

Estudio de la regioselectividad de la fracción insoluble en agua del látex de *Araujia sericifera*

Sánchez, Daniel A.,^{1,3*} Tonetto Gabriela M.,^{1,3} Ferreira, María L.^{2,3}

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

2. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

3. Planta Piloto de Ingeniería Química – PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

E-mail: dsanchez@plapiqui.edu.ar

Palabras Claves: látex de *Araujia sericifera*, lipasas, glicéridos, regioespecificidad

Resumen

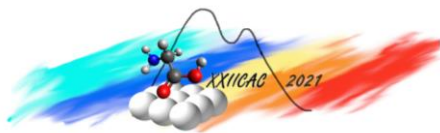
La regioselectividad de la fracción sólida con actividad lipasa obtenida del látex de *Araujia sericifera* fue evaluada en la hidrólisis de tricaprilina y en la esterificación de glicerol y ácido caprílico.

El biocatalizador derivado del látex mostró alta 1,3-especificidad. En la reacción de hidrólisis la posición *sn*-3 fue la preferentemente atacada para generar el 1,2-diglicérido y luego la hidrólisis de la posición *sn*-1 permitió la obtención del 2-monoglicérido. Por otro lado, la posición *sn*-1 fue la preferencialmente esterificada en la reacción entre glicerol y ácido caprílico, luego la posición *sn*-3 del 1-monoglicérido generado es esterificada para producir el 1,3-diglicérido.

Abstract

The regioselectivity of the solid with lipase activity obtained from the latex of *Araujia sericifera* was evaluated in the hydrolysis of tricapylin and in the esterification of glycerol and caprylic acid.

The latex-derived biocatalyst showed high 1,3-specificity. In the hydrolysis reaction, the *sn*-3 position was the one preferentially attacked to generate the 1,2-diglyceride and then the hydrolysis of the *sn*-1 position generated the 2-monoglyceride. On the other hand, the *sn*-1 position was preferentially attacked in the esterification of glycerol with caprylic acid, then the *sn*-3 position of the 1-monoglyceride was esterified to produce the 1,3-diglyceride.



Introducción

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas ampliamente utilizadas a nivel industrial debido a su capacidad de catalizar varias reacciones no solo en medio acuoso sino también en medios restringidos en agua, como esterificación, interesterificación y transesterificación [1]. Las lipasas se pueden obtener de fuentes animales, vegetales y microbianas. Las lipasas obtenidas de plantas se consideran una alternativa muy interesante por su bajo costo, disponibilidad en fuentes naturales y porque no es necesario producirlas mediante técnicas de biología molecular [2]. Las lipasas vegetales se encuentran en la fracción insoluble del látex de plantas de familias como Asclepiadaceae, Moraceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Caricaceae y Bromeliaceae. En este sentido, la fracción insoluble en agua del látex de *Araujia sericifera* (Apocynaceae) ha demostrado una interesante actividad lipasa. Recientemente, la actividad enzimática de este sólido ha sido evaluada frente a numerosos sustratos bajo diferentes condiciones de reacción [3-5].

La regioselectividad o regioespecificidad es una de las características más interesantes de las lipasas, de especial importancia en la síntesis y modificación de triglicéridos. Es la capacidad de las lipasas para reconocer las diferentes posiciones en la cadena carbonada del glicerol [6]. La mayoría de las lipasas son 1,3-específicas o inespecíficas, solo unas pocas lipasas se han informado como *sn*-2 específicas [7] o *sn*-3 específicas [8]. La regioespecificidad depende de la lipasa, el sustrato y las condiciones de reacción.

En este trabajo se estudia por primera vez la regioselectividad del sólido obtenido a partir del látex de *Araujia sericifera*. El análisis de la regioespecificidad es sumamente importante para la aplicación de las lipasas en la obtención de diglicéridos y triglicéridos estructurados con alto valor desde el punto de vista nutricional y médico.

