



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Ingeniería Química

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Síntesis enzimática de acilglicéridos de alto valor
nutricional**

Daniel Alberto Sánchez

Bahía Blanca

Argentina

2016

PREFASIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Planta Piloto de Ingeniería Química, dependiente del Departamento de Ingeniería Química y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2011 y el 12 de febrero de 2016, bajo la dirección de la Dra. María Luján Ferreira y la Dra. Gabriela M. Tonetto.

Daniel Alberto Sánchez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de(.....)

A mi familia, mi sustento

A la memoria de mis abuelos, eternamente en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, María Luján Ferreira y Gabriela Tonetto por el apoyo y estímulo constante en la realización de la presente tesis. Gracias Luján por la pasión puesta cada día en la investigación y por el entusiasmo demostrado en la transmisión de conocimientos. Gracias Gabriela por el compañerismo, por aventurarte a aprender junto a mí en esta tesis y estar atenta a cada detalle. Gracias a ambas por encontrarle siempre el lado positivo a los resultados, que a mí entender, eran malos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) por el soporte financiero para el desarrollo de esta tesis.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) por proveer los equipos y el espacio físico adecuado para la realización del trabajo resumido en el presente informe.

A todo el personal de apoyo del instituto PLAPIQUI y especialmente del grupo de Catálisis (Andrea, Matías, Diego, Magalí) por la incondicional ayuda en la puesta a punto de las técnicas y equipos usados para el trabajo experimental de la tesis.

A Ana Julia Ávila y Mariana Reinoso por su colaboración en el uso del cromatógrafo de gases y la implementación de la técnica cromatográfica. A María del Pilar Guauque Torres por su ayuda en la puesta a punto de la técnica de titulación.

A Esteban Brignole por la detallada explicación sobre el uso de Ecofac 1.0

A Julie Merchan Sandoval por la generosa facilitación de la montmorillonita empleada en esta tesis.

A la Ing. Miryam Crespo y al Dr. Claudio N. Ferrarello por la colaboración con el análisis ICP-AES de los preparados enzimáticos. Al Dr. Raúl Garay por su colaboración en la realización de los análisis por RMN de ^1H y ^{13}C de diversas muestras.

A Nora, Any, Adriana, Elsa, Selva y Guillermo por simplificararnos la vida dentro del instituto, por la incansable ayuda a la hora de realizar trámites.

A todos mis compañeros de oficina. Gracias por tantos momentos gratos, por tantos mates, por tantas tortas. Gracias Pili, Vicky, Ana, Agus, Edu, Naza, Andrés, Mariana, Yani, Marta, Fernando, Paula y Franco.

Gracias a todos los miembros del grupo de Catálisis por hacerme sentir parte de este grupo desde el primer día. Gracias Daniel, Luján, Mara, Gabi, Martín, Andrea, Matias, Diego, Maga.

Un agradecimiento muy especial merecen los grandes amigos que me dio la realización de esta tesis en PLAPIQUI: gracias Pili, Agus, Maga, Mariana A. S., Andrés y Fernando.

Gracias a mis abuelos, que hoy ya no están pero compartieron estos años de estudio junto a mí. Gracias por todo el amor y por la felicidad que me han dado.

Finalmente el agradecimiento más importante, a mis padres. Gracias por el apoyo constante, por esa compañía infaltable aún a cientos de kilómetros. Gracias por motivarme a aprender, por ayudarme a construir mi pensamiento. Gracias nuevamente a mis papás, y a mi hermano, por alegrarse por cada pequeño logro, por estar presentes en cada día de mi vida. Gracias por ser ejemplos de fortaleza, lucha y constancia, y en especial por sus inigualables corazones.

RESUMEN

En la presente tesis se estudia la síntesis enzimática en dos etapas de mezclas de acilglicéridos con un alto valor nutricional. El producto obtenido consiste principalmente en triglicéridos estructurados, triglicéridos de cadena media y 1,3-diglicéridos.

En el Capítulo 1 se define el concepto de acilglicérido y se describen las principales características de los acilglicéridos utilizados en alimentación humana. Además, se presentan las propiedades buscadas en nuevos glicéridos y el uso de lipasas para la obtención de los mismos, con especial énfasis en el mecanismo de acción y especificidad de estas enzimas.

El Capítulo 2 resume los materiales y métodos utilizados para llevar a cabo las reacciones de síntesis durante esta tesis. También se presentan las técnicas utilizadas para analizar los productos de reacción y los protocolos de inmovilización de lipasas.

El Capítulo 3 contiene los principales resultados de la síntesis enzimática de 1,3-dicaprina por esterificación de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM. Se lleva a cabo un diseño de experimentos y se estudian múltiples respuestas. Además, se analiza en detalle la migración de acilo (una reacción secundaria) y se propone un modelo teórico para explicar la participación de la lipasa en esta reacción.

En el Capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos al realizar la separación y purificación de 1,3-dicaprina sintetizada con la reacción descrita en el Capítulo 3. Se estudia la separación de acilgliceroles en un proceso en varias etapas empleando solventes de baja toxicidad. Como paso previo, se analiza la neutralización y separación del ácido cáprico remanente.

El Capítulo 5 se centra en el estudio de biocatalizadores para la obtención de mezclas de glicéridos estructurados de alto valor nutricional a través de la esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico. Se analiza la actividad y selectividad de enzimas comerciales, en forma libre e inmovilizada. Además, se realiza un exhaustivo análisis de las características de la mezcla de acilglicéridos obtenida con cada biocatalizador. Finalmente, se proponen y discuten varias técnicas para estudiar la composición de estas muestras.

En el Capítulo 6 se lleva a cabo un análisis detallado de la isomerización de acilos observada en la etanólisis de triglicéridos. En el mismo se examinan los principales factores que afectan a la reacción de migración de acilo durante la etanólisis de triglicéridos modelo catalizadas por Novozym 435.

El Capítulo 7 contiene los resultados más relevantes de la síntesis de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol a partir de la esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada por adsorción física sobre quitosano. En primer lugar, se estudia la obtención del biocatalizador. A continuación,

el mismo se analiza en reacción mediante un diseño de experimentos y se determinan las condiciones óptimas para la síntesis del triglicérido estructurado deseado.

Por último, el Capítulo 8 presenta las conclusiones más importantes y relevantes del trabajo experimental llevado a cabo. En este capítulo también se indican los posibles trabajos futuros derivados de la presente tesis.

ABSTRACT

In this doctoral thesis, the enzymatic two stages synthesis of acylglycerides blends, with high nutritional value, is studied. The nutritional mixture mainly consists in structured triglyceride, medium chain triglycerides and 1,3-diglycerides.

In Chapter 1, acylglycerides concept is defined and the main characteristics of the acylglycerides used in human nutrition are described. Also, the desired properties of novel acylglycerides and the use of lipases for obtaining of these glycerides are presented, with special emphasis on the mechanism of action and specificity of these enzymes.

Chapter 2 summarizes the materials and methods used to carry out the synthesis reactions during this thesis. The techniques used to analyze reaction products and the lipase immobilization protocols are also presented.

Chapter 3 contains the most important results of enzymatic synthesis of 1,3-dicaprin by esterification of glycerol with capric acid catalyzed by Lipozyme RM IM. An experimental design is performed and multiple responses are analyzed. In addition, acyl migration (a secondary reaction) is analyzed in detail and a theoretical model is proposed in order to explain the participation of lipase in this reaction.

Chapter 4 contains the results obtained by performing the separation and purification of 1,3-dicaprin synthesized by the reaction analyzed in Chapter 3. Acylglycerides

separation in a multistage process using solvents of low toxicity is studied. As a preliminary step, neutralization and removal of capric acid remaining is analyzed.

Chapter 5 focuses on the study of biocatalysts for the production of structured glycerides mixtures with high nutritional value through the esterification of 1,3-dicaprin with palmitic acid. The activity and selectivity of commercial enzymes, in free and immobilized form are analyzed. In addition, an exhaustive analysis of the characteristics of the mixture of acylglycerides obtained with each biocatalyst is performed. Finally, various techniques used to study the composition of the samples are proposed and discussed.

In Chapter 6, a detailed analysis of the acyl isomerization occurred during ethanolysis of triglycerides is carried out. In the same, the main factors affecting the reaction of acyl migration during ethanolysis of model triglycerides catalyzed by Novozym 435 are studied.

Chapter 7 contains the most relevant results of the synthesis of 1,3-dicaproyl-2-palmitoyl glycerol obtained from the esterification of 1,3-dicaprin with palmitic acid catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by physical adsorption on chitosan. First, the preparation of the catalyst is studied. Then, the catalyst is analyzed in reaction performing an experimental design and the optimal conditions for the synthesis of desired structured triglyceride are determined.

Finally, Chapter 8 shows the most important and relevant conclusions from the experimental work carried out. Possible future works, derivatives of the present thesis, are also indicated in this chapter.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Acilglicéridos	1
1.1.1. Triglicéridos.....	2
1.1.1.1. Triglicéridos de longitud de cadena media y triglicéridos estructurados.....	3
1.1.2. Diglicéridos	5
1.1.2.1. 1,3-diglicéridos	6
1.2. Propiedades buscadas en acilglicéridos.....	7
1.2.1. Propiedades nutricionales	8
1.2.2. Propiedades físicas	9
1.3. Lipasas.....	9
1.3.1. Mecanismo de reacción.....	10
1.3.2. Especificidad de las lipasas	13
1.3.3. Aplicaciones de las lipasas	16
1.3.4. Síntesis de triglicéridos estructurados empleando lipasas.....	19
1.4. OBJETIVOS.....	21
1.5. Referencias.....	22
2. EXPERIMENTAL.....	29
2.1. Materiales	29
2.1.1. Enzimas	29
2.1.2. Reactivos y Solventes.....	29
2.2. Métodos.....	30
2.2.1. Síntesis y purificación de 1,3-dicaproil glicerol.....	31
2.2.1.1. Adsorción de glicerol sobre gel de sílice.....	31
2.2.1.2. Esterificación de glicerol con ácido cáprico.....	32
2.2.1.3. Diseño factorial de cribado.....	33
2.2.1.4. Análisis estadístico.....	35
2.2.1.5. Análisis de muestras	35
2.2.1.5.1. Evaluación de la adsorción de ácido cáprico sobre gel de sílice	35
2.2.1.5.2. Desorción de ácido cáprico	35

2.2.1.5.3. Determinación de la conversión por titulación.....	36
2.2.1.5.4. Análisis cromatográfico.....	36
2.2.1.6 Evaluación del rol de la lipasa en la migración de acilos.....	37
2.2.1.6.1. Desactivación de la lipasa.....	37
2.2.1.6.2. Isomerización de monooleína.....	37
2.2.1.6.3. Isomerización en los productos de reacción de esterificación.....	38
2.2.1.7. Separación de aciglicéridos.....	39
2.2.1.7.1. Evaluación de solventes.....	39
2.2.1.7.2. Neutralización de ácido cáprico.....	42
2.2.1.7.3. Extracción líquido-líquido.....	43
2.2.2. Evaluación de catalizadores para la síntesis de mezclas de glicéridos estructurados por esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico.....	46
2.2.2.1. Empleo de lipasas comerciales en forma libre o inmovilizada.....	46
2.2.2.2. Análisis de metodologías para la remoción de agua en el medio de reacción.....	47
2.2.2.3. Transesterificación de dicaprina con palmitato de etilo.....	47
2.2.2.4. Remoción del agua contenida en la lipasa PS “Amano”.....	48
2.2.2.5. Inmovilización de lipasas.....	48
2.2.2.6. Identificación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3- palmitoil glicerol por cromatografía gaseosa.....	49
2.2.2.7. Hidrólisis de glicéridos catalizada por la lipasa de páncreas porcino.....	50
2.2.2.8. Etanólisis de glicéridos catalizada por Novozym 435.....	50
2.2.2.9. Resonancia magnética nuclear de ¹ H y ¹³ C.....	51
2.2.2.9.1. Apantallamiento, desplazamiento químico y multiplicidad.....	52
2.2.2.9.2. Efecto nuclear Overhauser.....	54
2.2.2.9.3. Análisis de muestras.....	54
2.2.3. Migración de acilos en etanólisis de triglicéridos.....	55
2.2.3.1. Reacción de etanólisis enzimáticamente catalizada.....	55
2.2.3.2. Diseño Box-Behnken.....	56
2.2.3.2.1. Diseño experimental 1 (DE1).....	56
2.2.3.2.2. Diseño experimental 2 (DE2).....	57
2.2.3.3. Método y enfoque teórico.....	57
2.2.4. Síntesis de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol.....	58
2.2.4.1. Inmovilización de la lipasa de Burkholderia cepacia sobre quitosano.....	58
2.2.4.1.1. Evaluación de la desorción de lipasa en <i>n</i> -heptano.....	59

2.2.4.1.2. Eliminación de la lipasa débilmente adsorbida.....	59
2.2.4.2. Determinación de porcentaje de inmovilización mediante la cuantificación de azufre elemental por ICP-AES.....	60
2.2.4.3. Análisis del biocatalizador por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia difusa.....	60
2.2.4.4. Esterificación de dicaprina con ácido palmítico	61
2.2.4.5. Diseño factorial de cribado.....	61
2.3. Referencias.....	62
3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 1,3-DICAPROILGLICEROL MEDIANTE ESTERIFICACIÓN DE GLICEROL CON ÁCIDO CÁPRICO EN SOLVENTE ORGÁNICO	64
3.1. Introducción.....	64
3.2. Adsorción de ácido cáprico sobre gel de sílice	67
3.3. Identificación de productos	68
3.4. Reacción de migración de acilos	69
3.5. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste	71
3.5.1. Conversión de ácido cáprico.....	73
3.5.2. Fracciones de acilglicéridos	76
3.5.2.1. Fracción de monocaprina respecto al total de productos.....	76
3.5.2.2. Fracción de dicaprina respecto al total de productos.....	78
3.5.2.3. Fracción de tricaprina respecto al total de productos	80
3.5.3. Producción de dicaproilglicerol	83
3.5.4. Isómeros de dicaproilglicerol.....	85
3.6. Análisis multirespuesta a través de funciones de deseabilidad.	89
3.7. Evaluación del rol del soporte en la reacción de migración de acilos	91
3.7.1. Migración de acilos en monooleína.....	92
3.7.2. Isomerización en los productos de reacción de esterificación	93
3.8. ¿Puede la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> catalizar la migración de acilo desde las posiciones sn-1/sn-3 a la posición sn-2 en sn-1 (sn-3) mono- y 1,3- diglicéridos?.....	93
3.9. Conclusiones	105
3.10. Referencias.....	106
4. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DIACILGLICÉRIDOS OBTENIDOS MEDIANTE ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA USANDO EXTRACCIÓN CON SOLVENTE	109
4.1. Introducción.....	109

4.2. Selección de solvente.....	111
4.3. Neutralización de ácido cáprico.....	115
4.4. Extracción líquido-líquido	117
4.5. Conclusiones	120
4.6. Referencias.....	121
5. ESTUDIO DE CATALIZADORES PARA LA SÍNTESIS DE MEZCLAS DE GLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS CON ALTO VALOR NUTRICIONAL POR ESTERIFICACIÓN DE 1,3- DICAPRINA CON ÁCIDO PALMÍTICO	124
5.1. Introducción.....	124
5.2. Evaluación de catalizadores.....	129
5.2.1. Empleo de lipasas comerciales en forma libre o inmovilizada.....	129
5.2.3. Metodologías para el control del agua en el medio de reacción	133
5.2.4. Transesterificación de dicaprina empleando palmitato de etilo.....	139
5.2.5. Remoción del agua contenida en la lipasa PS “Amano”	140
5.2.6. Empleo de la lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> inmovilizada	141
5.3. Evaluación de catalizadores: análisis de la conversión de dicaprina y de los productos de reacción en función de la reacción que les da origen	143
5.4. Evaluación de catalizadores: análisis de la composición final de CPC, CPP y CCC.....	146
5.5. Evaluación de catalizadores: análisis de la composición final de diglicéridos.....	149
5.6. Evaluación de catalizadores: producción de glicéridos con alto valor nutricional.....	150
5.7. Identificación del ácido graso esterificado en la posición sn-2	158
5.7.1. Identificación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol por cromatografía gaseosa.....	158
5.7.2. Identificación de ácido graso esterificado en posición sn-2 mediante hidrólisis con lipasa de páncreas porcino	161
5.7.3. Identificación de ácido graso esterificado en posición sn-2 mediante etanólisis con Novozym 435.	162
5.8 Resultado del análisis de muestras por resonancia magnética nuclear	164
5.8.1. Resonancia magnética nuclear de tripalmitina	167
5.8.2. Resonancia magnética nuclear de CGC y CCG	169
5.8.3. Resonancia magnética nuclear de CPC y CCP	172
5.8.4. Resonancia magnética nuclear de COC y CCO	174
5.9. Conclusiones	180

5.10. Referencias.....	181
6. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MIGRACIÓN DE ACILOS DURANTE LA ETANÓLISIS DE TRIGLICERIDOS CATALIZADA POR NOVOZYM 435	186
6.1. Introducción.....	186
6.2. Identificación de productos.....	187
6.3. Reacción de migración de acilos.....	189
6.4. Importancia del análisis de las muestras.....	191
6.5. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste	192
6.5.1 Conversión del triglicérido.....	195
6.5.2. Síntesis de diglicéridos.....	197
6.5.2.1. Formación de 1,2-diglicérido.....	198
6.5.2.2. Formación de 1,3-diglicérido.....	200
6.5.3. Síntesis de monoglicéridos.....	201
6.5.3.1. Formación de 2-monoglicérido.....	202
6.5.3.2. Formación de 1-monoglicérido.....	204
6.5.4. Formación de glicerol.....	205
6.5.5. Síntesis de etil éster.....	206
6.6. Análisis multirespuesta usando funciones de deseabilidad.....	208
6.7. Resultados del modelo teórico.....	212
6.8. Conclusiones.....	220
6.9. Referencias.....	222
7. SÍNTESIS DE 1,3-DICAPROIL-2-PALMITOIL GLICEROL CATALIZADA POR LA LIPASA DE BURKHOLDERIA CEPACIA INMOVILIZADA POR ADSORCIÓN FÍSICA SOBRE QUITOSANO.	225
7.2. Inmovilización de la lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> sobre quitosano.....	228
7.2.1. Cuantificación de la lipasa inmovilizada.....	232
7.3. Lixiviación de la lipasa débilmente adsorbida.....	234
7.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia difusa.....	235
7.5. Identificación de productos de reacción.....	241
7.6. Importancia del correcto análisis de muestras.....	242
7.7. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste	243
7.7.1. Reactivos consumidos.....	246
7.7.1.1. Conversión de 1,3-dicaprina.....	246
7.7.1.2. Conversión de 1,2-dicaprina.....	247

7.7.1.3. Conversión de ácido Palmítico	249
7.7.1.4. Reactividad de 1-monocaprina.....	252
7.7.2. Productos generados por hidrólisis	254
7.7.2.1. Formación de ácido cáprico.....	254
7.7.2.2. Formación de Glicerol.....	256
7.7.3. Productos generados a partir de hidrólisis y posterior esterificación.....	258
7.7.3.1. Generación de monopalmitina	258
7.7.3.2. Generación de diglicéridos formados por ácido cáprico y ácido palmítico	259
7.7.3.3. Generación de dipalmitina	261
7.7.3.4. Formación de tricaprina	263
7.7.3.5. Generación de 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol	265
7.7.4. Productos generados a partir de la esterificación de dicaprina con ácido palmítico.....	268
7.7.4.1. Formación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3- palmitoil glicerol	268
7.7.4.2. Selectividad y rendimiento a CPC + CCP	270
7.7.5. Migración de acilos durante la reacción.....	274
7.7. Análisis multirespuesta a través de funciones de deseabilidad	275
7.8. Conclusiones	278
7.9. Referencias.....	280
8. CONCLUSIONES	285
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	289
LISTADO DE TABLAS	292
LISTADO DE FIGURAS	295

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Acilglicéridos

Los acilglicéridos, también conocidos como glicéridos, son ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos (AG). El glicerol tiene tres grupos hidroxilo, que pueden ser esterificados con uno, dos, o tres ácidos grasos para formar monoglicéridos (MAG), diglicéridos (DAG), y triglicéridos (TAG) respectivamente. Los aceites y grasas empleados en alimentación contienen principalmente triglicéridos, pero son degradados por las enzimas naturales (lipasas) en mono y diglicéridos y ácidos grasos libres.

Glicéridos parciales son ésteres de glicerol con ácidos grasos, en los que no están esterificados todos los grupos hidroxilo. Dado que algunos de sus hidroxilos se encuentran libres, estas moléculas tienen cierta polaridad. Los glicéridos parciales de ácidos grasos de cadena corta son más polares que los glicéridos de cadena larga, y tienen excelentes propiedades solventes para drogas difíciles de solubilizar, haciéndolos valiosos como excipientes en la industria farmacéutica [1].

La forma más común de acilglicerol son los triglicéridos, que tienen alto valor calórico y en general aportan el doble de energía por gramo que los hidratos de carbono [2].

En la Figura 1.1 se presenta la numeración estereoquímica de los carbonos de glicerol en un triglicérido. Según esta numeración, si se sitúa el acilo esterificado en el carbono

central hacia la izquierda, se considera como carbono sn-1 al que queda arriba utilizando la proyección de Fischer.

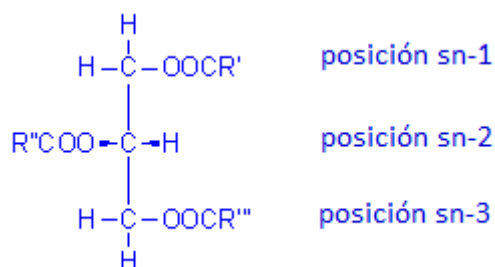


Figura 1.1. Estereoquímica de los carbonos del glicerol en un triglicérido.

1.1.1. Triglicéridos

Los triglicéridos, desde el punto de vista cuantitativo, son los componentes mayoritarios de los lípidos (93%-95% del total de lípidos ingeridos). Estos, junto con las proteínas y los carbohidratos, son macronutrientes necesarios en la nutrición humana y su consumo ronda los 100 g por día o más [3]. Los triglicéridos representan la principal fuente de energía, son fundamentales en la formación de estructuras celulares como las membranas, proveen de ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los eicosanoides y de otros derivados bioactivos, constituyen el vehículo de vitaminas liposolubles, y organolépticamente aportan la palatabilidad y el sabor de las comidas además de ser los componentes más importantes en la saciedad postprandial que producen los alimentos [4]. El manejo tecnológico de los lípidos y triglicéridos es más complejo que el de los otros macronutrientes, básicamente por la condición de insolubilidad o de escasa solubilidad en agua [4].

Un triglicérido es el producto de la esterificación del glicerol con tres ácidos grasos, los que pueden ser iguales o diferentes en sus características moleculares (tamaño de

cadena, grado de insaturación, isomería, entre otras). En los últimos años se ha generado un creciente interés por el desarrollo de nuevos triglicéridos [5]. Los mismos pueden clasificarse en varios tipos: AAA, ABA, AAB, ABC, siendo A, B y C diferentes ácidos grasos. Los grupos acilo en TAG alimentarios pueden variar en longitud de cadena de C2 a C24 y de ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados con hasta seis dobles enlaces [3].

Existe evidencia que demuestra que las propiedades nutricionales de los triglicéridos dependen no sólo de los ácidos grasos que los componen, sino también de la posición de estos en el esqueleto de glicerol [6].

1.1.1.1. Triglicéridos de longitud de cadena media y triglicéridos estructurados

Los triglicéridos de longitud de cadena larga (TCL), tales como los provenientes de aceites vegetales, grasas animales o aceites de pescado, son hidrolizados por varias enzimas en el intestino generando monoglicéridos y ácidos grasos libres. Los mismos son emulsionados por ácido biliar y posteriormente absorbidos [7-8]. Inicialmente, fueron empleados en nutrición parenteral triglicéridos de cadena larga provenientes de aceite de soja y cártamo. Sin embargo, el empleo de TCL puros está asociado con una lenta eliminación de los mismos del torrente sanguíneo y deterioros del sistema reticuloendotelial [9].

Los triglicéridos de cadena media (TCM) podrían hidrolizarse de manera casi completa para ser absorbidos predominantemente como ácidos grasos libres, y luego transportados al hígado donde se someten a oxidación [10-11]. En ausencia o

deficiencia de la lipasa pancreática, se ha indicado que una gran fracción de TCM pueden ser absorbidos como triglicéridos, mientras que los TCL no se absorben [10]. Por esta razón, los TCM han sido empleados en pacientes con malabsorción o cuidados infantiles debido a su rápida digestión y provisión de energía [12-13].

Dados los diferentes destinos metabólicos que presentan los ácidos grasos en función de su longitud de cadena, se ha comprobado una mejor absorción de los ácidos grasos de cadena media (AGCM) en comparación con los ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Por otro lado, estudios en humanos y animales han mostrado un incremento en el gasto de energía postprandial luego del consumo de TCM a corto plazo. El empleo de AGCM en nutrición animal a largo plazo permitió la reducción del peso corporal. Estas diferencias en el manejo metabólico de AGCM frente a AGCL sugieren un potencial uso de los TCM como agentes para la pérdida de peso [11]. Sin embargo, el consumo de TCM a largo plazo resulta en deficiencia de ácidos grasos de cadena larga, en especial ácidos grasos esenciales.

Diferentes alternativas han sido evaluadas en estudios de absorción, tales como mezclas físicas de TCM y TCL [14-15], triglicéridos interesterificados obteniendo TAG con estructura al azar [16-18] y triglicéridos con estructura específica [19-20]. Mezclas físicas de TCM y TCL no proporcionaron mejoras en la absorción de AGCL dado que cada uno de los triglicéridos individuales mantiene su nivel de absorción original. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena larga ubicados en posiciones primarias de los triglicéridos con estructura al azar son pobremente hidrolizados. Sin embargo, triglicéridos estructurados (TE) conteniendo AGCL en la posición sn-2 y AGCM en las

posiciones sn-1 y sn-3 han proporcionado beneficios metabólicos en comparación con las mezclas físicas [16-17] y los triglicéridos interesterificados [17]. En general, la denominación de TE hace referencia a triglicéridos cuya composición de ácidos grasos ha sido determinada por un proceso de laboratorio o industrial.

Los triglicéridos estructurados del tipo MLM (antes mencionados como ABA, siendo M un ácido graso de cadena media y L un ácido graso de cadena larga) han sido diseñados para mejorar la absorción de AGCL en pacientes con malabsorción. TE con estructura específica enriquecidos con ácido palmítico en posición sn-2 han sido empleados en fórmulas infantiles (por ejemplo, Betapol) para imitar la estructura de la leche humana [21]. Los TE también se han desarrollado con especial atención en la generación de grasas de bajas calorías o sustitutos de grasas debido a los crecientes problemas de obesidad y diabetes, ejemplos de estos productos son Olestra y Salatrim. Este último está compuesto por TE de estructura al azar obtenidos por interesterificación de aceites vegetales hidrogenados y triglicéridos conteniendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Aceites de cocina conteniendo DAG y TAG compuestos por AGCM y AGCL con estructura aleatoria se encuentran comercialmente disponibles en Japón y Estados Unidos. Se ha demostrado que aceites conteniendo alta proporción de diglicéridos y aceites compuestos por triglicéridos conteniendo AGCM y AGCL en la misma molécula pueden prevenir la acumulación de grasas [22-23]

1.1.2. Diglicéridos

Los diglicéridos (DAG) son componentes minoritarios de grasas y aceites comestibles [24]. Típicamente, el nivel de diglicéridos en aceites comestibles está por debajo del

5% [24-25]. Los DAG, generalmente en una mezcla con monoglicéridos, son empleados como aditivos alimentarios y se utilizan en gran medida como emulsionantes [26].

El método tradicional para producir diglicéridos es la interesterificación de TAG con glicerol en presencia de un catalizador inorgánico a elevada temperatura [27]. Los catalizadores alcalinos son los más ampliamente empleados, tales como hidróxido de sodio o potasio, metóxido de sodio y/o acetato de potasio.

1.1.2.1. 1,3-diglicéridos

Los diglicéridos pueden tener dos configuraciones, 1,3-diglicéridos (1,3-DAG) y 1,2(2,3)-diglicéridos (1,2(2,3)-DAG). En aceites naturales, 1,3-DAG constituyen aproximadamente el 70% del total de DAG. De igual manera, en aceites comerciales con alto contenido de diglicéridos, 1,3-DAG representan alrededor del 70% del total de diglicéridos como resultado del equilibrio durante el proceso de refinado y almacenamiento posterior al proceso de síntesis [28].

Los 1,3-DAG son intermediarios para la síntesis de varios compuestos con aplicaciones farmacéuticas [26,29]. Profármacos de diglicéridos se pueden obtener cuando la posición sn-2 se esterifica con un fármaco que lleva un grupo carboxílico, tal como el ácido niflúmico o ácido acetilsalicílico empleados como antiinflamatorios [30-31], por unión covalente con un alcohol, como el bupranolol utilizado como β -bloqueante [32], o por la unión a la posición sn-2 de fenitoína, que es un antiepiléptico de uso común [33], etc. Estas formas son absorbidas más fácilmente y tienen menores efectos secundarios que las drogas originales [26,29-30,32-33]. De manera similar, los

triglicéridos estructurados con un ácido poliinsaturado como el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) u otros, en posición sn-2 y AGCM en posiciones sn-1 y sn-3, pueden ser portadores de estos ácidos terapéutica y nutricionalmente valiosos [16].

Varios estudios sobre las propiedades nutricionales y los efectos del consumo de DAG [22,34-36] han revelado que los diglicéridos, de los cuales 1,3-DAG es un componente importante, comparados con los triglicéridos, tienen la capacidad de reducir las concentraciones de TAG en suero [34] y como resultado, disminuir tanto el peso corporal como la grasa visceral [22].

1.2. Propiedades buscadas en acilglicéridos

Las propiedades más significativas de los acilglicéridos dependen de su uso final. Estas son principalmente nutricionales o físicas, aunque algunas veces también pueden estudiarse propiedades químicas. Las propiedades nutricionales son importantes en triglicéridos y diglicéridos estructurados, alimentos funcionales, fórmulas infantiles, suplementos dietarios y en formulaciones orientadas al cuidado de la salud, así como también para el tratamiento de algunas enfermedades. Las propiedades físicas son importantes cuando se considera la dureza de los acilglicéridos, en especial en triglicéridos, en las características de grasas y aceites de cocina o fritura, y también son importantes cuando se consideran las aplicaciones cosméticas y/o lubricantes de los acilglicerolés.

1.2.1. Propiedades nutricionales

Los glicéridos son un componente importante de la alimentación, y hay una creciente concientización que la dieta en general y en particular los triglicéridos, son importantes en el mantenimiento de una buena salud y en la evolución y tratamiento de algunas enfermedades. La importancia nutricional de los triglicéridos y diglicéridos atrae mucho la atención, más cuando estas propiedades se revén cada año, e incluso en meses, debido al desarrollo de nuevos conocimientos en el área. Las propiedades de potencial interés incluyen:

- valores totales de energía, con interés en obtener acilglicéridos con reducido valor energético pero manteniendo las características de los aceites y grasas tradicionales
- la composición de ácidos grasos, teniendo en cuenta los niveles de ácidos grasos saturados, isómeros *cis* y *trans* de los ácidos, ácidos grasos esenciales y ácidos insaturados de cadena larga, recomendados en base a la actual hipótesis nutricional
- estructura de glicéridos, donde la bio-disponibilidad es un punto importante en este tema y la composición de ácidos grasos por si sola puede no ser suficiente para definir valores nutricionales.

El concepto de que toda grasa es mala y que la mejor dieta es aquella que no contiene grasas está siendo actualmente debatido [37].

1.2.2. Propiedades físicas

La importancia de las propiedades físicas está más comúnmente asociada con la cristalización, la forma de los cristales y el comportamiento de derretimiento. Por ejemplo, los aceites de frituras (y lubricantes) no deberían contener cristales y deberían estar libres de triglicéridos que puedan cristalizar o promover la cristalización [37]. La formación de espuma resulta también un punto crítico en aceites de fritura.

1.3. Lipasas.

Las lipasas, o triglicérido acilhidrolasas (EC 3.1.1.3), son enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos en medio acuoso. Las lipasas se encargan del metabolismo de los lípidos en los organismos vivos que las contienen, lo que justifica su amplia distribución en la naturaleza [38].

Las lipasas fueron identificadas a principios del siglo XX por el microbiólogo C. Eijkmann quien reportó que eran producidas por diferentes bacterias. Dicha presencia en bacterias y hongos, se convirtió en una de sus principales ventajas, ya que permite la producción de lipasas en cantidades industriales. Además, no requieren co-factores [39]. Si bien poseen una alta regioespecificidad y estereoselectividad, una de las características más exploradas de las lipasas es su “promiscuidad catalítica” referente a la posibilidad de actuar en diferentes reacciones químicas por cambios en las condiciones como: el solvente de reacción (acuoso-orgánico), la temperatura, el pH, la presencia de líquidos iónicos o sales inorgánicas, reacciones sin solvente, y con sustratos en fase gas o sólida [40]. Esto permite que las lipasas tengan un amplio espectro de aplicaciones en industrias como la de detergentes, fármacos, cosméticos,

alimentos, síntesis orgánica y de polímeros, tratamiento de cuero y eliminación de residuos, entre otras [41].

En cuanto a su estructura, los estudios de difracción de Rayos X (DRX) muestran que en general, las lipasas poseen un ensamblaje tipo α - β -hidrolasas con un núcleo de cadenas β -plegadas paralelas rodeadas de cadenas α -hélice. Su sitio activo está formado por una tríada catalítica consistente de los aminoácidos Serina (Ser), Histidina (His) y ácido Aspártico/Glutámico (Asp/Glu). Además, tiene cuatro “bolsillos de enlazamiento” (sitios de unión) de sustrato: un hueco oxaniónico para acomodar los TAG, y tres bolsillos para ubicar los ácidos grasos en posición sn-1, sn-2 y sn-3 [40]

La principal característica estructural de las lipasas es la existencia de una cadena de aminoácidos que cubre el sitio activo, llamada *LID* o tapa. La *LID* es una cadena de longitud variable para cada lipasa, y se postula que su movimiento da acceso al sitio en un fenómeno denominado *activación interfacial* [42-44].

1.3.1. Mecanismo de reacción

En 1884 Emil Fischer propuso que la enzima y sus sustratos funcionan como un sistema “llave-cerradura” refiriéndose al enlazamiento específico que da lugar al proceso catalítico enzimático. Actualmente el modelo de “acoplamiento inducido” define que el sustrato induce la orientación de los residuos en el sitio activo para que ocurra el proceso catalítico [45]. La Ecuación 1.1 representa el mecanismo de acción válido para un solo sustrato y un solo producto.



Donde E representa la enzima, S el sustrato, ES* el complejo enzima sustrato (estado de transición), P los productos y k_1 , k_2 y k_3 las constantes de formación/disociación de las especies químicas. Los enlaces temporales entre la enzima y el sustrato que forman el estado de transición facilitan el rompimiento de los enlaces del sustrato, de esta forma la energía de activación necesaria para la obtención del producto será menor (Figura 1.2) y la reacción procederá más rápidamente que cuando la enzima no se encuentra presente [46].

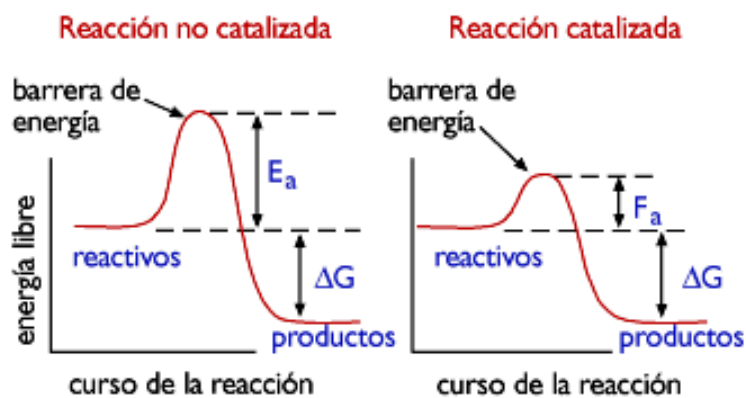


Figura 1.2. Representación de la energía de activación para una reacción con y sin enzima.

A pesar de la variedad de reacciones y sistemas en los que las lipasas han sido empleadas, el mecanismo de reacción conserva lineamientos generalizados que involucran el ataque nucleofílico de la Serina catalítica sobre el sustrato, la formación del complejo tetraédrico inestable que se hidroliza rápidamente para formar el intermediario acil-enzima, y finalmente la formación del producto y reordenamiento del sitio activo de la enzima. En la Figura 1.3 se muestra una representación del mecanismo de reacción de lipasas [47].

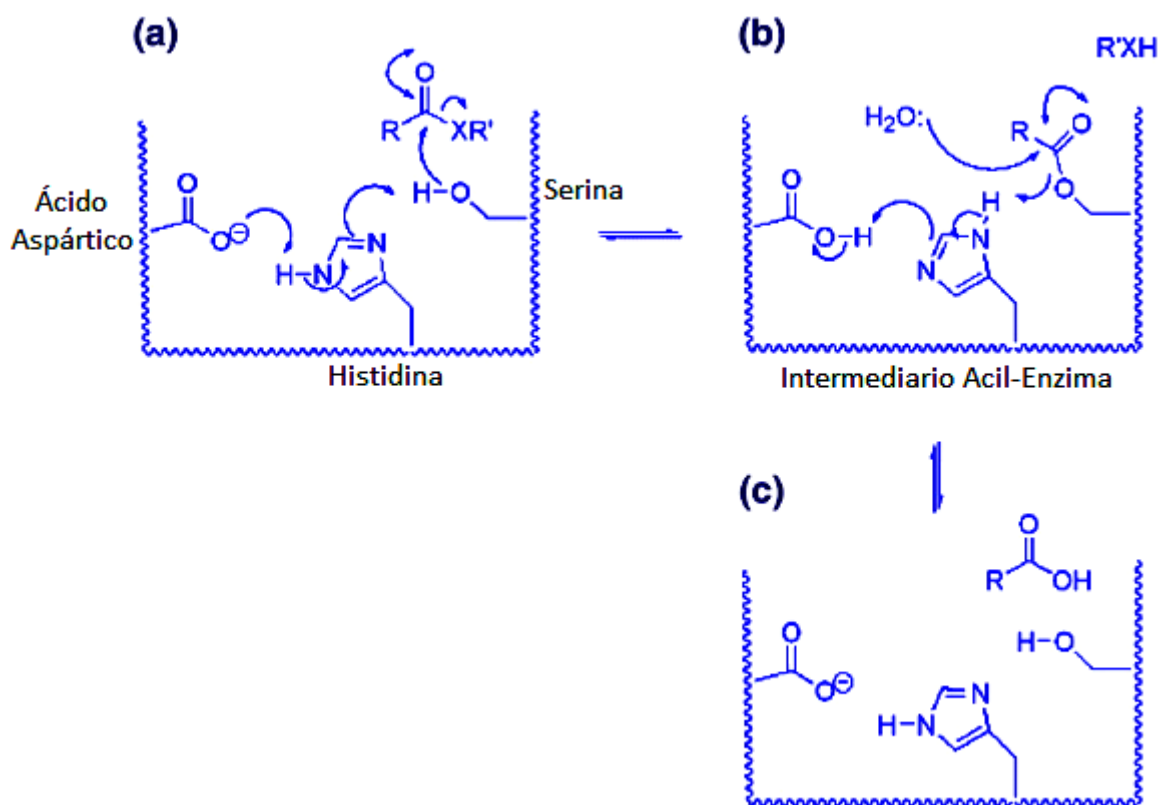


Figura 1.3. Representación del mecanismo de reacción de lipasas [47].

A continuación se detalla el mecanismo de reacción:

- La formación del complejo de transición en las lipasas implica re-
arreglamiento de la tríada catalítica para potenciar la nucleofilicidad del
residuo hidroxilo de la Serina catalítica. El oxígeno hidroxílico del ácido
Aspártico genera un enlace de hidrógeno con la Histidina. El nitrógeno de la
Histidina, puede por lo tanto desprotonar al residuo Serina, potenciado la
nucleofilicidad de su residuo hidroxilo. De esta forma el residuo hidroxilo de la
Serina podrá iniciar el proceso catalítico sobre el sustrato [47]. El residuo
hidroxilo de la Serina ataca nucleofílicamente al carbono carbonílico del
sustrato ($\text{R-CO-XR}'$), formando un intermediario tetraédrico.

- b) Dado que el intermediario tetraédrico es un hemiacetal inestable, se hidroliza rápidamente liberando $R'X-H$ (que puede ser un alcohol, éster o amina dependiendo de la naturaleza del sustrato) y formando el intermediario acil-enzima. Para completar la reacción, un segundo sustrato puede atacar nucleofílicamente al complejo acil-enzima (en el esquema se presenta una molécula de agua, aunque también puede ser un diglicérido, un alcohol o una amina).
- c) Este ataque nucleofílico permite la formación de un segundo intermediario tetraédrico inestable, que se hidroliza para liberar el producto final (en el caso particular del esquema, un ácido $R-CO-OH$), y regenerando el sitio activo de la enzima. Dependiendo del sustrato nucleófilo atacante, también se puede obtener un TAG, un éster, un ácido carboxílico o una amida.

Vale la pena resaltar que todo el mecanismo de reacción debe estar precedido por el movimiento de la LID que permite el acceso del sustrato al sitio activo y que facilita el enlazamiento de la lipasa a la interfase lipídica por el incremento en el área de la superficie hidrofóbica [44,48].

1.3.2. Especificidad de las lipasas

La especificidad es una de las propiedades más llamativas de las enzimas. La principal ventaja de las lipasas, la cual diferencia a las reacciones catalizadas por lipasas de las reacciones catalizadas químicamente, es la especificidad de las mismas.

La mayoría de las lipasas son selectivas hacia algún ácido graso o clases de ácidos, que poseen una longitud de cadena hidrocarbonada específica o un grado de insaturación dado. Este tipo de selectividad suele definirse como acilo-especificidad y ha sido explotada para producir triglicéridos estructurados y enriquecer lípidos con ácidos grasos específicos para mejorar sus características nutricionales [49]. Por ejemplo, la especificidad de algunas lipasas por ácidos grasos de cadena corta ha sido explotada para sintetizar TE de bajas calorías [50].

Ciertas lipasas muestran especificidad posicional (regioespecificidad) hacia los grupos acilos ubicados en una posición particular de la molécula de triglicérido. Las lipasas pueden ser clasificadas de acuerdo a su regio-selectividad como no regioespecíficas o sn-1,3 específicas hacia posiciones de los triglicéridos. Ejemplos de lipasas no específicas incluye a aquellas lipasas provenientes de *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium expansum* y *Pseudomonas cepacia* [51-53]. La hidrólisis de triglicéridos utilizando lipasas no específicas conduce a la completa descomposición de los mismos a glicerol y ácidos grasos libres. Diglicéridos y monoglicéridos son intermediarios, pero normalmente no se acumulan de manera importante durante la reacción, presumiblemente debido a que se hidrolizan más rápidamente que los triglicéridos. Como ejemplo de lipasas sn-1,3 específicas se pueden citar a las provenientes de *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus* y lipasa pancreática [51-53]. Estas enzimas cortan sólo los ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 del

esqueleto de glicerol. Así, con estas lipasas, la hidrólisis de triglicéridos permite generar ácidos grasos libres, 1,2 (2,3)-diglicéridos y 2-monoglicéridos.

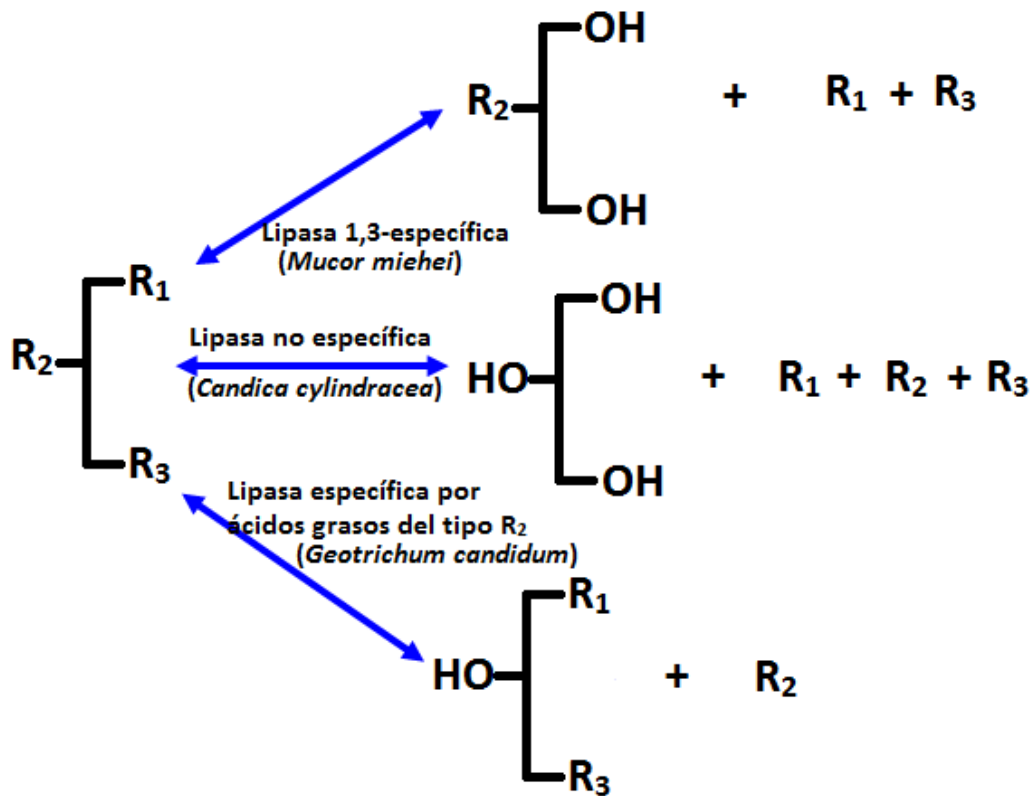


Figura 1.4. Especificidad de las lipasas en hidrólisis y esterificación (R₁, R₂ y R₃ = ácidos grasos/acilos) [53].

Las lipasas tienen la capacidad de distinguir entre sustratos enantiómeros. Esta forma de selectividad es denominada estereo-especificidad [54-55]. En la Figura 1.5 se presentan diglicéridos análogos que pueden ser reconocidos por una lipasa estereo-específica.

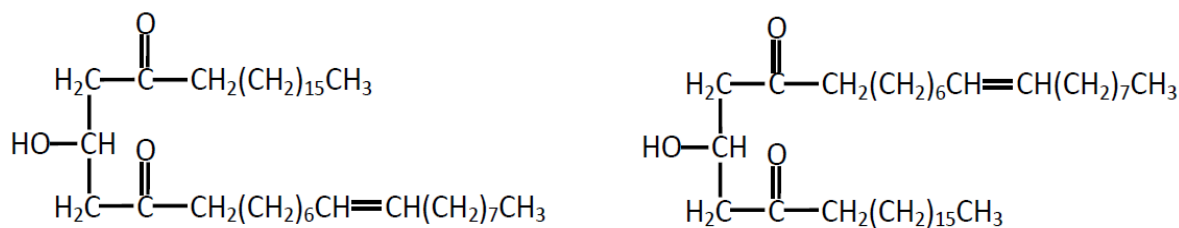


Figura 1.5. Diglicéridos enantiómeros, los cuales puede reconocer una lipasa estéreo-específica [54].

1.3.3. Aplicaciones de las lipasas

Reacciones catalizadas por estas enzimas fueron empleadas para la producción de triglicéridos utilizados para las formulaciones de grasa de confitería y aplicaciones nutricionales. En el área de las grasas de confitería, la interesterificación de aceite de girasol alto oleico con ácido esteárico usando la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* produce principalmente 1,3-diestearoil-2-oleoil-glicerol (StOSt) [51]. Otros reactivos fueron empleados para la producción de triglicéridos útiles como grasas de confitería. En particular, hay informes sobre la interesterificación enzimática de fracciones de aceite de palma con ácido esteárico o ésteres de estearato para producir grasas que contienen con altas concentraciones de StOSt y 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoilglicerol (POSt), que son los principales triglicéridos que componen la manteca de cacao [51]. Sustitutos de manteca de cacao fueron sintetizados usando lipasas 1,3-específicas a través de la acidólisis de aceite de palma con ácido mirístico [56] o por acidólisis de aceite de oliva con ácido palmítico [57].

Reacciones catalizadas por enzimas permitieron producir sustitutos de grasa de leche humana para su uso en fórmulas infantiles [58-60]. La acidólisis de tripalmitina con una mezcla de ácidos grasos insaturados utilizando una lipasa sn-1,3 específica como

biocatalizador permite obtener triglicéridos totalmente derivadas de aceites vegetales ricos en ácido palmítico esterificado en la posición sn-2 y con grupos acilo insaturados en las posiciones sn-1 y sn-3 [56]. Estos triglicéridos imitan estrechamente la distribución de ácido graso que se encuentra en la grasa de leche humana, y, cuando se utiliza en fórmulas infantiles en lugar de grasas convencionales, la presencia de palmitato en la posición sn-2 de los triglicéridos mejora la digestibilidad de la grasa y la absorción de otros nutrientes importantes tales como el calcio [21, 58].

Cuando lipasas no específicas fueron utilizadas como biocatalizadores para la interesterificación de mezclas de aceites, los TAG obtenidos son muy similares a los generados por interesterificación química [51]. Por lo tanto, la sustitución de interesterificación química mediante un proceso enzimático dando productos similares es técnicamente viable, aunque todavía no se ha adoptado a escala comercial, en gran parte debido a los costos relativamente altos del proceso asociados al biocatalizador [61].

También fue descrita la fabricación de grasas y aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) nutricionalmente importantes, tales como EPA y DHA. Por ejemplo, empleando reacciones enzimáticas, aceites vegetales han sido enriquecidos con EPA, mientras que a los aceites marinos (ricos en PUFA) se les ha incorporado AGCM en la estructura de los TAG [62,63]. El uso de esta técnica se ha empleado para producir TE estructurados con ácidos AGCM y PUFA situados inespecíficamente en cualquiera posición de los triglicéridos. Los procesos enzimáticos son particularmente adecuados para la producción y modificación de lípidos que contienen PUFA, ya que

estos ácidos grasos son susceptibles a daños en las condiciones más severas utilizadas para el procesamiento químico.

Cuando se utilizaron lipasas regioespecíficas para interesterificar mezclas de aceites, los productos formados fueron diferentes de los obtenidos por interesterificación química, y pueden presentar mejores propiedades funcionales. Por ejemplo, la interesterificación de aceite de soja y triestearina, utilizando el *Thermomyces lanuginosa* (lipasa 1,3-específica) como biocatalizador, permitió la obtención de margarinas con bajo contenido de ácidos grasos *trans* y buenas propiedades físicas [64].

La síntesis de 1,3-diglicéridos también fue realizada empleando lipasas específicas, ya que no se pueden obtener altos rendimientos de 1,3-DAG por métodos químicos directos dado que carecen de selectividad posicional. Son necesarias reacciones de múltiples pasos, y se utilizan grandes cantidades de solventes como medio de reacción y para la purificación de los productos [65,66]. La síntesis enzimática se ha llevado a cabo por diferentes métodos. Fue estudiada la esterificación directa de glicerol con ácidos grasos en sistemas libres de solvente [67], donde ciertos problemas como inhibición ácida o desactivación de la lipasa por el alcohol pueden ocurrir. También fue analizada la síntesis en dos etapas a partir de aceite de oliva, donde los tiempos de reacción son considerablemente elevados y la separación de los productos de reacción es compleja [68]. El empleo de solventes polares y sólidos para remover el agua generada durante la reacción de esterificación también se ha descrito [69],

obteniendo bajos rendimientos a 1,3-DAG y sin considerar problemas asociados al uso de adsorbentes.

1.3.4. Síntesis de triglicéridos estructurados empleando lipasas

Con el nombre de triglicéridos estructurados se hace referencia a menudo a una nueva generación de triglicéridos que pueden ser considerados como "nutracéuticos" [70]. Nutracéutico es un término usado para describir a los alimentos que proporcionan beneficios para la salud más allá de las atribuidas a sus efectos nutricionales [71]. Independientemente de la definición, los triglicéridos estructurados pueden ser diseñados para su uso como alimentos médicos o funcionales, así como nutracéuticos, dependiendo del tipo de aplicación.

Una forma de síntesis de triglicéridos estructurados puede ser por hidrólisis de una mezcla de triglicéridos seguido por la re-esterificación aleatoria del esqueleto de glicerol [72]. Típicamente, una variedad de ácidos grasos se utilizan en este proceso, incluyendo ácidos grasos saturados, monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados, en función del efecto metabólico deseado. Por lo tanto, una mezcla de ácidos grasos se incorpora en la misma molécula de glicerol. Estos triglicéridos son estructural y metabólicamente muy diferentes de las mezclas físicas simples de triglicéridos de cadena media y triglicéridos de cadena larga. Comenzando con un TCM y un TCL, seis posibles combinaciones de ácidos grasos podrían resultar en los triglicéridos estructurados (Figura 1.6).

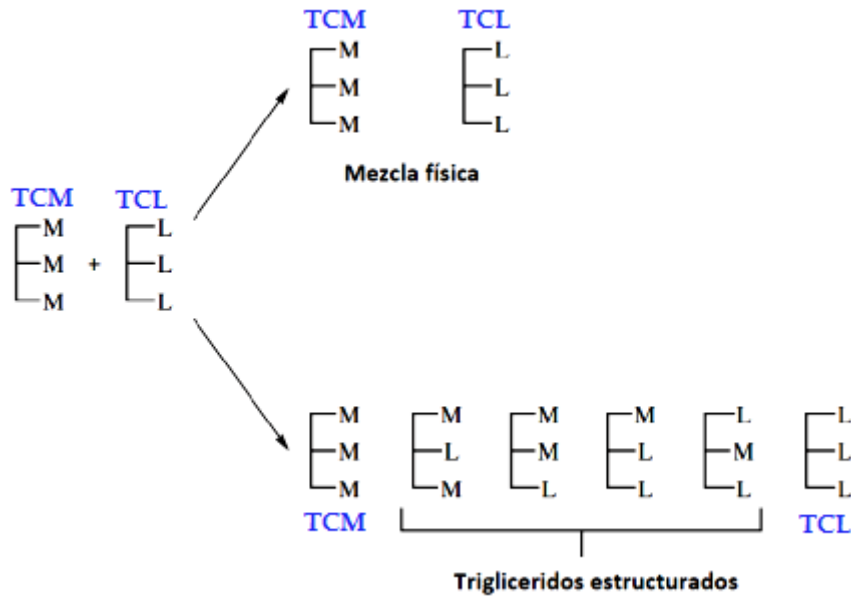


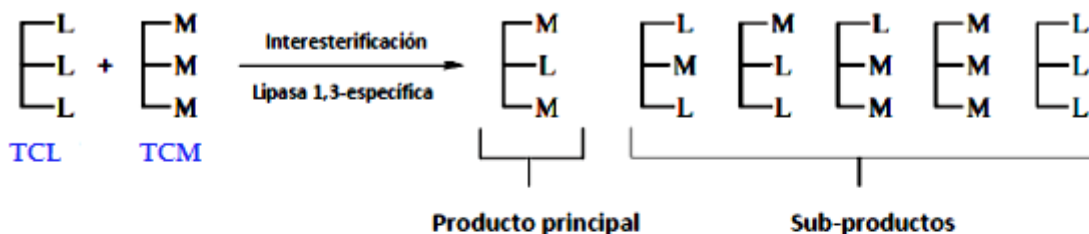
Figura 1.6. Mezcla física de triglicéridos y triglicéridos estructurados obtenidos por hidrólisis y posterior re-esterificación.

En base a su alta regioespecificidad, las lipasas son biocatalizadores eficaces para la fabricación de triglicéridos estructurados con composición y distribución de ácidos grasos en el esqueleto de glicerol predeterminadas. Los triglicéridos estructurados que se asemejan a los TAG de la leche humana han sido producidos por transesterificación de tripalmitina, con ácido oleico o PUFA con el uso de lipasas sn-1,3 específicas como biocatalizadores [58].

La interesterificación de un TCL con un TCM o con un ácido graso de cadena media mediante una lipasa sn-1,3 específica permite sintetizar triglicéridos que contienen acilos de cadena media en las posiciones sn-1,3 y ácidos grasos de cadena larga en la posición sn-2. Tales productos no se generan en la naturaleza y son difíciles de sintetizar por reacciones catalizadas químicamente. Dos métodos posibles para la

síntesis de estos triglicéridos estructurados se muestran en la Figura 1.7. Un punto clave para ambas estrategias es el empleo de lipasas sn-1,3 específicas.

a) Interesterificación de TCL con TCM



b) Acidólisis de TCL con AGCM

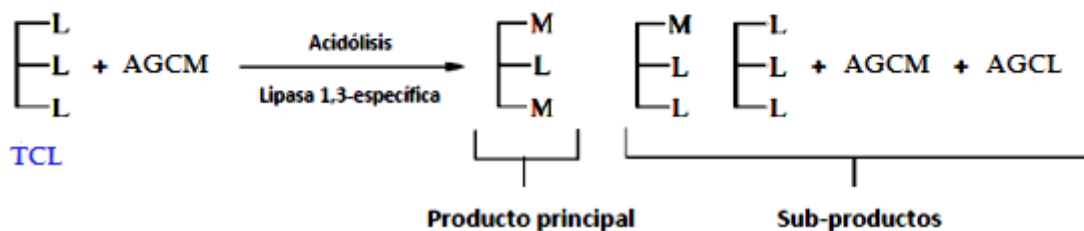


Figura 1.7. Síntesis enzimática de triglicéridos estructurados por reacciones de (a) interesterificación y (b) acidólisis [61].

1.4. OBJETIVOS

Los múltiples reportes sobre beneficios proporcionados por el consumo de 1,3-diglicéridos, triglicéridos de longitud de cadena media y triglicéridos estructurados, en particular TE del tipo MLM, dan cuenta del creciente interés en la síntesis de glicéridos con mejoradas propiedades nutricionales. Es por esta razón que en la presente tesis se plantean los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivo general: Desarrollar un método de síntesis enzimática en dos etapas de una mezcla de acilglicéridos con alto valor nutricional empleando como sustrato de partida glicerol.

Objetivos específicos:

- optimizar las condiciones de síntesis y purificación de 1,3-diglicéridos, en particular 1,3-dicaprina, a partir de la esterificación de glicerol con ácido cáprico en un medio orgánico,
- estudiar la reacción de migración de acilos durante la esterificación de glicerol,
- evaluar la actividad y selectividad de lipasas en la reacción de esterificación de la posición sn-2 de 1,3-dicaprina con ácido palmítico,
- analizar la migración de acilos durante la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 y la regio- y acilo-selectividad de la lipasa en esta reacción,
- estudiar las condiciones que favorecen la obtención de una mezcla de acilglicéridos de alto valor nutricional compuesta principalmente por 1,3-diglicéridos, triglicéridos de cadena media y triglicéridos estructurados con alta proporción de ácido palmítico en posición sn-2 y ácido cáprico en posiciones sn-1 y sn-3.

1.5. Referencias

[1] Fernandez, S., Jannin V., Rodier, J. D., Ritter, N., Mahler, B., Carrière, F. (2007). Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol®, medium chain glycerides and PEG esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771:633-640.

[2] Drummond, K. E., Brefere, L. M. (2001). *Nutrition for foodservice and culinary professionals*. 8th Ed., John Wiley & Sons.

[3] Mu H., Porsgaard, T. (2005). The metabolism of structured triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 44:430–448.

[4] Valenzuela, B. A., Sanhueza, C. J., Nieto K. S. (2002) El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista chilena de nutrición*, 29:106-115.

- [5] Marangoni, A. G., Rousseau D. (1995). Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends in food science & technology*, 6:329-335.
- [6] Hunter, J. E. (2000). Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 35:83–89.
- [7] Small, D.M. (1991) The Effects of Glyceride Structure on Absorption and Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 11:413–434.
- [8] Mattson, F.H., Volpenhein, R.A. (1964). The Digestion and Absorption of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry*, 239:2772–2777.
- [9] Seidner, D. L., Mascioli, E. A., Istfan, N. W., Porter, K. A., Selleck, K., Blackburn, G. L., Bistran, B. R. (1989). Effects of long-chain triglyceride emulsions on reticuloendothelial system function in humans. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 13:614-619.
- [10] Bach, A. C., Babayan, V. K. (1982). Medium-Chain Triglycerides: An Update. *American Journal of Clinical Nutrition*, 36:950–962.
- [11] Papamandjaris, A. A., MacDougall, D .E., Jones, P. J. H. (1998). Medium Chain Fatty Acid Metabolism and Energy Expenditure: Obesity Treatment Implications. *Life Sciences*, 62:1203–1215.
- [12] Babayan, V.K. (1987) Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids. *Lipids*, 22:417–420.
- [13] Mascioli, E. A., Bistran, B. R., Babayan, V. K., Blackburn, G. L. (1987). Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids as Unique Nonglucose Energy Sources in Hyperalimentation. *Lipids*, 22:421–423.
- [14] Jensen, G. L., McGarvey, N., Taraszewski, R., Wixson, S. K., Seidner, D. L., Pai, T., Yeh, Y. Y., Lee, T. W., DeMichele, S. J. (1994). Lymphatic Absorption of Enterally Fed Structured Triacylglycerol vs. Physical Mix in a Canine Model. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60:518–524.
- [15] Sakono, M., Takagi, H., Sonoki, H., Yoshida, H., Iwamoto, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. (1997). Absorption and Lymphatic Transport of Interesterified or Mixed Fats Rich in Saturated Fatty Acids and Their Effect on Tissue Lipids in Rats. *Nutrition Research*, 17:1131–1141.
- [16] Christensen, M. S., Høy, C. E., Becker, C. C., Redgrave, T. G. (1995). Intestinal Absorption and Lymphatic Transport of Eicosapentaenoic (EPA), Docosahexaenoic (DHA), and Decanoic Acids: Dependence on Intramolecular Triacylglycerol Structure. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61:56–61.

- [17] Christensen, M. S., Müllertz, A., Høy, C. E. (1995). Absorption of Triglycerides with Defined or Random Structure by Rats with Biliary and Pancreatic Diversion. *Lipids*, 30:521–526.
- [18] Kruimel J. W., Naber T. H., van der Vliet J. A., Carneheim C., Katan M. B., Jansen J. B. (2001). Parenteral Structured Triglyceride Emulsion Improves Nitrogen Balance and Is Cleared Faster from the Blood in Moderately Catabolic Patients. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 25:237–44.
- [19] Tso, P., Karlstad, M. D., Bistrain, B. R., DeMichele, S. J. (1995). Intestinal Digestion, Absorption, and Transport of Structured Triglycerides and Cholesterol in Rats. *American Journal of Physiology*, 268:G568–G577.
- [20] Hubbard, V. S., McKenna, M. C. (1987). Absorption of Safflower Oil and Structured Lipid Preparations in Patients with Cystic Fibrosis. *Lipids*, 22:424–428.
- [21] Lucas, A., Quinlan, P., Abrams, S., Ryan, S., Meah, S., Lucas, P. J. (1997). Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Archives of Disease in Childhood*, 77:F178–84.
- [22] Nagao, T., Watanabe, H., Goto, N., Onizawa, K., Taguchi, H., Matsuo, N. (2000). Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial. *Journal of Nutrition*, 130:792–797.
- [23] Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Negishi, S., Aoyama, T., Nakamura, M. (2003). Effect of dietary medium-and long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12:151–160.
- [24] D'Alonzo, R.P., Kozarek W.J., Wade R.L. (1982). Glyceride Composition of Processed Fats and Oils As Determined by Glass Capillary Gas Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59:292–295.
- [25] Abdel-Nabey, A. A., Shehata, A. A. Y., Ragab M. H., Rossell J. B. (1992). Glycerides of cottonseed oils from Egyptian and other varieties. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 69:443–447.
- [26] Berger, M., Schneider M.P. (1993). Regioisomerically Pure Mono and Diacylglycerols as Synthetic Building Blocks, *Fat Science Technology*, 95:169–175.
- [27] Sonntag, N. O. V. (1982). Glycerolysis of fats and methyl esters-status, review and critique. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59:795A–802A.
- [28] Watanabe, T., Shimizu, M., Sugiura M., Sato M., Kohori J., Yamada N., Nakanishi, K. (2003). Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1, 3-regiospecific lipase lipozyme RM IM. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80:1201-1207.

- [29] Haftendorn, R., Ulbrich-Hofmann, R. (1995). Synthesis of 2-Modified 1,3-Diacylglycerols, *Tetrahedron* 51:1177–1186.
- [30] El Kihel, L., Bourass, J., Richomme, P., Petit, J.Y., Letourneux, Y. (1996). Synthesis and Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of Niflumic Acid Lipophilic Prodrugs in Brain Edema. *Drug Research*, 46:1040–1044.
- [31] Kumar, R., Billimoria, J.D. (1978). Gastric ulceration and the concentration of salicylate in plasma in rats after administration of ¹⁴C-labelled aspirin and its synthetic triglyceride, 1,3-dipalmitoyl-2(2'-acetoxy-[¹⁴C]carboxylbenzoyl) glycerol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 30:754-758.
- [32] Mantelli, S., Speiser, P., Hauser, H. (1985). Phase Behavior of Diglyceride Prodrugs: Spontaneous Formation of Unilamellar Vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 37:329–343.
- [33] Scriba, G.K.E. (1993). Phenytoin-Lipid Conjugates as Potential Prodrugs of Phenytoin. *Archiv der Pharmazie*, 326:477–481.
- [34] Hara, K., Onizawa, K., Honda, H., Ide, T., Otsuji, K., Murata, M. (1993). Dietary Diacylglycerol-Dependent Reduction in Serum Triacylglycerol Concentration in Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 37:185–191.
- [35] Watanabe, H., Onizawa, K., Taguchi, H., Kobori, M., Chiba, H., Naito, S., Matuo, N., Yasukawa, T., Hattori, M., Shimasaki, H. (1997). Nutritional Characterization of Diacylglycerols in Rats. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 46:301–307.
- [36] Murata, M., Hara, K., Ide T. (1994). Alteration by Diacylglycerols of the Transport and Fatty Acid Composition of Lymph Chylomicrons in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58:1416–1419.
- [37] Gunstone, F. D. (2001). Why are structured lipids and new lipid sources required. *Structured and modified lipids*, 1-10.
- [38] Román, M. G. (2005). Tesis doctoral: Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes. Facultad de ciencias. Universidad de Granada. Granada, España.
- [39] Jaeger, K. E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 13:390-397.
- [40] Kapoor, M., Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47:555–569.
- [41] Gandhi, N. N. (1997). Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74:621-634.

- [42] Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P. M., Joerger, R., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. (1994). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *The Journal of Lipid Research*, 35:524-534.
- [43] Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S. A., Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351:491-494.
- [44] Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, 31:1532-1541.
- [45] Arroyo Sánchez, M. (1995). Tesis doctoral: Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad Complutense. Madrid, España.
- [46] Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- [47] Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148:237-250.
- [48] Brzozowski, A. M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A., Patkar, S. (2000). Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. *Biochemistry*, 39:15071-15082.
- [49] Rao, R., Divakar, S., Lokesh, B. R. (2009). Plackett-Burman design for determining the preference of *Rhizomucor miehei* lipase for FA in acidolysis reactions with coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:555-560.
- [50] Fomuso, F. B., Akoh, C. C. (1997) Enzymatic modification of triolein: incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74:269-272.
- [51] Macrae, A. R. (1983). Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60:291-294.
- [52] Villeneuve, P., Foglia, T.A. (1997). Lipase specificities : potential application in lipid bioconversions. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 8:640-650.
- [53] Mukherjee, K. D. (1990). Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, 3:211-293

- [54] Douchet, I., de Haas, G., Verger, R. (2003). Lipase Regio- and Stereoselectivities Toward Three Enantiomeric Pairs of Didecanoyl-deoxyamino-O methyl glycerol: A Kinetic Study by the Monomolecular Film Technique. *Chirality*, 15:220–226.
- [55] Rogalska, E., Ransac S., Verger, R. (1990). Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 265:20271-20276.
- [56] Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D., Macrae, A. (1984). Enzymic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 6:443-446.
- [57] Nielsen, T. (1985). Industrial application possibilities for lipase. *Anstrichmittel*, 87:15-19.
- [58] Quinlan, P., Moore, S. (1993). Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *Inform*, 4:580–585.
- [59] Christensen, T. C., Hølmer, G. (1993) Lipase catalyzed acyl-exchange reactions of butter oil. Synthesis of a human milk fat substitute for infant formulas. *Milchwissenschaft*, 48:543-548.
- [60] K. D. Mukherjee, in C. C. Akoh and D. B. Min, eds. (1998). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- [61] Senanayake, S. P. J., Shahidi, F. (2005). Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6:555-584.
- [62] Senanayake, S. P. J. N., Shahidi, F. (2002). Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, 77:115–123.
- [63] Senanayake, S. P. J. N., Shahidi, F. (2002). Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (*Phoca groenlandica*) blubber oil with capric acid. *Food Research International*, 35:745–752.
- [64] Costales-Rodríguez, R., Gibon, V., Verhé, R., De Greyt, W. (2009). Chemical and Enzymatic Interesterification of a Blend of Palm Stearin: Soybean Oil for Low trans-Margarine Formulation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86:681–697.
- [65] Ikeda, I., Gu X., Miyamoto, I., Okahara, M. (1989). Preparation of 1,3-Diacylglycerols and 1-Alkyl-3-acylglycerols in the Presence of Quaternary Ammonium Salt. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66: 822–824.
- [66] Benbouzid, M., Bhati A., Hamilton, J. R. (1988). Synthesis of Symmetrical Diacid Triacylglycerols from Glycerol-1,3-ditosylate. *Fat Science Technology*, 90:292–295.

- [67] Rosu, R., Yasui, M., Iwasaki, Y., Yamane, T. (1999). Enzymatic Synthesis of Symmetrical 1,3-Diacylglycerols by Direct Esterification of Glycerol in Solvent-Free System. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:839-843.
- [68] Blasi, F., Cossignani, L., Simonetti, M.S., Damiani P. (2007). Biocatalysed synthesis of sn-1,3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil. *Enzyme and Microbial Technology* 41:727–732.
- [69] Duan, Z-Q., Du, W., Liu, D-H. (2010). Novozym 435-catalyzed 1,3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. *Process Biochemistry* 45:1923–1927.
- [70] Kennedy JP. (1991). Structured lipids: fats of the future. *Food Technology*, 45:76-83.
- [71] Scott, F. W., Lee, N. S. (1996) Report of the Bureau of Nutritional Science Committee on Functional Foods, Food Directorate, Health Protection Branch, Ottawa, Canada.
- [72] Babayan, V. K. (1997). Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids*, 22:417-420.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

2.1.1. Enzimas

Lipozyme RM IM, la cual es una forma comercial de la lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada por adsorción en una resina macroporosa de intercambio aniónico, Duolite A-568, fue amablemente donada por Novo Nordisk A/S (Brasil). Novozym 435, que es una forma comercial de la lipasa B de *Candida antártica* inmovilizada sobre una resina acrílica fue una gentil donación de Novozyme (Bagsvaerd, Denmark, sucursal Brasil). Las lipasas de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Candida rugosa* comercialmente llamadas Lipase PS "Amano", Lipase AK "Amano" y Lipase AY "Amano" respectivamente fueron una generosa donación de Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japón).

2.1.2. Reactivos y Solventes

Glicerol, *n*-heptano y gel de sílice fueron suministrados por Cicarelli Laboratorios. Ácido cáprico, 1,2,4-butanotriol, tripalmitina y reactivos de sililación se obtuvieron de Fluka. Monocaprina, monooleina, dipalmitina, tricaprilina, tricaprina, trilaurina, timiristina y trioleina fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Etil decanoato y etil palmitato fueron provistos por SAFC. Etanol absoluto y éter etílico fueron suministrados por Dorwil. Fenolftaleína, hidróxido de potasio y piridina fueron comprados a Anedra S.A y quitosano fue provisto por Primex S.A. (Islandia). Todos los productos fueron de grado analítico.

2.2. Métodos

Dado el enfoque principalmente experimental de la presente tesis, y siendo un objetivo central la obtención de un producto o conjunto de productos, a continuación se detallan los métodos sobre los cuales se basaron las reacciones de síntesis y la cuantificación de los productos de reacción.

A modo de guía, el siguiente esquema muestra los temas más importantes que se presentarán desde el punto de vista de la metodología experimental, su diseño y empleo de herramientas analíticas.

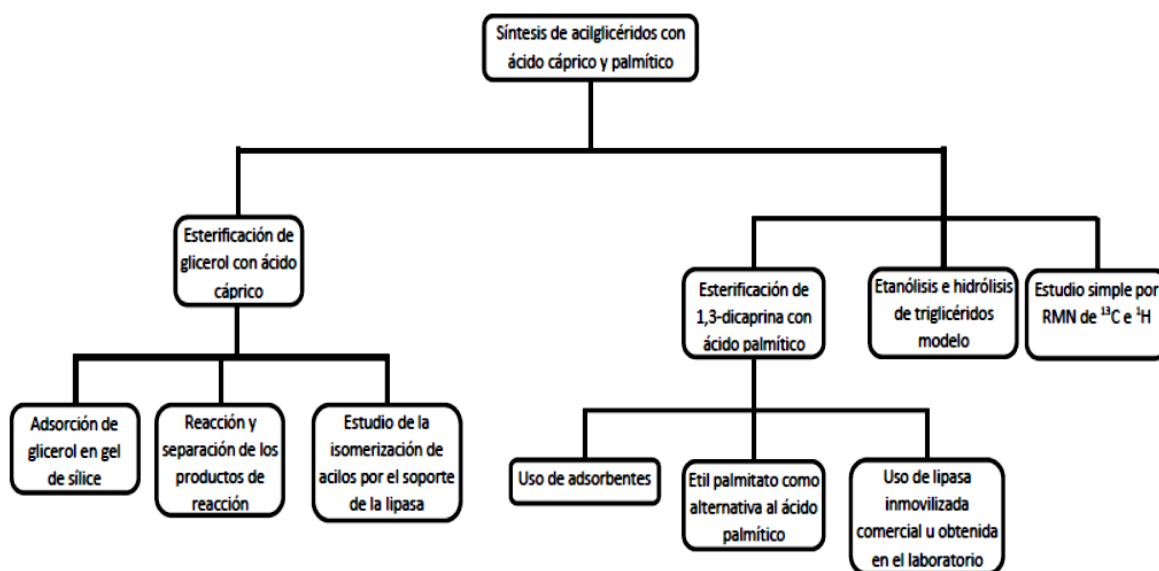


Figura 2.1. Esquema de los temas más importantes presentados en la metodología experimental.

2.2.1. Síntesis y purificación de 1,3-dicaproil glicerol

2.2.1.1. Adsorción de glicerol sobre gel de sílice

Polialcoholes altamente hidrófilos generan pérdida de la actividad enzimática. Esto puede deberse a dos factores: (1) en un medio de reacción hidrófobo, polioles se adhieren al soporte de la lipasa (y/o a la superficie expuesta de la lipasa) generando impedimentos para el acceso del ácido al sitio activo, o (2) los grupos hidroxilos del poliol interactúan fuertemente con el sitio activo de la enzima, directamente (o con su entorno directo). Por esta razón el gel de sílice se comporta como un "depósito del sustrato polar" y juega un papel protector para la enzima inmovilizada evitando su bloqueo (parcial o no) debido a glicerol.

El glicerol fue adsorbido de la siguiente manera: 1 g de glicerol y 2 g de gel de sílice fueron mecánicamente mezclados hasta lograr la completa adsorción en el sólido.



Figura 2.2. Adsorción de glicerol en gel de sílice. Derecha = gel de sílice, Izquierda = gel de sílice con glicerol adsorbido.

2.2.1.2. Esterificación de glicerol con ácido cáprico

La esterificación de glicerol se realizó en viales de 10 mL, los cuales fueron mantenidos en baños termostáticos con control de temperatura y agitación magnética. El tiempo de reacción fue de 6 horas. La reacción se llevó a cabo como sigue: 110 mg de ácido cáprico se disolvieron en 3 mL de *n*-heptano, luego se añadió la cantidad de glicerol, adsorbido sobre gel de sílice, fijado para cada reacción en estudio. Cuando la mezcla reactiva alcanzó la temperatura seleccionada, la reacción se inició con la adición de 50% de la cantidad total de enzima a estudiar (Tiempo 0). El 50% restante del biocatalizador se añadió a las 3 horas de reacción. Los valores de glicerol, dosis de lipasa inmovilizada y temperatura de reacción se establecieron de acuerdo al diseño experimental que se describirá en la Sección 2.2.1.3.

La adición de la lipasa inmovilizada en dos etapas permite minimizar la desactivación de la enzima y maximizar el rendimiento del producto deseado.



Figura 2.3. Equipo experimental. Baño termostático con controlador de temperatura y agitador magnético.

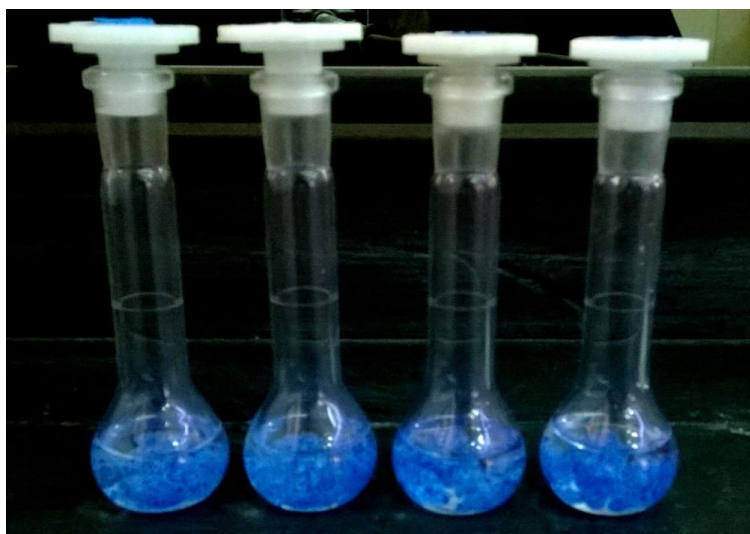


Figura 2.4. Viales de reacción conteniendo los reactivos en 3 mL de *n*-heptano.

2.2.1.3. Diseño factorial de cribado

Para estudiar la esterificación de glicerol con ácido cáprico se aplicó un diseño factorial de tres niveles y tres factores con dos puntos centrales y un total de 10 experimentos.

Las variables y sus niveles fueron: glicerol adsorbido sobre gel de sílice (**G** = 50-250

mg), temperatura de reacción (**T** = 40-60 °C) y carga de lipasa inmovilizada (**E** = 20-40 mg). Las respuestas estudiadas fueron la conversión de ácidos grasos (%), la actividad enzimática (µmol de ácido convertido/mg de lipasa inmovilizada), la producción de monocaprina, dicaprina y tricaprina (% molar respecto al total de productos), la selectividad y rendimiento a dicaprina (% en moles) y los porcentajes de formación de 1,2-dicaprina, 1,3-dicaprina y de 2,3-dicaprina (relativo al total de moles de dicaprina sintetizados). El diseño experimental y el análisis estadístico fueron realizados utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion en la versión XV.2. Los factores y niveles utilizados se presentan en la Tabla 2.1. El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado para proporcionar protección contra los efectos de variables ocultas.

Tabla 2.1. Factores experimentales para la esterificación de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM.

Numero de Corrida	Factores experimentales		
	G (mg)	T (°C)	E (mg)
1	50	40	20
2	150	50	30
3	250	40	20
4	250	40	40
5	250	60	40
6	150	50	30
7	250	60	20
8	50	60	20
9	50	60	40
10	50	40	40

2.2.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico completo se realizó utilizando el software STATGRAPHICS Centurion. Las respuestas se ajustaron por regresión múltiple, y se utilizaron los modelos generados para evaluar el efecto de los factores experimentales seleccionados. La bondad de ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2). El efecto estadísticamente significativo de las variables se probó mediante la prueba estadística ANOVA. Coeficientes no significativos fueron eliminados (valor- $p > 0.05$) y los modelos se perfeccionaron aplicando la prueba del valor-F. También se realizó un análisis multi-respuesta a través de funciones de deseabilidad.

2.2.1.5. Análisis de muestras

2.2.1.5.1. Evaluación de la adsorción de ácido cáprico sobre gel de sílice

Con el fin de evaluar la adsorción de ácido cáprico en gel de sílice, se realizó la siguiente experiencia: 110 mg de ácido cáprico, 100 mg de gel de sílice y 3 mL de *n*-heptano se colocaron en un vial de 10 mL. La mezcla se agitó durante 3 h a 40 °C. La fracción de ácidos grasos adsorbida se determinó mediante titulación con el método presentado en la Sección 2.2.1.5.3.

2.2.1.5.2. Desorción de ácido cáprico

Resultados preliminares indicaron que el ácido cáprico podría adsorberse sobre la superficie del gel de sílice. Con el fin de realizar la correcta la cuantificación del ácido graso, el medio de reacción se sometió a agitación intensa y posterior ultrasonido

durante 15 min. Un volumen de muestra (0.5 mL) se separó para analizar por cromatografía de gases (GC) siguiendo el protocolo presentado en la Sección 2.2.1.5.4. La muestra restante se diluyó con 20 mL de una solución 1:1 (v/v) de etanol absoluto:éter etílico. La mezcla se sometió a agitación magnética durante 40 min y a ultrasonido durante 20 min. La suspensión se filtró para eliminar gel de sílice y la enzima inmovilizada, y se procedió a la titulación de la solución recuperada siguiendo el método presentado en la Sección 2.2.1.5.3. Esta metodología permite desorber el 99.9% del ácido graso retenido en el gel de sílice.

2.2.1.5.3. Determinación de la conversión por titulación

La titulación de las muestras se realizó con una solución etanólica de hidróxido de potasio 0,03 M para determinar la cantidad de ácido sin reaccionar. Fenolftaleína se utilizó como indicador. El porcentaje de conversión de ácido se obtuvo con un error de ± 1 punto porcentual mediante la Ecuación 2.1.

$$X_C = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100\% \quad (2.1)$$

Donde C es ácido cáprico.

