

Universidad Nacional de Rosario Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas



Instituto de Química Rosario
(IQUIR-CONICET-UNR)

*“Esterilglucósidos, subproductos de la
producción de biodiesel, como una nueva
materia prima industrial”*

Autor: Lic. Renzo Carlucci

Director: Dr. Guillermo R. Labadie

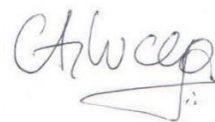
2024

“Esterilglucósidos, subproductos de la producción de biodiesel, como una nueva materia prima industrial”

Renzo Carlucci

Licenciado en Química, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Unidad Orgánica del Instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET) y en el Área Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril del 2019 y el 4 de octubre de 2024, bajo la dirección del Dr. Guillermo R. Labadie.



Renzo Carlucci
D.N.I. 37.230.428



A Paula

Por su amor y apoyo incondicionales. Gracias por ayudarme a seguir caminando hacia mis sueños, aún en épocas de tempestades.



Al Prof. Guillermo R. Labadie

*Por darme el espacio para
crecer como científico y
acompañarme durante todos estos
años.*

Agradecimientos

A los hermanos que me ha dado la vida: Facundo, Abel y Exequiel. Por estar siempre a mi lado, a través del espacio y el tiempo.

A mi mamá Carina, por compartirme su espíritu inquebrantable y el calcio de sus huesos. Por la educación que logró darme, con esfuerzo y sacrificio. Este trabajo está hecho con tanto amor y dedicación como el que ella supo darme.

A todas las personas que formaron parte de mi día a día durante todos estos años con quienes compartimos tristezas y alegrías: Gaby, Fede, Nati, Noe, Miguel, Ale, Sol, Pablito, Lu, Maru y Toni. Gracias por su compañía, empatía y gran sentido del humor.

A mis compañeras de Medicinal: Nadia, Tata, Mai, Lu, Agus y Cari. Por mostrarme nuevos caminos en la docencia.

A nuestros colaboradores: Dr. Juan Arancibia, Dr. Ariel Quiroga, Dra. Carla Comanzo y Dra. Natalia Lisa. Por los trabajos fructíferos compartidos.

A mis tutores de doctorado: Dr. Sebastián Simonetti, Dr. Ernesto Mata y Dra. Andrea Bracca. Por su tiempo y dedicación brindados.

A los CPA Lic. Guillermo Marcuzzi, Ing. Sergio Tindiglia, Lic. Fernanda Villalonga, y Tec. Griselda Wollert.

A mis familiares y amigos. Por ser partícipes de esta aventura, dándome siempre aliento para seguir adelante.

A todos los miembros de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y del Instituto de Química Rosario. Por contribuir al funcionamiento de instituciones públicas, libres y de calidad que motorizan la Ciencia y Tecnología del país.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el otorgamiento de una beca doctoral durante este trabajo de tesis. Y por añadidura, al Pueblo argentino que alguna vez supo confiar en el desarrollo de un sistema científico de excelencia.

Índice

Resumen	i
Publicaciones.....	iii
Abreviaturas y símbolos	v
1. Introducción	1
1.1 Crisis socio-ambiental actual	1
1.2 Desarrollo sustentable	5
1.2.1 Química Verde	7
1.2.2 Química Circular	9
1.3. Biorrefinerías	11
1.4 Producción de biodiesel.....	13
1.5 Depósitos insolubles.....	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo general	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Resultados y discusión	19
3.1 Esterilglucósidos.....	19
3.1.1 Ocurrencia de glucósidos.....	19
3.1.2 Purificación de SGs.....	22
3.1.3 Pureza de SGs.....	27
3.1.4 Determinación de toxicidad de SGs <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	32
3.2 Fitosteroles de alta pureza	43
3.2.1 Hidrólisis de SGs.....	45
3.2.2 Hidrólisis con ácidos minerales.	48
3.2.3 Hidrólisis de SGs con ácido metansulfónico	60
3.2.4 Análisis comparativo de E-factors	78
3.2.5 Síntesis formal de 22-oxi esteroides	81
3.3 Esterilglucósidos peracilados.....	96
3.3.1 Sustitutos de grasas.....	96
3.3.2 Nuevos sustitutos de grasas	97
3.3.3 Preparación de derivados poliacilados de SGs	97
3.3.4 Ensayos de digeribilidad y viabilidad celular de PASGs	106
4. Conclusiones y estudios futuros	111
5. Referencias.....	113
6. Materiales y Métodos	127
7. Espectros seleccionados	173

Resumen

Las problemáticas globales derivadas de la alta dependencia de los productos petroquímicos han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles, destacándose la producción a partir de materias primas renovables. En Argentina, las biorrefinerías de soja han crecido significativamente en las últimas dos décadas, utilizando el aceite de soja para la producción de biodiesel. Este biocombustible, por su carácter de renovable, representa una opción viable para la transición hacia energías más limpias. Sin embargo, durante el almacenamiento a gran escala del biodiesel, se forman depósitos insolubles, principalmente debido a la presencia de esterilglucósidos, entre otros componentes minoritarios.

Para abordar este desafío, recuperamos esterilglucósidos de alta pureza (960 g) a partir de 9 kg de depósitos insolubles mediante un proceso de purificación que incluye lavados con solventes apolares y polares, seguidos de filtración por gravedad. La pureza de los esterilglucósidos, determinada por resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNc), fue superior al 98%. Además, recuperamos los solventes utilizados y el biodiesel ocluido en los depósitos. Ensayamos la viabilidad celular con células de hepatoma humano (Huh7) usando pruebas de MTT, y realizamos estudios *in vivo* para evaluar el impacto de la administración de SGs. Los resultados mostraron que las células mantenían su viabilidad y los estudios *in vivo* confirmaron la inocuidad del producto en las concentraciones ensayadas durante un mes de tratamiento.

En el desarrollo de métodos para obtener productos de alto valor agregado, diseñamos un proceso de hidrólisis para la obtención de fitosteroles a partir de SGs, usando inicialmente $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ como agente catalítico. Tras explorar distintas concentraciones de ácido y tiempos de reacción, determinamos que 18 horas eran necesarias para completar la reacción, logrando fitosteroles con un rendimiento del 95% y una pureza superior al 99%, confirmada por CG/MS y RMNc. Para mejorar la eficiencia y reducir el impacto ambiental, optimizamos la hidrólisis usando ácido metansulfónico (MSA). Empleamos un Diseño de Experimentos para identificar los factores significativos y obtuvimos una superficie de respuesta, escalando el proceso hasta 100 g de SGs y obteniendo fitosteroles con rendimientos superiores al 95% y pureza superior al 99%. Comparando los *E*-factors de métodos tradicionales con nuestro método, demostramos que el nuestro es más amigable con el ambiente.

Además, sintetizamos derivados 22-oxo-23,24-bisnor-esteroles debido a su importancia en el desarrollo de moléculas bioactivas. Protegimos el doble enlace interno de

los esteroides mediante la formación de ésteres metílicos internos, obteniendo los productos deseados con rendimientos superiores al 75%. Realizamos la ozonólisis para escindir el doble enlace exocíclico del estigmasterol, recuperando derivados de β -sitosterol y campesterol. Posteriormente, obtuvimos los derivados 22-aldehído y 22-OH con rendimientos superiores al 70%, demostrando la viabilidad de utilizar el estigmasterol para obtener derivados sintéticos de interés y recuperando β -sitosterol y campesterol.

También exploramos la síntesis de análogos de Olestra[®], un sustituto de grasas no calórico, utilizando SGs aislados como sustrato. Sintetizamos tetra-acetil-, tetralauril-, tetrapalmitoil- y tetraoleil-SGs mediante calentamiento asistido por microondas, logrando buenos rendimientos. Evaluamos la síntesis de derivados de acetilo y oleilo mediante síntesis mecanoquímica, obteniendo buenos rendimientos y reduciendo significativamente el uso de solvente y temperatura. Los productos fueron evaluados frente a células Huh7, demostrando que el derivado de oleilo no es tóxico en las concentraciones evaluadas. Queda pendiente la evaluación *in vivo* para determinar su viabilidad como sustituto de grasas no calóricas.

En conclusión, los depósitos de biodiesel representan una nueva fuente de SGs explotable industrialmente. Desarrollamos un método de purificación a escala de kilogramos para obtener productos de alto valor agregado. Obtuvimos fitosteroides de alta pureza mediante distintos ácidos a escala de gramos y demostramos su uso en la obtención de derivados sintéticos. Además, sintetizamos derivados de SGs con ácidos grasos como posibles sustitutos de grasas. Los SGs se constituyen así como una nueva plataforma derivada de soja para el desarrollo de productos de alto valor agregado, especialmente nutraceuticos y sustitutos de grasas no calóricas.

Publicaciones

En el transcurso de la presente Tesis se publicaron y presentaron los siguientes trabajos:

Artículos revisados por pares:

- **Renzo Carlucci**, Sebastián N. Jäger and Guillermo R. Labadie*. “Steryl glucosides recovered from biodiesel tank deposits are an excellent source of phytosterols”, *Industrial Crops and Products*, Volume 187, Part A, 115307, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115307>.
- **Renzo Carlucci**, **Gabriel Di Gresia**, María Gabriela Mediavilla, Julia A. Cricco, Babu Tekwani, Shabana Khanand and Guillermo R. Labadie*. “Expanding the scope of novel 1,2,3-triazole derivatives as new antiparasitic drug candidates”, *RSC Medicinal Chemistry*, Volume 14, 122, 2023, <https://doi.org/10.1039/d2md00324d>.
- **Exequiel Porta**, **María Sol Balari**, **Renzo Carlucci**, Shane Wilkinson, Guoyi Ma, Babu L. Tekwani and Guillermo R. Labadie*. “Systematic study of 1,2,3-triazolyl sterols for the development of new drugs against parasitic Neglected Tropical Diseases”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 254, 115378, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115378>.
- **Santiago M. Ruatta**, **Denis N. Prada Gori**, **Martín Fló Díaz**, ..., **Renzo Carlucci**, Noelia S. Medrán, Guillermo R. Labadie, ..., **Alan Talevi*** and **Marcelo A. Comini***. “Garbage in, garbage out: how reliable training data improved a virtual screening approach against SARS-CoV-2 Mpro”, *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14:1193282, <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1193282>.
- **Renzo Carlucci**, María-Natalia Lisa, and Guillermo R. Labadie*. “1,2,3-Triazoles in Biomolecular Crystallography: A Geometrical Data-Mining Approach”, *Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 66, 21, 14377–14390, 2023, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01097>
- **Renzo Carlucci**, Juan Arancibia, Guillermo R. Labadie*. “Environmentally friendly process for phytosterols recovery from residues of biodiesel production”, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, Volume 37, 101360, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101360>.
- **Alejandro Recio Balsells**, Renzo Carlucci, Simone Giovannuzzi, Fabrizio Carta, Claudiu T. Supuran, Babu L. Tekwani, Héctor R. Morbidoni*, Guillermo R. Labadie*. “Repurposing antiparasitic N,N'-aliphatic diamine derivatives as promising antimycobacterial agents”, *Archiv der Pharmazie*, e2400597, 2024, <https://doi.org/10.1002/ardp.202400597>.

Selección de publicaciones en actas de congresos, simposios y conferencias

- “Síntesis mecanoquímica de esterilglucósidos peracilados”. **Renzo Carlucci**, Matías Krivoy, Micaela Formentin, Guillermo R. Labadie* (IQUIR-CONICET). XXIV Simposio Nacional de Química Orgánica (SAIQO 2023). Poster.
- “Biodiesel production waste as a new biorefineries raw material”. **Renzo Carlucci**, Guillermo R. Labadie* (IQUIR-UNR). Virtual Summer School on Green Chemistry & Sustainable Energy (ACS 2021). Poster.
- “Aprovechamiento de desechos de la producción de biodiesel como una nueva materia prima para biorrefinerías”. **Renzo Carlucci**, Guillermo R. Labadie* (IQUIR-CONICET). XXIII Simposio Nacional de Química Orgánica (SAIQO 2021). Poster.
- “Toxicidad de esterilglucósidos aislados de fondos de tanque de la producción de biodiesel”. **Renzo Carlucci**, Guillermo R. Labadie* (IQUIR- CONICET), Carla Comanzo, Ariel Quiroga (IFISE- CONICET). XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (SAIQO 2019). Poster.

Abreviaturas y símbolos

AcOEt: Acetato de Etilo

AIE: Agencia Internacional de Energía

ASG: 6-O-acil-esteril glucósido (del inglés, *Acylated Steryl Glucosides*)

COP: Conferencia de las Partes: (del inglés, *Conference of the Parties*)

BC: Bioeconomía Circular

BD: Biodiesel

cLogP: Log P calculado

CMNUCC: Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

CO₂: Dióxido de carbono

DAG: diacilglicérido

DCM: Diclorometano

DMAP: Dimetilamino-piridina

DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DoE: Diseño de Experimentos (del inglés, *Design of Experiments*)

EA: Economía de Átomos

EC: Economía Circular

EtOH: Etanol

Et₂O: Dietiléter

EV: Economía Verde

E-factor: Factor medioambiental (del inglés *Environmental Factor*)

FAME: Esteres metílicos de ácidos grasos (del inglés, *Fatty Acid Methyl Esters*)

GEI: Gases de Efecto Invernadero

GC-FID: Cromatografía Gaseosa acoplada a Detector por Ionización a la Llama

GC-MS: Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas

GOT: Transaminasa glutamil-oxaloacética (del inglés, *Glutamic-Oxaloacetic Transaminase*)

GPT: Transaminasa glutamil-piruvato (del inglés, *Glutamic Pyruvic Transaminase*)

Hex: Hexano

Huh7: Células de hepatoma humano 7 (del inglés, *Human hepatome 7 cells*)

i-ME: metiléteres internos (del inglés, *internal Methyleters*)

LAG: Molienda asistida por líquido (del inglés, *Liquid-Assisted Grinding*)

LCA: Análisis de Ciclo de Vida (del inglés, *Life Cycle Asessment*)

LD₅₀: Dosis Letal del 50% (del inglés, *Letal dose 50%*),

LD₉₀: Dosis Letal del 90% (del inglés, *Letal dose 90%*)

MAGs: Monoacilglicéridos

MeOH: Metanol

MSA: Ácido Metansulfónico (del inglés, *Methanesulfonic Acid*)

MsCl: Cloruro de metansulfonilo o mesilo

MTBE: Metil-terbutil-éter

MtCO₂e: Millones de toneladas de CO₂ equivalente

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NaOAc: Acetato de sodio

NDC: Contribución Determinada a Nivel Nacional (del inglés, *Nationally Determined Contribution*)

PASGs: peracilesterilglucósidos

Pyr: Piridina (del inglés, *Pyridine*)

QC: Química Circular

QV: Química Verde

¹³C-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de carbono

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón

RMNc: Resonancia Magnética Nuclear cuantitativa

RSM: Metodología de Superficie Respuesta (del inglés, *Response Surface Methodology*)

SGs: Esterilglucósidos (del inglés, *Steryl Glucosides*)

Me₂S: Sulfuro de metilo

SPE: Extracción por fase sólida (del inglés, *Solid Phase Extraction*)

TAG: Triacilglicérido

TEA: Trietilamina

THF: Tetrahidrofurano

1,3,5-TMB: 1,3,5-trimetoxibenceno

TsCl: Cloruro de *p*-toluensulfonilo o tosilo



1. Introducción

1.1 La crisis socio-ambiental

A partir de Revolución Industrial, ha tenido lugar un periodo de más de 200 años de producción extractivista. Los paradigmas políticos, económicos y socioculturales han sostenido modos de producción lineales, basados en el proceso secuencial *"extraer-producir-emplear-desechar"*. Este enfoque de producción y consumo ha perdurado hasta la actualidad, aunque ha experimentado transformaciones en el contexto del capitalismo contemporáneo en el que vivimos.

A lo largo de este periodo, la extracción masiva de recursos naturales, la producción industrial intensiva y la creciente generación de residuos han provocado una alarmante contaminación ambiental, contribuyendo de manera significativa a la generación de cambios en el ambiente y el clima global.¹ La extracción desmedida de recursos naturales, como combustibles fósiles, minerales, maderas y la producción agropecuaria extensiva, han llevado a la disrupción de ecosistemas enteros, la pérdida de biodiversidad y la degradación de hábitats. Además, la explotación de estos recursos a gran escala ha contribuido a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), como el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O), intensificando el calentamiento global y ocasionando cambios climáticos que enfrentamos en la actualidad. Estos desafíos son parte de las problemáticas más urgentes que afronta la humanidad.

La acumulación de GEI, principalmente CO_2 , atrapa más calor en la atmósfera, produciendo un aumento de la temperatura promedio del planeta y desencadenando alteraciones meteorológicas, eventos climáticos extremos y el derretimiento acelerado de los glaciares.² Tales alteraciones se engloban bajo la idea de "cambio climático antropogénico",² comúnmente denominado "cambio climático". Asimismo, la contaminación del aire, el agua y los suelos han generado efectos adversos para la salud humana, la biodiversidad y los ecosistemas, afectando la calidad de vida y la sustentabilidad a mediano y largo plazo.

Es por ello que las problemáticas ambientales son tratadas a escala mundial. Desde 1992, casi todos los países del planeta se han reunido anualmente en cumbres climáticas, las cuales se denominan "Conferencia de las Partes" (COP, por sus siglas en inglés). En 2016 nuestro país manifestó su compromiso ambiental, a través de la Ley N° 27270, firmando el Acuerdo de París,³ el cual fue acuñado a finales del año 2015 como fruto de la 21° COP de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), llevada a cabo en la homónima ciudad. En virtud de este acuerdo, cada país se comprometió a

presentar un plan nacional, conocido como Contribución Determinada a Nivel Nacional (NDC, por sus siglas en inglés), en el que se detallen las medidas específicas que se adoptarán para enfrentar el cambio climático. Estos planes varían según las circunstancias y capacidades de cada país, pero en conjunto deben contribuir a mantener el aumento de la temperatura global muy por debajo de 2,0°C con respecto a los niveles preindustriales, y se hace un esfuerzo por limitarlo a 1,5°C.⁴ Actualmente el aumento en la temperatura mundial ha superado 1,0°C y se proyecta superar los 1,5°C para 2030 si no se toman medidas preventivas y correctivas de forma inmediata.⁵

En este sentido, nuestro país presentó ante la CMNUCC en el año 2015 su primer NDC, que fue revisada y actualizada en 2016. Posteriormente, en diciembre del 2020, la Argentina presentó ante la CMNUCC la segunda NDC, y en noviembre de 2021 la actualizó aumentando su ambición en el objetivo de mitigación.^{6,7}

En 2022, tuvo lugar la 27ª cumbre anual, o COP 27, siendo la penúltima llevada a cabo a la fecha. La COP 27 de la CMNUCC se basó en los resultados de la COP 26. Esta, fue llevada a cabo en 2022 en Glasgow. Allí, se ha remarcado de manera imperiosa la necesidad de reducir las emisiones de GEI, especialmente CO₂ y CH₄, con el objetivo de preservar un clima habitable y limitar el calentamiento global. La COP 26 reafirmó la alarma y preocupación por el aumento actual de 1,1°C en las temperaturas y la urgencia de implementar acciones más ambiciosas para alcanzar los objetivos del Acuerdo de París.⁸

En cuanto al CO₂, se destaca la importancia de intensificar la acción climática en esta década crítica. Siendo el principal GEI emitido, los países acordaron reducir sus emisiones en un 45% para 2030, buscando lograr reducirlas a cero hacia mediados de siglo. Se reconoce estos planes son insuficientes y se insta a los países a presentar planes nacionales más efectivos antes de lo previsto. En la segunda NDC, Argentina se comprometió a lograr una meta absoluta e incondicional, que abarca la totalidad del territorio nacional y a todos los sectores de la economía, de no exceder la emisión neta de 349 millones de toneladas métricas equivalentes de dióxido de carbono (MtCO₂e) en el año 2030. Esta nueva meta es un 27,7% más ambiciosa respecto de la primera NDC, de 2016.^{6,7}

En relación al CH₄, se logró un compromiso significativo a través del *Global Methane Pledge* (Compromiso Global por el Metano).⁹ Un total de 103 países, incluidos 15 grandes emisores, se adhirieron a este compromiso para limitar sus emisiones en un 30 % para 2030, en comparación con los niveles de 2020. Dado que este gas es un potente GEI, esta iniciativa busca minimizar la emisión de este contribuyente principal al calentamiento global.¹⁰

Además de estos compromisos, la COP 26 también abordó la reducción del uso de combustibles fósiles, especialmente el carbón. Aunque algunas decisiones relacionadas con el carbón se suavizaron en comparación con las expectativas más ambiciosas, se logró un

avance al pedir la reducción gradual del uso de esta fuente de energía y la eliminación de subsidios ineficientes a los combustibles fósiles. Resulta contradictorio que siendo estos últimos la mayor fuente de contaminación del mundo, su tratamiento sea el que reciba el trato más flexible. Sin embargo, a la luz de la profunda dependencia que tiene nuestra sociedad sobre este tipo de fuente de energía, es claro que las transiciones planteadas deben ser paulatinas, aun requiriendo celeridad, lo que justifica la flexibilización.

Se denominan fuentes de energía primarias cuando se extraen o capturan de la naturaleza, sea en forma directa, como en el caso de la energía hidráulica, eólica, solar, o después de un proceso de extracción o recolección, como el petróleo, biocombustibles, el carbón mineral, la leña, etc. Las secundarias son las que resultan de un proceso de transformación por medio de la aplicación de tecnología, como sería el caso de la generación de electricidad. Con las energías primarias se construye la matriz energética de un país, estableciéndose las diferentes fuentes energéticas de las que se dispone y su incidencia relativa en el total de la oferta. Las matrices se recalculan anualmente y sirven para realizar comparaciones interanuales dentro de un país, como así también dentro de una región o a nivel mundial.

Argentina es basta en recursos naturales energéticos, contando con hidrocarburos, capacidad de aprovechar energía hidráulica, eólica y solar, así como yacimientos de uranio. Sin embargo, su matriz energética se basa principalmente en el empleo de combustibles fósiles, tanto para fuentes primarias como secundarias de energía, en tanto que las fuentes de energía renovables muestran un incipiente desarrollo (**Figura 1.1**).¹¹ Esta fuerte dependencia sobre los combustibles fósiles proviene del intenso uso y consumo de derivados de petróleo que, combinado con la disminución de los recursos petrolíferos a nivel mundial, y el impacto generado por su uso y explotación, causan preocupaciones políticas y ambientales.

Estos combustibles desempeñan un papel fundamental en la generación de energía térmica (no nuclear) para la producción de electricidad, y en el consumo residencial e industrial a través de redes de gas. Además, son utilizados en el transporte y la industria bajo la forma de productos refinados. En particular, durante los últimos 10 años, el transporte ha mostrado las tasas de crecimiento más altas en lo que respecta a emisiones de GEI.

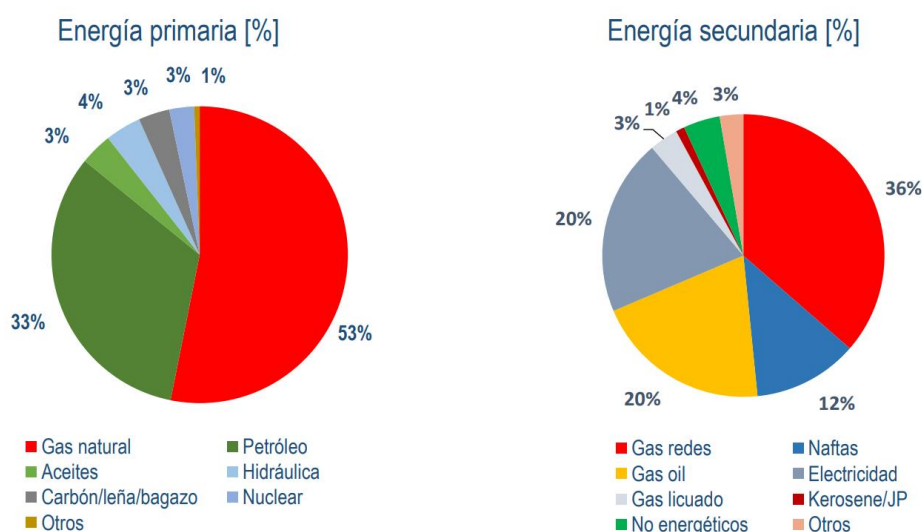


Figura 1.1. Matriz energética Argentina 2018. Reproducido de Caligari R., “¿Qué es la energía?”. Ministerio de Energía de la Nación.¹¹

Alcanzar las metas planteadas por la COP 26 impulsa la investigación científica con el objetivo de identificar las prácticas y factores que causan los problemas ambientales emergentes. Si bien se han identificado una gran cantidad de factores que contribuyen directa o indirectamente a los problemas ambientales globales, existe un consenso que el creciente consumo de energía, la rápida industrialización y la apertura comercial serían los tres factores más importantes.¹² En el caso de nuestro país, la demanda de energía está impulsada por el crecimiento de la población, el desarrollo económico y la gran extensión continental del territorio nacional. Esto último, a su vez, tiene un impacto directo en el consumo de combustibles para el transporte. Es importante mencionar que los recursos energéticos argentinos se encuentran principalmente concentrados en áreas alejadas de los centros de consumo, lo que requiere una infraestructura de transporte y distribución de energía altamente desarrollada para satisfacer la creciente demanda (gasoductos, oleoductos, rutas, hidrovías, etc.).

Según la segunda NDC presentada por Argentina en el año 2019 el transporte alcanzó el 33% del consumo de energía del país. Este elevado porcentaje se justifica en parte por la amplitud territorial y la dispersión geográfica de los focos productivos, lo que redundaría en grandes gastos energéticos en el transporte de cargas y pasajeros. El consumo de energía en este sector se cubrió con un 39% de gasoil, un 36% de nafta, un 12% de gas natural, un 9% de biocombustibles y un 4% de otros combustibles (**Figura 1.1**). En ese mismo año, la oferta total de energía primaria en el país fue de 81 mil ktep (kilo toneladas equivalentes de petróleo). De esta cantidad, el 87% provino de fuentes de energía no renovables, con el gas natural representando el 54%, el petróleo y sus derivados el 32%, y el carbón mineral el 1%.

Por otro lado, las energías hidráulica y nuclear contribuyeron con el 4% y el 3%, respectivamente. Las energías renovables no convencionales, como la proveniente de biomasa, los pequeños aprovechamientos hidroeléctricos, la energía eólica y la solar, representaron el 6%. Puede notarse que existen ejemplos que muestran una tendencia hacia modelos que permitan alcanzar los objetivos ambientales planteados para invertir la matriz energética actual. Sin embargo, todavía es necesario profundizar el empleo de prácticas no convencionales que permitan llevar a cabo procesos amigables con el ambiente.

1.2 Desarrollo sustentable

La comunidad científica ha enfatizado la urgencia de abordar de manera activa los desafíos ambientales que enfrenta nuestro planeta.¹³ Para ello, es crítico reducir el impacto ambiental de los sistemas de producción y consumo, a través de una transformación radical de los mismos, extendiéndose a todos los estratos sociales. Esta situación ha llevado a reconocer la necesidad de replantear los modelos de producción y consumo existentes. Sin embargo, no es una tarea fácil dado que la transición exigida involucra a numerosos actores de la sociedad.

No caben dudas de que existe una voluntad política manifiesta de la mayoría de los países del planeta para abordar tales desafíos. Sin embargo, en la actualidad solo el 55% de los países emisores de GEI han presentado planes concretos para lograr disminuir sus emisiones de carbono antes de 2030.¹³ El 45% restante ha pospuesto sus planes de neutralidad de carbono para 2050-2070. Por otro lado, si bien se busca estimular el empleo de procesos eficientes y rentables, priorizando las prácticas que salvaguarden el ambiente y sean sostenibles a largo plazo, muy pocas empresas han logrado alcanzar las metas ambientales propuestas.¹³ Más aún, el sector científico/tecnológico ha alertado a la comunidad política mundial sobre posibles consecuencias durante el escalado e implementación de las acciones de mitigación y adaptación planeadas.¹⁴ Así, la transición energética hacia modelos sustentables que sean amigables tanto con el ambiente, con las prácticas productivas/económicas, como con el colectivo social, sigue siendo un desafío en el que trabajar.¹⁵

En esta línea, es necesario evolucionar hacia sistemas de producción y consumo alternativos que permitan alcanzar la máxima eficiencia, minimizando los riesgos socioambientales y maximizando las ganancias económicas. Esto implica adoptar enfoques innovadores que integren la conservación de los recursos naturales, la eliminación/minimización de residuos producidos y la reducción de las emisiones contaminantes en todas las etapas de los procesos productivos. El concepto de "desarrollo

sostenible" surgió en 1987 como una respuesta a esta necesidad imperante.¹⁶ Este enfoque busca satisfacer las necesidades actuales del colectivo humano sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades. Desde entonces, las prácticas científicas y productivas han experimentado una transformación gradual en sus procesos, desplazándose hacia un paradigma consciente del ambiente y la sostenibilidad o sustentabilidad. Este último concepto merece ser considerado con detenimiento, dado que su uso y amplitud suele tomar una envergadura diferente según la disciplina desde donde se lo considere.¹⁷

Si bien es un concepto abierto, con una plétora de interpretaciones y nociones usualmente aplicables sólo a contextos específicos,¹⁷ la sustentabilidad ha sido definida como *la capacidad de mantener o mejorar el estado y disponibilidad de materiales o condiciones deseables a lo largo del tiempo*.¹⁸ En su visión, la sustentabilidad representa un concepto más amplio que el desarrollo sostenible. Mientras que el último se focaliza en el bienestar humano, el primero puede enfocarse en un aspecto ambiental concreto (teniendo o no en cuenta el bienestar humano) o bien en un aspecto específico de los sistemas humanos.¹⁸ A partir de estas definiciones, esta tesis buscará posicionarse en la "sustentabilidad tripartita" siendo esta la intersección del sostenimiento a largo plazo de las necesidades sociales, ambientales y económicas. Particularmente, para considerar una tecnología como sustentable, la misma debe cumplir dos condiciones.¹⁹ En primer lugar, el uso de recursos naturales debe ser a un ritmo tal que no comprometa los suministros correspondientes en el largo término. Y, en segundo lugar, los residuos deben ser generados a un ritmo que no comprometa su asimilación por parte del ambiente. Es evidente que los recursos no renovables de origen fósil están siendo explotados a un ritmo mayor al que pueden ser reemplazados por los procesos geológicos naturales y que la generación asociada de residuos no solo no logra ser asimilada por el ambiente, sino que modifica diversos ciclos naturales. Su uso puede considerarse entonces como insostenible en el largo término, pudiendo generar consecuencias irreversibles.¹⁹

Un hito significativo en el camino hacia un desarrollo sostenible fue la Acción de Prevención de la Contaminación promovida por los Estados Unidos en 1990, destacada como un catalizador fundamental para fomentar la conciencia ambiental.¹⁹ Esta legislación priorizó la prevención en la generación de residuos sobre el tratamiento de subproductos, sentando las bases para la aparición del concepto de "Química Verde" (QV) en el ámbito de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos durante la década de 1990.

En este escenario, se han desarrollado dos sistemas económicos que engloban las ideas enunciadas previamente: la Economía Verde (EV)¹ y la Economía Circular (EC)², desarrollados por la comunidad científica para abordar los desafíos ambientales y fomentar un enfoque más responsable en la producción y el consumo.

El concepto de EV es empleado hace más de 30 años en diversas áreas del conocimiento.²⁰ En la definición dada por Naciones Unidas durante la Conferencia *Rio+20* se describe a la EV como “una aproximación que busca, en principio, unir bajo una sola bandera todo el conjunto de políticas económicas y modos de análisis relevantes para el desarrollo sostenible”.²¹ Recientemente, la EV ha emergido como un paradigma que estimula vías de crecimiento que priorizan los objetivos ambientales.²² Este concepto, se centra en la idea de que el desarrollo económico debe estar en armonía con la protección y conservación del ambiente. Busca impulsar un desarrollo sostenible que no comprometa los recursos naturales ni genere impactos negativos en el entorno cercano o global. La transición hacia una EV implica promover prácticas y políticas que fomenten la eficiencia energética, la conservación de los recursos, el uso responsable de materiales y la minimización de la contaminación. En pocas palabras, la EV busca ser intrínsecamente baja en consumo de carbono, eficiente con los recursos empleados y socialmente inclusiva.²⁰

Por otro lado, la EC plantea una reevaluación del modelo de producción tradicional, basado en el concepto lineal de “*extraer-producir-emplear-desechar*”. En contraste, propone un enfoque donde los productos y materiales se mantienen en el ciclo económico durante el mayor tiempo posible, evitando su eliminación prematura y promoviendo su reutilización, reciclaje y regeneración. La EC busca cerrar los flujos de materiales y energía, reducir/eliminar la producción de residuos y minimizar el impacto ambiental asociado a la producción y el consumo de bienes y servicios.² De este modo, comulga con el paradigma de desarrollo sustentable que plantea la EV. Según Clark y col., será posible establecer una sinergia total entre los propósitos de la industria y la EC, cuando las prácticas químicas, tanto en contextos académicos como industriales, hayan modificado sus objetivos y se encuentren abocadas a cumplir con los propósitos de la EC.²³

1.2.1 Química Verde

En este contexto de creciente conciencia ambiental y necesidad de transición hacia prácticas más sostenibles, ha surgido un enfoque fundamental antes nombrado como “Química Verde” (QV).²⁴ Las Ciencias Químicas juegan un papel central en la concreción de una transición hacia un modelo de EC. La estrecha relación entre la QV y los objetivos para alcanzar un desarrollo sostenible han sido recientemente revisados en profundidad.²⁵ Prueba de ello son la abundante cantidad de publicaciones que relacionan conceptos englobados

bajo el término QV, que en su conjunto muestran la viabilidad para lograr una transición hacia prácticas sustentables tanto en aspectos ambientales, económicos como sociales.²⁵ En particular pueden destacarse los “12 principios” de la QV como el basamento teórico a partir de los cuales se ha construido conocimiento en diversos campos científicos.²⁶ Estos han sentado las bases para virar hacia un paradigma de desarrollo sostenible, aunque el impacto en el sistema de producción sigue siendo, en proporción, bajo. Anastas y col., definieron los 12 principios de la QV hace más de 25 años.^{26,27}

La QV se ha convertido en un enfoque clave en la investigación y la industria, promoviendo la adopción de procesos químicos y tecnologías que minimicen el uso de sustancias tóxicas, reduzcan el consumo de energía y recursos, eliminando o disminuyendo la generación de residuos y emisiones contaminantes. De este modo, la QV desafía a la comunidad química a diseñar y utilizar materiales y energía de una manera que aumente el rendimiento y el valor mientras se protege la salud humana y el ambiente.²⁵ De hecho, el propósito final de la QV es reducir los efectos negativos sobre la salud humana y el ambiente inherentes a la ejecución de prácticas químicas.²⁵ Esta filosofía ha impulsado la innovación en la síntesis de productos químicos, el diseño de materiales más sostenibles y la implementación de prácticas más responsables en diversos sectores industriales.

La QV, en línea con los conceptos de EV y EC, se enfoca en el diseño y desarrollo de procesos químicos y productos químicos que sean más sostenibles y amigables con el ambiente. Busca minimizar el uso y generación de sustancias tóxicas, reducir la demanda de recursos no renovables, optimizar la eficiencia energética y promover la utilización de materias primas renovables. La integración de la QV en los procesos industriales implica una transformación en la forma en que se conciben y se llevan a cabo las síntesis químicas, la selección de solventes, la gestión de residuos y la evaluación del impacto ambiental.^{28,29} Se promueve el uso de catalizadores más eficientes, la sustitución de productos químicos peligrosos por alternativas más seguras, la optimización de las condiciones de reacción y la minimización de la generación de residuos.

Se ha descrito a la Química Sustentable como el conjunto de desarrollos de sistemas químicos que apuntan a aplicar procesos químicos más seguros y amigables con el ambiente teniendo en consideración los impactos económicos y sociales que pueden generar los productos químicos durante todo su ciclo de vida.³⁰ En línea con ello, Chen y col. indicaron que la QV abraza tales aspiraciones poniéndola en marcha mediante la “guía de la práctica química hacia el empleo de síntesis más eficientes y amigables con el ambiente”.³⁰ Tales autores recalcan que es difícil diferenciar la QV y la Química Sustentable. Sin embargo, destacan que los 12 principios de la QV pueden constituir un conjunto de indicadores clave de rendimiento en lograr los objetivos del desarrollo sustentable. En resumidas cuentas, como

destacó el Prof. Roger A. Sheldon, la clave para alcanzar una “química verde y sustentable” es el uso de catálisis heterogénea, homogénea, organocatálisis y biocatálisis en síntesis orgánica, entre otros.¹⁹

Dado que un determinado producto puede ser obtenido mediante diferentes rutas procesales, es necesario contar con métricas que permitan cuantificar distintos aspectos ambientales considerando el ciclo productivo del mismo. Contar con herramientas que permitan comparar entre métodos diferentes para lograr un mismo producto hace posible ponderar cuán “verde” es un proceso, como métrica de sustentabilidad.

Existen métricas reconocidas por la comunidad académica que se usan desde décadas, como el *E-factor* (del inglés *Environmental Factor*; relación entre los kg de residuo generado por kg de producto obtenido)³¹ y la Economía de Átomos (EA, porcentaje en masa de átomos de los reactivos presentes en el producto deseado en una ecuación química balanceada).³² Las denominadas métricas univariadas (principalmente las basadas en medición de masas) pueden, si bien son una aproximación poco precisa, ser eficaces con fines comparativos.¹⁹ La EA y el *E-factor* han motivado a la comunidad química a considerar explícitamente la generación de residuos, además de los criterios más comunes como la convergencia sintética, el rendimiento químico y el costo de producción de productos.¹⁹

Usualmente, las métricas univariadas basadas en masas no son suficientes para lograr comparaciones detalladas de procesos.²⁸ En estos casos, o bien se suelen tener en cuenta métricas subjetivas cualitativas (ej. “alto consumo energético”, “gran cantidad de operaciones unitarias”, “uso de sustancias tóxicas”, etc), o se llevan a cabo análisis más extensos que consideran los ciclos completos de producción que involucran la fabricación de un producto. Entre este último tipo de aproximaciones podemos destacar los denominados Análisis de Ciclo de Vida (LCA, por sus siglas en inglés). Este tipo de análisis es sin dudas la aproximación más descriptiva que puede tenerse sobre un proceso productivo. Sin embargo, se recomienda realizarlo en etapas avanzadas de análisis de un proceso dada su complejidad y el extenso volumen de datos requerido para llevarlo a cabo.

1.2.2 Química Circular

Considerando lo previamente planteado, es claro que la QV puede constituir un pilar clave para lograr modelos químicos de desarrollo que posean a la EC como eje central. La EC se define como “regenerativa y restauradora por diseño, buscando continuamente maximizar la utilidad y el valor de los productos, componentes y materiales empleados”.²⁵ En línea con esta idea, Keijer y col. (2019) plantearon la posibilidad de lograr una Circularidad ideal, basándose en el reemplazo indeterminado de productos químicos y considerando a la energía como el único *input* del proceso.³³ La Circularidad involucra la identificación,

trazabilidad y transformación de materiales y recursos para lograr un uso repetido de los mismos.³⁴ Consecuentemente, la idea de **Química Circular** (QC) ha sido propuesta por estos autores como fruto de la puesta en práctica de los principios de la QV en un modelo que tiende a la implementación de un sistema de EC, posicionándola como vehículo hacia practicas sustentables.² De forma análoga a la QV, los autores postularon doce principios para la QC (**Figura 1.2**).²



Figura 1.2. Los doce Principios de la Química Circular. Adaptado de Keijer *et al* (2019).³³

En particular, promueve la eficiencia en el empleo de recursos químicos para diversas cadenas de valor, con especial atención en la innovación en reacciones químicas y la reutilización y el reciclaje de productos químicos. A su vez, busca desarrollar circuitos cerrados que permitan evitar efluentes tóxicos en las industrias químicas.³³ Dicho modelo otorga las bases teórico-prácticas para la ejecución eficaz y responsable de procesos químicos que permitan alinearse con el desarrollo sostenible de la sociedad. De forma análoga a los 12 principios de QV, los 12 principios de QC constituyen una guía para alcanzar un modelo de desarrollo sostenible que posea a la EC como eje.

El primero de estos principios plantea la necesidad de modificar la visión actual que se tiene sobre los desechos, debiendo verlos como recursos valiosos que deben ser transformados en productos comercializables. Los siguientes principios (2-4) destacan la necesidad de alcanzar la máxima eficiencia de recursos, tanto energéticos como materiales. Más aún propone una innovación continua en los procesos, buscando mejorar la Circularidad

y minimizar el impacto ambiental asociado (5-8). En línea con la QV, se plantea evitar cualquier efluente tóxico hacia el ambiente (6). Se busca además considerar la deposición de los productos generados en términos de la “escalera de la Circularidad”,³⁵ nuevamente buscando maximizar la vida útil de los materiales empleados y minimizando los efluentes generados (9). Por último, estos principios involucran guías para las comunidades productora, empresarial y política (10-12). En estos últimos exige el apoyo de cada sector de la sociedad que esté involucrada en la concreción de un desarrollo sostenible.

Es de destacar que los 12 principios de la QC abarcan aspectos de la química, pero también de la economía, la política y las ciencias ambientales. Esto muestra la importancia y conexión entre tales ámbitos, desde el punto de vista práctico, hacia la ejecución de un modelo de EC.

1.3. Biorrefinerías

La **Bioeconomía Circular** (BC) fue definida por la Comisión Europea (2018) como la creación de diferentes recursos renovables de origen biológico y sus conversiones en varios productos de alto valor agregado de origen biológico como alimentos, materias primas, sustancias bioquímicas y bioenergía. Fue señalada como una “panacea” que involucra multitud de fuentes de biomasa.³⁶

Este nuevo paradigma de producción promete mitigar problemáticas como los efectos del cambio climático, mediante el aprovechamiento de fuentes renovables de carbono. Dentro de los recursos renovables, para reemplazar una amplia fracción de los recursos fósiles, encontramos a la materia prima proveniente de las plantas como el actor con mayor potencial, denominada **biomasa**. Es este nuevo esquema de BC, la biomasa, reemplaza a las materias primas de fuentes no renovables como fuentes de carbono y energía. Las **biorrefinerías**, constituirán entonces, los centros de conversión optimizada de la biomasa. Es un concepto análogo al de refinerías de petróleo, buscando obtener multiplicidad de productos, aunque empleando fuentes renovables y su desarrollo oficiaría de medio para lograr las metas de la BC.³⁶

Según la Agencia Internacional de Energía (AIE), una biorrefinería es un concepto que incluye el procesamiento sustentable, junto con el correspondiente equipamiento específico, para la transformación de biomasa en productos comercializables y energía.³⁷ Básicamente el objetivo de una biorrefinería consiste en transformar la biomasa en productos orgánicos de primer o segundo tipo, pudiendo además producirse energía durante la transformación. La categoría de primario se reserva para bioproductos crudos, mientras que los secundarios son los obtenidos por refinación de los primeros. Dentro de las biorrefinerías, existen cuatro

plataformas de conversión principales: térmica, mecánica, química y biológica. Las plataformas químicas de biorrefinerías más importantes involucran carbohidratos, proteínas y triacilglicéridos (TAG), existiendo otras como biogás, lignina, electricidad, calor, etc.³⁸

A principios de 2020, Ubando y col., focalizaron el concepto de biorrefinería dentro de una BC, dando una clasificación general independientemente de la biomasa usada como materia prima.³⁶ A su vez, describieron minuciosamente las distintas fuentes renovables de biomasa que pueden emplearse como plataformas químicas. Diversos desechos de la industria alimenticia y papelera, así como otras fuentes poco empleadas como las algas unicelulares, pueden ser empleados para obtener diversos productos químicos y energía. Dentro de las plataformas descritas por tales autores, destacamos las transformaciones químicas y mecánicas como plataformas de particular interés para nuestro país.

Las biorrefinerías que emplean soja como biomasa consisten fundamentalmente en la conversión mecánica del grano en productos derivados. Estos productos son harina rica en proteínas y aceite abundante en ácidos grasos poliinsaturados obtenidos mediante el proceso denominado *crushing*.

El aceite de soja es considerado un *commodity*, por lo que su precio es regulado por el mercado internacional. Si bien este aceite es comestible, no es un producto de elección popular en nuestra región, por lo que su consumo alimenticio es bajo. Sin embargo, en cuanto a producción, Argentina fue el cuarto productor mundial de este aceite en 2019, alcanzando 8,01 Mt de aceite de soja, un 14% de la producción global.³⁹ Del total producido, solo el 30% (2,4 Mt) se mantuvo en el país, mientras que 5,5 Mt fueron exportadas. Esto convirtió a Argentina en el principal exportador mundial de aceite de soja en 2019.³⁹ El remanente que permaneció en el país, representó más del 60% del consumo interno de aceites vegetales, siendo el sector industrial el principal consumidor. El aceite de soja es considerado como un producto secundario o subproducto para el mercado interno, pudiendo ser revalorizado mediante su transformación en biodiesel (BD). En efecto, el principal uso que se le da al aceite de soja en nuestra región es la producción de BD, siendo esta la fuente exclusiva del citado biocombustible consumiendo más del 80% del aceite de soja disponible para el comercio interno.

Describiremos la producción de BD en Argentina dado el papel principal que juega este biocombustible en lograr una transición hacia un mundo definitivamente libre del uso de combustibles fósiles.

1.4 Producción de biodiesel

Según la “Estrategia de desarrollo resiliente con bajas emisiones a largo plazo para 2050”,⁴⁰ publicada en 2022 por la Secretaría de Cambio Climático, Desarrollo Sostenible e Innovación de Argentina: Realizar esfuerzos para lograr la neutralidad en emisiones de GEI para el año 2050 es un objetivo fundamental en la lucha contra el cambio climático. Esta meta implica abordar las emisiones de todos los sectores de la economía y promover acciones para reducir progresivamente las emisiones de GEI, al tiempo que se fortalecen los sumideros de carbono.

Además, como se planteó previamente, Argentina ha publicado su segundo informe NDC (12/2020) y una actualización (10/2021).⁷ En estos documentos que se encuentran publicados en el sitio gubernamental oficial se destaca que las emisiones de CO₂ son debidas principalmente al empleo de combustibles fósiles en la generación de energía (no nuclear) de uso industrial y doméstico para el transporte de cargas y pasajeros, tanto públicos como privados. En este contexto, el BD se presenta como una solución prometedora para mitigar las emisiones de GEI.

El BD es un combustible renovable y con menor impacto ambiental en comparación con los combustibles fósiles tradicionales, ya que se produce a partir de fuentes renovables. Al utilizar BD en lugar de combustibles convencionales, se reduce significativamente la **emisión neta** de GEI (**Figura 1.3**), contribuyendo así a mitigar el calentamiento global.

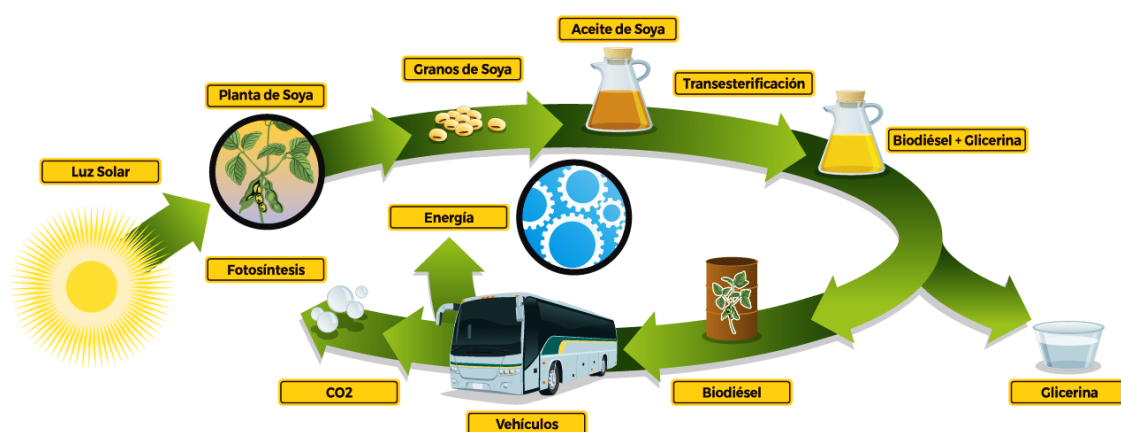


Figura 1.3. Ciclo de carbono relacionado al BD de soja. El CO₂ capturado por las plantas de soja, es luego reemitido al ambiente por parte de vehículos diésel. Reproducido de Quintana Roo Hoy 2018.⁴¹

La adopción y promoción del BD como alternativa sostenible en sectores como el transporte y la industria puede contribuir de manera significativa a la reducción de las emisiones de GEI. Si bien es una tecnología que involucra el uso de carbono, puede ser útil

como una tecnología de transición. Además, el BD también ofrece beneficios, como la reducción de la dependencia de los combustibles fósiles, el impulso a la economía local y la creación de puestos de trabajo en el sector de energías renovables.⁴²

Para lograr la neutralidad en emisiones de GEI, es esencial fomentar la investigación, la innovación y la implementación de políticas que promuevan el uso del BD y de otras fuentes de energía renovable (ej. bioetanol, hidrógeno verde, etc).

Argentina es un país agroexportador de tradición, dada sus enormes extensiones de tierra fértil, ideales para la agricultura y la ganadería. Si bien actualmente se dedica una superficie de aproximadamente 33 Mha al cultivo de diversos cereales y oleaginosas, el cultivo predominante es la **soja** ocupando 17 Mha,⁴³ representando más de la mitad del suelo cultivado en nuestro país (**Figura 1.4**).^{43,44}

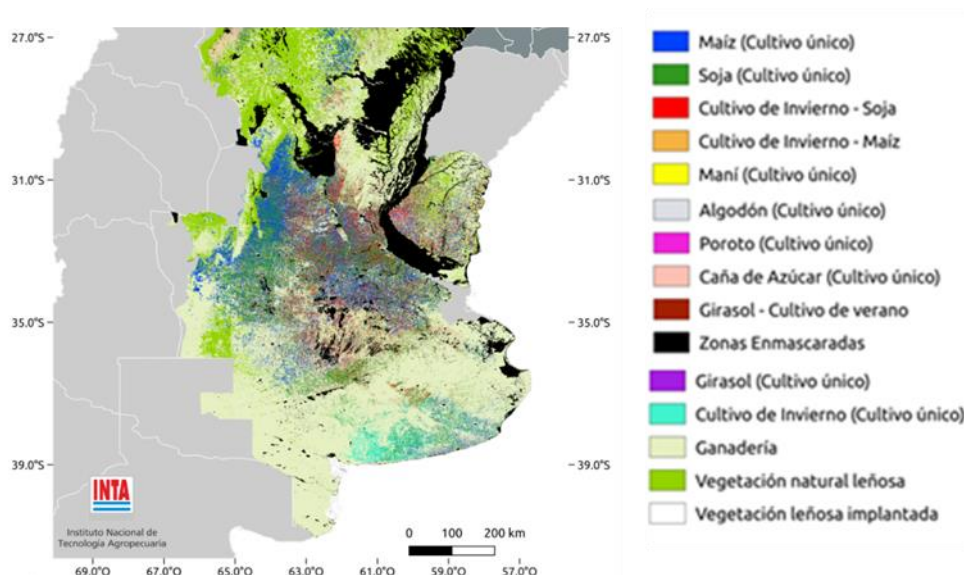


Figura 1.4. Mapa Nacional de Cultivos campaña 2018/2019. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

La Argentina cuenta con el segundo complejo industrial oleaginoso más importante del mundo, en términos de capacidad teórica de molienda medida en toneladas por día. El complejo industrial del Gran Rosario es el más importante del mundo a nivel de concentración geográfica. No existe otro caso de una zona que cuente con tanta cantidad de grandes fábricas ubicadas en un pequeño sector de apenas 70 kilómetros de costa sobre el río Paraná (**Figura 1.5**), contando con tecnología de última generación.^{44,45}

Durante las últimas décadas ha habido un crecimiento sostenido del cultivo de soja, con aumento constante de la superficie cultivada y el consiguiente incremento de la producción de todos los derivados que se obtienen de esta oleaginosa.⁴⁶ Este proceso llevó a la industria a visualizar en la producción de BD una alternativa de diversificación de

productos, impulsado por las diferencias impositivas y en parte por la promulgación de la ley de Biocombustibles en el año 2006.⁴⁷

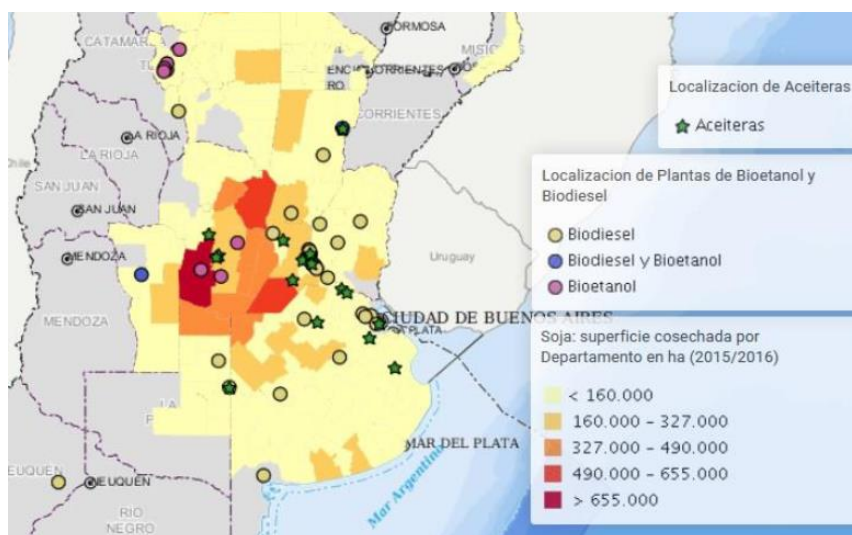


Figura 1.5. Relación entre zonas cultivadas con soja y cordón industrial de *crushing pull* y biorrefinerías. Dirección de Bioenergía. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.⁴⁸

Mayoritariamente en nuestro país, el BD es producido mediante la transesterificación de los TAGs presentes en el aceite de soja, catalizados por una base fuerte y utilizando MeOH como solvente. Por otro lado, existen distintas materias primas que pueden ser utilizadas para la producción de BD a saber: los aceites vegetales crudos (comestibles y no comestibles), grasas animales y aceites residuales. Estos contienen TAGs, ácidos grasos libres, fosfolípidos, agua y otros componentes minoritarios que deben ser removidos en etapas previas a la transesterificación, dependiendo del proceso y a la calidad del producto final que se desee obtener. Tras el proceso de transesterificación, se obtienen los esteres metílicos o *Fatty Acid Methyl Esters* (FAMES), y otras sustancias que se listan en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1. Composición de biodiesel de soja.

Componente	Composición del BD (%)
FAMES	98,5
MAGs	0,5
DAGs	0,1
TAGs	0,03
Glicerina libre	0,01
Esteroles libres	0,2
AGs libres	0,3
Metales G1 y G2	2 ppm
Contaminación total	20 ppm

BD: biodiesel; G1: grupo 1; G2: grupo 2; ppm: partes por millón.

El BD que era considerado un producto de laboratorio, ha pasado a ser un combustible usado de manera general. Debido a este enorme impulso, la producción de BD en Argentina ha crecido a tasas interanuales superiores al 80 por ciento, y a principios de esta década llegó a un máximo histórico de producción de 2,7 millones de toneladas, una capacidad instalada de 4.518.000 Tn/año, y exportaciones del orden de los 1.600 millones de dólares, aunque esta ha descendido en los últimos años.⁴⁹

Este crecimiento ha posicionado al país junto con los Estados Unidos y Brasil como los tres mayores productores mundiales de este biocombustible. De la producción nacional, las empresas productoras exportan el grueso del BD producido a Estados Unidos y a Europa (con variaciones temporales según las restricciones por acusaciones por *dumping* por parte de la UE y los EE.UU.); siendo el resto para consumo interno. La distribución regional de la producción de BD coincide con las zonas de cultivo, centralizándose tanto la siembra como los procesos de biorrefinamiento de soja en la región central del país (**Figura 1.5**). Nuestro laboratorio se encuentra en el epicentro de esta industria, posicionándose de forma privilegiada para abordar diversas problemáticas referidas a este sector productivo en puja.

1.5 Depósitos insolubles

Una de las consecuencias de la producción masiva de BD a partir de aceite de soja y palma, entre otros cultivos, ha sido la aparición en varios puntos de la cadena de producción, transporte y utilización; de depósitos de material insoluble. Estos componentes insolubles han aparecido en las fábricas de BD, en los tanques de almacenamiento (**Figura 1.6 a**, foto tomada en UnitecBio⁵⁰) cañerías y filtros (**Figura 1.6 b**⁵⁰), contenedores usado para su transporte y en los filtros de los motores que emplean BD como combustible. Este subproducto causa fallas mecánicas por la presencia de material sólido en los filtros de combustible que se formó en el tanque de BD, luego de su salida de la planta de producción y almacenamiento.

Si bien estos reportes provenían principalmente de los productores de BD de Europa y EE.UU., nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en las fábricas de Argentina de este combustible se encontraban con la presencia del mismo tipo de componentes insolubles.⁵¹ Más aún, en base a depósitos obtenidos en plantas locales fue posible mostrar que los componentes principales de tales depósitos eran esterilglucósidos (SGs).

Los SGs y su variante esterificada con ácidos grasos (6-O-acil-esteril glucósidos, ASGs por su sigla en inglés) son constituyentes glucolipídicos, también denominados glucosteroides, comunes en las plantas superiores y microorganismos, pero de escasa presencia en mamíferos y otros organismos.⁵²

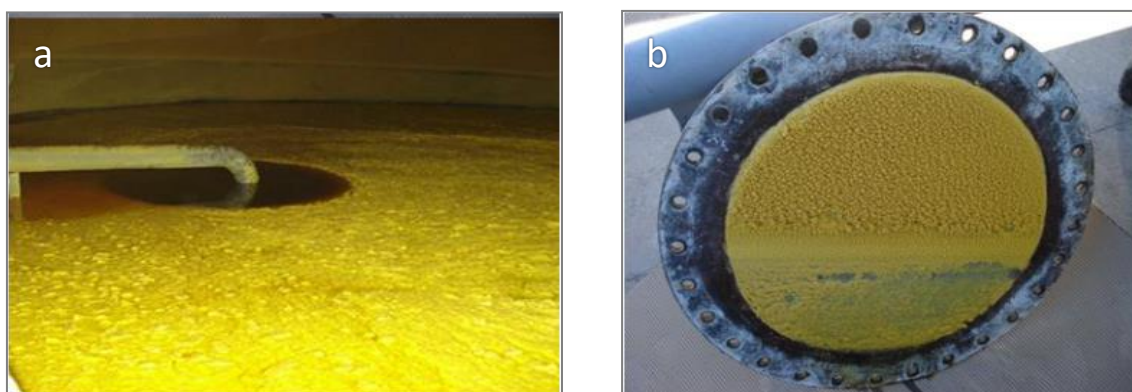
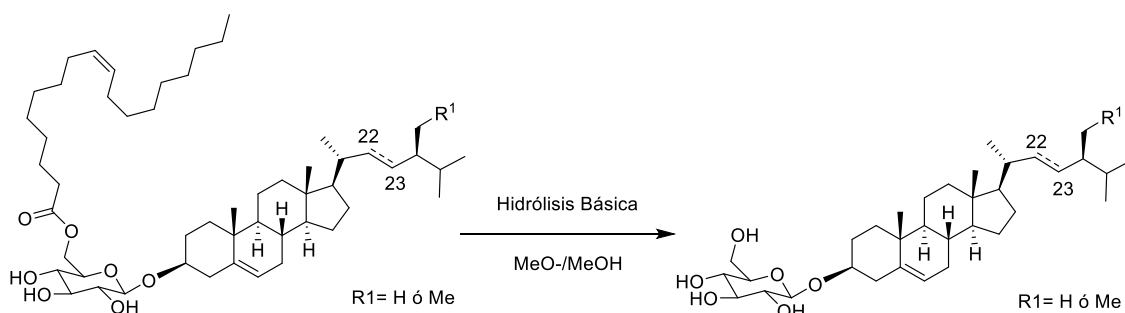


Figura 1.6. a) Tanques de almacenamiento de BD con depósitos insolubles. b) Filtro de tubería recubierto de depósitos.

Los ASGs son especies solubles en aceite que son hidrolizados a SGs tras el proceso de producción de BD (metanólisis), los cuales son insolubles en la matriz oleosa. (**Esquema 1**) La presencia de estos componentes insolubles en el BD ocasiona inconvenientes al momento de exportar este material. Tal es así que altas concentraciones de SGs en BD causan el incumplimiento del ensayo de “cold soak” (ensayo de contaminación/filtrabilidad de acuerdo a los estándares de calidad actuales de dicho biocombustible; norma europea EN14214 y en EEUU, ASTM D6751) generando la pérdida de mercados internacionales, con el consecuente detrimento económico para las empresas productoras y el país.



Esquema 1. Hidrólisis de ASGs a SGs durante el proceso de producción del BD.

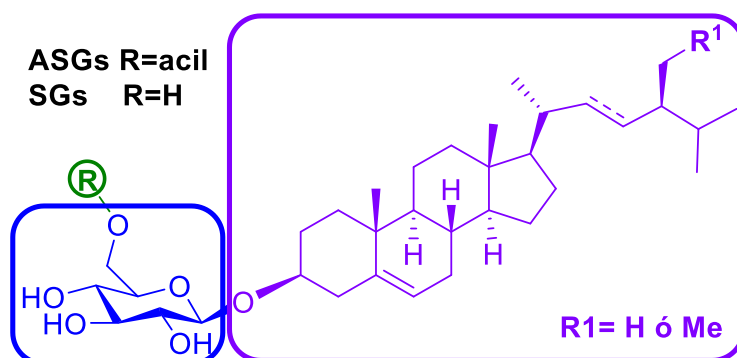
Teniendo en cuenta la producción de BD en Argentina de los últimos años y que los SGs en el BD de soja tienen una concentración promedio de 100 ppm, es de esperar que se generen alrededor de 270 ton de este “desecho” por año. Estos depósitos generan inconvenientes para las compañías productoras de biocombustibles y una vez recogido de los tanques de almacenamiento en general se los aprovecha quemándolos en calderas teniendo un valor calorífico equivalente al fueloil. Sin embargo, las biorrefinerías involucran el uso integral de la biomasa disponible, donde deben ser incluidos los residuos, dado su bajo costo y alta disponibilidad. Por lo tanto, nos resulta crítico recuperar este producto para su posterior puesta en valor.



2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Teniendo en cuenta el gran impacto que tiene la producción de aceite de soja en la economía de nuestro país y en particular de nuestra región, es importante el desarrollo de las biorrefinerías basadas en este commodity. El análisis de la cadena de valor y los productos generados en su producción nos permitió identificar oportunidades para ampliar esta cadena productiva mediante el aprovechamiento de lo que hasta ahora es visto como un problema. La deposición actual que se le da a los esterilglucósidos, siendo productos de alta complejidad estructural, y con propiedades físicas y químicas más que interesantes, es totalmente contraria a lo buscado en una BC. Es necesario repensar en este “desecho” como la materia prima de un nuevo proceso productivo que permita su aprovechamiento, y su reinserción en el ciclo productivo circular del BD. Es en este contexto que planteamos como objetivo general de este trabajo de tesis la utilización de los esterilglucósidos aislados de tanques de biodiesel para la generación de productos de alto valor agregado.



2.2 Objetivos específicos

En particular proponemos utilizar SGs como material de partida para el desarrollo de nuevos productos con utilidad para las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica. Para lograrlo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Aislar y purificar SGs de depósitos de fondos de tanques de almacenamiento de biodiesel a escala de kg.
- Evaluar la toxicidad en modelos *in vitro* e *in vivo* de los SGs aislados.
- Obtener fitosteroles de alta pureza mediante hidrólisis heterogénea de SGs.
- Sintetizar y caracterizar derivados poliacilados de SGs variando la proporción y el tipo de ácido graso empleado.
- Evaluar la toxicidad *in vitro* de derivados tetraacilados de SGs.

Resultados y discusión



3. Resultados y discusión

3.1 Esterilglucósidos

3.1.1 Ocurrencia de glucósidos

Los D-glicósidos son compuestos comúnmente encontradas en la naturaleza. Estos compuestos poseen enlaces acetálicos formados por una unidad de hexosa, conocida como glicón, y una molécula no acídica referida como aglicona o genina.⁵³ Además de su composición de glicón, los glicósidos también pueden ser clasificados en base a la aglicona unida al carbohidrato. Esta aglicona puede ser un compuesto fenólico, un compuesto de azufre o un alcohol alquílico, entre otros.⁵⁴ Diferentes familias de agliconas dan origen a diversos glicósidos, incluyendo flavonoides, esteroides, gliceroderivados y ceramidas. Estos glicósidos son metabolitos secundarios típicamente encontrados en plantas y organismos autótrofos, para propósitos como el transporte, o el almacenamiento de la aglicona y actuando como materiales de partida para transformaciones biosintéticas de mayor complejidad.⁵⁵ Cuando una aglicona está unida a una unidad de monosacárido, forma una especie molecular metabólicamente inerte, que perdura dentro del organismo vegetal. Esto permite el transporte, almacenamiento y utilización de los glicósidos luego de su síntesis. La acción enzimática de una glicosidasa libera la aglicona, restaurando su actividad original.⁵⁵

Entre los diferentes tipos de glicósidos, los derivados de esteroides han ganado un interés científico significativo debido a sus roles fundamentales en humanos, animales y otros organismos.^{52,56–59} Grille y col. llevaron a cabo en 2010 una revisión minuciosa sobre la ocurrencia de glucósidos derivados de esteroides en la naturaleza.⁵⁶ En años recientes, diversas investigaciones han señalado la importancia de estos glicósidos.⁵² Ejemplos de tales glicósidos derivados de esteroides incluyen alfa y beta-colesterilglicósidos, glicósidos cardíacos y fitosterilglicósidos derivados de esteroides como el beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol. Estos glicósidos se han encontrado en animales, plantas, algas y hongos, con una ocurrencia más limitada en animales en comparación con su presencia ubicua en plantas y hongos.^{55,56} Los glicósidos derivados de glucosa se denominan glucósidos, siendo ésta el glicón más común entre los glicósidos, existiendo por ejemplo derivados de fructosa, galactosa, manosa, etc., que dan lugar a fructósidos, galactósidos y manósidos, respectivamente. Los glicósidos que consideraremos en este trabajo de tesis son los derivados de glucosa y fitosteroides, *i. e.*, fitosterilglucósidos, aquí nombrados como esterilglucósidos (SGs, del inglés *Steryl Glucoside*, **Figura 3.1**).⁶⁰

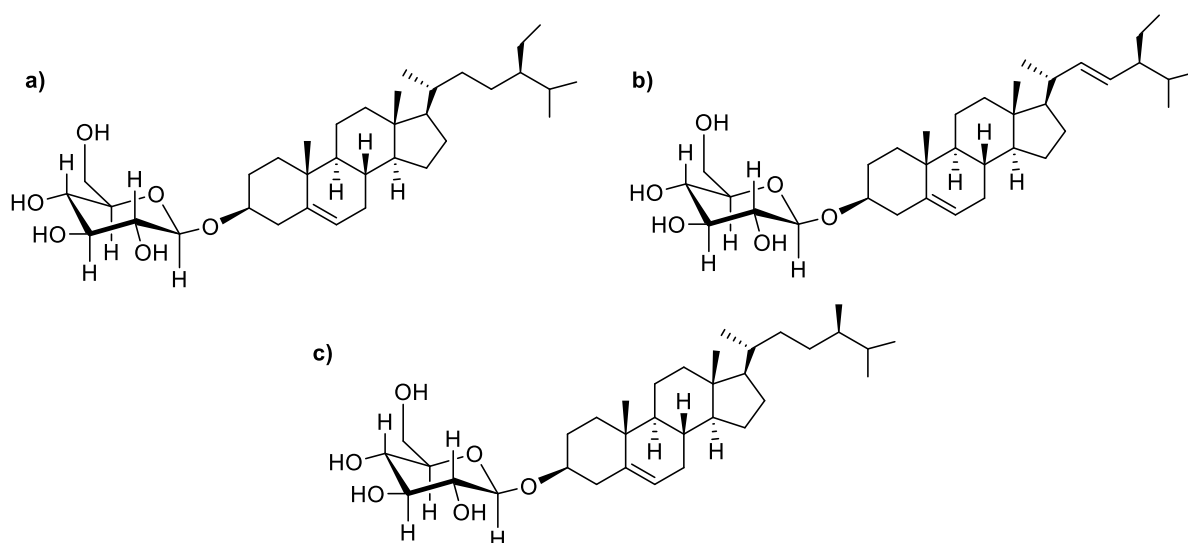


Figura 3.1. Los esterilglucósidos más abundantes en plantas superiores son aquellos derivados de β -sitosterol (a), estigmasterol (b) y campesterol (c).

Los orígenes biosintéticos de los SGs y su ocurrencia en la naturaleza han sido objeto de interés para diversas ramas de la comunidad científica.⁵⁸ Los SGs se sintetizan a través de una glucosilación enzimática, que involucra la transferencia de una unidad de glucosa al esteroil. Las vías biosintéticas que conducen a la producción de SGs han sido dilucidadas en distintas especies vegetales, proporcionando conocimientos sobre los mecanismos moleculares de su formación.^{58,59,61} Estas vías involucran la acción de glucosiltransferasas y otras enzimas asociadas.

Los SGs se distribuyen ampliamente en todo el reino vegetal, exhibiendo variaciones en sus niveles y distribución en diferentes tejidos y órganos vegetales. Son particularmente abundantes en las semillas, donde desempeñan roles críticos en la germinación y el desarrollo de la planta.⁵⁶ Además, los SGs se han identificado en otras partes de las plantas, incluyendo hojas, tallos y raíces, lo que indica su ocurrencia generalizada en organismos vegetales.⁶²

Los SGs exhiben una notable diversidad estructural y diversas actividades biológicas, y desempeñan roles cruciales en la fisiología vegetal y en mecanismos de defensa.^{55,56} Una función importante de los SGs es su contribución a la integridad y fluidez de las membranas vegetales debido a su naturaleza anfifílica, que afecta su estabilidad y permeabilidad.^{59,61} Además, estos compuestos poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas, lo que sugiere su participación en la defensa de las plantas contra el estrés ambiental y los patógenos.^{58,59,63}

Uno de los glucósidos de especial interés en nuestro grupo de investigación, es el daucosterol, un tipo de sapogenina esteroidal.⁶⁴ Este SG, derivado de β -sitosterol, es el

principal glucósido en diversas plantas (**Figura 3.1 a**). Este compuesto se ha destacado como un nutraceutico de gran interés debido a su amplio espectro de efectos beneficiosos para la salud. Se ha demostrado que el daucosterol posee una gama de efectos pleiotrópicos, incluyendo propiedades inmunomoduladoras, neuroprotectoras, anticancerígenas, antidiabéticas y conservantes alimentarios.^{60,64–66}

En particular, ha sido indicado que los SGs derivados de la soja, ricos en daucosterol, han mostrado beneficios para la salud humana, como reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares por su acción hipocolesterolémica.⁶⁷ Por lo tanto, una comprensión más profunda de las propiedades y efectos de estos compuestos podría contribuir al desarrollo de tratamientos médicos y mejoras en la calidad de vida. Otras actividades biológicas reportadas de los SGs son los efectos inmunoadyuvantes,^{58,68} y su neurotoxicidad, la cual sigue siendo objeto de debate en torno a la concentración y tipo de glicósidos.^{69–71}

Existen estudios en donde los SGs empleados fueron obtenidos de fuentes naturales a través de procesos de extracción laboriosos y a veces ineficientes. Por otro lado, su cuantificación por distintos métodos analíticos conlleva diversos desafíos dada su escasa solubilidad en solventes de variada polaridad y su alto peso molecular.^{72–75} Esto presenta una desventaja, especialmente considerando la baja concentración de SGs en los tejidos vegetales. Otros emplean SGs de origen sintético obtenidos mediante síntesis química y/o enzimática.^{67,69} De forma controversial, algunos estudios llevados a cabo por Shaw y col. no proporcionan información sobre la pureza de las muestras de SGs utilizadas en los ensayos biológicos, siendo que proponen al daucosterol como un potencial neurotóxico.⁷⁶ Sin embargo, a pesar del prolífico trabajo de este grupo, en 2022, Bigelow y col. intentaron replicar los modelos de neurotoxicidad reportados tras la administración de daucosterol, aunque con resultados contrarios a los propuestos.⁷¹ Más aún, El Omari y col. consideran a estos SGs como poseedores de propiedades neuroprotectoras.⁶⁰ De este modo, es necesario aún profundizar en el estudio de la toxicidad de los SGs para poder explotar su potencial como nutraceutico.

En este contexto, se reconoce que las fuentes de biomasa sostenibles son cruciales para la producción a gran escala de nutraceuticos como el daucosterol.⁶⁵ Estas fuentes ofrecen un enfoque responsable y respetuoso con el ambiente para la obtención de estos valiosos compuestos. Teniendo en cuenta la falta de una fuente natural a gran escala de SGs,⁷⁷ los beneficios para la salud humana reportados, así como las aplicaciones conocidas de sus agliconas,⁷⁸ el desarrollo de un proceso para la obtención de SGs de alta pureza sería de gran utilidad e impacto en el sector productivo. Para abordar este desafío, nos propusimos en esta parte de este trabajo de tesis abordar el estudio de un proceso que permita recuperar y purificar SGs de depósitos insolubles en BD de soja a escala de kilogramos. Reconociendo

la importancia de la pureza, describimos aquí una metodología cuantitativa basada en RMN para determinar la pureza de muestras de SGs utilizadas posteriormente en ensayos biológicos. Finalmente, realizamos evaluaciones de toxicidad en células de hepatoma humano (Huh7), seguidas de la evaluación de la toxicidad de corto plazo *in vivo*.