Experimental

Extracción del látex de Araujia sericifera

La extracción del látex de *Araujia sericifera* se realizó siguiendo una metodología previamente reportada [3]. Los frutos de *Araujia sericifera* fueron recolectados en plantaciones naturales del área rural de Salliqueló, Provincia de Buenos Aires, Argentina (36° 45' 00" S, 62° 55' 59" W). El látex se extrajo de los pecíolos del fruto y se recogió en una solución de 5 mmol L⁻¹ de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mantenida en un baño de hielo. El extracto se centrifugó (8000 rpm, 15 min) y la fracción insoluble obtenida se secó en estufa a 40 °C. El sólido seco obtenido se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Evaluación de la regioselectividad del biocatalizador derivado del látex

La hidrólisis de tricaprilina y la esterificación de glicerol fueron las reacciones seleccionadas para evaluar la regioselectividad del biocatalizador con actividad lipasa obtenido a partir de la fracción insoluble del látex de *Araujia sericifera*.

La hidrólisis de tricaprilina se realizó siguiendo una metodología previamente reportada [3]. Para ello, se colocaron 1 mmol de tricaprilina, 10 mmol de agua y 1 ml de n-heptano en viales de 10 ml. Los viales se llevaron a baño termostático a 30 °C y una vez alcanzada la temperatura de reacción, la misma se inició con la adición de 10% en peso del sólido del látex (con respecto a la masa de tricaprilina). La reacción se llevó a cabo durante 90 min bajo agitación magnética a 600 rpm y se tomaron muestras de 50 µl cada 30 min para ser analizadas por cromatografía de gases.

La esterificación de glicerol y ácido caprílico se realizó en las condiciones óptimas reportadas para la esterificación de glicerol y ácido cáprico catalizada por Lipozyme RM IM [9]. Para ello, se adsorbieron 250 mg de glicerol sobre 500 mg de gel de sílice y este sólido se colocó en un vial de 10 ml junto con 110 mg de ácido caprílico y 3 ml de n-heptano. La reacción se llevó a cabo durante 6 horas, a 60 °C y con agitación magnética a 600 rpm, se inició con la adición de 10 mg de biocatalizador derivado del látex y después de 3 horas de reacción se agregaron otros 10 mg del biocatalizador. Una vez que se

alcanzó el tiempo de reacción establecido, se tomó una muestra de 50 μl para ser analizada por cromatografía de gases. Para el análisis cromatográfico, las muestras se diluyeron con piridina y se sililaron con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) y su análisis se realizó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer AutoSystem XL siguiendo una metodología previamente publicada [8]. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

Resultados y discusión

La regioselectividad del biocatalizador obtenido del látex de *Araujia sericifera* fue evaluada en dos reacciones sumamente importantes en las que se emplean lipasas: hidrólisis de triglicéridos y esterificación de glicerol.

La Figura 1 muestra el perfil de reactivos y productos en la hidrólisis de tricaprilina en función del tiempo de reacción. La conversión de este triglicérido alcanzó el 70% en un tiempo tan corto como 30 min y permaneció alrededor del 75% después de 90 min de reacción. No se observó acumulación de glicéridos parciales y la concentración de ácidos grasos libres aumenta a medida que avanza el tiempo de reacción.