2.2.1.5.4. Análisis cromatográfico

Las muestras fueron diluidas con piridina y sililadas con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). El análisis de las muestras fue llevado a cabo en un cromatógrafo de gases PerkinElmer AutoSystem XL equipado con inyección on-column, detector por ionización de flama (FID) y una columna capilar para alta temperatura ZB-5HT Inferno (15 m \times 0.32 mm, con un ID de 0.10 μ m), usando H₂ como gas carrier. La

temperatura del detector fue mantenida a 380 °C. La temperatura inicial de la columna se mantuvo en 50 °C por un minuto, elevada a 180 °C a una velocidad de 15 °C/min, incrementada posteriormente a 230 °C a un ritmo de 7 °C/min y finalmente se llegó a 370 °C a 10 °C/min para mantenerse a esta temperatura por 5 min. Los resultados son la media de dos inyecciones con un error relativo promedio inferior al 2%. Los tiempos de elución de reactivos y productos fueron determinados con estándares de alta pureza.

2.2.1.6 Evaluación del rol de la lipasa en la migración de acilos

2.2.1.6.1. Desactivación de la lipasa

Cien miligramos de lipasa inmovilizada se colocaron en una estufa a 95 °C durante 30 min para desactivar completamente la lipasa de *Rhizomucor miehei*, siguiendo los resultados previos del grupo de catálisis enzimática [1]. Después de realizar la desactivación de la lipasa pudo ser evaluado el rol del soporte en la reacción de migración de acilos.

2.2.1.6.2. Isomerización de monooleína

La migración de acilo catalizada por el soporte Lipozyme RM IM se estudió con monooleína de pureza cromatográfica con un 79% sn-2 monooleína y el 21% sn-1 monooleína (probado por cromatografía). Se mezclaron 15 mg de monooleína, 2 mL de *n*-heptano y 40 mg del soporte obtenido con la lipasa desactivada, se adicionaron inicialmente 20 mg y 20 mg después de 3 h de reacción, como se realizó en la reacción

de esterificación. La reacción se llevó a cabo en viales de 10 mL con agitación magnética a 40 °C. Tiempo de reacción total fue de 6 h.

2.2.1.6.3. Isomerización en los productos de reacción de esterificación

Para llevar a cabo la reacción de esterificación se mezclaron 110 mg de ácido cáprico, 250 mg de glicerol adsorbidos en 500 mg de gel de sílice y 3 mL de *n*-heptano en un vial de 10 mL, posteriormente fue colocado en un baño termostático a 40 °C con agitación magnética (condiciones óptimas de reacción determinadas mediante el diseño experimental). El tiempo de reacción fue de 6 h y se inició la misma con la adición de 20 mg Lipozyme RM IM, y después de 3 h de reacción se adicionaron nuevamente 20 mg del biocatalizador. Alcanzado el tiempo preestablecido, el matraz se sometió a agitación intensa y a ultrasonido durante 15 min para desorber sustratos o productos, y el contenido se filtró para separar la sílice y la lipasa inmovilizada.

La solución obtenida fue empleada para estudiar la reacción de isomerización como sigue: todos los compuestos disueltos en *n*-heptano se colocaron nuevamente en un vial de 10 mL y el mismo fue colocado en un baño a 40 °C con agitación magnética. A tiempo inicial se añadieron 20 mg de la lipasa desactivada (soporte de Lipozyme RM IM), y 20 mg más del mismo material se adicionaron después de 3 h. La muestra recuperada contenía 53 mg de ácido cáprico, 11 mg monocaprina, 70 mg de dicaprina y 12 mg tricaprina.

2.2.1.7. Separación de aciglicéridos

2.2.1.7.1. Evaluación de solventes

Para estudiar la viabilidad de la separación de acilgliceroles fueron evaluados nueve solventes utilizando el programa Ecofac 1.0 (software de diseño molecular de solventes) basado en parámetros de interacción UNIFAC, diseñado por Cismondi y Brignole [2-4].

El log P es el logaritmo de la solubilidad de un compuesto no ionizado en octanol respecto a su solubilidad en agua no ionizada y se conoce como “coeficiente de reparto”. *n*-Heptano, cloroformo, dietil éter, *t*-butanol, propanol, ácido acético, acetona, etanol y metanol (ordenados en sus valores de log P) se evaluaron en un proceso de extracción líquido-líquido a 25 °C.

Siendo el glicerol polar y el ácido cáprico no polar, sus solubilidades en distintos solventes fueron muy diferentes. Esta etapa permitió explorar y determinar el mejor solvente para la reacción de esterificación de glicerol considerando principalmente la solubilidad de los compuestos presentes en el medio de reacción.

El modelo de contribución grupal UNIFAC (Universal Función Actividad Coeficiente) [5] y los correspondientes parámetros se utilizaron para el cálculo. Este enfoque a contribución grupal permite suponer que la mezcla no consiste en moléculas sino en limitados grupos funcionales de los cuales se conocen los parámetros de interacción [6].

El programa permitió la evaluación del desempeño de los solventes para la separación de dos componentes, uno de los cuales se extrae con el disolvente y el otro es el componente principal en la solución remanente.

Las mezclas propuestas para separar fueron:

- Extracción monocaprina con el solvente (de una mezcla que contiene dicaprina o tricaprina),
- Extracción de dicaprina con el solvente (de una mezcla que contiene monocaprina o tricaprina), y
- Extracción de tricaprina con el solvente (de una solución que contiene monocaprina y tricaprina).

Los parámetros que permitieron evaluar el desempeño de los disolventes utilizando Ecofac fueron la selectividad, el poder solvente y el coeficiente de distribución del soluto. La selectividad está definida por la Ecuación 2.2 como sigue:

$$\beta = \frac{\gamma_{B,S}^{\infty} MW_A}{\gamma_{A,S}^{\infty} MW_B} \quad (2.2)$$

El poder solvente es definido como muestra la Ecuación 2.3:

$$S_p = \frac{1}{\gamma_{A,S}^{\infty}} \frac{MW_A}{MW_B} \quad (2.3)$$

El coeficiente de distribución del soluto está definido por la Ecuación 2.4:

$$m = \frac{\gamma_{A,B}^{\infty} MW_B}{\gamma_{A,S}^{\infty} MW_S} \quad (2.4)$$

Donde:

MW_A es el peso molecular del compuesto A (a ser extraído con el solvente)

MW_B es el peso molecular del compuesto B (producto principal de la mezcla residual producto)

MW_S es el peso molecular del solvente

$\gamma_{A,S}^{\infty}$ es el coeficiente de distribución a dilución infinita del compuesto A en el solvente

$\gamma_{B,S}^{\infty}$ es el coeficiente de distribución a dilución infinita del compuesto B en el solvente

$\gamma_{A,B}^{\infty}$ es el coeficiente de distribución a dilución infinita del compuesto A en el compuesto B.

La pureza (P) fue calculada como sigue, empleando la Ecuación 2.5:

$$P = \frac{DAG}{(C+MAG+DAG+TAG)} \cdot 100 \quad (2.5)$$

Donde:

DAG son los moles de dicaprina obtenida en el producto final del proceso de separación

C + MAG + DAG + TAG son los moles totales de ácido cáprico (C), monocaprina (MAG), dicaprina (DAG) y tricaprina (TAG) presentes en el producto final de la separación.

El rendimiento fue definido usando la Ecuación 2.6

$$Y_{DAG} = \frac{DAG_f}{DAG_i} \cdot 100 \quad (2.6)$$

Donde:

Y_{DAG} es el rendimiento a dicaprina (recuperada) respecto a la cantidad inicial

DAG_i es la cantidad inicial de dicaprina

DAG_f es la cantidad recuperada de dicaprina.

2.2.1.7.2. Neutralización de ácido cáprico

La reacción de esterificación fue llevada a cabo en las condiciones óptimas encontradas mediante el diseño experimental presentado en la sección 2.2.1.3 (G =250 mg, T = 40 °C y E = 40 mg). Después de filtrar el contenido del matraz y obtener la muestra para el análisis cromatográfico, el ácido cáprico no consumido en la reacción se neutralizó. Fue tomado un volumen de muestra de la reacción de esterificación (3 mL) y se añadió igual volumen de una solución acuosa de KOH. Se estudiaron diferentes concentraciones de KOH (1, 0.5, 0.25, 0.1 y 0.05 M) para obtener una solución básica que permite la neutralización de la totalidad de ácido, pero minimizando la pérdida del compuesto de interés, en este caso, dicaprina.

Después de añadir el volumen apropiado de solución alcalina, la muestra fue sometida a agitación intensa y luego se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. La fase heptano se recuperó y 100 µL se retiraron para analizar por cromatografía de gases. El volumen restante de la muestra se utilizó para estudiar la separación de los acilglicéridos mediante extracción líquido-líquido con el protocolo presentado en la siguiente sección.

La etapa de neutralización se realizó por duplicado. El error promedio en la determinación del ácido remanente en la fase de heptano fue del 3.4%.

La cantidad de ácido cáprico que queda después de la etapa de neutralización en la fase orgánica es muy baja (y esta baja concentración aumenta el error relativo de la etapa de titulación).

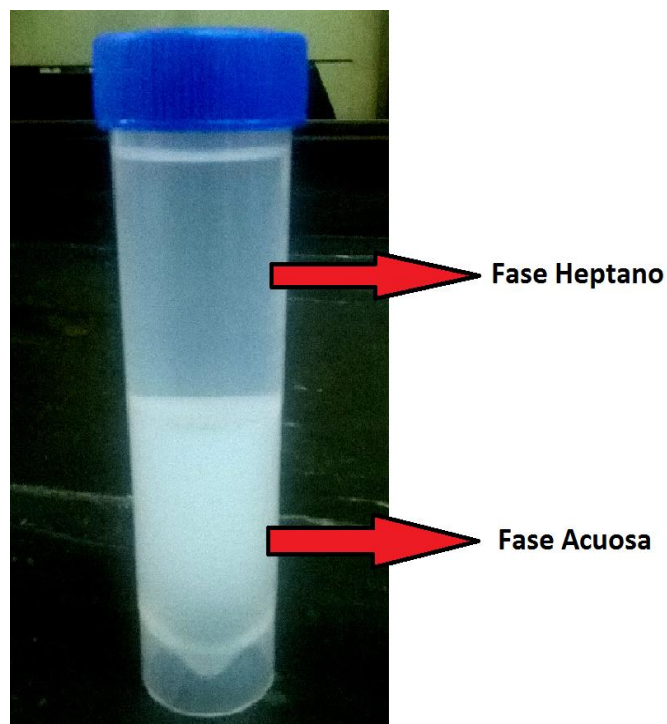


Figura 2.5. Neutralización del ácido cáprico no reaccionado.

2.2.1.7.3. Extracción líquido-líquido.

A la solución de *n*-heptano conteniendo los acilglicéridos, se añadió un volumen igual de una mezcla de etanol/agua (90/10 v/v). La pequeña proporción de agua permitió la separación de fases, que de otra forma no ocurriría. La muestra se sometió a agitación intensa permitiendo el contacto entre las fases y luego se centrifugó durante 20 min a 8000 rpm.

La fase de heptano fue recuperada y 200 μ L de la misma fueron tomados para analizar mediante cromatografía de gases. La fase hidroetanólica se mantuvo a -20 °C. Este

procedimiento con la fase heptano se llevó a cabo 3 veces como se muestra en la Figura 2.6.

A continuación, las tres fases hidroetanólicas recuperadas (Figura 2.6) se combinaron y se sometieron a una extracción con un volumen igual de *n*-heptano que permitió eliminar la fracción de tricaprina.

Por último, las dos fases heptano se combinaron y se sometieron a un nuevo proceso de extracción con una solución de etanol/agua como se muestra en la Figura 2.6.

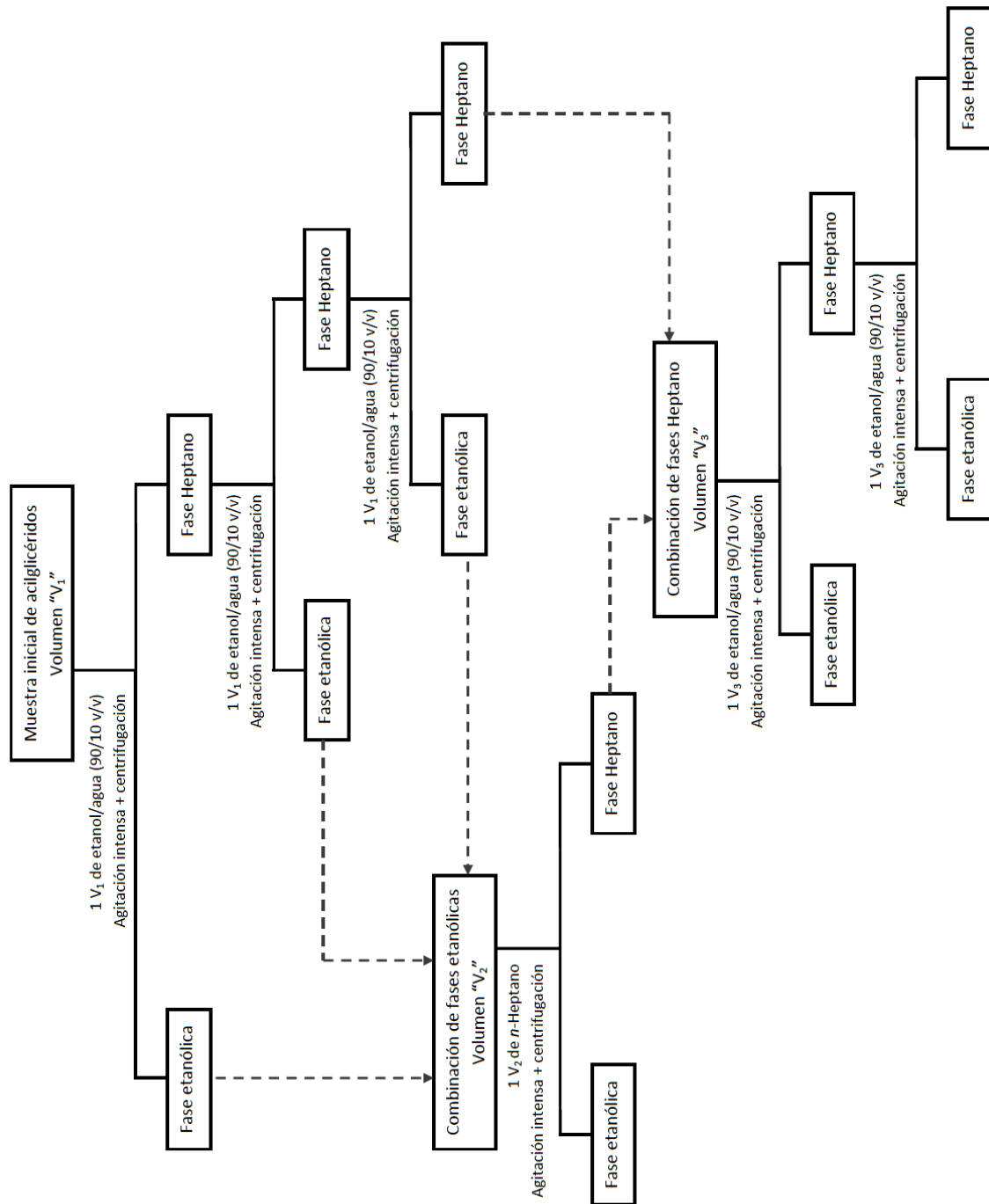


Figura 2.6. Etapas de separación que comprende el proceso de extracción líquido-líquido.

El proceso global separación se realizó por duplicado en condiciones similares. La diferencia de los valores finales en las repeticiones fue del 5.2%.

2.2.2. Evaluación de catalizadores para la síntesis de mezclas de glicéridos estructurados por esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico.

2.2.2.1. Empleo de lipasas comerciales en forma libre o inmovilizada

Fue evaluada la actividad, en la reacción de esterificación de la posición sn-2 de 1,3-dicaprina, de las lipasas de *Burkholderia cepacia* (**BCL**), *Pseudomonas fluorescens* (**PFL**) y *Candida rugosa* (**CRL**). Las mismas se encuentran comercialmente disponibles en forma no inmovilizada como Lipase PS "Amano", Lipase AK "Amano" y Lipase AY "Amano" respectivamente. Estas enzimas son presentadas en forma de polvo del cual el componente mayoritario es dextrina (entre 80 y 90%), que es usada como criopreservador durante el proceso de liofilización de las mismas [7]. También fueron ensayadas dos lipasas disponibles en forma inmovilizada, Lipozyme RM IM (**RML**) y Novozym 435 (**CALB**), que son formas comerciales de las lipasa de *Rhizomucor miehei* y de la lipasa B de *Candida antártica* respectivamente.

La esterificación de 1,3-dicaprina se realizó en viales de 10 mL, los cuales fueron mantenidos en baños termostáticos con control de temperatura y agitación magnética. El tiempo de reacción fue de entre 6 y 24 horas. La reacción se llevó a cabo como sigue: 40 mg de dicaprina (mayoritariamente 1,3-dicaprina) y 56 mg de ácido palmítico se disolvieron en 2 mL de *n*-heptano. La temperatura de reacción para todos los ensayos fue fijada en 45 °C. Cuando la mezcla reactiva alcanzó la temperatura seleccionada, la reacción se inició con la adición de 10 mg (50%) de la enzima a estudiar (Tiempo 0). El 50% restante del biocatalizador se añadió a las 3 horas de

reacción. La adición de la lipasa inmovilizada en dos etapas permitiría minimizar la desactivación de la enzima y maximizar el rendimiento del producto deseado.

2.2.2.2. Análisis de metodologías para la remoción de agua en el medio de reacción

Fue estudiado el efecto, sobre la conversión de diglicérido y la selectividad al producto deseado, del empleo de metodologías convencionales para la remoción de agua. A las reacciones llevadas a cabo bajo las condiciones detalladas en la sección anterior se les adicionó algún adsorbente al inicio de la reacción. Se analizó cómo el agregado de gel de sílice, tamiz molecular 13X y tamiz molecular 5A afectó a la síntesis de mezclas de acilglicéridos con alto valor nutricional. Se fijó una masa de adsorbente capaz de remover el doble del volumen de agua que se generaría si se produce 100% de conversión del diglicérido (10 mg de gel de sílice, 15 mg de tamiz molecular 13X y 15 mg de tamiz molecular 5A).

2.2.2.3. Transesterificación de dicaprina con palmitato de etilo

La reacción de transesterificación se llevó a cabo como sigue: 30 mg de dicaprina y 56 mg de etil palmitato fueron disueltos en 2 mL de *n*-heptano. La temperatura de reacción fue fijada en 45 °C. Cuando la mezcla reactiva alcanzó esta temperatura, la reacción se inició con la adición de 10 mg (50%) de BCL (Tiempo 0). El 50% restante del biocatalizador se añadió a las 3 horas de reacción. A tiempo inicial también se adicionaron 10 mg de tamiz molecular 13X.

2.2.2.4. Remoción del agua contenida en la lipasa PS “Amano”

La lipasa comercial PS “Amano” se comercializó hasta 2006 en forma de polvo del cual la mayor proporción (alrededor del 90%) era tierra de diatomeas, a partir de ese año la lipasa de *Burkholderia cepacia* comenzó a ser provista en forma sólida, mezclada con dextrina [7]. Según los datos hallados en la literatura el contenido de proteína en el polvo comercial denominado Lipase PS “Amano” ronda el 10% en peso [8].

La lipasa se trató por 15 horas a 30 °C y vacío con el objetivo de eliminar el agua contenida en el polvo comercial.

2.2.2.5. Inmovilización de lipasas

BCL fue inmovilizada por adsorción física sobre polipropileno comercial (en forma de pellets) y sobre montomorillonita como se detalla a continuación: 500 mg del polvo comercial se dispersaron en 50 mL agua bidestilada de pH 6.5. Luego de agitar con espátula se centrifugó hasta limpidez. Se separó el sobrenadante y se puso en contacto con 1 g del sólido a evaluar como soporte. Esta mezcla se mantuvo por 1 hora con agitación a 400 rpm y 30 °C. Luego se filtró para retirar el sólido y el mismo se secó por 15 horas a 30 °C.

La reacción de esterificación de dicaprina se llevó a cabo en iguales condiciones a las presentadas en la Sección 2.2.2.1 pero empleando 100 mg de biocatalizador (50 mg a Tiempo 0 y 50 mg a las 3 horas de reacción)

2.2.2.6. Identificación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol por cromatografía gaseosa

Los isómeros 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol (CPC) y 1,2-dicaproil-3-palmitoil (CCP) fueron sintetizados por dos vías diferentes

- CPC se sintetizó a partir de 2-monopalmitina (GPG) esterificándola posteriormente con ácido cáprico (C). Para ello se obtuvo el monoglicérido a partir de la etanolisis controlada (para minimizar migración de acilos) de tripalmitina (PPP) catalizada por Novozym 435. Finalizada la reacción el catalizador se separa y el etanol es evaporado rápidamente aplicando vacío. Al producto de reacción se le adicionaron 2 mL de *n*-heptano y 100 mg de ácido cáprico. La reacción de esterificación fue catalizada por 10 mg de Lipozyme RM IM, el tiempo de reacción fue de 15 minutos y la temperatura se fijó en 45 °C.
- CCP se sintetizó a partir de 1,2-dicaprina (CCG) esterificándola con ácido palmítico (P). Para ello se obtuvo CCG mediante la etanolisis de CCC catalizada por Novozym 435, finalizada la misma el catalizador fue separado del medio de reacción y el etanol evaporado rápidamente aplicando vacío. Al producto resultante se le adicionaron 2 mL de *n*-heptano y 100 mg de ácido palmítico. La reacción de esterificación fue catalizada por 10 mg de Lipozyme RM IM, el tiempo de reacción fue de 15 minutos y la temperatura 45 °C.

2.2.2.7. Hidrólisis de glicéridos catalizada por la lipasa de páncreas porcino

Finalizada la reacción de esterificación realizada tal como se describe en la Sección 2.2.2.1, los ácidos grasos libres fueron neutralizados con una solución acuosa de KOH 0.1 M. A los 2 mL de *n*-heptano conteniendo el producto de reacción se le adicionaron 2 mL de solución alcalina, se agitó intensamente y luego se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min. La fase orgánica se recuperó y una segunda etapa de neutralización fue realizada. Una vez eliminados los ácidos grasos libres el solvente fue evaporado.

A la mezcla de glicéridos obtenida se le agregaron 1.9 mL de buffer pH 8.0 y 0.1 mL de solución acuosa de CaCl₂ al 22% en peso. La reacción de hidrólisis fue llevada a cabo a 30 °C, por 30 min y con agitación magnética a 400 rpm, la misma se inició con la adición de 20 mg de lipasa de páncreas porcino (PPL). El producto de la hidrólisis fue analizado mediante cromatografía gaseosa empleando la metodología descrita en la Sección 2.2.1.5.4.

2.2.2.8. Etanólisis de glicéridos catalizada por Novozym 435

Tal como se describió en la Sección 2.2.2.7, los ácidos grasos libres fueron neutralizados y el solvente evaporado.

A la mezcla de glicéridos obtenida se le adicionaron 2 mL de etanol absoluto. La reacción de etanólisis fue llevada a cabo a 30 °C, por 90 min y con agitación magnética a 400 rpm, la misma se inició con la adición de 20 mg de Novozym 435. El producto de la etanólisis fue analizado mediante cromatografía gaseosa siguiendo la metodología antes descrita.

2.2.2.9. Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la herramienta analítica que proporciona información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química y en algunas de la Biología. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .

La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado. Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN

detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

2.2.2.9.1. Apantallamiento, desplazamiento químico y multiplicidad

En cualquier molécula, la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o *apantallado*. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo. Por lo general, los efectos de protección, o apantallamiento, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos.

En la práctica es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe, con suficiente exactitud para distinguir protones individuales, ya que las absorciones sólo varían en unas pocas milésimas. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra. La diferencia en la intensidad del campo

magnético necesario para la resonancia de los protones de la muestra y de la referencia se puede medir, ahora sí, con mucha exactitud. De esta forma, el desplazamiento químico está expresado por la Ecuación 2.7:

$$\text{Desplazamiento químico (ppm)} = \frac{\nu_{\text{muestra}} - \nu_{\text{referencia}}}{\nu_{\text{referencia}}} \cdot 10^6 \quad (2.7)$$

El compuesto de referencia más común en resonancia magnética nuclear es el tetrametilsilano ((CH₃)₄Si). Un desplazamiento de frecuencia típico podría ser de 100 Hz, en comparación con una frecuencia RMN fundamental de 100 MHz, por lo que el desplazamiento químico se expresa generalmente en partes por millón (ppm).

Como ya se indicado anteriormente un protón en un espectro de resonancia magnética nuclear está sujeto tanto al campo magnético externo como al campo inducido por los electrones que lo rodean. Pero, además, si en su entorno hay otros protones, sus campos magnéticos, aunque sean pequeños afectan a la frecuencia de absorción del protón que se está observando. El desdoblamiento de señales en multipletes, denominado desdoblamiento de espín, se origina cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de protones interaccionan (en general protones ubicados 2 o 3 enlaces de distancia). Cuando esta interacción ocurre se dice que los protones están acoplados magnéticamente.

2.2.2.9.2. Efecto nuclear Overhauser.

El NOE (del inglés Nuclear Overhauser Effect) es un efecto basado en acoplamientos dipolares, que son los que se producen a través del espacio, y a diferencia de los escalares no suelen provocar acoplamientos, estos solo se dan cuando la distancia entre los núcleos es inferior a la suma de radios de Van der Waals. El efecto NOE se describe como la variación de la intensidad que experimenta la señal de un núcleo X al irradiar un núcleo A con el que X se encuentra en acoplamiento dipolar (independientemente de que estuvieran o no en acoplamiento escalar). El efecto NOE no es instantáneo, de forma que si el tiempo de irradiación es corto, no aparecerá este efecto en los espectros de desacoplamiento.

2.2.2.9.3. Análisis de muestras

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance III equipado con una sonda multinuclear de 5 mm con sintonización automática a 30 °C para muestras disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los espectros fueron referenciados a la señal del solvente (7.26 ppm para ^1H y 77.16 ppm para ^{13}C). Se disolvieron 20-40 mg de muestra en 0.5 mL de CDCl_3 para realizar los análisis de ^{13}C . Los espectros de RMN de ^{13}C fueron registrados a 70 MHz y con desacoplamiento de pulso compuesto (la secuencia de desacoplamiento de pulso compuesto usada para espectros de ^{13}C incluye desacoplamiento de protones y comúnmente se llama Waltz-16) y condiciones estándares.

El programa de pulsos zgig fue usado para suprimir los efectos *Overhauser* nucleares mediante la inversa de la recolección del desacoplamiento de protones. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: ancho espectral de 2008 Hz (16 ppm) centrado sobre la región del carbonilo a 171 ppm; 16384 puntos de datos del FID, reales e imaginarios, colectados durante 6.8 s de adquisición de datos del FID, seguido por un tiempo de retardo de 25 s de recuperación para asegurar un tiempo de repetición de pulso 5 veces mayor al tiempo de relajación longitudinal T1 más largo esperado. Se recogieron un total de 1536 exploraciones, lo que requirió un tiempo aproximado de 14 h por espectro.

La preparación de muestras y recolección de los espectros de ^1H y ^{13}C fue realizada en el INQUISUR-Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur con la colaboración del Dr. Raul Garay.

2.2.3. Migración de acilos en etanólisis de triglicéridos

2.2.3.1. Reacción de etanólisis enzimáticamente catalizada

La reacción de etanólisis se realizó en viales de 10 mL, los cuales se mantuvieron en un baño termostático a 60 °C y agitación magnética. La reacción se llevó a cabo como sigue: 100 mg de triglicéridos se mezclaron con 2 mL de etanol absoluto. Cuando la mezcla reaccionante alcanzó la temperatura seleccionada, la reacción se inició mediante la adición de la cantidad de enzima a ser estudiada en cada prueba.

Los valores de tiempo de reacción, la longitud de cadena del ácido graso del triglicérido con y sin insaturación, y la carga de lipasa inmovilizada (Novozym 435) se establecieron de acuerdo con los diseños experimentales explicados en la sección 2.2.3.2.

2.2.3.2. Diseño Box-Behnken

2.2.3.2.1. Diseño experimental 1 (DE1)

En este estudio se aplicó un diseño a tres niveles incluyendo un subconjunto de corridas de un diseño factorial completo a tres niveles con un total de 15 experimentos. Las variables fueron tiempo de reacción, carga de lipasa inmovilizada y longitud de cadena del ácido graso que compone el triglicérido. Los niveles estudiados para estas variables se presentan en la Tabla 2.2. Las respuestas estudiadas fueron la conversión del triglicérido (X_{TAG}) y las fracciones molares de 1,2-diglicérido (1,2-DAG), 1,3-diglicérido (1,3-DAG), 2-monoglicérido (2-MAG), 1-monoglicérido (1-MAG), étil éster de ácido graso (FAEE) y glicerol (GGG). El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado para proporcionar protección contra los efectos de las variables ocultas.

Tabla 2.2. Valores de las variables usadas en ED1.

Variables Independientes	Símbolos	Niveles de las variables		
		-1	0	+1
Cantidad de lipasa inmovilizada (mg)	L	5	12.5	20
Tiempo de reacción (min)	T	30	60	90
Longitud de cadena de los triglicéridos saturados*	C	C	M	L

* C= Corto (Triacetina), M= Medio (Tricaprilina), L= Largo (Tripalmitina)

2.2.3.2.2. Diseño experimental 2 (DE2)

Este diseño es similar al DE1, pero en este caso se cambió el triglicérido de cadena larga (por trioleína) para estudiar el efecto de la insaturación en la reacción de interés.

Las variables y sus niveles se presentan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Valores de las variables usadas en ED2.

Variables Independientes	Símbolos	Niveles de las variables		
		-1	0	+1
Cantidad de lipasa inmovilizada (mg)	L	5	12.5	20
Tiempo de reacción (min)	T	30	60	90
Longitud de cadena del triglicérido*	C	C	M	L

* C= Corta (Triacetina), M= Media (Tricaprilina), L= Larga (Trioleína)

2.2.3.3. Método y enfoque teórico

Se utilizó el programa de Mecánica Molecular v.2 (MM2) tal como se encuentra implementado en Chem3D Ultra 5.0 (Cambridge Soft) para obtener los mínimos estérico conformacionales para cada configuración inicial explorada. Para una mejor visualización, se utilizó el programa ChemBioOffice 2008. La configuración incluye la estructura CALB, con los bolsillos de ácidos grasos y alcohol en base a lo presentado por Gudiño y colaboradores [9]. Además, se modelaron las estructuras completas de tripalmitina, tricaprilinea, triacetina y trioleína. Tres conformaciones diferentes para cada triglicérido fueron obtenidas: en la entrada del sitio activo de CALB (en la superficie de la enzima), en el "medio" del camino hacia la Serina catalítica (cerca de las paredes de la tríada catalítica), y cerca del grupo Serina de CALB. Después de la etapa de minimización, para los triglicéridos se realizó un cálculo PM3 (modelo

parametrizado 3) para obtener la entalpía de formación (ΔH_f°) para cada mínimo conformacional. Este enfoque fue seleccionado para analizar los cambios estructurales que sufren triglicéridos debido a la interacción con la lipasa en diferentes puntos del recorrido hacia la tríada catalítica.

Los ΔH_f° reportado para los triglicéridos se obtuvieron como sigue:

$$\Delta H_f^\circ = \Delta H_{\text{conformacional de TAG}}^\circ$$

2.2.4. Síntesis de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol

2.2.4.1. Inmovilización de la lipasa de *Burkholderia cepacia* sobre quitosano

La lipasa de *Burkholderia cepacia* (BCL) fue inmovilizada por adsorción física sobre quitosano como se describe a continuación: 500 mg del polvo comercial se dispersaron en 50 mL agua bidestilada de pH 6.5. Luego de agitar con espátula se centrifugó hasta limpidez. Se separó el sobrenadante y en un vaso de precipitados se puso en contacto con 1 g del quitosano. La inmovilización se llevó a cabo durante 1 hora, con agitación a 400 rpm y a 35 °C. Luego la mezcla se filtró para retirar el sólido y el mismo secó por 15 horas a 30 °C. Posteriormente el biocatalizador obtenido se mantuvo en estufa a 45 °C por 24 horas para eliminar el agua adsorbida en el soporte.

Durante el procedimiento descrito se tomaron muestras de la solución inicial y del sobrenadante al finalizar la inmovilización con el objetivo de determinar el porcentaje de lipasa adsorbida en función del contenido de azufre como se detalla en la Sección

2.2.4.2.

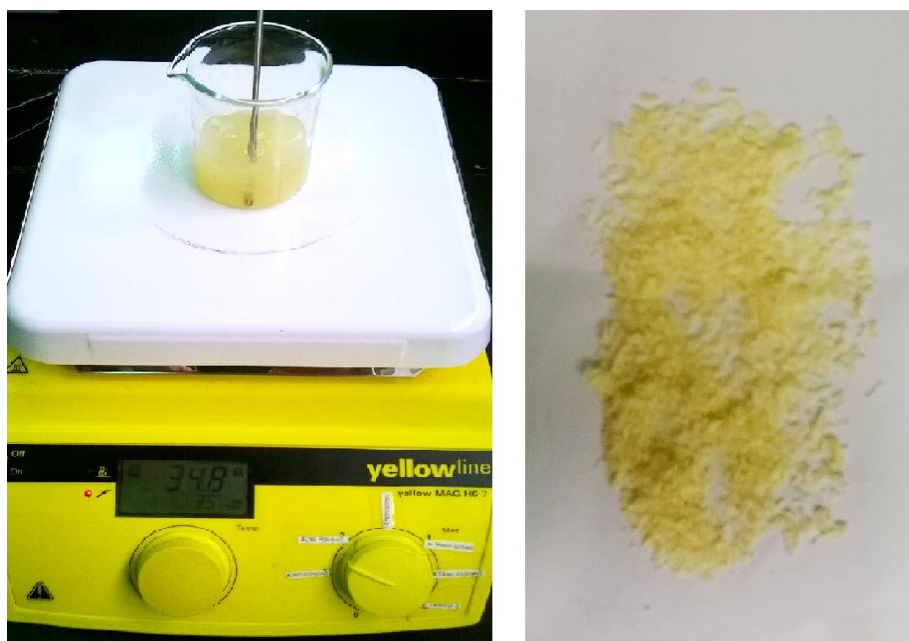


Figura 2.7. Inmovilización de lipasa de *Burkholderia cepacia*. Izquierda = inmovilización, derecha = catalizador obtenido.

2.2.4.1.1. Evaluación de la desorción de lipasa en *n*-heptano

Se colocaron 100 mg de la lipasa inmovilizada en un vial de reacción junto con 2 mL de *n*-heptano, el mismo se mantuvo en baño termostático a 50 °C durante 6 horas y con agitación magnética a 700 rpm. Luego de transcurrido el tiempo fijado el biocatalizador se separó y el contenido del vial fue analizado ICP-AES para determinar contenido de azufre.

2.2.4.1.2. Eliminación de la lipasa débilmente adsorbida

El biocatalizador obtenido fue colocado en 50 mL de agua destilada pH 6.5 y sometido a agitación magnética durante 1 min. Este procedimiento de lavado se realizó en dos oportunidades. Posteriormente se procedió al secado del biocatalizador colocándolo a 30 °C por 15 horas y luego 24 horas a 45 °C para retirar el agua adsorbida en el

quitosano. Se tomaron muestras del sobrenadante de ambos lavados para su posterior análisis por ICP-AES

2.2.4.2. Determinación de porcentaje de inmovilización mediante la cuantificación de azufre elemental por ICP-AES

La masa de lipasa fue determinada en función del contenido de azufre en la estructura de la proteína siguiendo la metodología desarrollada por Paula Nicolás en su tesis doctoral (tesis en ejecución). El contenido total de azufre fue determinado por espectrometría de emisión atómica por plasma inducido (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*) empleando un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo Shimadzu 9000 Simultáneo de Alta Resolución, estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de Análisis Químicos (LANAQUI-CERZOS-UNS-CONICET), a cargo de la Ing. Qca. Miryam B. Crespo y del Dr. Claudio N. Ferrarello.

2.2.4.3. Análisis del biocatalizador por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia difusa

La determinación de la presencia de grupos funcionales característicos en la lipasa inmovilizada se realizó empleando el equipo Nicolet 6700 Thermo scientific acondicionado para medidas de reflectancia difusa (DRIFTS, *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) en polvo, usando el software OMNIC versión 7.1 para la recolección y procesamiento de espectros. Para evitar la saturación de la señal registrada, la muestra se diluyó al 1% con KBr, previamente tratado térmicamente para eliminar agua.

2.2.4.4. Esterificación de dicaprina con ácido palmítico

La esterificación de dicaprina (1,3-dicaprina = 80%, 1,2/2,3-dicaprina = 20%, aproximadamente) se realizó en viales de 10 mL, cerrados, los cuales fueron mantenidos en baños termostáticos con control de temperatura y agitación magnética. El tiempo de reacción fue de 6 horas. La reacción se llevó a cabo como sigue: 50 mg de dicaprina se disolvieron en 2 mL de *n*-heptano, luego se añadió la cantidad de ácido palmítico fijado para cada reacción en estudio. Cuando la mezcla reactiva alcanzó la temperatura seleccionada, la reacción se inició con la adición del biocatalizador. Los valores de la relación molar ácido palmítico/dicaprina (**Relación P/Dicaprina**), dosis de lipasa inmovilizada (**L**) y temperatura (**T**) de reacción se establecieron de acuerdo al diseño experimental que se describirá en la Sección 2.2.4.5.

2.2.4.5. Diseño factorial de cribado

Para estudiar la esterificación de dicaprina (y en especial 1,3-dicaprina) con ácido palmítico se aplicó un diseño factorial de tres niveles y tres factores con dos puntos centrales y un total de 10 experimentos. Las variables y sus niveles fueron: relación molar ácido palmítico/dicaprina (1:1-3:1), temperatura de reacción (40-60 °C) y carga de lipasa inmovilizada (50-150 mg). Las respuestas estudiadas fueron los micromoles consumidos de: 1,3-dicaprina (CGC), 1,2-dicaprina (CCG), ácido palmítico (P) y 1-monocaprina (CGG), los micromoles generados de: ácido cáprico (C), glicerol (GGG), monopalmitina (PGG + GPG), 2,3-dicaprina (GCC), 1-caproil-2-palmitoil glicerol + 1-caproil-3-palmitoil glicerol (CPG + CGP), tricaprina (CCC), dipalmitina (PPG y PGP), 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol (CPC + CCP) y 1-caproil-2,3-palmitoil glicerol (CPP) y la selectividad y rendimiento a CPC + CCP. El diseño

experimental y el análisis estadístico fueron realizados utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion en la versión XV.2. Los factores y niveles utilizados se presentan en la Tabla 2.4. El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado para proporcionar protección contra los efectos de variables ocultas.

Tabla 2.4. Factores experimentales para la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando como catalizador la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano.

Numero de Corrida	Factores experimentales		
	L (mg)	T (°C)	P/Dicaprina
1	150	60	1
2	50	60	3
3	50	60	1
4	150	40	1
5	50	40	3
6	150	60	3
7	100	50	2
8	150	40	3
9	100	50	2
10	50	40	1

L = miligramos de lipasa inmovilizada, T = temperatura en °C y P/Dicaprina = relación en moles de ácido pamítico/dicaprina.

2.3. Referencias

- [1] Collins, S. E., Lassalle, V., Ferreira, M. L. (2011). FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72:220-228.
- [2] Cismondi M, Brignole E. A. (2001). ECOFAC—Computer aided solvent design and evaluation in environmental problems, based on group contribution methods with association. *Computer Aided Chemical Engineering*, 9:375–380.
- [3] Gani R, Brignole E. A. (1983). Molecular design of solvents for liquid extraction based on UNIFAC. *Fluid Phase Equilibria*, 13:331–340.
- [4] Cismondi M, Diaz M. S., Espinosa S., Brignole E. A. (2003). Molecular solvent design and near critical solvents optimization with ECOFAC. *Latin American applied research*, 33.

[5] Fredenslund A, Jones R. L., Prausnitz J. M. (1975). Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. *AIChE Journal*, 21:1086–1099.

[6] Gmehling J. (1995). From UNIFAC to modified UNIFAC to PSRK with the help of DDB. *Fluid Phase Equilibria*, 107:1–29.

[7] Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L. T. (2008). Sol–gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50:80-86.

[8] Gitlesen, T., Bauer, M., Adlercreutz, P. (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1345:188-196.

[9] Gudiño E, Iglesias L.E., Ferreira M. L. (2012). A rational approach to the regioselective deacetylation of 2,3,5-tri-O-acetyluridine by ethanolysis using Novozym 435. *BBA Protein and Proteomics*, 1824:627-636.

3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 1,3-DICAPROILGLICEROL MEDIANTE ESTERIFICACIÓN DE GLICEROL CON ÁCIDO CÁPRICO EN SOLVENTE ORGÁNICO

3.1. Introducción

El uso de diglicéridos (DAG) como emulsionantes no iónicos en alimentos, cosmética y farmacia es bien conocido, y a menudo una mezcla de monoglicéridos (MAG) y DAG se utiliza para estas aplicaciones debido al menor costo y el correcto desempeño de la misma [1,2].

Los DAG son también un componente natural menor de diversos aceites comestibles [3]. Desde 1999, un aceite de cocina compuesto principalmente por diglicéridos se encontró disponible en el mercado japonés. En enero de 2005 fue lanzado en Estados Unidos un aceite constituido aproximadamente por un 80% de diglicéridos y el resto triglicéridos [4]. Lamentablemente, debió ser retirado del mercado por problemas asociados a la presencia de un compuesto no triglicérido.

Estudios recientes sobre las propiedades nutricionales y la influencia del consumo de aceites basados en DAG han demostrado algunos efectos beneficiosos. Análisis comparativos de la ingesta de aceites basados en diglicéridos y aceites convencionales en animales y humanos han mostrado una reducción de la concentración de grasa corporal y en el hígado después de la ingesta de los aceites compuestos principalmente por DAG [5-8]. Los DAG están presentes en varias formas isoméricas, sn-1,2 (2,3)-DAG y sn-1,3-DAG, con una relación isomérica natural de aproximadamente 3:7. La forma 1,3-DAG es responsable de los efectos beneficiosos

dado que esta se metaboliza a lo largo de una ruta metabólica diferente de los triglicéridos y 1,2-DAG [5].

Aceites compuestos por una combinación de mono- y diglicéridos pueden obtenerse químicamente usando altas temperaturas (220-260 °C) y catalizadores inorgánicos, basados en sodio, potasio o calcio [9]. Otro enfoque es el uso de reacciones catalizadas por lipasas, que proporcionan varias ventajas tales como mayor selectividad, mayor pureza y calidad del producto, menor consumo energético y evitan el empleo de catalizadores tóxicos.

La síntesis de acilgliceroles parciales catalizada por lipasas se ha estudiado, principalmente con el objetivo de obtener MAG con un alto rendimiento [10-12]. Sin embargo, son pocos los informes disponibles que reportan la síntesis de DAG como objetivo primario.

En el presente capítulo, se sintetizó 1,3-dicaproilglicerol por esterificación directa del glicerol con ácido cáprico (C) en un solvente orgánico usando una forma inmovilizada comercial de lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) como catalizador. Siendo glicerol un subproducto de bajo costo de la industria del biodiesel, emplearlo como sustrato es altamente eficiente en términos económicos. Además, ya que ésta es una reacción de esterificación con sustratos simples, tales como glicerol y ácido cáprico, la complejidad del medio de reacción y aspectos analíticos se reducen considerablemente. En esta síntesis se estudió el efecto de los parámetros seleccionados (alimentación de glicerol, dosaje de enzima y temperatura de reacción)

en la conversión de ácido, selectividad y rendimiento a diglicéridos, así como en el proceso de migración de acilo. El estudio se realizó con un diseño factorial de cribado de tres factores y tres niveles.

Algunos estudios en la literatura se han focalizado en la síntesis de 1,3-DAG mediante esterificación catalizada por una lipasa [13,14], pero sin incluir en esos trabajos un cuidadoso análisis de los efectos de la adsorción del ácido graso o el monoglicérido en la sílice (utilizada como reservorio de glicerol). Tampoco fue considerado ni discutido el impacto del procedimiento de toma de muestras en los resultados. El efecto de errores en la toma de muestra puede ser muy importante en el caso de sistemas libres de solvente o en sistemas con sustratos o solventes volátiles. El mecanismo de la reacción de migración de acilos, considerando la participación de las enzimas en la misma, no se ha descrito con el nivel de detalle presentado en esta tesis. Watanabe y colaboradores [15] estudiaron la síntesis de 1,3-DAG a partir de una mezcla de ácidos grasos utilizando la lipasa inmovilizada de *R. miehei* en un sistema libre de solvente. Fue analizada la cinética de la síntesis de 1,3-DAG a partir de ácido graso y glicerol. Los autores destacaron que la enzima es regioselectiva a posiciones sn-1,3, pero también reportan que los tiempos de reacción largos, altas temperaturas y altas concentraciones de enzima inmovilizada aumentaron la migración de acilo, la producción de triglicéridos y la reducción de la pureza de 1,3-DAG. La pureza se redujo de 94% a 68% cuando el contenido de lipasa inmovilizada se varió de 2,5% a 20%, sin embargo no se incluyó ningún análisis de la migración de acilo de las posiciones sn-1 o sn-3 a sn-2. Tampoco se discute si la migración de acilo, responsable de la generación de los triglicéridos, fue inducida por el soporte de la lipasa inmovilizada o por la misma

lipasa. Otros autores [16,17] estudiaron las condiciones de reacción para la esterificación catalizada por Lipozyme RM IM. Reducciones en el rendimiento del diglicérido específico se encontraron debido a la migración de acilo causada por la cantidad de biocatalizador, pero no fue incluida ninguna discusión de las causas de esta reacción.

En este capítulo de la presente tesis se han considerado (a) los problemas de la utilización de gel de sílice y los errores que pueden estar presentes de no llevar a cabo correctamente las tomas de muestras (se pueden encontrar errores de hasta el 20% o más en la conversión de ácidos grasos debido a la adsorción de éstos en la sílice, un fenómeno no tenido en cuenta o por lo menos no informado adecuadamente en la literatura publicada), (b) una nueva explicación del mecanismo de migración de acilo (del cual no se registran antecedentes en la revisión bibliográfica realizada), y (c) un cuidadoso análisis de la distribución de isómeros de 1,3-DAG con cromatografía de gases.

3.2. Adsorción de ácido cáprico sobre gel de sílice

En estudios preliminares, se observó que el ácido cáprico se adsorbe en la superficie del gel de sílice. Si este fenómeno no es considerado, puede generarse un error importante en la determinación de ácidos grasos, con una posterior sobreestimación de la conversión de los mismos.

El estudio de adsorción, realizado en las condiciones que se presentaron en la Sección 2.2.1.5.1, indicó que 12.7 mg de ácido cáprico se adsorben en 100 mg de gel de sílice a

40 °C. Esto representa una adsorción de 0.074 mmol de ácido graso por 100 mg de sílice. En la literatura sólo se encontró un artículo que informó de la posibilidad de adsorción de ácido cáprico en gel de sílice [18].

3.3. Identificación de productos

Los productos más simples a esperar de la esterificación enzimática de glicerol (GGG) con ácido cáprico (C) son monocaprina (CGG) y el producto deseado: 1,3-dicaprina (CGC). A su vez, la migración de acilo hace que sea posible la obtención de otras dos configuraciones isoméricas de dicaprina: 1,2-dicaproiglicerol (CCG) y 2,3-dicaproiglicerol (GCC), que son productos de reacción indeseables. Tricaprina (CCC) se genera cuando estos diglicéridos no deseados son esterificados (más información sobre migración de acilos se presenta en la Sección 3.4). La columna capilar utilizada diferencia isómeros de posición, y su identificación fue posible tomando como referencia el trabajo presentado por Bruschweiler y Dieffenbacher [19], quienes proponen un método para la determinación de mono- y diglicéridos por cromatografía de gases.

Un típico cromatograma de los productos de reacción y sustratos sin reaccionar se muestra en la Figura 3.1.

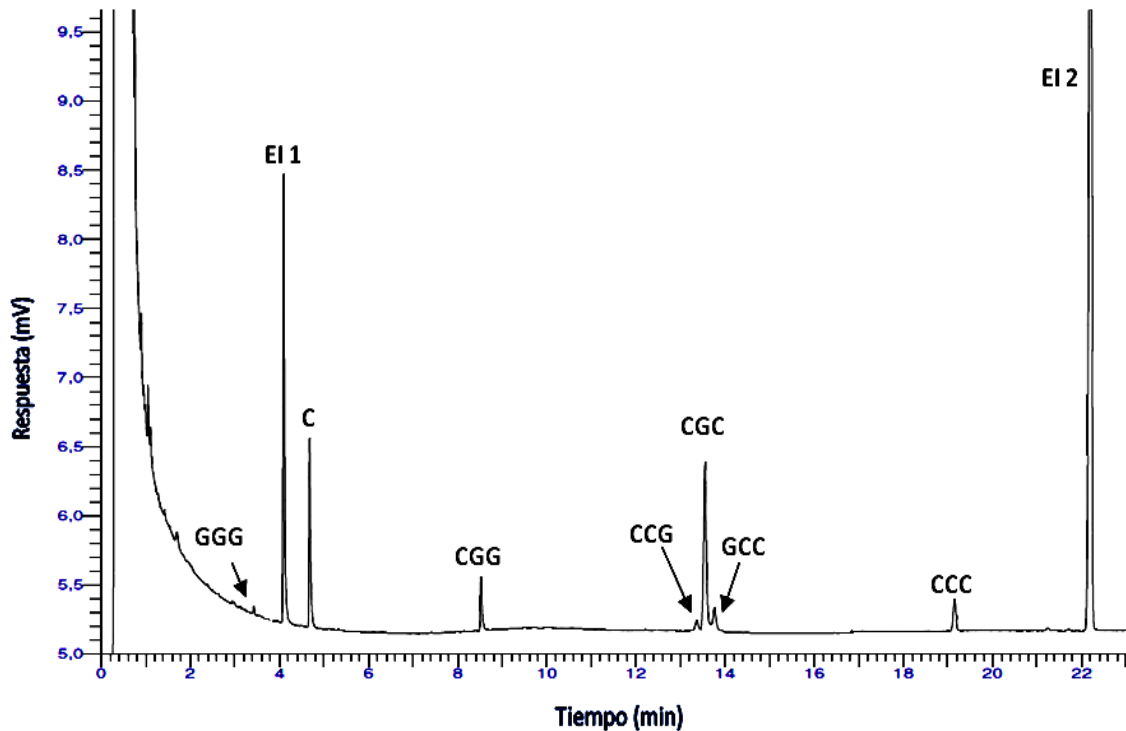


Figura 3.1. Típico cromatograma de los productos de reacción y reactivos no consumidos en la esterificación enzimática de glicerol y ácido cáprico usando Lipozyme RM IM. EI 1 y EI 2: patrones de calibración interna (EI 1 = 1,2,4-butanotriol, EI 2 = tripalmitina). Condiciones experimentales: glicerol: 250 mg (adsorbido en gel de sílice), temperatura: 60 °C y enzima: 20 mg, tiempo de reacción: 6 h.

3.4. Reacción de migración de acilos

La especificidad posicional de lipasas para atacar las posiciones sn-1 y sn-3 se debe a limitaciones estéricas que impiden que los glicéridos coordinen con el sitio activo de la lipasa a través del acilo esterificado en posición sn-2 [20]. Sin embargo, se puede observar en la Figura 3.1 que la producción de tricaprina no fue despreciable. La reacción que generó tricaprina en este sistema es la migración de ácidos grasos a partir de las posiciones sn-1 y sn-3 a la posición sn-2, incluso cuando la migración favorecida termodinámicamente es de la posición sn-2 a las posiciones sn-1/sn-3 [21]. En la síntesis de los diglicéridos de tipo MGM (ácidos grasos de longitud de cadena media (M) ubicados en las posiciones sn-1,3), la migración de acilo implica la migración de los ácidos grasos a partir de sn-1 y sn-3 a la posición sn-2 y re-migración desde la posición

sn-2 a sn-1 y sn-3. La migración de acilo se considera una reacción no enzimática [19]. Hay muchos factores que influyen en la migración de acilo, tales como la temperatura, el tiempo de reacción, la longitud de cadena de ácido, la actividad de agua, el tipo de reactor, la acidez del medio de reacción, la actividad de la lipasa, la polaridad del solvente y el tipo de soporte de inmovilización [21,22]. En particular, se ha considerado que la temperatura tiene una profunda influencia en la reacción de migración puesto que la misma se considera un proceso espontáneo termodinámicamente, no catalizado en solventes no polares [21]. La Figura 3.2 muestra el mecanismo propuesto para la reacción de esterificación entre glicerol y ácido cáprico catalizada por una lipasa inmovilizada, sobre la base de los conceptos propuestos por Watanabe et al. [23]. Incluso utilizando una lipasa sn-1,3 específica, la migración de acilo conduce a la formación de tricaprina (CCC) y mono- y diglicéridos inespecíficos. La flecha en la Figura 3.2 destaca la ruta de esterificación para obtener el 1,3-diglicérido.

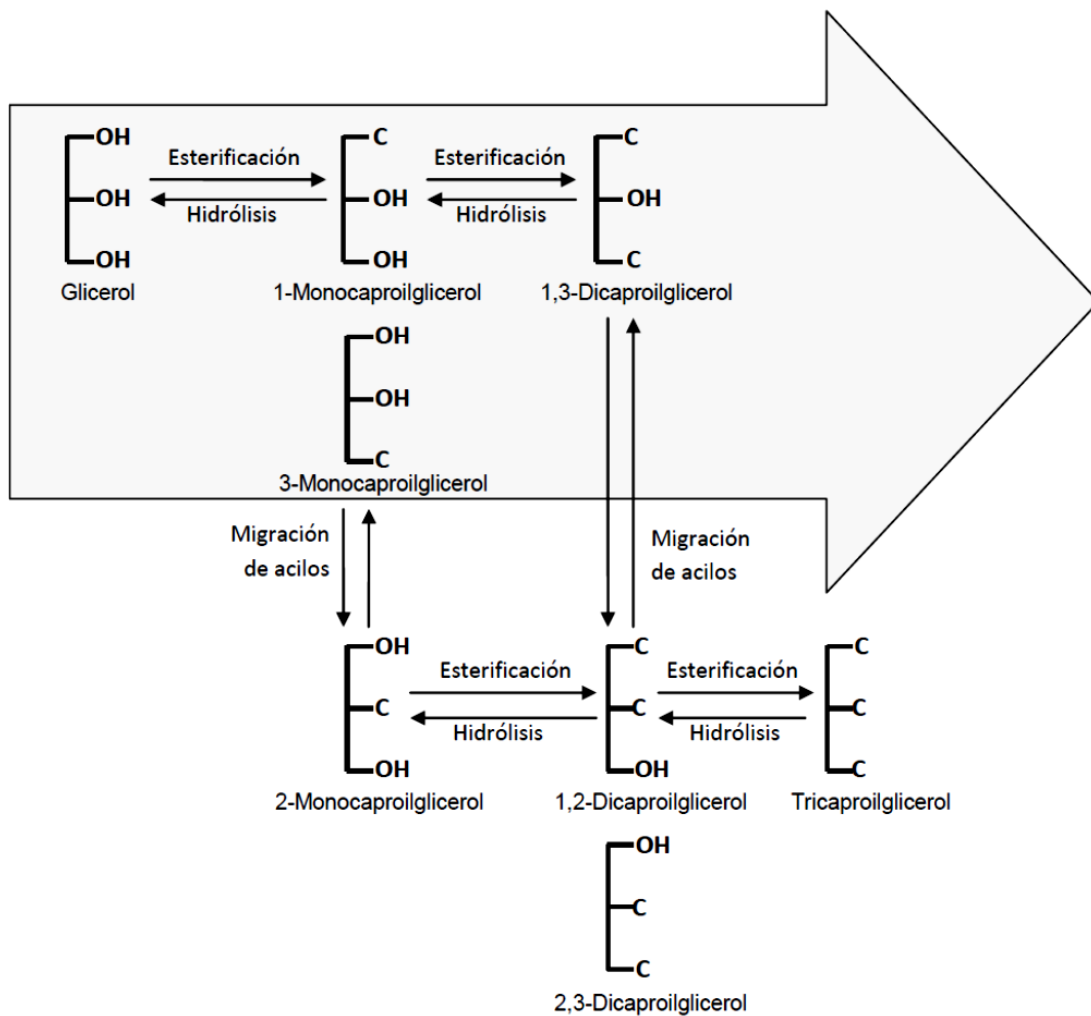


Figura 3.2. Esquema de reacción para la esterificación de glicerol con ácido cáprico usando Lipozyme RM IM.

3.5. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste

Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones diseñadas en la Sección 2.2.1.3. Los factores experimentales y respuestas obtenidas, correspondientes a mediciones realizadas a 6 h de reacción, se dan en la Tabla 3.1. El tiempo de reacción se optimizó en un estudio previo, para maximizar la obtención de DAG deseado. Los modelos obtenidos para cada variable de respuesta se analizan en detalle en los apartados siguientes. En primer lugar se analizaron las principales tendencias y correlaciones entre factores y respuestas. Posteriormente se introdujeron modelos de segundo

orden con el objetivo de ajustar los datos experimentales y detectar efectos no previsible. Los modelos de segundo grado fueron refinados aplicando la prueba del valor-F, también llamada test de Fisher o Fisher-Snedecor.

En estadística se denomina prueba F a cualquier prueba en la que el estadístico utilizado sigue una distribución F si la hipótesis nula no puede ser rechazada. En muchos casos, el test F puede resolverse mediante un proceso directo. Se requieren dos modelos de regresión, uno de los cuales restringe uno o más de los coeficientes de regresión conforme a la hipótesis nula. El test del valor-F entonces se basa en un cociente modificado de la suma de cuadrados de residuos de los dos modelos como sigue:

$$F = \frac{\left(\frac{RSS_0 - RSS_1}{m} \right)}{\left(\frac{1 - RSS_0}{n - k} \right)} \quad (3.1)$$

donde:

RSS_0 se refiere al coeficiente de determinación del modelo sin restringir (R^2)

RSS_1 se refiere al coeficiente de determinación del modelo restringido (R^2)

m se refiere al número de restricciones impuestas a los coeficientes estimados (coeficientes restringidos).

k se refiere al número de coeficientes estimados en el modelo sin restricciones.

n se refiere al número de observaciones del modelo.

El valor resultante debe entonces compararse con el valor correspondiente de la tabla de valores críticos. Si $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tablas}}$, empleando los datos tabulados de distribución F, el modelo restringido realiza un mejor ajuste de los parámetros.

Tabla 3.1. Factores experimentales establecidos y variables de respuesta obtenidas para la esterificación enzimática de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM a 6 h de reacción.

Ensayo Nº	Factores experimentales			Variables de respuesta									
	G (mg)	T (°C)	E (mg)	X _C (%)	MAG ^a	DAG ^a	TAG ^a	1,2-DAG ^b	1,3-DAG ^b	2,3-DAG ^b	σ _{DAG} ^b	Y _{DAG} (%)	A ^c
1	50	40	20	38	15	73	12	5	92	3	74	28	12
2	150	50	30	66	15	70	15	4	92	4	70	46	14
3	250	40	20	55	18	77	4	10	83	7	83	46	16
4	250	40	40	67	19	72	9	17	79	4	76	50	11
5	250	60	40	75	18	69	13	9	71	20	71	53	12
6	150	50	30	67	21	68	11	5	94	1	72	49	14
7	250	60	20	73	18	72	9	5	93	2	76	55	23
8	50	60	20	45	12	61	26	8	86	5	58	26	14
9	50	60	40	55	8	40	52	3	33	64	33	18	9
10	50	40	40	40	8	62	30	4	56	40	56	23	6

a Valores porcentuales respecto al total de productos de reacción (en moles)

b Valores porcentuales respecto al total de diglicéridos

c Actividad enzimática evaluada como μmol de ácido convertido por mg de lipasa inmovilizada

3.5.1. Conversión de ácido cáprico

El incremento de todas las variables analizadas repercutió en una mayor conversión del ácido graso (X_C). Durante este estudio no se detectó agregación del biocatalizador y en el rango de temperatura seleccionado no se observó desnaturalización de la lipasa. La mayor conversión de ácido cáprico se obtuvo para el máximo valor de los tres

factores (glicerol adsorbido = 250 mg, temperatura = 60 °C y lipasa inmovilizada = 40 mg), esto no coincide con la combinación de factores que conducen a la mayor selectividad a diglicéridos (como se discutirá en la Sección 3.5.2.2). Los valores de conversión de ácido cáprico tomaron valores comprendidos entre el 38 y 75% dependiendo de las condiciones de reacción.

Luego de identificar los principales efectos se aplicó un modelo cuadrático. El modelo de ajuste cuadrático que contiene todas las variables y combinaciones de las mismas está representado por la Ecuación 3.2.

$$X_{Ac} = A_0 + A_1G + A_2T + A_3E + A_4GE + A_5GT + A_6ET + A_7G^2 + A_8E^2 + A_9T^2 \quad (3.2)$$

donde G es glicerol, T es la temperatura y E es la cantidad de enzima inmovilizada.

Este modelo se ajustó mediante selección por pasos (prueba de Fisher explicada en la sección 3.5), eliminando las variables a fin de encontrar el mejor modelo que contiene sólo variables estadísticamente significativas. La prueba comienza con un modelo donde participan todas las variables especificadas y, a continuación, se elimina una variable a la vez en función de su significancia estadística en el modelo actual. La Ecuación 3.3 se obtuvo después de realizada la selección por pasos. Dado que el valor-p para el modelo resultó menor a 0.05, hubo una relación estadísticamente significativa entre las variables y la respuesta con un nivel de confianza superior al 95.0%. El coeficiente de determinación R^2 indica que el modelo puede explicar el 97.33% de la variabilidad en la conversión de ácido cáprico. El estadístico R^2 ajustado,

que es más apropiado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue 95.20%.

$$X_c = -14.1 + 0.430G + 0.325E + 0.600T - 0.00105G^2 \quad (3.3)$$

La Figura 3.3 muestra los gráficos de superficie de respuesta para el modelo de segundo orden, presentando los efectos de la cantidad de glicerol (adsorbido en gel de sílice), la temperatura y la cantidad de biocatalizador. Se puede observar en las gráficas una amplia región donde la conversión supera el 70%.

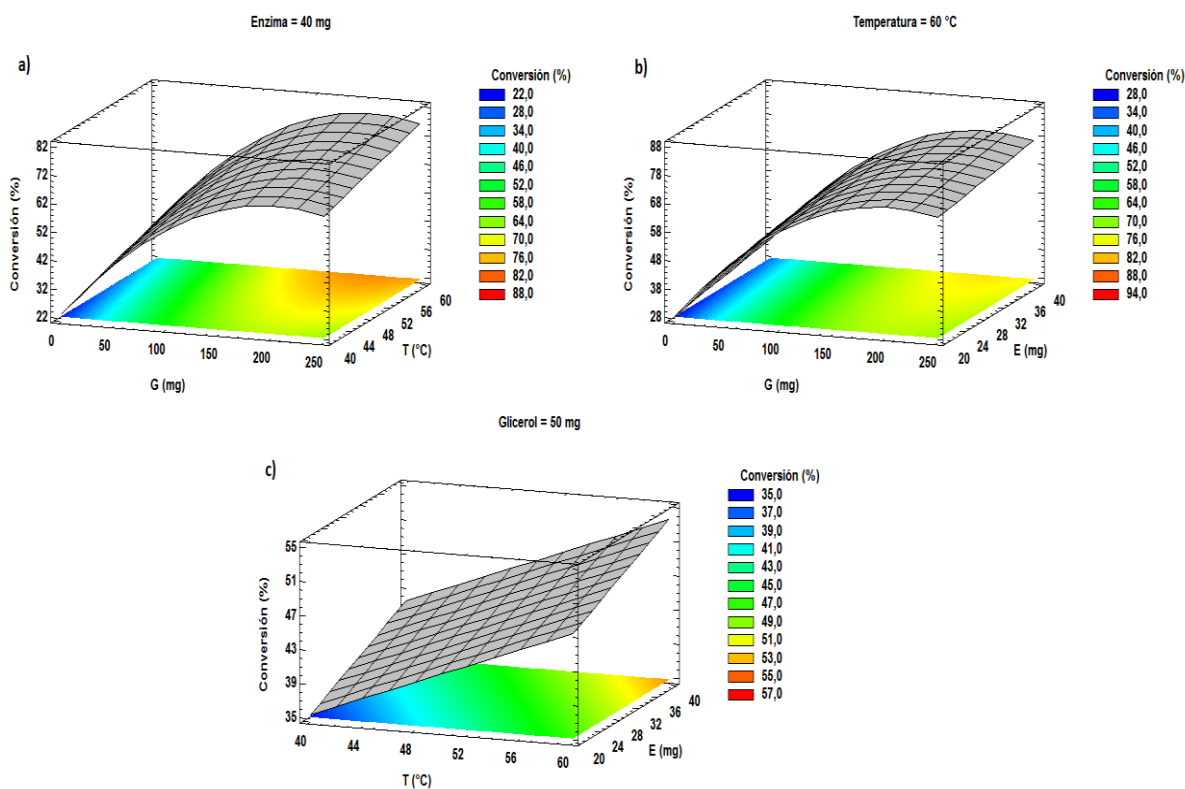


Figura 3.3. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático (Ec. 3.3) para conversión de ácido cáprico: (a) factores glicerol y temperatura, $E = 40\text{mg}$; (b) factores glicerol y enzima, $T = 60\text{ °C}$, (c) factores temperatura y enzima, $G = 50\text{ mg}$.

3.5.2. Fracciones de acilglicéridos

3.5.2.1. Fracción de monocaprina respecto al total de productos

La cantidad de glicerol adsorbido fue el principal factor que afectó positivamente la síntesis de monocaprina. La temperatura no tuvo prácticamente ningún efecto sobre la síntesis del monoglicérido. A bajas concentraciones de glicerol, el efecto negativo de la cantidad de lipasa inmovilizada se hizo importante, probablemente porque el monoglicérido es esterificado más rápidamente para dar dicaprina. La síntesis de monocaprina se ve favorecida por altas concentraciones de glicerol, bajas temperaturas y bajas dosis de biocatalizador.

Un modelo de segundo orden fue adoptado para ajustar esta respuesta. Una expresión igual a la Ecuación 3.2 se obtuvo por regresión múltiple. Se realizó la prueba de Fisher con el fin de obtener una expresión que contenga sólo variables estadísticamente significativas. La Ecuación 3.4 muestra la expresión obtenida para ajustar los datos de la fracción molar de monocaprina.

$$\%MAG = 15.3 + 0.101G - 0.352E + 0.00142GE - 0.000357G^2 \quad (3.4)$$

El valor-p para este modelo fue inferior a 0.05 y hubo una relación estadísticamente significativa entre las variables y la respuesta con un nivel de confianza superior al 95%. Este modelo fue capaz de explicar 87.81% de la variabilidad de la fracción molar de monocaprina generada (basado en el coeficiente R^2). El valor del estadístico R^2 ajustado fue 78.05.

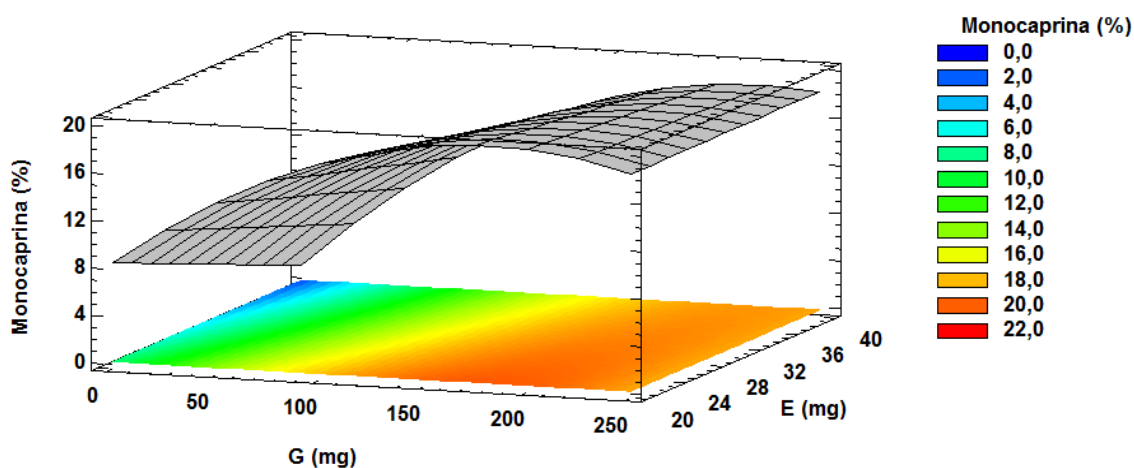


Figura 3.4. Superficie de respuesta utilizando un modelo de segundo orden para fracción de monocaprina en producto de reacción de esterificación de glicerol con ácido cáprico utilizando Lipozyme RM IM.

La superficie de respuesta obtenida para el porcentaje molar de monocaprina en los productos de esterificación se muestra en la Figura 3.4. La temperatura no se

consideró en el modelo debido al mínimo efecto que produce sobre la respuesta analizada. La región comprendida entre 150 y 250 mg de glicerol adsorbido muestra altas fracciones de monocaprina para cualquier valor de temperatura y dosaje de lipasa inmovilizada.

3.5.2.2. Fracción de dicaprina respecto al total de productos

El incremento de la concentración de glicerol influyó positivamente en la síntesis de dicaprina, mientras que el aumento de la temperatura y de la cantidad de biocatalizador afectaron negativamente a esta respuesta. Al parecer una alta proporción de glicerol inicial propicia la generación de monocaprina y posteriormente 1,3-dicaprina, mientras que el incremento de la temperatura y la masa de biocatalizador favorecen la generación de 1,2/2,3-dicaprina (por migración de acilos) y la rápida esterificación de éstos a tricaprina (como se verá en las Secciones 3.5.2.3 y 3.5.4).

La cantidad de glicerol adsorbido sobre gel de sílice fue el principal factor que afectó la síntesis de dicaprina. A bajas concentraciones de glicerol adsorbido, los efectos negativos del aumento de la temperatura y de la cantidad de lipasa inmovilizada se volvieron importantes. Los efectos de la temperatura y de la cantidad de enzima inmovilizada fueron similares.

Un modelo de segundo orden fue propuesto para ajustar los datos experimentales obtenidos para esta respuesta. La Ecuación 3.5 es el resultado de dicho ajuste. El

coeficiente de determinación R^2 fue 96.72% y el estadístico R^2 ajustado alcanzó un valor de 90.16%.

$$\%DAG = 132 - 0.0968G - 1.03T - 0.960E + 0.00296GE + 0.00333GT - 0.000303G^2 \quad (3.5)$$

La mayor fracción de dicaprina (para las condiciones ensayadas) se obtuvo con la mayor proporción de glicerol adsorbido, la cantidad mínima de lipasa inmovilizada y la temperatura más baja. Estas condiciones no se corresponden con los que maximizan la conversión de ácido cáprico y que fueron antes mencionadas en la Sección 3.5.1.

En la Figura 3.5 se presentan gráficos de superficie de resupestada para la fracción molar de dicaprina ajustada utilizando el modelo de segundo orden representado por la Ecuación 3.5. En los mismos puede observarse el efecto de las variables sobre esta respuesta, los cuales fueron ya descriptos.

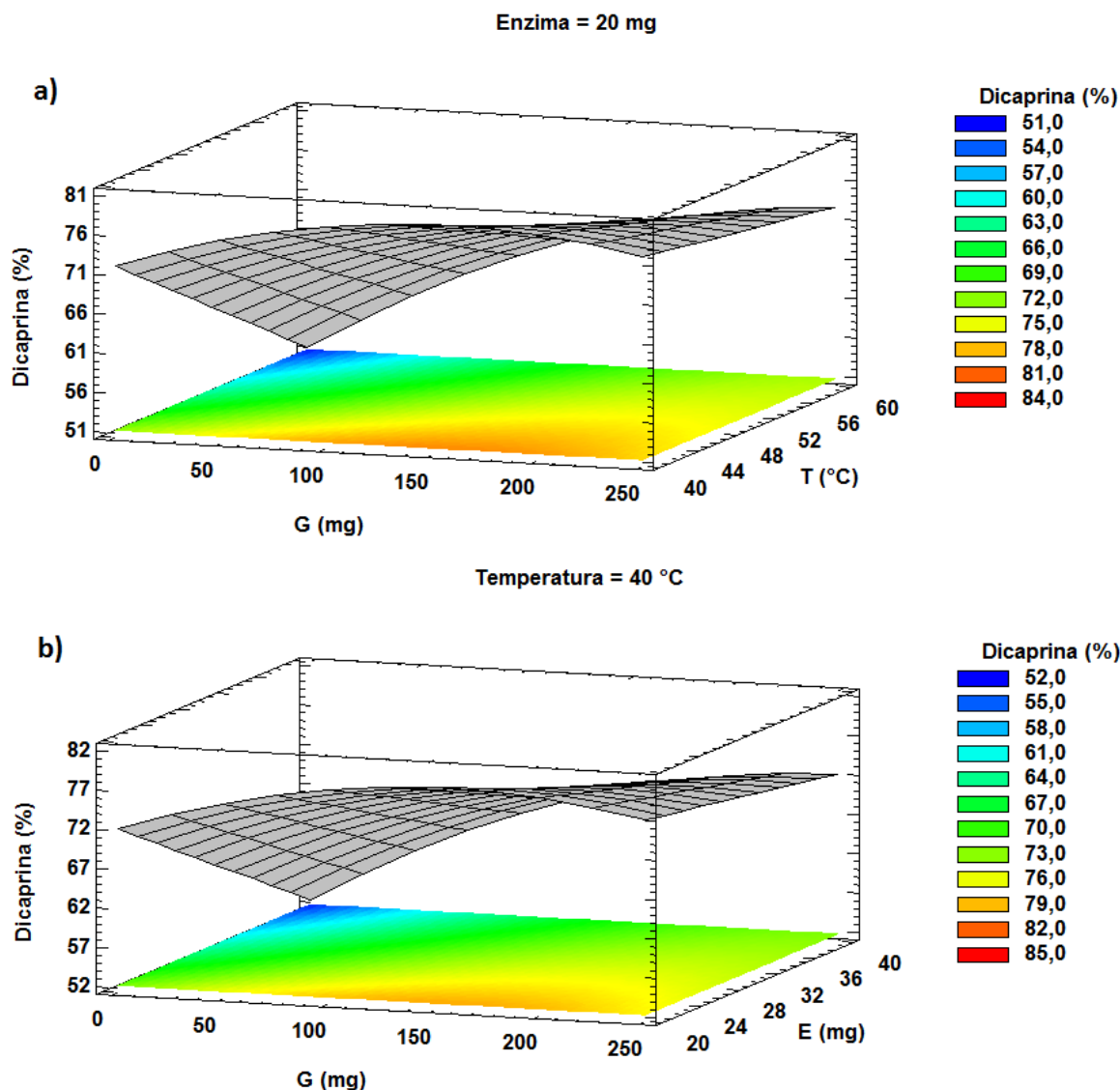


Figura 3.5. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático para fracción de dicaprina en el producto de reacción: (a) factores glicerol y temperatura, E = 20mg; (b) factores glicerol y enzima, T = 40 °C.

3.5.2.3. Fracción de tricaprina respecto al total de productos

El contenido inicial de glicerol adsorbido sobre gel de sílice fue el principal factor que afectó la síntesis de tricaprina, y el incremento del mismo tuvo un efecto negativo sobre esta respuesta. El aumento de la temperatura de reacción y de la masa de biocatalizador favorecieron la formación de tricaprina.

Como se mencionó en secciones anteriores, llevar a cabo la reacción de esterificación con alta proporción de glicerol inicial favorece la síntesis de monocaprina y 1,3-dicaprina, mientras que elevada temperatura y alta dosis de biocatalizador promueven la migración de acilos y la posterior obtención del triglicérido.

El efecto positivo, sobre esta respuesta, del incremento de la temperatura y de la masa de biocatalizador sólo fueron significativos cuando la síntesis se realizó con bajas concentraciones de glicerol adsorbido. La Ecuación 3.6 se obtuvo mediante el ajuste de los datos con un modelo de segundo orden y refinado para incluir sólo variables significativas.

$$\%TAG = -50.5 + 1.09T + 1.31E - 0.00437GE - 0.00345GT + 0.000666G^2 \quad (3.6)$$

El nivel de confianza para la relación entre las variables para este modelo superó el 99.9% (valor-p 0.0009). El coeficiente de determinación R^2 permite explicar el 98.54% de la variabilidad de la fracción de tricaprina, y el estadístico R^2 ajustado fue 96.71%.

En la Figura 3.6 se presentan gráficos de superficie de respuesta, para la formación de tricaprina, obtenidos a partir de la Ecuación 3.6 donde se muestran los efectos de la masa de glicerol y la temperatura para una cantidad fija de biocatalizador (Figura 3.6a) y los efectos de la masa de glicerol y la cantidad de lipasa inmovilizada para una dada temperatura de reacción (Figura 3.6b).

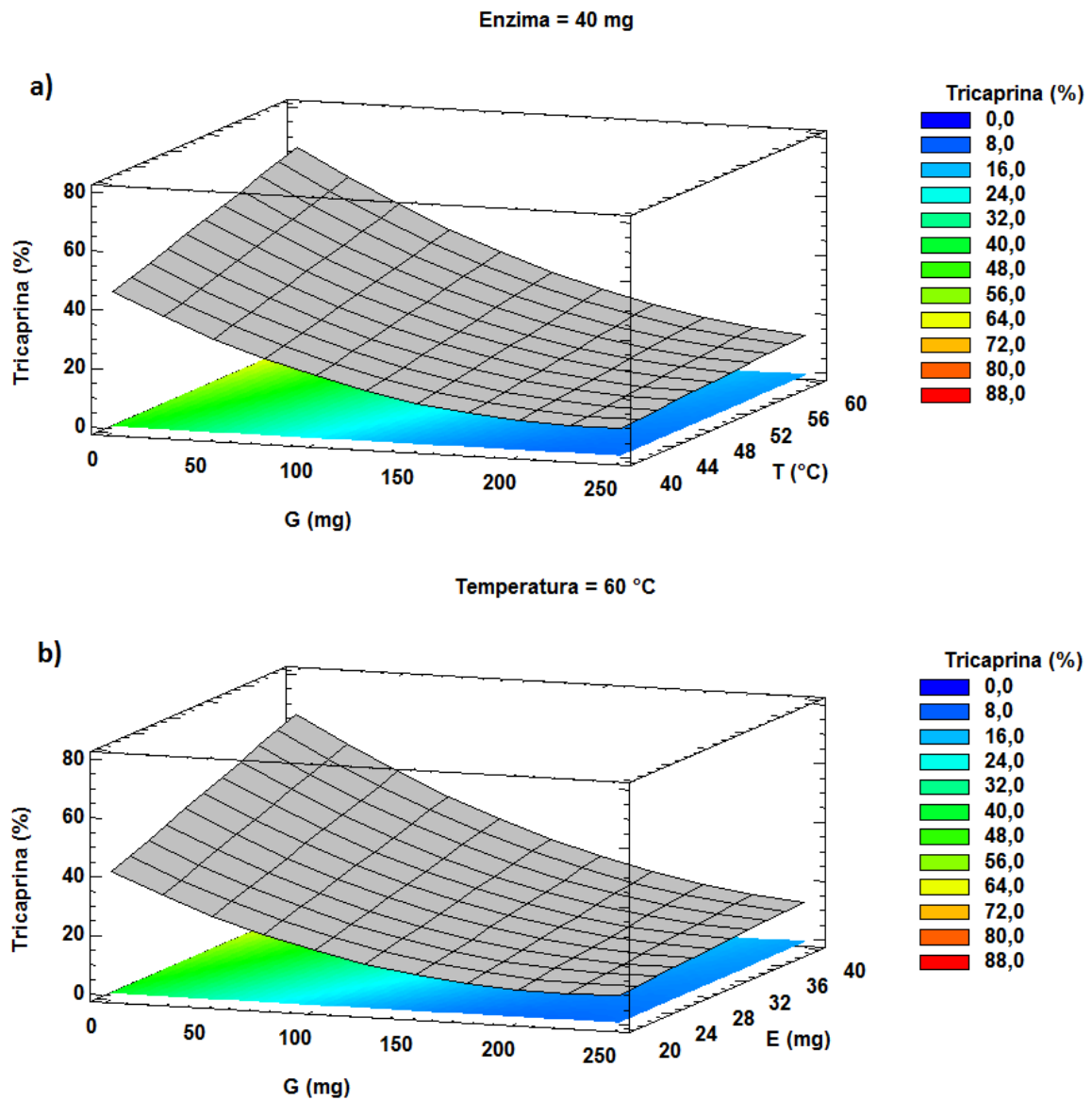


Figura 3.6. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático para fracción de tricaprina en el producto de reacción: (a) factores glicerol y temperatura, E = 40mg; (b) factores glicerol y enzima, T = 60 °C.

Resumiendo, el incremento del contenido de glicerol favoreció la síntesis de mono- y diacilglicéridos, mientras que los aumentos del dosaje de lipasa inmovilizada y de la temperatura se mostraron a favor de la reacción de migración de acilo y la síntesis de tricaprina.

3.5.3. Producción de dicaproilglicerol

La selectividad a dicaprina (σ_{DAG}) se vió favorecida por el aumento del contenido de glicerol, mientras que el incremento de la dosis de enzima inmovilizada y de la temperatura de reacción redujeron la selectividad al diglicérido. Como se mencionó en secciones anteriores los efectos generados por la temperatura y por la masa de biocatalizador se hicieron evidentes a bajas concentraciones de glicerol. Los mayores valores de selectividad (dentro del intervalo estudiado) se obtuvieron llevando a cabo la síntesis con la mayor concentración de glicerol, mínima cantidad de lipasa inmovilizada y menores valores de temperatura.