3.1.2 Purificación de SGs

Para empezar a estudiar las propiedades y el proceso de purificación de SGs de soja, se obtuvieron muestras de precipitados de tanques de almacenamiento de BD proveniente de una planta local, Unitecbio (www.unitecbio.com.ar). Los precipitados de tanque (**Figura 1.6**), que son extraídos mecánicamente, se presentan como un material viscoso amarillento compuesto principalmente por BD y SGs.⁵¹ Otros componentes minoritarios presentes en estos depósitos son glicerina y mono- y diacilglicéridos (MAGs y DAGs, respectivamente).⁵¹ La concentración de SGs, al final del proceso de producción de BD, ronda las 100 ppm, sin embargo en los tanques de almacenamiento, el precipitado formado puede tener concentraciones que superan el 50% p/p.⁷⁹ Una posible explicación para el aumento de la concentración de estas impurezas, que apenas están presentes en el BD, está ligada a las propiedades fisicoquímicas de los SGs y al medio que los circunda. Hemos propuesto un modelo⁵¹ en el que los componentes minoritarios polares presentes en el BD son encapsulados en una estructura micelar formada por SGs autoensamblados, aumentando su concentración local (**Figura 3.2**). A medida que las micelas flocculan, continúan acrecentando la concentración de los SGs en los depósitos insolubles. Debido a su carácter anfifílico y alto peso molecular, los SGs son muy poco solubles en la mayoría de solventes orgánicos polares y no polares, siendo poco solubles en DMSO, o en una estrecha ventana de mezclas como DCM:MeOH, THF:MeOH, entre otros, o moderadamente soluble en piridina (Pyr).

De este modo, aprovechando la baja solubilidad de los SGs en distintos solventes orgánicos desarrollamos un proceso de aislamiento basado en lavados de los depósitos insolubles con solventes orgánicos. Inicialmente, se buscó eliminar el BD ocluido en la mezcla, seleccionando hexano para facilitar su extracción del residuo. A continuación, los compuestos polares como el glicerol, los ácidos grasos libres y los lípidos polares se separarían con MeOH. La selección de estos solventes se basó en la solubilidad de los componentes que deben eliminarse, hexano para FAMES y MeOH para compuestos polares, y porque son ampliamente utilizados en las fábricas de aceite vegetal y BD. El hexano se utiliza para la extracción de aceite de semillas trituradas y el MeOH en el proceso de transesterificación para la producción de BD. El EtOH podría emplearse como una alternativa al MeOH, ya que es más respetuoso con el ambiente y minimiza los riesgos asociados a su manipulación.

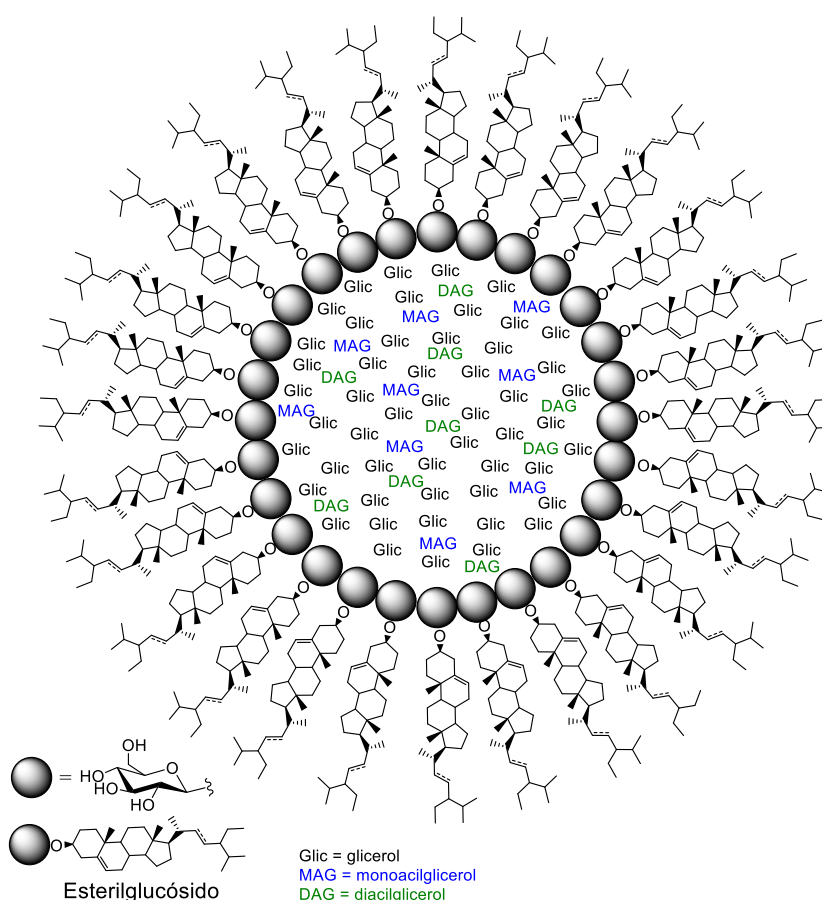


Figura 3.2. Estructura micelar propuesta para los depósitos insolubles incluyendo SGs y lípidos polares.

Durante la tesis doctoral del Dr. Sebastián Jäger se exploró este sistema desde una escala de miligramos a cientos de gramos. Allí, se evaluaron diferentes secuencias de purificación que involucraron lavados y etapas de solubilización para la obtención de SGs de alta pureza trabajando con hasta 900 g de fondo de tanque de BD. Se determinó que las etapas críticas de las cuales no se podían prescindir serían los lavados con hexano y el posterior tratamiento con MeOH a reflujo.⁷⁵ Con esto en mente, se diseñó un proceso de purificación de media escala que sea esencialmente circular, es decir, que nos permita recuperar la mayor cantidad de recursos empleados, maximizando la obtención de productos de interés, (**Figura 3.3**) estando de este modo en línea con los principios de la QC.

En esta nueva etapa del proyecto, buscamos aumentar la escala en 10 veces respecto de los trabajos previos. Para comenzar con el desarrollo experimental de este proyecto de tesis se procesaron 18 L de depósitos insolubles, decantado a lo largo de 6 años. Se procedió a la eliminación del BD presente en la mezcla mediante filtrado y posterior lavado con hexano. Para realizar este proceso fue necesario construir un sistema de filtración a medida que permita trabajar con estas cantidades (**Figura S1**). Una vez filtrado el BD (~10 L) separado

del sólido por decantación, se recuperó un residuo sólido viscoso (9 kg) con el que continuamos hacia las etapas de lavado con solventes orgánicos.

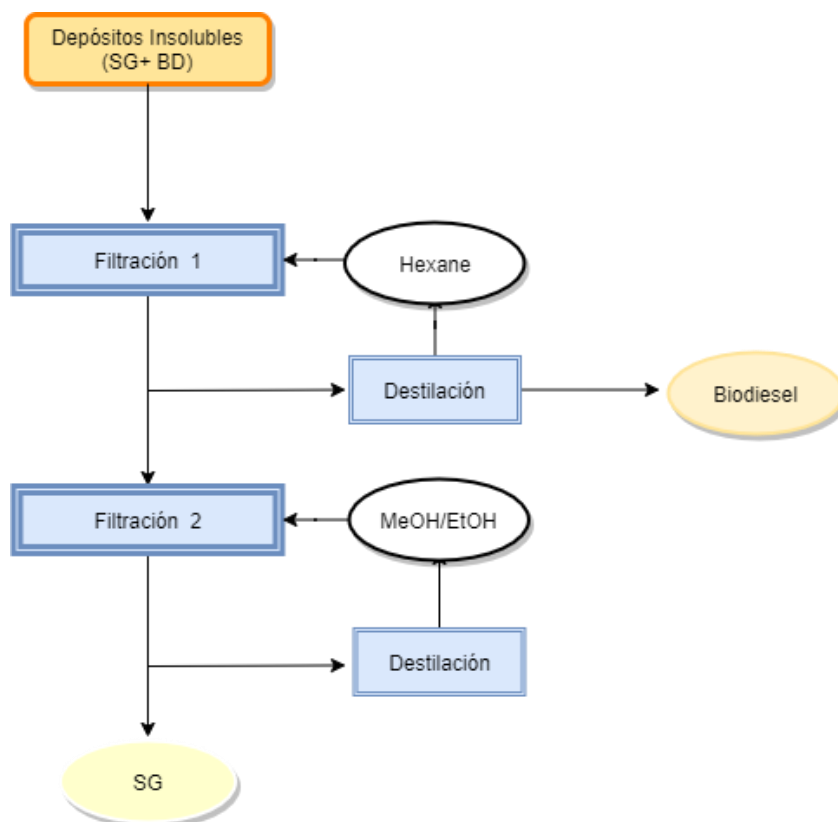


Figura 3.3. Proceso de purificación de depósitos insolubles. Los ciclos cerrados implican la reutilización de los solventes por destilación simple.

Para aumentar la fluidez del residuo y facilitar la separación de la fracción insoluble de interés, se adicionaron 5L de hexano. Posteriormente, la mezcla se filtró, obteniendo una torta compuesta por SGs y BD. A continuación, la torta fue resuspendida en una nueva porción de hexano (3 L), agitada manualmente durante 5 minutos y nuevamente filtrada a través de una tela de algodón. Luego de repetir dos veces más el proceso anterior, se separó el material obtenido en 6 lotes, que fueron secados evaporando el hexano remanente, dando lugar a 3,6 kg de sólido compuesto principalmente por SGs, además de ácidos grasos libres y otros glicolípidos polares.⁷⁵ En este proceso se emplearon 14 L de hexano que fueron destilados en un evaporador rotatorio, donde además se recuperaron aproximadamente 5 L de BD. Este último puede ser reinsertado en circuitos comerciales, valorizando el tratamiento de estos depósitos insolubles.

A continuación, se procesaron 3 de los 6 lotes de forma independiente, con pesos de 610 g, 602 g y 602 g, respectivamente. El sólido se resuspendió en MeOH, a razón de 1,56 g de SGs por ml de MeOH, y se calentó a reflujo durante una hora. Posteriormente, el material

insoluble fue recuperado mediante filtración. Finalmente, se dejó secar el sólido, evaporando el MeOH remanente, lo que resultó en la obtención de 158,5 g, 158,9 g y 160,3 g de SGs de alta pureza, respectivamente. Durante este proceso se eliminaron los contaminantes minoritarios, permitiendo obtener SGs a partir de los fondos de tanques de BD (**Figura 3.4**). De este modo, se aseguró que los depósitos contenían 10,6% p/p de SGs. Este resultado coincide con los valores esperados, según lo reportado por Moreau y col., quienes indicaron una gran dispersión en las concentraciones de SGs en matrices similares, con valores que oscilan entre el 1,3 y el 62% p/p, dependiendo del tiempo de almacenamiento del BD y la época del año en que se recoja.⁷⁹



Figura 3.4. Obtención de SGs de alta pureza a partir de depósitos insolubles provenientes de tanques de BD.

Completado el proceso de purificación se procedió a verificar la identidad de los productos obtenidos mediante ^1H -RMN, comparándolo con los espectros de SGs previamente obtenidos en el grupo usando material de alta pureza (99%, determinada por GC-FID).⁷⁵ (**Figura 3.5**) Los espectros mostraron inequívocamente que las muestras son SGs, presentando señales esperadas y coincidiendo también con lo reportado en la literatura.^{80,81} En detalle, en 5,33 ppm se observa un multiplete que integra para un protón correspondiente a los protones del doble enlace endocíclico del esqueleto de esterol. En 5,20-5,00 ppm se observan dos dobles dobletes (uno de ellos superpuestos) que corresponden a los dos protones de doble enlace exocíclico del estigmasterol. En 4,22 ppm se encuentra la señal característica del protón del carbono anomérico, la cual es un doblete que integra para un protón, con una constante de acoplamiento $J=7,7$ Hz. Este valor de J indica que el protón anomérico se encuentra en una relación axial-axial con respecto al C2'-H correspondiente a una configuración β del enlace glucosídico. Además, entre 3,66-3,38 ppm se distinguen dos multipletes correspondientes a los protones metilénicos C6'. La señal asignable a uno de los protones de C6' que se encuentra a $\sim 3,5$ ppm está superpuesta con la señal de C3-H y con

la señal de agua residual en 3,33 ppm.⁸² Los protones de los carbonos de la glucosa se observan a 3,18 (C^{3'}-H); 3,10 (C^{5'}-H); 3,05 (C^{4'}-H) y 2,90 ppm (C^{2'}-H), respectivamente.

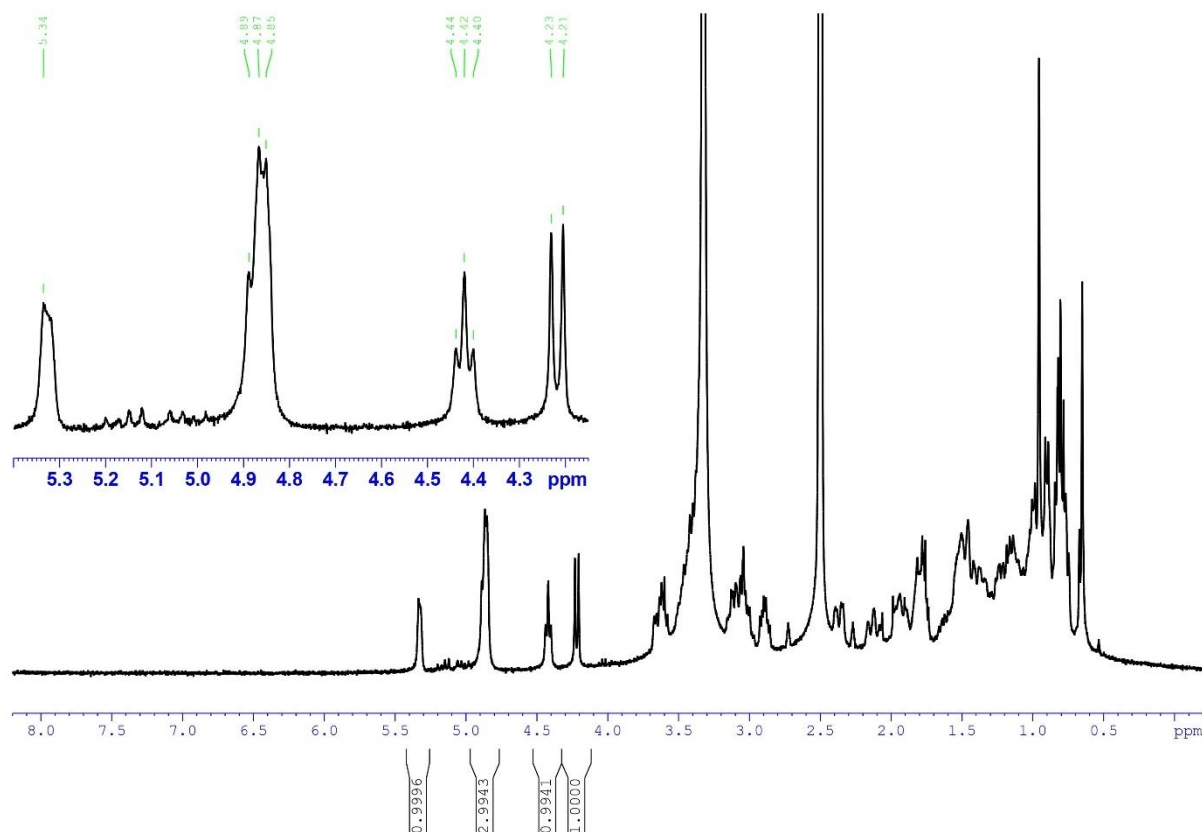


Figura 3.5. Espectro de ¹H-RMN de SGs aislados de fondo de tanque de BD. Solvente DMSO-d₆.

El exitoso proceso de purificación muestra la facilidad de recuperación del producto esperado en un corto tiempo (2 días de trabajo), con la posibilidad de recuperar los solventes empleados, para obtener SGs a mediana escala con equipamiento de bajo costo. Es de destacar que siendo posible recuperar los solventes empleados durante el proceso de purificación, así como el BD ocluido y los correspondientes SGs, la limitación principal del proceso propuesto sería el origen de la energía utilizada (calentamiento, agitación, generación de vacío, etc). Sin embargo, dicha limitación podría ser soslayada en caso de lograr la transición energética hacia el uso de fuentes renovables. Otra desventaja es el trabajo en batch, siendo preferibles los procesos continuos, para lo cual podrían intercalarse operaciones unitarias de lavado seguido de centrifugado empleando centrífugas continuas que permitan recuperar los SGs al tiempo que se obtienen las fases orgánicas correspondientes.

La posibilidad de recuperar el BD ocluido redundó en un 80% de la masa de partida en BD que puede ser reciclado. Como se planteó previamente, considerando la capacidad instalada de la región (4,4 Mton) y la concentración de SGs en el BD (~100 ppm) podrían obtenerse aproximadamente 400 ton de SG. Esta cantidad de SGs representaría alrededor de 10-20% de la masa de los fondos de tanque, estando acompañados de BD y compuestos minoritarios como restos de glicerina. De este modo deberían procesarse unas 2000 ton de fondo de tanques de BD, pudiéndose recuperar más de 1000 ton de BD tras el proceso de purificación. Teniendo en cuenta el precio de mercado de BD que ronda los US\$1000 la tonelada (febrero 2024), esta cantidad de BD representaría un valor de mercado de US\$1.000.000.⁸³

Así, este prometedor proceso podría diagramarse como una operación unitaria que, previamente optimizada y escalada, podría instalarse en una planta que tenga esta problemática, cuya existencia es en principio ubicua. Instalándose en la propia planta, se disminuirían los costos relacionados a la logística y de ese modo haría más sustentable el proceso productivo.

Los SGs obtenidos son compuestos con una compleja estructura química que podrían constituir un nuevo material de partida para diferentes procesos químicos. Por el momento, sus aplicaciones no han sido profundamente estudiadas debido a que no existía una fuente natural de fácil acceso para su implementación en procesos industriales. Actualmente se reporta en la literatura la recuperación de SGs de fuentes naturales como lecitina de soja,^{84,85} y la presencia y potencial recuperación de éstos a partir de diversas fuentes naturales como frutas, verduras y microalgas.^{86,87} Por otro lado, la recuperación industrial de SGs de alta pureza es importante para el desarrollo de estándares analíticos que se adapten a las posibles modificaciones en normativas internacionales de calidad de BD.⁸⁸

Teniendo en cuenta que este es un campo virgen, nuestra propuesta permitiría acceder a SGs de alta pureza a gran escala, sumando un producto más a la plataforma de biorrefinería de soja. El proceso de purificación propuesto permitiría utilizar los SGs como material de partida para el desarrollo de productos de alto valor agregado.

3.1.3 Determinación de pureza de SGs

Como se destacó previamente, los SGs ocurren naturalmente en forma de ASGs, que suelen ser incorporados en membranas lipídicas. De este modo, al obtener el aceite derivado de semillas, los ASGs son parte de la porción lipídica, acompañando a los TAGs como componentes minoritarios. Tras la producción de BD con dicho aceite, los restos acilo de los ASGs son escindidos, obteniéndose SGs que durante el almacenamiento del BD.

En el caso de obtenerse SGs de fuentes naturales, es de esperar que existan componentes minoritarios acompañándolos, los cuales podrían interferir en la determinación de sus propiedades biológicas. Por ello, es necesario determinar la pureza de los SGs aislados de fuentes naturales, así como de fuentes sintéticas,⁷¹ si se considera emplearlos como posibles nutraceuticos.

En instancias previas del proyecto, se analizaron muestras de SGs obtenidas durante los estudios de purificación en escala de gramos, empleando GC-FID, donde se encontró una pureza superior al 99%.⁷⁵ Esta técnica requirió el empleo de derivatización de los SGs mediante sililación de sus hidroxilos e inyección *on-column*.⁷⁵ Este tipo de inyección no puede ser llevado a cabo en cualquier equipo cromatográfico, por lo que representa una limitación que complejiza el ensayo de rutina de esta clase de compuestos. De este modo, se han desarrollado técnicas de análisis indirecto, que involucran la escisión previa del resto glucosídico a través de hidrólisis química o enzimática, y la posterior cuantificación de la aglicona por métodos tradicionales.⁸⁹

Debido a que, durante los experimentos de caracterización de los SGs por RMN en DMSO-d₆, se evidenciaron problemas de solubilidad decidimos abordar un estudio amplio de solubilidad de manera de encontrar concentración de trabajo aceptables para futuros experimentos. Para ello, se ensayó la disolución de 10 mg de SGs en cantidades crecientes de DMSO (1, 2, 4 y 8 ml). Alternativamente se evaluaron otros solventes orgánicos (EtOH, Anisol, DMF) o mezclas de solventes (Anisol:MeOH; AcOEt:MeOH; MTBE:MeOH y THF:MeOH; todos en relación v:v 2:1). Los resultados de estos ensayos fueron poco prometedores, a excepción de DMF que logró disolver los SGs hasta concentraciones similares a las logradas con DMSO. Comparamos la disolución empleando agitación orbital (700 rpm) empleando un termoagitador DLab HM-100Pro (**Tabla 3.1**, Entradas 1-5), o bien sonicando en un baño de ultrasonido termostatzado (**Tabla 3.1**, Entradas 6-8), ambos a 40°C. Tras el agregado de la cantidad necesaria de solvente se procedió a tratar la solución durante 5 min y 20 min, respectivamente, para luego evaluar visualmente y por efecto Tyndall con el auxilio de una fuente de luz láser roja corriente. Para el caso de agitación orbital se logró disolución total tras alcanzar el agregado de 8 ml de DMSO (20 min totales de agitación). En cambio, sonicando la solución se logró disolución total tras el agregado de 2 ml (40 min de sonicación).

Tabla 3.1. Ensayos de solubilidad de SG.

Entrada	Volumen (ml)	EtOH	Anisol	DMSO	DMF	Anisol:MeOH	AcOEt:MeOH	MTBE:MeOH	THF:MeOH
1	1								
2	2								
3	4								
4	6								
5	8								
6	1	-	-				-	-	
7	2	-	-				-	-	
8	4	-	-	-	-		-	-	

■: Insoluble; ■: Parcialmente soluble; ■: Disolución casi completa; ■: Disuelto.

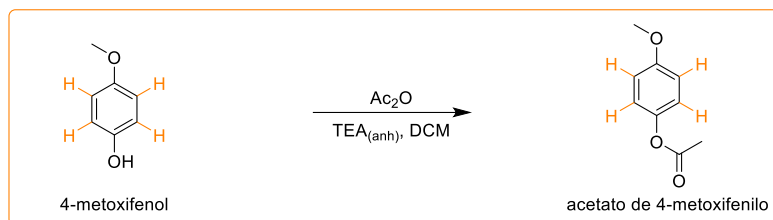
Para todos los experimentos se usaron 10 mg de SGs y cantidades creciente de solvente hasta lograr disolución total del mismo.

De este modo encontramos un límite superior de 5 mg SGs/ml DMSO (8,7 mM) como concentración de trabajo a la que podríamos apuntar para realizar las determinaciones de pureza mediante experimento de RMN cuantativo (RMNc). Si bien estudios preliminares mostraron una buena respuesta para trabajar con DMSO- d_6 como solvente (datos no exhibidos), decidimos buscar una alternativa que no tenga los problemas de solubilidad antes descritos, procurando además utilizar un solvente más económico y de mayor accesibilidad para nuestro laboratorio. También, consideramos la utilización de un estándar interno cuyas señales en el espectro no debería interferir en las de los SGs.

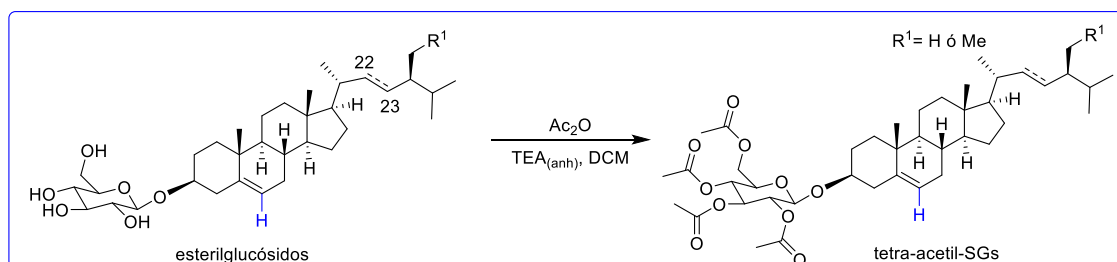
Es así que propusimos un método consistente en la derivatización del analito, en presencia de patrón interno con función dual, seguido de cuantificación por RMN. Por un lado, el patrón interno resultaría como testigo de la derivatización. Y por el otro, serviría como estándar de medición analítico para determinar la pureza del SGs mediante estudios de RMNc. La derivatización propuesta fue la peracetilación de los SGs, es decir la tetra acetilación de los hidroxilos del resto glucídico (**Esquema 2**). Esta transformación lo volvería soluble en solvente menos polares como el $CDCl_3$. Este solvente cuenta con solo un átomo de deuterio, posee menor costo que el DMSO- d_6 y es considerado como el solvente de rutina en RMN de compuestos orgánicos,⁹⁰ por lo fue elegido para el desarrollo de la metodología. De este modo, estaríamos evitando los problemas de solubilidad antes observados al tiempo que usamos un solvente con solo una fracción de átomos pesados y de fácil acceso. Por otro lado, seleccionamos el 4-metoxifenol como estándar interno dado que posee un hidroxilo susceptible de ser acetilado, actuando como control positivo de la derivatización, y presenta señales en una zona del espectro fuera de la ventana espectral que ocupan las señales de

los SGs (dos dobles dobles en 6,9 ppm que integran para cuatro protones correspondientes al anillo fenólico).

ESTANDAR INTERNO



ANALITO



Esquema 2. Derivatización de SGs en presencia de 4-metoxifenol como estándar interno mediante peracilación empleando anhídrido acético.

Un estudio colaborativo sobre RMNc mostró que para lograr resultados reproducibles es necesario pesar como mínimo dos mil veces el desvío estándar mostrado por la balanza empleada, tanto del analito como del estándar interno.⁹¹ Según el capítulo correspondiente de la farmacopea estadounidense, nunca debería pesarse menos que 820 veces la mínima apreciación del instrumento.⁹¹ Así, considerando la apreciación de la balanza empleada en nuestro trabajo (0,01 mg) deberíamos pesar por lo menos 8,20 mg de SGs para llevar a cabo nuestros análisis de RMNc.⁹¹ Buscamos entonces determinar la pureza de los SGs recuperados mediante un experimento por triplicado, cada uno constando de 11 mg de SGs de partida acompañados de 4-6 mg de estándar interno. De este modo se tendrían concentraciones de analito y estándar interno de ~40 mM y ~60mM, respectivamente, superando la concentración máxima lograda en DMSO en los estudios preliminares (~9mM).

Los sólidos fueron suspendidos en DCM, en presencia de $TEA_{(anh)}$ como base, para luego adicionarse Ac_2O , y se dejaron reaccionar a 50°C durante 2 h, con el auxilio de un termomezclador DLab HM-100Pro. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se observa una solución límpida, indicando que no queda analito sin derivatizar. Posteriormente, se evaporaron los componentes volátiles, para luego redissolver la mezcla en $CDCl_3$ y adquirir los espectros de 1H -RMN (**Figura 3.6**).

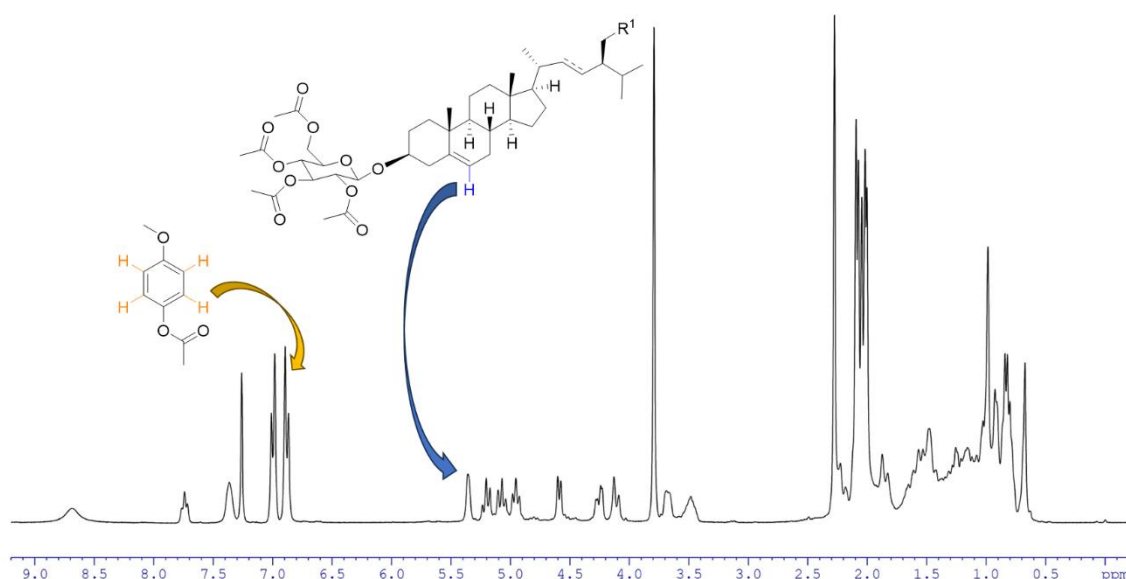


Figura 3.6. Espectro de ^1H -RMN cuantitativo de los SGs obtenidos empleando 4-metoxifenol como estándar interno. La relación de integrales se realizó tomando las áreas de las señales del espectro señaladas en las estructuras del analito y el estándar respectivamente.

Se integraron las señales en 7,00-6,70 ppm correspondientes a los protones aromáticos del estándar interno, y se las estandarizó en 1, para luego integrar de forma relativa la señal en 5,29 ppm correspondiente al protón olefínico endocíclico de los esteroides. De este modo, se determinó la pureza del material aislado, presentándose los resultados obtenidos en la **Tabla 3.2**. Para nuestra satisfacción, los tres ensayos independientes mostraron que los SGs poseen una pureza superior al 99% (**Figura S2-Figura S4**). Cabe destacar que los resultados arrojados por este método coinciden con los estudios previos utilizando GC-FID,⁷⁵ indicando la validez del método propuesto.

Tabla 3.2. Pureza por RMNc y derivatización de SGs obtenidos

Entrada	SGs (mg)	4-metoxifenol (mg)	Pureza (%)
1	11,32	6,09	99,8
2	11,08	3,88	99,9
3	11,52	4,50	100,3

El desarrollo de un método analítico que permite determinar la pureza de los SGs mediante técnicas de RMNc representa un importante avance en nuestra capacidad para analizar compuestos provenientes de matrices complejas. Tras evaluar la solubilidad de los SGs, encontrando problemas de solubilidad, se implementó con éxito la derivatización en presencia de 4-metoxifenol como estándar interno. La elección del CDCl_3 como solvente facilita el proceso y también asegura una mayor accesibilidad en el laboratorio. Este método

no solo proporciona resultados precisos sobre la pureza de los SGs, sino que también abre nuevas posibilidades para su aplicación en estudios farmacéuticos y nutracéuticos. En futuras investigaciones, se explorará la adaptación del método a diferentes matrices, lo que podría contribuir a un mejor entendimiento y aprovechamiento de los SGs en diversas aplicaciones industriales y científicas. Así, este enfoque analítico no solo responde a las necesidades actuales de caracterización, sino que también sienta las bases para investigaciones futuras que podrían expandir el uso de estos compuestos en el ámbito de la salud y la nutrición.

3.1.4 Determinación de toxicidad de SGs *in vitro* e *in vivo*

Siendo que los SGs presentan actividades biológicas interesantes, pudiéndose utilizar como nutracéutico,^{64–66} decidimos evaluar la digeribilidad *in vitro* mediante una digestión simulada,⁹² para considerar su estabilidad al atravesar el tracto digestivo. Luego ahondamos en la toxicidad de los mismos en un modelo celular de hígado, en el eventual caso de ingreso intestinal de los SGs. Finalmente llevamos a cabo estudios *in vivo* evaluando parámetros intestinales y hepáticos, para juzgar las consecuencias de la administración sostenida de SGs en un modelo animal.

3.1.4.1 Uso de SGs en ensayos biológicos reportados

Decidimos comenzar esta parte de nuestro trabajo revisando las actividades de los tres glucósidos en la base de datos ChemBI (consultado julio de 2024). Dicha base de datos contiene una colección manualmente depurada que extrae información de publicaciones, siendo periódicamente revisada y ampliada.⁹³ Para el derivado de campesterol no encontramos ninguna entrada asociada, mientras que para los derivados de estigmasterol y β -sitosterol hallamos 1 y 3 entradas, respectivamente. El derivado de estigmasterol (ChemBI ID: ChEMBL447335) posee 10 entradas de bioactividad asociadas, vinculadas a 4 documentos diferentes, donde algunas de ellas corresponden a daucosterol en vez del derivado de estigmasterol.⁹⁴ En estos se obtiene el glucósido derivado de plantas como fracción minoritaria y es evaluado frente a parásitos,⁹⁴ micobacterias⁹⁵ y algunas líneas celulares.^{96,97} Las concentraciones máximas empleadas fueron de 100 μ M, sin mencionar problemas de solubilidad durante los ensayos y solo en una de las entradas se detalla la preparación de soluciones del compuesto. Solamente en un ensayo frente a *Mycobacterium tuberculosis* en medio líquido el estigmasteril-3-O- β -glucósido fue destacado como activo con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 87 μ M,⁹⁵ aunque luego fue inactivo en ensayos contra el mismo organismo en medio de cultivo sólido, aún a concentraciones de hasta 348 μ M.

Entre las entradas correspondientes a daucosterol, una corresponde a ensayos frente a 58 líneas tumorales diferentes (ChEMBL ID: ChEMBL197711), incluidas en un data set de más de 7 millones de bioensayos (ChEMBL ID: ChEMBL1201862). En éste, el glucósido resultó inactivo frente a todas las líneas a 100 μ M. De las restantes entradas, una de ellas (ChEMBL ID: ChEMBL448133) es minoritaria con apenas dos bioensayos como antiinflamatorios empleando neutrófilos humanos como modelo, donde daucosterol resultó inactivo a 10 μ M.⁹⁸ Finalmente, la entrada principal referida a daucosterol (ChEMBL ID: ChEMBL506678) involucra 107 bioensayos, incluidos en 32 documentos diferentes. Más aún, en esta entrada se indica que el compuesto se encuentra en estudios clínicos fase 2, lo que muestra un camino promisorio para continuar investigándolo. Es de destacar que separamos las entradas según la etiqueta “Standard Type” para analizar sus publicaciones asociadas, y realizamos una revisión pormenorizada de cada una. Brevemente, encontramos actividades antibacterianas,^{99–101} antiinflamatoria,^{101–105} antioxidante,^{103,106} citotóxicas,^{102,107–117} y anti-Covid19 (ChEMBL ID: ChEMBL4495564). La mayoría de las entradas destacan la inactividad de los glucósidos ensayados en concentraciones del orden μ M, existiendo incluso entradas con concentraciones de hasta 100 μ M. Se destaca la actividad de los SGs frente a una línea celular de cáncer de colon (HT-29; 0,77 μ M)¹⁰⁸ y cierto efecto dependiente de la concentración por encima de 25 μ M frente a líneas celulares (Bel-7402, MCF7, HepG2 y A549),¹¹⁶ siendo prácticamente inactivo en casi todos los ensayos encontrados. Además, solo algunos trabajos indican el procedimiento de preparación de soluciones stock, así como el vehículo utilizado y el proceso de diluciones empleado.^{106,114,116}

Recientemente El Omari y col. compendieron las actividades biológicas de daucosterol, y sugirieron profundizar la investigación en la farmacodinámica, la farmacocinética y la toxicología de este compuesto.⁶⁰ De forma interesante, estos autores no nombran la actividad neurotóxica destacada por Khabazian, Tabata y col.,^{69,76} sino que por el contrario lo citan como un agente neuroprotector. De forma controversial, existen algunas referencias que reportan actividades de daucosterol erróneamente,¹¹⁸ o bien carentes de detalles sobre este compuesto,¹¹⁹ lo que puede resultar en estimaciones o conclusiones incorrectas; tal es el caso del reporte sobre actividad inflamatoria ensayada a 100 μ g/ml, es decir 175 μ M. Sin embargo, el trabajo es referido a un derivado monoesterificado en 6' de daucosterol con ácido benzoico.¹²⁰

Destacamos en este punto los aportes realizados por Sánchez-Ferrer sobre la agregación de daucosterol, quienes partiendo de soluciones de concentración 1 o 10 mg/ml de daucosterol en DMSO las diluyeron al décimo en agua pura y observaron la formación de dispersiones que caracterizaron con técnicas de microscopía.¹²¹ De este modo los ensayos llevados a cabo en medio acuoso en concentraciones entre 0,1-1 mg de SGs/ml de solución

(175-1750 μM) deberían presentarse en forma de dispersión. Profundizando en diversas publicaciones que trabajan con SGs, vimos que suele faltar información respecto de cómo se realizó la preparación de las diluciones ensayadas, así como la ausencia de comentarios sobre la formación de precipitados. Es por esto que evaluamos la formación de dispersiones tras la puesta en contacto de una cantidad fija de una solución stock de SGs (0,1 ml; 9,9 mM, DMSO) en distintos volúmenes de agua destilada (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 ml) de forma independiente. Para cada una de ellas, empleamos una fuente láser, inspeccionamos visualmente la presencia o ausencia de efecto Tyndall. Para nuestra sorpresa, todas las mezclas ensayadas mostraron claramente la dispersión del haz lumínico, lo que indicaría la formación de una suspensión en las concentraciones ensayadas, es decir, 0,045-0,99 mM, el cual es el rango en el que encontramos reportes de bioactividades. En otro experimento independiente se preparó otro conjunto de diluciones (0,028-0,62 mM), y se las diluyó con agua bajando un orden de magnitud con respecto al experimento anterior (4,5-99 μM), encontrando los mismos resultados. De este modo, pensamos que o bien la gran mayoría de ensayos reportados deben haberse hecho en forma de suspensión, o con menor probabilidad, que los distintos medios empleados podrían contener moléculas que contribuyan a mejorar la biodisponibilidad de los SGs. Hasta este punto vimos que los ensayos ejecutados rara vez superan los 100 μM , y cuya preparación suele ser poco detallada por lo cual es menester revisar la toxicidad de los SGs.

3.1.4.2 Evaluación de viabilidad celular frente a SGs

En vista de la gran variabilidad de la información reportada sobre la actividad de los SGs y gracias a una colaboración con el grupo del Prof. Ariel Quiroga (IFISE-CONICET-UNR), se buscó determinar la toxicidad del producto aislado de los tanques de BD. La Dra. Carla Comanzo llevó a cabo los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se prepararon soluciones stock de SGs en acetona y DMSO, en concentraciones de 0,17 mM y 9,95 mM, respectivamente. La elección de estos solventes se debió a que poseen baja toxicidad usados como vehículo concentraciones de 0,5-1%.

Comenzamos ensayando los SGs con la línea celular modelo Huh7 (hepatoma humano) mantenidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 10% de suero fetal bovino, utilizando acetona o DMSO como vehículo de los glucósidos. Dichas células fueron tratadas durante 72 h con cinco concentraciones diferentes de SGs (0,06-1% de vehículo en buffer) y, una vez finalizados los tratamientos, se realizó un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con el fin de obtener las curvas dosis/respuesta. Este ensayo permite determinar la viabilidad de las células siguiendo la actividad metabólica de las mismas por reducción del MTT, mediante espectroscopía UV-Vis.

A continuación, se muestran los gráficos de sensibilidad de SGs en la línea celular Huh7 graficando el número de células viables para cada concentración de SGs empleada (**Figura 3.7**).

El análisis de los resultados mediante ANOVA mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ensayadas y el control para acetona y DMSO ($p > 0,05$), por lo que podemos asegurar que los SGs no son tóxicos hasta la máxima concentración ensayada. Sería importante profundizar estos estudios determinando índice de letalidad (LD_{50} : *Letal dose 50%* ó LD_{90} : *Letal dose 90%*). Sin embargo, nos enfrentamos al problema de la baja solubilidad de los compuestos en el medio de cultivo, por lo que sería un problema a sortear en un futuro mediante alguna formulación (Tween 80, ciclodextrinas, entre otros) para lograr que los SGs estén biodisponibles para las células. De este modo, siendo que no se observó disminución significativa de la viabilidad de las células, y considerando la baja tasa de permeación de los SGs en el tracto digestivo,⁵² la concentración de SGs en sangre difícilmente alcanzaría los valores ensayados tras una permeación intestinal, por lo que los SGs no representarían un riesgo para los hepatocitos.

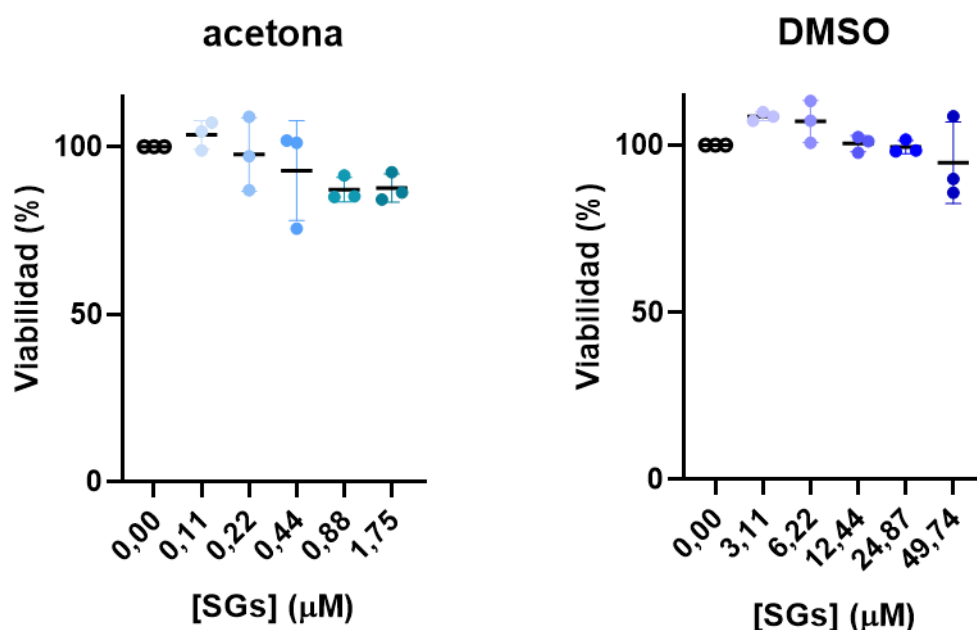


Figura 3.7. Gráficos de supervivencia de células Huh7 para diferentes concentraciones de SGs (0,1-49,7 μM) para dos solventes diferentes. Las concentraciones ensayadas se obtuvieron mediante diluciones de las soluciones madre de SGs en los diferentes vehículos. El control consistió en el agregado de 1% de vehículo para acetona, o de 0,5% para DMSO. * $p < 0,05$ vs. 0 μM (control con vehículo).

Como no encontramos reportes de solubilidad de SGs en agua, ni de la existencia de transportadores específicos, intentamos disolver 18 mg de SGs en 500 ml de agua mediante

baño de ultrasonido y no logramos ni siquiera una suspensión parcial, evidenciada por la rápida acumulación de sólido en el fondo del recipiente empleado luego del tratamiento con baño de ultrasonido. Podemos entonces asegurar que la solubilidad en agua a temperatura ambiente se encuentra muy por debajo de 36 mg/l, es decir 63 μ M. Según la Farmacopea Argentina, los compuestos con solubilidades menores a 100 mg/l son considerados como prácticamente insoluble o insolubles, tal sería el caso de los SGs.¹²²

Estos ensayos, aunque preliminares, arrojan un panorama promisorio para ahondar en los estudios de toxicidad *in vivo* dado que no mostraron toxicidad frente a los hepatocitos, los cuales serían los encargados de procesar los SGs internalizados. En términos de digestión, ha sido propuesto por Moreau y Hicks que los ASGs son hidrolizados enzimáticamente a SGs, aunque estos últimos no sufrirían la escisión de la porción glucídica.^{56,78} De este modo esperaríamos que los SGs recorran el tracto digestivo sin sufrir modificaciones químicas. Para evaluar esta hipótesis procedimos a ensayos de digestión enzimática *in vitro*.

3.1.4.3 Digestión simulada de SGs

Los métodos de digestión *in vitro* simulan los procesos de digestión *in vivo* y se utilizan ampliamente para estudiar el comportamiento gastrointestinal de los alimentos o productos farmacéuticos. Aunque los estudios nutricionales humanos siguen siendo considerados los más aceptados y confiables para abordar las cuestiones relacionadas con la dieta, los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, requieren menor mano de obra calificada y no tienen restricciones éticas. A su vez, estos ensayos presentan una alta reproducibilidad debido a la accesibilidad a condiciones controladas y a un fácil muestreo. Dichos métodos de digestión simulados suelen incluir las fases orales, gástricas e intestinales. En cuanto a estas últimas, generalmente se simulan las condiciones del intestino delgado, aunque ocasionalmente se incluyen las del intestino grueso. Estos métodos buscan reproducir las condiciones fisiológicas, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, el pH de cada sección, el tiempo de digestión y la concentración salina, entre otros factores.⁹²

Como modelo de digeribilidad, llevamos a cabo un ensayo enzimático de digestión simulada que consta de una etapa oral, una estomacal y una intestinal, realizadas en forma secuencial y estática (en el mismo tubo de reacción).⁹² Tras practicar la digestión sobre 25 mg de SGs, tanto en etapas secuenciales como individuales, se extrajeron del medio de reacción y luego se ensayaron por TLC sin observar la formación de fitosteroles en ninguna etapa en particular, ni tras el proceso en general. Si bien mostramos que los SGs no serían hidrolizados en las condiciones ensayadas, nuestra aproximación fue cualitativa. Por lo tanto,

podrían realizarse estudios cuantitativos respecto de las concentraciones de partida y las recuperadas, aunque requeriría de una analítica apropiada. También, es de destacar que, si bien ensayamos los SGs frente a tres enzimas digestivas (amilasa, peptidasa y lipasa pancreática), ninguna de ellas es una glucosidasa que pueda hidrolizar el acetal del glucósido de forma quimioespecífica. De este modo, siendo que estas enzimas están presentes en los alimentos, el destino de los SGs puede verse modificado si estos son administrados individualmente, o en presencia de otros componentes dietarios. Como veremos en capítulos posteriores, el bajo pH del estómago tampoco lograría hidrolizar a los glicósidos dado que, según nuestros estudios, se necesitan concentraciones de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 4 M y más de 70°C para lograr la hidrólisis química, (ver **3.2.2 Hidrólisis con ácidos minerales**) constituyendo otro indicio de la resistencia de los SGs a la hidrólisis durante su paso por el tracto digestivo. Sin embargo, según Nyström y col. (2008) es posible que exista cierta hidrólisis enzimática de los SGs por parte de enzimas endógenas de los materiales vegetales ingeridos, o bien por glucosidasas microbianas de la microbiota intestinal, especialmente en el colon.¹²³ No obstante, para evaluar su posible importancia para la nutrición humana, se necesita mucha más información sobre el metabolismo de los SGs.

3.1.4.4 Evaluación de toxicidad de SGs en ratones

Seguidamente, se llevaron a cabo estudios *in vivo*, para lo cual se prepararon suspensiones de SGs (25, 50, 100 y 200 [mg/kg PC]/día), y se trataron cuatro grupos de animales (2 ratones cada uno) durante un lapso de tres semanas continuas, contando además con un grupo control (3 ratones). Posteriormente, los animales fueron eutanasiados y se tomaron muestras de sangre y tejido. Estas muestras fueron seguidamente usadas para evaluar parámetros plasmáticos, analizar marcadores moleculares y evaluar por microscopía la arquitectura tisular de hígado e intestino delgado (yeyuno).

Comenzando el análisis de los grupos, se observó que no hubo diferencias significativas en los pesos corporales (PC) de los animales, ni a lo largo del tratamiento, ni entre los grupos ensayados (**Figura 3.8**). Del mismo modo, no existió diferencia entre los pesos del hígado (PH) de los diferentes grupos, y por tanto tampoco entre la relación porcentual PH/PC %, constituyendo el primer indicio de ausencia de toxicidad de los SGs. Es de destacar que durante el tratamiento no se observaron modificaciones físicas ni conductuales en los ratones, lo que indica que el tratamiento con SGs no generó efectos comportamentales en los animales.

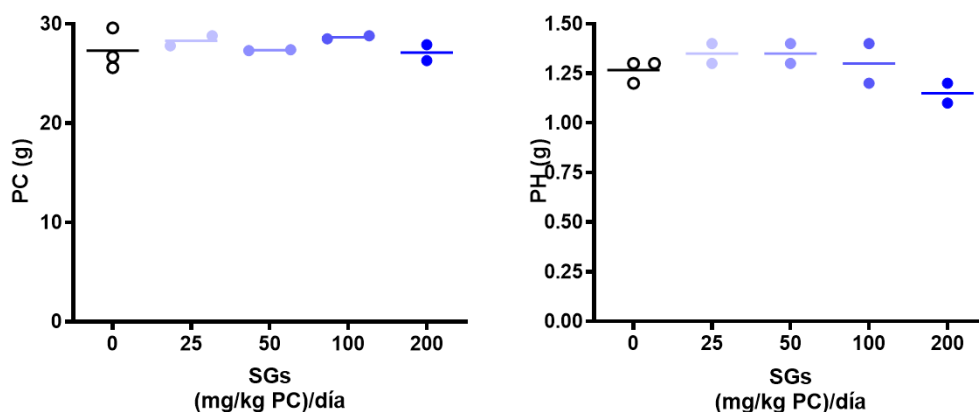


Figura 3.8. Comparación de los pesos corporales y hepáticos de ratones tratados con SGs a diferentes concentraciones (2 animales por grupo) en comparación con el grupo control (3 animales).

Se determinaron valores plasmáticos de cada grupo que pudiesen evidenciar alguna modificación metabólica causada por el tratamiento con SGs. Se midió la concentración de glucosa, colesterol y TAGs, buscando alguna modificación en el metabolismo de carbohidratos o lípidos, respectivamente. Como puede notarse a partir de los gráficos de la **Figura 3.9**, existen diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0,05$).

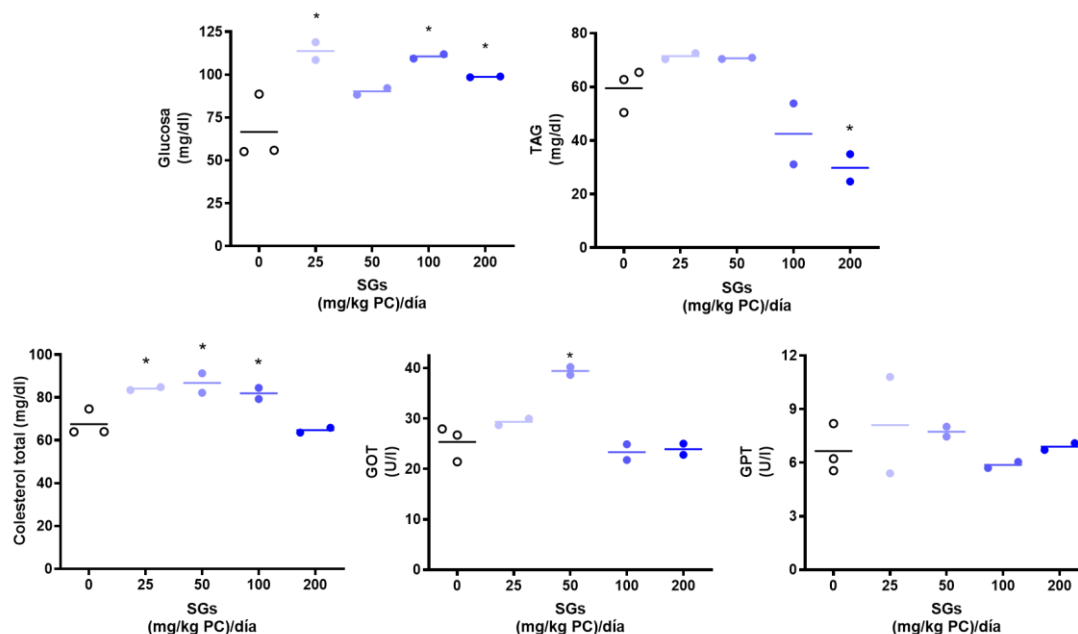


Figura 3.9. Medición de parámetros bioquímicos plasmáticos en los grupos tratados (2 animales por grupo) y el grupo control (3 animales). * $p < 0,05$ vs. control (0 mg/kg PC/día).

El aumento de glucosa en sangre, junto a la disminución en los TAGs plasmáticos nos permite proponer un efecto de disminución en la absorción de estos últimos por el tratamiento con SGs. Esta disminución en la absorción de TAGs, forzaría el uso de carbohidratos como fuente de energía, evidenciado por el incremento en la glicemia plasmática. Sin embargo, se observa un aumento significativo en la disminución de TAGs sólo para la condición de mayor concentración de SGs. Paradójicamente, en este grupo es en donde se presenta un efecto menos pronunciado de aumento de glucosa en sangre. Respecto de las concentraciones de colesterol total en sangre, puede notarse un aumento estadísticamente significativo en relación al grupo control, aunque dicho aumento no revestiría una diferencia tal que permita inferir una modificación metabólica específica. Finalmente se evaluaron dos marcadores plasmáticos referidos al funcionamiento hepático, estos son la transaminasa glutamil-oxaloacética (GOT; del inglés, *Glutamic-Oxaloacetic Transaminase*) y la transaminasa glutamil-piruvato (GPT; del inglés, *Glutamic Pyruvic Transaminase*). Dado que se esperaría un aumento en los valores de estos marcadores en caso de toxicidad hepática, podemos inferir que el tratamiento con SGs, en las concentraciones ensayadas, no provoca este efecto. Estos resultados confirman nuestras observaciones en los ensayos *in vitro*. Ya sea por inocuidad, insolubilidad o incapacidad de atravesar membranas, los SGs no mostraron toxicidad alguna.

Posteriormente, se llevaron a cabo mediciones de TAGs y colesterol, ambos en tejidos, y se compararon con las mediciones de los grupos control (**Figura 3.10**). Además, se realizaron análisis de Western Blot de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP, del inglés *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*).

Puede observarse que no existe diferencias significativas entre los grupos, tanto en contenido de TAGs como de colesterol, en hígado e intestino delgado. Excepcionalmente, se observa una disminución en los WB de intestino delgado para valores intermedios de SGs administrados, aunque dicha diferencia es mínima, por lo que no habría una diferencia clara entre grupos. Este segundo indicio respalda la hipótesis de que los SGs no son tóxicos, dado que no se observaron diferencias metabólicas entre el grupo control y los grupos tratados.

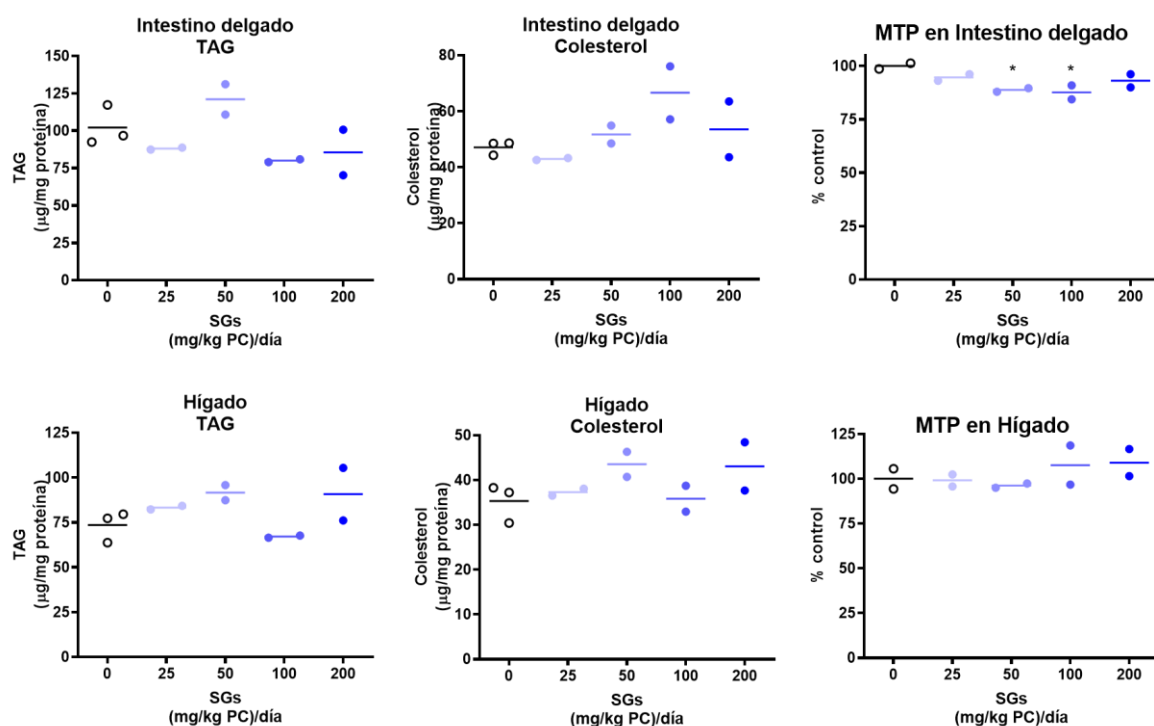


Figura 3.10. Medición de la acumulación de lípidos en tejido (TAGs y colesterol) y medición relativa de MTP en ambos órganos de grupos tratados (2 animales cada uno) y el control (3 animales). * $p < 0,05$ vs. 0 (mg/kg PC)/día (control)

Finalmente, se evaluó la histología del tejido hepático e intestinal de los animales en cortes histológicos incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina (HE) para evaluar la arquitectura tisular de los órganos de los diferentes grupos estudiados. (**Figura 3.11**) Se muestra un corte histológico para cada uno de los grupos tratados (SGs 25-200 [mg/kg PC]/día) precedidos de un corte correspondiente al grupo control.

Respecto al hígado, no se observaron diferencias entre los grupos en la organización tisular, las estructuras lobulillares, trabeculares y portales no presentaron alteraciones aparentes y la distribución de las fibras colágenas se mantuvo dentro de su patrón de disposición normal en el parénquima hepático. Los hepatocitos mostraron aspecto normal con núcleos eucromáticos y citoplasma basófilo, se observaron sinusoides hepáticos normales, no se observaron células necróticas, ni áreas de inflamación en ninguna de las tres zonas del lobulillo hepático entre los grupos. En intestino, tanto en el duodeno como en el yeyuno, se pudo observar la mucosa con su epitelio cilíndrico alto con microvellosidades conservadas, no se observó atrofia de las vellosidades, ni de las criptas de Lieberkhün, ni tampoco presencia de edema, fibrosis o inflamación con infiltración de células inflamatorias en la mucosa o la submucosa intestinal en todos los grupos estudiados. Por lo tanto, podemos asegurar que el tratamiento con SGs no genera diferencias en la arquitectura tisular, probando la inocuidad de los SGs en las concentraciones ensayadas.

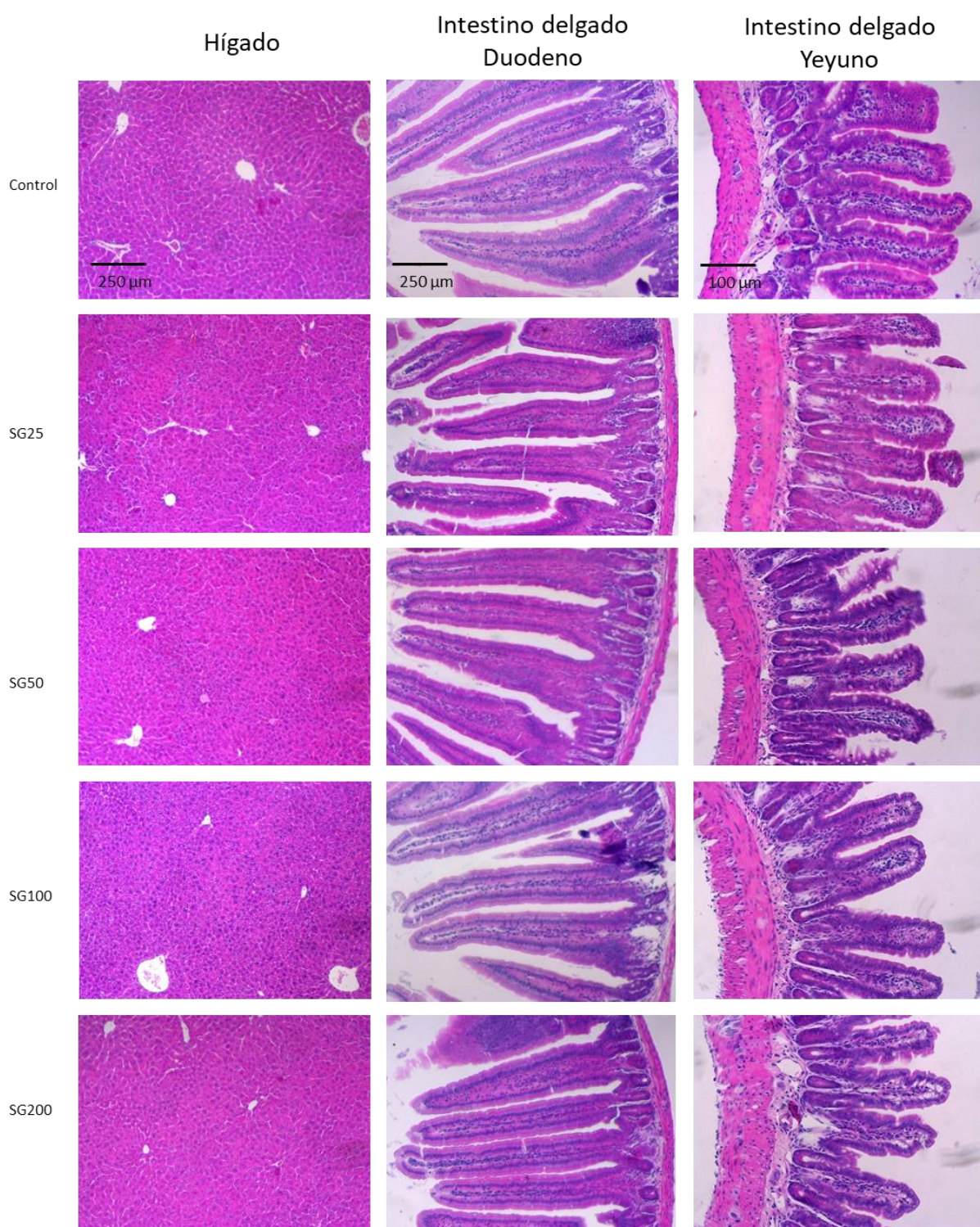


Figura 3.11. Estructuras tisulares de (izquierda) hígado y de dos tramos de intestino delgado, (centro) duodeno y (derecha) yeyuno. Los cortes histológicos fueron teñidos con HE, como tinción de rutina. Cada fila corresponde a una concentración de tratamiento de SGs ([mg/kg PC]/día).

De este modo, tras los ensayos *in vitro* e *in vivo*, probamos que el tratamiento con SGs aislados de BD de soja no genera modificaciones metabólicas ni tisulares observable, tras tratamiento durante 3 semanas. Sin embargo, nuestros ensayos fueron realizados por duplicado para cada grupo de tratamiento, de este modo sería deseable aumentar el número de animales tratados para poder confirmar nuestras observaciones preliminares. Además, sería necesario extender el tiempo de tratamiento, por lo menos hasta 4 meses, que es el tiempo en el cual se espera la aparición de problemas neurológicos en murinos,^{70,76} aunque esperaríamos que no se repliquen esos modelos, como demostró Bigelow y col.⁷¹

Queda pendiente entonces, profundizar en los estudios de toxicidad en otros modelos de mayor complejidad. Una vez superada dicha prueba, los SGs podrían ser empleados en el desarrollo de nutracéuticos explorando sus propiedades hipocolesterolémicas ya probadas, o bien, profundizando en la disminución de triglicéridos en sangre observada en nuestros estudios preliminares *in vivo*.

3.2 Fitosteroles de alta pureza

Los esteroides de plantas, también conocidos como fitosteroles, son moléculas de interés para la comunidad científica dado que su consumo se asocia con posibles beneficios en la salud. Estas moléculas, son metabolitos secundarios vegetales con estructuras y propiedades similares al colesterol (**Figura 3.12**). De este modo, suele encontrarse a los fitosteroles como parte de las membranas lipídicas de las células vegetales. Diferentes estudios han demostrado que los fitosteroles presentan actividades hipocolesterolémica, antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, y su consumo se asocia con menores riesgos de enfermedades cardiovasculares.^{124,125} Lin y col. demostraron que el consumo de fitosteroles disminuye la absorción intestinal de colesterol, y de forma interesante observaron el mismo comportamiento al suministrar SGs aislados de lecitina de soja. En ese estudio, once voluntarios sanos consumieron en un orden aleatorio, desayunos enriquecidos con SGs (300 mg), fitosteroles (300 mg) o bien libre de agregados. Tanto los fitosteroles, como los SGs, redujeron significativamente la absorción intestinal de colesterol en comparación con el control, medida por el enriquecimiento plasmático de $\Delta 7$ -colesterol, el cual fue incluido en las comidas de prueba de los ensayos.⁵⁶ Estos resultados coinciden con los datos presentados en 1994 por Tateo y col.⁶⁷

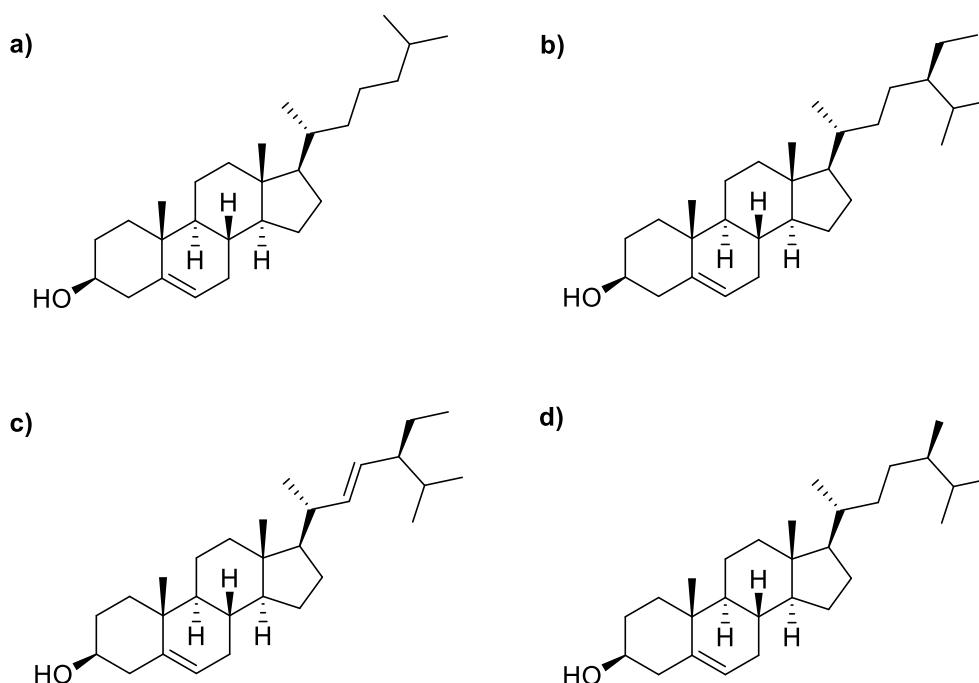


Figura 3.12. Estructura de esteroides (a) colesterol, (b) β -sitosterol, (c) estigmasterol y (d) y campesterol.

La presencia de fitosteroles es ubicua en plantas y vegetales por lo que son constituyentes comunes de la dieta humana,¹²⁶ aunque normalmente son consumidos en cantidades por debajo de las concentraciones activas. Para aumentar los niveles basales de consumo de fitosteroles, se los adiciona a alimentos en su forma libre o esterificados con ácidos grasos en C-3 (ésteres de esteroides de ácidos grasos). Mediante esta suplementación se busca disminuir la absorción de colesterol en el intestino con la consecuente reducción del nivel de colesterol en sangre. Los fitoesteroides también son utilizados como materiales de partida en la preparación de esteroides terapéuticos. Tales procesos involucran el uso de biotransformaciones junto a vías sintéticas convencionales,¹²⁷ y tienen mercado mundial que excede las 1000 toneladas por año.¹²⁸

Desde el punto de vista estructural, todos los fitosteroides cuentan con un hidroxilo en C3 y distintas modificaciones en el esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno, así como en la cadena exocíclica unida al C17, donde varían tanto la cantidad y posición de los dobles enlaces como la presencia o ausencia de grupos metilo. Todas estas combinaciones dan lugar a más de 250 fitosteroides diferentes.¹²⁹ Sin embargo, los esteroides más abundantes son el β -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol (**Figura 3.12**) siendo la distribución relativa de esteroides característica de cada especie vegetal.^{129,130}

La obtención a gran escala de fitosteroides se lleva a cabo principalmente utilizando subproductos de la producción de aceites vegetales¹³¹ y de la industria de la pulpa del papel¹³². Como se señaló previamente, las materias primas de origen vegetal poseen un gran potencial para reemplazar gran parte de los recursos fósiles empleados en producciones industriales. Por ejemplo, las biorrefinerías que emplean TAGs como plataforma usan aceites vegetales obtenidos de semillas o aceites usados para producir principalmente BD y glicerina a través de una transesterificación. En el caso particular del aceite de soja, además de dichos productos mayoritarios, pueden obtenerse otras especies químicas como ser tocoferoles, lecitinas, SGs y fitosteroides, entre otros. En el refinado de aceites vegetales, el proceso de desodorizado se utiliza para eliminar compuestos volátiles, ceras, ácidos grasos libres, pigmentos y productos de oxidación. Junto con estas sustancias no deseadas, los fitoesteroides y tocoferoles se eliminan formando los denominados "lodos del desodorizado", siendo una de las principales materias primas para obtener fitoesteroides, dando valor a dicho subproducto. Otra fuente de fitosteroides es el denominado *tall oil*, un subproducto de la industria de la pasta de papel. En la digestión química de la madera se obtiene una "prepulpa" tras la saponificación de los ácidos grasos esterificados y las resinas, convertidas en sus sales sódicas. El resultado de esta etapa es una mezcla de compuestos químicos que se eliminan formando espumas que flotan en la superficie (de aquí el nombre "*tall oil*") y permiten separar los jabones, resinas, alcoholes grasos, fitoesteroides, etc. Más allá del subproducto

que se utiliza para obtener fitosteroles, los procesos industriales empleados para separar y concentrar la fracción insaponificable de interés, se basan en técnicas de recristalización y destilación al vacío.¹³³

Para comenzar con el empleo de SGs como fuente de productos de alto valor agregado decidimos ensayar la hidrólisis en medio ácido de los SGs obtenidos a partir de los fondos de tanques de BD. De este modo buscamos explotar una nueva fuente de fitosteroles de alta pureza mediante un proceso simple y eficiente, partiendo de un desecho industrial, hoy en desuso. Para ello comenzaremos evaluando ensayos a escala de mg, buscando optimizar condiciones de reacción, para luego escalar el proceso hasta gramos.

3.2.1 Hidrólisis de SGs

Los crecientes reportes sobre glucósidos derivados de esteroides han demostrado que los SGs provenientes de células animales o vegetales presentan distintas funciones biológicas. Estas moléculas han mostrado tener bioactividades desde protectoras hasta tóxicas.^{52,56} Sin embargo, las agliconas de estas moléculas no presentan tales limitaciones, por lo cual nos propusimos utilizar los SGs recuperados como una fuente de fitosteroles, dado que son entidades moleculares conocidas y poseen un mercado establecido. De hecho, el mercado de fitosteroles a escala mundial representa un flujo de capitales que supera los US\$ 900 millones por año.¹³⁴ Comparando los métodos de obtención de fitosteroides mencionados previamente, obtenerlos a partir de la hidrólisis de SGs tendría que ser una opción más simple, económica y eficiente. A diferencia de los métodos tradicionales que requieren su aislamiento de una matriz compleja, el proceso que deberíamos emplear consistiría en la hidrólisis ácida de los SGs. Dado que para dicho proceso de obtención utilizaremos SGs purificados como material de partida, el proceso de aislamiento y purificación debería ser mucho más simple. Es por eso que se espera que los fitosteroides obtenidos mediante este proceso tengan una alta pureza. Basamos nuestra hipótesis en la elevada pureza encontrada para los SGs en estudios exploratorios, ya sea por técnicas de GC-FID⁷⁵ como de RMNc (ver

3.1.3 Determinación de pureza de SG).

Durante una etapa previa del proyecto, se exploraron condiciones de hidrólisis de los SGs utilizando mezclas de agua acidulada mezclada con alcoholes como solvente, como así también distintas concentraciones y tipos de ácidos. El agregado de alcoholes al medio de reacción se exploró pensando que ayudaría a mejorar el avance de reacción. Sin embargo, no se observó una mejora significativa en la cinética de la reacción, por lo que se prosiguió el estudio utilizando únicamente agua como solvente. Se evaluó la hidrólisis utilizando $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ o $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$ como promotor ácido en concentraciones entre 0,9M – 8,7M y 1,7M – 7,7M,

respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo variando la temperatura desde 25°C hasta 80°C.

Como resultado de este estudio exploratorio se concluyó que la hidrólisis de los SGs era viable en las condiciones ensayadas, aunque restaba determinar parámetros que permitan optimizar dicha reacción como ser la temperatura utilizada, la concentración y el tipo preferido de ácido, así como el mínimo tiempo de calentamiento requerido para que la reacción logre completarse. Además, siendo que la presencia de ácido tiene la finalidad de catalizar las reacciones de hidrólisis, éstos permanecen en el medio de reacción aun habiéndose hidrolizado todos los SGs de partida. Este hecho nos permite proponer la recuperación de los jarabes ácidos para su posterior reutilización en otros ciclos de hidrólisis con nuevos *batches* de SGs.

Como instancia preliminar de esta etapa del trabajo de tesis decidimos hacer una búsqueda bibliográfica sobre la hidrólisis de SGs en distintos medios y con distintos catalizadores. Tras realizar un sondeo de reacciones utilizando el motor de búsqueda Reaxys® (www.reaxys.com,¹³⁵ consultado diciembre de 2019) haciendo uso de la estructura del β -glucósido derivado de β -sitosterol (daucosterol) como material de partida, se hallaron tan solo 13 entradas (33 documentos publicados) de las cuales 5 entradas describían la hidrólisis química de los SGs (13 documentos publicados). Las condiciones reportadas incluyen la solvólisis del enlace glucosídico catalizada por ácido, utilizando como solventes agua, etanol, metanol y sus combinaciones, y en un solo caso, la mezcla 1,4-dioxano. Los ácidos utilizados incluyen HCl (9 condiciones) y H₂SO₄ (3 condiciones).