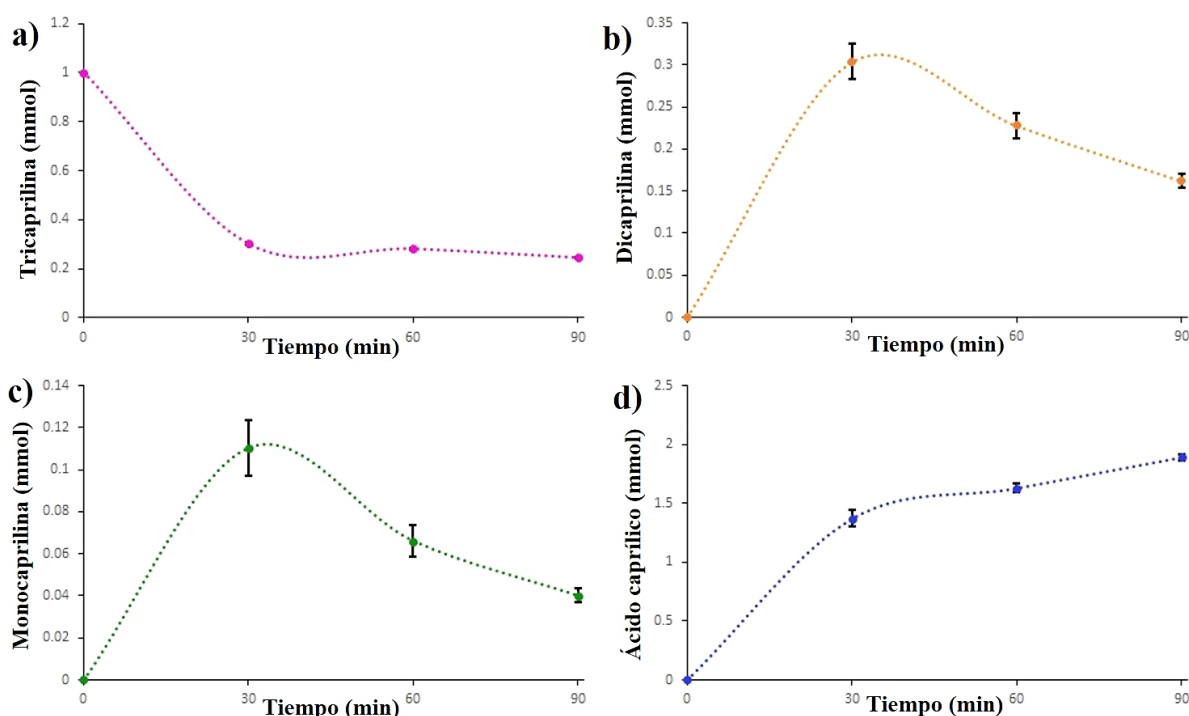


Figura 1. Productos generados y reactivos consumidos en función del tiempo durante la hidrólisis de tricaprilina catalizada por la fracción sólida del látex de *A. sericifera*: a) contenido de tricaprilina, b) contenido de dicaprilina, c) contenido de monocaprilina y, d) ácido caprílico liberado.

La Figura 2 muestra el porcentaje relativo de isómeros para cada uno de los glicéridos parciales. El biocatalizador derivado del látex de *A. sericifera* hidrolizó principalmente la posición *sn*-3 del triglicérido, generando altas proporciones de 1,2-dicaprilina (Figura 2a). Después de 30 min de reacción, la fracción de 1,2-dicaprilina fue superior al 83% y este porcentaje permaneció por encima del 75% incluso en tiempos de reacción prolongados. La concentración de 1,2-diglicérido se redujo debido a la hidrólisis de la posición *sn*-1 para dar 2-monocaprilina y también debido a la isomerización (migración de acilos) que suele ser importante después de los primeros minutos de reacción y cuando el grado de hidrólisis supera el 15%.

La fracción de 1,2-dicaprilina obtenida para la hidrólisis de tricaprilina catalizada por el sólido del látex es similar, e incluso superior, a las fracciones de este glicérido reportadas para la hidrólisis catalizada por los extractos crudos de semillas de *Jatropha mahafalensis* y *Adansoni grandidieri*, reconocidas como 1,3-específicas [10].

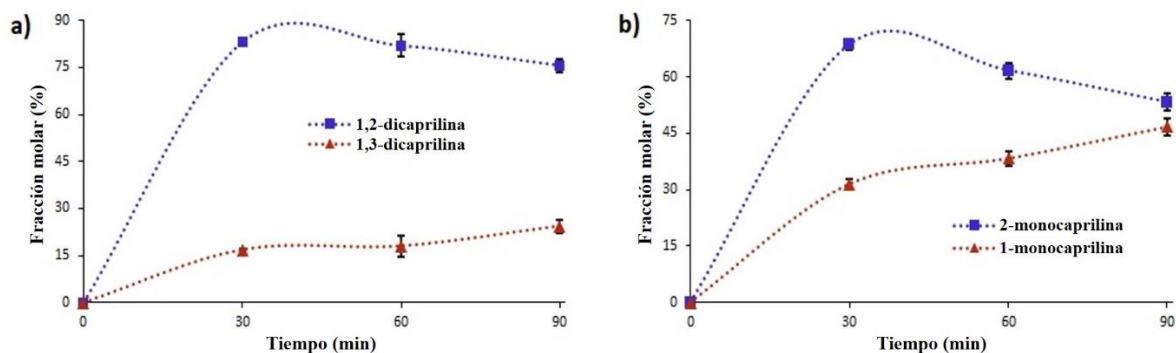


Figura 2. Variación en el tiempo de la fracción molar de los isómeros de cada uno de los glicéridos parciales generados en la hidrólisis de tricaprilina catalizada por la fracción sólida del látex de *A. sericifera*, a) fracción molar de isómeros de dicaprilina y b) fracción molar de isómeros de monocaprilina.

