

¹H RMN: Una herramienta rápida para la cuantificación de la etanolisis sin solvente del aceite de coco mediante *resting cells* fúngicas

¹H NMR: A quick tool for the quantification of the solvent-free ethanolysis from coconut oil by fungal *resting cells*

Edinson Yara-Varón^I, Jordi Eras^I, Mercè Torres^{II}, Ramon Canela-Garayoa^I

Resumen: Los ésteres etílicos de ácidos grasos (EE) de aceite de coco tienen amplias aplicaciones tanto en la industria de los aromas como en la industria de las fragancias. En este trabajo se muestra cómo se puede monitorizar el progreso de la síntesis de EE sin solvente utilizando dos *resting cells* fúngicas (*Aspergillus flavus* y *Rhizopus oryzae*) mediante resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN). El método es simple, rápido, eficaz y permite la cuantificación del material de partida (TAG), los EE y los diversos productos intermedios (monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) y los ácidos grasos libres (AG)) en 3 min y sin necesidad de preparar ningún derivado. Para determinar el contenido de cada uno de los productos de la reacción, en las muestras de crudo resultantes de diversas condiciones experimentales, se desarrolló una ecuación. Los resultados fueron similares a los obtenidos mediante cromatografía de gases.

Palabras clave: RMN espectroscopía, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus oryzae*.

Abstract: Fatty acids ethyl esters (EE) from coconut oil have wide applications in the flavors and fragrances industries. This paper shows how monitoring the progress of the synthesis of EE in a solvent-free system using two fungal resting cells (*Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*) by proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR). The method is simple, fast, effective and it allows the quantification of starting material (TAG), the EE and various intermediates (monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols

I Departamento de Química, ETSEA, Universidad de Lleida, Rovira Roure, 191, 25198-Lleida, España.

II Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ETSEA, Universidad de Lleida, Rovira Roure 191, 25198-Lleida, España. canela@quimica.udl.cat; Tel: +34 973702843. Fax: +34 973238264.

(DAG) and free fatty acids (FFA)). The results are obtained in 3 min without preparing any derivative. An equation was developed to determine each product of the reaction from the crude samples, resulting from different experimental conditions. The results were similar to those obtained by gas chromatography.

Keywords: NMR spectroscopy, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus oryzae*.

1. INTRODUCCIÓN

Los ésteres etílicos de ácidos grasos tienen diversas aplicaciones como materias primas para la fabricación de aromas y fragancias que son empleados en la industria alimentaria, cosmética, y farmacéutica.

Muchos de los compuestos en el mercado actual de los aromas se producen por síntesis química, por fermentación o por medio de extracción a partir de fuentes vegetales y animales. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el interés por la síntesis de este tipo de productos a través de biocatalizadores (Vandamme and Soetaert, 2002), todo esto debido a la gran demanda de ésteres de carácter natural empleados como aromas, los cuales a menudo son caros y escasos (Xu et al., 2002).

Muchos reportes sobre la catálisis enzimática de ésteres usados como aromas han demostrado que la esterificación enzimática, en comparación con las reacciones químicas tradicionales donde se usan catalizadores alcalinos, puede tener ciertas ventajas, tales como: condiciones suaves de reacción, mayor especificidad, mayor estabilidad, alta selectividad con menos subproductos y catálisis de una amplia gama de sustratos (Yara-Varón et al., 2012). La síntesis de EE se lleva a cabo utilizando lipasas, este tipo de enzimas catalizan una gran variedad de reacciones con una amplia gama de sustratos, incluyendo alcoholisis, hidrólisis, interesterificación y transesterificación (Solarte et al., 2014). En particular, las reacciones catalizadas por lipasas son consideradas una de las reacciones más eficientes para la producción de biodiesel y productos de valor añadido, tales como 2-monoacilglicerol (MAG), y ácidos grasos poliinsaturados de alta pureza tales como ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido gama-Linolénico (GLA) (Zhao et al., 2012).

Aunque el uso de enzimas extracelulares inmovilizadas presenta ventajas, tales como el aumento de la estabilidad y la posibilidad de re-uso, estas requieren de métodos complejos para su separación, purificación y estabilización, lo cual aumenta el coste del proceso a escala industrial. Una alternativa al uso de enzimas inmovilizadas es el uso de las *resting cells* fúngicas, las cuales ofrecen una ventaja importante, ya que pueden

ser utilizadas directamente como biocatalizador y no necesitan el costoso proceso de aislamiento, purificación e inmovilización. Las hifas fúngicas retienen diferentes tipos de enzimas y puede ser inmovilizadas mediante el crecimiento de los hongos sobre un sustrato sólido, constituyendo un biocatalizador natural (Ferrarezi et al., 2014).