Seguidamente, ampliamos la búsqueda proponiendo como material de partida un β -glucósido genérico, lo que dio lugar a 1433 entradas diferentes. Dada la heterogeneidad del resultado obtenido, la lista se depuró considerando las entradas más numerosas. De este modo acotamos los resultados a condiciones de hidrólisis catalizadas por ácido que pudieran ajustarse a nuestro sistema. En primer lugar, se consideraron la totalidad de las entradas filtrándose por “Reactivo/Catalizador” seleccionándose las subclases “ácido clorhídrico”, “agua” y “ácido sulfúrico”, representando el 75% del total. Posteriormente, se filtraron las 861 entradas restantes según “Clases de Reacción” seleccionándose “hidrólisis”, representando el 68% de las entradas. Se repitió el filtrado invirtiendo el orden de aplicación de criterios para la selección y se obtuvo la misma base de datos de reacciones.

Los datos obtenidos fueron graficados como diagramas circulares (**Figura 3.13**) permitiéndonos visualizar los solventes, los reactivos, las temperaturas y los tiempos de reacción más utilizados.

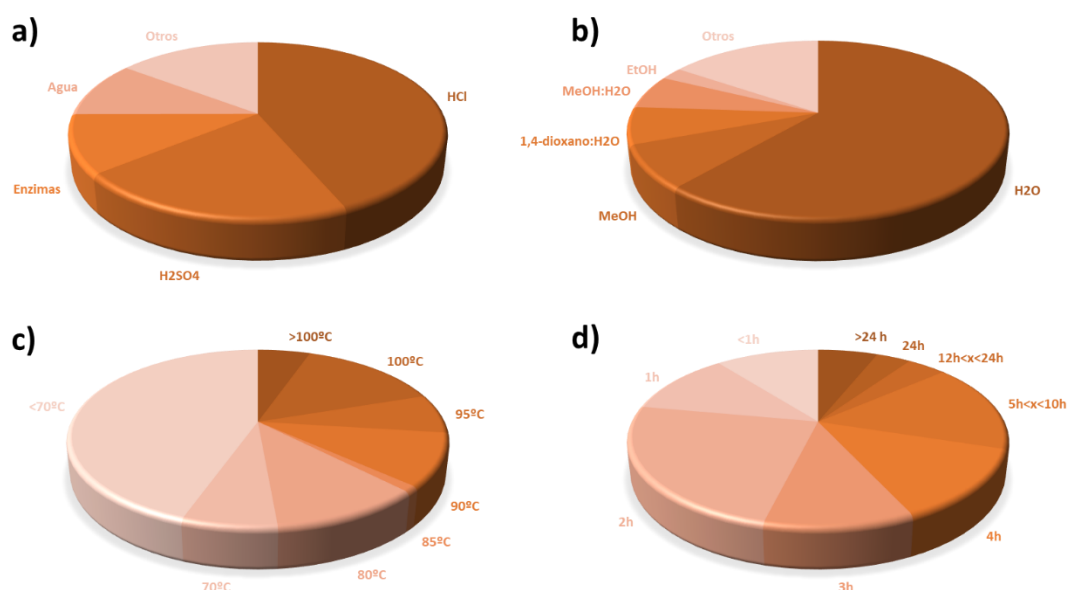


Figura 3.13. Distribución de las condiciones de reacción encontradas en Reaxys[®] según a) reactivo, b) solvente, c) temperatura y d) tiempo de reacción.

Si bien existen condiciones preponderantes, se observa una marcada heterogeneidad en las condiciones de reacción. Una posible explicación para esta observación es que, en la mayoría de los casos, estas reacciones se utilizan para el aislamiento y caracterización de productos a escala de miligramos, sin que se reporten casos de hidrólisis de glicósidos a escala industrial. Por otro lado, algunas entradas incluyen más de una reacción detallada lo que podría causar desvíos en los resultados de la minería de datos debido a redundancia en la base de datos. Más aún, algunas reacciones incluidas no cuentan con todos los datos esperados como ser la temperatura empleada, el tiempo de reacción, solvente, etc. Sin embargo, a pesar de la heterogeneidad y los posibles desvíos generados por redundancia de datos, es posible extraer información útil.

Considerando los reactivos (**Figura 3.13 a**) los más empleados son los ácidos minerales, HCl y H₂SO₄, que en su conjunto representan más del 64% de las reacciones. También se encontraron condiciones que utilizaban enzimas (glucosidasas), representando un 11% del total. A partir de los datos y las experiencias previas de nuestro grupo de trabajo, seleccionamos los dos ácidos minerales para continuar nuestro estudio. Sin embargo, dentro de la información recabada en la base de datos, no se encontró reportada la concentración de ácido, por lo que debería ser una de las variables a optimizar.

Por otro lado, entre los solventes utilizados (**Figura 3.13 b**) el agua representa más del 61% de las reacciones consideradas. Este resultado puede verse aumentado debido a que las entradas que usan enzimas pueden tener agua como solvente o buffers acuosos, que se categorizan como “Otros”. Considerando que la mayoría de las reacciones descriptas

utilizan agua y que los antecedentes de nuestro grupo mostraban que la presencia de alcoholes en el proceso de hidrólisis no mejora el curso de la reacción, continuamos nuestros estudios empleando agua acidificada como medio de reacción.

Con respecto a la temperatura (**Figura 3.13 c**) puede notarse que más del 55% de las reacciones consideradas utilizan temperaturas mayores o iguales a 70°C, mientras que el 45% restante utiliza temperaturas más bajas y compatibles con el empleo de enzimas. Estos datos son coincidentes con los estudios previos del grupo en donde no se observó la reacción de hidrólisis de SGs por debajo de los 70°C. Por esta razón seleccionamos para nuestros estudios 80°C de temperatura como parte de nuestras condiciones de reacción.

Por último, con respecto a los tiempos de reacción reportados (**Figura 3.13 d**), se encontró que más del 70% de las reacciones emplean tiempos menores a 5 horas, aunque en algunos casos alcanzan hasta los 7 días de reacción (168 horas). Estos datos se contradicen con lo observado previamente en nuestro sistema, donde no se evidenció un avance significativo de la reacción en tiempos cortos. Por lo tanto, el tiempo de reacción será una de las variables a optimizar en etapas posteriores.

Por lo tanto, a partir de estas consideraciones, procedimos a la optimización de la reacción de hidrólisis de los SGs obtenidos previamente a partir de los fondos de tanques de BD, empleando una estrategia de optimización basada en el análisis de una variable a la vez.

3.2.2 Hidrólisis con ácidos minerales

El proceso propuesto para la obtención de fitosteroles se basa en la hidrólisis de los SGs, en el cual tanto el material de partida como el producto son insolubles en el medio de reacción. Una vez completada la transformación, el producto podría separarse fácilmente por filtración, mientras que la glucosa formada concomitantemente durante el proceso permanecería disuelta en el medio acuoso ácido. Dado que el ácido no se consume durante la reacción, el medio ácido podría reutilizarse en nuevas reacciones.

Luego de aunar criterios entre las condiciones reportadas y los estudios previos sobre la hidrólisis de SGs abordados previamente en nuestro grupo, nos propusimos optimizar las condiciones de hidrólisis empleadas, procurando recuperar y reutilizar el medio de reacción. A continuación, se presenta un diagrama de flujo que engloba la estrategia propuesta (**Figura 3.14**).

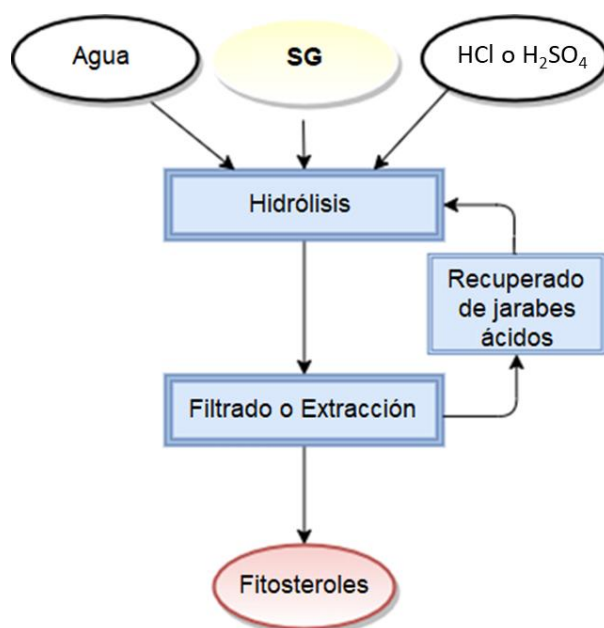
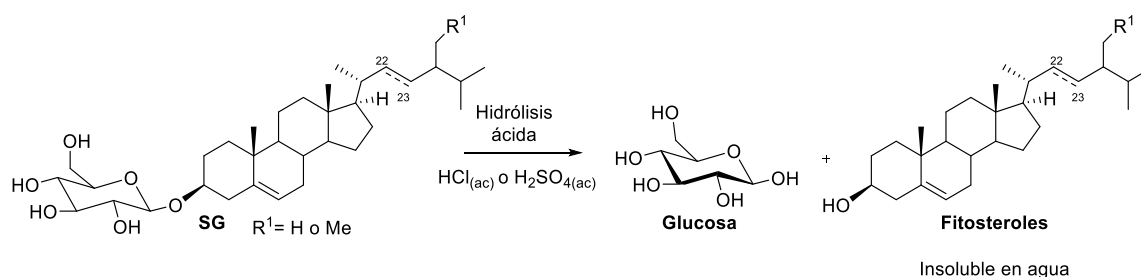


Figura 3.14. Proceso de producción de fitosteroles. Partiendo de los SGs el proceso circular en *batch* permitiría obtener los fitoesteroles, recuperando los jarabes ácidos para una nueva reacción de hidrólisis.

Con el fin de determinar cuál de los dos ácidos minerales (HCl o H_2SO_4) sería seleccionado para la optimización a escalas mayores, comenzamos realizando una serie de experimentos exploratorios. Como primer paso realizamos reacciones de hidrólisis de 100 mg de SGs (0,173 mmol) en 5 ml de ácido empleando cuatro experimentos independientes para cada condición (**Esquema 3**). Las reacciones fueron calentadas a 80°C con agitación orbital de 700 rpm utilizando un termo-mezclador DLab HM100-PRO, durante 32 h para lograr que las reacciones se completen.



Esquema 3. Obtención de fitosteroles por hidrólisis ácida de esteril-β-D-glucopiranósidos.

Dado que en estudios previos las reacciones a temperaturas inferiores a 70°C no progresaban y que las reacciones a temperaturas más elevadas requerían más de 24 horas para completarse, los experimentos exploratorios se realizaron calentando a 80°C durante 32 horas. Una vez fijadas las condiciones de reacción, buscamos determinar la concentración óptima de ácido para futuros ensayos. Para ello, se llevaron a cabo reacciones por

cuadruplicado utilizando las mismas cantidades de SGs, pero con diferentes concentraciones de ácido (1, 2, 4 y 8M). Las condiciones y resultados de estos experimentos se detallan en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Ensayos exploratorios de la hidrólisis de SGs empleando distintos ácidos.

Entrada ¹	Ácido	Conc. (M)	Fitosteroles (mg)	Rendimiento (%)
1	HCl	1	0,83±0,35	1,16±0,49
2	HCl	2	0,93±0,23	1,30±0,32
3	HCl	4	68,6±0,89	95,9±1,25
4	HCl	8	53,9±2,35	75,9±3,31
5	H ₂ SO ₄	1	0,58±0,08	0,81±0,12
6	H ₂ SO ₄	2	0,48±0,08	0,67±0,12
7	H ₂ SO ₄	4	7,30±1,92	7,71±5,03
8	H ₂ SO ₄	8	72,3±3,46	101,8±4,87

Condiciones de Reacción: SG: 100 mg, Vol. de ácido: 5.0 ml, Temp: 80 °C, Tiempo: 32 h.

¹Cada entrada es el resultado de cuatro experimentos independientes.

Como se observa, al utilizar HCl en concentraciones menores a 4M no se detectó avance en la reacción (**Tabla 3.3**, Entradas 1-2). Notablemente, las entradas con concentraciones superiores a 2M mostraron la desaparición total de SGs. En particular, cuando la reacción se realizó con HCl 4M, se completó obteniendo un rendimiento promedio del 95.9% (**Tabla 3.3**, Entrada 3). Por otro lado, al duplicar la concentración de ácido, el rendimiento promedio disminuyó en un 20% (**Tabla 3.3**, Entrada 4).

Los resultados obtenidos utilizando H₂SO₄ mostraron un comportamiento similar. Las reacciones con concentraciones de ácido inferiores a 4M tuvieron rendimientos promedios cercanos al 1% (**Tabla 3.3**, Entradas 5-6). Aumentando la concentración a 4M, se observó un ligero incremento con un rendimiento promedio inferior al 10% (**Tabla 3.3**, Entrada 7), significativamente menor que el obtenido con la misma concentración de HCl. Finalmente, la reacción realizada con H₂SO₄ 8M alcanzó una conversión cuantitativa del material de partida (**Tabla 3.3**, Entrada 8).

Tras una inspección visual de los sólidos obtenidos notamos que las reacciones en las que se empleó H₂SO₄ presentaban una coloración marrón intensa, comparado con los fitosteroles obtenidos en las reacciones catalizadas por HCl (**Figura 3.15**). Dicha coloración

puede ser atribuida a la presencia de productos de deshidratación de la glucosa, como ser huminas insolubles.¹³⁶

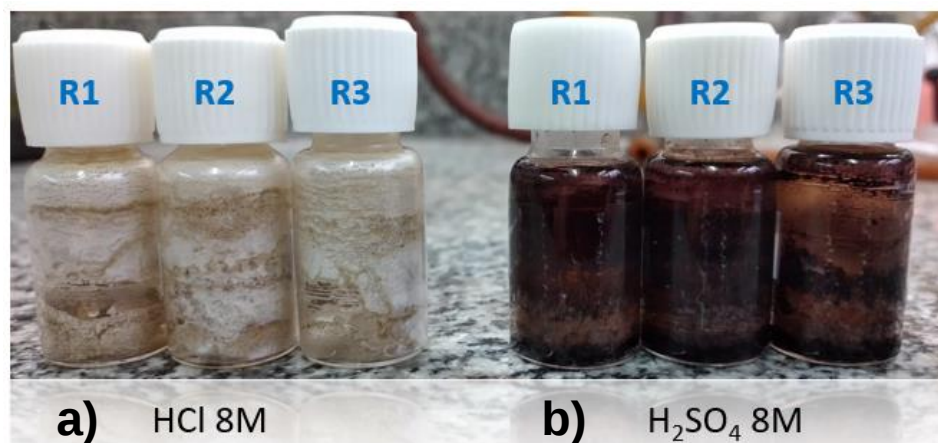


Figura 3.15. Fitosteroles obtenidos por hidrólisis ácida de 100 mg de SGs a 80°C durante 32 h. a) en 5 ml de HCl 8M; b) en 5 ml de H₂SO₄ 8M.

En ambos casos, una vez completados los tiempos de reacción los fitosteroles fueron recuperados del medio de reacción mediante filtración, apropiadamente lavados y secados. Los fitosteroles fueron caracterizados por ¹H-RMN en CDCl₃ presentando las señales de protones olefínicos características. Encontramos un multiplete a 5,35 ppm asignable al protón olefínico endocíclico del esqueleto de esteroides y dos dobles dobletes entre 5,19-4,97 ppm asignados a los protones del doble enlace de la cadena exocíclica del estigmasterol (**Figura 3.16**). Basados en la relación de integraciones de estas dos señales (1:0,5; **Figura 3.16**) pudimos concluir que la relación de los fitosteroles se mantiene tras la reacción de hidrólisis, en donde el estigmasterol es de alrededor del 25%. Además, encontramos una señal a 3,52 ppm la cual se representa un multiplete característico del C3-H de los fitosteroles (**Figura 3.16**). Considerando la relación entre las áreas de las señales, y la presencia de señales características, concluimos que el proceso empleado nos permite obtener fitosteroles en ausencia de subproductos y de alta pureza.

En vista de los resultados obtenidos, seleccionamos HCl como agente de hidrólisis para futuras reacciones en una concentración de 4M, ya que, a diferencia del H₂SO₄, requiere menos equivalentes y no genera coloración en el producto (**Figura 3.15**). Considerando los experimentos descritos anteriormente, logramos fijar la temperatura, así como el tipo y la concentración óptima de ácido a utilizar.

A continuación, realizamos un estudio cinético de la reacción de hidrólisis, empleando HCl(ac) (4M) como agente hidrolítico, con el fin de determinar el tiempo necesario para completar la transformación de SGs en fitosteroles.

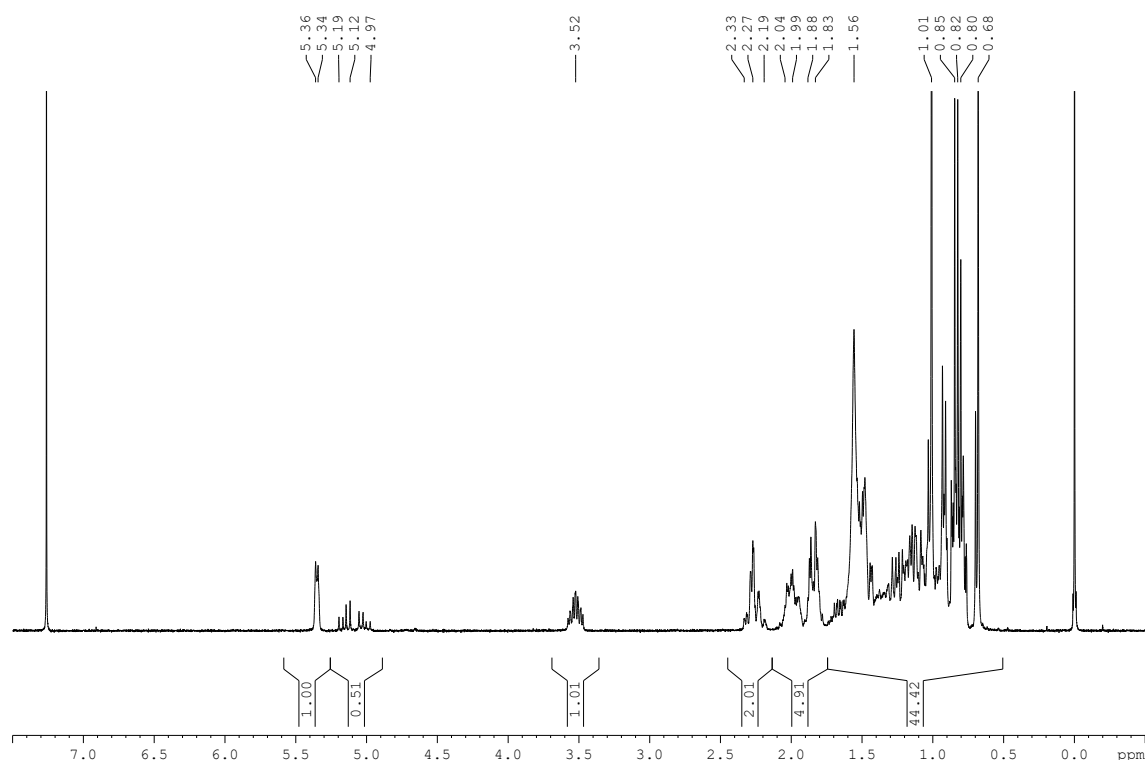


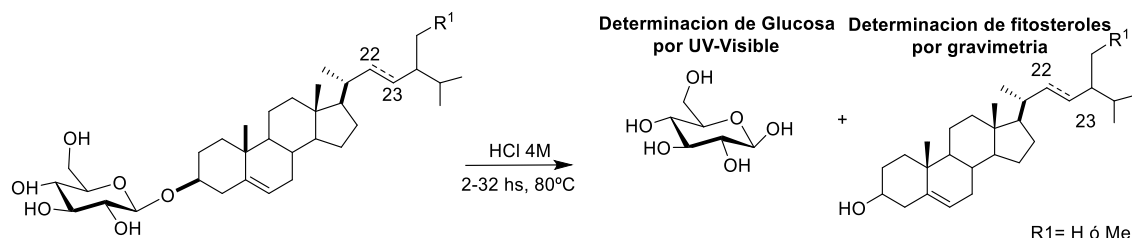
Figura 3.16. Espectro de ^1H -RMN de la mezcla fitosteroles obtenidos a partir de la hidrólisis de los SGs recuperados. Solvente CDCl_3 .

3.2.2.1 Cinética de la hidrólisis de SGs

Con el fin de determinar el tiempo necesario para completar la reacción en estudio, llevamos a cabo una serie de experimentos por cuadruplicado en las condiciones antes descritas (**Esquema 4**). Para seguir el avance de reacción se determinó la cantidad de fitosteroles obtenidos por técnicas gravimétricas, y paralelamente se determinó la concentración de glucosa usando un kit enzimático comercial (Glicemia *enzimática* AA, Wiener lab, Rosario, Argentina). Este ensayo consiste en dos reacciones enzimáticas acopladas, la primera es catalizada por la glucosa oxidasa (GOD), que reacciona con la glucosa disuelta produciendo peróxido de hidrógeno. Este producto, formado en cantidades estequiométricas, es reducido por la acción de peroxidasa (POD) que junto con 4-aminofenazona y 4-hidroxibenzoato da lugar a la formación de una quinona roja. La producción de esta quinona a $\lambda_{\text{abs}}=505 \text{ nm}$ es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

Para cada reacción se suspendieron 100 mg de SGs (0,173 mmol) en 5 ml de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 4 M y se calentaron a 80°C y agitaron a 700 rpm en un termo-mezclador DLab HM100-PRO. Los tiempos de reacción se evaluaron en 2, 8, 12, 16, 18, 20, 24, 28 y 32 h, para dar un set de 36 experimentos. Una vez concluidos los tiempos de reacción estipulados, los fitosteroles formados fueron extraídos del medio de reacción utilizando Et_2O (2x2ml). Posteriormente las

fases orgánicas combinadas fueron filtradas para eliminar restos de SGs suspendidos y luego concentradas utilizando un equipo de corriente paralela de nitrógeno BIOBASE a 40°C.



Esquema 4. Estudio de la hidrólisis de SGs catalizada por HCl_(ac) 4M en función del tiempo. Se siguió el avance de reacción mediante técnicas espectroscópicas (UV-Vis) para el seguimiento de la glucosa formada y paralelamente la determinación gravimétrica de los fitosteroles extraídos del medio de reacción.

Finalmente, las masas obtenidas fueron pesadas con precisión en balanza analítica. Por otro lado, las fases acuosas fueron recolectadas para posteriores análisis de concentración de glucosa. Las masas de fitosteroles obtenidas en cada experimento se listan en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4. Masas de fitosteroles obtenidas luego de la hidrólisis de los SGs

Replica	1	2	3	4
t (h)	Masa (mg)			
2	4,0	5,6	5,0	8,2
8	19,3	17,4	19,4	19,6
12	49,9	59,0	58,1	48,1
16	69,8	68,5	68,7	68,0
18	62,0	67,2	66,3	58,6
20	67,1	69,1	66,5	63,9
24	68,3	68,0	69,4	69,1
28	69,5	69,6	69,9	68,7
32	70,6	69,7	69,7	70,7

Condiciones de Reacción: SG: 100 mg, Vol. de HCl 4M: 5,0 ml, Temp: 80 °C, Agitación: 700 rpm

Para evaluar el nivel de degradación que sufre la glucosa en el medio de reacción, se desarrolló un experimento control. El mismo consistió en reacciones por cuadruplicado conteniendo la máxima concentración esperada tras la hidrólisis completa de los SGs de partida. Para ello se prepararon soluciones acuosas disolviendo glucosa pura en 5 ml de HCl 4 M, y se calentaron a 80°C con agitación constante a 700 rpm utilizando el termo-mezclador. Las reacciones se calentaron durante 2, 4, 8, 16 y 32 h, transcurridos estos tiempos se

tomaron muestras del seno de las reacciones y se realizaron medidas espectrofotométricas de concentración de glucosa con los métodos antes descritos. Con los datos obtenidos se confeccionó una curva de concentración *versus* tiempo. En la (**Figura 3.17**), se presentan el resultado de este estudio, donde se observa que existe degradación de la glucosa a lo largo de la reacción, aunque dicha degradación no sigue una tendencia lineal. Se observó el desarrollo de una leve coloración de la solución, como evidencia de la degradación de la glucosa. Estos resultados nos previnieron de una posible disminución en las mediciones de glucosa empleadas para el seguimiento del avance de reacción.

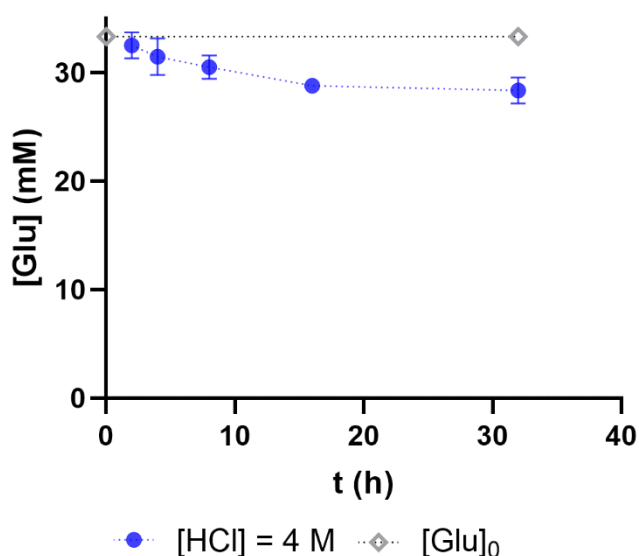


Figura 3.17. Reacción control de degradación de glucosa. Se sometieron cantidades fijas de glucosa a la acción hidrolítica del HCl 4 M bajo calentamiento y agitación constantes.

Con los datos de masas obtenidos se calcularon las concentraciones de fitosteroles formados y se compararon con los datos obtenidos en las correspondientes mediciones de glucosa. Las curvas de concentración vs tiempo (**Figura 3.18**) mostraron que la reacción tiene una cinética sigmoidea, y que después de 18 h la concentración de fitosteroles se estabiliza en el tiempo. Inicialmente, decidimos utilizar la formación de glucosa para seguir el avance de la reacción, pero observamos que el monosacárido se degradaba en el tiempo. En los experimentos control vimos que luego de 16 h de reacción, la concentración de la glucosa de partida disminuyó un 13,6% y luego de 32 h un 14,8% del total inicial. Tales resultados justifican la diferencia observada en las concentraciones finales de fitosteroles (34,2 mM) y la glucosa (29,8 mM) luego de 32 h de reacción (**Figura 3.18**). Sin embargo, como era de esperarse, observamos que tanto la aparición de fitosteroles, como de glucosa, comparten cinéticas similares. De aquí que consideramos que la formación de fitosteroles fuese una variable más confiable para seguir el avance de la reacción.

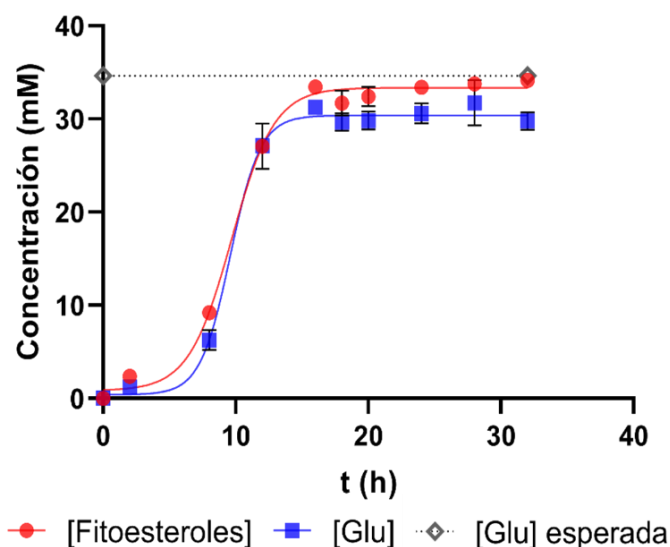


Figura 3.18. Cinética de la hidrólisis de SGs. Condiciones de reacción: 100 mg de SG, 5 ml de HCl 4 M, a 80°C y 700 rpm. Seguimiento discontinuo con 4 experimentos independientes para cada tiempo de reacción ensayado.

Estos resultados nos permitieron demostrar que, en las condiciones ensayadas, la reacción requiere cuanto menos 18 h para finalizar la transformación buscada, siendo este el tiempo a utilizar en próximos experimentos.

Como siguiente paso de nuestro trabajo, evaluamos la posibilidad de emplear un mismo medio de reacción en múltiples ciclos de uso y recuperado, bajo las condiciones de reacción recién descritas.

3.2.2.2 Reciclado de medio ácido acuoso

Una vez completada la optimización univariada de las condiciones de hidrólisis a escala de miligramos, procedimos a evaluar la reutilización del medio de reacción, determinando la cantidad de producto obtenido mediante métodos gravimétricos. Se realizaron una serie de experimentos de hidrólisis utilizando HCl 4M en ciclos reiterados. Completado cada ciclo de hidrólisis, se determinó la pureza de los fitosteroles obtenidos utilizando un kit comercial para la determinación de colesterol (Colectat *enzimático* AA, Wiener lab). Este ensayo consta de tres reacciones enzimáticas acopladas que generan un producto coloreado, cuantificable espectrofotométricamente. El kit incluye una colesterol esterasa (CHE), que hidroliza posibles ésteres de colesterol (necesario en el análisis bioquímico de colesterolemia). Posteriormente, el colesterol es oxidado por la acción de colesterol oxidasa (CHOD), liberando peróxido de hidrógeno en el medio. Este último, formado en cantidades estequiométricas, es reducido por la acción de peroxidasa (POD), que junto con 4-aminofenazona y fenol, produce una quinonimina de color rojo. La cantidad de

este producto se puede determinar mediante la medición de la absorbancia a 505 nm, la cual es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. Dado que las enzimas del kit tienen como sustrato nativo el colesterol, inicialmente nos propusimos validar su uso para la cuantificación de fitosteroles y evaluar la linealidad del método. Los resultados de este estudio se muestran en la (**Figura 3.19**). Como se puede observar, la respuesta del colesterol es ligeramente mayor que para los fitosteroles, dado que presenta una mayor pendiente. Sin embargo, ambas muestran una respuesta de primer orden en el rango de concentración evaluado, cumpliendo con la ley de Beer-Lambert. Este hecho se condice con lo reportado por Moghadasian y col., en 2002, quienes señalaron la inespecificidad de la reacción enzimática sobre los esteroides, lo que podría generar un error analítico en las determinaciones de colesterolemia debido a la presencia de otros esteroides.¹³⁷ Así, dado que nuestro producto está libre de colesterol y otros esteroides, la aplicabilidad de este kit comercial para la cuantificación de fitosteroles quedó garantizada.

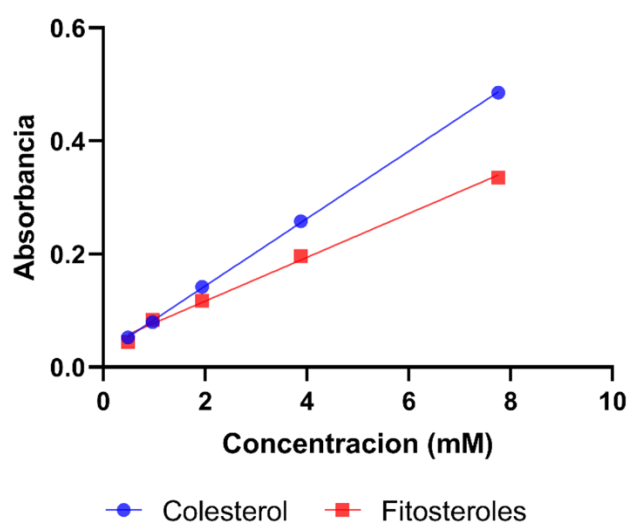


Figura 3.19. Curvas de calibración de esteroides. Ambos esteroides muestran un comportamiento lineal en el rango estudiado.

Completada esta etapa, realizamos la reacción propuesta durante 9 ciclos de hidrólisis, cada una por cuadruplicado usando 100 mg de SGs (0,173 mmol) y suspendidos en 5 ml de HCl 4M. Posteriormente, las reacciones se calentaron y agitaron en las condiciones previamente descritas. Una vez finalizado el tiempo de reacción, los fitosteroides se aislaron y se recuperó el medio para ser reutilizado. En la **Tabla 3.5** se muestran los resultados obtenidos, listándose los rendimientos promedio hallados gravimétricamente junto a las puridades determinadas por estudios espectrofotométricos. Para nuestra satisfacción, todos los ciclos arrojaron resultados positivos.

Tabla 3.5. Fitosteroles preparados por hidrólisis catalizada por HCl 4 M

Ciclo ¹	Rendimiento (%)	Pureza ² (%)
1	95,7±1,2	96,7±4,6
2	98,1±1,1	103,4±5,3
3	99,2±0,3	101,3±5,7
4	97,5±1,7	104,1±5,8
5	95,8±1,9	97,3±1,9
6	99,1±1,2	96,8±3,1
7	102,2±0,6	92,1±6,5
8	100,9±1,1	101,7±2,8
9	99,8±0,9	103,2±0,6

Condiciones: SG: 100 mg, Vol.: 5,0 ml, T: 80 °C, Agitación: 700 rpm

¹Cada ciclo es el resultado de 4 experimentos independientes.

²Determinación espectrofotométrica con kit de cuantificación de colesterol

Los rendimientos promedios fueron consistentemente altos para cada ciclo (superior al 96%) y las purezas obtenidas rondan el 100% (**Figura 3.20**, Izquierda). Paralelamente, se determinaron las concentraciones de glucosa luego de cada ciclo (**Figura 3.20**, Derecha). Como era de esperar, durante cada ciclo tiene lugar la degradación de la glucosa remanente, la cual sigue una progresión lineal. El reciclado de los medios de reacción pudo realizarse eficientemente durante los nueve ciclos de hidrólisis sin que éstos se volvieran viscosos ni demasiado oscuros. Si bien nuestros experimentos culminaron al noveno ciclo, parecería posible reutilizar el mismo medio de reacción durante decenas de ciclos basándonos en la alta solubilidad de la glucosa en agua (2,6 M). De este modo, mostramos que el reciclado del medio de reacción es viable y podría aplicarse a procesos continuos.

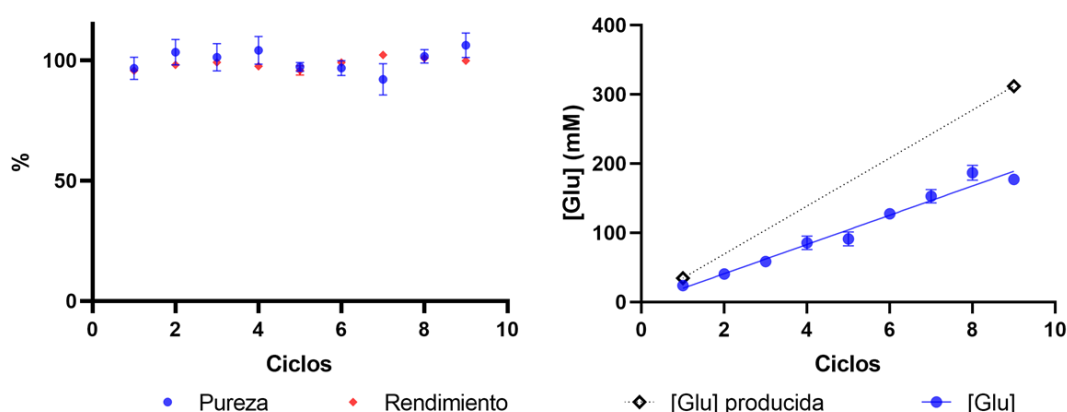


Figura 3.20. Múltiples ciclos de hidrólisis de SGs. Condiciones de reacción: 100 mg de SGs en 5 ml HCl 4M, a 80°C. (4 experimentos independientes) Izquierda: Rendimiento gravimétrico (rojo) y pureza espectrofotométrica (azul) de cada uno de los ciclos ensayados. Derecha: Concentración de glucosa producida (línea de puntos) en relación a la medición espectroscópica de glucosa en el medio de reacción para cada ciclo (azul).

3.2.2.3 Hidrólisis de SGs a escala de gramos

Habiendo demostrado que era posible reutilizar el medio de reacción para cantidades fijas de SGs, restaba aumentar la escala de trabajo para demostrar la posible aplicabilidad industrial del proceso. Para ello, procedimos a evaluar la técnica a escala de gramos, aumentando 100 veces el volumen de reacción y la cantidad de partida de SGs a hidrolizar. Decidimos entonces elevar la escala pasando de hidrolizar 100 mg a 10 g de SGs. Los ensayos se realizarían por triplicado, recuperando los fitosteroles por filtración a presión reducida. Seguidamente, se neutralizarían mediante lavados acuosos, para finalmente determinar la pureza por dos métodos diferentes.

Utilizando las condiciones de hidrólisis optimizadas se procedió a tratar 10 g de SGs suspendidos en 500 ml de HCl 4M en un balón de 1 litro. La mezcla se calentó a 80°C en baño de silicona y se agitó magnéticamente. Durante la evolución de la reacción, el medio pasa de ser una suspensión blanca a ligeramente amarilla, evidencia de la degradación leve de glucosa en huminas u otros subproductos que colorean el medio de reacción. Una vez alcanzado el tiempo de reacción optimizado se recuperaron los fitosteroles por filtración a presión reducida. Posteriormente los fitosteroles fueron lavados apropiadamente con agua destilada (500 ml), luego $\text{NaHCO}_3(\text{sat})$ (300 ml) y nuevamente con agua (500 ml), para luego secarlos en estufa de vacío a 60°C hasta pesada constante, obteniéndose excelentes rendimientos (93,2-97,3%). En esta oportunidad la pureza de los sólidos obtenidos fue medida utilizando técnicas de RMNc y paralelamente por GC-MS de los productos sililados (**Tabla 3.6**), utilizando estándares internos adecuados.

Tabla 3.6. Obtención de fitosteroles a escala de gramos

Réplica	Masa (g)	Rend (%)	Pureza (%)	
			RMNc	GC-MS
1	6,91	96,5	100,1	98,7
2	6,70	93,4	99,5	99,9
3	6,62	91,6	99,5	99,1

Condiciones de Reacción: SGs: 10 g, Vol. de HCl 4M: 500 ml, Temp: 80 °C

Para realizar la determinación la pureza de los fitosteroles mediante RMNc se pesó una cantidad precisa de fitosteroles y se las disolvió en una mezcla CDCl_3 :benceno (100:1), siendo el benceno utilizado como estándar interno. Los cálculos de pureza fueron hechos comparando el área de la señal del benceno (7,36 ppm, 6H) con el área del protón olefínico endocíclico de los esteroides (~5,35 ppm, 1H). Las masas y purezas de cada reacción individual se presentan en la **Tabla 3.7**.

Tabla 3.7. Análisis de purezas por RMNc

Réplica	1	2	3
Fitosteroles (mg)	4,79	4,79	5,34
Pureza (%)	100,1	99,5	99,5

Alternativamente, se llevaron a cabo experimentos de GC-MS utilizando colesterol como estándar interno para calcular la pureza de los fitosteroles. Brevemente, se pesó una cantidad precisa de los fitosteroles que fueron posteriormente derivatizados utilizando una solución formada por Pyr:MTSTFA:Hex (1:1:10) en presencia de una concentración de estándar de colesterol (1,15 mM). La mezcla fue calentada a 80°C y agitada a 700 rpm en un termo-mezclador DLab HM100-PRO durante 1 h. La reacción se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se inyectó en el cromatógrafo (1 μL) para proceder a su análisis cuantitativo.

Las determinaciones de pureza se realizaron comparando las áreas de las señales de los productos derivados de colesterol y de las muestras. Las masas y purezas de cada reacción se presentan en la **Tabla 3.8**.

Tabla 3.8. Análisis de pureza por GC/MS

Replica	1	2	3
Fitosteroles (mg)	3,21	3,13	3,41
Pureza (%)	98,7	99,9	99,1

Como puede verse, ambos métodos arrojaron valores de pureza de 99%. Es de destacar que, si bien se hace uso de un estándar interno en uno y otro, el método de GC-MS requiere una reacción de derivatización. En cambio, el método basado en RMN no requiere ese paso adicional. Probamos entonces la aplicabilidad de métodos de RMNc para la determinación de pureza de los fitosteroles obtenidos a partir de SGs, a través de un proceso simple y eficiente.

De este modo, demostramos que el proceso de hidrólisis de SGs propuesto es capaz de producir fitosteroles de alta pureza, mediante un proceso eficiente y en varios aspectos amigable con el ambiente. Tras haber optimizado las condiciones mediante un enfoque univariado, logramos escalar el proceso de miligramos a gramos manteniendo tanto la eficiencia como la pureza del material obtenido.

No obstante, un análisis crítico del proceso desarrollado revela una debilidad principal: el uso de un ácido mineral no renovable como agente de hidrólisis. Por ello, nos propusimos rediseñar el proceso empleando un ácido verde y utilizando técnicas estadísticas de diseño de experimentos (DoE, por sus siglas en inglés), que permiten optimizar múltiples variables simultáneamente y analizar sus interacciones. De este modo, estaríamos alineando el rediseño del proceso con los principios de la QC.

3.2.3 Hidrólisis de SGs con ácido metansulfónico

Examinando el proceso desarrollado para obtener fitosteroles de alta pureza a partir de SGs desde la perspectiva de la QV y de la QC, se identificaron varias ventajas. Por un lado, se utiliza un residuo industrial como material de partida, se emplea agua como solvente, y el medio de reacción es reutilizable. Además, los subproductos de la reacción no son peligrosos. Sin embargo, presenta la desventaja de utilizar HCl 4M como reactivo, un ácido mineral no renovable, y una baja concentración de material de partida (2% p/V), lo que incrementa los costos energéticos del proceso a lo largo de los ciclos. Silvestri y col. señalaron que al buscar cerrar circuitos de materiales (procesos), en principio debe evitarse la acumulación de sustancias peligrosas. Es por eso que es crítico encontrar el equilibrio adecuado entre las cantidades de materiales que deben reciclarse y su toxicidad.²⁵ La gestión de las sustancias químicas peligrosas se considera prioritaria para garantizar un alto nivel de protección de la salud y el ambiente, promoviendo un enfoque circular de la economía.²⁵

Las desventajas señaladas pueden ser subsanadas adoptando un enfoque que siga los principios de la QC permitiendo generar proceso adaptado a las demandas productivas del mundo actual.

En este sentido, con el objetivo de que nuestro proceso avance en la escalera de circularidad,³³ partiendo de los antecedentes de hidrólisis previamente desarrollados,

buscamos rediseñar el proceso hacia una técnica más sustentable y eficiente. Por ello se propuso cambiar el $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ empleado, por una opción que posea menor impacto ambiental, como ser el ácido metansulfónico (MSA, por sus siglas en inglés).¹³⁸ El MSA es considerado un ácido amigable con el ambiente, debido a que es parte del ciclo natural del azufre. Dado que el HCl proviene de fuentes no renovables consideramos que el MSA sería un buen sustituto para el proceso de hidrólisis de SGs.

El MSA ha sido señalado como una alternativa ecológica a los ácidos minerales en diferentes escenarios.¹³⁸ Por ejemplo, dado que es biodegradable y no oxidante, puede considerarse como una alternativa adecuada al ácido fosfórico en la formulación de agentes de limpieza. Como el MSA no contiene fósforo en su estructura, evita la contribución a la eutrofización y el consiguiente aumento del crecimiento de algas en acuíferos naturales.¹³⁹ Las propiedades físicas y químicas del MSA encuentran utilidad en diversos procesos industriales, pudiendo emplearse como disolvente buscando desarrollar procesos sostenibles. Con su baja presión de vapor, alto punto de ebullición y ausencia de compuestos volátiles peligrosos en condiciones operativas normales, el MSA presenta excelentes características como disolvente. Además, posee una toxicidad relativamente baja en comparación con muchos ácidos disponibles comercialmente.¹⁴⁰

Este ácido se introdujo por primera vez durante los años 80s en la industria microelectrónica y de electroplatinado, y sus aplicaciones han ido creciendo rápidamente.^{141,142} Actualmente encuentra aplicaciones a gran escala en las industrias farmacéutica y de galvanoplastia, en el reciclado de metales, el almacenamiento de energía y la producción de BD. Los avances en metodologías sintéticas¹⁴³ y catalizadores¹⁴⁴ han llevado al desarrollo de nuevos productos industriales utilizando MSA.¹⁴⁵ Es por eso que se ha seguido investigando nuevos métodos para prepararlo, el más reciente, utilizado metano y trióxido de azufre.¹⁴⁶ Este proceso ha recibido una gran atención debido a la abundancia de materias primas y a su potencial para integrarse en los procesos químicos industriales existentes. Actualmente, el MSA se produce principalmente convirtiendo el gas de síntesis en metanol, que luego se somete a reacciones adicionales con sulfuro de hidrógeno y ácido nítrico. La reducción de los costos de producción podría ampliar los campos de aplicación del MSA y facilitar la sustitución de los ácidos convencionales por esta alternativa respetuosa con el ambiente.

En esta nueva etapa de nuestro estudio, propusimos desarrollar un proceso amigable con el ambiente para la hidrólisis de SGs utilizando MSA como agente auxiliar de hidrólisis. El proceso se optimizó utilizando una metodología de superficie de respuesta variando la concentración de MSA, la temperatura de reacción y el tiempo para alcanzar las condiciones óptimas. Veremos a continuación algunos conceptos necesarios para introducir el DoE. Para

comenzar con el proceso de optimización, tomamos como modelo las reacciones de SGs realizadas en escala de mg con una $[SG] = 2\%$ p/V. Sin embargo, más allá de ser condiciones de reacción con resultados aceptables, habían sido obtenidas mediante la estrategia de optimización de una variable a la vez (OVAT, por sus siglas en inglés). Con el fin de adecuar las condiciones al MSA e introducir nuevas estrategias de optimización, decidimos emplear una metodología basada en criterios estadísticos que permitan evaluar variables en conjunto para poder predecir la respuesta del sistema en estudio. La metodología DoE, desde su introducción hace algunas décadas, es cada vez más utilizada en diversidad de procesos químicos.¹⁴⁷ Uno de los tipos más empleados de DoE es la metodología denominada de “Superficie Respuesta” (RSM, por sus siglas en inglés).¹⁴⁸

Este tipo de aproximaciones involucran tres fases. La primera consiste en el estudio preliminar del sistema definiendo las variables que afectarían su desempeño. En nuestro caso planteamos la concentración del MSA, la temperatura, el tiempo de reacción, y, dado que es una reacción heterogénea, la agitación. Una vez definidas se procede a evaluar condiciones aisladas en una aproximación OVAT dando pocos valores a cada variable para encontrar posibles límites de cada uno. En segundo lugar, se realiza una etapa de evaluación de las variables consideradas, llamadas factores, en modelos factoriales completos o fraccionarios donde se considera una variable de salida o respuesta para diagnosticar el resultado del proceso empleado. Esta etapa se denomina *screening* de factores significativos. Una vez identificados los factores significativos se procede a la tercera etapa, denominada optimización, donde se busca generar una superficie de respuesta mediante el análisis multivariable de un proceso con el cual predecir su comportamiento en condiciones no ensayadas. De aquí que estas metodologías se denominen RSM (del inglés *Response Surface Methodology*). En ella se evalúan los factores significativos en mayor cantidad de niveles (valores que toman los factores) empleando modelos estadísticos como ser el modelo centrado en las caras, el central compuesto, Box-Benken, entre otros.

Nuestra estrategia consistió en la selección de la concentración de MSA (M), la Temperatura de reacción ($^{\circ}\text{C}$), el tiempo de reacción (h) y la velocidad de agitación orbital empleada (rpm) como factores de estudio. Como etapa preliminar realizamos reacciones de prueba para estimar los límites físicos/experimentales de cada uno de los factores y las condiciones que se fijarían para algunas variables de reacción.

3.2.3.1 Estudios preliminares

Basados en los conocimientos previos sobre la hidrólisis de SGs utilizando HCl como agente auxiliar, donde encontramos que la reacción a escala de decenas de miligramos cursaba de manera eficiente con una concentración de SGs del 2% p/V. Por lo tanto,

establecimos esta condición para nuestros estudios preliminares. Dado que el sistema es heterogéneo, evaluamos la formación de fitosteroles en función del tiempo, manteniendo condiciones similares a las estudiadas anteriormente, pero variando el tamaño de partícula del material de partida y la agitación para determinar si estas variables afectan la cinética de la reacción.

El análisis de los gráficos de obtención de fitoesteroles en función del tiempo (**Figura 3.21**), revela que el tamaño de partícula no modificaría el curso cinético de la reacción de forma significativa. Existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) para las 15 h y las 18 h, aunque de solo 2,8mM. Las reacciones de menor tamaño de partícula son coherentemente las que cursan algo más rápido, dada su mayor superficie expuesta. Sin embargo, esta diferencia no representa una ventaja práctica relevante, requiriéndose en ambas condiciones alrededor de 24 h para completar la transformación. Por lo tanto, se fijó el tamaño de partículas en menor a 500 μm como estándar para futuros experimentos. En cuanto a la velocidad de agitación, se observó una mayor variabilidad en la respuesta; sin embargo, la influencia cuantitativa de esta variable no resultó clara. Un análisis estadístico de ambas curvas indica que las reacciones con menor agitación (300 rpm) presenta concentraciones significativamente mayores ($p < 0,0001$) de 7,1mM-7,8mM a partir de las 12 h, aunque ambas requieren alrededor de 24 h para completarse. Por lo tanto, se seleccionó la agitación como un factor a evaluar en el proceso de optimización.

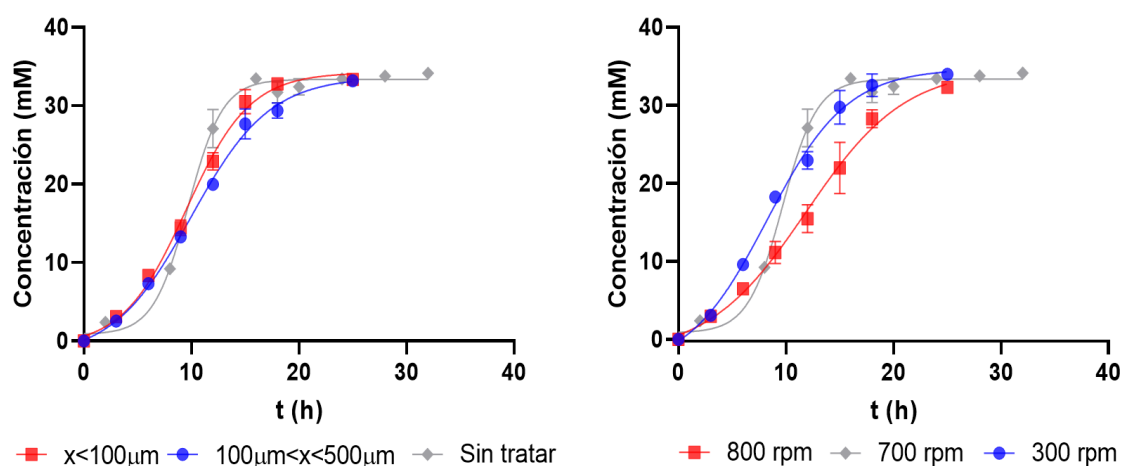
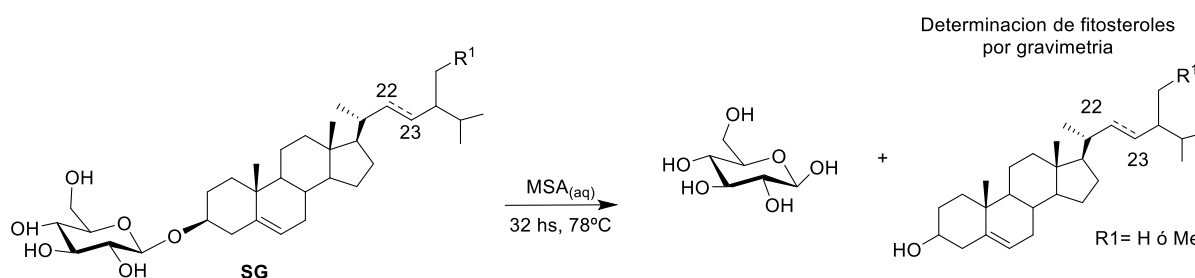


Figura 3.21. Ensayos sobre la influencia del tamaño de partícula (izquierda) y la velocidad de agitación orbital (derecha) para reacciones de hidrólisis de SGs con $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ hechas por cuadruplicado en las condiciones ya reportadas.

Los resultados del proceso previamente desarrollado mostraron la alta dependencia de la cantidad de fitosteroles obtenidos con relación a la temperatura y el tiempo empleados. En vista de que en el proceso basado en HCl requiere temperaturas y tiempos superiores a

70°C y 18 h, respectivamente, decidimos evaluar estas variables como factores de estudio en la etapa de optimización.

Ya comenzando los estudios de nuestro nuevo sistema, evaluamos reacciones por duplicado empleando MSA en diversas concentraciones (**Esquema 5**). Todas las reacciones fueron realizadas a 2% p/V de SG, a 78°C durante 32 h y agitación orbital de 700 rpm.



Esquema 5. Ensayo de la hidrólisis de SGs con MSA a escala de decenas de miligramos. Se usaron condiciones de reacción preliminares. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los resultados obtenidos de estos experimentos exploratorios se listan en la **Tabla 3.9**. Se observa que, a diferencia de la reacción con HCl, se requeriría concentraciones más altas de MSA para lograr la hidrólisis en las condiciones ensayadas. Además, identificamos limitaciones experimentales, se recupera más masa de la esperada y la extracción con solventes orgánicos presentó dificultades.

Tabla 3.9. Influencia de la concentración de MSA en la hidrólisis de SGs.

[MSA] (M)		0,25	0,5	1	2	4	5	6	7	8	9,84 ^b
Fitosteroles (mg)	Exp 1	2,2	2,5	2,5	2,8	6,6	3,8	16,2	78,2	67,1	123,3
	Exp 2	2,7	2,3	2,1	3,2	4,4	4,3	14,0	69,9	77,4	150,0

Condiciones de Reacción: [SG]=2% p/V, Vol. reacción= 2,5 ml de MSA, T=78°C t= 32 h. Todos los experimentos fueron realizados por duplicados. ^b Concentración del MSA comercial (Lutropur® MSA, BASF) 70% p/p (densidad ~1,35 g/ml).

Lo primero puede deberse a la reacción de los fitosteroles con los grupos aldehído de la glucosa o huminas generadas en el medio de reacción durante el avance de la misma,⁷⁵ sumado a la presencia de solvente ocluido y/o la disolución parcial de MSA en el solvente empleado para la extracción. Estas diferencias también fueron observadas en las reacciones usando MSA 7M y 8M donde se recuperan masas superiores a la esperada, aunque en estos casos dentro de valores más razonables. Lo segundo podría deberse a que el MSA a una concentración de 9,83M posee un $\delta=1,35$ g/ml, lo que dificulta particularmente la extracción de los fitosteroles empleando DCM como solvente de extracción dado que no se logran separar las fases por tener una densidad casi idéntica (DCM $\delta=1,33$ g/ml). Por este motivo y

dado su menor impacto ambiental, se continuaron los ensayos usando Et₂O como solvente de extracción del medio de reacción.

Dado que la reacción de hidrólisis no progresaba con concentración de MSA inferiores a 7M definimos los dos niveles del factor [MSA] como 4M y 8M. Se espera que este factor sea significativo en el intervalo planteado, dado que uno de los niveles corresponde a una condición de hidrólisis, mientras que el otro nivel representa una condición que no produjo un avance significativo de la reacción.

Posteriormente, se evaluó una T de 50°C en la hidrólisis con [MSA] = 1, 2, 4 y 8M. Como era de esperar, no se observó hidrólisis de los SGs, incluso después de 32 h de reacción en ninguna de las concentraciones evaluadas. En contraste, al ensayar la hidrólisis a 100 °C con MSA (7M), se observó conversión, aunque el aislamiento del producto se tornó dificultoso y presentando además una intensa coloración. En base a estos resultados, definimos las temperaturas de 60 °C y 90 °C como niveles del factor T. En el primer caso, decidimos elevar la temperatura en diez grados respecto de la máxima temperatura ensayada sin observar avance de la reacción, para buscar un límite inferior de T donde la reacción sea efectiva. En el segundo nivel, se decidió disminuir la temperatura máxima a ensayar para minimizar la formación de subproductos indeseados. Además, en el eventual caso del escalado del proceso, sería una desventaja tener que elevar la temperatura hasta la ebullición del agua dado el alto costo energético que acarrea, debido al alto calor específico de la misma.

En cuanto al factor tiempo, tomando los resultado de los estudios previos, se establecieron como niveles 15 h y 32 h, correspondiendo respectivamente, al tiempo mínimo en que observó hidrólisis y la máxima duración de la reacción de hidrólisis.

Finalmente, en cuanto a la agitación, se eligió tomar a 200 rpm y 800 rpm como niveles a considerar en la etapa de *screening* para evaluar la significatividad de este factor.

3.2.3.2 *Screening de factores*

De este modo, pasamos a la etapa de screening donde se empleó un diseño factorial completo de cuatro factores a dos niveles y una respuesta, con duplicados de cada condición (n=32 experimentos) el cual se delineó empleando el software de diseño experimental Design Expert 7. (**Tabla 3.10**) Los ensayos fueron realizados en condiciones estandarizadas de temperatura, tiempo y agitación gracias al empleo del termo-agitador orbital mencionado previamente. Luego de ensayada cada condición particular, el producto fue extraído del medio de reacción empleando Et₂O. Los extractos fueron filtrados para eliminar restos de material en suspensión, se evaporó el solvente, primero con corriente de aire, completando el proceso aplicando vacío. Asumiendo que el cambio de ácido no altera el curso de la reacción,

asimismo que la pureza del producto obtenido no se vería alterada, no siendo necesarias etapas adicionales de purificación.

Tabla 3.10. Condiciones evaluadas para la etapa de *screening* de factores.^a

Entrada	[MSA] (M)	Temp (°C)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)	Masa aislada (mg) _b
1	4	60	15	200	1.10
2	4	60	15	200	1.30
3	8	60	15	200	3.40
4	8	60	15	200	4.20
5	4	90	15	200	34.30
6	4	90	15	200	33.60
7	8	90	15	200	34.60
8	8	90	15	200	32.40
9	4	60	32	200	1.30
10	4	60	32	200	1.20
11	8	60	32	200	34.50
12	8	60	32	200	35.80
13	4	90	32	200	34.10
14	4	90	32	200	33.20
15	8	90	32	200	32.60
16	8	90	32	200	34.70
17	4	60	15	800	2.20
18	4	60	15	800	1.30
19	8	60	15	800	4.60
20	8	60	15	800	4.20
21	4	90	15	800	32.80
22	4	90	15	800	32.80
23	8	90	15	800	34.20
24	8	90	15	800	35.30
25	4	60	32	800	3.60
26	4	60	32	800	1.60
27	8	60	32	800	34.10
28	8	60	32	800	33.50
29	4	90	32	800	34.80
30	4	90	32	800	35.40
31	8	90	32	800	36.40
32	8	90	32	800	36.50

^aSe utilizó un diseño factorial completo de cuatro factores a dos niveles por duplicado con una respuesta. Condiciones de Reacción: [SG]=2% p/V, Vol. reacción= 2,5 ml de MSA. ^bFitosteroles aislados del medio de reacción por extracción con Et₂O

El análisis de los resultados mostró que en una condición (**Tabla 3.10**, Entradas 31 y 32) las masas aisladas superaron el máximo teórico esperado (35,8 mg) pudiendo tratarse de casos de contaminación con productos de degradación de la glucosa. Esta condición corresponde a la más energética de las ensayadas, dado que posee los máximos valores de temperatura y tiempos de reacción. Por otro lado, presenta la mayor concentración de MSA

usada de modo que estos resultados se condicen con nuestros estudios exploratorios. Dado que las impurezas del proceso antes desarrollado representan alrededor del 3%, proseguimos nuestro estudio de factores significativos sin ahondar en mayores detalles en cuanto a la pureza de las masas obtenidas en el *screening*, dejándolo para etapas posteriores.

Una vez obtenidos los valores de respuesta de cada condición ensayada se prosiguió con el análisis de factores significativos. En primer lugar, se llevó a cabo un test ANOVA de los datos experimentales, para lo cual se utilizaron los efectos de variables ficticias para estimar los errores estándar en los coeficientes de cada factor.¹⁴⁹ De este modo tanto la concentración de MSA, como la temperatura y el tiempo de reacción resultaron ser factores significativos ($p < 0,0001$). Considerando además los gráficos de distribución normal de los residuos y el gráfico de Pareto asociado a los mismos es de destacar que la variable más significativa del modelo es la temperatura de reacción, seguida de la concentración de MSA y finalmente el tiempo. Además, según el análisis del modelo existen interacciones entre factores, lo que era esperable dado el tipo de sistema en estudio. Por otro lado, el factor agitación orbital no mostró ser significativo en el rango evaluado ($p = 0,0656$). Es decir, agitar a 200 rpm u 800 rpm no modificaría significativamente la respuesta observada al variar las demás condiciones.

Como conclusión de esta etapa de análisis descartamos el factor de agitación para posteriores optimizaciones y fijamos su valor en 500 rpm, valor promedio de los niveles empleados en las condiciones ensayadas. De este modo se siguió con la etapa de optimización de los tres factores (T, [MSA] y t) mediante una estrategia de construcción de superficie respuesta (RSM).

3.2.3.3 Diseño de superficie respuesta

Para esta etapa de nuestro análisis, se aplicó un diseño central compuesto de tipo cubo-estrella usando Design Expert. Al igual que en la etapa previa, el diseño incluyó la variación conjunta de los factores en varios niveles. En este caso, cada factor varió en 5 niveles diferentes, uno correspondiente al valor central (punto central), una dupla de valores correspondientes a los vértices del cubo (punto cubo) y finalmente los valores extremos (puntos estrella).¹⁴⁷ Se realizaron 30 experimentos para evaluar las condiciones propuestas, registrando la masa aislada como variable respuesta (**Tabla 3.11**). Los rangos en los que se variaron los factores fueron: concentración de MSA entre 4M y 8M, Temperatura entre 60°C y 90°C, y tiempo entre 15 h y 32 h. Los valores extremos de los rangos corresponden a los puntos estrella del diseño, siendo estos los menos cuantiosos. En cambio, la mayoría de las

condiciones ensayadas se encuentran en valores centrales de los factores, de ahí la denominación de *central* compuesta.

Tabla 3.11. Condiciones evaluadas para la etapa de optimización.^a

Entrada	Temperatura (°C)	[MSA] (M)	Tiempo (h)	Masa aislada* (mg)
1	66,1	4,8	18,4	3,80
2	66,1	4,8	18,4	2,60
3	83,9	4,8	18,4	16,70
4	83,9	4,8	18,4	15,70
5	66,1	7,2	18,4	8,70
6	66,1	7,2	18,4	9,90
7	83,9	7,2	18,4	34,60
8	83,9	7,2	18,4	32,70
9	66,1	4,8	28,6	1,90
10	66,1	4,8	28,6	1,70
11	83,9	4,8	28,6	26,50
12	83,9	4,8	28,6	25,90
13	66,1	7,2	28,6	28,00
14	66,1	7,2	28,6	26,90
15	83,9	7,2	28,6	35,40
16	83,9	7,2	28,6	34,40
17	60,0	6,0	23,5	2,10
18	60,0	6,0	23,5	2,70
19	90,0	6,0	23,5	33,60
20	90,0	6,0	23,5	33,40
21	75,0	4,0	23,5	3,60
22	75,0	4,0	23,5	4,60
23	75,0	8,0	23,5	34,00
24	75,0	8,0	23,5	34,30
25	75,0	6,0	15,0	8,30
26	75,0	6,0	15,0	7,00
27	75,0	6,0	32,0	32,80
28	75,0	6,0	32,0	31,00
29	75,0	6,0	23,5	34,70
30	75,0	6,0	23,5	34,60

^aSe empleó un diseño central compuesto cubo-estrella de tres factores por duplicado con una respuesta. Condiciones de Reacción: [SG]=2% p/V, Vol. reacción= 2,5 ml de MSA. *Fitosteroles aislados del medio de reacción por extracción con Et₂O

La masa aislada osciló entre 1,6 y 35,4 mg, siendo 35,8 mg el valor teórico esperado. El valor máximo de masa aislada se observó para la reacción a una temperatura de 83,2 °C, concentración de MSA de 7,2 M y tiempo de reacción de 28,6 h (**Tabla 3.11**, Entrada 15). En contraste, la menor masa aislada se observó para una temperatura de reacción de 66,1 °C, concentración de MSA de 4,8 M y tiempo de reacción de 28,6 h (**Tabla 3.11**, Entrada 10).

Estos resultados revelaron la presencia de una barrera energética significativa, que requeriría temperaturas superiores a 70°C para cualquier progreso apreciable en la reacción de hidrólisis. Notablemente, incluso cuando se utilizó MSA a una concentración de 6M, la reacción no mostró avances a 60°C, como se indica en las Entradas 17 y 18 de la **Tabla 3.11**. Sin embargo, la reacción fue evidente a 90°C (**Tabla 3.11**, Entradas 19-20). También, con la misma concentración de ácido, se produjo un progreso notorio en la reacción a 75°C (**Tabla 3.11**, Entradas 27-30), pero con una fase de retraso notable, mostrando un progreso mínimo durante las 15 horas iniciales (**Tabla 3.11**, Entradas 25-26).

Con el fin de predecir la relación que se establece entre las variables involucradas en la hidrólisis de SGs se empleó un modelo de ajuste cuadrático para los datos de la **Tabla 3.11** que responde a la siguiente **Ecuación 1**:

$$M_{aislada} = a + b.T + c.[MSA] + d.t + e.T^2 + f.([MSA])^2 + g.t^2 + h.T.[MSA] + i.[MSA].t + j.T.t. \quad (1)$$

La adecuación del modelo desarrollado se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) tal como se presenta en la **Tabla 3.12**. Se puede decir que el modelo es significativo cuando su valor p (Prob > F) es < 0,01, es decir, todas las variables ([MSA], T y t) interactúan afectando a la masa aislada de fitosteroles de manera significativa.

Tabla 3.12. Análisis de la varianza de modelo cuadrático para la hidrólisis de SGs.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	5076.46	9	564.05	34.33	< 0.0001
A-Temperatura	2162.02	1	2162.02	131.58	< 0.0001
B-[MSA]	1722.03	1	1722.03	104.80	< 0.0001
C-Tiempo	692.86	1	692.86	42.17	< 0.0001
AB	7.84	1	7.84	0.48	0.4977
AC	7.56	1	7.56	0.46	0.5053
BC	29.16	1	29.16	1.77	0.1978
A2	381.67	1	381.67	23.23	0.0001
B2	327.28	1	327.28	19.92	0.0002
C2	298.99	1	298.99	18.20	0.0004
Residual	328.63	20	16.43		
Lack of Fit	320.36	5	64.07	116.28	< 0.0001
Pure Error	8.26	15	0.55		
Cor Total	5405.08	29	564.05	34.33	< 0.0001

El valor F (34,33) y el valor $p < 0,01$ (**Tabla 3.12**) indican que el modelo desarrollado es significativo, con una relación lineal entre el valor de respuesta predicho y el real (**Figura 3.22, a**). Además, el coeficiente de determinación múltiple ($R^2=0,94$) y el R^2 ajustado ($R_{adj}^2=0,91$) indican que las variables explican eficazmente los datos.¹⁵⁰ En efecto, el valor real y predicho de la masa aislada se confirma por la línea recta obtenida en el gráfico de probabilidad normal (**Figura 3.22, b**). En otras palabras, el modelo es apto para navegar el espacio que abarca el diseño establecido. La **Figura 3.22** muestra la relación existente entre los valores de los residuos encontrados frente a los valores predichos, lo que revela que los errores son independientes. Además, todos los valores residuales se encuentran dentro de los límites de control y, por tanto, el modelo desarrollado puede utilizarse para predecir la masa aislada tras hidrolizar los SGs con MSA.

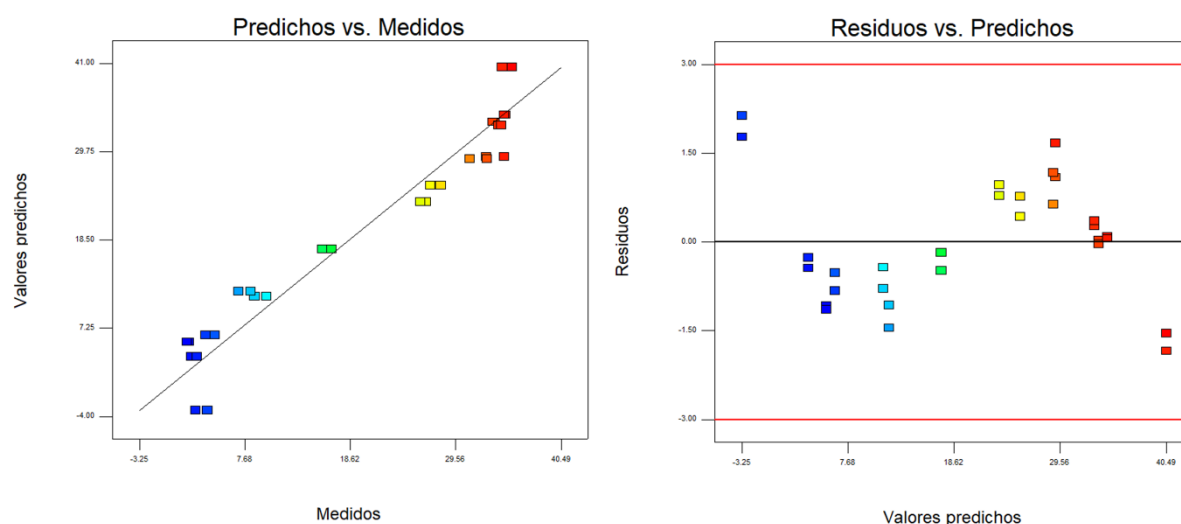


Figura 3.22. Hidrólisis de SGs como respuesta del sistema en estudio. a) Valores medidos para la Masa aislada versus los valores de la respuesta predichos, b) Análisis de los residuos para la Masa aislada.

La tabla del ANOVA (**Tabla 3.12**) muestra que la Temperatura (A) para determinar el grado de hidrólisis es el factor más significativo ($p < 0,01$), seguido de la concentración de MSA (B), en comparación con el tiempo (C). Esto indica que tanto la temperatura como la concentración de MSA juegan un papel principal en la hidrólisis de SGs. Observaciones similares se registraron en la hidrólisis mediada por HCl antes descrita. Sin embargo, ahora podemos asegurar que la hidrólisis de SGs tiene a la temperatura como el factor principal, seguido por la concentración de MSA. De este modo, se seleccionó el modelo cuadrático para la masa aislada de fitosteroles como valor de respuesta y se ajustó la **Ecuación 1** a los datos experimentales. Se derivó adecuadamente el modelo polinómico global de segundo orden que indica la relación entre la respuesta y las variables significativas. Para la hidrólisis de SGs

por acción de MSA, el modelo polinómico de segundo orden que representa la masa aislada de fitosteroles (mg, M_{aislada}) se expresa en función de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$, T), la concentración de MSA (M , $[\text{MSA}]$) y el tiempo (h , t). El modelo obtenido para la hidrólisis de SGs se expresa con coeficientes de regresión codificados (errores estándar en paréntesis), $a=34,4$ (2,9), $b=8,9$ (0,8), $c=7,9$ (0,8), $d=5,0$ (0,8), $e=-5,6$ (1,2), $f=-5,2$ (1,2), $g=-5,0$ (1,2), siendo h , i , y j insignificantes en la **Ecuación 2** de la siguiente manera:

$$M_{\text{aislada}} = 34,4 + 8,9.T + 7,9.[\text{MSA}] + 5.t - 5,6.T^2 - 5,2.([\text{MSA}])^2 - 5.t^2 \quad (2)$$

Los valores positivos en el modelo indican un efecto sinérgico entre los factores, mientras que los negativos indican un efecto antagónico. Se observó que la interacción de todas las variables independientes es positiva, lo que sugiere que la hidrólisis óptima de los SGs se observa en puntos de diseño de alta energía, es decir, alta temperatura, alta concentración de MSA y tiempos de reacción prolongados. Esta observación pone de manifiesto la elevada demanda energética necesaria para lograr la reacción deseada, lo que da lugar a una progresión lenta que a menudo tarda más de 20 horas en completarse. Por lo tanto, existen limitaciones fisicoquímicas predichas por el modelo. La reacción sólo pudo completarse tras 20,5 h de estar en contacto con una solución ácida de MSA 6,6 M a 80°C . Los coeficientes de los términos cuadráticos en la **Ecuación 2** para la temperatura (T), la concentración de MSA ($[\text{MSA}]$) y el tiempo (t) fueron todos negativos, dado que la respuesta disminuye lejos de los puntos centrales. Así, los experimentos con condiciones cercanas o por encima del punto central presentarán altos valores de masa aislada de fitosteroles, mientras que las condiciones por debajo o muy por encima de los puntos centrales se espera que exhiban valores bajos para la masa recuperada. Además, el ANOVA (**Tabla 3.12**) mostró que, a nivel cuadrático, todos los factores manifestaron un efecto significativo, mientras que, a nivel de interacción, ninguna mostró ser de importancia, a excepción de la interacción entre el tiempo y la concentración de MSA (BC a $p<0,20$) que mostró un efecto relativo. Esto tiene sentido dado que a mayores concentraciones de ácido esperaríamos que la reacción de hidrólisis curse en menores tiempos y viceversa.

Se predijo mediante software una superficie de respuesta parabólica elíptica para la masa aislada de fitosteroles como función de la temperatura, la concentración de MSA y el tiempo de reacción (hipersuperficie, 4D). Los efectos de interacción de las variables independientes para la respuesta deseada se representan visualmente en gráficos de superficie tridimensional (3D) graficadas como superficies de nivel para diferentes valores del tiempo (**Figura 3.23**). Los valores más altos de las tres variables indican una respuesta máxima por encima de los puntos centrales (**Figura 3.23**, $t = 23,50$ h) y la disminución de estas variables reducirá la hidrólisis de los SGs.