La Figura 2b muestra el perfil de isómeros de monocaprilina en función del tiempo de reacción. En tiempos breves se observa una alta proporción de 2-monocaprilina, monoglicérido generado por la acción de las lipasas 1,3-específicas. A medida que avanza la reacción, se observa un aumento en la fracción de 1-monocaprilina a expensas de una reducción en la fracción de 2-monocaprilina. La generación del 1-monoglicérido está asociada con: a) la migración de acilo (isomerización) desde la posición *sn*-2 a *sn*-1 del monoglicérido, que se considera una reacción no enzimática, y b) la hidrólisis de la posición *sn*-3 de 1,3-dicaprilina generada por la isomerización de la 1,2-dicaprilina.

El biocatalizador con actividad lipasa obtenido a partir de la fracción sólida del látex de *A. sericifera* hidrolizó preferentemente la posición *sn*-3 de tricapriline para generar 1,2-dicaprilina en una alta proporción y luego, la posición *sn*-1 del diglicérido fue hidrolizada para generar 2-monocaprilina. En la Figura 3 se muestra un cromatograma, con la correspondiente identificación de compuestos, para una muestra de la hidrólisis de tricapriline después de 30 min de reacción.

La columna cromatográfica utilizada tiene la capacidad de identificar isómeros de glicéridos parciales en función de la posición del grupo hidroxilo [9], de esta forma fue posible identificar y cuantificar los isómeros de mono y diglicéridos. En la Figura 3 se muestra una ampliación de los picos correspondientes a los diglicéridos y en esta se puede observar la fracción mayoritaria de 1,2-dicaprilina.

También fue estudiada la regioselectividad de este biocatalizador con actividad lipasa en la esterificación de glicerol y ácido caprílico. Después de 6 horas de reacción, la conversión del ácido fue ligeramente inferior al 20%. La inhibición de la actividad enzimática probablemente se produjo debido al glicerol, ya que este polirol es desplazado del gel de sílice por la adsorción de compuestos de látex.

La Tabla 1 muestra la fracción molar de los glicéridos generados a partir de la reacción de esterificación.

Tabla 1. Fracción molar de acilglicéridos generados por la esterificación de glicerol y ácido caprílico catalizada por el sólido obtenido del látex de *A. sericifera*.

Glicéridos	Fracción molar, %
Monocaprilina	11.9 ± 1.4
Dicaprilina	57.2 ± 1.5
Tricaprilina	30.8 ± 2.9

Incluso para esta baja conversión del ácido, la regioselectividad del biocatalizador fue considerablemente alta. Las fracciones relativas de 1-monocaprilina y 1,3-dicaprilina fueron 94,4% y 93%, respectivamente (Tabla 2).