Por otra parte, el proceso de análisis de los diferentes productos de una reacción requiere de una gran inversión de tiempo y de recursos, que por lo general conllevan al incremento de los costes de producción a escala industrial. Una herramienta rápida, eficaz y versátil es la espectroscopía de RMN. El empleo de ^1H -RMN permite el análisis de los diferentes productos de la reacción en poco tiempo (unos 3 min) y sin necesidad de llevar a cabo el procesamiento de las muestras como ocurre con la cromatografía de gases (GC-FID) en donde muchas veces se tiene que realizar la derivatización de los productos como paso previo a su análisis. Además el análisis cromatográfico mediante GC-FID en general requiere de mucho más tiempo, sin permitir la diferenciación rápida entre los distintos tipos de glicéridos y de ácidos grasos libres.

Así, en el presente trabajo, la espectroscopía de RMN se usó como una alternativa para analizar y cuantificar los productos de transesterificación en la producción de EE a partir del aceite de coco y mediante el empleo de dos *resting cells*.

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Procedimiento para la preparación de las *resting cells* fúngicas.

Dos *resting cells* fúngicas, *A. flavus* (CECT 20475) y *R. oryzae* (CECT 20476), fueron depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjassot, Valencia-España). Los microorganismos se mantuvieron en agar patata dextrosa (PDA) a 4 °C. Los micelios fúngicos se cultivaron en un medio líquido sintético siguiendo el método de Torres et al., (2000). Los micelios fueron separados del medio de cultivo por filtración usando un embudo Buchner, después fueron lavados tres veces con agua destilada seguido por tres lavados con acetona. Finalmente, los micelios se liofilizaron durante 18 h y se trituraron.

2.2 Síntesis de EE catalizada por lipasas

Resting cells de *A. flavus* y *R. oryzae* se emplearon para catalizar la reacción de transesterificación del aceite de coco (1 mmol) y del etanol (3 mmol). La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 24 h, a 900 rpm y sin solvente. La reacción se detuvo mediante la separación por filtración de las *resting cells* del crudo de reacción.

2.3 Experimentos de RMN

Los productos (EE, AG, 1-MAG, 2-MAG, y DAG) y el aceite de coco natural, que no ha reaccionado (TAG), contenidos en la mezcla de reacción se analizaron por RMN. Experimentos de ^1H - y ^{13}C -RMN se realizaron en un espectrómetro Varian AS400 operando a 400 y 101 MHz para los experimentos de ^1H y ^{13}C , respectivamente. También se llevó a cabo un experimento para determinar la correlación entre los protones y los carbonos (HSQC) de cada producto. Todos los experimentos se desarrollaron a 25°C usando 20 mg de cada una de las muestra disueltos en 700 μL de CDCl_3 .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis cualitativo y cuantitativo por RMN

La síntesis de los EE se realizó empleando aceite de coco, etanol y dos diferentes *resting cells* (Figura 1). Esta reacción de transesterificación se llevó a cabo sin emplear disolvente y a temperatura ambiente (25°C). Los crudos de reacción de los diferentes ensayos realizados se analizaron, inicialmente, mediante un experimento de ^1H -RMN.

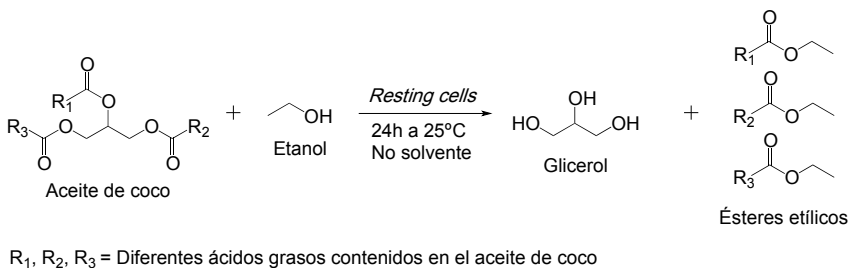


Figura 1. Esquema de la reacción de etanolisis del aceite de coco mediante el empleo de dos *resting cells* fúngicas sin emplear solvente.

En la Figura 2 se muestran los espectros de ^1H -RMN del material de partida (aceite de coco) y de los crudos de las reacciones de la transesterificación empleando las dos *resting cells* por separado y una mezcla 1 a 1 de los dos biocatalizadores. En esta gráfica también se indican las señales características que nos permiten identificar cada uno de los productos. En la Tabla 1 se muestra a que compuesto corresponde cada una de las letras (a-h) mostradas en los espectros de ^1H -RMN.