Cuando se considera el rendimiento a dicaprina (Y_{DAG}), la masa de glicerol adsorbido sobre gel de sílice fue la variable que presentó mayor incidencia en esta respuesta. El rendimiento a DAG tomó valores que variaron entre 18 y 55% dependiendo de las condiciones de reacción.

Los efectos producidos por la temperatura y la cantidad de biocatalizador en la selectividad refuerzan la idea del impacto de estas variables sobre la migración de acilo. El incremento en los valores de las mismas favoreció la migración de los grupos acilo de las posiciones sn-1 y sn-3 a la posición sn-2, lo que permite la generación de diglicéridos no específicos y luego tricaprina, reduciendo así la selectividad hacia el producto deseado. La Ecuación 3.7 permitió ajustar los datos de selectividad, y el coeficiente R^2 indica que con este modelo fue posible explicar 99.07% de la variabilidad en esta respuesta, y el valor ajustado R^2 fue 97.91%. La Figura 3.7a

muestra un gráfico de superficie de respuesta obtenido a partir de la Ecuación 3.7, donde la masa de biocatalizador se fijó en 20 mg y se variaron los restantes factores.

$$\sigma_{DAG} = 138 - 1.16T - 1.25E + 0.00370GE + 0.00334GT - 0.000575G^2 \quad (3.7)$$

En el caso del rendimiento, en el modelo refinado sólo se considera la cantidad inicial de glicerol adsorbido como variable independiente (Ecuación 3.8) y el mismo ajustó 94.03% de los cambios en el rendimiento a dicaprina, y el valor del coeficiente R^2 ajustado fue 92.32%. La Figura 3.7b muestra el gráfico de superficie de respuesta para este modelo.

$$Y_{DAG} = 4.18 + 0.437G - 0.000998G^2 \quad (3.8)$$

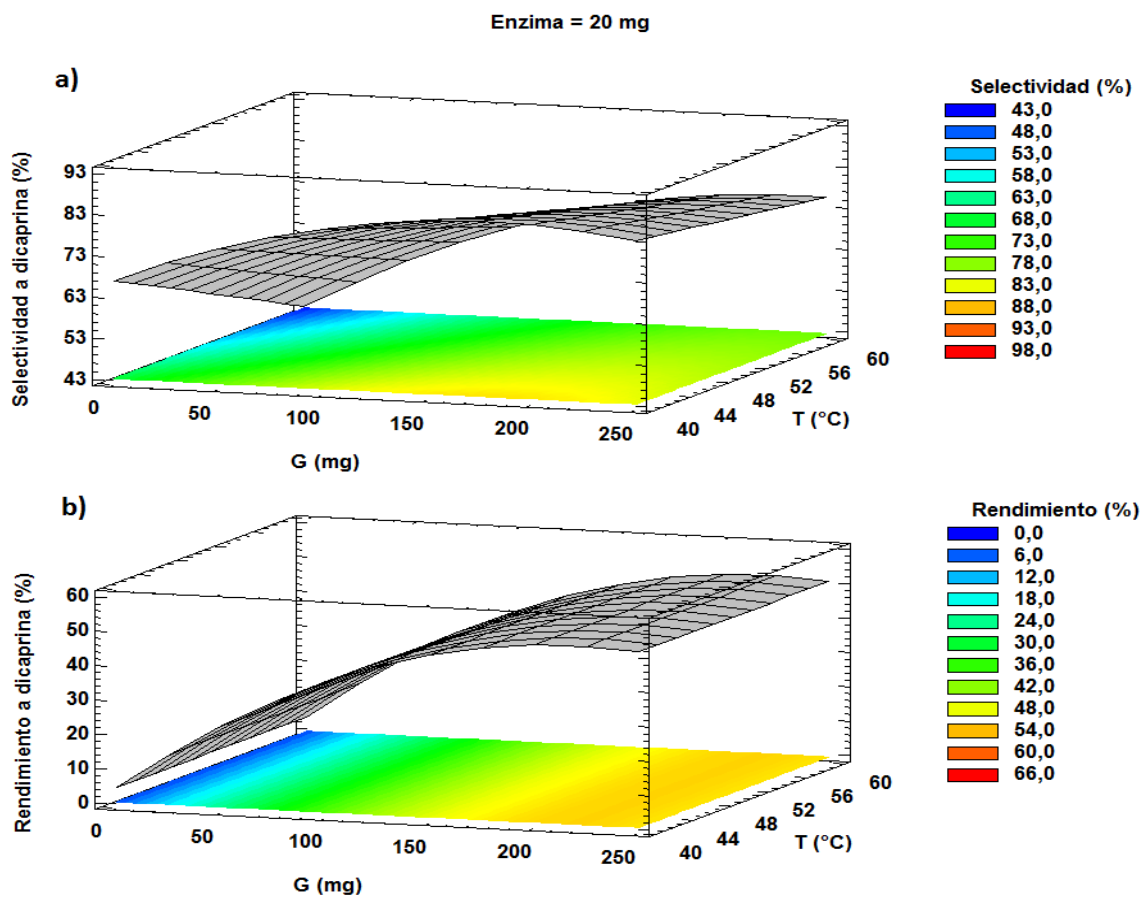


Figura 3.7. Selectividad y rendimiento a dicaprina. (a) Modelo de segundo orden para selectividad a dicaprina; factores: glicerol (G) y la temperatura (E), enzima 20 mg, (b) modelo de segundo orden para el rendimiento a dicaprina.

3.5.4. Isómeros de dicaproilglicerol

Aunque la lipasa utilizada en esta reacción es específica para las posiciones sn-1 y sn-3, la reacción de la migración de acilo permite la existencia de ácido graso esterificado en la posición sn-2. Así, además del diglicérido deseado (1,3-dicaproilglicerol), también se obtuvieron dos formas isoméricas de dicaprina (1,2-dicaproilglicerol y 2,3-dicaproilglicerol).

La generación de isómeros estuvo influenciada por combinaciones de factores. En términos generales, aumentar la cantidad de glicerol promovió la síntesis del isómero específico, mientras que el aumento de la dosis de biocatalizador y de la temperatura favorecieron la síntesis de los otros isómeros. Los factores que promovieron la síntesis de isómeros no específicos también favorecieron la reacción de esterificación y la conversión de los mismos a tricaprina. Las fracciones de cada isómero respecto al total de diglicéridos se analizan en detalle a continuación.

La temperatura no tuvo prácticamente ningún impacto sobre la fracción de 1,2-dicaprina, siendo la cantidad inicial de glicerol adsorbido y el dosaje de lipasa inmovilizada los factores que influyeron en la generación de este isómero. El contenido de glicerol redujo la formación de 1,2-dicaprina mientras que los efectos causados por la cantidad de biocatalizador y la temperatura se hicieron más importantes cuando la concentración de glicerol fue baja. Altas temperaturas tienen un efecto negativo en la fracción del isómero inespecífico. Aparentemente, aunque la temperatura favorece la migración de acilo, incrementa aún más la velocidad de esterificación y 1,2-dicaprina se convierte rápidamente en tricaprina.

Un modelo simple de segundo orden en G ajustó el 98.11% de los datos obtenidos para la fracción 1,2-dicaprina, y el estadístico R^2 ajustado fue 95.76%. Este modelo está representado por la Ecuación 3.9.

$$\% 1,2 \text{ DAG} = -4.02 + 0.376T - 0.00227GT + 0.00214GE - 0.00531ET + 0.000250G^2 \quad (3.9)$$

La generación de 2,3-dicaprina está relacionada con la migración de acilos de la posición sn-1 a las sn-2, en 1,3-dicaprina. El aumento en el contenido inicial de glicerol permitió reducir este tipo de migración. El incremento de la temperatura y de la masa de lipasa inmovilizada favorecieron la formación de 2,3-dicaprina. Al igual que lo mencionado para la generación de 1,2-DAG, los efectos causados por la temperatura y la carga de biocatalizador se hicieron considerablemente importantes cuando la reacción fue llevada a cabo con bajo contenido de glicerol. Un modelo de segundo orden en E (Ecuación 3.10) permitió explicar el 96.52% de la variabilidad de la fracción molar de 2,3-dicaprina, y el valor de R^2 ajustado fue 92.16%.

$$\% 2,3 \text{ DAG} = 71.1 + 0.203G - 7.44E + 0.156E^2 - 0.0101GE + 0.0194TE \quad (3.10)$$

La síntesis de ambos isómeros no deseados se vió favorecida por el incremento de la masa de lipasa inmovilizada empleada, lo que permite presumir la participación del catalizador en la reacción de migración de acilos. El efecto de esta variable sobre esta reacción secundaria fue incluso mayor que el producido por la temperatura de reacción.

La generación de 1,3-dicaprina estuvo favorecida por el aumento de la cantidad de glicerol adsorbido sobre gel de sílice. El aumento de la temperatura tuvo un ligero efecto positivo sobre la síntesis del diglicérido deseado, probablemente porque, para

el tiempo de reacción estudiado, favorece la esterificación de monocaprina más que la migración de acilos. Coincidiendo con lo observado en las otras formas isoméricas, el incremento en la masa de biocatalizador empleado favoreció la reacción de migración de acilos, por lo tanto influyó negativamente en la obtención de 1,3-DAG. El efecto negativo de la temperatura se vuelve importante a bajas concentraciones de glicerol. Un modelo de segundo orden en G, representado por la Ecuación 3.11, permitió ajustar el 97.04% de los datos experimentales para la fracción de 1,3-dicaprina, mientras que el valor del estadístico R^2 ajustado fue 94.67%.

$$\% 1,3 \text{ DAG} = 117 + 0.00723GE + 0.00669GT - 0.0490ET - 0.00160G^2 \quad (3.11)$$

En la Figura 3.8 se muestra el efecto de la masa de glicerol y de la dosis de biocatalizador para cada uno de los isómeros de dicaprina cuando se lleva a cabo la reacción de esterificación a 50 °C. Los efectos antes mencionados pueden observarse en los correspondientes gráficos.

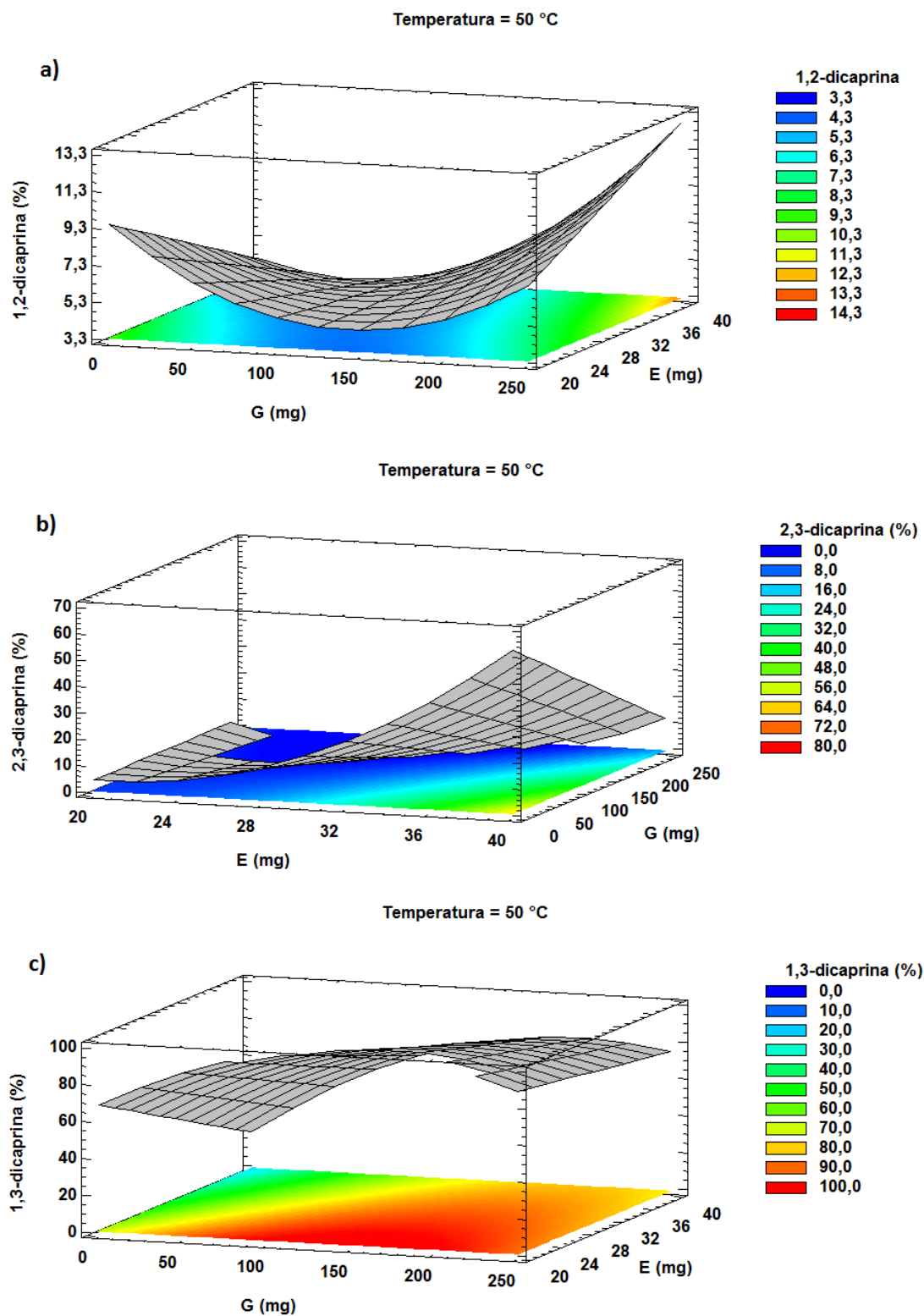


Figura 3.8. Gráficos de superficies de respuesta para las fracciones de isómeros de diacilglicerol. (a) fracción de 1,2-dicaproilglicerol, (b) fracción 2,3-dicaproilglicerol, y (c) fracción de 1,3-dicaproilglicerol.

3.6. Análisis multirespuesta a través de funciones de deseabilidad.

En las secciones anteriores, se evaluaron los efectos de las variables experimentales sobre diferentes respuestas al llevar a cabo la esterificación enzimática de glicerol con ácido cáprico. Fueron desarrolladas regresiones de segundo grado para cada respuesta, y se obtuvieron las condiciones óptimas para las mismas. En esta sección, las respuestas fueron analizadas con el objetivo de obtener un óptimo global. Sin embargo, al considerar todas las respuestas al mismo tiempo, es poco probable lograr el óptimo en el mismo lugar, sobre todo cuando algunas de las respuestas se deben maximizar y otras minimizar. Para este análisis se utilizó el enfoque basado en una función de utilidad llamada "función de deseabilidad". La función de deseabilidad fue introducida por primera vez por Harrington [22], quien sugirió el cálculo de los valores de deseabilidad asociada a cada resultado de un experimento. En la presente sección se ha intentado construir un modelo que maximiza las variables de respuesta seleccionadas (conversión de ácido cáprico, selectividad y rendimiento a dicaprina, etc.), minimizando al mismo tiempo otras variables (fracción de mono- y diglicéridos no específicos y tricaprina). Aunque el número de experimentos en este trabajo es limitado (10 experimentos), hay informes en la literatura sobre el éxito de las aplicaciones de diseño factorial con un número reducido de experimentos para el análisis multi-respuesta con funciones de deseabilidad [24]. La Figura 3.9a y 3.9b muestra la función de deseabilidad obtenida por la maximización de: la conversión de ácido, la selectividad y el rendimiento a dicaprina, la fracción de dicaprina del producto de reacción y la fracción la 1,3-dicaprina respecto al total de isómeros, y minimizando la fracción de mono- y tricaprina y el porcentaje de isómeros inespecíficos de dicaprina. Al llevar a cabo la síntesis con la más alta concentración de glicerol

estudiado, la función de deseabilidad alcanzó valores mayores a 0.53 para todo el rango de temperaturas y dosaje de biocatalizador (Figura 3.9a), alcanzando un valor de 0.80 para la esterificación con 250 mg de glicerol adsorbido sobre gel de sílice, 20 mg de lipasa inmovilizada y en 60 °C. La Figura 3.9b muestra que la cantidad de glicerol fue el principal factor que afecta la función de deseabilidad, ya que promueve la síntesis de dicaprina, pero a su vez minimiza la reacción de migración de acilo y la consiguiente producción de tricaprina. En la Figura 3.9c se presenta la respuesta multivariable resultante de maximizar la conversión y la fracción del diglicérido específico y minimizar las fracciones de los restantes isómeros. En este caso, la función deseabilidad alcanza valores superiores a 0.95 cuando la esterificación se realizó con 250 mg de glicerol, 20 mg de lipasa inmovilizada y a una temperatura de 60 °C. En las condiciones anteriores, los valores de la función de deseabilidad superaron el 0.92 para la mayoría de los casos. Sólo cuando se impuso la minimización de la fracción de monocaprina el valor de la función de deseabilidad descendió a 0,8. La minimización de la fracción monocaprina afecta fuertemente los valores de la función de deseabilidad. Sin embargo, cabe señalar que todos los resultados y las conclusiones extraídas de las funciones de deseabilidad están absolutamente condicionados por el rango de los valores experimentales utilizado en este trabajo. Como las funciones de deseabilidad se basan en modelos generados a partir de los datos experimentales obtenidos dentro de un cierto rango, deben ser analizadas cuidadosamente antes de su aplicación a casos reales o intervalos extendidos, ya que los modelos obtenidos sugieren que los niveles altos de reactivos y las altas temperaturas favorecen la síntesis de diglicéridos específicos, pero no tienen en cuenta los efectos de la inactivación

térmica, la inhibición por ácido, o los problemas de transferencia de masa que podrían producirse debido al alto contenido de glicerol y de gel de sílice.

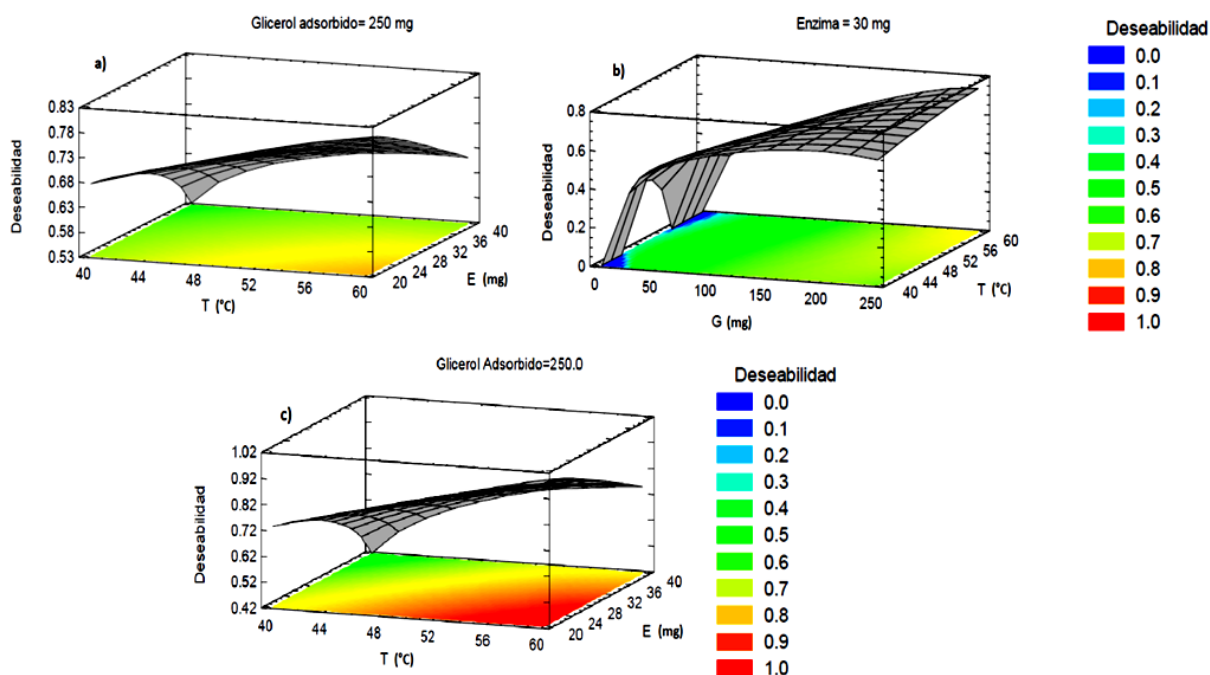


Figura 3.9. Gráficos de superficie de respuesta para las funciones de deseabilidad resultantes de: (a y b) maximización de X_{AC} , Y_{DAG} , σ_{DAG} , %DAG y 1,3-DAG, y la minimización de %MAG, %TAG, 1,2-DAG y 2,3-DAG, (c) maximización de X_{AC} , y 1,3-DAG y minimización de 1,2-DAG y 2,3-DAG.

3.7. Evaluación del rol del soporte en la reacción de migración de acilos

La reacción de migración de acilos fue la responsable de la generación de isómeros no deseados de dicaprina y hasta incluso tricaprina (como se mostró en secciones anteriores). La alternativa a esto sería considerar que la RML no actúa como 1,3 específica, lo cual no está de acuerdo ni con la literatura ni con los resultados obtenidos en éste y otros trabajos del grupo. La existencia de esta reacción secundaria provoca una importante pérdida de rendimiento al diglicérido deseado, una de las principales causas de esta reacción ha sido el incremento de la masa de biocatalizador

empleado. En las secciones siguientes se analiza el rol del soporte de Lipozyme RM IM en la reacción de migración de acilos.

3.7.1. Migración de acilos en monooleína

La lipasa contenida en Lipozyme RM IM fue desactivada siguiendo la metodología presentada en la Sección 2.2.1.6.1 y posteriormente el sólido se puso en contacto con monooleína de pureza cromatográfica tal como se detalla en la Sección 2.2.1.6.2. La monooleína puede adsorberse sobre el soporte de Lipozyme RM IM principalmente por fuerzas hidrofóbicas, por lo cual al finalizar la reacción la temperatura se incrementó a 70 °C y la muestra se sometió a agitación magnética intensa para promover la desorción del monoglicérido.

Después de 6 h de reacción, la composición final de la monooleína fue del 71% sn-2 monooleína y el 29% sn-1 monooleína (se encontró migración de la posición sn-2 a la posición sn-1). Esta migración fue esperada ya que la migración de acilo de la posición sn-2 a las posiciones sn-1/sn-3 está más favorecida termodinámicamente. No se observó migración de acilo de sn-1 a sn-2, este tipo de migración es necesaria para explicar la formación de isómeros de 1,3-dicaprina (esto es 2,3 y 1,2 diglicéridos), isómeros de monoglicéridos 1-MAG y tricaprina.

Se concluye que en estas condiciones el soporte de Lipozyme RM IM no promovió la migración de acilos de sn-1 a sn-2 en monocaprina.

3.7.2. Isomerización en los productos de reacción de esterificación

Del total de monocaprina sintetizado, el 97% correspondió a sn-1 monocaprina y sólo el 3% a sn-2 monocaprina. Para el caso del diglicérido, 96% fue 1,3-dicaprina y 4% fue 1,2-dicaprina. Después de 6 h de reacción utilizando Lipozyme RM IM desactivada (siguiendo el protocolo presentado en la Sección 2.2.1.6.1), la temperatura se elevó a 70 °C y se intensificó la agitación magnética para liberar reactivos que podrían encontrarse adsorbidos en la superficie del sólido. La concentración de ácido no mostró ningún cambio, lo que confirma la desactivación total de la lipasa. La masa total de acilgliceroles tampoco cambió. Isómeros de monocaprina tuvieron la misma composición que la inicial, mientras que en el caso de dicaprina, 95% se trató de 1,3-dicaprina y el 5% restante fue 1,2-dicaprina. La diferencia entre la composición inicial y final fue menor que el error detectado en las mediciones experimentales de la concentración por cromatografía gaseosa (1.6%). Estos resultados mostraron que el soporte (lipasa desactivada) no presentó ninguna actividad en la isomerización de acilo desde las posiciones sn-1/sn-3 a la posición sn-2 en sn-1 (sn-3) mono- o 1,3-diglicéridos.

3.8. ¿Puede la lipasa de *Rhizomucor miehei* catalizar la migración de acilo desde las posiciones sn-1/sn-3 a la posición sn-2 en sn-1 (sn-3) mono- y 1,3-diglicéridos?

En varios manuscritos se ha informado el aumento de la migración de acilo con la temperatura y la cantidad lipasa, pero no se presentaron estudios con el objetivo de explorar este tema en profundidad [13-15]. La falta de participación del soporte del biocatalizador en la migración de acilo hacia la posición sn-2 abre la posibilidad de que la lipasa se comporte como catalizador para la isomerización por migración de acilo. La

reacción podría ser cinéticamente controlada y esto podría estar relacionado con las condiciones locales encontradas en el entorno a la lipasa inmovilizada.

Se consideró la estructura de la RML del *Protein Data Bank* y se analizó el ambiente próximo al sitio activo, en conjunto con la Serina e Histidina de la tríada catalítica.

Teniendo en cuenta que RML es 1,3-específica en disolvente orgánico (como *n*-heptano) para que la reacción de isomerización sea posible deben darse algunas condiciones importantes:

- la Serina con el grupo hidroxilo debe estar disponible para coordinar con el 1,3-diglicérido ó el sn-1/sn-3 monoglicérido. Para que esta reacción sea posible, el mono- o diglicérido debe estar presente a la distancia de enlace del grupo Serina. Cuando la acil enzima está presente (por ejemplo por reacción del ácido graso con la Serina), reacciona con glicerol o con el monoglicérido/diglicérido. En el caso de reaccionar con el sn-1 monoglicérido con el OH en la posición sn-3 se genera el mismo estado de transición que en el caso de la reacción de 1,3-dicaprina a través del acilo en posición sn-3 (ver Figura 3.14).
- Una alta concentración local de 1(3)-monoglicérido entorno a la tríada catalítica. En el caso del monoglicérido, la reacción preferida sería la esterificación de las posiciones sn-1 o sn-3 del monoglicérido en comparación con la reacción de isomerización, especialmente cuando la concentración de ácido cáprico es alta y la acil enzima está presente. Esta sería la explicación de la baja cantidad de 2-

monoglicérido final encontrado en la reacción de esterificación de glicerol (3% de sn-2 monocaprina).

- Una alta concentración local de 1,3-diglicérido entorno a la Serina con el grupo hidroxilo disponible en vez de la acil enzima. Esto es muy probable después de la esterificación del sn-1 o sn-3 monoglicérido y la regeneración del grupo de Serina de la tríada catalítica. La RML es una enzima hidrolítica con alta actividad en la hidrólisis de ésteres [26]. El carbono central de 1,3-dicaprina es aquiral, por lo tanto el hidroxilo está libre en la solución, pero en el entorno de la lipasa la coordinación de 1,3-dicaprina es importante para comprender la isomerización. Con la coordinación de la posición sn-1 o la posición sn-3 y la formación de un intermedio tetraédrico enzimático, el potencial del cambio de hidroxilo de la posición sn-1 o sn-3 a sn-2 está presente. Cuando la Serina ataca uno de los grupos terminales C=O, el carbono central del glicerol se convierte en quiral (véase la Figura 3.13 y 3.14). Sin la presencia de la enzima, el intermedio tetraédrico no se forma, y esta es la razón de la dependencia de la migración de acilo de sn-1 (sn-3) a sn-2 con la cantidad de lipasa. La formación de isómeros de diglicéridos es una reacción en serie con la formación de 1,3-dicaprina o por reacción de los monoglicéridos con la acil enzima. Basados en los resultados experimentales, parece que 2,3-dicaprina fue generada principalmente a altas temperaturas y alto contenido de enzima pero a baja concentración de glicerol, mientras que 1,2-dicaprina fue generada a temperaturas más bajas, elevado contenido de enzima y alta concentración de glicerol.

La Figura 3.10 muestra la isomerización espontánea de 1,2-DAG a 1,3-DAG y de 2-MAG a 1-MAG, tal como fue presentado por Laszlo y colaboradores para glicéridos derivados de ácidos grasos de cadena larga [27].

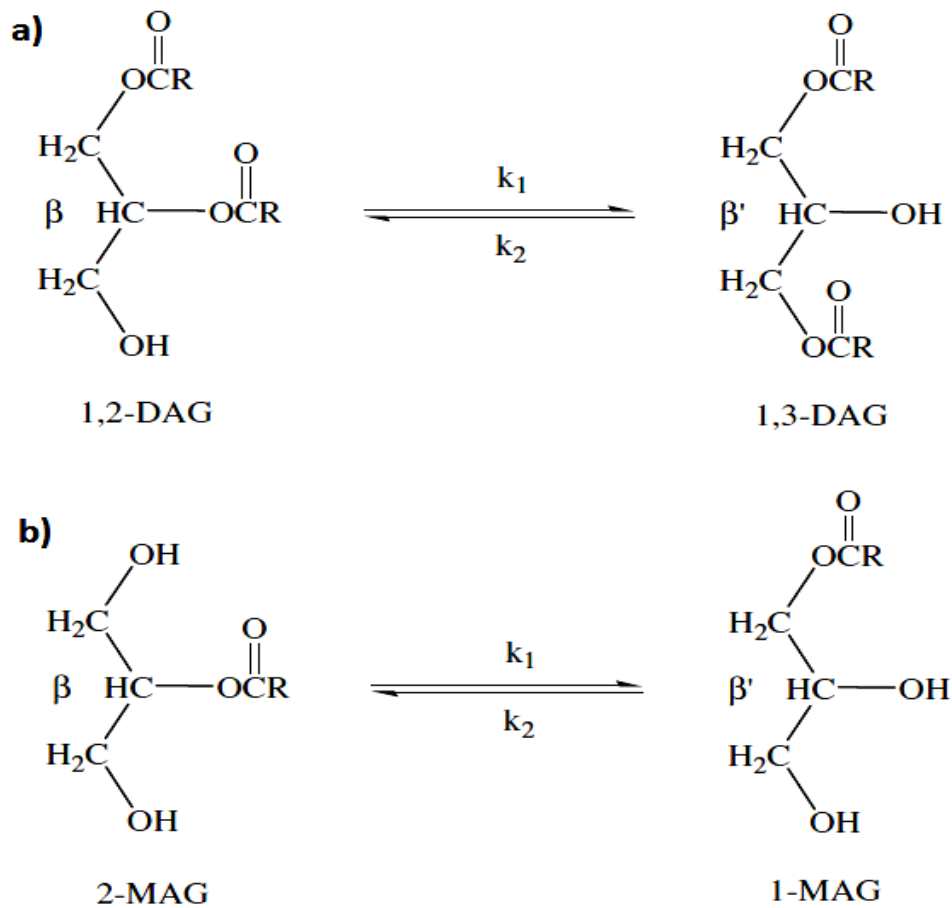


Figura 3.10. Isomerización (migración de acilo) de 1,2-DAG (a) y 2-MAG (b) [27].

En el mencionado trabajo se propuso la formación de un intermediario denominado intermediario cetal, para la isomerización de 1,2 DAG a 1,3 DAG, como se muestra en la Figura 3.11.

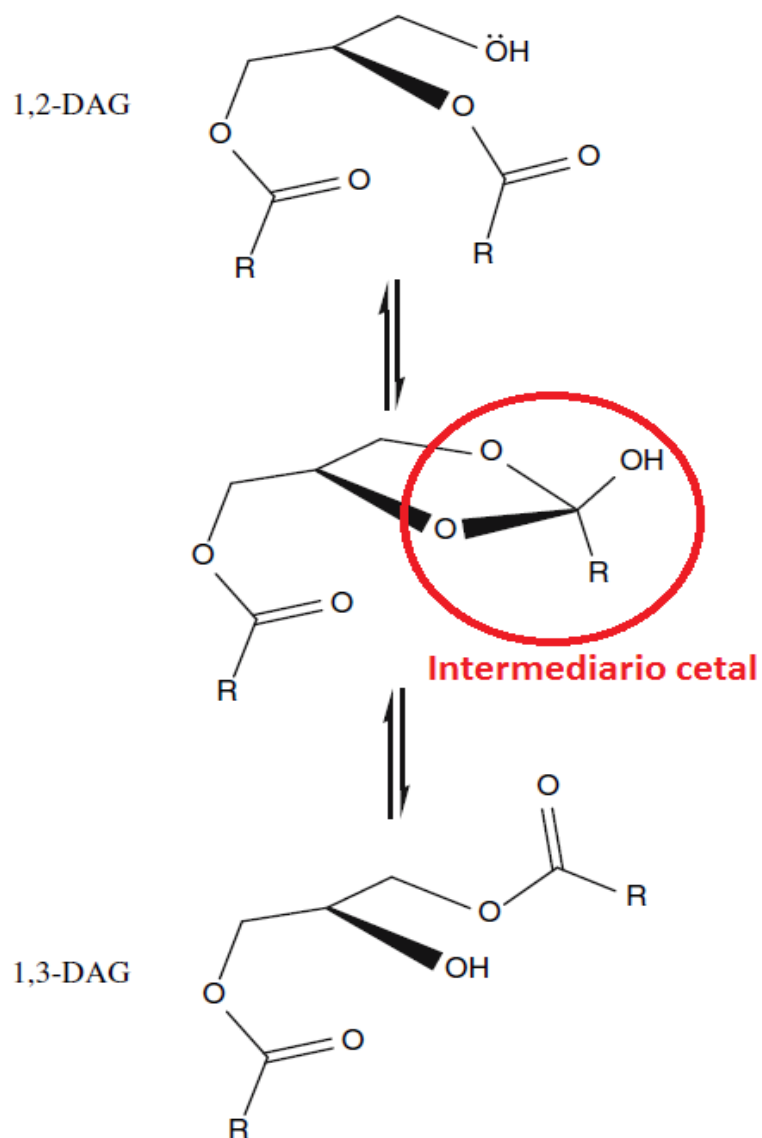


Figura 3.11. Mecanismo de isomerización de acilo para 1,2 DAG a 1,3 DAG [27]. Se destaca en rojo la estructura del intermediario cetal.

El mecanismo a través de un intermediario cetal se ha planteado en estado líquido (no tienen lugar en estado sólido). Se supone que podría estar catalizado por grupos ácidos o básicos. Este mecanismo podría tener lugar en forma espontánea no catalizada en el medio de reacción. En el caso de la enzima, debemos considerar la estructura del sitio activo y la ubicación del compuesto en las cercanías del mismo.

En función a la información disponible en *Protein Data Bank 3tlg* [28] a cerca de la estructura de la RML, es posible observar que esta lipasa tiene en su tríada catalítica a una Serina en posición 144, Histidina en 257 y Aspartato en 203, ubicados espacialmente en forma particular. La Figura 3.12 muestra la coordinación del 1,3-DAG a la Serina de la tríada catalítica.

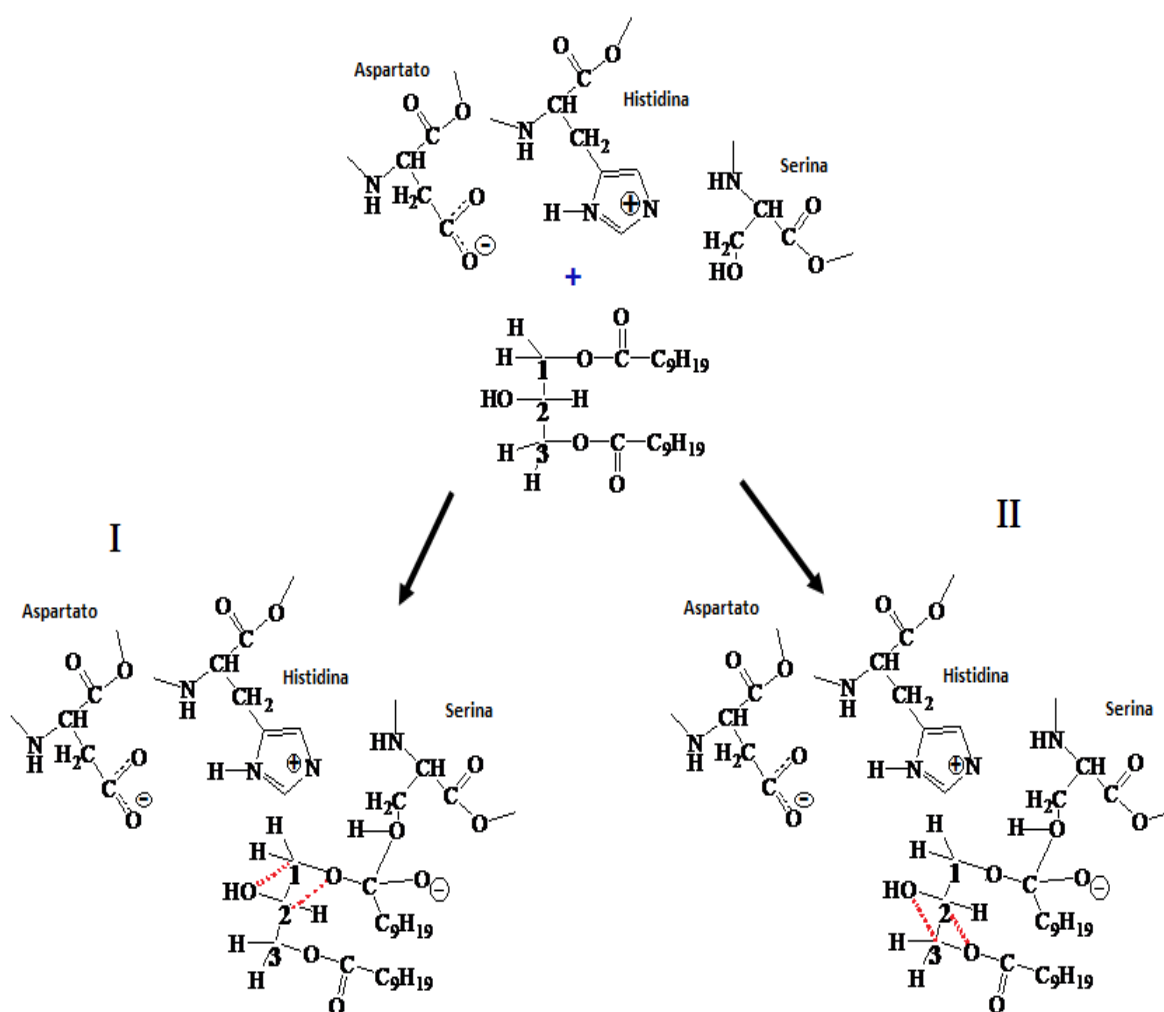


Figura 3.12. Esquema de 1,3-DAG con OH del C2 posicionado cerca de la Histidina. I) Migración de acilos con participación de la Serina y II) migración de acilos mediada por la distribución de cargas del entorno de la tríada catalítica.

En la Figura 3.12 se representan con línea punteada roja la migración y los nuevos enlaces que se generarían. En ambos casos el DAG se coordinó a la Serina y formó el

intermediario. En los esquemas, la coordinación de 1,3-dicaprina se produce a través del carbonilo en posición sn-1, sin embargo se plantean dos posibilidades de migración. En la Figura 3.12I se muestra la migración del acilo en sn-1, el producto de esta migración se muestra en la Figura 13a. Sin embargo, en la Figura 3.12II se muestra la migración de acilo posible desde sn-3 que podría estar catalizada por la distribución de cargas del entorno de la tríada catalítica. El diglicérido resultante de esta reacción se muestra en la Figura 3.13b.

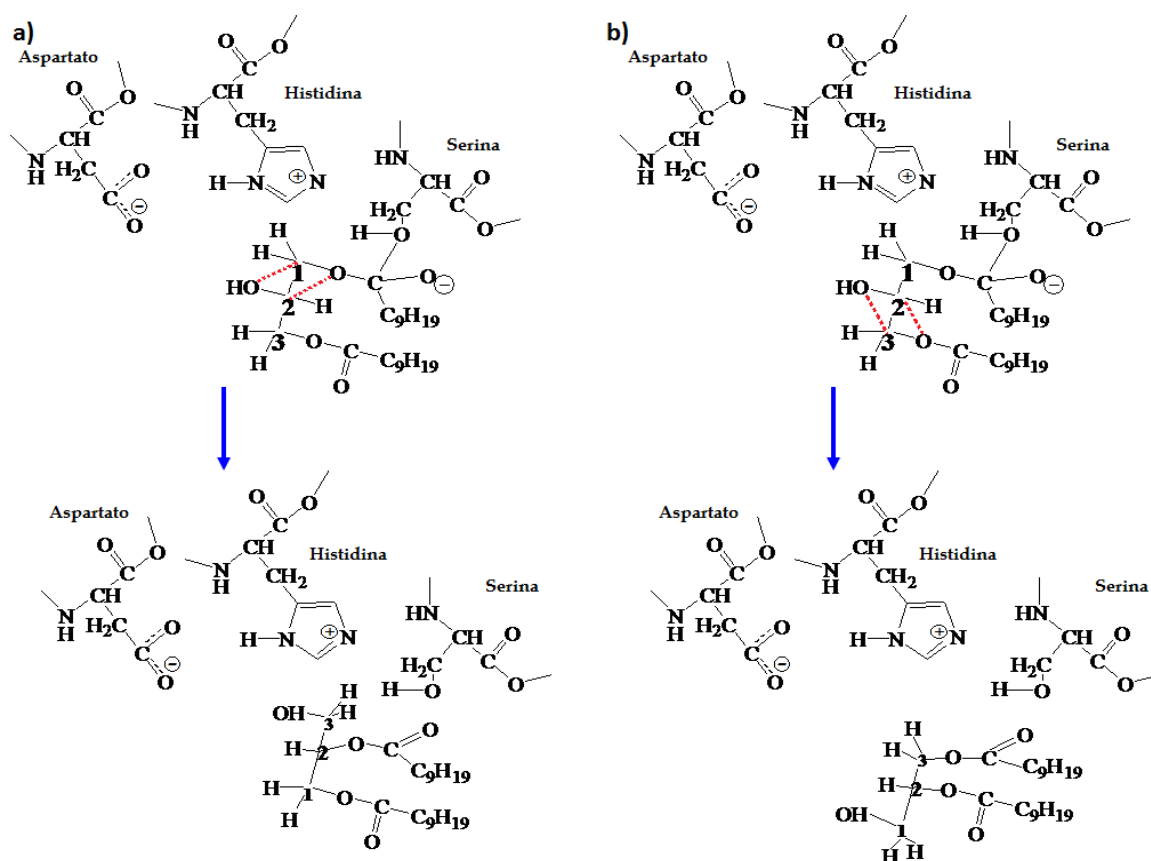


Figura 3.13. Migración de acilos en 1,3-dicaprina. Coordinación a través de la posición sn-1, a) formación de 1,2-dicaprina y b) generación de 2,3-dicaprina.

Si bien las posiciones sn-1 y sn-3 de 1,3-dicaprina son indistinguibles en solución, y el carbono en sn-2 resulta no quiral, cuando se produce la reacción con la Serina y la formación del intermediario tetraédrico, el C2 pasa a ser quiral. El intermediario formado es distinto dependiendo de la posición atacada. En las Figuras 3.12 y 3.13 el intermediario se generó con el OH del C2 cerca de la Histidina. Con el objetivo de observar las diferencias en el intermediario tetraédrico, en la Figura 3.14 se esquematiza la reacción de migración de acilos mediada por la enzima cuando el OH del C2 se encuentra cerca de la Serina.

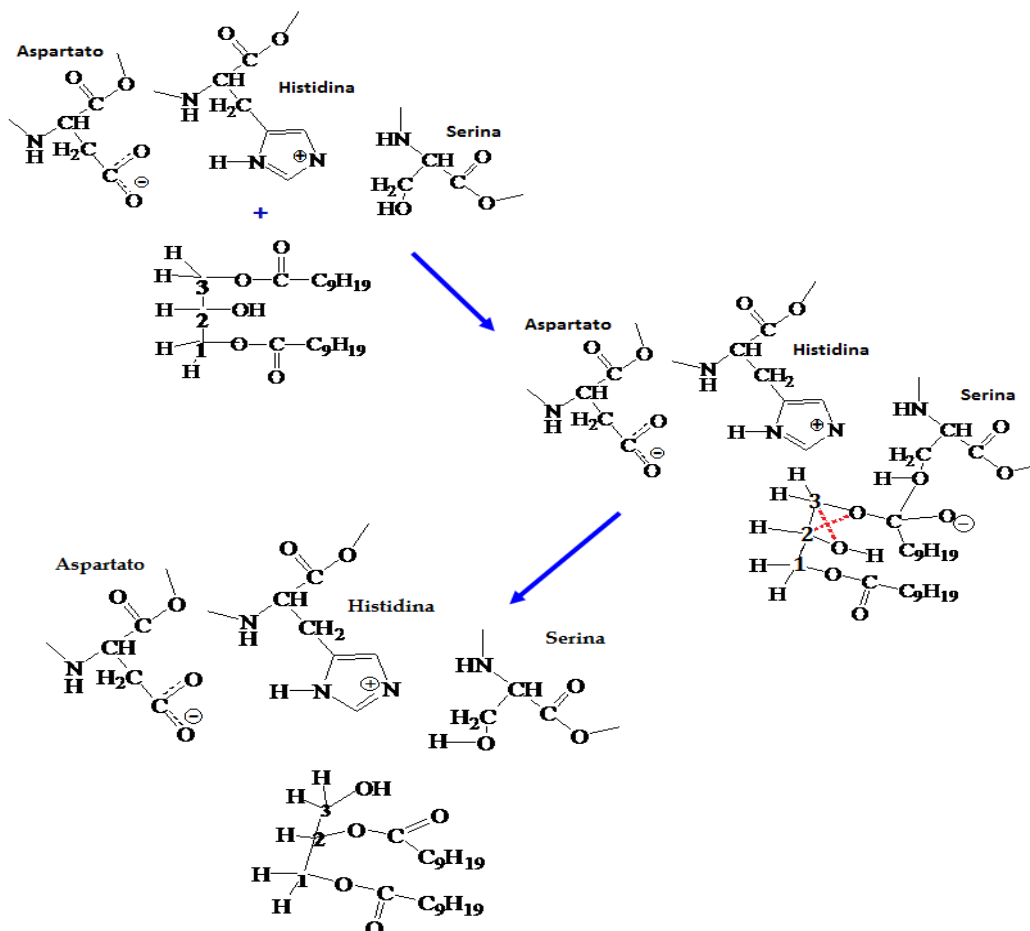


Figura 3.14. Esquema de migración de acilo en 1,3 DAG con OH de C2 posicionado hacia el lado de la Serina.

En función a lo observado en las Figuras 3.12, 3.13 y 3.14, es claro que la interacción por el C1 (Figura 3.12 y 3.13) y la migración de acilo es mucho más simple que en el caso de la interacción por el C3 (Figura 3.14), en donde la migración de acilo estaría menos favorecida debido a impedimentos estéricos. Este impedimento es claramente visible en la Figura 3.15, donde se muestra un visión tridimensional simplificada de la coordinación de la Serina con 1,3-diacetina (como modelo). En la Figura 3.15a se esquematiza la coordinación a través del acilos en posición sn-3, donde el impedimento estérico para la migración es mayor. Mientras que en la Figura 3.15b se representa la coordinación de la Serina con el acilo en posición sn-1, situación en la cual la migración de acilos sería más plausible.

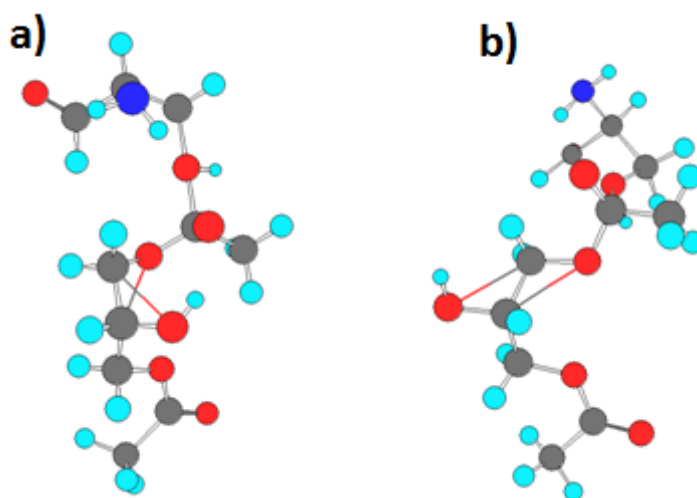


Figura 3.15. Representación tridimensional de la coordinación de 1,3-diacetina con la Serina de la tríada catalítica. a) Interacción a través del acilo en posición sn-3 y b) interacción a través del acilo en posición sn-1.

La formación del intermediario tetraédrico puede ocurrir por:

- por coordinación de 1,3 DAG, sobre todo a través de la posición sn-1, en función a lo antes descrito.

- por coordinación de un monoglicérido a la acil enzima (Figura 3.16)

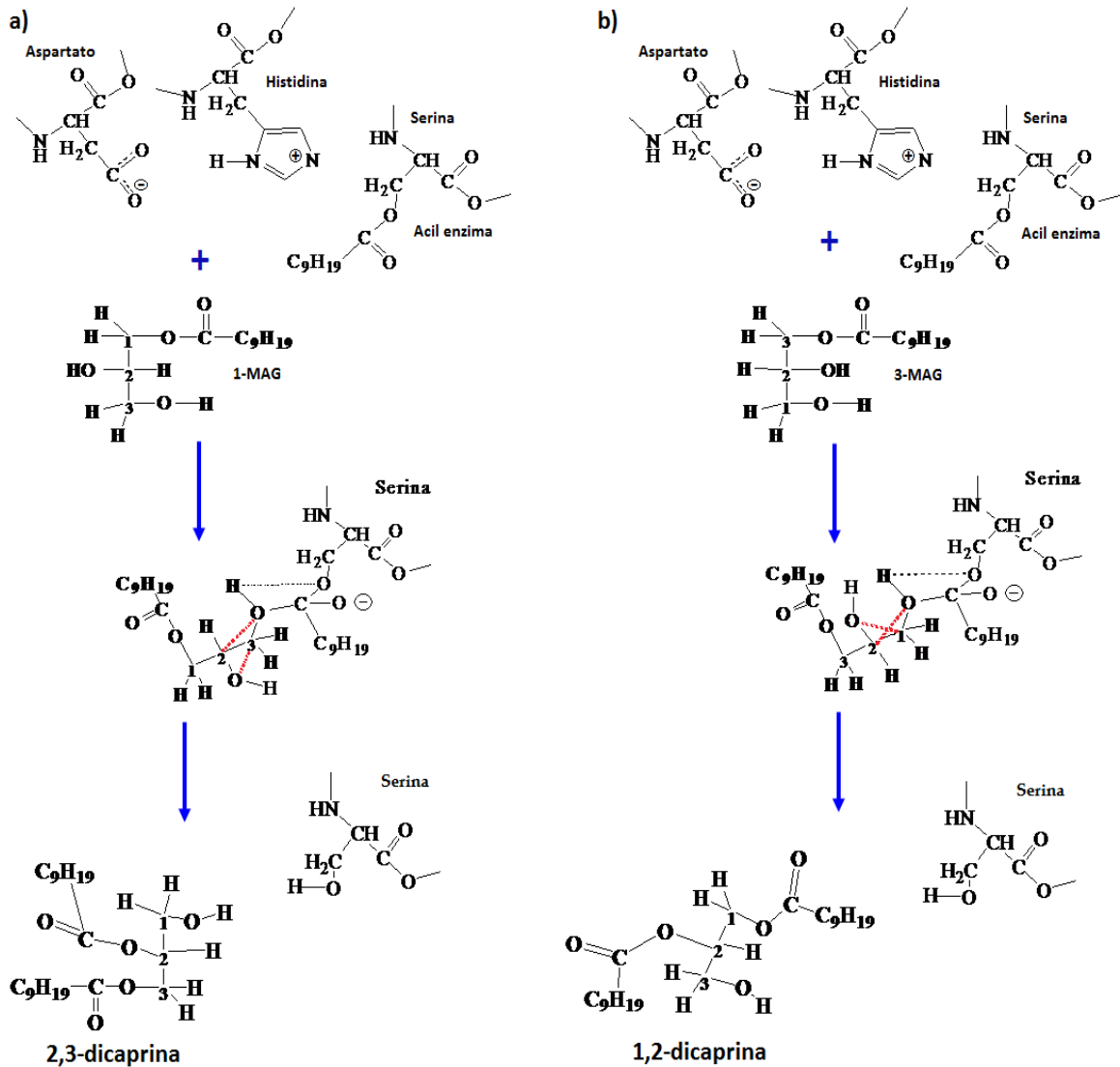


Figura 3.16. Migración de acilos luego de la coordinación de monoglicéridos con la acil enzima. a) generación de 2,3-dicaprina y b) formación de 1,2-dicaprina

Luego de la interacción del monoglicérido con la acil enzima, la isomerización de acilo sería el mecanismo por el cual se generarían 1,2-diglicérido y 2,3-diglicérido. Mediante una simple visualización, es claro que la formación de 2,3-diglicérido se encuentra estéricamente favorecida.

En función al análisis del entorno estérico del sitio activo de lipasa resulta evidente que la migración de acilos por coordinación de diglicéridos con la Serina es más probable cuando la misma ocurre a través de la posición sn-1. Tanto la Serina de la tríada catalítica como el entorno del sitio activo podrían participar en la migración. Cuando se considera la participación de los grupos Serina en la isomerización de 1,3-dicaprina, el producto formado es 1,2-dicaprina. Cuando la migración de acilos ocurre posteriormente a la reacción de la acil enzima con monoglicéridos, el producto más probable es 2,3-dicaprina.

Los resultados experimentales mostraron que la síntesis de isómeros se vió afectada principalmente por la masa de la enzima y la temperatura, como es de esperar si la isomerización se controla cinéticamente. La migración de acilo fue mayor cuando el glicerol estuvo presente en baja concentración, en estas condiciones la concentración relativa de tricaprina fue muy alta, sobre todo con cantidades altas de enzima. Después del tiempo de reacción, fue encontrada la 1,2-dicaprina remanente. Al parecer la tricaprina se formó por esterificación de la posición sn-3 de 1,2 dicaprina.

Los resultados experimentales muestran que la posición sn-1 es la preferentemente esterificada en glicerol. Sin embargo, cuando la posición sn-2 se encuentra esterificada, la posición sn-3 parece ser la preferencialmente esterificada. Esto implica que la propuesta para la formación de tricaprina es:



y en menor proporción



Siendo G posición con OH y C posición ocupada por ácido cáprico en el glicérido. Tal propuesta coincide con los resultados obtenidos en reacciones llevadas a cabo con baja concentración de glicerol y elevada carga de biocatalizador (Tabla 3.1, ensayos 9 y 10).

La propuesta presentada aquí pretende evaluar cómo el entorno estérico en proximidades al sitio activo de la enzima puede generar las condiciones para explicar, aunque parcialmente, los resultados experimentales. Se planea continuar con el análisis de migración de acilos promovida por la lipasa mediante el empleo de técnicas de simulación molecular. Cabe destacar que la isomerización analizada es la correspondiente a la migración de acilos de las posiciones sn-1/sn-3 a sn-2, sin embargo la migración termodinámicamente más favorecida (de sn-2 a sn-1/sn3) también podría estar presente. La composición de productos finales es consecuencia de ambas.

Como comentario final, la acidólisis de triglicéridos es mucho menos eficiente que la esterificación de glicerol en términos de productividad, pero casi no hay migración de acilo, especialmente con ácido cáprico [29]. Esto hace evidente que la presencia de un hidroxilo en la posición sn-2 en los glicéridos es clave para hacer esta propuesta posible.

3.9. Conclusiones

El estudio realizado en este capítulo mostró que la forma comercial inmovilizada de la lipasa 1,3-específica de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) es un buen catalizador para la síntesis de 1,3-dicaproylglicerol mediante la esterificación de glicerol con ácido cáprico en solvente orgánico. El análisis de los efectos de algunos de los parámetros de reacción seleccionados utilizando un diseño experimental mostró que la síntesis de 1,3-dicaproylglicerol se vio favorecida por el uso de altas cantidades de glicerol adsorbido sobre gel de sílice. El aumento de la temperatura exhibió un efecto ligeramente positivo sobre la producción de 1,3-dicaprina, mientras que el incremento de la dosis de lipasa inmovilizada tuvo un efecto negativo sobre la fracción final de este isómero. Los resultados también mostraron que, dependiendo de las condiciones experimentales, el porcentaje molar de tricaprina en el producto de reacción varió entre 4% y 52%. La productividad relativa máxima de 1,3-dicaprina fue del 55%. Los datos experimentales permitieron respaldar la propuesta de que el intermedio tetraédrico de la síntesis enzimática de 1,3-dicaprina pueden sufrir la migración de acilo, mientras que el soporte de Lipozyme RM IM no fue activo para catalizar la reacción de isomerización.

Los resultados y conclusiones del presente capítulo dieron origen a la siguiente publicación:

Sánchez, D. A., Tonetto, G. M., Ferreira M. L. (2014). *Enzymatic synthesis of 1,3-dicaproylglycerol by esterification of glycerol with capric acid in an organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 100:7–18.*

3.10. Referencias

- [1] Gunstone, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:1535-1549.
- [2] Fureby, A. M., Tian, L., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1997). Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:198-206.
- [3] D'alonzo, R. P., Kozarek, W. J., Wade, R. L. (1982). Glyceride composition of processed fats and oils as determined by glass capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59:292-295.
- [4] De Guzman, D. (2001). Kao's fat-reducing DAG oil scheduled for US introduction. *Chem. Market Rep*, 259.
- [5] Meng, X., Zou, D., Shi, Z., Duan, Z., Mao, Z. (2004). Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, 39:37-41.
- [6] Maki, K. C., Davidson, M. H., Tsushima, R., Matsuo, N., Tokimitsu, I., Umporowicz, D. M., Frost, S. D. (2002). Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *The American journal of clinical nutrition*, 76:1230-1236.
- [7] Taguchi, H., Watanabe, H., Onizawa, K., Nagao, T., Gotoh, N., Yasukawa, T., Itakura, H. (2000). Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 19:789-796.
- [8] Murase, T., Aoki, M., Wakisaka, T., Hase, T., Tokimitsu, I. (2002). Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism. *Journal of lipid research*, 43:1312-1319.
- [9] Sonntag, N. O. (1982). Glycerolysis of fats and methyl esters—status, review and critique. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 59:795A-802A.
- [10] Nouredini, H., Harmeier, S. E. (1998). Enzymatic glycerolysis of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:1359-1365.
- [11] McNeill, G. P., Yamane, T. (1991). Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68:6-10.
- [12] Watanabe, Y., Shimada, Y., Yamauchi-Sato, Y., Kasai, M., Yamamoto, T., Tsutsumi, K., Sugihara, A. (2002). Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:891-896.

- [13] Kristensen, J. B., Xu, X., Mu, H. (2005). Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82:329-334.
- [14] Waldinger, C., Schneider, M. (1996). Enzymatic esterification of glycerol III. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1, 3-sn-diacylglycerols and 1 (3)-rac-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73:1513-1519.
- [15] Watanabe, T., Shimizu, M., Sugiura, M., Sato, M., Kohori, J., Yamada, N., Nakanishi, K. (2003). Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1, 3-regiospecific lipase lipozyme RM IM. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80:1201-1207.
- [16] Zhong, N., Gui, Z., Xu, L., Huang, J., Hu, K., Gao, Y., Li, B. (2013). Solvent-free enzymatic synthesis of 1, 3-Diacylglycerols by direct esterification of glycerol with saturated fatty acids. *Lipids in health and disease*, 12:1-7.
- [17] Lei, Q., Lee, W. L., Li, T. (2013). Design and synthesis of 1, 3-dicapryloyl-2-acetyl-glycerol as molecular probe for triacylglycerol metabolism study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115:232-238.
- [18] Haas, M. J., Fox, P. S., Foglia, T. A. (2011). Lipase-catalyzed synthesis of partial acylglycerols of acetoacetate. *European journal of lipid science and technology*, 113:168-179.
- [19] Brüsweiler, H., Dieffenbacher, A. (1991). Determination of mono- and diglycerides by capillary gas chromatography: results of a collaborative study and the standardized method. *Pure and applied chemistry*, 63:1153-1162.
- [20] Páez, B. C., Medina, A. R., Rubio, F. C., Moreno, P. G., Grima, E. M. (2003). Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and microbial technology*, 33:845-853.
- [21] Yang, T., Fruekilde, M. B., Xu, X. (2005). Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food chemistry*, 92:101-107.
- [22] Xu, X. (2000). Enzymatic production of structured lipids: Process reactions and acyl migration. *Inform*, 11:1121-1131.
- [23] Watanabe, T., Sugiura, M., Sato, M., Yamada, N., Nakanishi, K. (2005). Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, 40:637-643.

- [24] Harrington, E. C. (1965). The desirability function. *Industrial quality control*, 21:494-498.
- [25] Baş, D., Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836-845.
- [26] Gutiérrez-Ayesta, C., Carelli, A. A., Ferreira, M. L. (2007). Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and microbial technology*, 41:35-43.
- [27] Joseph A. Laszlo, J. A., Compton, D. L., Vermillion, K. E. (2008). Acyl Migration Kinetics of Vegetable Oil 1,2-Diacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85:307–312
- [28] Lipase Rhizomucor miehei open state PDB 4tgl, <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=4tgl>
- [29] Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66:15-32.
- [30] Rodriguez, J. A., Mendoza, L. D., Pezzotti, F., Vanthuyne, N., Leclaire, J., Verger, R., Fotiadu, F. (2008). Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases. *Analytical biochemistry*, 375:196-208.
- [31] Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food chemistry*, 127:993-998.

4. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DIACILGLICÉRIDOS OBTENIDOS MEDIANTE ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA USANDO EXTRACCIÓN CON SOLVENTE

4.1. Introducción

La presente tesis se centra en la síntesis en dos etapas de mezclas de acilglucéridos con alto valor nutricional mediante reacciones enzimáticas, de las cuales el triglicérido estructurado del tipo MLM es un componente muy importante.

Los triglicéridos estructurados (TE) conteniendo una mezcla de ácidos grasos de cadena media (AGCM) y ácidos grasos de cadena larga (AGCL) en la misma molécula han sido diseñados para fines médicos y nutricionales. La colocación de un ácido graso de cadena larga (L) en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol, particularmente si está saturado, aumenta la digestibilidad de los triglicéridos del tipo MLM, estando en la posición sn-1 y sn-3 un ácido graso de cadena media (M). Como se ha indicado en los capítulos anteriores, estos TE son útiles para el sistema inmunológico y mejoran la eliminación de lípidos en los tejidos, teniendo aplicación en la prevención de la obesidad y sus trastornos médicos asociados [1-3].

Varios autores han informado de un proceso de dos etapas para la síntesis de estos TAG [4-7]. En el primer paso, se obtienen 2-monoacilglicéridos (2-MAG) (a partir de aceites vegetales o de triglicéridos con los ácidos grasos deseados) por alcoholólisis enzimática utilizando lipasas 1,3-específicas. En el segundo paso, se añaden AGCM en las posiciones extremas del 2-MAG por esterificación enzimática ó también puede llevarse a cabo con un catalizador heterogéneo.

La recuperación de los intermediarios de reacción también ha sido estudiada. Esteban y colaboradores [8] reportaron un proceso de extracción. Sin embargo, se centraron en la recuperación de monoglicéridos, separándolos de etil ésteres. Un procedimiento similar fue descrito por Irimescu y colaboradores [9], pero utilizando solventes tóxicos como cloroformo. La neutralización del ácido cáprico remanente también se ha estudiado como una etapa de purificación previa [10]. Sin embargo, no fue estudiada la concentración apropiada de la solución de KOH, debido a que la muestra evaluada contenía sólo triglicéridos.

La síntesis enzimática de 1,3-diacilglicerol (1,3-DAG) puede ser el primer paso para la síntesis del triglicérido estructurado MLM deseado. Pero los 1,3-DAG son importantes en sí mismos. Las características metabólicas de DAG han sido ampliamente estudiadas. Resultados de estudios clínicos mostraron que 1,3-DAG son eficaces en la prevención de la obesidad [11,12] y reducen la acumulación de triglicéridos en tejidos [13,14].

En este capítulo se presentan los estudios relacionados con la separación de los productos de reacción de la síntesis de 1,3-diacilglicerol, específicamente 1,3-dicaprina (CGC). La misma se llevó a cabo mediante esterificación enzimática de glicerol con ácido cáprico (C) usando como biocatalizador una forma inmovilizada de una lipasa de *Rhizomucor miehei*, específica para las posiciones sn-1 y sn-3 (Lipozyme RM IM) tal como se presentó en la Sección 2.2.1.2 y analizada en detalle en el Capítulo 3. Sin embargo, para maximizar la obtención de un triglicérido específico, es necesario purificar el producto intermediario de reacción, ya que en la primera etapa, además

del diglicérido específico generado se obtienen monocaprina, diglicéridos inespecíficos (generados por la migración de acilo) y tricaprina (CCC). Por supuesto, también hay que considerar el ácido graso remanente.

Se evaluaron diferentes solventes utilizando un programa computacional para seleccionar aquellos que permitieran la separación de dicaprina del resto de los productos presentes en la mezcla. Una vez seleccionados los solventes (teniendo en cuenta la toxicidad de los mismos), se llevó a cabo la separación de acilglicerolos presentes en el producto de reacción, realizando previamente la neutralización de ácido cáprico remanente con una solución de KOH.

4.2. Selección de solvente

Usando el programa Ecofac 1.0 se obtuvieron los valores de selectividad, poder solvente, y coeficiente de distribución del soluto para evaluar cada separación y solvente propuesto. Basados en estos resultados, se seleccionó la combinación más adecuada de solventes para maximizar la separación.

La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos para la extracción con solvente del monoglicérido de una mezcla de monocaprina y dicaprina. Los solventes marcados en gris permitirían una adecuada extracción líquido-líquido. La mezcla resultante o solución mezcla residual se identifica como “mezcla residual” de aquí en adelante.

Tabla 4.1. Extracción con solvente de monocaprina de una mezcla conteniendo monocaprina-dicaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Metanol	2.65	3595.36	120.28
Ácido acético	1.48	3139.38	105.02
Etanol	2.61	1183.92	39.61
Propanol	1.63	806.76	26.99
Acetona	0.25	730.83	24.45
<i>t</i> -Butanol	1.25	513.71	17.19
Cloroformo	0.01	240.40	8.04
Dietiléter	0.03	181.18	6.06
<i>n</i> -Heptano	0.01	0.77	0.03

La Tabla 4.2 muestra los resultados de la evaluación de los solventes adecuados para la separación de monocaprina de una mezcla conteniendo mono- y tricaprina. Una vez más, solventes destacados en gris son los mejores candidatos para esta separación.

Tabla 4.2. Extracción con solvente de monocaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y tricaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Metanol	26.05	3595.36	620.19
Ácido acético	6.58	3139.38	541.54
Etanol	20.95	1183.92	204.22
Dietiléter	0.00	941.32	162.38
Propanol	8.50	806.76	139.17
Acetona	0.23	730.83	126.07
<i>t</i> -Butanol	5.15	513.71	88.61
Cloroformo	0.00	240.40	41.47
<i>n</i> -Heptano	0.00	0.77	0.13

Metanol, ácido acético, etanol y propanol se presentan como los mejores solventes para la extracción de monocaprina, separándola de los restantes acilglicéridos. De los mencionados solventes, etanol sería el más apropiado debido a su baja toxicidad y alta presión de vapor a temperaturas bajas y presión atmosférica.

En las Tablas 4.3 y 4.4 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la extracción con solvente de dicaprina separándola de mono- y tricaprina, respectivamente. Entre los solventes ensayados no hay un único solvente que permite la extracción de la dicaprina, separándolo de los restantes acilglicéridos presentes en la mezcla.

Tabla 4.3. Extracción con solvente de dicaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y dicaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Cloroformo	108.48	26078.22	383.22
Dietiléter	34.16	6189.71	90.96
Acetona	3.99	2918.95	42.89
Ácido acético	0.67	2116.78	31.11
Metanol	0.38	1356.12	19.93
Propanol	0.61	493.70	7.25
Etanol	0.38	454.20	6.67
<i>t</i> -Butanol	0.80	409.83	6.02
<i>n</i> -Heptano	81.01	62.44	0.92

Tabla 4.4. Extracción con solvente de dicaprina de una mezcla conteniendo dicaprina y tricaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Cloroformo	0.03	26078.22	533.59
Dietiléter	0.11	6189.71	126.65
Acetona	0.91	2918.95	59.72
Ácido acético	4.44	2116.78	43.31
Metanol	9.83	1356.12	27.75
Propanol	5.20	493.70	10.10
Etanol	8.04	454.20	9.29
<i>t</i> -Butanol	4.11	409.83	8.39
<i>n</i> -Heptano	0.06	62.44	1.28

Las Tablas 4.5 y 4.6 muestran los resultados teóricos obtenidos con el programa Ecofac 1.0 para evaluar el desempeño de los solventes en la extracción de tricaprina de mezclas con monocaprina y dicaprina, respectivamente. Cloroformo, éter dietílico,

acetona y *n*-heptano se presentaron como posibles solventes para extraer el triglicérido, siendo *n*-heptano el más adecuado debido a su baja toxicidad relativa y a la posibilidad de extracción en vacío.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el programa, el procedimiento de extracción se diseñó usando combinaciones de *n*-heptano y etanol.

Tabla 4.5. Extracción con solvente de tricaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y tricaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Cloroformo	3842.57	--	--
Dietiléter	301.43	54612.23	3968.04
Acetona	4.37	3194.51	232.11
<i>n</i> -Heptano	1434.83	1106.07	80.36
Ácido acético	0.15	477.13	34.67
Metanol	0.04	138.02	10.03
<i>t</i> -Butanol	0.19	99.73	7.25
Propanol	0.12	94.96	6.90
Etanol	0.05	56.51	4.11

Tabla 4.6. Extracción con solvente de tricaprina de una mezcla conteniendo dicaprina y tricaprina.

Solvente	Selectividad	Poder Solvente	Coef. de Distribución
Cloroformo	35.42	--	--
Dietiléter	8.82	54612.23	617.73
Acetona	1.09	3194.51	36.13
<i>n</i> -Heptano	17.71	1106.07	12.51
Ácido acético	0.23	477.13	5.40
Metanol	0.10	138.02	1.56
<i>t</i> -Butanol	0.24	99.73	1.13
Propanol	0.19	94.96	1.07
Etanol	0.12	56.51	0.64

Con *n*-heptano, los triglicéridos pueden ser extraídos y los restantes acilglicéridos permanecen en la fase etanólica. Después de la separación de la tricaprina, la dicaprina y monocaprina podrán ser separadas empleando los mismos solventes. En las siguientes secciones del presente capítulo se estudia la extracción con solvente utilizando sólo *n*-heptano y etanol con el fin de verificar los resultados teóricos. Volúmenes relativos de muestra y solventes y el número de etapas de tratamiento se analizarán como parámetros importantes en el procedimiento general.

4.3. Neutralización de ácido cáprico

La mezcla final de esterificación contiene monocaprina, dicaprina, tricaprina y ácido cáprico remanente. Todos estos compuestos están disueltos en el solvente de reacción, *n*-heptano. Los productos fueron detectados siguiendo el método cromatográfico presentado en la Sección 2.2.1.5.4 y la identificación de cada uno de los productos se detalló en la Sección 3.3.

La purificación de dicaprina, obtenida como el producto de la reacción de esterificación, se realizó mediante extracción con solventes. El ácido sin reaccionar se neutralizó previamente con una solución acuosa de KOH tal como se describe en la Sección 2.2.1.7.2. La Tabla 4.7 muestra el desempeño de las soluciones alcalinas con diferentes concentraciones.

Puede observarse que la solución de hidróxido no sólo permite la neutralización del ácido y la eliminación del mismo de la fase de heptano, sino que también permite la eliminación del monoglicérido.

Tabla 4.7. Desempeño de diferentes soluciones de KOH para la neutralización de ácido cáprico y extracción de acilglicéridos.

Concentración de KOH	Neutralización de ácido (%)	Porcentaje de eliminación de monocaprina	Porcentaje de pérdida de dicaprina	Eliminación porcentual de tricaprina
1M	100	99	53	38
0.5 M	99	97	7	5
0.25 M	98	92	5	2
0.1 M	93	82	3	0
0.05 M	40	38	0	0

La solución de KOH debe ser capaz de neutralizar la totalidad del ácido, y a la vez minimizar las pérdidas de los productos de interés, en este caso el diglicérido. Con este objetivo, se realizaron dos etapas de lavado con una solución alcalina de concentración 0,1 M. La primera etapa permitió la neutralización y separación de 93% del ácido cáprico y 82% del monoglicérido con la pérdida de 3% de diglicérido y sin extracción de triglicéridos. La segunda etapa permite la eliminación del 99.5% de total de ácido y 95% de monocaprina. En este proceso de neutralización se perdió 4.5% de dicaprina y 4% de tricaprina.

La Figura 4.1 muestra los cromatogramas de la muestra antes y después de la neutralización con solución acuosa 0,1 M de KOH.

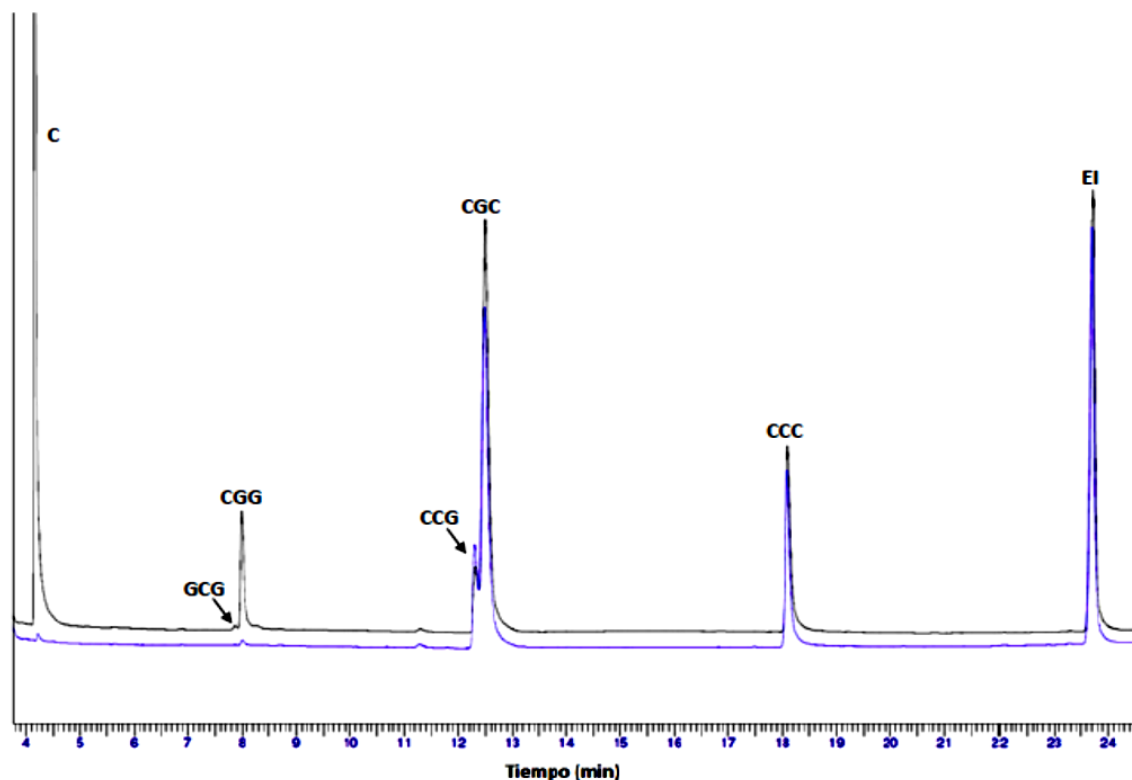


Figura 4.1. Cromatogramas correspondientes a las muestras de reacción de esterificación antes y después de la neutralización en dos etapas con solución 0.1M de KOH. La muestra inicial contenía 52 mg de ácido cáprico, 4 mg de monocaprina, 28 mg de dicaprina y 12 mg de tricaprina.

4.4. Extracción líquido-líquido

Una muestra inicial conteniendo 122 mg de dicaprina y 74 mg de tricaprina disueltos en *n*-heptano, con volumen total de 12.5 mL, se sometió al proceso de separación como se describe en el Capítulo 2 (Sección 2.2.1.7.3).

En la primera etapa de extracción se recuperó 94% de la dicaprina inicial (115 mg) con una pureza del 89%. Para aumentar la pureza de la diglicérido extraído, las fases etanólicas obtenidas se combinaron, y se lavaron con un volumen igual de *n*-heptano. En esta etapa se perdieron 47 mg de dicaprina, pero la pureza del diglicérido aumentó al 97%.

Una tercera etapa de separación se llevó a cabo con el objetivo de recuperar una mayor proporción de dicaprina y con alta pureza. En esta etapa 45 mg de dicaprina se recuperaron, sin embargo, la pureza fue sólo del 80%. Usando el procedimiento general (con las tres etapas de extracción), 113 mg del diglicérido se recuperaron con 89% de pureza. Es evidente entonces que los resultados arrojados por un proceso en tres etapas no representan ninguna mejora en comparación con un proceso consistente sólo en la primera etapa.

Las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 muestran un esquema del procedimiento y el rendimiento de cada una de las etapas de separación.

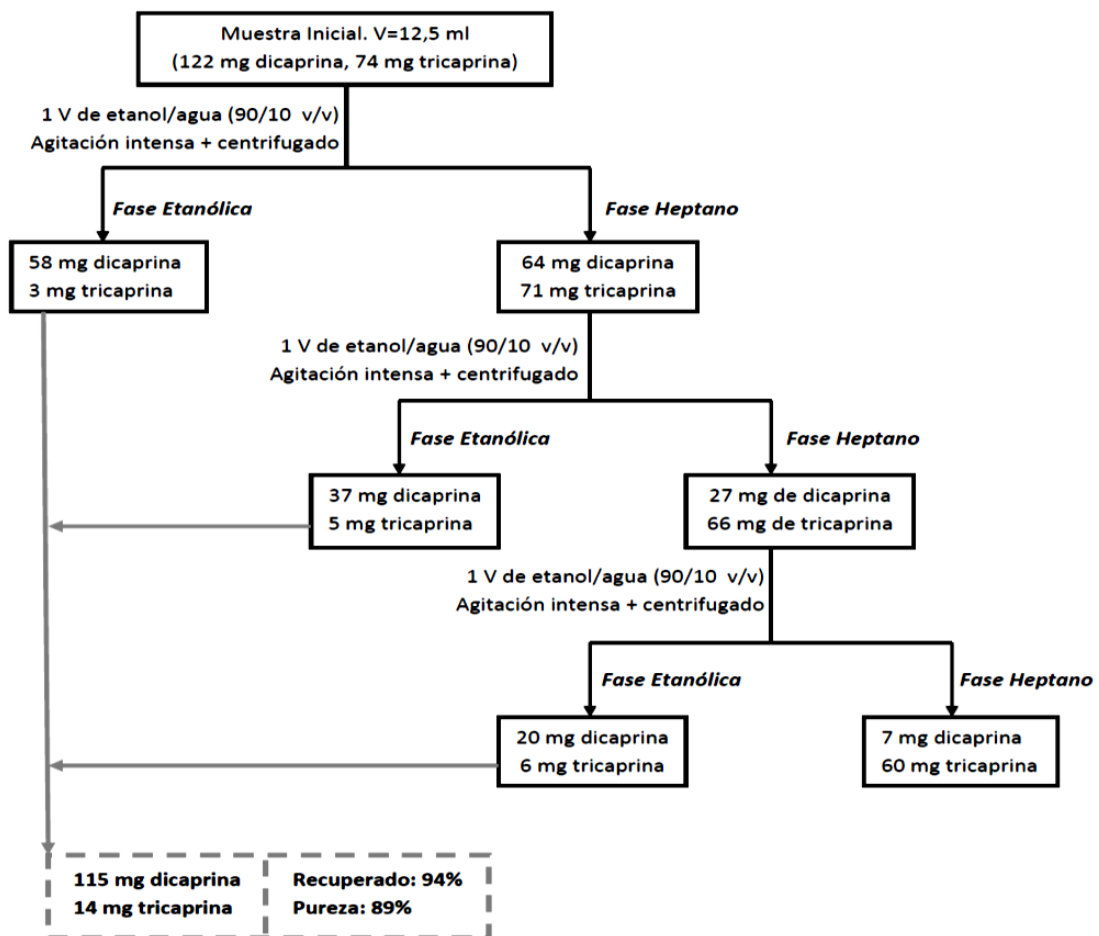


Figura 4.2. Esquema y resultados de la primera etapa de extracción.

