

# “Síntesis enzimática de lípidos en solventes de eutéctico profundo: ventajas y desafíos “

Dr. Iván Jachmanián

Área Grasas y Aceites  
Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Facultad de Química\_UDELAR  
Montevideo, Uruguay

[ijachman@fq.edu.uy](mailto:ijachman@fq.edu.uy)

# Contexto

- Creciente interés en aplicación de principios de Química Verde.
- Solventes orgánicos convencionales: tóxicos, inflamables, contaminantes, etc.
- Búsqueda de nuevos solventes eficientes para proceso enzimáticos:
  - No tóxicos
  - Económicos
  - Biodegradables
- Mezclas de baja temperatura de transición (LTTM: ILs, DES,...)

## ILs

- No volátiles
- Alta estabilidad térmica
- Solubilidad diferencial
  
- Síntesis compleja
- Costosos
- No-toxicidad cuestionable
- Muy estudiados

## DESs

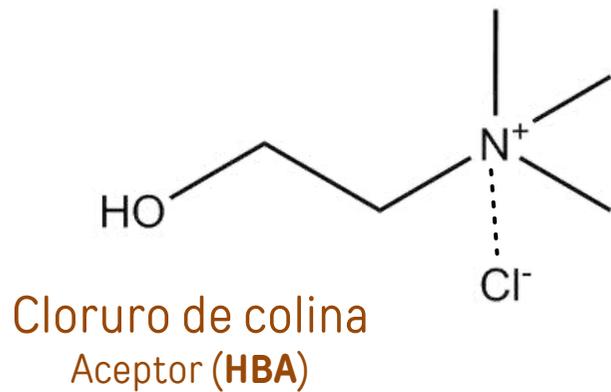
- No volátiles
- Alta estabilidad térmica
- Solubilidad diferencial
  
- Síntesis simple
- Bajo costo
- No tóxicos
- Menos estudios

# Solventes de Eutéctico Profundo

(*Deep Eutectic Solvents* : DES)

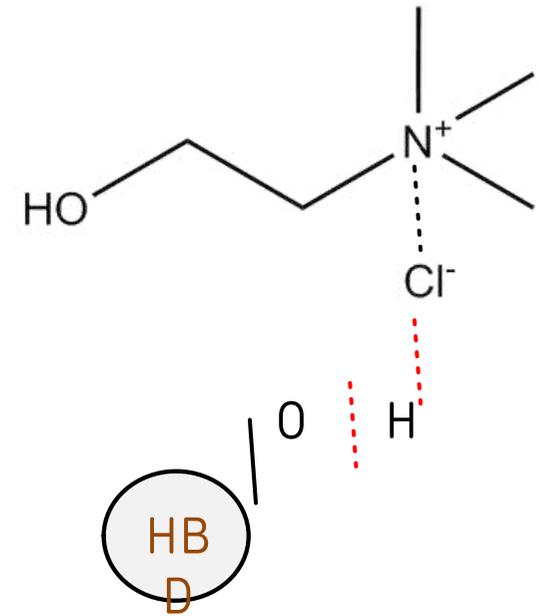
- Mezcla de dos compuestos con capacidad para interactuar fuertemente mediante enlaces de hidrógeno:
  - Aceptor (Hydrogen Bond Acceptor : HBA)
  - Donador (Hydrogen Bond Donor: HBD)

# Solventes de Eutéctico Profundo



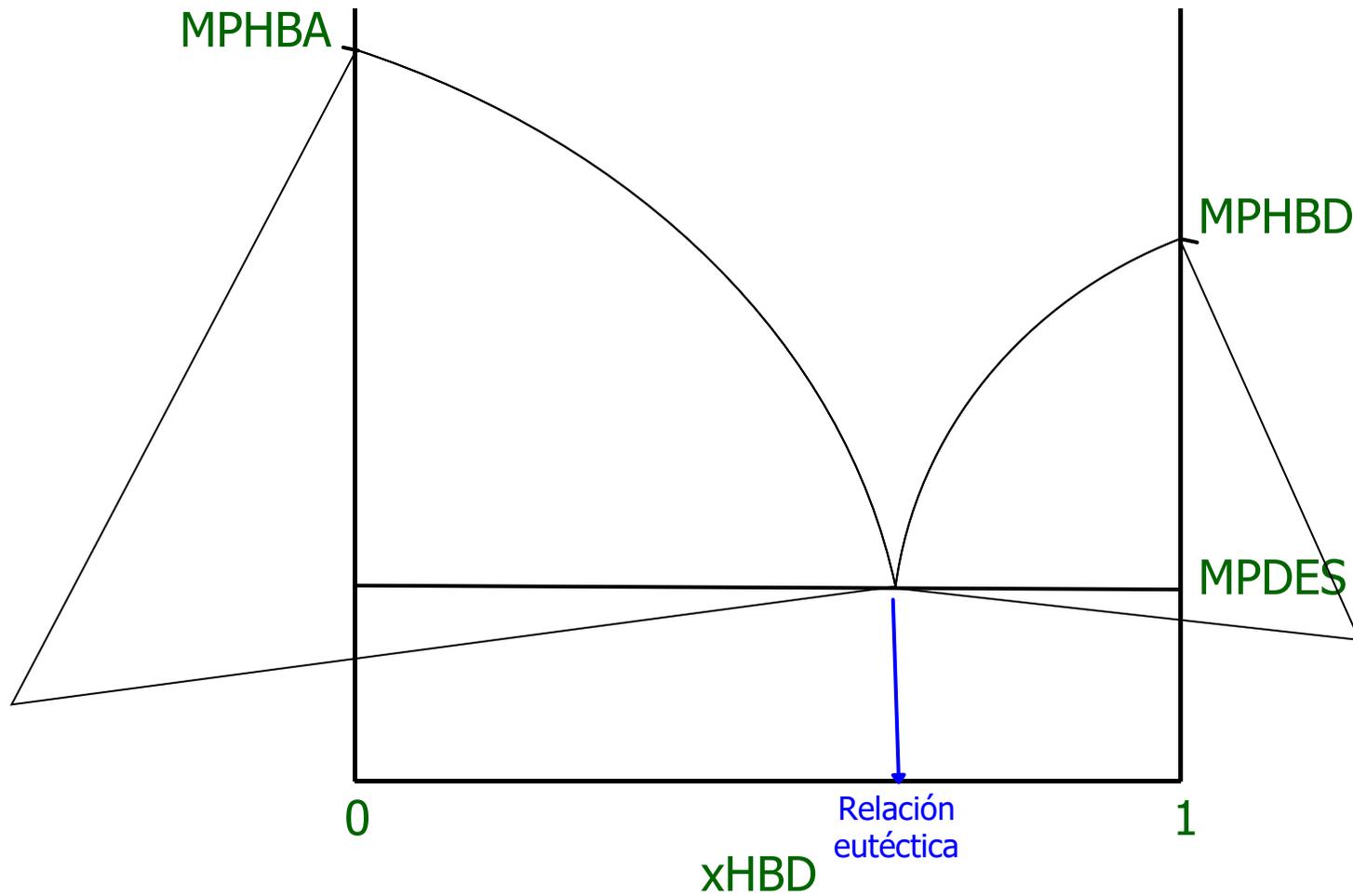
Sólidos a T ambiente

Calor

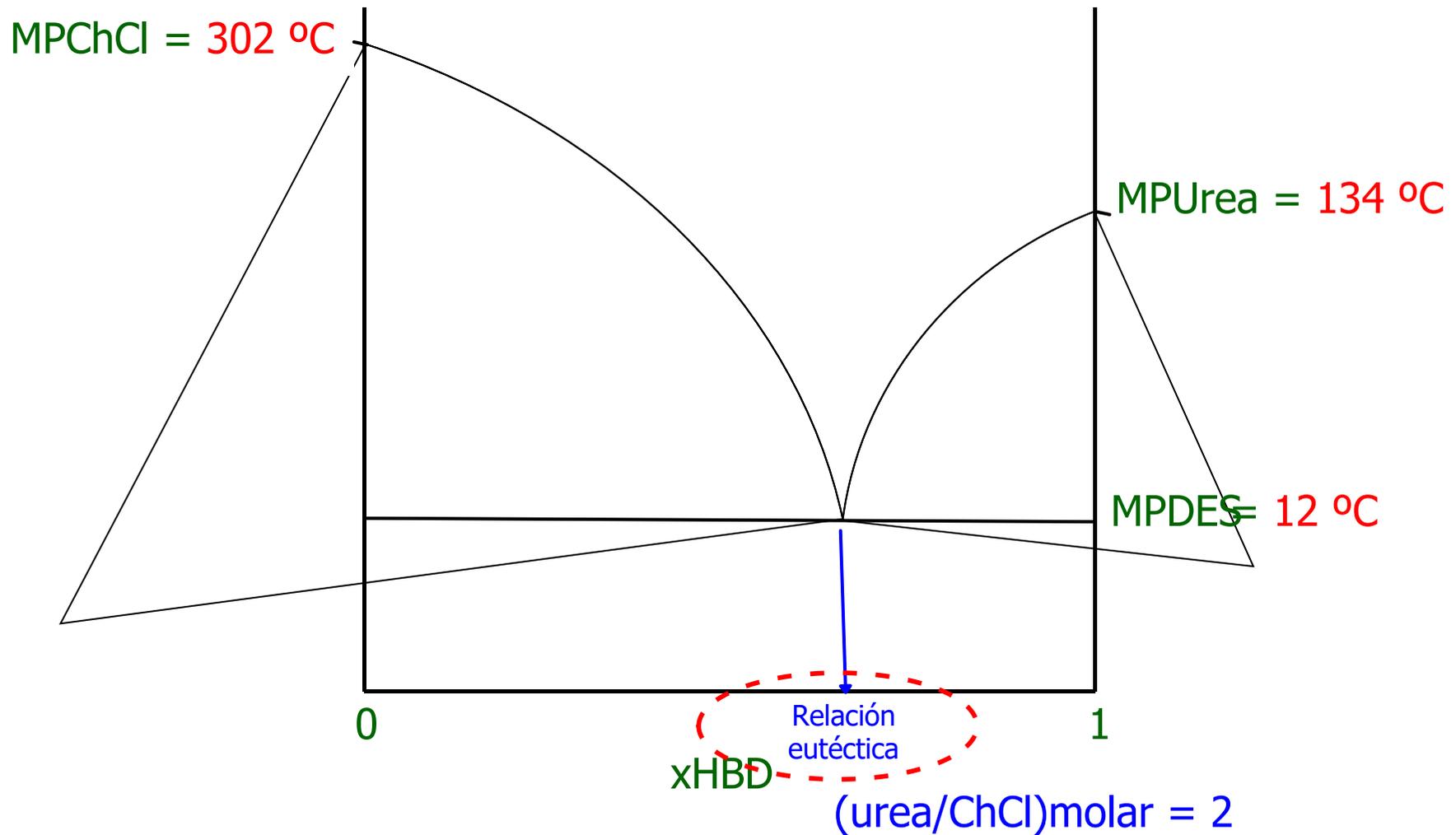


Líquido a T ambiente

# Solventes de Eutéctico Profundo



# Ejemplo: Cloruro de colina / Urea



# Ventajas del uso de DESs

- Baja volatilidad
- Baja inflamabilidad
- Baja temperatura de fusión
- Fácil preparación
- Versatilidad
- Bajo costo
- Solventes verdes
- Solubilidad

