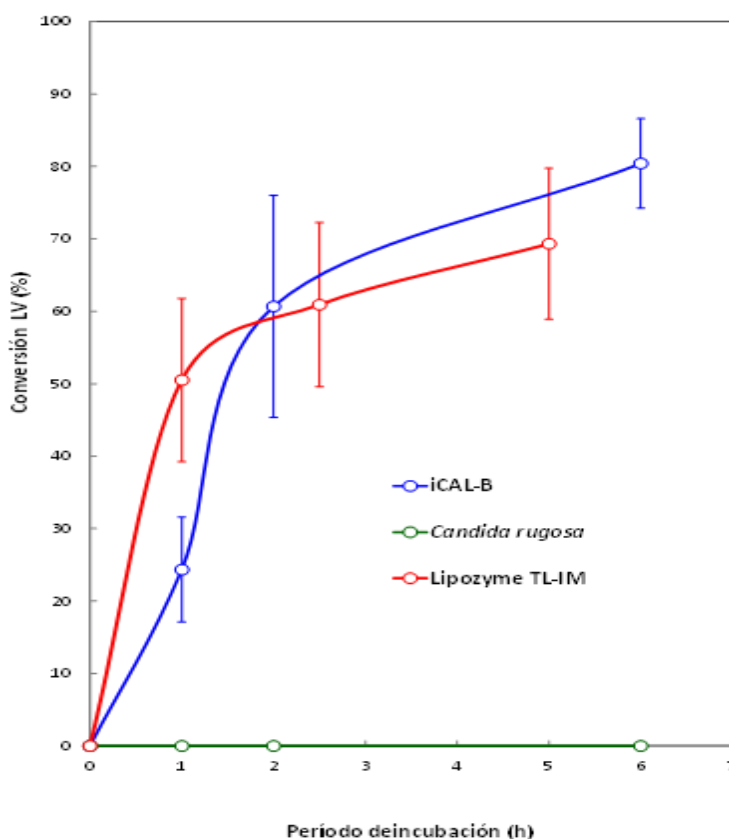


Figura 4.2. Evolución de la conversión del laurato de vinilo durante su transesterificación con metanol en medio DES 2, catalizada por las lipasas Lipozyme TL-IM, *Candida rugosa* e iCAL-B

Esta misma reacción catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* llevada a cabo en hexano, alcanzó una conversión del 21,5 % a las 5,5 h de reacción, lo que demuestra que la misma es capaz de catalizar dicha reacción, sin embargo, la actividad nula mostrada en el DES 2 claramente sugiere que este solvente en las condiciones estudiadas ejerce un drástico efecto negativo sobre su actividad.

Para el caso esta reacción en medio hexano catalizada por la enzima Lipozyme TL-IM la conversión alcanzada a las 5 h de reacción fue cercana a la conversión completa, mientras que llevada a cabo en el solvente DES 2 alcanzó un valor medio del 69,3 %.

En el caso de la enzima iCAL-B, en medio hexano permitió también alcanzar una conversión cercana al 100 % luego de 4 h de incubación, mientras que en el DES 2 conversión alcanzada fue de 80,4 % luego de 6 h de reacción.

Estos resultados muestran que el desempeño de las tres enzimas en la catálisis de esta reacción fue superior en medio hexano que en el medio DES 2. Asimismo, al igual que en hexano, se vuelve a verificar un mejor desempeño de las dos lipasas inmovilizadas que el de la lipasa libre, diferencia aún más notoria en medio DES 2, ya que esta última se inactivó totalmente.

Si bien estos resultados indican un peor desempeño de las lipasas estudiadas en la reacción modelo seleccionada en el medio DES 2 que en hexano, existen reportes que evidencian que es posible que ocurra el efecto contrario. Por ejemplo, la transesterificación de valerato de etilo con 1-butanol catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* liofilizada fue más eficiente cuando se realizó en medio DES formado por ChCl y glicerol que cuando se desarrolló en tolueno (Gorke et al., 2008). Por lo que debe considerarse que el desempeño de las lipasas en un medio DES depende de la naturaleza del solvente y de las características de los sustratos y el tipo de reacción.

4.3.2 Desempeño de la lipasa iCAL-B en la síntesis de ésteres de colesterol en los diferentes DES

Considerando la alta actividad de la lipasa iCAL-B en la catálisis de la transesterificación del laurato de vinilo con metanol en el DES 2, se procedió a estudiar la transesterificación con colesterol en lugar de metanol, de manera de utilizar un sustrato con mayor complejidad estructural. Asimismo, resultó interesante ensayar también los demás DES seleccionados (Tabla 4.1), de manera de evaluar el efecto de los diferentes medios de reacción sobre la actividad enzimática.

La Figura 4.3 muestra la conversión de colesterol a laurato de colesterol durante el transcurso de la incubación en los diferentes solventes. Se observa que la mayor conversión

fue la que resultó de realizar la reacción en medio DES 4, alcanzando al 9,0 % a las 48 h de reacción. Este resultado sugiere que en las condiciones ensayadas el desempeño de la lipasa iCAL-B en el DES 4 frente a esta reacción no fue notoriamente diferente al que mostró en la catálisis de la misma reacción en medio hexano, donde permitió alcanzar una conversión del colesterol del 14,0 % a las 72 h de reacción (Capítulo 3, sección 3.3.2.). Si bien en ese caso no se determinó la conversión alcanzada a las 48 h de reacción, si se supone una evolución lineal de la conversión, a las 48 h correspondería una conversión del 9,3 %, estimación muy aproximada pero que permite comparar ambas situaciones.

En cambio, cuando la incubación se realizó en los DES 1, 2, o 3 los valores de conversión alcanzados a las 48 h de incubación fueron notoriamente inferiores a los alcanzados en el DES 4 (0, 1,2 y 3,3 %, respectivamente).

Estos resultados fueron en principio llamativos, en particular la ausencia de actividad enzimática en el caso de la incubación realizada en el DES 1, el cual ha sido reportado como un solvente relativamente amigable para procesos que involucran catalizadores enzimáticos, pero también la baja actividad verificada en los DES 2 y 3.

Sin embargo, el análisis por GC de los productos de reacción obtenidos en estos tres solventes mostró, además del pico del producto de interés (laurato de colesterilo), picos significativos correspondientes a los lauratos de cada uno de los HBD componentes del DES: mono- y dilaurato de butilo (DES 1), mono-, di- y trilaurato de glicerilo (DES 2) y mono- y dilaurato de isosorbida (DES 3). Por lo tanto, debe considerarse que los resultados de la Figura 4.3 no son totalmente representativos de la actividad relativa de la enzima en cada uno de los solventes estudiados, sino que involucran también la preferencia relativa de la enzima por los dos sustratos disponibles en el medio; el colesterol y el HBD correspondiente.

La reactividad del componente HBD ya ha sido mencionada en trabajos previos tal como se menciona en el Capítulo 1, y obviamente puede condicionar la viabilidad del uso de DES cuyos componentes potencialmente puedan competir con la reacción de interés. Si bien es de esperar que la fuerte interacción HBD-HBA mantenga capturado al componente HBD y disminuya su disponibilidad para participar de cualquier reacción, los resultados demuestran que dada su elevada concentración, una pequeña fracción del mismo liberada al medio puede representar una concentración significativa frente a un sustrato relativamente

diluido, lo que lo puede posicionar como un competidor en el proceso de interés. Este aspecto, por su trascendencia, requirió de un estudio más detallado que será desarrollado en el capítulo siguiente.

Asimismo, que el DES 4, constituido por urea, un compuesto conocido por su capacidad para promover la desnaturalización de proteínas y en consecuencia inactivar catalizadores enzimáticos (Durand et al., 2014; Gorke et al., 2008), haya sido el solvente donde la lipasa iCAL-B resultó más activa, sugiere que la fuerte interacción urea-ChCl mantiene a la urea impedida de actuar sobre la proteína y expresar su efecto desnaturalizante.

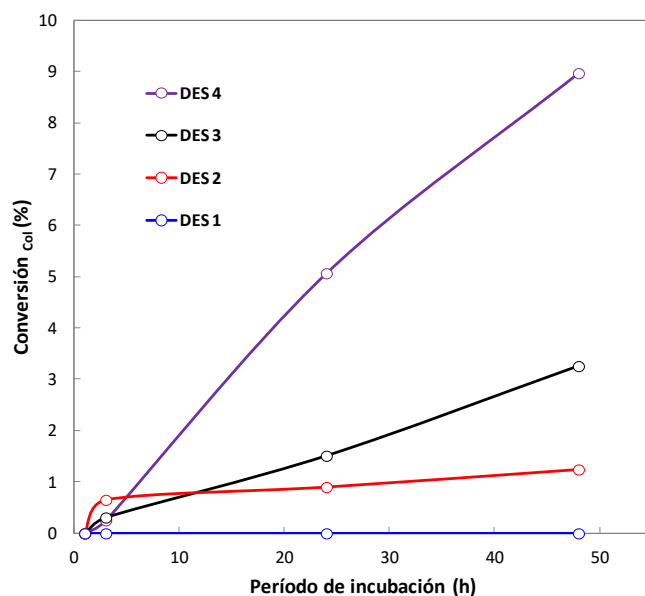


Figura 4.3. Evolución de la conversión de colesterol durante su transesterificación con laurato de vinilo en medio DES 1, 2, 3, y 4, catalizada por la lipasa iCAL-B

El análisis de los productos mostró también la presencia de ácido láurico, lo que demostró la ocurrencia de hidrólisis de laurato de vinilo catalizada por la lipasa, lo que pudo ocurrir debido a la presencia de trazas de agua en el medio de reacción, pese a que se trabajó con los componentes del DES previamente desecados. Por este motivo se repitió la incubación en el DES 4 por un período de tiempo más prolongado y con un mayor exceso de laurato de vinilo (100 mg, 1600 % exceso), de manera de asegurar la existencia de una elevada concentración de sustrato durante todo el período de reacción. En este caso, además de la

evolución de la conversión de colesterol a laurato de colesterilo se determinó también el porcentaje de hidrólisis del LV (Figura 4.4).

Los resultados muestran que ambos valores se incrementaron progresivamente con el período de incubación. Debe considerarse que el aumento en el porcentaje de hidrólisis del LV implica la modificación de las condiciones de reacción, sustituyendo uno de los reactivos de la transesterificación de interés por otro, el ácido láurico, que eventualmente podría contribuir a la generación del producto de interés, pero en una reacción de otra naturaleza, la esterificación con el colesterol.

Se observa que el mayor valor de porcentaje de conversión de colesterol a laurato de colesterilo fue del 14,2 %, obtenido luego de 144 h de incubación.

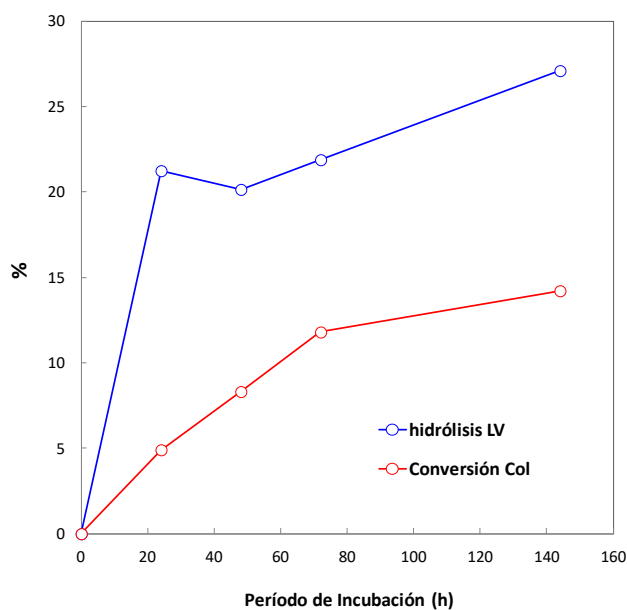


Figura 4.4. Evolución la hidrólisis del laurato de vinilo y de la conversión del colesterol durante la transesterificación en medio DES 4 catalizada por la lipasa iCAL-B

4.3.3 Efecto de la concentración de agua en el DES 4 en el desempeño de la lipasa iCAL-B en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol

Conocido el efecto del agua sobre la actividad enzimática en medio DES resultó necesario determinar la actividad de la lipasa iCAL-B en la transesterificación de laurato de vinilo con colesterol en medio de reacción DES 4 con diferentes agregados de agua. Para ello se

repitió el ensayo en las condiciones del punto anterior, pero con diferentes concentraciones de agua en el medio, correspondientes a las relaciones molares agua/ChCl (R) iguales a 1, 1,5 o 2.

Las incubaciones se prolongaron por un período de 72 h, transcurrido el cual no se verificó formación de laurato de colesterol. Sin embargo, se detectó la rápida acumulación de ácido láurico en el medio de reacción, lo que demostró que la presencia de agua en el medio de reacción desencadenó la rápida hidrólisis del laurato de vinilo catalizada por la lipasa iCAL-B, alcanzándose prácticamente la hidrólisis total hacia el final del período de incubación. La Figura 4.5 muestra que los porcentajes de hidrólisis crecieron durante el transcurso del tiempo de incubación y que a mayor concentración de agua en el medio de reacción mayor fue la velocidad de hidrólisis.

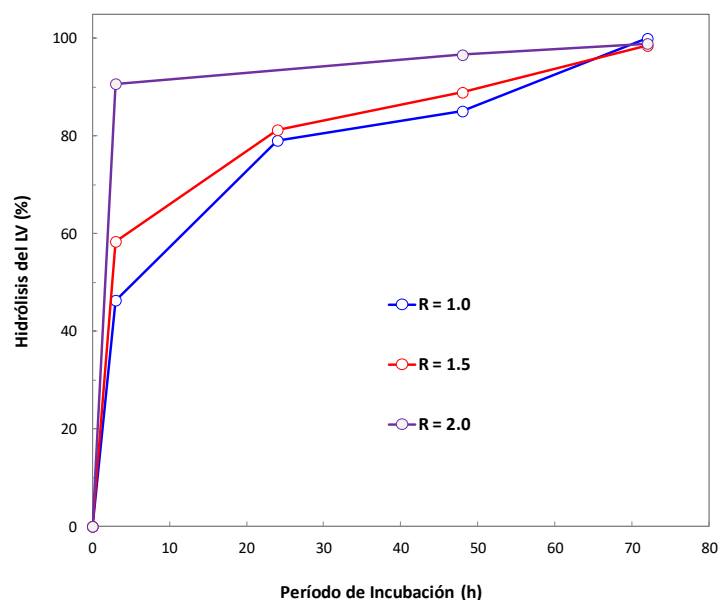


Figura 4.5. Evolución del porcentaje de hidrólisis del laurato de vinilo durante su incubación con colesterol en medio DES 4 con agregado de agua a niveles $R = 1, 1,5$ o 2 , en presencia de la lipasa iCAL-B

Estos resultados indican que en el medio DES 4 la presencia de agua potencia la hidrólisis del laurato de vinilo, verificada anteriormente en este solvente anhidro, pero no permitiendo en este caso la generación de laurato de colesterol. Posiblemente no sólo la actividad de agua en el medio sino también el más rápido acceso del laurato de vinilo al centro activo de

la enzima, de mayor difusividad y menos impedido estéricamente que el colesterol, determinen que su hidrólisis prevalezca frente a la transesterificación de este último.

4.3.4 Desempeño de la lipasa iCAL-B en la esterificación de ácido láurico con colesterol en DES 4

En base a los resultados obtenidos en el punto anterior, se decidió estudiar la viabilidad de la reacción partiendo de ácido láurico como sustrato, de esta manera se analizaría la esterificación del colesterol a laurato de colesterilo. Si bien ya se mencionó la ventaja que representa el LV como sustrato (Figura 3.1), los resultados del punto anterior mostraron la prevalencia de su hidrólisis por sobre su transesterificación con colesterol, por lo que su ausencia en el medio de reacción podría favorecer la esterificación del colesterol con el ácido láurico.

Para comprobar esto se llevó a cabo la determinación de la actividad de la lipasa iCAL-B en la esterificación de ácido láurico con colesterol en medio de reacción DES 4, con agregado de agua a niveles correspondiente a $R = 1, 1,5, \text{ o } 2$ (moles de agua/ mol de ChCl).

Las incubaciones se prolongaron por 24 h, pero independiente del contenido de agua, se detectó la formación de mínimas trazas de laurato de colesterilo. Estos resultados permitieron concluir que la esterificación con AL no es viable para la generación de laurato de colesterilo en este medio de reacción catalizada por la iCAL-B. En definitiva, estos resultados son coherentes con los resultados del punto anterior (4.3.3), ya que la rápida hidrólisis del LV verificada en esos ensayos implican un medio rico en AL, que tampoco condujo a la generación del éster de colesterol.

4.4 Conclusiones

Como era de esperar los resultados obtenidos en este capítulo y el anterior demostraron que las lipasas estudiadas desarrollaron diferente actividad catalítica frente a las mismas reacciones en medio DES y en solventes orgánicos.

En particular, todas las lipasas estudiadas resultaron más activas en la catálisis de la transesterificación de laurato de vinilo con metanol en medio hexano que en el DES ChCl/glicerol (DES 2).

En la síntesis de laurato de colesterilo se obtuvieron resultados positivos cuando se la realizó mediante transesterificación de colesterol con laurato de vinilo, no así cuando se la realizó mediante esterificación con ácido láurico.

En esta transesterificación catalizada por la lipasa iCAL-B el mayor porcentaje de conversión de laurato de vinilo a laurato de colesterilo se presentó en la reacción llevada a cabo en el DES 4, seguido por los DES 3, 2 y 1.

Estos resultados no pueden atribuirse únicamente a la diferente actividad de esta enzima en los diferentes solventes, ya que la presencia en los productos de ésteres de los HBD de los DES 1, 2 y 3 indicó la ocurrencia de reacciones competitivas con la síntesis de interés.

El agregado de agua al medio de reacción DES 4 en las proporciones correspondientes a moles de agua/ mol de ChCl (R) = 1,0, 1,5, o 2,0 produjo un aumento en el porcentaje de hidrólisis del laurato de vinilo sin mejorar el rendimiento en laurato de colesterilo obtenido en medio anhidro. Dado el conocido efecto determinante del agua sobre la eficiencia de las reacciones enzimáticas en medio DES, este aspecto será desarrollado con más profundidad en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO 5

REACTIVIDAD DE LOS COMPONENTES DEL DES Y EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGUA

5.1 Introducción

Es común que el componente HBD del DES posea en su estructura radicales hidroxilo, capaces de conferirle la habilidad de “donar” uno o más átomos de hidrógeno capaces de generar enlaces con el componente HBA dando origen a la interacción necesaria para que ocurra la depresión eutéctica en la temperatura de fusión que los caracteriza. Obviamente la presencia de hidroxilos en la molécula del HBD lo convierte en un potencial sustrato, capaz de participar en reacciones de esterificación o transesterificación que se pretendan desarrollar en el solvente DES.

Si bien en principio la fuerte interacción entre ambos componentes del DES limita la disponibilidad de los mismos para participar en las reacciones que se desarrollan en dicho medio (Durand et al., 2012), varios factores serán determinantes sobre tal posibilidad. En primer lugar, debe considerarse que, dado que se trata de los componentes del solvente, el HBD se encuentra siempre en muy alta concentración, varios órdenes superior a la de los sustratos de interés, lo que favorecerá su tendencia a reaccionar. Asimismo, es conocido que la actividad de agua en el medio debilita el grado de interacción entre los componentes del DES, dada su capacidad de generar enlaces de hidrógeno con ambos componentes, pudiendo desencadenar la “disrupción” del DES cuando alcanza una concentración muy elevada (Hammond et al., 2017).

Si bien se han reportado casos en que una fuerte red de enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES es suficiente para evitar la participación del HBD en la reacción de interés, los factores antes mencionados, combinados o no, pueden conducir situaciones muy diferentes donde incluso a que la concentración del producto derivado del HBD sea aún mayor que la del producto de interés (Pätzold et al., 2019).

Por ejemplo, se ha reportado que cuando la transesterificación de valerato de etilo con 1-butanol catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* liofilizada se realizó en los dos DES diferentes formados por el cloruro de etilamonio combinado con etilenglicol o con glicerol, ambos HBD se comportaron de manera muy diferente. En el caso del etilenglicol se verificó una competitividad importante, siendo el valerato de etilo convertido en un 31 % a monovalerato de etilenglicol y en un 23 % a valerato de butilo. Si bien la concentración del éster del HBD superó levemente a la del producto buscado, resulta llamativo que la diferencia no fuera aún mayor, considerando que el etilenglicol se encontraba en una concentración 25 veces superior que la del 1-butanol. En cambio, en la incubación realizada en el otro DES la conversión del sustrato a valerato de butilo superó el 90 % mientras que los ésteres del glicerol no superaron el 0,5 % del producto (Gorke et al., 2008).