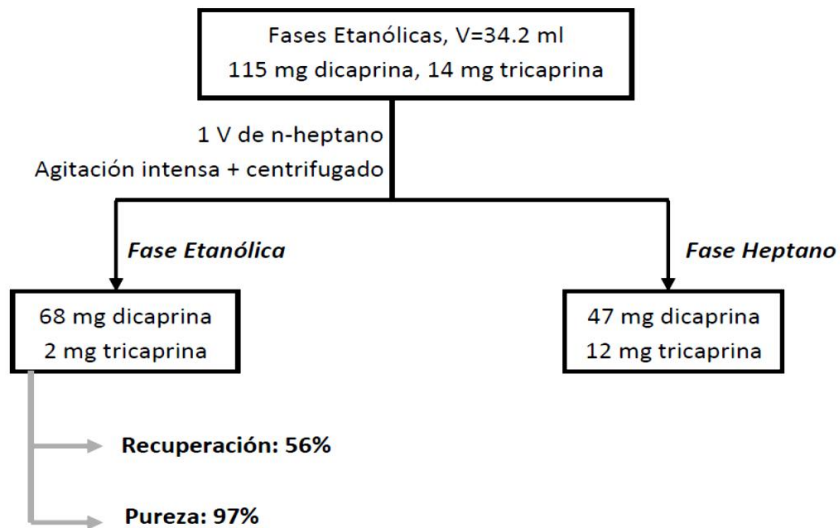


Figura 4.3. Esquema y resultados de la segunda etapa de extracción

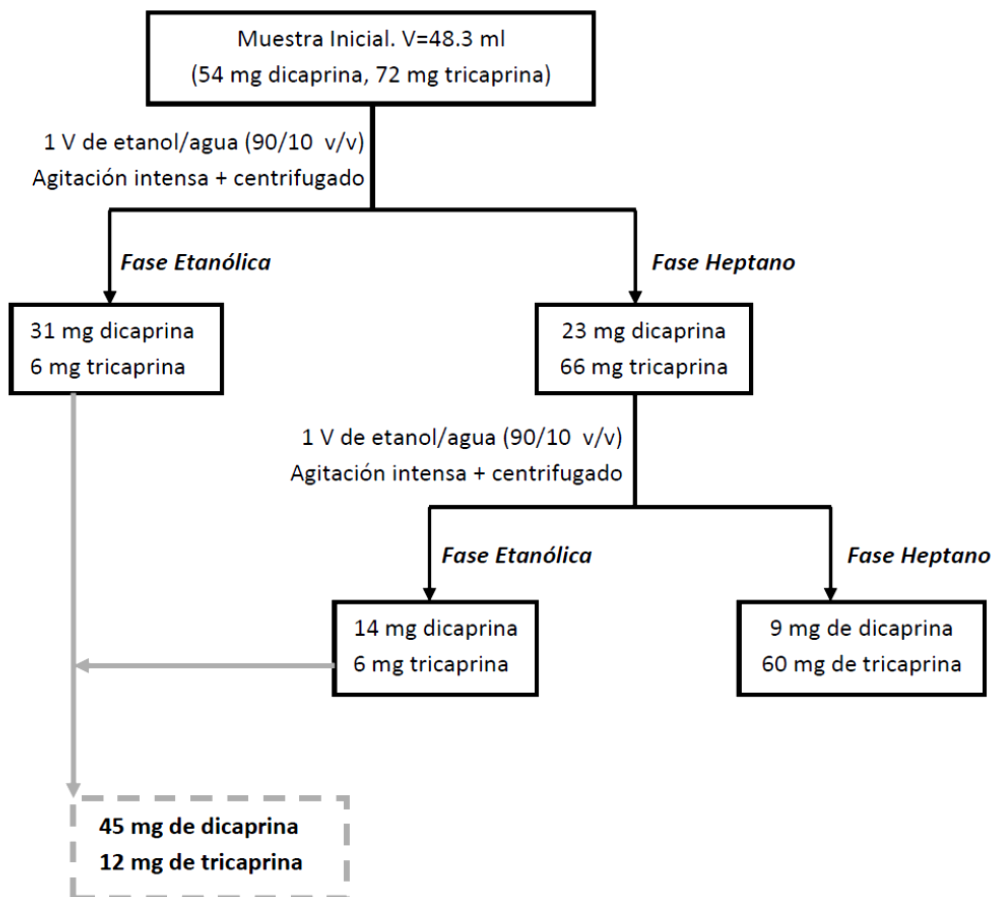


Figura 4.4. Esquema y resultados de la tercera etapa de extracción

Como era de esperar, existe una estrecha relación entre la fracción de dicaprina recuperada y la pureza de la misma. Llevando a cabo sólo la primera etapa fue posible recuperar 94% de la dicaprina presente en la muestra después de la neutralización con una pureza del 89%. En la búsqueda de un producto de mayor pureza, dos etapas de separación permitieron una recuperación del 56% de la dicaprina con una pureza del 97%. Un producto con 89% de pureza se obtiene con una tercera etapa de extracción, recuperando sólo 93% de la dicaprina presente al comienzo de la primera etapa.

4.5. Conclusiones

Se llevó a cabo la separación de acilglicérols obtenidos como resultado de la esterificación de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM con un proceso simple empleando solventes de baja toxicidad. Fue posible la recuperación de dicaprina, separándola de mono- y tricaprina.

Se realizó una selección preliminar de los solventes empleando el programa Ecofac 1.0. Los solventes escogidos se estudiaron experimentalmente y mostraron un buen desempeño para la extracción líquido-líquido. Una etapa previa a la extracción fue la neutralización del ácido cáprico remanente. Se aplicó un proceso en dos etapas con una solución de KOH 0,1 M, permitiendo la eliminación del 99.5% del ácido y 95% de la monocaprina, con pérdidas de 4.5% y 4% de di- y tricaprina, respectivamente.

Con un procedimiento de separación en tres pasos simples, es posible recuperar 94% de la dicaprina con 89% de pureza. Si se requiere una mayor pureza, una etapa adicional de extracción permite aumentarla a 97%, pero con una disminución

considerable en el rendimiento a dicaprina. Una condición intermedia se consigue mediante la realización de un paso de la tercera etapa, en la que se recupera 81% de la dicaprina con una pureza del 93%. Un paso adicional no mejoró la pureza o el rendimiento. Teniendo en cuenta el proceso general, llevando a cabo la neutralización y sólo la primera etapa de extracción fue posible recuperar 90% de la dicaprina inicial con 89% de pureza.

Los resultados y conclusiones del presente capítulo dieron origen a la siguiente publicación:

*Sánchez, D. A., Tonetto, G. M., Ferreira M. L. (2014). **Separation of acylglycerides obtained by enzymatic esterification using solvent extraction.** Journal of the American Oil Chemists' Society, 91:261–270.*

4.6. Referencias

- [1] Jandacek, R. J., Whiteside, J. A., Holcombe, B. N., Volpenhein, R. A., Taulbee, J. D. (1987). The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. *The American journal of clinical nutrition*, 45:940-945.
- [2] Ikeda, I., Tomari, Y., Sugano, M., Watanabe, S., Nagata, J. (1991). Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. *Lipids*, 26:369-373.
- [3] Porsgaard, T., Høy, C. E. (2000). Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *The Journal of nutrition*, 130:1619-1624.
- [4] Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P., Schmid, R. D. (1998). Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:1527-1531.
- [5] Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. (1998). Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:703-710.
- [6] Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. (2001). Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1, 3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:285-290.
- [7] Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. (2001). Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:743-748.
- [8] Esteban, L., del Mar Muñío, M., Robles, A., Hita, E., Jiménez, M. J., González, P. A., Molina, E. (2009). Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. *Biochemical Engineering Journal*, 44:271-279.
- [9] Irimescu, R., Iwasaki, Y., Hou, C. T. (2002). Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:879-883.
- [10] Hita, E., Robles, A., Camacho, B., Ramírez, A., Esteban, L., Jiménez, M. J., Molina, E. (2007). Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. *Process Biochemistry*, 42:415-422.

[11] Yasukawa, T., Yasunaga, K. (2001). Nutritional Functions of Dietary Diacylglycerols. *Journal of Oleo Science*, 50:427-432.

[12] Maki, K. C., Davidson, M. H., Tsushima, R., Matsuo, N., Tokimitsu, I., Umporowicz, D. M., Frost, S. D. (2002). Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *The American journal of clinical nutrition*, 76:1230-1236.

[13] Watanabe H., Nagao T., Yasukawa T., Shimasaki H. (2001). Studies on the role of dietary diacylglycerols in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.*, 88:155–162

[14] Tomonobu, K., Hase, T., Tokimitsu, I. (2006). Dietary diacylglycerol in a typical meal suppresses postprandial increases in serum lipid levels compared with dietary triacylglycerol. *Nutrition*, 22:128-135.

5. ESTUDIO DE CATALIZADORES PARA LA SÍNTESIS DE MEZCLAS DE GLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS CON ALTO VALOR NUTRICIONAL POR ESTERIFICACIÓN DE 1,3-DICAPRINA CON ÁCIDO PALMÍTICO

5.1. Introducción

Los triacilgliceroles (TAG) constituyen la mayor contribución energética aportada por los lípidos dietarios. Los triglicéridos de longitud de cadena media (TCM) ó MMM (siendo M un ácido graso de C6 a C12) han sido empleados como grasas de rápida digestión para proporcionar energía especialmente en pacientes con malabsorción y en cuidados infantiles [1-3]. Sin embargo, el uso a largo plazo de MCT puede resultar en deficiencia de ácidos grasos esenciales [4,5] y puede tener efectos secundarios, como acidosis metabólica. Por lo tanto, triacilglicéridos alternativos tales como mezclas físicas de TCM y aceite vegetal convencional, grasas interesterificadas obteniendo TAG de estructura al azar y TAG estructurados específicos con ácidos grasos de cadena media (AGCM) ubicados en las posiciones sn-1,3, han sido utilizados en estudios de absorción [6-9] y nutrición clínica [10]. La estructura del TAG afecta su digestión y absorción [8,9,11]. Los triglicéridos estructurados (TE) específicos con ácidos grasos de cadena larga localizados en la posición sn-2 proporcionan una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de fácil adsorción [7-9]. Por lo tanto, el valor nutricional de un TAG depende tanto de la composición de ácidos grasos como de la distribución posicional de los grupos acilo dentro de la molécula del TAG.

La modificación de triglicéridos puede realizarse para obtener grasas con reducido contenido calórico para dar respuesta al creciente interés de los consumidores hacia

alimentos más saludables. Ejemplos de lípidos modificados con menor densidad calórica disponibles en el mercado son Caprenina (Procter & Gambler, Estados Unidos), Salatrim (Nabisco Foods, Estados Unidos), Neobee MCT (Aarhus United, Estados Unidos), Vivóla (Forbes-Med, Canadá) y Diacylglycerol oil (Kao Corp., Japón) [12].

Los ácidos grasos de longitud de cadena media son metabolizados más rápidamente en comparación con los ácidos de cadena larga (AGCL). AGCM son transportados al hígado vía vena porta. Posteriormente sufren un proceso de β -oxidación generando cetonas, una fuente rápida de energía. Esto provoca un aumento de la termogénesis y la saciedad inducida por la alimentación [13-14]. Mientras que los AGCL son ciclados nuevamente en los conductos linfáticos intestinales, se incorporan a los quilomicrones y se transfiere a la circulación principalmente a través del conducto torácico, prácticamente sin pasar por el hígado lo que permite que se acumulen en el cuerpo como grasa.

Los triglicéridos conteniendo sólo ácidos grasos de cadena media no son adecuados para su uso en cocina, tales como aceites para freír, debido a la formación de espuma. Es por eso que AGCL son incorporados a los TCM para superar estos inconvenientes, dando lugar a los denominados triglicéridos de longitud de cadena media y larga (TCML), donde cada triglicérido contiene ácidos grasos de cadena media y larga en la misma molécula. Estos productos son o pueden producirse a través de acidólisis, esterificación o interesterificación enzimática [15-17].

El uso de lipasas no específicas permitirá la obtención de triglicéridos estructurados con configuraciones al azar. Estos TCML pueden presentar 6 configuraciones (MLM, MML, LLM, LML, LLL, y MMM), pero el uso de lipasas 1,3-específicas permitiría la generación de TE con composición específica [18].

En la molécula de TCML, el ácido graso de cadena larga es proporcionada por un aceite vegetal (tal como canola, soja, semilla de algodón, girasol, maní, oliva, maíz, semilla de cártamo, salvado de arroz o aceite de sésamo). La fuente de ácido graso de cadena media es un triglicérido de cadena media (coco o palma kernel) o ácidos grasos como el ácido cáprico o caprílico. El ácido graso de cadena larga proporcionado por el TCL permite incrementar el punto de humo de los TCM y por lo tanto se puede aplicar para freír [18].

Healthy Resseta es un aceite compuesto por TCML (transesterificación de TCM con aceite de colsa) comercialmente disponible en Japón y Estados Unidos para ser empleado como aceite de cocina. El mismo se produce en Japón desde 1999 por Nisshin Oillio Group Ltd. Este TCML fue reconocido como seguro (GRAS) en 2006 teniendo en cuenta lo dispuesto por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos.

En 2010, Koh y colaboradores obtuvieron un aceite con 59.76% en peso de TCML llevando a cabo la esterificación de glicerol con ácidos grasos de cadena corta y larga, empleando 10% de enzima, 70 °C, relación molar ácidos grasos/glicerol 3.5:1 y con un tiempo de reacción de 14 horas [18]. Dos años más tarde, Arifin y coautores llevaron a

cabo el modelado y optimización de la reacción estudiada antes por Koh, logrando un producto con 58% de TCML y estableciendo como condiciones óptimas una temperatura de reacción de 65 °C, relación molar ácidos/glicerol 3:1, tiempo de reacción 13.61 horas y carga de lipasa 8% en peso [19].

Por otro lado, los diglicéridos (DAG) son componentes naturales de diversos aceites comestibles, y son moléculas tensioactivas ampliamente utilizados como emulsionantes en la industria alimentaria [20]. Se ha demostrado que el consumo de aceites ricos en DAG, especialmente en el 1,3-isómero, tiene efectos positivos sobre la salud humana, entre ellos, la disminución de triglicéridos en suero postprandial (TG) y la reducción de acumulación de grasa corporal [21,22].

Con lipasas 1,3-específicas, la mayor parte del ácido graso puede ubicarse en posiciones sn-1,3. De esta manera, como se vio en el Capítulo 3 pudo llevarse a cabo la síntesis de 1,3-DAG, en particular 1,3-dicaprina, empleando Lipozyme RM IM. Luego de un apropiado (incluso simple) proceso de extracción con solventes, presentado en el Capítulo 4, 1,3-dicaprina se separó y se obtuvo con el grado de pureza necesario. Este diglicérido, más allá de su propio valor nutricional, puede ser esterificado en la posición sn-2 con un ácido graso de cadena larga para obtener TCML con estructura particular. Es necesaria una lipasa no específica para llevar a cabo esta segunda etapa. Claramente, la composición final incluirá tri- y diglicéridos, e incluso otros productos obtenidos como resultado de la reacción de hidrólisis. La composición de la mezcla final debe ser analizada con el objetivo de elegir el catalizador que maximice los

productos deseados y minimice los indeseados, en el contexto de una alta conversión de 1,3-DAG.

En este capítulo se propone estudiar la síntesis enzimática de una mezcla de glicéridos nutricionalmente valiosos a través de la esterificación de un 1,3-DAG ó MGM (con M = ácido cáprico, C ó 10:0) con un ácido graso de cadena larga (L) saturado, particularmente ácido palmítico (P) ó 16:0. Se presentan aquí los resultados obtenidos mediante el ensayo (*screening*) de lipasas comerciales, en forma libre e inmovilizada.

El objetivo del presente capítulo es maximizar la síntesis del triglicérido MLM (1,3 dicaproil-2-palmitoil glicerol o CPC), con M = 10:0 y L = 16:0, en una mezcla de TG y DAG. Además del producto deseado, cantidades menores de MMM (tricaprina o CCC), MML (1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol o CCP) y MLL (1 caproil-2,3-dipalmitil glicerol o CPP) o LLM (1,2-dipalmitoil-3-caproil glicerol o PPC) también serían aceptables, especialmente debido al impacto en la salud de los TCM y siendo M un ácido graso saturado. También tendría alto valor nutricional la presencia de 1,3 DAG, especialmente formados por uno o dos ácidos grasos de cadena media (MGM o CGC, MGL (1-caproil-3-palmitoil glicerol o CGP) / LGM (1 palmitoil-3-caproil glicerol o PGC). Los productos de reacción fueron agrupados en función de la reacción que los genera: esterificación, hidrólisis e hidrólisis con posterior esterificación. Los triglicéridos y diglicéridos de alto valor nutricional se presentarán por separado. También los productos no deseados se analizaron para caracterizar los diferentes sistemas catalíticos explorados, buscando minimizar la formación de LLL y LGL (tripalmitina y 1,3-dipalmitoil glicerol). La incorporación de ácido palmítico en la posición sn-2 de los

productos finales se exploró llevando a cabo hidrólisis de los productos deseados catalizada por la lipasa de páncreas porcino (PPL), etanólisis catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

5.2. Evaluación de catalizadores

El empleo de diferentes lipasas, en forma libre e inmovilizada, estuvo principalmente orientado a la obtención de un producto y no a un estudio básico. Es por esta razón que no se ha realizado un estudio cinético que permita comparar biocatalizadores en términos de unidades de actividad enzimática (U). Además, el empleo de reacciones test para comparar actividad enzimática de cada catalizador no brinda información certera del comportamiento de los mismos en el sistema de reacción a ser empleados.

En los estudios presentados a continuación se evalúan masas fijas de diferentes catalizadores como una forma de comparar los productos generados por cada uno de ellos, a sabiendas de que pueden presentar diferente actividad específica, o diferentes problemas difusionales.

5.2.1. Empleo de lipasas comerciales en forma libre o inmovilizada

La esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico fue llevada a cabo siguiendo el protocolo presentado en el Capítulo 2 (Sección 2.2.2.2). La identificación de los productos se realizó mediante cromatografía de gases siguiendo la metodología presentada en la Sección 2.2.1.5.4. El avance de la reacción no pudo seguirse mediante titulación simple ya que, además de consumirse ácido palmítico en la reacción de esterificación, se presenta en forma paralela la reacción de hidrólisis.

En la Figura 5.1 se presentan cromatogramas donde se muestran los picos correspondientes a los reactivos y los productos típicos de la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por lipasas. Además del producto deseado, 1,3-dicaproil-2-palmitoilglicerol (CPC), se obtienen otros productos debido a la reacción de hidrólisis y posterior re-esterificación. Entre los productos secundarios se detecta ácido cáprico (C), 1-caproil-3-palmitoilglicerol (CGP), 1-caproil-2-palmitoilglicerol (CPG), 1,3-dipalmitoilglicerol (PGP) y 1,2-dipalmitoilglicerol (PPG), 1-caproil-2,3-palmitoilglicerol (CPP) y tripalmitina (PPP). Probablemente también se obtenga 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol (CCP).

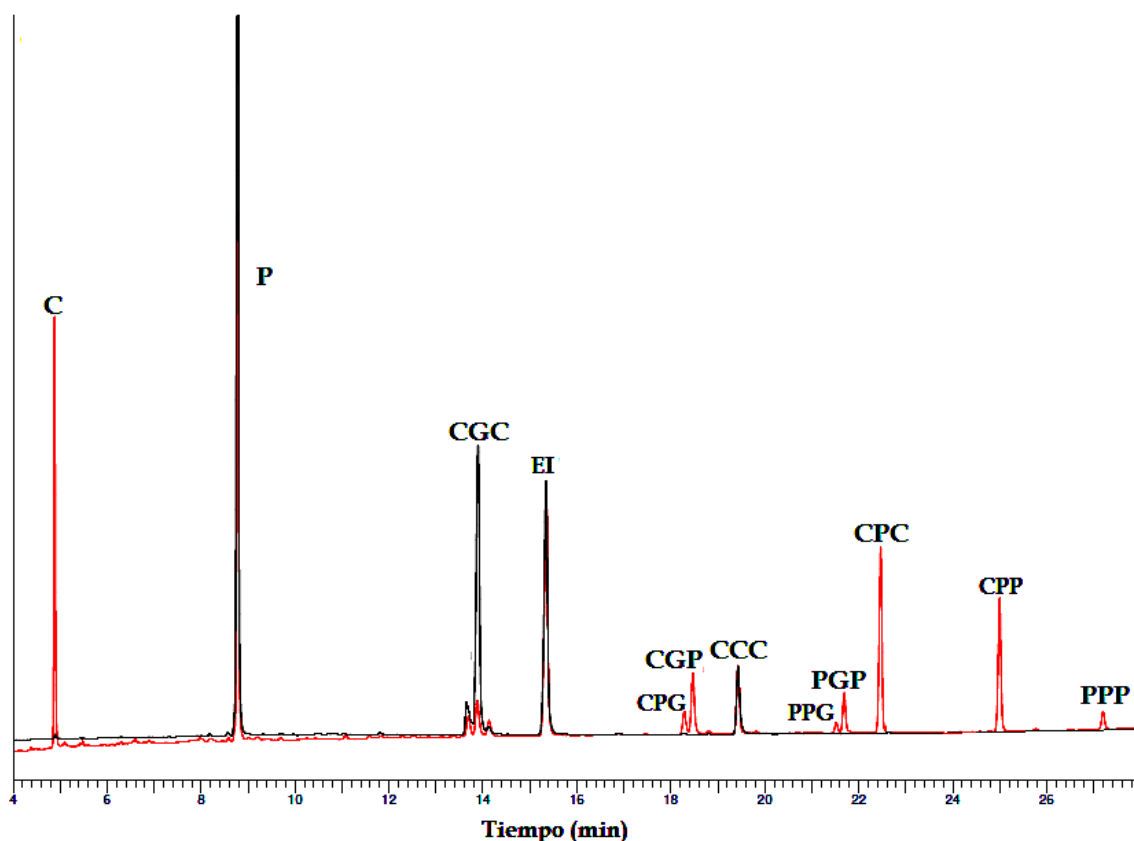


Figura 5.1. Cromatogramas correspondientes a reactivos (Negro) y productos (Rojo) al llevar a cabo la esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. EI: estándar de calibración (tricaprilina).

En la Tabla 5.1 se presenta el desempeño de cada uno de los biocatalizadores en la reacción de síntesis del triglicérido deseado luego de 12 horas de reacción.

Tabla 5.1. Reactivos y productos (μ moles) en la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por diferentes lipasas luego de 12 horas de reacción.

Reactivos y productos (μ moles)	Concentración inicial	Lipasas				
		CRL	CALB	RML	BCL	PFL
GGG	0.00	0.00	22.25	0.00	0.00	18.40
C	1.74	6.55	149.30	135.65	116.65	104.65
P	218.41	213.35	101.82	104.79	119.33	98.47
CGC	112.33	90.99	18.01	18.55	22.96	27.10
CPG+CGP	0.00	3.15	24.24	19.54	22.67	22.64
CCC	9.01	20.00	1.00	0.00	6.08	0.00
PPG+PGP	0.00	0.00	12.58	6.94	7.75	5.55
CPC	0.00	1.90	20.43	30.79	26.04	36.32
CPP	0.00	0.00	14.29	18.59	9.92	14.49
PPP	0.00	0.00	4.15	3.43	0.00	2.10
X_{DAG} (%)	--	19	84	83	80	76

CRL = Lipasa de *Candida rugosa* (Lipase AY "Amano"), CALB = Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435), RML = Lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), BCL = Lipasa de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS "Amano") y PFL = Lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK "Amano"). X_{DAG} = porcentaje de conversión del diglicérido.

En la Figura 5.2 se resume gráficamente el desempeño de cada uno de los biocatalizadores ensayados en esta reacción considerando la conversión de dicaprina y el rendimiento a CPC. Las mayores conversiones del diglicérido se obtuvieron con las lipasas inmovilizadas, aunque también con estas enzimas fue más importante la reacción de hidrólisis, tal como se observa en la generación de ácido cáprico y de los productos secundarios.

La mayor selectividad al 1,3-dicaproil-2-palmitoilglicerol se obtuvo con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (42.6%), aunque también la tasa de hidrólisis es elevada

generando otros productos en altas proporciones. El rendimiento a CPC logrado con esta lipasa fue 32%

Todos los biocatalizadores analizados en esta sección permitieron conversiones de DAG superiores al 75%, a excepción de CRL que no resultó adecuada para esta reacción ya que se trata de una lipasa naturalmente preparada para llevar a cabo reacciones de hidrólisis. En función de los resultados presentados en la Tabla 5.1 la lipasa de *Burkholderia cepacia* (BCL) se presenta como uno de los mejores catalizadores para llevar a cabo la síntesis de una mezcla de glicéridos de alto valor nutricional. Si bien el rendimiento a CPC logrado con el uso de esta enzima es menor que empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* o Lipozyme RM IM, la composición de la mezcla obtenida resulta sumamente atractiva ya que no contiene tripalmitina (PPP), posee la menor proporción de CPP y a su vez contiene tricaprina (CCC) y una fracción interesante de diglicéridos.

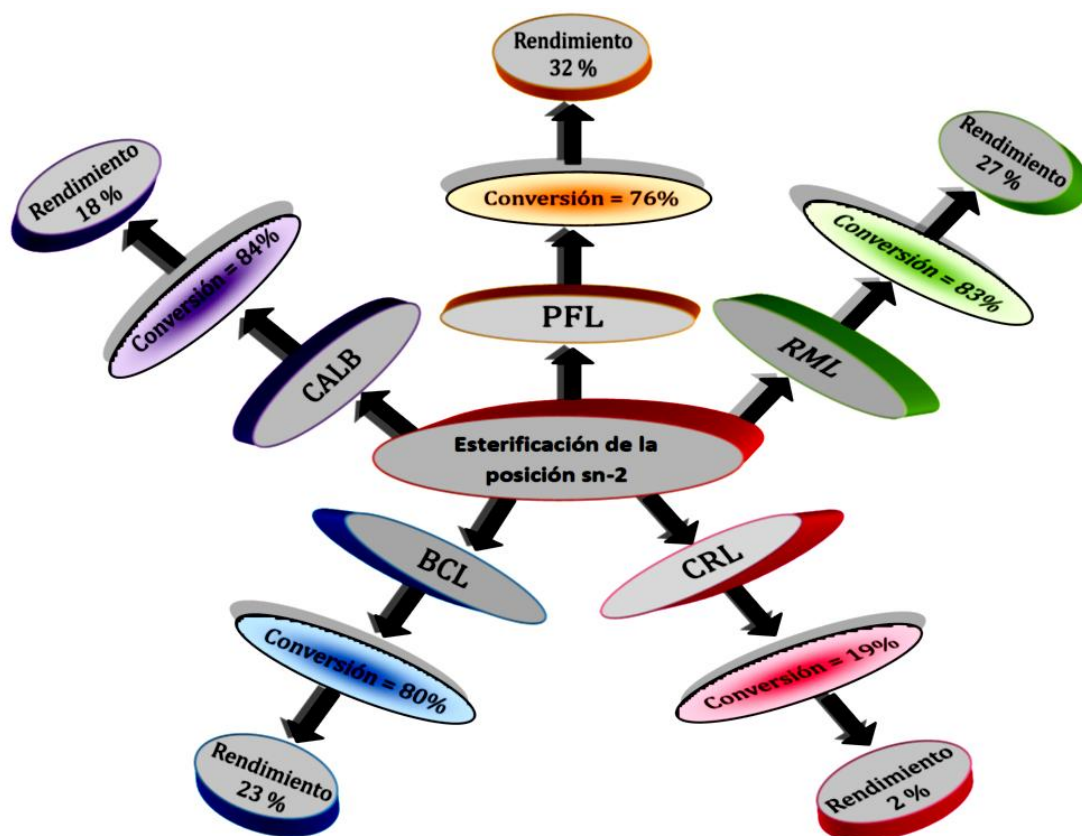


Figura 5.2. Esquema del desempeño de los biocatalizadores en la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmito.

5.2.3. Metodologías para el control del agua en el medio de reacción

Con el objetivo de reducir la reacción de hidrólisis y maximizar la síntesis del triglicérido estructurado CPC se propusieron diferentes técnicas para el control del agua en el medio de reacción.

En primer lugar, la reacción de esterificación se llevó a cabo siguiendo el método descrito en la Sección 2.2.2.1 pero con el agregado de 10 mg de gel de sílice como agente removedor de agua. En estas condiciones, la reacción procedió más lentamente y mediante los análisis cromatográficos se hizo evidente la adsorción de reactivos y productos en el gel de sílice.

En la Tabla 5.2 se muestra el rendimiento a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol al llevar a cabo la reacción de esterificación con el agregado de gel de sílice.

Tabla 5.2. Rendimiento a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por diferentes lipasas y utilizando gel de sílice como agente removedor del agua en el sistema de reacción.

Lipasa	Rendimiento a CPC
<i>Burkholderia cepacia</i>	20%
CALB (Novozym 435)	12%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20%
RML (Lipozyme RM IM)	18%
<i>Candida rugosa</i>	0%

Para verificar el porcentaje de adsorción de reactivos en el gel de sílice, 50 mg de dicaprina y 56 mg de ácido palmítico se disolvieron en 2 mL de *n*-heptano y luego se adicionaron 10 mg de gel de sílice. La mezcla se mantuvo en baño termostático a 45 °C y con agitación magnética por 6 horas. Alcanzado este tiempo se tomó una muestra para analizar por cromatografía gaseosa determinando que 99% del ácido palmítico y 70% de la dicaprina se adsorbieron sobre el gel de sílice. Se hace evidente entonces que esta metodología para el control del agua durante la reacción de esterificación limita la disponibilidad de los reactivos y en consecuencia el progreso de la reacción.

Como segunda metodología para el control del agua se reemplazó al gel de sílice por tamiz molecular 13X. El ensayo de adsorción de reactivos anteriormente descrito se realizó nuevamente pero empleando este tamiz. El análisis cromatográfico permitió determinar que 59% del ácido palmítico y 7% de dicaprina se adsorbieron sobre el tamiz molecular.

En la Figura 5.3 se presentan los miligramos de reactivos y productos en función del tiempo de reacción al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando BCL como catalizador y tamiz molecular 13X para controlar el contenido de agua en el sistema de reacción y minimizar la reacción de hidrólisis. Los productos de reacción fueron analizados por cromatografía gaseosa en intervalos de 3 horas. En la misma puede observarse que después de 12 hs de reacción, la hidrólisis aumenta considerablemente, con un fuerte incremento de la cantidad de ácido cáprico generado. La conversión de ácido palmítico prácticamente se detiene después de 15 hs, incluso cuando la conversión de dicaprina continúa hasta las 18 hs. El máximo rendimiento a CPC tiene lugar a las 15 horas de reacción, a este tiempo el rendimiento a CPC fue 27% y a CPP 15%, mientras que si se consideran los productos de reacción a las 12 horas de iniciada la misma el rendimiento a CPC fue 22% y a CPP 2%. La reducción en la fracción de tricaprina y la generación de dipalmitina, CPP y tripalmitina están estrechamente relacionadas con la reacción de hidrólisis y los cambios se vuelven importantes a partir de las 15 hs.

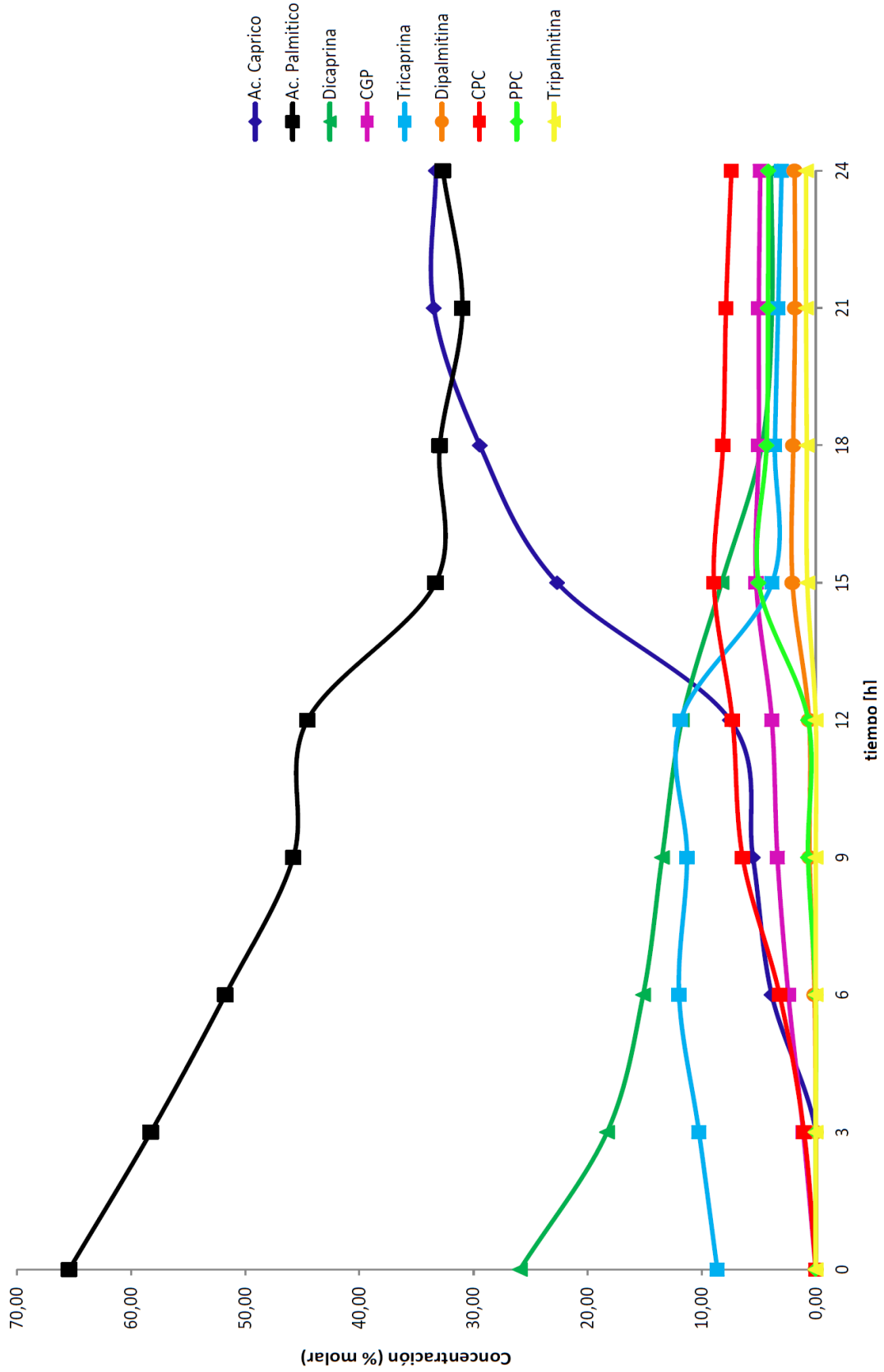


Figura 5.3. Concentraciones de reactivos y productos en función del tiempo de reacción para la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* empleando tamiz molecular 13X como metodología de control

Como última metodología para la remoción de agua del medio de reacción se empleó tamiz molecular 5A. Nuevamente se evaluó la adsorción de reactivos en el tamiz sin el agregado de lipasa. Mediante el análisis cromatográfico se pudo determinar que no existió adsorción de los reactivos en el tamiz 5A. La reacción de esterificación se llevó a cabo en las condiciones indicadas en la Sección 2.2.2.1 con la adición de 15 mg de tamiz molecular 5A, en este caso el tiempo de reacción se fijó en 12 horas en función de los resultados obtenidos con el tamiz 13X (importante incremento de la reacción de hidrólisis a mayores tiempos). Finalizada la reacción se logró una conversión del 80% de la dicaprina inicial, con un rendimiento a CPC del 23%.

Las metodologías tradicionales, encontradas en la literatura, propuestas para la remoción de agua, tales como el uso de gel de sílice o tamices moleculares 13X o 5A no introdujeron mejoras en la selectividad a triglicéridos estructurados.

Está claro que la presencia de adsorbentes cambia la relación molar de sustratos en el seno del medio de reacción, de esta manera no sólo se ve afectada la cinética sino también la selectividad. La conversión de DAG es menor empleando tamices moleculares debido a la adsorción de sustratos en los mismos, probablemente la adsorción de productos también es posible como ya se vio en el Capítulo 3.

En varios trabajos se ha reportado el uso de gel de sílice o tamices moleculares como sólidos para adsorber el agua que se genera como producto de la esterificación de glicerol o glicéridos [23-27]. Sin embargo, en estos manuscritos no se ha considerado la posibilidad de que compuestos polares puedan ser adsorbidos por estos sólidos. Las

sustancias mencionadas incluyen ácidos grasos (saturados o insaturados, poliinsaturados, ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media y ácidos grasos de cadena larga), también monoglicéridos y diglicéridos. Estas moléculas tienen grupos carboxílicos (COOH) y grupos hidroxilo (OH) que pueden ser adsorbidos sobre los tamices moleculares o gel de sílice, además del agua como producto de la esterificación. Como resultado de la adsorción de sustratos en los sólidos, la relación molar de ácidos a glicerol o glicéridos en el seno del solvente es diferente a la nominal, afectando entonces la cinética y la selectividad de la reacción.

Varios estudios han examinado el uso de vacío o el empleo de sistemas bifásicos para remover el agua formada y aumentar la conversión de sustratos en la esterificación de glicerol, mono- y diglicéridos [28-30].

La adsorción de ácidos grasos y diglicéridos sobre gel de sílice y tamiz molecular 13X es un problema serio que afecta la relación molar in situ. En la mezcla de sustratos y productos presentes en el medio de reacción, varios de ellos pueden ser adsorbidos por algún sólido, incluyendo el soporte sobre el que las enzimas se encuentran inmovilizadas. Inicialmente P y CGC pueden ser adsorbidos, pero cuando la reacción procede también puede adsorberse C, los mono- y diglicéridos generados. Los triglicéridos no son adsorbidos en sólidos polares, hidroxilados o ácidos (de Lewis o Brønsted). Esta complicación es inevitable y produce una grave pérdida de sustratos y falta de control de la relación molar entre reactivos durante la reacción, de tal manera que tanto la cinética como la selectividad se ven afectadas.

Como se vio el empleo de gel de sílice y tamiz 13X reduce de manera drástica la concentración de P en el solvente orgánico, mientras que la concentración de CGC se ve también afectada pero siempre se mantiene relativamente más elevada. Probablemente el agua también se adsorba en gran medida sobre los sólidos, permitiendo que la reacción de esterificación esté más favorecida que la hidrólisis, sin embargo la productividad de compuestos deseados y la conversión total se ven afectadas considerablemente, incrementando los costos operativos.

5.2.4. Transesterificación de dicaprina empleando palmitato de etilo

Como se mostró en la sección anterior, la reacción de hidrólisis y posterior generación de productos no deseados no pudo reducirse empleando metodologías convencionales para el control del agua. Como alternativa se propuso el empleo de etil palmitato en lugar de ácido palmítico, generando etanol en lugar de agua como producto de la reacción con dicaprina. Se empleó tamiz molecular 13X como metodología de control del etanol generado ya que la adsorción de diglicéridos sobre este sólido es baja y el palmitato de etilo no se adsorbe sobre el tamiz.

La reacción de transesterificación se llevó a cabo como se presentó en el Capítulo 2 (Sección 2.2.2.3). En la Tabla 5.3 se presentan los reactivos y productos obtenidos en función del tiempo de reacción. El rendimiento a 1,3-dicaproil-2-pamitoil glicerol fue sólo del 8% a las 12 horas de reacción, el máximo rendimiento se obtuvo a las 10 hs (9%).

Tabla 5.3. Reactivos y productos en función del tiempo de reacción para la transesterificación de dicaprina con etil palmitato catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* empleando tamiz molecular 13X.

Reactivos y productos (% molar)	Tiempo de reacción (h)						
	0	2	4	6	8	10	12
C	0.00	0.79	1.22	1.82	2.44	2.47	2.69
P	71.59	70.94	69.13	68.17	66.61	66.06	65.56
CGC	25.55	19.45	16.22	13.42	11.68	10.73	9.51
CPG+CGP	0.00	0.00	1.29	1.34	1.93	2.18	2.42
CCC	2.87	6.34	7.82	8.73	8.60	7.97	7.69
PPG+PGP	0.00	0.00	0.00	0.16	0.20	0.27	0.30
CPC	0.00	0.64	1.16	1.61	2.36	2.48	2.66
CPP	0.00	0.00	0.00	0.07	0.14	0.17	0.17
PPP	0	0	0	0	0	0	0

5.2.5. Remoción del agua contenida en la lipasa PS “Amano”.

Los altos niveles de hidrólisis registrados en las reacciones antes estudiadas pueden ser asignados a un elevado contenido de agua presente en la lipasa comercial. Siguiendo el procedimiento de secado presentado en la Sección 2.2.2.4 se obtuvo una reducción de peso del 1.2% que puede atribuirse al agua removida del biocatalizador. La lipasa así obtenida fue ensayada en la reacción de esterificación en iguales condiciones a las descritas en la Sección 2.2.2.1.

Luego de 9 horas de reacción el rendimiento a CPC cae de 20% en la lipasa sin tratar a 5% en la lipasa a la que se eliminó el agua. No sólo se registraron cambios en la actividad del catalizador (como se muestra en la Tabla 5.4) sino que también su selectividad se vio afectada: reducción en la producción de CGP y CPC e incremento en la generación de CCC.

Tabla 5.4. Conversión de DAG y rendimiento a CPC al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando BCL con y sin tratamiento para remover el agua en el catalizador.

	BCL Sin Tratar	BCL Tratada
Conversión de DAG	61%	17%
Rendimiento a CPC	20%	5%

Aparentemente, retirar el agua que forma parte del biocatalizador provoca una importante rigidización de la lipasa con la consiguiente pérdida de actividad.

En función a los resultados hasta aquí presentados en este capítulo, las reacciones de esterificación que se presentan en las secciones subsiguientes fueron llevadas a cabo sin aplicar ninguna metodología para el control del agua en el medio de reacción.

5.2.6. Empleo de la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada

BCL fue inmovilizada sobre polipropileno comercial y sobre montmorillonita (área superficial específica 750-800 m²/g) como se describe en la Sección 2.2.2.5 y la reacción de esterificación se llevó a cabo como se indica en la Sección 2.2.2.1 pero empleando 100 mg del biocatalizador obtenido (50 mg al inicio y los restantes 50 mg a las 3 horas)

Empleando la lipasa inmovilizada sobre polipropileno se logró 48% de conversión del DAG con 10% de rendimiento a CPC, la manipulación y recuperación del biocatalizador es sencilla ya que se encuentra en forma de pellets.

Por su parte, BCL inmovilizada sobre montmorillonita permitió la conversión del 82% del DAG con un rendimiento a CPC del 24%. En la práctica el uso de este biocatalizador se vuelve complejo debido al pequeño tamaño de partícula de la montmorillonita que puede generar problemas como agregación, dificultades en la separación para la reutilización y potenciales problemas prácticos en un escalado.

La diferencia en la actividad registrada en estos catalizadores puede atribuirse al porcentaje de inmovilización de lipasa logrado en cada uno de ellos. Al realizarse la inmovilización en una solución acuosa, el contacto del polipropileno con la misma es bajo y el polímero tiende a mantenerse en la superficie del líquido, altas velocidades de agitación son necesarias para favorecer el contacto, lo que afecta no sólo el proceso de inmovilización sino que también puede afectar la actividad de la lipasa. Por otro lado, la montmorillonita se dispersa fácilmente en agua y el mezclado de esta arcilla en la solución conteniendo la lipasa es muy bueno, incluso a bajas velocidades de agitación. Estas diferencias entre los sólidos probablemente han favorecido mayor porcentaje de inmovilización de lipasa en la montmorillonita que en el polipropileno.

Al ser planteado como estudio exploratorio, se eligieron condiciones de inmovilización puntuales y no era el objetivo la optimización de la etapa de inmovilización o un estudio exhaustivo de caracterización de los soportes. Se pretendió comparar el carácter superficial (hidrofóbico orgánico en el polipropileno, hidrofílico en el caso de quitosano (empleado en el Capítulo 7) e inorgánico en el caso de la montmorillonita). Trabajos previos del grupo permitieron establecer que el quitosano es un excelente soporte (aún con sólo 4 % de área BET).

5.3. Evaluación de catalizadores: análisis de la conversión de dicaprina y de los productos de reacción en función de la reacción que les da origen

En esta sección y en las siguientes, los productos de reacción serán cuidadosamente descritos y analizados. Más adelante se analizará la presencia de isómeros, hasta tanto se empleará la nomenclatura que se detalla a continuación para proseguir con el análisis de DAG y TAG:

CGC = dicaprina total, incluyendo mayoritariamente 1,3-dicaprina y menores proporciones de 1,2- y 2,3-dicaprina en el sustrato.

CPC = incluye el producto deseado (CPC) y posible presencia de CCP y PCC

CPP = incluyendo CPP, PCP y PPC

CGP = incluyendo CGP y PGC, también CPG y PCG, y además GPC y GCP

PGP = dipalmitina considerando la totalidad de los isómeros (1,2-, 1,3- y 2,3-dipalmitina)

La única vía para obtener DAG o TAG con ácido cáprico en posición sn-2 (excluyendo las menores proporciones de 1,2-DAG y 2,3-DAG presentes en el sustrato) son:

- migración de acilos de las posiciones sn-1/sn-3 a la sn-2 en CGC o CGP, una reacción paralela a la de esterificación y a la hidrólisis
- esterificación de la posición sn-2 con ácido cáprico en lugar de palmítico, una reacción en serie en la cual primero ocurre la hidrólisis de DAG (CGC) o TAG (CCC) formados por ácido cáprico.

Con excepción de CRL, todas las otras lipasas mostraron conversiones del DAG superiores al 60%. Las lipasas comerciales provistas por Novo, Lipozyme RM IM (RML)

y Novozym 435 (CALB), permitieron obtener porcentajes de conversión de dicaprina cercanos al 84%, mientras que las lipasas libres de Amano, BCL y PFL, lograron conversiones de 76 y 80% del diglicérido respectivamente. La lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre montmorillonita BCL-MONT) permitió incrementar la conversión de DAG a 82%.

Aún cuando la relación molar de sustratos fue seleccionada de modo tal de promover la esterificación de CGC con P para producir CPC, la reacción de hidrólisis permite generar sn-1/sn-3 monocaprina, ácido cáprico y glicerol, y reacciones en serie de hidrólisis y posterior esterificación que promueven la generación de CGP, PGP y CPP y PPP.

Considerando la presencia de fracciones de 1,2- y 2,3-dicaprina en el sustrato de partida y la posibilidad de existencia de la reacción de migración de acilos en los productos de reacción, es factible encontrar CPP (además de CPC), y los isómeros GCP, GPC, CCP y PPC o incluso PCP.

En la Figura 5.4 se muestra la distribución de productos, en porcentaje en peso, teniendo en cuenta la reacción que los genera (no se consideran los remanentes de CGC, P y CCC). Considerando:

- Hidrólisis Pura = C + GGG
- Esterificación Pura = CPC
- Hidrólisis + Esterificación = CGP+PGP+CPP+PPP

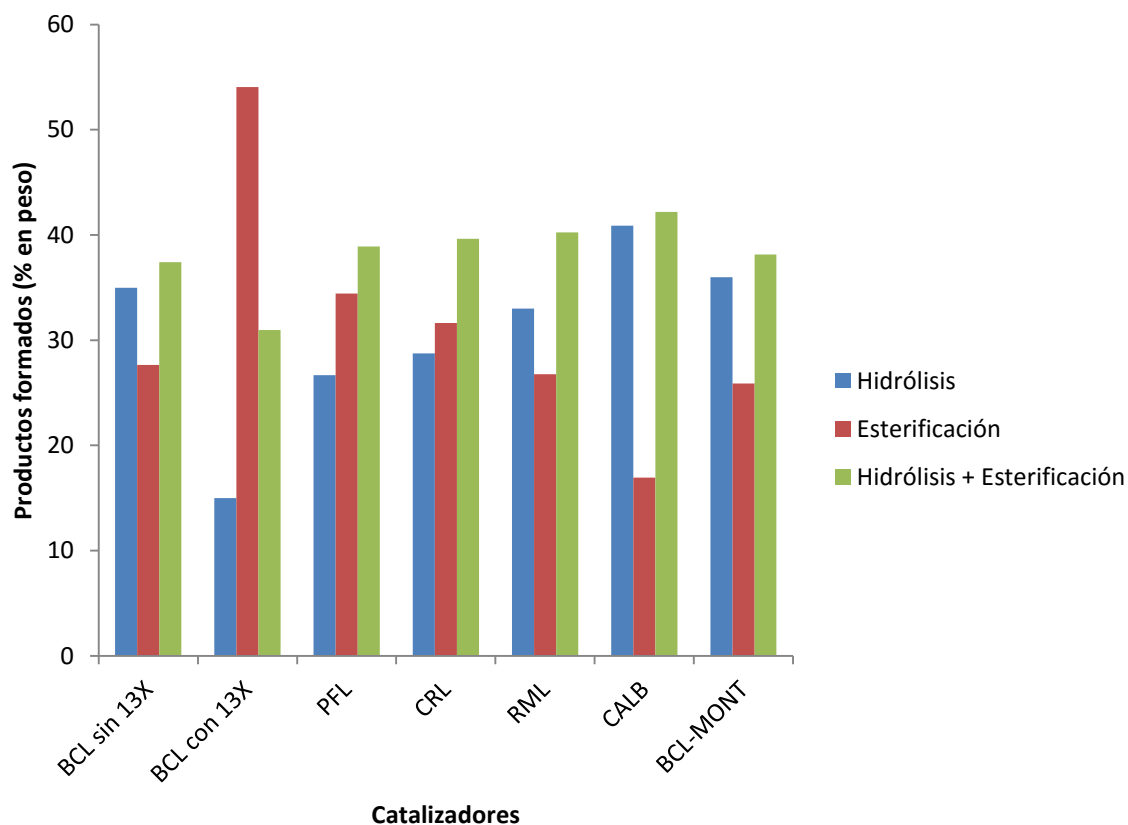


Figura 5.4. Productos formados, agrupados de acuerdo a la reacción por la cual fueron generados al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando diversos catalizadores, tiempo de reacción = 12 horas.

A partir de esta figura varios puntos pueden destacarse respecto a las reacciones de esterificación, hidrólisis e hidrólisis con posterior esterificación para diferentes enzimas:

- A pesar que PFL y CRL tienen diferentes actividades y conversiones finales, la distribución de productos de las reacciones de hidrólisis, esterificación e hidrólisis + esterificación (26,7-28,9% / 34,4-31,6% / 38,9-39,6 %, para cada reacción y lipasa respectivamente) son muy similares.
- RML tiene una distribución de productos muy similar a BCL y a BCL inmovilizada sobre montmorillonita (BCL-MONT) (hidrólisis: 33-35-36%,

esterificación: 26,7-27,6-25,9% e hidrólisis con posterior esterificación: 40,2-37,4-38,1%).

- Cuando se llevó a cabo la síntesis empleando BCL y tamiz molecular 13X se obtuvo la mayor producción relativa de CPC. Este resultado es comprensible considerando que el agua, ácido cáprico y palmítico están adsorbidos sobre el tamiz favoreciendo la reacción de esterificación frente a la de hidrólisis. Con el uso de tamices moleculares 13X, la mezcla final contiene 54% de CPC, mientras que sin ellos sólo el 27% del total de productos es CPC empleando BCL. El control cinético a través de la baja concentración de sustratos en el medio de reacción, que se da al emplear tamices, hace que la conversión de dicaprina sea considerablemente menor que en los casos donde no se utilizan metodologías para el control del agua.
- CALB produce el menor porcentaje relativo del producto deseado CPC (16,9%), siendo las reacciones de hidrólisis e hidrólisis con posterior esterificación mucho más importantes.

5.4. Evaluación de catalizadores: análisis de la composición final de CPC, CPP y CCC

La Figura 5.5 muestra el perfil de los tres triglicéridos principales que se encuentran en el medio de reacción: CCC, CPC y PPC.

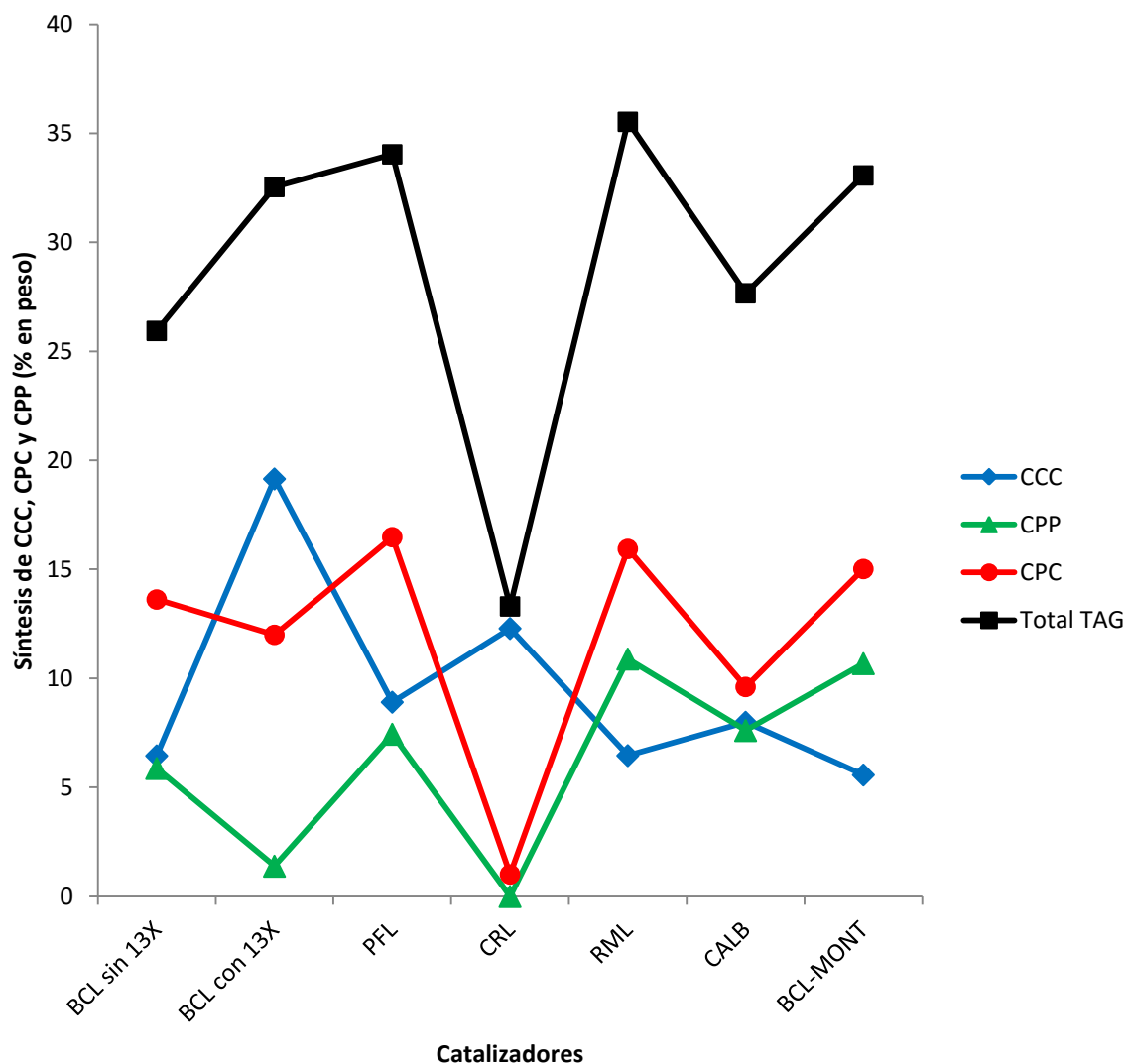


Figura 5.5. Principales triglicéridos sintetizados mediante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando diversos catalizadores, tiempo de reacción = 12 horas.

Varios puntos importantes se pueden destacar respecto a las tendencias que revela el gráfico cuando la reacción fue detenida a las 12 horas:

- Para todas las lipasas estudiadas, la síntesis de CPC y CPP tienen perfiles similares, siendo la cantidad de CPP formada mucho más baja que la de CPC, luego de 12 horas. Esto permite presumir que la generación de CPP está relacionada con una reacción en serie de hidrólisis de CPC para generar

CPG y posterior esterificación de la posición sn-3 con P para dar el triglicérido CPP.

- El comportamiento de la síntesis de CCC es claramente diferente de las tendencias observadas CPC y PPC. Hay dos posibles vías para la generación de CCC: la esterificación de CGC con C en sn-2 por una lipasa no específica (que necesitaría la presencia de C en concentraciones competitivas para ser esterificado antes que P) o la reacción en serie migración de C desde sn-1/sn-3 a sn-2 para producir GCC o CCG y, finalmente, la esterificación de ellos con C en posición sn-1 o sn-3. La reacción de isomerización de sn-1 a sn-2, como se mostró en el Capítulo 3, puede ser catalizada enzimáticamente cada vez que un glicérido tiene un grupo hidroxilo en la posición sn-2. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, la segunda vía parecería la más probable debido a las altas concentraciones iniciales de CGC. Desde el comienzo de la reacción, la migración de C desde las posiciones sn-1/sn-3 a sn-2 es una reacción paralela a la esterificación de P y estas dos son reacciones paralelas a la hidrólisis de CGC. Como se mostró en la Figura 5.3 a mayores tiempos de reacción la hidrólisis de CCC se vuelve importante con la consiguiente liberación de C.

La presencia de estos triglicéridos en el producto final de reacción permite elevar el valor nutricional de la mezcla obtenida. Lee y coautores han informado sobre los beneficios del consumo de triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena media y ácidos grasos de cadena larga en la misma molécula [12].

5.5. Evaluación de catalizadores: análisis de la composición final de diglicéridos

La Figura 5.6 muestra la síntesis de CGP y el consumo de CGC para las lipasas estudiadas, con fines comparativos también se presenta la formación de CPP en el mismo gráfico. Cabe recordar que la denominación CGP incluye los diglicéridos CGP, PGC, CPG, PCG, GPC y GCP (ver página 143).

Las tendencias que se observan en la Figura 5.6 dan sustento a la propuesta presentada en la sección anterior, la existencia de la reacción en serie: CGC→CPC→CPG→CPP.

Diferentes aplicaciones de diglicéridos en la industria alimentaria han sido recientemente reportadas [31]. Los productos alimenticios más importantes conteniendo diglicéridos y, quizás los más rentables, son los aceites de cocina conteniendo una alta proporción de DAG. Nishide y colaboradores han desarrollado un aceite conteniendo entre 60 y 100% de DAG [32], el mismo ha sido desarrollado para mejorar los niveles de colesterol en sangre, restringir la acumulación de grasa corporal y prevenir la adiposidad. Este aceite cuenta además con un contenido elevado de antioxidantes y fitoesteroles.

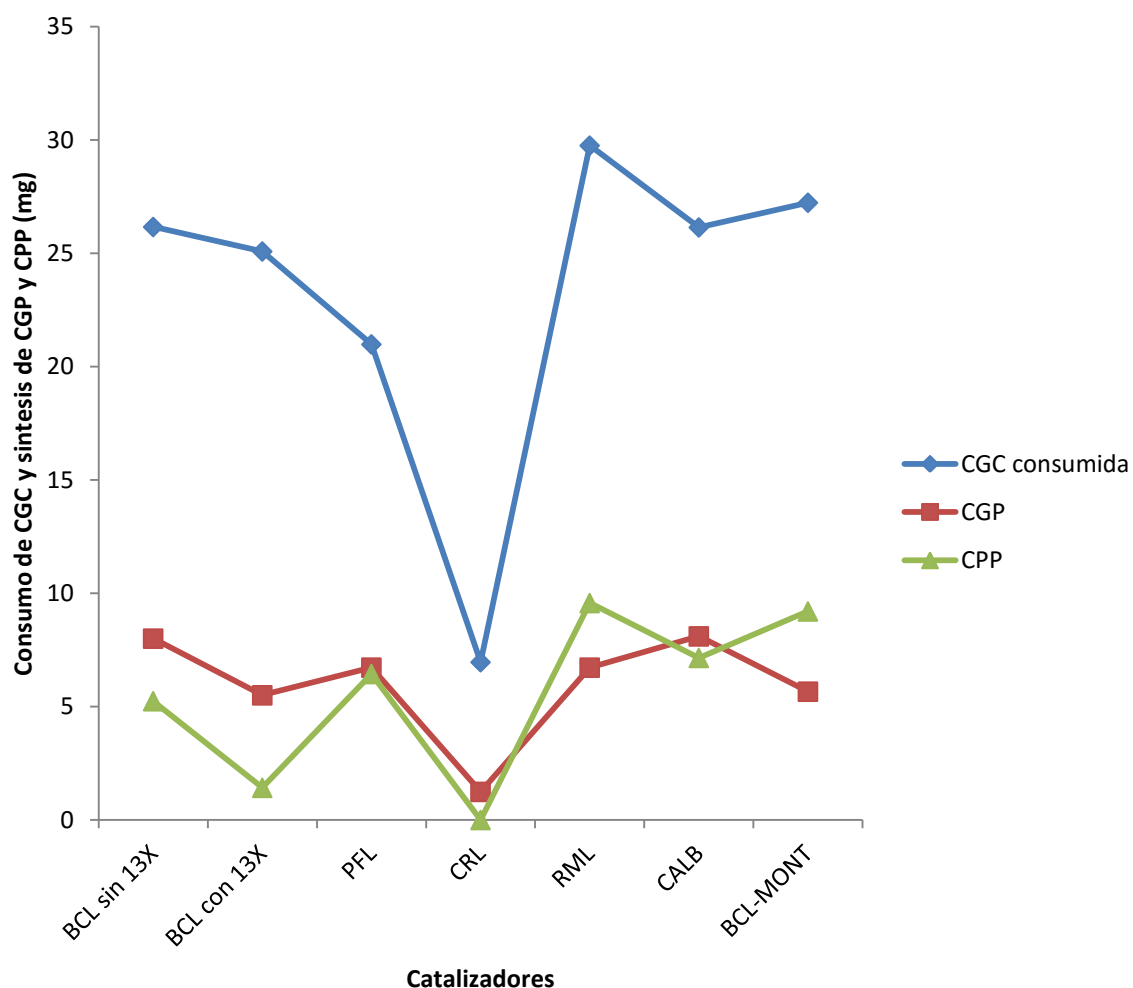


Figura 5.6. CGC consumido y CGP generado (se incluye la formación de CPP con fines comparativos) al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico por 12 horas empleando diferentes catalizadores.

5.6. Evaluación de catalizadores: producción de glicéridos con alto valor nutricional

Dada la composición de la mezcla al finalizar la reacción de esterificación, en *n*-heptano, un tratamiento con una solución acuosa alcalina permite extraer el ácido cáprico y palmítico presente. El producto final será entonces una mezcla de alto valor nutricional compuesta por TAG (CPC, CCC y CPP) y DAG (CGC, CGP). Un objetivo importante es reducir al mínimo la producción de PGP y PPP. La digestión y el metabolismo de ácido palmítico en sn-1 y sn-3 posición se han correlacionado con efectos adversos en los lactantes alimentados con sustitutos de leche [33].

La literatura referida a triglicéridos de cadena media y larga (TCML) se ha vuelto cada vez más importante en los últimos 10 años. Como se ha mencionado previamente, TCM y TCML son una fuente de energía de rápida absorción y desfavorecen la acumulación de grasa en los seres humanos [34]. Por esta razón es importante hacer una clasificación entre los “glicéridos deseables” y los llamados aquí “glicéridos indeseables” (con alto contenido de P) a fin de encontrar el mejor biocatalizador en la producción de TCM y TCML (CPC, CCC, CPP) junto con diglicéridos de cadena media (DCM, particularmente CGC) y diglicéridos de cadena media y larga (DCML, en particular CGP). La Figura 5.7 muestra la distribución de productos considerando todos los compuestos presentes en la mezcla al finalizar la reacción, y la Figura 5.8 presenta la concentración de la mezcla basada sólo en el total de glicéridos deseables e indeseables

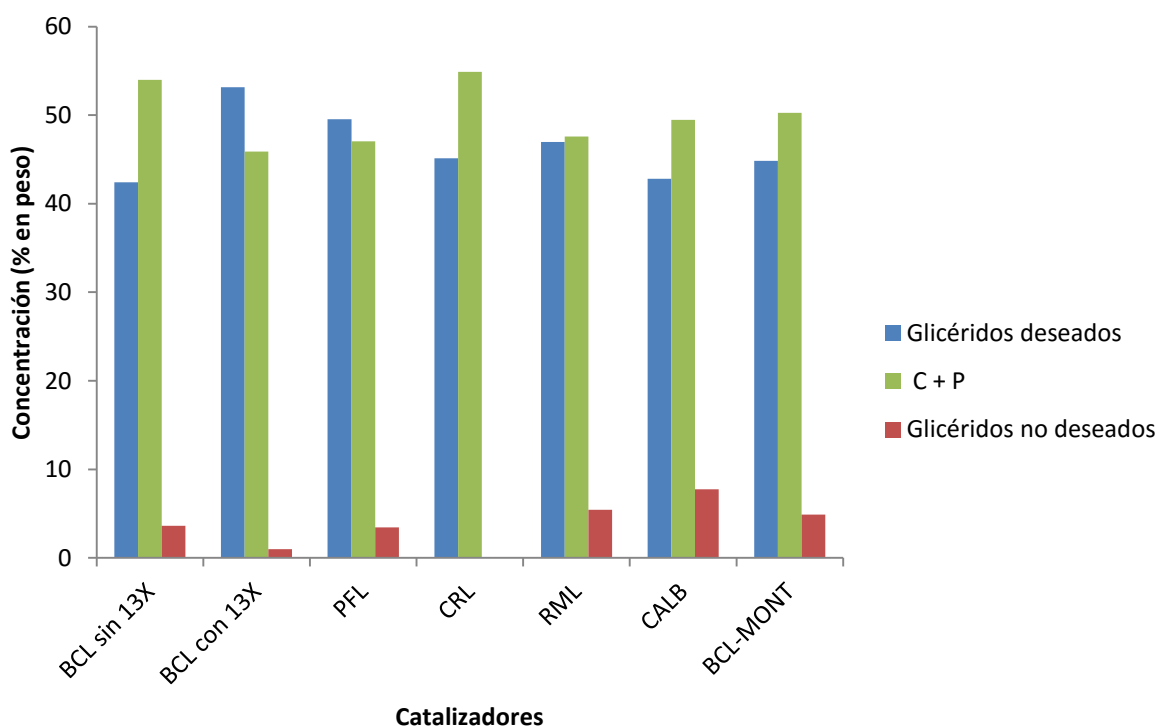


Figura 5.7. Concentración de glicéridos deseados, indeseados y ácidos grasos libres luego de 12 horas de reacción con diferentes catalizadores.

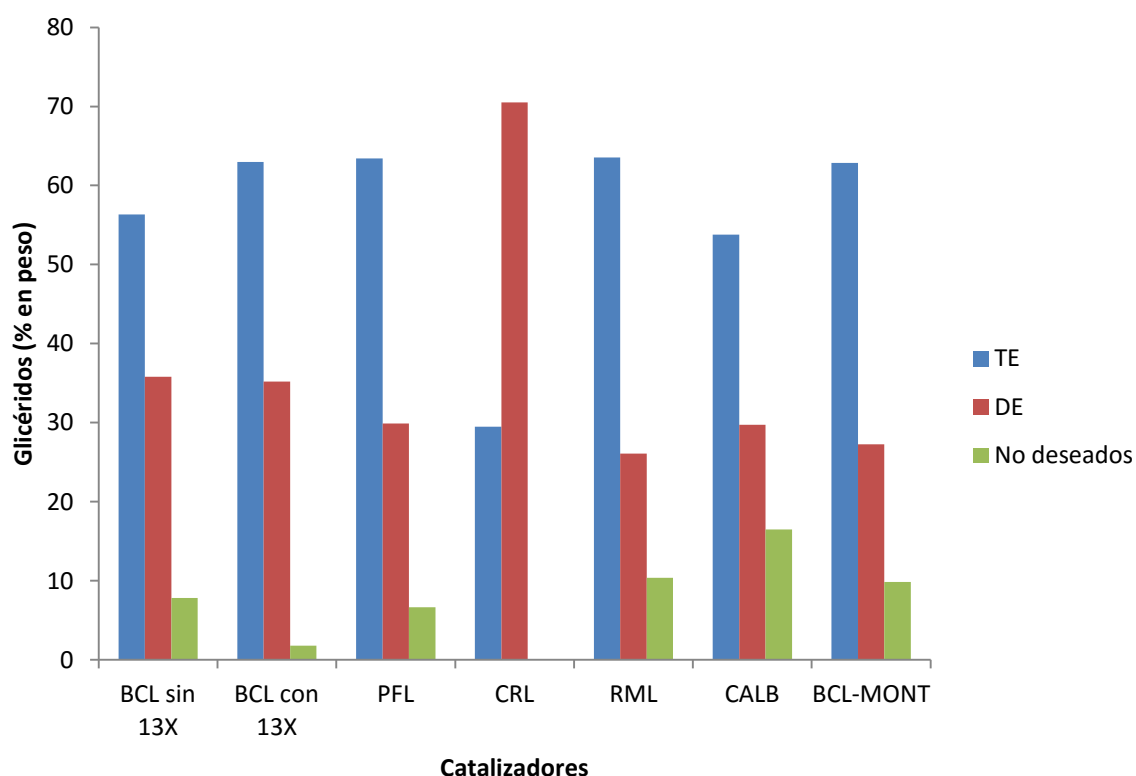


Figura 5.8. Concentración de triglicéridos, diglicéridos deseados y glicéridos no deseados luego de 12 horas de reacción con diferentes catalizadores y luego de separar los ácidos grasos libres.

En función de la información disponible en la literatura sobre el metabolismo de triglicéridos estructurados [35], en el producto final C10:0 debe mantenerse principalmente en posiciones sn-1 y sn-3 mientras que C16:0 debe mantenerse en una alta proporción en posición sn-2 para ser fácilmente disponibles a través del metabolismo.

La fórmula infantil comercialmente disponible como Betapol™, un TAG interesterificado con C16:0 en la posición sn-2, favorece la absorción de triglicéridos y reduce las pérdidas de calcio. Otras grasas han sido diseñadas para ser pobremente absorbidas y favorecer la pérdida de peso, tales como triglicéridos con composición al

azar conteniendo C18:0 y ácidos grasos de cadena corta (C2:0 a C4:0). Salatrim™ o Caprenin™ contienen ácido caprílico, cáprico y behénico.

En este estudio, con la excepción de CRL, y su bajo conversión de dicaprina, el contenido de triglicéridos estructurados alcanzó valores comprendidos entre 53 a 63% (% en peso), el contenido de diglicéridos estuvo entre 26 y 36% y los peores resultados en la selectividad se obtuvieron con RML y CALB (con aproximadamente 10 y 15% de productos no deseados respectivamente). Los mejores resultados se obtuvieron con BCL empleando tamiz molecular 13X.

El metabolismo de los TAG implica el ataque de las posiciones sn-1 y sn-3 de glicéridos con C10:0 en estas posiciones, pero también el ataque de esas posiciones cuando C16:0 se encuentra esterificado en ellas. El porcentaje de C10:0 y C16:0 liberado después de la hidrólisis teniendo en cuenta la composición final de la mezcla de reacción (sin los ácidos grasos C y P, extraídos previamente con solución alcalina) se muestra en la Figura 5.9. Con este proceso de síntesis, el porcentaje en peso de C potencialmente liberado por el metabolismo de esta mezcla fluctúa entre 64 a 98% y el porcentaje de ácido palmítico (no deseado) que potencialmente se podría liberar varía entre 2 a 36% dependiendo del catalizador que se utilice para llevar a cabo la síntesis. Bajo este análisis, los mejores catalizadores son las enzimas solubles PFL y BCL, esta última en particular cuando se emplea con tamiz 13X. Finalmente los resultados obtenidos con BCL-MONT también podrían ser aceptables.

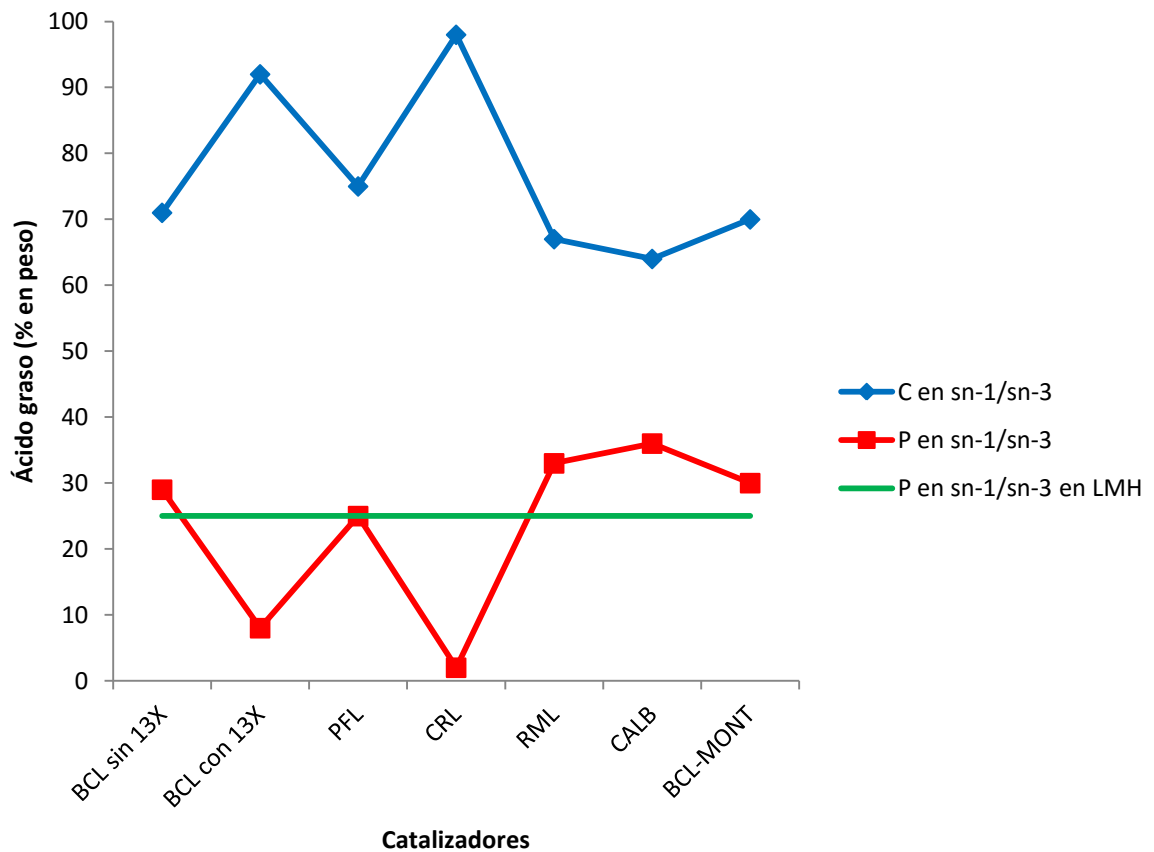


Figura 5.9. Ácido cáprico y palmítico potencialmente liberados durante el metabolismo de la mezcla nutricional obtenida con cada catalizador. Comparación con el máximo porcentaje de ácido palmítico liberado durante la digestión de la grasa de leche materna humana (LMH).

Es importante el análisis de la composición de los sustitutos de grasas nutricionales disponibles para evaluar las potenciales aplicaciones de la mezcla obtenida en este estudio. La Tabla 5.5 muestra los principales sustitutos de las grasas dietéticas comerciales [36-37].

Tabla 5.5. Sustitutos comerciales de grasas alimentarias, usos y composición de ácidos grasos. Comparación con la mezcla nutricional obtenida en este capítulo.

Tipo de sustituto	Nombre Comercial	Aplicaciones	Comentarios	% AGCM ^a	% AGCL ^b	% AGCC ^c
Triglicérido Estructurado	Benefat (antes Salatrim)	Industria Alimentaria	Ácidos Grasos Cortos = acético, propiónico y butírico Ácidos Grasos Largos = aceite hidrogenado (canola, soja, algodón)		C18:0	C2, C4
Triglicérido Estructurado	Caprenin	Caramelos		C8-C10 (43-45)%	(C22:0) (43-45%)	
Triglicérido Estructurado	Bohenin	Confección de dulces			C18:1 –C20	
TCM	Neobee			C8-C10		
	Captrin			C8-C10		
	Captex			C8, C10	C18:2	
	Miglyol			C8 (50-65%) C10 (30-45%)		
Aceite de DAG	Enova	Aderezo para ensaladas	Discontinuado			
En este estudio				C10- (64 a 98%)	C16 (2-36%)	NO

^a AGCM = Ácidos grasos de longitud de cadena media

^b AGCL = Ácidos grasos de longitud de cadena larga

^c AGCC = Ácidos grasos de longitud de cadena corta

En la Tabla 5.6 se presenta la distribución de ácidos grasos en triglicéridos comúnmente empleados en alimentación humana, mientras que en la Figura 5.10 se presenta la concentración de ácido palmítico en la mezcla final y su concentración en la posición sn-2.

Tabla 5.6. Distribución posicional de ácidos grasos en triglicéridos alimentarios [38-39].

Fuente	Posición	Ácidos Grasos (% molar)					
		Ac.	Ac.	Ac.	Ac.	Ac.	Ac. α -
		Mirístico C14:0	Palmítico C16:0	Esteárico C18:0	Oleico C18:1	Linoleico C18:2	Linolenico C18:3
Aceite de Palma	1		60	3	27	9	-
	2		13	<1	68	18	-
	3		72	8	14	3	-
Aceite de Oliva	1		13	3	72	10	1
	2		1	-	83	14	1
	3		17	4	74	5	-
Aceite de Soja	1		4	6	23	48	9
	2		1	<1	22	70	7
	3		13	6	28	45	9
Manteca de Karité	1 y 3		4	80	10	5	-
	2		1	3	79	17	-
Manteca de Cacao	1		34	50	12	1	1
	2		2	2	87	9	-
	3		37	53	9	<1	-
Grasa Porcina (extra muscular)	1	1	10	30	51	6	-
	2	4	72	2	13	3	-
	3	-	-	7	73	8	-
Carne vacuna (intra muscular)	1	4	41	17	20	4	1
	2	9	17	9	41	5	1
	3	1	22	24	37	5	1
Leche de vaca	1	11	36	15	21	1	-
	2	20	33	6	14	3	-
	3	7	10	4	15	<1	-

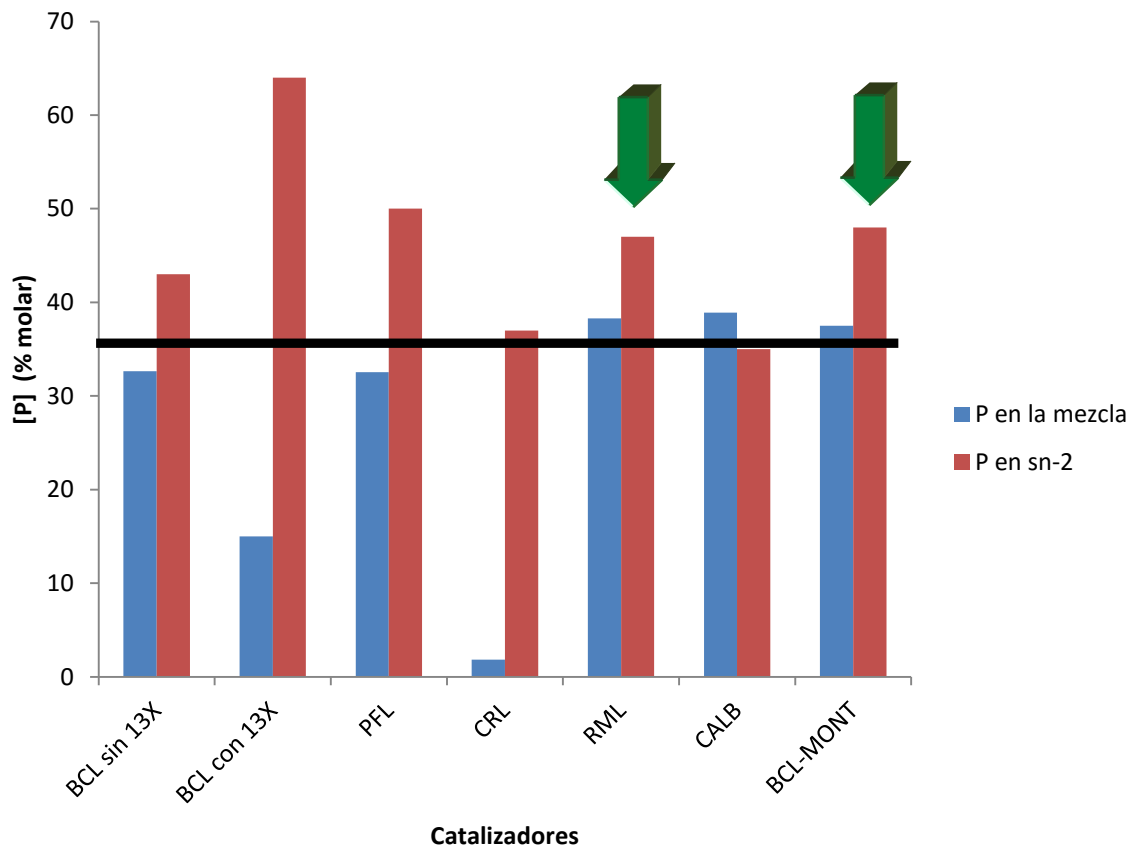


Figura 5.10. Concentración de ácido palmítico presente en los glicéridos que componen la mezcla nutricional y concentración de este ácido en posición sn-2 de esos glicéridos. Comparación con la concentración de ácido palmítico en posición sn-2 en la grasa de leche vacuna [40].

La línea en la Figura 5.10 muestra la concentración de P en posición sn-2 en la leche de vaca. RML y BCL inmovilizada lograron producir una mezcla que podría contener 47-48% de P en sn-2.

De la Figura 5.10 se hace evidente que las tendencias que se registran para las mezclas obtenidas con BCL sin tamiz molecular, RML y BCL sobre montmorillonita son similares. Llevando a cabo la esterificación con BCL con el agregado de tamiz 13X se logró una alta proporción de P en posición sn-2, sin embargo el porcentaje de ácido palmítico en la mezcla nutricional es bajo. Las mezclas finales obtenidas con CALB y CRL claramente

no presentan comportamientos similares a otras. La mezcla nutricional obtenida en el presente capítulo tiene mayor porcentaje de P en la posición sn-2 que la grasa de leche de vaca, y la fracción molar de P en sn-2 se encuentra entre la correspondiente a la grasa de leche de vaca (33%) y la de los triglicéridos porcinos (72%) y lejos de cualquier fórmula nutricional enriquecida con aceites vegetales (P en sn-2 para aceites vegetales entre 1 y 13%, ver Tabla 5.7).

5.7. Identificación del ácido graso esterificado en la posición sn-2

Un aspecto sumamente importante en la síntesis de acilglicéridos estructurados es la correcta identificación del ácido graso esterificado en la posición sn-2. En primer lugar, un cuidadoso análisis de muestras se realizó por cromatografía de gases. Posteriormente, metodologías tradicionales fueron evaluadas. La hidrólisis de glicéridos empleando lipasa de páncreas porcino [41,42] o la etanólisis catalizada por Novozym 435 [43-45] son las metodologías más ampliamente reportadas para la identificación de ácidos grasos esterificados en posición sn-2. Ambas técnicas permitirían la generación de 2-monoglicéridos al liberar los ácidos grasos esterificados en posiciones sn-1 y sn-3.

5.7.1. Identificación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol por cromatografía gaseosa

Dado que la columna empleada ha podido detectar isómeros de posición para el caso de mono- y diglicéridos se planteó la síntesis de 1,3-dicaproil-2-palmitoilglicerol (CPC) y 1,2-dicaproil-3-palmitoilglicerol (CCP) mediante la metodología presentada en la Sección 2.2.2.6.