*Desafíos?*

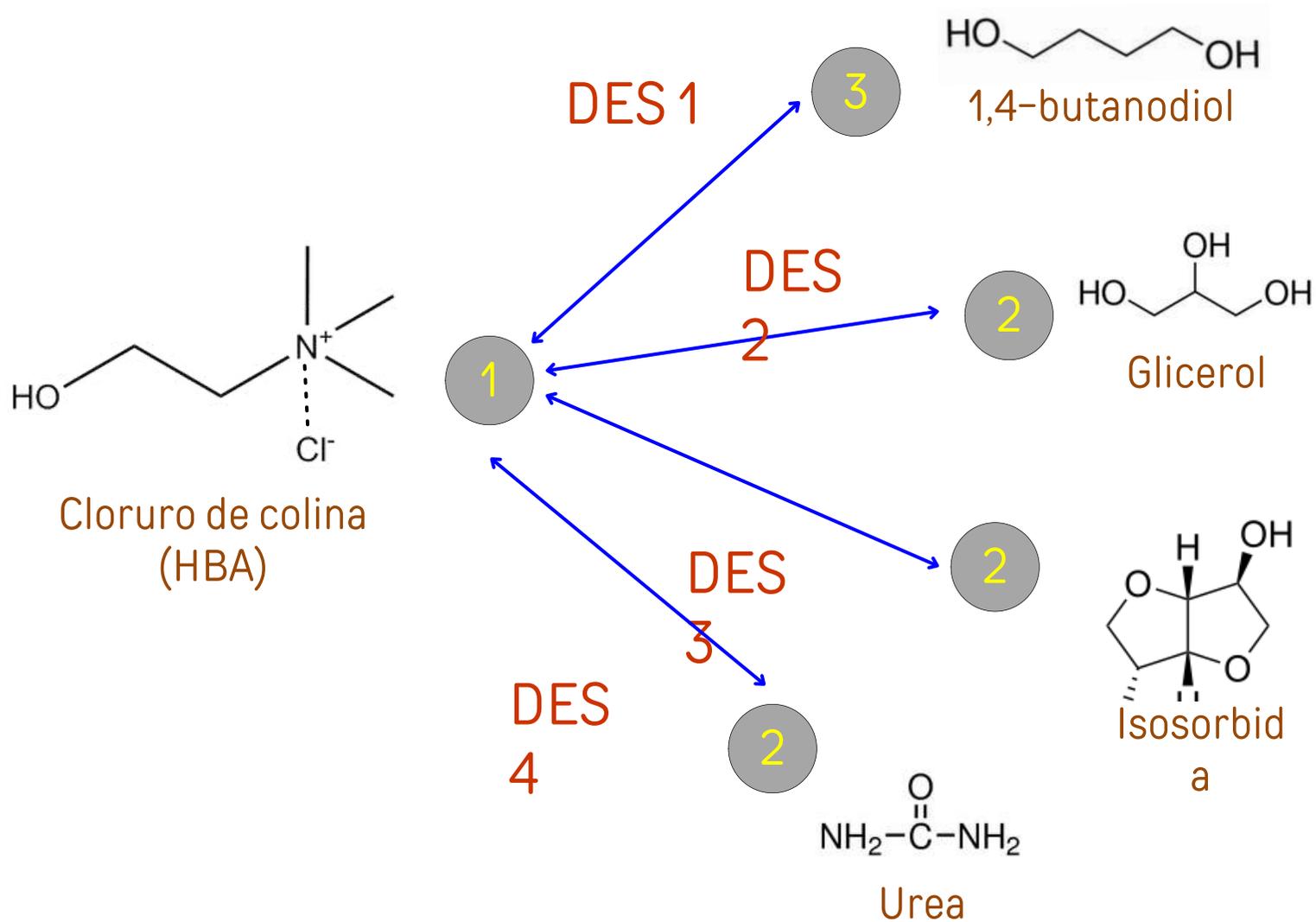
# Preguntas:

1. ¿Pueden reaccionar los propios componentes del DES compitiendo con la reacción de interés?
2. ¿Las características particulares de estos solventes puede afectar la actividad enzimática?
3. ¿Qué eficiencia se puede alcanzar en reacciones de esterificación “convencionales” ácido graso + alcohol?
4. ¿Y en la síntesis de lípidos complejos atractivos para la industria alimentaria?

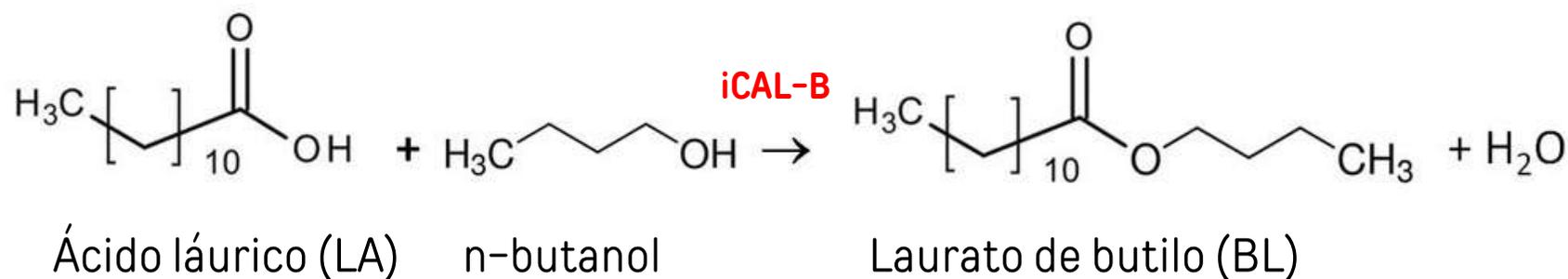
1

# Reactividad de HBDs

# 4 DES:



# Procedimiento 1



200 mg ácido láurico  
+  
50 mg n-butanol  
+  
30 mg lipasa iCAL-B  
+  
3g DES  
R = (H<sub>2</sub>O/ChCl)molar = 1