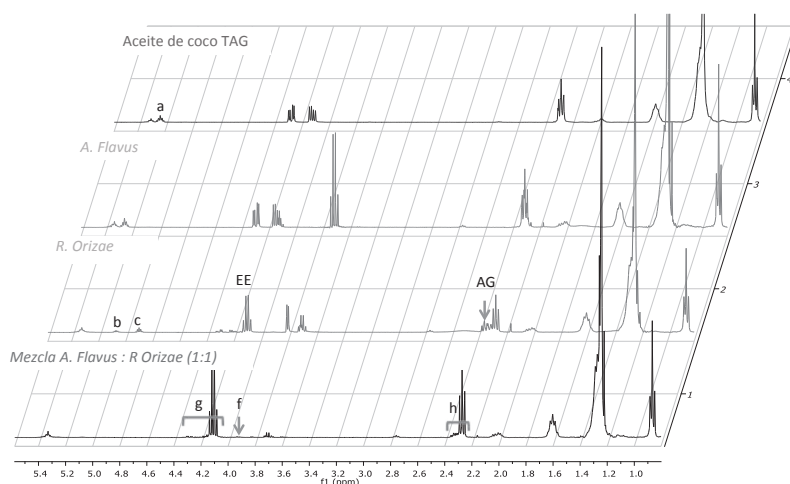


Figura 2. Espectros de ^1H -RMN en CDCl_3 del aceite de coco y de diferentes reacciones de transesterificación.

Compuesto	I_M^*
TAG	a
1,2-DAG	b
2-MAG	c
EE	$d = \frac{g}{2} - (2a + b + f)$
AG	$e = \frac{h - g}{2} - (a + b + c)$
1-MAG	f
OCH_2 (a, b, d, f)	g
CH_2COO (a, b, c, d, e)	h

$$\%M = \frac{I_M}{\sum_{i=a}^f I}$$

* El valor de la integración correspondiente a 1H del compuesto indicado.

Tabla 1. Identificación de las señales correspondientes a cada compuesto y ecuaciones usadas para la cuantificación de los EE, AG y del porcentaje total (%M) de cada producto.

Las señales identificadas con las letras *a*, *b*, *c* y *f* (Figura 2), que corresponden a los compuestos determinados en la tabla 1, integran para un protón característico de cada compuesto, por lo tanto, el valor de la integral de esa señal se utiliza para cuantificar dicho producto. Por otra parte, las señales identificadas con letras EE y AG corresponden a señales que se pueden usar para determinar y cuantificar los ésteres

etílicos y los ácidos grasos libres presentes en el crudo de reacción. Sin embargo, estas señales no se pueden emplear directamente para la cuantificación debido a que en este mismo desplazamiento químico se encuentran señales de otros productos.

Así, en la región de desplazamiento químico donde se encuentra la señal EE (4,05-4,35 ppm) también aparecen señales identificadas como *g* que corresponden a protones de varios compuestos (TAG, 1,2-DAG y 1-MAG). Respecto a la señal AG, en la misma región (2,25-2,4 ppm) se encuentran otras señales identificadas como *h* que corresponden a protones de otros compuestos (EE, TAG, 1,2-DAG, 2-MAG y 1-MAG). Teniendo en cuenta estos aspectos, nosotros hemos desarrollado las ecuaciones identificadas como *e* y *d* que nos permiten realizar la cuantificación de los ésteres etílicos y de los ácidos grasos libres producto de la reacción a partir de los valores de las integrales de cada una de las señales mencionadas en cada ecuación.

Por otra parte, con muestras provenientes de los ensayos de transesterificación con los mayores rendimientos se realizaron experimentos de ^{13}C -RMN. La Figura 3 muestra la presencia de una señal a 173,7 ppm y otra a 177,2 ppm que corresponden a los grupos carboxilo del éster etílico y del ácido graso libre respectivamente. Con ello se corrobora la presencia de ambos compuestos en dichas muestras.