La reactividad del HBD se ha identificado como uno de los factores más importantes a la hora de considerar la conveniencia de utilizar los DES como medio de reacción. Esto no sólo se debe a que involucra reacciones secundarias que compiten con la reacción de interés, sino que además la composición del mismo DES puede modificarse como consecuencia de las mismas, modificando las propiedades del solvente (Durand et al., 2012).

Sin embargo, existen ejemplos en los que la reactividad del HBD lejos de ser un problema ha sido convenientemente aprovechada. Efectivamente, una estrategia interesante que se ha aplicado con éxito consiste en utilizar un DES tal que su componente HBD sea a su vez uno de los reactivos de interés del proceso, por lo cual el DES cumple la doble función de solvente y sustrato. Se ha reportado por ejemplo la síntesis enzimática de hexanoato de glucosa mediante la incubación de hexanoato de vinilo en medio ChCl/glucosa (1:1) catalizada por la lipasa iCAL-B (Pöhnlein et al., 2015). Esta misma lipasa ha sido aplicada con éxito en la síntesis de diferentes ésteres de varios azúcares mediante procesos de transesterificación conducidos en solventes generados por la combinación de cloruro de colina con el azúcar respectivo (Siebenhaller et al., 2017).

Es por lo mencionado anteriormente que resultó de interés verificar la potencial reactividad de los distintos HBD en reacciones de esterificación, así como el efecto de distintos niveles de agua en DES en el rendimiento de una reacción modelo con preincubación de lipasas.

En este capítulo, se muestran los resultados obtenidos en incubaciones de ácido láurico con exceso de n-butanol en presencia de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B) en los diferentes DES descritos en el capítulo anterior (Tabla 4.1), basados en cloruro de colina (ChCl) cuatro HBD diferentes: 1,4-butanodiol, glicerol, isosorbida y urea. Mediante la determinación de la presencia en los productos de ésteres de los diferentes HBD y sus concentraciones relativas al laurato de butilo generado por la reacción modelo de interés, fue posible estimar la reactividad relativa de los diferentes componentes de los DES.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, estándares analíticos y las enzimas comerciales fueron adquiridas a la firma Sigma–Aldrich. Se utilizó la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B, producida por Novozymes, Dinamarca).

5.2.2 Síntesis de DES

Los DES utilizados fueron sintetizados tal como se describe en la sección materiales y métodos del Capítulo 4 (4.2.2.)

5.2.3 Síntesis de estándares de los ésteres láuricos de los HBD de interés

En un vial de 15 mL se colocó 10 mg de cada HBD (1,4-butanodiol, glicerol, isosorbida y urea) y la cantidad de laurato de vinilo correspondiente a un 100 % de exceso, se agregó se 10 mL de 2-metil-2-butanol (2M-2BuOH) y 10 mg de lipasa iCAL-B.

Los viales fueron incubados a 45 °C y 250 rpm durante 48 h. Durante la incubación se tomaron muestras periódicas de 1 µL de cada vial y se analizaron por GC tal como se describe en la sección de materiales y métodos del Capítulo 4 (4.2.4.).

La identificación de los picos y sus respectivos tiempos de retención se realizó considerando que las moléculas de mayor peso molecular presentaban mayor tiempo de retención.

5.2.4 Reactividad de los componentes HBD de los diferentes DES

En un vial de 15 mL se colocaron 200 mg de ácido láurico, 50 mg de n-butanol, 3 g de DES (1, 2, 3 o 4), la cantidad de agua destilada correspondiente a una relación $R = \text{mol agua} / \text{mol ChCl} = 1$ y 30 mg de lipasa iCAL-B. La mezcla se incubó a 50 °C y 250 rpm durante 24 h. Luego de la incubación se tomó una muestra de 200 μL de cada vial, la que se transfirió a otro vial conteniendo 1 mL de agua destilada, el cual se agitó para generar la disrupción del DES. Posteriormente se agregaron 2 mL de hexano en cada vial, los que se agitaron en vórtex durante 15 seg y luego se dejaron en reposo hasta la separación de fases. Finalmente, 1 μL de la fase hexano se analizó por GC como se describe a continuación.

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu GC-2010, equipado con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (14 m \times 0.53 mm \times 0.16 μm , con una precolumna integrada de 2 m \times 0.53 mm I.D.). Las temperaturas del inyector y el horno siguieron el mismo programa, que se inició en 80 °C seguido de un calentamiento a 10 °C/min hasta 350 °C. Se utilizó N_2 como gas portador a 70 kPa. La identificación de los picos se realizó mediante comparación con los resultados obtenidos en el análisis en idénticas condiciones de estándares analíticos comerciales y considerando que, tratándose de una columna no polar, a las moléculas de mayor peso molecular corresponde un mayor tiempo de retención. El porcentaje total de ésteres láuricos de cada HBD en el total de ésteres producidos se estimó en función del porcentaje de área de los mismos en el cromatograma, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \sum \text{área de ésteres láuricos de HBD} = 100 \times \frac{\sum (A_{ELHBD})}{\sum (A_{ELHBD}) + A_{LB}} \quad [\text{Ec. 5.1}]$$

$\sum (A_{ELHBD})$: Suma de las áreas de los picos del cromatograma correspondientes a los ésteres láuricos del HBD.

A_{LB} : Área del pico del cromatograma correspondiente al laurato de butilo.

Los resultados de la Ec 5.1 se consideran estimaciones, ya que dada la muy diferente naturaleza de los compuestos analizados para una cuantificación precisa hubiera sido

necesario determinar factores de respuesta, lo que no fue posible por no disponer de estándares de cada uno de ellos y porque tampoco se pretendió una cuantificación exacta del grado de competencia de los HBD. Las incubaciones se realizaron por duplicado y se informan los resultados promedio.

5.2.5 Efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al medio DES 4 sobre su actividad catalítica

En cuatro viales de 15 mL se colocó 3 g de DES 4, en tres de ellos la cantidad de agua destilada correspondiente a valores de R (moles de agua/moles ChCl) igual a 1, 2 o 3 y en todos ellos se agregó 30 mg de lipasa iCAL-B. Posteriormente se agregó 50 mg de ácido láurico y 120 μ L de n-butanol en cada uno, y la mezcla se incubó durante 24 h a 50 $^{\circ}$ C y agitación orbital a 200 rpm.

El procedimiento se repitió pre-incubando la enzima en el DES 4 (previo al agregado del ácido láurico y el butanol) durante 24 o 48 h.

Luego de las 24 h de incubación se realizó la toma de muestra y su análisis de la misma manera que se describió en el punto 5.1.2, determinándose la concentración de laurato de butilo. La conversión del ácido láurico a laurato de butilo se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Conversión (\%)} = 100 \times \frac{A_{LB}}{A_{AL} + A_{LB}} \quad [\text{Ec 5.2}]$$

Conversión (%): Porcentaje de conversión de ácido láurico a laurato de butilo

A_{AL} : Área de pico de ácido láurico en el cromatograma obtenido mediante el análisis por GC

A_{LB} : Área de pico de laurato de butilo en el cromatograma obtenido mediante el análisis por GC

Todas las incubaciones se realizaron por duplicado y se informan los resultados promedio.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Reactividad de los componentes HBD de los diferentes DES

Obviamente la naturaleza de los diferentes componentes HBD de los DES utilizados (Tabla 4.1) sugiere la posibilidad de que existan reacciones que los involucran y que estas estén compitiendo con las reacciones de esterificación de interés. Esta posibilidad ya ha sido reportada para varios de estos DES en reacciones de transesterificación y esterificación catalizadas por lipasas (Durand et al., 2013). Lo mencionado no sólo implicaría la formación de productos secundarios, sino que además podría cambiar la composición del propio DES, proporcionando un medio de reacción que varía conforme avanza la reacción, esto podría complejizar aún más el sistema de estudio.

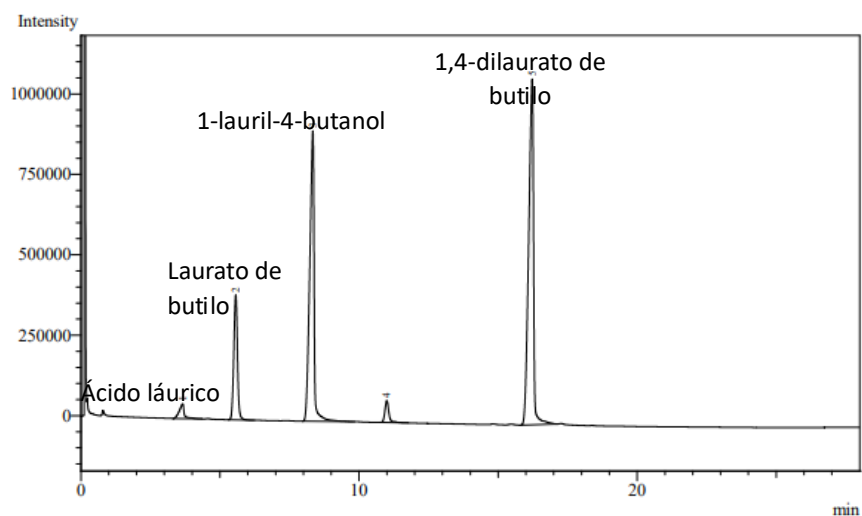
Para evaluar este fenómeno se eligió como reacción modelo la esterificación de ácido láurico con n-butanol catalizada por la enzima iCAL-B, la cual se realizó en cada uno de los solventes DES de interés. De acuerdo con ensayos previos realizados en los que se verificó la importancia de la presencia de agua en el medio de reacción, en todos los casos se agregó la cantidad de agua necesaria para alcanzar una relación molar agua/ChCl igual a 1 ($R = 1$).

La Figura 5.1 muestra los cromatogramas obtenidos en el análisis por GC de los diferentes productos obtenidos luego de las 24 h de incubación. En todos los cromatogramas se observan los picos correspondientes al ácido láurico sin reaccionar y al laurato de butilo generado ($t_r = 4,299$ y $5,583$ min, respectivamente).

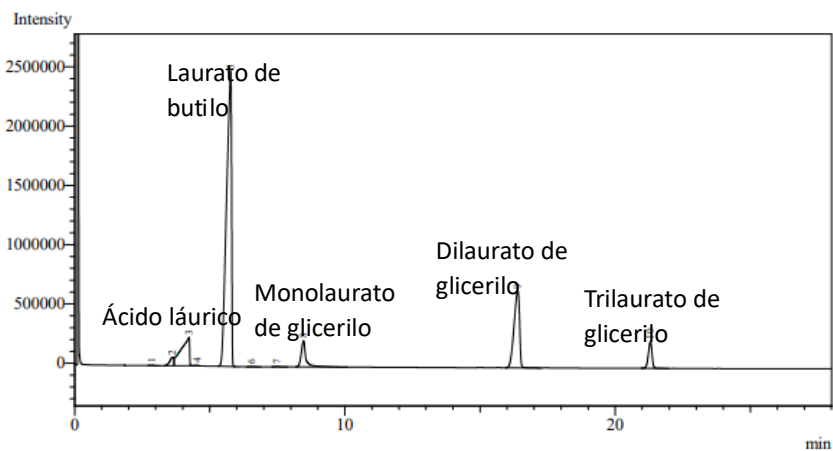
Además de estos picos, el cromatograma correspondiente al análisis del producto de la reacción llevada a cabo en el DES 1 (Figura 5.1a) mostró la presencia de los dos ésteres del 1,4-butanodiol (1-laurato de 4-butanol y 1,4-dilaurato de butilo), ambos en mayor cantidad que laurato de butilo. Asimismo, el cromatograma correspondiente al análisis del producto de la incubación realizada en DES 2 (Figura 5.1b) mostró la presencia de los 3 ésteres del glicerol (mono-, di- y trilaurato de glicerilo), correspondiendo la mayor concentración de los tres al diéster, aunque en este caso todos los ésteres del HBD mostraron menor concentración que el laurato de butilo. El cromatograma correspondiente a la Figura 5.1c muestra que también como producto de la reacción que transcurrió en medio DES 3 se formaron ésteres del HBD. Se observan dos picos correspondientes a los dos isómeros del monolaurato de isosorbida y el pico del dilaurato de isosorbida, ambos en una

concentración mucho menor que la del laurato de butilo, como evidencia la relación entre sus picos.

En cambio, el cromatograma correspondiente al producto de la incubación realizada en el DES 4 (Figura 5.1d), únicamente muestra los picos correspondientes al ácido láurico sin reaccionar y al laurato de butilo generado en la reacción, lo que indica que los componentes del solvente no participaron de la reacción de esterificación.



a)



b)

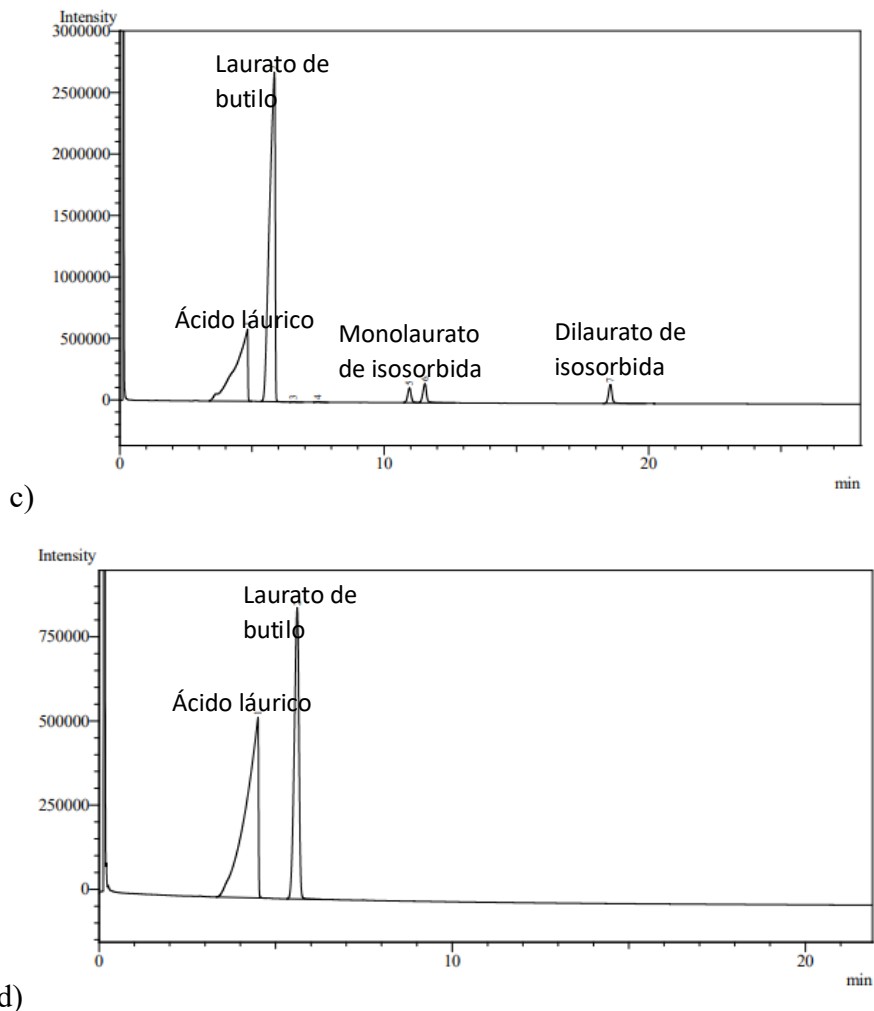


Figura 5.1. Cromatogramas correspondientes al análisis por GC de los productos obtenidos luego de 24 horas de incubación de ácido láurico con *n*-butanol en presencia de la lipasa iCAL-B en los solventes DES 1 (a), DES 2 (b), DES 3 (c) y DES 4 (d)

Estos resultados coinciden con resultados previos relativos a la generación de ésteres del glicerol en reacciones enzimáticas de esterificación de ácidos grasos con diferentes alcoholes en DES en los que el glicerol es el componente HBD frente a cloruro de etilamonio o ChCl actuando como HBA (Durand et al., 2012; Gorke et al., 2008).

Aunque se ha estudiado ampliamente el uso del DES 2 como medio de reacciones enzimáticas de esterificación y transesterificación (Durand et al., 2012; Gorke et al., 2008; Hao et al., 2021; X. Liu et al., 2021; Suo et al., 2022), sólo en las publicadas por Gorke et al. (2008) y Duran et al. (2012) se hace mención a la posibilidad de que el glicerol compita con el alcohol sustrato de dichas reacciones.

Resulta llamativo que en varias publicaciones más recientes no se menciona la posibilidad de competencia del glicerol en reacciones de esterificación o transesterificación de ácidos grasos con etanol (Hao et al., 2021; Suo et al., 2022) y butanol (X. Liu et al., 2021) realizadas en medio ChCl/glicerol . Posiblemente esto se deba a que en estos estudios la determinación del rendimiento de la reacción se realizó únicamente mediante el análisis de la acidez libre en el medio de reacción, ya que dicha metodología obviamente no permite distinguir si los ácidos grasos se consumieron debido a que se esterificaron con el sustrato alcohólico de interés o con el glicerol aportado por el DES.

En la Figura 5.2 se muestran los porcentajes de área correspondiente al total de los ésteres láuricos de los diferentes HBD en el total de los ésteres producidos luego de 24 h de reacción, determinados según la Ec. 5.1. Se observa que el HBD del DES 1 resultó el más reactivo, ya que la suma de áreas del mono- y diéster láurico del 1,4-butanodiol alcanzó a un 86.9 %, seguido por los HBD del DES 2 y DES 3 con porcentajes de área de sus respectivos ésteres láuricos de 31,1 % (mono-, di- y trilaurato de glicerilo) y 7,2 % (mono- y dilaurato de isosorbida). Como ya se mencionó, no se verificaron productos que pudieran asociarse a la reacción de alguno de los componentes del DES 4.

Estos resultados confirman que los componentes HBD de los DES 1 a 3 pueden competir con el butanol en la reacción de esterificación con el ácido láurico en las condiciones ensayadas. Mediante los porcentajes de área representados en la Figura 5.2. es posible ordenar de menor a mayor el grado de competitividad de los distintos HBD componentes de los DES en esta reacción, siendo el DES 4 el de menor reactividad, seguido por el DES 3, DES 2 y DES 1.

Como ya se mencionó, numerosos factores son determinantes sobre la reactividad de los componentes HBD y su capacidad de competir con el sustrato de interés, por lo que resulta complejo prever el comportamiento del sistema. Entre estos factores se destacan la concentración del HBD en el DES, la fuerza de su interacción entre éste y el componente HBA y, vinculado con esto, la actividad de agua en el medio de reacción, la preferencia relativa del catalizador por el HBD o por el sustrato de interés, la accesibilidad al sitio activo de la lipasa según la estructura del sustrato y la viscosidad del medio de reacción, entre otras. Claramente, resulta decisivo frente a reacciones de esterificación o transesterificación, la existencia, cantidad y la naturaleza de los grupos hidroxilo en la

molécula de HBD. Esto resulta evidente analizando estos resultados, donde únicamente el HBD que no presenta grupos OH- en su estructura resultó indiferente a la esterificación, mientras que los demás reaccionaron. Por otro lado, resulta razonable que el 1,4-butanodiol hay sido el más reactivo, reaccionando aún más eficientemente que el n-butanol, ya que además de su similitud estructural con este último, lo que lo haría igualmente accesible al centro activo de la enzima, dispone de dos centros reactivos capaces de ser esterificados. Luego, la mayor reactividad mostrada por el glicerol en comparación con la isosorbida sugiere que posiblemente la presencia de 3 grupos OH- sumada a una mejor accesibilidad al centro activo, ya que la primera presenta una molécula de mayor tamaño y quizás más impedida, hayan sido los factores diferenciales.