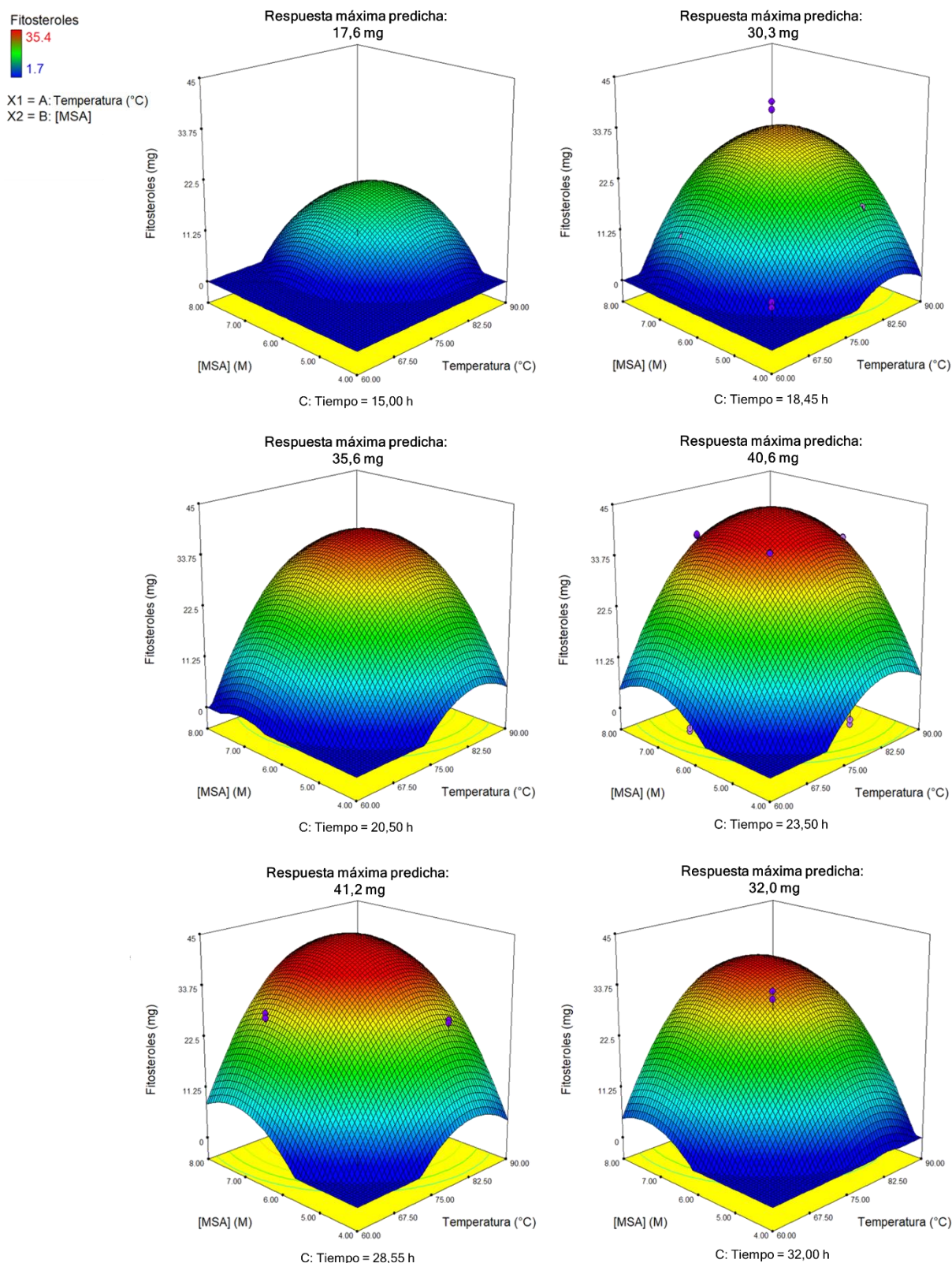


Figura 3.23. Representación tridimensional de la predicción del modelo para la masa aislada de fitosteroles para distintos tiempos. Cada superficie de nivel corresponde a un tiempo detallado. Los puntos de diseño se representan como puntos violetas.¹⁵¹

Estos resultados pueden explicarse a través del mecanismo de reacción por el que cursan las hidrólisis de los glucósidos, que implica dos pasos: la protonación del sustrato seguida de la descomposición unimolecular.^{152,153} Mientras que el primer paso es rápido, el segundo presenta una cinética relativamente lenta. Estas características coinciden con el comportamiento macroscópico observado durante la hidrólisis de los SGs, los cuales muestran la necesidad de condiciones de alta temperatura y demoras en el inicio del avance de la reacción.

La cinética lenta de la descomposición unimolecular de una especie cargada positivamente está asociada a una barrera de alta energía, lo que requiere el uso de temperaturas elevadas para superarla. Además, la insolubilidad tanto del material de partida como de los fitosterol en el medio ácido acuoso limita la reacción a la fracción de glucósidos (SGs) que logra ser solubilizada. Este hecho reduce la eficiencia global del proceso al restringir la cantidad de sustrato disponible para la hidrólisis y complicar la disolución y el contacto efectivo entre el reactivo y el sustrato. Luego, se produciría la lenta descomposición del intermediario catiónico en el alcohol correspondiente (en nuestro caso fitosterol) y un ión oxonio, que reacciona con el agua del medio para dar glucosa.^{152,153}

Por consiguiente, los dos factores críticos para la progresión de la reacción son una elevada concentración de MSA y temperatura. El ácido interviene en el primer paso, y su elevada concentración debería contribuir a la solubilización del sustrato, como así también del intermedio reactivo. Además, las altas temperaturas son necesarias para que el segundo paso supere la barrera de alta energía de la descomposición unimolecular del catión oxonio.

Tras el ANOVA, se empleó una prueba de falta de ajuste para evaluar la significación del modelo. A pesar de que el modelo resultó ser significativo (valor $F = 34,33$; $p < 0,0001$), el valor F de 116,28 de la prueba de falta de ajuste (*Lack of fit*) fue significativo en relación con el error puro y sólo hay un 0,01 % de posibilidades de que se produzca un valor F de ese orden debido al ruido. Esto podría ser posible porque las diferencias entre los puntos periféricos son sustancialmente mayores que las diferencias entre los puntos centrales. En otras palabras, los puntos centrales se ajustan mejor que los puntos del modelo.¹⁵⁴ Es importante destacar que las predicciones para valores altos de masa aislada de fitosterol siempre fueron mayores que el rendimiento cuantitativo de la reacción (35,8 mg de fitosterol, 0,087 mmol) más allá del tiempo = 20,5 h, (**Figura 3.23**, C: Tiempo = 20,5 h) alcanzando predicciones tan altas como 41,2 mg (**Figura 3.23**, C: Tiempo = 28,55 h). Por lo tanto, fue necesario realizar experimentos de validación para demostrar la precisión de las predicciones del modelo.

Alternativamente, los mismos datos se procesaron utilizando una red neuronal de optimización creada en MATLAB por el Prof. Alejandro Olivieri (IQUIR-CONICET),¹⁵⁵ y los

resultados fueron coherentes con la predicción anterior. Por lo tanto, decidimos continuar con la evaluación del modelo.

Seguidamente, se buscó optimizar las variables en dos etapas. Primero se buscó una optimización que considere los tres factores en rango para maximizar la respuesta evaluada. Se obtuvieron 30 soluciones diferentes, todas con valores máximos de la función deseabilidad.¹⁵⁶ Con el objetivo de validar la predicción hecha por el modelo, se seleccionaron tres condiciones solución donde se cumpliría que respuesta generaría un alto valor para la masa aislada. En particular se seleccionaron las condiciones donde individualmente se encontraba la predicción de menor valor para alguno de los tres factores dentro de las 30 soluciones posibles arrojadas por el modelo.

Se ensayaron las condiciones propuestas para validar el modelo por triplicado, obteniéndose excelentes valores de masas recuperadas que superaron el 95% del valor máximo teórico posible (35.6 mg de fitosteroles). Tal valor de referencia era menor al valor predicho para cada condición, siendo más cercano a los valores de respuesta encontrados (**Tabla 3.13**). De este modo pudimos probar la eficacia de la predicción y así demostrar la validez del diseño y el ajuste del modelo a pesar de lo señalado por el ANOVA (**Tabla 3.12**).

Tabla 3.13. Condiciones seleccionadas para validación del modelo predichas por el software DesignExpert para lograr una respuesta máxima.

Entrada	Temperatura (°C)	[MSA] (M)	Tiempo (h)	Masa predicha* (mg)	Masa aislada [‡] (mg)
1	73,3	7,0	23,8	35,9	35,0 ± 0,7
2	79,8	5,79	25,6	37,2	35,2 ± 0,4
3	81,6	6,43	21,6	37,6	34,4 ± 1,1

*Predicción del valor de la respuesta esperado en esa condición

[‡] Promedio de triplicado fitosteroles aislados del medio de reacción empleando Et₂O

3.2.3.4 Optimización de factores

En el proceso desarrollado durante etapas previas del proyecto, ya se había alcanzado rendimientos superiores al 95%, por lo que en este rediseño adicionamos una regla extra para la optimización. Estando en línea con la búsqueda de sustentabilidad del proceso, consideramos aumentar la bioseguridad del mismo, así como disminuir los recursos empleados, para lo cual elegimos minimizar la concentración de MSA.

Entonces, se impuso como restricciones de la optimización numérica que la Temperatura (**) y el tiempo (**) estén en rango, minimizando [MSA] (***), y maximizando la Masa aislada (*****) (importancias relativas para la función deseabilidad entre paréntesis). A partir de esto obtuvimos una única solución de compromiso con un valor para la función

deseabilidad de 0,869 (**Figura 3.24**). Puede observarse que para valores de [MSA] menores a 5,41M la función deseabilidad disminuye marcadamente, dado que la reacción avanza poco a concentraciones por debajo de dicho límite. Dado la importancia de [MSA] seleccionada para la optimización, la función deseabilidad cae de forma preponderante fuera del valor encontrado para el máximo de deseabilidad. Del mismo modo, la gran dependencia con la temperatura muestra que por debajo de 70°C decae la función deseabilidad correlacionándose con una disminución de la predicción para la masa aislada.

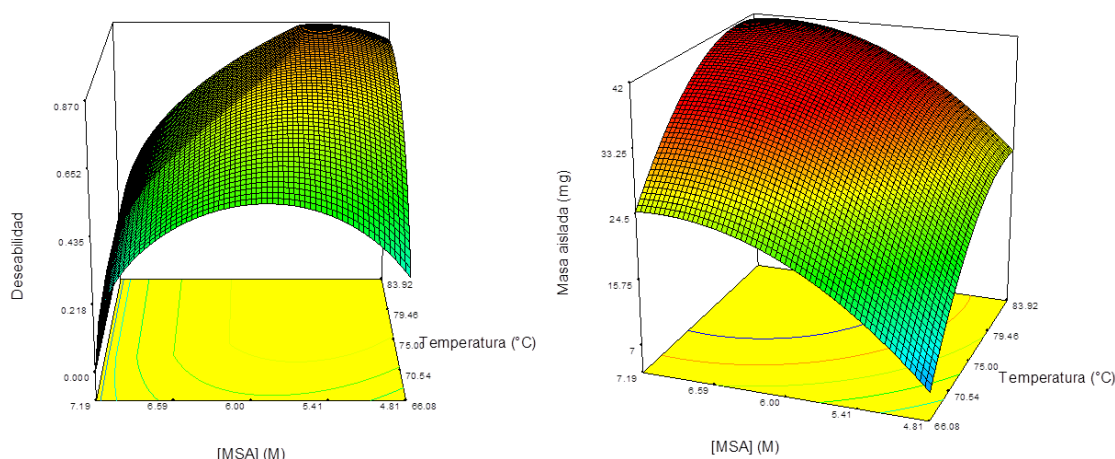


Figura 3.24. Superficies respuesta ajustadas empleando DesignExpert. Tanto la superficie correspondiente a la función deseabilidad (izquierda) como aquella de la masa de fitosteroles aislada (derecha) fueron modeladas para $t = 25,45$ h

Habiendo obtenido un valor razonable de deseabilidad,¹⁵⁶ se prosiguió en el estudio de la hidrólisis de SGs con las condiciones que se describen a continuación (**Tabla 3.14**). Para nuestra satisfacción, el resultado obtenido fue cercano a la predicción hecha por el modelo, validando su aplicabilidad al sistema en estudio. Disponiendo de las condiciones optimizadas de reacción, nos encontrábamos en condiciones de escalar la cantidad de SGs empleada para la hidrólisis y en consecuencia el volumen de solución ácida a emplear.

Tabla 3.14. Condiciones predichas por DesignExpert para lograr una respuesta máxima (Max), con la mínima cantidad posible de MSA (Min) y manteniendo el resto en los rangos evaluados (rang).

Entrada	Temp. °C	[MSA] M	Tiempo h	Masa esperada* mg	Masa aislada* (mg)
Repuesta	rang	Min	rang	max	
1	82,1	5,42	25,45	33,9	34,4 ± 0,8

*Predicción del valor de la respuesta esperado en esa condición

† Fitosteroles aislados del medio de reacción empleando Et₂O. Promedio de 3 experimentos independientes

3.2.3.5 Incremento de la concentración inicial de SGs y escalado

Previamente, fuimos capaces de mostrar que el solvente empleado para las reacciones con $[SG]=2\%$ p/V ($HCl_{(ac)} 4M$), podía reutilizarse al menos 10 veces.⁷⁵ Con este resultado en mente decidimos evaluar el aumento de la cantidad de SGs de partida, manteniendo el volumen de reacción en 2,5 mL, buscando determinar si la reacción era viable al aumentar la concentración del sustrato en la misma solución ácida. ($[MSA] = 5,42M$) De este modo seríamos capaces de disminuir los recursos consumidos, así como los costos energéticos y el tiempo involucrados en el proceso.

Por lo tanto, procedimos a evaluar diferentes $[SG]$ (4, 10, 15 y 20% p/V), siendo la máxima concentración ensayada el equivalente a realizar 10 ciclos de hidrólisis al 2% p/V. Los resultados obtenidos mostraron satisfactoriamente que el sistema responde del mismo modo para todas las concentraciones ensayadas (**Figura 3.25**).

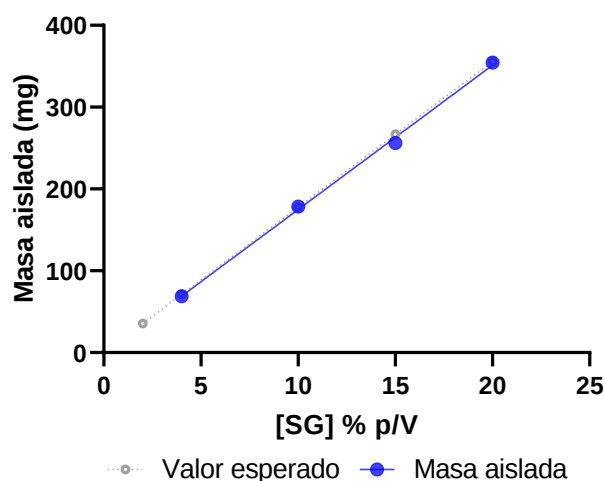


Figura 3.25. Estudio del aumento de la cantidad de SGs empleada como material de partida. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en las condiciones optimizadas.

Una vez demostrada la eficiencia de la hidrólisis en las condiciones optimizadas hasta $[SG] = 20\%$ p/V, proseguimos aumentando la escala de la reacción en un orden de magnitud. A tal efecto, se ensayó la hidrólisis de 5 g de SGs suspendidos en 25 ml de $[MSA] 5,42 M$ a $82,1\text{ }^{\circ}C$ durante 25,45 h, realizando tres experimentos independientes. A diferencia de las etapas exploratoria y de optimización, se empleó agitación mecánica a 1000 rpm, suplantándose además la extracción de los fitosteroles obtenidos del medio de reacción con solvente (Et_2O) por el filtrado y posterior lavado del sólido con $NaHCO_{3(ac)}$, seguido de $H_2O_{(dest)}$. Este proceso sería más cercano al esperado para aplicaciones industriales, esperando mantener la pureza del material obtenido y disminuyendo el uso de solventes y

etapas costosas en energía. Con el fin de comparar la pureza de los productos en los distintos procesos, se utilizó la técnica de ^1H -RMNc validada previamente, usando 1,3,5-trimetoxibenceno (1,3,5-TMB) como estándar interno (**Figura 3.26**).

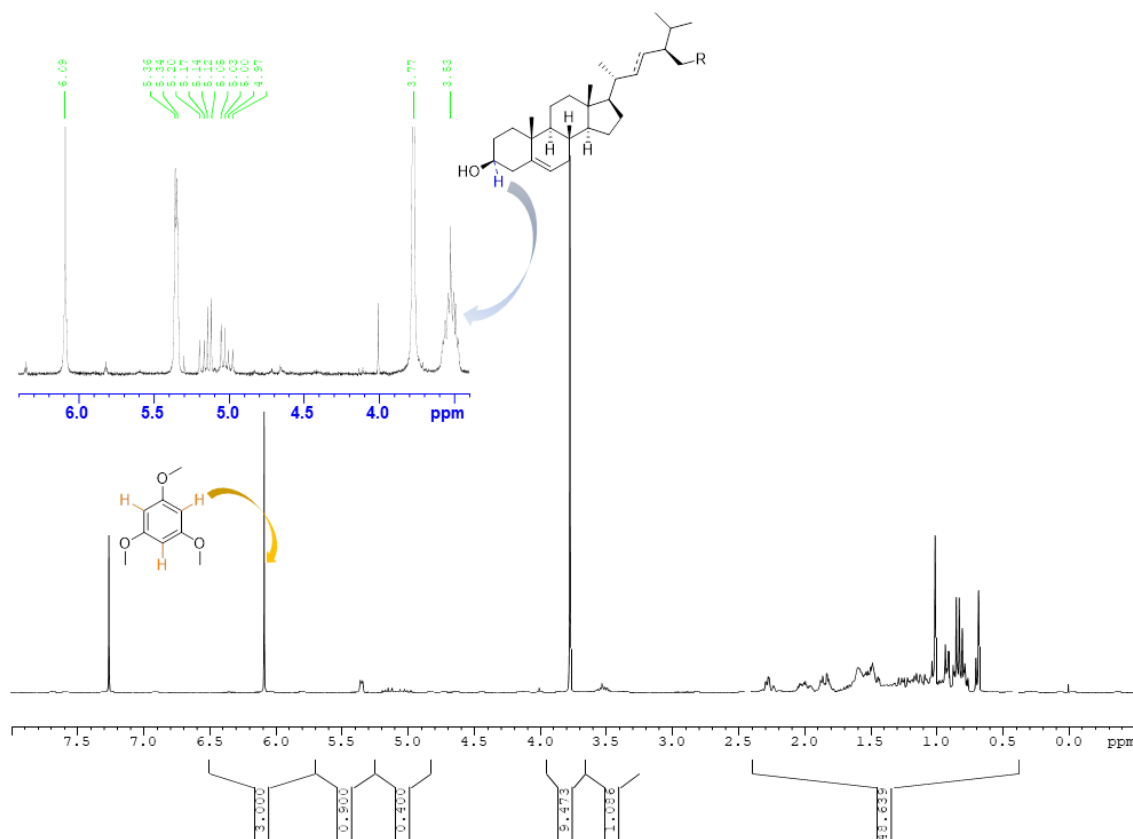


Figura 3.26. Espectro de ^1H -RMN cuantitativo de los fitosteroles obtenidos empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno. Se encuentran marcadas las señales del analito y el estándar usadas determinar la relación de áreas.¹⁵⁷

Consideramos esta técnica como apropiada para conocer la pureza de nuestro producto, dado que validamos su uso frente a GC-MS para los fitosteroles obtenidos mediante hidrólisis con HCl.⁷⁵ Los resultados de estos experimentos mostraron que la masa aislada fue $3,46 \pm 0,37\text{g}$ con una pureza que en todos los casos superó el 99%, como se muestra en la **Tabla 3.15**.

Tabla 3.15. Hidrólisis de SGs a escala de gramos empleando condiciones optimizadas.

Entrada	Masa aislada (g)	Pureza (%)
1	3,51	99,7
2	3,46	99,3
3	3,42	100,2

El escalado del proceso de hidrólisis a una mayor cantidad de SGs se realizó exitosamente, aumentando 20 veces la cantidad de material de partida. En este ensayo se hidrolizaron 100 g de SGs, con 500 ml del ácido en su concentración optimizada, usando un balón de tres bocas de 1 litro y un baño de silicona. Este proceso fue realizado por duplicado, obteniendo 68,5 g y 69,0 g de fitosteroles aislados, manteniendo una pureza superior al 98%, como se determinó por análisis de ^1H -RMN. Sin embargo, se encontró que la filtración tras la neutralización de los restos ácidos fue impracticable en esta escala. Para solucionar este problema, procedimos a centrifugar la suspensión para separar el medio ácido de los fitosteroles obtenidos. Este hecho resalta un desafío logístico a resolver para futuras aplicaciones industriales.

Con estos excelentes resultados, podemos asegurar que el cambio de escala, tipo de agitación y método de purificación, no modifica la respuesta del sistema, obteniéndose fitosteroles de alta pureza. Por el contrario, queda en evidencia que el proceso planteado es robusto en distintas escalas y condiciones lo que lo convierte en una estrategia prometedora para futuras etapas de escalado hacia métodos industriales. Más aún, el aumentar la concentración inicial de SGs permite no sólo optimizar el proceso desde el punto de vista práctico, sino que también representa una disminución de diez veces en el tiempo, energía y recursos empleados.

Así, logramos optimizar el proceso planteado mediante una aproximación estadística, para luego, variar la concentración de material de partida y la escala desde decenas de miligramos hasta gramos. Queda demostrado entonces que el MSA es un auxiliar de hidrólisis eficaz en el proceso de hidrólisis de SGs a escala de gramos, pudiendo constituir un reemplazo eficiente en el uso de ácidos minerales para el mismo fin.

3.2.4 Análisis comparativo de *E*-factors

A principios de la década de 1990 se introdujo el concepto de *E(nvironmental) factor* (factor ambiental, *E*-factor) como medio para cuantificar la generación de residuos en los procesos industriales (**Ecuación 3**).¹⁵⁸

$$E - factor = (kg \text{ materiales de entrada}) / (kg \text{ producto}) \quad (3)$$

El *E*-factor ha sido definido como la relación de masas que existe entre residuos y productos para un proceso de producción y abarca la evaluación de todas las sustancias químicas utilizadas. Normalmente, los cálculos del *E*-factor no incorporan los insumos de energía y agua, el uso de solventes o los subproductos de la combustión, como el vapor de agua o el dióxido de carbono. No obstante, realizamos un análisis comparativo de los valores del *E*-factor, teniendo en cuenta la inclusión parcial (5% de pérdida por evaporación de

solventes durante la manipulación) o la consideración completa de la pérdida de solventes y/o agua utilizados. Las pérdidas de solvente son otra de las principales fuentes de residuos en la síntesis orgánica industrial y, para nuestro análisis original de los *E*-factors de los procesos industriales, si no se conocían las pérdidas de solvente, supusimos que serían el 10% de la cantidad utilizada en el proceso. Aplicamos esta métrica para evaluar y comparar la eficiencia de nuestro desarrollo en comparación con los procesos industriales actuales de obtención de fitosteroles. Como el *E*-factor se basa en mediciones de masas, su valor está muy influido por las fases iniciales del proceso considerado. Por lo tanto, resulta imperativo establecer unas condiciones límite claras para calcular los *E*-factors. En otras palabras, en un análisis pormenorizado debemos determinar cuáles son las etapas de cada uno de los procesos.

Tradicionalmente, los cálculos del *E*-factor se realizan del modo “puerta a puerta”, abarcando las materias primas que entran por la puerta de la fábrica y el producto final que sale de ella.¹⁵⁹ En nuestro estudio, definimos como punto de partida los subproductos ricos en fitosteroles (depósitos de tanques de BD, destilado del desodorizado de la industria del aceite de soja y licor negro/*tall oil* de la industria maderera),¹³³ con la obtención de fitosteroles de alta pureza como punto final de los procesos. Se han documentado varios métodos para aislar fitosteroles de fuentes industriales, y para cada subproducto, consideraremos un método reportado como estándar comparativo.

Es importante señalar que nos centramos únicamente en el *E*-factor como métrica ambiental. En consecuencia, nuestras conclusiones representan una comparación ilustrativa destinada a destacar las ventajas de nuestro método propuesto sobre los procesos empleados habitualmente.

El aislamiento de los fitosteroles a partir de aceites vegetales se produce después de la etapa de desodorización del proceso de refinado del aceite. Esto implica tratar el llamado “destilado del desodorizador” mediante hidrólisis alcalina y pasos de extracción empleando varios productos químicos auxiliares.¹³² En el caso de los destilados del desodorizado de soja, los fitosteroles suelen constituir una proporción del 5-18% p/p de los barros del destilado.

Por el otro lado, en la producción del papel, posterior al tratamiento termoquímico de las astillas de madera, del proceso de refinado de la pasta se obtiene un líquido viscoso de color amarillo-negro y oloroso conocido como mezcla de jabones de *tall oil*.¹³³ Posteriormente, un tratamiento ácido del jabón da lugar a un producto insoluble denominado *tall oil* crudo. A continuación, se somete a saponificación y destilación de la fracción volátil, obteniéndose “brea” de *tall oil*. Los fitosteroles pueden aislarse de cualquiera de estos materiales mediante extracción con solventes orgánicos. El contenido de fitosteroles en la brea de *tall oil* puede oscilar entre el 8 y el 20% p/p.¹³³

Independientemente de la fuente de fitosteroles considerada, los métodos de extracción convencionales deben complementarse con procesos adicionales para lograr la extracción completa de esteroides. Por ejemplo, la extracción con hexano y la posterior destilación para separar los productos de interés.¹³² Además, es importante destacar que se pierden cantidades significativas de esteroides durante los procedimientos de refinado, siendo además poco eficientes en aspectos energéticos y de recursos. El desarrollo de un proceso que mejore el rendimiento de fitosteroides, sin el uso de solventes tóxicos o ecológicamente peligrosos, sigue siendo un desafío.¹⁶⁰

El método desarrollado es una aproximación sencilla que comprende dos pasos de tratamiento con solvente y un paso de reacción de hidrólisis heterogénea. Con estas medidas, conseguimos una concentración de fitosteroides de ~7% p/p tras los pasos de aislamiento e hidrólisis. Seleccionamos el proceso de aislamiento descrito por Czuppon y col. para los barros del desodorizado con bajo contenido en fitosteroides,¹⁶¹ el proceso descrito por Huibers y col. para el *tall oil* crudo y el descrito por Sonnier y Ben-Olel para la brea de *tall oil*.^{162,163} Dado que el contenido de fitosteroides es similar en las distintas matrices y que la pureza del producto y los rendimientos de los procesos son comparables, postulamos que una comparación entre procesos mediante el análisis del *E*-factor será significativa a pesar de ser una aproximación limitada.

Basándonos en nuestros cálculos del *E*-factor (**Tabla 3.16**), podemos afirmar que nuestro método presenta un mayor nivel de sostenibilidad ambiental en comparación con los enfoques convencionales, ya que arroja el valor de *E*-factor más bajo. Al emplear la aproximación tradicional de *E*-factor, que no considera solventes y agua, nuestro método exhibe la mitad del valor que los métodos de referencia, generándose 1,3 kg de residuo por cada kg de fitosteroides producidos. Tras considerar las pérdidas de solventes y agua, el método basado en barros del desodorizado presenta un *E*-factor 57 veces más grande que nuestro método, con una generación de residuos asociada de 166 kg debido a un elevado consumo de solventes. Con estas consideraciones nuestro método se asocia con la generación de 23,69 kg de residuos por kg de fitosteroides. Al considerar el método basado en *tall oil* puede verse que, a pesar de presentar un *E*-factor 1,9 veces más grande, al agregar los solventes y agua presenta un valor 12% más bajo que nuestro método, *i. e.* 20,95 kg de residuos. También realizamos un análisis del consumo de energía para cada proceso. Aunque de naturaleza cualitativa, este análisis reveló una notable disparidad entre nuestro método y las técnicas convencionales. Los métodos comunes se caracterizan por una alta demanda energética debido a que poseen reacciones a temperaturas elevadas (superior a 120°C), destilaciones a temperaturas que oscilan entre 150-300°C y tratamientos prolongados bajo vacío intenso. Aunque el método basado en *tall oil* genera menos residuos,

su alto consumo energético representa una desventaja ambiental. Por el contrario, nuestro enfoque implica dos pasos de calentamiento con temperaturas en torno a los 80°C.

Tabla 3.16. Cálculo de E-factor para diferentes procesos de recuperado de fitosteroles.

Subproducto	E-factor	E-factor c/ 5% solv. perdido	E-factor c/ agua y 5% solv. perdido	E-factor c/ agua y solv. perdido	Energía [†]
Depósito de tanque de BD	1,30	2,15	7,57	23,69	*
Barros del desodorizador	2,92	9,08	48,95	166,00	***
<i>Tall oil</i>	2,43	3,10	8,36	20,95	*****

[†]Basado en los pasos que consumen energía reportados en los respectivos métodos considerados

El contraste entre los métodos tradicionales estudiados y nuestra propuesta demuestra que la obtención de fitoesteroles a partir de la hidrólisis de los SGs recuperados de depósitos de BD puede considerarse más respetuosa con el ambiente que los métodos predominantes empleados en entornos industriales. Además, las condiciones de trabajo más suaves del proceso desarrollado, minimizarían el deterioro de fitosteroles debido a su manipulación, constituyendo una alternativa interesante para futuros desarrollos industriales.

Como conclusión de esta etapa destacamos que logramos ejecutar la hidrólisis heterogénea de SGs utilizando MSA como auxiliar de hidrólisis a escala de gramos. El proceso de hidrólisis mostró robustez en las condiciones ensayadas, permitiéndonos alcanzar rendimientos superiores al 95%. La condición optimizada para la hidrólisis de SGs al 20% p/V con 5,42 MSA a 82°C durante 25,45 h produjo más de 68 g de fitosteroles. La pureza se verificó mediante experimentos de RMNc, encontrándose valores superiores a 98%. Desarrollamos un proceso optimizado más sustentable (en términos de E-factor y consumo de energía) y seguro, el cual continuaremos perfeccionando para alcanzar la escala industrial. Nuestros hallazgos contribuyen a circularizar la producción de BD, transformando residuos en productos comercializables de alto valor. El desarrollo de un método sostenible y eficiente para producir fitoesteroles también tiene importantes implicancias en las industrias alimentaria y nutracéutica, de modo que esperamos que nuestros desarrollos sean capaces de alcanzar la industria en el mediano plazo.

3.2.5 Síntesis formal de 22-oxi esteroides

Habiendo sido capaces de obtener fitosteroles de alta pureza evaluamos cuales eran los destinos sintéticos en que estos podrían emplearse como sustrato. De este modo,

buscamos generar otro producto de alto valor agregado que nos permita seguir valorizando los fitosteroles obtenidos, y consecuentemente los SGs recuperados.

La búsqueda en la literatura permitió encontrar una gran variedad de procesos a los que se suele someter a las mezclas de fitosteroles para obtener diferentes productos. Por ejemplo, se suele practicar la separación de los fitosteroles de mezclas enriquecidas por tratamientos físicos, por ejemplo mediante cristalización fraccionada,¹⁶⁴ o bien a través de transformaciones químicas que permitan enriquecer la mezcla en uno de los esteroides deseados.^{133,165} Otro destino sintético es la formación de sus ésteres de ácidos grasos, ya sea a través de síntesis orgánica,¹⁶⁶ o bien de forma enzimática.¹⁶⁵ Los métodos enzimáticos presentan ventajas como ser el empleo de condiciones suaves de reacción y la elevada calidad del producto obtenido. Sin embargo, sigue presentando algunos problemas, como tiempos de reacción largos, baja eficiencia en la transformación perseguida y un elevado costo, por lo que son poco utilizados a nivel industrial. En la actualidad, los métodos sintéticos siguen siendo la fuente principal para la obtención de ésteres de fitosteroles.¹⁶⁶ Por otro lado, encontramos la síntesis de derivados oxiesteroideos a partir de mezclas de fitosteroles en distintos reportes. Existen diversas estrategias de síntesis orgánica,¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ o métodos que emplean biotransformaciones.^{171,172}

En términos sintéticos, se destaca el papel preponderante que posee el estigmasterol sobre otros fitoesteroides. La presencia del doble enlace exocíclico C22-C23 lo convierte en un material de partida de interés para la obtención de derivados esteroidales mediante la modificación de la cadena exocíclica. La escisión oxidativa del citado doble enlace, para dar derivados 22-oxoesteroideos a partir de estigmasterol ha sido extensamente reportada en la literatura.^{167,168,170,173,174} El derivado 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-22-carbaldehído-23,24-bisnortcolesterol (22-aldehído-i-ME) se relaciona con múltiples reportes en la literatura (96 entradas en Reaxys®, consultado julio de 2024). En ellas encontramos a esta molécula señalada como un intermediario clave en síntesis de esteroides (**Figura 3.27**). Dicho intermediario representa la posibilidad de introducir modificaciones en la cadena exocíclica, al tiempo que protege el doble enlace interno del anillo B. El aldehído puede ser sometido a reacciones de reducción,^{175,176} adición,¹⁷⁷ condensación,¹⁷⁸ olefinaciones^{167,179,180} y epoxidación.¹⁸¹ Una vez introducida la modificación en la cadena exocíclica, el intermediario es susceptible de recuperar la funcionalidad olefínica,¹⁷⁶ o bien ser modificado en distintas posiciones del esqueleto tetracíclico.¹⁸¹ De este modo se han logrado obtener derivados de esteroides con propiedades antitumorales,¹⁸² antifúngicas,¹⁷⁷ fitohormonas,¹⁸¹ derivados de vitamina D,¹⁸³ o moléculas funcionales que son empleadas como herramientas para dilucidar detalles metabólicos.¹⁷⁸ (**Figura 3.27**)

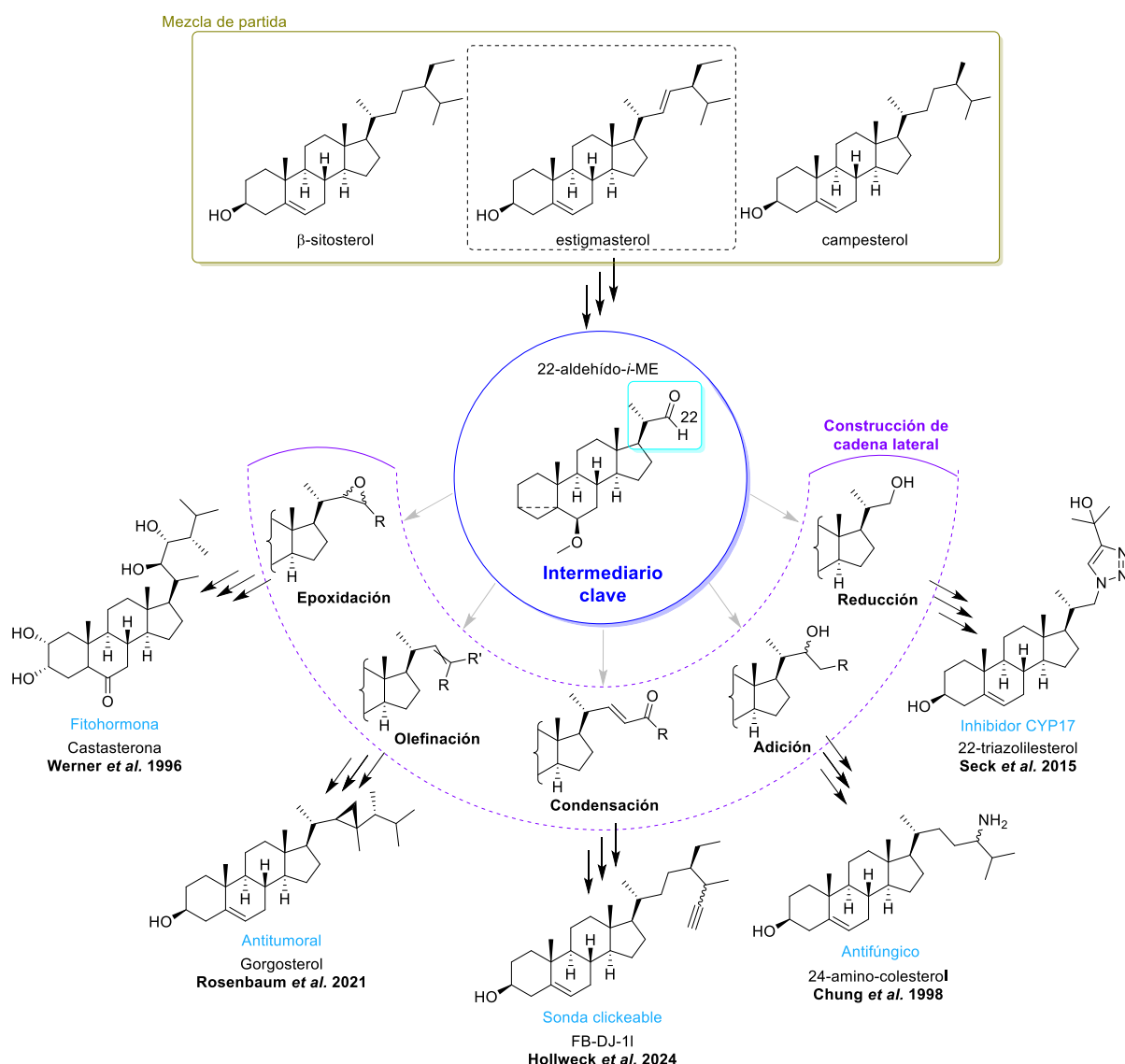
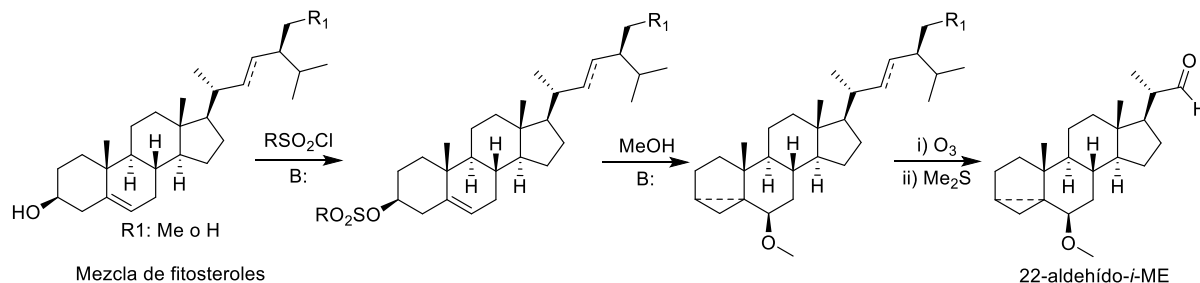


Figura 3.27. Ejemplos de transformaciones reportadas para 22-aldehído-*i*-ME en diversas moléculas con actividad biológica listadas en la plataforma Reaxys®. (Consultado julio de 2024)

De este modo, partiendo de los fitosteroles obtenidos se buscó desarrollar un intermediario clave en la obtención de productos de química fina. Mediante la funcionalización del estigmasterol de la mezcla, buscamos obtener el intermediario 22-aldehído-*i*-ME. (**Esquema 6**). En esta ruta, β -sitosterol y campesterol, al no poseer doble enlace exocíclico, podrían ser recuperados. Describimos a continuación la síntesis del aldehído derivado de estigmasterol.

Partiendo de la mezcla de fitosteroles previamente obtenidos, nos planteamos desarrollar una estrategia para la síntesis de un intermediario sintético de interés, usualmente empleado en la obtención de derivados de colesterol con potenciales usos en el desarrollo de agentes terapéuticos.¹⁶⁷ Dado que los fitosteroles previamente obtenidos resultaron de

gran pureza (~99%) se decidió emplearlos como material de partida de nuestra transformación, sin purificaciones adicionales.



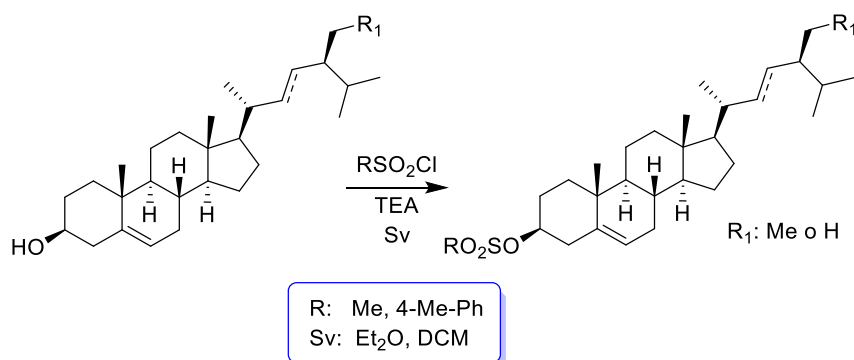
Esquema 6. Estrategia sintética para la obtención de 22-oxo estigmasteril-metil éter

Considerando que ~25% de la masa de la mezcla corresponde a estigmasterol, el objetivo sería recuperar los otros dos esteroides una vez consumada la reacción. En la estrategia planteada los fitosteroides de cadena exocíclica saturada permanecerían inalterados durante la etapa de derivatización, pudiéndose recuperar una mezcla de β -sitosterol y campesterol tras tratamiento ácido para regenerar el doble enlace endocíclico.¹⁸⁴ De este modo daríamos lugar a la revalorización del producto obtenido en pasos previos, diversificando entonces sus potenciales aplicaciones.

La estrategia propuesta consiste en la protección del doble enlace endocíclico del anillo B del esqueleto de esteroide, para luego modificar sintéticamente la cadena exocíclica del estigmasterol con el fin de instalar, en pasos posteriores de síntesis, un nuevo fragmento en la estructura como ser grupos de interés sintéticos. Luego de realizada la derivatización de la cadena exocíclica se sigue con la remoción del grupo protector y posteriores transformaciones para llegar a la molécula objetivo. Este tipo de estrategia ya ha sido reportado para estigmasterol puro en la construcción de moléculas de interés medicinal,^{174,176} así como en otros escenarios.^{167,169,173,185} Esta misma propuesta ha sido patentada desde hace más de 40 años buscando un fin similar al nuestro, el cual es obtener productos de química fina empleando el estigmasterol de la mezcla.^{170,186}

La protección del doble enlace endocíclico mediante una reacción de Sustitución Nucleofílica alílica (S_N2') o *anormal*,¹⁸⁷ se emplea desde hace casi una centuria, sin haber sufrido modificaciones sustanciales.¹⁶⁷ De este modo, buscamos desarrollar estrategias sintéticas seleccionando agentes que fueran efectivos en la transformación química, asociados a mejores perfiles de sustentabilidad. En nuestra aproximación comenzamos estudiando el empleo de las condiciones tradicionales de activación del alcohol en buen grupo saliente y buscamos cambiar la fuente de sulfonilo que transforma el C3-O, por uno de mayor economía de átomos.

Para ello cambiamos el uso de TsCl por MsCl, dado que este último proviene del ácido renovable MSA,¹³⁸ sustituyendo el resto carbonado unido al S. Además, comparamos el uso de éter etílico (Et₂O) con DCM como solvente de reacción, la trietilamina (TEA) en lugar de Pyr como base no nucleofílica, para evaluar condiciones de reacción más amigables con el ambiente (**Esquema 7**).



Esquema 7. Optimización de la reacción de sulfonilación del grupo HO-C3.

Para ello se disolvieron los fitosteroles aislados (1,22 mmol) en el correspondiente solvente, y se hicieron reaccionar con 1,5 eq. del cloruro de sulfonilo en presencia de TEA. Las cuatro condiciones evaluadas fueron llevadas a cabo por duplicado a temperatura ambiente, con agitación orbital. Se presentan los resultados obtenidos en la **Tabla 3.17**:

Tabla 3.17. Evaluación de condiciones de reacción para la sulfonilación del grupo OH de los fitosteroles empleando MsCl y TsCl como reactivos, y DCM ó Et₂O como solventes.

Entrada	Cloruro de sulfonilo	Solvente	Tiempo (h)	Rendimiento* (%)	
1	MsCl	DCM	2	78,7	82,1
2	MsCl	Et₂O	2	83,8	82,6
3	TsCl	DCM	20	53,2	73,7
4	TsCl	Et ₂ O	20	16,5	7,4

*Valores para dos ensayos independientes, calculados por ¹H-RMNc en base al contenido relativo de sulfonato de fitosterilo.

En el caso en que se usó MsCl el tiempo de las reacciones se fijó en 2 horas, mientras que las de TsCl se continuaron hasta alcanzar las 20 horas. Se siguieron las reacciones por TLC hasta desaparición total del material de partida, completándose solo en las condiciones en que empleamos MsCl. Una vez finalizada la reacción, se realizó una extracción líquido-líquido de los productos de reacción obteniéndose un sólido rojo en el caso de las reacciones en DCM y un sólido amarillento en aquellas donde se empleó Et₂O. Posteriormente se determinó el rendimiento empleando técnicas de ¹H-RMNc usando 1,3,5-TMB como estándar

interno (**Figura 3.28; Figura S24Figura S31**). Una vez realizados los espectros se calcularon los contenidos de sulfonilos en el crudo, y posteriormente el rendimiento de las reacciones integrando la señal correspondiente al C3-H (δ (ppm)=4,52; 1H, multiplete) contra los protones aromáticos del estándar interno (δ (ppm)=6,09; 3H, singlete)

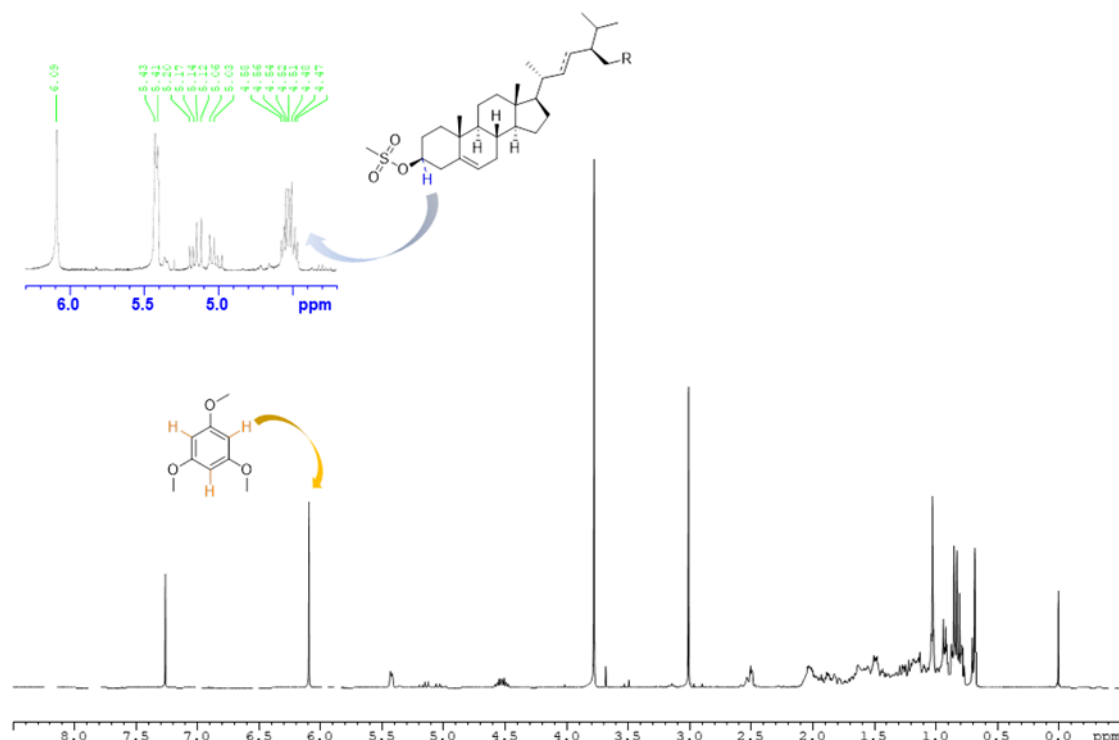
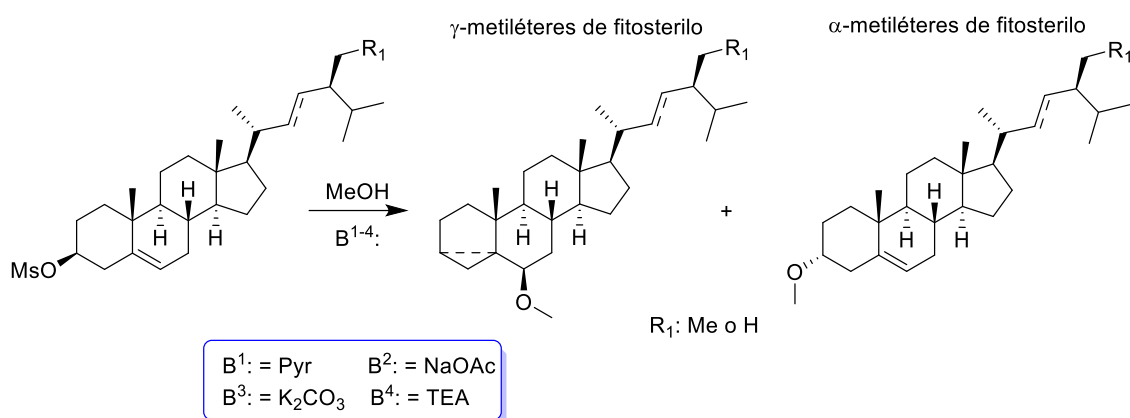


Figura 3.28. Espectro de ^1H -RMNc del producto de reacción de mesilación de fitosterol empleando 1,3,5-TMB como estándar interno. Las señales empleadas en el análisis corresponden a los protones aromáticos del estándar (6,09 ppm; 3H; singlete), y la señal correspondiente al MsO-C3-H (4,52 ppm; 1H; multiplete).

Si bien el empleo de TsCl se considera una condición tradicional para la activación de este tipo de alcoholes secundarios, este tratamiento mostró ser poco eficiente en nuestros experimentos. Existen reportes para estigmasterol donde se emplea la dupla TsCl/Pyr con rendimientos cuantitativos,¹⁴ sin embargo en nuestros experimentos usando DCM y Et₂O no se obtuvieron esos resultados al emplear TEA como base. Las reacciones en las que se empleó TsCl y Et₂O mostraron un pobre avance de reacción, incluso después de 20 horas. En cambio, empleando el mismo agente de sulfonilación, pero DCM como solvente, se vio un aumento en el rendimiento (53-83%), aunque requiere prolongados tiempos de reacción. Por el contrario, las reacciones en las que se empleó MsCl, no sólo permitieron obtener los productos sulfonilados con rendimientos superiores al 80%, sino que además requirieron solo 2 horas para completarse. De este modo las condiciones que emplean MsCl y Et₂O son más

amigables con el ambiente, fueron igual de eficientes que la condición de DCM, requieren tiempos menores que con TsCl, y se obtienen buenos rendimientos.

Dado el elevado título del material recién sintetizado, se continuó con la estrategia planteada evaluando la metanólisis de los derivados mesilados. Este paso de reacción suele ser llevado a cabo en presencia de Pyr como base. Dado su perfil tóxico decidimos evaluar NaOAc, K₂CO₃ y TEA como bases alternativas, y menos nocivas para el ambiente.^{174,188} (**Esquema 8**).¹⁸⁹



Esquema 8. Reacción de solvólisis (metanólisis) para la formación del ciclopropano derivado de esteroides (metiléteres internos de fitosteroides, *i*-ME) para la protección del doble enlace endocíclico variando la base empleada (Pyr, NaOAc, K₂CO₃ y TEA).

Partiendo de mesilatos de fitosterilo obtenidos (85% pureza, ~0,1 mmol), se disolvieron en MeOH_(anh) en presencia de la correspondiente base. Las reacciones se mantuvieron a reflujo con agitación orbital por 6 h. Una vez cumplido el tiempo, se evaporó el MeOH, se resuspendió la reacción en Et₂O, y se lavó la fase orgánica con agua destilada para eliminar las bases empleadas. El crudo de reacción fue evaluado por ¹H-RMNc con 1,3,5-TMB como estándar interno. (**Figura 3.29**) Las reacciones quedaron evidenciadas por la desaparición de la señal de C3-H (δ (ppm)=4,52; 1H; multiplete) y la aparición de dos señales de metoxilo correspondientes a los productos de S_N2' y S_N2, (derivados OMe de la mezcla de fitosteroides) γ -ME y α -ME, respectivamente (δ (ppm)=3,35 y 3,32; respectivamente; 3H; singletes). Los γ -ME son también conocidos como metil éteres *internos* o *i*-ME.

Para el análisis cuantitativo de las mezclas se calculó el contenido de *i*-ME del material integrando la señal correspondiente a C6-H (δ (ppm)=2,77, 1H, triplete) contra los protones aromáticos del estándar interno (δ (ppm)=6,09, 3H, singlete). Adicionalmente se calculó la relación α -ME : *i*-ME empleando las señales de C6-H.

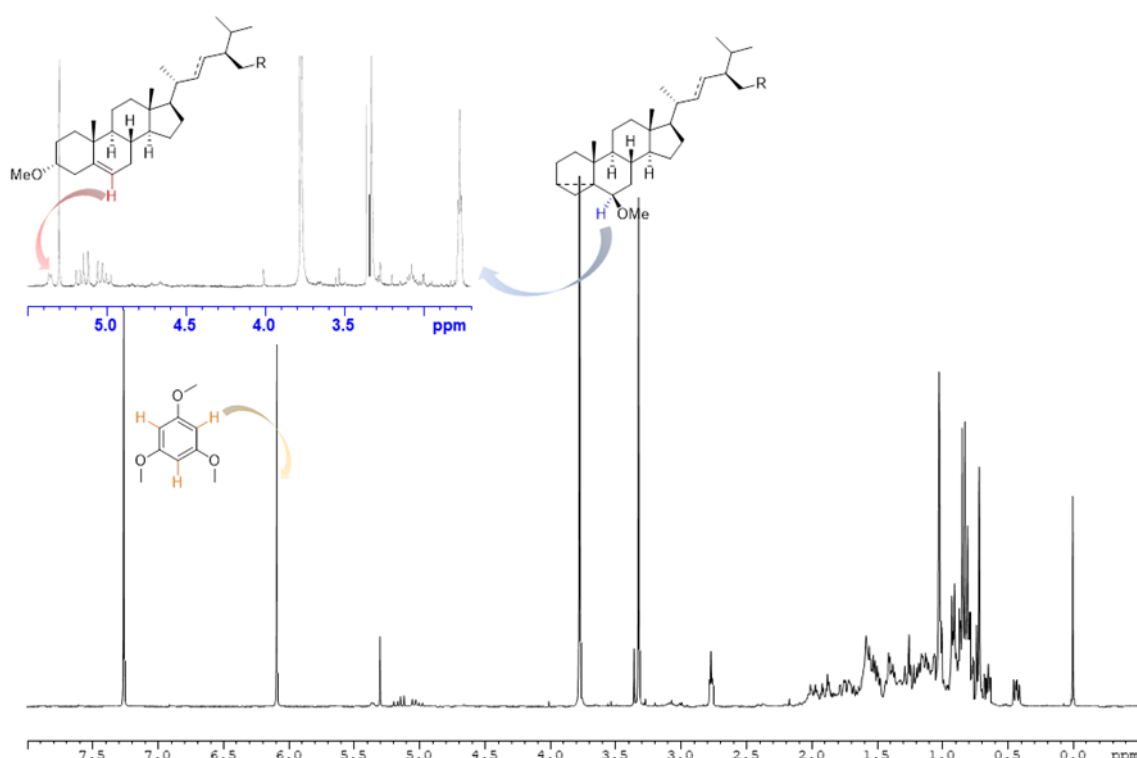


Figura 3.29. Espectro de ^1H -RMN de los productos de reacción de metanólisis de los mesilatos de fitosterilo empleando 1,3,5-TMB como estándar interno.

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Tabla 3.18**. Todas las condiciones evaluadas mostraron ser más eficientes que cuando se emplea Pyr (**Tabla 3.18**, Entrada 1). Dicha condición mostró tener la menor relación entre el producto esperado y el subproducto. Por el contrario, el uso de bases alternativas mejoró la relación entre los productos, aumentando también el rendimiento de la reacción. Dado que la condición que emplea K_2CO_3 (**Tabla 3.18**, Entrada 3) dio los mejores rendimientos, fue la seleccionada para la síntesis propuesta.

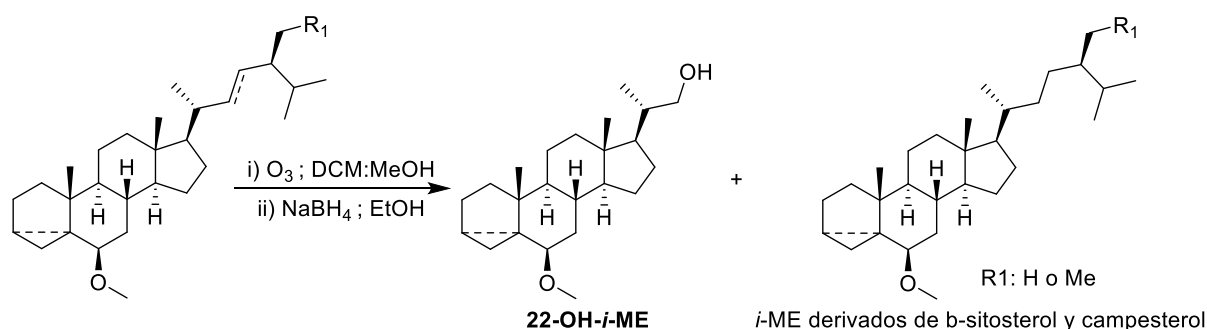
Tabla 3.18. Evaluación de condiciones de reacción para la formación de los éteres metílicos derivados de fitosteroles.

Entrada	Base	$\alpha\text{-ME} : i\text{-ME}$	Rendimiento* (%)
1	Pyr	1:2,68	67,4
2	NaOAc	1: 6,81	79,4
3	K_2CO_3	1: 6,94	92,3
4	TEA	1:7,1	81,3

*Calculado por ^1H -RMNc en base al contenido relativo de *i*-ME

3.2.5.2 Ozonólisis de metiléteres internos derivados de fitosteroles

Habiendo obtenido los *i*-ME de fitosterilo, continuamos con el estudio de la ozonólisis de dichos productos para aprovechar el derivado de estigmasterol presente en la mezcla. Para ello desarrollamos nuestra reacción en condiciones clásicas, siguiéndola de forma indirecta tanto por ^1H -RMN (cualitativamente) como por GC-MS (cuantitativamente). Si bien nuestro objetivo era la obtención del aldehído en la posición 22, decidimos preparar el alcohol dada su mayor estabilidad. Este hecho facilitaría el seguimiento analítico de las reacciones. Así, una vez realizada la ozonólisis, se trató el trioxolano formado con NaBH_4 , obteniéndose el correspondiente derivado 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-22-OH-23,24-bisnor-colesterol, que nombraremos como 22-OH-*i*-ME (**Esquema 9**).^{173,175}



Esquema 9. Reacción de ozonólisis reductiva de *i*-ME de fitosterilo.

Realizamos reacciones de ozonólisis independientes con aprox. $\sim 0,01$ mmol de *i*-ME a 10, 20, 30, 45 y 120 min como experimentos exploratorios. Una vez cumplido el tiempo de reacción estipulado, se eliminó el ozono remanente con corriente de N_2 . Luego se agregó un estándar de colesterol (1,01 mg/ml) para realizar mediciones cuantitativas que nos permita describir la distribución de especies presentes en la reacción, empleando GC-MS (**Figura 3.30** y **Tabla 3.19**).

Tras seguir de forma discontinua el avance de la reacción de ozonólisis mediante GC-MS, fue evidente la desaparición del estigmasteril-*i*-ME (*i*-EME) y la aparición del derivado 22-OH-*i*-ME, en relación a la señal de colesterol empleado como estándar interno. Para ello fue necesario realizar una derivatización previa empleando MTSTFA como agente sililante, con Pyr como base y hexano como solvente. Se representan a continuación los cromatogramas obtenidos. (**Figura 3.30**)

Tabla 3.19. Estudio de la reacción de ozonólisis del *i*-ME de fitosterilo.

<i>t</i> (min)		<i>TMS-22-OH-i-ME</i>	<i>campesteril-i-ME</i>	<i>i-EME</i>	β -sitosteril- <i>i-ME</i>	<i>TMS-Col</i>
	<i>TR (min)*</i>	10,264	11,825	12,041	12,505	13,319
10	Área	1619313	28664432	29266439	62314965	50159292
	% [#]	1,3	23,5	24,0	51,1	-
20	Área	3871101	23903512	14527641	48711490	44369231
	%	4,3	26,3	16,0	53,5	-
30	Área	7365146	31262401	23902102	63122567	55207158
	%	5,9	24,9	19,0	50,2	-
45	Área	16050501	29514446	16040869	66133502	48921889
	%	12,6	23,1	12,6	51,8	-
120	Área	27257345	35577322	3118690	74071208	57471549
	%	19,5	25,4	2,2	52,9	-

*Tiempo de retención (TR): promedios de las 5 corridas. [#]Porcentajes relativos al área total (suma) de derivados de fitosteroles y 22-OH-*i-ME*

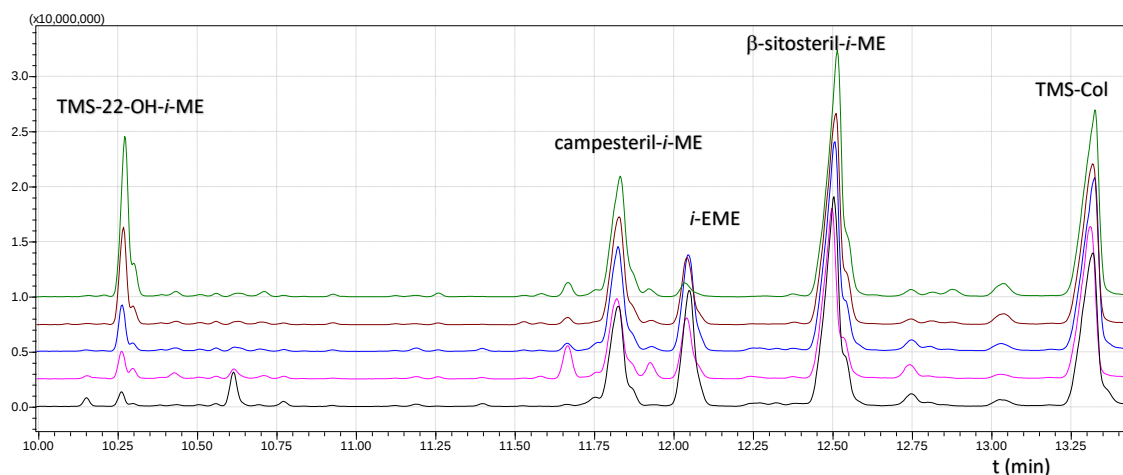


Figura 3.30. Seguimiento discontinuo de la reacción de ozonólisis por GC-MS con colesterol como estándar interno. Representación de los cromatogramas para tiempos de reacción de 10, 20, 30, 45 y 120 min de abajo hacia arriba, respectivamente. Se asignaron los picos de cada derivado de esteroil empleando estándares externos (EME y 22-OH-*i-ME*) y por comparación de los espectros con los presentes en la base de datos NIST.

En base al estándar de colesterol empleado se calcularon las concentraciones de las tres especies derivadas de los esteroides de partida, y del producto de la ozonólisis (**Figura 3.31**). Como puede verse, las concentraciones de las especies derivadas de *i-ME* de β -sitosterol y campesterol permanecieron invariantes a lo largo del tiempo dado que no sufren transformación durante la ozonólisis. De este modo vimos que es posible llevar a cabo la ozonólisis en presencia de la mezcla de fitosteroides protegidos, sin necesidad de separación previa. El producto de ozonólisis posee un comportamiento cromatográfico significativamente distinto al de los *i-ME*, por lo que su separación es muy sencilla. Esto habilita la obtención de

un producto conformado por β -sitosterol y campesterol en una relación 2:1, tras regenerar el doble enlace endocíclico mediante hidrólisis ácida.¹⁷³

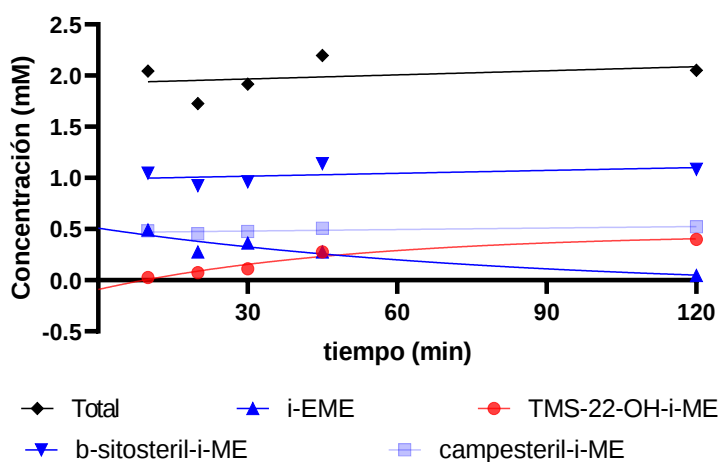


Figura 3.31. Cinética de la reacción de ozonólisis relativa al seguimiento discontinuo con patrón interno derivado de colesterol (TMS-colesterol) de la reacción de ozonólisis de los *i*-ME sintetizados previamente.

Adicionalmente, adquirimos espectros de ^1H -RMN para $t=0$, 30, 120 minutos, y los comparamos con el del producto 22-OH-*i*-ME (**Figura 3.32**). La transformación se evidencia por la desaparición de la señal de los dos protones del doble enlace exocíclico del *i*-EME (δ (ppm)=5,16; 5,02, respectivamente, 1H, doble doblete) y la aparición de la señal de uno de los protones diasterotópicos del metileno de alcohol (δ (ppm)=3,64, 1H, doble doblete). Siendo que la mezcla de partida contaba con ME tanto α , como γ , se observaron 2 señales de metoxilo con δ de 3,35 ppm y 3,32 ppm, respectivamente. Puede apreciarse que durante el transcurso de la reacción la señal desaparece dado que esa especie cuenta con un doble enlace endocíclico susceptible de dar la escisión oxidativa. Cabe aclarar que el aumento en la señal de doble enlace endocíclico a los 30 y 120 min corresponden al estándar de colesterol agregado para el análisis por GC-MS.

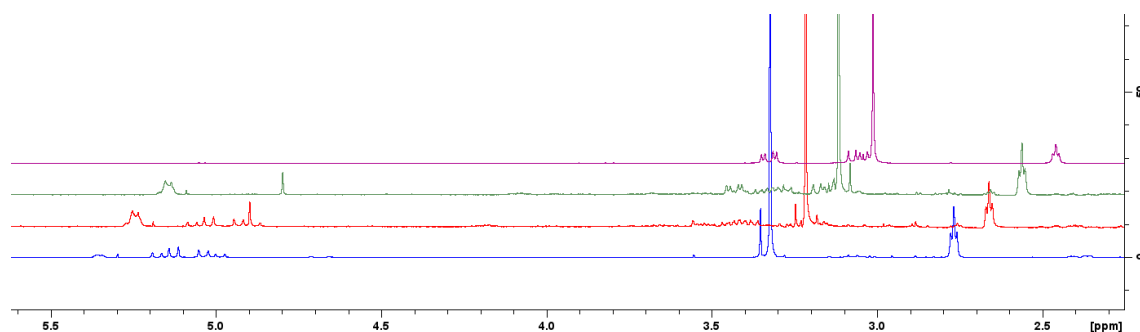


Figura 3.32. Seguimiento de la ozonólisis mediante ^1H -RMN para $t = 0$ (azul), 30 (rojo), 120 (verde) minutos. El producto se presenta en violeta. Se muestran las zonas de los espectros desde 2,5 ppm a 5,5 ppm donde se evidencia la transformación ocurrida. Solvente CDCl_3 .

Dado que la ozonólisis para la obtención del aldehído en posición 22 no difiere en tratamiento de aquella para la obtención del alcohol, a excepción de la etapa final de la síntesis, decidimos probar la secuencia estudiada empleando las condiciones más eficientes, aunque cambiando el tratamiento sobre el trioxolano. Para ello escalamos la reacción de protección del doble enlace endocíclico de la mezcla de fitosteroles de 0,5 g a 5,0 g, y paralelamente evaluamos la protección de estigmasterol comercial (95% pureza).

La mesilación de fitosteroles a escala de gramos ($\sim 10\text{mmol}$) se practicó empleando las condiciones antes detalladas. Se analizaron los crudos de reacción por RMN y se continuó con el siguiente paso de síntesis sin purificaciones previas. Se sometió entonces el sólido aislado a una metanólisis ($\sim 0,2\text{ M}$) empleando $\text{K}_2\text{CO}_{3(\text{anh})}$, a reflujo, durante 2 h. Tras la reacción, se aisló un sólido ceroso y se purificó por cromatografía en columna con un gradiente Hex:AcOEt del 1% para dar 3,78 g (8,93 mmol) de un aceite translúcido. El producto fue identificado por RMN para dar entonces un 73% de rendimiento global para ambos pasos. En sendas condiciones se trató estigmasterol (95% pureza, $\sim 5\text{ mmol}$), y se obtuvo *i*-EME tras ambas etapas de síntesis con un 63% de rendimiento global. De este modo mostramos que la mezcla de fitosteroles se comporta de modo similar que el estigmasterol comercial durante las etapas de protección del doble enlace endocíclico.

Se ensayó la reacción de ozonólisis empleando *i*-EME ($\sim 0,25\text{ mmol}$) para la síntesis del derivado 22-aldehído-*i*-ME variando el co-solvente empleado. En un caso se emplearon 10 ml de la mezcla clásica DCM:MeOH (2:1)²⁰ y en otro DCM:Pyr (99:1)²¹, ambos a -78°C bajo el paso de una corriente de O_2/O_3 generado *ex situ*. Se dejó reaccionar durante 3 y 4 h, respectivamente. Luego, tras eliminar el O_3 remanente se agregó Me_2S para lograr la formación del grupo carbaldehído tras la escisión del trioxolano intermedio y se dejó evolucionar la reacción a temperatura ambiente. De forma interesante se observó por ensayos de TLC que en la condición que emplea Pyr como cosolvente, la formación del 22-aldehído *i*-ME se da sin la necesidad del agregado del agente reductor (**Figura 3.33**).

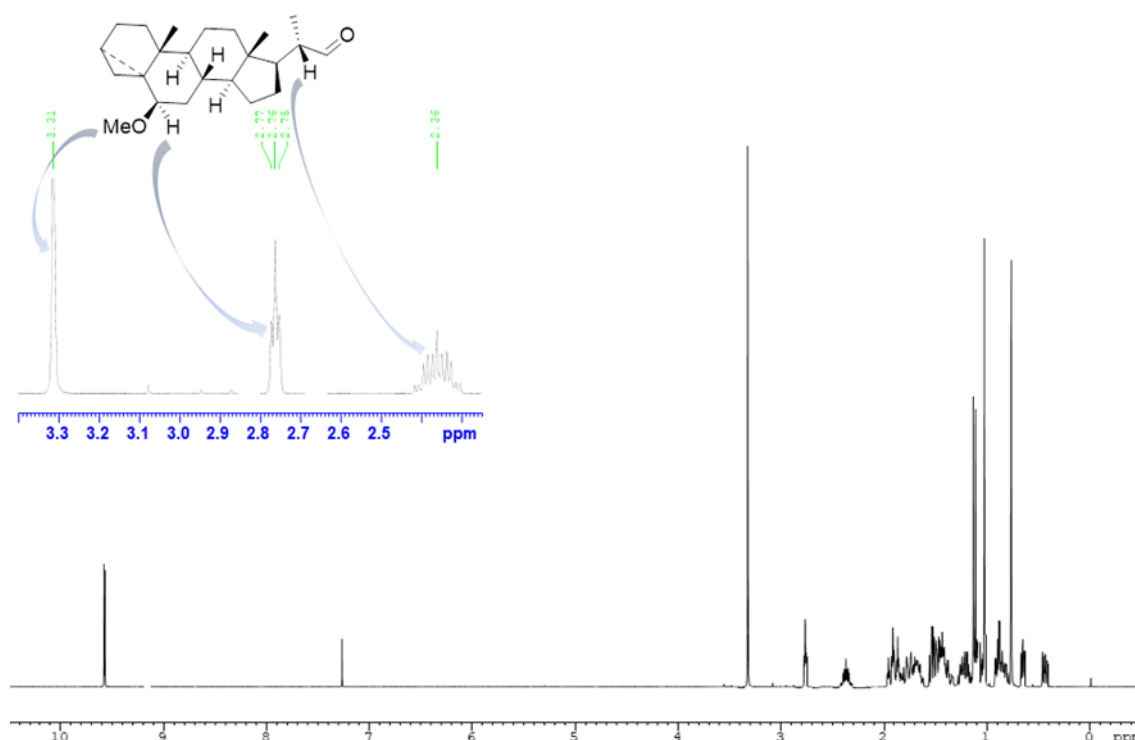


Figura 3.33. Espectro de ^1H -RMN del producto de reacción de ozonólisis de *i*-ME, *i. e.* 22-aldehído-*i*-ME. Las señales empleadas en el análisis corresponden a los protones alfa al carbonilo (2,36 ppm, 1 H, multiplete) y del aldehído (9,57 ppm, 1H, doblete, $J_3=3,28$ Hz).

El fenómeno observado en la ozonólisis en presencia de Pyr, ya fue reportado en 1958 por Slomp y col., quienes postularon la formación del N-óxido de Pyr durante la ozonólisis, proponiendo al óxido como organocatalizador en la descomposición de los trioxolanos.¹⁹⁰ A principio de siglo, Schwartz y col. exploraron el uso de compuestos auxiliares durante la reacción de ozonólisis para lograr una descomposición eficiente de los trioxolanos generados y la posterior obtención de derivados carbonílicos.¹⁹¹ De forma destacable, desarrollaron un método que emplea DMSO (2 eq) y TEA (1 eq) en DCM húmedo (0,05% H_2O) a 0°C para dar el aldehído correspondiente con un 84% de rendimiento aislado,¹⁹¹ el cual sería interesante poner en práctica para nuestro sistema en estudio.

Los autores, también mostraron que el N-óxido de Pyr tiene una mejor performance que la base libre en la obtención de aldehídos trabajando a 0°C . Si bien destacaron que tratar aminas con ozono lleva a la formación parcial de los N-óxidos correspondientes, Pyr no fue reconocido como un auxiliar eficiente dado que encontraron un bajo rendimiento de la reacción tras su empleo.¹⁹¹ Sin embargo, Willand-Charnley y col. reportaron en 2012 el uso de Pyr como organocatalizador en reacciones de ozonólisis con excelentes rendimientos, trabajando a -78°C .^{192,193} Los autores manifiestan que la ozonólisis en presencia de Pyr no implica el consumo de Pyr en, por ejemplo, la formación del N-óxido, aunque no descartan la

formación de derivados de Pyr durante la reacción. En cambio, postulan que la transformación cursaría a través de la formación de aductos zwitteriónicos entre Pyr y peroxoderivados, con la posterior descomposición organocatalizada de los peroxiacetales en compuestos carbonílicos, liberándose Pyr y una molécula de O_2 .^{192,193}

Luego de purificar cromatográficamente la reacción, encontramos conversiones superiores al 95%, con rendimientos aislados superiores al 75% para ambas condiciones. Puede verse a través del análisis de RMN la aparición de una señal C22-H en 9,57 ppm (1 H, d, $J=3,28$ Hz), al protón unido al C22 del carbonilo de aldehído, y la desaparición de las señales de los protones olefínicos del doble enlace trans Δ -C22,C23 que aparecen en 5,16 ppm y 5,02 ppm. La señal del C20-H mostró ser un doble-cuadruple-doble (dqd) como resultado del acoplamiento del metino C22-H ($J=3,3$ Hz), C21-H₃ ($J=6,8$ Hz) y C17-H ($J=10,2$ Hz), respectivamente. De este modo mostramos que las condiciones planteadas son eficientes para la obtención del intermediario buscado, trabajando a escala de mg de la mezcla de *i*-ME como material de partida.