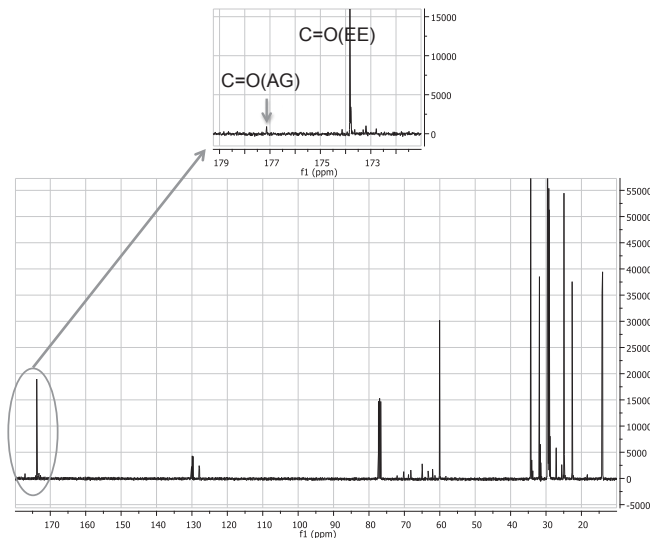


Figura 3. Espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 del crudo de reacción de la transesterificación del aceite de coco indicando las señales correspondientes de los grupos carboxilo de los ésteres etílicos (EE) y de los ácidos grasos libres (AG) presentes en la muestra.

Otro experimento que nos permitió corroborar la presencia de los diferentes productos en el crudo de reacción de la transesterificación del aceite de coco y el etanol fue el ^1H - ^{13}C HSQC-RMN (Figura 4). Este experimento en dos dimensiones (2D-RMN) permite la combinación de un espectro de ^1H y un espectro de ^{13}C y la determinación de la correlación de los enlaces C-H, es decir, se puede observar que H está unido a que C.

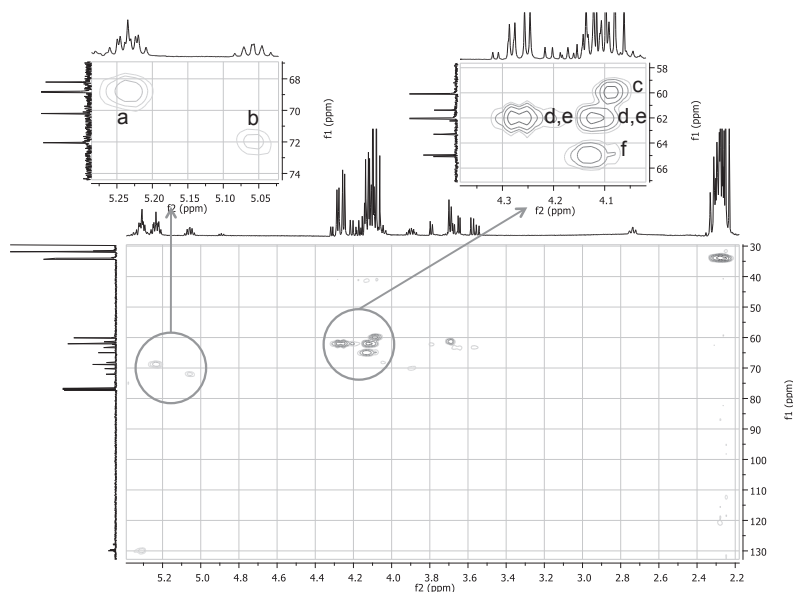


Figura 4. Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC-RMN en CDCl_3 del crudo de reacción de la transesterificación del aceite de coco indicando la correlación de las señales del ^1H y de ^{13}C de los diferentes productos de la reacción. Las señales de color azul corresponden a CH y las de color rojo pueden ser tanto CH_2 como CH_3 .

3.2 Síntesis de EE

Las dos *resting cells* fúngicas empleadas en la síntesis de los EE mostraron diferente actividad lipásica. En la tabla 2 se muestran los resultados de las reacciones de transesterificación estudiadas. Cuando se empleó *A. flavus* se observó una menor actividad enzimática comparada con la actividad mostrada por el *R. oryzae*, la cual fue aproximadamente 7 veces mayor. Este comportamiento puede ser debido a que el *R. oryzae* contiene lipasas 1,3 específicas que catalizan mejor las reacciones con ácidos grasos de cadena larga (Gog et al., 2012).

Biocatalizador	Mezcla	Rendimiento (%)
<i>A. flavus</i>	1:0	7,8±1,2
<i>R. oryzae</i>	0:1	55,6±2,4
<i>A. flavus</i> : <i>R. oryzae</i>	1:1	85,4±3,5

Tabla 2. Actividad enzimática de las *resting cells* fúngicas empleadas en la síntesis de EE. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 24 h, a 900 rpm y sin emplear solvente.