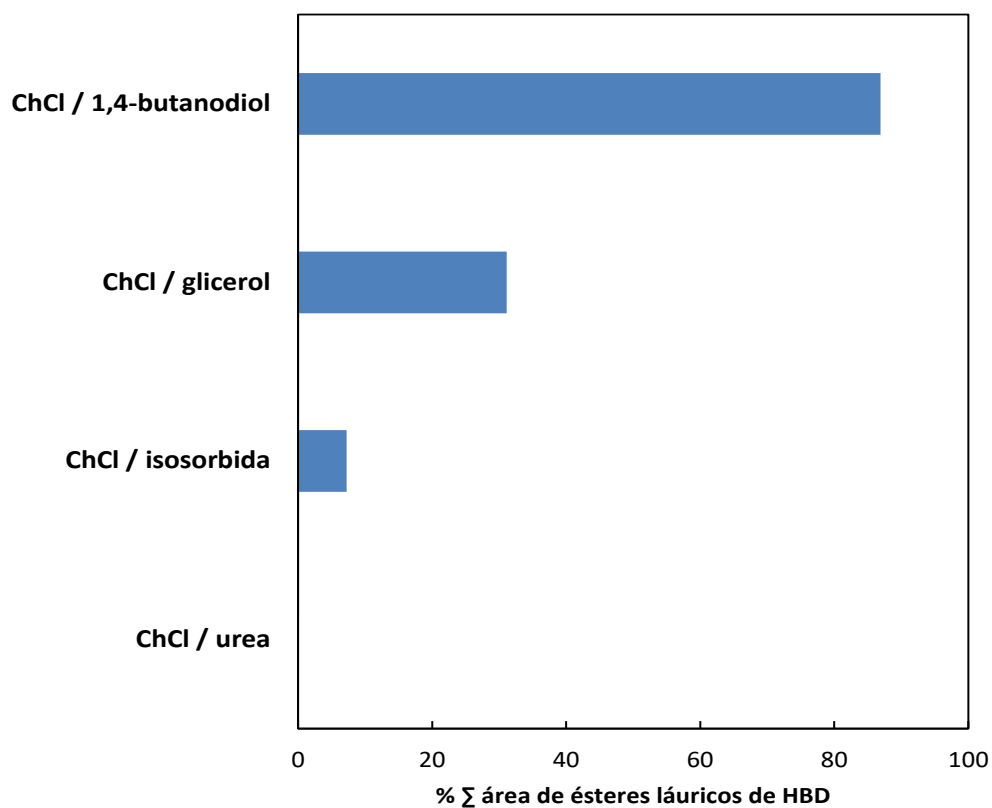


Figura 5.2. Suma de los porcentajes de área de los picos correspondientes a los lauratos de los diferentes HBD en el análisis por GC de los productos de reacción obtenidos luego de 24h de incubación de ácido láurico con n-butanol en los diferentes DES en presencia de la lipasa iCAL-B

A partir de estos resultados es obvio que a los efectos de evitar cualquier posibilidad de competencia de los componentes HBD del DES con los sustratos de interés en este tipo de

reacciones y los inconvenientes asociados con esto, el DES 4 será el más conveniente a utilizar como medio de reacción.

5.3.2 Efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al medio DES4 sobre su actividad catalítica

Dado que el DES 4, compuesto por ChCl y urea resulta el más conveniente para conducir reacciones de esterificación, considerando que la urea no compite en el proceso, resultó de interés verificar si la actividad de la lipasa iCAL-B se ve afectada cuando se la expone a este medio por un período prolongado. Esto es particularmente importante dado que es conocida la capacidad de la urea de desnaturalizar proteínas y, por lo tanto, afectar negativamente la actividad de las enzimas (Durand et al., 2014; Gorke et al., 2008). Asimismo, el poder desnaturalizante de la urea en tanto componente del DES, se ha asociado a la actividad de agua en el medio de reacción, dado que el agua debilita la asociación ChCl-urea, quedando esta más “libre” en el medio de reacción, lo que le permitiría expresar su efecto desnaturalizante (Durand et al., 2014).

Por lo expuesto anteriormente, resultó del mayor interés verificar el efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al DES 4 conteniendo distintos niveles de agua durante diferentes períodos de tiempo. Para ello se comparó la conversión alcanzada luego de 24h en la esterificación de ácido láurico con n-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B en idénticas condiciones y período de reacción, pero luego de exponer la lipasa al DES 4 en preincubaciones de 24 y 48 h. Luego de dicho período de exposición de la enzima al DES se agregaron los sustratos al sistema, se prolongó la incubación por 24 h y, finalmente, se determinó la conversión alcanzada. Esta comparación se realizó en paralelo con el solvente anhidro y con diferentes contenidos agua, a los niveles correspondientes a $R = 1, 2$ y 3 .

En la Figura 5.3 se muestran las conversiones del ácido láurico a laurato de butilo alcanzadas en cada caso. Se observa que las conversiones correspondientes al sistema sin agua agregada ($R=0$) fueron mínimas o despreciables, independientemente del período de preincubación de la enzima. Esto está en concordancia con lo indicado por Durand et al., (2014) quienes señalaron que en medio DES 4 se requiere una relación molar agua/ChCl mínima para la conveniente hidratación de la enzima y que ésta adquiera una conformación activa.

En el caso de las incubaciones realizadas con enzima sin preincubar, se observa una elevada conversión a los tres niveles de agua agregados, alcanzando valores en torno al 80 % y sin que se verifique, dentro del margen de error, una tendencia clara con respecto a la cantidad de agua en el sistema. Estos resultados confirman el efecto favorable de la presencia de agua en el medio de reacción, lo que es coherente con lo reportado para reacciones de alcoholisis de diferentes ácidos fenólicos catalizados por esta lipasa, demostrando que la actividad de agua en el medio de reacción potencia la actividad enzimática y aumenta drásticamente el rendimiento de las reacciones (Durand et al., 2013; Durand et al., 2014).

Sin embargo, resultaron algo sorprendentes considerando que a niveles de agua tan altos como el correspondiente a $R=3$ (igual a 21% en peso) se esperaría una intensa competencia de la reacción de hidrólisis, lo que no ocurrió. Esto podría explicarse dado que la actividad de agua en este medio es muy inferior a la que podría esperarse por su concentración debido a la incorporación de las moléculas de agua dentro de la red de enlaces de hidrógeno del DES, capaz de reducir su poder nucleofílico y disponibilidad para reaccionar (Durand et al., 2013).

Es conocido que la presencia de agua en los DES, y en particular en el DES 4, afecta drásticamente su viscosidad. Está reportado que el aumento de la concentración de agua en dicho DES desde $R = 0$ hasta 1, 2 o 3 produce una reducción en la viscosidad desde 119,8 hasta 24,7, 9,9 y 6,0 cP, respectivamente (a 50 °C y 1 bar) (Yadav & Pandey, 2014). Asimismo, mediante el estudio de las propiedades fisicoquímicas de este DES y particularmente la difusión de sus componentes a 30 °C, se verificó que cuando el contenido de agua en DES supera el 25 % la difusión de los componentes del DES se incrementa, lo que se refleja en la disminución de la viscosidad y aumento de la conductividad del mismo (Shah & Mjalli, 2014).

Este descenso en la viscosidad obviamente repercute en la organización de los componentes del DES y en la polaridad del solvente, afectando en consecuencia la movilidad y capacidad de difusión de los sustratos y los propios componentes del DES, facilitando su circulación hacia la superficie de resina acrílica soporte de la lipasa y al interior de sus poros. Como consecuencia, la velocidad de acceso a los sitios activos se acelera, favoreciendo la acción catalítica de la enzima e incrementando la velocidad de la esterificación.

También se debe considerar que el soporte utilizado en la formulación del biocatalizador que es, muy probablemente, Lewatit VP OC 1600 (copolímero de polimetacril-divinilbenceno), es altamente hidrofóbico, por lo que también podría limitar la difusión hacia el interior del material macroporoso (Ortíz et al., 2019).

Cuando la enzima fue expuesta a 24 y 48 h de preincubación, las máximas conversiones se presentaron a R=1, alcanzando al 68,9 y 92,4 %, respectivamente.

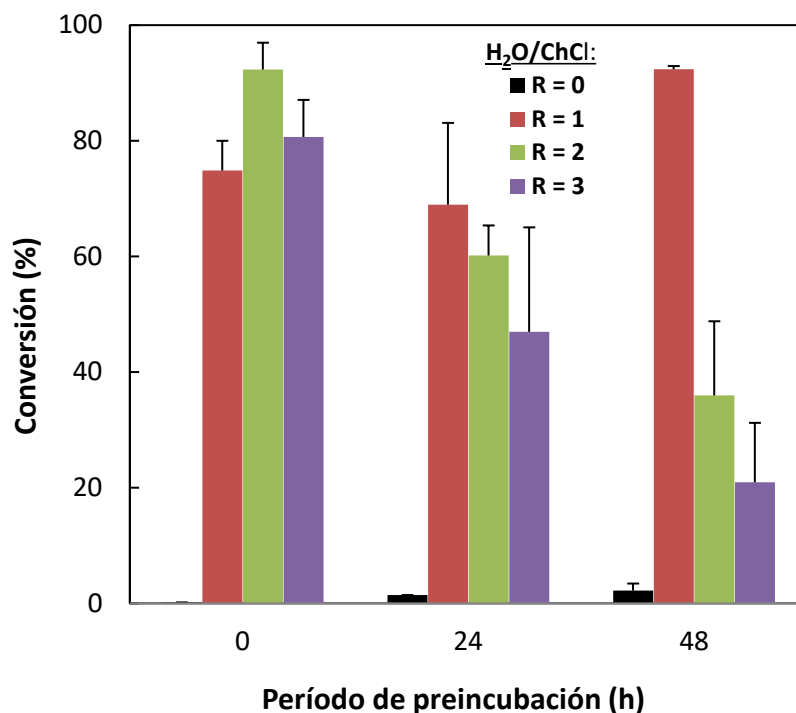


Figura 5.3. Conversión del ácido láurico a Laurato de butilo luego de su incubación durante 24 h con n-butanol, catalizada por la enzima iCAL-B sometida a diferentes períodos de preincubación (0, 24 y 48 h) en el DES 4 conteniendo agua a valores de R= 0, 1, 2, y 3

Los resultados sugieren también que para valores de R = 2 y 3 el incremento en el período de preincubación afectó negativamente la conversión del ácido láurico, la cual se vio disminuida tanto por efecto del incremento de la concentración de agua como del aumento del período de preincubación. Estos resultados demuestran que ambos parámetros afectan la actividad esterificante de la lipasa iCAL-B inmovilizada en la resina acrílica.

Este fenómeno podría asociarse al hecho de que un aumento en el contenido de agua en el medio de reacción debilita las interacciones entre los componentes que conforman al DES.

Esta menor asociación de la urea con el ChCl, permitiría una mayor disponibilidad de urea libre en el medio, facilitando su interacción con la enzima y manifestando su efecto desnaturizante sobre la misma (Durand et al., 2014). Por lo tanto, el agua genera efectos opuestos sobre la actividad catalítica, mientras que posibilita la hidratación de la enzima favoreciendo el desarrollo de su actividad catalítica, cuando se supera determinada concentración debilita la interacción entre los componentes del DES, permitiendo a la urea expresar su efecto desnaturizante (Durand et al., 2014). Este efecto “desestabilizador” del agua sobre el DES fue demostrado para el sistema ChCl:glicerol, para el que se determinó el gradual incremento de la concentración libre de ambos componentes a medida que se aumentó la concentración de agua (Nian et al., 2019).

También mediante el uso de simulación dinámica molecular se ha demostrado que la lipasa B de *Candida antarctica* puede mantener su conformación activa en el medio DES formado por ChCl:urea debido a las interacciones de la urea con la colina y los iones cloruro, que no permitiría la difusión de la urea al núcleo de la lipasa, contrariamente a lo que ocurre en solución acuosa, donde la urea desnaturiza la enzima (Monhemi et al., 2014). Adicionalmente, dicho trabajo demostró que la urea, la colina y los iones cloruro pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos en la superficie de la enzima, favoreciendo aún más su estabilidad y preservando su forma activa. Utilizando métodos similares, Shehata et al. (2020) demostraron que la incubación de la lipasa en el DES ChCl:urea levemente hidratado le permite alcanzar el máximo nivel de actividad, debido al incremento en la movilidad de los residuos involucrados con el dominio del “*lid*”.

Mediante la síntesis de acetato de butilo catalizada por iCAL-B vía la esterificación de 1-butanol con anhídrido acético en medio de reacción DES 4 sin agregado de agua, Bubalo et al., (2015) reportaron conversiones menores al 5 %. En este estudio se plantea una explicación diferente, se indica que en el medio anhidro se da la interacción del 1-butanol con la estructura del DES mediante enlaces de hidrógeno, generado un efecto de “atrapamiento” del sustrato y haciendo que este no esté disponible para reaccionar. Por otro lado, cuando el nivel de agua en el DES está por encima de un óptimo, las moléculas de agua que se encuentran cerca del centro activo de la lipasa compiten con el sustrato de interés dando lugar a reacciones de hidrólisis y esto hace que el rendimiento de la reacción sea bajo. Según este planteo, la cantidad óptima de agua sería aquella que permitiera la

liberación del sustrato de la red del DES y tal que la misma quede mayormente retenida en la red de enlaces del DES, minimizando así su disponibilidad para promover reacciones de hidrólisis. Sin embargo, sugieren que no debe descartarse la posibilidad de que el efecto de “atrapamiento” pueda involucrar también al producto, dependiendo de su naturaleza y capacidad de interactuar con el DES, lo que disminuiría su concentración en el medio de reacción favoreciendo el desplazamiento de la misma hacia los productos (Bubalo et al., 2015). Por lo tanto, el DES 4 con agregado de agua preservó la actividad enzimática para todos los tiempos de preincubación, aunque el comportamiento de la enzima varió con los mismos. Estos resultados demuestran que el agregado de agua tiene un rol favorable y determinante sobre la actividad y estabilidad de la enzima iCAL-B en este medio y que la lipasa cambia su comportamiento con la cantidad de agua en este y con el tiempo de exposición al mismo.

5.4 Conclusiones

Mediante los ensayos de esterificación de ácido láurico con n-butanol catalizada por la enzima iCAL-B en los diferentes DES de interés basados en ChCl, se verificó que los componentes HBD de dichos DES que presentan grupos hidroxilo en su estructura fueron capaces de competir en diferente grado con el sustrato de la reacción modelo elegida.

La proporción de lauratos de los diferentes HBD en los productos permitió estimar el grado de competitividad de los mismos, correspondiendo el mayor al 1,4-butanodiol, seguido por el glicerol y, en menor grado, por la isosorbida. En cambio, no se detectó ningún producto de reacción derivado de la urea, lo que sugirió que el DES ChCl:urea es el solvente más conveniente para conducir reacciones de esterificación de ácidos grasos catalizadas por la lipasa iCAL-B.

Se verificó también que el agua juega un rol determinante sobre la actividad enzimática en el DES ChCl/Urea, demostrándose que el agregado de un mol de agua por mol de ChCl ($R = 1$) permitió mantener la lipasa iCAL-B convenientemente hidratada favoreciendo el desarrollo de su capacidad catalítica sin que tal concentración de agua fuera suficiente para promover reacciones de hidrólisis capaces de competir con la reacción de esterificación de interés.

Asimismo, se constató que en presencia de agua a una mayor concentración ($R = 2$ o 3), también permitió a la lipasa iCAL-B desarrollar un elevado potencial catalítico, sin embargo, la preincubación en dichas condiciones demostró que su actividad se vio disminuida tanto por la duración del período de incubación como por el contenido de agua, por lo que se concluyó que estas condiciones no resultan adecuadas para reacciones que deban prolongarse por largos períodos de tiempo.

Además de la necesidad de suministrar agua al sistema para mantener la enzima suficientemente hidratada, el agua es determinante sobre la fuerza de interacción entre los propios componentes del DES, la interacción de reactivos y/o productos en la red del DES y el consecuente efecto de “atrapamiento” de éstos, la posibilidad de que la hidrólisis compita con los procesos de interés, la viscosidad del medio y los procesos de transferencia de masa, etc. Esto representa un escenario extremadamente complejo dado que la actividad del agua en el medio DES involucra algunos fenómenos con efecto favorable y otros con efecto negativo sobre la eficiencia de las reacciones de interés, que combinados pueden conducir a situaciones difíciles de prever.

Esto sugiere que la determinación de la concentración óptima de agua para cada tipo de proceso a realizarse en medio DES sea uno de los mayores desafíos a la hora de planificar un proceso enzimático a realizarse en este tipo de solvente y, seguramente, una de las mayores diferencias con relación a la modalidad de trabajo con solventes orgánicos convencionales.

CAPÍTULO 6

EFFECTO DEL LARGO DE CADENA DEL ÁCIDO GRASO EN LA EFICIENCIA DE LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN EN MEDIO DES 4

6.1 Introducción

Tal como se ha indicado a lo largo de los capítulos anteriores, los DES se han señalado como candidatos prometedores en el ámbito de “solventes innovadores” para su uso en tecnologías alimentaria y química así como en biotecnología (Cvjetko Bubalo et al., 2015). A lo largo de este trabajo de tesis se han mencionado algunas ventajas del uso de determinados DES como medio de reacción en procesos catalizados por lipasas en base a numerosos estudios realizados en este campo de aplicación.

Entre estos se destaca el estudio de la transesterificación de laurato de vinilo con alcoholes de distinto largo de cadena (1-butanol, 1-octanol y 1-octadecanol) catalizada por la lipasa iCAL-B en distintos DES formados por ChCl o por cloruro de etilamonio como medios de reacción (Durand et al., 2012). La elección de la transesterificación entre el alcohol y laurato de vinilo resulta ventajosa por tautomerización del alcohol vinílico producido a acetaldehído, lo que le confiere un carácter irreversible a la reacción, como se mencionó en el Capítulo 3 (Figura 3.1). Los resultados mostraron mayores conversiones en los DES formados por ChCl. A su vez, cuando las reacciones se realizaron en ChCl:glicerol o ChCl:urea (identificados en esta tesis como DES 2 y 4, respectivamente), las conversiones alcanzadas no variaron significativamente con el largo de cadena del alcohol utilizado como sustrato (Durand et al., 2012).

Si bien en dicho estudio se analizó el efecto del largo de cadena del sustrato nucleófilo (el alcohol), hasta el momento no se han reportado estudios referidos al efecto del largo de cadena del sustrato electrófilo sobre la eficiencia de la reacción.

Se consideró por lo tanto que realizar un estudio de este aspecto resultaba relevante, ya que es de esperar que el largo de cadena del electrófilo sea determinante sobre su capacidad de interactuar con el sitio activo de la lipasa, con un efecto determinante sobre el rendimiento de la reacción.

Otro factor relevante por considerar en el estudio de las reacciones de interés catalizadas por lipasas en medio DES, como se demostró y discutió ampliamente en el capítulo anterior, es el contenido de agua del medio de reacción.

En este capítulo se estudió el efecto del largo de cadena de ácidos grasos saturados sobre la eficiencia de su esterificación con n-butanol. Dado que el HBD del DES 4 fue el único que no verificó competencia en este tipo de proceso, éste fue el solvente seleccionado para estos ensayos. Asimismo, dado el efecto comprobado del contenido de agua en el medio de reacción, se realizaron ensayos en paralelo en idénticas condiciones, pero variando el contenido de agua del medio. Se utilizó como catalizador la lipasa iCAL-B, de demostrada actividad catalítica en medio DES basados en ChCl.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, y enzimas comerciales fueron adquiridas a la firma Sigma–Aldrich. Se utilizó la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B) y los estándares de los ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0).

6.2.2 Reacción de esterificación

Se preparó una única solución en hexano conteniendo los siete ácidos grasos a una concentración 0,05 mM de cada uno de ellos y 0,02 mM de tricosano como estándar interno (IS). Se transfirió 1 mL de esta solución a un vial de 15 mL y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno, de esta manera todas las incubaciones se realizaron a partir de idéntica cantidad de cada ácido graso y, sobre todo, la misma relación de cada uno respecto al IS, lo que resultó fundamental para el diseño del método de cálculo utilizado. Posteriormente, se agregó al vial 3 g de DES 4, 100 μ L de n-butanol y 30 mg de la lipasa iCAL-B y se inició la incubación a 50 °C y 200 rpm en agitador orbital. Alternativamente el

procedimiento se repitió agregando al inicio de la incubación la cantidad de agua necesaria para alcanzar una relación molar agua/ChCl (R) igual a 1, 2 o 3.

Paralelamente se realizaron incubaciones en idénticas condiciones, pero utilizando hexano como medio de reacción en lugar del DES 4, las cuales se prolongaron hasta la conversión completa de los ácidos grasos de la mezcla.

Mientras que los ácidos grasos totalizaron 0,35 mmol en la mezcla de incubación, los 100 μL de n-butanol equivalen a 1,09 mmol, lo que confirma su adición en exceso.