Seguidamente, escalamos la ozonólisis en un factor de 10. Tratando la mezcla de *i*-ME (~2 mmol) en DCM:Pyr obtuvimos el producto deseado con un rendimiento del 76%. Realizamos un seguimiento temporal de la reacción mediante RMN, con tomas cada hora durante un período de 5 horas. Observamos la conversión de señales características y confirmamos que la reacción se completó después de poco más de 4 h. (**Figura 3.34**)

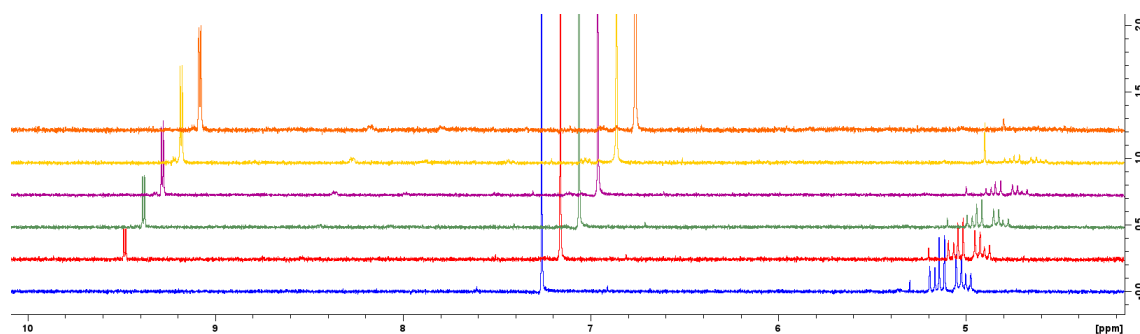


Figura 3.34. Seguimiento de la reacción ozonólisis de *i*-ME. Se realizaron espectros de 1H -RMN para $t = 0$ (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (violeta, 4 (amarillo) y 5 horas (naranja). Se muestran las zonas de los espectros desde 5 ppm a 10 ppm donde se evidencia la transformación ocurrida. Solvente $CDCl_3$.

Paralelamente, recuperamos los *i*-ME derivados de β -sitosterol y campesterol con un rendimiento mayor al 95%, listos para ser desprotegidos y recuperados en su forma de alcohol secundario. De este modo, luego de tratarlos con ácido para-toluenosulfónico en dioxano:agua, estos productos podrían ser regenerados como fitosteroles libres de forma cuantitativa, dado el alto grado de eficiencia reportado para esta reacción.¹⁷⁶ Además, dada

la viabilidad de separación entre estos dos esteroides podrían obtenerse de forma individual con alta pureza y buenos porcentajes de recuperación.^{132,194}

Con estos resultados, demostramos la aplicabilidad de los fitosteroides obtenidos en la síntesis de productos de interés sintético, logrando la síntesis formal del derivado 22-OH-*i*-ME, al tiempo que recuperando los otros *i*-MEs. Estas mezclas de esteroides que no posean estigmasterol, permitirían una mejor separación de β -sitosterol y campesterol.¹⁹⁵ De este modo no solo se aprovecharía el estigmasterol presente en la mezcla, sino que además podrían obtenerse los esteroides remanentes por separado, valorizando la mezcla de esteroides obtenida.

El método desarrollado fue llevado a cabo en su totalidad buscando la linealidad de procesos en batch, en analogía a operaciones unitarias. Por ello, todas las reacciones fueron evaluadas en una misma escala (gramos), para asegurar la transformación desde los SGs, pasando por los fitosteroides y sus derivados, hasta la obtención de los productos mencionados. Es importante destacar que, a pesar de no haber optimizado cada paso de reacción, hemos logrado nuestros objetivos con buenos resultados. Sin embargo, durante las transformaciones realizadas, se pierde casi un 30% de los fitosteroides derivados de β -sitosterol y campesterol. Para completar este trabajo, restaría optimizar la síntesis en escala de gramos, para lo cual podría establecerse una RSM para cada paso, buscando maximizar los rendimientos, minimizando los recursos empleados. Este trabajo será abordado en futuras instancias del proyecto, donde se escalará la ozonólisis de los *i*-ME hasta alcanzar las decenas de gramos y a su vez, se explorarán alternativas novedosas y más seguras para la escisión del doble enlace del EME, como ser el empleo de técnicas fotoquímicas, sin ozono.¹⁹⁶ Por otro lado, contar con el intermediario sintetizado nos permitirá profundizar en estudios sobre agentes antiparasitarios desarrollados por nuestro laboratorio,¹⁹⁷ mediante la obtención de sondas clickeables y/o sondas fluorescentes derivadas de triazolil-esteroides.

3.3 Esterilglucósidos peracilados

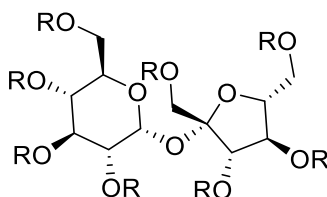
3.3.1 Sustitutos de grasas

Según estudios internacionales alrededor del 13% de los adultos son obesos y el 39% de éstos presenta sobrepeso, por lo que la obesidad ha sido declarada como una pandemia. Como estrategia para combatir estas enfermedades se ha propuesto disminuir el consumo de alimentos de alto contenido calórico. Para lograrlo, se ha sugerido desarrollar sustitutos de grasas para ser incorporados en los alimentos. Los sustitutos de grasas no calóricos son ingredientes que imitan funciones sensoriales y físicas de la grasa en los alimentos, aunque no ofrecen calorías tras su ingesta. Estos proporcionan lubricidad, sensación agradable en la boca, y otras características que le brinda la materia grasa a los alimentos.¹⁹⁸ Tales componentes suelen ser evaluados y regulados por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration, U.S.A.*) en dos categorías: como sustancias seguras o como aditivos alimentarios. Mientras que las primeras no deben ser sometidas a pruebas exhaustivas, ya que son reconocidas como tales por expertos científicos, los segundos requieren estudios rigurosos para determinar seguridad. Los sustitutos de grasas basados en una combinación de ingredientes reconocidos como seguros, no requieren aprobación especial ya que muchas de estas sustancias son similares a las presentes en los alimentos. Son ejemplos de este tipo de sustitutos: almidones, gomas, fibras y proteínas.^{199,200} La mayoría de los sustitutos de grasas que se utilizan actualmente se clasifican como “seguros”.

En general la estrategia reconocida para el desarrollo de una grasa no calórica, no digerible y/o no asimilable, consiste en alterar químicamente una grasa natural con el fin de cambiar su susceptibilidad a la hidrólisis y/o absorción en el lumen intestinal. Distintas estrategias para el diseño de sustitutos de grasas no calóricos han sido propuestas:²⁰¹ A saber: a) Reemplazar el glicerol de un TAG por un carbohidrato o un poliol, b) Reemplazar los ácidos grasos por otros ácidos alternativos de modo de proteger el enlace éster aumentando el impedimento estérico, c) Invertir el enlace éster reemplazando el glicerol por un ácido policarboxílico y esterificarlo con un alcohol de cadena larga, d) Modificar el enlace éster por un éter. Un producto que alcanzó el mercado a fines del siglo pasado fue Olestra®, comercializado como sustituto de grasas no calórico bajo la marca *Olean*, siendo un derivado de un carbohidrato (sacarosa) y ácidos grasos.

Las grasas naturales constan de una molécula de glicerol unida a tres moléculas de AGs (triacilgliceroles, TAGs). Olestra® se prepara mediante la sustitución de la molécula de glicerol con sacarosa esterificando sus respectivos grupos hidroxilos con 6, 7 u 8 AGs (C12-C20) (**Figura 3.35**). Las propiedades del producto obtenido están gobernadas principalmente

por el largo de la cadena carbonada y el grado de insaturaciones de los ácidos grasos empleados. Con esta cantidad de AGs, las enzimas digestivas no pueden acceder a hidrolizar el enlace éster. Este hecho se debe al gran impedimento estérico que producen las largas cadenas de AGs evitando la accesibilidad de las esterasas a los grupos ésteres y, en consecuencia, la hidrólisis de los mismos. Se ha demostrado también que la sacarosa esterificada con 1, 2 o 3 AGs es susceptible a dicha hidrólisis. De este modo este poliéster de sacarosa no puede ser digerido y no añade materia grasa.²⁰²



R : Grupo acilo derivado de ácidos grasos C12-C20

Figura 3.35. Estructura de Olestra® (8 unidades de ácidos grasos).

3.3.2 Nuevos sustitutos de grasas

Olestra® ganó gran popularidad en el mercado, llegando a ser parte de productos de consumo masivo. Sin embargo, existen trabajos que asocian su consumo con la disminución en la absorción de nutrientes liposolubles. Aunque otros consideran que es una herramienta útil para bajar el contenido graso en sujetos con factores de riesgo.²⁰³ Por este motivo nos propusimos generar nuevos sustitutos de grasas no calóricos para luego evaluar su perfil biológico, en comparación con la molécula modelo. Con el objetivo de sintetizar nuevos productos a partir de SGs e inspirados en Olestra®, buscamos preparar productos poliacilados decorando el glicón de nuestros glucósidos con AGs. Tomando la estructura de Olestra®, si consideramos que la misma posee una glucosa y una fructosa acilada en múltiples posiciones, un producto poliacilado basado en SGs mantendría la porción de la glucosa acilada, mientras y la porción del esteroil sustituiría la porción de la fructosa acilada (**Figura 3.36**).

3.3.3 Preparación de derivados poliacilados de SGs

Con el fin de estudiar los derivados poliacilados de SGs como sustitutos de grasas, procedimos a abordar su preparación. En primer lugar, se procedió a esterificar los hidroxilos de la glucosa de los SGs, para lo cual se utilizaron distintos AGs, a saber, ácido láurico, palmítico y oleico. Se utilizaron dichos AGs con el objetivo de obtener sustitutos de grasas que puedan emular las propiedades fisicoquímicas de Olestra®.

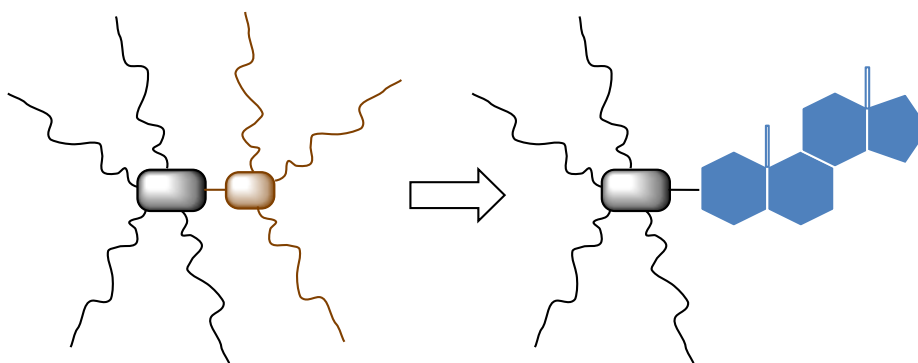
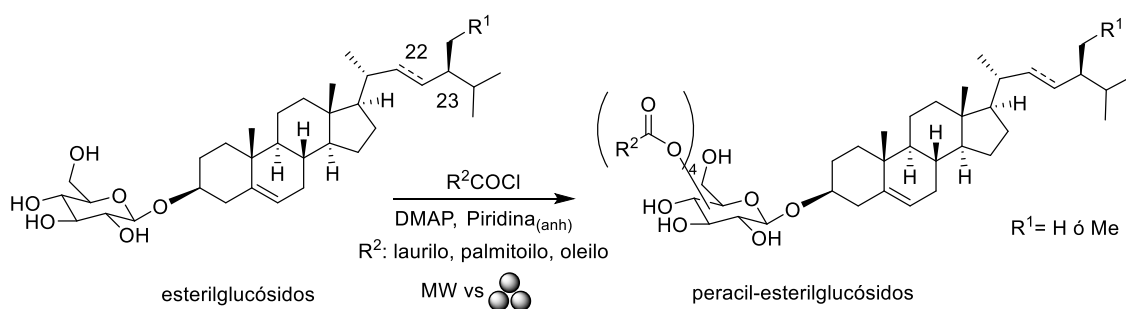


Figura 3.36. Diseño racional de sustitutos de grasas basado en Olestra mediante modificación estructural de los esterilglucósidos obtenidos.

Alternativamente, se empleó también anhídrido acético como agente acilante, para obtener un derivado tetraacetilado de SGs, producto que ha sido reportado previamente.²⁰⁴

Para comenzar con la síntesis, se prepararon los correspondientes cloruros de ácido usando cloruro de tionilo, en condiciones tradicionales.²⁰⁵ Una vez preparados, se hicieron reaccionar con SGs en Pyr, con catálisis de DMPA y calentamiento con microondas a 160°C (**Esquema 10**). Tales condiciones fueron derivadas de las empleadas previamente en nuestro grupo para la monoacilación de SGs.²⁰⁴ Las diferencias con el método original fueron el cambio de sym-colidina por Pyr, el aumento de la cantidad de equivalentes de agente acilante y que fueron necesarios tiempos de reacción más prolongados, pasando de 3 minutos a entre 10 y 20 min. según el caso.



Esquema 10. Síntesis de esterilglucósidos peracilados.

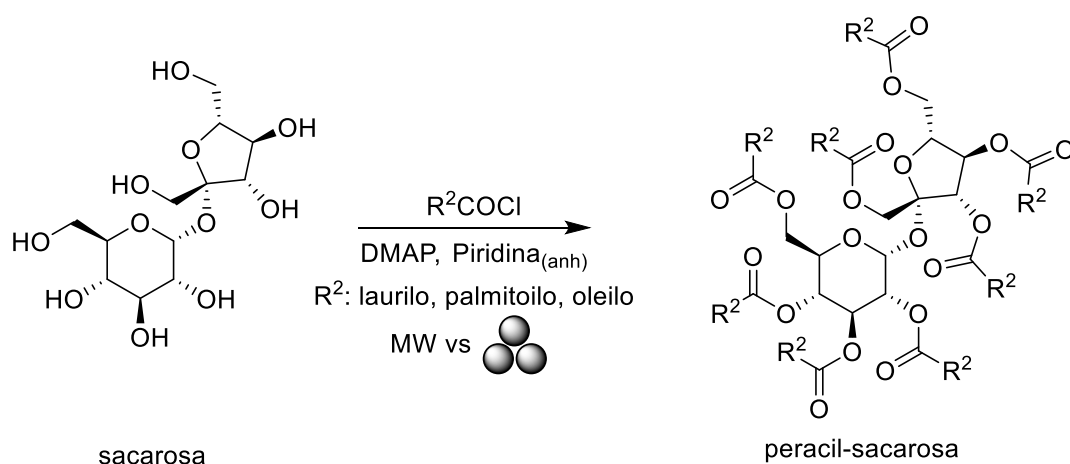
En línea con los preceptos de la QC, decidimos explorar nuevas condiciones de reacción reduciendo el uso de solventes y la demanda energética, siendo la mecanoquímica una estrategia novedosa para satisfacer estas demandas. En efecto, la mecanoquímica es una rama de la química que estudia y utiliza la energía mecánica para inducir reacciones. A diferencia de la química tradicional, que generalmente requiere solventes y calor para que las reacciones ocurran, la mecanoquímica emplea fuerzas físicas como molienda, fricción o compresión para activar los reactivos y llevarlos a reaccionar.²⁰⁶

La mecanoquímica puede ser de alta o baja energía, dependiendo de la cantidad de energía mecánica aplicada al sistema. En la mecanoquímica de alta energía se emplean mayores velocidades de agitación o rotación, generando impactos y fricciones intensas, lo que permite realizar reacciones rápidas, como la síntesis de materiales duros o nanopartículas. En contraste, la mecanoquímica de baja energía utiliza condiciones más suaves, con menor velocidad y menor impacto, lo que hace que las reacciones sean más lentas, pero con mayor control y selectividad, ideal para compuestos sensibles o reacciones que no requieren superar grandes barreras energéticas. Dada la alta reactividad de los agentes acilantes, cuyas reacciones poseen una baja barrera energética, era factible la esterificación de SGs mediante condiciones mecanoquímicas de baja energía.

En las reacciones con alta demanda energética, los procesos suelen llevarse a cabo en molinos a bolas o planetarios.²⁰⁷ Alternativamente, en los casos de reacciones de baja energía, como en los trabajos reportados por el grupo de la Prof. Colacino,²⁰⁸ las reacciones se realizan en un frasco de vidrio (viales de 20 ml) con esferas de vidrio (3 o 6 mm de diámetro) en un molino planetario.

Siguiendo estos antecedentes, decidimos abordar la aproximación de baja energía, realizando las reacciones de acilación de SGs en un agitador orbital IKA VibraMax a ~2000 rpm.

Paralelamente decidimos evaluar la síntesis de sacarosa octa-acilada (componente mayoritario de Olestra®) empleando técnicas de calentamiento en microondas y mecanoquímicas (**Esquema 11**).



Esquema 11 Síntesis de sacarosa octa-acilada.

Mediante estos experimentos exploratorios, buscamos obtener condiciones alternativas a las síntesis tradicionales de este producto. Dado que como material de partida

se emplea sacarosa y ácidos grasos o BD, suele ser necesario emplear altas temperaturas (100-180°C), intenso vacío y el uso de aleaciones Na-K como catalizador.²⁰⁹ Del mismo modo que para los SGs, llevamos a cabo la síntesis de octa-acetilsacarosa, para emplearla como modelo comparativo, tanto para la síntesis, como en los ensayos de actividad frente a la digestión y toxicidad *in vivo*. Cabe señalar que este tipo de moléculas ya ha sido sintetizado por métodos mecanoquímicos asistidos por ultrasonido.²¹⁰

Comenzamos los ensayos de peracilación asistidos por microondas trabajando con los SGs recuperados y las comparamos frente a la acilación de sacarosa en sendas condiciones. Los resultados de estos experimentos se listan en la **Tabla 3.20**.

Tabla 3.20. Reacciones de peracilación de SGs y sacarosa asistida por calentamiento con microondas.

Entrada	Sustrato	mmoles	Agente acilante	Eq.	Temp. (°C)	t (min)	Rend. (%)*
1	SG	0.26	Lauril-Cl	8	160	10	52
2	SG	0.26	Lauril-Cl	16	160	10	82
3	SG	0.26	Palmitoil-Cl	8	160	20	86
4	SG	0.26	Palmitoil-Cl	16	160	20	70
5	Sacarosa	0.13	Oleil-Cl	16	160	20	44
6	SG	0.26	Oleil-Cl	16	160	20	44
7	SG	0.26	Oleil-Cl	8	160	20	57
8	SG	0.26	Oleil-Cl	8	t.a.	240	24
9	Sacarosa	0.13	Ac ₂ O	20	160	10	97
10	SG	0.26	Ac ₂ O	20	160	3	47
11	SG	0.26	Ac ₂ O	20	160	10	82
12	SG	0.26	Ac ₂ O	10	160	10	80
13	SG	0.26	Ac ₂ O	10	t.a.	240	77

*Calculado en base a la masa recuperada de productos peracilados aislados cromatográficamente

Basándonos en experiencias previas, comenzamos trabajando con los cloruros de laurilo y palmitoil, calentando las reacciones hasta 160°C mediante microondas. Cada acilante requirió diferentes tiempos de reacción para lograr la desaparición del material de partida, siendo los de menor tamaño los que necesitaron tiempos menores. A pesar de que todo el material de partida fue consumido, no recuperamos la cantidad esperada de producto peracilado (**Tabla 3.20**, Entradas 1-4). Cuando se aumentó la cantidad de equivalentes del agente acilante, en el caso del laurilo mejoró hasta un 82% (**Tabla 3.20**, Entrada 2). Sin embargo, en el caso de los AGs más largos (C16 y C18), resultó contraproducente. Al utilizar 8 eq se obtuvieron rendimientos de 86% y 57%, respectivamente (**Tabla 3.20**, Entradas 3 y

7). En cambio, al duplicar la cantidad de agente acilante se obtuvieron rendimientos 16 y 13% más bajos, respectivamente (**Tabla 3.20**, Entradas 4 y 6). Según pudo observarse en los espectros de ^1H -RMN, encontramos que los productos purificados por cromatografía en columna presentaban contaminación con AGs (**Figura S36-Figura S39**). A través de ensayos de RMNc empleando 135-TMB como estándar interno, logramos determinar que el derivado de oleilo presentaba la mayor pureza de los derivados de ácidos grasos, alcanzando el 96% (**Tabla S14**). Entre las condiciones de acetilación pudimos ver que la reacción progresa con excelentes resultados tanto con 20 eq, como con 10 eq de anhídrido acético, con rendimientos superiores al 80% (**Tabla 3.20**, Entradas 11-12) y 99% de pureza. Para determinar la importancia del calentamiento por microondas en las reacciones evaluamos las condiciones de obtención del derivado de oleilo, pero agitándola esta vez a temperatura ambiente. En este caso, el tiempo de reacción se extendió arbitrariamente a 240 min (**Tabla 3.20**, Entrada 8), y si bien se observó la desaparición del material de partida, solo logramos un 25% de rendimiento aislado del producto peracilado, frente al 57% logrado mediante calentamiento (**Tabla 3.20**, Entrada 7). En cambio, en la condición análoga, pero empleando anhídrido acético, la reacción alcanza un 77% de rendimiento. (**Tabla 3.20**, Entrada 13)

Los productos obtenidos fueron identificados mediante experimentos de RMN. En los espectros de ^1H -RMN se observa el corrimiento de las señales correspondientes a los protones de la glucosa tras la acilación de los grupos hidroxilo. En los espectros de SGs acilados estos corrimientos van de 3,12-2,92 ppm (solvente DMSO- d_6) a desplazamientos a campos más bajos (5,22-4,92 ppm en el caso de los derivados tetraoleilados) (**Figura 3.37**). Este hecho, acompañado de la presencia en el espectro de ^{13}C -RMN de cuatro señales entre 174 y 172 ppm, asignables a carbonos de éster, nos permitieron confirmar la presencia de los productos. Es de destacar que el derivado peracetilado de SGs presenta una excelente resolución de señales en su espectro de RMN y además es el de más fácil purificación dada la simpleza del agente acilante.

Por otra parte, los derivados poliacilados de sacarosa análogos de Olestra[®], fueron obtenidos y caracterizados espectroscópicamente. Si bien la condición de peracetilación de sacarosa curso de forma casi cuantitativa, la formación del octaoleilato de sacarosa se logró con un rendimiento apenas superior al 40%. (**Tabla 3.20**, Entradas 9 y 5, respectivamente) En ambos casos fue posible notar la presencia de 7 señales en la zona de carboxilos de éster en los espectros de ^{13}C -RMN.

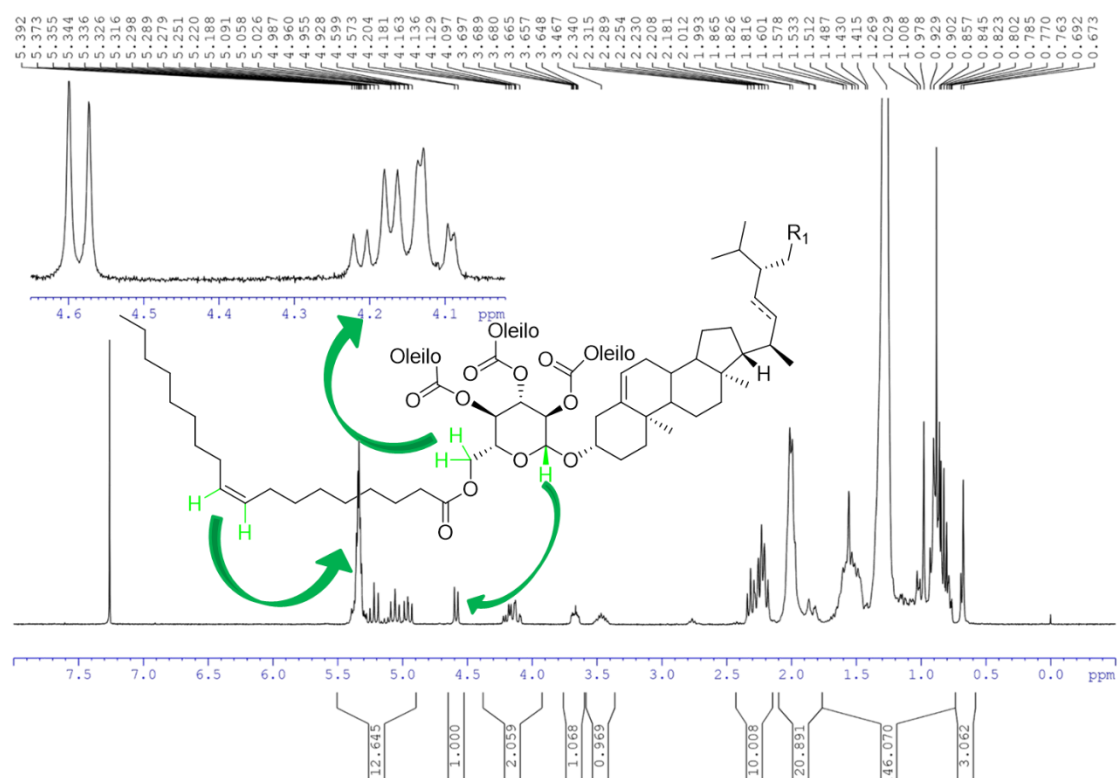


Figura 3.37. Espectro de ^1H -RMN de derivado tetraoleilado sintetizado a partir de SGs. Solvente CDCl_3 .

Siendo que buscamos tener el derivado octaoleilado en forma pura para emplearlo como molécula de referencia en estudios posteriores, quisimos confirmar la presencia de los 8 carboxilos de éster. Realizamos entonces experimentos ^{13}C -RMN cuantitativos, con tiempos de espera entre escaneos suficientes para permitir que todos los carbonos lleguen al estado basal, pudiendo así integrar señales de forma relativa, comparando las señales de carbonos de éster ($\delta = 172,1\text{-}173,4$ ppm) con la señal de carbono anomérico de hexosa ($\delta = 103,4$ ppm).

En la **Figura 3.38** se muestra el espectro, con excelentes valores de áreas relativas de las señales en cuestión. Se destaca además la presencia de 16 protones olefínicos, correspondientes a las 8 unidades de oleilo ($\delta = 129,7\text{-}130,0$ ppm), así como la presencia de otro carbono anomérico ($\delta = 89,8$ ppm). De este modo confirmamos la obtención del octaoleato de sacarosa, preparado de forma análoga al derivado tetraoleato de SGs. Alternativamente, se realizaron las reacciones propuestas en condiciones mecanoquímicas con el objetivo de buscar una fuente diferente de energizado y así lograr economizar recursos. Debido a que las condiciones mecanoquímicas de reacción mejoran la eficacia de las transformaciones, decidimos disminuir la cantidad de equivalentes de agente acilante empleado.

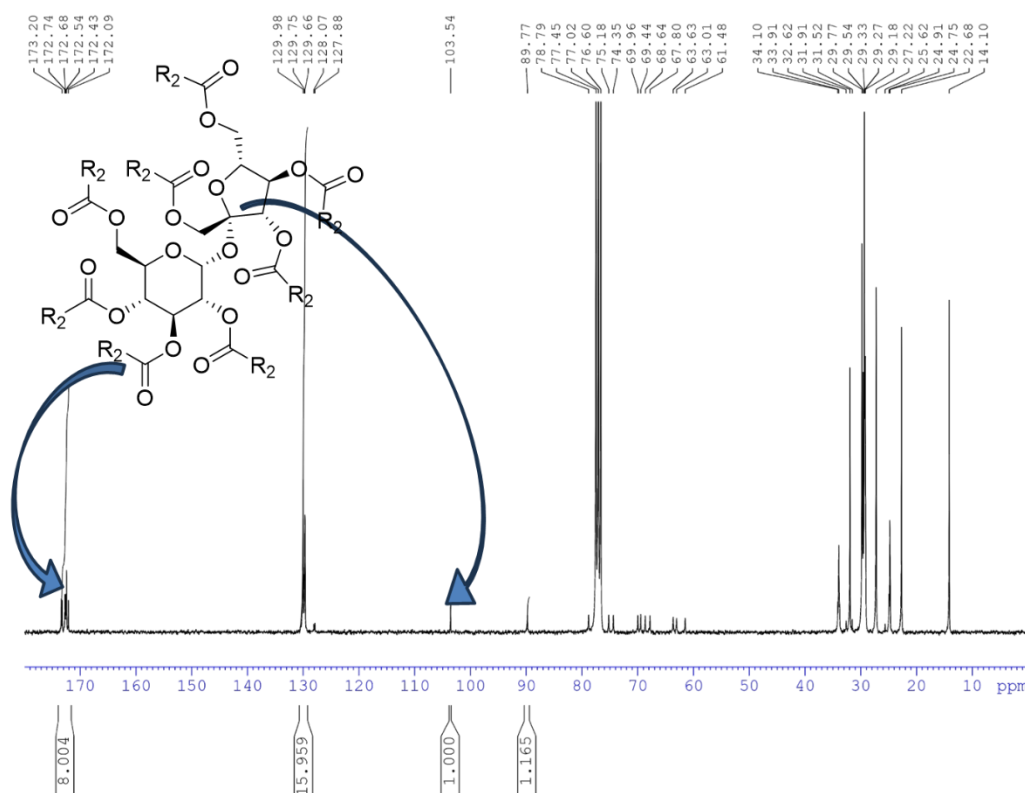


Figura 3.38. Espectro de ^{13}C -RMN de derivado octaoleilado de sacarosa. Solvente CDCl_3

Para realizar una reacción ha sido establecido que la relación entre el volumen de solvente empleado y la masa de sustrato a transformar se denomina como η . Este parámetro suele emplearse para dar el carácter de “sin solvente” ($\eta=0 \text{ }\mu\text{l/mg}$), “molienda asistida por liquido” (LAG, por sus siglas en inglés, $0 \text{ }\mu\text{l/mg} < \eta < 1 \text{ }\mu\text{l/mg}$), “Barro” ($1 \text{ }\mu\text{l/mg} < \eta < 5 \text{ }\mu\text{l/mg}$) o bien “disoluciones” ($\eta>10 \text{ }\mu\text{l/mg}$).²⁰⁶

En nuestro caso particular, manteniendo la misma cantidad de sustratos de partida, donde trabajábamos con un $\eta=20 \text{ }\mu\text{l/mg}$, decidimos disminuir este valor hasta $\eta<1 \text{ }\mu\text{l/mg}$, trabajando de este modo en la zona de LAG. Para ello disminuimos el volumen de Pyr utilizado en 20 veces, en relación a las reacciones asistidas por microondas. Como planteamos previamente, dado que los cloruros de ácidos y anhídridos son altamente reactivos, decidimos llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente, dado que estaríamos en una zona energética donde la reacción puede tener lugar, aunque quizás parcialmente, como demostramos para la síntesis de derivados oleilados de SGs (**Tabla 3.20**, Entrada 8).

Las reacciones fueron llevadas a cabo en viales de vidrio de 20 ml, empleando esferas de vidrio de 3 mm de diámetro y un agitador orbital analógico IKA VXR basic Vibrax®. Previamente, homogeneizamos el tamaño de partícula tanto de la sacarosa como de los SGs a tamaños menores a $100 \text{ }\mu\text{m}$ para asegurar reproducibilidad en las reacciones. Se trató el material de partida con la base correspondiente durante 3 min con agitación constante, para

luego agregarse el agente acilante y dejar reaccionar por el tiempo estipulado. (**Tabla 3.21**) Comenzamos nuestros estudios evaluando la peracetilación de los sustratos de partida, basándonos en las mejores transformaciones exhibidas en las reacciones asistidas por microondas (**Tabla 3.20**, Entradas 9-13), en comparación con el uso de cloruros de ácido. En todas las condiciones ensayadas se empleó un 10%mol en exceso para cada centro reactivo de los sustratos. Para la peracilación de sacarosa encontramos rendimientos aceptables bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, contrario a nuestra experiencia, el uso de DMAP mostró un menor rendimiento que sin este aditivo (**Tabla 3.21**, Entradas 1 y 2).

Tabla 3.21. Condiciones de reacción para la peracilación de SGs y sacarosa asistida por energía mecánica.

Entrada	Sustrato	mmol	Agente acilante	Equiv.	N° Esferas	t (min)	DMAP cat.	Rend. (%)*
1	Sacarosa	0,13	Ac ₂ O	8,8	45	60	NO	70
2	Sacarosa	0,13	Ac ₂ O	8,8	45	60	SI	55
3	SGs	0,26	Ac ₂ O	4,4	45	60	NO	69
4	SGs	0,26	Ac ₂ O	4,4	45	60	SI	48
5	SGs	0,26	Ac ₂ O	4,4	0	240	NO	28
6	Sacarosa	0,13	Oleil-Cl	8,8	45	60	SI	33
7	Sacarosa	0,13	Oleil-Cl	12	45	60	SI	61
8	Sacarosa	0,13	Oleil-Cl	12	45	60	NO	27
9	SGs	0,26	Oleil-Cl	4,4	45	60	NO	41
10	SGs	0,26	Oleil-Cl	4,4	45	60	SI	53
11	SGs	0,26	Oleil-Cl	4,4	45	60	4,4 eq.	20
12	SGs	0,26	Oleil-Cl	4,4	0	60	NO	33

*Calculado en base a la masa recuperada de productos peracilados aislados cromatográficamente

El mismo efecto fue observado en la peracetilación de SGs. Tras alcanzar rendimientos cercanos al 70% en ausencia de catalizador, vimos que el agregado de DMAP disminuyó el rendimiento de la reacción en un 15% (**Tabla 3.21**, Entradas 3 y 4). Luego procedimos a evaluar la formación de los derivados de oleilo. En este caso, comenzamos las reacciones de sacarosa empleando un 10%mol en exceso de cloruro de oleilo por cada centro acilable sin mejorar los resultados (**Tabla 3.21**, Entrada 6). Sin embargo, aumentando el exceso hasta un 50% para cada centro observamos una mejora notable en los resultados (**Tabla 3.21**, Entrada 7). Previendo un comportamiento similar en la formación del producto de peracilación, ensayamos una condición sin DMAP, para determinar la influencia de este catalizador. Contrariamente a lo observado previamente, eliminando el DMAP de la reacción empeora el rendimiento de peracilación, aun trabajando con mayores excesos de agente

acilante. (**Tabla 3.21**, Entrada 8). De forma similar, la presencia de DMAP mejora el rendimiento de la reacción en cantidades catalíticas para la síntesis de SGs logrando superar el 50% (**Tabla 3.21**, Entradas 9 y 10). De hecho, evaluamos una condición con 4,4 eq de cloruro de oleilo y 4,4 eq DMAP para activar todos los cloruros de ácido buscando facilitar la transferencia del grupo acilo. Desafortunadamente, se obtuvo un rendimiento de apenas 20% (**Tabla 3.21**, Entrada 11). Alternativamente ensayamos la reacción de peracilación con ambos agentes acilantes sobre SGs, en ausencia de esferas, aunque sometiendo el vial a agitación orbital (**Tabla 3.21**, Entradas 5 y 12). Como puede verse, el avance de la reacción es pobre, aunque notorio. Este hecho puede ocurrir gracias a que existe transferencia de masa debido a la agitación orbital, pero la ausencia de esferas generaría una baja en el rendimiento encontrado dado que no existe la asistencia mecánica en la reacción. Este efecto es más notorio en la reacción de acetilación donde la ausencia de esferas genera una disminución del 50% en el rendimiento, en comparación con la condición con esferas y sin DMAP (**Tabla 3.21**, Entrada 1).

En las transformaciones antes descritas, todo el material de partida fue consumido, aunque se obtienen productos con menor grado de acilación junto a los derivados peracilados. Tales subproductos pueden recuperarse para luego ser tratados en una nueva etapa de acilación, aumentando la eficiencia del proceso. A pesar de usar 8 y 4,4 equivalentes de agente acilante por cada mmol de SGs, es decir un exceso de 100 mol% y 10 mol% de cloruro de acilo por centro reactivo de SGs en condiciones de microondas o mecanoquímicas, respectivamente, no se logra una peracilación de forma completa. Siendo la reacción desarrollada es una acilación secuencial de los distintos alcoholes del azúcar, es probable que esta pueda verse impedida en su avance por motivos estéricos. La acilación comienza por el alcohol primario del resto glucídico, dado que es el más reactivo, para luego continuar hacia los secundarios; de este modo una posible razón por la cual no se logra un avance completo de la reacción reside en el último paso de acilación, es decir el ataque nucleofílico del hidroxilo secundario del derivado triacilado de SGs. El gran impedimento estérico proveniente de la presencia de voluminosas colas alifáticas de dichos derivados, lo que disminuirían la reactividad de los centros nucleofílicos aún sin acilar, incluso a pesar de la alta temperatura empleada en los ensayos de microondas. A pesar de que en condiciones mecanoquímicas se alcanza solo un 50% de rendimiento en las condiciones empleadas, estos resultados son alentadores para avanzar en el mejoramiento de la técnica, pudiendo migrar hacia el uso de otros tipos de molinos que permitan entregar mayores cantidades de energía a la reacción, ayudando a completar el avance de la misma.²⁰⁸

Exploramos algunas condiciones para la esterificación de los productos con resultados positivos, en los que fuimos capaces de obtener derivados de SGs con posibles aplicaciones

como sustitutos de grasas. Ambas estrategias cursaron con rendimientos aceptables y con la posibilidad de recuperar productos de subacilación, minimizando la generación de residuos. El análisis comparativo de los métodos, mostró que es factible disminuir el uso de Pyr en 20 veces, al tiempo que eliminamos el uso de altas temperaturas para lograr la transformación. Así queda demostrado el potencial de las transformaciones mecanoquímicas para la síntesis de este tipo de productos de peracilación.

Dado que la reacción no ha sido optimizada de forma metodológica, una de las posibles continuaciones de la misma sería optimizar la peracilación de SGs utilizando herramientas estadísticas para determinar tales condiciones óptimas. En otras palabras, realizar un diseño experimental enfocado en maximizar el rendimiento de peracilación.¹⁴⁷

Una vez optimizado el proceso, nuestro interés radicaría en escalar la reacción para obtener decenas de gramos en vistas de una posible industrialización del proceso. No obstante, este escalado quedaría sensiblemente atado a las evaluaciones biológicas de los derivados peracilados, ya que no tendría sentido proseguir en esta línea de investigación si éstos presentan toxicidad.

3.3.4 Ensayos de digeribilidad y viabilidad celular de PASGs

De modo análogo a los ensayos desarrollados para SGs evaluamos la resistencia a la hidrólisis de PASGs en condiciones químicas similares a la estomacal (bajos pHs), así como hidrólisis en presencia de una lipasa pancreática en condiciones intestinales.⁹² Para ello tomamos 25 mg de cada uno de los 4 derivados preparados y se los puso en contacto con fluido estomacal a diferentes pHs (1,3,5 y 8) bajo agitación orbital a 37°C durante 2 h. Seguidamente, se extrajeron los derivados de SGs y se evaluó la presencia de productos por TLC, donde no se observó aparición de productos (**Figura S40**). Por tanto, podemos asegurar que los PASGs serían capaces de soportar el ácido estomacal sin sufrir modificaciones.

Seguidamente ensayamos la etapa intestinal de digestión de los cuatro derivados,⁹² empleando las mismas condiciones que las usadas para SGs, pero de forma individual, es decir, sin estar precedida por las etapas oral y estomacal. Del mismo modo que en el ensayo de pH, luego de ser tratados, los productos fueron recuperados y ensayados por TLC, donde no observamos formación de productos de hidrólisis (**Figura S41**). Así, podemos concluir que los PASGs atravesarían el tracto digestivo sin sufrir modificaciones. De este modo los PASGs cumplen con una de las condiciones para ser un sustituto de grasas no calórico, *i. e.*, ser resistente a las condiciones de digestión.

La segunda condición, *i. e.*, la incapacidad de ingresar al organismo, debe ser aún evaluada ya sea por modelos *in vitro* (mediciones experimentales de Log P, ensayo paralelo de permeabilidad de membrana artificial (PAMPA, del inglés *Parallel Artificial Membrane*

Permeability Assay)), o en animales modelo para determinar tanto el impacto del consumo de los mismos, como la modificación metabólica que puedan sufrir. Sin embargo, podemos prever un comportamiento de alta lipofilidad, y por ende de baja permeación intestinal. Las reglas de Lipinski, apodadas “Las reglas de 5”, son un conjunto de límites numéricos en propiedades fisicoquímicas específicas, entre ellas el logaritmo del coeficiente de partición o Log P, que constituyen una guía para orientarnos en la posibilidad de que una molécula sea absorbida tras su administración oral. El Log P es una medida cuantitativa de la lipofilidad de una molécula, constituida por la relación de concentraciones que muestra una sustancia entre dos fases inmiscibles. Existen métodos *in silico* que permiten calcular el Log P de una sustancia, particularmente se suele calcular el denominado Log P_{ow} , es decir el Log P que mostraría una sustancia en un sistema conformado por octanol y agua. Se considera como valores óptimos de Log P el rango 0-5 para lograr penetración intestinal. Existen moléculas que presentan valores extremos de Log P y que sin embargo son absorbidos, como el colesterol. Esto puede deberse a la existencia de otros mecanismos de absorción, como ser enzimas específicas, transportadores, o procesos supramoleculares como la formación de quilomicrones, etc. Si bien no podemos fiarnos de un Log P calculado (cLogP) para determinar la factibilidad de la absorción intestinal, podemos predecir el valor aproximado de Log P de SGs, así como de los compuestos derivados e inferir un comportamiento posible. La molécula base, es decir los SGs, presentan un cLog P de 6,07 según la plataforma de predicción de MarvinSketch.²¹¹ De este modo considerando la alta lipofilidad, sumado al gran tamaño molecular y baja solubilidad de los SGs, podríamos esperar una baja o nula absorción intestinal a menos que exista algún transportador específico que cause su ingreso sistémico. A partir de la peracilación de los mismos se ve un aumento considerable de los valores de cLog P de los productos en relación a los acilos de que derivan. En el caso del derivado de acetilo (cLog P=7,84), muestra un aumento de lipofilidad de casi 2 unidades. Los derivados de laurilo, palmitoilo y oleilo, presentan valores de cLog P que superan ampliamente la decena (cLog P=26,64; 33,76; 35,87; respectivamente), por lo cual no esperaríamos que puedan ser incorporado a menos que exista o bien hidrólisis de los ésteres o un mecanismo de transporte específico que cause su ingreso. De forma comparable al derivado de oleilo de SGs, el cLog P del octaoleilato de sacarosa (análogo de Olestra) es de 48,83.

En el improbable caso en que los PASGs ingresaran a la luz intestinal, éstos serían transportados por vía sanguínea hacia el hígado, donde serían recibidos por hepatocitos. De este modo, evaluamos la toxicidad de los compuestos en la línea hepática modelo Huh7. Así, buscamos evaluar el impacto de los posibles sustitutos de grasas tras una eventual

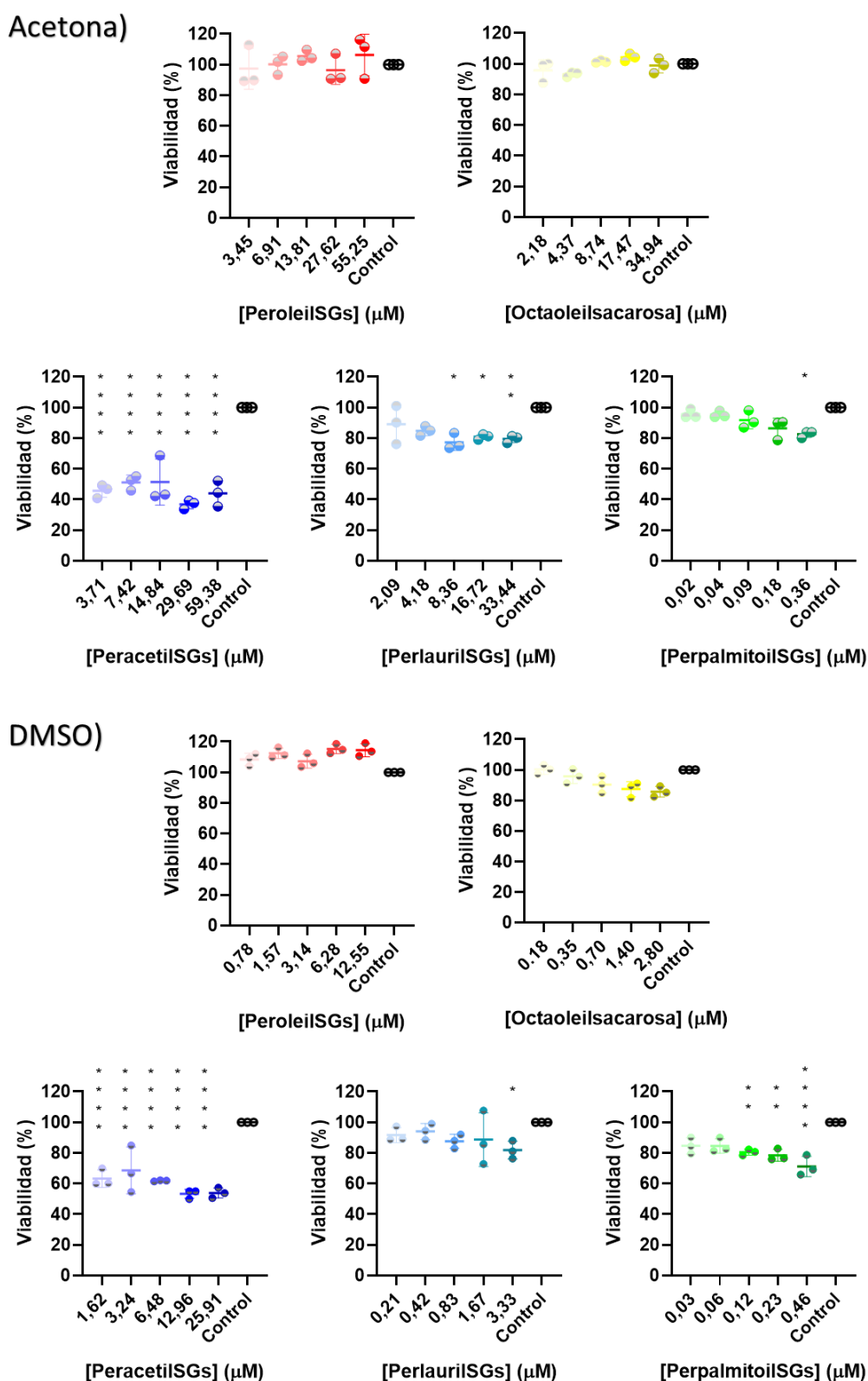
incorporación metabólica. Para ello empleamos las mismas condiciones ensayadas para los SGs mediante ensayos de MTT.

Comenzamos evaluando la solubilidad de los productos tetraesterificados en acetona y DMSO, mediante el método de agregados consecutivos de solvente hasta disolución total (**Tabla 3.22**). Ensayamos también el derivado octaoleilado de sacarosa como molécula modelo en reemplazo del Olestra®. Puede verse que el derivado de acetilo presenta la mayor concentración en ambos vehículos, seguido del derivado de oleilo. En ambos casos el derivado de laurilo mostró un comportamiento similar a la molécula modelo, la octaoleilsacarosa. Casi todos los compuestos, a excepción del derivado de palmitoilo fueron más solubles en acetona que en DMSO, lográndose soluciones de 3,34-5,94 mM.

Tabla 3.22. Concentración de las soluciones de PASGs preparadas en acetona y DMSO mediante agregados sucesivos de volúmenes conocidos

Compuesto	Solvente:	acetona		DMSO	
	PM (g/mol)	mM	ppm	mM	ppm
<i>tetraacetil-SGs</i>	741	5,938	4400	2,591	1920
<i>tetralauril-SGs</i>	1301	3,344	4350	0,333	433
<i>tetrapalmitil-SGs</i>	1525	0,036	54	0,046	71
<i>tetraoleil-SGs</i>	1629	5,525	9000	1,255	2044
<i>octaoleilsacarosa</i>	2261	3,494	7900	0,280	633

De modo similar al ensayo para SGs, se evaluó la sensibilidad a los PASGs de células Huh7, como modelo hepático ante una eventual permeación tras la ingesta de dichos compuestos. Se evaluaron diluciones al centésimo de las soluciones madres de PASGs obteniéndose resultados poco claros. Como puede observarse en la **Figura 3.39** los derivados de acetilo mostraron una disminución considerable de la viabilidad celular en ambos vehículos. Contrariamente a lo esperado, la disminución es constante para todas las concentraciones ensayadas. Este hecho podría indicar que la porción del compuesto que logra estar biodisponible causaría la disminución observada, siendo independiente del aumento en la concentración ensayada. En cambio, los derivados de AGs saturados mostraron una disminución significativa respecto del control ($p < 0,05$) sólo en las concentraciones más altas. Los perpalmitoilSGs mostraron disminuir la viabilidad en el mismo orden que los derivados de laurilo (~80% de viabilidad), aunque a concentraciones 10 veces menores. Sin embargo, no conocemos las concentraciones efectivas que se logran durante el ensayo y por tanto las conclusiones son parciales. Para nuestra satisfacción, los derivados de oleilo de SGs y sacarosa no mostraron disminución significativa de la viabilidad respecto del control.



Siendo que la molécula modelo (octaoleilsacarosa, Olestra[®]) mostró ser no tóxica frente a las células ensayadas, estos resultados nos animan a profundizar los ensayos de los sustitutos de grasas no calóricos propuestos. Más aún, las bajas concentraciones logradas en solventes orgánicos nos permiten intuir que su solubilidad en agua será extremadamente baja, i.e. prácticamente insolubles según Farmacopea, del mismo modo que Olestra[®].²¹² Como punto de comparación Olestra[®] fue empleado en distintos ensayos *in vitro* en concentraciones del orden que las empleadas en nuestro ensayo.²¹³ De este modo a menos que los sustitutos de grasas sean degradados enzimáticamente, esperamos que sean incapaces de atravesar membranas por su baja solubilidad y alta lipofilicidad. Entonces, a pesar de haber encontrado una disminución significativa de la viabilidad celular para los derivados de laurilo y palmitoilo, proponemos continuar con los ensayos de toxicidad, junto a los derivados de oleilo, en modelos animales. Por otro lado, desde el punto de vista físico, los derivados saturados de cadena larga suelen ser sólidos amorfos/cerosos, mientras que el derivado de oleilo presenta cierta fluidez a temperatura ambiente. Por lo tanto, sería deseable evaluar sus propiedades de forma aislada, así como en mezclas, para lograr distintas consistencias una vez formulados como alimentos.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis, tanto química como enzimática, y los ensayos recién expuestos, validan de forma preliminar el potencial de los PASGs como sustitutos de grasas no calórico. Para continuar, buscaremos profundizar los estudios de toxicidad de los PeroleilSGs, PerpalmítoilSGs y PerlaurilSGs dados los resultados prometedores encontrados en nuestros estudios preliminares *in vitro*, tanto de digeribilidad como de toxicidad.



4. Conclusiones y estudios futuros

Frente a la problemática de los productos insolubles encontrados en los tanques de almacenamiento de BD, hemos visto la posibilidad de aprovechar este desecho buscando obtener productos de alto valor agregado. Empleando una estrategia de economía circular, desarrollada a partir de experiencias previas, fuimos capaces de recuperar esterilglucósidos mediante un proceso robusto y eficiente. Al mismo tiempo logramos recuperar el BD que formaba parte de los depósitos insolubles de partida, junto a los solventes empleados en el proceso de purificación.

Tras desarrollar un método de determinación de pureza de los esterilglucósidos aislados, probamos el elevado título del producto obtenido. Para ello desarrollamos un método de resonancia magnética cuantitativo usando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno. La medición de pureza arrojó valores superiores al 99% para los esterilglucósidos obtenidos.

A su vez, evaluamos la toxicidad mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*, demostrando la inocuidad de los esterilglucósidos en las condiciones de ensayo. Este hecho posiciona a los esterilglucósidos como un candidato de interés para desarrollos posteriores de este producto como nutracéutico.

En busca de obtener productos de alto valor agregado a partir de los SGs desarrollamos dos estrategias circulares empleando diferentes ácidos para la obtención de fitosteroles de alta pureza. Tales métodos fueron escalados desde mg a gramos, mostrando excelentes rendimientos y purezas, al tiempo que fue posible reciclar el medio de reacción y emplearlo en múltiples ciclos de hidrólisis. Dado el prometedor perfil de la reacción, tanto en términos prácticos como ambientales, resta escalar el proceso hasta alcanzar la escala piloto, para luego proyectarse hacia una eventual aplicación industrial.

Consecutivamente llevamos a cabo el aprovechamiento del estigmasterol de la mezcla para la obtención de moléculas de interés sintético. Buscamos obtener el derivado 22-aldehído-*i*-ME. Luego de evaluar condiciones de protección del doble enlace endocíclico de los fitostesteroles, se procedió a ozonizar la mezcla para dar con el producto buscado con buenos rendimientos. Al mismo tiempo, logramos recuperar el β -sitosterol y el campesterol de la mezcla, los cuales podrían posteriormente obtenerse de forma individual mediante técnicas cromatográficas, cristalizaciones fraccionadas, entre otras. De este modo, desarrollamos un segundo paso de aprovechamiento de la mezcla cruda de fitosteroles obtenida.

Finalmente diseñamos y sintetizamos tres derivados de ácidos grasos y esterilglucósidos, inspirados en la estructura de Olestra®, un sustituto de grasas no calórico.

Tras obtener los productos mediante calentamiento por microondas, procedimos a ensayar técnicas de síntesis mecanoquímicas con buenos resultados. Resta aún llevar a cabo los ensayos de digeribilidad correspondientes para evaluar el perfil de sustituto de grasas no calórico *in vivo*. Además, se buscará desarrollar sondas que permitan dilucidar el destino metabólico de los posibles sustitutos de grasas durante su paso en el tracto digestivo.

A partir del cuerpo de resultados de este trabajo de tesis podemos asegurar que los esterilglucósidos obtenidos de fondos de tanques de BD de soja, representan un producto de utilidad en sí mismo, al tiempo que constituyen una plataforma para la obtención de moléculas de interés como ser fitosteroles, así como posibles sustitutos de grasas no calóricos.

5. Referencias

Nota: Se agregó el DOI o el vínculo web de cada referencia como hipervínculo sobre el texto de la misma, para facilitar su acceso

- (1) Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. *¿Qué es el cambio climático?* (accedido 06/07/2023)
- (2) Islam, A.; Malek, A.; Teo, S. H.; Marwani, H. M.; Rahman, M. M.; Asiri, A. M.; Khan, M. A. R.; Taufiq-Yap, Y. H.; Awual, Md. R. Smart Materials for CO₂ Conversion into Renewable Fuels and Emission Reduction. *Sustain. Mater. Technol.* **2023**, 37, e00636.
- (3) United Nations. *The Paris Agreement*. (accedido 06/07/2023)
- (4) O'Riordan, T. COP 26 and Sustainability Science. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*. **2022**, 64 (1), 2–3.
- (5) Intergovernmental Panel on Climate Change. *Global Warming of 1.5°C*. (accedido 06/07/2023)
- (6) Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. *Memoria Técnica Registro Nacional de Proyectos de Mitigación del Cambio Climático* (RENAMI). **2023**.
- (7) Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. *Contribución Determinada a Nivel Nacional*. (accedido 06/07/2023)
- (8) Conference of the Parties 26. (accedido 06/07/2023)
- (9) Conference of the Parties 27. *Global Methane Pledge: From Moment to Momentum*. COP 27 Fact Sheet. (accedido 06/07/2023)
- (10) Balcombe, P.; Anderson, K.; Speirs, J.; Brandon, N.; Hawkes, A. The Natural Gas Supply Chain: The Importance of Methane and Carbon Dioxide Emissions. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, 5 (1), 3–20.
- (11) Caligari, R. Ministerio de Energía. *¿Qué es la energía?* (accedido 06/07/2023)
- (12) Naqvi, B.; Rizvi, S. K. A.; Mirza, N.; Umar, M. Financial Market Development: A Potentiating Policy Choice for the Green Transition in G7 Economies. *Int. Rev. Financ. Anal.* **2023**, 87, 102577.
- (13) Yang, M.; Chen, L.; Wang, J.; Msigwa, G.; Osman, A. I.; Fawzy, S.; Rooney, D. W.; Yap, P.-S. Circular Economy Strategies for Combating Climate Change and Other Environmental Issues. *Environ. Chem. Lett.* **2023**, 21 (1), 55–80.
- (14) Agard, J.; Alcamo, J.; Biermann, F.; Colls, A.; Falkenmark, M.; Folke, C.; Glantz, M. H.; Gordon, C.; Goverse, T.; Gramberger, M.; Harding, R.; Krug, T.; Leemans, R.; Sunday A. Leonard; Nishioka, S.; Oladele Osibanjo; Peduzzi, P.; Pratt, C.; Sánchez-Rodríguez, R.; Scholes, M.; Priyadarshi R. Shukla; Ashbindu Singh; Srivastava, L.; Stocking, M. A.; Vogel, C.; Xia, J.; Young, O. R.; Linxiu Zhang. UNEP, 2012. 21 Issues for the 21st Century: Result of the UNEP Foresight Process on Emerging Environmental Issues. Alcamo, J., Leonard, S.A. (Eds.). United Nations Environment Programme (UNEP), Nairobi, Kenya, 56pp. **2012**.
- (15) Elkington, J. Towards the Sustainable Corporation: Win-Win-Win Business Strategies for Sustainable Development. *Calif. Manage. Rev.* **1994**, 36 (2), 90–100.

- (16) Cassen, R.H. Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. *Oxford University Press of the World Commission on Environment and Development*. **1987**.
- (17) Purvis, B.; Mao, Y.; Robinson, D. Three Pillars of Sustainability: In Search of Conceptual Origins. *Sustain. Sci.* **2019**, *14* (3), 681–695.
- (18) Harrington, L. M. B. Sustainability Theory and Conceptual Considerations: A Review of Key Ideas for Sustainability, and the Rural Context. *Pap. Appl. Geogr.* **2016**, *2* (4), 365–382.
- (19) Sheldon, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (1), 32–48.
- (20) Loiseau, E.; Saikku, L.; Antikainen, R.; Droste, N.; Hansjürgens, B.; Pitkänen, K.; Leskinen, P.; Kuikman, P.; Thomsen, M. Green Economy and Related Concepts: An Overview. *J. Clean. Prod.* **2016**, *139*, 361–371.
- (21) Brand, U. Green Economy – the Next Oxymoron? No Lessons Learned from Failures of Implementing Sustainable Development. *GAIA - Ecol. Perspect. Sci. Soc.* **2012**, *21* (1), 28–32.
- (22) Abid, N.; Ikram, M.; Wu, J.; Ferasso, M. Towards Environmental Sustainability: Exploring the Nexus among ISO 14001, Governance Indicators and Green Economy in Pakistan. *Sustain. Prod. Consum.* **2021**, *27*, 653–666.
- (23) Clark, J. H.; Farmer, T. J.; Herrero-Davila, L.; Sherwood, J. Circular Economy Design Considerations for Research and Process Development in the Chemical Sciences. *Green Chem.* **2016**, *18* (14), 3914–3934.
- (24) Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (9), 686–694.
- (25) Silvestri, C.; Silvestri, L.; Forcina, A.; Di Bona, G.; Falcone, D. Green Chemistry Contribution towards More Equitable Global Sustainability and Greater Circular Economy: A Systematic Literature Review. *J. Clean. Prod.* **2021**, *294*, 126137.
- (26) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, **1998**.
- (27) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 301–312.
- (28) Mercer, S. M.; Andraos, J.; Jessop, P. G. Choosing the Greenest Synthesis: A Multivariate Metric Green Chemistry Exercise. *J. Chem. Educ.* **2012**, *89* (2), 215–220.
- (29) Jessop, P. G. Searching for Green Solvents. *Green Chem.* **2011**, *13* (6), 1391.
- (30) Chen, T.-L.; Kim, H.; Pan, S.-Y.; Tseng, P.-C.; Lin, Y.-P.; Chiang, P.-C. Implementation of Green Chemistry Principles in Circular Economy System towards Sustainable Development Goals: Challenges and Perspectives. *Sci. Total Environ.* **2020**, *716*, 136998.
- (31) Sheldon, R. A. The Role of Catalysis in Waste Minimization. In *Precision Process Technology: Perspectives for Pollution Prevention*; Weijnen, M. P. C., Drinkenburg, A. A. H., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht. **1993**; pp 125–138.
- (32) Trost, B. The Atom Economy—A Search for Synthetic Efficiency. *Science*. **1991**, *254* (5037), 1471–1477.

- (33) Keijer, T.; Bakker, V.; Slootweg, J. C. Circular Chemistry to Enable a Circular Economy. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (3), 190–195.
- (34) Dull, D. Supplying the Circular Economy: Seven Concepts for Partnership. *J. Supply Chain Manag. Logist. Procure.* **2021**, *3* (3), 226–238.
- (35) Lansink, A. Challenging Changes – Connecting Waste Hierarchy and Circular Economy. *Waste Manag. Res. J. Sustain. Circ. Econ.* **2018**, *36* (10), 872.
- (36) Ubando, A. T.; Felix, C. B.; Chen, W.-H. Biorefineries in Circular Bioeconomy: A Comprehensive Review. *Bioresour. Technol.* **2020**, *299*, 122585.
- (37) Cherubini, F.; Jungmeier, G.; Mandl, M.; Philips, C.; Wellisch, M.; Jrgensen, H.; Skiadas, I.; Boniface, L.; Dohy, M.; Pouet, J.-C. IEA Bioenergy Task 42 on Biorefineries: Co-Production of Fuels, Chemicals, Power and Materials from Biomass; IEA Bioenergy Copenhagen, Denmark. **2007**; pp 1–37.
- (38) Cherubini, F.; Jungmeier, G.; Wellisch, M.; Willke, T.; Skiadas, I.; Van Ree, R.; de Jong, E. Toward a Common Classification Approach for Biorefinery Systems. *Biofuels Bioprod. Biorefining.* **2009**, *3* (5), 534–546.
- (39) Bolsa de Comercio de Rosario. *Fotografía del mercado mundial y local del aceite de soja*. Bolsa de Comercio de Rosario. (accedido 10/08/2023)
- (40) Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. *Estrategia a largo plazo a 2050*. (accedido 10/08/2023)
- (41) Ministerio de Tecnologías de la Información y Comunicación, Agencia de información Paraguaya. *Empresarios del biodiesel esperan que la mezcla se incremente hasta el 10%*. (accedido 10/08/2023)
- (42) Sahoo, G.; Wani, A. M.; Swamy, S. L.; Sharma, A. Environmental Impact and Economic Benefits of Biofuel Production. In *Bio-Clean Energy Technologies: Volume 1*; Chowdhary, P., Khanna, N., Pandit, S., Kumar, R., Eds.; Clean Energy Production Technologies; Springer Nature: Singapore. **2022**; pp 349–378.
- (43) Bolsa de Comercio de Rosario. *Estimaciones*. (accedido 11/08/2023)
- (44) Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. *Biodiesel*. (accedido 11/08/2023)
- (45) Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. *La Argentina posee la industria de biodiésel más moderna del mundo*. (accedido 11/08/2023)
- (46) Panichelli, L.; Dauriat, A.; Gnansounou, E. Life Cycle Assessment of Soybean-Based Biodiesel in Argentina for Export. *Int. J. Life Cycle Assess.* **2009**, *14* (2), 144–159.
- (47) Manrique, S. M.; Salvo, A. W.; Villafañe, F.; Martín, J. N.; Honorato, M. O. *Panorama de Tecnologías de bioenergía en Argentina*; Red Iberoamericana de Tecnologías de Biomasa y Bioenergía Rural, **2020**.
- (48) Ciani, M. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. *Informe Biocombustibles Agosto 2019*. (accedido 11/08/2023)
- (49) Bolsa de Comercio de Rosario. *Desafíos y perspectivas para los biocombustibles en el 2023*. (accedido 11/08/2023)
- (50) UnitecBIO. (accedido 11/08/2023)
- (51) Cabrera, R.; Pruzzo, P.; Andrusko, N.; Hourcade, M.; Labadie, G. R. Identificación, cuantificación y determinación de la variabilidad en el tiempo de los componentes

- insolubles del biodiesel de soja que se comercializa en Argentina. *A&G (ASAGA)*. **2010**, 4 (XX), 612–617.
- (52) Shimamura, M. Structure, Metabolism and Biological Functions of Steryl Glycosides in Mammals. *Biochem. J.* **2020**, 477 (21), 4243–4261.
- (53) McNaught, A. D.; Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*; Blackwell Science Oxford. **1997**. Vol. 1669.
- (54) Bartnik, M.; Facey, P. Chapter 7 - Glycosides. In *Pharmacognosy (Second Edition)*; McCreath, S. B., Clement, Y. N., Eds.; Academic Press, **2024**; pp 103–165.
- (55) Kytidou, K.; Artola, M.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. Plant Glycosides and Glycosidases: A Treasure-Trove for Therapeutics. *Front. Plant Sci.* **2020**, 11, 357.
- (56) Grille, S.; Zaslowski, A.; Thiele, S.; Plat, J.; Warnecke, D. The Functions of Steryl Glycosides Come to Those Who Wait: Recent Advances in Plants, Fungi, Bacteria and Animals. *Prog. Lipid Res.* **2010**, 49 (3), 262–288.
- (57) Ferrer, A.; Altabella, T.; Arró, M.; Boronat, A. Emerging Roles for Conjugated Sterols in Plants. *Prog. Lipid Res.* **2017**, 67, 27–37.
- (58) Normile, T. G.; McEvoy, K.; Del Poeta, M. Steryl Glycosides in Fungal Pathogenesis: An Understudied Immunomodulatory Adjuvant. *J. Fungi* **2020**, 6 (1), 25.
- (59) Chávez, A.; Castillo, N.; López-Tubau, J. M.; Atanasov, K. E.; Fernández-Crespo, E.; Camañes, G.; Altabella, T.; Ferrer, A. Tomato STEROL GLYCOSYLTRANSFERASE 1 Silencing Unveils a Major Role of Steryl Glycosides in Plant and Fruit Development. *Environ. Exp. Bot.* **2023**, 206, 105181.
- (60) El Omari, N.; Jaouadi, I.; Lahyaoui, M.; Benali, T.; Taha, D.; Bakrim, S.; El Menyiy, N.; El Kamari, F.; Zengin, G.; Bangar, S. P.; Lorenzo, J. M.; Gallo, M.; Montesano, D.; Bouyahya, A. Natural Sources, Pharmacological Properties, and Health Benefits of Daucosterol: Versatility of Actions. *Appl. Sci.* **2022**, 12 (12).
- (61) Du, Y.; Fu, X.; Chu, Y.; Wu, P.; Liu, Y.; Ma, L.; Tian, H.; Zhu, B. Biosynthesis and the Roles of Plant Sterols in Development and Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (4), 2332.
- (62) Breinhölder, P.; Mosca, L.; Lindner, W. Concept of Sequential Analysis of Free and Conjugated Phytosterols in Different Plant Matrices. *J. Chromatogr. B.* **2002**, 777 (1), 67–82.
- (63) Aboobucker, S. I.; Suza, W. P. Why Do Plants Convert Sitosterol to Stigmasterol? *Front. Plant Sci.* **2019**, 10.
- (64) Zingue, S.; Gbaweng Yaya, A. J.; Michel, T.; Ndinteh, D. T.; Rutz, J.; Auberon, F.; Maxeiner, S.; Chun, F. K.-H.; Tchinda, A. T.; Njamien, D.; Blaheta, R. A. Bioguided Identification of Daucosterol, a Compound That Contributes to the Cytotoxicity Effects of *Crateva Adansonii* DC (Capparaceae) to Prostate Cancer Cells. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, 247, 112251.
- (65) Shamprasad, B. R.; Subramani, R.; Subramaniam, S.; Sivasubramanian, A. Environmentally Benign, Ultrasonication Assisted, Sustainable Valorization for Commercially Important Nutraceutical-Daucosterol from the Heartwood of Invasive *Prosopis Juliflora* (Sw.) DC. *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, 29, 100810.
- (66) Ramírez-Serrano, C. E.; Jiménez-Ferrer, E.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Vargas-Villa, G.; Ramírez-Carreto, R. J.; Chavarría, A.; Tortoriello, J.; Pedraza-Alva, G.; Pérez-

- Martínez, L. A Malva Parviflora's Fraction Prevents the Deleterious Effects Resulting from Neuroinflammation. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109349.
- (67) Tateo, M.; Yoshikawa, M.; Takeuchi, H.; Fujii, S.; Mizobuchi, H.; Takeuchi, H. Effects of Sterylglycosides from Soybean on Lipid Indices in the Plasma, Liver, and Feces of Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58* (3), 494–497.
- (68) Bouic, P. J. D.; Etsebeth, S.; Liebenberg, R. W.; Albrecht, C. F.; Pegel, K.; Van Jaarsveld, P. P. Beta-Sitosterol and Beta-Sitosterol Glucoside Stimulate Human Peripheral Blood Lymphocyte Proliferation: Implications for Their Use as an Immunomodulatory Vitamin Combination. *Int. J. Immunopharmacol.* **1996**, *18* (12), 693–700.
- (69) Tabata, R. C.; Wilson, J. M. B.; Ly, P.; Zwiegers, P.; Kwok, D.; Van Kampen, J. M.; Cashman, N.; Shaw, C. A. Chronic Exposure to Dietary Sterol Glucosides Is Neurotoxic to Motor Neurons and Induces an ALS–PDC Phenotype. *NeuroMolecular Med.* **2008**, *10* (1), 24–39.
- (70) Van Kampen, J. M.; Baranowski, D. C.; Robertson, H. A.; Shaw, C. A.; Kay, D. G. The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. *PLoS ONE.* **2015**, *10* (10), e0139694.
- (71) Bigelow, L. J.; Perry, M. A.; Ogilvie, S. L.; Tasker, R. A. Longitudinal Assessment of Behaviour and Associated Bio-Markers Following Chronic Consumption of β -Sitosterol β -D-Glucoside in Rats: A Putative Model of Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 810148.
- (72) Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M. Analysis of Steryl Glucosides in Foods and Dietary Supplements by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography. *J. Food Lipids.* **2005**, *12* (2), 124–140.
- (73) Murai, T.; Jin, S.; Itoh, M.; Horie, Y.; Higashi, T.; Ikegawa, S. Analysis of Steryl Glucosides in Rice Bran-Based Fermented Food by LC/ESI-MS/MS. *Steroids.* **2020**, *158*, 108605.
- (74) Bezerra, K. da S.; Filho, N. R. A. Development of Methods to Quantify Free and Conjugated Steroids in Fatty Matrices by HPLC–MS/MS. *ACS Omega.* **2020**, *5* (21), 12270–12277.
- (75) Carlucci, R.; Jäger, S. N.; Labadie, G. R. Steryl Glucosides Recovered from Biodiesel Tank Deposits Are an Excellent Source of Phytosterols. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *187*, 115307.
- (76) Khabazian, I.; Bains, J. S.; Williams, D. E.; Cheung, J.; Wilson, J. M. B.; Pasqualotto, B. A.; Pelech, S. L.; Andersen, R. J.; Wang, Y.-T.; Liu, L.; Nagai, A.; Kim, S. U.; Craig, U.-K.; Shaw, C. A. Isolation of Various Forms of Sterol β -d-Glucoside from the Seed of *Cycas Circinalis*: Neurotoxicity and Implications for ALS-Parkinsonism Dementia Complex. *J. Neurochem.* **2002**, *82* (3), 516–528.
- (77) Xie, M.; Zhao, H. A Novel Method for Extracting Steryl Glucosides From Soy Lecithin. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, *120* (2), 1700247.
- (78) Moreau, R. A.; Nyström, L.; Whitaker, B. D.; Winkler-Moser, J. K.; Baer, D. J.; Gebauer, S. K.; Hicks, K. B. Phytosterols and Their Derivatives: Structural Diversity, Distribution, Metabolism, Analysis, and Health-Promoting Uses. *Prog. Lipid Res.* **2018**, *70*, 35–61.
- (79) Moreau, R. A.; Scott, K. M.; Haas, M. J. The Identification and Quantification of Steryl Glucosides in Precipitates from Commercial Biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85* (8), 761–770.

- (80) Van Hoed, V.; Zyaykina, N.; De Greyt, W.; Maes, J.; Verhé, R.; Demeestere, K. Identification and Occurrence of Steryl Glucosides in Palm and Soy Biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85* (8), 701–709.
- (81) Selmair, P. L.; Koehler, P. Molecular Structure and Baking Performance of Individual Glycolipid Classes from Lecithins. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (12), 5597–5609.
- (82) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*. **2010**, *29* (9), 2176–2179.
- (83) Ministerio de Economía. *Boletín oficial República Argentina – Ministerio de Economía Secretaría de Energía - Resolución 923/2023*. (accedido 17/12/2023)
- (84) Kang, J.; Che, Y.; Yan, N.; Cao, D. Evaluation System Construction and Factor Impact Analysis of Silica-Gel Adsorption to Extract Phytosterol Glycosides from Soybean Lecithin Powder. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99* (9), 4287–4295.
- (85) Kang, J.; Cao, D. Optimization of the Silica-Gel Adsorption Technique for the Extraction of Phytosterol Glycosides from Soybean Lecithin Powder Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network Models. *J. Food Sci.* **2020**, *85* (7), 1971–1982.
- (86) R. B. Gómez-Coca and María del Carmen Pérez Camino and Wenceslao Moreda. Steryl Glycosides in Foods: An Overview. **2016**.
- (87) Stonik, V. A.; Stonik, I. V. Sterol and Sphingoid Glycoconjugates from Microalgae. *Mar. Drugs*. **2018**, *16* (12), 514.
- (88) Cardeño, F.; Lapuerta, M.; Rios, L.; Agudelo, J. R. Reconsideration of Regulated Contamination Limits to Improve Filterability of Biodiesel and Blends with Diesel Fuels. *Renew. Energy*. **2020**, *159*, 1243–1251.
- (89) Münger, L. H.; Nyström, L. Enzymatic Hydrolysis of Steryl Glycosides for Their Analysis in Foods. *Food Chem.* **2014**, *163*, 202–211.
- (90) Guzman, A. L.; Hoye, T. R. TMS Is Superior to Residual CHCl₃ for Use as the Internal Reference for Routine ¹H NMR Spectra Recorded in CDCl₃. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (2), 905–909.
- (91) Miura, T.; Sugimoto, N.; Bhavaraju, S.; Yamazaki, T.; Nishizaki, Y.; Liu, Y.; Bzhelyansky, A.; Amezcua, C.; Ray, J.; Zailer, E.; Diehl, B.; Gallo, V.; Todisco, S.; Ofuji, K.; Fujita, K.; Higano, T.; Geletneky, C.; Hausler, T.; Singh, N.; Yamamoto, K.; Kato, T.; Sawa, R.; Watanabe, R.; Iwamoto, Y.; Goda, Y. Collaborative Study to Validate Purity Determination by ¹H Quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2020**, *68* (9), 868–878.
- (92) Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Feunteun, S. L.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5* (6), 1113–1124.
- (93) Zdravil, B.; Felix, E.; Hunter, F.; Manners, E. J.; Blackshaw, J.; Corbett, S.; de Veij, M.; Ioannidis, H.; Lopez, D. M.; Mosquera, J. F.; Magarinos, M. P.; Bosc, N.; Arcila, R.; Kizilören, T.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Adasme, M. F.; Monecke, P.; Landrum, G. A.