En relación a las lipasas producidas por el *A. flavus*, diversos trabajos han mostrado su preferencia por ácidos grasos de cadena corta. Por otra parte, en un trabajo previo realizado por Solarte et al. (2014), se puso de manifiesto que la cepa de *A. flavus* utilizada en el presente estudio, permite la síntesis de alcoholes secundarios. Por lo tanto, es posible que por una parte la actividad enzimática de este biocatalizador, cuando se emplea solo, se vea afectada por la estructura de los TAG del aceite de coco, y por otra parte que la mejora observada en el rendimiento de la reacción cuando se emplea mezclado con un enzima 1,3 específico, como es el caso de *R. oryzae*, sea debido a que se combina la capacidad de hidrolizar las posiciones extremas del TAG que tiene *R. oryzae* con la capacidad de reaccionar con los ésteres de alcoholes secundarios de *A. flavus*. Aproximaciones semejantes ya han sido descritas empleando enzimas comerciales inmovilizadas (Lee et al., 2006).

Cuando se realizó la reacción de transesterificación empleando una mezcla 1:1 de las dos *resting cells* fúngicas el rendimiento fue superior al 85%. Este resultado, posiblemente, es debido a que existe una mayor disponibilidad de sustrato para las lipasas de *A. flavus*. Esto ocurre a medida que la reacción se desarrolla, es decir, se lleva a cabo la hidrólisis y esterificación de los ésteres del triacilglicérido en posición 1,3 por parte de las lipasas del *R. oryzae*. Asimismo, a medida que ocurre la transesterificación se lleva a cabo también la isomerización de los monoglicéridos de posición 2 a posición 1 o 3, facilitando la actividad enzimática de las *resting cells* fúngicas.

4. CONCLUSIONES

La metodología desarrollada en este trabajo ha permitido la monitorización y cuantificación de la etanolisis del aceite de coco mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN), un método simple, rápido y eficaz. La reacción de transesterificación se llevo a cabo sin emplear solvente y utilizando dos *resting cells* fúngicas. Asimismo, hemos desarrollado una ecuación para determinar el contenido de TAG,

DAG, MAG, EE y FFA presentes en las muestras provenientes de los ensayos de transesterificación con mayores rendimientos.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado en parte por una subvención de la Secretaría de Estado de Política Científica y Tecnológica del Ministerio de Educación y Cultura Española (número de concesión del contrato: CTQ2009-14699-C02-01). Los autores agradecen al Vicerrectorat de Recerca de l'Universitat de Lleida (España) por la beca de la UdL.

6. REFERENCIAS

- Ferrarezi, A.L., Hideyuki Kobe Ohe, T., Borges, J.P., Brito, R.R., Siqueira, M.R., Vendramini, P.H., Quilles, J.C., Jr., da Costa Carreira Nunes, C., Bonilla-Rodriguez, G.O., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E. (2014). Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. *J Mol Catal B-Enzym* 107, 106–113. doi:10.1016/j.molcatb.2014.05.012
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., Irimie, F.D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy* 39, 10–16. doi:10.1016/j.renene.2011.08.007
- Lee, D.H., Kim, J.M., Shin, H.Y., Kang, S.W., Kim, S.W. (2006). Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11, 522–525.
- Solarte, C., Yara-Varón, E., Eras, J., Torres, M., Balcells, M., Canela-Garayoa, R. (2014). Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. *J Mol Catal B-Enzym* 100, 78–83.
- Torres, M., Barbosa, E., Loscos, V., Canela, R. (2000). Lipase activity of resting cells of *Aspergillus flavus* after solvent washing; memory effects from endogenous substrate arising from the original growth medium. *Biotechnol Lett* 22, 1265–1268.
- Vandamme, E.J., Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 1323–1332. doi:10.1002/jctb.722
- Xu, Y., Wang, D., Mu, X.Q., Zhao, G.A., Zhang, K.C. (2002). Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *J Mol Catal B-Enzym* 18, 29–37. doi:10.1016/S1381-1177(02)00056-5

Yara-Varón, E., Eras Joli, J., Torres, M., Sala, N., Villorbina, G., Méndez, J.J., Canela-Garayoa, R. (2012). Solvent-free biocatalytic interesterification of acrylate derivatives. *Catal Today*, 2012 doi:10.1016/j.cattod.2012.02.055.

Zhao, T., Kim, B.H., Hong, S.I., Yoon, S.W., Kim, C.-T., Kim, Y., Kim, I.-H. (2012). Lipase-catalyzed production of pinolenic acid concentrate from pine nut oil using a recirculating packed bed reactor. *J. Food Sci.* 77, C267–71. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02562.x

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Edinson Yara-Varón, Jordi Eras, Mercè Torres, Ramon Canela-Garayoa. ¹ H RMN: Una herramienta rápida para la cuantificación de la etanolisis sin solvente del aceite de coco mediante <i>resting cells</i> fúngicas. <i>Revista Tumbaga</i> (2014), 9 vol. I, 99-108	Día/mes/año 01/12/2013	Día/mes/año 03/04/2014