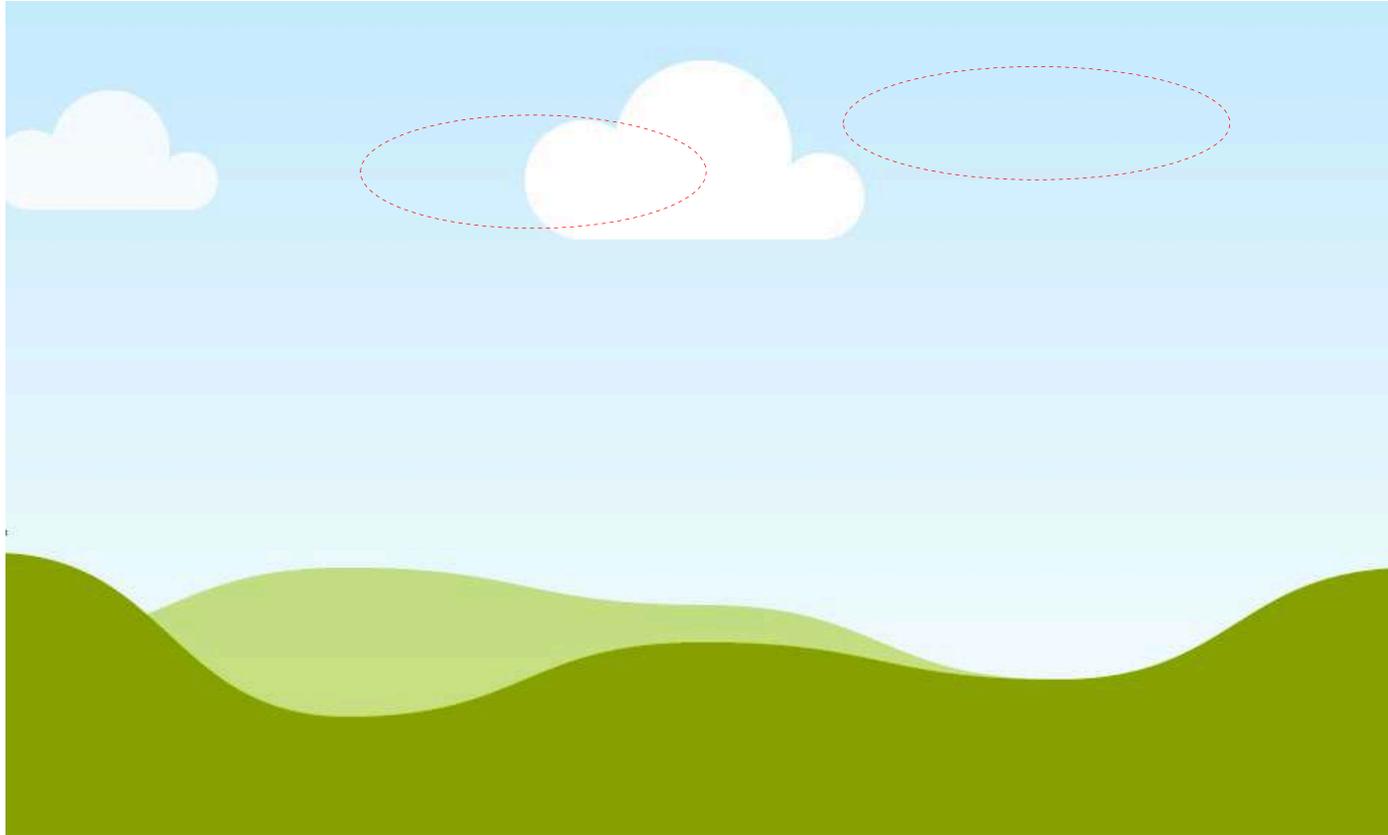
24 h, 50 °C  
200 rpm

200 uL muestra  
+  
1 mL agua  
+  
2 mL hexano

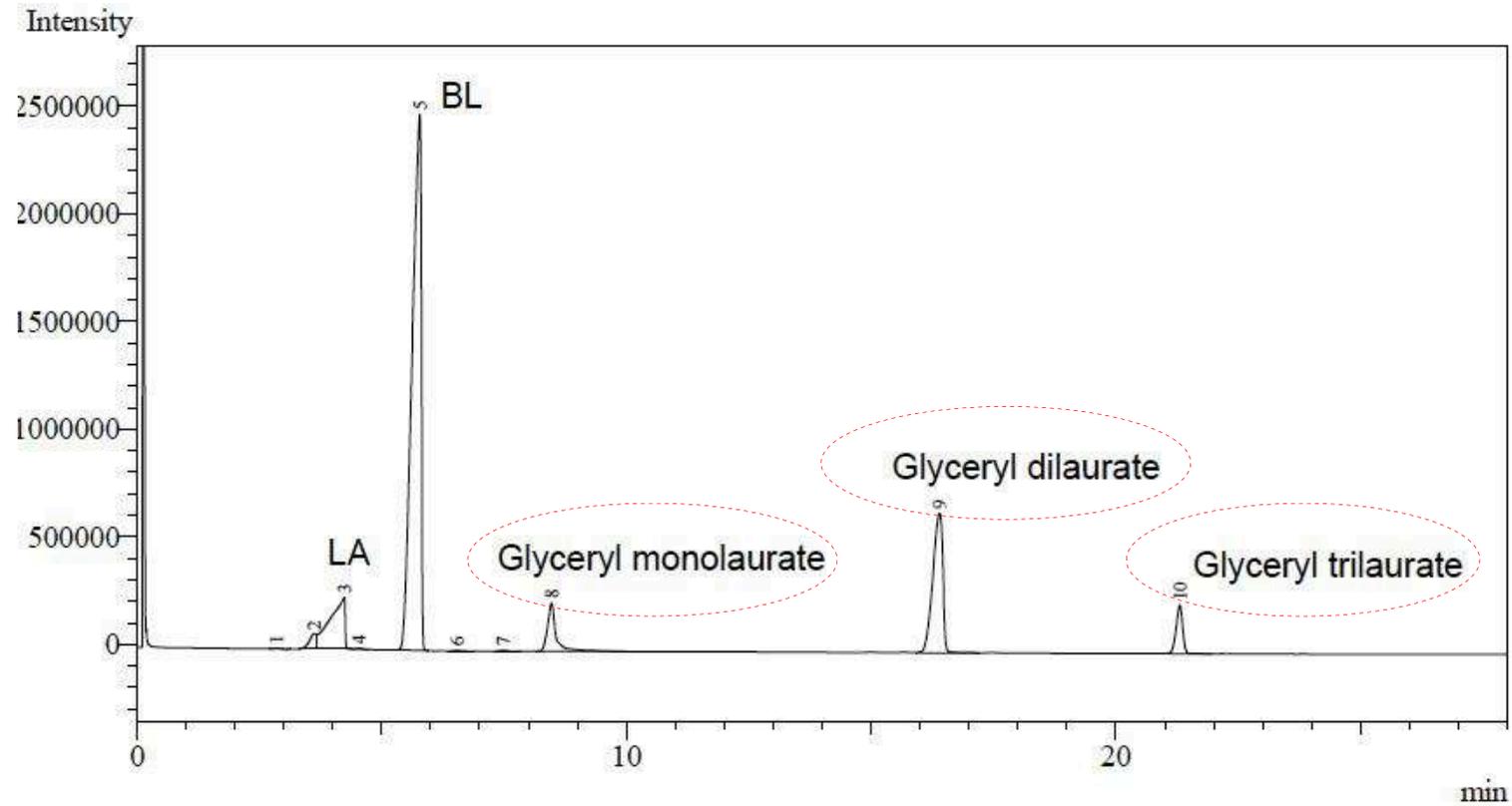
centrifugación  
Fase hexano

GLC/FID  
Supelco Met -  
biodiesel

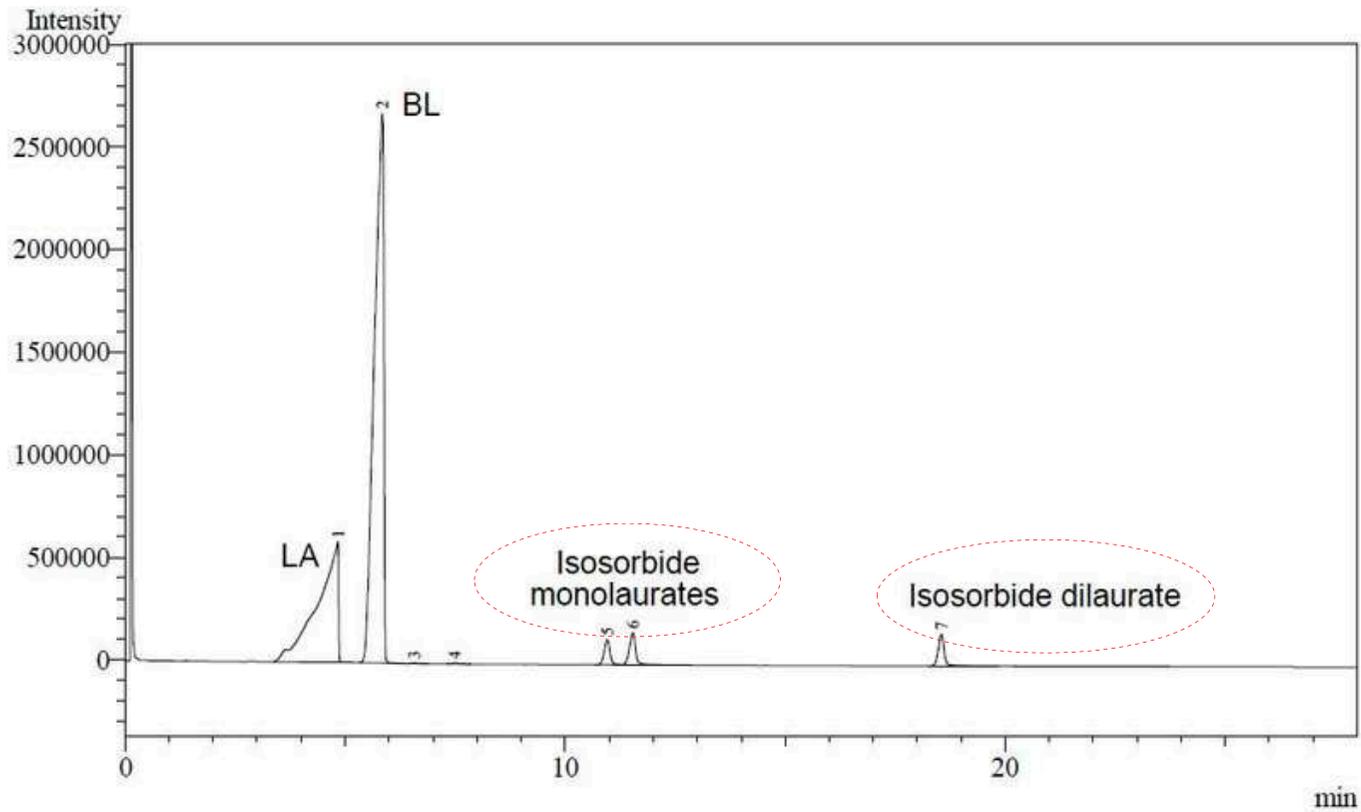
# DES 1 : ChCl/1,4-butanodiol



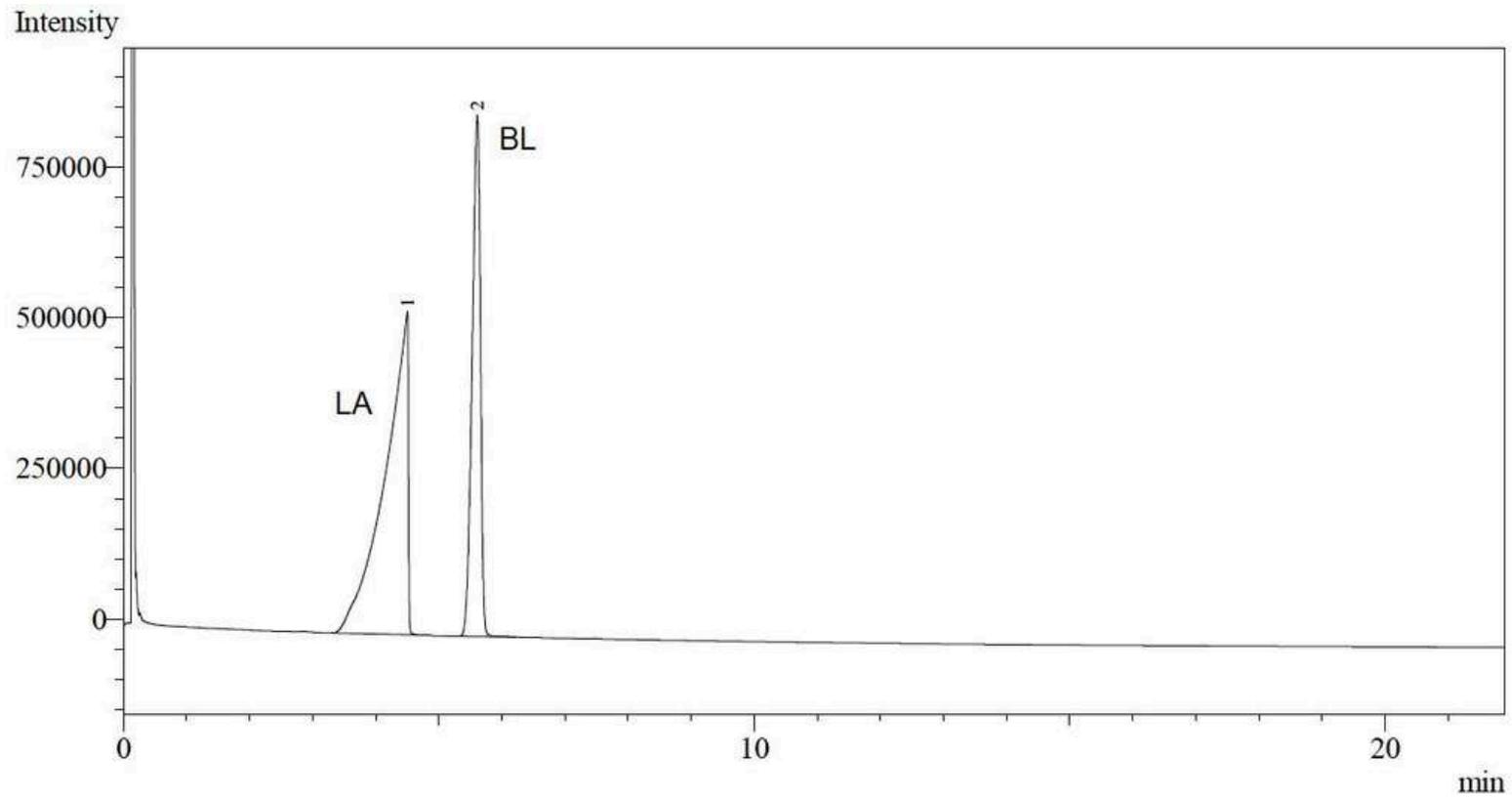
# DES 2 : ChCl/1,4-glicerol



# DES 3 : ChCl/isosorbida



# DES 3 : ChCl/urea



# Reactividad relativa de los HBDs

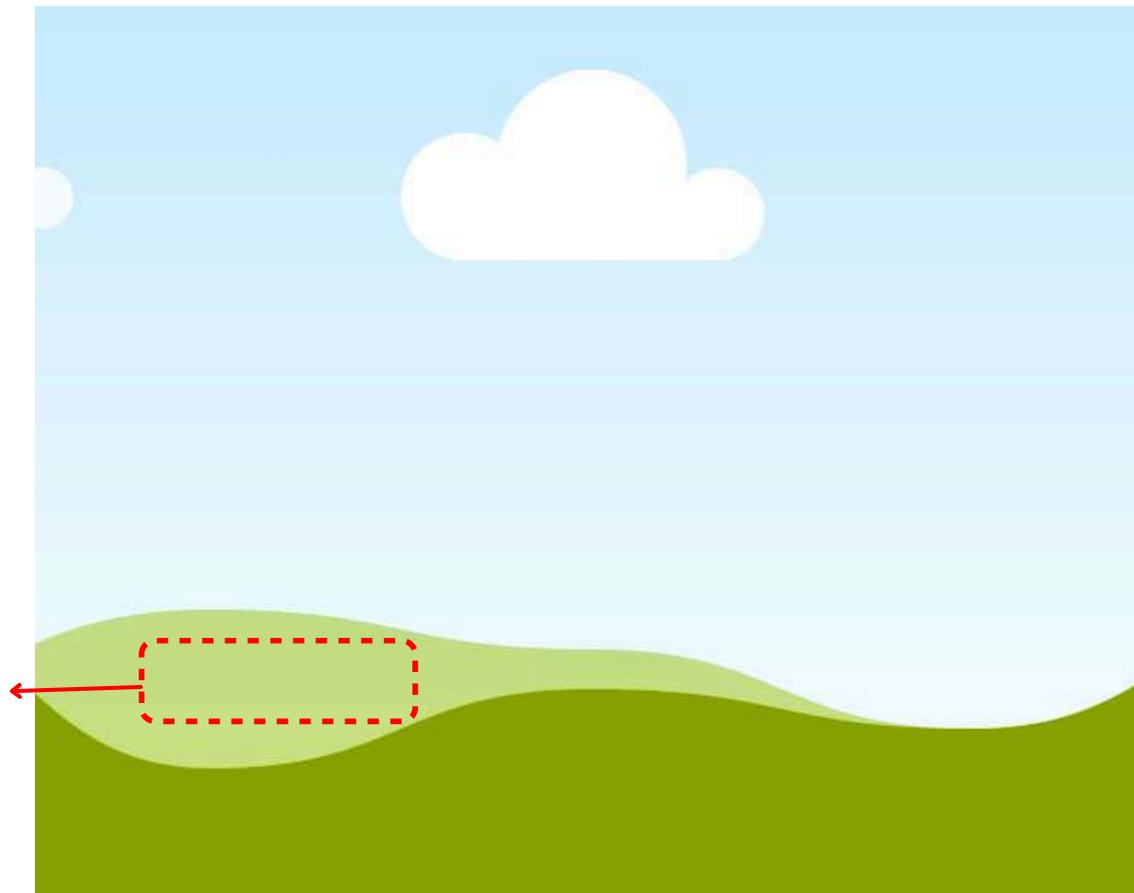
$$\% \Sigma \text{HBD-LE} = 100 \times \frac{\Sigma(A_{\text{HBD-LE}})}{\Sigma(A_{\text{HBD-LE}}) + A_{\text{BL}}}$$