La Figura 5.11 muestra dos cromatogramas correspondientes a la síntesis de CPC por esterificación de 2-monopalmitina con ácido cáprico.

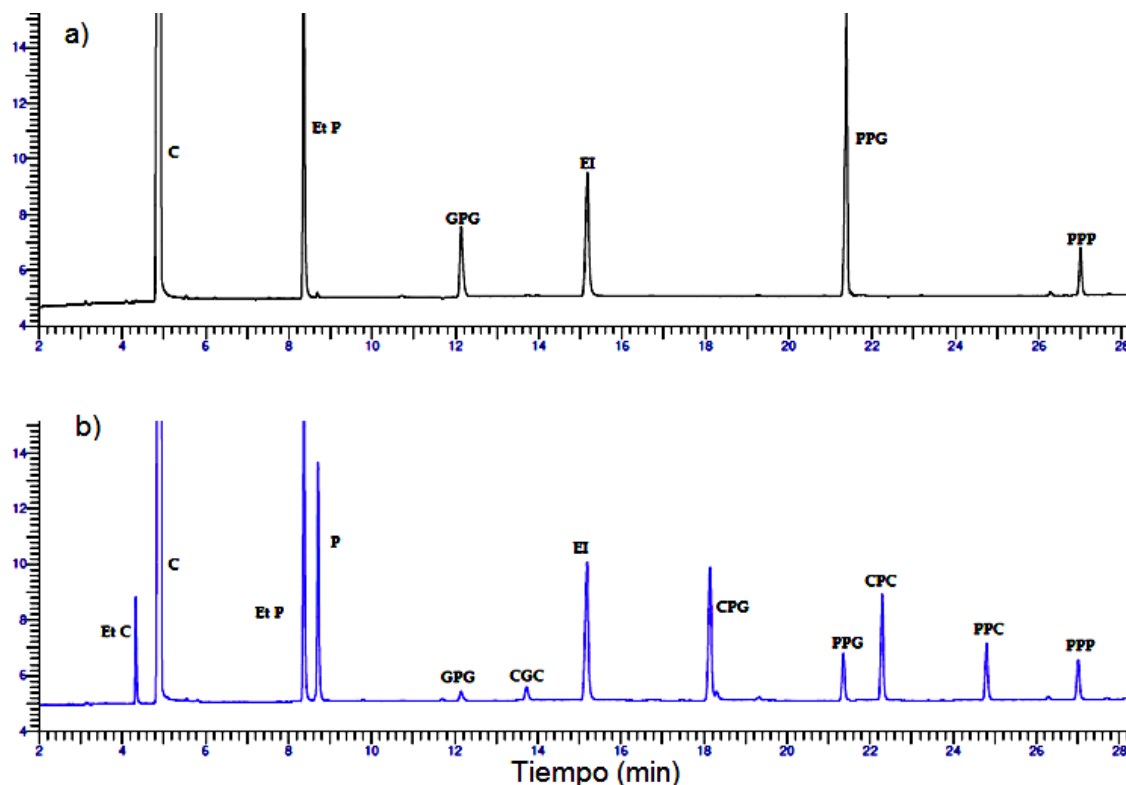


Figura 5.11. Síntesis de CPC por esterificación de 2-monopalmitina con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM. a) Inicio de la reacción, b) 15 minutos de reacción

Un gráfico igual al presentado en la Figura 5.11 pero considerando la síntesis de CCP mediante la esterificación de 1,2-dicaprina con ácido palmítico se muestra en la Figura 5.12. Finalmente, en un mismo gráfico, se presentan los cromatogramas para los productos de ambas reacciones (Figura 5.13). Donde se hace evidente que la columna no es capaz de diferenciar estos isómeros de posición.

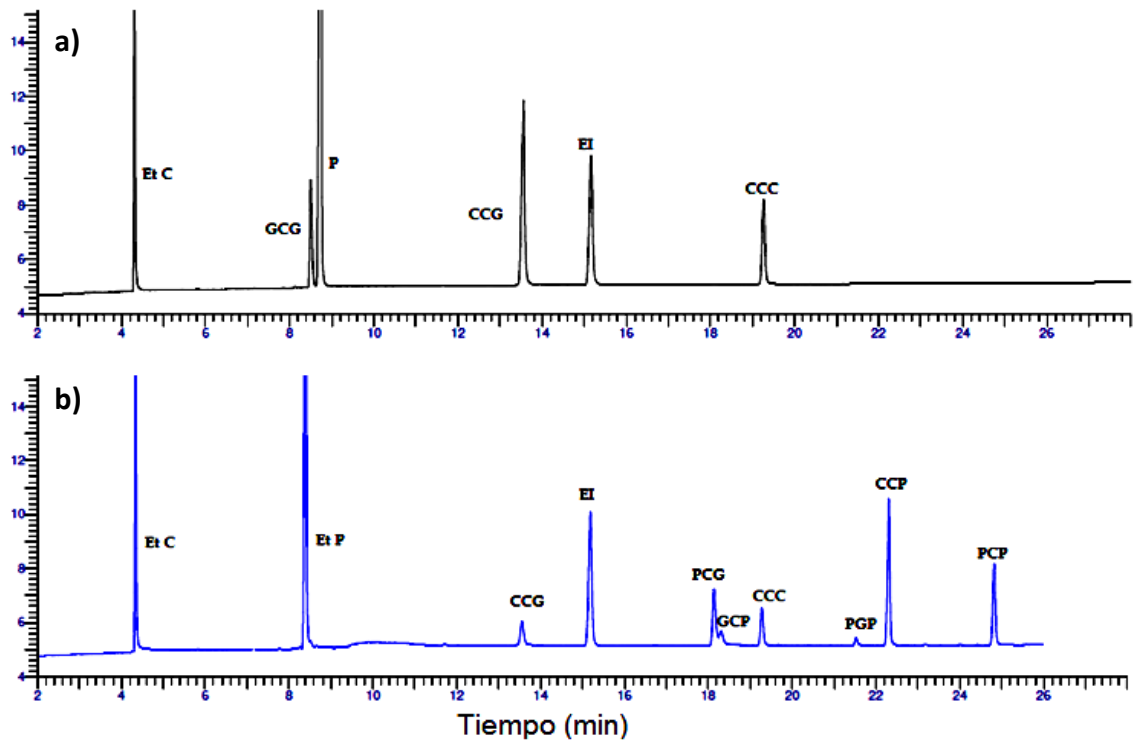


Figura 5.12. Síntesis de CCP por esterificación de 1,2-dicaprina con ácido palmítico catalizada por Lipozyme RM IM. a) Inicio de la reacción, b) 15 minutos de reacción

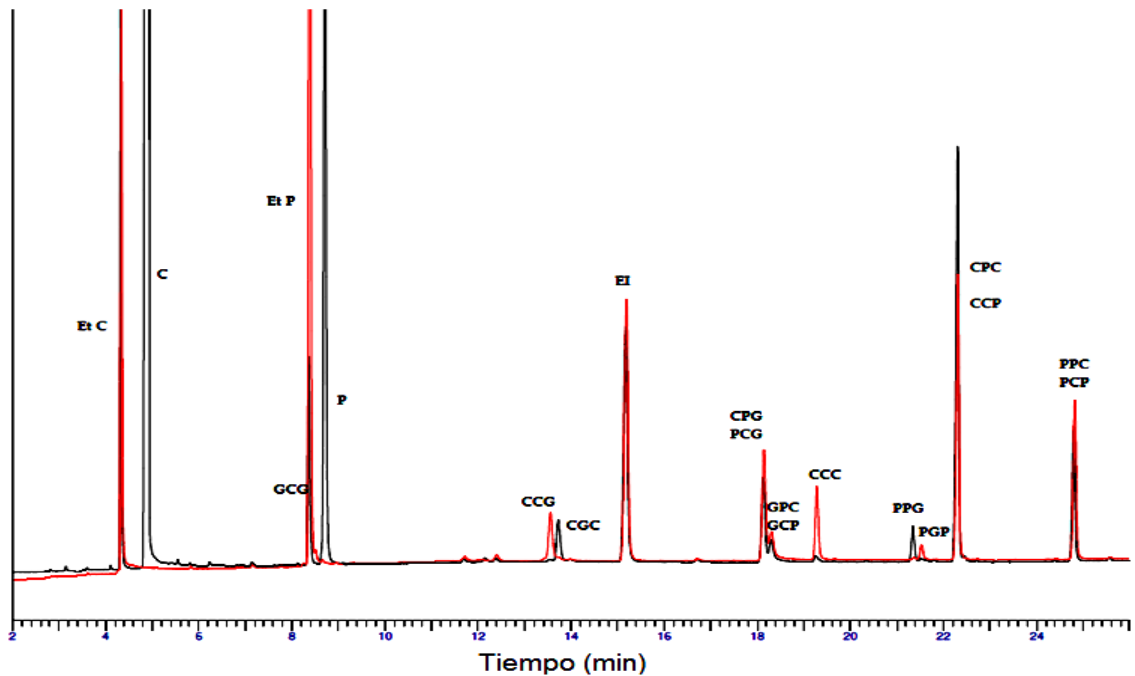


Figura 5.13. Cromatogramas para muestras del producto final de la reacción de síntesis de CPC y de CCP. Referencias: Negro: muestra con CPC, Rojo: muestra con CCP.

Es evidente que la columna empleada sólo permite la diferenciación de la posición de grupos OH y no de ácidos grasos. De esta manera es posible diferenciar todos los isómeros de diglicéridos puros por ejemplo, los isómeros de dicaprina, CCG CGC GCC. Sin embargo, cuando se trata de diglicéridos estructurados sólo es posible la diferenciación de la posición del grupo OH y no de los ácidos grasos. El tiempo de retención de CPG y PCG es el mismo, de igual manera GPC y GCP.

5.7.2. Identificación de ácido graso esterificado en posición sn-2 mediante hidrólisis con lipasa de páncreas porcino

La hidrólisis de glicéridos con lipasa de páncreas porcino (PPL) se llevó a cabo como se indica en la Sección 2.2.2.7. En la Figura 5.14 se presentan los cromatogramas de la muestra de glicéridos iniciales y los productos de la hidrólisis.

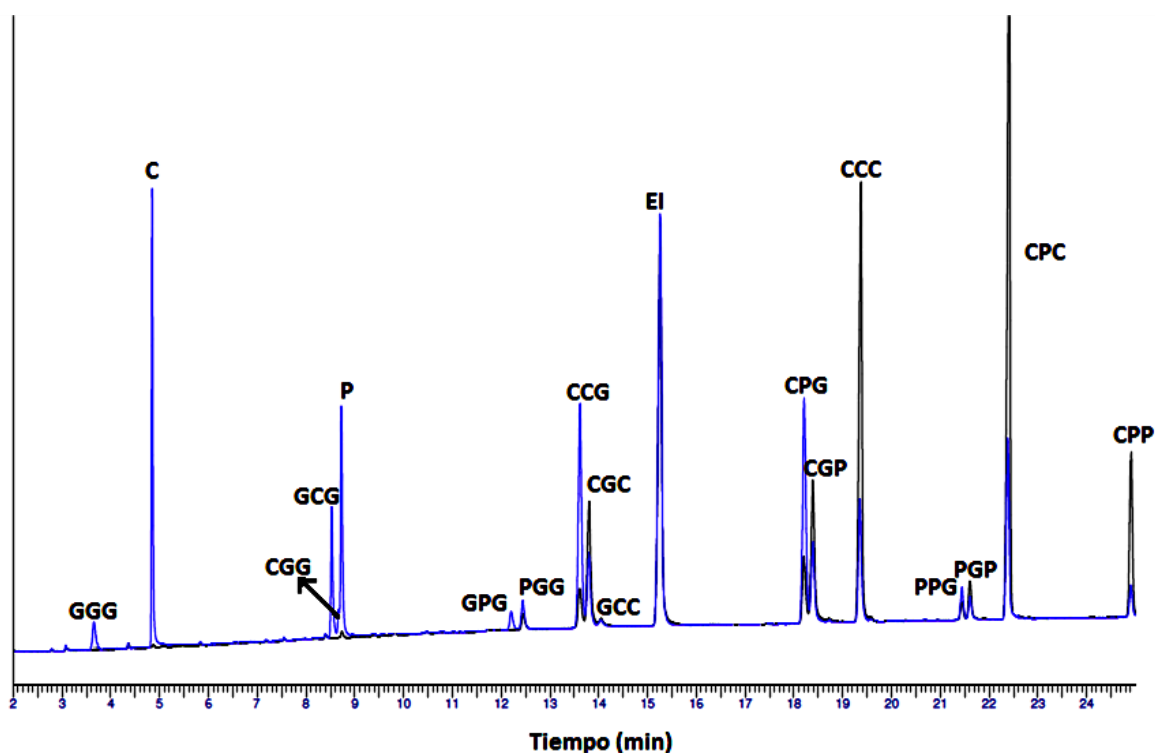


Figura 5.14. Cromatogramas correspondientes a la mezcla nutricional (Negro) y al producto de la hidrólisis de la misma con PPL (Azul).

Varios aspectos importantes pueden destacarse de la Figura 5.14. Se observa una alta proporción de 2-monocaprina y 1,2-dicaprina, probablemente generada a partir de hidrólisis de tricaprina presente en la mezcla nutricional. Por otro lado, la mayor proporción de ácido cáprico que de ácido palmítico liberado, indica que C se encuentra mayoritariamente en posiciones sn-1 y sn-3 y P se encuentra en menor proporción en estas posiciones. El incremento de CPG indica que una alta proporción de P se encuentra en la posición sn-2 y que la hidrólisis de la posición sn-3 es más factible que la de la posición sn-1. Finalmente la presencia de 1-monopalmitina, 1-monocaprina y glicerol sólo pueden explicarse en término de la reacción de migración de acilos ya que la lipasa de páncreas porcino ha sido ampliamente reconocida como 1,3-específica [46].

El empleo de PPL para la identificación de ácidos grasos en la posición sn-2 se encuentra limitado por la ocurrencia de la reacción de migración de acilos. La proporción de 2-monopalmitina generada es considerablemente baja ya que la hidrólisis de la posición sn-1 resulta más difícil que la de la posición sn-3, por lo cual la hidrólisis de 1,2-DAG es compleja, en especial por la preferencia de PPL por ácidos grasos de cadena corta [46]. Aumentar el tiempo de reacción para favorecer la hidrólisis de diglicéridos también favorecería la migración de acilos de sn-2 a sn-1.

5.7.3. Identificación de ácido graso esterificado en posición sn-2 mediante etanólisis con Novozym 435.

La etanólisis de glicéridos catalizada por Novozym 435 se llevó a cabo como se indica en la Sección 2.2.2.8. En la Figura 5.15 se presentan los cromatogramas

correspondientes a la muestra de glicéridos iniciales y los productos generados por la etanólisis de la misma.

Coincidiendo con lo observado durante la hidrólisis realizada con PPL, la presencia de 1-monocaprina, 1-monopalmitina y glicerol sólo puede explicarse en base a la reacción de migración de acilos. Aún a tiempos cortos y baja temperatura la migración de acilos fue importante lo que impide la correcta determinación del porcentaje de ácido palmítico esterificado en sn-2.

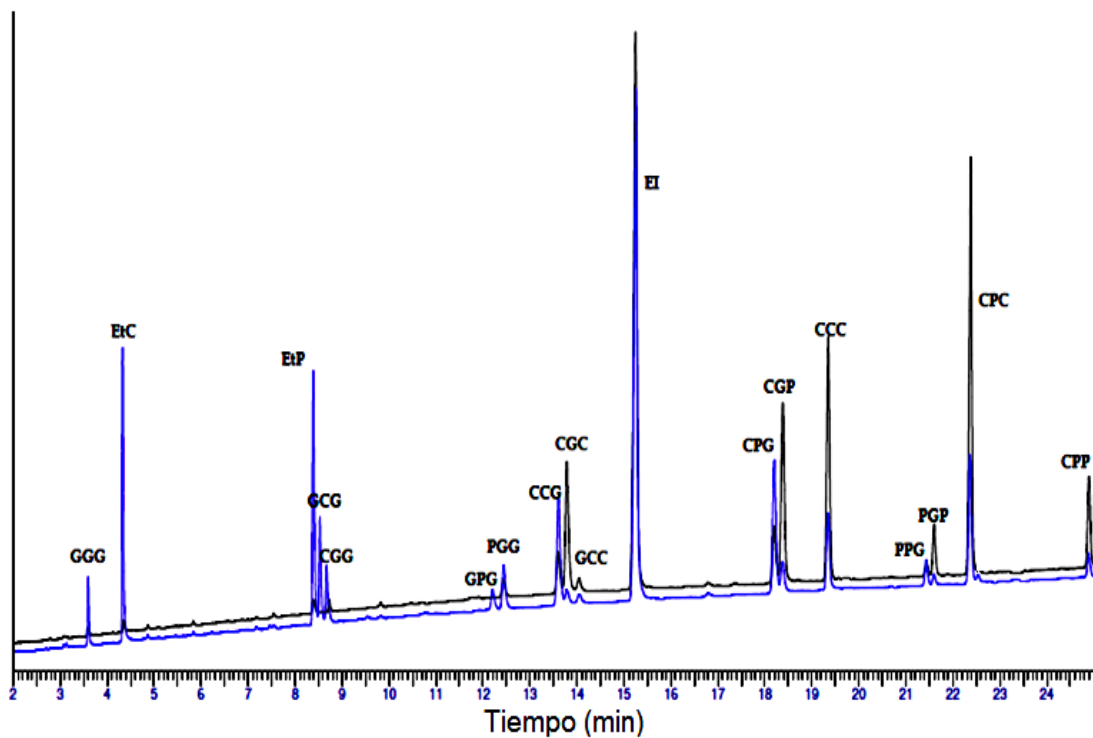


Figura 5.15. Cromatogramas correspondientes a la mezcla nutricional (Negro) y al producto de la etanólisis de la misma con Novozym 435 (Azul).

5.8 Resultado del análisis de muestras por resonancia magnética nuclear

La preparación de las muestras y la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron realizadas con la colaboración del Dr. Raul Garay siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.2.2.9.

El análisis por ^{13}C RMN para triglicéridos muestra dos conjuntos de resonancias para los carbonos carbonílicos. El conjunto de alta frecuencia incluye las cadenas esterificados en posiciones sn-1(3) del glicerol, mientras que el set de baja frecuencia incluye las cadenas que se ubican en la posición sn-2. En particular, las señales de los carbonos carbonílicos ubicadas en posiciones sn-1/3 se desplazan en aproximadamente 0,42 ppm a mayor frecuencia que las de los carbonilos de la posición sn-2 del glicerol.

Dentro de cada conjunto de señales, la correspondiente a ácidos grasos saturados, oleico y linoleico aparecen de mayor a menor frecuencia en ese orden, de acuerdo con las asignaciones sobre la base de modelos sintéticos de triglicéridos.

La espectroscopia de triglicéridos por RMN ^{13}C de alta resolución por el análisis de carbonos carbonílicos ha permitido el estudio de la distribución posicional de ácidos grasos en los TAG. Fue introducida como un nuevo método analítico para detectar la adulteración de aceites de oliva vírgenes con aceites sintéticos esterificados. En estos aceites, que deben mostrar una distribución aleatoria de ácidos grasos entre posiciones de glicerol (una distribución aleatoria predice que el 33,3% de cada ácido graso se encuentra la posición sn-2), los porcentajes de cadenas saturadas en la

posición sn-2 fueron más altos que el valor máximo de 1,3% encontrado en un aceite de oliva virgen extra donde las cadenas saturadas están esterificadas predominantemente en las posiciones sn-1/sn-3 [47].

La resonancia de carbonos carbonílicos fue utilizada para estudiar la estructura molecular de los triglicéridos de aceites de oliva monovarietal. Las resonancias integradas de cadenas de carbonilo saturado, oleilo y linoleilo fueron empleadas para llevar a cabo el análisis regioespecífico de los triglicéridos mediante el cálculo de la composición total, la distribución entre las posiciones sn-1/sn-3 y la posición sn-2 del glicerol y la especificidad hacia la posición sn-2 del glicerol de ácidos grasos con insaturaciones.

La Figura 5.16 muestra la distribución de los picos en el espectro de ^{13}C RMN para un aceite de oliva que contiene ácidos grasos saturados (S), oleico (O) y linoleico (L)

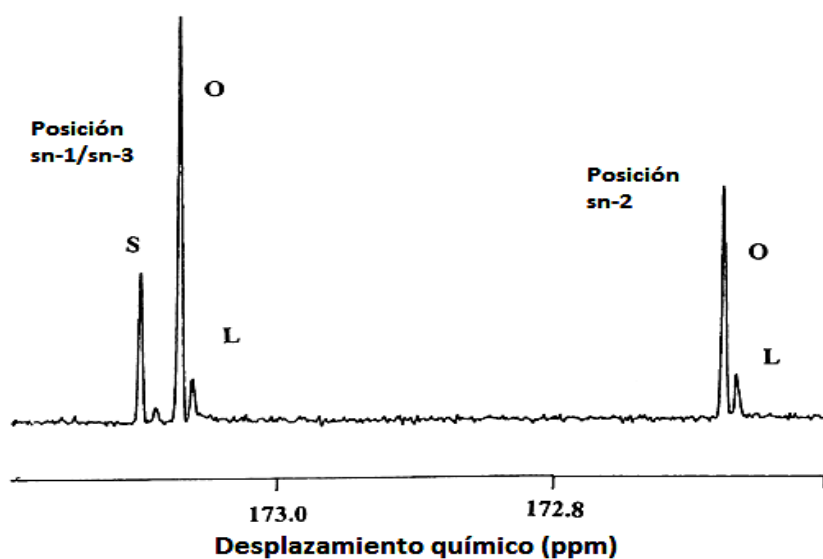


Figura 5.16. Región de carbono carbonílico (172-174 ppm) del espectro de ^{13}C a 300 MHz de una muestra de aceite de oliva. Se indican las resonancias de cadenas saturadas (S), oleil (O) y linoleil esterificadas en posiciones sn-1/sn-3 y sn-2 [47].

El espectro de RMN de ^{13}C de una muestra de aceite de oliva contiene las resonancias de carbonos de la fracción de triglicéridos del aceite de oliva, es decir, las resonancias de ácidos grasos. Las resonancias de carbono-13 se agrupan en cuatro conjuntos de señales: carbonos carbonílicos de 172 a 174 ppm, átomos de carbono insaturados en el intervalo de 124 a 134 ppm, carbonos del esqueleto de glicerol de 60 a 72 ppm y carbonos alifáticos de 10 a 35 ppm.

Se analizaron las siguientes muestras, tanto por RMN ^1H como por RMN ^{13}C :

- Tripalmitina patrón (PPP), comercial.
- Mezcla de 1,3-dicaprina (CGC) con 1,2-dicaprina (CCG), caracterizada por cromatografía gaseosa.
- Mezcla de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol (CPC) y 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol (CCP) de la segunda etapa de obtención de triglicéridos estructurados MLM.
- Mezcla de CGC y CCG esterificada con ácido oleico (O) para generar COC y CCO.

Del análisis preliminar de la literatura consultada resultó evidente que la RMN de ^1H puede indicarnos la presencia de insaturaciones en los triglicéridos. Esto es, en presencia de un ácido graso insaturado, podía confirmarse la incorporación del mismo al triglicérido por la aparición de señales características de hidrógeno asociado al carbono etilénico (resonancia a 5.2–5.5 ppm). Como el objetivo específico era encontrar una técnica que nos permitiera analizar la incorporación de un ácido graso de cadena larga en la posición sn-2, en primer lugar los estudios por RMN de ^1H no

fueron concluyentes en ese sentido. Siendo P y C saturados, es muy difícil poder diferenciar en función al largo de cadena los distintos ácidos grasos incorporados.

5.8.1. Resonancia magnética nuclear de tripalmitina

Los espectros de RMN para tripalmitina (PPP) se presentan a continuación. En la Figura 5.17 se muestra el espectro de ^1H .

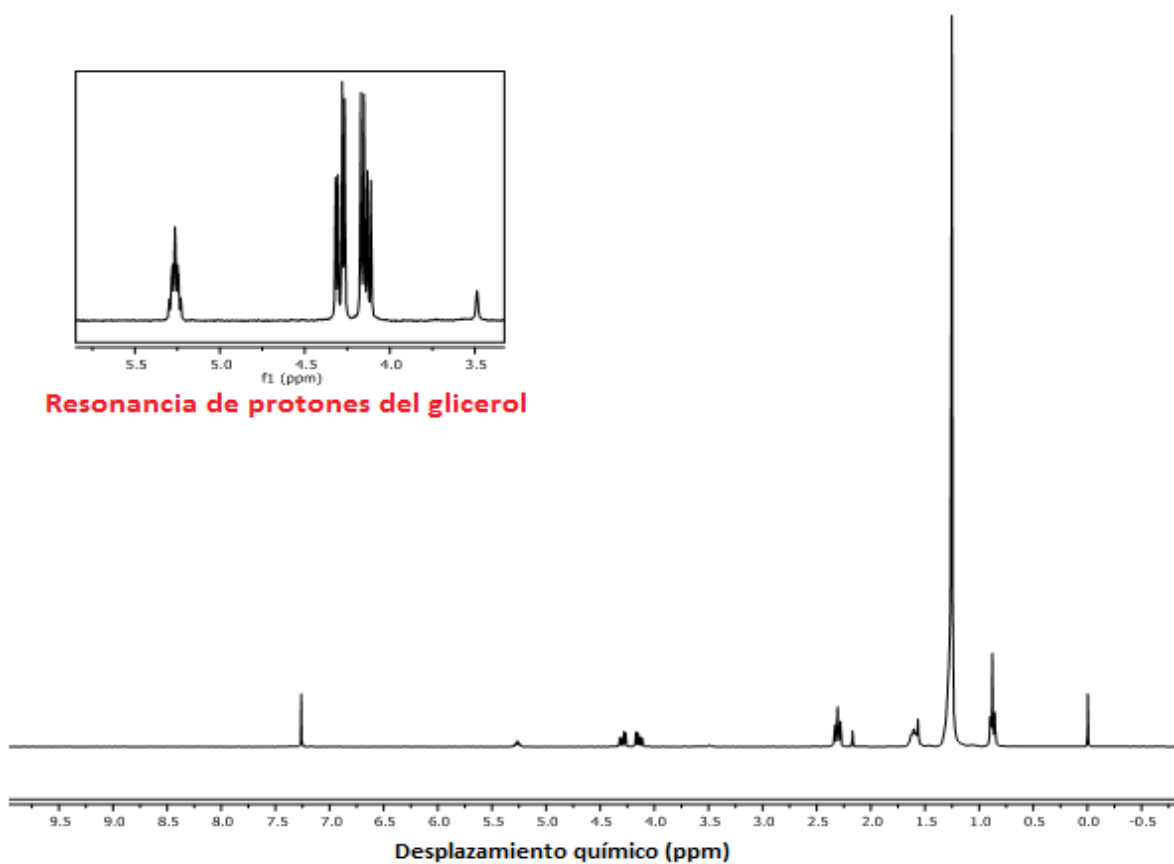


Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H de tripalmitina.

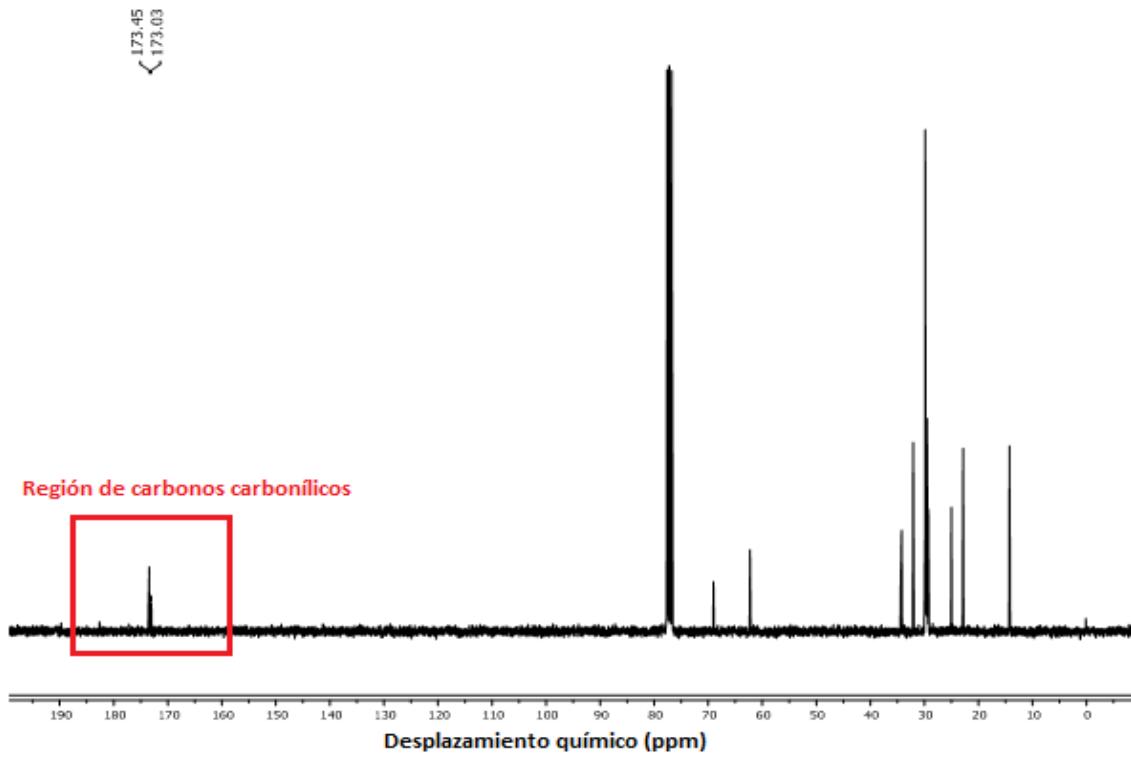


Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C de tripalmitina.

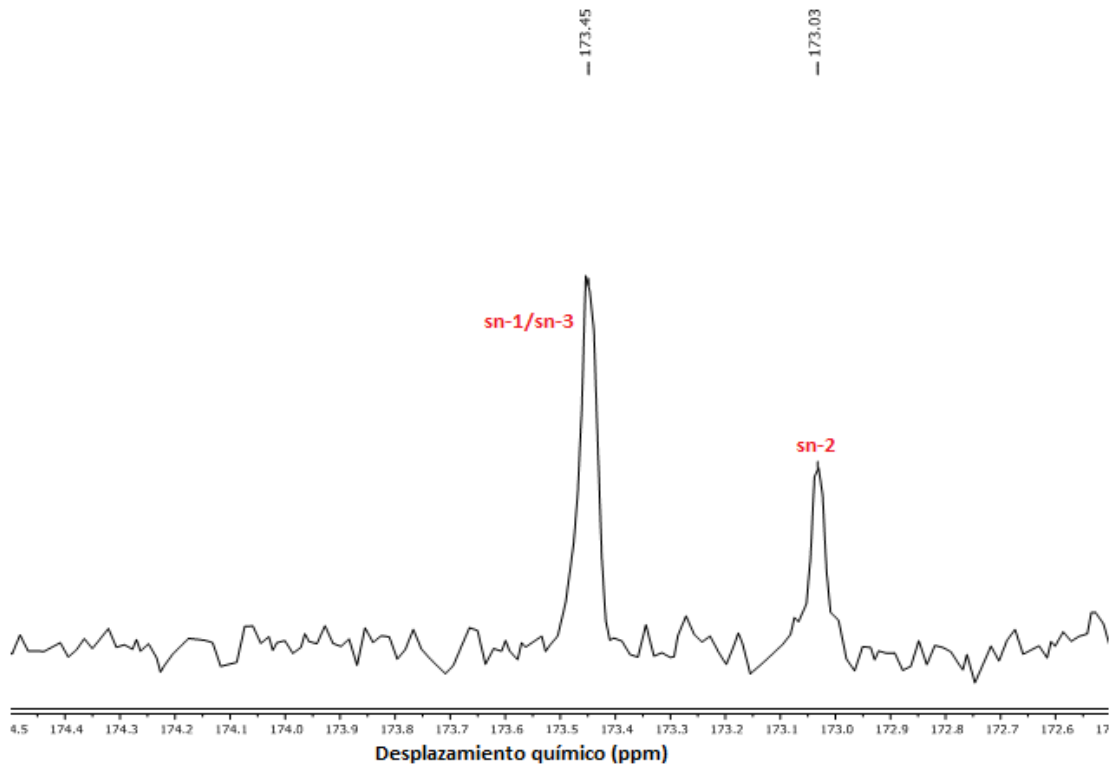


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^{13}C de tripalmitina, zona de carbonos carbonílicos.

La Figura 5.19 muestra el espectro de ^{13}C de tripalmitina en la región de carbonos carbonílicos, tal espectro es sólo cualitativo ya que aún contiene el efecto nuclear Overhauser (descrito en la Sección 2.2.2.9.1). Esta zona (172 a 174 ppm) es la más importante para poder detectar diferencias en la posición sn-2. Para PPP, las señales del carbonilo del ácido palmítico en las posiciones sn-1 y sn-3 aparecen en 173.45, mientras que la señal del carbonilo correspondiente al ácido palmítico en sn-2 aparece en 173.03.

5.8.2. Resonancia magnética nuclear de CGC y CCG

La muestra analizada contiene no sólo diglicéridos sino también una fracción menor de tricaprina. En la Figura 5.20 se presenta el espectro de ^1H para esta muestra, mientras que en las Figuras 5.21, 5.22 y 5.23 se muestran los espectros de ^{13}C .

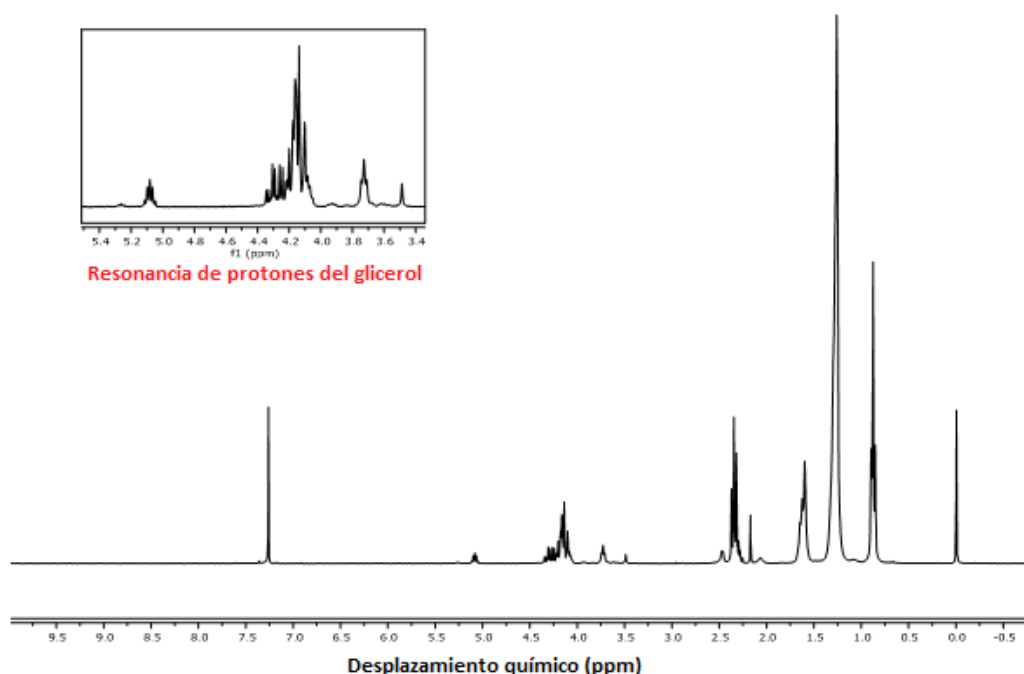


Figura 5.20. Espectro de RMN de ^1H de CGC y CCG.

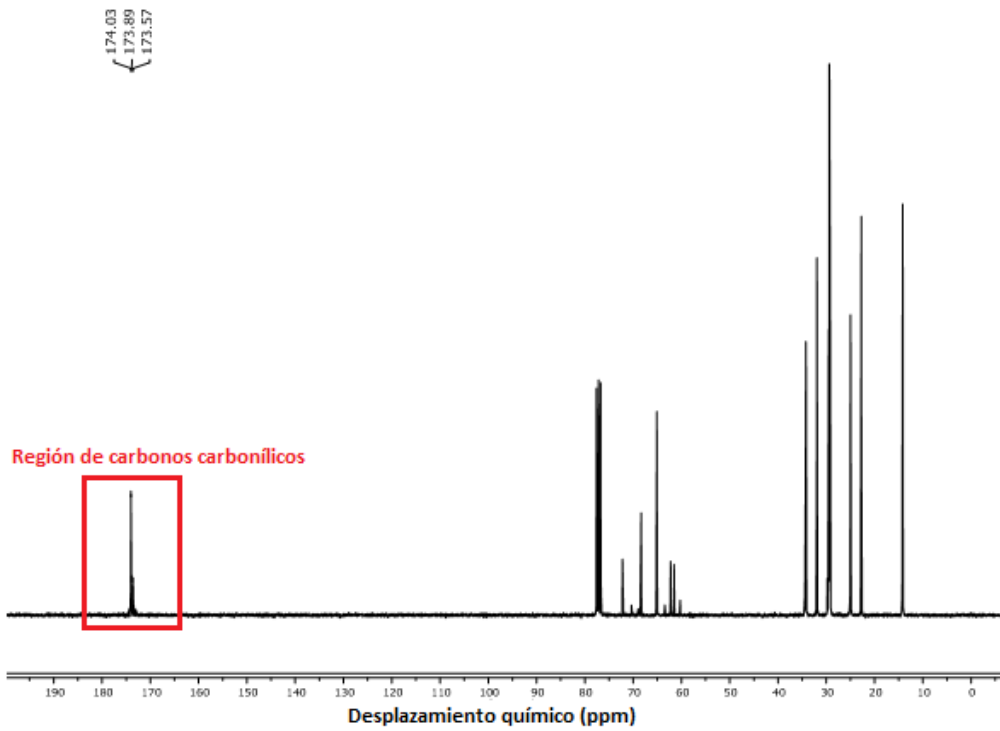


Figura 5.21. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG.

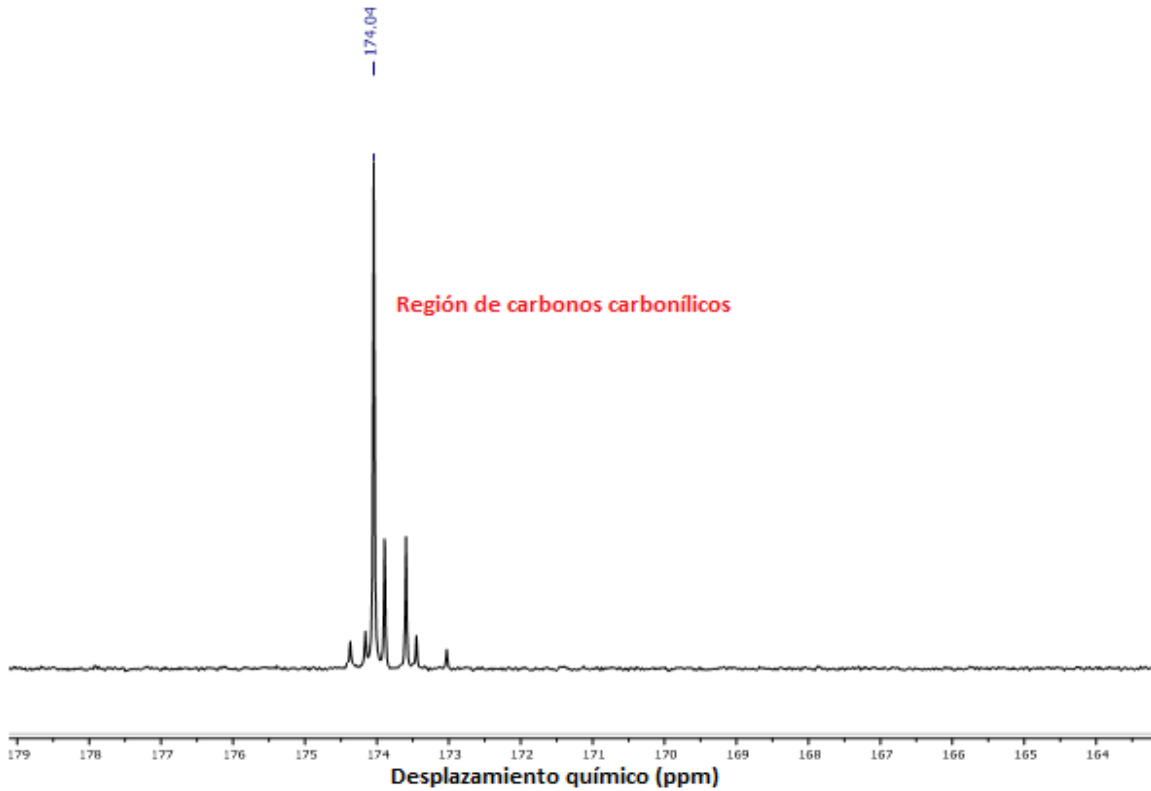


Figura 5.22. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG mostrando la región de carbonos carbonílicos.

En la Figura 5.23 se presenta una ampliación aún mayor de la zona de carbonilos y donde se han suprimido los efectos Overhauser, lo que permite la cuantificación.

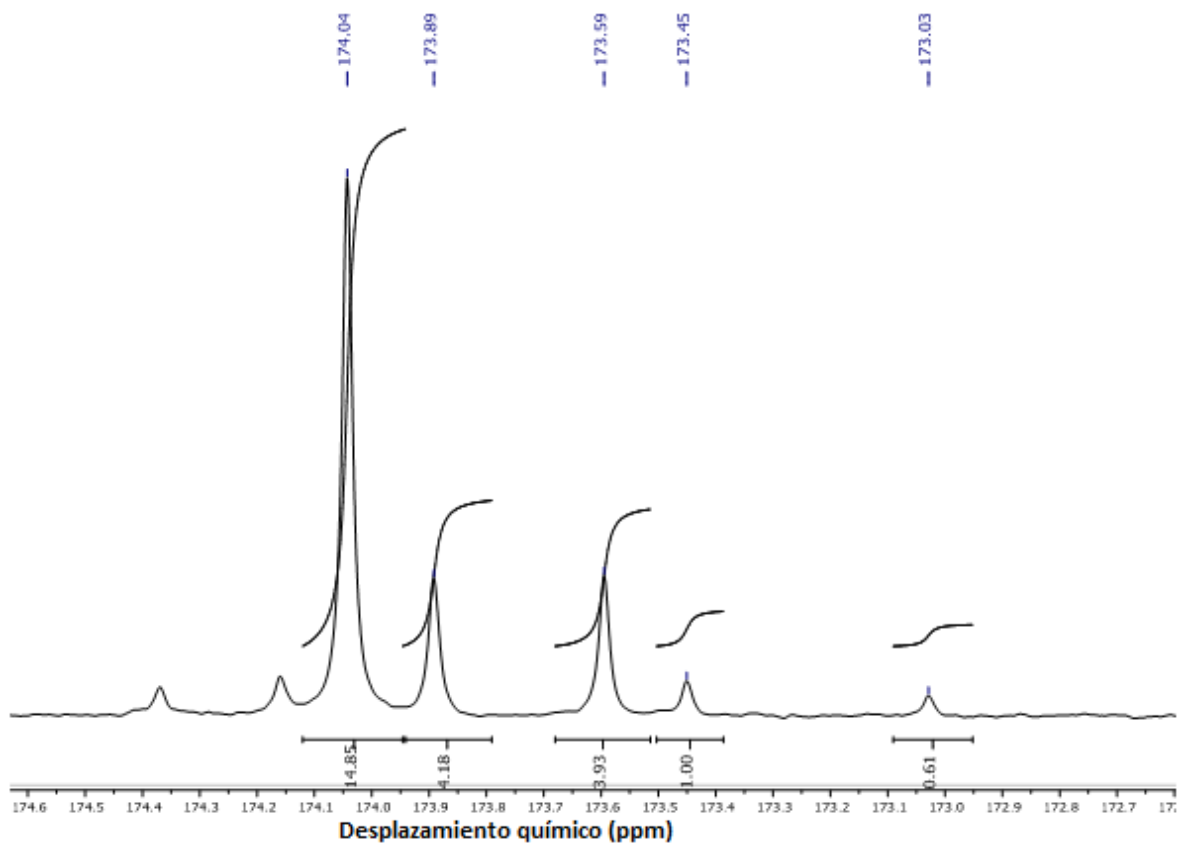


Figura 5.23. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG ampliación de la región de carbonos carbonílicos.

La muestra analizada contenía 63% de CGC, 33 % de CCG(GCC) y 4 % del triglicérido CCC. En la Figura 5.21 se detectan picos a 173.45 ppm correspondientes a los carbonilos de ácido cáprico (C) esterificado en posiciones sn-1 y sn-3, mientras que a 173.03 se detecta el pico correspondiente al carbonilo de C esterificado en posición sn-2. Estos resultados confirman que con la técnica empleada, bajo estas condiciones, el equipo no posee la capacidad de discriminar entre ácido cáprico y ácido palmítico.

El pico detectado a 173.59 ppm es asignable al carbonilo de C en posición sn-2 en CCG(GCC), mientras que el pico en 173.89 ppm se asigna a C esterificado en sn-1 en CCG o en sn-3 de GCC. Finalmente en 174.04 ppm, aparece el pico correspondiente a carbonilos de ácido cáprico esterificado en posiciones sn-1/sn-3 de 1,3-dicaprina.

5.8.3. Resonancia magnética nuclear de CPC y CCP

Los triglicéridos CPC y CCP fueron obtenidos por esterificación de la muestra conteniendo CGC y CCG. En la Figura 5.24 se presenta el espectro de ^1H correspondiente a estos TAG, donde se observan la resonancia de las H del glicerol y no se detectan protones oleofínicos (como es de esperar).

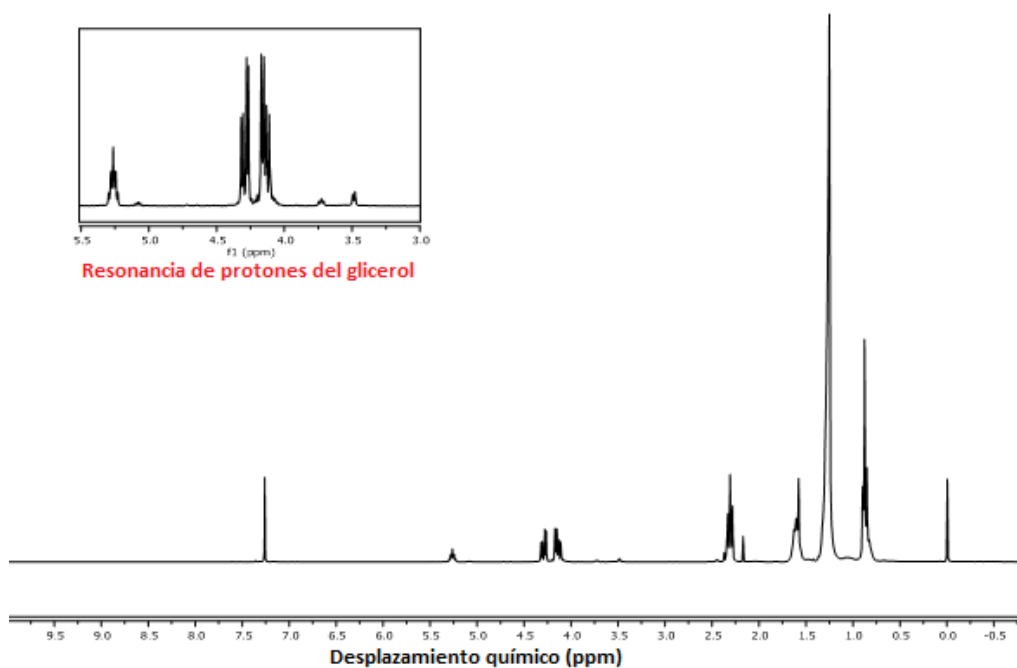


Figura 5.24. Espectro de RMN de ^1H de CPC y CCP.

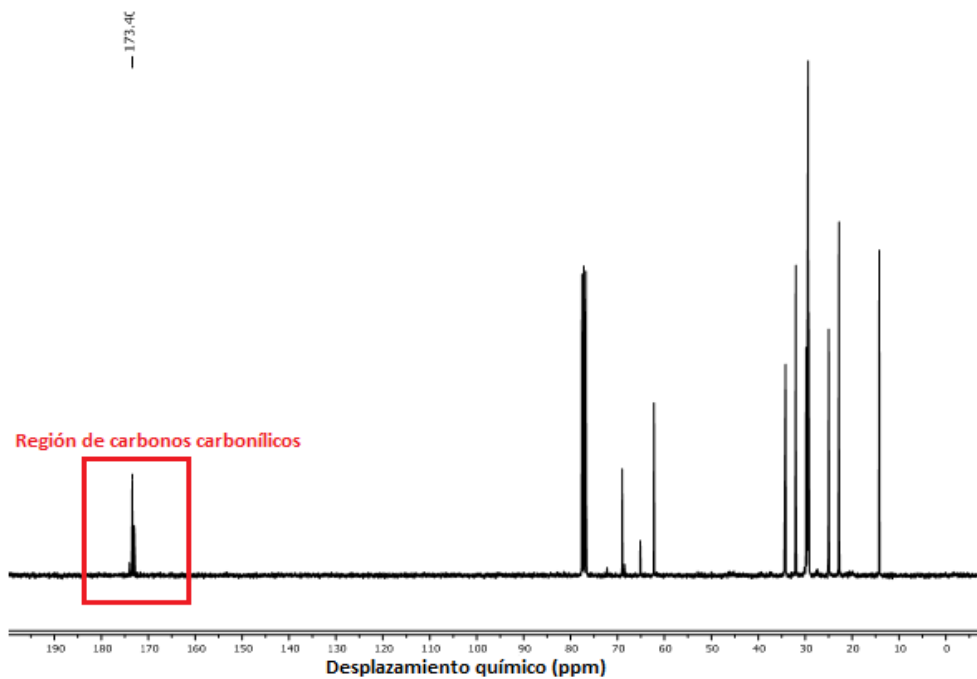


Figura 5.25. Espectro de RMN de ^{13}C de CPC y CCP.

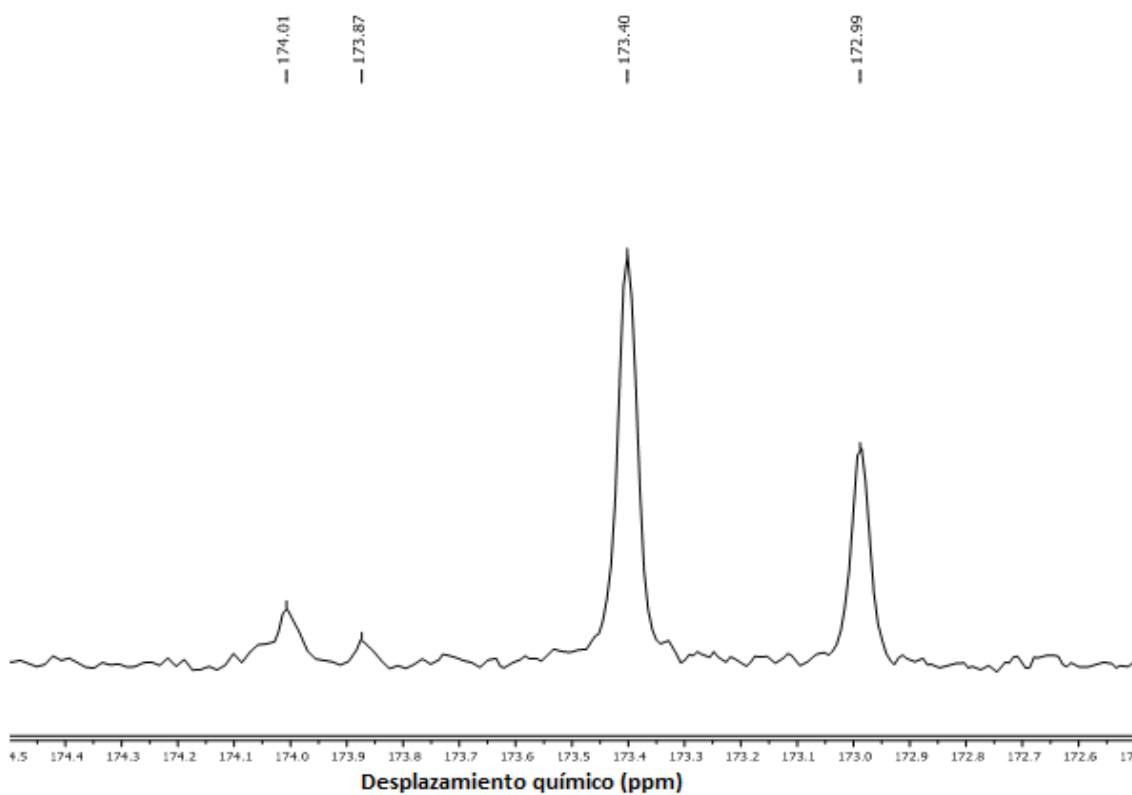


Figura 5.26. Espectro de RMN de ^{13}C de CPC y CCP, región de carbonos carbonílicos

Los picos detectados a 173.87 ppm y 174.01 ppm son asignables a diglicéridos remanentes (1,3 y 1,2 DAG). Dos picos bien diferenciados aparecen a 173.40 ppm (sn-1/sn-3) y 172.99 ppm (sn-2). En este caso no es posible determinar si la posición sn-2 se encuentra esterificada con ácido cáprico o palmítico.

En función a los resultados hasta aquí presentados, resulta claro que la técnica no puede contribuir en la diferenciación de ácidos grasos saturados de distinta longitud de cadena esterificados en posición sn-2 de triglicéridos. Esto se confirmó al realizar la síntesis de CCP desde CCG, en donde el único pico que no aparece en relación al último espectro presentado es el ubicado a 174.04 ppm (espectro no mostrado).

Teniendo en cuenta que el método puede discriminar entre ácidos grasos saturados e insaturados, se consideró el análisis de una mezcla de triglicéridos obtenida por esterificación de dicaprina (mayoritariamente CGC) con ácido oleico.

5.8.4. Resonancia magnética nuclear de COC y CCO

La muestra a analizar fue obtenida por esterificación de dicaprina, conteniendo 80% de CGC y 20% de CCG, con ácido oleico. En la Figura 5.27 se presenta el espectro de ^1H correspondiente a esta muestra en donde se detecta la presencia de hidrógenos oleofínicos

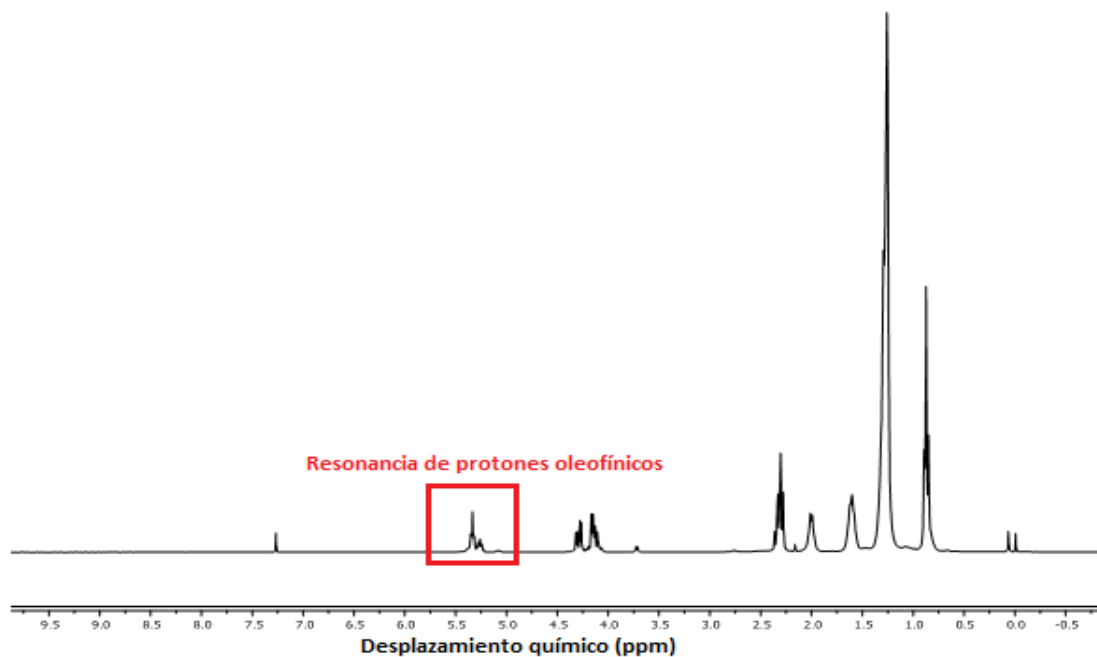


Figura 5.27. Espectro de RMN de ^1H de COC y CCO.

La presencia de los picos en la zona comprendida entre 5.2 a 5.5 ppm en el espectro de RMN de ^1H permite confirmar la incorporación de ácido oleico en el triglicérido ya que los protones olefinicos $-\text{CH}=\text{CH}-$ de ácidos grasos insaturados con intensidad media en esta zona [47].

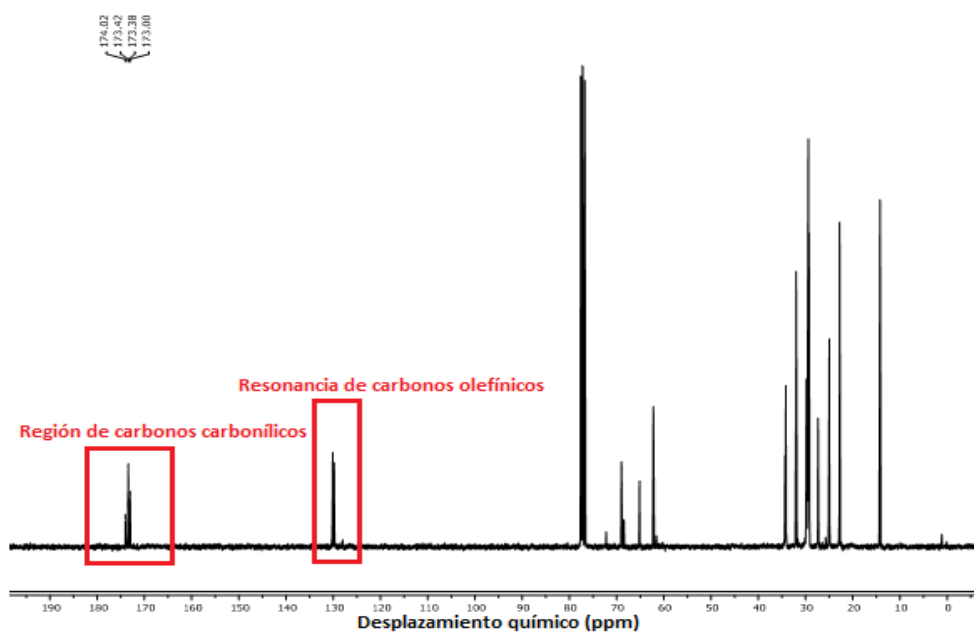


Figura 5.28. Espectro de RMN de ^{13}C de COC y CCO.

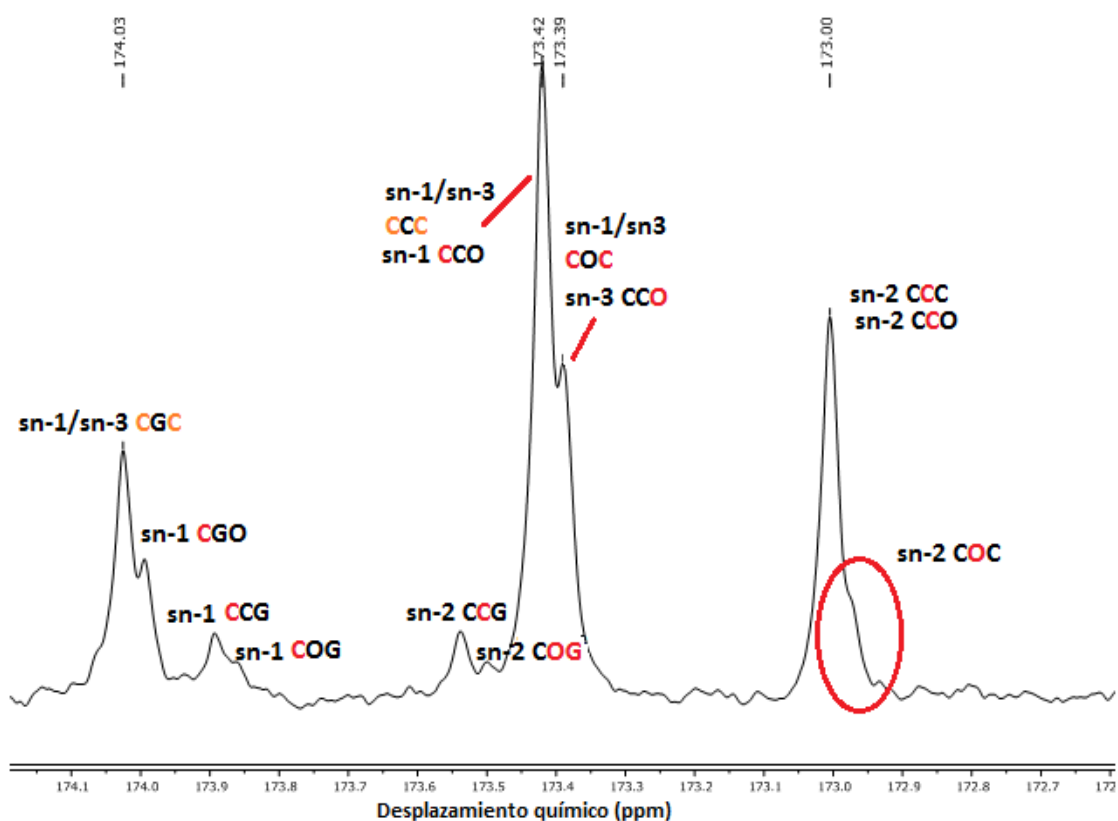


Figura 5.29. Espectro de RMN de ^{13}C de COC y CCO, región de carbonos carbonílicos.

A parte de los picos a 173.0 ppm, 173.39 ppm, 173.42 ppm y 174.03 ppm en esta muestra, en la zona de 172 a 174 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C , fue posible detectar:

- un hombro en 172.97
- un pico en 173.54
- un pico en 173.9
- un pico en 173.98

Uno de los puntos más importantes es correlacionar estos datos con resultados de la cromatografía gaseosa asociados, que se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Composición de la mezcla en la esterificación de dicaprina con ácido oleico.

Reactivos y productos (μ moles)	Muestra	
	Inicial	Final
C	0.30	6.00
CGG	0	0
O	19.5	14.92
OGG	0	0
GOG	0	0
CCG	4.10	0.96
CGC	15.33	2.79
GCC	0.07	0.59
CGO	0	2.29
CPG	0	0
CCC	1.68	4.83
OOG	0	0
OGO	0	0.49
COC (CCO)	0	4.13
COO	0	0

En función a los resultados de la cromatografía gaseosa se observa que se han detectado:

- Diglicéridos : CCG-GCC, CGC remanentes; CGO y OGO (en bajas cantidades)
- Triglicéridos: CCC, COC(CCO)

El pico en 173.59 ppm es asignable a C esterificado en sn-2 en CCG, mientras que el pico en 173.9 ppm se asigna a C esterificado en sn-1 en CCG. Finalmente en 174.03 ppm, aparece el pico correspondiente a ácido cáprico esterificado en posiciones sn-1/sn-3 en CGC.

El pico en 173.45 ppm es atribuible al ácido cáprico esterificado en posiciones sn-1/sn-3 de tricaprina con contribución del ácido cáprico en posición sn-1 de CCO, mientras

que el pico en 173 ppm corresponde al carbonilo del ácido cáprico esterificado en posición sn-2 de CCC con contribuciones del carbonilo de C en sn-2 de CCO. El hombro detectado en 172.97 ppm es asignable al carbonilo del ácido oleico esterificado en sn-2 en COC.

El pico en 173.39 se asigna a una contribución del carbonilo del ácido oleico en posición sn-3 de CCO y de los carbonilos de C en posiciones sn-1/sn-3 en COC. El pico en 173.98 ppm es asignable al carbonilo en sn-1 en CGO y el de 173.54 ppm al carbonilo en posición sn-2 en CCG. El pico en 173.89 se asigna a C en sn-1 en CGO.

En el rango comprendido entre 124 y 134 ppm, del espectro de ^{13}C de RMN, de la muestra conteniendo COC y CCO aparecen los picos pertenecientes a los carbonos olefínicos del ácido oleico, confirmando nuevamente la incorporación del mismo en el triglicérido final.

El objetivo del empleo de esta técnica fue hallar un método no destructivo para estudiar y caracterizar triglicéridos debido a las dificultades encontradas en el empleo de técnicas convencionales, como hidrólisis o etanólisis regioespecíficas de triglicéridos. El principal problema está asociado con existencia de migración de acilos, aún a tiempos cortos de reacción. Fue evidente que la técnica no permite diferenciar entre ácidos grasos saturados de distinta longitud (diferencias entre C y P) en esta zona específica del espectro. Pero es posible emplearla para estudiar el impacto de saturados frente a insaturados o poliinsaturados, tal como se ha descrito en la literatura, e incluso determinar la incorporación de un grupo insaturado en la posición

sn-2 del glicerol, aún en mezclas que incluyen un triglicérido saturado como tricaprina (CCC).

La reacción de incorporación de ácido oleico es mucho más lenta que la de ácido palmítico, tanto en posición sn-3 como en posición sn-2. La propuesta aquí fue confirmar la presencia de ácido oleico en posición sn-2. Esto permitiría suponer una alta incorporación de ácido palmítico en posición sn-2 dado que la producción de triglicérido estructurado es considerablemente mayor en menores tiempos. Se esperaría entonces que la relación CGC a CCG en el material de partida se mantenga en los triglicéridos obtenidos (es decir la relación CPC a CCP), o cambie muy poco, dado que a elevadas relaciones molares relativas de ácido palmítico se minimizan reacciones secundarias (como se verá en el Capítulo 7).

Se plantea continuar con este trabajo para lograr un estudio exhaustivo por RMN $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de sistemas modelos de triglicéridos estructurados.

Es importante entonces considerar que, la forma de optimizar la reacción es maximizar la proporción de 1,3 diglicérido de la mezcla inicial y llevar a cabo la reacción con la mayor relación de ácido palmítico a sustrato que sea posible. De esta forma, aunque primero se esterifique CCG, la reacción favorecida en segunda lugar será la formación de CPC antes que la hidrólisis.

5.9. Conclusiones

En el presente capítulo se evaluaron diferentes lipasas, en forma libre o inmovilizada, para llevar a cabo la esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico en un medio con solvente orgánico obteniendo conversiones de dicaprina de entre el 19 y el 84%.

La reacción de hidrólisis redujo el rendimiento a glicéridos con alto valor nutricional. Por esta razón, diferentes técnicas para el control del agua en el medio de reacción fueron evaluadas. Si bien se registraron mejoras en la composición de la mezcla final obtenida, la conversión y el rendimiento se redujeron considerablemente.

Se llevó a cabo la inmovilización de la lipasa de *Burkholderia cepacia* sobre polipropileno y sobre montmorillonita. En el primer caso, el catalizador obtenido resultó de fácil manipulación y separación del medio de reacción pero los valores de conversión y rendimiento no fueron satisfactorios. La inmovilización sobre montmorillonita generó un catalizador con muy buena actividad, sin embargo el pequeño tamaño de partícula del sólido lo vuelve inviable desde el punto de vista práctico y por ello no se utilizó.

Todos los catalizadores fueron evaluados en función de la composición de la mezcla final obtenida por la esterificación de dicaprina (principalmente 1,3-dicaprina) con ácido palmítico. Varios de ellos resultaron sumamente interesantes para sintetizar una mezcla que actúe como sustituto de grasas compuesta mayoritariamente por TCM, TCML, 1,3-DAG de cadena media y 1,3-DAG de cadena media y larga, con bajas o nulas proporciones de dipalmitina y tripalmitina.

Con la técnica cromatográfica empleada no fue posible diferenciar isómeros de triglicéridos estructurados. Las metodologías tradicionales para la identificación del ácido graso esterificado en la posición sn-2 permitieron observar una alta proporción de ácido palmítico esterificado en posición sn-2 en forma cualitativa. Sin embargo la baja velocidad de reacción y la ocurrencia de migración de acilos limitan la aplicabilidad de estas técnicas para cuantificar correctamente el porcentaje de P en sn-2. Se exploró el uso de RMN como herramienta adicional de caracterización de productos y se planea continuar con el desarrollo de la misma.

5.10. Referencias

- [1] Bach, A. C., Babayan, V. K. (1982). Medium-chain triglycerides: an update. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 36:950-962.
- [2] Babayan, V.K. (1987). Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids, *Lipids* 22:417-420.
- [3] Mascioli, E. A., Babayan, V. K., Bistran, B. R., Blackburn, G. L. (1988). Novel triglycerides for special medical purposes. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 12:127S-132S.
- [4] Pettej, M. J., Daftary, S., Levine, J. J. (1991). Essential fatty acid deficiency associated with the use of a medium-chain-triglyceride infant formula in pediatric hepatobiliary disease. *The American journal of clinical nutrition*, 53:1217-1221.
- [5] Jeppesen, P. B., Christensen, M. S., Høy, C. E., Mortensen, P. B. (1997). Essential fatty acid deficiency in patients with severe fat malabsorption. *The American journal of clinical nutrition*, 65:837-843.
- [6] Hubbard, V.S., McKenna M.C. (1987). Absorption of Safflower Oil and Structured Lipid Preparations in Patients with Cystic Fibrosis. *Lipids*, 22:424-428.
- [7] Ikeda, I., Tomari, Y., Sugano, M., Watanabe, S., Nagata, J. (1991). Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. *Lipids*, 26:369-373.
- [8] Christensen, M. S., Høy, C. E., Becker, C. C., Redgrave, T. G. (1995). Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic

(DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *The American journal of clinical nutrition*, 61:56-61.

[9] Christensen, M. S., Müllertz, A., Høy, C. E. (1995). Absorption of triglycerides with defined or random structure by rats with biliary and pancreatic diversion. *Lipids*, 30:521-526.

[10] Heird, W. C., Grundy, S. M., & Hubbard, V. S. (1986). Structured lipids and their use in clinical nutrition. *American journal of clinical nutrition*, 43:320–324.

[11] Kritchevsky, D. (1988). Effects of triglyceride structure on lipid metabolism. *Nutrition reviews*, 46:177-181.

[12] Lee, Y. Y., Tang, T. K., Lai, O. M. (2012). Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium-and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *Journal of food science*, 77:R137-R144.

[13] Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E., Jones, P. J. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life sciences*, 62:1203-1215.

[14] Aoyama, T., Nosaka, N., Kasai, M. (2007). Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. *The Journal of Medical Investigation*, 54:385-388.

[15] Xu, X., Fomuso, L. B., Akoh, C. C. (2000). Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48:3-10.

[16] Mu, H., Xu, X., Høy, C. E. (1998). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:1187-1193.

[17] Rubin, M., Moser, A., Vaserberg, N., Greig, F., Levy, Y., Spivak, H., Lelcuk, S. (2000). Structured triacylglycerol emulsion, containing both medium-and long-chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: a double-blind randomized cross-over study. *Nutrition*, 16:95-100.

[18] Koh, S. P., Tan, C. P., Lai, O. M., Arifin, N., Yusoff, M. S. A., Long, K. (2010). Enzymatic synthesis of medium-and long-chain triacylglycerols (MLCT): optimization of process parameters using response surface methodology. *Food and bioprocess technology*, 3:288-299.

[19] Arifin, N., Soo-Peng, K., Long, K., Chin-Ping, T., Yusoff, M. S. A., Oi-Ming, L. (2012). Modeling and optimization of Lipozyme RM IM-catalyzed esterification of medium-and long-chain triacylglycerols (MLCT) using response surface methodology. *Food and bioprocess technology*, 5:216-225.

- [20] Kahveci, D., Guo, Z., Özçelik, B., Xu, X. (2010). Optimisation of enzymatic synthesis of diacylglycerols in binary medium systems containing ionic liquids. *Food chemistry*, 119:880-885.
- [21] Nagao, T., Watanabe, H., Goto, N., Onizawa, K., Taguchi, H., Matsuo, N., Yasukawa, T., Tsushima, R., Shimasaki, H., Itakura, H. (2000). Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. *Journal of Nutrition*, 130:792-797.
- [22] Murase, T., Mizuno, T., Omachi, T., Onizawa, K., Komine, Y., Kondo, H., Hase, T., Tokimitsu, I. (2001). Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *The Journal of Lipid Research*, 42:372-378.
- [23] Berger, M., Laumen, K., Schneider, M. P. (1992). Enzymatic esterification of glycerol I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1, 3-sn-diacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69:955-960.
- [24] Kristensen, J. B., Xu, X., Mu, H. (2005). Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82:329-334.
- [25] Waldinger, C., Schneider, M. (1996). Enzymatic esterification of glycerol III. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1, 3-sn-diacylglycerols and 1 (3)-rac-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73:1513-1519.
- [26] Duan, Z. Q., Du, W., Liu, D. H. (2010). Novozym 435-catalyzed 1, 3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. *Process Biochemistry*, 45:1923-1927.
- [27] Kwon, S. J., Han, J. J., Rhee, J. S. (1995). Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. *Enzyme and microbial technology*, 17:700-704.
- [28] Rosu, R., Yasui, M., Iwasaki, Y., Yamane, T. (1999). Enzymatic synthesis of symmetrical 1, 3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76:839-843.
- [29] Kahveci, D., Guo, Z., Özçelik, B., Xu, X. (2010). Optimisation of enzymatic synthesis of diacylglycerols in binary medium systems containing ionic liquids. *Food chemistry*, 119:880-885.
- [30] Watanabe, T., Sugiura, M., Sato, M., Yamada, N., Nakanishi, K. (2005). Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, 40:637-643.

- [31] Mohammad, N., SY Choong, T., Yeoh, C. M., Lai, O. M. (2012). Recent Patents on Diacylglycerol Production and Applications. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 5:103-109.
- [32] Nishide, T., Tsuchiya, S., Koike, S., Nakajima, Y., Inagawa, Y., Yano, M., Kawaseki, Y. U.S. Patent No. 7,232,586 (2007). Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [33] Bar-Yoseph, F., Lifshitz, Y., Cohen, T. (2013). Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 89:139-143.
- [34] Takeuchi, H., Sekine, S., Kojima, K., Aoyama, T. (2008). The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17:320-323.
- [35] Karupaiah, T., Sundram, K. (2007). Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. *Nutr Metab*, 4:1-17.
- [36] Høy, C. E., Xu, X. (2001). Structured triacylglycerols. *Structured and modified lipids*, 209-239.
- [37] Senanayake, S. P. J., Shahidi, F. (2005). Dietary fat substitutes. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- [38] Haas, M. J. (2005). Animal fats. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- [39] Gunstone, F. D. (2005). Vegetable oils. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- [40] Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi-Keefe, C. J. (1991). The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74:3228-3243.
- [41] Mukherjee, K. D., Kiewitt, I. (1998). Structured triacylglycerols resembling human milk fat by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex. *Biotechnology letters*, 20:613-616.
- [42] Hita, E., Robles, A., Camacho, B., Ramírez, A., Esteban, L., Jiménez, M. J., Molina, E. (2007). Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. *Process Biochemistry*, 42:415-422.
- [43] Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. (2001). Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:743-748.

[44] Hita, E., Robles, A., Camacho, B., González, P. A., Esteban, L., Jiménez, M. J., Molina, E. (2009). Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 46:257-264.

[45] Esteban, L., Jiménez, M. J., Hita, E., González, P. A., Martín, L., Robles, A. (2011). Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1, 3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 54:62-69.

[46] Xu, X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102:287-303.

[47] Vlahov, G. (1999). Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 35:341–357

6. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE MIGRACIÓN DE ACILOS DURANTE LA ETANÓLISIS DE TRIGLICERIDOS CATALIZADA POR NOVOZYM 435

6.1. Introducción

La reacción de migración de acilos afecta no sólo a la síntesis de diglicéridos específicos, como fue presentado en el Capítulo 3, sino que también afecta a las reacciones que permiten evaluar ácidos grasos en la posición sn-2 en triglicéridos como se mostró en el Capítulo 5. Es evidente entonces que la migración de acilos es una reacción que requiere un estudio detallado, especialmente cuando está presente en reacciones sumamente estudiadas.

Las reacciones de etanólisis de triglicéridos catalizadas por enzimas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años para la producción de biodiesel usando un alcohol de cadena corta que se puede obtener sin tener que recurrir a los combustibles fósiles [1-6]. El objetivo de esta reacción puede ser también la generación de acilglicéridos (mono- y diglicéridos específicos) [7-9], o para la síntesis de ésteres de etilo utilizado en diferentes aplicaciones industriales [10].

Sin embargo, no se ha dado la debida consideración a la reacción de migración de acilos que ocurre durante la etanólisis. Esta reacción es responsable de la generación de isómeros no deseados durante la síntesis de acilglicéridos [11-12]. A su vez, es una reacción deseada durante la producción de biodiesel, porque la mayoría de las lipasas empleadas en este proceso de síntesis son específicas por alguna posición del esqueleto de glicerol [13-15]. De no existir la migración de acilo, los rendimientos a

biodiesel no superarían el 66 % y las concentraciones de monoglicéridos serían elevadas.

En este capítulo se estudian los principales factores que afectan a la reacción de la migración de acilo durante el etanólisis de triglicéridos. Se analizó el tiempo de reacción, la longitud de cadena del ácido graso saturado en el triglicérido y la carga biocatalizador. También se estudió cómo la presencia de insaturaciones en el triglicérido afecta a esta reacción. Comprender cómo estos factores influyen en la migración de acilo permitiría minimizar o maximizar esta reacción de acuerdo con el producto de interés.

6.2. Identificación de productos

Los productos esperados de la etanólisis enzimática de triglicéridos catalizadas por Novozym 435 fueron 1,2-diglicérido (1,2-DAG), 2,3-diglicérido (2,3-DAG), 2-monoglicérido (2-MAG) y el éster etílico del ácido graso (Et). La migración de acilos permite la obtención de otro isómero de diglicérido (1,3-diglicérido (1,3-DAG)) y dos isómeros de monoglicérido: 1-monoglicérido (1-MAG) y 3-monoglicérido (3-MAG).

La columna capilar utilizada en este estudio permite la diferenciación entre los isómeros de posición con la presencia de grupos hidroxilo. La Figura 6.2 presenta un cromatograma típico de la etanólisis de tripalmitina, mostrando los reactivos y productos de reacción.

En la Figura 6.1, a modo de recordatorio, se esquematiza la primera etapa de la reacción de etanolólisis de triglicéridos catalizada por lipasas.

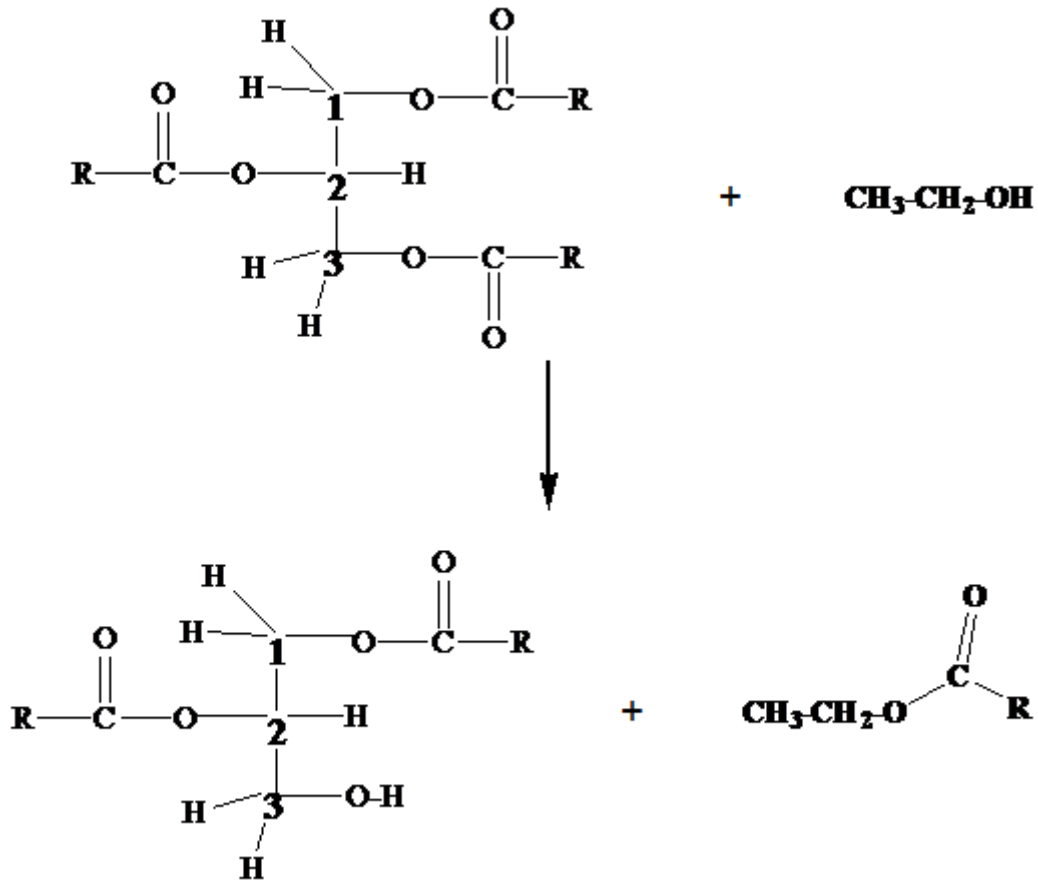


Figura 6.1. Representación de la primera etapa de la etanolólisis de triglicéridos catalizada por lipasas.

Luego, en una segunda etapa, reacciona el grupo acilo del 1,2-DAG y genera 2-MAG con una lipasa 1,3 específica.