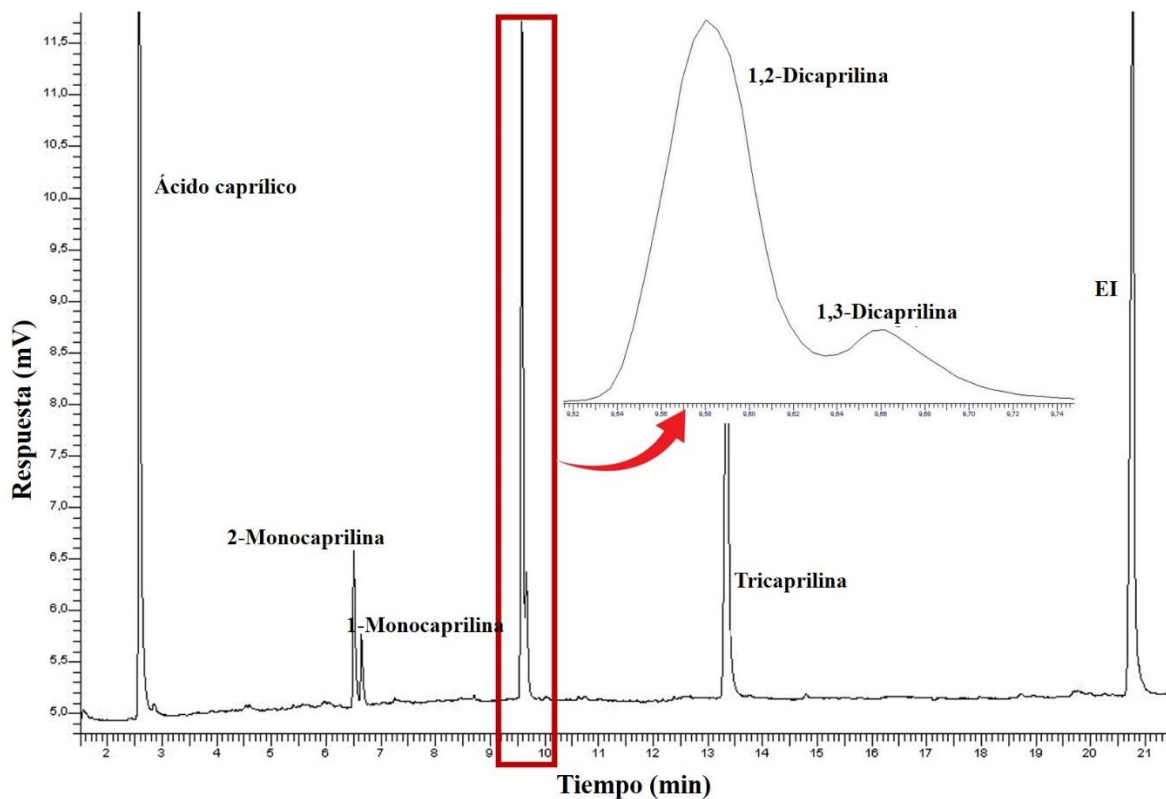


Figura 3. Cromatograma correspondiente a una muestra de la reacción de hidrólisis de tricapriline catalizada por la fracción sólida del látex de *A. sericifera*. Tiempo de reacción: 30 min.

Table 2. Fracción molar de isómeros de monocaprilina y dicaprilina generados por la esterificación de glicerol y ácido caprílico catalizada por el sólido obtenido del látex de *A. sericifera*.

Glicéridos parciales	Fracción molar, %
2-Monocaprilina ^a	5.6 ± 0.1
1-Monocaprilina ^a	94.4 ± 0.1
1,2-Dicaprilina ^b	7.0 ± 0.6
1,3-Dicaprilina ^b	93.0 ± 0.6

a: fracción del isómero respecto al total de monoglicéridos, b: fracción del isómero respecto al total de diglicéridos.

La alta regioespecificidad mostrada por el biocatalizador derivado del látex de *A. sericifera* en la reacción de esterificación de glicerol es similar a la reportada bajo las mismas condiciones para Lipozyme RM IM [9], un biocatalizador comercial obtenido de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, ampliamente reconocido como 1,3-regioespecífico. La Figura 4 muestra el cromatograma de una muestra obtenida de la reacción de esterificación de glicerol con ácido caprílico catalizada por la fracción sólida del látex de *A. sericifera* luego de 6 horas de reacción. La figura muestra claramente la regioespecificidad del biocatalizador, así como la liberación de glicerol al medio de reacción, compuesto que pudo haber limitado el avance de la reacción.