%  $\Sigma$  HBD-LE : % de ésteres láuricos del HBD

A<sub>HBD-LE</sub> : Área del HBD-LE

A<sub>BL</sub> : Área del laurato de butilo

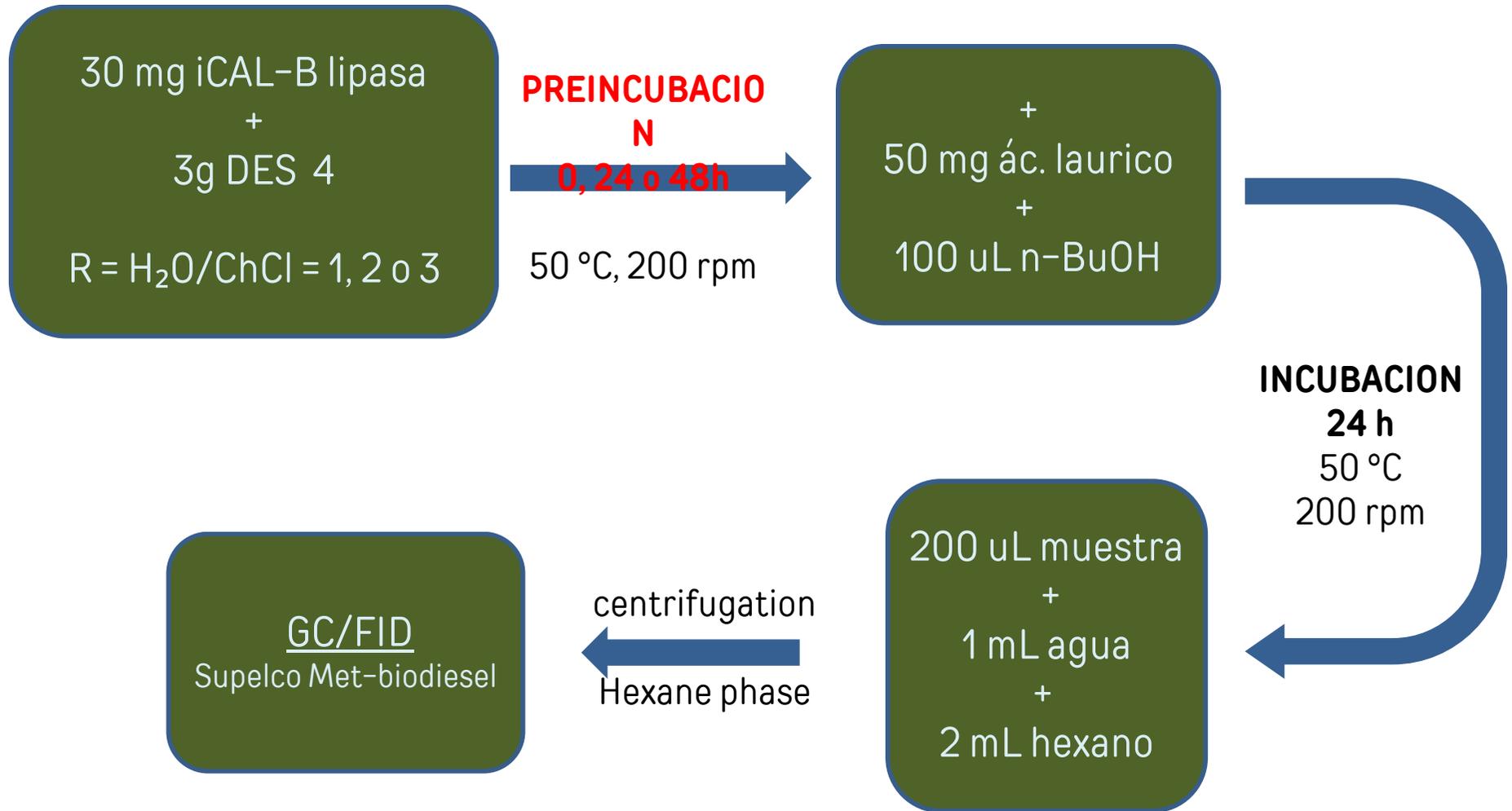
DES 4  
no reactivo



2

Efecto de la exposición de la lipasa iCAL-B al DES ChCl/urea

# Procedimiento 2



# Resultados

## Lipasa sin preincubar:

R = 0: mínima conversión

R = 1 to 3: altas conversiones



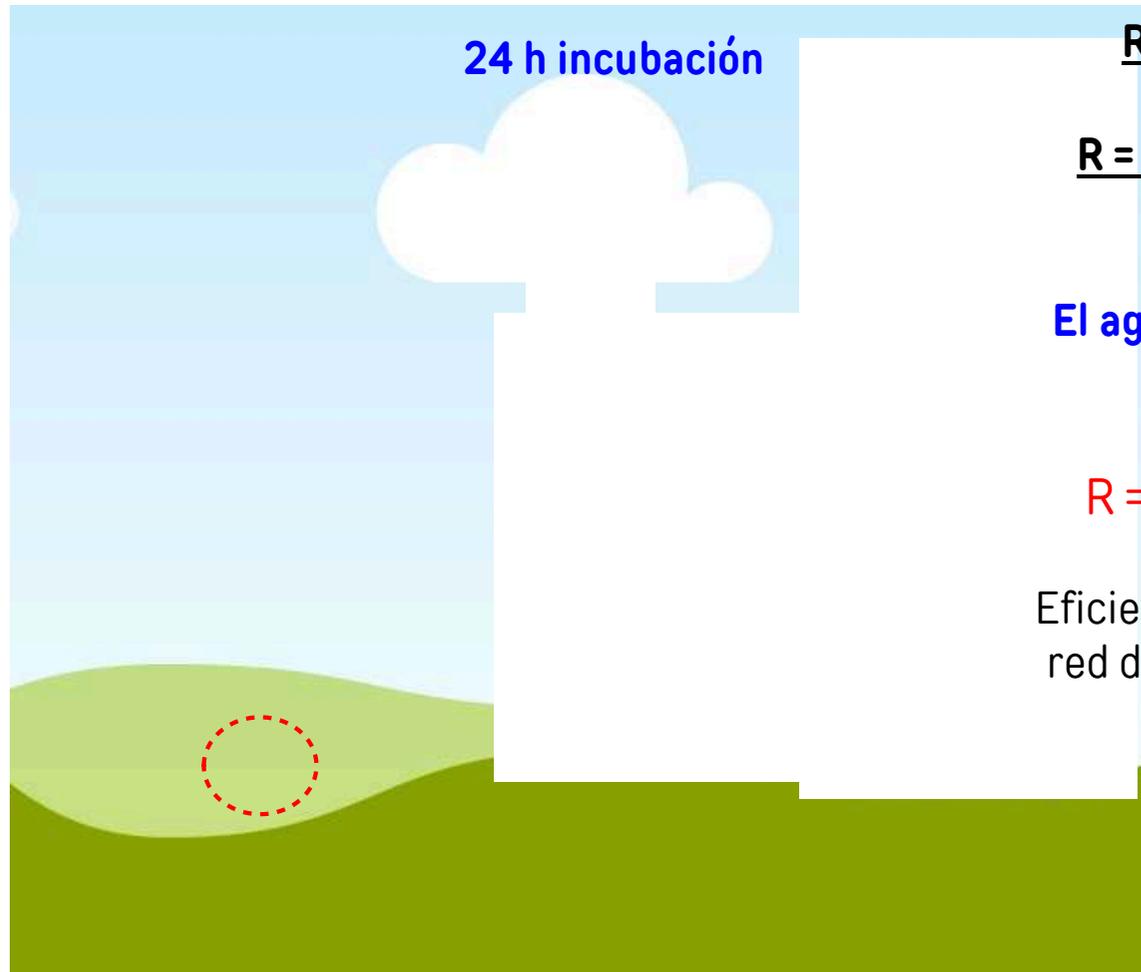
**El agua necesaria para mantener la lipasa activa**

**R = 3 WRITE TO US 21 % H<sub>2</sub>O en el DES !!**

Eficiente incorporación del agua en la red de enlaces de hidrógeno del DES



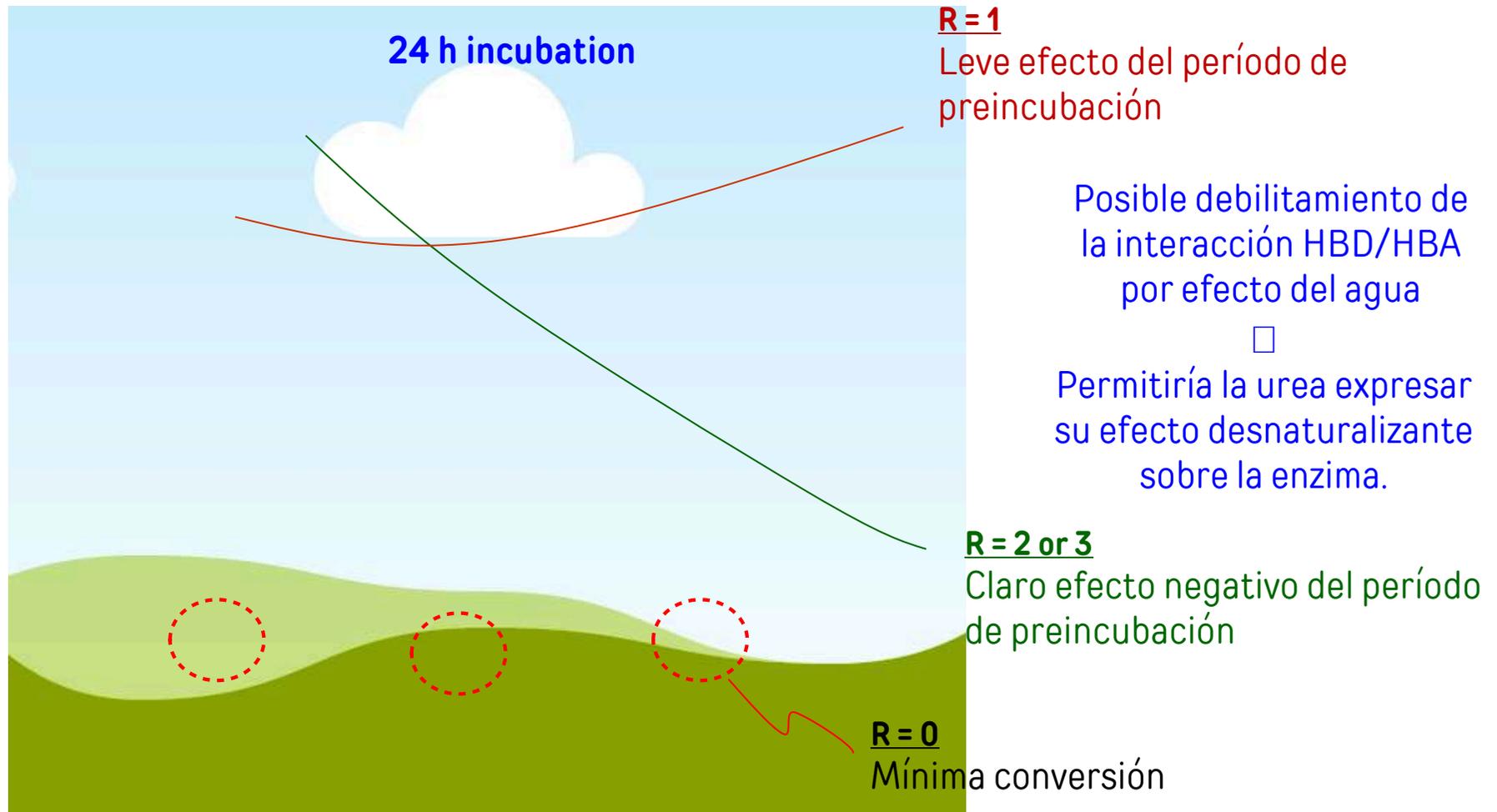
**Reducido poder nucleofílico del agua**