Periódicamente se tomaron muestras de 200 μL de la mezcla de reacción, las que se transfirieron a un vial conteniendo 1 mL de agua destilada el cual se agitó para lograr la disrupción del DES. Para la extracción de los productos se agregó 2 mL de hexano, el vial se agitó en vortex durante 15 seg y luego se lo dejó reposar hasta separación de fases. 1 μL de la fase hexano se destinó al análisis por GC.

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu GC-2014, equipado con inyector split/split less, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco SP-2330 (30 m \times 0,25 mm \times 0.20 μm). Las temperaturas del inyector y el horno siguieron el mismo programa, que se inició en 50 $^{\circ}\text{C}$ seguido de un calentamiento a 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 220 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó N_2 como gas portador a 70 kPa.

Dado que no se dispuso de estándares analíticos de todos los ésteres butílicos, para la identificación de los picos se consideró que sus tiempos de retención aumentaron progresivamente con el largo de cadena del ácido graso esterificado (Figura 6.1).

Por el mismo motivo, para el cálculo de la conversión de cada ácido graso, se consideró el cociente del área del pico de su éster butílico en el cromatograma obtenido en el análisis de cada muestra recogida de las incubaciones en el DES respecto al área del pico del IS. Luego se comparó dicho cociente con el mismo cociente obtenido del análisis del cromatograma de la muestra incubada en hexano (conversión completa), como se describe a continuación:

$$C_i = 100 \times \frac{\left(\frac{A_i}{A_{IS}}\right)_{\text{DES,t}}}{\left(\frac{A_i}{A_{IS}}\right)_{\text{H,f}}} \quad [\text{Ec. 6.1}]$$

C_i : Porcentaje de conversión del ácido graso i.

$(A_i/A_{IS})_{DES,t}$: Cociente entre el área del pico del éster butílico del ácido graso i y el pico del IS en el cromatograma correspondiente al análisis de la muestra recogida de la incubación en DES 4 al período de incubación “ t ”.

$(A_i/A_{IS})_{H,f}$: Cociente entre el área del pico del éster butílico del ácido graso i y el pico del IS en el cromatograma correspondiente al análisis de la muestra recogida a las 48 h de la incubación en hexano, correspondiente a la conversión completa.

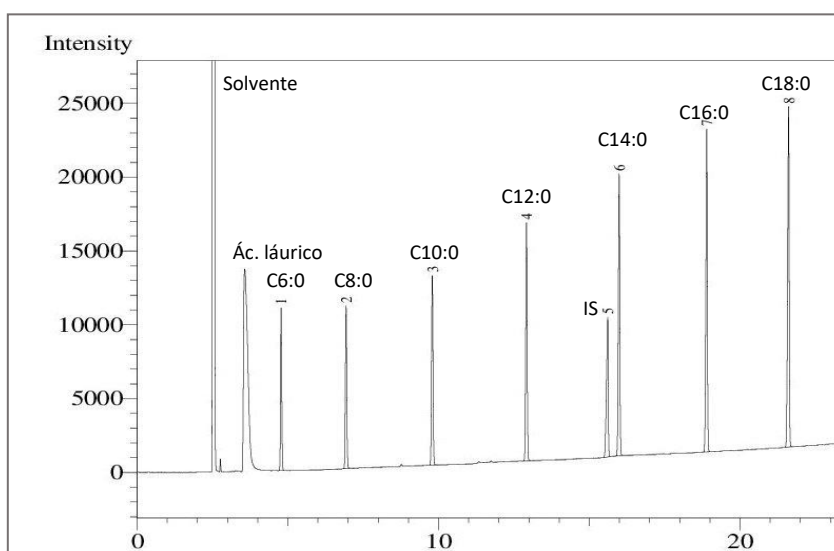


Figura 6.1. Cromatograma obtenido en el análisis de los productos de la incubación en hexano de ácidos grasos de distinto largo de cadena con n -butanol, catalizada por la lipasa iCAL-B, luego de 48 h de reacción

A partir de la conversión determinada en los primeros 60 min de reacción, se estimó la velocidad inicial de reacción de cada ácido, definida como los micromoles de ácido graso esterificados por minuto por gramo de enzima convertido, según:

$$V_{o,i} = \frac{1 \times 10^4 \cdot (mmol Ai)_o \cdot C_{i,60}}{60 \cdot M_{enzima}} \quad [Ec. 6.2]$$

$V_{o,i}$: Velocidad inicial de reacción del ácido graso i ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g_{enz}^{-1}$).

$(mmol Ai)_o$: Milimoles iniciales del ácido graso i .

$C_{i,60}$: Conversión del ácido graso i a los 60 min de incubación.

M_{enzima} : Masa de enzima en mg.

Las incubaciones se realizaron por triplicado y se informan los resultados promedio.

6.3 Resultados y discusión

Las Figuras 6.2 a 6.5 muestran el progreso de la conversión de cada ácido graso durante la incubación realizada en el DES 4 conteniendo las diferentes concentraciones de agua, desde $R = 0$ hasta 3, respectivamente.

La Figura 6.2 muestra que en el DES 4 sin agregado de agua, todos los ácidos grasos mostraron conversiones crecientes al aumentar el período de reacción. También se observa que para un mismo período de reacción las conversiones decrecieron con el aumento del largo de cadena del ácido graso. Por lo tanto, la mayor conversión fue la correspondiente al ácido C6:0 a las 48 h de reacción, alcanzando a un 32,8 %. Para este mismo lapso se obtuvieron conversiones de los ácidos C8:0, C10:0 y C12:0 de 14,9, 8,0 y 5,0 % respectivamente, mientras que para el resto de los ácidos grasos se obtuvieron conversiones menores al 5 %, también decrecientes con el largo de cadena del ácido graso.

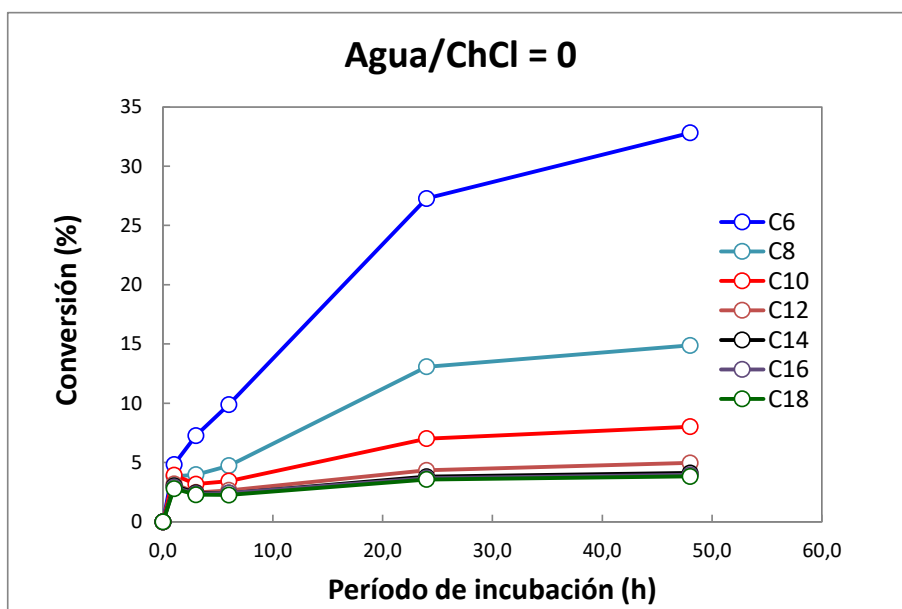


Figura 6.2. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con n -butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en el DES 4 anhidro ($R = 0$)

Se observa que la adición de agua al medio de reacción en una relación molar agua/ChCl = 1 (Figura 6.3) produjo un significativo aumento de la velocidad de generación de alquilatos de butilo, sobre todo para los de ácidos grasos de mayor largo de cadena. Particularmente la conversión del ácido graso C6:0 alcanzó un 31,4 % luego de 4 h de reacción, levemente superior que la alcanzada luego de 48 h en el medio anhidro. Contrariamente a lo observado en el medio de reacción sin agua, las conversiones del resto de ácidos grasos aumentaron gradualmente durante todo el período de incubación. Las conversiones finales de ácidos grasos de C10:0 a C18:0 fueron todas superiores al 80 %, mientras que el ácido graso 8:0 alcanzó una conversión ligeramente inferior del 75 %.

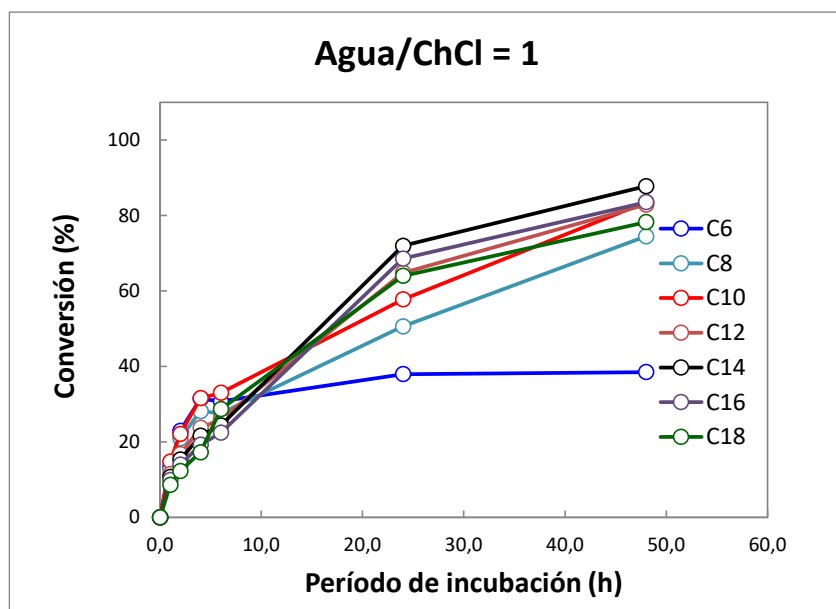


Figura 6.3. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con *n*-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para $R = 1$

Los ensayos con valores crecientes de concentración de agua en el medio de reacción (Figuras 6.4 y 6.5) confirman la existencia de un efecto favorable de esta variable sobre la actividad catalítica de la enzima, así como una menor eficiencia en la esterificación de los dos ácidos más cortos (C6:0 y C8:0) en relación a los demás.

En el medio de reacción con relación molar agua/ChCl = 2 (Figura 6.4) se obtuvieron conversiones aún mayores que las observadas en los casos anteriores, y nuevamente el

incremento fue mayor para los ácidos grasos de mayor largo de cadena. Efectivamente la máxima conversión fue del 96,6 % y correspondió al ácido esteárico (C18:0) a las 48 h de reacción. Luego de 5 horas de reacción las conversiones alcanzadas por los ácidos C10:0 a C18:0 excedieron el 80 % mientras que los ácidos C6:0 y C8:0 alcanzaron conversiones de 49,0 y 53,0 %, respectivamente. Posteriormente, a las 24 h de reacción, estos últimos mostraron conversiones del 56,5 y 85,0 %, respectivamente, las que verificaron un descenso 45,0 y 82,6 %, respectivamente, alcanzadas las 48 h de reacción. Este fenómeno podría estar asociado a reacciones de hidrólisis competitivas promovidas por el elevado contenido de agua en el medio de reacción.

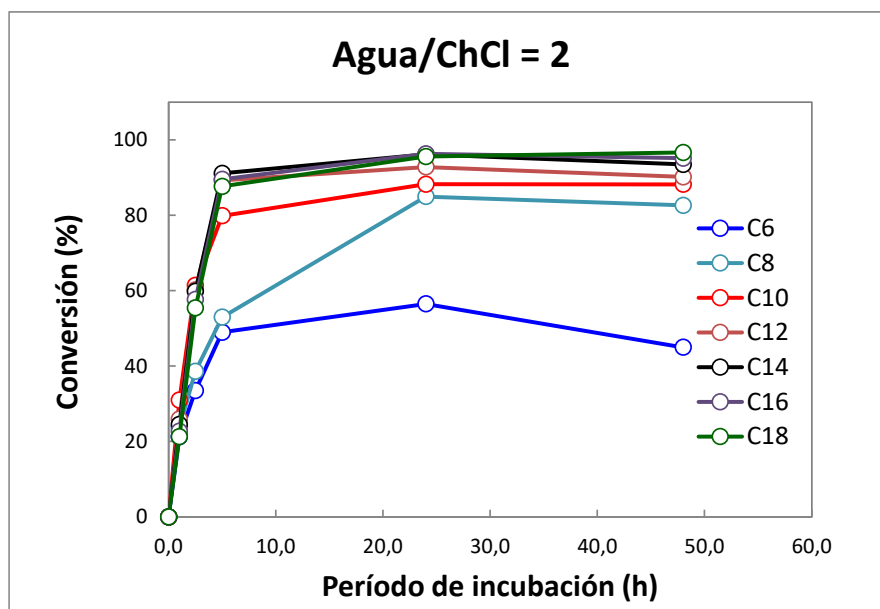


Figura 6.4. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con *n*-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para $R = 2$

En la condición correspondiente al mayor contenido de agua ensayado (relación molar agua/ChCl=3), mostrada en la Figura 6.5, se verificaron las mayores velocidades de reacción para todos los ácidos grasos. Los ácidos grasos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) alcanzaron su conversión máxima tan sólo a las 3 h de reacción, con valores cercanos al 95 %, los que permanecieron prácticamente constantes durante el resto del período de incubación. Los ácidos grasos mirístico (C14:0), láurico (C12:0) y cáprico (C10:0) alcanzaron prácticamente conversión total a las 24 h de incubación, aunque a las 48

h de reacción las mismas mostraron un leve descenso, lo que podría deberse a la ocurrencia de reacciones de hidrólisis, como se mencionó anteriormente. La conversión del ácido caprílico (C8:0) reveló un comportamiento similar ya que alcanzó una conversión de un 88,7 % a las 24 h de reacción, la cual que disminuyó hasta 73,4 % a las 48 h de reacción. En cuanto al ácido caproico (C6:0), este alcanzó un máximo de conversión de 52,1% a las 6 h de reacción seguida por una disminución progresiva hasta 41,5 y 26,5 % a las 24 y 48 h de reacción, respectivamente.

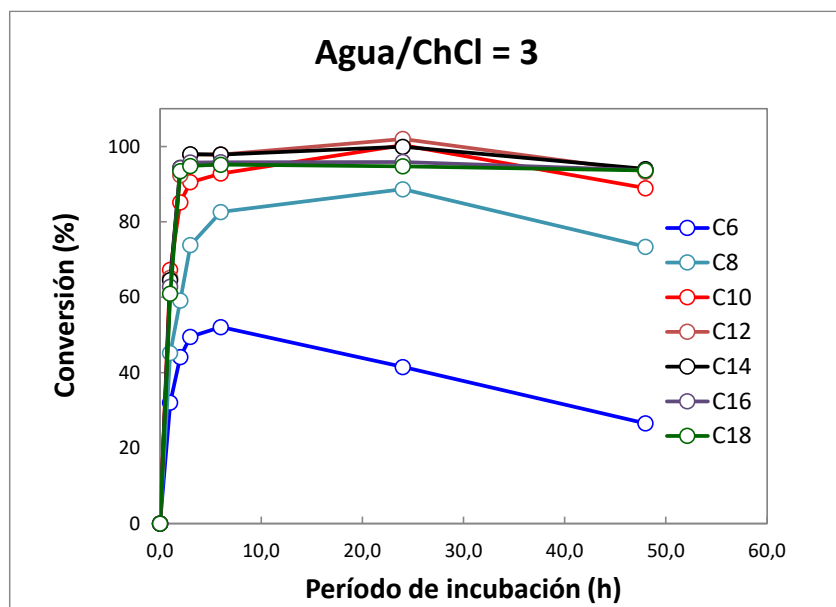


Figura 6.5. Evolución de la conversión de los diferentes ácidos grasos en la esterificación con *n*-butanol catalizada por la lipasa iCAL-B, en medio DES 4 para $R = 3$

Observando en conjunto la situación presentada en las Figuras 6.2 a 6.5, se deduce que mientras que en ausencia de agua en el medio de reacción la eficiencia de la conversión a ésteres butílicos fue mayor a medida que decrece el largo de cadena del ácido graso, esto se revirtió cuando la reacción transcurrió en el DES 4 con agregados de agua, efecto que se acentuó desde $R=1$ a 3.

El efecto del agua en el medio de reacción podría ser explicado por su posible efecto sobre el modo de organización de las moléculas de ácidos grasos, ya que, sería esperable que dependiendo del contenido de agua del medio, estas moléculas presenten tendencia a organizarse de diferente manera según su largo de cadena y carácter anfifílico, pudiendo encontrarse bajo dos modalidades: disueltas (o dispersas) o formando agregados

moleculares. Dichos agregados pueden involucrar varios tipos de organización complejos, como la formación de micelas, o micelas inversas, alrededor de gotículas de agua y/o de gotículas del DES y/o agregados microscópicos, dependiendo del número de carbonos y capacidad anfifílica de los sustratos.

Es razonable entonces suponer que los ácidos grasos, según su longitud, son capaces de formar agregados o de dispersarse en el DES según la cantidad de agua en el mismo. Asimismo, podría considerarse que la posible organización de los ácidos grasos de cadena larga y media en el solvente enriquecido en agua podría dar lugar también a la incorporación del n-butanol en el seno de dichas estructuras, que al migrar a los poros del soporte de la lipasa iCAL-B inmovilizada transportarían ambos sustratos simultáneamente al sitio activo de la misma.

Este fenómeno se vería potenciado por el progresivo agregado de agua al DES, que aumentaría gradualmente la polaridad del medio, favoreciendo la formación de micelas de los ácidos grasos más largos. A la vez, es conocido que el aumento de la concentración de agua disminuye la viscosidad de este solvente, lo que combinado con el descripto anteriormente favorecerían la transferencia de sustratos al sitio activo de la enzima.

Por el contrario, los ácidos grasos y el n-butanol disueltos o dispersos en el DES, que no formaron parte de las micelas, pueden migrar al sitio activo de la lipasa simultáneamente o no, por lo que la probabilidad de que estos se encuentren al mismo tiempo en el sitio activo sería menor que cuando lo alcanzan formando un agregado mixto.

Se debería considerar también la diferente afinidad de cada ácido graso con el interior de los poros que conforman la resina que soporta al catalizador. Cuando la reacción transcurre en el medio DES sin agregado de agua, posiblemente las moléculas más pequeñas difundan con más facilidad en el solvente viscoso hacia el interior de los poros de la resina, por lo que su reacción se vería favorecida frente a la de moléculas de mayor tamaño. Pese a esto, los bajos rendimientos observados pueden explicarse por la combinación de una baja velocidad de difusión debido a la elevada viscosidad del medio, y por la ausencia de una cantidad de agua suficiente para que la lipasa alcance su óptimo de actividad.

Este planteo coincide con la importancia de los fenómenos de transferencia de masa y la dependencia de los mismos del tamaño de las gotículas de sustrato en el medio de reacción

descriptas en detalle para la síntesis de glicolípidos en el DES ChCl/urea por Hollenbach et al. (2020). Los autores concluyeron que la accesibilidad de los ácidos grasos al centro activo de la lipasa es un factor limitante en el rendimiento de la reacción y que la disminución del tamaño de la gotícula de la emulsión formada por los ácidos grasos y el DES, aumentó significativamente la velocidad inicial de reacción y el rendimiento de la misma.

En la Figura 6.6 se muestran las velocidades iniciales de reacción (V_0 en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{enzima}}^{-1}$) determinadas a partir de los valores iniciales de conversión (Ec. 6.2) para cada nivel de agua (R) en el DES y largo de cadena del ácido graso. Los resultados muestran que la velocidad inicial de reacción crece con el incremento de la concentración de agua en el medio de reacción, lo que resulta coherente con lo mostrado en las Figuras 6.2 a 6.5. Se observa además que en el DES sin agregado de agua las velocidades iniciales de reacción de los ácidos grasos de cadena corta son las mayores, disminuyendo gradualmente al aumentar el largo de cadena. El análisis de las velocidades iniciales permite visualizar claramente los cambios en la eficiencia con que reacciona cada ácido graso a los diferentes niveles de agua en el medio. Puede verificarse que para R=3 la velocidad inicial de reacción del ácido esteárico (C18:0) excede a la del ácido caproico (C6:0) alcanzando una relación de $V_{0,\text{C18:0}}/V_{0,\text{C6:0}}=1,8$ lo que es prácticamente inverso a lo obtenido en la situación con R=0.