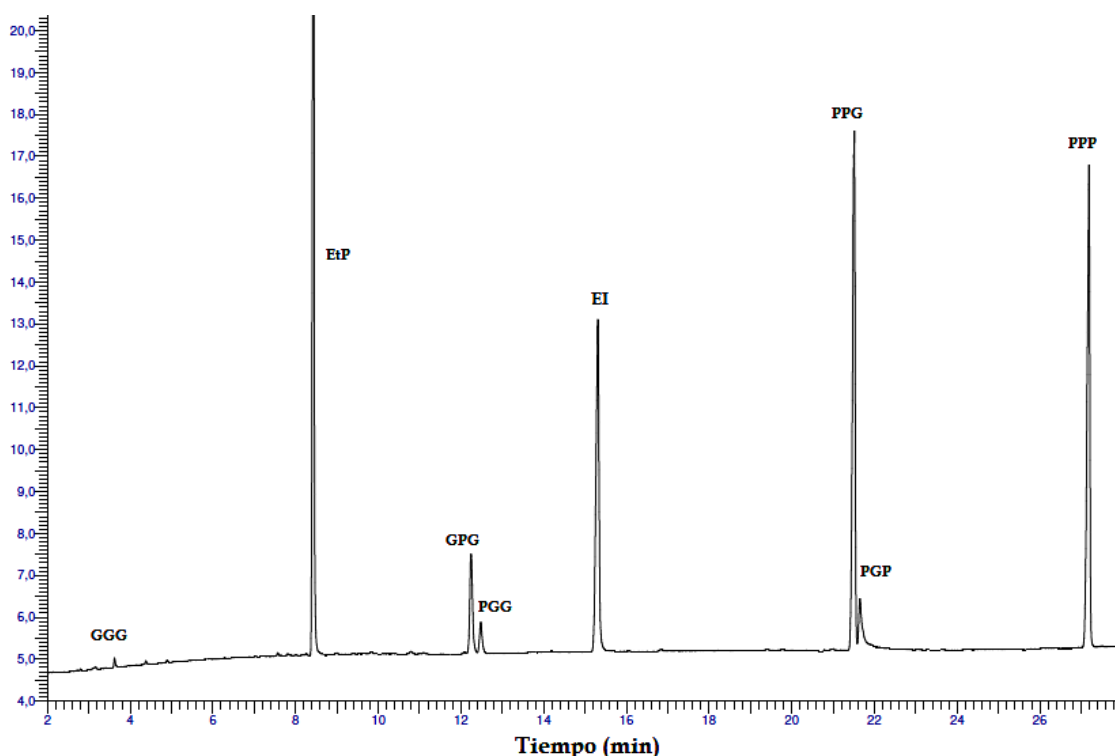


Figura 6.2. Cromatograma típico de los reactivos y productos de reacción en la etanólisis enzimática de tripalmitina utilizando Novozym 435. GGG = glicerol, EtP = etil palmitato, GPG = 2-monopalmitina, PGG = 1-monopalmitina, PPG = 1,2-dipalmitina, PGP = 1,3-dipalmitina, PPP = tripalmitina y EI = estándar de calibración interna (tricaprilina). Condiciones experimentales del ensayo catalítico: tripalmitina: 100 mg, etanol: 2 mL, temperatura: 60 °C, enzima: 20 mg, tiempo de reacción: 60 min.

Este cromatograma típico muestra que los productos mayoritarios son, a los 60 minutos, el DAG PPG y el MAG GPG. Se supone que, con una enzima 1,3 específica, PGP y PGG se generan por isomerización de acilo.

6.3. Reacción de migración de acilos

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) ha sido reportada como una lipasa 1,3-específica en reacciones de alcoholólisis [16-21], de modo que para la etanólisis de triglicéridos se esperaría obtener 1,2- y 2,3-diglicéridos y 2-monoglicéridos. Sin embargo, como se observa en la Figura 6.1, se obtuvieron 1,3-DAG, 1-MAG e incluso glicerol (GGG). Como se mencionó anteriormente, la formación de estos glicéridos y

glicerol puede explicarse en términos de la reacción de migración de acilo. La migración observada en este trabajo se produjo principalmente de la posición sn-2 a posición sn-3, y en menor medida, de sn-2 a sn-1. Estas reacciones han sido consideradas como termodinámicamente más favorecidas [22].

Un mecanismo para la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 465 se muestra en la Figura 6.3. La flecha gris indica la ruta de reacción si la migración de acilo no ocurriera.

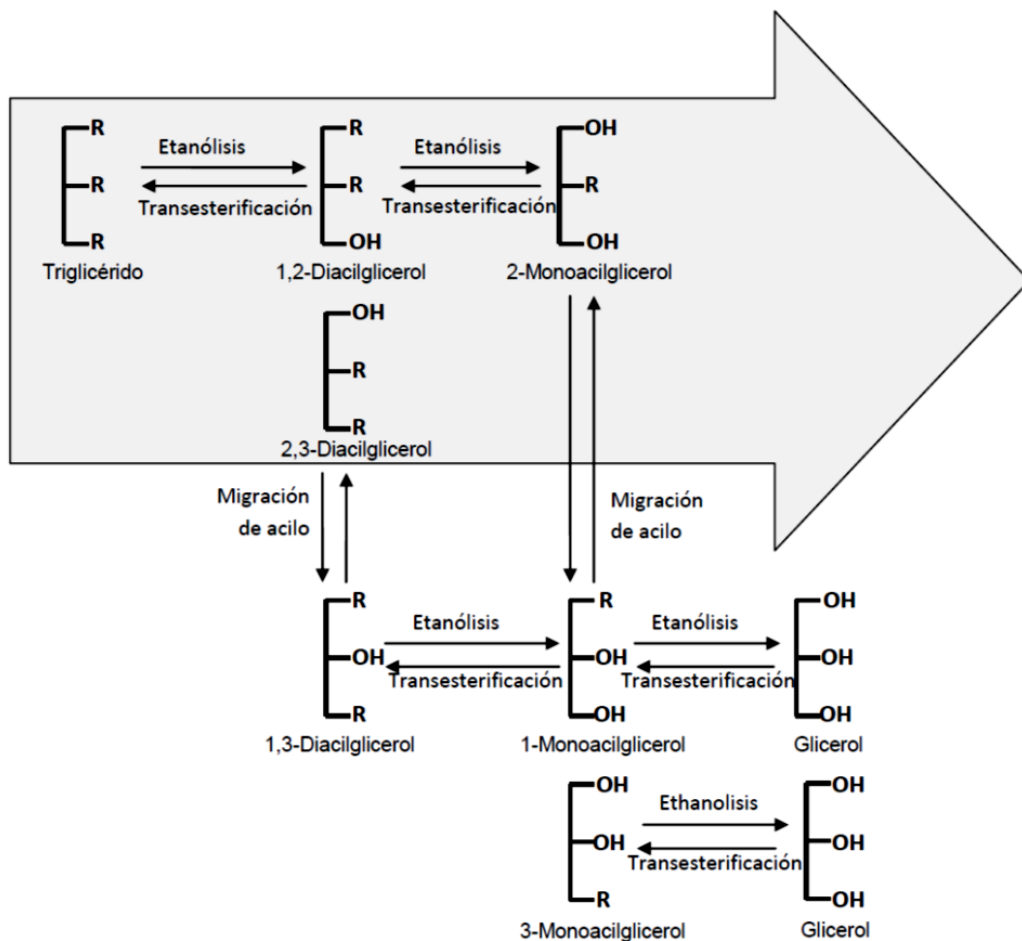


Figura 6.3. Esquema de la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435.

6.4. Importancia del análisis de las muestras

Dado que la migración de acilos de la posición sn-2 a sn-1 o sn-3 es una reacción relativamente rápida, las muestras se deben almacenar el menor tiempo posible. La migración de acilo se ha observado en las muestras almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h, sobre todo en condiciones iniciales alejadas del equilibrio.

En la Figura 6.4 se muestran dos cromatogramas obtenidos para las muestras de reacción de etanolisis de tricaprilina catalizada con 20 mg de Novozym 435 durante 90 minutos. En trazo negro se presenta el resultado del análisis cromatográfico de la muestra al finalizar la reacción, y en rojo para la misma muestra después de 48 h de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

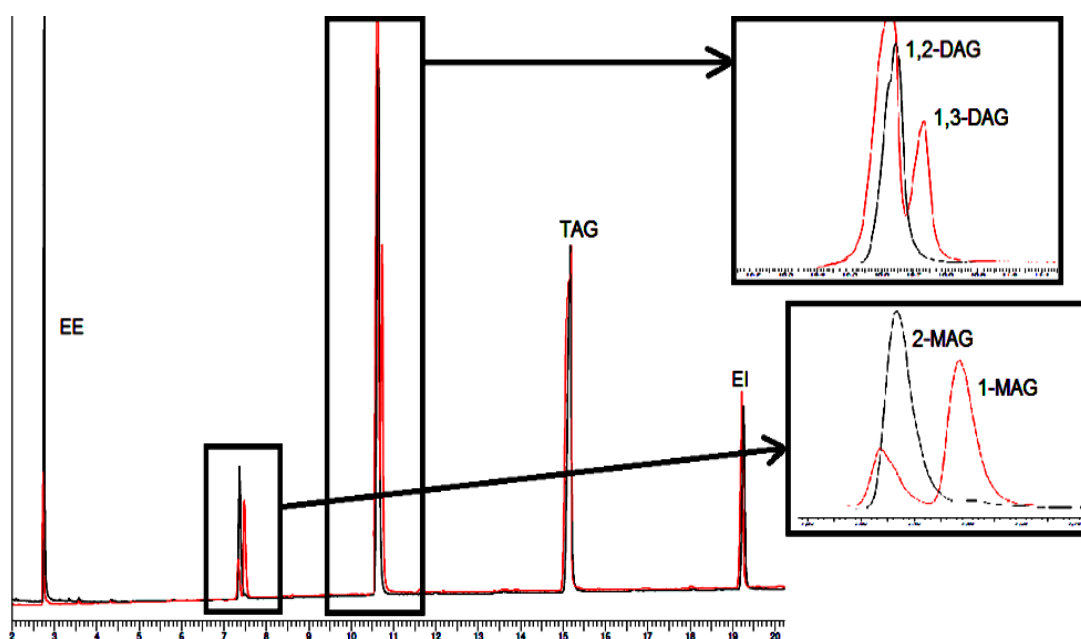


Figura 6.4. Cromatogramas para evaluar migración de acilo durante el almacenamiento. En negro la muestra al finalizar la reacción y en rojo la muestra luego de 48 h de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como se puede observar, la migración de acilo puede ocurrir finalizada la reacción incluso a temperaturas considerablemente bajas. Es por ello que las muestras deben ser analizadas en el menor tiempo posible para evitar que la migración de acilo se produzca durante el almacenamiento de las muestras.

6.5. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste

Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones presentadas en la Sección 2.2.3.1. Los factores estudiados y las respuestas medidas se presentan en las Tablas 6.1 y 6.2 para el diseño experimental 1 (DE1) y el diseño experimental 2 (DE2), respectivamente. Los resultados de los modelos obtenidos para cada variable de respuesta se analizan en detalle en las siguientes secciones. Las respuestas se ajustaron utilizando modelos de segundo orden como muestra la Ec. 6.1:

$$Rta. = A_0 + A_1L + A_2T + A_3C + A_4LT + A_5LC + A_6TC + A_7L^2 + A_8T^2 + A_9C^2 \quad (6.1)$$

donde **L** es la masa de la lipasa, **T** es el tiempo de reacción, y **C** la longitud de cadena de los ácidos grasos que constituyen el triglicérido.

Esta ecuación fue refinada para cada respuesta usando una selección decreciente por pasos realizando la prueba del valor-F tal como se explicó en la Sección 3.5.

Tabla 6.1. Factores evaluados y respuestas obtenidas en la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 de acuerdo al diseño experimental 1 (DE1).

Factores experimentales			Variables de respuesta						
L	T	C	X _{TAG} (%)	1,2-DAG ^a	1,3-DAG ^a	2-MAG ^a	1-MAG ^a	FAEE ^a	GGG ^a
1.0	1.0	0.0	65.00	26.68	0.00	8.46	0.07	45.03	0.52
1.0	-1.0	0.0	42.18	22.64	0.43	3.69	0.17	33.54	1.10
0.0	1.0	1.0	26.88	15.20	0.39	2.59	0.65	25.68	1.15
-1.0	1.0	0.0	29.09	19.95	0.00	1.97	0.10	23.74	0.16
0.0	0.0	0.0	29.93	22.97	0.00	0.09	0.00	22.96	0.00
-1.0	-1.0	0.0	8.28	7.35	0.00	0.28	0.02	7.61	0.00
0.0	-1.0	1.0	14.34	9.02	0.70	1.11	0.54	15.94	0.69
0.0	0.0	0.0	27.87	21.48	0.00	0.10	0.00	22.59	0.00
1.0	0.0	1.0	29.7	15.81	0.82	2.79	0.69	27.71	1.36
0.0	0.0	0.0	29.44	22.74	0.00	0.13	0.00	22.31	0.00
-1.0	0.0	-1.0	8.27	6.83	0.00	0.22	0.07	8.72	0.44
1.0	0.0	-1.0	43.28	25.40	0.00	3.07	0.29	32.93	0.27
0.0	-1.0	-1.0	13.37	10.87	0.00	0.47	0.10	12.72	0.24
-1.0	0.0	1.0	9.11	5.83	0.89	0.65	0.52	9.28	0.37
0.0	1.0	-1.0	37.47	23.47	0.00	2.33	0.26	29.61	0.32

^a Porcentaje molar respecto al total de compuestos presentes en la muestra de reacción

L = masa de biocatalizador (1 = 20 mg, 0 = 12.5 mg y -1 = 5 mg)

T = tiempo de reacción (1 = 90 min, 0 = 60 min y -1 = 30 min)

C = longitud de cadena del triglicérido (1 = larga, 0 = media y -1 = corta)

Tabla 6.2. Factores evaluados y respuestas obtenidas en la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 de acuerdo al diseño experimenta 2 (DE2)

Factores experimentales			Variables de respuesta						
L	T	C	X _{TAG} (%)	1,2-DAG ^a	1,3-DAG ^a	2-MAG ^a	1-MAG ^a	FAEE ^a	GGG ^a
1.0	1.0	0.0	65.00	26.68	0.00	8.46	0.07	45.03	0.52
1.0	-1.0	0.0	42.18	22.64	0.43	3.69	0.17	33.54	1.10
0.0	1.0	1.0	9.28	7.17	0.00	0.12	0.00	10.66	0.00
-1.0	1.0	0.0	29.09	19.95	0.00	1.97	0.10	23.74	0.16
0.0	0.0	0.0	29.93	22.97	0.00	0.09	0.00	22.96	0.00
-1.0	-1.0	0.0	8.28	7.35	0.00	0.28	0.02	7.61	0.00
0.0	-1.0	1.0	2.52	1.61	0.00	0.32	0.00	5.59	0.00
0.0	0.0	0.0	27.87	21.48	0.00	0.10	0.00	22.59	0.00
1.0	0.0	1.0	15.18	11.21	0.12	0.98	0.23	15.34	0.32
0.0	0.0	0.0	29.44	22.74	0.00	0.13	0.00	22.31	0.00
-1.0	0.0	-1.0	8.27	6.83	0.00	0.22	0.07	8.72	0.44
1.0	0.0	-1.0	43.28	25.40	0.00	3.07	0.29	32.93	0.27
0.0	-1.0	-1.0	13.37	10.87	0.00	0.47	0.1	12.72	0.24
-1.0	0.0	1.0	0.94	0.55	0.00	0.31	0.00	1.72	0.00
0.0	1.0	-1.0	37.47	23.47	0.00	2.33	0.26	29.61	0.32

^a Porcentaje molar respecto al total de compuestos presentes en la muestra de reacción

L = masa de biocatalizador (1 = 20 mg, 0 = 12.5 mg y -1 = 5 mg)

T = tiempo de reacción (1 = 90 min, 0 = 60 min y -1 = 30 min)

C = longitud de cadena del triglicérido (1 = larga con insaturación, 0 = media y -1 = corta)

Cabe recordar que los triglicéridos de la tabla 6.1 son triacetina (corto), tricaprilina (medio) y tripalmitina (largo). Mientras que los correspondientes a la tabla 2 son triacetina (corto), tricaprilina (medio) y trioleína (largo con insaturación)

6.5.1 Conversión del triglicérido

El incremento en la carga biocatalizador y del tiempo de reacción favorecieron la conversión de triglicéridos. Por otro lado, el aumento de la longitud de la cadena de los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos tuvo un efecto negativo sobre esta respuesta. En principio se supuso que existían factores estéricos que afectan el ingreso de triglicéridos de cadenas largas al sitio activo de CALB. Este fenómeno le confiere a esta lipasa marcada preferencia por ácidos grasos de cadena corta.

La Ecuación 6.2 describe el comportamiento de la conversión de triglicéridos cuando la etanolisis se llevó a cabo considerando solamente triglicéridos saturados (DE1), y se obtuvo después de realizar la selección por etapas como se describió anteriormente:

$$X_{TAG} = 29.1 + 15.7L + 10.0T - 2.79C - 9.81C^2 + 3.74T^2 + 3.32L^2 - 3.61LC - 2.89TC \quad (6.2)$$

Dado que el valor-p fue inferior a 0.05, hubo una relación estadísticamente significativa entre las variables y la respuesta con un nivel de confianza superior al 95.0%. Este criterio fue aplicado a todos los modelos que se presentan en este capítulo. El coeficiente de determinación R^2 indicó que este modelo puede explicar 98.96% de la variación en la conversión de triglicéridos.

Cuando se considera la presencia de una insaturación (DE2), el efecto de las variables fue similar al mencionado anteriormente, pero el impacto negativo de la longitud de cadena de los ácidos grasos en la conversión aumentó. Al parecer, la presencia de insaturaciones en los ácidos grasos elimina la linealidad en la molécula del ácido

cuando estas no existen. La estructura del triglicérido se vuelve más compleja, aumentando los impedimentos para llegar al sitio activo de CALB (ver Figura 6.5).

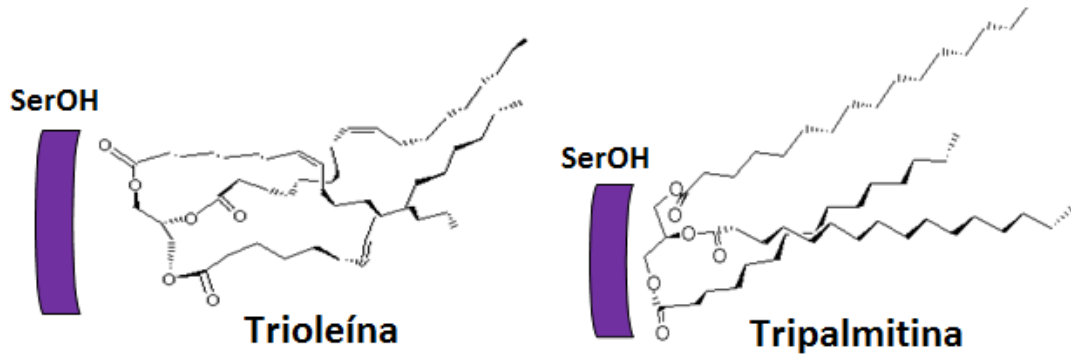


Figura 6.5. Estructura esquemática de trioleína y tripalmitina cerca de la Serina del sitio activo.

La Ecuación 6.3 se utilizó para ajustar la conversión triglicéridos para DE2:

$$X_{TAG} = 33.1 + 14.9L + 9.31T - 9.31C - 16.8C^2 \quad (6.3)$$

Este modelo pudo explicar el 94.70% de los cambios que ocurren en la conversión de los triglicéridos.

Los efectos del contenido de biocatalizador y de la longitud de cadena del triglicérido sobre la conversión para DE1 (a) y DE2 (b) son mostrados en la Figura 6.6.

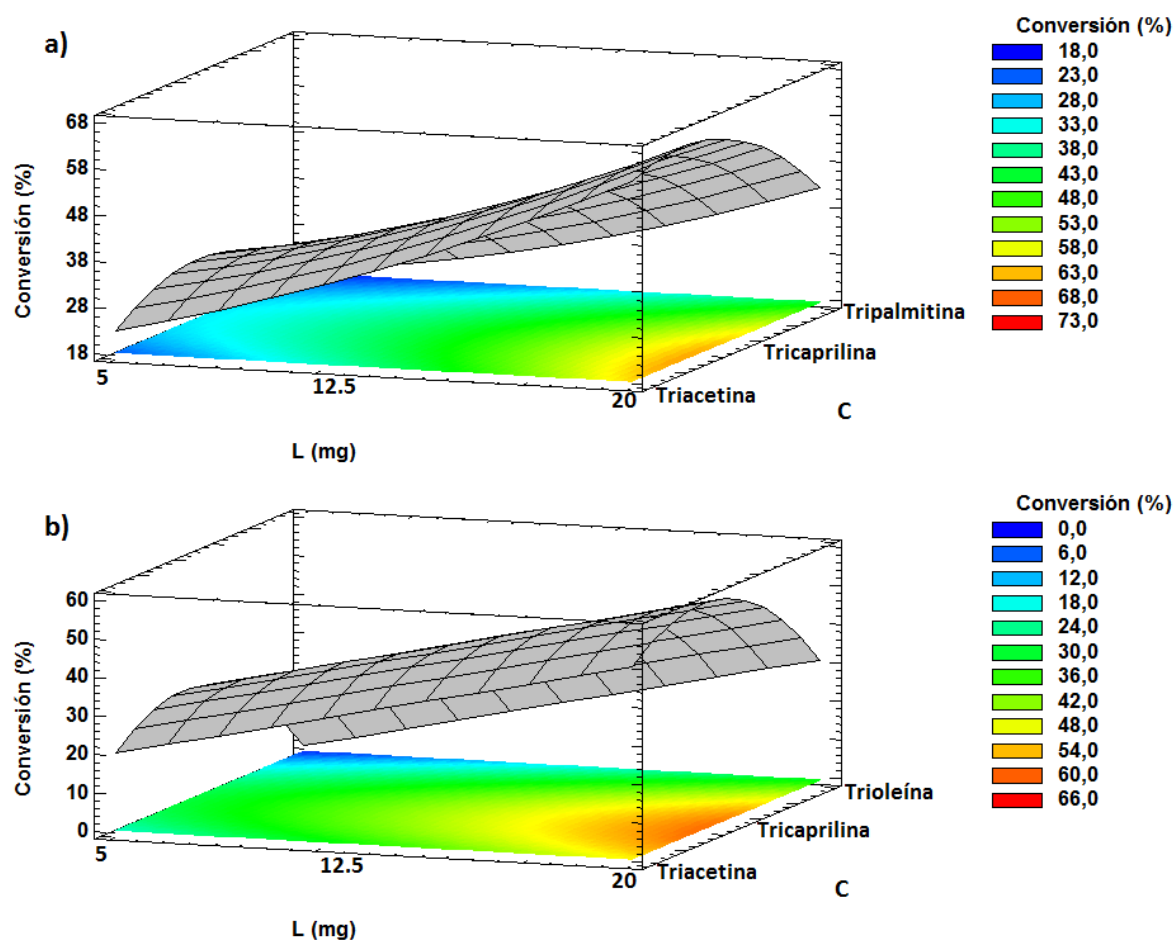


Figura 6.6. Variación en la conversión de triglicéridos durante la etanolisis catalizada por Novozym 435 luego de 90 minutos de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

6.5.2. Síntesis de diglicéridos

Como se mencionó anteriormente, esta lipasa ha sido reportada en varios trabajos como una lipasa específica para las posiciones sn-1 y sn-3 [16-20]; sin embargo, al llevar a cabo la etanolisis de triglicéridos, se pudo observar una marcada selectividad hacia la posición sn-3. La alcoholisis de la posición sn-1 fue considerablemente más lenta y esta situación se volvió más importante cuando la longitud de la cadena de los ácidos que constituyen el triglicérido aumentó. Este fenómeno se intensificó con la presencia de una insaturación en el ácido graso.

Los resultados obtenidos coinciden con los datos presentados en varios trabajos donde se informa la preferencia de CALB para los ácidos grasos de cadena corta [23-25]. Los productos de reacción de etanólisis de tripalmitina se muestran en el cromatograma presentado en la Figura 6.2, donde se puede observar la ausencia de 2,3-dipalmitina (GPP), y se hace evidente que la posición sn-3 es la principalmente atacada.

6.5.2.1. Formación de 1,2-diglicérido

Al analizar solamente triglicéridos saturados (DE1), la fracción molar de 1,2-diglicéridos se vio favorecida por el incremento del tiempo de reacción y la carga de Novozym 435. El aumento de la longitud de cadena del triglicérido tuvo un significativo efecto negativo en la fracción de este diacilglicérido, mostrando nuevamente la preferencia de esta lipasa para triglicéridos compuesto de ácidos grasos de cadena corta.

La Ecuación 6.4 se utilizó para ajustar la fracción de 1,2-DAG, explicando el 98.54% de las variaciones en esta respuesta (basado en R^2):

$$1,2-DAG = 21.8 + 6.32L + 4.43T - 2.59C - 2.13L^2 - 6.64C^2 - 2.14LT - 2.15LC - 1.61TC \quad (6.4)$$

Cuando se tuvo en cuenta no sólo el efecto de la longitud de cadena, sino también de la presencia de una insaturación en el ácido graso, la influencia de las variables en esta respuesta fue similar. Pero como en el caso de la conversión de triglicéridos, la existencia de la insaturación aumentó el efecto negativo del incremento de la longitud de la cadena en la fracción de 1,2-diacilglicerol. Como ya se mencionó, las insaturaciones podrían limitar la conversión en esta reacción.

La Ecuación 6.5 se utilizó para describir la relación entre la fracción de 1,2-diglicérido y las variables estudiadas teniendo en cuenta la presencia de insaturaciones en el TG con ácidos grasos de cadena larga (DE2). Con esta sencilla ecuación fue posible explicar 93.51% de los cambios en la fracción de este diglicérido (basado en R^2).

$$1,2-DAG = 20.5 + 6.41L + 4.35T - 5.75C - 9.66C^2 \quad (6.5)$$

En la Figura 6.7 se presentan dos gráficos de superficie de respuesta que muestran la variación de la fracción molar de 1,2-diacilglicérido en función de la carga biocatalizador y longitud de cadena de triglicérido. La Figura 6.7a corresponde al DE1 y la 6.7b al DE2.

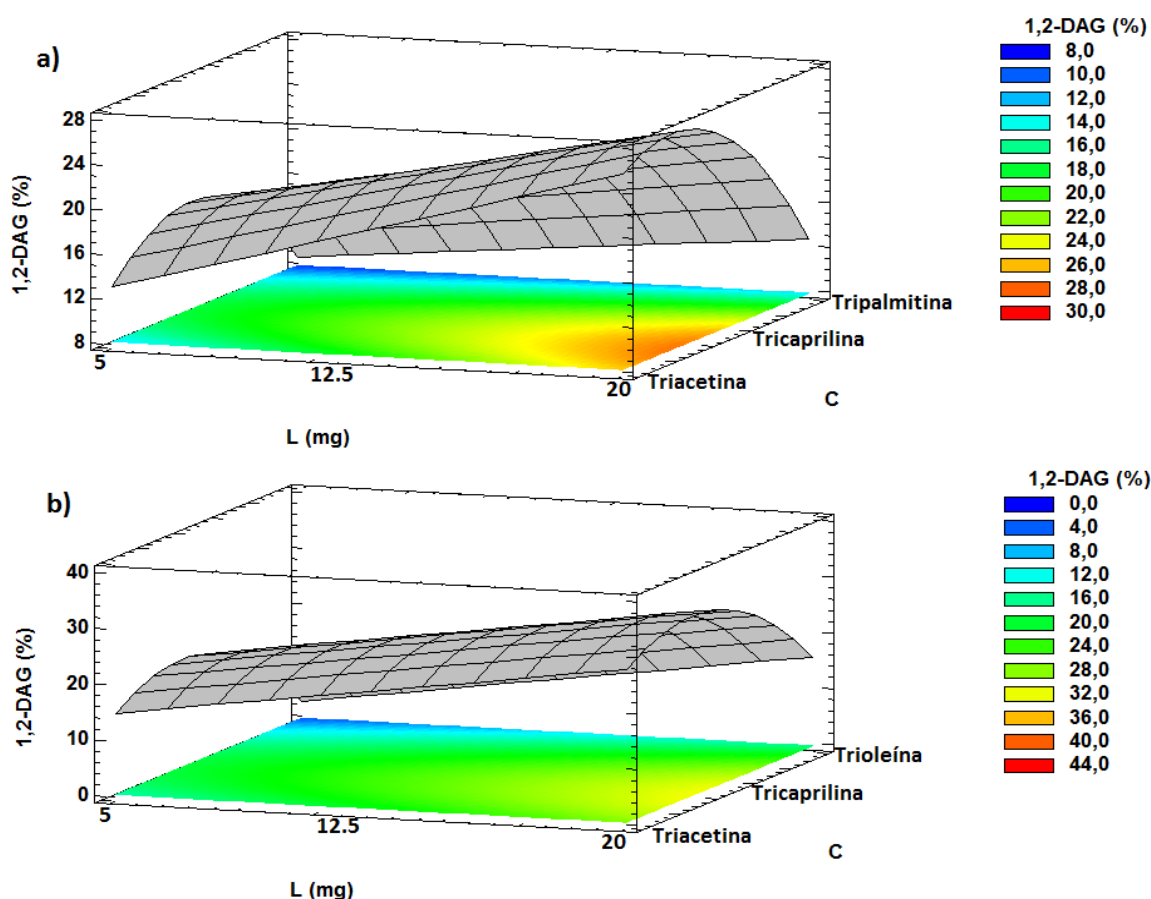


Figura 6.7. Variación en la fracción molar de 1,2-DAG en la etanólisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

6.5.2.2. Formación de 1,3-diglicérido

El aumento de la longitud de cadena de los triglicéridos favoreció la formación de 1,3-DAG. Esto muestra que los ácidos de cadena larga favorecen la migración de acilo, porque la formación de este isómero se explica únicamente en términos de esta reacción. Al parecer, la etanólisis en la posición sn-1 es compleja cuando se encuentra esterificada con ácidos grasos de cadena larga, y esta situación hace posible la migración de acilo de la posición sn-2 a la posición sn-3.

El aumento de la carga de biocatalizador tuvo un efecto positivo sobre esta respuesta, lo que permite suponer que la lipasa interviene en la reacción de migración de acilo como se indicó en el Capítulo 3 para el caso de Lipozyme RM IM.

Por otra parte, el aumento del tiempo de reacción tuvo un efecto negativo en la formación de 1,3-diglicérido. Aunque uno de los principales factores que influyen en la migración de acilo es el tiempo de reacción, el hecho de que tenga un efecto negativo en esta respuesta indica que la velocidad de la etanólisis en la posición sn-3 fue más rápida que la migración, y por lo tanto el 1,3-diacilglicérido se convirtió en 1-monoglicérido.

La combinación de los factores carga de biocatalizador y tiempo de reacción tuvo un efecto negativo en esta respuesta. Esto ocurrió no porque no afecten a la migración de acilo, sino porque favorecen la reacción de etanólisis y la posición sn-3 del diglicérido es atacada rápidamente.

El comportamiento observado fue similar para los dos diseños experimentales, aunque la presencia de insaturaciones tuvo un efecto negativo sobre esta respuesta. Probablemente este impacto negativo está relacionado con la menor conversión que se observó para este tipo de triglicéridos.

Las Ecuaciones 6.6 y 6.7 se utilizaron para ajustar la fracción 1,3-diglicérido para DE1 y DE2, respectivamente:

$$1,3\text{-DAG} = -0.0146 - 0.0925T + 0.350C + 0.133L^2 + 0.298C^2 - 0.108LT \quad (6.6)$$

$$1,3\text{-DAG} = 0.0685L - 0.0538T + 0.0688L^2 + 0.0388T^2 - 0.0388C^2 - 0.108LT \quad (6.7)$$

El coeficiente de determinación R^2 indicó que el modelo representado por la Ecuación 6.6 puede explicar el 92.19% de la variación en la fracción 1,3-DAG, mientras que el representado por la Ecuación 6.7 sólo puede explicar el 76.37% de los cambios en esta fracción. A pesar de que, como se mencionó anteriormente, el comportamiento fue similar para triglicéridos saturados y triglicéridos con insaturaciones, la diferencia en el ajuste indica que la formación de 1,3-DAG, cuando se consideran estos últimos, no puede ser completamente explicada a través de regresión múltiple con las variables estudiadas. Para explicar estos resultados, al menos un parámetro adicional debería ser incluido.

6.5.3. Síntesis de monoglicéridos

La síntesis de 2-monoacilglicéridos de longitud de cadena larga ha sido estudiada por varios autores [17, 26-27]. Este monoglicérido es un precursor importante para la síntesis de triglicéridos estructurados. Sin embargo, la reacción de la migración de acilo

no ha recibido la debida consideración para esta síntesis y, en general, se asume que el ácido graso de cadena larga está esterificado en la posición sn-2 del glicerol, cuando se obtiene por la alcoholisis de un triglicérido con lipasas 1,3-específicas. Esto se refleja en la literatura específica y en el uso de cromatografía en capa fina para el estudio de etanolisis con lipasas 1,3 específicas (sin utilizar cromatografía gaseosa o líquida).

6.5.3.1. Formación de 2-monoglicérido

Los principales factores que influyeron en la formación 2-monoglicérido fueron la carga de biocatalizador y el tiempo de reacción. Ambas variables tuvieron un efecto positivo en sobre esta respuesta. El aumento de la longitud de cadena del triglicérido tuvo un impacto negativo, aunque no muy significativo (como se puede ver en la Ecuación 6.8). Esto coincide con las observaciones reportadas anteriormente, donde se vió ácidos grasos de cadena larga favorecieron la migración de acilo, ya sea en el diglicérido a partir de 1,2-DAG a 1,3-DAG y luego la generación de 1-monoglicérido por etanolisis de la posición sn-3, o directamente en monoglicéridos mediante la conversión 2-MAG a 1-MAG.

El comportamiento de esta respuesta con respecto a las variables estudiadas fue similar para DE1 y DE2. Sin embargo, la presencia de insaturaciones en triglicéridos de cadena larga (ED2) nuevamente remarcó el efecto negativo producido por el aumento de la longitud de la cadena.

Las Ecuaciones 6.8 y 6.9 describen la relación entre la fracción molar de 2-MAG y las variables estudiadas para DE1 y DE2, respectivamente:

$$2\text{-MAG} = 0.107 + 1.86L + 1.23T + 1.78L^2 + 1.72T^2 - 0.200C^2 + 0.770LT \quad (6.8)$$

$$2\text{-MAG} = 0.107 + 1.68L + 1.02T - 0.545C + 1.91L^2 + 1.58T^2 - 0.876C^2 + 0.770LT \quad (6.9)$$

En base al valor del estadístico R^2 , los modelos propuestos para DE1 y DE2 permitieron explicar 93.27 y 85.75% de la variación en la fracción molar de 2-MAG, respectivamente. La variación de esta fracción con respecto a la carga biocatalizador y longitud de cadena del triglicérido para ambos diseños experimentales se presenta en la Figura 6.8.

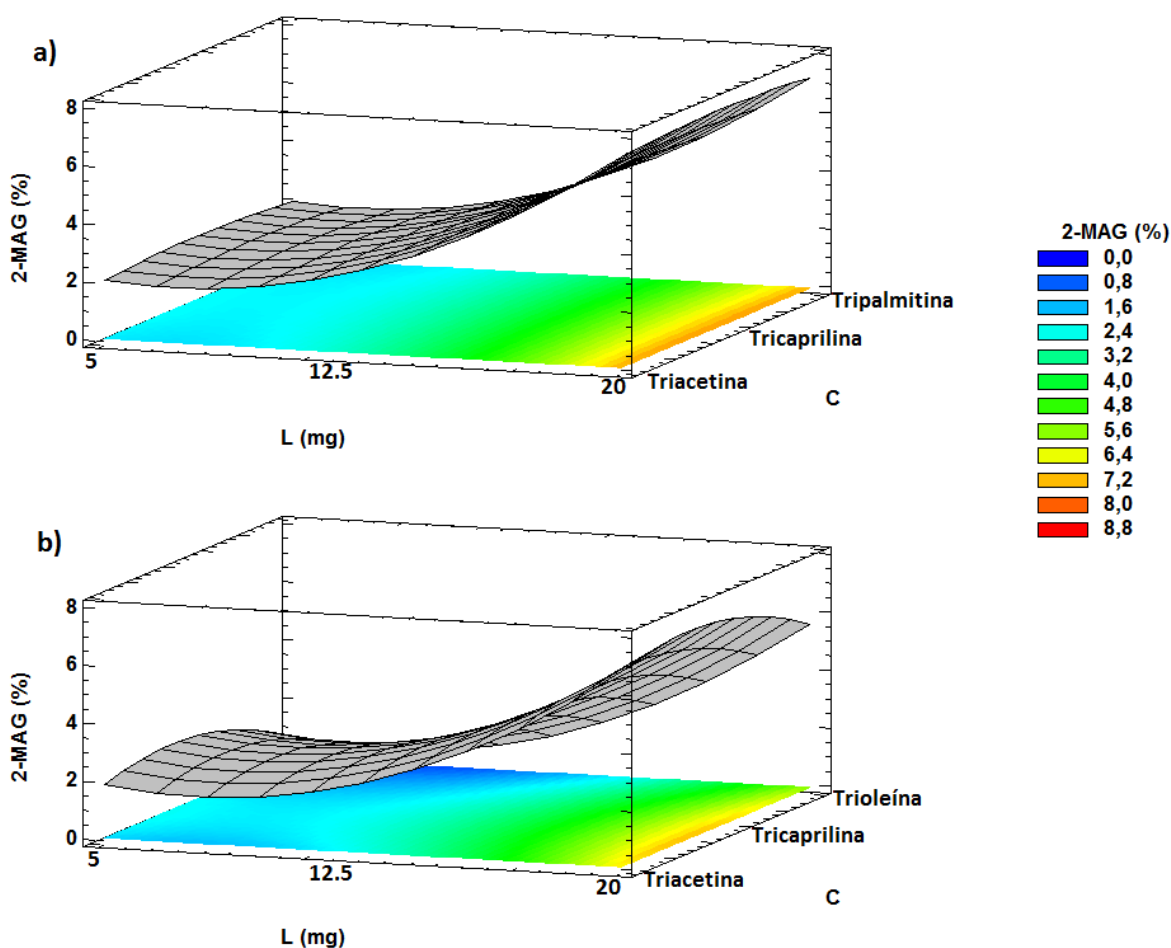


Figura 6.8. Variación en la fracción molar de 2-MAG en la etanólisis de triglicéridos catalizadas por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

6.5.3.2. Formación de 1-monoglicérido

La formación de 1-MAG puede explicarse en términos de la reacción de migración de acilo. 1-MAG puede generarse por la migración de acilo a partir de 1,2-DAG al 1,3-DAG y posterior etanólisis de la posición sn-3, o por la migración de acilo de la posición sn-2 a la posición sn-1 en el monoglicérido.

De acuerdo con las observaciones reportadas anteriormente, tanto el aumento en la carga de biocatalizador como el incremento de la longitud de cadena de los triglicéridos favorecieron la migración de acilo, y por lo tanto tuvieron un efecto positivo en la formación de 1-MAG. Los triglicéridos de longitud de cadena larga con insaturaciones han tenido un efecto negativo sobre esta respuesta indicando que la presencia de insaturaciones podría estar limitando el acceso del sustrato al sitio activo de la lipasa.

La Ecuación 6.10 describe la relación entre la fracción molar de 1-MAG y las variables estudiadas para el DE1:

$$1\text{-MAG} = 0.0638L + 0.0312T + 0.210C + 0.0475L^2 + 0.0425T^2 + 0.345C^2 \quad (6.10)$$

El coeficiente de determinación R^2 para este modelo tuvo un valor de 96.64%.

La Ecuación 6.11 describe la relación entre la fracción molar de 1-MAG y las variables estudiadas para el DE2:

$$1\text{-MAG} = 0.01 + 0.0712L + 0.0175T - 0.0612C + 0.0725L^2 + 0.0725C^2 - 0.0450LT - 0.04CT \quad (6.11)$$

Con esta ecuación fue posible explicar 83.07% de la variación de la fracción de 1-monoglicérido.

6.5.4. Formación de glicerol

La formación de glicerol durante la etanolisis de triglicéridos catalizadas por Novozym 435 fue el resultado de la reacción de migración de acilo. Con el fin de detectar la presencia de este polialcohol, es necesario realizar una cuidadosa toma de las muestras de reacción y un análisis adecuado de las mismas. El glicerol se encuentra solubilizado en etanol, sin embargo para realizar el análisis de la muestra por cromatografía este solvente debe ser evaporado. La muestra en general suele diluirse en heptano, de ser así el glicerol quedará adherido a las paredes del vial y el mismo no será detectado en el análisis. Todas las muestras de reacción fueron evaporadas y posteriormente diluidas en piridina para poder analizar su composición.

El aumento del tiempo de reacción, de la carga de biocatalizador y de la longitud de cadena de los triglicéridos favorecieron la formación de glicerol. Una vez más se hace evidente que las tres variables estudiadas promovieron la migración de acilo cuando se consideraron solamente triglicéridos saturados. La Ecuación 6.12 se utilizó para modelar la fracción molar de glicerol para DE1:

$$GGG = 0.285L + 0.288C + 0.228L^2 + 0.218T^2 + 0.382C^2 - 0.185LT + 0.290LC \quad (6.12)$$

El valor de R^2 indica que el modelo puede explicar 92.39% de los cambios en la fracción GGG.

Cuando se considera el efecto de la insaturación en los ácidos grasos de que componen el triglicérido (DE2), el efecto del tiempo de reacción y la carga de biocatalizador favorecieron la formación de GGG. Sin embargo, la presencia de la insaturación tuvo un efecto negativo en esta respuesta. Probablemente el acceso de los acilglicéridos formados por ácidos grasos insaturados al sitio activo de la lipasa está restringido, lo que limita el progreso de las reacciones.

La Ecuación 6.13 representa la relación entre la fracción molar de glicerol y las variables estudiadas para DE2.

$$GGG = -0.0146 + 0.201L - 0.0425T - 0.119C + 0.283L^2 + 0.166T^2 - 0.185LT + 0.122LC(6.13)$$

El valor de R^2 para este modelo fue de 80.20%

6.5.5. Síntesis de etil éster

La producción de biodiesel a partir de un alcohol de cadena corta que se puede obtener sin recurrir a los combustibles fósiles es una alternativa interesante. La generación de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) se vio favorecida por el aumento del tiempo de reacción y de la carga de biocatalizador, ya sea considerando triglicéridos saturados o con insaturaciones.

El aumento de la longitud de cadena influyó negativamete en la formación de etil éster. Como fue mencionado anteriormente, CALB es selectiva a ácidos grasos de cadena corta. Cuando los ácidos grasos de cadena larga de los triglicéridos presentan una insaturación, el efecto negativo de la longitud de cadena se incrementó, porque al

parecer el acceso de estos ácidos al sitio activo de la lipasa es limitado. Las Ecuaciones 6.14 y 6.15 describen la relación entre la fracción de FAEE y las variables estudiadas para DE1 y DE2, respectivamente:

$$FAEE = 22.6 + 11.2L + 6.78T + 1.77L^2 + 3.09T^2 - 4.73C^2 - 1.44LC - 1.79TC \quad (6.14)$$

$$FAEE = 22.62 + 10.6L + 6.20T - 6.33C + 2.45L^2 + 2.41T^2 - 10.4C^2 - 2.65LC - 2.96TC \quad (6.15)$$

Utilizando la Ecuación 6.14 fue posible explicar el 99.10% de la variación en la fracción FAEE, mientras que la Ecuación 6.15 explica 98.99% de los cambios en esta fracción (en base a los coeficientes de determinación R^2).

En la Figura 6.9 se presentan dos gráficos de superficie de respuesta para la fracción FAEE, donde se muestran los efectos de la carga biocatalizador y de la longitud de cadena del triglicérido a un tiempo de reacción de 90 min.

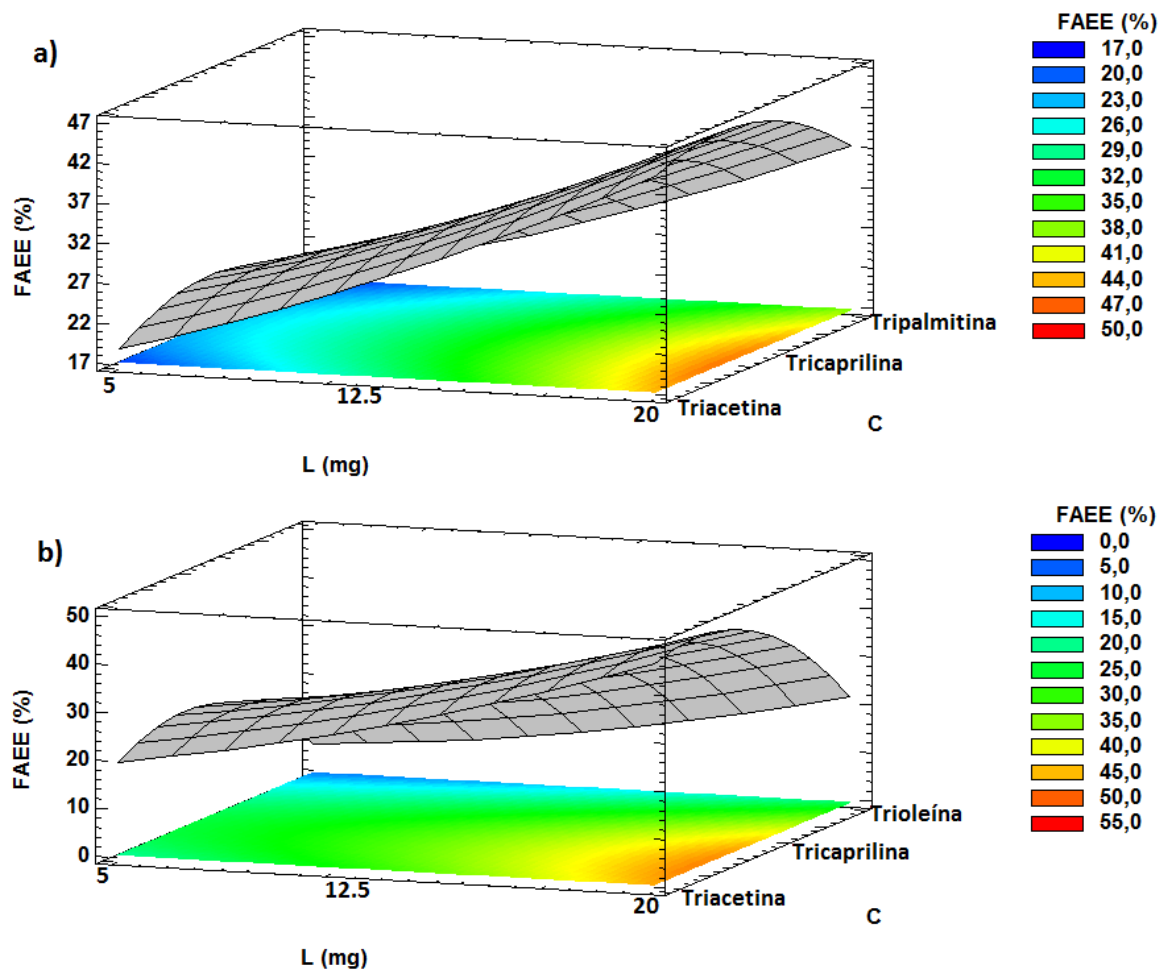


Figura 6.9. Variación en la fracción molar de FAEE en la etanólisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

6.6. Análisis multirespuesta usando funciones de deseabilidad

En las secciones anteriores se evaluaron los efectos de las variables experimentales sobre diferentes respuestas al realizar la etanólisis enzimática de triglicéridos. Se desarrollaron regresiones de segundo orden para cada respuesta, y se obtuvieron las condiciones óptimas para las mismas. En esta sección, las respuestas se analizan con el objetivo de obtener un óptimo global.

Se busca desarrollar dos modelos con objetivos opuestos: uno que maximice la conversión de triglicéridos, la fracción de FAEE y la fracción molar de glicerol (centrado en la síntesis enzimática de biodiesel), y otro que maximice la conversión de triglicéridos y la fracción 2-MAG, minimizando la fracción molar de glicerol y de 1-MAG (centrado en la síntesis de 2-MAG minimizando la migración de acilo).

En la Figura 6.10 se muestran gráficos de la superficie estimada de la función de deseabilidad para la maximización de la síntesis de etil ésteres. Como se puede observar en la Figura 6.10a, los valores más altos de la función de deseabilidad se obtuvieron cuando la síntesis se llevó a cabo con triglicéridos de cadena larga y con alta carga de biocatalizador. Los valores de deseabilidad también aumentaron con el tiempo de reacción (no se muestra en la Figuras 6.10a y 6.10b)

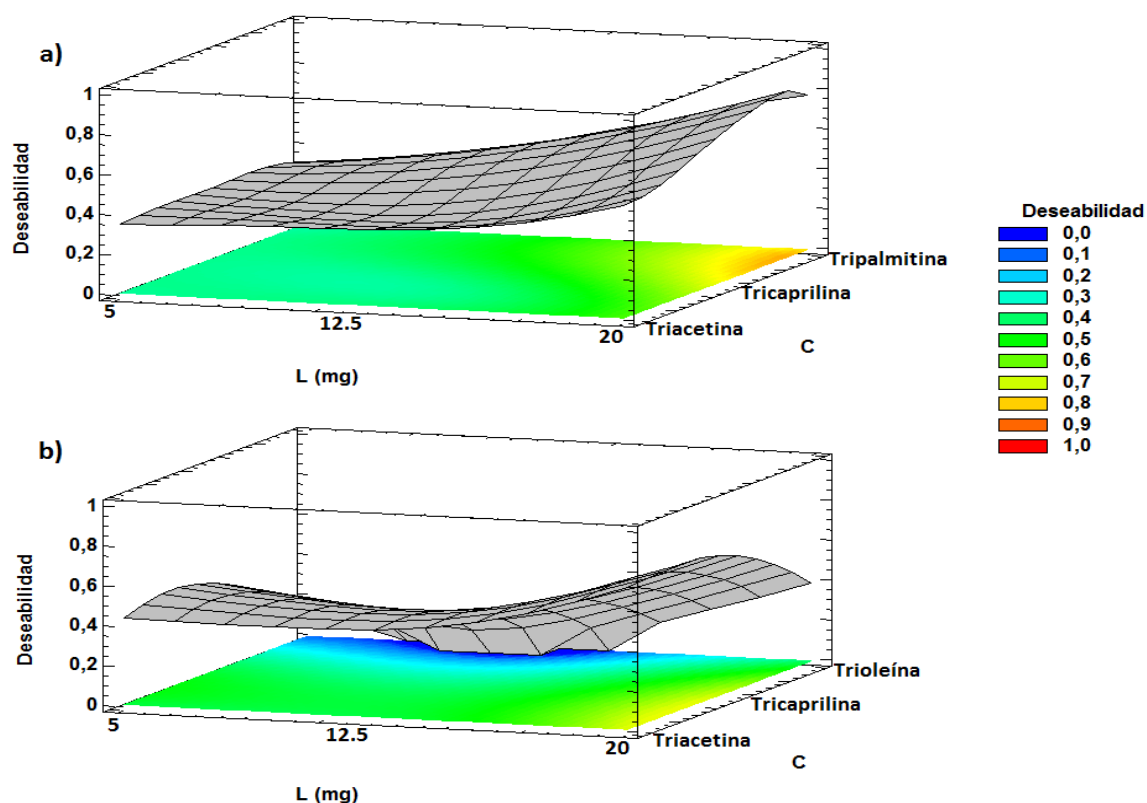


Figura 6.10. Gráficos de superficie de respuesta para la función de deseabilidad maximizando conversión, fracción molar de etil ésteres y fracción molar de glicerol en la etanólisis de triglicéridos para un tiempo de reacción de 90 min. Variables: carga de biocatalizador y longitud de cadena de los triglicéridos. Referencias: a) DE1, b) DE2.

La conversión de TG formados de ácidos grasos de cadena larga con insaturaciones fue baja debido a las restricciones que estos presentan para acceder al sitio activo de la lipasa. En la Figura 6.10b puede observarse que la función deseabilidad exhibió los valores más altos cuando el tiempo de reacción y la carga de biocatalizador se encontraban en los niveles máximos analizados, pero para triglicéridos de longitud de cadena corta o media.

Los gráficos de la superficie de respuesta estimada para la maximización de la fracción 2-MAG y la minimización de la migración de acilo se muestran en la Figura 6.11. En estos gráficos sólo fueron considerados los triglicéridos saturados (DE1), dado que la

presencia de insaturaciones restringe fuertemente la conversión de triglicéridos y la fracción 2-MAG observada.

Al maximizar la formación de 2-MAG, la función de deseabilidad alcanzó los valores más altos cuando la carga biocatalizador y el tiempo de reacción se encontraban en los niveles máximos evaluados en este trabajo (Figura 6.11a) y con triglicéridos de cadena corta y media (Figura 6.11b).

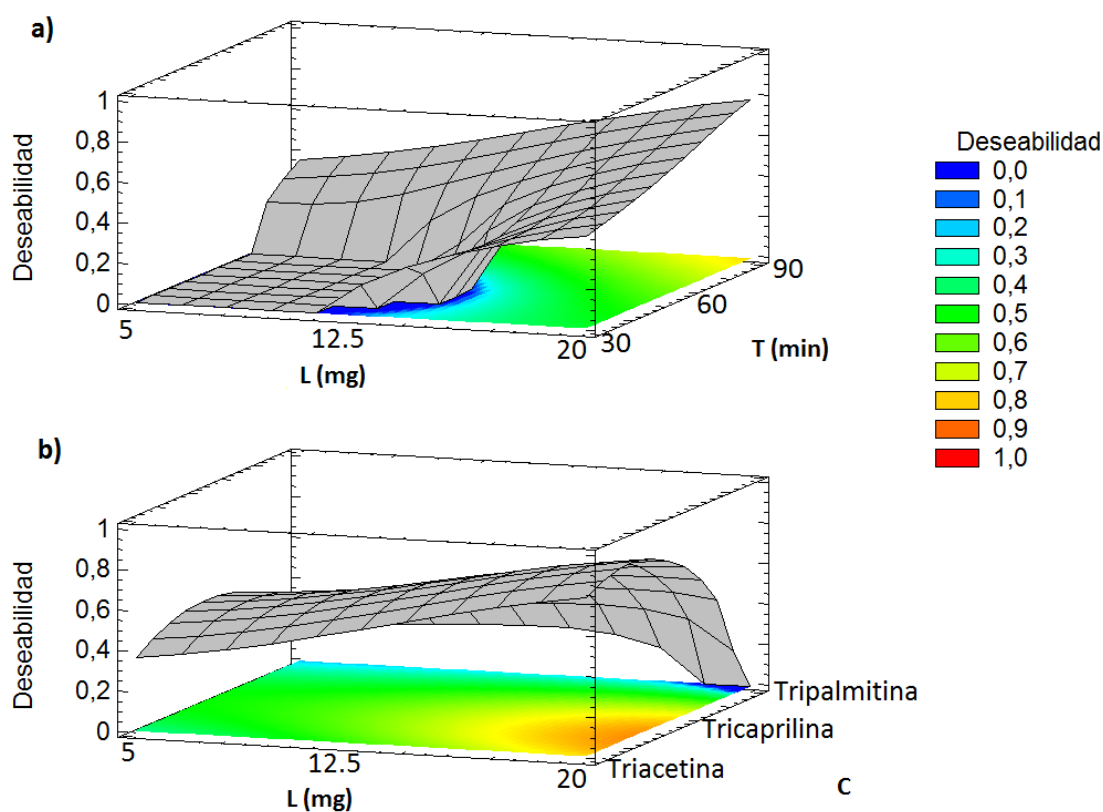


Figura 6.11. Gráfico de superficie de respuesta para la función de deseabilidad maximizando la formación de 2-MAG. a) etanolisis de triacetina considerando variaciones en la carga de biocatalizador y el tiempo de reacción, b) etanolisis de triglicéridos luego de 90 min de reacción, considerando el efecto de la longitud de cadena de los triglicéridos y la carga de biocatalizador.

6.7. Resultados del modelo teórico

Con el objetivo de comprender la selectividad hacia ácidos grasos de cadena corta y la alta especificidad hacia la posición sn-3 se aplicó un modelo teórico tal como fue descrito en la sección 2.2.3.3.

La Tabla 6.3 muestra los resultados de las tres conformaciones diferentes para cada triglicérido: en la entrada del sitio activo de CALB (posición I), en el "medio" del camino hacia la Serina catalítica (posición II), y cerca del grupo Serina de la tríada catalítica de CALB (posición III).

Tabla 6.3. Entalpías de formación (ΔH_f°) para las conformaciones seleccionadas para cada uno de los triglicéridos estudiados.

Triglicérido	Posición I ΔH_f° (kcal/mol)	Posición II ΔH_f° (kcal/mol)	Posición III ΔH_f° (kcal/mol)
Triacetina	- 249.6	-246	-239.5
Tricaprilina	- 338.6	-337.8	-336.2
Tripalmitina	- 468.2	-462.1	-464.0
Trioleína	- 419.0	-387.0	-409.0

Las etapas de minimización generaron estructuras que claramente no son muy diferentes, excepto que son "compactadas" a través de un proceso como el que ocurre en un fuelle para los triglicéridos saturados. Para el caso de la trioleína, existe una notable diferencia de entalpía entre las posiciones I y II y entre la II y III. Esta diferencia indica que la posición II, en la cual la trioleína se mueve hacia la Serina, es la menos favorecida. La interacción de los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas de la trioleína con las paredes de CALB es fuerte cuando este

triglicérido está ingresando en el sitio activo de la lipasa. La baja conversión de trioleína podría estar relacionada con la llegada del sustrato al sitio activo debido que el movimiento de éste se ve fuertemente impedido.

Este estudio teórico simple sugiere posibles explicaciones de dos hechos principales que mostraron los datos experimentales:

a) la menor actividad de CALB en Novozym 435 para trioleína (incluso con selectividad similar a otros triglicéridos):

Del diseño experimental resulta claro que la selectividad de CALB es similar cuando se consideran triglicéridos saturados o insaturados, pero la actividad es mucho menor para trioleína que para los otros triglicéridos estudiados. Las supuestas causas de esta diferencia fueron las características estéricas y electrónicas de la trioleína frente a los triglicéridos saturados. La Figura 6.12 muestra las diferentes conformaciones encontradas para la tripalmitina en la superficie de la lipasa en el camino hacia el sitio catalítico (posición I) y cerca de la Serina (posición III) y para la trioleína en la superficie de la lipasa (posición I) y situado en las paredes de los bolsillos del sitio activo de CALB (posición II). Las estructuras que se muestran se obtuvieron después de la minimización estérica del sitio activo de CALB y el entorno, más el triglicérido coordinado cerca de la entrada al sitio activo (estructuras I y II) o cerca de la Serina (estructura III).

La tripalmitina (Figura 6.12a) sólo cambia la apertura de las 3 cadenas largas de hidrocarburos mientras recorre el camino hacia la Serina. El caso de la trioleína es más

complejo (Figura 6.12b). La estructura está “doblada” y por lo tanto los dobles enlaces introducen restricciones estéricas para la porción central del TAG para llegar a la Serina del sitio activo.

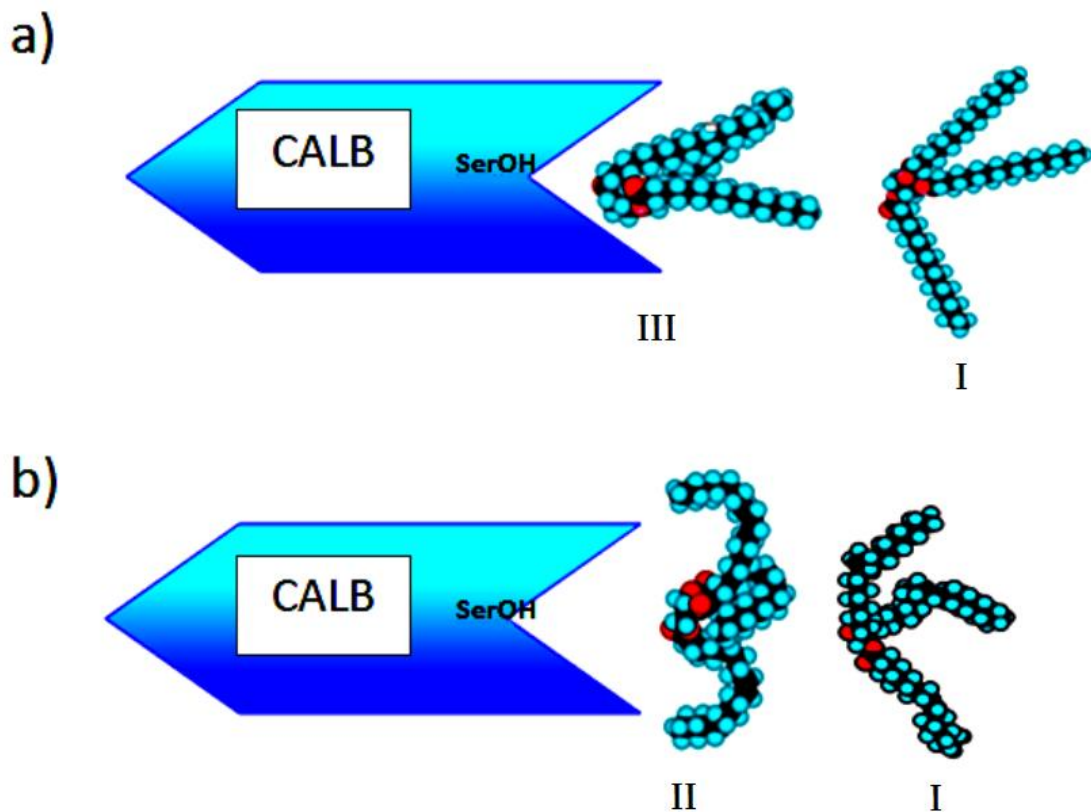


Figura 6.12. Representación esquemática de tripalmitina (a) y trioleína (b) en la superficie de CALB (posición A), cerca de la Serina (posición C) y situado en la entrada del túnel hacia la tríada catalítica de CALB (posición B).

Los factores que pueden influir en las diferencias de actividades son:

- difusión del triglicérido desde el exterior hacia el entorno de la enzima,
- difusión de triglicérido a través de la *Lid* o “tapa” abierta hacia la tríada catalítica y las interacciones con grupos laterales de aminoácidos pertenecientes a aminoácidos que constituyen la entrada al sitio activo de la enzima, la *Lid* y el túnel alrededor de la tríada catalítica,

- adsorción del triglicérido cerca de la Serina de la tríada catalítica de CALB por el lado de los carbonilos

b) la especificidad de CALB hacia a posición sn-2:

Está claro que CALB tiene estereoselectividad hacia la posición sn-3 para todos los triglicéridos. Tratando de encontrar una explicación, se analizó detenidamente la estructura de triacetina

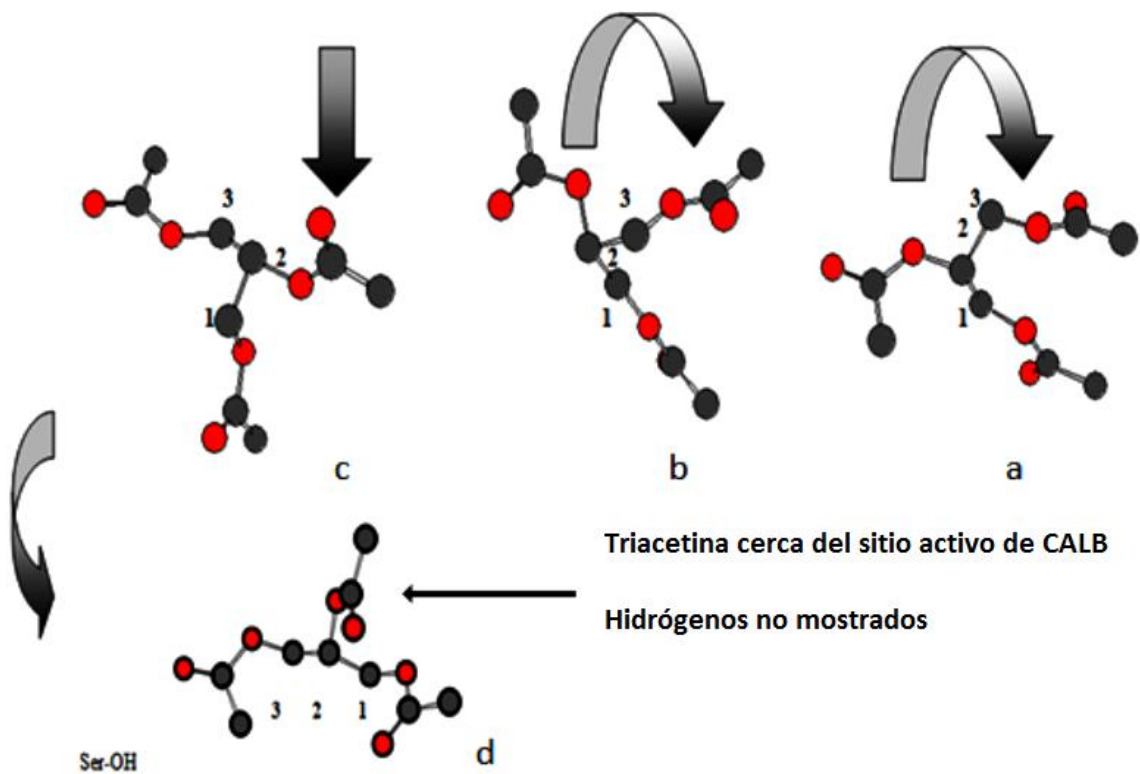


Figura 6.13. Representación esquemática de triacetina (sin hidrógenos) en: a) Posición I, b y c) Posición II y d) Posición III.

La Figura 6.13 muestra una posible explicación para la selectividad sn-3 en CALB. Los pasos desde a) hasta c) muestran cómo la triacetina puede torcerse sin impedimento estérico sustancial alrededor. Los principales cambios tienen lugar en la estructura del

esqueleto remanente del glicerol en la triacetina y los enlaces se giran sin romperse o cambiar.

El impedimento estérico con las paredes de CALB haría imposible acomodar triacetina para poder coordinar el grupo unido al C1 del glicerol con la Serina. En su lugar, la coordinación del grupo unido al C3 de glicerol permite la ubicación correcta de los restantes grupos del TAG con el espacio adecuado para evitar fuertes interacciones con los bolsillos de alcohol y de los ácidos grasos de CALB.

Una visión más detallada se presenta en la Figura 6.14. En la misma, empleando triacetina como triglicérido modelo, se muestra la coordinación del triacilglicérido con la tríada catalítica de CALB y la formación de intermediarios en la reacción.

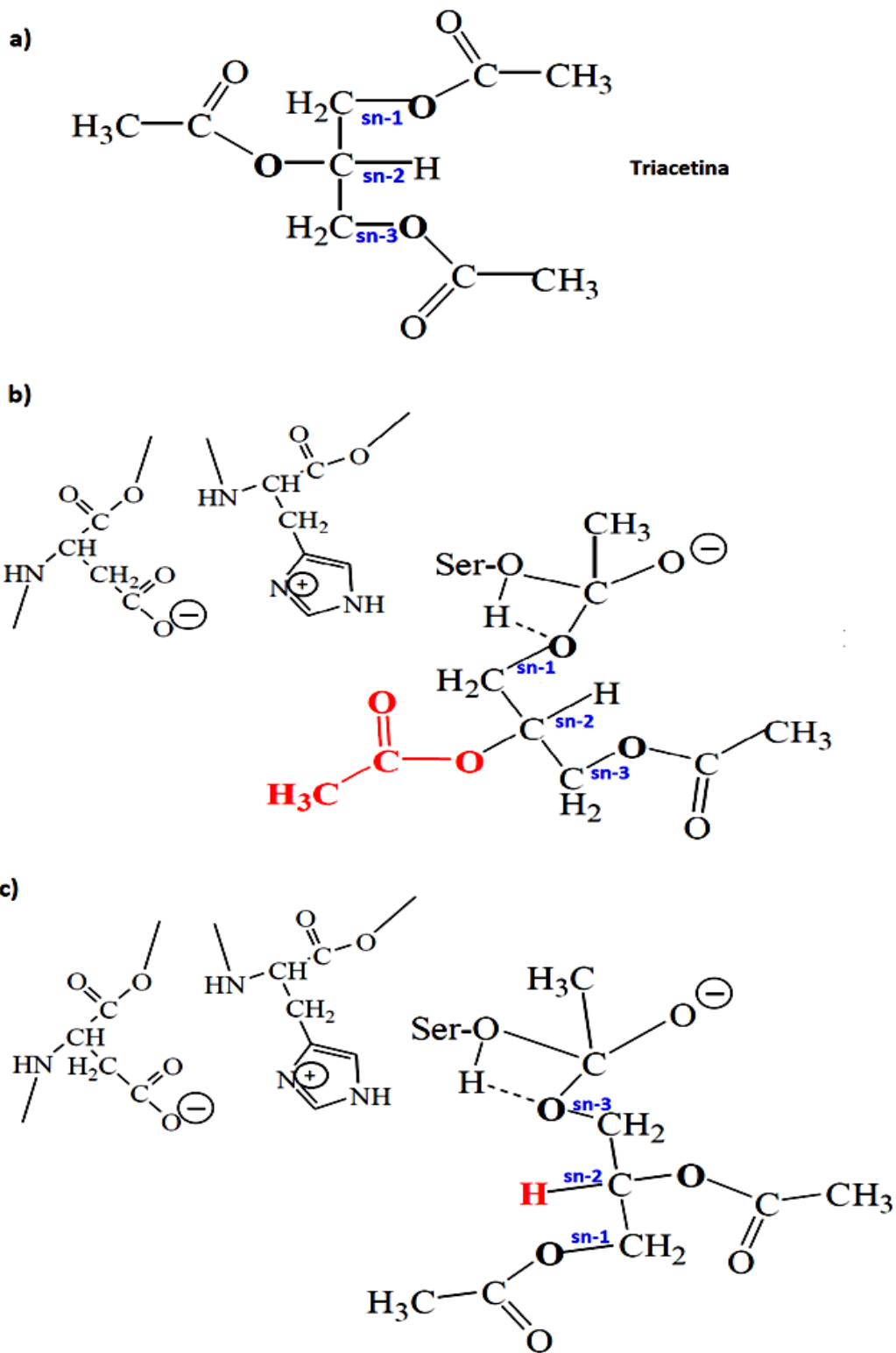


Figura 6.14. Intermediarios de reacción de triacetina con la tríada catalítica de CALB. a) Triacetina, b) intermediario por coordinación a través de la posición sn-1, c) intermediario por coordinación a través de la posición sn-3.

Al parecer la interacción estérica resulta más importante cuando el triglicérido se coordina con la Serina catalítica a través de la posición sn-1. Como puede verse en la Figura 6.14b el acilo esterificado en posición sn-2 interaccionaría con las paredes del sitio activo de CALB o incluso con la Histidina impidiendo la coordinación de la Serina con el acilo esterificado en posición sn-1. Sin embargo, cuando la coordinación se realiza a través de la posición sn-3, en posición sn-2 se encuentra un hidrógeno orientado hacia el sitio activo, lo que generaría impedimentos considerablemente menores (Figura 6.14c). Las restricciones probablemente se vuelvan más importantes a medida que la longitud de los ácidos grasos en el triglicérido aumenta. Este modelo simple nos permitiría comprender la alta selectividad a la posición sn-3 que la lipasa B de *Candida antarctica* ha mostrado.

En la Figura 6.15 se presenta la formación de intermediarios de diglicéridos al reaccionar con el sitio activo de CALB. En la Figura 6.15c se presenta el intermediario de reacción que se generaría por la coordinación del 1,2-diglicérido a través del acilo en posición sn-1, nuevamente se hace evidente que esta reacción podría encontrarse limitada por interacciones estéricas debido a la presencia del acilo esterificado en sn-2 y que se encuentra orientado hacia el sitio activo de la lipasa. Este modelo simple permitiría explicar la baja conversión de 1,2-DAG observada en las reacciones llevadas a cabo en este capítulo como en el Capítulo 5.

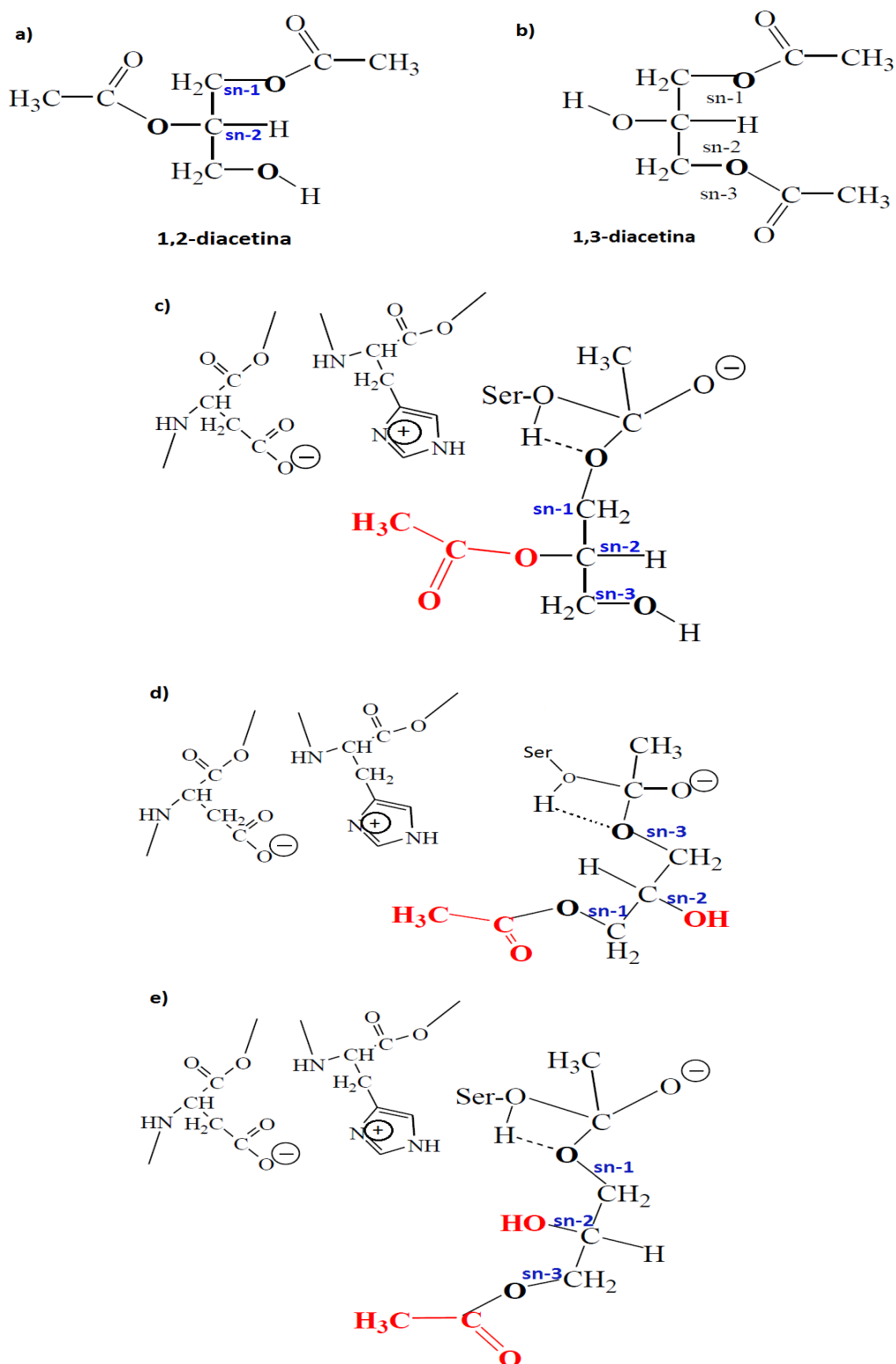


Figura 6.15. Intermediarios de reacción de diacetina con la tríada catalítica de CALB. a) 1,2-diacetina, b) 1,3-diacetina, c) intermediario por coordinación de 1,2-diacetina a través de la posición sn-1, d) intermediario por coordinación de 1,3-diacetina a través de la posición sn-3 y e) intermediario por coordinación de 1,3-diacetina a través de la posición sn-1.

Finalmente en las gráficas presentadas en las Figuras 6.15d y 6.15e se muestran los intermediarios que se forman cuando 1,3-dicaprina reacciona por sn-3 y por sn-1 respectivamente. Al parecer es más factible la etanolisis de 1,3-dicaprina cuando la reacción de ésta con la Serina del sitio activo se produce a través del acilo esterificado en posición sn-3. En esta situación el impedimento estérico es menor que si la reacción procediera por sn-1. Lo que permite comprender la formación de 1-monoglicérido por etanolisis de 1,3-diglicérido, tal como fue observado en este capítulo.

6.8. Conclusiones

En base a los resultados presentados en este capítulo se puede indicar que:

- La presencia de glicerol en los productos de reacción es una indicación clara de la migración de acilo con enzimas supuestamente 1,3 específicas. Es muy importante realizar un muestreo adecuado para detectar este polialcohol.
- El análisis de las muestras de reacción debe llevarse a cabo en el menor tiempo posible. La migración de acilos de la posición sn-2 a sn-1 o sn-3 se produce espontáneamente durante el almacenamiento de las muestras, aún a una temperatura tan baja como -20 °C.
- La formación de 2-MAG por etanolisis de triglicéridos se ve favorecida por los tiempos de reacción más largos y mayores cargas de biocatalizador con triglicéridos saturados de cadena media o corta. En el caso de triglicéridos

de cadena larga, la formación de este monoglicérido está severamente limitada por la migración de acilo.

- La migración de acilos aumenta el rendimiento de etil ésteres y minimiza el contenido de mono- y diglicéridos en el biodiesel. Se recomienda la síntesis enzimática de biodiesel si los aceites que se utilizan están compuestos principalmente por triglicéridos de cadena larga, dado que favorecen la migración de acilo. Con el fin de maximizar el rendimiento, tiempos de reacción considerablemente largos y grandes cargas de biocatalizador son necesarios.
- La conversión de acilglicéridos formados por ácidos grasos de cadena larga con insaturaciones es relativamente baja debido probablemente a las restricciones para el acceso de éstos al sitio activo de la lipasa.

Los resultados y conclusiones del presente capítulo dieron origen a la siguiente publicación:

Sánchez, D. A., Tonetto, G. M., Ferreira M. L. (2016). *An insight on acyl migration in solvent-free ethanolysis of model triglycerides using Novozym 435*. *Journal of Biotechnology*, 220:92-99.

6.9. Referencias

- [1] Selmi, B., Thomas, D. (1998). Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:691-695.
- [2] Kanasawud, P., Phutrakul, S., Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1992). Triglyceride interesterification by lipases. 3. Alcoholysis of pure triglycerides. *Enzyme and microbial technology*, 14:959-965.
- [3] Chesterfield, D. M., Rogers, P. L., Al-Zaini, E. O., Adesina, A. A. (2012). Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chemical Engineering Journal*, 207:701-710.
- [4] Yesiloglu, Y. (2004). Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81:157-160.
- [5] Pessoa, F. L., Magalhães, S. P., de Carvalho Falcão, P. W. (2010). Production of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower and soybean oils: modeling. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161:238-244.
- [6] Joshi, H. C., Toler, J., Walker, T. (2008). Optimization of cottonseed oil ethanolysis to produce biodiesel high in gossypol content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85:357-363.
- [7] Esteban, L., del Mar Muñío, M., Robles, A., Hita, E., Jiménez, M. J., González, P. A., Molina, E. (2009). Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. *Biochemical Engineering Journal*, 44:271-279.
- [8] Rahman, H., Anggadiredja, K., Sitompul, J. P., Gusdinar, T. (2015). Synthesis and Characterization of 2-monoacylglycerols from *Canarium Oil* (*Canarium Indicum*). *Procedia Food Science*, 3:162-173.
- [9] Piyatheerawong, W., Yamane, T., Nakano, H., Iwasaki, Y. (2006). Enzymatic preparation of enantiomerically pure sn-2, 3-diacylglycerols: a stereoselective ethanolysis approach. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83:603-607.
- [10] Shaw, J. F., Wang, D. L., Wang, Y. J. (1991). Lipase-catalysed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long-chain fatty acids. *Enzyme and microbial technology*, 13:544-546.
- [11] Kristensen, J. B., Xu, X., Mu, H. (2005). Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82:329-334.

- [12] Blasi, F., Cossignani, L., Simonetti, M. S., Damiani, P. (2007). Biocatalysed synthesis of sn-1, 3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 41:727-732.
- [13] Jensen, R. G., Galluzzo, D. R., Bush, V. J. (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). *Biocatalysis and Biotransformation*, 3:307-316.
- [14] Du, W., Xu, Y. Y., Liu, D. H., Li, Z. B. (2005). Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37:68-71.
- [15] Duan, Z. Q., Du, W., Liu, D. H. (2011). The mechanism of solvent effect on the positional selectivity of *Candida antarctica* lipase B during 1,3-diolein synthesis by esterification. *Bioresource technology*, 102:11048-11050.
- [16] Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. (2001). Utilization of reaction medium-dependent regioselectivity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:285-290.
- [17] Irimescu, R., Iwasaki, Y., Hou, C. T. (2002). Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:879-883.
- [18] del Mar Muñío, M., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., Jiménez, M. J., González, P. A., Molina, E. (2008). Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1, 3 specific lipases. *Process Biochemistry*, 43:1033-1039.
- [19] Pilarek, M., Szewczyk, K. W. (2007). Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *Journal of biotechnology*, 127:736-744.
- [20] del Mar Muñío, M., Robles, A., Esteban, L., González, P. A., Molina, E. (2009). Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochemistry*, 44:723-730.
- [21] Pfeffer, J., Freund, A., Bel-Rhlid, R., Hansen, C. E., Reuss, M., Schmid, R. D., Maurer, S. C. (2007). Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale. *Lipids*, 42:947-953.
- [22] Yang, T., Fruekilde, M. B., Xu, X. (2005). Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food chemistry*, 92: 101-107.