# Resultados



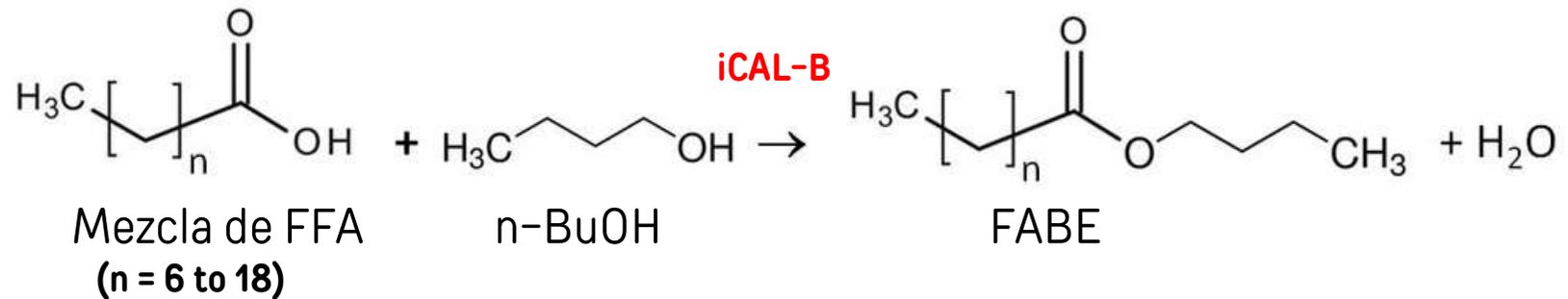
# Resultados



3

Eficiencia de la  
esterificación de  
ácidos grasos

# Procedimiento 3



0.05 mMol cada FFA  
+  
100 uL n-BuOH  
+  
Int Std (tricosano)  
+  
30 mg CAL-B lipasa  
+  
3g DES  
(H<sub>2</sub>O/ChCl=0, 1, 2 or 3)

**INCUBACIÓN**  
50 °C/250 rpm

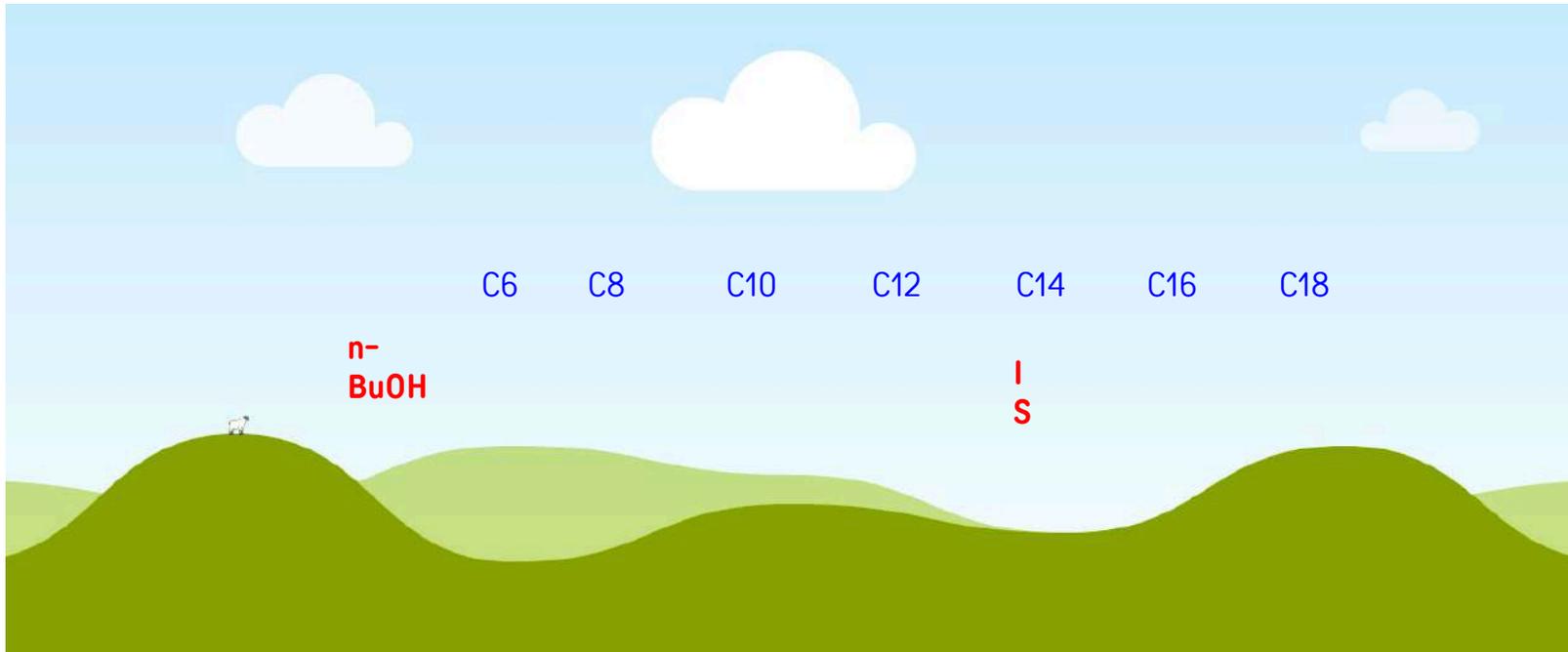
200uL muestra  
+  
1 mL agua  
+  
2 mL hexano

**centrifugación**  
Hexano

GLC:  
Supelco  
SP2330  
Split / FID

Hexano  
(reacción completa)

# Procedimiento 3

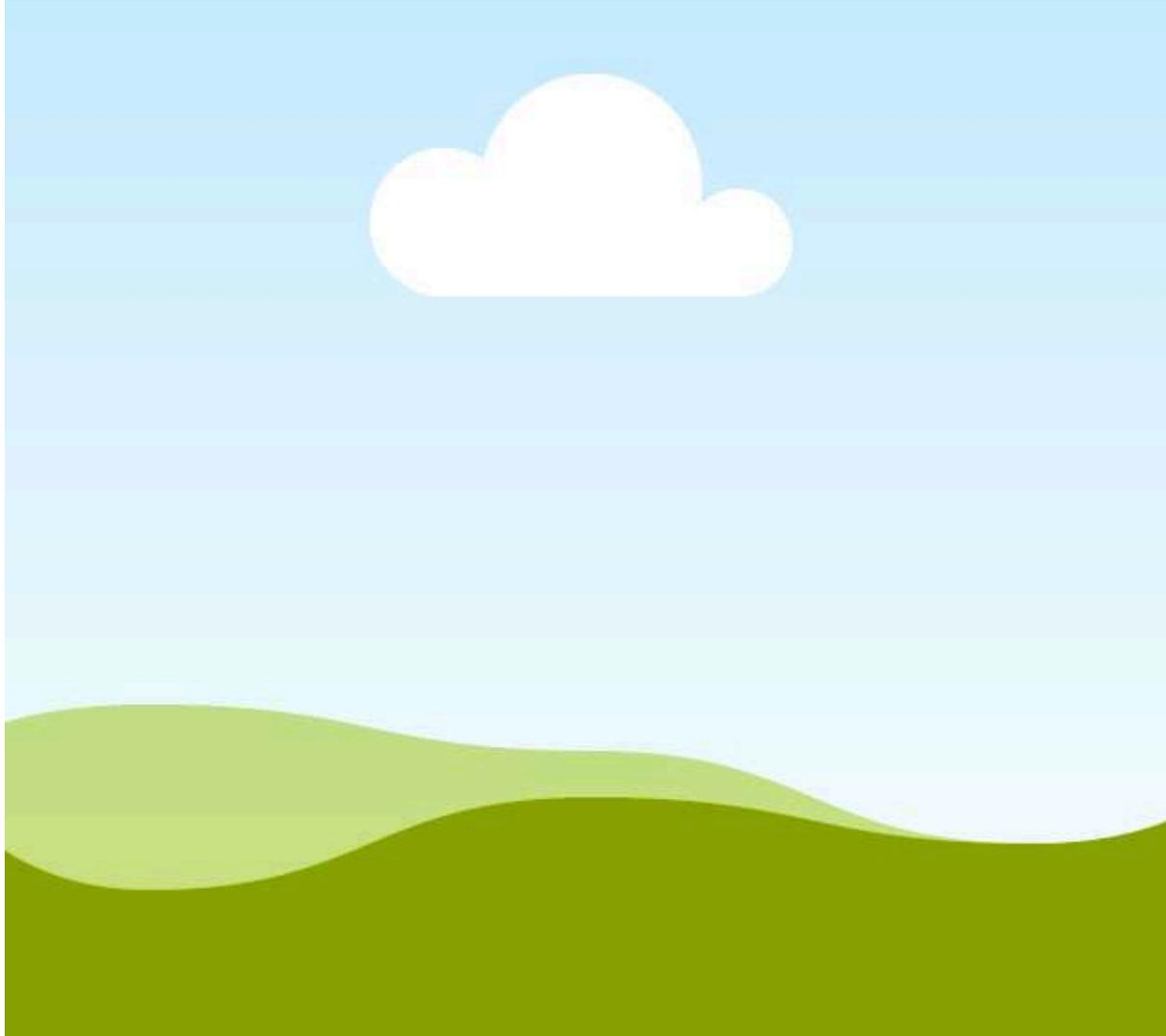


$$\text{Conversion (\%)} = 100 \times \frac{\left(\frac{A_i}{A_{IS}}\right)_{DES,t}}{\left(\frac{A_i}{A_{IS}}\right)_{H,f}}$$

$(A_i / A_{IS})_{DES,t}$  : Área del FABE “i” dividida por el área del IS a tiempo “t” (incubación en DES)