Se observa claramente que los agregados de agua a valores de R=1, 2 y 3 produjeron un aumento significativo de la velocidad inicial con respecto a la obtenida en el DES anhidro. En el solvente conteniendo agua al nivel R=3 se alcanzaron las mayores velocidades iniciales para cualquiera de los ácidos grasos, con los máximos valores en aquellos de largos de cadena de C10 a C18, sin que se notaran diferencias significativas entre ellos.

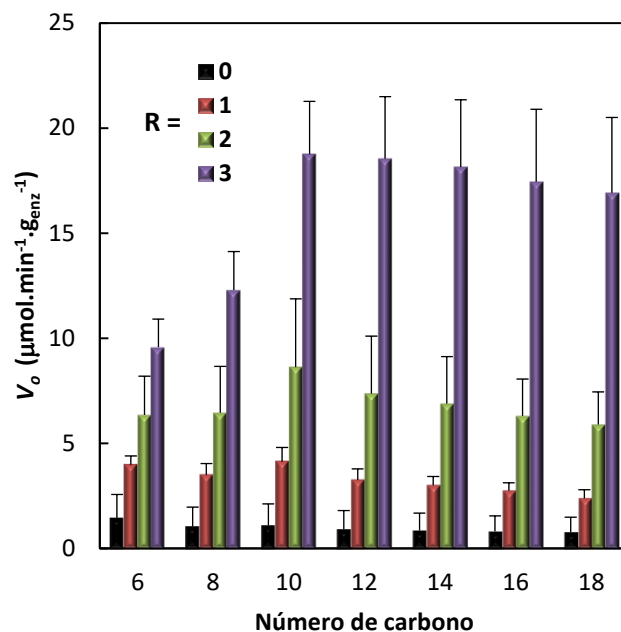


Figura 6.6. Velocidades iniciales correspondientes a la esterificación catalizada por la lipasa iCAL-B de los ácidos grasos de diferente largo de cadena con n-butanol en medio DES 4 con diferentes contenidos de agua (R)

Como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos pueden atribuirse a una combinación de múltiples factores por tratarse de una reacción enzimática heterogénea y las características del medio de reacción, pudiendo plantearse alguna interpretación adicional.

Por ejemplo, la alta conversión alcanzada por el ácido graso de cadena más corta en el DES sin agregado de agua, coincide con su mayor velocidad inicial de reacción en esas condiciones, lo que sugiere que la actividad de la lipasa fue suficiente para catalizar la reacción pero que no todos los ácidos grasos se encontraban disponibles para reaccionar.

Como se ha mencionado, la red generada por los enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES anhidro es la más rígida y puede generar enlaces de hidrógeno también con el n-butanol (Bubalo et al., 2015), así como con residuos de la superficie de la lipasa iCAL-B (Monhemi et al., 2014). En estas condiciones se podría plantear también la hipótesis de que el ácido graso de cadena más corta es el más hábil para interactuar con los componentes del DES por lo que, si además se admite la interacción DES/butanol y DES/lipasa, le permitiría acceder más fácilmente al alcohol y al sitio activo de la lipasa, convirtiéndose en el sustrato preferido en medio anhidro.

Por el contrario, a medida que crece la concentración de agua en el medio, la interacción agua-DES podría favorecer la disociación del n-butanol del DES, haciendo que una mayor proporción del mismo esté disponible para reaccionar. A su vez en un sistema con alta concentración de agua los ácidos grasos más largos e hidrófobos tendrán la menor afinidad para interactuar con los componentes hidrófilos del sistema ChCl:urea, estando así disponibles para ser esterificados y, posiblemente, transportados mediante agregados lipídicos junto con el n-butanol hacia los poros de la enzima inmovilizada. Como resultado, los ácidos grasos más cortos e hidrófilos podrían estar en desventaja para acceder a la esterificación.

Obviamente estos análisis parten de suposiciones que requerirían de un estudio más profundo, el cual escapa al alcance de este trabajo.

6.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el agregado de agua al medio DES formado por ChCl y urea a una relación molar agua/ChCl (R) igual a 1 es esencial para asegurar la adecuada hidratación de la lipasa iCAL-B y para permitir el desarrollo de su capacidad catalítica, sin favorecer la hidrólisis por sobre la reacción de esterificación.

Aunque se constató que niveles mayores de agua en el medio provocaron el aumento de la velocidad inicial de esterificación, repercutieron negativamente en las conversiones alcanzadas en incubaciones prolongadas por más de 24 h, lo que podría vincularse al debilitamiento de los enlaces entre los componentes del DES causado por el exceso de agua en el medio, permitiendo a la urea expresar su efecto desnaturalizante sobre el catalizador. Asimismo, elevadas concentraciones de agua en el medio podrían contribuir a la ocurrencia de la reacción inversa, potenciando la hidrólisis de los ésteres.

Los resultados obtenidos confirmaron también que el efecto de la concentración de agua en este DES afecta de diferente manera la esterificación de ácidos grasos de distinto largo de cadena. Mientras que los ácidos grasos de cadena más corta caproico y caprílico (C6 y C8, respectivamente) se esterificaron más eficientemente en el medio de reacción anhidro, esta tendencia se invirtió a medida que la concentración de agua se incrementó.

Las características del sistema estudiado permiten aventurar diferentes hipótesis que involucran una compleja combinación de varios fenómenos que conducen a los resultados

obtenidos. Estos incluyen el efecto del agua sobre la interacción entre los componentes del DES y de éstos con los propios sustratos, su efecto sobre la posibilidad de que los sustratos formen agregados o agregados mixtos determinantes sobre el acceso de los mismos al sitio activo de la lipasa y el efecto sobre la viscosidad del medio de reacción y los fenómenos de transferencia de masa asociados.

CAPÍTULO 7

SÍNTESIS DE ESTERES DE FITOESTEROLES

7.1 Introducción

Como se mencionó en la Introducción (Capítulo 1), está demostrado que la incorporación en la dieta de alimentos con esteroides, estanoles y sus derivados puede tener efectos beneficiosos para la salud humana. Particularmente los fitoesteroides se clasifican dentro de los triterpenos y poseen una estructura semejante a la del colesterol, que es el esteroide más abundante en las células animales. Dentro de estos compuestos los más reconocidos por ser bioactivos en humanos se encuentran el Estigmasterol, el β -sitosterol y el Campesterol (A. da S. Pereira et al., 2022).

Debido a la estructura de los fitoesteroides que contiene un núcleo esteroide policíclico y una cadena lateral en posición C-17 los mismos son poco solubles en agua, además estos poseen un grupo hidroxilo en la posición C-3 que limita su solubilidad en aceite (Figura 3.4). Las propiedades mencionadas sumadas al alto punto de fusión de los fitoesteroides hacen que su incorporación en alimentos sea compleja. Es por esto que se han diseñado estrategias para que los fitoesteroides puedan ser incluidos más fácilmente en matrices alimentarias, entre ellas la síntesis de ésteres de fitoesteroides (Feng et al., 2021).

Aunque los ésteres de fitoesteroides pueden ser obtenidos por síntesis química, este método de obtención acarrea inconvenientes tales como consumo de energía en exceso, formación de productos secundarios, pardeamiento de productos y baja selectividad, entre otros. En este contexto se reconoce la catálisis enzimática como una alternativa a la síntesis química que no implica los inconvenientes mencionados anteriormente. Es por esto que se han realizado diversos estudios en la catálisis enzimática de ésteres de fitoesteroides por esterificación directa con las lipasas iCAL-B y de *Cándida rugosa* (He et al., 2017).

Una vez verificado que el DES 4 (ChCl/urea) resultó ser un medio de reacción conveniente ya que, a diferencia de los otros DES, sus componentes no participan en las reacciones de

interés (Capítulo 5), en este capítulo se procedió a estudiar la eficiencia de la síntesis de ésteres de fitoesteroles en este solvente mediante dos modalidades, la esterificación y la transesterificación con ácido láurico o laurato de vinilo, respectivamente.

Asimismo, habiéndose demostrado el rol fundamental de la concentración de agua en el medio de reacción, se consideró el estudio de esta variable sobre el rendimiento del proceso.

Como catalizador se utilizó la lipasa de *Candida rugosa*, dado que si bien los resultados del capítulo anterior demostraron que la lipasa iCAL-B es muy activa en reacciones de esterificación de ácidos grasos en el DES 4, la misma mostró mínima actividad catalítica frente a la síntesis de ésteres de esteroides en hexano, lo que sugiere cierto grado de rechazo por estos sustratos. En cambio, la lipasa de *Candida rugosa* fue de las que mostró mayor actividad frente a esa misma reacción (Capítulo 3).

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, estándares analíticos y la lipasa de *Candida rugosa* fueron adquiridos a la firma Sigma–Aldrich. La mezcla de fitoesteroides fue suministrada por la empresa COGNIS GmbH.

7.2.2 Esterificación de fitoesteroides con ácido láurico.

En un vial de 15 mL se colocaron 25 mg de la mezcla de fitoesteroides, 50 mg de ácido láurico (300 % exceso), 30 mg de lipasa de *Candida rugosa* y 4 g del DES 4, el cual se incubó durante 24 h a 45 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Finalizado el período de incubación se agregaron 5 mL de agua destilada y se agitó en vortex para generar la disrupción del DES. Finalmente se realizaron dos extracciones sucesivas con 5 mL de hexano y los extractos se combinaron y se analizaron por GC.

El mismo procedimiento se repitió agregando al vial la cantidad de agua destilada correspondiente a R = 1, 2 o 3. Las incubaciones se realizaron por triplicado y se informan los resultados promedio.

Las muestras se analizaron por GC en un equipo Shimadzu GC-2010, con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (15 m × 0.32 mm x 0.1 µm). La temperatura inicial del programa fue de 160 °C

seguida de un aumento de la temperatura hasta 230 °C a 4 °C/min. Se utilizó N₂ como gas portador a 70 kPa.

El porcentaje de conversión total de la mezcla de fitoesteroles se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ conversión} = 100 \times \frac{\Sigma (A_{ELF})}{\Sigma (A_{ELF}) + \Sigma (A_F)} \quad [\text{Ec. 7.1}]$$

$\Sigma (A_{ELF})$: Suma de las áreas de los picos del cromatograma correspondientes a los ésteres láuricos de los fitoesteroles.

$\Sigma (A_F)$: Suma de las áreas de los picos del cromatograma correspondientes a los fitoesteroles sin esterificar.

7.2.3 Transesterificación de fitoesteroles con laurato de vinilo

Se repitió el procedimiento descrito en el punto anterior (7.2.2) en idénticas condiciones, pero sustituyendo los 50 mg de ácido láurico por 65 µL de laurato de vinilo (LV: 300 % exceso). Las incubaciones se prolongaron por 24 y 72 h. Realizándose en paralelo dos blancos para el nivel de agua correspondiente a R = 3, ambos sin contener fitoesteroles y sólo uno de ellos con agregado de enzima.

La conversión de los fitoesteroles a lauratos de fitoesterilo se realizó según la Ec. 7.1.

El mismo análisis por GC permitió detectar la ocurrencia de hidrólisis del laurato de vinilo, manifestada por la aparición de ácido láurico en las muestras. En estos casos fue posible determinar también el porcentaje de hidrólisis del LV, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ hidrólisis de LV} = 100 \times \frac{A_{AL}}{A_{LV} + A_{AL}} \quad [\text{Ec. 7.2}]$$

A_{AL} : Área del pico del cromatograma correspondientes al ácido láurico.

A_{LV} : Área de pico del cromatograma correspondientes al laurato de vinilo.

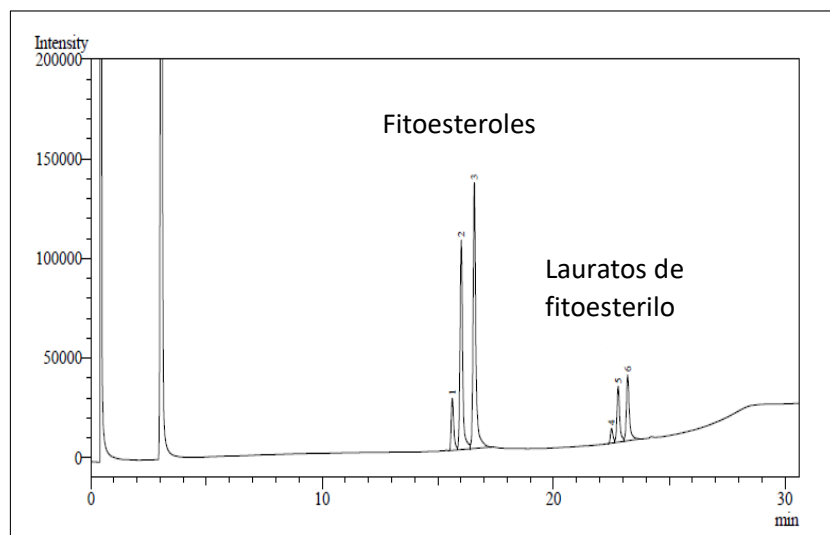


Figura 7.1. Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa luego de 24 h de reacción de síntesis de esteres de esteroides en medio DES 4 catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*

7.2.4 Transesterificación de la mezcla de fitoesteroides con laurato de vinilo agregado en adiciones sucesivas

Se repitió el mismo procedimiento descrito en “7.2.3”, pero realizando dos agregados extra de 65 μL o 22 μL de LV, uno a las 24 y otro a las 48 h. En este caso únicamente se trabajó con una concentración de agua en el medio correspondiente a $R = 3$ y las incubaciones se prolongaron por 72 h. Se realizaron tomas de muestra a las 24, 48 y 72 h de incubación.

Alternativamente, se hicieron incubaciones con adiciones sucesivas de LV, también de 65 o 22 μL , realizadas a períodos más cortos: 2, 4 y 6 h, las que se prolongaron por 24 h.

En todos los casos las conversiones y porcentajes de hidrólisis se calcularon mediante las ecuaciones 7.1 y 7.2, respectivamente.

Las incubaciones se realizaron por triplicado y se informan los resultados promedio y las desviaciones estándar.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Esterificación de fitoesteroles con ácido láurico

En primer lugar, se intentó realizar la síntesis de ésteres de la mezcla de fitoesteroles mencionada en 7.2.1. mediante la esterificación con ácido láurico, en medio DES 4 y niveles de agua correspondientes a $R = 0, 1, 2$ y 3 , catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*. Sin embargo, al cabo de 48 h de incubación no se detectó la formación de ésteres de ninguno de los fitoesteroles de la mezcla, en ninguna de las condiciones ensayadas.

Si bien estos resultados se encontraron en principio algo llamativos, dado que esta lipasa mostró alta actividad catalítica en la síntesis de ésteres de fitoesteroles (Capítulo 3), dicho comportamiento fue verificado en la transesterificación con LV y en medio hexano, lo que indica que el cambio de sustrato y solvente afectó drásticamente su desempeño como catalizador.

Tal como se ha mencionado en los capítulos anteriores, el rendimiento de las reacciones de catálisis enzimática en medios de reacción DES depende de múltiples factores que pueden jugar a favor o en contra de los procesos de interés. Asimismo, ya se ha hecho referencia a las ventajas que representa el LV como sustrato en reacciones de síntesis de ésteres, por lo cual se procedió a la sustitución del ácido láurico por este sustrato.

7.3.2 Transesterificación de fitoesteroles con laurato de vinilo

Como se demostró en los del Capítulo 3 la lipasa de *Candida rugosa* fue muy activa en la catálisis de la transesterificación de esta mezcla de fitoesteroles con el LV en medio hexano, alcanzando prácticamente la conversión completa luego de 40 h de incubación.

La Figura 7.2. muestra los resultados obtenidos cuando la incubación se realizó en el medio ChCl/urea, como se describe en 7.2.3. Se observa que se verificó la generación de ésteres de los tres fitoesteroles de la mezcla, obteniéndose luego de 24 h de incubación los porcentajes de conversión totales de 0, 3,4, 7,9 y 12,8 % en los casos en que el DES 4 se utilizó con niveles de agua correspondientes a $R = 0, 1, 2$ y 3 , respectivamente. Los resultados confirman, también en este caso, el efecto determinante de la actividad de agua en el medio de reacción sobre la actividad enzimática, manifestado por el aumento de la eficiencia de la reacción a medida que se aumentó el contenido de agua del medio. El mismo efecto fue descrito en los capítulos 5 y 6 para reacciones de esterificación

catalizadas por la lipasa iCAL-B en este mismo DES, por lo que este resultado no resulta llamativo, sobre todo tratándose de un sustrato más complejo como los fitoesteres y de una lipasa no inmovilizada, lo que suele conferirle mayor vulnerabilidad a un catalizador enzimático frente a un medio no convencional de alta higroscopicidad.

Si bien, como ya se mencionó la utilización de LV como sustrato resulta ventajosa, y así lo demuestran los resultados obtenidos, en el capítulo precedente se mencionó también los inconvenientes de su utilización en medios con elevada concentración de agua, ya que paralelamente al proceso de interés es factible que la lipasa catalice también su hidrólisis a ácido láurico.

Efectivamente, el análisis de los resultados mostró la presencia de diferentes niveles de ácido láurico en los productos, lo que permitió determinar el porcentaje de hidrólisis del LV en dichas muestras (Ec. 7.2). La Figura 7.2 muestra que el grado de hidrólisis fue mayor conforme se incrementó la concentración de agua en el sistema, siendo despreciable para los niveles de agua correspondientes a $R=0$ y 1 , pero alcanzando $3,9$ y $11,8$ % para los correspondientes a $R=2$ y 3 , respectivamente.

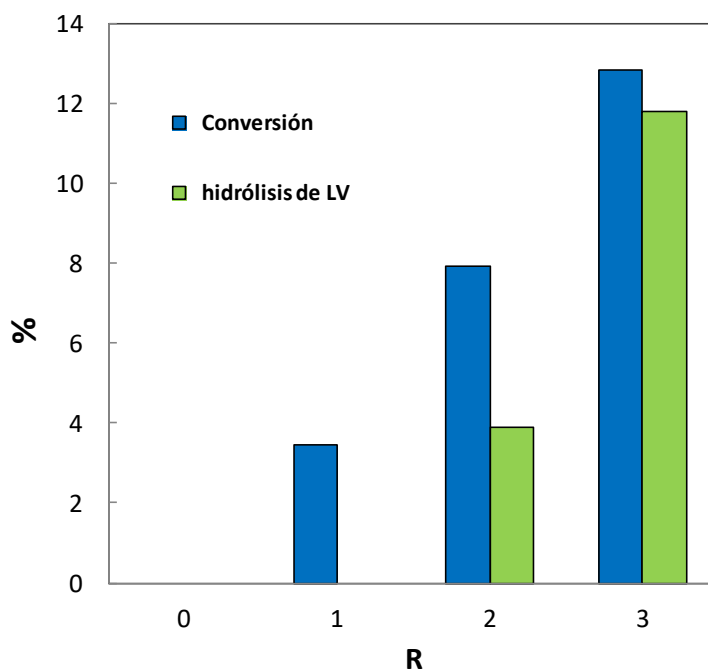


Figura 7.2. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteres e hidrólisis del LV luego de 24 h de transesterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en medio de reacción DES 4, conteniendo agua a los niveles $R=0$, 1 , 2 , y 3

La Figura 7.3 muestra además que la proporción entre los ésteres de fitoesteroles generados prácticamente coincidió en todos los casos con la de los respectivos fitoesteroles en la mezcla utilizada como sustrato, lo que indicó que la enzima no mostró preferencia por ninguno de los tres esteroides. Este comportamiento coincide con el mostrado por esta misma enzima en la catálisis de esta reacción en medio hexano (Capítulo 3).

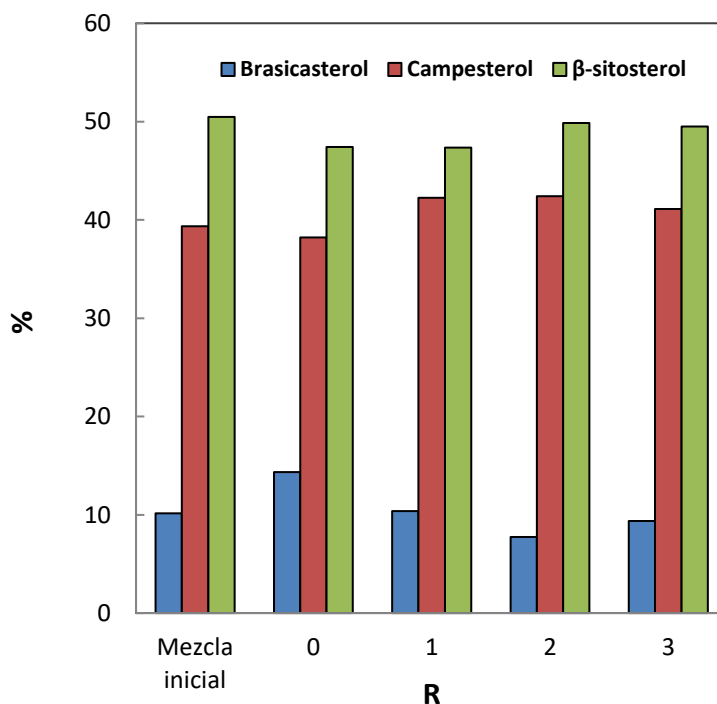


Figura 7.3. Composición de la mezcla de fitoesteroles utilizada como sustrato y de la fracción de ésteres de fitoesteroles obtenida luego de 24 h de transesterificación de dicha mezcla con LV, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en medio de reacción DES 4 conteniendo agua a los niveles R=0, 1, 2, y 3

Si bien las conversiones alcanzadas no fueron muy elevadas, los resultados demostraron nuevamente que el LV es mejor sustrato que el ácido láurico y también que la concentración de agua en el DES 4 es determinante sobre la actividad de la enzima.