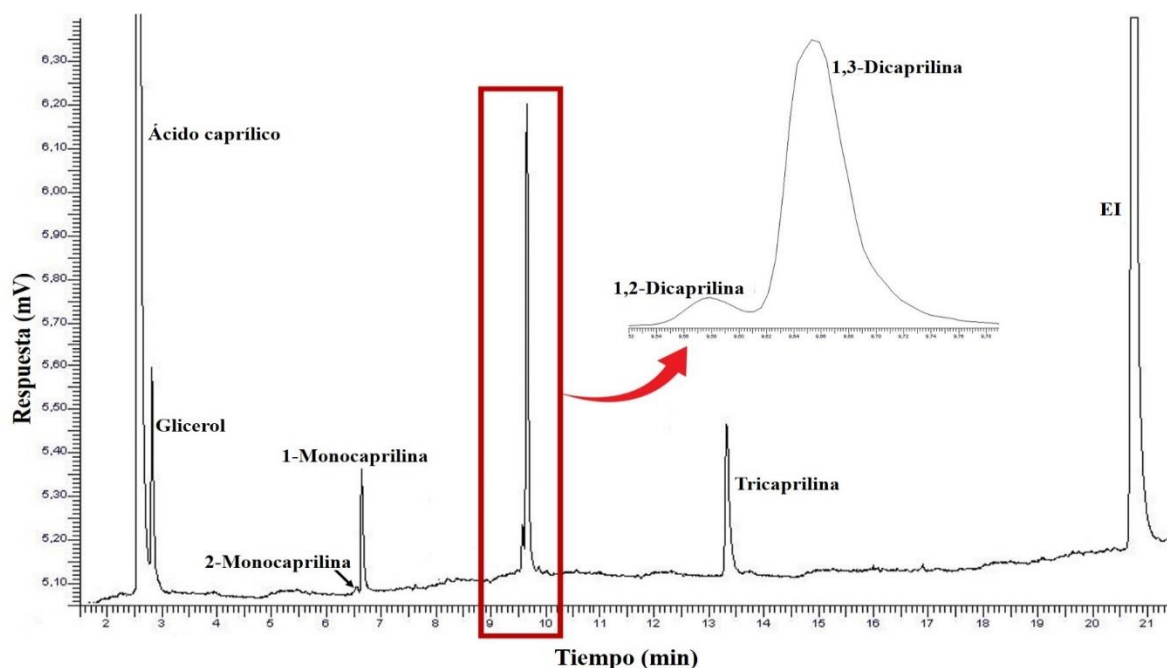


Figura 4. Cromatograma correspondiente a una muestra de la reacción de esterificación entre glicerol y ácido caprílico catalizada por el sólido obtenido a partir del látex de *A. sericifera*.

Conclusiones

La fracción sólida derivada del látex de *Araujia sericifera* mostró una alta especificidad hacia las posiciones *sn*-1,3. En la reacción de hidrólisis, la posición *sn*-3 de tricaprilina fue preferentemente atacada generando 1,2-dicaprilina en altas proporciones, luego la posición *sn*-1 del diglicérido es hidrolizada para generar 2-monocaprilina. En la esterificación de glicerol, la posición *sn*-1 es preferencialmente esterificada para generar 1-monocaprilina, luego, la posición *sn*-3 del monoglicérido es esterificada para generar altas proporciones de 1,3-dicaprilina. Tanto en reacción de hidrólisis como en la esterificación, el rendimiento a glicéridos específicos se ve reducido por la isomerización (migración de acilos) que se vuelve importante cuando la conversión supera el 15% y el tiempo de reacción es superior a los 15 min.

Referencias

- [1] K.-E. Jaeger, T. Eggert; Curr. Opin. Biotechnol. 13 (2002) 390-397.
- [2] U. Mishra, R. Kandali; Indian J. Agric. Biochem. 32 (2019) 123-131.
- [3] D. A. Sánchez, S. R. Morcelle, M. E. Fait, G. M. Tonetto, M. L. Ferreira; Fermentation 5 (2019) 18.
- [4] Matkovic S. R., Nilsson J. F, Fait M. E., Morcelle S. R., Briand L. E.; Catal Lett 146 (2016) 2341-2347.
- [5] P.S. Mateos, M.B. Navas, S.R. Morcelle, C. Ruscitti, S.R. Matkovic, L. E. Briand; Catal. Today 372 (2021) 211-219.
- [6] X. Tong, P. K. Busk, L. Lange; Biotechnol. Appl. Biochem. 63 (2015) 471-478.
- [7] R. R. C. Monteiro, J. J. Virgen-Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, T. N. da Rocha, J. C. S. dos Santos, A. R. Alcántara, R. Fernandez-Lafuente, R; Catal. Today 362 (2021) 141-154.
- [8] N. C. Mhetras, K. B. Bastawde, D. V. Gokhale; Bioresour. Technol. 100 (2009) 1486-1490.
- [9] D. A. Sánchez, G. M. Tonetto, M. L. Ferreira; J. Mol. Catal. B Enzym. 100 (2014) 7-18.
- [10] P. A. Nanssou Kouteu, B. Baréa, N. Barouh, J. Blin, P. Villeneuve; J. Agric. Food Chem. 64 (2016) 8838-8847