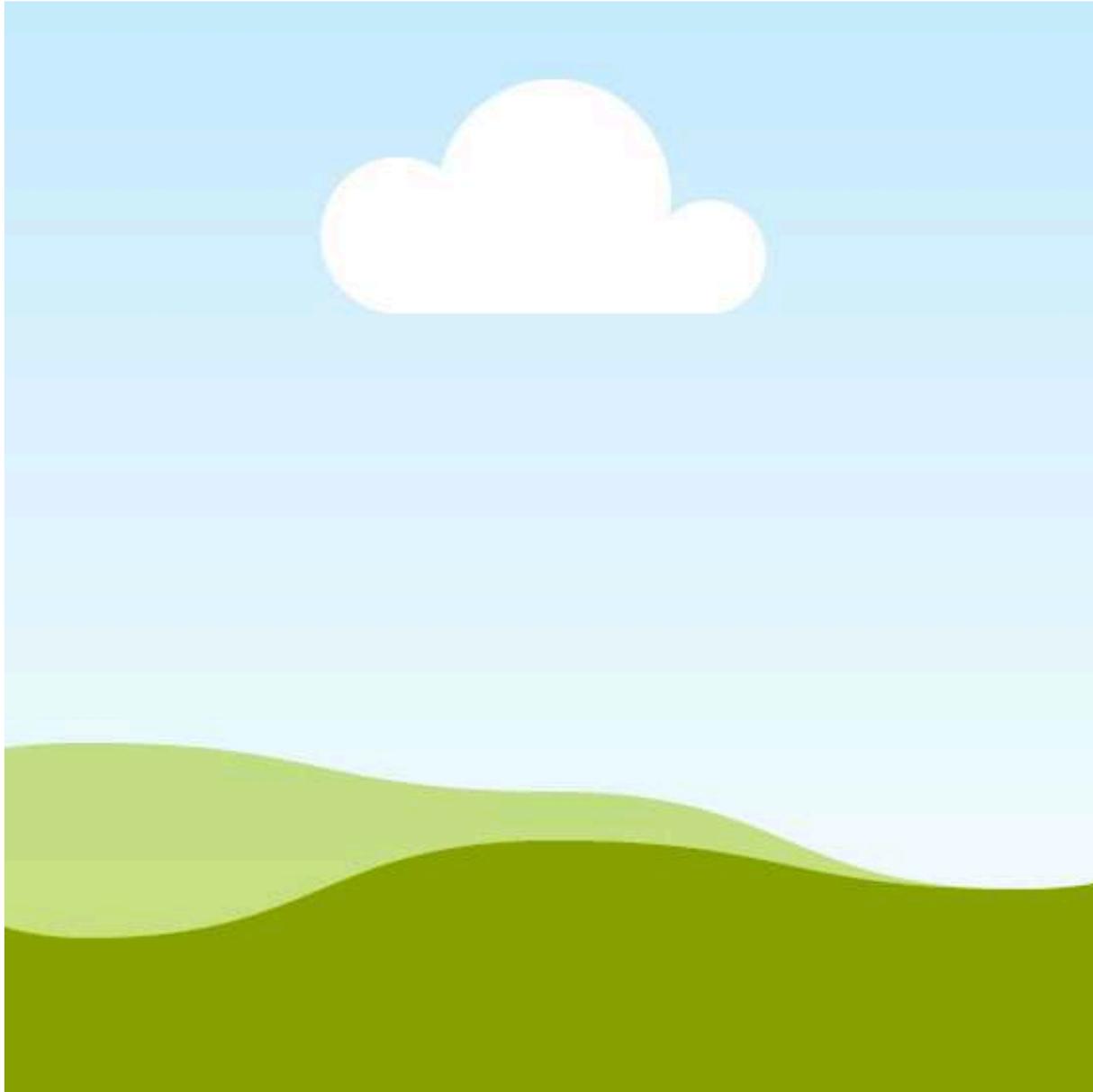
$(A_i / A_{IS})_{H,f}$  : Área del FABE “i” dividida por el área del IS a tiempo “t” (incubación en hexano)

$$R = (\text{H}_2\text{O}/\text{ChCl})_{\text{molar}} = 0$$



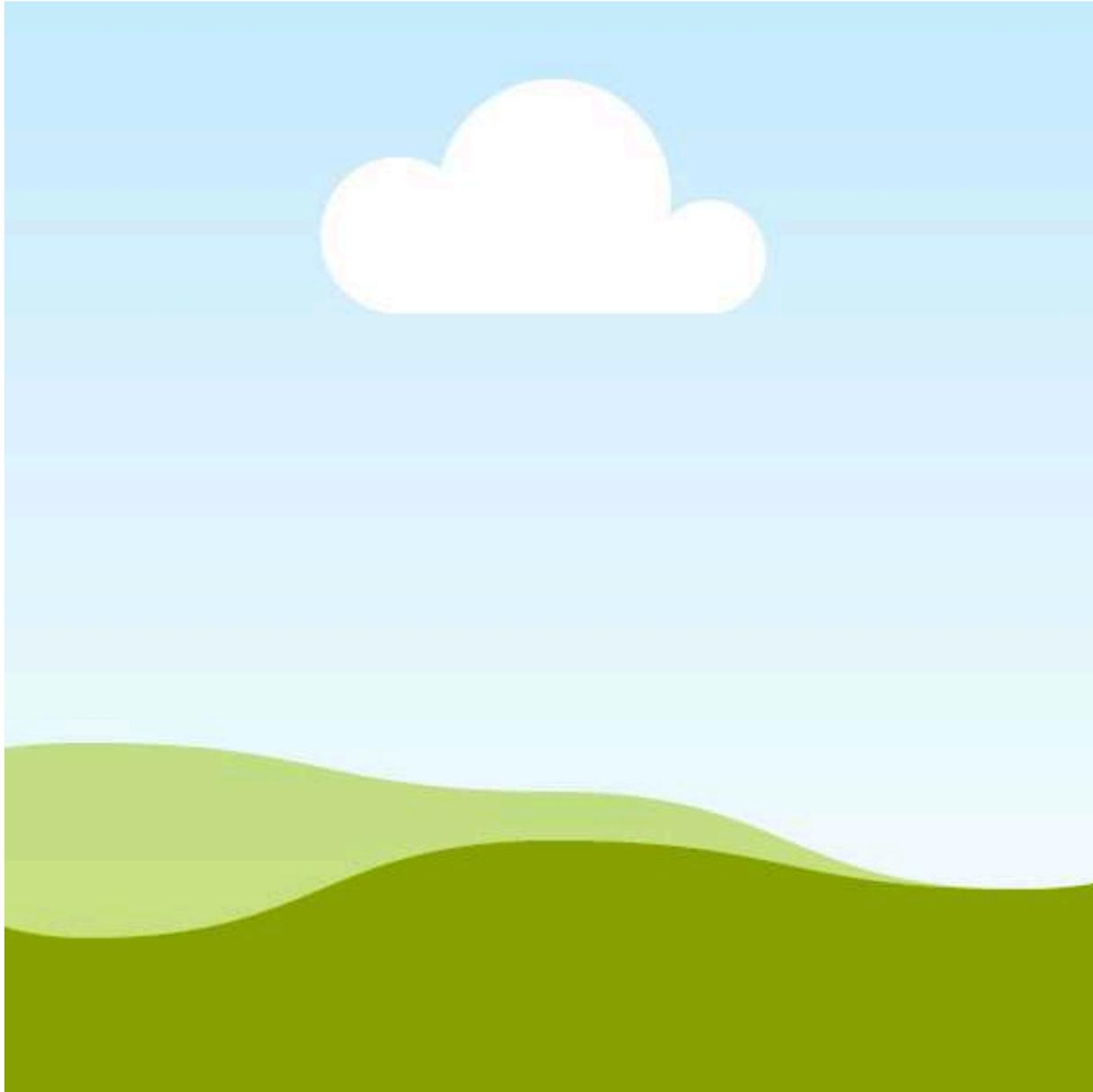
- Baja actividad catalítica
- Conversiones más altas de los ácidos grasos más cortos

$$R = (\text{H}_2\text{O}/\text{ChCl})_{\text{molar}} = 1$$



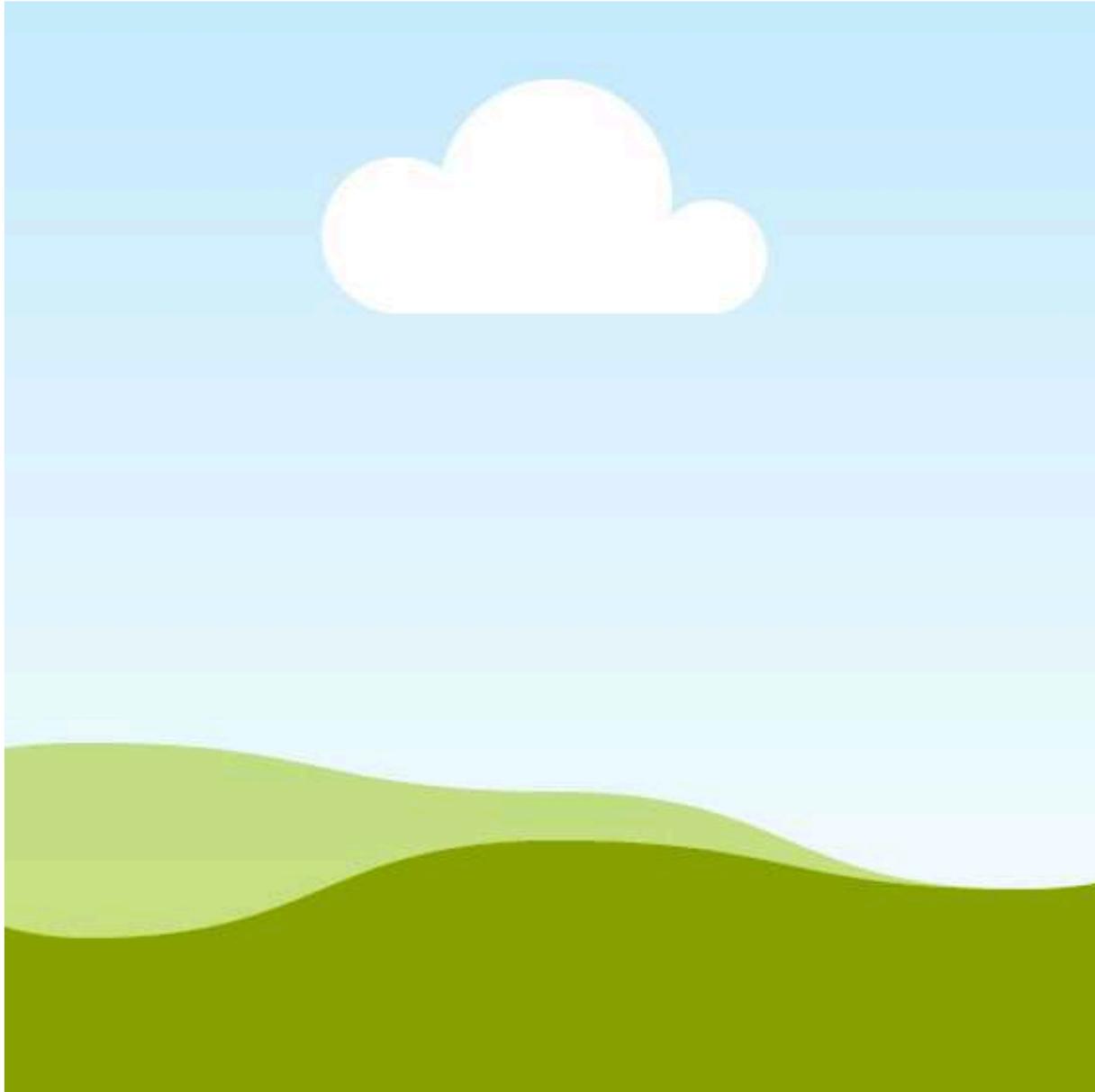
- Incremento de la actividad catalítica
- Los ácidos más cortos alcanzaron las menores conversiones finales
- Probable mayor interacción de éstos con los componentes del DES (“atrapamiento”)