A los efectos de evaluar si el aumento del período de incubación permitiría alcanzar conversiones más elevadas, se repitió la incubación en idénticas condiciones, pero prolongando la misma por 72 h. Si bien en este caso tampoco se observó la generación de ésteres en el sistema anhidro (R=0), resultó llamativo que las conversiones alcanzadas a los

niveles de agua correspondientes a R= 1, 2 y 3 fueron muy similares, o incluso levemente inferiores, a las obtenidas luego de sólo 24 h de reacción: 1,9, 5,5 y 14,8 %, respectivamente.

El nivel de hidrólisis se incrementó con el aumento de la concentración de agua en el medio de reacción, alcanzando un 24,1 % para la incubación realizada a R = 3. Asimismo, el porcentaje de hidrólisis de una incubación testigo realizada en idénticas condiciones con agua en el medio al nivel R=3 pero sin la adición de fitoesteroles, arrojó un porcentaje de hidrólisis del LV a ácido láurico del 86,4 % luego de 72 h de incubación.

Por otra parte, en un segundo blanco realizado en las mismas condiciones, pero sin la presencia de la enzima, no se detectó la generación de ácido láurico luego de las 72 h de incubación, lo que demuestra que la hidrólisis del LV se debió exclusivamente a la acción de la lipasa, descartando cualquier posibilidad de hidrólisis espontánea debida al exceso de agua en el medio.

Estos resultados demostraron que la ventaja del uso de LV como sustrato se perdió gradualmente al aumentar el período de incubación, a medida que éste fue convertido progresivamente en ácido láurico.

7.3.3 Transesterificación de fitoesteroles con laurato de vinilo suministrado en adiciones sucesivas

Si bien los resultados anteriores demostraron que en el medio DES 4 la concentración de agua correspondiente a R=3 fue la más favorable para la síntesis de los ésteres de interés, esta alta concentración de agua en el medio de reacción promovió la hidrólisis del LV a ácido láurico, con la consecuente pérdida del sustrato necesario para la reacción. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de realizar adiciones sucesivas del sustrato durante la incubación. Para ello se procedió de dos maneras, adicionando a las 0, 24 y 48 h de incubación una cantidad de LV igual a la adicionada a la mezcla de partida (65 μ L), o iniciando la incubación con un tercio de dicha cantidad de LV ($65/3 = 21,7 \mu\text{L} \sim 22 \mu\text{L}$ por fines prácticos), cantidad que representa un exceso estequiométrico del 100 %, y adicionando a las 24 y 48 h de incubación ese mismo volumen, totalizando 65 μ L de LV al final de la incubación. De esta de manera se buscó “reponer” la pérdida de LV por hidrólisis y evaluar la conversión alcanzada al mantener una alta concentración del mismo a lo largo de todo el período de incubación.

La Figura 7.4 muestra que en el caso de la incubación realizada hasta alcanzar un total de 65 μL de LV (3x 65/3 μL), a las 24 horas de reacción la conversión obtenida fue del 18,4 % pero, pese a las adiciones sucesivas de sustrato, a las 48 y 72 h de reacción la conversión descendió a 15,3 y 11,6 %, respectivamente.

La Figura 7.4 muestra también que cuando la incubación se inició con 65 μL de LV y se realizaron adiciones sucesivas de esa misma cantidad de LV a 24 y 48 h de reacción, las conversiones alcanzadas superaron a las obtenidas adicionando un tercio de este volumen.

Luego de adicionado el LV y prolongada la incubación por 48 h, se observa que la conversión alcanzó al 32,5 %, lo que sugiere que la estrategia seguida a los efectos de mantener elevada la concentración del sustrato tuvo un efecto favorable sobre la conversión, pero para que ello sea efectivo se requiere que las adiciones de LV sean elevadas, alcanzando un total de 3 veces la cantidad utilizada en el ensayo descrito en el punto 7.2.2.

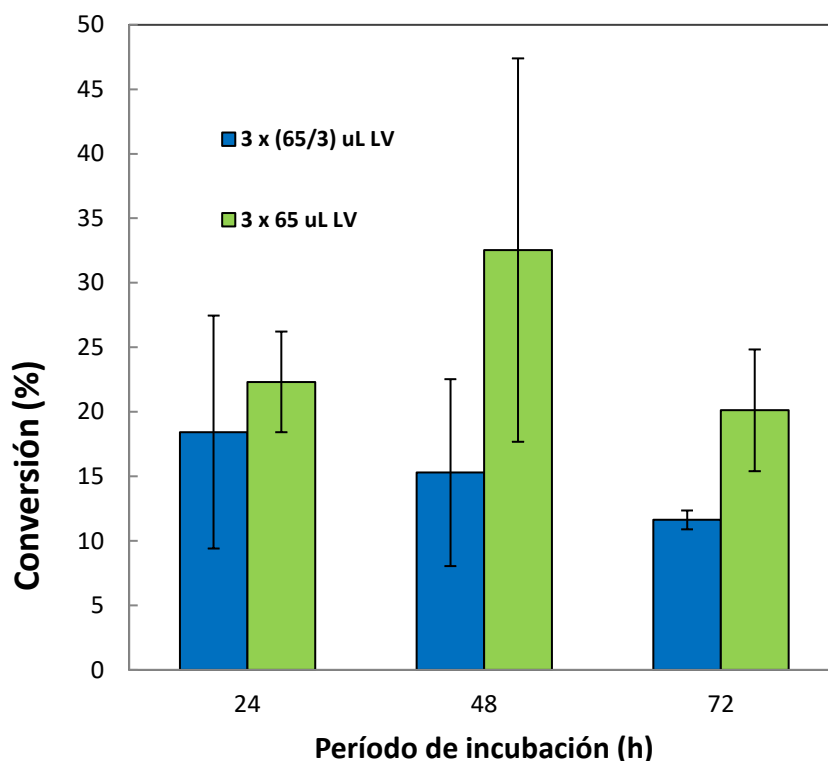


Figura 7.4. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteroles luego de 24, 48 y 72 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 μL o (65/3) μL de LV, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en medio de reacción DES 4 con un nivel de agua de R=3

Debe notarse también que en el caso de la incubación iniciada con 65 μL de LV en la mezcla de reacción, luego de 24 h se alcanzó una conversión del 22,3 % (Figura 7.4), valor superior al 12,8 % que muestra la Figura 7.2 en las mismas condiciones y período de incubación. Esta aparente discrepancia, sumado a los valores de desviación estándar relativamente altos encontrados, indica una pobre reproducibilidad del método que no puede dejar de reconocerse.

Pese al efecto favorable de la segunda adición de LV que produjera un incremento importante de la conversión hacia las 48 h de incubación, se observa que, a las 72 h de incubación, luego de que el sistema reaccionara por otras 24 h con una concentración aún mayor de LV, la conversión descendió a 20,1 %, lo cual resultó inesperado. Sin embargo, este fenómeno podría estar asociado a la posibilidad de la ocurrencia de reacciones de hidrólisis de los propios ésteres de fitoesteroles, catalizada por la misma lipasa, ya que siendo activa en la esterificación debe poder actuar también en la catálisis del proceso inverso.

Considerando esta posibilidad, la concentración de ésteres de fitoesteroles en el medio de reacción, así como los porcentajes de conversión informados, serían el resultado de dos fenómenos contrapuestos ocurriendo en forma simultánea, la generación de los mismos mediante la esterificación y su desaparición por hidrólisis. El efecto de ambos fenómenos sobre la concentración de los ésteres dependerá de la velocidad relativa de los mismos, mientras que una alta velocidad de transesterificación producirá un aumento en los valores de conversión, si la velocidad de esta reacción decae, es posible que la hidrólisis prevalezca y se manifieste produciendo un descenso en la conversión.

La aparición de ésteres en el medio de reacción demuestra inequívocamente que la velocidad de la transesterificación debió superar a la de la hidrólisis al menos hasta los períodos de incubación más breves. Sin embargo, los resultados de la Figura 7.4 indican que el porcentaje de conversión de los fitoesteroles disminuye a tiempos prolongados de incubación. Esto podría deberse a que la generación de ésteres de fitoesteroles se enlentece al aumentar el porcentaje de hidrólisis del LV con el período de incubación, mientras que la hidrólisis de los ésteres continúa ocurriendo sin que su velocidad se vea afectada en forma significativa, resultando en un descenso neto de la concentración de los ésteres en el medio de reacción.

Si esto fuera así, períodos prolongados de incubación repercutirían negativamente en la concentración de ésteres, por lo que resultó interesante ensayar la misma estrategia de agregados sucesivos de LV a intervalos más breves. Para ello se llevó a cabo la transesterificación de la mezcla de fitoesteres con adiciones sucesivas LV (de 65 o 22 μL) en las mismas condiciones que los ensayos anteriores, pero realizando las 3 adiciones de LV a las 0, 3 y 6 h de incubación, tomándose muestras de la mezcla de reacción luego de 2, 4, 6 y 24 h de incubación.

En la Figura 7.5 se muestran los porcentajes de conversión obtenidos en ambas incubaciones. Para el caso de la reacción en la que se realizaron adiciones de 65 μL de LV se observa que las conversiones crecieron conforme transcurrió la reacción, alcanzando un máximo de conversión de 53,2 % a las 6 h de reacción, período en que el sistema recibió dos agregados de LV (a tiempo 0 y 3 h). Posteriormente a las 24 h de reacción la conversión a ésteres disminuyó a 27,6 %, repitiendo el comportamiento del sistema observado en el caso anterior.

En el caso de la reacción realizada con agregados de 22 μL , se observó un comportamiento similar, con incrementos de la conversión hasta las 6 h de incubación, en que alcanzó un máximo de 27,2 % y disminución posterior al cabo de las 24 h de incubación.

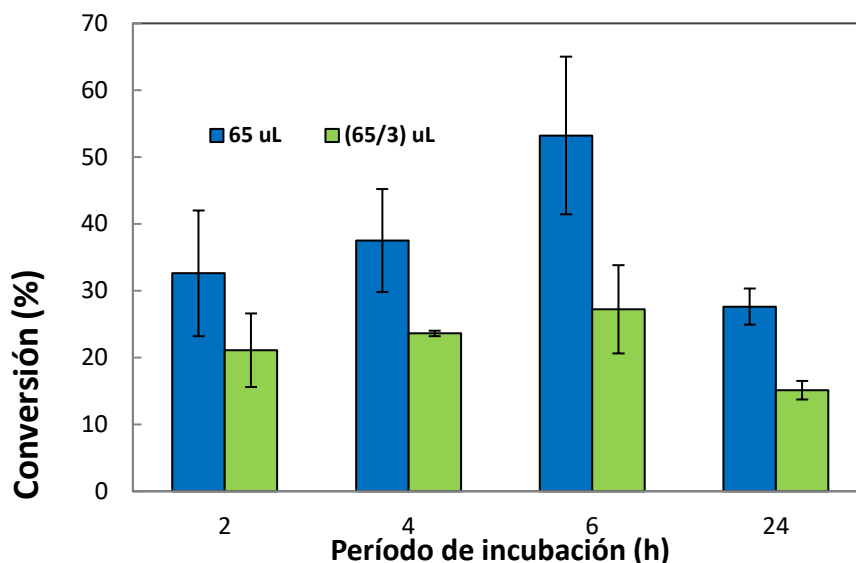


Figura 7.5. Porcentaje de conversión de la mezcla de fitoesteres luego de 2, 4, 6 y 24 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 μL o (65/3) μL de LV, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en medio de reacción DES 4 con R=3

En la Figura 7.6 se muestran los porcentajes de hidrólisis del LV determinados a los mismos tiempos de incubación que las muestras de la Figura 7.5. Para ambos valores de agregado de LV la hidrólisis fue máxima a las 2 h de incubación, alcanzando al 81,9 y 41,5 % para los casos en que se partió de 22 o 65 μL de LV, respectivamente. Prácticamente el porcentaje de hidrólisis a las 2 h de incubación en el caso que se partió de 22 μL de LV duplica al obtenido cuando se partió de 65 μL .

Conforme transcurrió la reacción el porcentaje de hidrólisis decreció levemente cuando se realizaron agregados de 65 μL hasta alcanzar un valor de 13,9 % a las 24 h de incubación, mientras que cuando se realizaron agregados de 22 μL el porcentaje de hidrólisis decreció inicialmente, pero mostró un leve incremento a las 24 h de reacción.

Debe tenerse en cuenta que la verificación de un porcentaje de hidrólisis constante o incluso descendente no implica que la hidrólisis no progrese, dado que luego cada adición de LV provoca que el porcentaje de hidrólisis disminuya debido a que se diluye el ácido láurico libre respecto al total (ácido láurico libre + LV).

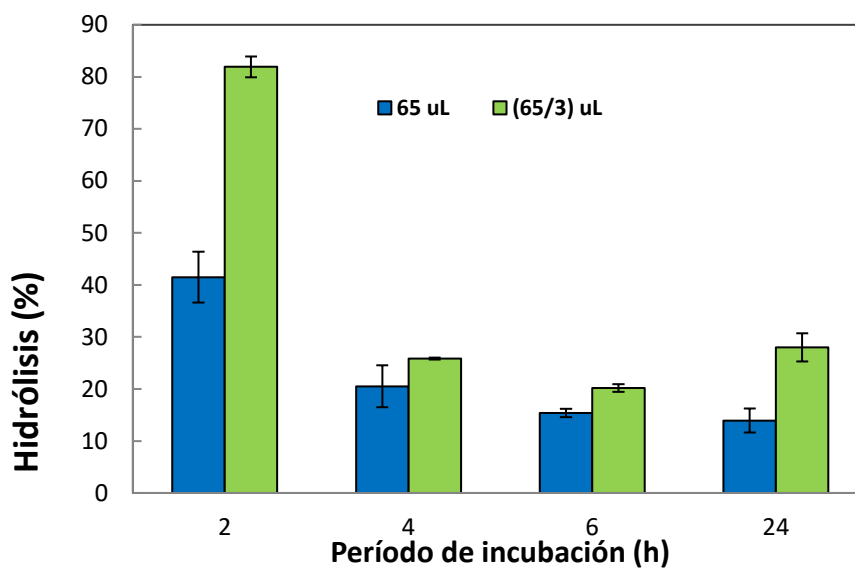


Figura 7.6. Porcentaje de hidrólisis del LV luego de 2, 4, 6 y 24 h de reacción con adiciones sucesivas de 65 μL de LV, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en medio de reacción DES 4 con $R=3$

Los resultados obtenidos demostraron que la estrategia de realizar adiciones sucesivas de LV permitió mantener una elevada concentración de este sustrato, disminuyendo el impacto

de su hidrólisis en el rendimiento de la reacción de interés, lo que permitió superar los porcentajes de conversión de los fitoesteroles a sus ésteres láuricos.

7.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que la esterificación de ácido láurico con fitoesteroles y la lipasa de *Candida rugosa* en el medio DES 4 con diferentes niveles de agua no es un método efectivo para sintetizar ésteres de fitoesteroles.

En cambio, mediante la transesterificación de laurato de vinilo con la mezcla de fitoesteroles llevada a cabo en medio DES 4 con niveles de agua correspondientes a $R = 0, 1, 2$ y 3 se verificó la generación de los productos de interés. Asimismo, la cantidad de ésteres de fitoesteroles obtenida en la reacción aumentó conforme se incrementó la concentración de agua en DES, alcanzando su máximo para el nivel de agua correspondiente a $R = 3$. Estos resultados volvieron a evidenciar que el efecto del agua es crucial sobre la actividad enzimática para ciertos sistemas DES/sustrato/lipasa, corroborando así lo descrito en los capítulos 5 y 6 para reacciones de esterificación catalizadas por la lipasa iCAL-B en este mismo DES.

Cuando la incubación se realizó por 72 h las cantidades de ésteres de fitoesteroles obtenidas no variaron significativamente respecto a las obtenidas durante la incubación de 24 h para todos los niveles de agua. Esto podría deberse a la ocurrencia de los fenómenos de hidrólisis, tanto del laurato de vinilo como de los ésteres de fitoesteroles, ocurriendo simultáneamente a la síntesis de los mismos.

La verificación de la ocurrencia de hidrólisis de laurato de vinilo a ácido láurico en grados significativos cuando se realizó la incubación a elevadas concentraciones de agua se identificó como un inconveniente a resolver, dado que como se mencionó anteriormente, el ácido láurico no es capaz de ser esterificado y generar los ésteres de interés.

Realizar adiciones sucesivas de laurato de vinilo durante el período de incubación (a las 24 y 48 h) demostró ser un método eficiente para mitigar parcialmente el efecto de su hidrólisis sobre el rendimiento de la transesterificación, permitiendo alcanzar conversiones a laurato de colesterilo de hasta 32,5 % en 72 h de reacción.

Finalmente, se logró maximizar el rendimiento mediante incubaciones más breves, de 24 h, realizando adiciones sucesivas de agua a los tiempos de incubación 0, 3 y 6 h, lo que permitió alcanzar una conversión del 53,2 %.

En síntesis, los resultados evidenciaron que el DES 4 en presencia de agua resultó un medio conveniente para la expresión de la actividad catalítica de la lipasa de *Candida rugosa* frente a la reacción de interés, y que la pérdida de uno de los sustratos por hidrólisis puede ser compensada parcialmente mediante el adecuado diseño de métodos de adiciones sucesivas del mismo.

CAPÍTULO 8

SÍNTESIS DE GLUCOLÍPIDOS

8.1 Introducción

Como ya se mencionó el uso de DES como medio para reacciones enzimáticas dirigidas a la obtención de glucolípidos puede presentar ciertas ventajas adicionales a las ya mencionadas para este tipo de solvente. En particular algunos DES, a diferencia de la mayoría de los solventes orgánicos convencionales, tienen la capacidad de solubilizar tanto azúcares hidrofílicos como ácidos grasos hidrofóbicos.

Asimismo, se ha reportado la síntesis enzimática de glucolípidos en el DES formado por ChCl y glucosa, lo que resulta muy conveniente ya que el propio HBD cumple la doble función de formar parte del solvente y actuar como sustrato del proceso de interés.

En este sentido se han estudiado varias combinaciones de relaciones molares de componentes de DES formados por cloruro de colina y glucosa. En el estudio llevado a cabo por Hayyan et al. (2013) se estudiaron las propiedades de las mezclas de ambos componentes las relaciones molares ChCl:glucosa iguales a 1:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 1:1.5, 1:2, y 1:2.5, verificándose que solo las tres primeras formaron un líquido incoloro a temperatura ambiente. Asimismo, estudiaron la viscosidad y la densidad de las cuatro primeras mezclas, encontrando que todas ellas presentaron valores superiores de ambas propiedades al correspondiente a la mezcla eutéctica en un rango de temperaturas de entre 300 y 360 K.

En la Figura 8.1 se presenta el diagrama de fases de mezclas de cloruro de colina con distintos polioles publicado por Harris (2008). En el mismo se verifica que el punto eutéctico para la mezcla ChCl:glucosa se produce en relación molar 2:1 mencionada anteriormente. Sin embargo existen trabajos publicados en los que se describe la transesterificación de ácidos grasos con azúcares en los que el medio de reacción utilizado fue la mezcla ChCl:glucosa en relación molar 1:1 (Pöhnlein et al., 2015).