- Leach, A. R. The ChEMBL Database in 2023: A Drug Discovery Platform Spanning Multiple Bioactivity Data Types and Time Periods. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52 (D1), D1180–D1192.
- (94) del Rayo Camacho, M.; Phillipson, J. D.; Croft, S. L.; Marley, D.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C. Assessment of the Antiprotozoal Activity of Galphimia Glauca and the Isolation of New Nor-Secofriedelanes and Nor-Friedelanes. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65 (10), 1457–1461.
- (95) Bibi, N.; Tanoli, S. Ahmad. K.; Farheen, S.; Afza, N.; Siddiqi, S.; Zhang, Y.; Kazmi, S. U.; Malik, A. In Vitro Antituberculosis Activities of the Constituents Isolated from *Haloxylon Salicornicum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (14), 4173–4176.
- (96) Liu, D.; Kong, G.; Chen, Q. C.; Wang, G.; Li, J.; Xu, Y.; Lin, T.; Tian, Y.; Zhang, X.; Yao, X.; Feng, G.; Lu, Z.; Chen, H. Fatty Acids as Natural Specific Inhibitors of the Proto-Oncogenic Protein Shp2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (22), 6833–6837.
- (97) Carcache-Blanco, E. J.; Kang, Y.-H.; Park, E. J.; Su, B.-N.; Kardono, L. B. S.; Riswan, S.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Constituents of the Stem Bark of *Pongamia Pinnata* with the Potential to Induce Quinone Reductase. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66 (9), 1197–1202.
- (98) Lin, C.-W.; Hwang, T.-L.; Chen, F.-A.; Huang, C.-H.; Hung, H.-Y.; Wu, T.-S. Chemical Constituents of the Rhizomes of *Bletilla Formosana* and Their Potential Anti-Inflammatory Activity. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (8), 1911–1921.
- (99) Nair, J. J.; Wilhelm, A.; Bonnet, S. L.; van Staden, J. Antibacterial Constituents of the Plant Family Amaryllidaceae. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (22), 4943–4951.
- (100) Oh, K.-B.; Mar, W.; Kim, S.; Kim, J.-Y.; Oh, M.-N.; Kim, J.-G.; Shin, D.; Sim, C. J.; Shin, J. Bis(Indole) Alkaloids as Sortase A Inhibitors from the Sponge *Spongosorites* Sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15 (22), 4927–4931.
- (101) Kim, S.-H.; Shin, D.-S.; Oh, M.-N.; Chung, S.-C.; Lee, J.-S.; Chang, I.-M.; Oh, K.-B. Inhibition of Sortase, a Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase, by β -Sitosterol-3-O-Glucopyranoside from *Fritillaria Verticillata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67 (11), 2477–2479.
- (102) Chan, H.-H.; Hwang, T.-L.; Reddy, M. V. B.; Li, D.-T.; Qian, K.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H.; Wu, T.-S. Bioactive Constituents from the Roots of *Panax Japonicus* Var. Major and Development of a LC-MS/MS Method for Distinguishing between Natural and Artificial Compounds. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74 (4), 796–802.
- (103) Kiem, P. V.; Cuong, N. X.; Nhiem, N. X.; Thu, V. K.; Ban, N. K.; Minh, C. V.; Tai, B. H.; Hai, T. N.; Lee, S. H.; Jang, H. D.; Kim, Y. H. Antioxidant Activity of a New C-Glycosylflavone from the Leaves of *Ficus Microcarpa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (2), 633–637.
- (104) Kishore, N.; Kumar, P.; Shanker, K.; Verma, A. K. Human Disorders Associated with Inflammation and the Evolving Role of Natural Products to Overcome. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 179, 272–309.
- (105) Tewtrakul, S.; Tansakul, P.; Daengrot, C.; Ponglimanont, C.; Karalai, C. Anti-Inflammatory Principles from *Heritiera Littoralis* Bark. *Phytomedicine* **2010**, 17 (11), 851–855.
- (106) Su, B.-N.; Pawlus, A. D.; Jung, H.-A.; Keller, W. J.; McLaughlin, J. L.; Kinghorn, A. D. Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda Citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68 (4), 592–595.

- (107) Ha, D. T.; Tuan, D. T.; Thu, N. B.; Nhiem, N. X.; Ngoc, T. M.; Yim, N.; Bae, K. Palbinone and Triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia Suffruticosa*, Paeoniaceae) Stimulate Glucose Uptake and Glycogen Synthesis via Activation of AMPK in Insulin-Resistant Human HepG2 Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (19), 5556–5559.
- (108) Ratnayake, S.; Fang, X.; Anderson, J. E.; McLaughlin, J. L.; Evert, D. R. Bioactive Constituents from the Twigs of *Asimina Parviflora*. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55 (10), 1462–1467.
- (109) Diaz, F.; Chai, H.-B.; Mi, Q.; Su, B.-N.; Vigo, J. S.; Graham, J. G.; Cabieses, F.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D. Anthrone and Oxanthrone C-Glycosides from *Picramnia Latifolia* Collected in Peru. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (3), 352–356.
- (110) Ali, M. S.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Banskota, A. H.; Kadota, S. Six New Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia Blepharocalyx*. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64 (3), 289–293.
- (111) Liu, S.-Q.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Scheld, H. W. Additional Biologically Active Constituents of the Chinese Tallow Tree (*Sapium Sebiferum*). *J. Nat. Prod.* **1988**, 51 (3), 619–620.
- (112) Yen, C.-T.; Lee, C.-L.; Chang, F.-R.; Hwang, T.-L.; Yen, H.-F.; Chen, C.-J.; Chen, S.-L.; Wu, Y.-C. Indiosides G–K: Steroidal Glycosides with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities from *Solanum Violaceum*. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75 (4), 636–643.
- (113) Li, X.; Zhao, C.; Jing, S.; Sun, J.; Li, X.; Man, S.; Wang, Y.; Gao, W. Novel Phenanthrene and Isocoumarin from the Rhizomes of *Dioscorea Nipponica* Makino Subsp. *Rosthornii* (Prain et Burkill) C. T. Ting (Dioscoreaceae). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (15), 3595–3601.
- (114) Lin, P.; Li, S.; Wang, S.; Yang, Y.; Shi, J. A Nitrogen-Containing 3-Alkyl-1,4-Benzoquinone and a Gomphilactone Derivative from *Embelia Ribes*. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69 (11), 1629–1632.
- (115) Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. Ricinine: A Pyridone Alkaloid from *Ricinus Communis* That Activates the Wnt Signaling Pathway through Casein Kinase 1 α . *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (17), 4597–4601.
- (116) Zhang, T.-T.; Liu, Y.-J.; Yang, L.; Jiang, J.-G.; Zhao, J.-W.; Zhu, W. Extraction of Antioxidant and Antiproliferative Ingredients from Fruits of *Rubus Chingii* Hu by Active Tracking Guidance. *MedChemComm* **2017**, 8 (8), 1673–1680.
- (117) Li, J.; Ding, Y.; Li, X.-C.; Ferreira, D.; Khan, S.; Smillie, T.; Khan, I. A. Scuteflorins A and B, Dihydropyranocoumarins from *Scutellaria Lateriflora*. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72 (6), 983–987.
- (118) Ding, Y.; Liang, C.; Kim, J. H.; Lee, Y.-M.; Hyun, J.-H.; Kang, H.-K.; Kim, J.-A.; Min, B. S.; Kim, Y. H. Triterpene Compounds Isolated from *Acer Mandshuricum* and Their Anti-Inflammatory Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (5), 1528–1531.
- (119) Gunasekera, S. P.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. Constituents of *Nealchornea Yapurenis* (Euphorbiaceae). *J. Nat. Prod.* **1980**, 43 (2), 285–287.
- (120) Al-Haidari, R. A.; Al-Oqail, M. M. New Benzoic Acid Derivatives from *Cassia Italica* Growing in Saudi Arabia and Their Antioxidant Activity. *Saudi Pharm. J.* **2020**, 28 (9), 1112–1117.

- (121) Sánchez-Ferrer, A.; Adamcik, J.; Mezzenga, R. Edible Supramolecular Chiral Nanostructures by Self-Assembly of an Amphiphilic Phytosterol Conjugate. *Soft Matter*. **2011**, 8 (1), 149–155.
- (122) Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. *Libro Farmacopea Argentina 7^a Ed.* (accedido 22/6/2024)
- (123) Nyström, L.; Moreau, R. A.; Lampi, A.-M.; Hicks, K. B.; Piironen, V. Enzymatic Hydrolysis of Steryl Ferulates and Steryl Glycosides. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227 (3), 727–733.
- (124) Li, X.; Xin, Y.; Mo, Y.; Marozik, P.; He, T.; Guo, H. The Bioavailability and Biological Activities of Phytosterols as Modulators of Cholesterol Metabolism. *Molecules*. **2022**, 27 (2), 523.
- (125) Vilahur, G.; Ben-Aicha, S.; Diaz-Riera, E.; Badimon, L.; Padró, T. Phytosterols and Inflammation. *Curr. Med. Chem.* **2019**, 26 (37), 6724–6734.
- (126) Bai, G.; Ma, C.; Chen, X. Phytosterols in Edible Oil: Distribution, Analysis and Variation during Processing. *Grain Oil Sci. Technol.* **2021**, 4 (1), 33–44.
- (127) Batth, R.; Nicolle, C.; Cuciurean, I. S.; Simonsen, H. T. Biosynthesis and Industrial Production of Androsteroids. *Plants*. **2020**, 9 (9), 1144.
- (128) Zhang, Y.; Xiao, P.; Pan, D.; Zhou, X. New Insights into the Modification of the Non-Core Metabolic Pathway of Steroids in Mycolicibacterium and the Application of Fermentation Biotechnology in C-19 Steroid Production. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (6), 5236.
- (129) Salehi, B.; Quispe, C.; Sharifi-Rad, J.; Cruz-Martins, N.; Nigam, M.; Mishra, A. P.; Konovalov, D. A.; Orobinskaya, V.; Abu-Reidah, I. M.; Zam, W.; Sharopov, F.; Venneri, T.; Capasso, R.; Kukula-Koch, W.; Wawruszak, A.; Koch, W. Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Front. Pharmacol.* **2021**, 11, 599959.
- (130) Nyström, L.; Schär, A.; Lampi, A.-M. Steryl Glycosides and Acylated Steryl Glycosides in Plant Foods Reflect Unique Sterol Patterns. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, 114 (6), 656–669.
- (131) Zhang, R.; Han, Y.; McClements, D. J.; Xu, D.; Chen, S. Production, Characterization, Delivery, and Cholesterol-Lowering Mechanism of Phytosterols: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, 70 (8), 2483–2494.
- (132) Dikshit, S.; Bubna, S.; Gupta, A.; Kumar, P. Advances in Various Techniques for Isolation and Purification of Sterols. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, 57 (7), 2393–2403.
- (133) Fernandes, P.; Cabral, J. M. S. Phytosterols: Applications and Recovery Methods. *Bioresour. Technol.* **2007**, 98 (12), 2335–2350.
- (134) Randhir, A.; Laird, D. W.; Maker, G.; Trengove, R.; Moheimani, N. R. Microalgae: A Potential Sustainable Commercial Source of Sterols. *Algal Res.* **2020**, 46, 101772.
- (135) Goodman, J. Computer Software Review: Reaxys. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49 (12), 2897–2898.
- (136) van Zandvoort, I.; Wang, Y.; Rasrendra, C. B.; van Eck, E. R. H.; Bruijninx, P. C. A.; Heeres, H. J.; Weckhuysen, B. M. Formation, Molecular Structure, and Morphology of Humins in Biomass Conversion: Influence of Feedstock and Processing Conditions. *ChemSusChem*. **2013**, 6 (9), 1745–1758.

- (137) Moghadasian, M.; Frohlich, J.; Scudamore, C. Specificity of the Commonly Used Enzymatic Assay for Plasma Cholesterol Determination. *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55* (11), 859.
- (138) Gernon, M. Environmental Benefits of Methanesulfonic Acid. Comparative Properties and Advantages. *Green Chem.* **1999**, *1* (3), 127–140.
- (139) Kappenthuler, S.; Oliveira, S.; Wehrli, J.; Seeger, S. Environmental Assessment of Alternative Methanesulfonic Acid Production Using Direct Activation of Methane. *J. Clean. Prod.* **2018**, *202*, 1179–1191.
- (140) Palden, T.; Onghena, B.; Regadío, M.; Binnemans, K. Methanesulfonic Acid: A Sustainable Acidic Solvent for Recovering Metals from the Jarosite Residue of the Zinc Industry. *Green Chem.* **2019**, *21* (19), 5394–5404.
- (141) Binnemans, K.; Jones, P. T. Methanesulfonic Acid (MSA) in Hydrometallurgy. *J. Sustain. Metall.* **2023**, *9* (1), 26–45.
- (142) Binnemans, K.; Tom Jones, P. Methanesulfonic Acid (MSA) in Clean Processes and Applications: A Tutorial Review. *Green Chem.* **2024**, *26* (15), 8583–8614.
- (143) Traboni, S.; Bedini, E.; Silipo, A.; Vessella, G.; Iadonisi, A. Solvent-Free Glycosylation from per-O-Acylated Donors Catalyzed by Methanesulfonic Acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021* (41), 5669–5676.
- (144) Saha, A.; Ramesh, E.; Sahoo, A. K. Brønsted Acid Promoted Sulfenylacyloxylation of Alkynes: Access to 4-Sulfenylisocoumarins. *Adv. Synth. Catal.* **2022**, *364* (20), 3496–3500.
- (145) Ramos, F. J.; de Haro, J. C.; Rodríguez, J. F.; Pérez, Á.; Carmona, M. An Environmentally Friendly Production of Ester-biolubricant from Oleic Acid. *Biofuels Bioprod. Biorefining.* **2022**, *16* (6), 1655–1666.
- (146) Díaz-Urrutia, C.; Ott, T. Activation of Methane: A Selective Industrial Route to Methanesulfonic Acid. *Science.* **2019**, *363* (6433), 1326–1329.
- (147) Leardi, R. Experimental Design in Chemistry: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, *652* (1–2), 161–172.
- (148) Pereira, L. M. S.; Milan, T. M.; Tapia-Blácido, D. R. Using Response Surface Methodology (RSM) to Optimize 2G Bioethanol Production: A Review. *Biomass Bioenergy.* **2021**, *151*, 106166.
- (149) Vera-Candioti, L.; Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C. Simultaneous Multiresponse Optimization Applied to Epinastine Determination in Human Serum by Using Capillary Electrophoresis. *Pap. Present. 10th Int. Conf. Chemom. Anal. Chem.* **2007**, *595* (1), 310–318.
- (150) Arancibia, J. A.; Nepote, A. J.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C. Spectrofluorimetric Determination of Phenylephrine in the Presence of a Large Excess of Paracetamol. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *419* (2), 159–168.
- (151) Carlucci, R.; Arancibia, J. A.; Labadie, G. R. Environmentally Friendly Process for Phytosterols Recovery from Residues of Biodiesel Production. *Sustain. Chem. Pharm.* **2024**, *37*, 101360.
- (152) Bennet, A. J.; Sinnott, M. L. Complete Kinetic Isotope Effect Description of Transition States for Acid-Catalyzed Hydrolyses of Methyl .Alpha.- and .Beta.-Glucopyranosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (23), 7287–7294.

- (153) Bunton, C. A.; Lewis, T. A.; Llewellyn, D. R.; Vernon, C. A. Mechanisms of Reactions in the Sugar Series. Part I. The Acid-Catalysed Hydrolysis of α - and β -Methyl and α - and β -Phenyl D-Glucopyranosides. *J. Chem. Soc. Resumed.* **1955**, No. 0, 4419–4423.
- (154) Kraber, S. *Stat-Ease*. Understanding Lack of Fit: When to Worry. (accedido 31/01/2024)
- (155) Giordano, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. SRO_ANN: An Integrated MatLab Toolbox for Multiple Surface Response Optimization Using Radial Basis Functions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**, 171, 198–206.
- (156) Ertürk, A. S. Controlled Production of Monodisperse Plant-Mediated AgNP Catalysts Using Microwave Chemistry: A Desirability-Function-Based Multiple-Response Optimization Approach. *ChemistrySelect.* **2019**, 4 (32), 9300–9308.
- (157) Carlucci, R.; Arancibia, J. A.; Labadie, G. R. Environmentally Friendly Process for Phytosterols Recovery from Residues of Biodiesel Production. *Sustain. Chem. Pharm.* **2024**, 37, 101360.
- (158) Sheldon, R. A. The E Factor at 30: A Passion for Pollution Prevention. *Green Chem.* **2023**, 25 (5), 1704–1728.
- (159) Sheldon, R. A. Organic Synthesis-Past, Present and Future. *Chem. Ind.* **1992**, No. 23, 903–906.
- (160) Eychenne, V.; Basso, Y.; Vallejo, O.; Schwarzer, J. Process for the Production and Purification of Sterols. US Patent: US11781088B2. **2023**.
- (161) Czuppon, T.; Kemeny, Z.; Kovari, E.; Recseg, K. Process for Recovery of Plant Sterols from By-Product of Vegetable Oil Refining. US Patent: US7368583B2. **2008**.
- (162) Huibers, D. T.; Robbins, A. M.; Sullivan, D. H. Method for Separating Sterols from Tall Oil. US Patent: US20010007906A1. **2002**.
- (163) Sonnier, W.; Schultz, M. Process of Extracting and Purifying Phytosterols and Phytostanols from Tall Oil Pitch. European Patent Office: EP1470149A2. **2003**.
- (164) Xu, W. L.; Huang, Y. B.; Qian, J. H.; Sha, O.; Wang, Y. Q. Separation and Purification of Stigmasterol and β -Sitosterol from Phytosterol Mixtures by Solvent Crystallization Method. *Sep. Purif. Technol.* **2005**, 41 (2), 173–178.
- (165) Chang, M.; Zhang, T.; Feng, W.; Wang, T.; Liu, R.; Jin, Q.; Wang, X. Preparation of Highly Pure Stigmasteryl Oleate by Enzymatic Esterification of Stigmasterol Enriched from Soybean Phytosterols. *LWT.* **2020**, 128, 109464.
- (166) Zhi, M.; Wu, M. Synthesis and Crystallization Purification of Phytosterol Esters for Food Industry Application. *Food Sci. Technol (Campinas)*. **2022**, 42.
- (167) Rosenbaum, N.; Schmidt, L.; Mohr, F.; Fuhr, O.; Nieger, M.; Bräse, S. Formal Semisynthesis of Demethylgorgosterol Utilizing a Stereoselective Intermolecular Cyclopropanation Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2021 (10), 1568–1574.
- (168) Giroux, S.; Corey, E. J. Stereocontrolled Synthesis of Dafachronic Acid A, the Ligand for the DAF-12 Nuclear Receptor of *Caenorhabditis Elegans*. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (32), 9866–9867.
- (169) Russo, V.; Marinozzi, M.; Castro, N. F. F. Side-Chain Modified Ergosterol and Stigmasterol Derivatives as Liver X Receptor Modulators. US Patent: US2020157135A1. **2020**.

- (170) Feula, A.; Salituro, F.; Stites, R. Steroidal Compositions and Methods of Treating Lipogenic Cancers. World Intellectual Property Organization: WO2023205801A2. **2023**.
- (171) Savinova, T. S.; Diep, N. T.; Voishvillo, N. E.; Andryushina, V. A.; Karpova, N. V.; Beletskaya, I. P.; Huy, L. D. Extraction of a Mixture of Phytosterols from Soybean Processing By-Product and Its Use in the Manufacture of 9 α -Hydroxyandrost-4-En-3,17-Dione. *Pharm. Chem. J.* **2012**, 46 (3), 183–186.
- (172) El-Shemy, H. *Soybean and Health*. BoD – Books on Demand. **2011**.
- (173) Spencer, T. A.; Li, D.; Russel, J. S.; Tomkinson, N. C.; Willson, T. M. Further Studies on the Synthesis of 24 (S), 25-Epoxycholesterol. A New, Efficient Preparation of Desmosterol. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (7), 1919–1923.
- (174) Kim, B. J.; Morita, H. Utility of I-Steroid-Route to Oxidized Sterol Bound to a Cross-Linker: Synthesis of the Steroid Antigen. *Chem. Lett.* **2000**, 29 (1), 42–43.
- (175) Palermo, J. A.; Rodriguez Brasco, M. F.; Hughes, E. A.; Seldes, A. M.; Balzaretti, V. T.; Cabezas, E. Short Side Chain Sterols from the Tunicate Polizoa Opuntia. *Steroids*. **1996**, 61 (1), 2–6.
- (176) Seck, I.; Fall, A.; Lago, C.; Sène, M.; Gaye, M.; Seck, M.; Gómez, G.; Fall, Y. Synthesis of a Cholesterol Side-Chain Triazole Analogue via ‘Click’ Chemistry. *Synthesis*. **2015**, 47 (18), 2826–2830.
- (177) Chung, S.-K.; Ryoo, C. H.; Yang, H. W.; Shim, J.-Y.; Kang, M. G.; Lee, K. W.; King, H. I. Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives as Antifungal Agents. *Tetrahedron*. **1998**, 54 (52), 15899–15914.
- (178) Hollweck, M.; Jordan, D.; Bracher, F. Synthesis of a Side Chain Alkyne Analogue of Sitosterol as a Chemical Probe for Imaging in Plant Cells. *Biomolecules*. **2024**, 14 (5), 542.
- (179) Pontini, L.; Marinozzi, M. Novel Synthetic Access to 24a-Homochol-5-En-24a-Oate Scaffold from Stigmasterol. *Org. Prep. Proced. Int.* **2021**, 53 (6), 571–577.
- (180) Yakimchyk, V. S.; Kazlova, V. V.; Hurski, A. L.; Savchenko, R. G.; Kostyleva, S. A.; Zhabinskii, V. N.; Khripach, V. A. Enantioselective Catalytic Approach to the C23-C28 Subunit of 24 α -Methyl Steroids. *Steroids*. **2019**, 148, 82–90.
- (181) Werner, F.; Parmentier, G.; Luu, B.; Dinan, L. A Convenient Stereoselective Synthesis of Castasterone and Its Analogues Using Arsenic Ylides. *Tetrahedron*. **1996**, 52 (15), 5525–5532.
- (182) Raccosta, L.; Marinozzi, M.; Costantini, S.; Maggioni, D.; Ferreira, L. M.; Corna, G.; Zordan, P.; Sorice, A.; Farinello, D.; Bianchessi, S.; Riba, M.; Lazarevic, D.; Provero, P.; Mack, M.; Bondanza, A.; Nalvarte, I.; Gustafsson; Ranzani, V.; De Sanctis, F.; Ugel, S.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M. A.; Pontini, L.; Pacciarini, M.; Traversari, C.; Pagani, M.; Bronte, V.; Sitia, G.; Antonson, P.; Brendolan, A.; Budillon, A.; Russo, V. Harnessing the Reverse Cholesterol Transport Pathway to Favor Differentiation of Monocyte-Derived APCs and Antitumor Responses. *Cell Death Dis.* **2023**, 14 (2), 129.
- (183) Okamoto, M.; Tabe, M.; Fujii, T.; Tanaka, T. Asymmetric Isopropylation of Steroidal 24-Aldehydes for the Synthesis of 24(R)-Hydroxycholesterol. *Tetrahedron Asymmetry*. **1995**, 6 (3), 767–778.
- (184) Lomenick, B.; Shi, H.; Huang, J.; Chen, C. Identification and Characterization of β -Sitosterol Target Proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (21), 4976–4979.

- (185) Datla, A.; Nagre, P.; Tamore, J.; Prabhu, M. S.; Kadam, S. V. Synthesis of Cholesterol and Vitamin D3 from Phytosterols. European Patent Office: EP3906247A1. **2022**.
- (186) Foster, C. H. Process for Separating Stigmasterol-Derived Products. US Patent: US4192811A. **1980**.
- (187) Kepner, R. E.; Winstein, S.; Young, W. G. Allylic Rearrangements. XXIV. Abnormal Bimolecular Substitution. The Condensation of Butenyl and Pentenyl Chlorides with Sodium Malonic Ester. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71 (1), 115–119.
- (188) Tomkinson, N. C.; Willson, T. M.; Russel, J. S.; Spencer, T. A. Efficient, Stereoselective Synthesis of 24 (S), 25-Epoxycholesterol. *J. Org. Chem.* **1998**, 63 (26), 9919–9923.
- (189) Partridge, J. J.; Faber, S.; Uskoković, M. R. Vitamin D3 Metabolites I. Synthesis of 25-hydroxycholesterol. *Helv. Chim. Acta.* **1974**, 57 (3), 764–771.
- (190) Slomp, G. Jr.; Johnson, J. L. Ozonolysis. II.1 The Effect of Pyridine on the Ozonolysis of 4,22-Stigmastadien-3-One2. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80 (4), 915–921.
- (191) Schwartz, C.; Raible, J.; Mott, K.; Dussault, P. H. 'Reductive Ozonolysis' via a New Fragmentation of Carbonyl Oxides. *Tetrahedron.* **2006**, 62 (46), 10747–10752.
- (192) Willand-Charnley, R.; Fisher, T. J.; Johnson, B. M.; Dussault, P. H. Pyridine Is an Organocatalyst for the Reductive Ozonolysis of Alkenes. *Org. Lett.* **2012**, 14 (9), 2242–2245.
- (193) Willand-Charnley, R.; Dussault, P. H. Tandem Application of C–C Bond-Forming Reactions with Reductive Ozonolysis. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (1), 42–47.
- (194) Chuang, Y.; Ju, Y.; Widjaja, A. Separation of Campesterol and β -Sitosterol from a Sterol Mixture. *Sep. Sci. Technol.* **2006**, 41 (13), 3027–3038.
- (195) Srividya, N.; Heidorn, D. B.; Lange, B. M. Rapid Purification of Gram Quantities of β -Sitosterol from a Commercial Phytosterol Mixture. *BMC Res. Notes.* **2014**, 7, 182.
- (196) Wise, D. E.; Gogarnoiu, E. S.; Duke, A. D.; Paolillo, J. M.; Vacala, T. L.; Hussain, W. A.; Parasram, M. Photoinduced Oxygen Transfer Using Nitroarenes for the Anaerobic Cleavage of Alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144 (34), 15437–15442.
- (197) Porta, E. O. J.; Ballari, M. S.; Carlucci, R.; Wilkinson, S.; Ma, G.; Tekwani, B. L.; Labadie, G. R. Systematic Study of 1,2,3-Triazolyl Sterols for the Development of New Drugs against Parasitic Neglected Tropical Diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 254, 115378.
- (198) Jonnalagadda, S. S.; Jones, J. M.; Black, J. D. Position of the American Dietetic Association: Fat Replacers. *J. Am. Diet. Assoc.* **2005**, 105 (2), 266–275.
- (199) Martins, A. J.; Vicente, A. A.; Cunha, R. L.; Cerqueira, M. A. Edible Oleogels: An Opportunity for Fat Replacement in Foods. *Food Funct.* **2018**, 9 (2), 758–773.
- (200) Marangoni, A. G.; Van Duynhoven, J. P.; Acevedo, N. C.; Nicholson, R. A.; Patel, A. R. Advances in Our Understanding of the Structure and Functionality of Edible Fats and Fat Mimetics. *Soft Matter.* **2020**, 16 (2), 289–306.
- (201) Hunt, R.; Zorich, N. L.; Thomson, A. B. Overview of Olestra: A New Fat Substitute. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **1998**, 12, 193–197.
- (202) Miller, K.; Lawson, K.; Tallmadge, D.; Madison, B.; Okenfuss, J.; Hudson, P.; Wilson, S.; Thorstenson, J.; Vanderploeg, P. Disposition of Ingested Olestra in the Fischer 344 Rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1995**, 24 (2), 229–237.

- (203) Lovejoy, J. C.; Bray, G. A.; Lefevre, M.; Smith, S. R.; Most, M. M.; Denkins, Y. M.; Volaufova, J.; Rood, J. C.; Eldridge, A. L.; Peters, J. C. Consumption of a Controlled Low-Fat Diet Containing Olestra for 9 Months Improves Health Risk Factors in Conjunction with Weight Loss in Obese Men: The Ole' Study. *Int. J. Obes.* **2003**, *27* (10), 1242–1249.
- (204) Jäger, S. N.; Porta, E. O. J.; Labadie, G. R. Convenient Synthesis of the Immunogenic Glycolipid BbGL1. *Steroids*. **2019**, *141*, 41–45.
- (205) Bauer, S. The Preparation of Fatty Acid Chlorides. *Oil Soap* **1946**, *23* (1), 1–5.
- (206) Do, J.-L.; Friščić, T. Mechanochemistry: A Force of Synthesis. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (1), 13–19.
- (207) Andersen, J. M.; Mack, J. Decoupling the Arrhenius Equation via Mechanochemistry. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (8), 5447–5453.
- (208) Martina, K.; Rotolo, L.; Porcheddu, A.; Delogu, F.; Bysouth, S. R.; Cravotto, G.; Colacino, E. High Throughput Mechanochemistry: Application to Parallel Synthesis of Benzoxazines. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (5), 551–554.
- (209) Rizzi, G. P.; Taylor, H. M. A Solvent-Free Synthesis of Sucrose Polyesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1978**, *55* (4), 398–401.
- (210) Petkova, N. “Green” Synthesis of Sucrose Octaacetate and Characterization of Its Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2018**, *31* (4), 395–402.
- (211) Csizmadia, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. MDPI (Basel). **1999**.
- (212) Allgood, G. S.; McAvoy, D. C.; Woltering, D. M. Environmental Assessment of a New Food Ingredient, the Fat Replacer Olestra. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, *16* (3), 586–600.
- (213) Skare, K. L.; Skare, J. A.; Thompson, E. D. Evaluation of Olestra in Short-Term Genotoxicity Assays. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28* (2), 69–73.
- (214) Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T.; Sato, J. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res.* **1982**, *42* (9), 3858–3863.
- (215) Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Yamane, T.; Miyazaki, M.; Miyano, K.; Sato, J. Phenotypical stability of a Human Hepatoma Cell Line, HuH-7, in long-term culture with chemical defined medium. *GANN Jpn. J. Cancer Res.* **1984**, *75* (2), 151–158.
- (216) Ferretti, A. C.; Tonucci, F. M.; Hidalgo, F.; Almada, E.; Larocca, M. C.; Favre, C. AMPK and PKA Interaction in the Regulation of Survival of Liver Cancer Cells Subjected to Glucose Starvation. *Oncotarget*. **2016**, *7* (14), 17815–17828.
- (217) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265–275.
- (218) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37* (8), 911–917.
- (219) SigmaAldrich. *Quantitative NMR*. (accedido 15/02/2024)

6. Materiales y Métodos

6.1 Condiciones Generales

Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo bajo nitrógeno seco de alta pureza y los solventes y reactivos fueron transferidos con jeringa con presión positiva de nitrógeno seco. Las soluciones fueron evaporadas a presión reducida en evaporador rotatorio y en bomba de vacío.

Todos los materiales de partida fueron adquiridos en SIGMA-Aldrich.

Las reacciones efectuadas a 0 °C se llevaron a cabo mediante empleo de baño de hielo. Las reacciones efectuadas a -78°C se llevaron a cabo mediante empleo de baño criogénico de AcOEt y N_{2(l)}. Las reacciones realizadas a altas temperaturas y a reflujo se realizaron empleando baños de silicona mediante calentamiento con platinas termoeléctricas, mantas calefactoras con agitación magnética, o con termomezclador orbital DLab HM-100PRO. Las reacciones a reflujo se refrigeraron por uso de circulación de agua corriente.

Las estructuras de los compuestos obtenidos fueron elucidadas a través de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protones y de carbono (¹H-RMN y ¹³C-RMN) de una y dos dimensiones e infrarrojo (IR). Alternativamente se empleó espectrometría de masas para el caso particular de fitosteroles y derivados.

6.2 Datos físicos

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance 300 MHz (¹H, utilizando la señal del tetrametilsilano como patrón de referencia interno) y a 75 MHz (¹³C, utilizando la señal del solvente, CDCl₃, como patrón de referencia interno). Las mediciones se realizaron disolviendo la muestra en CDCl₃ o en DMSO-*d*₆ en los casos que fue necesario. Los espectros de ¹H-RMN fueron informados indicando los desplazamientos químicos de las señales (δ) y, a continuación, entre paréntesis y en este orden, se detalló la multiplicidad de la señal, la integración de la señal, la constante de acoplamiento (*J*), y finalmente, la asignación de la señal. Los espectros de ¹³C-RMN fueron informados indicando los desplazamientos químicos de las señales (δ). Los desplazamientos químicos fueron informados en unidades de partes por millón (ppm), relativas al patrón de referencia correspondiente y las constantes de acoplamiento en s⁻¹ (Hz). Las abreviaturas utilizadas para informarlas multiplicidades de las señales fueron: s=singlete, sa=singlete ancho, d=doblete, dd=doble doblete, ddd=doble-doble doblete, dqd= doble-cuadruple doblete, t=triplete, dt= doble triplete y m=multiplete.

Los espectros de RMN ^{13}C reportados incluyen: espectros totalmente desacoplados BB (del inglés Broad Band) que permiten diferenciar carbonos cuaternarios, metínicos, metilénicos y metílicos. En el análisis de espectros bidimensionales se utilizó la técnica de HSQC editado (del inglés, Heteronuclear Single Quantum Coherence Edited), HMBC (del inglés, de Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) y COSY (del inglés, Correlation Spectroscopy).

Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo FTIR-8400, usando como patrón de calibración la banda 1601 cm^{-1} del poliestireno. Las muestras sólidas se midieron como dispersiones en pastillas de bromuro de potasio (KBr), obtenidas por compresión de una mezcla finamente pulverizada de aproximadamente 3 mg de muestra cada 100 mg de KBr seco.

6.3 Cromatografía

6.3.1 Cromatografía en capa delgada

Las TLC (Cromatografía en capa delgada, del inglés *Thin-layer Chromatography*) se realizaron sobre placas comerciales de aluminio cubiertas con silica gel Merck (60 F₂₅₄) y se desarrollaron con sistemas de solventes adecuados a cada muestra. Las manchas se detectaron con lámpara de luz UV ($\lambda = 254\text{ nm}$), por inmersión en una solución de p-anisaldehído (p-anisaldehído/ácido sulfúrico/ácido acético en etanol 95%, 2,5 %: 2,5 %: 0,25 % v/v) ó en solución de ninhidrina (0,2 g en 100 ml de etanol) y posterior calentamiento para mejorar la sensibilidad de la detección.

6.3.2 Cromatografía en columna

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron sobre silica gel Merck 60H eluyendo con sistemas de solventes de polaridad creciente adecuados para cada muestra, aumentando la velocidad de elución con presión de nitrógeno (cromatografía flash). Las siembras se realizaron con las muestras a purificar adsorbidas sobre silica gel. Los eluatos fueron colectados y ensayados por TLC para determinar las fracciones obtenidas.

6.3.3 Purificación semi-automática

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron empleando purificador por cromatografía flash y colector de fracciones Biotage® Isolera™ One. Las siembras se realizaron con las muestras a purificar adsorbidas sobre silica gel. Las fracciones colectadas por el equipo fueron ensayadas por TLC para determinar las fracciones obtenidas.

6.3.4 GC-MS

Los ensayos de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas se emplearon para determinar pureza de fitosteroles o para seguimiento de la ozonólisis utilizando colesterol como patrón interno. Para ello se pesaron cantidades precisas de analito y se lo disolvieron en una solución de 250 μ l de Pyr, 250 μ l de MTSTFA y 2,0 ml de hexano, incorporando una solución de colesterol en Pyr anhidra como patrón interno 500 μ l (1,15 mM) o 100 μ l (2,52 mM), respectivamente. Las mezclas se calentaron a 78 °C y se agitaron a 700 rpm en un termomezclador DLab HM100-PRO durante 1 h. Las reacciones se dejaron enfriar y se inyectaron en el sistema GC (1 μ l).

El análisis se realizó con un espectrómetro Shimadzu GCMS-QP2010 Plus. Los datos se registraron utilizando el software LabSolutions GCMSolution 4.44. Las condiciones de GC se describen a continuación: columna ZB-1 ms (100% dimetilpolisiloxano; 30 m; 0,25 mm DI; película de 0,25 μ m), volumen de inyección de 1,0 μ l, se empleó He como gas a 38 cm³/s, y la temperatura del inyector fue de 250 °C. El programa de temperatura del horno fue: 50 °C (0 min), 30 °C/min hasta 300 °C (10 min) hasta el final de la serie (18,33 min). Las condiciones de MS se describen a continuación: La fuente de iones de impacto electrónico se ajustó a 70 eV, la temperatura de la fuente de iones y la interfaz fueron de 250 y 300 °C, respectivamente, y el rango de barrido de masas iónicas fue de 60-600 m/z.

Las determinaciones de pureza se realizaron comparando las áreas de las señales de colesterol y de las muestras.

6.4. Reactivos, gases y solventes

Los gases se secaron por pasaje a través de ácido sulfúrico concentrado.

Los solventes utilizados como eluyentes en TLC o cromatografía en columna fueron purificados por destilación. Los solventes de reacción fueron de calidad “Pro-análisis” y en los casos necesarios se sometieron a ulterior purificación tal como se describe a continuación:

- **Diclorometano** anhidro: Anhidrado y desgasado mediante el sistema de purificación de solventes MBraun MB-SP.
- **THF** anhidro: Anhidrado y desgasado mediante el sistema de purificación de solventes MBraun MB-SP.
- **Metanol** anhidro: Destilado sobre CaH₂ bajo atmosfera de nitrógeno y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
- **N,N-Dimetilformamida** anhidra: Secada sobre CaO, destilada a presión reducida y almacenada en botellas con tamices moleculares de 4 Å.

- **Acetonitrilo** anhidro: Secado y destilado sobre CaH_2 bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
- **Piridina** anhidra: Destilada sobre NaOH bajo atmósfera de nitrógeno y almacenada en botellas con tamices moleculares de 4 Å.

Precipitados del tanque de almacenamiento de biodiésel: Las muestras fueron generosamente proporcionadas por Rodolfo Cabrera de UnitecBio (San Lorenzo, Argentina), siendo un material viscoso amarillento. Dicho precipitado estaba compuesto principalmente por 75-85% p/p de BD (EN14103) y 10-19% p/p de SGs (mediante pruebas de filtración). Los componentes menores son monoglicéridos (EN14105), diglicéridos (EN14105), triglicéridos (EN14105), glicerina libre inferior al 0,5% p/p (EN14105) y un índice de acidez de 0,1-1,5 (ISO 660). También contiene otros componentes menores como se ha informado anteriormente.^{51,75}

Ácido metanosulfónico 70% p/p ($\delta = 1,481 \text{ g/ml}$): Lutropur® fue donado generosamente por BASF y se utilizó como catalizador ácido en las reacciones de hidrólisis. Las soluciones utilizadas en la hidrólisis se prepararon diluyendo el producto comercial en agua destilada hasta alcanzar la concentración deseada.

El metanol (grado técnico, Cicarelli, Argentina), el hexano y el acetato de etilo (grado técnico, Sintorgan, Argentina) se adquirieron de proveedores locales y se utilizaron sin purificación adicional. El bicarbonato sódico (grado USP, Anedra, Argentina) también se obtuvo de un proveedor local.

6.5 Esterilglucósidos

6.5.1 Purificación de esterilglucósidos (SGs)

Los esterilglucósidos se purificaron siguiendo el siguiente procedimiento: Partiéndose de 18 l de fondo de tanque decantado, se procedió a la eliminación del BD presente en la mezcla mediante filtrado y posterior lavado con Hexano. Para ello, una vez filtrado el BD separado del sólido por decantación, se realizaron cuatro lavados del sólido obtenido con

Hexano, el cual fue agregado en porciones de 5 l y 3 x 3 l, respectivamente. Tras cada agregado, se agito manualmente durante 5 minutos y se filtró en el dispositivo presentado en la figura de la derecha. Con el objetivo de recuperar el Hexano empleado en los lavados, se evaporó la solución obtenida tras cada filtración mediante evaporador rotatorio. La evaporación consistió en 45 min de evaporación constante en un rotavapor a 120 rpm., 20 mmHg y un baño de agua termostatzado a 40°C. Luego del citado tratamiento se obtuvieron 15 l de BD, aproximadamente, y 3,6 kg de sólido aún impurificado, que fue separado en 6 lotes de aproximadamente 600 g cada uno.

Tres de los lotes de dicho sólido, que incluían 610 g, 602 g y 602 g, respectivamente, fueron tratado a reflujo con MeOH en una relación de 0,56 ml de MeOH/g de SGs impuros durante 2 h para eliminar el BD remanente y la glicerina ocluida. Posteriormente se filtró la suspensión utilizando un embudo Büchner, recuperándose el MeOH con los residuos. Se eliminó el MeOH remanente en el sólido en estufa de vacío a 70°C hasta pesada constante obteniéndose 158,0 g, 158,9 g y 160,3 g, respectivamente de un sólido amorfo beige que mostró ser SGs según los ensayos de ^1H -RMN.



Figura S1

6.5.2 Ensayo de solubilidad de SGs en solventes orgánicos

Se pesaron 10 mg de SGs en tubo roscado con tapa de 10 ml y se agregó 1 ml del correspondiente solvente o mezcla de solventes. Luego se trató la suspensión con calentamiento (40°C) y agitación orbital (400 rpm) mediante un termomezclador DLab HM-100Pro, durante 5 min. Luego de transcurrido el tiempo se inspeccionó el seno del líquido de forma visual y mediante evaluación por efecto Tyndall con un láser rojo corriente. En caso de no haber nada de disolución (I, insoluble) o disolución parcial (PS, parcialmente soluble) de los SGs, se agregó solvente, repitiendo el tratamiento. Alternativamente se varió la agitación orbital por sonicado durante 20 min en un baño de ultrasonido termostatzado, también a 40°C.

6.5.3 Derivatización y ^1H -RMNc de SGs

Se pesaron cantidades medidas con precisión de SGs en un tubo roscado con tapa de 10 ml. Se agregó en el mismo tubo una cantidad medida con precisión de 4-metoxifenol. Se suspendió la mezcla en 2 ml de DCM y se agregaron 200 μl de Ac_2O y 200 μl de TEA. Se dejó reaccionar por dos horas a 50°C con agitación orbital empleando un termomezclador orbital DLab HM-100PRO.

Una vez completado el tiempo de reacción, se evaporaron los componentes volátiles de la mezcla, y se resuspendieron en CDCl_3 para proceder a los ensayos de ^1H -RMNc. Se integraron las señales correspondientes a los protones aromáticos del acetato de 4-metoxifenol (7,1-6,9 ppm, dd, 4H) y al protón unido a C3 (4,52 ppm, m, 1H).

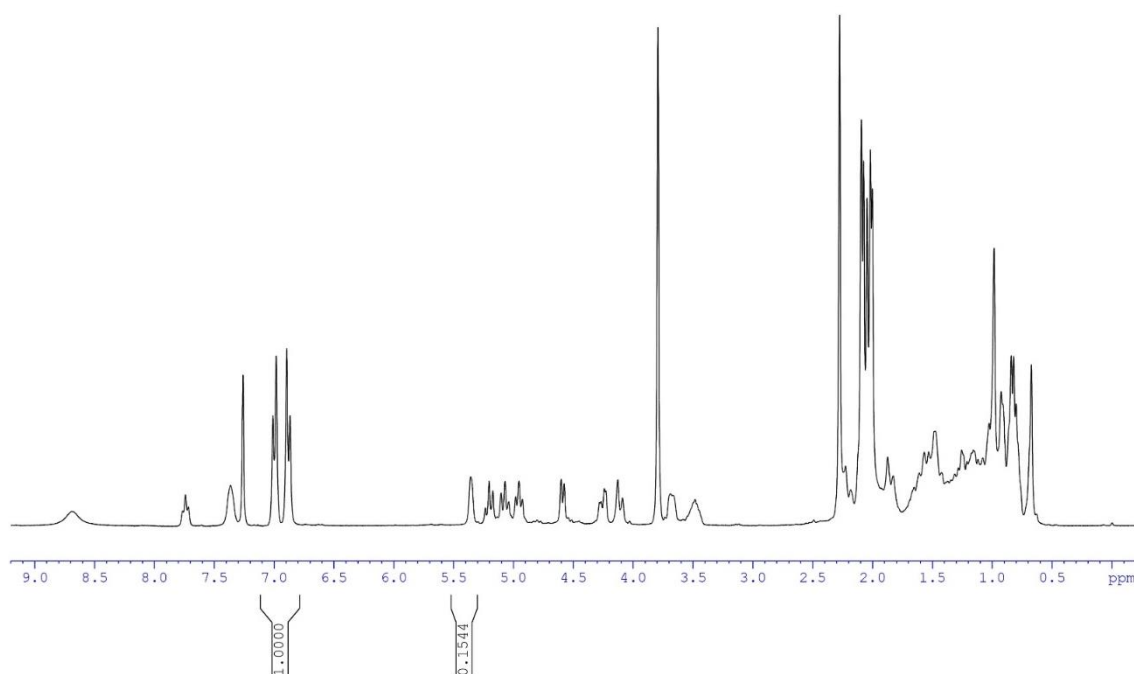


Figura S2. Determinación de pureza de esterilglucósidos por ^1H -RMNc para la Entrada 1 empleando 4-metoxifenol como estándar interno, mediante derivatización vía peracetilación, empleando CDCl_3 como solvente.

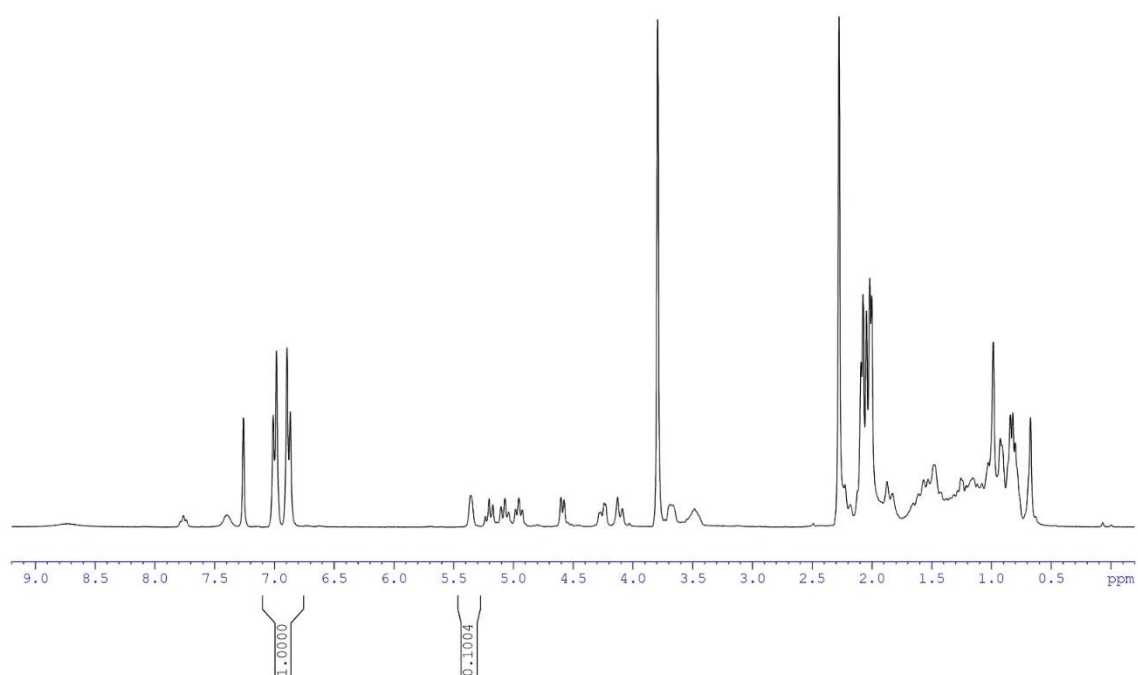


Figura S3. Determinación de pureza de esterilglucósidos por ¹H-RMNC para la Entrada 2 empleando 4-metoxifenol como estándar interno, mediante derivatización vía peracetilación, empleando CDCl₃ como solvente.

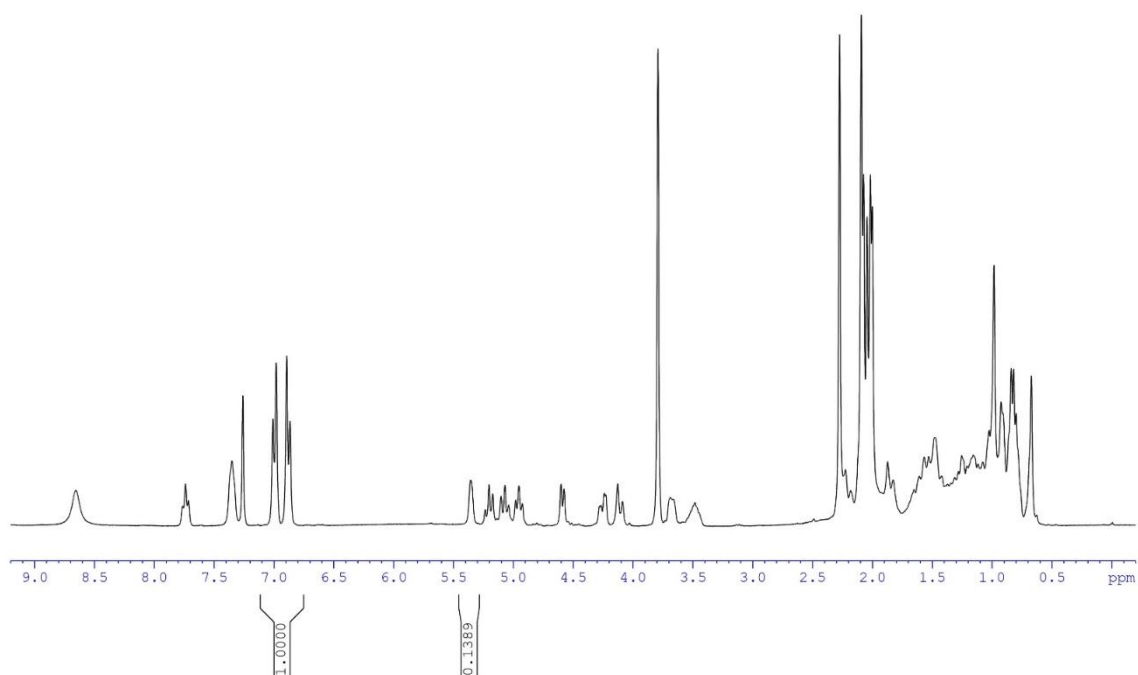


Figura S4. Determinación de pureza de esterilglucósidos por ¹H-RMNC para la Entrada 3 empleando 4-metoxifenol como estándar interno, mediante derivatización vía peracetilación, empleando CDCl₃ como solvente.

6.5.4 Ensayos de viabilidad celular

6.5.4.1 Soluciones de compuesto

Se prepararon soluciones independientes de SGs en acetona y DMSO mediante sonicado a 40°C durante 10 minutos.

Se pesaron 1,1 mg de SGs en tubo roscado y se agregaron 11 ml de acetona. Se sonicó la mezcla para lograr una solución límpida, de concentración 0,174 mM.

Se pesaron 11,4 mg de SGs en tubo roscado y se agregaron 2 ml de DMSO. Se sonicó la mezcla para lograr una solución límpida, de concentración 9,941 mM.

6.5.4.2 Línea celular

Se utilizaron las células Huh7 como modelo in vitro. Huh7 es una línea celular obtenida a partir de tejido de hígado de un paciente masculino japonés de 57 años de edad con hepatocarcinoma celular. Esta línea fue establecida en 1982 y ha demostrado ser sumamente estable, sin modificar considerablemente sus características en cultivos prolongados en el tiempo.^{214,215} Las células Huh7, fueron suministradas por el JCRB (del inglés Japanese Collection of Research Bioresources) Cell Bank (Tokio, Japón). Las células fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % (V/V) de suero fetal bovino (SFB; Internegocios S.A., Buenos Aires, Argentina), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco) (DMEM 10%) e incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% O₂ y 5% CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días. Para despegar las células, las mismas fueron previamente tripsinizadas. Para esto, se procedió a lavar las células dos veces con solución amortiguadora fosfato salino (PBS; del inglés phosphate-buffered saline. Composición PBS 1X: Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 20 mM y NaCl 100 mM; pH 7,5) y posteriormente se las trató con tripsina (0,01 mg/cm² de superficie de cultivo)-EDTA (4 µg/cm² de superficie de cultivo) (Gibco) con el fin de lograr la separación de las mismas. La reacción de tripsinización se detuvo mediante el agregado de DMEM 10% SFB, procediéndose luego a la homogenización de la suspensión celular. La densidad celular se determinó mediante conteo con Cámara de Neubauer (Boeco, Hamburg, HA, Alemania). Finalmente, las células fueron sembradas en la cantidad requerida, para continuar con su mantenimiento o proceder con los experimentos.

6.5.4.3 Tratamiento y ensayo de viabilidad celular mediante ensayo de MTT

Para llevar a cabo los tratamientos, las células fueron sembradas, incubadas durante toda la noche para permitir la correcta adhesión de las células a las placas y tratadas al día siguiente. Para ello, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo los

tratamientos con diversas dosis de SGs. El grupo control fue tratado con el vehículo (acetona o DMSO), es decir, el solvente en el cual fueron preparadas las soluciones stock de SGs.

El ensayo de MTT es un método simple para determinar la viabilidad celular por detección de la actividad metabólica. La estimación se realiza a través de la medida de absorbancia generada por la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolo), un colorante amarillo soluble en agua, es captado por las células y reducido por las deshidrogenasas mitocondriales a un producto púrpura insoluble de cristales de formazán, a una velocidad que es proporcional al número de células con mitocondrias funcionales.²¹⁶

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000 células Huh7/pocillo. Se realizó una dilución 1/100 desde las soluciones madre para el primer punto y luego diluciones al medio. Se aclaran para cada ensayo las concentraciones empleadas. Luego de 24 h, las células fueron tratadas con diferentes dosis de la solución de compuesto por 72 h. Luego del tratamiento, se incorporó al medio de cultivo el reactivo MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml. Luego de 2 h de incubación a 37°C, las células fueron lisadas y se solubilizaron los cristales de formazán mediante la adición de 200 µl de DMSO. La absorbancia del metabolito producido en las células viables fue detectada a 540 nm (con un filtro de referencia de 650 nm) en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células control, y se realizaron curvas dosis-respuesta.

6.5.5 Animales

Se emplearon ratones macho C57BL/6 provistos y mantenidos por el bioterio del “Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud” (CAECIHS) de la Universidad Abierta Interamericana (UAI). Todos los experimentos *in vivo* fueron realizados de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la UNR.

Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas, con libre acceso al agua y alimento (dieta normal comercial; estándar), en un ambiente de 20-22 °C y ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Se dividió a los animales al azar en cinco grupos y se inició el tratamiento. Los grupos tratados recibieron los SGs mediante sonda gástrica con la dosis correspondiente a cada grupo, *i. e.* 25, 50, 100 o 200 mg/kg/día, durante 3 semanas; al grupo “Control” se le administró el vehículo del fármaco (carboximetilcelulosa 0,5%). Finalizado el tratamiento, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) como agente anestésico y xilacina (3 mg/kg) como agente miorrelajante mediante inyección intraperitoneal

y sometidos a eutanasia mediante punción cardíaca, recogiendo la sangre para la obtención de plasma. Los hígados e intestinos (duodeno y yeyuno) fueron retirados, inspeccionados y pesados. Posteriormente, fueron procesados y una parte se congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -70 °C para estudios posteriores, mientras que otra parte fue procesada para determinaciones bioquímicas y otra para análisis histológicos.

6.5.6 Determinaciones bioquímicas en plasma sanguíneo

Los niveles plasmáticos de TAGs, colesterol total, colesterol-LDL, glicemia, alanina transaminasa (ALT/GPT) y aspartato transaminasa (AST/GOT) fueron determinados mediante kits comerciales de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Weiner Lab, Rosario, Argentina).

6.5.6.1 Determinación de TAGs

El método se basa en la liberación del glicerol de la molécula de TAGs y su posterior conversión enzimática en una quinonimina roja; para ello, se adicionó al plasma sanguíneo el reactivo comercial (buffer Good (pH 6,8), clorofenol, lipoprotein lipasa, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, adenosina trifosfato y 4- aminofenazona). Se utilizó glicerol como testigo. La detección del producto coloreado se realizó a 505 nm a 25 °C en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

6.5.6.2 Determinación de colesterol total

El método se basa en conversión enzimática del colesterol en una quinonimina roja; para ello, se adicionó al plasma sanguíneo el reactivo comercial (buffer Good (pH 6,8), colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona, fenol y colato de sodio). Se utilizó colesterol como testigo. La detección del producto coloreado se realizó a 505 nm a 25 °C en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

6.5.6.3 Determinación de colesterol-LDL

Las LDL presentes en el plasma sanguíneo se separaron del plasma precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular (solución de sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH 6,7). Luego del agregado del reactivo, la muestra fue centrifugada durante 15 min a 3000 rpm, y se separó el sobrenadante donde quedan las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determinó en dicho sobrenadante empleando el sistema enzimático para detectar el colesterol total descrito en la sección previa. Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtuvo el valor de colesterol unido a las LDL.

6.5.6.4 Determinación de glicemia

En este caso, la detección de los niveles de glucosa en sangre se realiza a través de la conversión enzimática de la glucosa en una quinonimina roja; para ello, se adicionó al plasma sanguíneo el reactivo comercial (glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona, buffer fosfatos pH 7,0 y 4-hidroxibenzoato). Se utilizó glucosa como testigo. La detección del producto coloreado se realizó a 505 nm a 25 °C en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

6.5.6.5 Determinación de GOT

La aspartato aminotransferasa (AST; GOT, del inglés *glutamyl oxaloacetic transaminase*) es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial) ampliamente difundida. Se encuentra en mayor concentración en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante en el torrente sanguíneo. Su determinación se basa en la detección del consumo de NADH.

Para la determinación, se agregó al plasma sanguíneo un reactivo comercial que consistía en 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH), buffer Tris pH 7,8 y L-aspartato. Luego de 1 min de iniciada la reacción, se registró la absorbancia inicial y luego se repitió la medición a los 1, 2 y 3 min de la primera lectura, a 340 nm a 37°C en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). A partir de los valores medidos, se obtuvo la pendiente de la recta obtenida que fue utilizada para calcular el valor de GOT (AST) como U/L.

6.5.6.6 Determinación de GPT

La alanina aminotransferasa (ALT; GPT, del inglés *glutamyl pyruvic transaminase*) es una enzima unilocular (citoplasmática) cuya mayor actividad se localiza en el tejido hepático. La destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares provoca la liberación de GPT a la circulación sanguínea. Los aumentos de actividad GPT en suero se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas. Su determinación se basa en la detección del consumo de NADH.

Para ello, se agregó al plasma sanguíneo el reactivo comercial (2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), lactato deshidrogenasa (LDH), buffer Tris pH 7,5 y L-aspartato). Luego de 1 min de iniciar la reacción, se registró la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 min de la primera lectura, a 340 nm a 37°C en un lector de microplaca DTX 880 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). A partir de los valores medidos, se obtuvo la pendiente de la recta obtenida que fue utilizada para calcular el valor de ALT como U/L.

6.5.7 Determinaciones bioquímicas en tejido

Parte de los tejidos almacenados a -70°C fueron utilizados para preparar homogenados totales mediante ruptura mecánica en solución buffer de homogeneización (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, sacarosa 250 mM, EDTA 5 mM) con el agregado de inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF, ortovanadato de sodio y fluoruro de sodio). Los homogenados totales obtenidos fueron almacenados a -70°C .

6.5.7.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue cuantificada utilizando el método de Lowry.²¹⁷ Se usó albúmina sérica bovina como testigo.

6.5.7.2 Determinación de niveles de lípidos en tejidos

Para determinar los niveles de TAGs y colesterol en tejido hepático e intestinal, los lípidos fueron extraídos mediante el método de Bligh y Dyer.²¹⁸ A partir del extracto, se realizó la determinación de TAGs y colesterol, tal como se describió en las secciones **6.5.6.1** Determinación de TAGs y **6.5.6.2** Determinación de colesterol total.

6.5.8 Estudios histológicos

Parte de los hígados e intestinos se fijaron con formol 10% y se procesaron para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de $5\text{ }\mu\text{m}$ y se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (HE) para analizar la arquitectura tisular. De cada corte histológico, se tomaron microfotografías representativas utilizando un microscopio de campo claro Olympus Co, LTD. Modelo UMDOB y cámara digital Olympus modelo D – 360 Zoom de 3,2 megapíxeles de resolución.

6.6 Fitosteroles de alta pureza

6.6.1 Determinación de la concentración de glucosa

La concentración de glucosa en el medio acuoso fue medida utilizando un kit comercial para cuantificación de glucosa mediante una reacción enzimática seguida de determinación espectrofotométrica del color generado. El procedimiento seguido para la determinación se encuentra descrito en el kit Glicemia enzimática AA de WienerLab® (Rosario, Argentina). Brevemente se tomaron 100 μl de muestra del medio acuoso acidulado y fue neutralizado con 400 μl $\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$ y diluido con 500 μl de agua destilada para alcanzar el rango de linealidad del método. Posteriormente se preparó una mezcla de reacción empleando 1 ml de reactivo de color $\geq 10\text{ kU/l}$ de glucosa oxidasa (GOD), $\geq 1\text{ kU/l}$ peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) 0,5 mM, buffer fosfato (pH 7,0) 100 mM y hidroxibenzoato 12 mM, y

10 μ l de muestra se dejaron reaccionar durante 5 min para desarrollar color. Finalmente, se midió la absorbancia UV-Vis a longitud de onda fija (505 nm) empleando un espectrofotómetro Jasco V-700. Las concentraciones de cada muestra fueron calculadas empleando la siguiente curva de calibración (**Tabla S1**), graficada en la figura.

Tabla S1. Curva de calibración para glucosa

Réplica	1	2	3
[Glucosa] (mM)	Absorbancia (a.u.)		
0,33	0,0241	0,0209	0,0218
0,66	0,0379	0,0565	0,0430
1,32	0,0743	0,0799	0,0881
2,64	0,1649	0,1592	0,1598
5,28	0,3103	0,3186	0,3260
5,56	0,3443	0,3512	0,3834

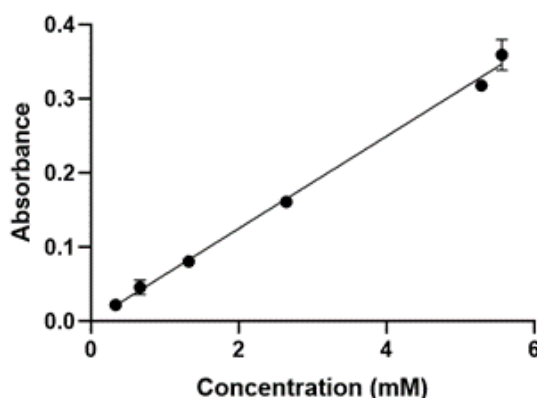


Figura S5. Curva de calibración para glucosa empleando una solución madre de glucosa pura y el kit de medición de glucosa Glicemia enzimática AA de WienerLab®

La concentración de glucosa medida para diferentes períodos de hidrólisis de SGs se midieron y graficaron en la **Figura 3.18**. Se detallan a continuación los valores medidos para cada una de las réplicas **Tabla S2**.

Tabla S2. Concentración de glucosa para cada réplica del análisis cinético de la hidrólisis de SGs empleando HCl como agente de hidrólisis.

Réplica	1	2	3	4
t (h)	Concentración (mM)			
2	1,33	1,11	0,90	0,51
8	7,64	5,65	6,61	5,23
12	27,38	26,39	29,70	27,61
16	30,90	31,20	31,65	28,25
18	29,26	28,67	30,87	29,89
20	29,34	29,13	29,65	31,27
24	31,43	31,01	28,56	29,41
28	32,13	29,12	33,98	34,48
32	30,96	29,58	28,62	29,90

6.6.2 Hidrólisis de SGs en HCl

6.6.2.1 Reacción de hidrólisis a escala de mg

Se suspendieron 100 mg de SGs (0,174 mmol) en 5 ml de HCl 4M en un tubo Hach de 10 ml. La mezcla se calentó a 78 °C y se agitó a 700 rpm en un termomezclador orbital DLab HM100-PRO. Los fitosteroles se extrajeron con éter etílico (2 × 2 ml). Los extractos orgánicos combinados se filtraron y luego se concentraron utilizando un concentrador paralelo BIOBASE a 40 °C y se pesaron en balanza analítica. La reacción se monitorizó por TLC extrayendo una pequeña cantidad del sólido en un tubo de ensayo, se añadió una pequeña cantidad de AcOEt, el ácido de la muestra extraída se neutralizó con NaHCO₃ y se realizó una TLC de la fase orgánica.

6.6.2.2 Múltiples ciclos de hidrólisis a escala de mg

Para cada ciclo, las reacciones fueron hechas en las condiciones recién descritas, por cuádruplicado. Los fitosteroles fueron extraídos con éter etílico (2x2 ml). Los extractos orgánicos combinados se filtraron y luego se concentraron utilizando un concentrador paralelo BIOBASE a 40 °C y se pesaron en balanza analítica. Las fases acuosas correspondientes fueron filtradas, para emplearse en nuevos ciclos de hidrólisis, luego de la determinación de glucosa del mismo. Se grafican los promedios de las masas obtenidas para cada ciclo en la **Figura 3.20** y se listan a continuación en la **Tabla S3** los valores individuales para cada réplica en su respectivo ciclo.

Tabla S3. Fitosteroles obtenidos tras repetidos ciclos de hidrólisis

Réplica	1	2	3	4
ciclo	mg			
1	67,6	67,3	68,0	69,6
2	70,0	70,7	70,0	68,6
3	70,4	70,9	70,4	70,8
4	68,4	68,1	70,4	70,8
5	66,9	69,7	66,7	69,5
6	69,2	71,3	70,3	71,3
7	72,7	72,3	73,4	72,5
8	72,5	72,7	71,2	70,8
9	70,5	70,5	72,0	71,1

6.6.2.3 Ensayos de pureza mediante kit de colesterol

El contenido de fitoesteroles del sólido obtenido se midió mediante un kit comercial para la cuantificación de colesterol por ensayo enzimático de color y posterior medición espectrofotométrica. El procedimiento para la determinación se siguió como se describe en el kit Colestat enzimático AA de WienerLab® (Rosario, Argentina). Brevemente se disolvieron 10 mg de muestra de sólido homogeneizado en 5 ml de isopropanol para ajustar la linealidad del método. Luego se preparó una mezcla de reacción con 1 ml de reactivo de color ≥ 100 kU/l de colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) ≥ 100 kU/l, 4-aminofenazona (4-AF) 0,2 mM, buffer de Good 50 mM, fenol 15 mM y colato de sodio 0,2 mM, y 10 μ L de solución cruda de fitosteroles de la muestra, y se dejó reaccionar durante 15 min para el desarrollo del color. Por último, se midió la absorbancia UV-Vis (505 nm) con un espectrofotómetro Jasco V-700.

Para validar el uso del kit de colesterol como herramienta para medir el contenido de fitosterol de las muestras, comparamos la linealidad de una curva de calibración de colesterol de control y la curva de calibración de fitosteroles. La absorbancia de las muestras de colesterol y fitosteroles de concentración conocida se detalla en la **Tabla S4** y se obtuvieron curvas trazando la absorbancia frente a la concentración de esteroides como se muestra en la **Figura 3.19**.

Tabla S4. Curva de calibración para colesterol y esteroides empleando kit enzimático

Replica	1	2	3	1	2	3
Conc (mM)	Absorbancia (u.a.) Colesterol			Absorbancia (u.a.) Fitosteroides		
0,485	0,0573	0,0475	0,0529	0,0470	0,0435	0,0454
0,970	0,0820	0,0788	0,0780	0,0850	0,0848	0,0820
1,940	0,1457	0,1399	0,1413	0,1108	0,1159	0,1265
3,880	0,2645	0,2577	0,2531	0,1887	0,2039	0,1980
7,759	0,4804	0,4875	0,4888	0,3325	0,3403	0,3340

Luego de la validación de la técnica se procedió a evaluar la pureza de los sólidos obtenidos tras la hidrólisis mediante determinaciones espectroscópicas, a través de la siguiente curva de calibración detallada en la **Tabla S5**, y graficada en la **Figura S6**.

Tabla S5. Curva de calibración de fitosteroides

Réplica	1	2	3
[Fitosteroides] (mM)	Absorbancia (a.u.)		
0,485	0,0191	0,0170	0,0273
0,970	0,0553	0,0736	0,0550
1,940	0,1072	0,0935	0,0979
3,880	0,1959	0,1954	0,1775
7,759	0,3390	0,3376	0,3382

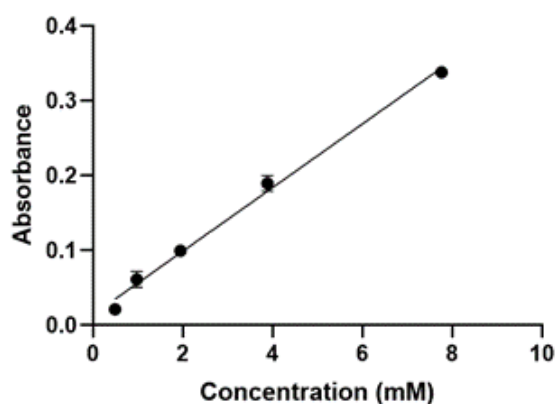


Figura S6. Curva de calibración de fitosteroides

6.6.2.4 Hidrólisis de SGs a escala de gramos

La reacción se realizó por triplicado. Se suspendieron 10 g de SGs (17,4 mmol) en 500 ml de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 4M en un balón de 1000 ml. La suspensión se calentó a 78°C y se agitó magnéticamente durante 24 h. Una vez concluido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró utilizando papel de filtro y embudo Büchner, a presión reducida. El sólido obtenido se lavó y filtró iterativamente mediante papel de filtro y embudo Büchner con 500 ml de agua destilada, 250 ml de $\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$ y 500 ml de agua destilada. Finalmente, los fitosteroles se secaron en estufa de vacío a 60°C hasta alcanzar un peso constante para obtener un sólido de color blanquecino a amarillento.

6.6.2.5 Ensayos de pureza mediante RMNc

Se utilizó un método de ^1H -RMN cuantitativo (RMNc) para determinar la pureza de los fitosteroles obtenidos. Brevemente, se disolvió una cantidad exactamente pesada de fitosteroles en 500 μl de CDCl_3 y se utilizó 5 μl (56,07 μmol) de benceno como patrón interno. Se adquirieron espectros ^1H (128 barridos) en un resonador Bruker Avance II 300 MHz utilizando CDCl_3 como disolvente. El cálculo de la pureza se realizó comparando el área de la señal de benceno (7,36 ppm, s, 6H) y el área del protón olefínico endocíclico de los restos de esterol (~5,35 ppm, m, 1H). Las masas y la pureza de cada reacción se describen en la **Tabla S6**, seguidas de los correspondientes espectros de ^1H -RMNc (**Figura S7-Figura S9**).

Tabla S6. Análisis de la pureza de los fitosteroles mediante RMNc

Replica	1	2	3
Fitosteroles (mg)	4,79	4,79	5,34
Pureza (%)	100,1	99,5	99,5

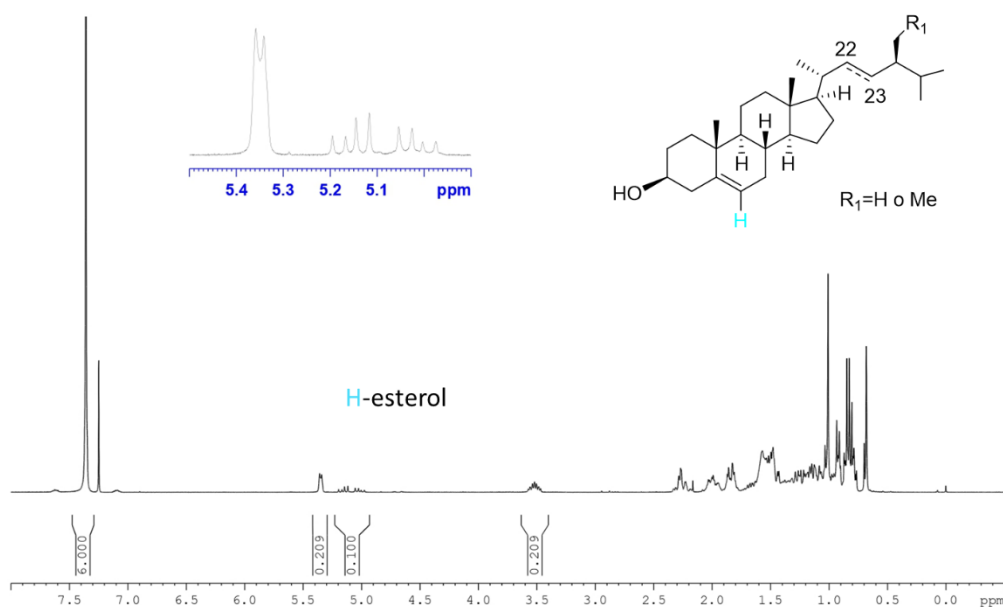


Figura S7. Determinación de pureza de fitosteroles por 1H -RMNC para la Replica 1 empleando benceno como estándar interno y $CDCl_3$ como solvente.