- [23] Anderson, E. M., Larsson, K. M., Kirk, O. (1998). One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16:181-204.
- [24] Karabulut, I., Durmaz, G., Hayaloglu, A. A. (2009). Fatty acid selectivity of lipases during acidolysis reaction between triolein and saturated fatty acids varying from caproic to behenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57:7584-7590.
- [25] Villeneuve, P., Pina, M., Montet, D., Graille, J. (1995). Determination of lipase specificities through the use of chiral triglycerides and their racemics. *Chemistry and physics of lipids*, 76:109-113.
- [26] Wang, X., Liang, L., Yu, Z., Rui, L., Jin, Q., Wang, X. (2014). Scalable synthesis of highly pure 2-monoolein by enzymatic ethanolysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116:627-634.
- [27] Shimada, Y., Ogawa, J., Watanabe, Y., Nagao, T., Kawashima, A., Kobayashi, T., Shimizu, S. (2003). Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Lipids*, 38:1281-1286.

7. SÍNTESIS DE 1,3-DICAPROIL-2-PALMITOIL GLICEROL CATALIZADA POR LA LIPASA DE *BURKHOLDERIA CEPACIA* INMOVILIZADA POR ADSORCIÓN FÍSICA SOBRE QUITOSANO.

7.1. Introducción

El valor nutricional de los triglicéridos (TAG) y sus propiedades fisicoquímicas no sólo se determinan por la composición de ácidos grasos (AG) sino que también dependen de la distribución de los grupos acilos en el esqueleto de glicerol (GGG) [1].

En lo referente a la nutrición humana, en el intestino, triacilgliceroles de cadena larga (TCL), tales como los procedentes de aceites vegetales, grasas animales o aceites de pescado, son hidrolizados por varias enzimas en monoacilgliceroles y ácidos grasos libres y se incorporan en micelas mezcladas con ácido biliar y posteriormente son absorbidos [2-4]. Por otro lado se ha sugerido que los triacilgliceroles de cadena media (TCM) sufren una hidrólisis casi completa para ser absorbidos predominantemente como ácidos grasos libres [5,6]. En ausencia o deficiencia de la lipasa pancreática, algunos estudios han indicado que una gran fracción de TCM pueden ser absorbido como triacilgliceroles, mientras que los TCL no se absorben [5]. Por esta razón, TCM se han utilizado para ciertos grupos de pacientes o niños debido a su rápida digestión y aporte de energía [5,7-9]. Sin embargo, una alta dosis de TCM ha causado ciertos efectos tóxicos en los experimentos con animales [10]. Por lo tanto, triglicéridos alternativos se han utilizado en estudios de absorción, tales como mezclas físicas de TCM y TCL, aunque las mismas no han generado mejora en la absorción de ácidos

grasos de cadena larga dado que cada uno de los triglicéridos individuales mantiene su tasa de absorción inicial [11].

Una alternativa a la mezcla física surgió a partir de los triglicéridos estructurados (TE). Los TE pueden ser clasificados como aceites o grasas modificadas o sintéticas, por cualquier metodología, tales como hidrogenación, fraccionamiento, interesterificación, esterificación, e incluso producidos por plantas modificadas genéticamente. Aunque usualmente la definición de TE hace referencia a triglicéridos cuya composición de ácidos grasos (AG) ha sido determinada por un proceso de laboratorio o industrial. Los mismos pueden ser obtenidos a partir de reestructuración de aceites o grasas naturales, o a partir de ácidos grasos, teniendo funcionalidad o propiedades nutricionales especiales para alimentación o propósitos farmacéuticos [12].

Los TE pueden ser clasificados en varios tipos: AAA, ABA, AAB y ABC, siendo A, B y C diferentes ácidos grasos.

Los triglicéridos estructurados del tipo ABA, formados por AG de longitud de cadena media en posiciones sn-1 y sn-3 y ácidos grasos de cadena larga en posición sn-2 (MLM) han recibido especial atención en los últimos años [13-15]. Se ha probado que este tipo de triglicéridos presentan beneficios metabólicos respecto a triglicéridos naturales, mezclas físicas o triglicéridos estructurados con composición al azar [16-17]. En particular, en nutrición infantil, los TE con ácido palmítico en posición sn-2 son mejor adsorbidos que cuando se encuentra esterificado en posiciones sn-1 o sn-3 [14-15].

La mayor parte del ácido palmítico en grasa de leche humana se encuentra esterificado en posición sn-2 [18-20]. Sin embargo, prácticamente todas las fórmulas infantiles contienen ácido palmítico predominantemente en posiciones sn-1,3 y la liberación del mismo durante la digestión está asociada con la formación de jabones de calcio que son pobremente adsorbidos, y resultan responsables de constipación en lactantes. De modo que el desarrollo de nuevas fórmulas enriquecidas con ácido palmítico en posición sn-2 permitiría evitar los trastornos antes mencionados y proveer rápida energía [21-23].

Una variedad de métodos para la síntesis enzimática de estos compuestos han sido descritos [24,25]. Estos incluyen acidólisis de triglicéridos [26,27] o interesterificación entre dos triglicéridos [28,29]. Desafortunadamente, los rendimientos a TAG de tipo MLM son bajos, y se generan un gran número de subproductos, que son difíciles de separar del producto deseado. Métodos de síntesis de triglicéridos del tipo MLM en dos etapas han sido desarrollados con el objetivo de reducir la generación de productos no deseados. Los métodos más ampliamente estudiados incluyen una primera etapa de alcoholólisis o hidrólisis de triglicéridos de cadena larga con lipasas 1,3-específicas y posterior esterificación de estas posiciones con ácidos grasos de cadena corta o media [30]. Sin embargo la reacción de migración de acilos que puede ocurrir durante la primera o segunda etapa no ha tenido una adecuada consideración (como fue mostrado en el Capítulo 6), y suele asumirse la obtención de productos específicos sin el apropiado análisis cuantitativo en detalle [31-33]. Más aun, la especificidad de las enzimas no se ha evaluado en cada uno de los medios de reacción empleados siendo que la misma puede variar con el tipo de sustrato y/o dependiendo del uso de

solventes. Tampoco se ha considerado apropiadamente la posibilidad de inhibición por alcohol o aún por ácido graso [34-39].

En esta sección, la síntesis de TE del tipo MLM, particularmente 1,3-dicaproil-2-pamitoil glicerol (CPC) fue estudiada por un metodología diferente. En primer lugar, un diglicérido 1,3-específico formado por ácidos grasos de longitud de cadena media fue sintetizado a partir de las condiciones óptimas obtenidas en el Capítulo 3 y purificado mediante el procedimiento presentado en el Capítulo 4. El producto obtenido fue esterificado con ácido palmítico empleando como catalizador la lipasa de *Burkholderia cepacia* (BCL) inmovilizada por adsorción física sobre quitosano. El empleo de *n*-heptano como solvente permitiría orientar la reacción de esterificación a la posición sn-2 tal como fue demostrado por Bi y colaboradores [40]

Un único trabajo donde se ha estudiado este tipo de síntesis empleando BCL inmovilizada sobre tierra de diatomeas fue hallado luego de una extensa revisión [41]. En el mismo los autores han estudiado la síntesis de 1,3-dicaprilol-2-oleil-glicerol (CaOCa) y 1,3-dilauroil-2-oleil-glicerol (LaOLa) y han reportaron que empleando ácido oleico en la segunda etapa la reacción prácticamente no procedió.

7.2. Inmovilización de la lipasa de *Burkholderia cepacia* sobre quitosano

De los muchos materiales que han sido estudiados como soportes en la literatura de inmovilización de enzimas (orgánicos o inorgánicos, hidrofóbicos o hidrofílicos, naturales o sintéticos) la quitina y el quitosano han recibido gran interés debido a sus numerosas propiedades que los vuelven atractivos para su uso como soportes de

enzimas. En este aspecto, quitina y quitosano ofrecen ventajas importantes como son la versatilidad de formas en las que puede obtenerse (polvo, geles, granos, fibras, membranas), la baja biodegradabilidad, la alta afinidad por las proteínas, la no-toxicidad y el bajo costo.

En cuanto al origen de estos materiales, la quitina es el principal constituyente de las cáscaras de crustáceos, los exoesqueletos de los insectos y de las paredes celulares de los hongos. Es un poliaminosacárido natural hidrofílico que constituye una de las fuentes orgánicas renovables más cuantiosa del planeta. Se estima que la quitina se sintetiza y degrada en la biósfera a razón de al menos 10 Gt al año. En referencia a su fórmula química, la quitina se compone de unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina, formando una larga cadena de polímero, insoluble en la mayoría de los solventes. El quitosano es el principal derivado de la quitina, el cual se obtiene por su *N*-deacetilación parcial (80-85 %). La quitina y el quitosano pueden considerarse análogos químicos de la celulosa, en la cual el hidroxilo en el carbono 2 fue reemplazado por grupos acetamino y amino respectivamente [42]. La Figura 7.1 muestra las estructuras moleculares de los monómeros de quitina, quitosano y celulosa.

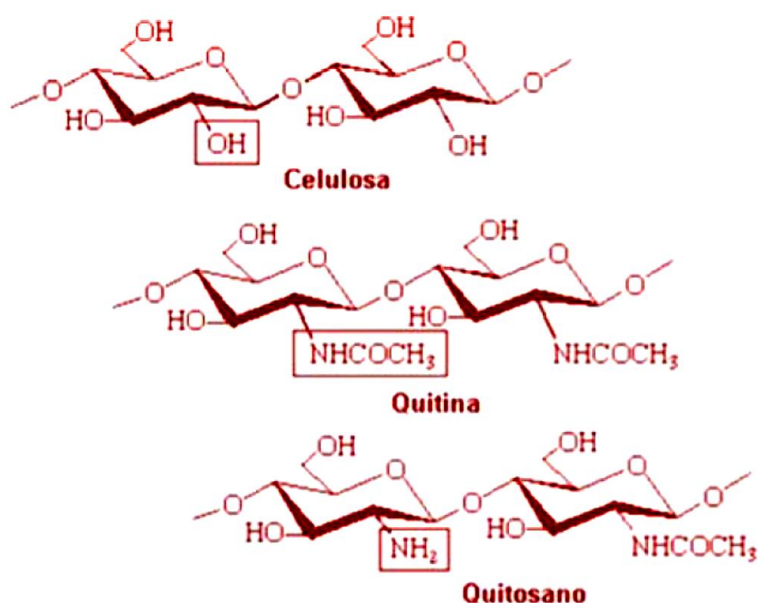


Figura 7.1. Monómeros de celulosa, quitina y quitosano [43].

Comercialmente, la quitina se obtiene relativamente a bajo costo a partir de cáscaras de crustáceos (principalmente cangrejos, camarones, langostinos y langostas), que son desechos de la industria del procesamiento de mariscos. Básicamente el proceso consiste en la deproteinización de las cáscaras con una solución diluida de NaOH y en la decalcificación con una solución diluida de HCl. Para obtener el quitosano, la quitina se *N*-deacetila parcialmente por tratamiento con una solución de NaOH al 40-45%, seguida de procedimientos de purificación [42].

El quitosano posee propiedades químicas y biológicas distintivas. En sus cadenas lineales de poliglucosamina de alto peso molecular, el quitosano tiene grupos amino e hidroxilos reactivos, favorables para la modificación química. Adicionalmente, los grupos amino convierten al quitosano en uno de los pocos polielectrolitos catiónicos encontrados en la naturaleza. Las propiedades biológicas únicas del quitosano como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad a productos inocuos, la no-toxicidad, la

afinidad por proteínas, la hidrofiliidad, etc., confieren al quitosano un extraordinario potencial en numerosas aplicaciones. En las últimas dos décadas se ha examinado la aplicación de diversos materiales basados en quitina y quitosano, habiéndose desarrollado productos de aplicación potencial en el tratamiento de aguas de desecho, en la industria alimenticia, en la agricultura, en la industria de la pulpa de papel y en la de los cosméticos.

Debido a sus incomparables propiedades biológicas, los usos más atractivos de los materiales basados en quitina y quitosano recaen en las áreas de la medicina y la biotecnología. Como soportes de enzimas, la quitina y el quitosano han sido usados en forma de polvos, escamas, pellets y geles de diversas configuraciones geométricas [42].

La elección de este soporte para la inmovilización de enzimas radicó en las ya mencionadas propiedades del quitosano. A su vez, la relativa alta resistencia mecánica de las escamas de quitosano y la fácil recuperación del mismo del sistema de reacción fueron otras características que condicionaron la elección.

La lipasa de *Burkholderia cepacia* se inmovilizó sobre quitosano en escamas siguiendo la metodología detallada en la Sección 2.2.4.1. En este tipo de inmovilización se descarta que la unión establecida sea de tipo covalente. A la temperatura de inmovilización (30 °C), no resulta factible que se hayan establecidos enlaces químicos entre las lipasas y los grupos amino del quitosano. Más bien se estima que la unión generada involucra fuerzas del tipo van der Waals, aunque no se descarta el

establecimiento de enlaces del tipo iónico entre los aminoácidos expuestos de las lipasas y las especies $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ del quitosano. Los aminoácidos hidrófobos, que en medio acuoso no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, no pueden intervenir en la unión.

El procedimiento de inmovilización se llevó a cabo por triplicado manteniendo las condiciones descritas en la Sección 2.2.4.1. Si bien el porcentaje de enzima inmovilizada no fue analizado en cada uno de los biocatalizadores obtenidos, sí fue evaluada la actividad de cada uno de ellos en la reacción de esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico en *n*-heptano (12 horas, 45 °C, 100 mg de biocatalizador y relación molar ácido palmítico/dicaprina 2:1) obteniendo valores de conversión de diglicérido (82%) y rendimiento a CPC/CCP (28%) completamente reproducibles. Además, la actividad del biocatalizador se mantuvo inalterable durante el almacenamiento (a -4 °C) por períodos de tiempo superiores a los 6 meses.

Si bien el porcentaje de lipasa contenida en cada catalizador podría variar debido a la evaporación del agua durante el procedimiento de inmovilización, al llevar a cabo el mismo a 35 °C y sólo por el lapso de 1 hora es probable que este efecto no sea importante.

7.2.1. Cuantificación de la lipasa inmovilizada

La cuantificación de la masa de lipasa inmovilizada sobre quitosano se realizó en función del contenido de azufre de la estructura proteica de la enzima. La

concentración de azufre fue determinada por espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES) como se indicó en la Sección 2.2.4.2.

En la Figura 7.2 se presenta la secuencia de aminoácidos para la lipasa de *Burkholderia cepacia* [44]. A partir de la misma se identificó la presencia de 2 residuos cisteína y un residuo metionina (cisteína y metionina son los únicos aminoácidos proteínogénicos que contienen azufre), de modo que existen 3 moles de azufre por mol de lipasa.

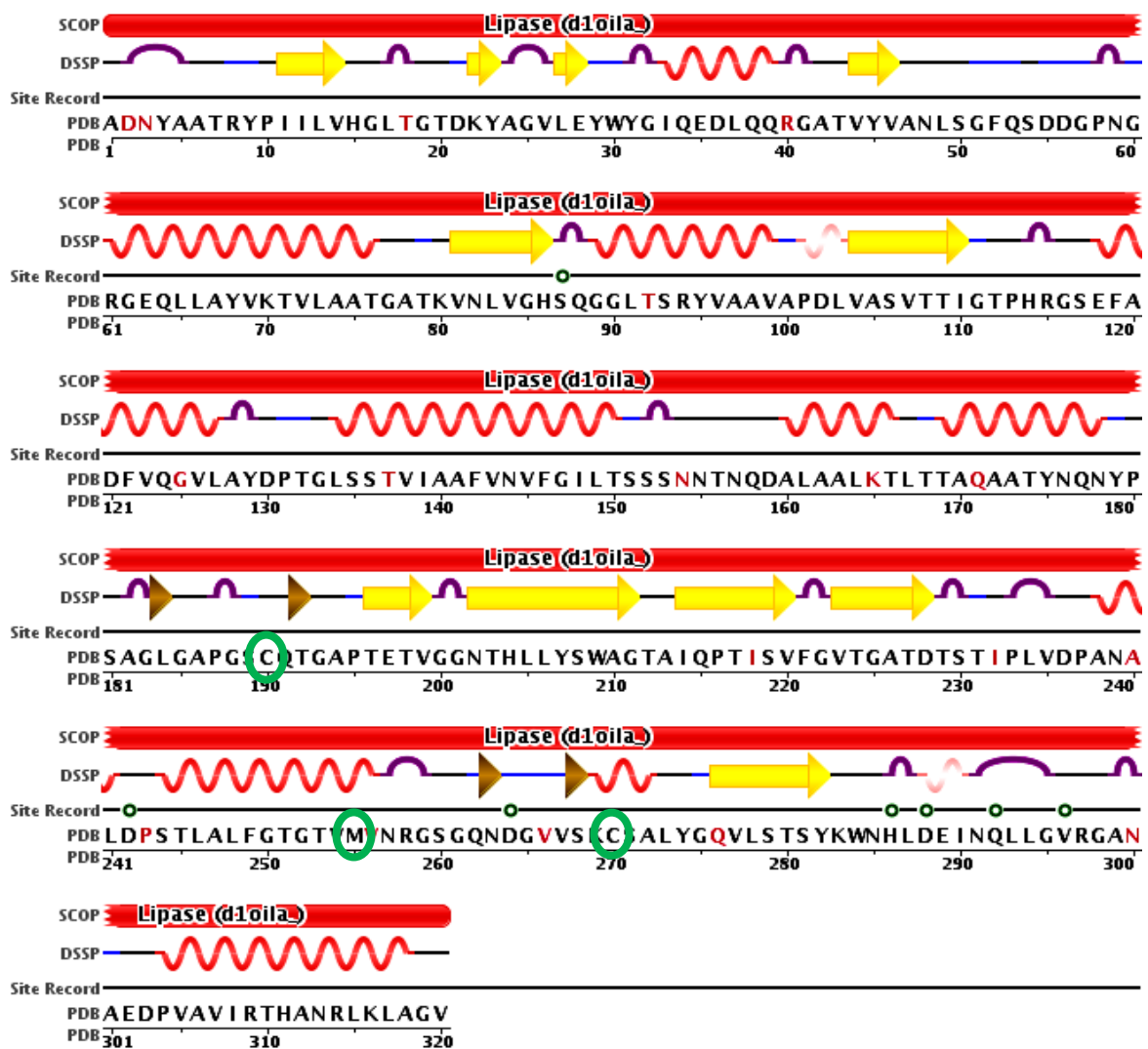


Figura 7.2. Secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Burkholderia cepacia*. La gráfica fue obtenida de *Protein Data Bank (PDB)* [44].

Estudios realizados mediante ICP-AES permitieron determinar que 500 mg de lipasa PS-Amano contienen 0.282 mg de Azufre (S), luego del procedimiento de inmovilización descrito en la sección 2.2.4.1 se recuperaron 0.182 mg de S (Tabla 7.1). Considerando que el peso molecular de BCL es 34.1 KDa [45] fue posible determinar que el proceso de inmovilización se inició con 99.97 mg de lipasa. Luego de finalizar el proceso de inmovilización se recuperaron 64.52 mg de lipasa. De modo que 35.45 mg de lipasa quedaron absorbidos sobre 1000 mg de quitosano. En función a esta información es posible determinar que se obtuvo un biocatalizador con aproximadamente 3.4% en peso de lipasa.

Tabla 7.1. Determinación de azufre por ICP-AES en las distintas etapas de proceso de inmovilización.

Etapas	Azufre (mg)
Inicio	0.282
Final inmovilización	0.182
100 mg en heptano S/L	0.00164
1º Lavado	0.005
2º Lavado	0.005
100 mg heptano C/L	0

S/L = sin lavados, C/L = con lavados

7.3. Lixiviación de la lipasa débilmente adsorbida

En la sección 2.2.4.1.1 se presentó un procedimiento para evaluar el porcentaje de lipasa que se desorbe al emplear la misma en un sistema con *n*-heptano. El análisis por ICP-AES de la solución permitió determinar la presencia de 0.00164 mg de azufre (Tabla 7.1), que corresponden a 0.58 mg de lipasa (un porcentaje de pérdida equivalente al 16.4%).

Con el objetivo de evitar contaminar el producto final con lipasa desorbida se realizaron dos lavados como se indica en 2.2.4.1.2. En el sobrenadante de ambos lavados se detectaron 0.005 mg de azufre que corresponden a 1.77 mg de lipasa cada uno. Por lo que finalmente se obtuvo un biocatalizador conteniendo 31.90 mg, que corresponde a un porcentaje en peso del 3.09%.

Finalmente se llevó a cabo una nueva prueba siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.4.1.1. El sobrenadante fue nuevamente analizado por ICP-AES determinando que el contenido de azufre fue inferior a los límites de detección del equipo de modo que podríamos asumir que no existió pérdida de lipasa luego de retirar la enzima débilmente adsorbida.

7.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia difusa

Se obtuvieron espectros infrarrojos por transformada de Fourier-Reflectancia difusa (DRIFTS) del quitosano, de la lipasa de *Burkholderia cepacia*, y de la lipasa inmovilizada sobre quitosano empleando la metodología indicada en la Sección 2.2.4.3. La radiación medida en el espectro está relacionada con la concentración, pero depende de varias propiedades de la muestra como el tamaño de partícula y la humedad [46]. El aumento en el tamaño de partícula reduce la dispersión de la luz y la radiación penetra más profundamente, con lo cual se produce un desplazamiento en el eje de las ordenadas como función del tamaño de partícula [46]. La presencia de agua provoca la aparición de bandas características y además cambia el índice de refracción del medio variando la dispersión del haz [46]. Es por estas razones que el análisis derivado del espectro es sólo una contribución cualitativa a la determinación de la inmovilización de lipasa.

Las muestras conteniendo lipasa se secaron parcialmente por 15 horas a 45 °C antes de medir el espectro. Este procedimiento de secado es muy suave y por lo tanto es esperable observar la contribución de las moléculas de agua en los espectros. En la región 3600-3400 cm^{-1} se observan las señales de tensión del enlace O-H de la molécula de agua. La muestra conteniendo sólo quitosano se secó a 100 °C por 15 horas para eliminar el contenido de agua.

En la Figura 7.3 se presenta un espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de quitosano [47].

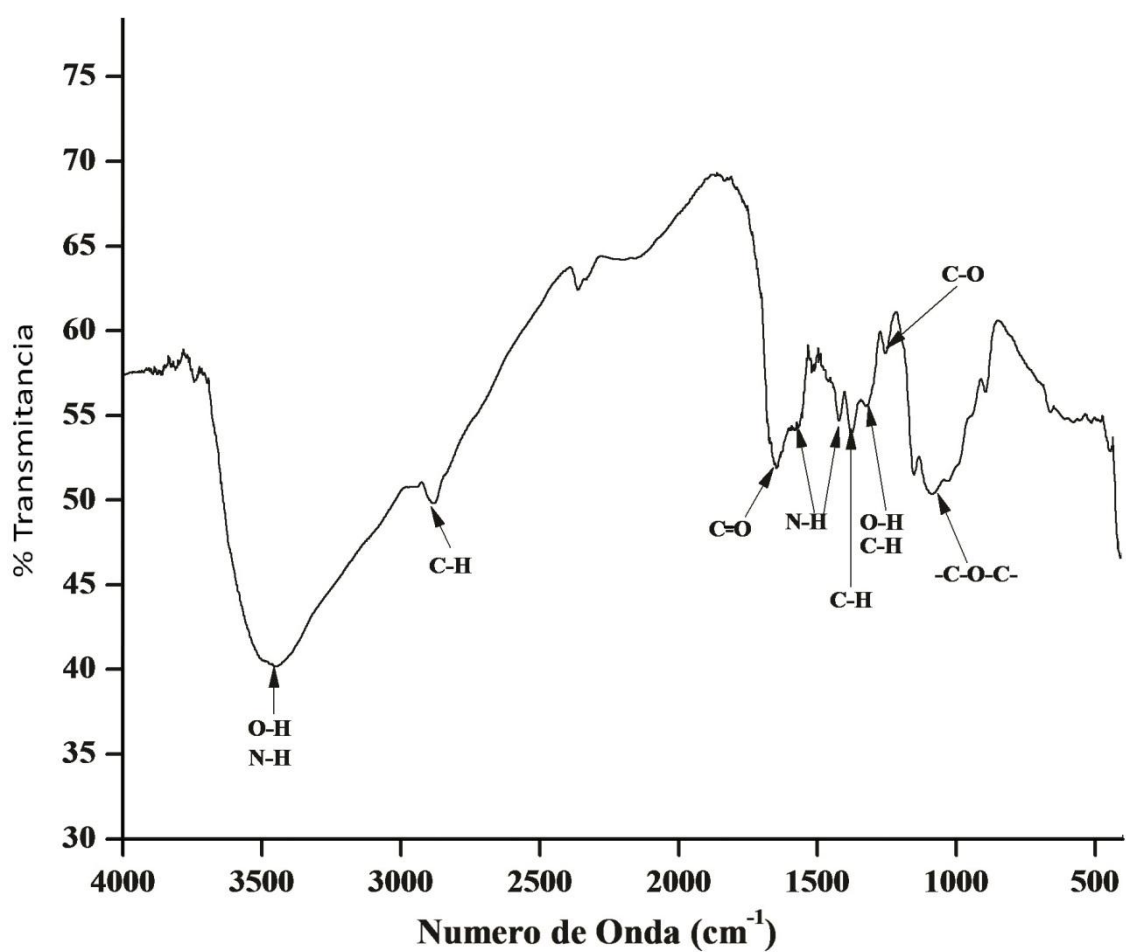


Figura 7.3. Espectro FTIR de quitosano con identificación de las bandas.

En la Figura 7.3 se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano. Se aprecian las bandas correspondientes a los estiramientos O-H y N-H ($3.250\text{--}3.600\text{ cm}^{-1}$), característicos de alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del sólido. En el espectro se observan también bandas del estiramiento C-H a 2842 cm^{-1} y otras originadas por estiramientos C=O y N-H, característicos de grupos amida, entre $1.650\text{--}1.550\text{ cm}^{-1}$. La banda característica a 1645 cm^{-1} se relaciona con el grupo C=O presente en un grupo amida I y la asignada a 1432 cm^{-1} se debe a un grupo amida II. La banda de absorción relativa a deformaciones del grupo amino se observa a 1565 cm^{-1} , mientras que la banda centrada en 1367 cm^{-1} surge de vibraciones del estiramiento del grupo metil (C-H) presente en el grupo acetamida (R-NHCOCH_3) residual, que está allí debido a la desacetilación parcial de la quitina, o debido a grupos O-H unidos a los anillos. La banda observada a 1081 cm^{-1} se debe a la presencia del grupo piranósico.

En la Figura 7.4 se presentan los espectros correspondientes a la lipasa de Burkholderia cepacia y al quitosano, mientras que en la Figura 7.5 se muestran los espectros del quitosano y de la lipasa inmovilizada sobre este sólido.

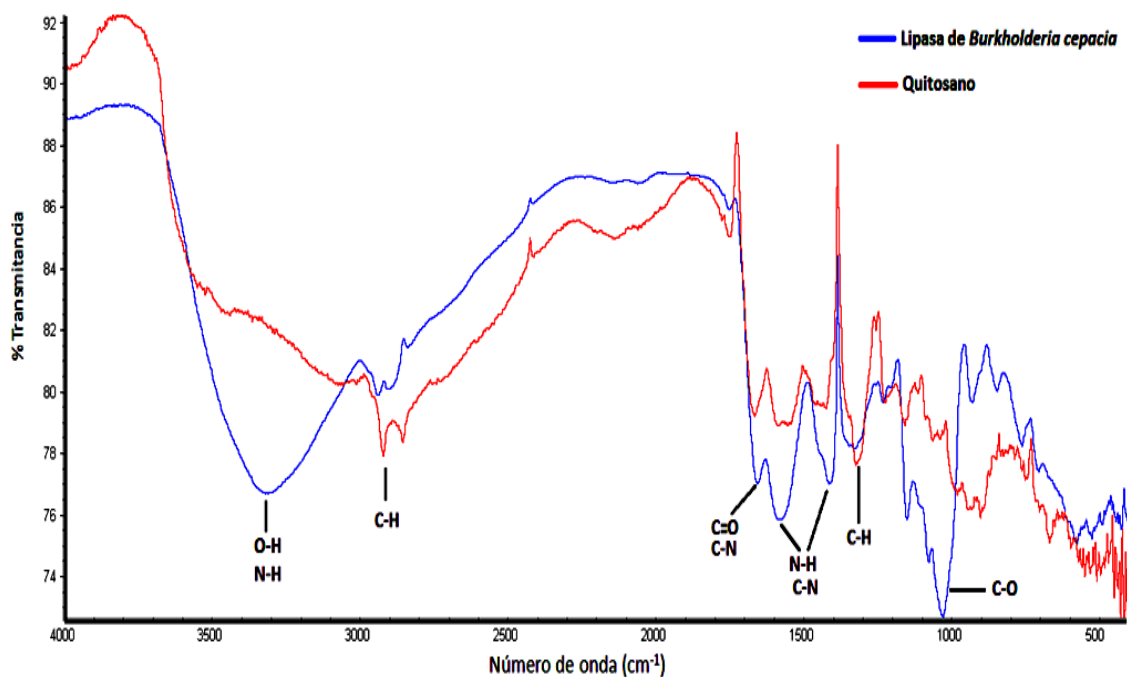


Figura 7.4. Espectros DRIFTS de la lipasa de *Burkholderia cepacia* y del quitosano.

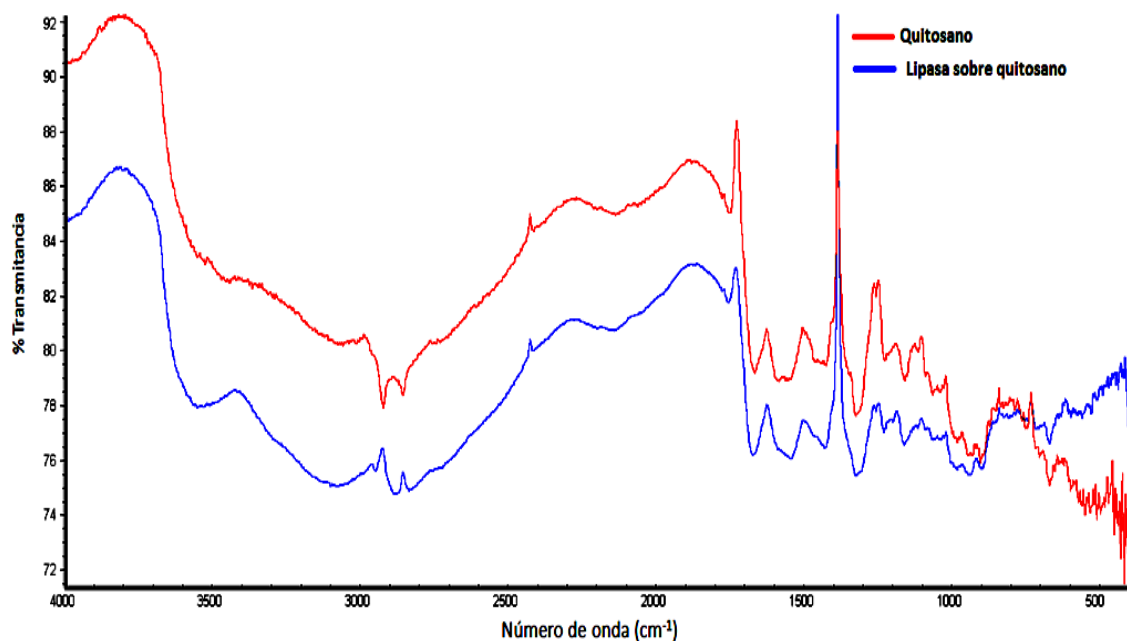


Figura 7.5. Espectros DRIFTS de la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada y del quitosano.

En las Figuras 7.4 y 7.5, a $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ se observan las bandas de amida A y B características de las proteínas y que corresponden con señales de estiramiento de los enlaces N-H de aminas y amidas primarias y secundarias [48], esperables debido a la

presencia de residuos aminacídicos nitrogenados. En la región de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ se pueden observar las señales adjudicadas a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico presentes en el enlace C-H con hibridación sp^3 y sp^2 .

En todos los espectros de muestras conteniendo proteína se pueden observar las bandas características de amida I, II y III. En la banda de amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) sobresale la contribución de los modos vibracionales del estiramiento del grupo carbonilo (C=O) con una mínima contribución de la vibración de estiramiento fuera del plano del enlace C-N, la deformación CCN y el enlace N-H en el plano. La banda de la amida I está afectada fuertemente por la naturaleza de las cadenas laterales y esto depende de la estructura secundaria del esqueleto proteico (α -hélice, β -plegada y estructuras al azar). Por lo tanto, su estudio exhaustivo usando técnicas de ATR y análisis de reducción de ancho de banda y segunda derivada, permite hacer un examen detallado de los cambios en la estructura secundaria de la enzima, y así acercar conclusiones sobre su estabilidad frente a procesos de inmovilización o inactivación térmica [48-50].

En cuanto a la banda de la amida II, se encuentra centrada a 1550 cm^{-1} y corresponde a una combinación de señales de flexión en el plano de N-H y estiramiento de C-N con pequeñas contribuciones de flexión en el plano de C=O y estiramiento C-C y N-C. A diferencia de la banda de amida I, no es sencillo hacer correlaciones entre la estructura y las señales observadas en la deconvolución de los picos [48].

La banda de la amida III ($1400-1200\text{ cm}^{-1}$) es una combinación de la vibración de la flexión de N-H y estiramiento de C-N con pequeña contribuciones de la flexión en el plano de C=O y el estiramiento de C-C. Estas bandas son complejas y no permiten una correlación directa con la estructura de la proteína. Los picos de la banda de amida III se resuelven mejor después de deuteroar porque se elimina el acoplamiento por la vibración de N-H [49].

En los espectros sobresale una banda entre $1300-1450\text{ cm}^{-1}$. La banda puede adjudicarse a la flexión en el grupo $-\text{CH}_2$ adyacente al carbonilo y estiramiento de C-N. Este tipo de grupos pueden estar presentes en algunos residuos de las cadenas laterales de aminoácidos tales como los ácidos glutámico y aspártico, las amidas glutamina y asparagina, fenilalanina y triptófano [48].

En la región de $1260-1000\text{ cm}^{-1}$ se pueden encontrar las señales correspondientes al estiramiento del enlace C-O de alcoholes primarios, secundarios, terciarios y fenólicos. De igual manera las señales observadas en la región de $750-630\text{ cm}^{-1}$ pueden ser asignadas a flexión fuera del plano del enlace O-H de un alcohol [51]. Este tipo de enlaces pueden encontrarse en los aminoácidos serina, treonina y tirosina.

Como puede observarse en las Figuras 7.3, 7.4 y 7.5 las señales características de la lipasa y del quitosano son similares, de modo que la identificación de la enzima sobre este soporte resulta compleja, en especial teniendo en cuenta la baja concentración de proteína inmovilizada.

Si bien la técnica de FTIR no permitió corroborar la presencia de lipasa, los resultados de ICP-AES, y la alta actividad del biocatalizador (como puede verse en la Tabla 7.4), no dejan lugar a duda sobre la presencia de lipasa de *Burkholderia cepacia* sobre quitosano.

7.5. Identificación de productos de reacción

Como producto de la esterificación de 1,3-dicaprina (CGC) con ácido palmítico (P) se espera obtener 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol (CPC), a su vez a partir la fracción menor de 1,2-dicaprina (CCG) presente en el reactivo de partida se esperaría obtener 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol (CCP), luego de la esterificación con ácido palmítico.

Si bien la lipasa inmovilizada fue tratada térmicamente para remover el agua débilmente adsorbida, la reacción de hidrólisis no pudo ser evitada dando lugar a la generación de ácido cáprico (C) y glicerol (GGG). Debido a la existencia de reacciones de hidrólisis y posterior esterificación, en el medio de reacción también fueron identificados otros productos: monopalmitina (GPG y PGG), 1-caproil-2-palmitoil glicerol (CPG), 1-caproil-3-palmitoil glicerol (CGP), tricaprina (CCC), dipalmitina (PPG y PGP) y 1-caproil-2,3-palmitoil (CPP).

Como ya fue discutido en las Secciones 5.6 y 5.7, la columna capilar empleada permite identificar isómeros en función de la posición del grupo hidroxilo, es por ello que ha sido posible identificar y cuantificar isómeros de mono- y diglicéridos pero no así isómeros de triglicéridos.

Un típico cromatograma de los productos de reacción y reactivos sin reaccionar se muestra en la Figura 7.6.

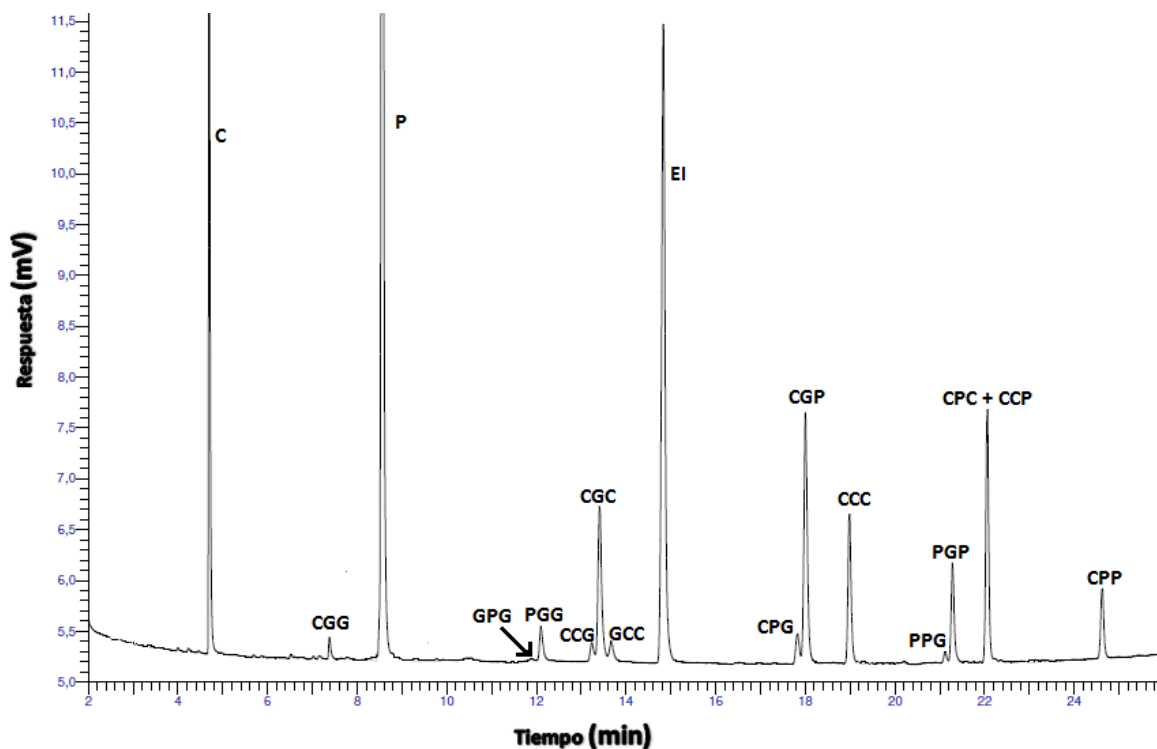


Figura 7.6. Típico cromatograma de los productos de reacción y reactivos no consumidos en la esterificación enzimática de dicaprina y ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia*. EI: patrón de calibración interna. Condiciones experimentales: dicaprina = 50 mg, relación ácido palmítico/dicaprina = 3:1, temperatura = 40 °C y enzima = 150 mg, tiempo de reacción = 6 h.

7.6. Importancia del correcto análisis de muestras

La reacción de hidrólisis permitió la generación de glicerol. Dado que las reacciones se llevaron a cabo en un sistema con solvente orgánico no polar, el polialcohol (altamente polar) tiende a adherirse sobre el biocatalizador o sobre las paredes del vial de reacción.

Tal como se destacó en el Capítulo 6, el uso de un solvente que permita solubilizar ácidos grasos, acilglicéridos y glicerol es necesario para un adecuado análisis de las muestras.

En la Figura 7.7 se presentan dos cromatogramas donde se compara una toma de muestra directa del vial de reacción con una muestra solubilizada en piridina.

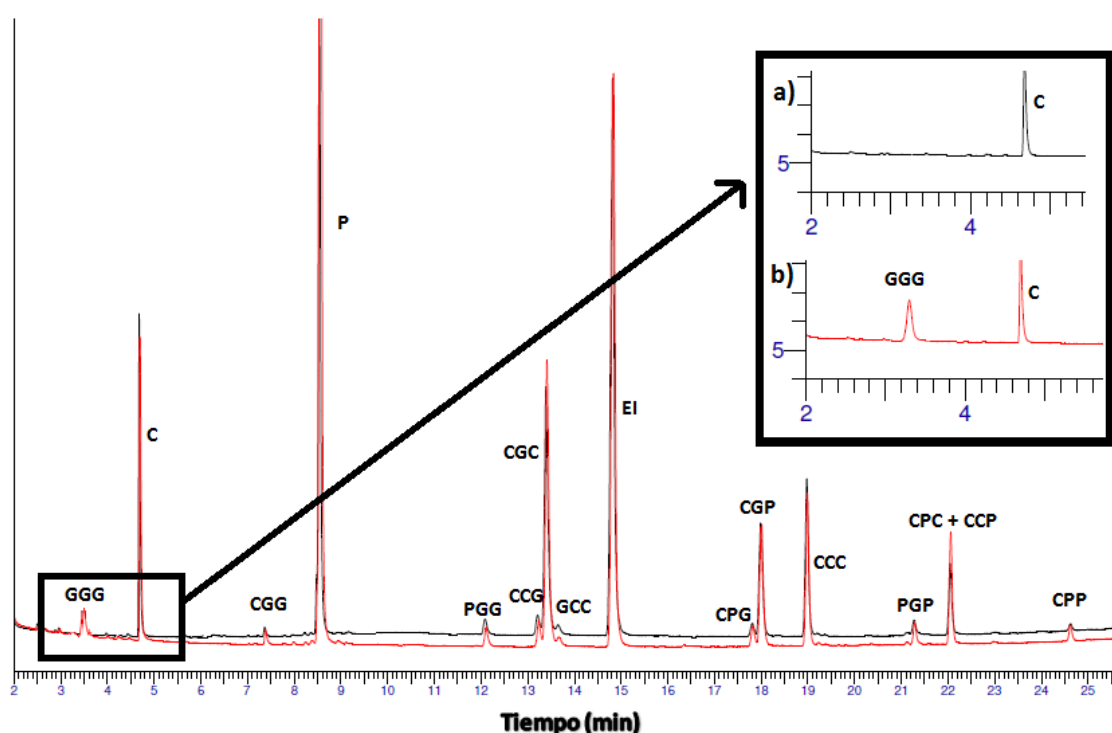


Figura 7.7. Cromatogramas de una muestra extraída directamente del sistema de reacción (Negro) y una muestra extraída luego del agregado de piridina (Rojo). En el recuadro se amplía la región donde se observa la elución de glicerol.

7.7. Efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas y modelos de ajuste

Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones indicadas en la Sección 2.2.4.5

Los factores experimentales y respuestas obtenidas correspondientes a mediciones realizadas a 6 h de reacción se dan en la Tabla 7.2, 7.3 y 7.4. Se llevó a cabo un análisis detallado de las tendencias y correlaciones entre factores y respuestas. Los resultados

de los modelos obtenidos para cada respuesta se analizan en detalle en los apartados siguientes. Modelos de segundo orden permitieron obtener un buen ajuste de los datos experimentales. Los mismos fueron refinados aplicando la prueba del valor-F, también llamada test de Fisher o Fisher-Snedecor detallada previamente en la sección 3.5.

El modelo de ajuste cuadrático que contiene todas las variables y combinaciones de las mismas está representado por la Ecuación 7.1.

$$X_{Ac} = A_0 + A_1L + A_2T + A_3R_M + A_4LT + A_5LR_M + A_6TR_M + A_7L^2 + A_8T^2 + A_9R_M^2 \quad (7.1)$$

Donde **L** es masa de lipasa inmovilizada, **T** la temperatura de reacción y **R_M** la relación molar P/Dicaprina.

Tabla 7.2. Factores experimentales establecidos y reactivos consumidos durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

Ensayo Nº	Factores experimentales			Reactivos consumidos (µmoles)			
	L (mg)	T (°C)	R _M (mol/mol)	CCG	CGC	P	CGG ^a
1	150	60	1	11.20	54.74	39.95	0.24
2	50	60	3	17.77	49.10	37.74	0.00
3	50	60	1	13.73	38.26	31.32	0.20
4	150	40	1	10.33	52.52	47.48	0.24
5	50	40	3	13.71	31.50	38.32	-0.22
6	150	60	3	14.83	56.50	62.85	0.81
7	100	50	2	10.79	46.68	50.62	0.18
8	150	40	3	12.62	44.5	66.70	0.51
9	100	50	2	10.92	47.80	49.60	0.19
10	50	40	1	11.44	34.82	35.12	-0.30

^a Los valores negativos indican que en la reacción se generó 1-monocaprina

Tabla 7.3. Factores experimentales establecidos y productos generados durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

Ensayo Nº	Factores experimentales			Productos generados (µmoles)										
	L (mg)	T (°C)	R _M (mol/mol)	GGG	C	PGG+GPG	GCC ^a	CPG+CGP	CCC	PGP + PPG	CPC + CCP	CPP		
1	150	60	1	25.33	65.35	1.91	-0.88	10.45	6.74	2.50	17.65	2.45		
2	50	60	3	27.85	73.95	2.50	0.45	12.58	3.60	1.62	17.18	1.09		
3	50	60	1	11.57	29.50	2.17	0.42	10.18	11.01	1.16	14.98	0.71		
4	150	40	1	17.66	57.24	2.35	0.13	13.40	3.65	3.08	20.74	2.38		
5	50	40	3	3.18	22.28	2.44	-0.07	13.44	6.71	1.71	16.23	1.35		
6	150	60	3	13.96	57.75	2.88	0.14	14.66	7.21	5.79	21.33	6.18		
7	100	50	2	12.13	55.35	2.87	0.52	16.24	1.32	3.87	17.79	2.92		
8	150	40	3	0.00	37.53	3.59	1.47	19.08	3.31	5.69	22.82	4.74		
9	100	50	2	13.76	58.02	2.95	0.57	16.96	1.19	3.84	16.96	2.68		
10	50	40	1	5.14	24.82	2.30	0.27	13.36	8.25	1.93	14.07	0.63		

^a Los valores negativos indican que en la reacción se consumió 2,3-dicaprina

Tabla 7.4. Factores experimentales establecidos y parámetros evaluados durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

Ensayo Nº	Factores experimentales			Conversión (%)		Selectividad (%)	Rendimiento (%)
	L (mg)	T (°C)	R _M (mol/mol)	CCG	CGC	CPC + CCP	CPC + CCP
1	150	60	1	85	86	27	22.62
2	50	60	3	88	65	26	17.78
3	50	60	1	79	58	29	17.98
4	150	40	1	78	77	33	25.26
5	50	40	3	87	48	36	19.90
6	150	60	3	94	87	30	26.14
7	100	50	2	89	78	31	24.53
8	150	40	3	91	80	38	31.06
9	100	50	2	90	80	29	23.39
10	50	40	1	87	52	30	17.47

7.7.1. Reactivos consumidos

7.7.1.1. Conversión de 1,3-dicaprina

Como se mencionó anteriormente, este diglicérido es consumido por dos vías, por un lado la esterificación de la posición sn-2 que permitió la generación del triglicérido estructurado deseado y por otro lado la reacción de hidrólisis que llevó a la obtención de monocaprina, ácido cáprico e incluso glicerol.

El incremento de todas las variables favoreció la conversión de 1,3-dicaprina (X_{CGC}), sin embargo el efecto del aumento de la relación molar fue prácticamente insignificante sobre esta respuesta. Los valores de conversión para 1,3-dicaprina estuvieron entre 48% y 87%.

Si bien para todas las respuestas fue planteado un modelo como el representado por la Ec. 7.1, luego de realizar regresión múltiple y aplicar la prueba del valor-F se obtuvo un

modelo simple en el que todas las variables resultaron estadísticamente significativas.

El mismo permitió explicar el 97.50% de los cambios observados en la conversión de 1,3-dicaprina y está representado por la Ecuación 7.2.

$$X_{CGC} = -11.6 + 1.06L + 0.488T - 0.00395L^2 \quad (7.2)$$

En la Figura 7.8 se presenta un gráfico de superficie de respuesta obtenido mediante la Ec. 7.2.

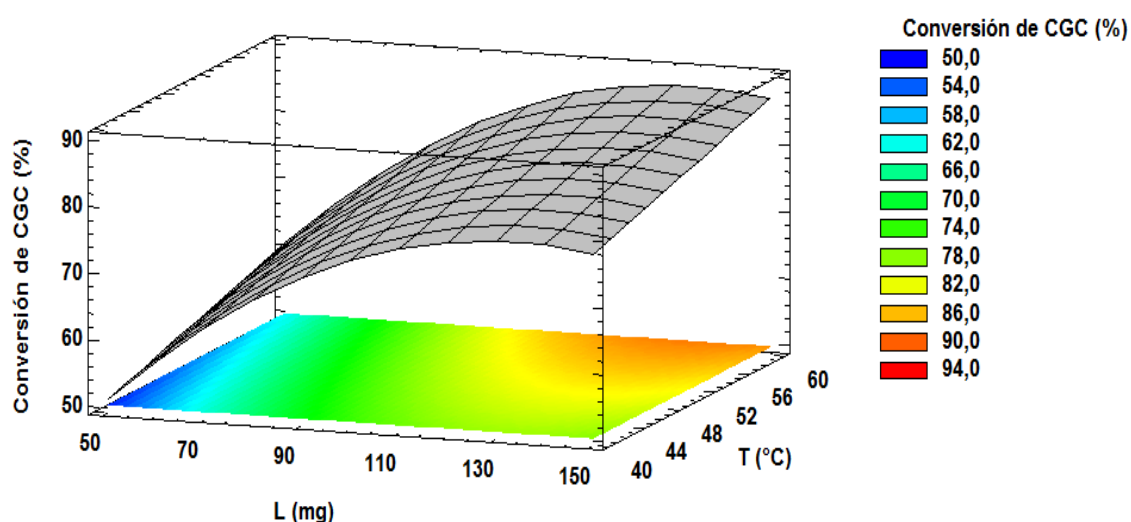


Figura 7.8. Conversión de CGC al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. Variables: masa de biocatalizador y temperatura de reacción, relación molar P/Dicaprina = 3:1.

7.7.1.2. Conversión de 1,2-dicaprina

En las condiciones óptimas encontradas para la síntesis de 1,3-dicaprina, en el Capítulo 3, la relación 1,3-dicaprina/1,2(2,3)-dicaprina en el producto es 9:1. Sin embargo, en el proceso de separación el diglicérido perdido es mayoritariamente 1,3-dicaprina (verificado por cromatografía gaseosa), por lo cual la fracción de 1,2-DAG al inicio de esta etapa es mayor, tal como se indicó en la Sección 2.2.4.4.

La esterificación de la posición sn-3 con ácido palmítico probablemente resulte más simple que la esterificación de la posición sn-2, de modo que se espera que este diglicérido se consuma mayormente para generar 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol y en menor proporción debido a la hidrólisis de la posición sn-1 para generar monocaprina.

La conversión de este diglicérido (X_{CCG}) se vio afectada positivamente por el incremento de todas las variables estudiadas. El aumento en el valor de los factores podría favorecer la reacción de esterificación, la hidrólisis o ambas. Sin embargo a bajas temperaturas la conversión de 1,2-dicaprina si vió desfavorecida por el incremento de la masa de biocatalizador, probablemente la conversión no sea menor con el aumento del dosaje de lipasa, sino que este diglicérido puede generarse por migración de acilos a partir de 1,3-dicaprina. Los valores de conversión de 1,2-dicaprina variaron entre 78% y 94%.

Aplicando regresión múltiple y el test de Fisher fue obtenido un modelo de segundo orden en L que permitió explicar 89.75% de la variabilidad en la conversión de 1,2-dicaprina (en función del estadístico R^2). La Ecuación 7.3 representa dicho modelo de ajuste.

$$X_{CCG} = 94.5 - 0.00129L^2 - 0.436T + 0.00433TL + 0.0203TR_M + 0.0294LR_M \quad (7.3)$$

En la Figura 7.9 se presentan gráficos de superficie de respuesta que muestran el comportamiento de esta respuesta en función de los factores estudiados. En el gráfico mostrado en la Figura 7.9.a se representan la conversión de 1,2-dicaprina luego de 6 horas de reacción empleando 100 mg de lipasa inmovilizada en función de la

temperatura y la relación P/Dicaprina. En la Figura 7.9.b la misma respuesta se presenta en función de la masa de biocatalizador y de la temperatura para una relación P/Dicaprina = 3:1.

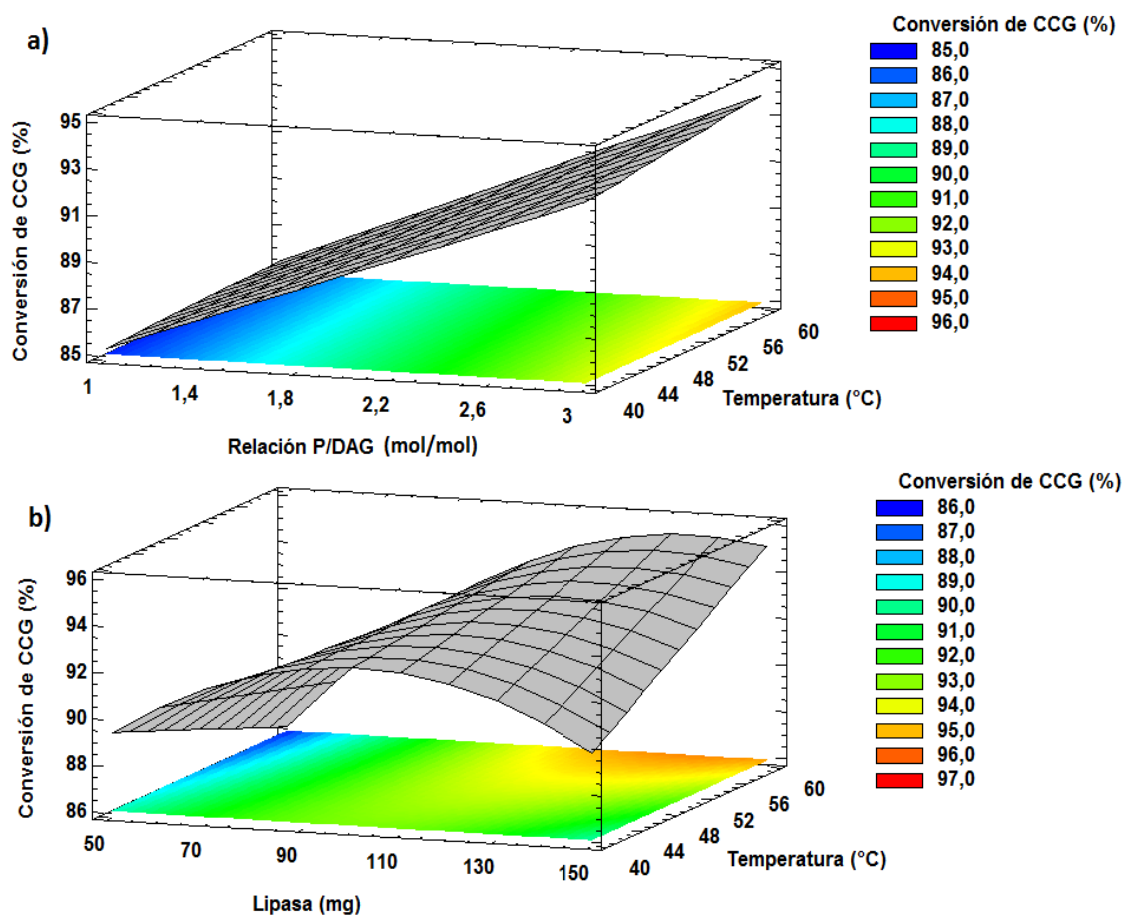


Figura 7.9. Conversión de CCG al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

7.7.1.3. Conversión de ácido Palmítico

En el sistema de reacción en estudio el ácido palmítico se consumió no sólo para dar los productos teóricamente esperados (1,3-dicaproil-2-pamitoil glicerol y en menor proporción 1,2-dicaproil-3-palmitoiliglicerol) sino que debido a la reacción de hidrólisis y posterior esterificación este ácido reaccionó para dar otros productos tales como

monopalmitina, dipalmitina, 1-caproil-2-palmitoil glicerol, 1-caproil-3-palmitoil glicerol y 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol.

La relación molar de ácido palmítico respecto a dicaprina (P/Dicaprina) se varió entre 1:1 y 3:1 con el objetivo de evaluar la influencia de este parámetro sobre el rendimiento al triglicérido estructurado deseado.

El incremento en el contenido de lipasa inmovilizada y de la relación ácido palmítico/dicaprina favorecieron la conversión de ácido palmítico. Al parecer ambos factores tuvieron impacto positivo sobre la reacción de esterificación. El aumento de la temperatura mostró un efecto negativo sobre el consumo de este ácido durante la reacción, aunque esta última variable tuvo baja incidencia sobre la respuesta aquí estudiada. Probablemente la reacción de hidrólisis sea más favorecida por el incremento de la temperatura que la esterificación.

La Ecuación 7.4 se obtuvo luego de realizar regresión múltiple y eliminación de variables paso a paso, este modelo sencillo de segundo orden respecto a la masa de biocatalizador permitió explicar el 99.02% de los cambios observados en los micromoles de ácido palmítico consumidos luego de 6 horas de reacción. Gráficos de superficie de respuesta empleando el modelo generado son presentados en la Figura 7.10.

$$P = 6.23 - 0.00268L^2 + 0.682L - 0.00193LT + 0.0680LR_M \quad (7.4)$$

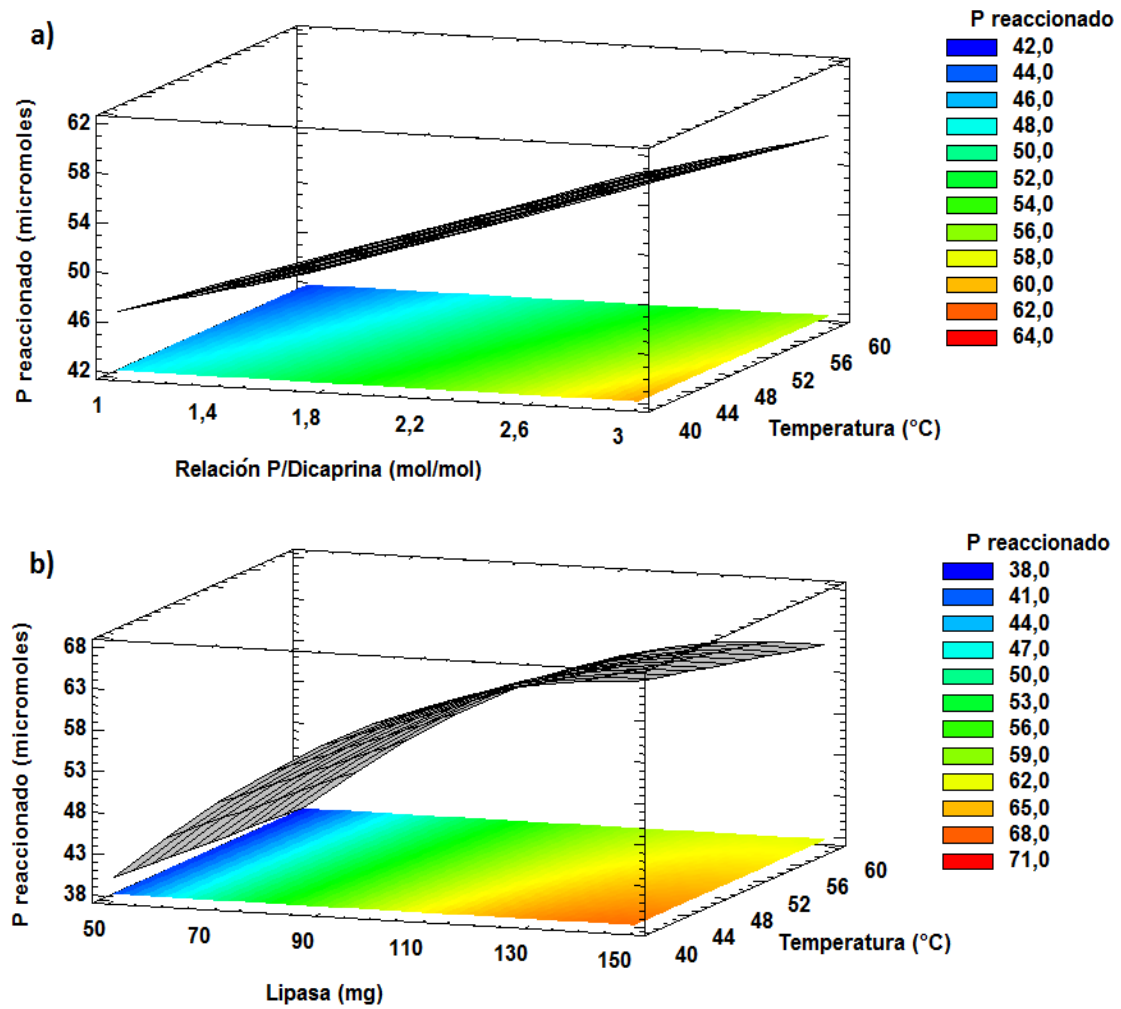


Figura 7.10. Consumo de ácido palmítico al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

7.7.1.4. Reactividad de 1-monocaprina

Una baja proporción de monocaprina está presente en el sustrato de partido. La misma se generó durante la síntesis estudiada en el Capítulo 3 y no fue completamente removida en la etapa de purificación presentada en el Capítulo 4.

Como puede verse en la Tabla 7.2 los cambios en los micromoles de monocaprina han sido mínimos, probablemente este monoglicérido se genere por hidrólisis de 1,2/1,3-dicaprina pero luego sea rápidamente esterificado y es por ello que prácticamente no se detectaron variaciones a las 6 horas de reacción.

Cuando la síntesis fue llevada a cabo a bajas temperaturas, baja relación ácido palmítico/dicaprina y bajo contenido de biocatalizador, se generó 1-monocaprina. En estas condiciones la velocidad de la reacción de esterificación se reduce. En las restantes condiciones ensayadas la velocidad de esta reacción es mayor y el monoglicérido es consumido (los valores negativos de monocaprina presentados en la Tabla 7.2 indican que el monoglicérido fue generado y no consumido).

Los cambios en los micromoles de 1-monocaprina fueron ajustados por regresión lineal múltiple y posterior eliminación de las variables estadísticamente no significativas. Se obtuvo un modelo lineal simple que permitió explicar el 93.03% de la variabilidad de esta respuesta (en función del R^2), tal modelo es representado por la Ecuación 7.5.

$$CCG = -0.632 + 0.0128T - 0.170R_M + 0.00260LR_M \quad (7.5)$$

En la Figura 7.11 se presentan gráficos de superficie para los cambios en el número de micromoles de 1-monocaprina en función de los factores estudiados, en la Figura 7.11.a se muestra la variación de esta respuesta luego de 6 horas de reacción empleando 100 mg de biocatalizador mientras que en la Figura 7.11.b puede observarse la respuesta de esta variable a los cambios en la masa de biocatalizador y la temperatura para una relación P/Dicaprina = 3:1.

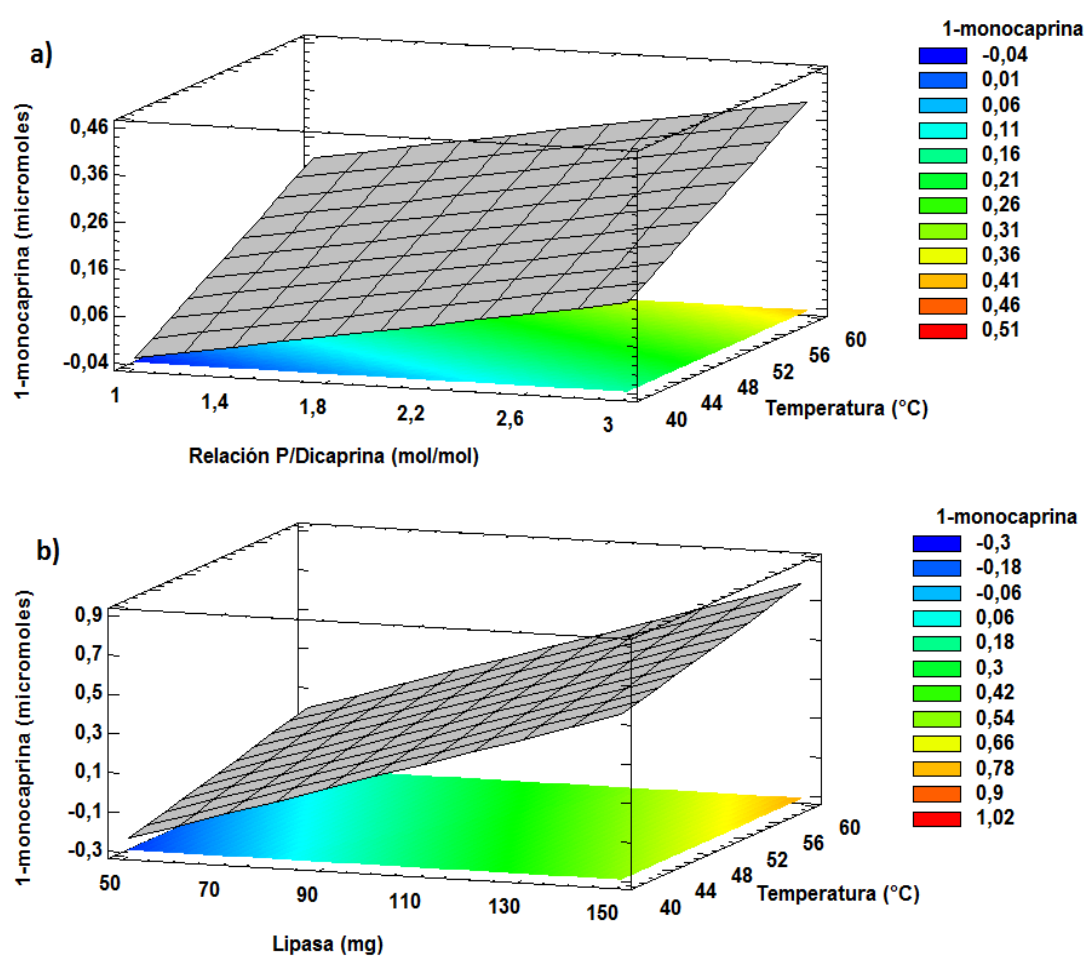


Figura 7.11. Variación en el número de micromoles de 1-monocaprina al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación P/Dicaprina = 3:1.

7.7.2. Productos generados por hidrólisis

7.7.2.1. Formación de ácido cáprico

Durante la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmítico una reacción secundaria, y no menor, tuvo lugar. Si bien el sistema de reacción no contiene agua, la reacción de hidrólisis ha sido importante en durante este estudio, aún cuando el agua débilmente adsorbida ha sido removida del biocatalizador con la metodología indicada en la Sección 2.2.4.1. El agua contenida en la lipasa inmovilizada, fundamental para conservar su actividad, podría permitir que la reacción de hidrólisis ocurra. Por otro lado la esterificación genera agua como producto.

Esta reacción no deseada, que tuvo lugar al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano, puede ser evaluada en función de la generación de ácido cáprico.

El incremento de la temperatura y de la masa de lipasa inmovilizada tuvieron un efecto positivo sobre la formación de ácido cáprico, mientras que elevar la relación ácido palmítico/dicaprina impactó negativamente sobre esta respuesta. El aumento del contenido de ácido palmítico inicial parece favorecer la reacción de esterificación y minimizar la hidrólisis, como era de esperar.

Se obtuvo un modelo simple de segundo orden en la relación ácido palmítico/diglicérido luego de eliminar las variables estadísticamente no significativas del modelo representado por la Ec. 7.1. El mismo está representado por la Ecuación

7.6 y permitió explicar el 93.23% de los cambios observados en esta respuesta (en función del estadístico R^2). Los gráficos de superficie presentados en la Figura 7.12 muestran el efecto de las variables sobre la respuesta estudiada de acuerdo al ajuste realizado por la Ecuación 7.6.

$$C = -24.8 + 0.833L - 6.26R_M^2 - 0.164R_M L + 0.862R_M T - 0.00672LT \quad (7.6)$$

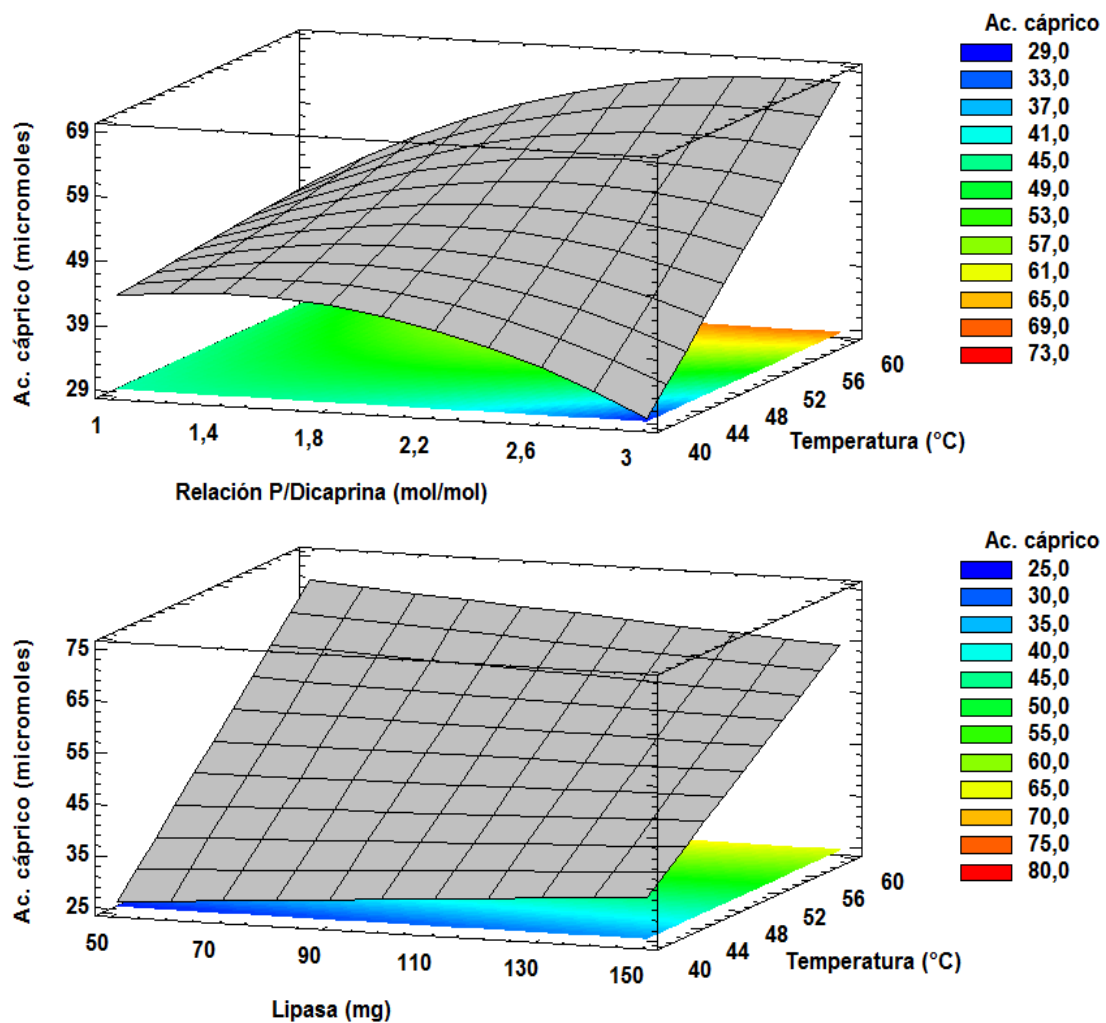


Figura 7.12. Ácido cáprico generado por hidrólisis durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

7.7.2.2. Formación de Glicerol

La generación de glicerol es un claro indicio de lo importante que ha sido la reacción de hidrólisis, sin embargo como se indicó en la sección 7.6 la detección de este polialcohol requiere de una correcta preparación de la muestra.

Al igual que en la generación de ácido cáprico, el incremento de la temperatura y del contenido de lipasa inmovilizada favorecieron la reacción de hidrólisis y en este caso la síntesis de glicerol. Sin embargo, cuando el contenido inicial de ácido palmítico fue elevado la formación de glicerol no aumentó con el incremento del dosaje de biocatalizador. Probablemente el glicerol generado sea reesterificado debido a la alta concentración de P. Finalmente, el aumento en el contenido de ácido palmítico permitió reducir la generación del polialcohol. Como se indicó anteriormente una alta proporción de ácido palmítico inicial pareciera favorecer la reacción de esterificación frente a la hidrólisis.

La Ecuación 7.7 fue obtenida por regresión múltiple y refinada mediante eliminación de las variables estadísticamente no significativas, la misma permitió explicar el 95.76% de los cambios en los moles de glicerol generado (en función al R^2).

$$GGG = -7.24 + 0.240L - 7.25R_M - 0.108LR_M + 0.325TR_M \quad (7.7)$$

En la Figura 7.13 se presentan gráficos de superficie que muestran el comportamiento de la respuesta en estudio en función de las variables analizadas. En la gráfica a se muestra el comportamiento de esta respuesta en función de la relación ácido palmítico/dicaprina y la temperatura cuando la reacción de esterificación fue llevada a

cabo empleando 100 mg de lipasa inmovilizada como catalizador, y en la Figuras 7.13.b y 7.13.c se representa la generación de glicerol en función de la masa de biocatalizador y la temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 1:1 y 3:1 respectivamente.

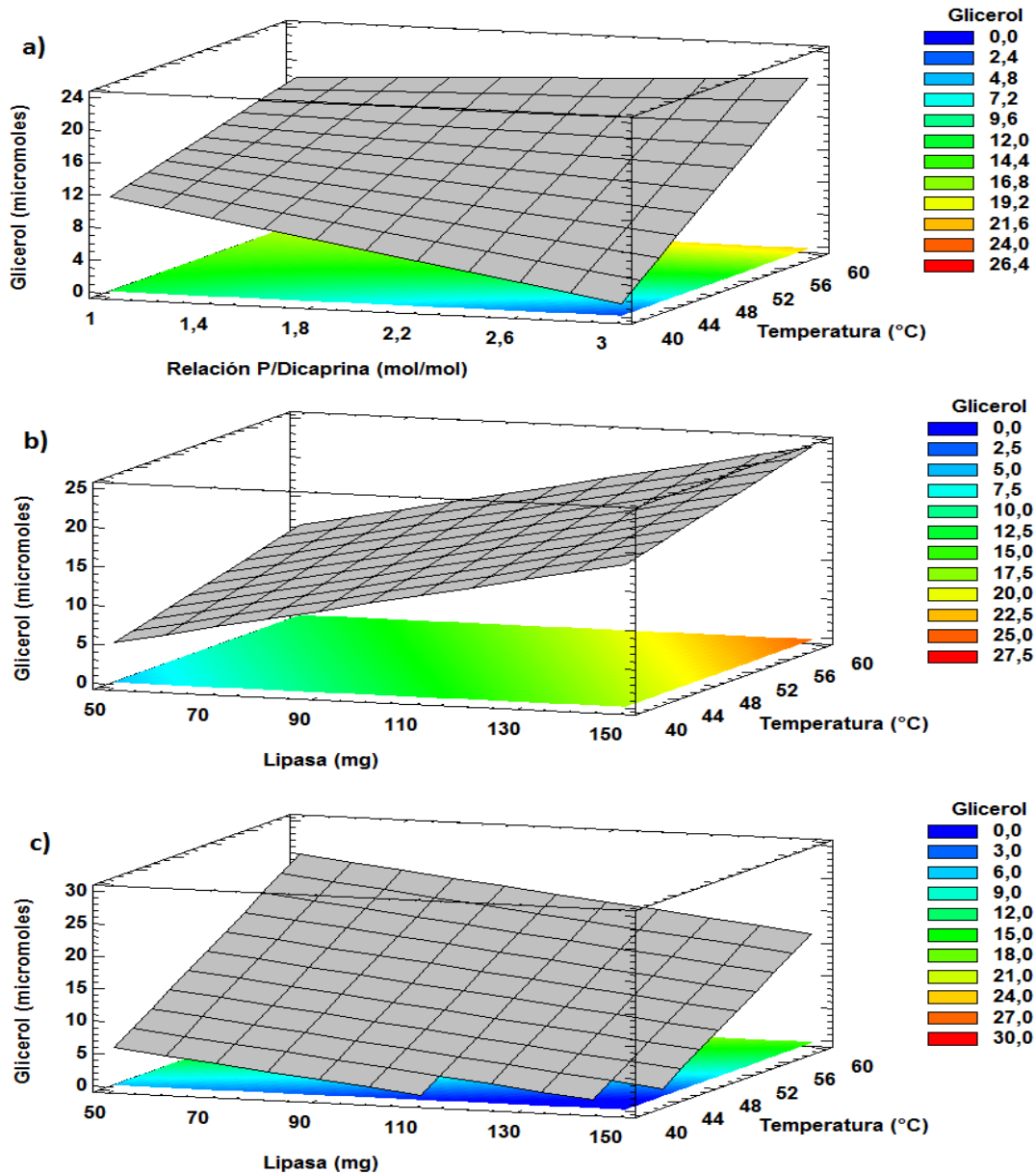


Figura 7.13. Generación de glicerol por hidrólisis durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 1:1 y c) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

7.7.3. Productos generados a partir de hidrólisis y posterior esterificación

7.7.3.1. Generación de monopalmitina

Luego de la hidrólisis de dicaprina y generación de glicerol, este último es esterificado con ácido palmítico para generar monopalmitina, mayoritariamente 1-monopalmitina y en menor proporción 2-monopalmitina (monoglicéridos no mostrados individualmente en Tabla 7.3).

La generación de este monoglicérido se vio afectada positivamente por el incremento en la relación ácido palmítico/dicaprina y por el incremento del dosaje de lipasa inmovilizada. El incremento de la temperatura tuvo un impacto negativo sobre la síntesis de monopalmitina. Como se mencionó anteriormente, esta variable presentó un efecto muy importante sobre la reacción de hidrólisis, lo que explicaría este comportamiento.

El efecto de las variables seleccionadas sobre la formación de monopalmitina se ajustó por regresión múltiple y posterior eliminación por pasos. Se obtuvo así un modelo de segundo orden en la relación molar que permitió explicar el 94.57% de los cambios observados en esta respuesta (en función al estadístico R^2). Tal modelo es representado por la Ecuación 7.8, gráficos de superficie de respuesta obtenidos a partir de la misma son presentados en la Figura 7.14.

$$\text{Monopalmitina} = 1.38 - 0.392R_M^2 + 1.40R_M - 0.000142LT + 0.00503LR_M \quad (7.8)$$

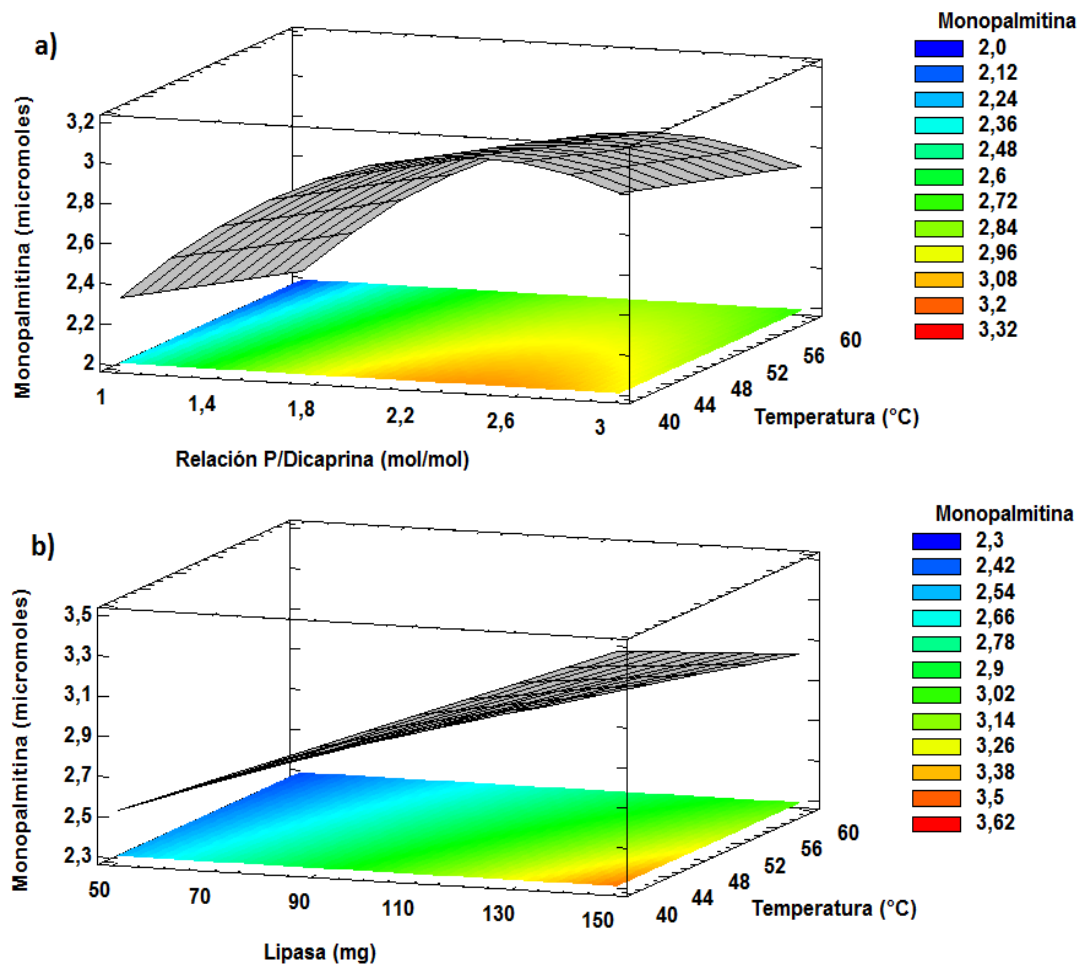


Figura 7.14. Formación de monopalmitina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar fija 3:1.