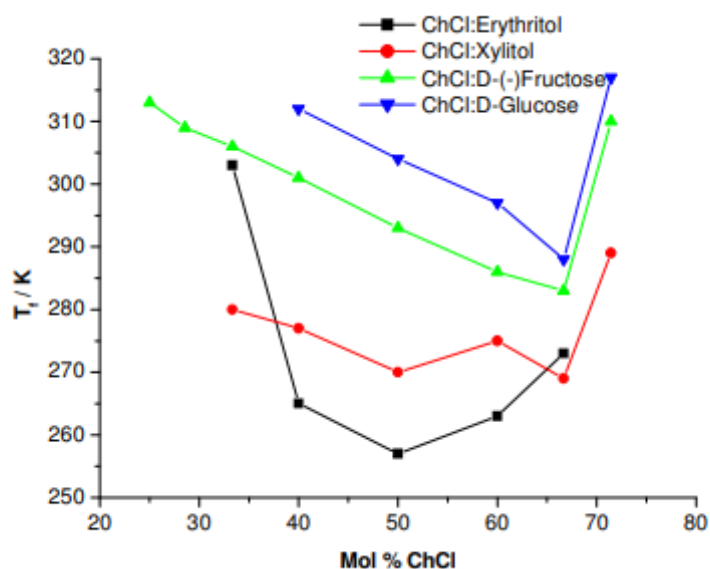


Figura 8.1. Diagrama de fases de mezclas de ChCl:polioles (Harris, 2008)

En este capítulo se estudió la síntesis de glucolípidos mediante la transesterificación de laurato de vinilo con glucosa catalizada por la lipasa iCAL-B. Como medio de reacción se utilizó el DES 4 utilizado en los capítulos precedentes y el DES formado por ChCl y glucosa combinados en dos diferentes proporciones, la relación 2:1 eutéctica y la relación 1:1. Asimismo se estudió el efecto de la concentración de agua en el medio de reacción sobre la eficiencia del proceso.

8.2 Materiales y métodos

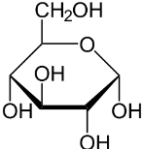
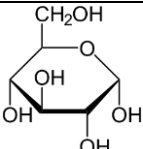
8.2.1 Materiales

Todos los solventes, reactivos, estándares analíticos y las enzimas comerciales fueron adquiridas a la firma Sigma–Aldrich. Se utilizó la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (iCAL-B).

8.2.2 Síntesis de DES

La síntesis de los DES se realizó tal como se describe en el punto 4.2.2 con las relaciones molares mostradas en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: DES formados por ChCl, los HBD que los componen y relación molar HBD/ChCl

Solvente	HBD	(ChCl:Glucosa) _{molar}
DES 5	Glucosa	1:1
		
DES 5*	Glucosa	2:1
		

8.2.3 Síntesis de laurato de glucosilo en DES 4

Se agregaron 600 mg (2,65 mmol) de laurato de vinilo, 150 mg (0,83 mmol) de glucosa, 15 mg de hexadecano, 50 mg de lipasa y 5 g de DES 4 a un vial de 15 mL. El vial fue agitado en vortex durante 10 seg y posteriormente se incubó a 70 °C en bloque calefactor con agitación orbital a 1000 rpm. Las incubaciones se prolongaron por diferentes períodos, durante los cuales se tomaron muestras de 200 µL, las que se transfirieron a un vial de 4 mL conteniendo 1 mL de agua destilada. Luego de agitar el vial en vortex se agregó al mismo 1 mL de acetato de etilo y se agitó en vortex nuevamente. La fase orgánica fue transferida a un vial de 15 mL y esta se secó bajo una corriente de N₂.

Previo al análisis las muestras fueron derivatizadas mediante silanización, para ello, sobre el extracto seco se agregaron 100 µL de piridina y 100 µL de reactivo silanizante compuesto por BSA y TMCS (#15256 Supelco: bis-trimetilsililacetamida 93.0 - 97.0 % + trimetilclorosilano 3.0 - 5.0 %) y fue colocado en un bloque termostático a 70 °C durante 30 min. Finalmente se agregaron 7 mL de hexano y se tomó 1 µL para el análisis por GC.

El análisis se realizó en equipo Shimadzu GC-2010, con inyector on-column PTV, detector de ionización de llama (FID), columna capilar Supelco MET-biodiesel (15 m × 0.32 mm x

0.1 μm). La temperatura inicial del programa fue de 160 °C seguida de un calentamiento hasta 230 °C a 4 °C/min. Se utilizó N₂ como gas portador a 70 kPa.

Las incubaciones se realizaron por duplicado.

8.2.4 Síntesis de laurato de glucosilo en DES formado por ChCl:glucosa

Se repitió el procedimiento del punto anterior (8.2.3) en el medio DES 5 y DES 5* constituidos por ChCl y glucosa en las proporciones indicadas en la Tabla 8.1, por lo que no se agregó glucosa extra al sistema. A su vez, en el caso de las incubaciones realizadas en DES 5, el procedimiento se repitió nuevamente adicionando a la mezcla de incubación la cantidad de agua necesaria para alcanzar relaciones molares agua/ChCl (R) iguales a 1 y 2. Todas las incubaciones se realizaron por triplicado.

La cantidad de micromoles de laurato de glucosilo fue calculada tal como se describe en el Anexo II a partir de las áreas de picos de laurato de glucosilo y estándar interno obtenidos en el análisis por GC de los productos de reacción. Dado que no se dispuso de estándares de los diferentes ésteres generados, para el cálculo se consideró las áreas de picos correspondientes a cada producto obtenidas en el análisis del producto de reacción completa, obtenido cuando la reacción se realizó en 2M-2BuOH (3.3.5).

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 Síntesis de laurato de glucosilo en DES 4

En base a los ensayos previos que demostraron el desarrollo de una actividad catalítica importante de la lipasa iCAL-B en medio DES 4, se intentó la síntesis de laurato de glucosilo en este medio y utilizando dicha lipasa, mediante la transesterificación de laurato de vinilo y glucosa. Sin embargo, luego de 72 h de incubación no se verificó la presencia de ésteres de glucosa en los productos. Este resultado contrastó con lo informado por Pöhnlein et al. (2015) donde se obtuvo hexanoato de glucosilo a partir de la transesterificación de hexanoato de vinilo y glucosa, catalizada por la lipasa iCAL-B en este mismo medio de reacción.

Sin embargo, el resultado negativo obtenido coincide con lo reportado recientemente por Semproli et al. (2023), en donde tampoco se obtuvieron ésteres de glucosa incubando

laurato de vinilo con glucosa en medio de reacción DES 4 con contenido de agua del 5 % en el medio de reacción

8.3.2 Síntesis de laurato de glucosilo en DES 5

Considerando el resultado negativo en la transesterificación en DES 4, resultó interesante ensayar la alternativa ya mencionada de ensayar el proceso en el DES formado por ChCl y glucosa en relación 1:1 (DES 5), confiriéndole a la glucosa la doble función de solvente y sustrato.

Se realizó la incubación de laurato de vinilo en medio DES 5 en presencia de la lipasa iCAL-B, en medio anhidro ($R=0$) y con agregado de agua a los niveles correspondientes a R igual a 1 y 2. Esto dado que en resultados mostrados en varios capítulos previos demostraron que el contenido de agua en el DES es un factor determinante sobre la actividad enzimática y la eficiencia de las reacciones en este tipo de solvente.

El análisis de las muestras recogidas a diferentes períodos de incubación mostró en este caso la generación de ésteres de glucosa, aunque a una muy baja velocidad. La Figura 8.2 muestra la evolución de la cantidad de ésteres de glucosa generados durante el período de incubación para las diferentes concentraciones de agua en el medio de reacción. Obviamente los resultados no se expresan en porcentaje de conversión de glucosa, dado que por su alta concentración en el medio se obtendrían valores insignificantes.

En los tres casos los productos principales correspondieron a monoésteres de glucosa, observándose mínima presencia de diésteres y ausencia de triésteres. Se puede ver además que si bien en los tres casos la cantidad de ésteres generados se incrementó con el período de incubación, el aumento fue más notorio y drástico para la incubación realizada en el solvente anhidro ($R = 0$). Asimismo, la cantidad de producto generado fue la más baja en el caso de la incubación realizada con el DES con la mayor concentración de agua.

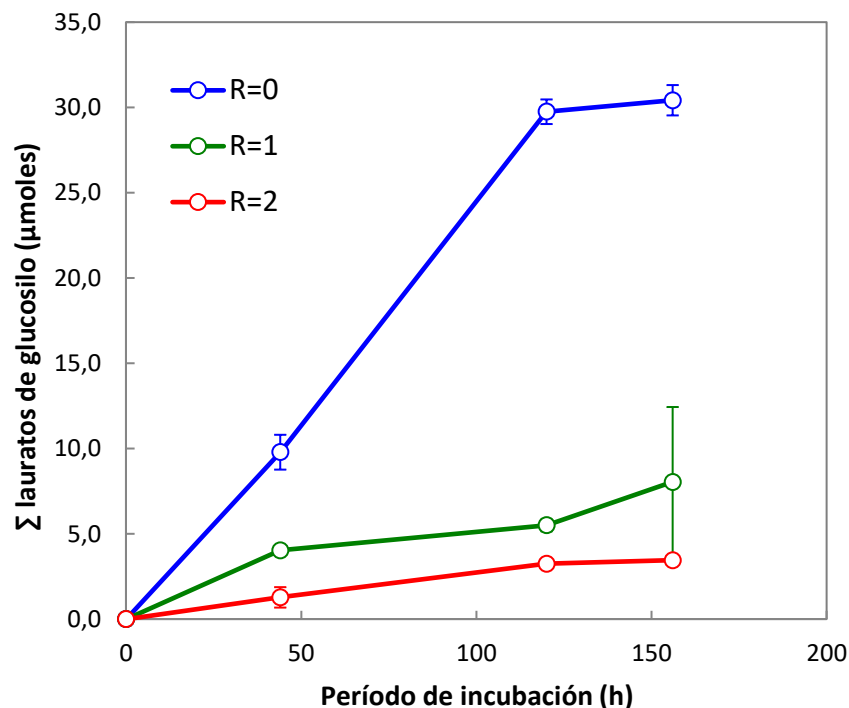


Figura 8.2. Micromoles totales de lauratos de glucosilo generados durante la incubación de laurato de vinilo en medio DES 5 conteniendo agua en relaciones $R = 0, 1$ y 2 , en presencia de la lipasa iCAL-B

El efecto negativo de la concentración de agua sobre la eficiencia de la reacción resultó llamativo, ya que como se ha mencionado en los capítulos anteriores se había verificado que el agregado de agua al medio de reacción DES afectaba favorablemente la actividad enzimática. Obviamente se trata de procesos diferentes a los descritos previamente, tanto por la naturaleza de la reacción como por las características del solvente, por lo que es posible que, si bien la presencia de agua mejorase la actividad enzimática, también favorezca la hidrólisis de los ésteres en lugar de su formación, reacción también catalizada por la misma lipasa.

Dada la mayor eficiencia mostrada por la reacción realizada en el DES 5 anhidro, se decidió repetir el proceso en este medio por un período prolongado, de manera de verificar qué grado de avance se podía alcanzar y si un aumento de la concentración de monolaurato de glucosilo en el medio de reacción favorecía la aparición de di- y triésteres de glucosa.

La Figura 8.3 muestra la evolución en la cantidad de los productos con el período de incubación. En la misma se verifica que la cantidad total de ésteres de glucosa crece conforme transcurre la reacción alcanzando un máximo de 149 μmol al cabo de 336 h de incubación. Como era de esperarse, la mayor proporción de producto correspondió a los monolauratos de glucosilo. A diferencia de los casos anteriores se verificó una incipiente generación de dilauratos, mientras que tampoco en este caso se detectó la formación de trilauratos.

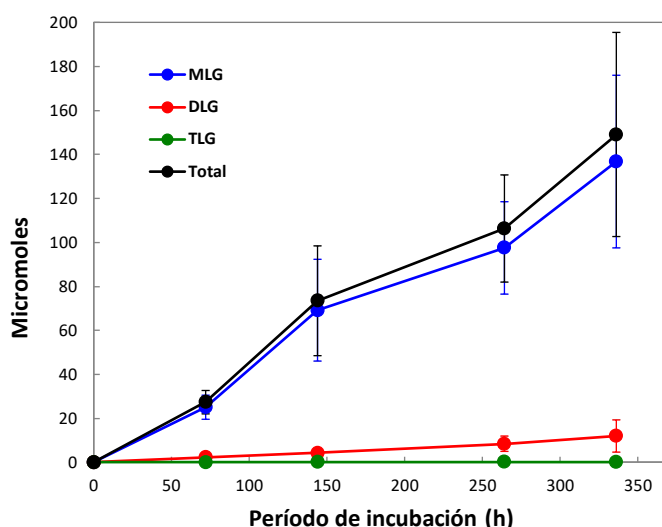


Figura 8.3. Micromoles totales de ésteres de glucosa y micromoles de mono-, di- y trilaurato de glucosilo (MLG, DLG y TLG, respectivamente) generados durante la incubación de laurato de vinilo y glucosa en medio DES 5 catalizada por la lipasa iCAL-B

Podría considerarse que en estos casos en que el DES utilizado como medio de reacción es a la vez sustrato, a medida la reacción avanza puedan ocurrir modificaciones en la estructura del mismo debido al consumo de uno de sus componentes HBD. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la cantidad de producto generado en este caso es tal que el posible efecto sobre la concentración de glucosa del medio es totalmente despreciable.

Uno de los factores que puede afectar negativamente la velocidad de reacción en este tipo de DES es la elevada viscosidad que presentan las mezclas ChCl/glucosa. Por este motivo, en base a información relativa a las propiedades fisicoquímica de mezclas ChCl/glucosa en

diferentes proporciones, se decidió ensayar la misma reacción de transesterificación en este sistema, pero en relación 2:1 (identificada como DES 5*). Se ha reportado para esta nueva proporción una menor viscosidad que la correspondiente a la mezcla 1:1 y también una menor temperatura de fusión (15 contra 31 °C; (Hayyan et al., 2013)), lo que es coherente con que dicha proporción corresponda a la mezcla eutéctica. Independientemente de esto, ambas mezclas aportan un medio fluido capaz de actuar como solvente y, el hecho de que la mezcla 1:1 no coincida con el punto eutéctico no representa un inconveniente, ya que la eventual existencia de glucosa “no asociada” al ChCl implicaría una mayor disponibilidad de la misma para actuar como sustrato.

La Figura 8.4 muestra la cantidad de monolauratos de glucosilo producidos durante la incubación del laurato de vinilo en medio DES 5 comparada con la producida en medio DES 5*, en ambos casos en presencia de la lipasa iCAL-B.

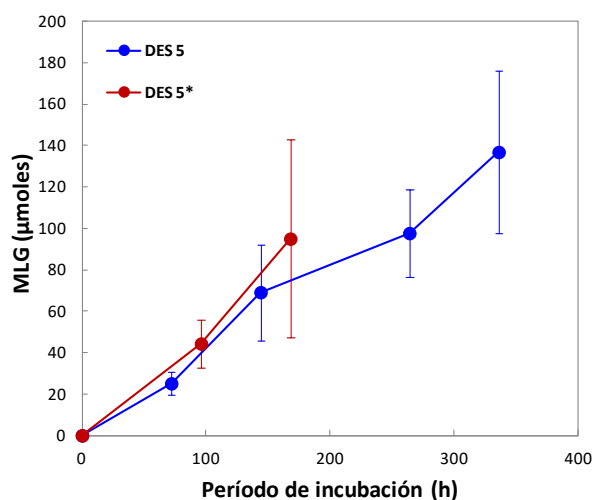


Figura 8.4. Micromoles de monolaurato de glucosilo generados durante la incubación de laurato de vinilo en los medios DES 5 y DES 5* en presencia de la lipasa iCAL-B

Los resultados indican que, dentro del elevado margen de error del método, no se puede afirmar que haya una diferencia real en el rendimiento de la reacción en uno y otro solvente, si bien se podría sugerir una leve diferencia a favor de la conversión en el DES 5*. Es claro que si bien la viscosidad del DES 5* es menor a la del DES 5, no es el único parámetro que afecta la eficiencia de este tipo de reacciones. Un estudio más detallado debe

incluir otros factores como la polaridad, la tensión superficial y la actividad de agua, como ya se ha mencionado (K. H. Zhao et al., 2016).

8.4 Conclusiones

Aunque el DES 4 mostró ser un medio de reacción adecuado para reacciones de transesterificación enzimática catalizadas por la lipasa iCAL-B, en dicho medio y en condiciones similares no se verificó la formación de ésteres láuricos de glucosa. En cambio, sí fue posible obtener ésteres de glucosa en el DES formado por ChCl/glucosa con diferentes proporciones entre ambos (1:1 y la eutéctica 2:1), actuando la glucosa como componente del solvente y sustrato a la vez.

La cantidad de laurato de glucosilo obtenida en el DES formado por ChCl/glucosa con relación molar 1:1 fue máxima en el medio anhidro y disminuyó a medida que aumentó la concentración de agua en el medio de reacción ($R = 1$ y 2), a diferencia de lo observado en las reacciones estudiadas en los capítulos precedentes en otros solventes DES. Estos resultados confirman que la concentración de agua necesaria para optimizar la eficiencia de una reacción en un medio DES depende de cada sistema y de la naturaleza del proceso en cuestión.

No se evidenció ninguna diferencia significativa en el rendimiento de la reacción al utilizar como solvente el medio ChCl/glucosa a las relaciones molares 1:1 o 2:1 entre ambos componentes, si bien dada la menor viscosidad de la mezcla 2:1 sugería que utilizar dicha relación podría favorecer la reacción al mejorar los fenómenos de transferencia de masa.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo realizado permitió evaluar el desempeño de diferentes lipasas comerciales de interés tecnológico (Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM, iCAL-B y *Candida rugosa*) en la catálisis de diferentes reacciones de esterificación y transesterificación en solventes orgánicos convencionales y en varios DES tipo III basados en cloruro de colina.

Como era de esperarse el desempeño de las lipasas en medio DES fue muy diferente al verificado en solventes orgánicos convencionales. Quedó demostrado que los DES constituyen un medio de reacción complejo donde el desempeño de los catalizadores enzimáticos depende de la naturaleza de la reacción y el tipo de sustrato seleccionado, con un efecto determinante del contenido de agua del medio y de las características estructurales de los componentes del solvente.

En particular, se demostró que solventes basados en cloruro de colina combinado con un HBD que presente grupos hidroxilo en su estructura son capaces de competir en reacciones de esterificación o transesterificación, lo que constituye una limitante importante para su utilización como medio de reacción. Dicha capacidad dependerá del tipo de HBD, del catalizador a utilizar y de la reacción a desarrollar. Los resultados obtenidos identificaron al 1,4-butanodiol como el más reactivo, seguido por el glicerol y, en menor grado, por la isosorbida, mientras que no se detectó ningún producto de reacción derivado de la urea. Estos resultados resultaron particularmente relevantes dado que suele sostenerse que la fuerte interacción HBA-HBD inhibe a los componentes del DES a reaccionar. Asimismo, varias publicaciones vinculadas al desarrollo de reacciones similares a las estudiadas en esta tesis y en los mismos DES no reportan este fenómeno.

Estos resultados permitieron identificar al DES formado por ChCl y urea en relación 1:2 como el más conveniente para conducir reacciones de esterificación de ácidos grasos catalizadas por la lipasa iCAL-B.

En dicho medio de reacción, la presencia de agua a una relación molar agua/ChCl igual a 1 resultó esencial para asegurar la adecuada hidratación de la lipasa iCAL-B y permitirle

desarrollar su capacidad catalítica, sin favorecer la hidrólisis por sobre la reacción de esterificación.

Se confirmó también que la concentración de agua en dicho DES es determinante sobre eficiencia de la esterificación de ácidos grasos con n-butanol y sobre la velocidad de esterificación de ácidos grasos saturados según su largo de cadena. Mientras que los ácidos grasos de cadena más corta se esterificaron más eficientemente en el medio de reacción anhidro, esta tendencia se invirtió a medida que la concentración de agua se incrementó. Los resultados sugirieron la posibilidad de que la concentración de agua, además de afectar directamente la actividad enzimática, puede jugar un rol determinante sobre la posible organización de las moléculas de sustrato en el medio de reacción en función de su largo de cadena y carácter anfifílico, lo que evidentemente debe vincularse al rendimiento del proceso.

En cuanto a la síntesis de ésteres de fitoesteroles se determinó que medio ChCl:urea (1:2) la síntesis de lauratos de fitoesterilos puede ser catalizada eficientemente por la lipasa de *Candida rugosa* sin inmovilizar mediante la transesterificación de los fitoesteroles con laurato de vinilo.