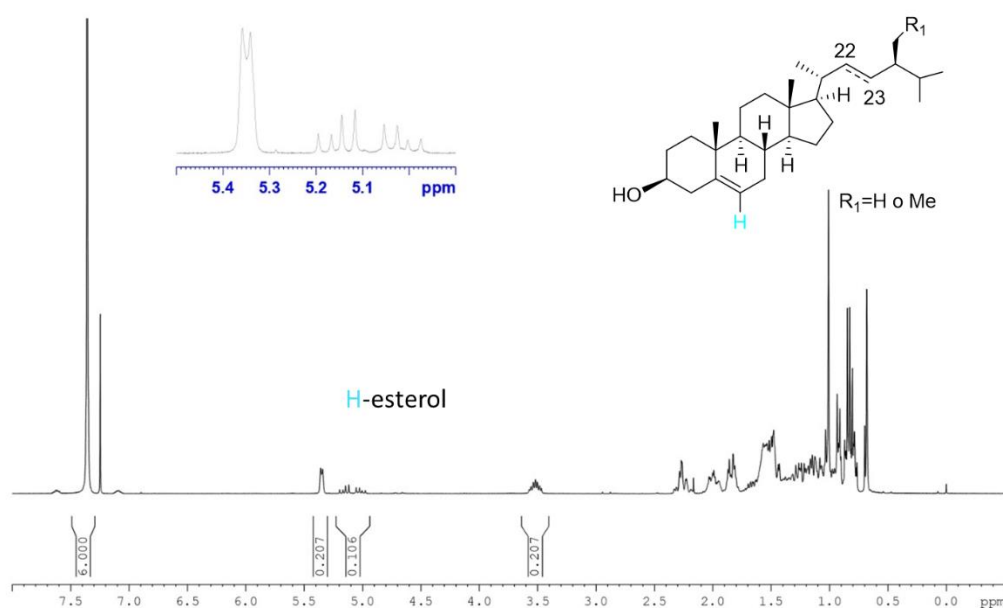


Figura S8. Determinación de pureza de fitosteroles por 1H -cRMN para la Replica 2 empleando benceno como estándar interno y $CDCl_3$ como solvente.

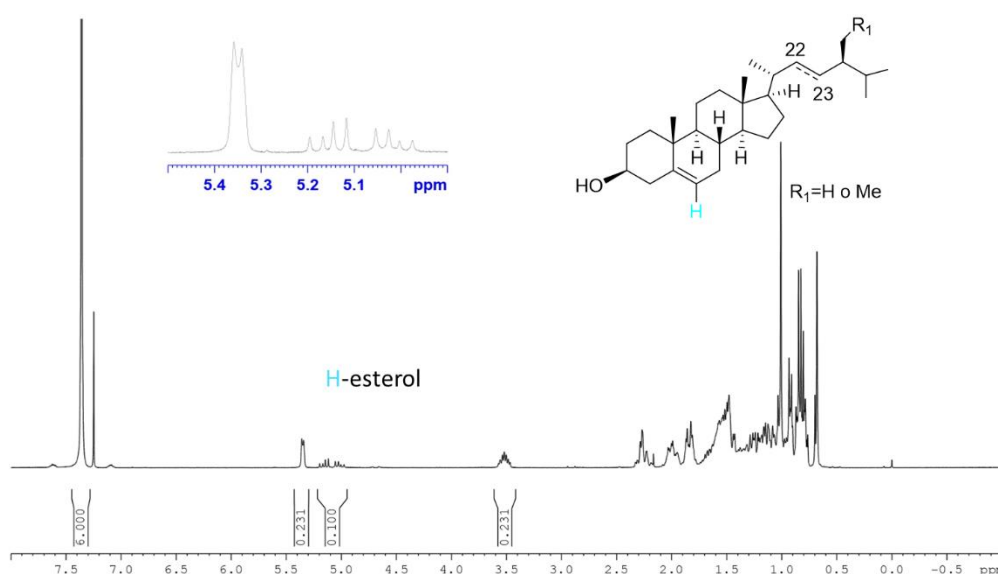


Figura S9. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNC para la Replica 3 empleando benceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

6.6.2.5 Ensayos de pureza mediante CG/EM

Se llevaron a cabo experimentos de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) con estándar interno para calcular la pureza de los fitosteroles obtenidos empleando colesterol como estándar luego de ser derivatizados. El método empleado se describe más arriba (Sección 6.3.4). Las determinaciones de pureza se realizaron comparando las áreas de las señales de colesterol y las de las muestras. Las masas pesadas y las purezas calculadas se describen en la **Tabla S7**, seguidas de los datos de las mediciones GC correspondientes descritos en la **Tabla S8** y los cromatogramas (**Figura S10-Figura S12**).

Tabla S7. Análisis de la pureza de los fitosteroles mediante CG/EM

Réplica	1	2	3
Fitosteroles (mg)	3,21	3,13	3,41
Pureza (%)	98,7	99,9	99,1

Tabla S8. Áreas observadas para los picos considerados en el análisis de pureza

Réplica	1		2		3	
Compuesto	RT (min)	Área	RT (min)	Área	RT (min)	Área
Colesterol	13,326	129686744	13,323	122458495	13,328	121909393
Campesterol	14,403	62266280	14,401	57146478	14,413	60866299
Estigmasterol	14,757	64222755	14,748	59528189	14,754	63693909
β -sitosterol	15,538	154600822	15,531	145468784	15,542	157321353

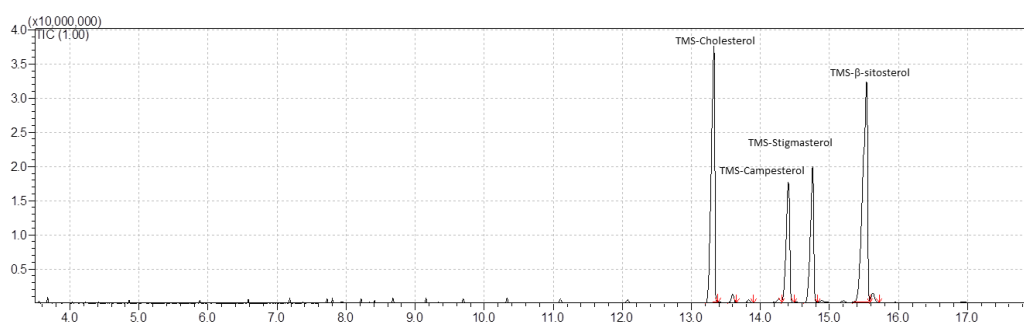


Figura S10. Espectro de GC-MS para la determinación de pureza de la Réplica 1.

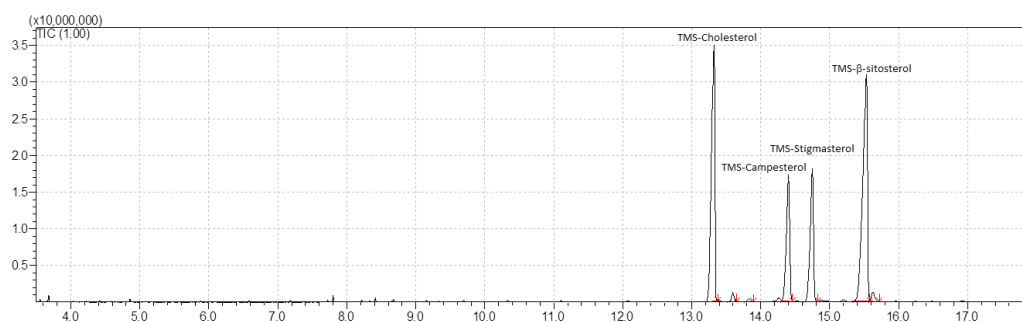


Figura S11. Espectro de la GC-MS para la determinación de pureza de la Réplica 2.

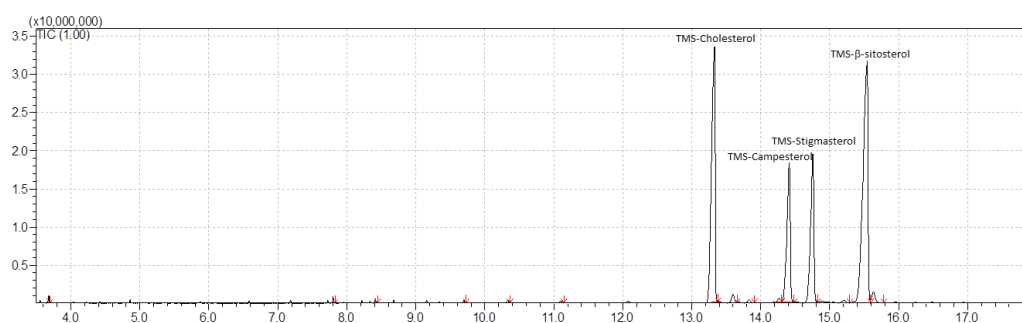


Figura S12. Espectro de la GC-MS para la determinación de pureza de la Réplica 3.

6.6.3 Hidrólisis de SGs en MSA

6.6.3.1 Reacción de hidrólisis a escala de mg

Se suspendieron 50 mg de SGs (0,087 mmol) en 2,5 ml de MSA acuoso de concentración particular a ensayar, en un tubo Hach de 10 ml. La mezcla se calentó a temperatura fija y se agitó a 500 rpm en un termomezclador orbital DLab HM100-PRO. Los fitosteroles se extrajeron con éter etílico (2 × 2 ml). Los extractos orgánicos combinados se filtraron y luego se concentraron utilizando un concentrador paralelo BIOBASE a 40 °C y se pesaron en balanza analítica.

6.6.3.2 Aumento de la concentración de partida de SG

En los ensayos de aumento de la concentración de SGs en la reacción de hidrólisis, se empleó el mismo volumen (2,5 ml) y se emplearon cantidades crecientes de glucósido de partida en ensayos individuales. Se suspendió una cantidad en peso exacta de SGs en 2,5 ml de una solución acuosa de MSA en un tubo Hach de 10 ml. La mezcla se calentó y agitó en un termomezclador orbital D-Lab HM100-PRO. Los fitosteroles se extrajeron con DCM o éter etílico ($2 \times (2 \text{ ml solvente}/100 \text{ mg fitosteroles})$). Los extractos orgánicos combinados se filtraron y luego se concentraron utilizando un concentrador de soplado de nitrógeno paralelo BIOBASE a 40 °C, luego se secaron al vacío y se pesaron en balanza analítica. La reacción se monitorizó por TLC extrayendo una pequeña cantidad del sólido en un tubo de ensayo, se añadió una pequeña cantidad de AcOEt, se neutralizó el ácido de la muestra extraída con NaHCO_3 y se realizó una TLC de la fase orgánica.

6.6.3.3 Hidrólisis de SGs a escala de gramos

Se suspendieron 5 g de SGs (8,72 mmol) en 25 ml de $[\text{MSA}] = 5,42 \text{ M}$ en un tubo de 100 ml con adaptador esmerilado. La mezcla se calentó a 82,1°C durante 25,45 h con un baño de silicona termoestable y bajo agitación mecánica de 1000 rpm utilizando un agitador de hélice Velp Scientifica ES y una hélice de PTFE. Los fitosteroles se separaron del medio de reacción, y ambos se recuperaron, por filtración mediante un papel de filtro y embudo Büchner. Se almacenaron más de 21 ml de medio ácido recuperado (aprox. 85%) para otros ciclos de hidrólisis. Los fitosteroles se lavaron con $\text{NaHCO}_{3(\text{ac})}$ (15 ml), y $\text{H}_2\text{O}_{(\text{dest})}$ hasta alcanzar filtrado incoloro, luego se secaron en estufa de secado al vacío a 60 °C y se pesaron en balanza analítica. La pureza del material se determinó mediante análisis cuantitativo de RMN

Se suspendieron 100 g de SGs (0,174 mol) en 250 ml de $[\text{MSA}] = 5,42 \text{ M}$ en un balón de tres bocas de 1000 ml con adaptador esmerilado. La mezcla se calentó a 82 °C durante 25,45 h con un baño de silicona termoestable y bajo agitación mecánica de 1000 rpm utilizando un agitador de hélice Velp Scientifica ES y una hélice de PTFE. Los fitosteroles se separaron del medio de reacción, y ambos se recuperaron, por filtración mediante un papel de filtro y embudo Büchner. Se almacenaron más de 220 ml de medio ácido recuperado (aprox. 90%) para otros ciclos de hidrólisis. Los fitosteroles se lavaron con $\text{NaHCO}_{3(\text{ac})}$ (150 ml), y $\text{H}_2\text{O}_{(\text{dest})}$ hasta alcanzar filtrado incoloro ($3 \times 150 \text{ ml}$) y separaron de las aguas de lavado mediante centrifugado durante 10 min. Luego se secaron en estufa de secado al vacío a 60°C y se pesaron en balanza granataria. La pureza del material se determinó mediante análisis cuantitativo de RMN

6.6.3.4 Optimización de la superficie respuesta mediante una red neuronal basada en MATLAB

El Código de la red neuronal (OPT_RBF) se descargó de la página del grupo del Prof. Alejandro Olivieri, alojada en la solapa Química Analítica de la página del Instituto de Química Rosario. (<https://www.iquir-conicet.gov.ar/2022/10/03/quimiometria-analitica/>)

El mismo se corrió en la plataforma MATLAB sin modificaciones analizando los mismos datos que empleamos en DesignExpert. Se predijo la función deseabilidad con las mismas consideraciones antes descritas (**3.2.3.3** Diseño de superficie respuesta). A continuación, se describen los parámetros encontrados y se grafica las predicciones de residuos (**Figura S13**), así como a la función deseabilidad y una superficie de nivel para la respuesta, considerando $t=25,45$ h (**Figura S14**).

-Máximo de la función Deseabilidad optimizada: 0.6268

Valores asociados a este valor de la función Deseabilidad:

- Respuesta 1: 34,5572 mg

-Factores para maximizar la Deseabilidad:

- Temperature: 81,4 °C
- [MSA]: 5,4 M
- Time: 25,9 h

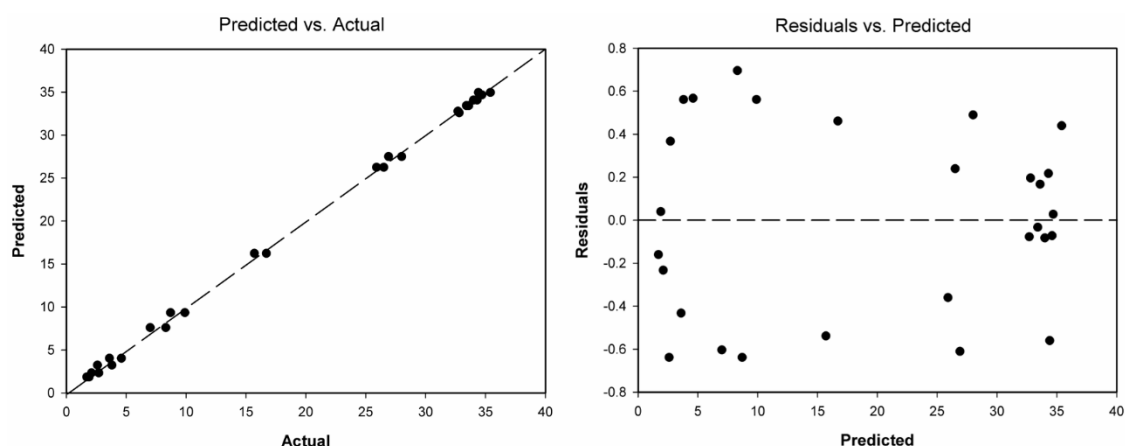


Figura S13. Predicción de la respuesta para la hidrólisis de SGs mediante redes neuronales artificiales. (izquierda) Valor obtenido de la masa aislada frente a la respuesta predicha; (derecha) Análisis de diagnóstico residual de la masa aislada.

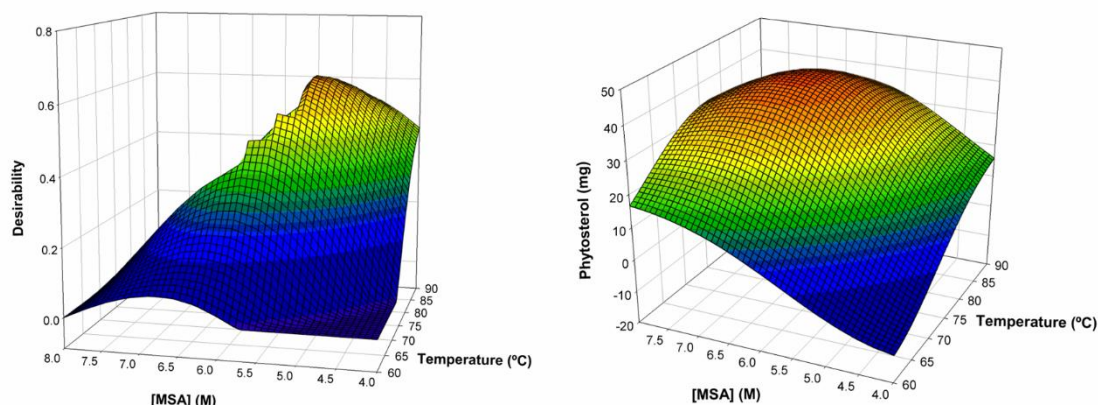


Figura S14. Superficies de respuesta ajustadas mediante un modelo cuadrático. Tanto la superficie correspondiente a la función de deseabilidad (izquierda) como la de la masa de fitosteroles aislados (derecha) se modelaron para $t = 25,45$ h.

6.6.3.5 Ensayos de pureza mediante RMNc

Se utilizó un método de ^1H -RMN cuantitativo (RMNc) para determinar la pureza de los fitosteroles obtenidos. Brevemente, se disolvió una cantidad exactamente pesada de fitosteroles en 500 μl de CDCl_3 y se utilizó 1,3,5-trimetoxibenceno como patrón interno. Este patrón se empleó en reemplazo del benceno dado que tiene mejores cualidades como patrón interno, a saber, alto punto de ebullición, baja presión de vapor, baja reactividad y alto grado de pureza, entre otras. En efecto, el 1,3,5-trimetoxibenceno es uno de los estándares recomendados por SigmaAldrich para técnicas de RMNc.²¹⁹ Se adquirieron espectros ^1H (128 scans) en un resonador Bruker Avance II 300 MHz utilizando CDCl_3 como solvente. El cálculo de la pureza se realizó comparando el área de la señal de los protones aromáticos del 1,3,5-trimetoxibenceno (6,09 ppm, s, 3H) y el área del protón C3-H del anillo A de los restos de esterol (~3,52 ppm, m, 1H). Las masas y la pureza de cada reacción se describen en la **Tabla S9**, seguidas de los correspondientes espectros ^1H -RMNc (**Figura S15-Figura S17**).

Tabla S9. Pureza de fitosteroles medida por RMNc

Réplica	1	2	3
Fitosteroles (mg)	3,48	3,11	3,34
1,3,5-trimetoxibenceno (mg)	0,92	1,27	1,32
Pureza (%)	99,7	99,3	99,0

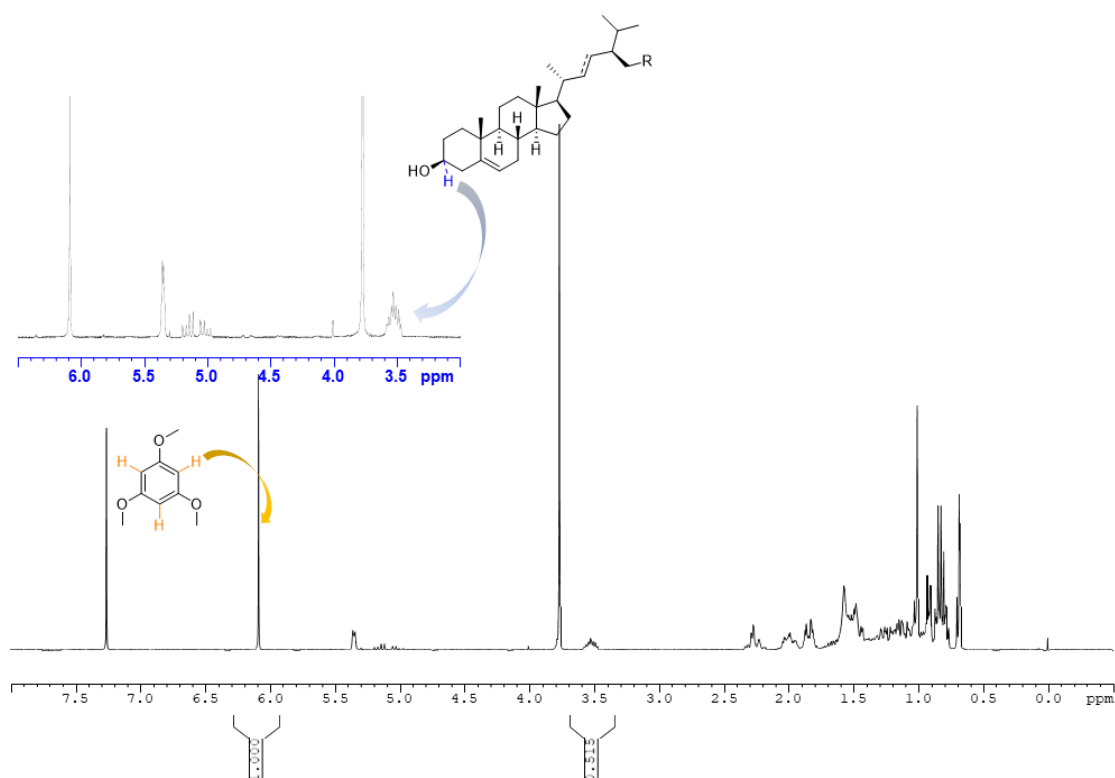


Figura S15. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 1 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

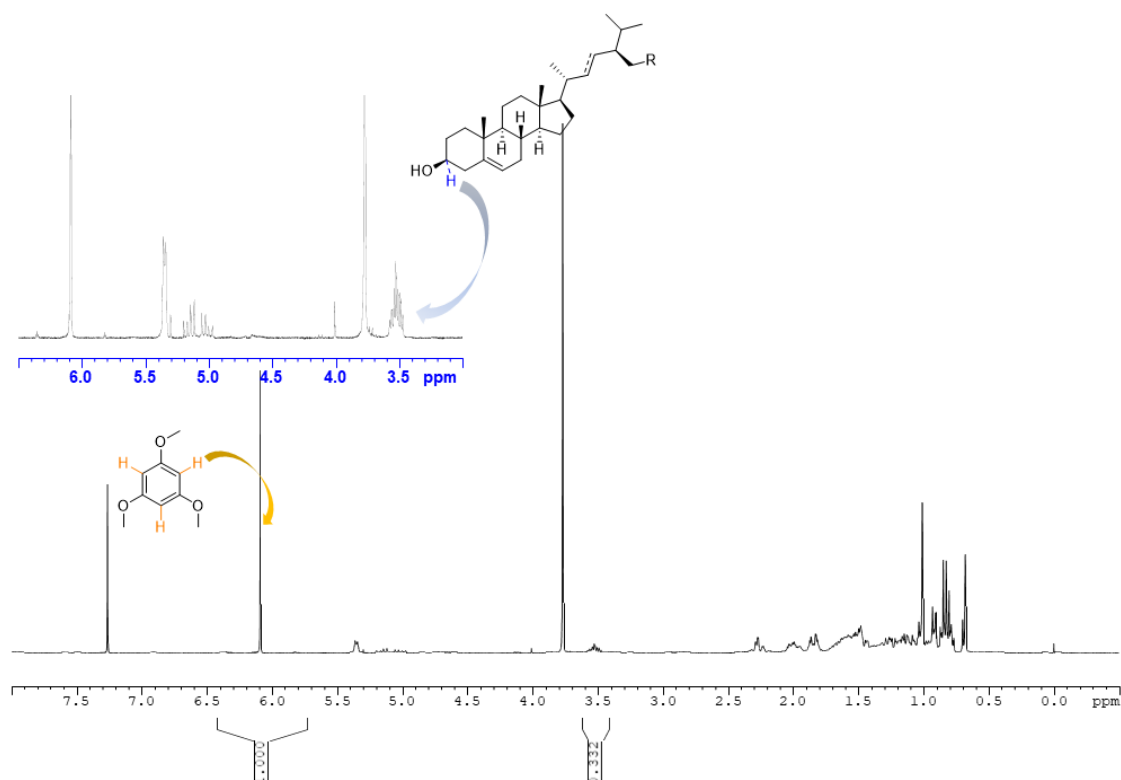


Figura S16. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 2 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

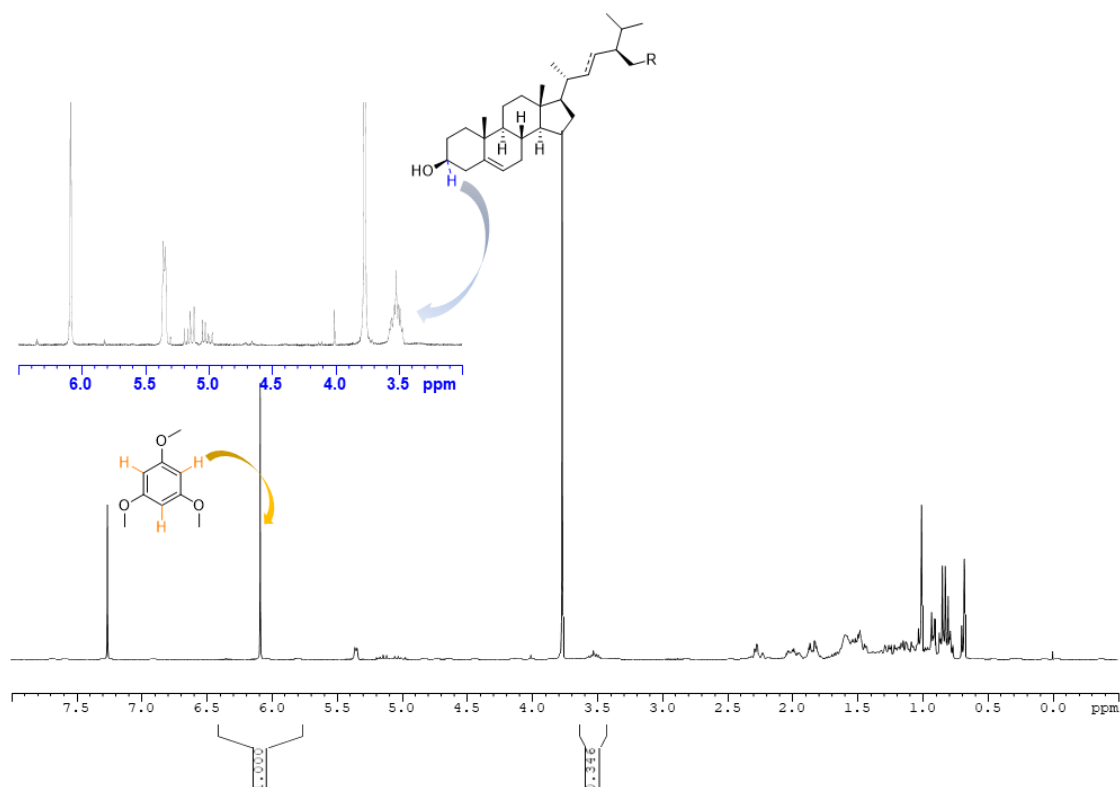


Figura S17. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 3 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

Se utilizó un método similar de ^1H -RMN cuantitativo (RMNc) para determinar la pureza de los fitosteroles obtenidos a mayor escala. Brevemente, se disolvieron 2,53 mg y 3,21 mg de fitosteroles (Réplica 1 y 2, respectivamente), en 1,3 ml de CDCl_3 de forma independiente. Del mismo modo se disolvieron 6,17 mg de 1,3,5-trimetoxibenceno como patrón interno.²¹⁹ Se prepararon soluciones por triplicado empleando 400 μl de la solución de analito junto a 100 μl de la solución de patrón interno, mezclándolos en un tubo de RMN. Se adquirieron espectros ^1H (128 barridos) en un resonador Bruker Avance II 300 MHz utilizando CDCl_3 como solvente. El cálculo de la pureza se realizó comparando el área de la señal de los protones aromáticos del 1,3,5-trimetoxibenceno (6,09 ppm, s, 3H) y el área del protón olefínico endocíclico de los restos de esterol (~5,35 ppm, m, 1H). Las masas y la pureza de cada reacción se describen en la **Tabla S10**, seguidas de los correspondientes espectros ^1H -RMNc (**Figura S18-Figura S23**).

Tabla S10: Pureza de fitosteroles medida por RMNc

Réplica	1	2
Fitosteroles (mg)	2,53	3,21
1,3,5-trimetoxibenceno (mg)	6,17	
Experimento 1 (área)	0,1196	0,1515
Experimento 2 (área)	0,1190	0,1512
Experimento 3 (área)	0,1201	0,1490
Pureza* (%)	99,1	98,4

*Resultado del promedio de tres experimentos

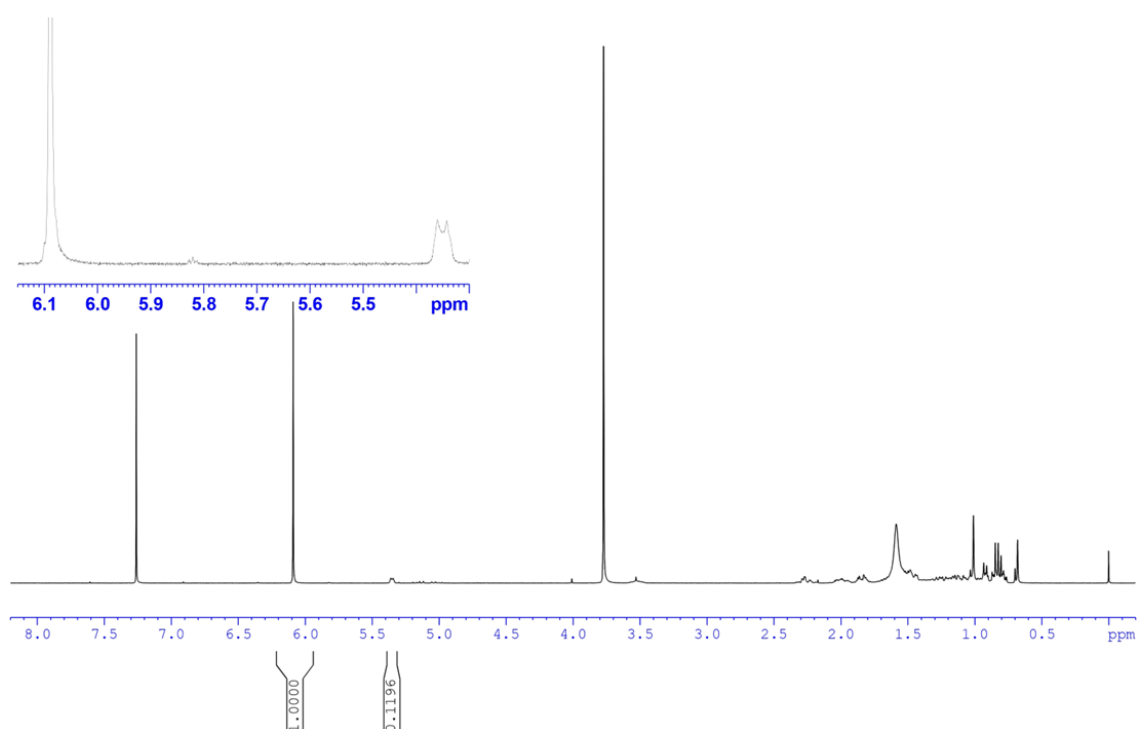


Figura S18. Determinación de pureza de fitosteroles por ¹H-RMNc para la Réplica 1 (Experimento 1) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl₃ como solvente.

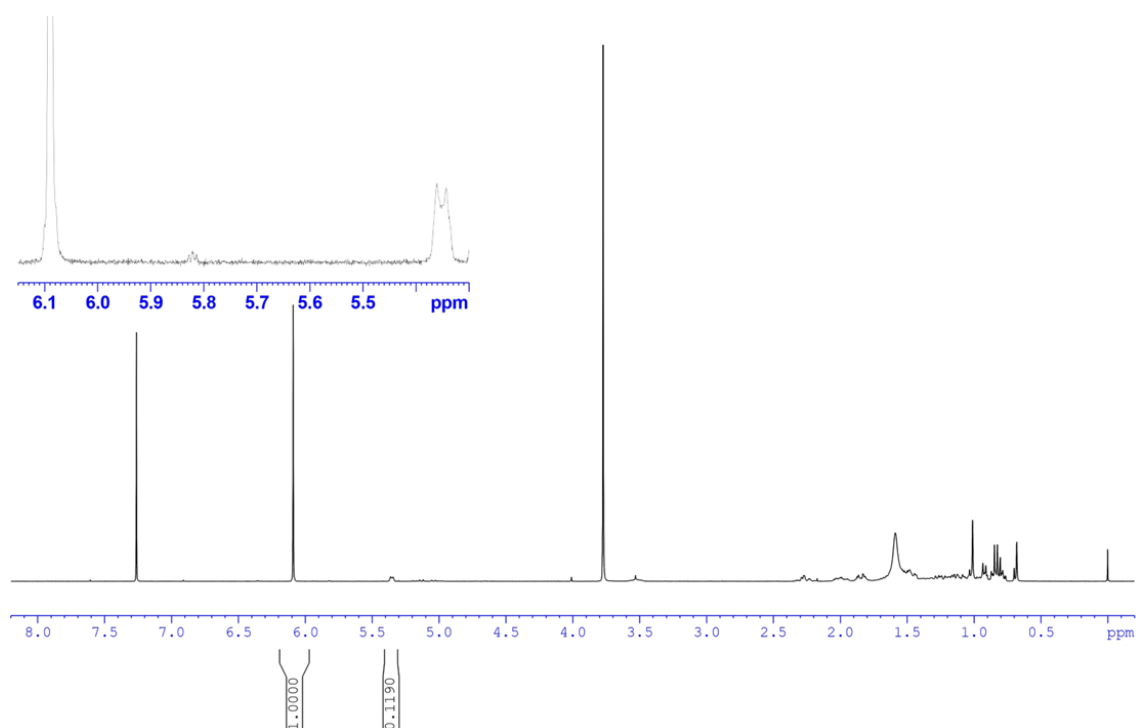


Figura S19. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 1 (Experimento 2) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

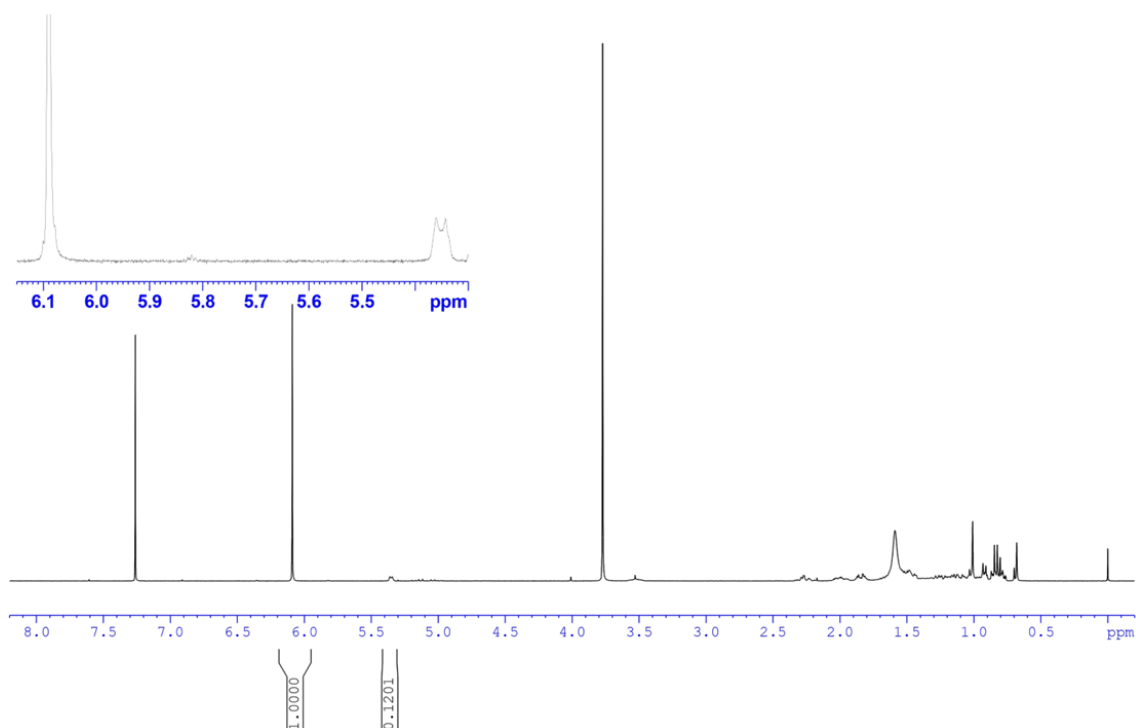


Figura S20. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 1 (Experimento 3) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

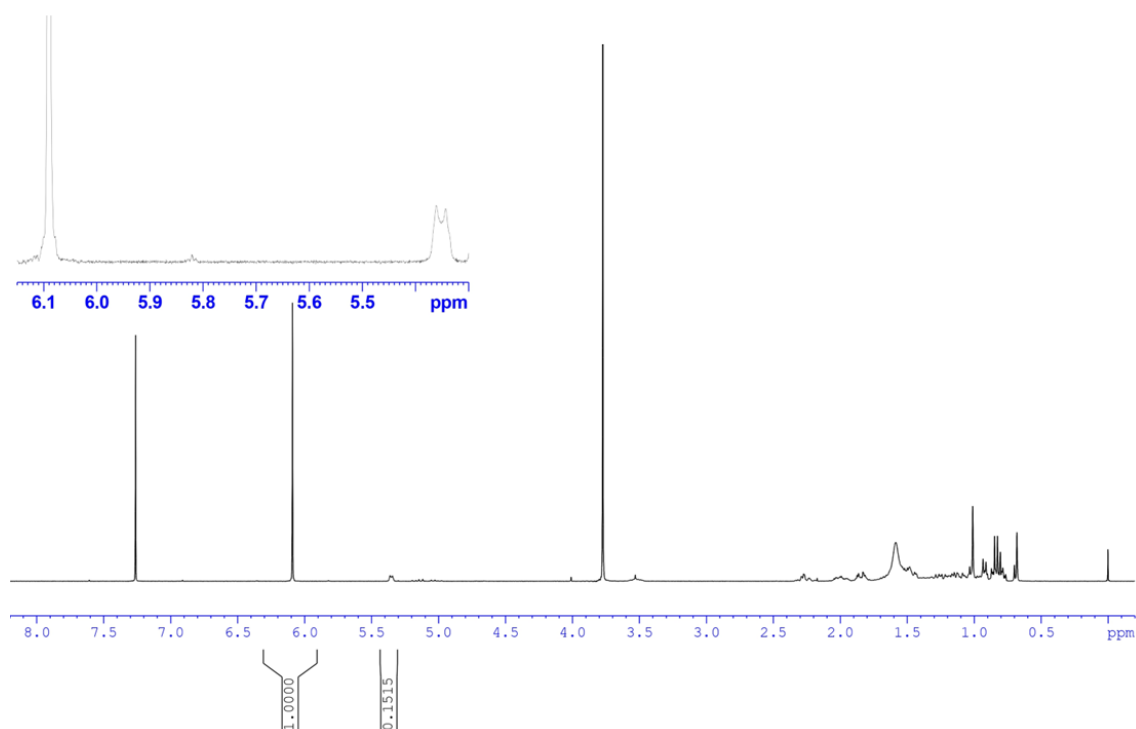


Figura S21. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 2 (Experimento 1) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

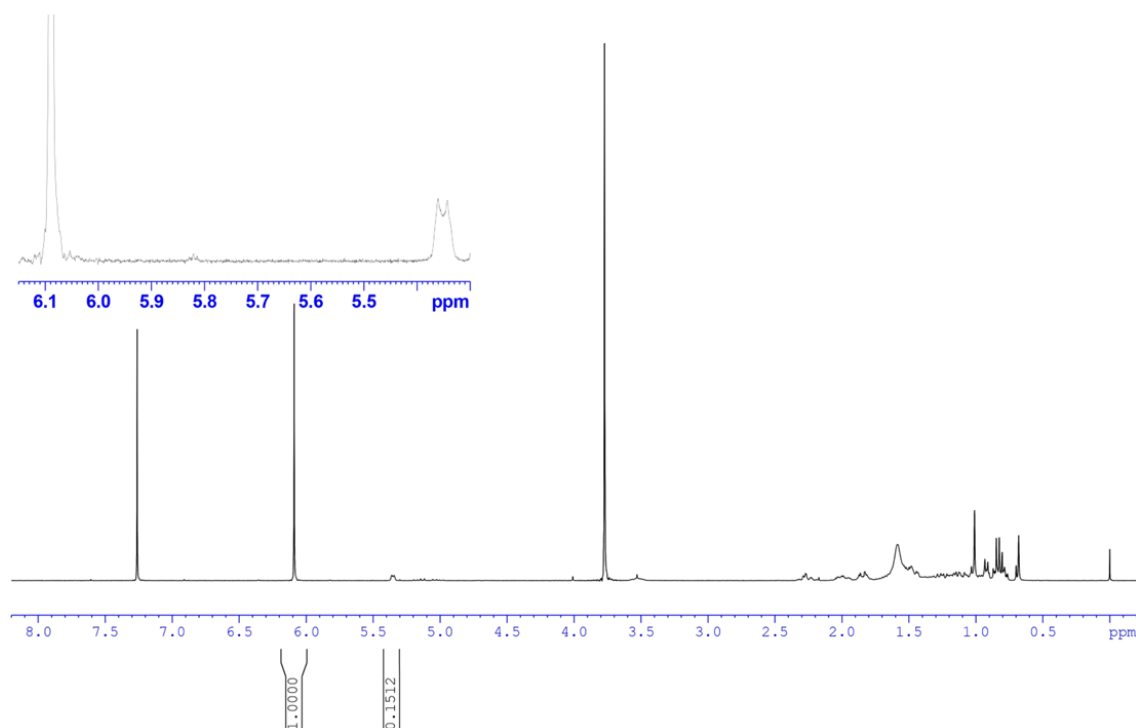


Figura S22. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 2 (Experimento 2) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

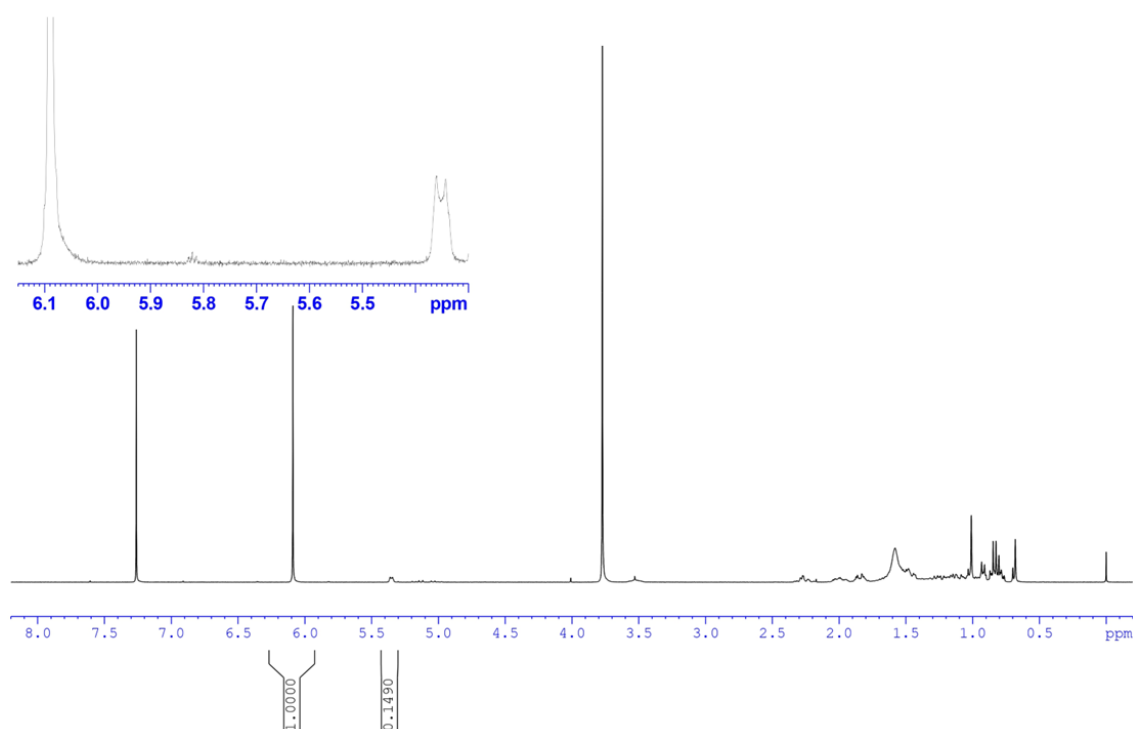


Figura S23. Determinación de pureza de fitosteroles por ^1H -RMNc para la Réplica 2 (Experimento 3) empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

6.6.3.6 Cálculo de *E*-factors

Se realizaron los cálculos de los *E*-factors para tres métodos diferentes, teniendo en cuenta los residuos acumulados generados durante las etapas clave de la recuperación de fitosteroles. Además de la evaluación exhaustiva de los residuos líquidos y sólidos, en los cálculos de *E*-factors se tuvieron en cuenta simultáneamente las cantidades de solventes y agua utilizadas. Los procedimientos para calcular los *E*-factors de los procesos para depósitos insolubles de tanques de BD, barros del desodorizado de aceites,¹⁶¹ y el *tall oil*¹⁶² del tratamiento de celulosa se describieron tal y como se documentan en la bibliografía. El análisis cualitativo del consumo de energía incluyó la evaluación de las temperaturas empleadas en cada etapa y la utilización de procesos de alto vacío. Se asignó una etiqueta cualitativa que indica consumos de energía bajo (*), alto (***) o muy alto (****). Se calcularon los consumos referidos a la producción de 1 kg de fitosteroles puros (*M*ref), considerando kg o l según haya sido informado en las técnicas consideradas.

Método 1: Fondo de tanque de BD			
Paso 1	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Depósitos insolubles de BD	13.81	kg	~5 L de BD recuperados Recuperado
Hexano (δ.rel=0,66)	21.49	l	
Energía	*		
Producto obtenido: Torta	5.53	kg	
Paso 2	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Torta obtenida	5.53	kg	Recuperado Temperatura 80°C
MeOH (δ.rel=0,79)	3.53	l	
Energía	*		
Producto obtenido: SGs	1.45	kg	
Paso 3	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
SGs	1.45	kg	Recuperado Temperatura 80°C
Agua	5.42	l	
Ácido metansulfónico (δ.rel=1,35)	4.00	l	
Energía	*		
NaHCO ₃	0.22	kg	
Producto obtenido: Fitosteroles	1.00	kg	
Pureza	99	%	

Método 2: Barros del desodorizado			
Paso 1a	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Barros del desodorizado	18.62	kg	AGs recuperados
Energía	***		Temperaturas > 100°C
Producto obtenido	7.37	kg	
Paso 1b	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Barros del desodorizado sin AGs	19.93	kg	
Hexano (δ .rel=0,66)	119.59	L	
NaOH	1.87	kg	
Agua	39.86	L	
EtOH (δ .rel=0,79)	39.86	L	
Citric Acid	0.35	kg	
Producto obtenido	7.37	kg	
Paso 2	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Residuo sin AGs	7.37	kg	
Anhídrido benzoico (90%)	0.32	kg	
Energía	***		
Producto obtenido	7.70	kg	
Paso 3	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Ésteres de fitosteroles (22,1%)	7.70	kg	Tocoferoles recuperados
Energía	***		Temperaturas > 100°C
Producto obtenido	5.88	kg	
Paso 4	Mref		
Recurso	cantidad	unidad	Observaciones
Ésteres de fitosteroles (28.72%)	5.88	kg	
MeOH (δ .rel=0,79)	11.76	L	
Na	0.07	kg	
AcOH(cc) (δ .rel=1.05)	0.29	L	
Hexano (δ rel=0,66)	5.29	L	
Energía	***		Temperaturas > 100°C
Producto obtenido: Fitosteroles	1	kg	
Pureza	96%		

Método 3: <i>Tall Oil</i>					
Paso 1			Mref		
Recurso	cantidad	unidad	cantidad	unidad	Observaciones AGs y resinas recuperadas; Temperaturas > 100°C
<i>Tall Oil</i> crudo	21772.43	kg	64.96	kg	
Energía	***				
Producto obtenido	2373.20	kg	7.08	kg	
Paso 2			Mref		
Recurso	cantidad	unidad	cantidad	unidad	Observaciones
<i>Tall oil</i> remanente	0.861	kg	7.08	kg	Temperaturas > 100°C
NaOH	0.172	kg	1.41	kg	
Agua	0.64	L	5.26	L	
Energía	***				
H ₃ PO ₄ (85%)	0.124	kg	1.02		Autoclavado
Energía	***				
Producto obtenido	0.879	kg	7.23	kg	
Paso 3			Mref		
Recurso	cantidad	unidad	cantidad	unidad	Observaciones
Residuo modificado	3500	kg	7.23	kg	Temperaturas 250°C ~1mbar de vacío
Energía	*****	J			
Producto obtenido	2333.33	kg	4.82	kg	
Paso 4			Mref		
Recurso	cantidad	unidad	cantidad	unidad	Observaciones
Residuo al 40%	0.04	kg	4.82	kg	Temperatura 65°C
MeOH:IPA (80:20)	0.11	kg	13.25	kg	
Energía	*				
Producto obtenido:					
Fitosteroles	0.0083	kg	1.00	kg	
Pureza	96%				

6.6.4 Síntesis formal de metiléter interno de 22-OH-23,24-nor-colesterol

6.6.4.1 Síntesis de derivados sulfonilados

Se disolvieron 500 mg (1,22 mmol, 1 eq.) de los fitosteroles aislados en 6 ml del solvente, y se hicieron reaccionar con 1,5 eq. del cloruro de sulfonilo correspondiente en presencia de 2 eq. de TEA. Se monitoreo la formación del correspondiente sulfonato de fitosterilo por cromatografía de capa delgada (TLC). Las cuatro condiciones evaluadas fueron llevadas a cabo por duplicado a temperatura ambiente, con agitación orbital empleando un termomezclador orbital DLab HM-100PRO.

En el caso en que se usó MsCl el tiempo de las reacciones se fijó en 2 horas, mientras que las de TsCl se continuaron por más de 20 horas. Una vez finalizada la reacción, se realizó

una extracción líquido-líquido de los productos de reacción obteniéndose un sólido rojo en el caso de las reacciones en DCM y un sólido amarillento en aquellas donde se empleó Et₂O.

Tabla S11

Entrada (duplicados)	Cloruro de sulfonilo	Solvente	Masa Aislada	
1/1'	MsCl	DCM	538,1	593,5
2/2'	MsCl	Et₂O	586,8	556,8
3/3'	TsCl	DCM	754,7	794,9
4/4'	TsCl	Et ₂ O	749,9	767,7

Posteriormente se determinó el rendimiento empleando técnicas de ¹H-RMNc (Figura S24-Figura S31). Para ello se mezclaron 4-5 mg del producto aislado del medio de reacción, con 50 µL de una solución de 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno ([Std]=114,8 mM) y se disolvieron en 500 µL de CDCl₃. Se integraron las señales correspondientes a los protones aromáticos del 1,3,5-trimetoxibenceno (6,09 ppm, s, 3H) y al protón unido a C3 (4,52 ppm, m).

Tabla S12

Entrada	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'
Masa (mg)	4,73	3,96	5,41	4,48	5,43	5,55	4,33	4,57
Área analito	1,4161	1,1732	1,6209	1,4170	0,8156	1,2283	0,2164	0,1302
Ms-Fitosteroles (%)	78,7	82,1	83,8	82,6	53,2	73,7	16,5	7,4

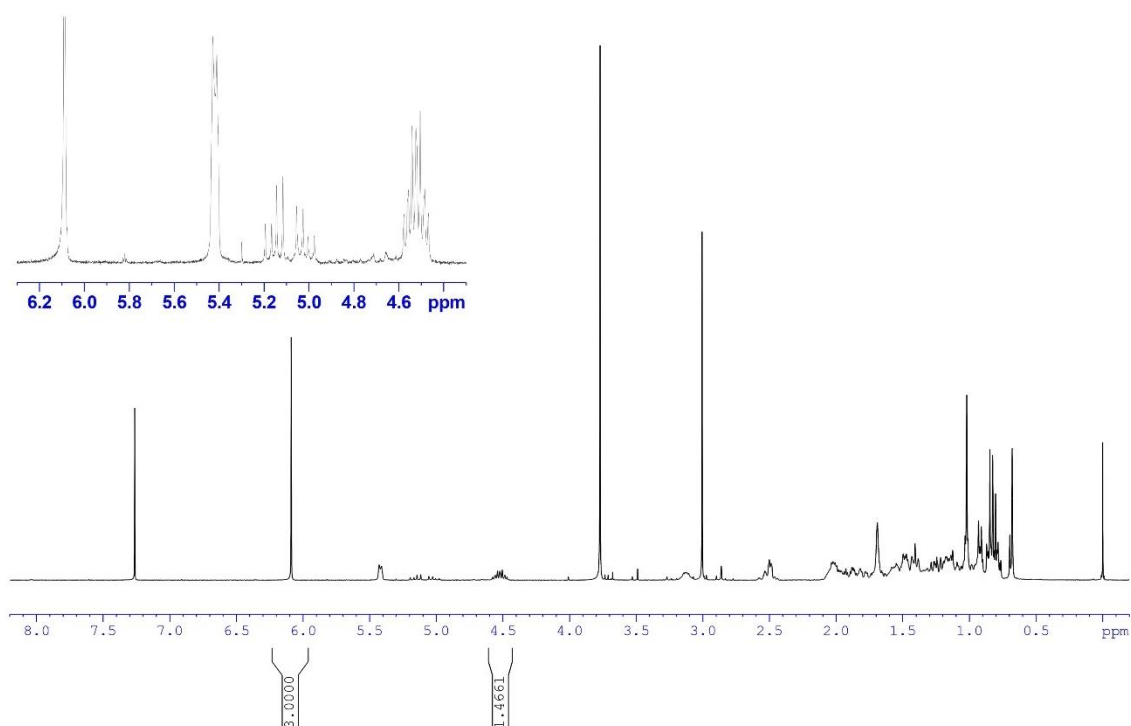


Figura S24. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 1 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

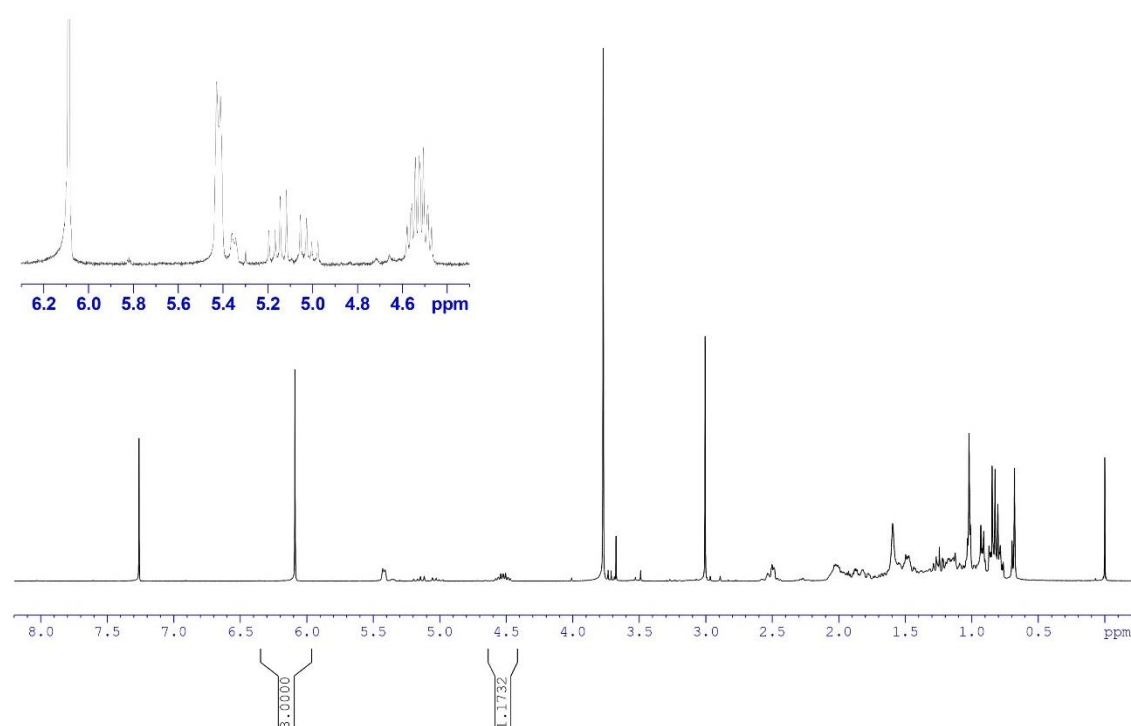


Figura S25. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 1' empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

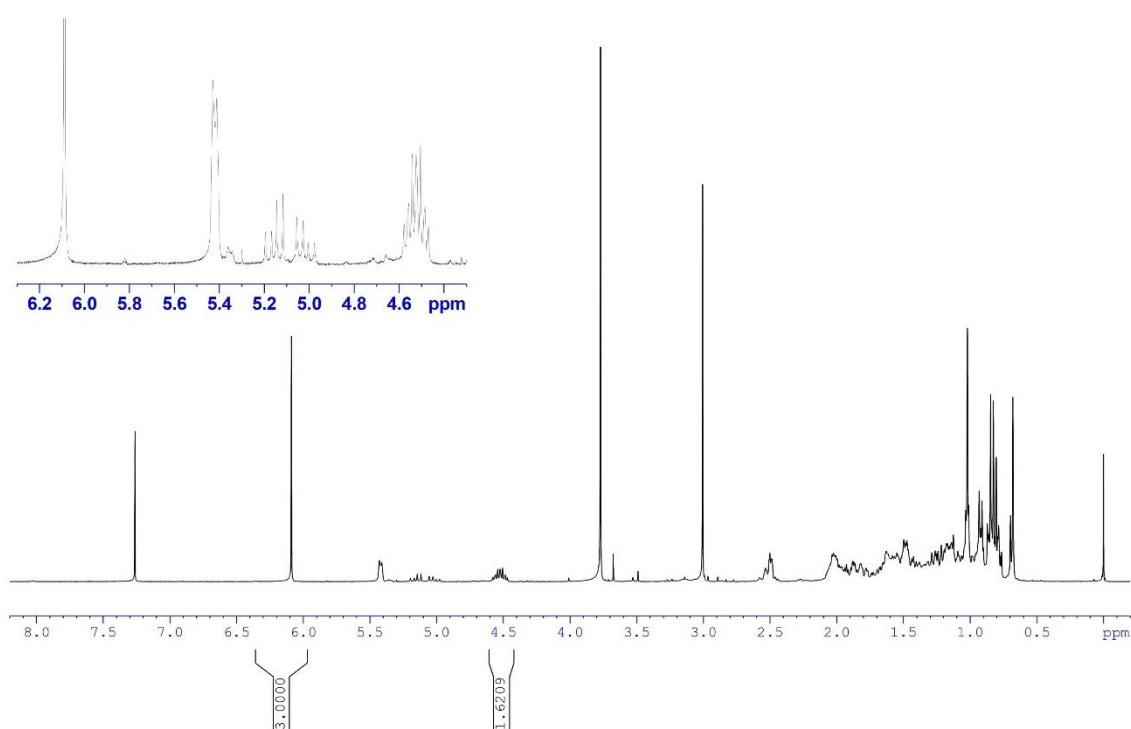


Figura S26. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 2 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

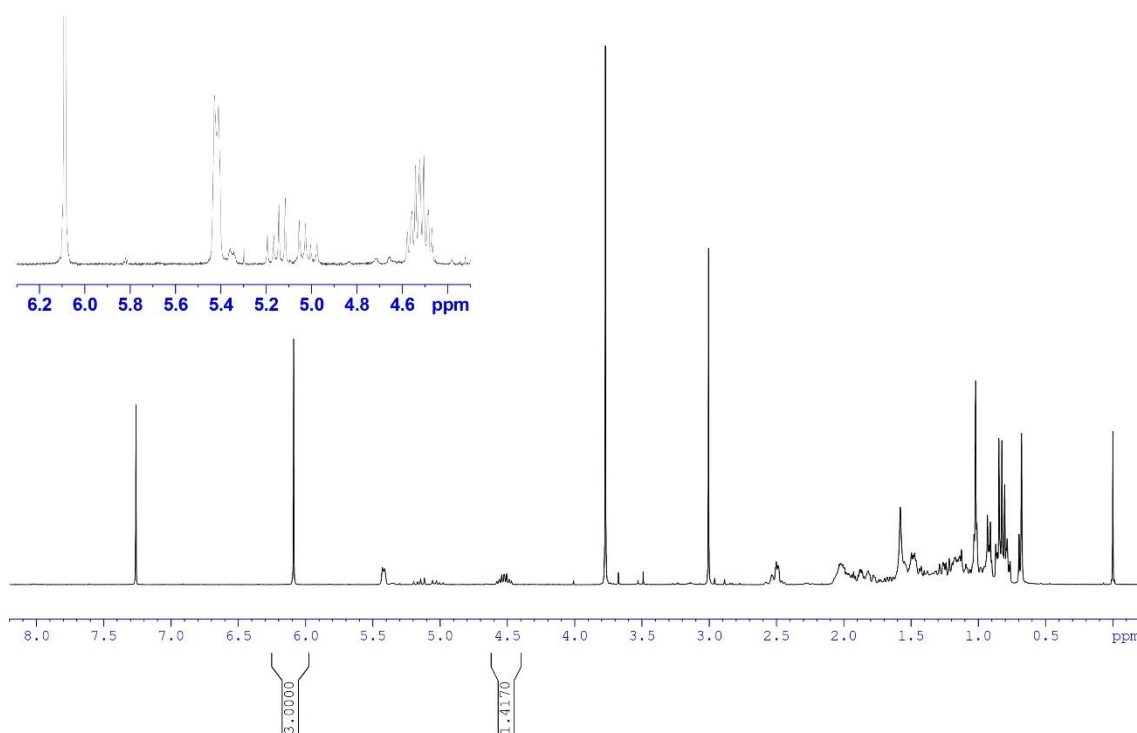


Figura S27. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 2' empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

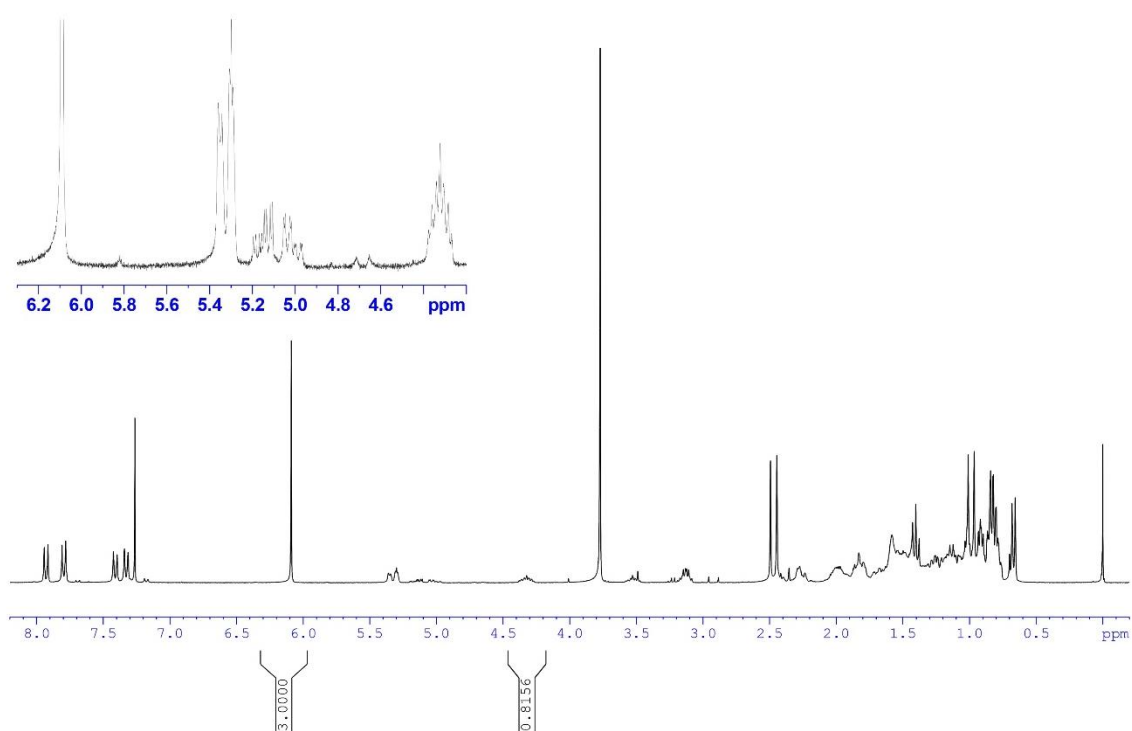


Figura S28. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 3 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

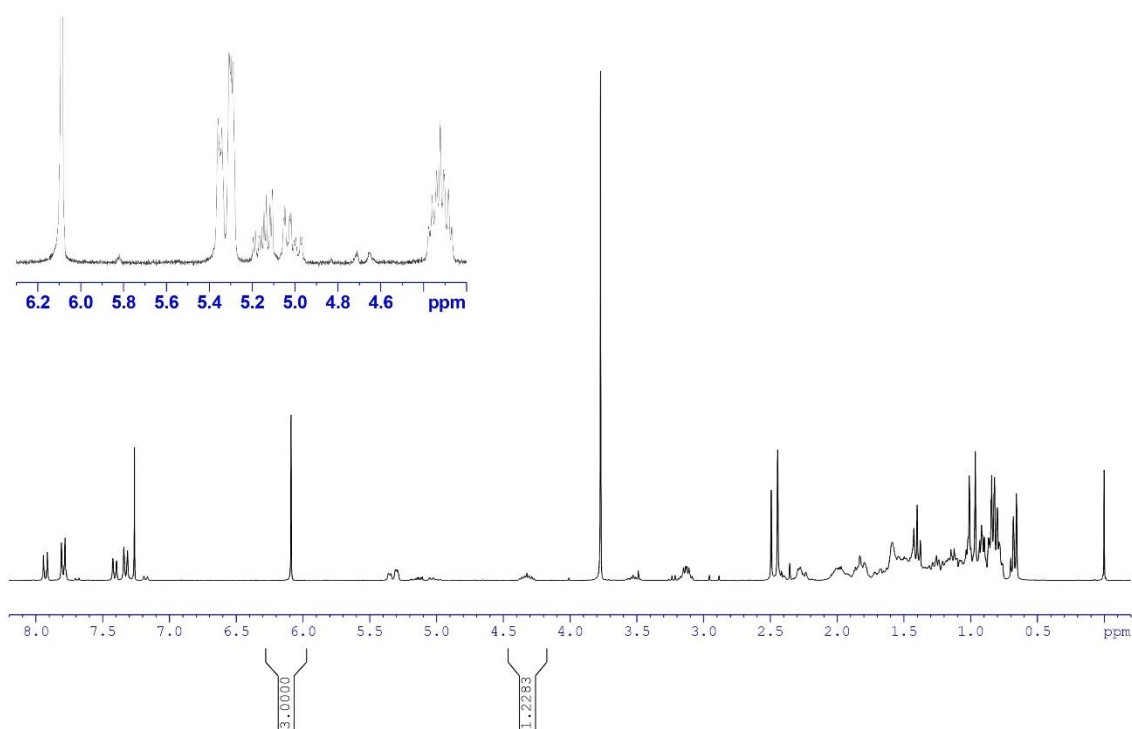


Figura S29. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 3' empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

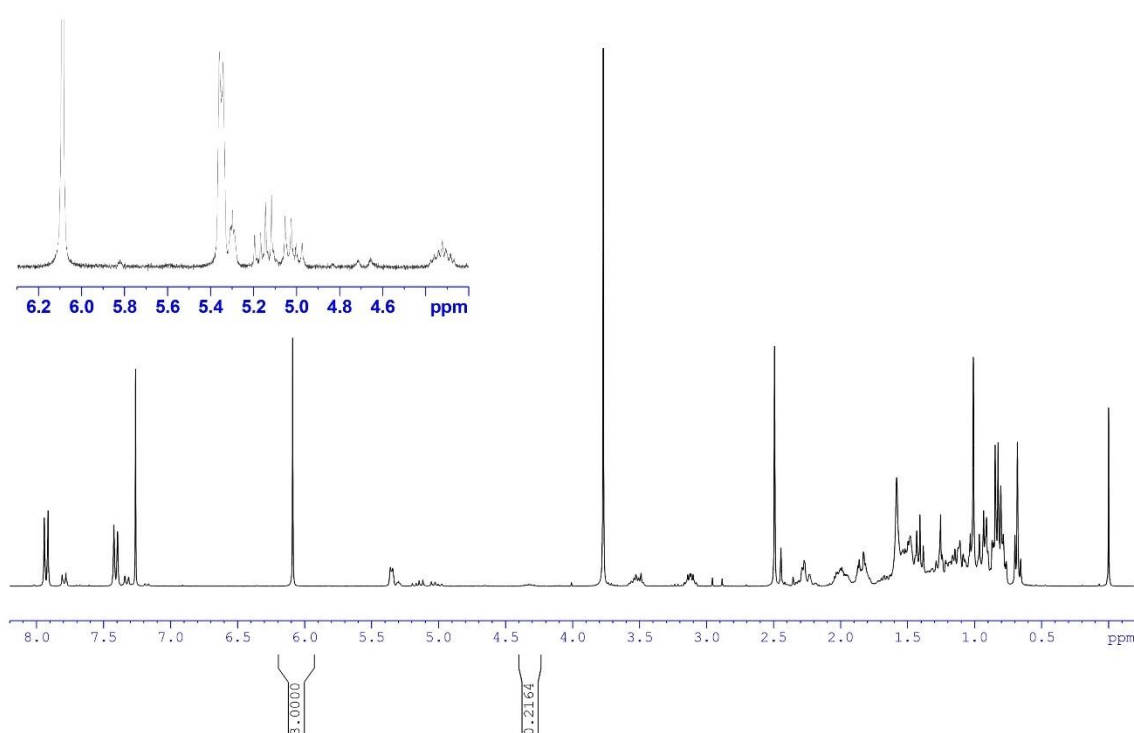


Figura S30. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 4 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

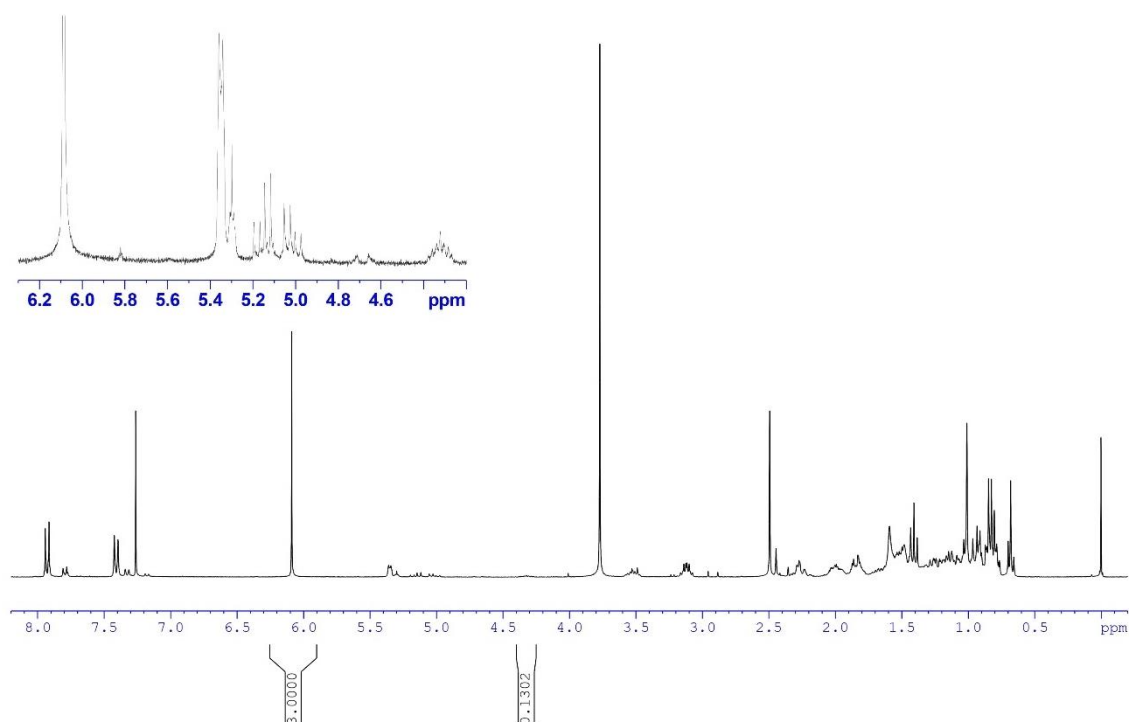


Figura S31. Determinación de pureza de fitosteroles sulfonilado por ^1H -RMNc para la Entrada 4' empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente

6.6.4.2 Síntesis de metil éteres internos derivados de fitosterilo

Se emplearon 57,0 mg de los productos mesilados antes obtenidos como material de partida (49,6 mg, 87% pureza, 0,1 mmol, 1 eq) y se disolvieron en 2 ml de MeOH_(anh) en presencia de 3,6 eq. de la correspondiente base. Las reacciones se mantuvieron a reflujo (~80°C) con agitación orbital (700 rpm) por 6 h empleando un termomezclador orbital DLab HM-100PRO. Una vez cumplido el tiempo, se evaporó el MeOH, se redisolvió la reacción en DCM (5 ml), y se lavó la fase orgánica con agua destilada (10 ml) para eliminar la base empleada. El crudo de reacción fue evaluado por ¹H-RMNc con 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno, en condiciones similares a las antes descritas.