$$R = (\text{H}_2\text{O}/\text{ChCl})_{\text{molar}} = 2$$



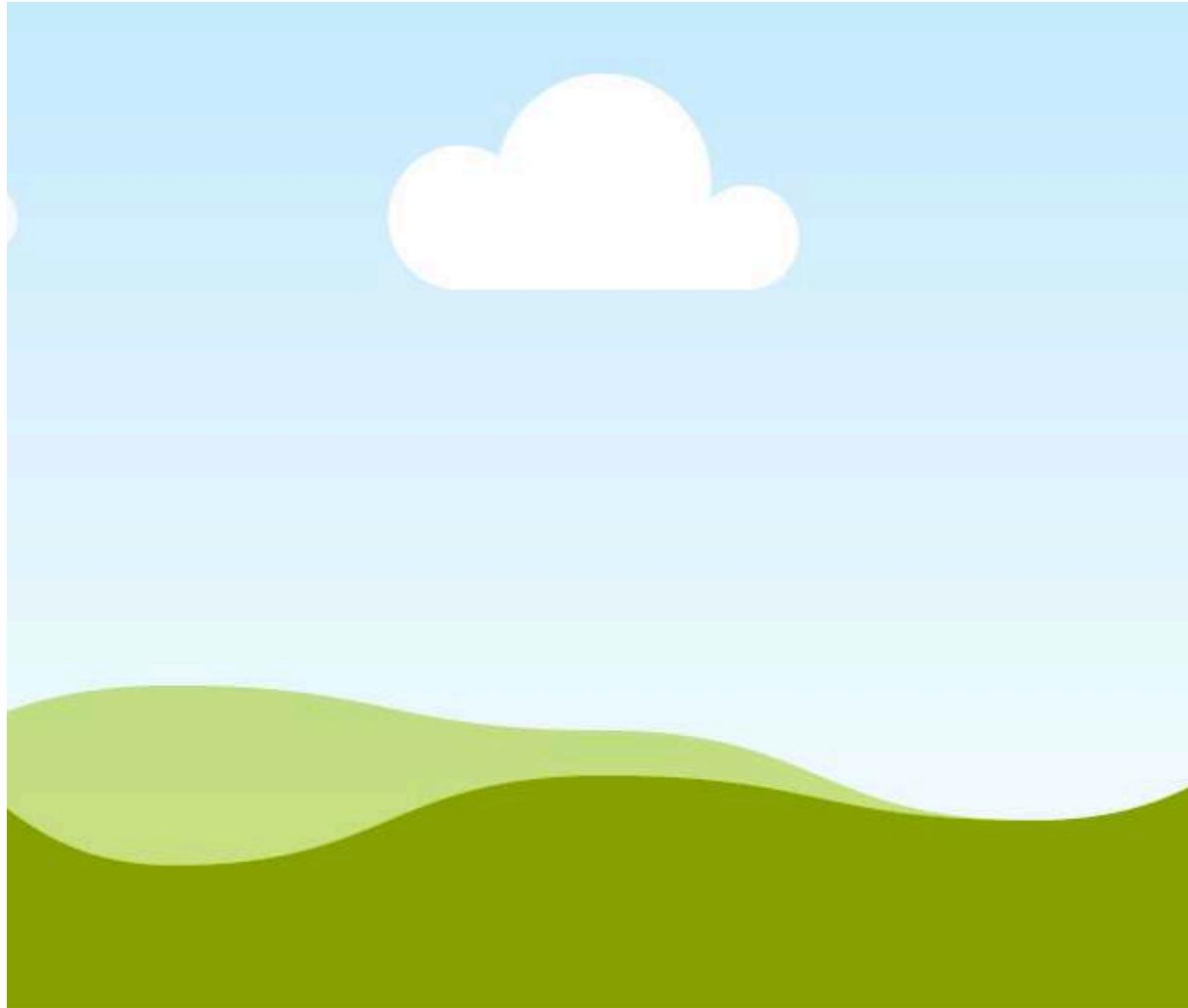
- Aún mayor actividad catalítica de la lipasa iCAL\_B
- Más altas conversiones de los ácidos grasos más largos
- C12–C18 convertidos cerca de 90 % después de 4 h

$$R = (\text{H}_2\text{O}/\text{ChCl})_{\text{molar}} = 3$$



- Actividad catalítica aún mayor
- Los ácidos grasos siguen siendo los de mayor conversión
- C12-C18 convertidos en más de 90 % a las 4 h

# Velocidad inicial de esterificación



- $v_0$  aumenta con la concentración de agua
- $v_0$  mayor para los ácidos más cortos en el DES anhidro
- Tendencia opuesta en medio con agua

4

# Síntesis de lípidos complejos

# Lípidos complejos de interés:

## 4.1.- Ésteres de fitosteroles

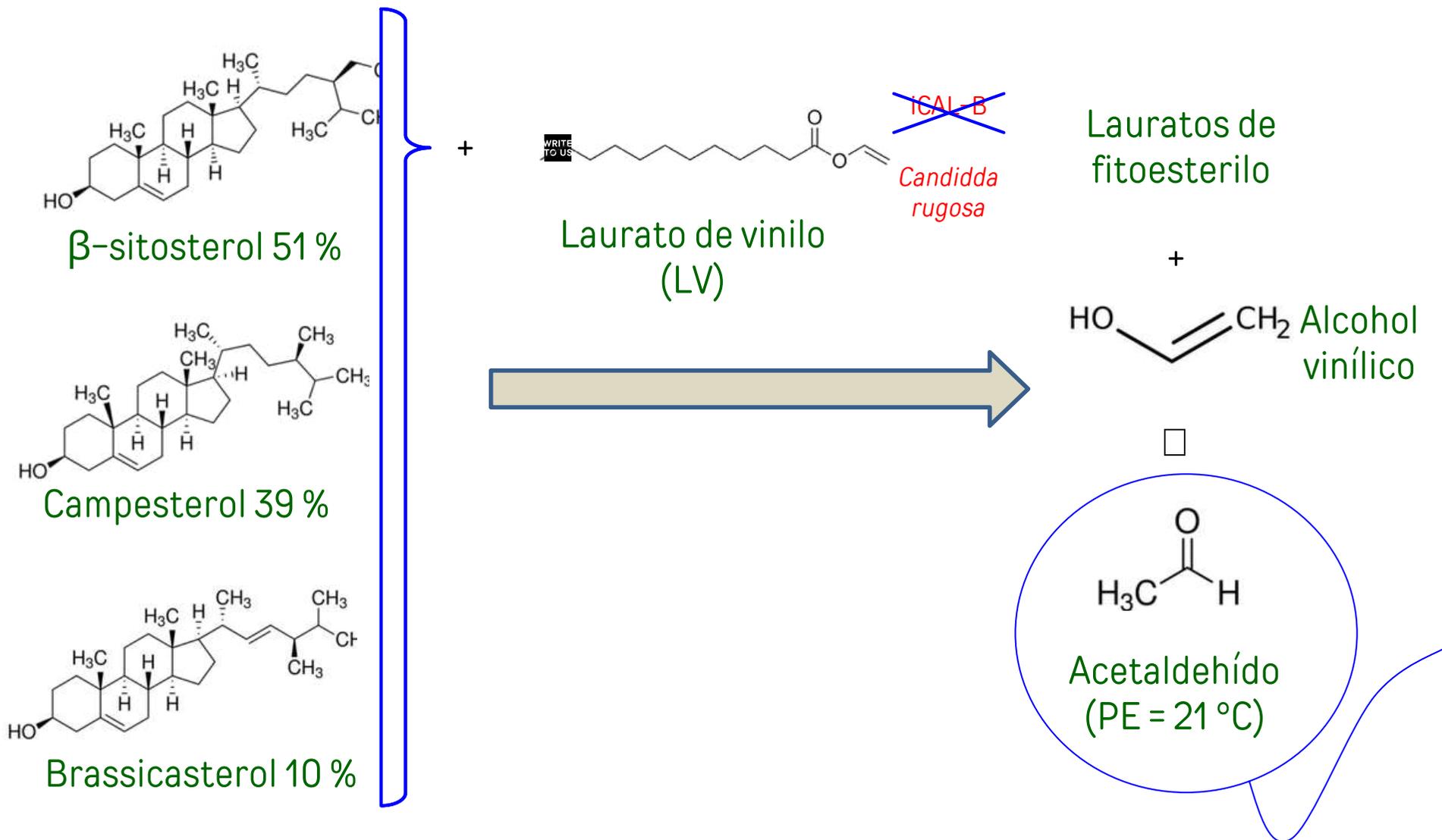
- Compuestos bioactivos: afecta metabolismo del colesterol, reduce su absorción, minimiza desórdenes metabólicos, controla sobrepeso, control de nivel sérico de LDL, prevención de enfermedades cardiovasculares.

## 4.2.- Ésteres de azúcares

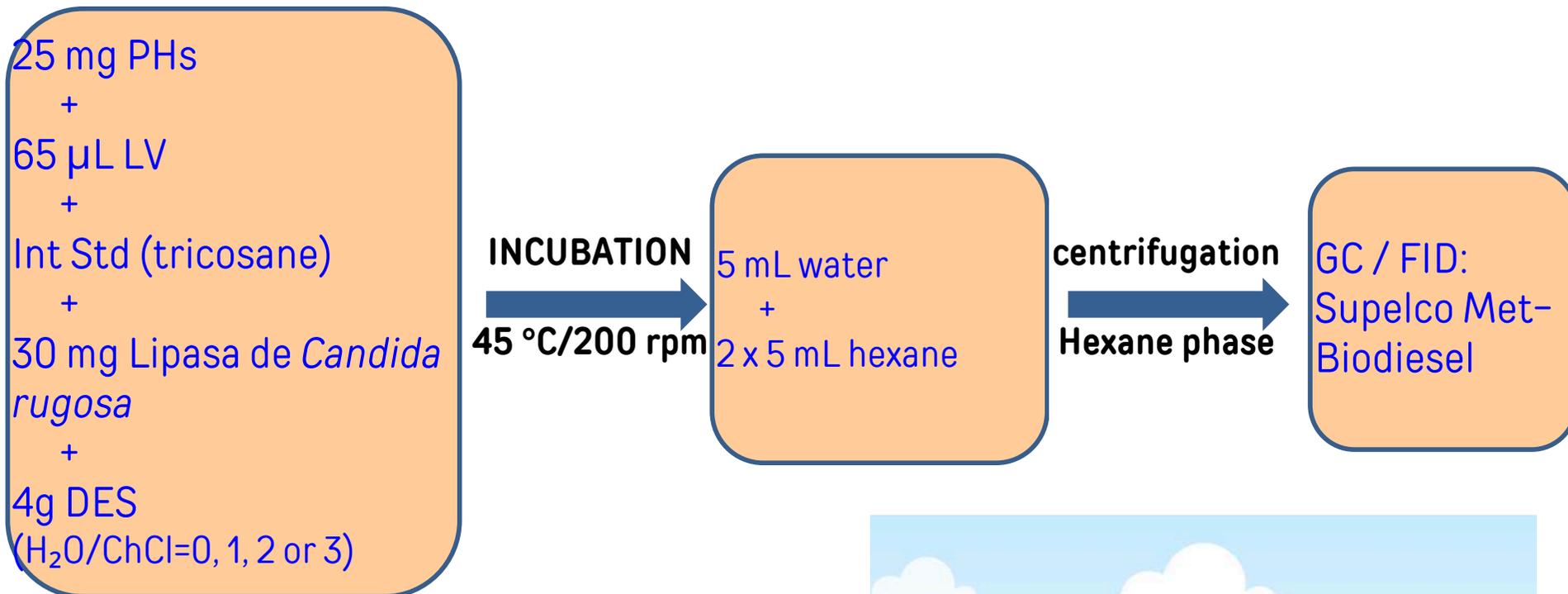
- Propiedades surfactantes y emulsificantes. Aplicaciones en industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Emulsiones comestibles (margarinas, shortengns, cremas, untables en general), son biocompatibles y biodegradables. Actividad antimicrobiana. Indicios de actividad antitumral y anti-inmunodeficiencia humana