7.7.3.2. Generación de diglicéridos formados por ácido cáprico y ácido palmítico

La reacción de hidrólisis, que ocurrió principalmente en posición sn-3, permitió la generación de 1-monocaprina. Posiblemente el monoglicérido pudo haber sido rápidamente esterificado con ácido palmítico en posición sn-3 dando lugar a la obtención de 1-caproil-3-palmitoil glicerol (CGP), en especial cuando la síntesis se llevó a cabo con altas concentraciones del ácido.

También fue obtenido otro diglicérido combinando ácido cáprico y palmítico en el esqueleto de glicerol, 1-caproil-2-palmitoil glicerol (CPG). El mismo pudo haberse generado a partir de la esterificación con ácido palmítico de la posición sn-2 de 1-monocaprina, o bien a través de la hidrólisis de la posición sn-3 del triglicérido estructurado deseado. En esta sección ambos diglicéridos han sido cuantificados en forma conjunta.

El incremento de la relación ácido palmítico/dicaprina y del contenido de biocatalizador propiciaron la síntesis de estos diglicéridos, ambos factores favorecieron la reacción de esterificación de P, coincidiendo con lo antes reportado. Por otro lado, el aumento de la temperatura impactó negativamente sobre esta respuesta, mostrando nuevamente que temperaturas elevadas producen un incremento importante de la velocidad de la reacción de hidrólisis.

Estos diglicéridos son unos de los productos obtenidos en mayor proporción durante el presente estudio (sin considerar los productos de hidrólisis pura que pueden ser fácilmente removidos luego de finalizar la reacción).

Un modelo de segundo orden en la masa de biocatalizador fue obtenido por regresión múltiple y refinado eliminando variables sin efectos estadísticamente significativos, el mismo permitió explicar el 95.93% de los cambios observados en estos diglicéridos (Ecuación 7.9). Gráficos de superficie de respuesta para este modelo se presentan en la Figura 7.15.

$$\text{CPG} + \text{CGP} = 1.77 - 0.00128L^2 + 0.310L - 0.00131LT + 0.0161LR_M \quad (7.9)$$

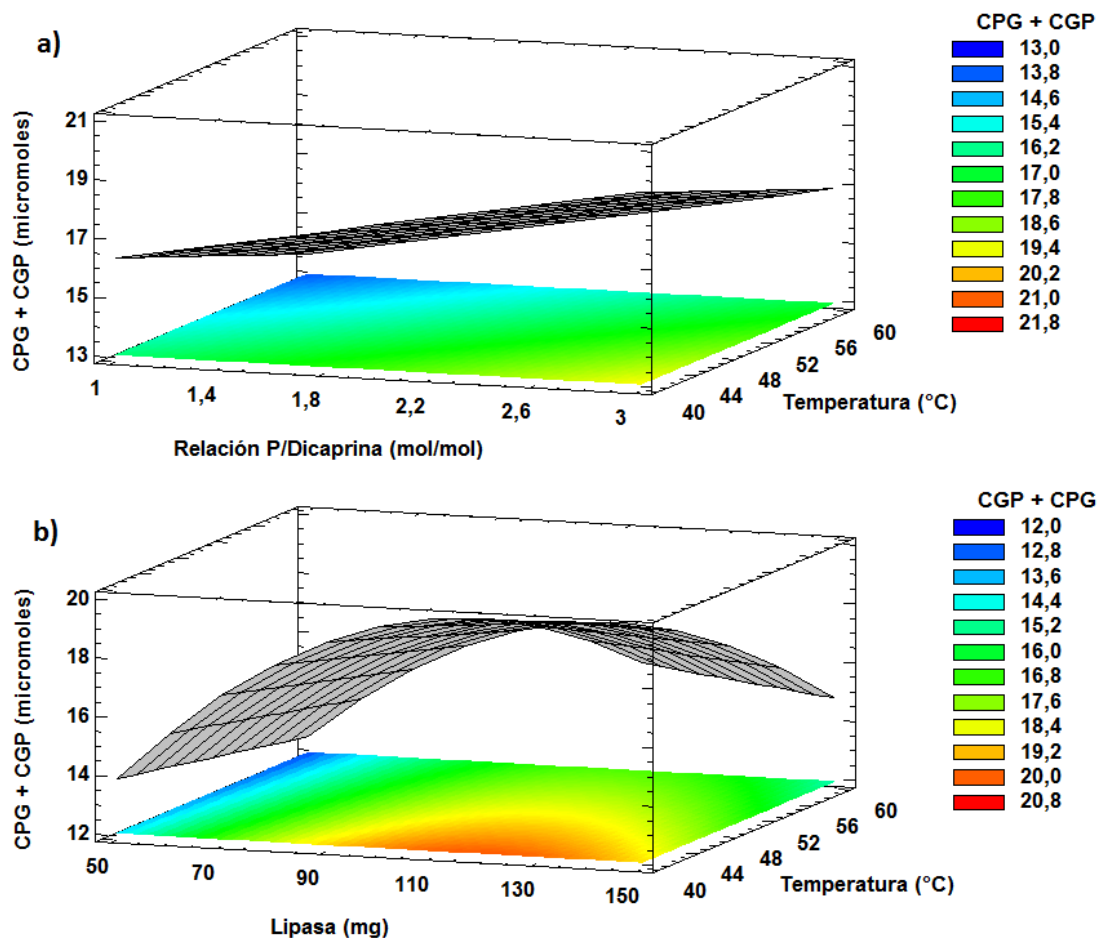


Figura 7.15. Generación de 1-caproil-3-palmitoil glicerol + 1-caproil-2-palmitoil glicerol durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación dicaprina:ácido palmítico y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

7.7.3.3. Generación de dipalmitina

La formación de dipalmitina podría atribuirse a la esterificación de glicerol (generado por hidrólisis de dicaprina) con ácido palmítico. Como se muestra en la Figura 7.6 se obtuvo mayoritariamente 1,3-dipalmitina y en menor proporción 1,2-dipalmitina.

El incremento de la masa de biocatalizador y de la relación ácido palmítico/dicaprina favorecieron la generación de este diglicérido, mientras que la temperatura influyó

negativamente sobre esta respuesta, aunque el efecto de esta última variable no fue significativo excepto cuando la relación molar de ácido palmítico a sustrato fue baja.

La Ecuación 7.10 fue obtenida luego de realizar una regresión lineal múltiple y sólo variables con efectos significativos estadísticamente fueron consideradas. Este modelo permitió explicar el 99.93% de los cambios en esta respuesta (evaluación hecha en función del R^2).

$$\text{Dipalmitina} = 1.35 - 0,000368L^2 + 0.0719L - 0.05075T - 1.50R_M + 0.0142LR_M + 0.0170TR_M \quad (7.10)$$

Gráficos de superficie de respuesta obtenidos a partir del modelo generado se muestran en la Figura 7.16. En el gráfico presentado en la Figura 7.16.a se muestra la formación de dipalmitina en función de la relación ácido palmítico/dicaprina y de la temperatura cuando se lleva a cabo la reacción empleando 100 mg de lipasa inmovilizada, mientras que en la Figura 7.16.b se representa la generación en función de la masa de biocatalizador y de la temperatura cuando la reacción se lleva a cabo con la mayor proporción de ácido palmítico ensayado.

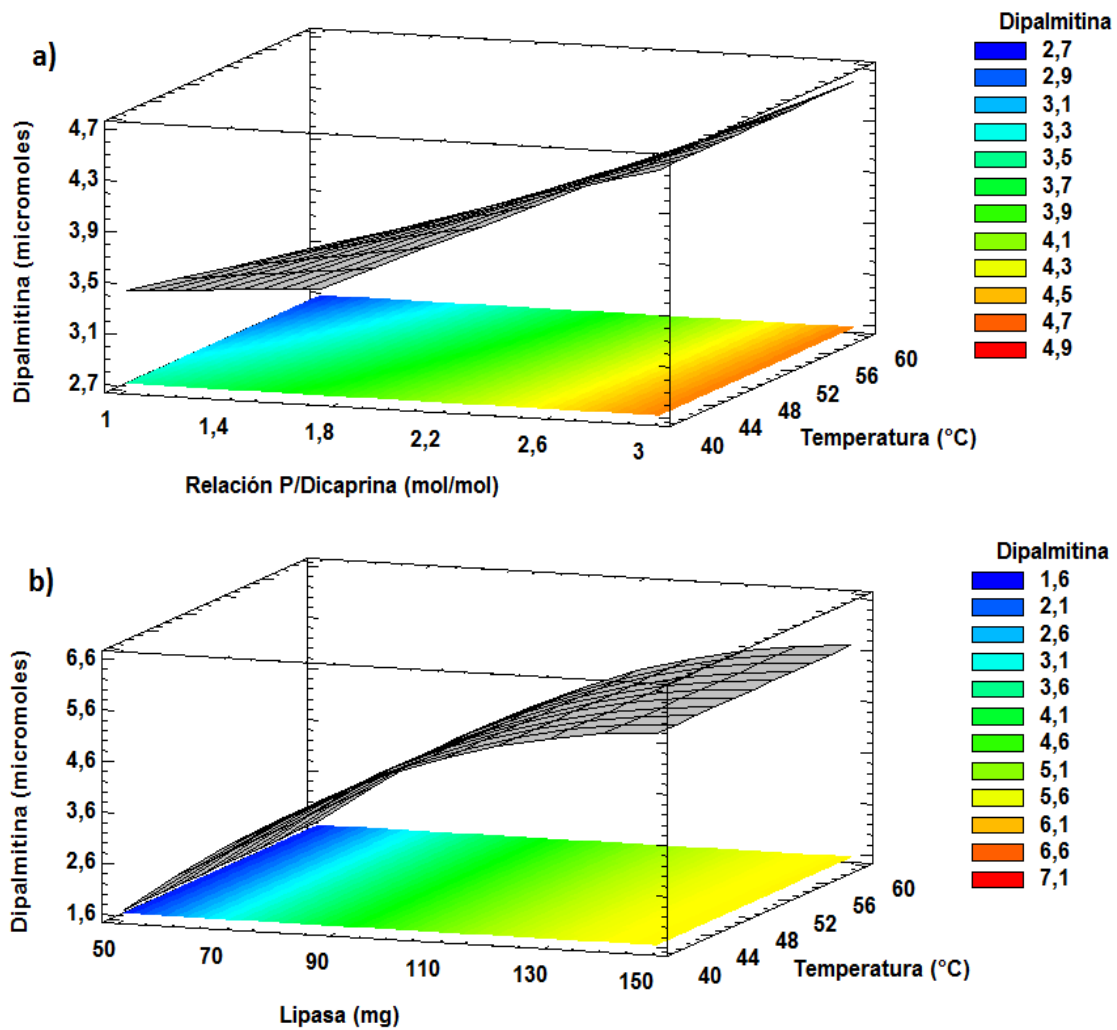


Figura 7.16. Generación de dipalmitina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación molar ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

7.7.3.4. Formación de tricaprina

El ácido cáprico generado por hidrólisis es reesterificado para generar tricaprina. Posiblemente la posición sn-3 de 1,3-dicaprina es hidrolizada fácilmente y el ácido cáprico liberado es esterificado en la posición sn-3 de 1,2-dicaprina dando lugar así a este triglicérido.

El incremento de la temperatura de reacción favoreció la generación de tricaprina, en especial cuando la concentración de ácido palmítico es baja, lo que muestra que alta relación P/Dicaprina favorecería la esterificación de ácido palmítico. Por otro lado, llevar a cabo la síntesis con bajo contenido de biocatalizador tuvo un impacto negativo sobre esta respuesta, mientras que altas dosis favorecieron la generación de tricaprina. Probablemente se da una competencia entre la reacción de hidrólisis y de esterificación que podría orientarse hacia una u otra en función del dosaje de lipasa inmovilizada. Finalmente, el incremento de la concentración de ácido palmítico influyó negativamente sobre la generación de tricaprina. Como se ha mencionado anteriormente, el aumento en los valores de este factor propicia la esterificación de ácido palmítico en lugar de ácido cáprico.

La Ecuación 7.11 representa el modelo obtenido mediante regresión lineal múltiple para describir la relación entre los micromoles de tricaprina generados y los factores seleccionados (R^2 para el modelo obtenido = 93.70%).

$$CCC = 30.1 + 0.00202L^2 - 0.573L + 0.0216LR_M - 0.0648TR_M + 0.00207LT \quad (7.11)$$

En la Figura 7.17.a se presenta un gráfico de superficie para la respuesta aquí estudiada, donde se evalúan los cambios en función de la temperatura y la relación P/Dicaprina luego de 6 horas de reacción empleando 100 mg de biocatalizador, mientras que la gráfica b presentada en la misma figura muestra el comportamiento de esta respuesta frente a cambios en la masa de biocatalizador y de la temperatura luego de 6 horas de reacción con el máximo contenido de ácido palmítico inicial estudiado.

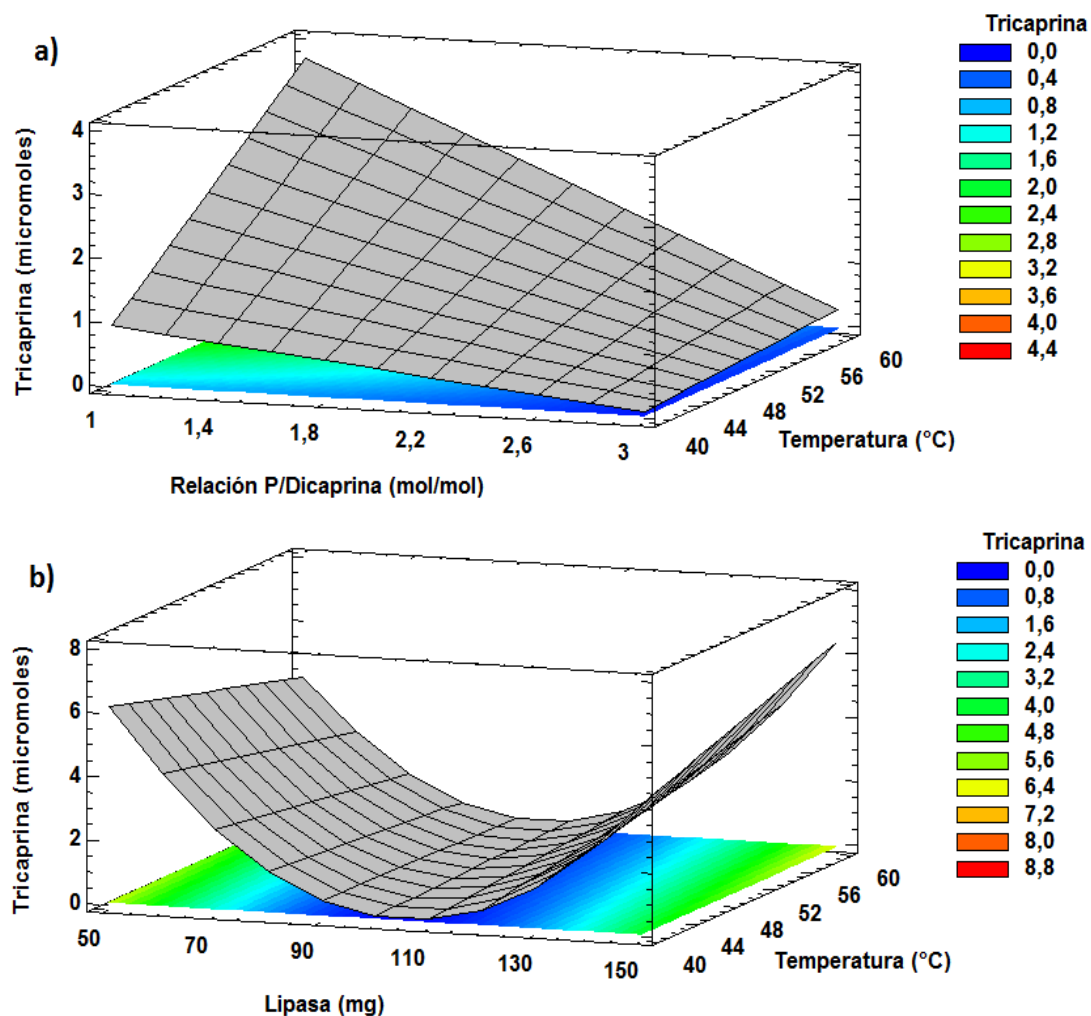


Figura 7.17. Generación de tricaprina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación molar ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar fija 3:1.

7.7.3.5. Generación de 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol

La esterificación con ácido palmítico de diglicéridos formados por ácido cáprico y ácido palmítico en la misma molécula (Sección 7.5.3.2) permite la generación de 1-caproil-2,3-palmitoil glicerol (CPP).

En el caso de CGP puede ocurrir la esterificación de la posición sn-2 o bien migración de acilo de la posición sn-3 a la sn-2 y posterior esterificación de la posición sn-3, mientras que en CPG la posición sn-3 pareciera ser esterificada más fácilmente.

Todos los factores analizados influyeron positivamente sobre esta respuesta. Un modelo simple obtenido por regresión múltiple y posterior aplicación de test de Fisher permitió explicar el 96.41% de los cambios en la generación de CPP. Dicho modelo es representado por la Ecuación 7.12.

$$CPP = -0.484 + 0.00970LR_M + 0.000213LT \quad (7.12)$$

Si bien se han propuesto modelos de segundo orden, sólo las variables estadísticamente significativas se consideran luego de realizar la prueba del valor-F.

En la Figura 7.18 se muestran gráficos de superficie de respuesta para la formación de 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol generados empleando en modelo obtenido anteriormente.

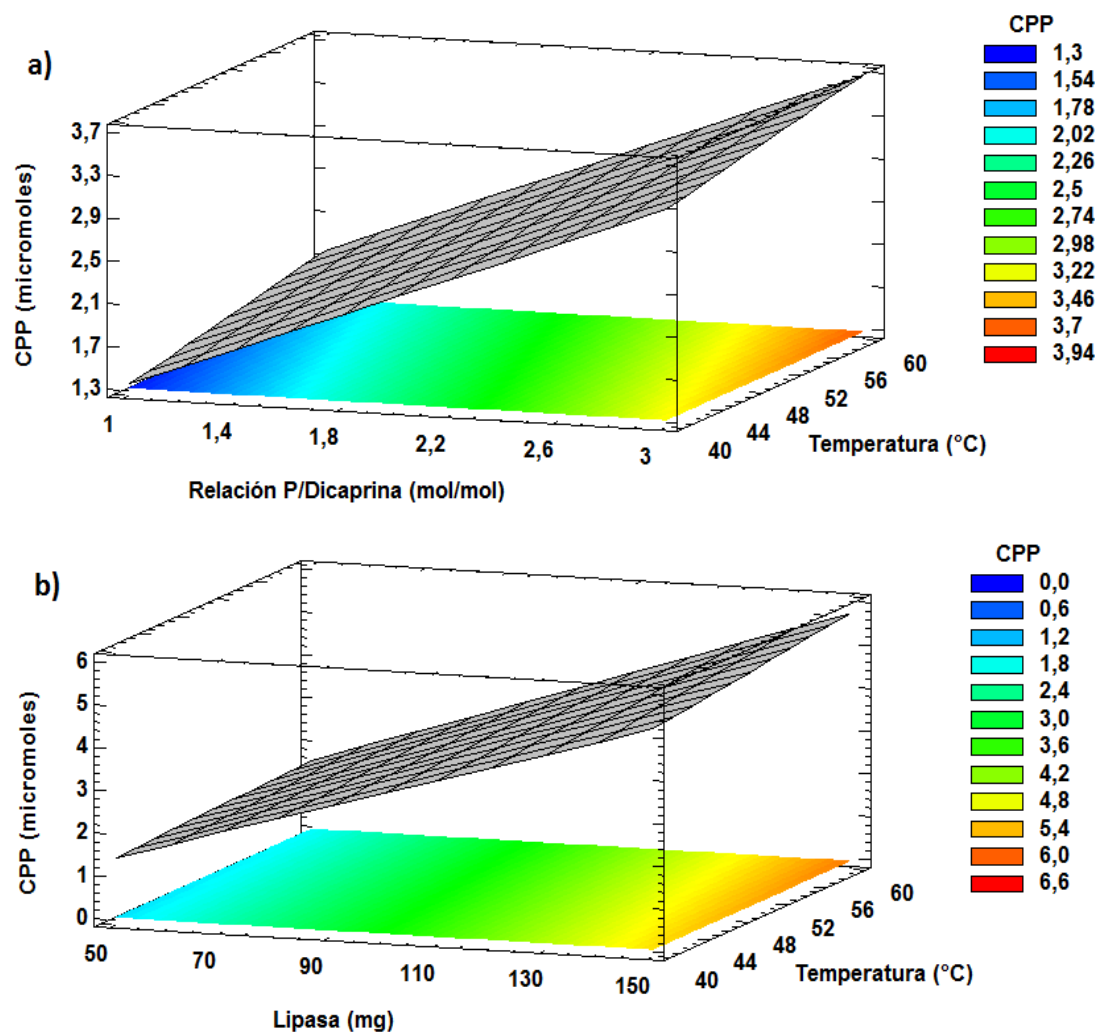


Figura 7.18. Formación de 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1

7.7.4. Productos generados a partir de la esterificación de dicaprina con ácido palmítico

7.7.4.1. Formación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol y 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol

La dicaprina empleada como reactivo estuvo compuesta aproximadamente en un 80% por 1,3-dicaprina y 20% por 1,2-dicaprina. La posición sn-3 es, en general, más rápidamente esterificada que la posición sn-2, por lo cual se espera que parte del triglicérido estructurado sea 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol (CCP). La esterificación de la posición sn-2, de 1,3-dicaprina, con ácido palmítico permite la generación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol (CPC), siendo este el triglicérido estructurado deseado.

Los resultados de las reacciones de hidrólisis y etanolisis de las muestras de reacción, en conjunto con los análisis realizados por resonancia magnética nuclear (Capítulo 5) permitieron detectar una alta proporción de ácido palmítico esterificado en la posición sn-2 en los triglicéridos estructurados obtenidos.

Para maximizar la fracción de CPC frente a CCP es fundamental minimizar el contenido de 1,2-dicaprina en el diglicérido de partida.

El incremento del contenido de biocatalizador y de la relación ácido palmítico/dicaprina favorecieron la síntesis de estos triglicéridos, mientras que el aumento de la temperatura afectó negativamente a esta respuesta. Estos resultados coinciden con lo observado previamente: alto contenido de ácido palmítico inicial, alta

proporción de biocatalizador y baja temperatura favorecen la reacción de esterificación de ácido palmítico frente a la reacción de hidrólisis.

Un modelo simple obtenido por regresión lineal múltiple y refinado mediante selección por pasos para considerar sólo variables estadísticamente significativas permitió obtener la Ecuación 7.13 con un valor de R^2 de 96.18%. Empleando este modelo fueron generados los gráficos de superficie de respuesta que se presentan en la Figura 7.19.

$$CPC + CCP = 10.3 + 0.101L + 0.0263TR_M - 0.00101LT \quad (7.13)$$

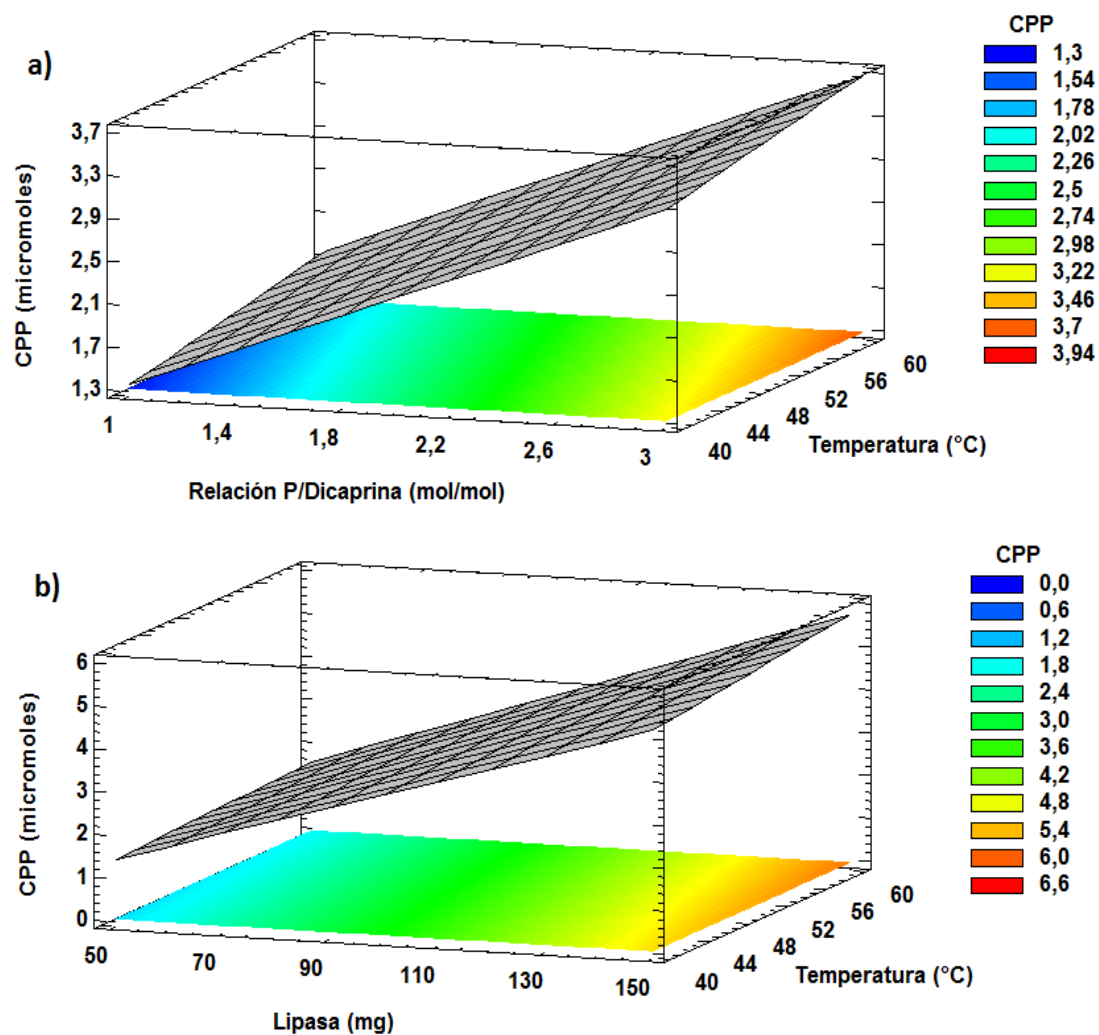


Figura 7.19. Generación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol por esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura llevando a cabo la reacción con la mayor proporción de ácido palmítico evaluada en este estudio.

7.7.4.2. Selectividad y rendimiento a CPC + CCP

La selectividad a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol fue calculado mediante la Ecuación 7.14.

$$\sigma_{CPC+CCP} = \frac{\text{micromoles generados de CPC+CCP}}{\text{micromoles convertidos de dicaprina}} \cdot 100 \quad (7.14)$$

Esta respuesta se vio favorecida por el incremento del contenido de biocatalizador y de la relación ácido palmítico/dicaprina, mientras que la temperatura tuvo un efecto fuertemente negativo sobre la misma.

La máxima selectividad a CPC + CCP lograda fue 38%.

Un modelo lineal simple fue obtenido mediante regresión múltiple y posterior selección por pasos, el mismo es representado por la Ecuación 7.15 y permitió explicar el 92.40% de la variabilidad observada en la selectividad a CPC + CCP.

$$\sigma_{\text{CPC+CCP}} = 29.9 + 6.80R_M - 0.142R_M T - 0.000340LT + 0.0163R_M L \quad (7.15)$$

En la Figura 7.20a se presenta un gráfico de superficie de respuesta donde se muestran los cambios ocurridos en la selectividad en función de la relación molar ácido palmítico/dicaprina y de la temperatura luego de 6 horas de reacción empleando 100 mg de lipasa inmovilizada. En la gráfica presentada en la Figura 7.20b se muestra la selectividad a CPC + CCP en función de la masa de biocatalizador y de la temperatura de reacción luego de 6 horas de reacción llevando a cabo la misma con la mayor proporción de ácido palmítico.

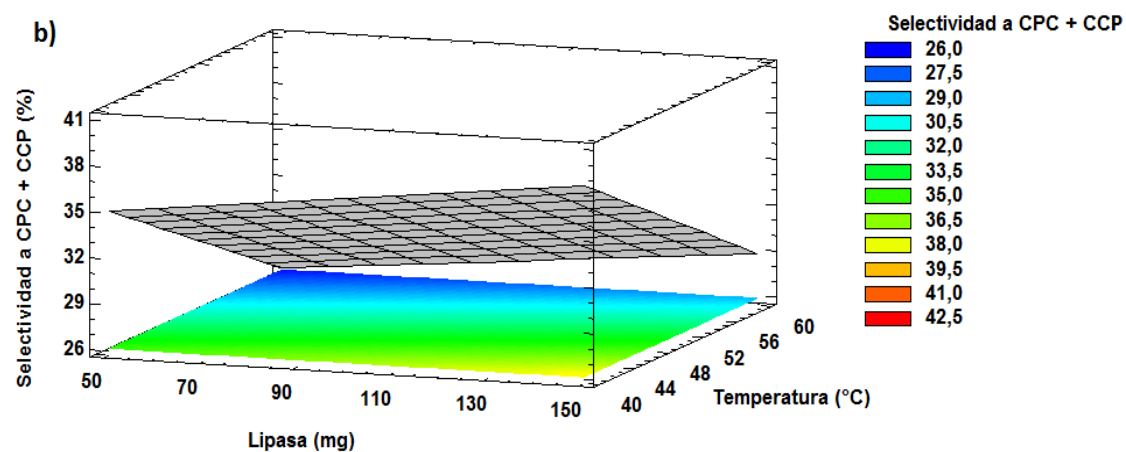
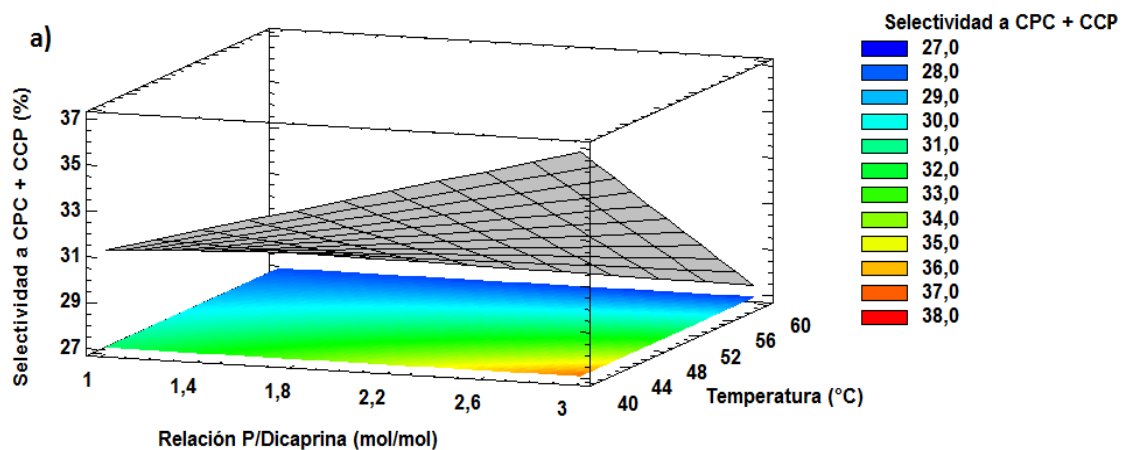


Figura 7.20. Selectividad porcentual a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol generados durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

El rendimiento a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol fue calculado mediante la Ecuación 7.16.

$$Y_{CPC+CCP} = \frac{\text{Micromoles generados de CPC+CCP}}{\text{Micromoles iniciales de dicaprina}} \cdot 100 \quad (7.16)$$

Al igual que lo ocurrido con la selectividad, el rendimiento se vio beneficiado por el aumento del dosaje de lipasa inmovilizada y de la relación ácido palmítico/dicaprina,

mientras que la temperatura afectó negativamente a esta respuesta. Lo antes mencionado coincide con la información recabada durante este estudio: llevar a cabo la reacción con la mayor masa de biocatalizador, la mayor proporción de ácido palmítico y la mínima temperatura ensayada favoreció la reacción de esterificación frente a la reacción de hidrólisis.

Mediante un modelo lineal simple fue posible ajustar esta respuesta, el estadístico R^2 para el mismo fue 95.06%, indicando una buena relación entre los factores y la respuesta. El modelo obtenido por regresión lineal múltiple y posteriormente refinado mediante selección por pasos es representado por la Ecuación 7.17.

$$Y_{\text{CPC+CCP}} = 14.6 + 0.110L + 0.0151LR_M - 0.00121LT \quad (7.17)$$

Gráficos de superficie de respuesta son presentados en la Figura 7.21. Las condiciones en las que se evalúa el rendimiento en la Figura 7.21.a y 7.21.b coinciden con las antes mencionadas para la selectividad a CPC + CCP y para las restantes respuestas previamente evaluadas.

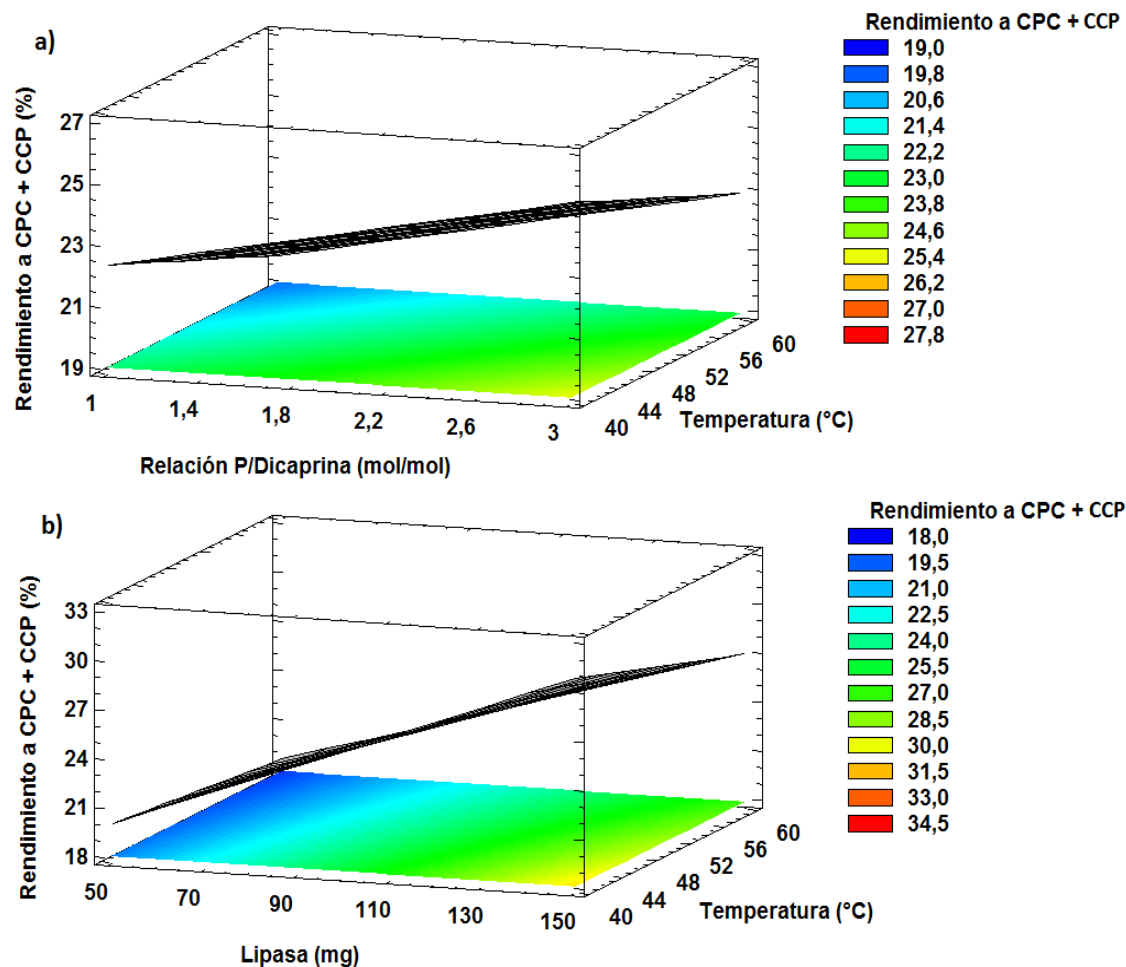


Figura 7.21. Rendimiento porcentual a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol generados durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

7.7.5. Migración de acilos durante la reacción

La generación de 2,3-dicaprina fue observada durante este estudio, la misma podría atribuirse a migración de acilos de la posición sn-1 a sn-2 en 1,3-dicaprina, potencialmente catalizada por la lipasa.

El aumento de la relación molar favoreció la generación de 2,3-dicaprina, mientras que el incremento de la temperatura y de la masa de lipasa inmovilizada afectaron

negativamente a esta respuesta. Durante el desarrollo de la presente tesis se hizo evidente que la reacción de migración de acilos se ve favorecida por altas temperaturas e incluso las lipasas podrían participar en la misma. Sin embargo, esta respuesta no se incrementó con los parámetros antes mencionados. Este hecho no implica que no hayan favorecido la migración, sino que la reacción de hidrólisis se ve más favorecida que la migración. Más aun, cuando la síntesis fue llevada a cabo con alta concentración de ácido palmítico, la hidrólisis se ve desfavorecida y en estas condiciones la generación de 2,3-dicaprina es mayor.

Mediante regresión lineal múltiple se obtuvo un modelo de segundo orden en la relación ácido palmítico/dicaprina que permitió explicar el 96.08% de los cambios en los micromoles de 2,3-dicaprina (en función del R^2). La ecuación 7.18 representa a dicho modelo.

$$GCC = -1.81 - 0.115R_M^2 + 0.0229L + 0.0543T + 0.00705LR_M - 0.000752LT \quad (7.18)$$

7.7. Análisis multirespuesta a través de funciones de deseabilidad

En las secciones anteriores fueron evaluados los efectos de las variables experimentales sobre diferentes respuestas al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada por adsorción física sobre quitosano. Se elaboraron regresiones de diferente complejidad para cada respuesta y las condiciones óptimas para las mismas fueron obtenidas. En esta sección se analizan las respuestas en conjunto con el objetivo de obtener un óptimo global. Como se mencionó en las secciones 3.6 y 6.6, cuando se consideran

todas las respuestas al mismo tiempo, es poco probable que alcancen el óptimo en el mismo punto, especialmente cuando algunas de las respuestas se deben maximizar y otras minimizar. Para este análisis se utilizó nuevamente el enfoque basado en una función de utilidad conocida como “función de deseabilidad”.

En este trabajo se ha intentado generar un modelo que permita maximizar las variables de respuesta seleccionadas (por ejemplo; consumo de ácido palmítico, conversión de 1,3-dicaprina, selectividad a CPC + CCP, rendimiento a CPC + CCP, etc) y minimizar otras (generación de glicerol, ácido cáprico, tricaprina, dipalmitina, etc). Si bien el número de experimentos en el presente trabajo es limitado (10 experimentos) hay reportes en la literatura sobre aplicaciones de diseño factorial con cantidad reducida de experimentos para realizar análisis multirespuesta con funciones de deseabilidad [52].

En la Figura 7.22 se presenta la función de deseabilidad obtenida utilizando Statgraphics Centurion donde se realizó optimización de respuestas múltiples maximizando el consumo de ácido palmítico, la conversión de 1,3-dicaprina y el rendimiento a CPC + CCP y minimizando la generación de ácido cáprico y glicerol (minimización de hidrólisis).

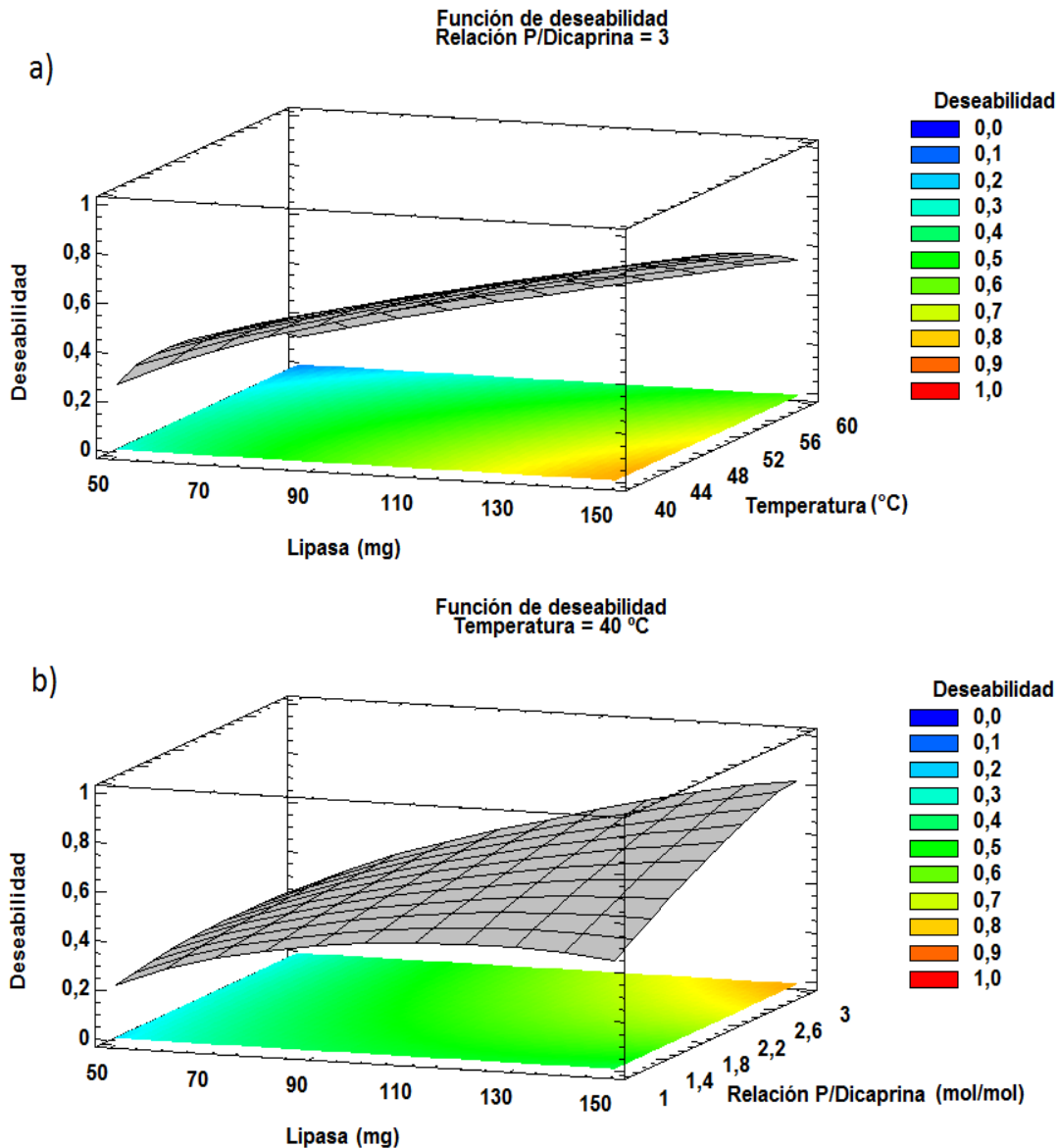


Figura 7.22. Gráfico de superficie de respuesta para función de deseabilidad maximizando los micromoles de ácido palmítico consumidos, los micromoles de 1,3-dicaprina convertidos y el rendimiento a CPC + CCP, y minimizando la generación de ácido cáprico y glicerol. a) variables: masa de lipasa inmovilizada y temperatura, manteniendo fija la relación ácido palmítico/dicaprina (3:1) y b) variables: masa de lipasa inmovilizada y relación ácido palmítico/dicaprina, manteniendo fija la temperatura en 40 °C.

La función de deseabilidad alcanzó valores superiores a 0.8 llevando a cabo la esterificación a la menor temperatura ensayada, con la máxima relación ácido palmítico/dicaprina y el mayor contenido de lipasa inmovilizada.

Cabe señalar que todos los resultados y las conclusiones obtenidas a partir de las funciones de deseabilidad están absolutamente condicionados por el intervalo experimental utilizado en este trabajo, ya que las funciones deseabilidad se basan en modelos generados con los datos experimentales obtenidos en un cierto rango, deben entonces, analizarse cuidadosamente antes de su aplicación a casos reales e intervalos ampliados, ya que estos modelos sugieren que altos contenidos de ácido palmítico y alta carga de biocatalizador favorecen la síntesis del triglicérido estructurado deseado, sin embargo no se han tenido en cuenta los posibles efectos de inhibición ácida o posible agregación de la lipasa inmovilizada.

De los resultados de RMN de ^{13}C e ^1H presentados en el Capítulo 5, se hace evidente que en la mezcla producida de CCP y CPC está compuesta mayoritariamente por CPC.

Esto está avalado por:

- la presencia de 2 MAG al realizar la hidrólisis con lipasa de páncreas porcino de los productos de esta reacción
- presencia de CPG en los productos de reacción (proveniente probablemente de la hidrólisis en posición sn-3 de CPC)
- los tiempos cortos de reacción utilizados y la proporción alta relativa de ácido palmítico presente

7.8. Conclusiones

Mediante un proceso simple la lipasa de *Burkholderia cepacia* fue inmovilizada sobre quitosano mediante fuerzas de van der Waals y probablemente enlaces iónicos, obteniendo un catalizador con aproximadamente 3% en peso de lipasa.

El catalizador obtenido mostró alta actividad en el sistema de reacción, logrando conversiones de diglicérido cercanas al 90%.

Como resultado de este estudio se obtuvo una mezcla de acilglicéridos compuesta mayoritariamente por ácido cáprico en posiciones sn-1 y sn-3 y ácido palmítico en alta proporción en posición sn-2.

La reacción de hidrólisis favoreció la generación de acilglicéridos no deseados. Controlar esta reacción es fundamental para maximizar la selectividad al producto deseado.

La presencia de 1,2-dicaprina en el material de partida propició la rápida generación de 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol entre los productos de reacción. Minimizar el contenido inicial de este diglicérido permitiría la obtención de un producto final con menor proporción del isómero del triglicérido estructurado deseado.

Finalmente podemos concluir que llevar a cabo la reacción a la menor temperatura ensayada y con el mayor contenido de biocatalizador y la mayor relación molar de ácido palmítico/dicaprina evaluados favoreció la reacción de esterificación frente a la de hidrólisis posibilitando una mayor obtención de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol.

7.9. Referencias

- [1] Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P., Schmid, R. D. (1998). Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:1527-1531.
- [2] Small, D. M. (1991). The Effects of Glyceride Structure on Absorption and Metabolism. *Annual review of nutrition*, 11:413-434.
- [3] Mattson, F. H., Volpenhein, R. A. (1964). The Digestion and Absorption of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry*, 239:2772-2777.
- [4] Kayden, H. J., Senior, J. R., Mattson, F. H. (1967). The Monoglyceride Pathway of Fat Absorption in Man. *The Journal of Clinical Investigation* 46:1695-1702.
- [5] Bach, A. C., Babayan, V. K. (1982). Medium-Chain Triglycerides: An Update. *American Journal of Clinical Nutrition*, 36:950-962.
- [6] Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E., Jones, P. J. H. (1998). Medium Chain Fatty Acid Metabolism and Energy Expenditure: Obesity Treatment Implications. *Life sciences*, 62:1203-1215.
- [7] Babayan, V. K. (1987). Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids. *Lipids* 22:417-420.
- [8] Mascioli, E. A., Bistran, B. R., Babayan, V. K., Blackburn, G. L. (1987). Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids as Unique Nonglucose Energy Sources in Hyperalimentation. *Lipids*, 22:421-423.
- [9] Merolli, A., Lindemann, J., Vecchio, A. J. D. (1997). Medium-chain Lipids: New Sources, Uses. *Inform*, 8:597-603.
- [10] Henwood, S., Wilson, D., White, R., Trimbo, S. (1997). Developmental Toxicity Study in Rats and Rabbits Administered an Emulsion Containing Medium Chain Triglycerides as an Alternative Caloric Source. *Fundamental and Applied Toxicology*, 40:185-190.
- [11] Sakono, M., Takagi, H., Sonoki, H., Yoshida, H., Iwamoto, M., Ikeda, I., Imaizumi, K. (1997) Absorption and Lymphatic Transport of Interesterified or Mixed Fats Rich in Saturated Fatty Acids and Their Effect on Tissue Lipids in Rats. *Nutrition Research*, 17:1131-1141.
- [12] Høy C-E, Xu X. (2001). Structured triacylglycerols. In: Gunstone FD, editor. *Structured and modified lipids*. New York: Marcel Dekker. 209-40.
- [13] Jandacek, R. J., Whiteside J. A., Holcombe B. N., Volpenhein R. A., Taulbee J. D. (1987). The Rapid Hydrolysis and Efficient Absorption of Triacylglycerides with

Octanoic Acid in the 1 and 3 Positions and Long-Chain Fatty Acid in the 2-Position. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45:940–945

[14] Lien, E. L., Boyle F. G., Yuhas R., Tomarelli R. M., Quinlan P. (1997). The Effect of Triglyceride Positional Distribution on Fatty Acid Absorption in Rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 25:167–174.

[15] Aoe S., Yamamura J., Matsuyama H., Hase M., Shiota M., Miura S. (1997). The positional distribution of dioleoyl-palmitoyl glycerol influences lymph chylomicron transport, composition and size in rats. *Journal of Nutrition*, 127:1269–1273.

[16] Christensen, M. S., Høy, C. E., Becker, C. C., Redgrave, T. G. (1995). Intestinal Absorption and Lymphatic Transport of Eicosapentaenoic (EPA), Docosahexaenoic (DHA), and Decanoic Acids: Dependence on Intramolecular Triacylglycerol Structure. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61:56–61.

[17] Christensen, M. S., Müllertz, A., Høy, C. E. (1995). Absorption of Triglycerides with Defined or Random Structure by Rats with Biliary and Pancreatic Diversion. *Lipids*, 30:521–526.

[18] Jensen R. G., Hagerty M. M., McMahon K. E. (1978) Lipids of human milk and infant formulas: a review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31:990–1016.

[19] Innis S. M., Dyer R., Quinlan P., Diersen-Schade D. (1995). Palmitic acid is absorbed as sn-2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride sn-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets. *Journal of Nutrition*, 125:73–81.

[20] Renaud S. C., Ruf J. C., Petithory D. (1995). The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats. *Journal of Nutrition*, 125:229–237.

[21] Filer L. J., Mattson F. H., Fomon S. J. (1969). Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant. *Journal of Nutrition*, 99:293–298.

[22] Lucas A., Quinlan P., Abrams S., Ryan S., Meah S., Lucas P. J. (1997). Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Archives of Disease in Childhood*, 77:F178–F184

[23] Lien, E. L., Boyle F. G., Yuhas R., Tomarelli R. M., Quinlan P. (1997). The Effect of Triglyceride Positional Distribution on Fatty Acid Absorption in Rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 25:167–174.

[24] Bornscheuer, U. T., Adamczak M., Soumanou M. M. (2002). Lipase-Catalyzed Synthesis of Modified Lipids. *Lipids as Constituents of Functional Foods*, edited by F.D. Gunstone, F.D., PJ Barnes & Associates, Bridgwater, United Kingdom. 149–182.

- [25] Xu, X. (2000). Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Reactions: A Review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1002:287–303.
- [26] Akoh, C. C., Jennings B. H., Lillard D. A. (1995). Enzymatic Modification of Trilinolein: Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72:1317–1321.
- [27] Shimada, Y., Sugihara A., Nakano H., Yokota T., Nagao T., Komemushi S., Tominaga Y. (1996). Production of Structured Lipids Containing Essential Fatty Acids by Immobilized *Rhizopus delemar* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73:1415–1420.
- [28] Fomuso, L. B., Akoh C. C. (1998). Structured Lipids: Lipase-Catalyzed Interesterification of Tricaproin and Trilinolein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:405–410.
- [29] Soumanou, M. M., Bornscheuer U. T., Menge U., Schmid R. D. (1997). Synthesis of Structured Triglycerides from Peanut Oil with Immobilized Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74:427–433.
- [30] Hayes, D. G., Gulari E. (1992). Formation of Polyol-Fatty Acid Esters by Lipases in Reverse Micellar Media. *Biotechnology and bioengineering*, 40:110–118.
- [31] Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. (2001). Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:743-748.
- [32] Irimescu, R., Iwasaki, Y., Hou, C. T. (2002). Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:879-883.
- [33] del Mar Muñío, M., Robles, A., Esteban, L., González, P. A., Molina, E. (2009). Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochemistry*, 44:723-730.
- [34] Goh, S. H., Yeong, S.K., Wang, C. W. (1993). Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: effect of solvent on 1,3-specificity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70:567-570.
- [35] García-Alles, L. F., Gotor, V. (1998). Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering*, 59:163-170.
- [36] Bellot J. C., Choisnard L., Castillo, E., Marty, A. (2001). Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during

monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enzyme and microbial technology*, 28:362-369.

[37] Kuo, S. J., Parkin, K. L. (1996). Solvent polarity influences product selectivity of lipase-mediated esterification reactions in microaqueous media. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73:1427-1433.

[38] Rendón, X., López-Munguía, A., Castillo, E. (2001). Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:1061-1066.

[39] Liao, H. F., Tsai, W. C., Chang, S. W., Shieh, C. J. (2003). Application of solvent engineering to optimize lipase-catalyzed 1,3-diglycerols by mixture response surface methodology. *Biotechnology letters*, 25:1857-1861.

[40] Bi, Y. H., Wang, Z. Y., Duan, Z. Q., Zhao, X. J., Chen, X. M., Nie, L. H. (2015). An insight into the solvent effect on the positional selectivity of the immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* in 1,3-diolein synthesis. *RSC Advances*, 5:23122-23124.

[41] Wongsakul, S., Aran, H., Bornscheuer, U. T. (2004). Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerides from 1,3-diacylglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81:151-155.

[42] Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35:126-139.

[43] Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46:1-27.

[44] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1OIL>

[45] Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., Menge, U. (1994). Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1201:55-60.

[46] Macho, S. (2002). Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante (Doctoral dissertation, Tesis doctoral. Departamento de Química Analítica I Química Orgánica. Universitat Rovira i Virgili, España).

[47] Macea, R. B., Hoyos, C. F. D., Montes, Y. G., Fuentes, E. M., Ruiz, J. I. R. (2015). Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 25:58-69.

[48] Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767:1073-1101.

- [49] Collins, S. E., Lassalle, V., Ferreira, M. L. (2011). FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72:220-228.
- [50] Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M., Doglia, S. (2005). Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*, 511-517.
- [51] Yadav, L. D. S. *Organic Spectroscopy*. Kluwer academic publishers. New Delhi, India (2005).
- [52] Baş, D., Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836–845.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis estuvo orientado a la síntesis de acilglicéridos de alto valor nutricional empleando reacciones enzimáticas. La obtención de una mezcla de glicéridos se evaluó en un proceso de síntesis en dos etapas, incluyendo etapas de purificación de productos intermedios. Los principales componentes, nutricionalmente valiosos, en la mezcla de acilglicéridos fueron: triglicéridos estructurados compuestos mayoritariamente por ácido palmítico en posición sn-2 y ácido cáprico en posiciones sn-1/sn-3, triglicéridos de cadena media y 1,3-diglicéridos.

La primera etapa de síntesis consistió en la obtención de 1,3-dicaprina. La forma comercial inmovilizada de la lipasa 1,3-específica de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) resultó un buen catalizador para la síntesis de 1,3-dicaproylglicerol mediante la esterificación de glicerol con ácido cáprico, en solvente orgánico. La síntesis de este diglicérido específico se vio favorecida por el uso de altas cantidades de glicerol adsorbido sobre gel de sílice, mientras que el incremento de la dosis de lipasa inmovilizada tuvo un efecto negativo sobre la fracción final de este isómero. El rendimiento máximo de 1,3-dicaprina fue del 55% luego de 6 horas de reacción. Los datos experimentales permitieron respaldar la propuesta de que el intermedio tetraédrico de la síntesis enzimática de 1,3-dicaprina pueden sufrir la migración de acilo.

La esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico se planeó con el objetivo de obtener triglicéridos con alta proporción de ácido cáprico en posiciones sn-1/sn-3 y

ácido palmítico en posición sn-2. A fin de maximizar el rendimiento a este triglicérido estructurado, se llevó a cabo la purificación del diglicérido sintetizado en la primera etapa. La neutralización del ácido cáprico remanente se realizó con una solución acuosa de KOH 0.1M en dos etapas, lo que permitió la remoción del ácido y el monoglicérido. Se realizó una selección preliminar de los solventes empleando el programa Ecofac 1.0. Fueron elegidos etanol y *n*-heptano, mostrando un buen desempeño para la extracción líquido-líquido en estudios experimentales. Con un procedimiento de separación en tres pasos simples, fue posible recuperar 94% de la dicaprina con 89% de pureza. Si se requiere una mayor pureza, una etapa adicional de extracción permite aumentarla a 97%, pero recuperando sólo el 56% de dicaprina. Teniendo en cuenta el proceso general, llevando a cabo la neutralización y sólo la primera etapa de extracción fue posible recuperar 90% de la dicaprina inicial con 89% de pureza.

Se evaluaron diferentes lipasas para llevar a cabo la esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico en un medio con solvente orgánico, obteniendo conversiones de dicaprina de hasta el 84%. Todos los catalizadores fueron evaluados en función de la composición de la mezcla final obtenida por la esterificación de dicaprina (principalmente 1,3-dicaprina) con ácido palmítico. Varios de ellos resultaron sumamente interesantes para sintetizar una mezcla que actúe como sustituto de grasas compuesta mayoritariamente por triglicéridos estructurados ricos en ácido palmítico en posición sn-2 y ácido cáprico en posiciones sn-1/sn-3, triglicéridos de cadena media, 1,3-diglicéridos de cadena media y 1,3-diglicéridos de cadena media y larga, con bajas o nulas proporciones de dipalmitina y tripalmitina. *Burkholderia*

cepacia fue la lipasa con mejor desempeño, y se realizó su inmovilización sobre polipropileno y sobre montmorillonita. El biocatalizador obtenido con polipropileno resultó poco activo, mientras que la inmovilización sobre montmorillonita generó un catalizador con muy buena actividad, sin embargo el sólido obtenido resultó de difícil empleo por ser un polvo con reducido tamaño de partícula. Las metodologías tradicionales para la identificación del ácido graso esterificado en la posición sn-2 permitieron observar una alta proporción de ácido palmítico en esta posición en forma cualitativa. Se exploró el uso de RMN como herramienta adicional para la caracterización de productos.

Se analizó en detalle la esterificación de 1,3-dicaprina con ácido palmítico en solvente orgánico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. La inmovilización de la enzima se realizó con un proceso simple y la misma se une al soporte mediante fuerzas de van der Waals y probablemente enlaces iónicos, obteniendo un catalizador con aproximadamente 3% en peso de lipasa. Este biocatalizador mostró alta actividad, con conversiones de diglicérido cercanas al 90% luego de 6 horas de reacción. La generación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol se maximizó al operar con alta concentración de ácido palmítico, alta carga de biocatalizador y temperaturas relativamente bajas. Reducir al máximo el contenido de 1,2-dicaprina en el sustrato de partida resulta fundamental para minimizar la generación de 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol.

Adicionalmente, la migración de acilos que tiene lugar durante etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 fue analizada en detalle. Esta reacción

secundaria es muy importante en los procesos empleados para la síntesis de glicéridos parciales con estructura específica. La presencia de 1,3-diglicéridos, 1-monoglicéridos e incluso glicerol a cortos tiempos de reacción, fue un claro indicador de la existencia e importancia de esta reacción. La formación de 2-MAG por etanólisis de triglicéridos se vio favorecida por tiempos de reacción más largos y mayores cargas de biocatalizador con triglicéridos saturados de cadena media o corta. Asimismo, la conversión de acilglicéridos formados por ácidos grasos de cadena larga con insaturaciones fue relativamente baja, debido probablemente a las restricciones para su acceso al sitio activo de la lipasa.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis surgen potenciales trabajos a futuro tales como:

- exploración de biocatalizadores no comerciales con el objetivo de reducir costos,
- evaluar el reuso del biocatalizador empleado en cada etapa,
- estudio del escalado de las diferentes etapas del proceso de síntesis,
- síntesis de acilglicéridos portadores de ácidos grasos poliinsaturados nutricional y terapéuticamente valiosos, como por ejemplo DHA (ácido docosahexaenoico, 22-6 n-3) y EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5 n-3),
- llevar a cabo un detallado estudio por RMN $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de sistemas modelos de triglicéridos estructurados,
- continuar y profundizar el análisis de migración de acilos promovida por la lipasa mediante el empleo de técnicas de simulación molecular (incluyendo métodos semiempíricos de cálculo).

LISTADO DE ABREVIATURAS

AG:	Ácido graso/s
MAG:	Monoacilglicérido/s
DAG:	Diacilglicérido/s
TAG:	Triacilglicérido/s
TCL:	Triglicéridos de cadena larga
TCM:	Triglicérido de cadena media
TCML:	Triglicéridos de cadena media y larga
AGCM:	Ácido graso de cadena media
AGCL:	Ácido graso de cadena larga
AGCC:	Ácido graso de cadena corta
TE:	Triglicerido estructurado
GGG:	Glicerol
1,3-DAG:	1,3-diacilglicerol
1,2-DAG:	1,2-diacilglicerol
2,3-DAG:	2,3-diacilglicerol
1-MAG:	1-diacilglicerol
2-MAG:	2-diacilglicerol
3-MAG:	3-diacilglicerol
FAEE:	Etil éster de ácido graso
PUFA:	Ácido graso poliinsaturado
DHA:	Ácido docosahexaenoico
EPA:	Ácido eicosapentaenoico

Ser:	Serina
His:	Histidina
Asp:	Ácido aspártico
Glu:	Ácido glutámico
BCL:	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>
CRL:	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
PFL:	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
RML:	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
PPL:	Lipasa de páncreas porcino
CALB:	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
C:	Ácido cáprico
P:	Ácido palmítico
O:	Ácido oleico
CGG:	1-monocaprina
GCG:	2-monocaprina
CGC:	3-monocaprina
CCG:	1,2-dicaprina
CGC:	1,3-dicaprina
GCC:	2,3-dicaprina
CCC:	Tricaprina
CPC:	1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol
CCP:	1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol
CPP:	1-caproil-2,3-palmitoil glicerol
CGP:	1-caproil-3-palmitoil glicerol

CPG:	1-caproil-2-palmitoil glicerol
PPP:	Tripalmitina
PPG:	1,2-dipalmitina
PGP:	1,3-dipalmitina
GPP:	2,3-dipalmitina
GPG:	2-monopalmitina
PGG:	1-monopalmitina
GGP:	2-monopalmitina
COC:	1,3-dicaproil-2-oleoil glicerol
CCO:	1,2-dicaproil-3-oleoil glicerol
CGO:	1-caproil-3-oleoil glycerol
OGO:	1,3-dioleína

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Factores experimentales para la esterificación de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM.

Tabla 2.2. Valores de las variables usadas en ED1.

Tabla 2.3. Valores de las variables usadas en ED2.

Tabla 2.4. Factores experimentales para la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando como catalizador la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano.

Tabla 3.1. Factores experimentales establecidos y variables de respuesta obtenidas para la esterificación enzimática de glicerol con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM a 6 h de reacción.

Tabla 4.1. Extracción con solvente de monocaprina de una mezcla conteniendo monocaprina-dicaprina.

Tabla 4.2. Extracción con solvente de monocaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y tricaprina.

Tabla 4.3. Extracción con solvente de dicaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y dicaprina.

Tabla 4.4. Extracción con solvente de dicaprina de una mezcla conteniendo dicaprina y tricaprina.

Tabla 4.5. Extracción con solvente de tricaprina de una mezcla conteniendo monocaprina y tricaprina.

Tabla 4.6. Extracción con solvente de tricaprina de una mezcla conteniendo dicaprina y tricaprina.

Tabla 4.7. Desempeño de diferentes soluciones de KOH para la neutralización de ácido cáprico y extracción de acilglicéridos.

Tabla 5.1. Reactivos y productos (μ moles) en la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por diferentes lipasas luego de 12 horas de reacción.

Tabla 5.2. Rendimiento a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por diferentes lipasas y utilizando gel de sílice como agente removedor del agua en el sistema de reacción.

Tabla 5.3. Reactivos y productos en función del tiempo de reacción para la transesterificación de dicaprina con etil palmitato catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* empleando tamiz molecular 13X.

Tabla 5.4. Conversión de DAG y rendimiento a CPC al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando BCL con y sin tratamiento para remover el agua en el catalizador.

Tabla 5.5. Sustitutos comerciales de grasas alimentarias, usos y composición de ácidos grasos. Comparación con la mezcla nutricional obtenida en este capítulo.

Tabla 5.6. Distribución posicional de ácidos grasos en triglicéridos alimentarios.

Tabla 5.7. Composición de la mezcla en la esterificación de dicaprina con ácido oleico.

Tabla 6.1. Factores evaluados y respuestas obtenidas en la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 de acuerdo al diseño experimenta 1 (DE1).

Tabla 6.2. Factores evaluados y respuestas obtenidas en la etanolisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 de acuerdo al diseño experimenta 2 (DE2).

Tabla 6.3. Entalpías de formación (ΔH°_f) para las conformaciones seleccionadas para cada uno de los triglicéridos estudiados.

Tabla 7.1. Determinación de azufre por ICP-AES en las distintas etapas de proceso de inmovilización.

Tabla 7.2. Factores experimentales establecidos y reactivos consumidos durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

Tabla 7.3. Factores experimentales establecidos y productos generados durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

Tabla 7.4. Factores experimentales establecidos y parámetros evaluados durante esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano a 6 h de reacción.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Estereoquímica de los carbonos del glicerol en un triglicérido.

Figura 1.2. Representación de la energía de activación para una reacción con y sin enzima.

Figura 1.3. Representación del mecanismo de reacción de lipasas.

Figura 1.4. Especificidad de las lipasas en hidrólisis y esterificación (R1, R2 y R3 = ácidos grasos/acilos).

Figura 1.5. Diglicéridos enantiómeros, los cuales puede reconocer una lipasa estereo-específica.

Figura 1.6. Mezcla física de triglicéridos y triglicéridos estructurados obtenidos por hidrólisis y posterior re-esterificación.

Figura 1.7. Síntesis enzimática de triglicéridos estructurados por reacciones de (a) interesterificación y (b) acidólisis.

Figura 2.1. Esquema de los temas más importantes presentados en la metodología experimental.

Figura 2.2. Adsorción de glicerol en gel de sílice. Derecha = gel de sílice, Izquierda = gel de sílice con glicerol adsorbido.

Figura 2.3. Equipo experimental. Baño termostático con controlador de temperatura y agitador magnético.

Figura 2.4. Viales de reacción conteniendo los reactivos en 2 mL de *n*-heptano.

Figura 2.5. Neutralización del ácido cáprico no reaccionado.

Figura 2.6. Etapas de separación que comprende el proceso de extracción líquido-líquido.

Figura 2.7. Inmovilización de lipasa de *Burkholderia cepacia*. Izquierda = inmovilización, derecha = catalizador obtenido.

Figura 3.1. Típico cromatograma de los productos de reacción y reactivos no consumidos en la esterificación enzimática de glicerol y ácido cáprico usando Lipozyme RM IM. El 1 y El 2: patrones de calibración interna (El 1 = 1,2,4-butanotriol, El 2 = tripalmitina). Condiciones experimentales: glicerol: 250 mg (adsorbido en gel de sílice), temperatura: 60 °C y enzima: 20 mg, tiempo de reacción: 6 h.

Figura 3.2. Esquema de reacción para la esterificación de glicerol con ácido cáprico usando Lipozyme RM IM.

Figura 3.3. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático (Ec. 3.3) para conversión de ácido cáprico: (a) factores glicerol y temperatura, E = 40mg; (b) factores glicerol y enzima, T = 60 °C, (c) factores temperatura y enzima, G = 50 mg.

Figura 3.4. Superficie de respuesta utilizando un modelo de segundo orden para fracción de monocaprina en producto de reacción de esterificación de glicerol con ácido cáprico utilizando Lipozyme RM IM.

Figura 3.5. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático para fracción de dicaprina en el producto de reacción: (a) factores glicerol y temperatura, E = 20mg; (b) factores glicerol y enzima, T = 40 °C.

Figura 3.6. Superficies de respuesta utilizando modelo cuadrático para fracción de tricaprina en el producto de reacción: (a) factores glicerol y temperatura, E = 40mg; (b) factores glicerol y enzima, T = 60 °C.

Figura 3.7. Selectividad y rendimiento a dicaprina. (a) Modelo de segundo orden para selectividad a dicaprina; factores: glicerol (G) y la temperatura (E), enzima 20 mg, (b) modelo de segundo orden para el rendimiento a dicaprina.

Figura 3.8. Gráficos de superficies de respuesta para las fracciones de isómeros de diacilglicerol. (a) fracción de 1,2-dicaproilglicerol, (b) fracción 2,3-dicaproilglicerol, y (c) fracción de 1,3-dicaproilglicerol.

Figura 3.9. Gráficos de superficie de respuesta para las funciones de deseabilidad resultantes de: (a y b) maximización de X_{AC} , Y_{DAG} , σ_{DAG} , %DAG y 1,3-DAG, y la minimización de %MAG, % TAG, 1,2-DAG y 2,3-DAG, (c) maximización de X_{AC} , y 1,3-DAG y minimización de 1,2-DAG y 2,3-DAG.

Figura 3.10. Isomerización (migración de acilo) de 1,2-DAG (a) y 2-MAG (b).

Figura 3.11. Mecanismo de isomerización de acilo para 1,2 DAG a 1,3 DAG. Se destaca en rojo la estructura del intermediario cetol.

Figura 3.12. Esquema de 1,3-DAG con OH del C2 posicionado cerca de la Histidina. I) Migración de acilos con participación de la Serina y II) migración de acilos mediada por la distribución de cargas del entorno de la tríada catalítica.

Figura 3.13. Migración de acilos en 1,3-dicaprina. Coordinación a través de la posición sn-1, a) formación de 1,2-dicaprina y b) generación de 2,3-dicaprina.

Figura 3.14. Esquema de migración de acilo en 1,3 DAG con OH de C2 posicionado hacia el lado de la Serina.

Figura 3.15. Representación tridimensional de la coordinación de 1,3-diacetina con la Serina de la tríada catalítica. a) Interacción a través del acilo en posición sn-3 y b) interacción a través del acilo en posición sn-1.

Figura 3.16. Migración de acilos luego de la coordinación de monoglicéridos con la acil enzima. a) generación de 2,3-dicaprina y b) formación de 1,2-dicaprina.

Figura 4.1. Cromatogramas correspondientes a las muestras de reacción de esterificación antes y después de la neutralización en dos etapas con solución 0.1M de KOH. La muestra inicial contenía 52 mg de ácido cáprico, 4 mg de monocaprina, 28 mg de dicaprina y 12 mg de tricaprina.

Figura 4.2. Esquema y resultados de la primera etapa de extracción.

Figura 4.3. Esquema y resultados de la segunda etapa de extracción

Figura 4.4. Esquema y resultados de la tercera etapa de extracción

Figura 5.1. Cromatogramas correspondientes a reactivos (Negro) y productos (Rojo) al llevar a cabo la esterificación enzimática de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. El: estándar de calibración (tricaprilina).

Figura 5.2. Esquema del desempeño de los biocatalizadores en la reacción de esterificación de dicaprina con ácido palmito.

Figura 5.3. Concentraciones de reactivos y productos en función del tiempo de reacción para la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* empleando tamiz molecular 13X como metodología de control.

Figura 5.4. Productos formados, agrupados de acuerdo a la reacción por la cual fueron generados al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando diversos catalizadores, tiempo de reacción = 12 horas.

Figura 5.5. Principales triglicéridos sintetizados mediante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico empleando diversos catalizadores, tiempo de reacción = 12 horas.

Figura 5.6. CGC consumido y CGP generado (se incluye la formación de CPP con fines comparativos) al llevar a cabo la esterificación de dicaprina con ácido palmítico por 12 horas empleando diferentes catalizadores.

Figura 5.7. Concentración de glicéridos deseados, indeseados y ácidos grasos libres luego de 12 horas de reacción con diferentes catalizadores.

Figura 5.8. Concentración de triglicéridos, diglicéridos deseados y glicéridos no deseados luego de 12 horas de reacción con diferentes catalizadores y luego de separar los ácidos grasos libres.

Figura 5.9. Ácido cáprico y palmítico potencialmente liberados durante el metabolismo de la mezcla nutricional obtenida con cada catalizador. Comparación con el máximo porcentaje de ácido palmítico liberado durante la digestión de la grasa de leche materna humana (LMH).

Figura 5.10. Concentración de ácido palmítico presente en los glicéridos que componen la mezcla nutricional y concentración de este ácido en posición sn-2 de esos glicéridos. Comparación con la concentración de ácido palmítico en posición sn-2 en la grasa de leche vacuna

Figura 5.11. Síntesis de CPC por esterificación de 2-monopalmitina con ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM. a) Inicio de la reacción, b) 15 minutos de reacción

Figura 5.12. Síntesis de CCP por esterificación de 1,2-dicaprina con ácido palmítico catalizada por Lipozyme RM IM. a) Inicio de la reacción, b) 15 minutos de reacción

Figura 5.13. Cromatogramas para muestras del producto final de la reacción de síntesis de CPC y de CCP. Referencias: Negro: muestra con CPC, Rojo: muestra con CCP.

Figura 5.14. Cromatogramas correspondientes a la mezcla nutricional (Negro) y al producto de la hidrólisis de la misma con PPL (Azul).

Figura 5.15. Cromatogramas correspondientes a la mezcla nutricional (Negro) y al producto de la etanólisis de la misma con Novozym 435 (Azul).

Figura 5.16. Región de carbono carbonílico (172-174 ppm) del espectro de ^{13}C a 300 MHz de una muestra de aceite de oliva. Se indican las resonancias de cadenas saturadas (S), oleil (O) y linoleil esterificadas en posiciones sn-1/sn-3 y sn-2.

Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H de tripalmitina.

Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C de tripalmitina.

Figura 5.19. Espectro de RMN de ^{13}C de tripalmitina, zona de carbonos carbonílicos.

Figura 5.20. Espectro de RMN de ^1H de CGC y CCG.

Figura 5.21. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG.

Figura 5.22. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG mostrando la región de carbonos carbonílicos.

Figura 5.23. Espectro de RMN de ^{13}C de CGC y CCG ampliación de la región de carbonos carbonílicos.

Figura 5.24. Espectro de RMN de ^1H de CPC y CCP.

Figura 5.25. Espectro de RMN de ^{13}C de CPC y CCP.

Figura 5.26. Espectro de RMN de ^{13}C de CPC y CCP, región de carbonos carbonílicos.

Figura 5.27. Espectro de RMN de ^1H de COC y CCO.

Figura 5.28. Espectro de RMN de ^{13}C de COC y CCO.

Figura 5.29. Espectro de RMN de ^{13}C de COC y CCO, región de carbonos carbonílicos.

Figura 6.1. Representación de la primera etapa de la etanólisis de triglicéridos catalizada por lipasas.

Figura 6.2. Cromatograma típico de los reactivos y productos de reacción en la etanólisis enzimática de tripalmitina utilizando Novozym 435. GGG = glicerol, EtP = etil palmitato, GPG = 2-monopalmitina, PGG = 1-monopalmitina, PPG = 1,2-dipalmitina,

PGP = 1,3-dipalmitina, PPP = tripalmitina y EI = estándar de calibración interna (tricaprilina). Condiciones experimentales del ensayo catalítico: tripalmitina: 100 mg, etanol: 2 mL, temperatura: 60 °C, enzima: 20 mg, tiempo de reacción: 60 min.

Figura 6.3. Esquema de la etanólisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435.

Figura 6.4. Cromatogramas para evaluar migración de acilo durante el almacenamiento. En negro la muestra al finalizar la reacción y en rojo la muestra luego de 48 h de almacenamiento a -20 °C.

Figura 6.5. Estructura esquemática de trioleína y tripalmitina cerca de la Serina del sitio activo.

Figura 6.6. Variación en la conversión de triglicéridos durante la etanólisis catalizada por Novozym 435 luego de 90 minutos de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

Figura 6.7. Variación en la fracción molar de 1,2-DAG en la etanólisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

Figura 6.8. Variación en la fracción molar de 2-MAG en la etanólisis de triglicéridos catalizadas por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

Figura 6.9. Variación en la fracción molar de FAEE en la etanólisis de triglicéridos catalizada por Novozym 435 después de 90 min de reacción. Variables: carga biocatalizador y longitud de la cadena del triglicérido. Referencias: a) DE1, b) DE2.

Figura 6.10. Gráficos de superficie de respuesta para la función de deseabilidad maximizando conversión, fracción molar de etil ésteres y fracción molar de glicerol en la etanólisis de triglicéridos para un tiempo de reacción de 90 min. Variables: carga de biocatalizador y longitud de cadena de los triglicéridos. Referencias: a) DE1, b) DE2.

Figura 6.11. Gráfico de superficie de respuesta para la función de deseabilidad maximizando la formación de 2-MAG. a) etanólisis de triacetina considerando variaciones en la carga de biocatalizador y el tiempo de reacción, b) etanólisis de triglicéridos luego de 90 min de reacción, considerando el efecto de la longitud de cadena de los triglicéridos y la carga de biocatalizador.

Figura 6.12. Representación esquemática de tripalmitina (a) y trioleína (b) en la superficie de CALB (posición A), cerca de la Serina (posición C) y situado en la entrada del túnel hacia la tríada catalítica de CALB (posición B).

Figura 6.13. Representación esquemática de triacetina (sin hidrógenos) en: a) Posición I, b y c) Posición II y d) Posición III.

Figura 6.14. Intermediarios de reacción de triacetina con la tríada catalítica de CALB. a) Triacetina, b) intermediario por coordinación a través de la posición sn-1, c) intermediario por coordinación a través de la posición sn-3.

Figura 6.15. Intermediarios de reacción de diacetina con la tríada catalítica de CALB. a) 1,2-diacetina, b) 1,3-diacetina, c) intermediario por coordinación de 1,2-diacetin a través de la posición sn-1, d) intermediario por coordinación de 1,3-diacetin a través de la posición sn-3 y e) intermediario por coordinación de 1,3-diacetin a través de la posición sn-1.

Figura 7.1. Monómeros de celulosa, quitina y quitosano.

Figura 7.2. Secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Burkholderia cepacia*. La gráfica fue obtenida de *Protein Data Bank (PDB)*.

Figura 7.3. Espectro FTIR de quitosano con identificación de las bandas.

Figura 7.4. Espectros DRIFTS de la lipasa de *Burkholderia cepacia* y del quitosano.

Figura 7.5. Espectros DRIFTS de la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada y del quitosano.

Figura 7.6. Típico cromatograma de los productos de reacción y reactivos no consumidos en la esterificación enzimática de dicaprina y ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia*. El: patrón de calibración interna. Condiciones experimentales: dicaprina = 50 mg, relación ácido palmítico/dicaprina = 3:1, temperatura = 40 °C y enzima = 150 mg, tiempo de reacción = 6 h.

Figura 7.7. Cromatogramas de una muestra extraída directamente del sistema de reacción (Negro) y una muestra extraída luego del agregado de piridina (Rojo). En el recuadro se amplía la región donde se observa la **elución** de glicerol.

Figura 7.8. Conversión de CGC al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un

dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura.

Figura 7.9. Conversión de CCG al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

Figura 7.10. Consumo de ácido palmítico al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

Figura 7.11. Variación en el número de micromoles de 1-monocaprina al realizar la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación P/Dicaprina = 3:1.

Figura 7.12. Ácido cáprico generado por hidrólisis durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

Figura 7.13. Generación de glicerol por hidrólisis durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 1:1 y c) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar P/Dicaprina = 3:1.

Figura 7.14. Formación de monopalmitina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar fija 3:1.

Figura 7.15. Generación de 1-caproil-3-palmitoil glicerol + 1-caproil-2-palmitoil glicerol durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de

Burkholderia cepacia inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación dicaprina:ácido palmítico y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

Figura 7.16. Generación de dipalmitina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación molar ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

Figura 7.17. Generación de tricaprina durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación molar ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar fija 3:1.

Figura 7.18. Formación de 1-caproil-2,3-dipalmitoil glicerol durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

Figura 7.19. Generación de 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol por esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura llevando a cabo la reacción con la mayor proporción de ácido palmítico evaluada en este estudio.

Figura 7.20. Selectividad porcentual a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol generados durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

Figura 7.21. Rendimiento porcentual a 1,3-dicaproil-2-palmitoil glicerol + 1,2-dicaproil-3-palmitoil glicerol generados durante la esterificación de dicaprina con ácido palmítico catalizada por la lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre quitosano. a) Variables: relación ácido palmítico/dicaprina y temperatura para un

dosaje de biocatalizador de 100 mg, b) Variables: masa de biocatalizador y temperatura para una relación molar ácido palmítico/dicaprina = 3:1.

Figura 7.22. Gráfico de superficie de respuesta para función de deseabilidad maximizando los micromoles de ácido palmítico consumidos, los micromoles de 1,3-dicaprina convertidos y el rendimiento a CPC + CCP, y minimizando la generación de ácido cáprico y glicerol. a) variables: masa de lipasa inmovilizada y temperatura, manteniendo fija la relación ácido palmítico/dicaprina (3:1) y b) variables: masa de lipasa inmovilizada y relación ácido palmítico/dicaprina, manteniendo fija la temperatura en 40 °C.