Se verificó que la cantidad de ésteres de fitoesteroles obtenida en la reacción aumentó con el nivel de agua en DES, alcanzando su máximo por una relación molar agua/ChCl igual a 3. Estos resultados volvieron a evidenciar que el efecto del agua es crucial sobre la actividad enzimática para ciertos sistemas DES/sustrato/lipasa.

Dada la necesidad de la presencia de agua en el DES y la capacidad de la enzima de catalizar la hidrólisis del laurato de vinilo sustrato, se logró maximizar la generación de ésteres de fitoesteroles reponiendo el laurato de vinilo en el sistema mediante sus adiciones sucesivas. Esto permitió alcanzar una conversión del 53,2 % de una mezcla compuesta por brassicasterol, campesterol y β -sitosterol, sin que se evidenciara preferencia por la esterificación de ninguno de ellos.

En relación a la síntesis de ésteres de glucosa la transesterificación de este sustrato con laurato de vinilo también fue el proceso que mostró resultados más positivos. Para ello fue necesario realizar la incubación en el DES formado por ChCl y glucosa (1:1 o 1:2),

actuando ésta en el doble rol de sustrato y componente del sistema solvente. En estos DES la lipasa iCAL-B mostró una actividad catalítica algo reducida, pero que permitió obtener los productos de interés luego de períodos prolongados de incubación. A diferencia del resto de las reacciones estudiadas, en este caso los rendimientos fueron mayores en el solvente anhidro que en el solvente hidratado.

En síntesis, este trabajo de tesis aporta resultados novedosos sobre la aplicación de los DES como medio de reacción para procesos de modificación de lípidos y síntesis de derivados lipídicos de interés tecnológico mediante catálisis enzimática, como una alternativa más limpia y “verde” que los procesos tradicionales de catálisis química o el uso de solventes orgánicos convencionales.

En este marco, el trabajo realizado permitió también identificar varios desafíos, dado que se verificó que el uso de los DES para este tipo de proceso, además de las ventajas conocidas, incorpora varios fenómenos que complejizan el sistema de reacción. Entre ellos, la posibilidad de que los componentes del solvente mismo compitan con el proceso de interés y el efecto determinante del contenido de agua del medio sobre su viscosidad, la actividad enzimática y la posibilidad de modificar el modo de organización de las moléculas de los sustratos. Estos fenómenos determinan que las condiciones óptimas para conducir un proceso en medio DES dependerán de un conjunto de variables adicionales a los parámetros clásicos, como la temperatura, presión, tiempo y velocidad de agitación, por lo que para su correcto diseño se requiere de un estudio específico de cada caso particular.

ANEXO I. DIFUSIÓN DE RESULTADOS DE LA TESIS

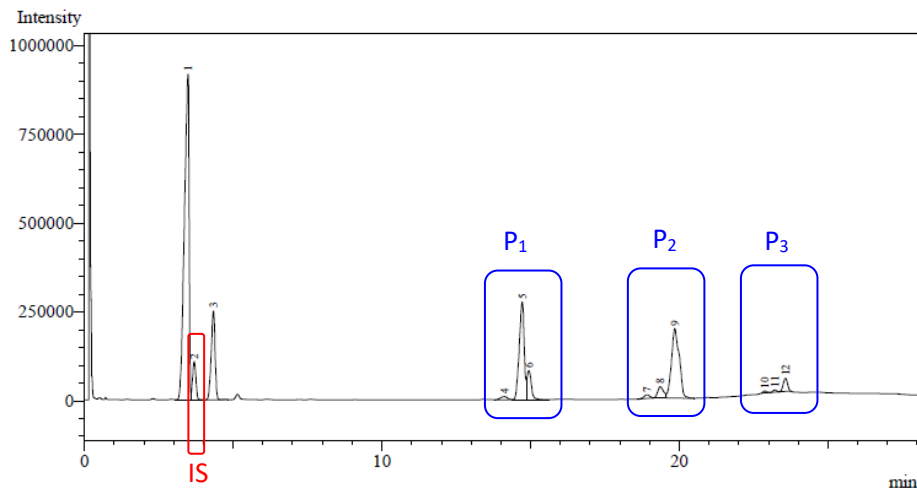
Publicación arbitrada

- Effect of the water content and the lengthening of fatty acids chain on the iCALB-catalyzed esterification in deep eutectic solvents. Maurente, L., Callejas, N., Volonterio, E., Baréa, B., Barouh, N., Bourlieu-Lacanal, C., Durand, E., Villeneuve, P., Figueroa-Espinoza, M.C., Jachmanián, I. Journal of the American Oil Chemists' Society 101:407–417, 2024.

Presentaciones en Congresos

- Síntesis enzimática de ésteres alquílicos en solventes de eutéctico profundo. Maurente L, Callejas N, Jachmanián I. ENAQUI 7, Montevideo, Uruguay (11/2021).
- Effect of fatty acid chain length on the efficiency of the lipase-catalyzed synthesis of alkyl esters in deep eutectic solvents. Maurente L, Callejas N, Jachmanián I. 2023 AOCS Annual Meeting and Expo., Denver, Colorado (05/2023).

ANEXO II. CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE GLUCOSA



$$\frac{m_i}{m_{IS}} = F_i \cdot \frac{A_i}{A_{IS}}$$

- m_i : masa de P_i en la mezcla de reacción
- m_{IS} : masa de IS en la mezcla de reacción
- F_i : factor de respuesta del detector frente a i relativo al IS
- A_i : área del pico correspondiente al producto P_i
- A_{IS} : área del pico correspondiente al IS

$$\text{moles } P_i = m_{P_i} = F_i \cdot \frac{m_{IS}}{A_{IS}} \cdot \frac{A_i}{PM_i} \quad [\text{Ec 8.1}]$$

PM_i : peso molecular del producto P_i

$$\text{moles totales de producto} = m_{tp} = \frac{m_{IS}}{A_{IS}} \cdot \sum \frac{F_i \cdot A_i}{PM_i} \quad [\text{Ec 8.2}]$$

Si el detector tiene la misma sensibilidad frente a cada producto (F_i iguales):

$$m_{tp} = F \cdot \frac{m_{IS}}{A_{IS}} \cdot \sum \frac{A_i}{PM_i} \quad [\text{Ec 8.3}]$$

$$\% \text{ molar}_i = 100 \cdot \frac{mP_i}{mtp} = 100 \cdot \left(\frac{\frac{A_i}{PM_i}}{\sum \frac{A_i}{PM_i}} \right) \quad [\text{Ec 8.4}]$$

$\% \text{ molar}_i$: porcentaje molar del producto i en el total de productos

Si se logra realizar un ensayo “x” para el que se pueda asegurar que la conversión de la glucosa es del 100 %, se cumplirá que los moles totales de producto serán iguales a los moles de glucosa inicial:

$$mtp = m_{g,o,x} / PM_g \quad [\text{Ec 8.5}]$$

$$m_{g,o} / PM_g = F \cdot \frac{m_{IS,x}}{A_{IS,x}} \cdot \sum \frac{A_{i,x}}{PM_i} \quad [\text{Ec 8.6}]$$

Por lo tanto el factor F se puede determinar como:

$$F = \left[\frac{m_{g,o,x} / PM_g}{\frac{m_{IS,x}}{A_{IS,x}} \cdot \sum \frac{A_{i,x}}{PM_i}} \right] \quad [\text{Ec 8.7}]$$

Determinado el valor de F mediante la [Ec 8.7], se puede determinar los moles de cada éster generado mediante la [Ec 8.1] y los moles totales de producto generados mediante la [Ec 8.3].

BIBLIOGRAFIJA

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2001). Preparation of novel, moisture-stable, lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chemical Communications*, *1*(19), 2010–2011. <https://doi.org/10.1039/b106357j>
- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2002). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, *1*, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- Amelio, A., Genduso, G., Vreysen, S., Luis, P., & Bruggen, B. Van Der. (2014). *evaluation of treatment alternatives* †. 3045–3063. <https://doi.org/10.1039/c3gc42513d>
- Arcens, D., Grau, E., Grelier, S., Cramail, H., & Peruch, F. (2020). Impact of Fatty Acid Structure on CALB-Catalyzed Esterification of Glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *122*(4), 2–7. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900294>
- Bornscheuer, U. T. (2002). *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. *26*, 73–81.
- Bornscheuer, U. T. (2014). Enzymes in lipid modification: Past achievements and current trends. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*(10), 1322–1331. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400020>
- Brett, C. M. A. (2018). Deep eutectic solvents and applications in electrochemical sensing. *Current Opinion in Electrochemistry*, *10*, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.05.016>
- Cai, T., & Qiu, H. (2019). Application of deep eutectic solvents in chromatography: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *120*, 115623. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115623>
- Cao, J., Wu, R., Zhu, F., Dong, Q., & Su, E. (2022a). Enzymes in nearly anhydrous deep eutectic solvents: Insight into the biocompatibility and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, *157*(November 2021), 110022. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110022>
- Cao, J., Wu, R., Zhu, F., Dong, Q., & Su, E. (2022b). How to improve the efficiency of biocatalysis in non-aqueous pure deep eutectic solvents: A case study on the lipase-catalyzed transesterification reaction. *Biochemical Engineering Journal*, *179*(January), 108336. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108336>
- Crawford, D. E., Wright, L. A., James, S. L., & Abbott, A. P. (2016). Efficient continuous synthesis of high purity deep eutectic solvents by twin screw extrusion. *Chemical Communications*, *52*(22), 4215–4218. <https://doi.org/10.1039/c5cc09685e>
- Cvjetko Bubalo, M., Jurinjak Tušek, A., Vinković, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., & Radojčić Redovniković, I. (2015). Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *122*, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.005>
- Degn, P., Pedersen, L. H., Duus, J., & Zimmermann, W. (1999). Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in tert-butanol. *Biotechnology Letters*, *21*(4), 275–280.

<https://doi.org/10.1023/A:1005439801354>

- Docherty, K. M., & Kulpa, C. F. (2005). Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry*, 7(4), 185–189. <https://doi.org/10.1039/b419172b>
- Domínguez De María, P., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., & Alcántara, A. R. (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances*, 24(2), 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., & Villeneuve, P. (2012). Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry*, 47(12), 2081–2089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2014). 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*, 116(1), 16–23. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300246>
- Dwamena, A. K. (2019). Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. *Separations*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/separations6010009>
- El Achkar, T., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2019). Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 288, 111028. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028>
- El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>
- Feng, S., Wang, L., Shao, P., Sun, P., & Yang, C. S. (2021). A review on chemical and physical modifications of phytosterols and their influence on bioavailability and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(20), 5638–5657. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1888692>
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3–4), 197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>
- García-Verdugo, E., Altava, B., Burguete, M. I., Lozano, P., & Luis, S. V. (2015). Ionic liquids and continuous flow processes: A good marriage to design sustainable processes. *Green Chemistry*, 17(5), 2693–2713. <https://doi.org/10.1039/c4gc02388a>
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 04(01), 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Gomez, F. J. V., Espino, M., Fernández, M. A., & Silva, M. F. (2018). A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, 3(22), 6122–6125. <https://doi.org/10.1002/slct.201800713>
- Gorke, J. T., Srienc, F., & Kazlauskas, R. J. (2008). Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chemical Communications*, 10, 1235–1237. <https://doi.org/10.1039/b716317g>
- Grüninger, J., Delavault, A., & Ochsenreither, K. (2019). Enzymatic glycolipid surfactant synthesis from renewables. *Process Biochemistry*, 87(May), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.023>

- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Heidelberg, T., & Chisti, Y. (2011). Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, 46(11), 2079–2090. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.021>
- Hammond, O. S., Bowron, D. T., & Edler, K. J. (2017). The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(33), 9782–9785. <https://doi.org/10.1002/anie.201702486>
- Hao, X., Suo, H., Zhang, G., Xu, P., Gao, X., & Du, S. (2021). Ultrasound-assisted enzymatic preparation of fatty acid ethyl ester in deep eutectic solvent. *Renewable Energy*, 164, 937–947. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.114>
- Harris, R. C. (2008). *Physical Properties of Alcohol Based Deep Eutectic Solvents*. August.
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., Alnashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., & Hashim, M. A. (2013). Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 178, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.025>
- He, W., Sen, Cui, D. D., ZHANG, Y. L., Liu, Y., Yin, J., CHEN, G., Jia, C. S., & Feng, B. (2017). Highly efficient synthesis of phytosterol linolenate catalyzed by *Candida rugosa* lipase through transesterification. *Food Science and Technology Research*, 23(4), 525–533. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.525>
- Hollenbach, R., Bindereif, B., van der Schaaf, U. S., Ochsenreither, K., & Syldatk, C. (2020). Optimization of Glycolipid Synthesis in Hydrophilic Deep Eutectic Solvents. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00382>
- Hoyos, L. V., Ramírez, L., Yarce, C. J., Alvarez-Vasco, C., & Ortega, N. H. C. (2021). Sustainable production of glycolipids by biocatalyst on renewable deep eutectic solvents. *Catalysts*, 11(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/catal11070853>
- Ijardar, S. P., Singh, V., & Gardas, R. L. (2022). Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Deep Eutectic Solvents in Liquid–Liquid Extraction*, 1–23. <https://doi.org/10.1201/9781003231158-1>
- Janab, E., Temelli, F., Curtis, J. M., & Zhao, Y. Y. (2014). Performance of two immobilized lipases for interesterification between canola oil and fully-hydrogenated canola oil under supercritical carbon dioxide. *Lwt*, 58(1), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.051>
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>
- Karimi, M., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., Tamaddon, F., & Azadi, D. (2015). Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils. *Talanta*, 144, 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.021>
- Kennedy, J. F., Kumar, H., Panesar, P. S., Marwaha, S. S., Goyal, R., Parmar, A., & Kaur, S. (2006). Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(May), 1163–1169. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Kourist, R., Brundiek, H., & Bornscheuer, U. T. (2010). Protein engineering and discovery of Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900143>

- Liu, X., Wang, M., Zhang, X., Sun, Y., Song, W., & Liu, Y. (2021). The correlation between the physicochemical properties of water-based deep eutectic solvents and catalytic activity of lipase Novozym 435. *Journal of Molecular Liquids*, 325, 115200. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115200>
- Liu, Y., Wang, F., & Tan, T. (2009). Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2–3), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.03.003>
- Makoś, P., & Boczkaj, G. (2019). Deep eutectic solvents based highly efficient extractive desulfurization of fuels – Eco-friendly approach. *Journal of Molecular Liquids*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111916>
- Miao, M., Liu, H., Jiang, B., Yang, C., Xia, X., & Zhang, T. (2014). Enzyme-catalysed synthesis of plant steryl laurate in non-aqueous media using salt hydrate pairs and its characterisation. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.011>
- Mohammed, W., Ali, A. Q., & Errayes, A. (2020). Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages. *Chemical Methodologies*, 4(4), 408–423. <https://doi.org/10.33945/sami/chemm.2020.4.4>
- Monhemi, H., Housaindokht, M. R., Moosavi-Movahedi, A. A., & Bozorgmehr, M. R. (2014). How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: Insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: Choline chloride deep eutectic solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(28), 14882–14893. <https://doi.org/10.1039/c4cp00503a>
- Nian, B., & Li, X. (2022). Can deep eutectic solvents be the best alternatives to ionic liquids and organic solvents: A perspective in enzyme catalytic reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 217(June), 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.044>
- Pätzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Syldatk, C., & Holtmann, D. (2019). Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 37(9), 943–959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>
- Peng, L., Xu, X., Mu, H., Høy, C. E., & Adler-Nissen, J. (2002). Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 523–532. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00147-3)
- Pereira, A. da S., de Souza, A. H., Fraga, J. L., Villeneuve, P., Torres, A. G., & Amaral, P. F. F. (2022). Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. *Catalysts*, 12(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>
- Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2009). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340–372. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Pérez, B., Anankanbil, S., & Guo, Z. (2017). Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters and Their Industrial Utilizations. *Fatty Acids*, 329–354. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809521-8.00010-6>
- Pöhnlein, M., Ulrich, J., Kirschhöfer, F., Nusser, M., Muhle-Goll, C., Kannengiesser, B., Brenner-Weiß, G., Luy, B., Liese, A., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2015). Lipase-catalyzed synthesis

- of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(2), 161–166. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400459>
- Poojari, Y., & Clarson, S. J. (2013). Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.10.002>
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>
- Rodriguez Rodriguez, N., Van Den Bruinhorst, A., Kollau, L. J. B. M., Kroon, M. C., & Binnemans, K. (2019). Degradation of Deep-Eutectic Solvents Based on Choline Chloride and Carboxylic Acids [Research-article]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(13), 11521–11528. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01378>
- Santana, A. P. R., Mora-Vargas, J. A., Guimarães, T. G. S., Amaral, C. D. B., Oliveira, A., & Gonzalez, M. H. (2019). Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452>
- Santanatoglia, A., Nzekoue, F. K., Sagratini, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., & Caprioli, G. (2023). Development and application of a novel analytical method for the determination of 8 plant sterols/stanols in 22 legumes samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 118(February), 105195. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105195>
- Shamsuri, A. A., & Abdullah, D. K. (2010). *IONIC LIQUIDS : PREPARATIONS AND LIMITATIONS 2 . Preparations of Traditional Ionic Liquid , Protic Ionic Liquid and Deep Eutectic Solvent*. 14(2), 101–106.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)
- Siebenhaller, S., Hajek, T., Goll, C. M., Himmelsbach, M., Luy, B., Kirschhöfer, F., Weiß, G. B., Hahn, T., Zibek, S., & Syldatk, C. (2017). Beechwood carbohydrates for enzymatic synthesis of sustainable glycolipids. *Bioresources and Bioprocessing*. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0155-7>
- Siebenhaller, S., Kirchhoff, J., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Muhle-Goll, C., Luy, B., Haitz, F., Hahn, T., Zibek, S., Syldatk, C., & Ochsenreither, K. (2018). Integrated Process for the Enzymatic Production of Fatty Acid Sugar Esters Completely Based on Lignocellulosic Substrates. *Frontiers in Chemistry*, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00421>
- Siebenhaller, S., Muhle-goll, C., Kirschh, F., Brenner-weiss, G., Michael, G., Rupp, S., Zibek, S., & Syldatk, C. (2017). Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. “*Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.*” <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.01.015>
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- Soltanmohammadi, F., Jouyban, A., & Shayanfar, A. (2020). New aspects of deep eutectic solvents: extraction, pharmaceutical applications, as catalyst and gas capture. *Chemical Papers*, 75(2), 439–453. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01316-w>

- Suo, H., Hao, X., Zhang, G., Zhang, Q., & Du, S. (2022). A kinetic study of the ultrasonically assisted ethyl esterification of fatty acids using an immobilized lipase catalyst and deep eutectic solvent. *International Journal of Chemical Kinetics*, *54*(7), 400–412. <https://doi.org/10.1002/kin.21569>
- Tambe, A., Vyasrayani, R., Datla, A., Ponrathnam, S., & Demnerova, K. (2015). Macroporous Poly(Vinyl Acetate-Co-Divinyl Benzene) Copolymer Beads as Adsorptive Support for the Direct Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B. *Enzyme Engineering*, *04*(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000130>
- Vigier, K. D. O., & Jérôme, F. (2019). *Synthesis and Properties*. In *Deep Eutectic Solvents* (D. J. Ramón & G. Guillena (eds.)). <https://doi.org/10.1002/9783527818488.ch1>
- Villeneuve, P., Turon, F., Caro, Y., Escoffier, R., Baréa, B., Barouh, B., Lago, R., Piombo, G., & Pina, M. (2005). Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. *Enzyme and Microbial Technology*, *37*(1), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.002>
- Xu, K., Wang, Y., Huang, Y., Li, N., & Wen, Q. (2015). A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta*, *864*, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.026>
- Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N., & Wen Yong, L. (2017). Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0165-5>
- Yang, Z., & Huang, Z. L. (2012). Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. *Catalysis Science and Technology*, *2*(9), 1767–1775. <https://doi.org/10.1039/c2cy20109g>
- Zhang, X., Heinonen, S., & Levänen, E. (2014). Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis. *RSC Advances*, *4*(105), 61137–61152. <https://doi.org/10.1039/c4ra10662h>
- Zhao, D., Liao, Y., & Zhang, Z. D. (2007). Toxicity of ionic liquids. *Clean - Soil, Air, Water*, *35*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1002/clen.200600015>
- Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011a). New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *9*(6), 1908–1916. <https://doi.org/10.1039/c0ob01011a>
- Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011b). Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *72*(3–4), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015>
- Zhao, K. H., Cai, Y. Z., Lin, X. S., Xiong, J., Halling, P. J., & Yang, Z. (2016). Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules*, *21*(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules21101294>