# 4.1 Ésteres de fitosteroles

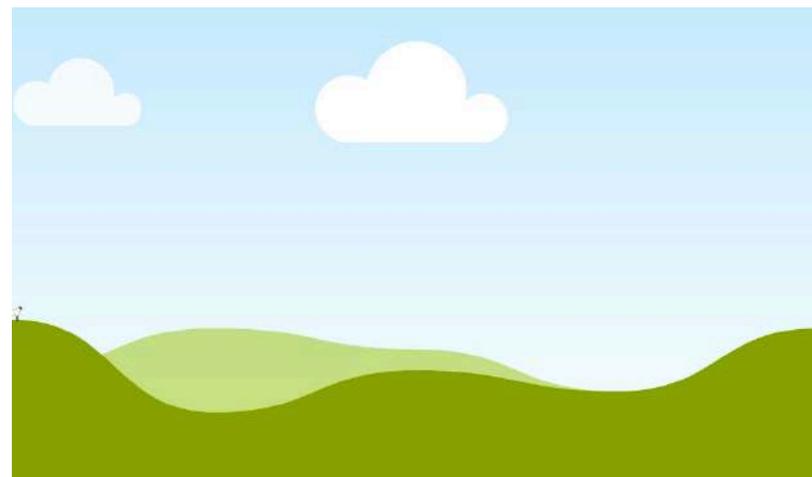
# Procedimiento 4.1



# Procedimiento 4.1

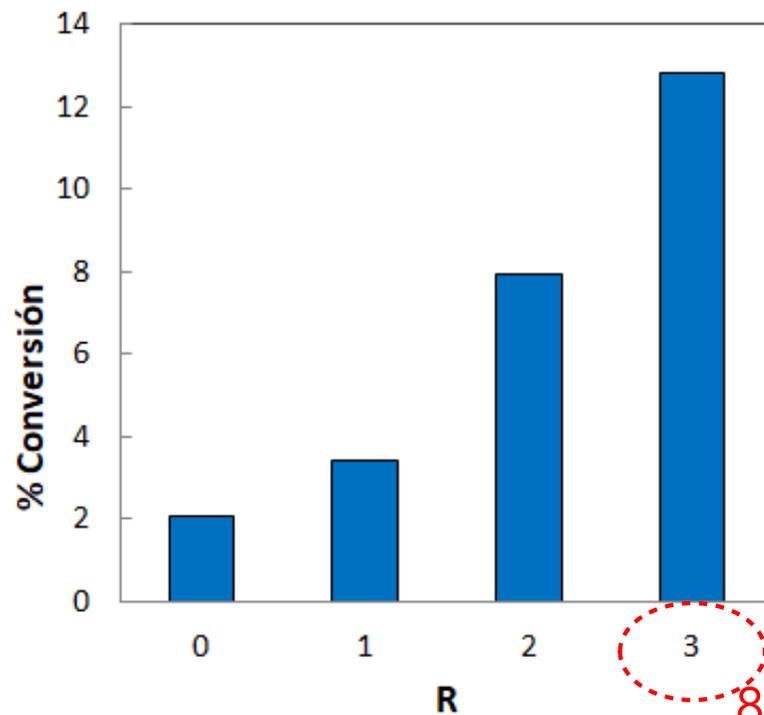


$$\% \text{ conversión} = 100 \times \frac{\sum (A_{LF})}{\sum (A_{LF}) + \sum (A_F)}$$



# Resultados

- DES ChCl/urea (R = 0 a 3)
- 24h de incubación
- 50 °C



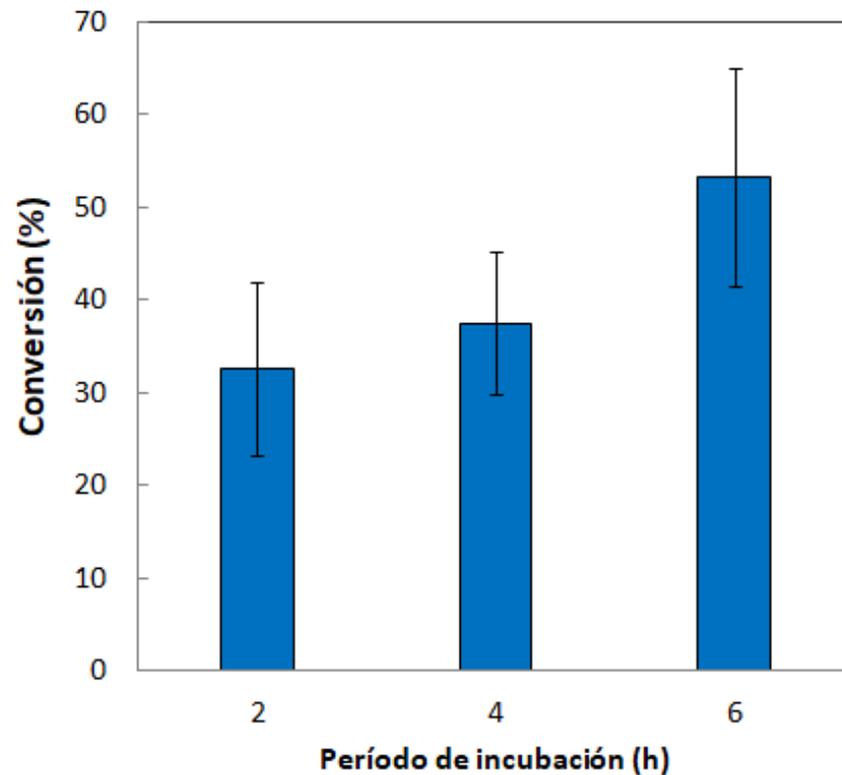
86 % hidrólisis del LV

Efectos del agua  
contrapuestos:

- Mejora la actividad enzimática
- Promueve la hidrólisis del LV

# Resultados

- DES ChCl/urea (R = 3)
- Adiciones sucesivas de LV: 3 x 65  $\mu$ L
- 50 °C

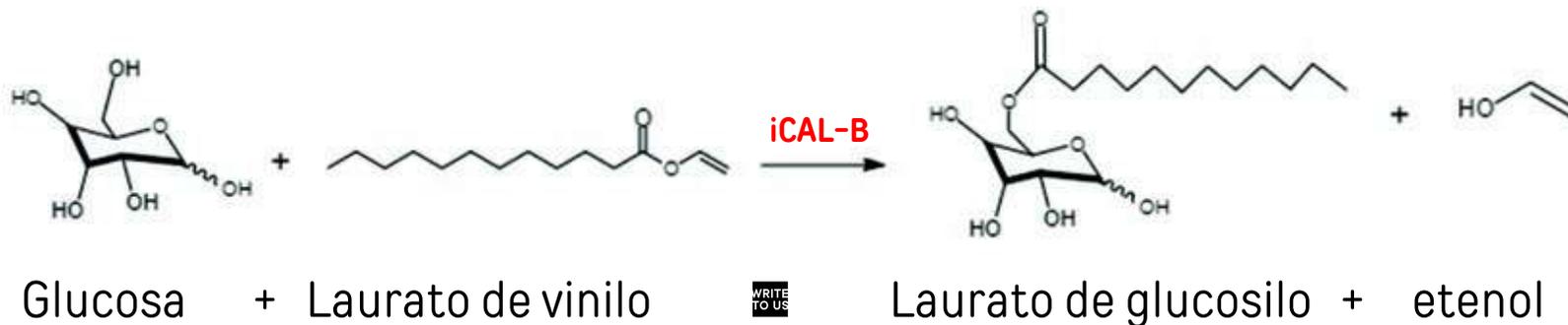


Los agregados sucesivos de LV permitieron mantener su concentración elevada en todo el período de incubación

## 4.2

# Ésteres de azúcares

# Procedimiento 4.2



150 mg glucosa  
+  
600 mg LV  
+  
15 mg IS (hexadecano)  
+  
50 mg iCAL-B lipase  
+  
5g DES  
(H<sub>2</sub>O/ChCl=0, 1, 2 or 3)

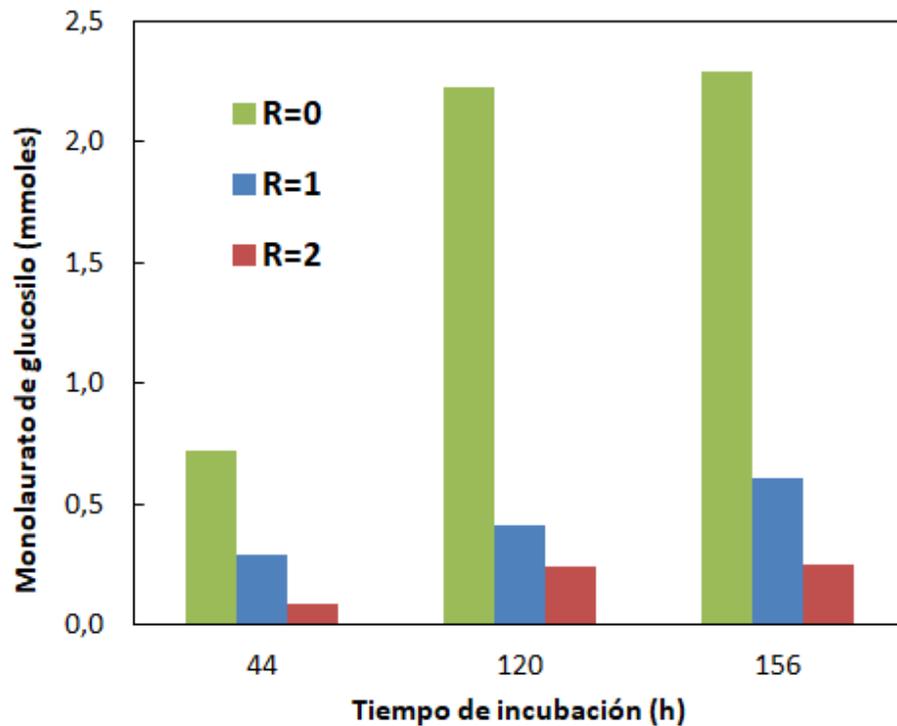
**INCUBACION**  
70 °C/1000 rpm

200 uL muestra  
+  
1 mL agua  
+  
1 mL EtAc

**Separación**  
**Silanización**

GC / FID:  
Supelco Met-  
Biodiesel

- DES ChCl/urea (1:2) □ No se detectó producto
- DES ChCl/glucosa (1:1)  MP = 31°C



Doble rol de la Glucosa:

- HBD
- Sustrato

# Desafíos

- Cinética en general más lenta que en solventes convencionales.
- Posible competitividad del HBD con la reacción de interés.
- Posible efecto inhibitorio sobre la enzima:
  - Selección de la enzima en función de la reacción.
  - Ajuste de las condiciones de reacción.
- Ajuste de la concentración de agua:
  - Maximizar la actividad enzimática.
  - Moderar la viscosidad.
  - Evitar la disrupción del DES
- Conveniente selección del conjunto DES/lipasa e función del proceso
- Evaluar posibilidad de conferir doble rol a componentes del DES: “solvente + sustrato”.

## Equipos de investigación:

### Uruguay (UDELAR)

- Lorena Maurenste
- Nicolás Callejas
- Elisa Volonterio
- Iván Jachmanián

### Francia (CIRAD)

- Maria Cruz Figueroa-Espinoza
- Bruno Baréa
- Nathalie Barouh
- Claire Bourlieu-Lacanal
- Erwann Durand
- Pierre Villeneuve

## Agradecimientos:



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN



PEDECIBA  
MEC-UDELAR



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



COOPÉRATION SCIENTIFIQUE  
FRANCE - AMÉRIQUE LATINE

*Gracias !*

ijachman@fq.edu.uy