Tabla S13

Entrada	Masa (mg)	Área H-C6=C5	Área H-C6-OMe	Pureza (%)
1	3,99	0,3735	1,0028	62,8
2	4,07	0,1890	1,2630	77,5
3	2,62	0,1349	0,9415	89,8
4	4,76	0,2505	1,4903	78,2

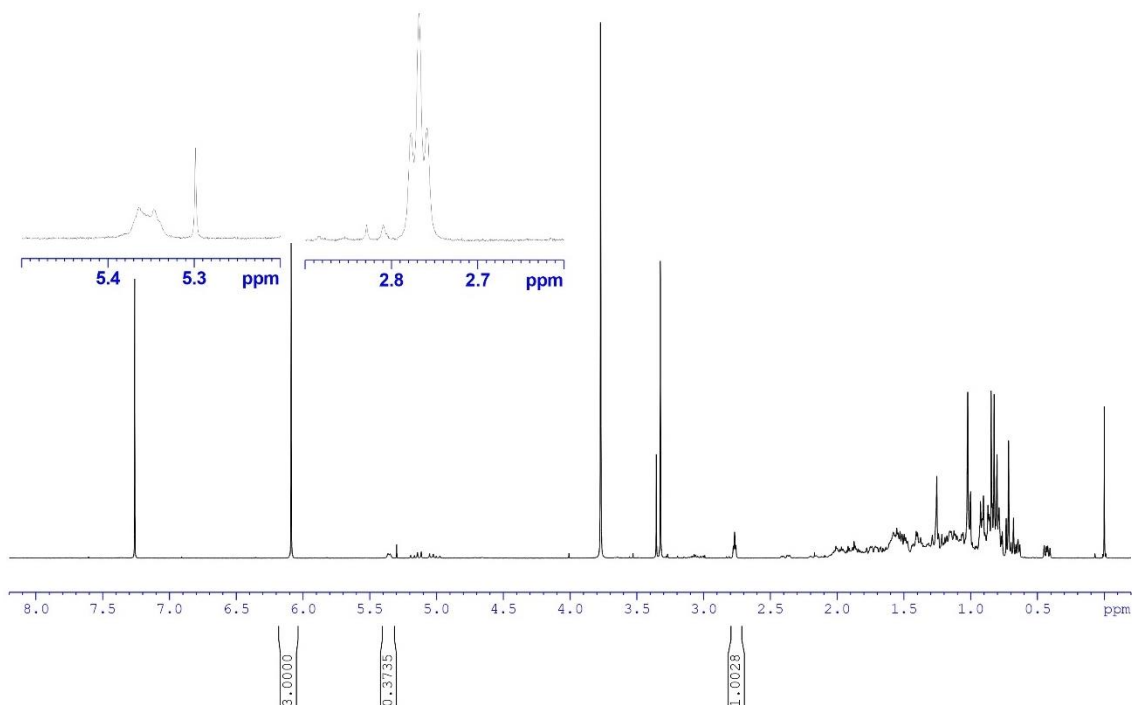


Figura S32. Determinación de pureza de metiléteres internos de fitosterilo por ¹H-RMNc para la Entrada 1 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl₃ como solvente.

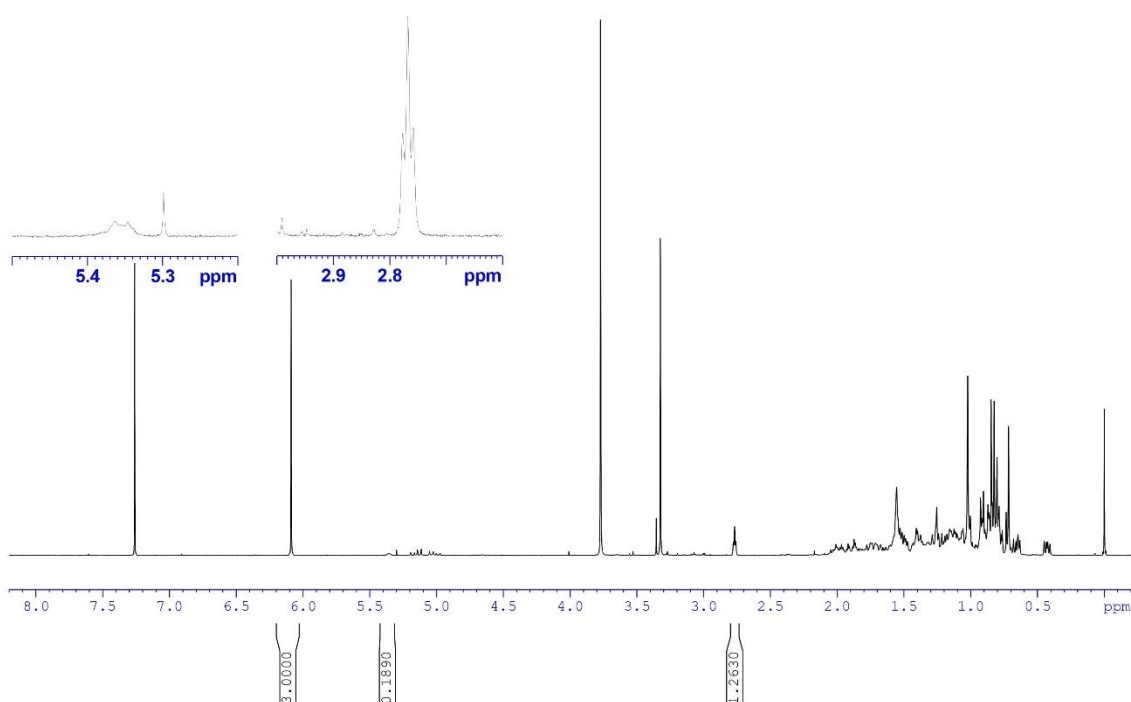


Figura S33. Determinación de pureza de metiléteres internos de fitosterilo por ^1H -RMNc para la Entrada 2 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

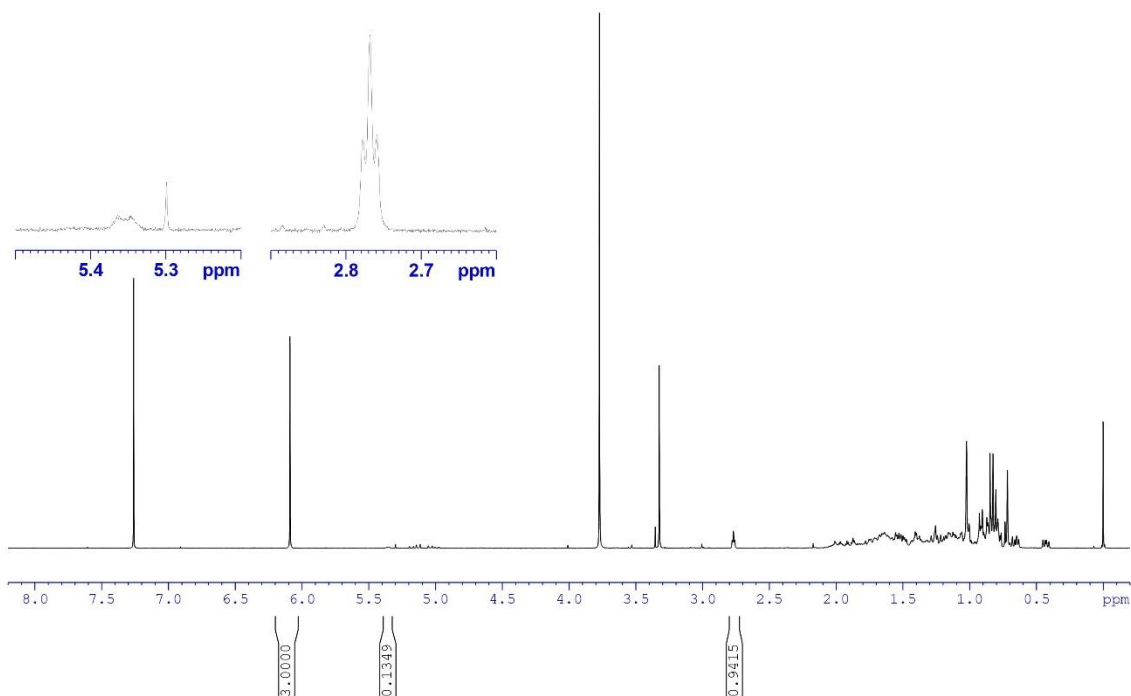


Figura S34. Determinación de pureza de metiléteres internos de fitosterilo por ^1H -RMNc para la Entrada 1 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

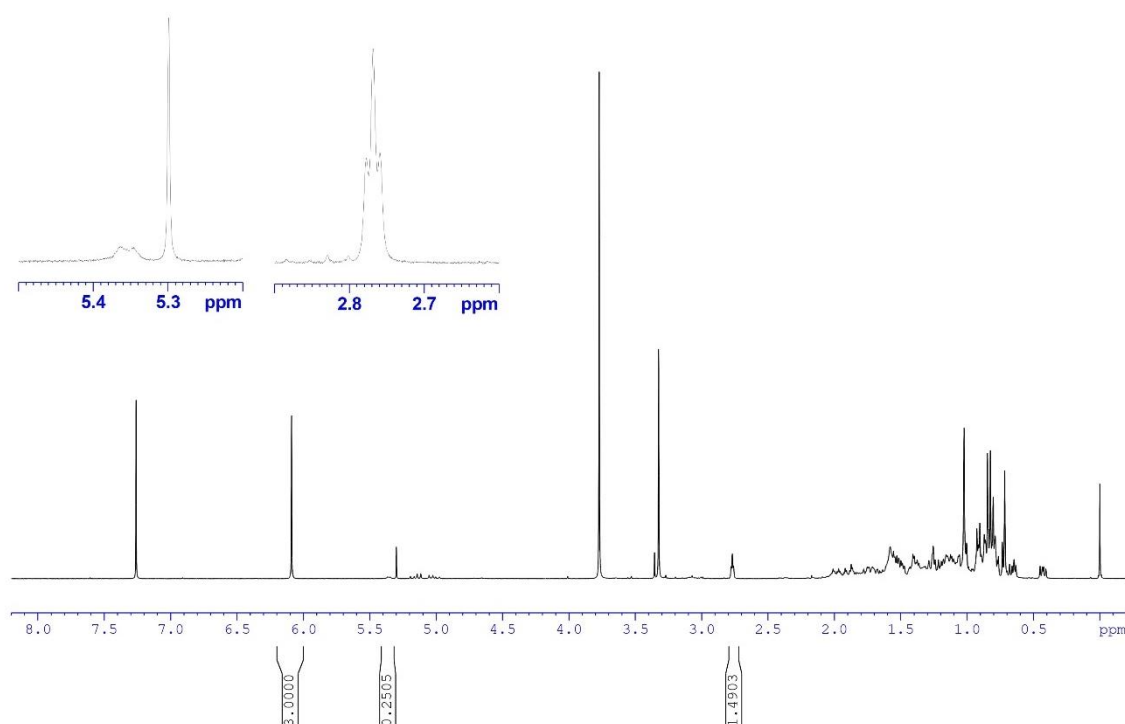


Figura S35. Determinación de pureza de metiléteres internos de fitosterilo por ^1H -RMNc para la Entrada 4 empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

Alternativamente se escaló la reacción de protección del doble enlace endocíclico de la mezcla de fitosteroles de 0,5 g a 5,0 g, y paralelamente se evaluó la protección de estigmasterol comercial (95% pureza). Por un lado, se pesaron 5 g de la mezcla de fitosteroles (12,2 mmol), se disolvieron en un balón de 100 ml, conteniendo 75 ml de $\text{Et}_2\text{O}_{(\text{anh})}$, se agregó 2,5 eq de TEA y finalmente se adicionaron 2 eq. de MsCl . Luego de transcurridas 2 h de la reacción a temperatura ambiente, se transvasó la reacción a ampolla de decantación y se frena el avance de la misma con el agregado de 75 ml de agua destilada. Tras realizar la extracción correspondiente con solvente orgánico, se obtuvo un sólido tras evaporar dicho solvente que se analizó por RMN mostrando mayoritariamente un solo producto lo que nos hizo decidir continuar la síntesis sin mayores purificaciones. Se sometió entonces el sólido aislado a una metanólisis ($\sim 0,2$ M) empleando 3 eq de $\text{K}_2\text{CO}_{3(\text{anh})}$ a reflujo, durante 2 h. Tras la reacción, se evaporó el MeOH de la reacción, se redisolvió en solvente orgánico y se lavó la fase orgánica con agua destilada. Posteriormente se purificó el sólido ceroso aislado por cromatografía en columna con un gradiente Hex:AcOEt del 1% para dar 3,78 g de *i*-ME (8,93 mmol, 73% de rendimiento global) de un aceite translúcido. En sendas condiciones se trataron 2,10 g de estigmasterol (95% pureza, 4,83 mmol), y se obtuvieron 1,3039 mg de *i*-EME (3,05 mmol, 63% de rendimiento global).

6.6.4.3 Síntesis de derivado 22-oxo metil éter internos derivado de estigmasterol

Se ensayó la reacción de ozonólisis empleando *i*-estigmasteril metil éter (*i*-EME) para la síntesis del derivado 22-aldehído. Para ello se pesaron 100 mg del producto antes obtenido y se sometió a 2 condiciones de ozonólisis variando el co-solvente empleado. En un caso se empleó 10 ml de DCM:MeOH (2:1) y en otro las clásicas condiciones DCM:Pyr (99:1), ambos a -78°C bajo el paso de una corriente de O_2/O_3 generado *ex situ*. Se dejó reaccionar durante 3 h y 4 h, respectivamente. Luego, tras eliminar el O_3 remanente se agregaron 5 eq de SMe_2 y se dejó evolucionar la reacción a temperatura ambiente durante 10 h.

Luego de realizar una extracción líquido-líquido, lavando la fase orgánica con agua, y purificando por cromatografía en columna empleando un gradiente Hex:AcOEt 2% se recuperaron 1,2 mg y 6,9 mg de *i*-EME, respectivamente. Por lo tanto, las condiciones mostraron 98% y 94% de conversión. Se aislaron 61,2 mg y 62,1 mg respectivamente del producto buscado, correspondiendo a un rendimiento del 75% y 76% para cada condición.

Alternativamente, se escaló la reacción. Partiendo de 922,4 mg de metil éteres internos derivados de fitosterilo (2,15 mmol; 0,54 mmol de *i*-EME) se disolvieron en 15 ml de una mezcla DCM:Pyr (99:1). Se enfrió la mezcla a -78°C y se trató con una corriente de O_2/O_3 generado *ex situ*. Luego, tras eliminar el O_3 con O_2 se evaporó el solvente y se purificó por columna cromatográfica obteniéndose 142,3 mg de un aceite translucido, correspondiente al producto buscado para dar un 76% de rendimiento. Además, se recuperaron 670,8 mg correspondientes a los éteres metílicos internos derivados de β -sitosterol y campesterol.

6.7 Esterilglucósidos peracilados

6.7.1 Síntesis de derivados peracilados asistida por microondas

En un tubo de microondas de 5 ml se adicionó sacarosa o SGs (0,13 mmol y 0,26 mmol, respectivamente), junto a 3 ml de Pyr anhidra, en atmósfera de nitrógeno, y se selló el vial con una tapa con septo de teflón. Se adicionó el cloruro de ácido correspondiente mediante jeringa de vidrio y se procedió a calentar la reacción a 160°C por el tiempo indicado, empleando un reactor de microondas Biotage® Initiator+. Una vez finalizada la reacción se evaporó la Pyr, se redisolvió en 10 ml de Hex:AcOEt 90:10 y se lavó la fase orgánica con 10 ml de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 1M, 10 ml de $\text{H}_2\text{O}_{(\text{dest})}$ y 10 ml de $\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$. Posteriormente se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se evaporó el solvente y se purificó el producto por cromatografía en columna para dar los productos peracilados buscados.

6.7.2 Síntesis de derivados peracilados en condiciones mecanoquímicas

En un vial de vidrio de 20 ml se adicionó sacarosa o SGs (0,13 mmol y 0,26 mmol, respectivamente), junto a 45 esferas de vidrio de 3 mm de diámetro. Se adicionaron 150 μ l de Pyr anhidra y se tapó el vial con una tapa a rosca. Se agitó mediante un agitador orbital a 2000 rpm durante 3 min. Posteriormente se abrió el sistema y se adicionó el cloruro de ácido correspondiente y se procedió a agitar la reacción por el tiempo indicado a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de agitación se resuspendió la mezcla de reacción en 10 ml de Hex:AcOEt 90:10 y se lavó la fase orgánica con 10 ml de HCl_(ac) 1M, 10 ml de H₂O_(dest) y 10 ml de NaHCO_{3(sat)}. Posteriormente se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se evaporó el solvente y se purificó el producto por cromatografía en columna para dar los productos peracilados buscados.

6.7.3 Ensayos de pureza mediante RMNc

Se utilizó un método de ¹H-RMN cuantitativo (RMNc) para determinar la pureza de los PASGs obtenidos. Brevemente, se disolvió una cantidad exactamente pesada de PASGs en 500 μ l de CDCl₃ y se utilizó 1,3,5-trimetoxibenceno como patrón interno. Este patrón es uno de los estándares recomendados por SigmaAldrich para técnicas de RMNc.²¹⁹ Se adquirieron espectros ¹H (128 scans) en un resonador Bruker Avance II 300 MHz utilizando CDCl₃ como solvente. El cálculo de la pureza se realizó comparando el área de la señal de los protones aromáticos del 1,3,5-trimetoxibenceno (6,09 ppm, s, 3H) y el área del protón anomérico C1'-H del resto glucosa de los SGs (~4,55 ppm, m, 1H). Las masas y la pureza de cada reacción se describen a continuación.

Tabla S14. Pureza de PASGs medida por RMNc

PASGs	Masa analito (mg)	1,3,5-TMB (mg)	Pureza (%)
PeracetilSGs	8,42	1,48	99
PerlaurilSGs	7,39	1,30	80
PerpalmitoilSGs	5,49	1,20	87
PeroleilSGs	4,75	1,21	96

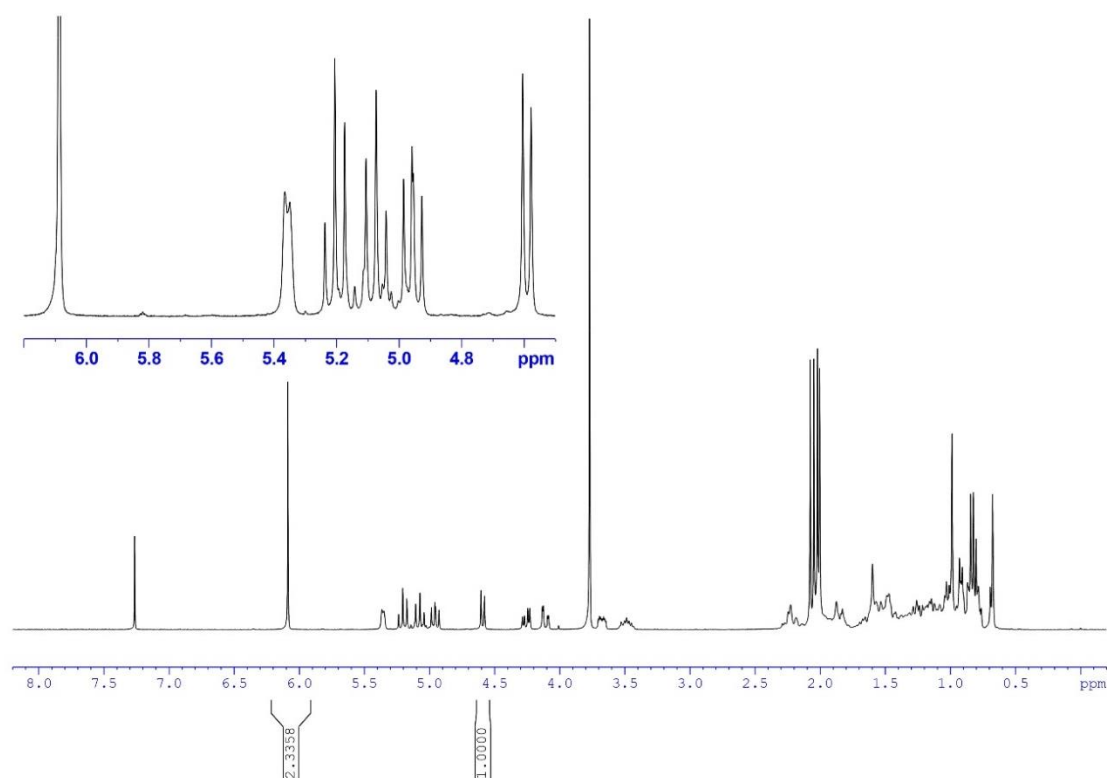


Figura S36. Determinación de pureza de peracetylSGs por ^1H -RMNc empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

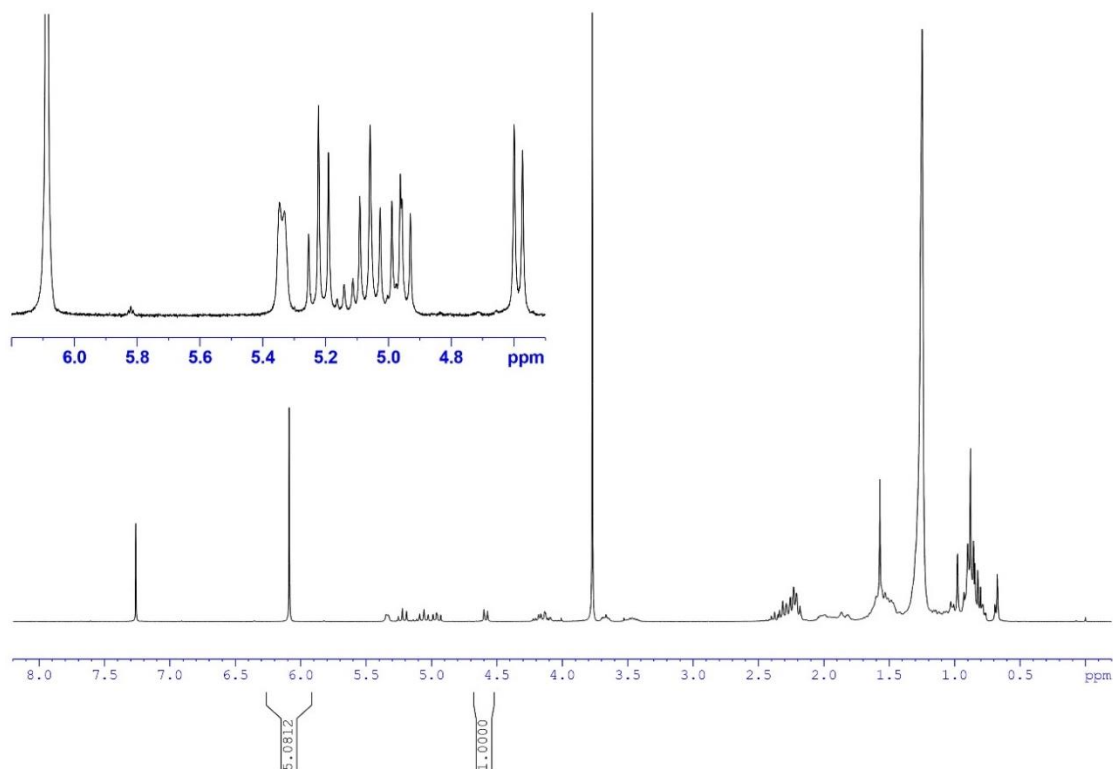


Figura S37. Determinación de pureza de perlaurilSGs por ^1H -RMNc empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

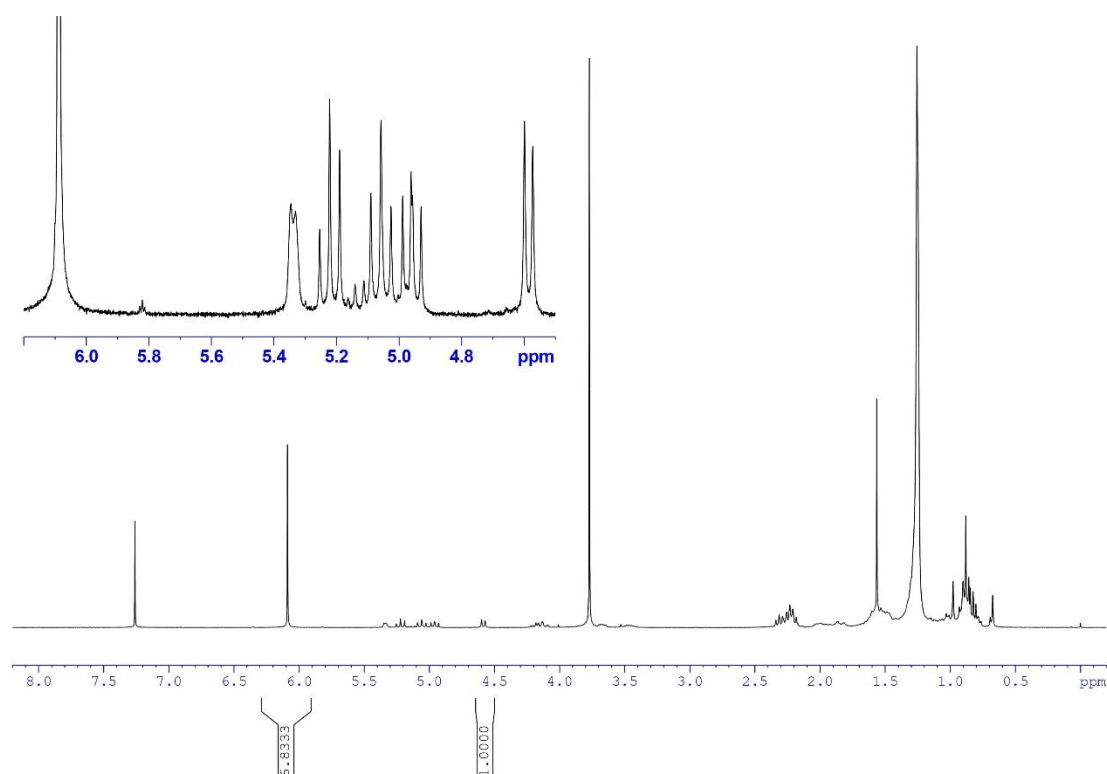


Figura S38. Determinación de pureza de perpalmitoilSGs por ^1H -RMNc empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

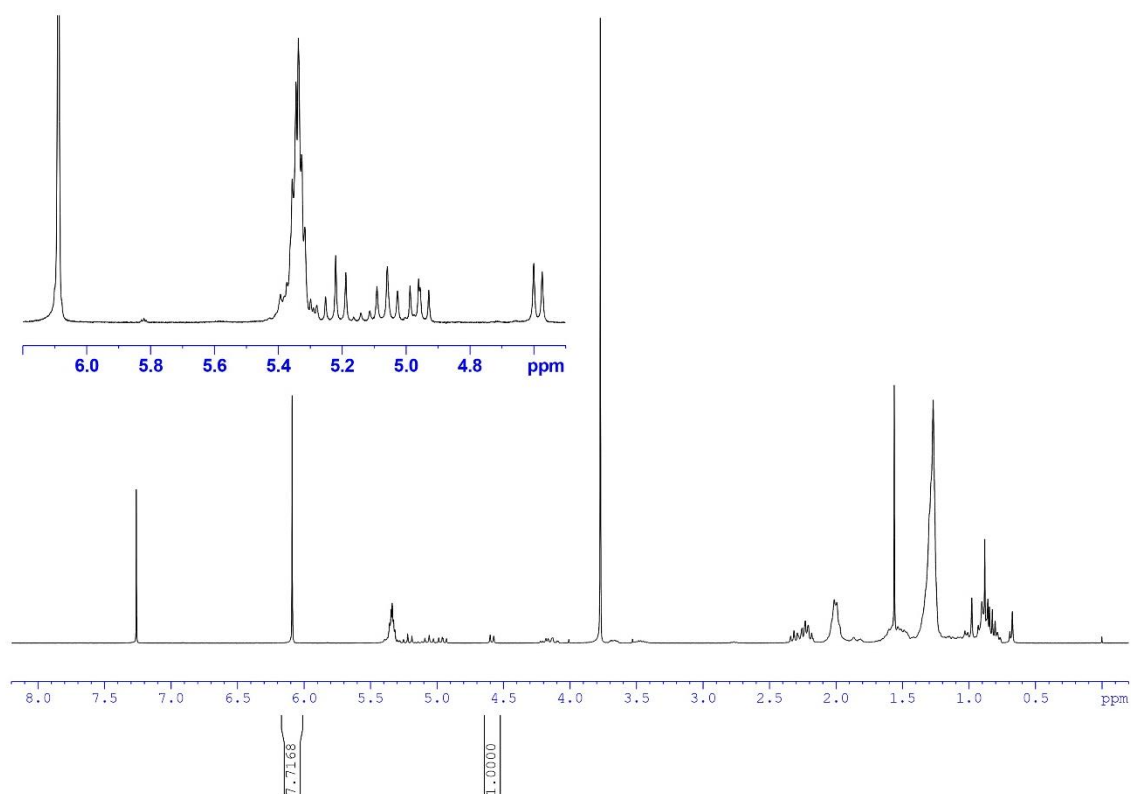


Figura S39. Determinación de pureza de peroleilSGs por ^1H -RMNc empleando 1,3,5-trimetoxibenceno como estándar interno y CDCl_3 como solvente.

6.7.4 Ensayos de viabilidad celular

Se buscó replicar los ensayos de digestión enzimática y de viabilidad celular llevados a cabo para los SGs. Comenzamos evaluando la estabilidad del derivado tetraacetilado y tetraoleilado frente a fluido gástrico simulado (SGF) de distinto pH (1, 3, 5 y 8). Tras dejar en contacto los derivados de SGs con cada medio durante 2 h a 37°C, bajo agitación constante, no se observó formación de productos de hidrólisis.

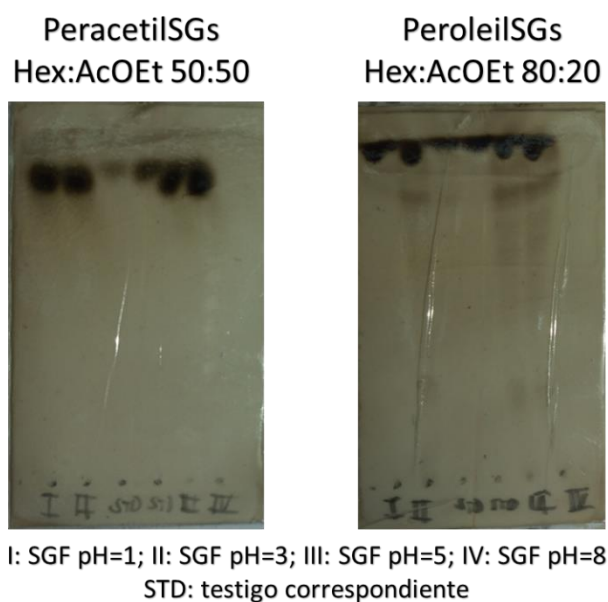
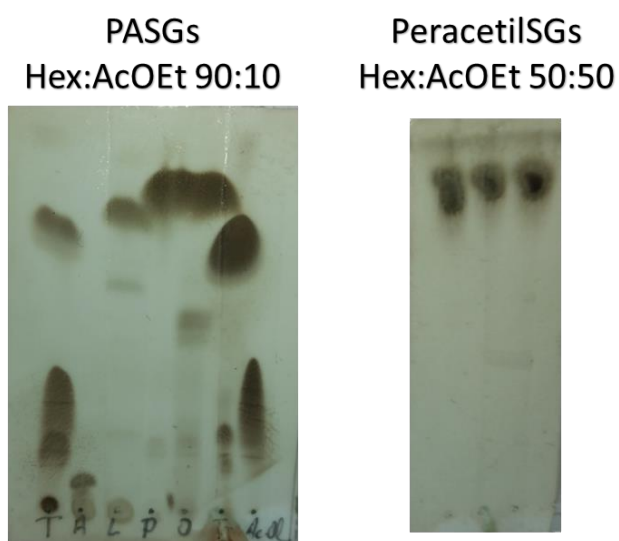


Figura S40. Ensayo de hidrólisis acuosa de derivados tetraacilados de SGs en fluido gástrico simulado a diferentes pH.

Luego se evaluó la resistencia a la hidrólisis de los cuatro derivados tetraacilados tras una etapa intestinal de digestión simulada. Para nuestra satisfacción, ninguno de los derivados mostró aparición de productos de subacilación, ni de presencia de ácidos grasos. Sin embargo, la misma solución de enzimas fue capaz de hidrolizar trioleína (tris-oleilglicerol) empleada como control positivo de la reacción enzimática donde puedo evidenciarse por TLC la formación de ácido oleico mediante el uso de estándares cromatográficos.



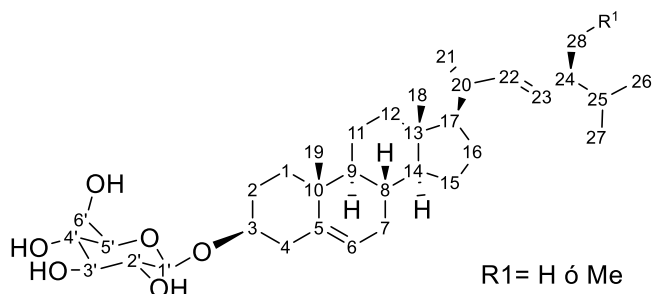
A: tetraacetilSGs; L: tetralaurilSGs; P: tetrapalmitoilSGs; O: tetraoleilSGs

T: trioleina (izquierda: tratado | derecha: sustrato control); Ac. Ol: ácido oleico (control positivo)

Figura S41. Ensayo de hidrólisis enzimática de derivados tetraacilados de SGs en fluido intestinal simulado en presencia de lipasa pancreática. Se empleó trioleina como sustrato control del funcionamiento del enzima.

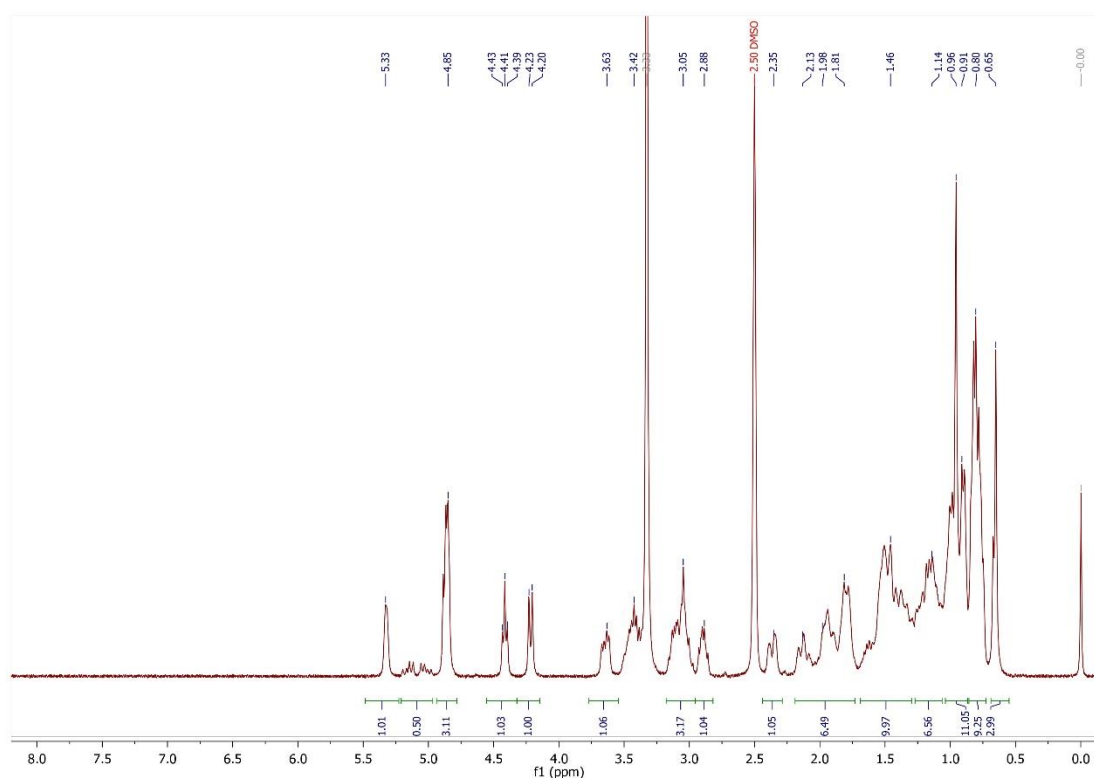
7. Espectros seleccionados

7.1 Esterilglucósidos

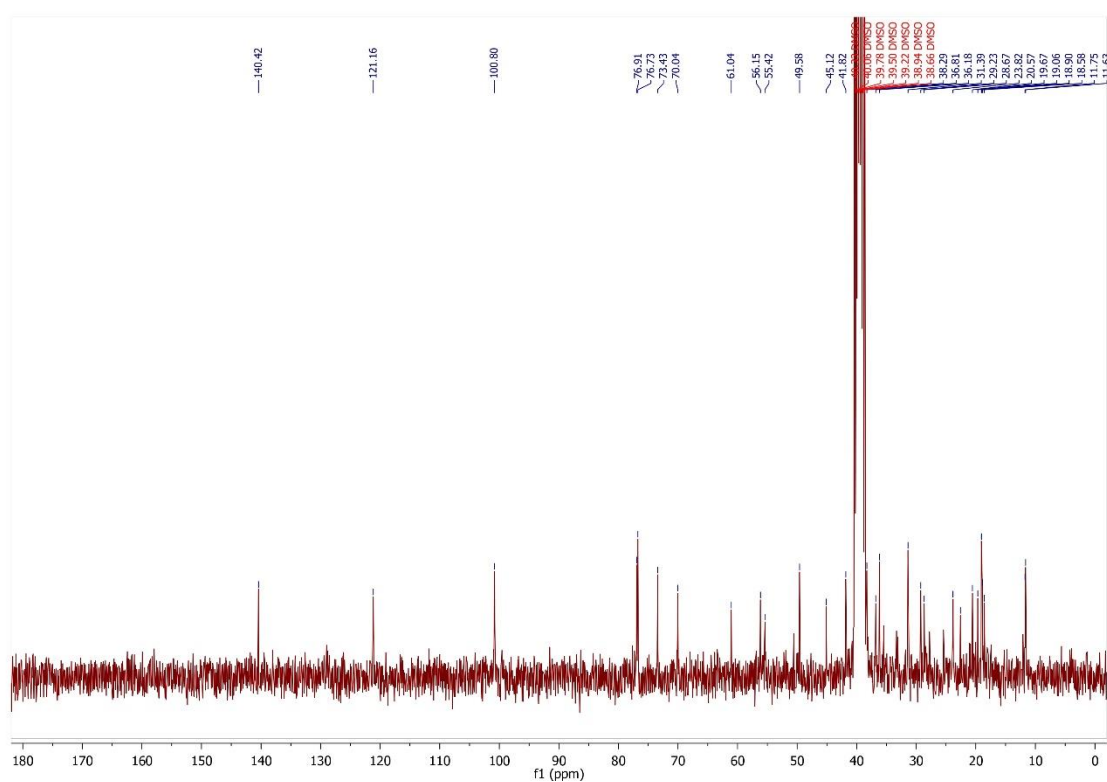


IR (cm⁻¹) = 3383,14; 2958,8; 2868,2; 1463,97; 1379,1; 1166,9; 1072,4; 1022,3

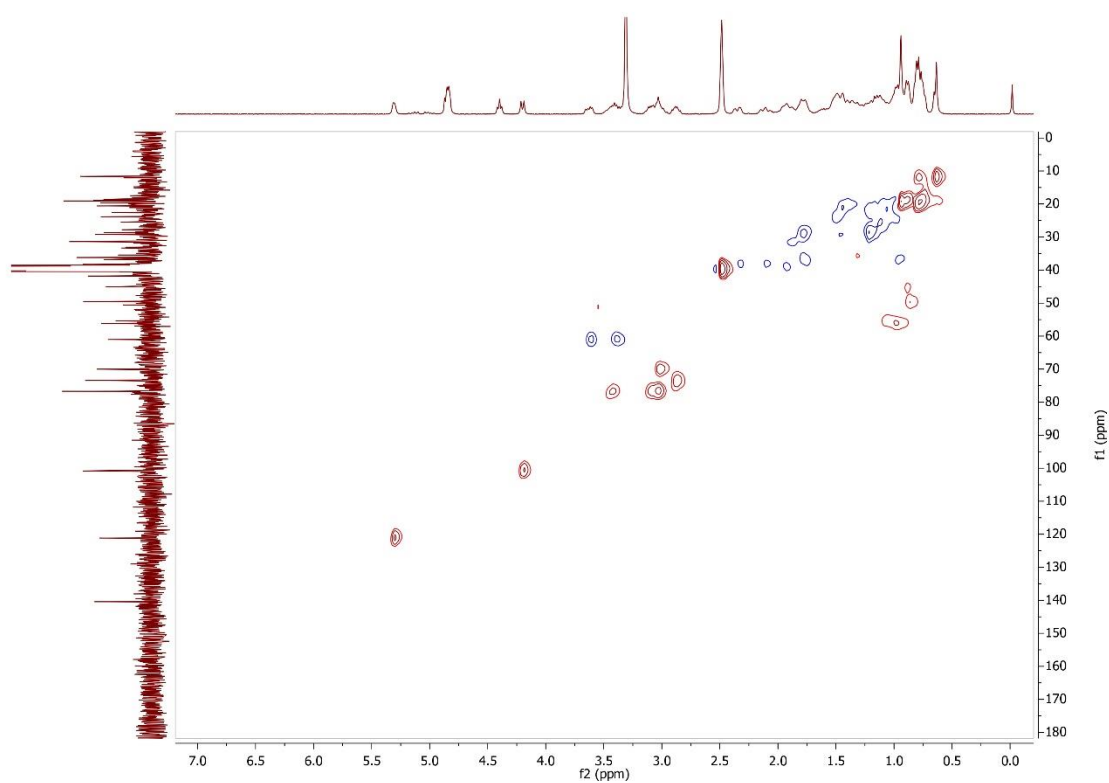
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,33 (m, 1H, C6-H); 5,20-4,96 (m, 2H, H-C22=C23-H estigmasterol); 4,92-4,76 (señales superpuestas, 3H, C2'/3'/4'-OH); 4,41 (t, 1H, 5,9 Hz, C6'-OH); 4,22 (d, 1H, J = 7,5 Hz, C1'-H); 3,64 (dd, 1H, 11,6 Hz, 4,9 Hz, C6'-H_a); 3,42 (señales superpuestas, 2H, C6'-H_b y C3-H); 0,96 (s, 3H, C19-H₃); 0,68 (s, 3H, C18-H₃).



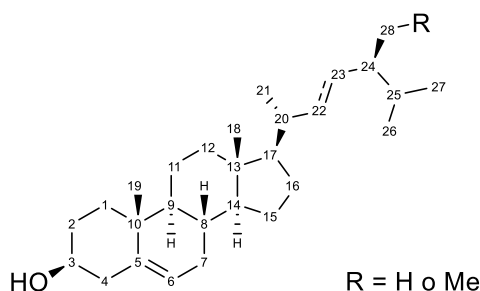
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 140,4; 121,2; 100,8; 76,9; 76,7; 73,4; 70,0; 61,0; 56,2; 55,4; 49,6; 45,1; 41,8; 38,3; 36,8; 36,2; 31,4; 29,2; 28,7; 23,8; 22,6; 20,6; 19,7; 19,1; 18,9; 18,6; 11,7; 11,6.



HSQC editado

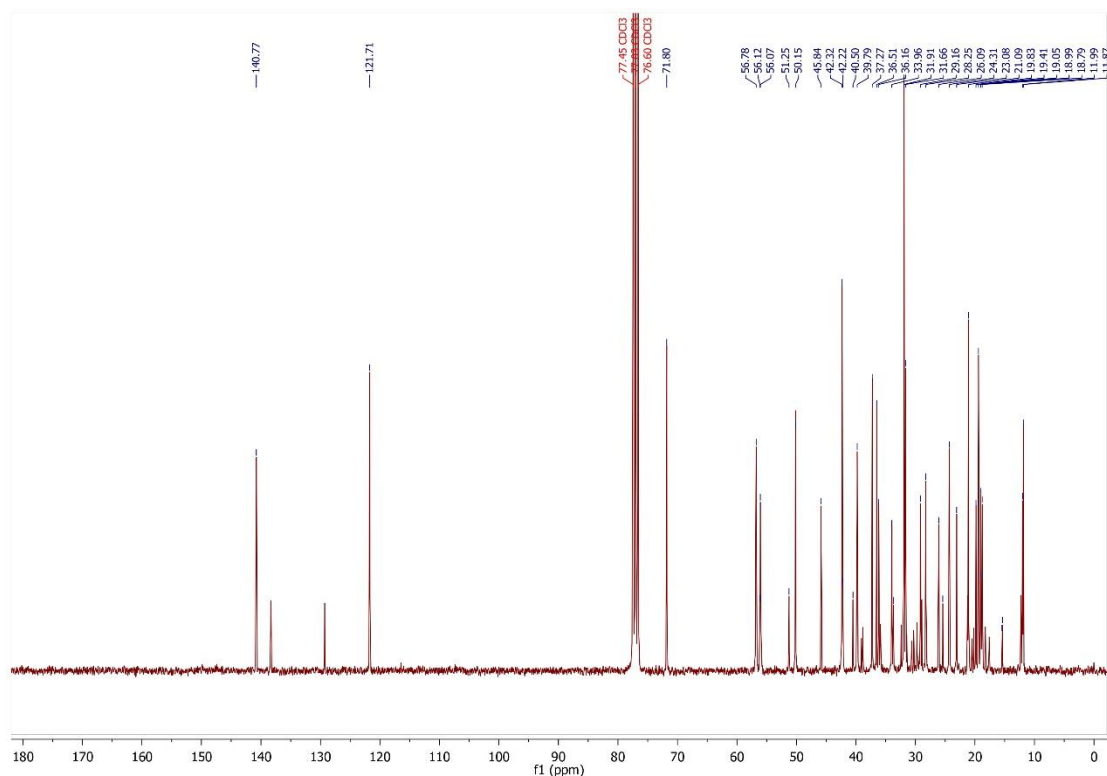


7.2 Fitosteroles

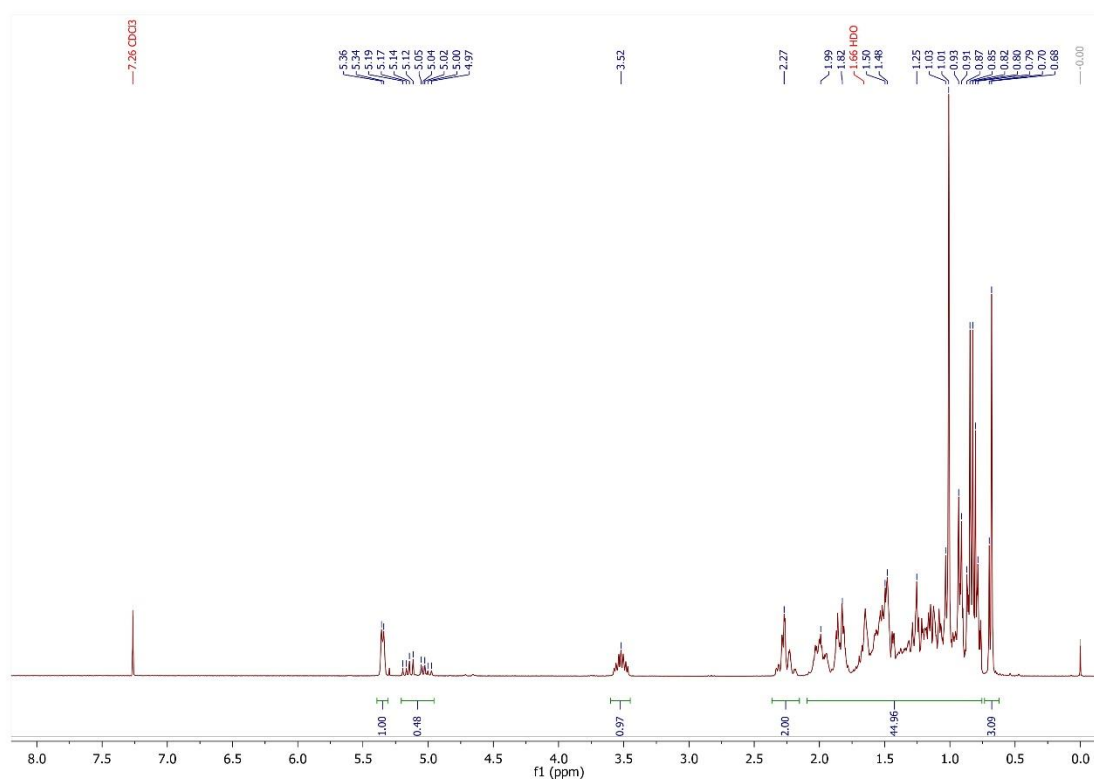


IR (cm⁻¹) = 3425,6; 2935,7; 2889,4; 1464,0; 1379,1; 1047,4.

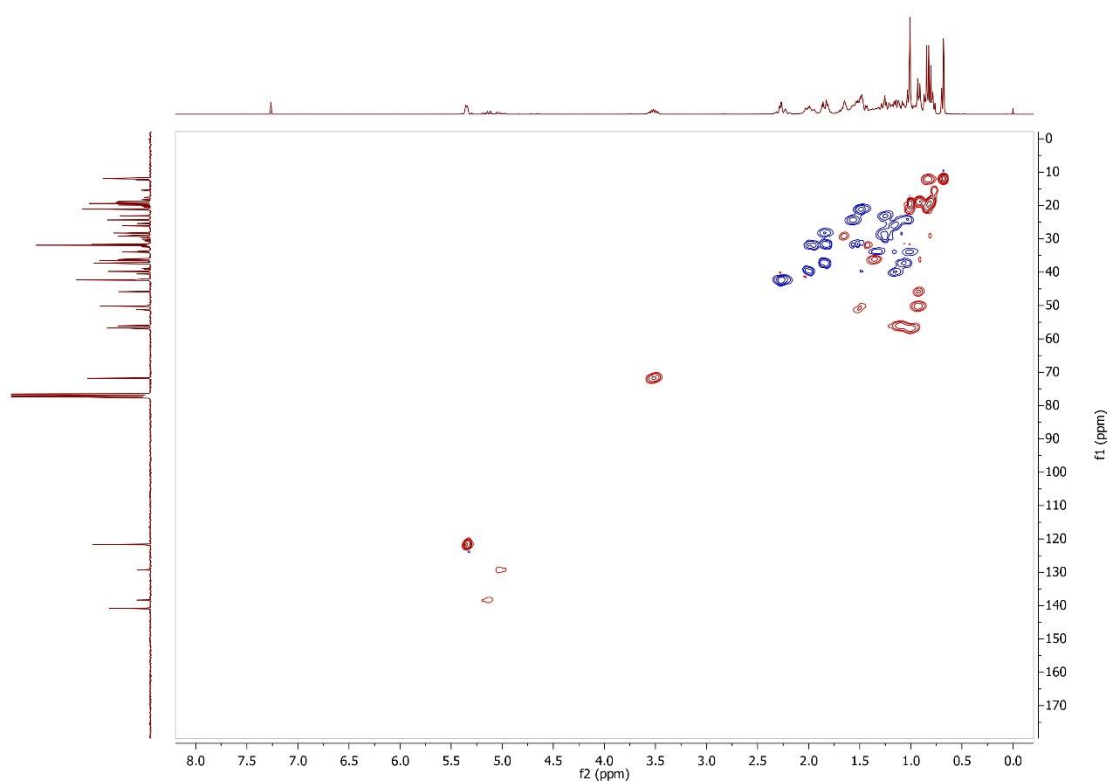
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,35 (m, 1H, C6-H); 5,20-4,96 (m, 2H, H-C22=C23-H estigmasterol); 3,52 (m, 1H, C3-H); 2,27 (m, 2H, C4-H₂); 1,01 (s, 3H, C19-H₃); 0,92 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,84 (d, 3H, 6,5 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,4 Hz, C26-H₃); 0,68 (s, 3H, C19-H₃).



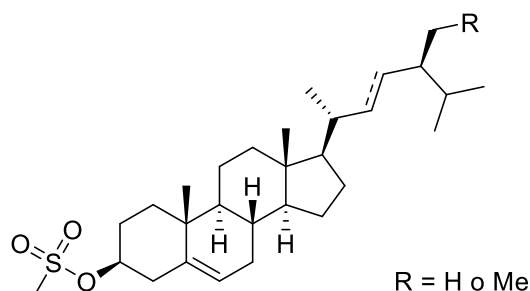
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 140,8; 121,7; 71,8; 56,8; 56,1; 51,2; 50,2; 45,8; 42,3; 42,2; 40,5; 39,8; 37,3; 36,5; 36,2; 34,0; 33,7; 31,9; 31,7; 29,2; 28,3; 26,1; 25,4; 24,3; 23,1; 21,1; 19,8; 19,4; 19,0; 18,8; 15,5; 15,4; 12,0; 11,9.



HSQC editado

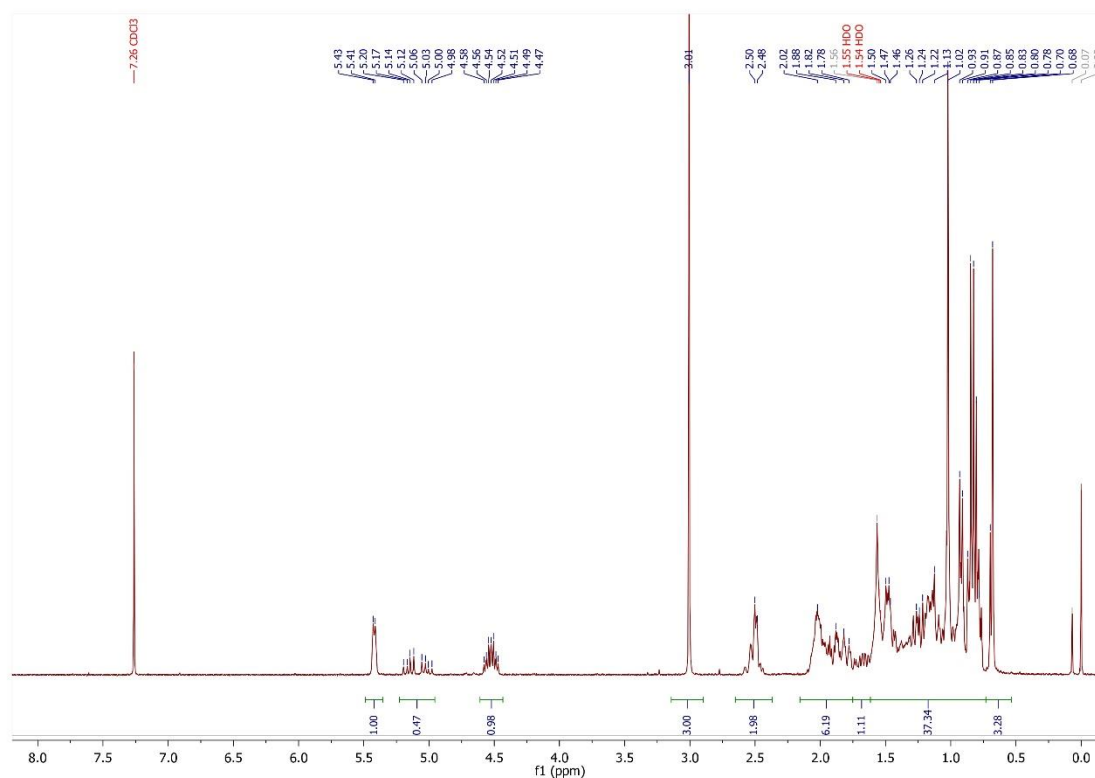


7.3 3-metilsulfonil-fitosteroles

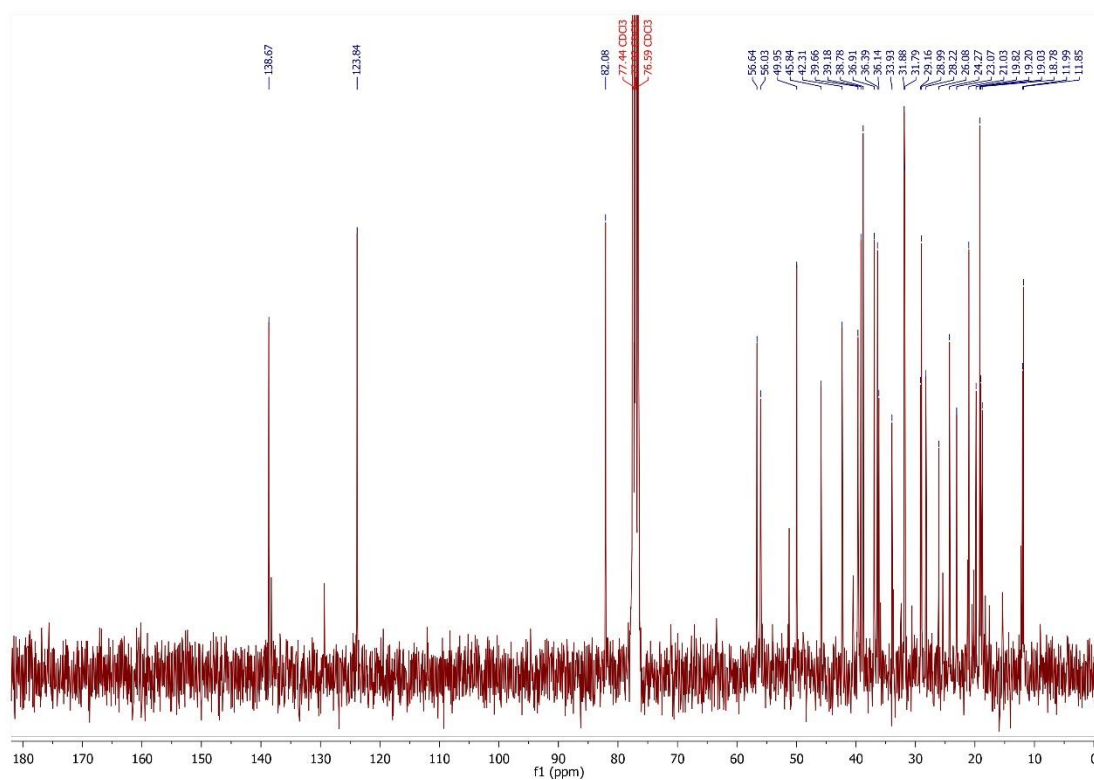


IR (cm⁻¹) = 2956,9; 1635,6; 1356,0; 1265,3; 1172,7; 935,5; 738,7; 704,0.

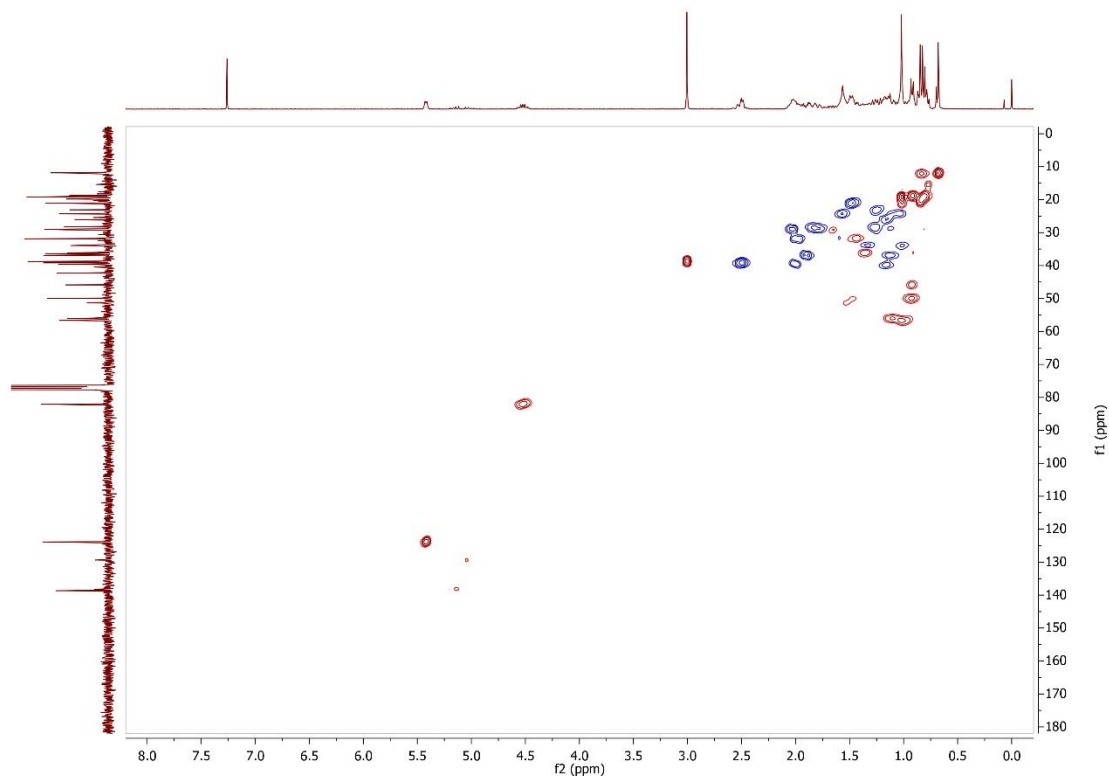
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,42 (m, 1H, C6-H); 5,20-4,98 (m, 2H, H-C22=C23-H estigmasterol); 4,52 (m, 1H, C3-H); 3,01 (s, 3H, C3-SO₃-CH₃), 2,49 (m, 2H, C4-H₂); 1,02 (s, 3H, C19-H₃); 0,92 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,84 (d, 3H, 6,5 Hz, C27-H₃); 0,82 (d, 3H, 6,4 Hz, C26-H₃); 0,68 (s, 3H, C18-H₃).



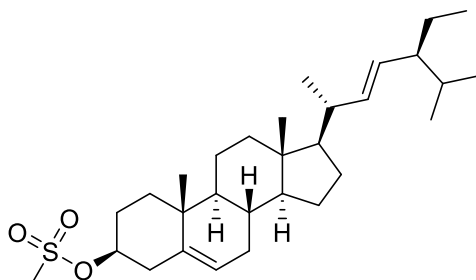
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 138,7; 123,8; 82,1; 56,6; 56,0; 49,9; 45,8; 42,3; 39,7; 39,2; 38,8; 36,9; 36,4; 36,1; 33,9; 31,9; 31,8; 29,2; 29,0; 28,2; 26,1; 24,3; 23,1; 21,0; 19,8; 19,2; 19,0; 18,8; 12,0; 11,9.



HSQC editado

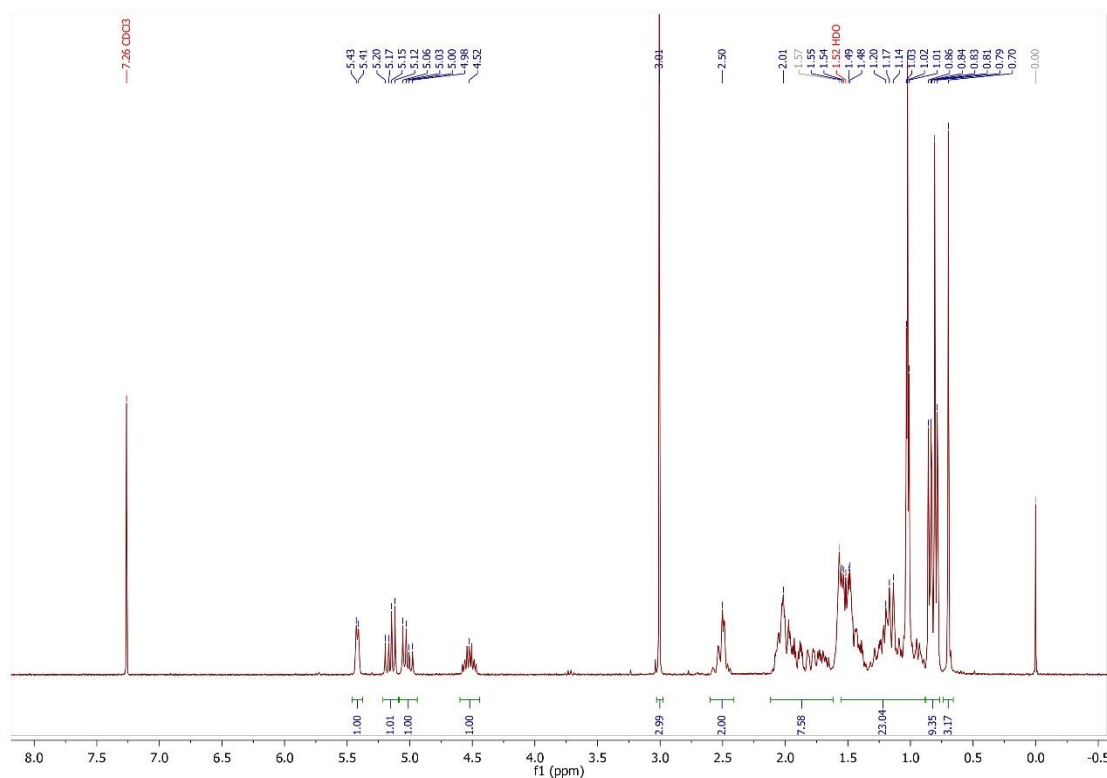


7.3' 3-metilsulfonil-estigmasterol

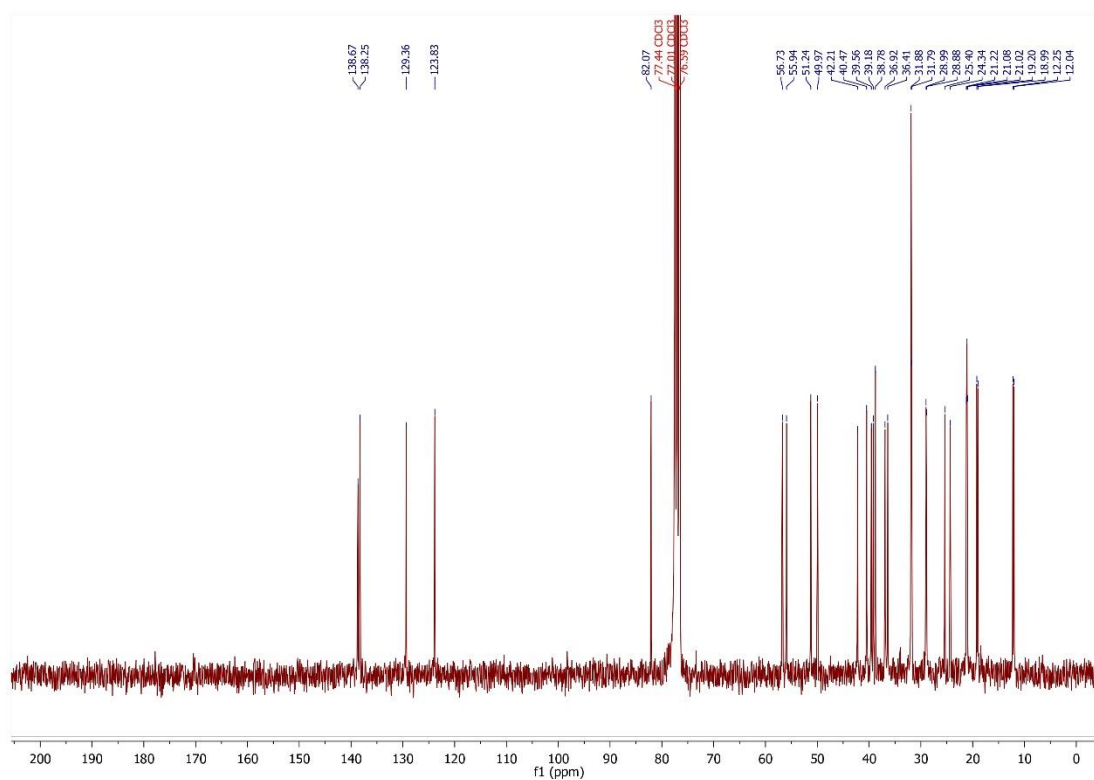


IR (cm⁻¹) = 2933,7; 1458,2; 1319,31; 1265,3; 1174,65; 964,41; 941,3; 869,9; 738,7.

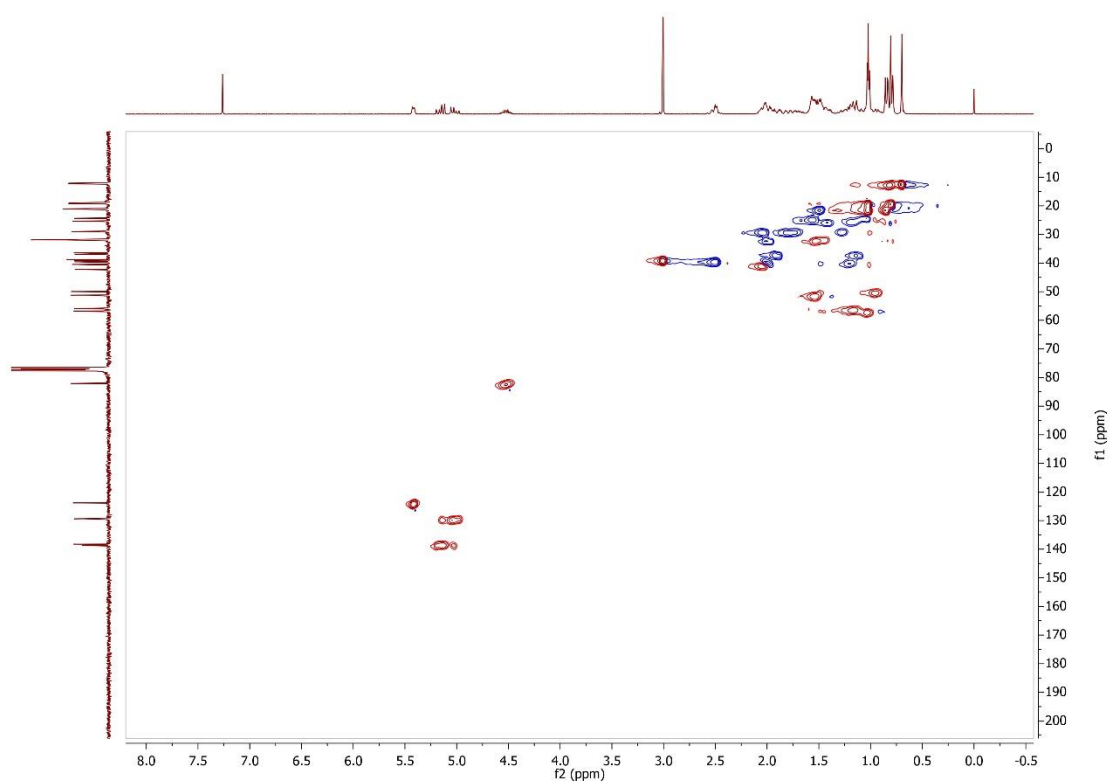
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,42 (m, 1H, C6-H); 5,16 (dd, 15,2 Hz, 8,4 Hz, 1H, C22-H); 5,02 (dd, 15,2 Hz, 8,5 Hz, 1H, C23-H); 4,52 (m, 1H, C3-H); 3,01 (s, 3H, C3-SO₃-CH₃), 2,49 (m, 2H, C4-H₂); 1,02 (s, 3H, C19-H₃); 1,02 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,85 (d, 3H, 6,5 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,4 Hz, C26-H₃); 0,70 (s, 3H, C18-H₃).



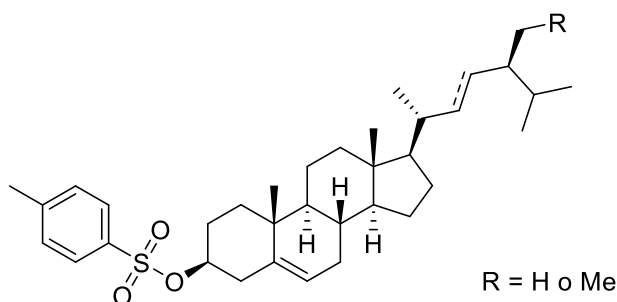
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 138,7; 138,3; 129,4; 123,8; 82,1; 56,7; 56,0; 51,2; 50,0; 42,7; 40,5; 39,6; 39,2; 38,8; 36,9; 36,4; 31,9; 31,8; 29,0; 28,9; 25,4; 24,3; 21,2; 21,1; 21,0; 19,2; 19,0; 12,3; 12,0.



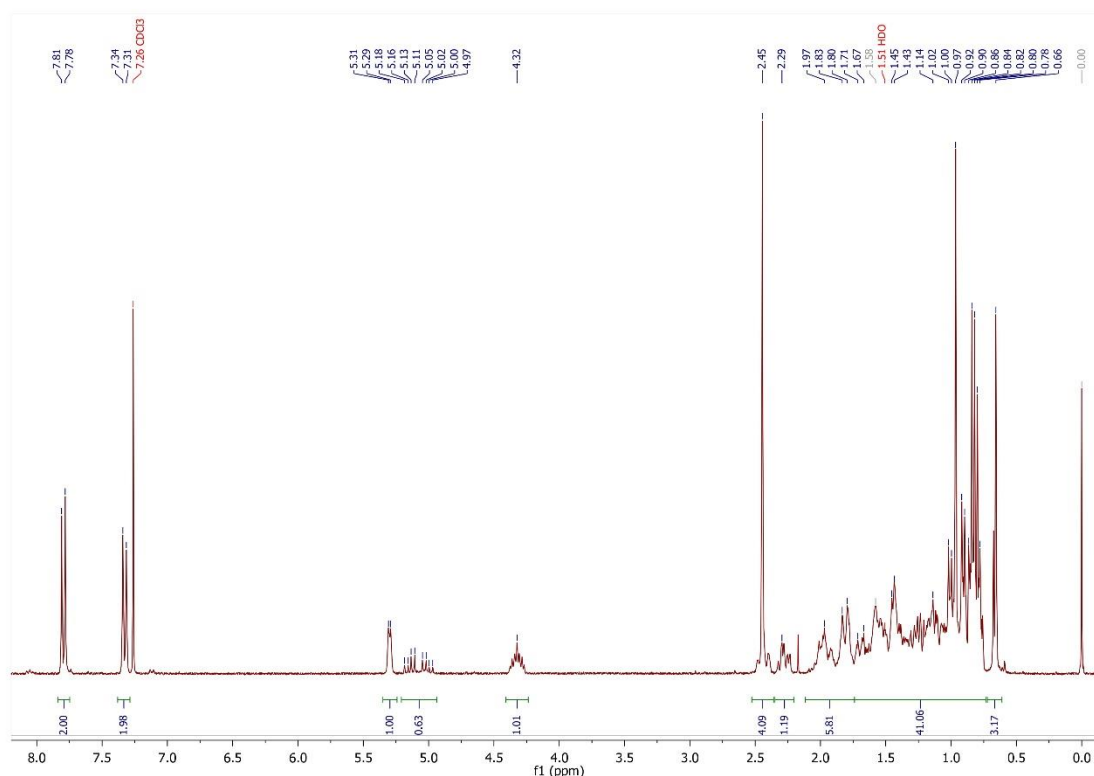
HSQC editado



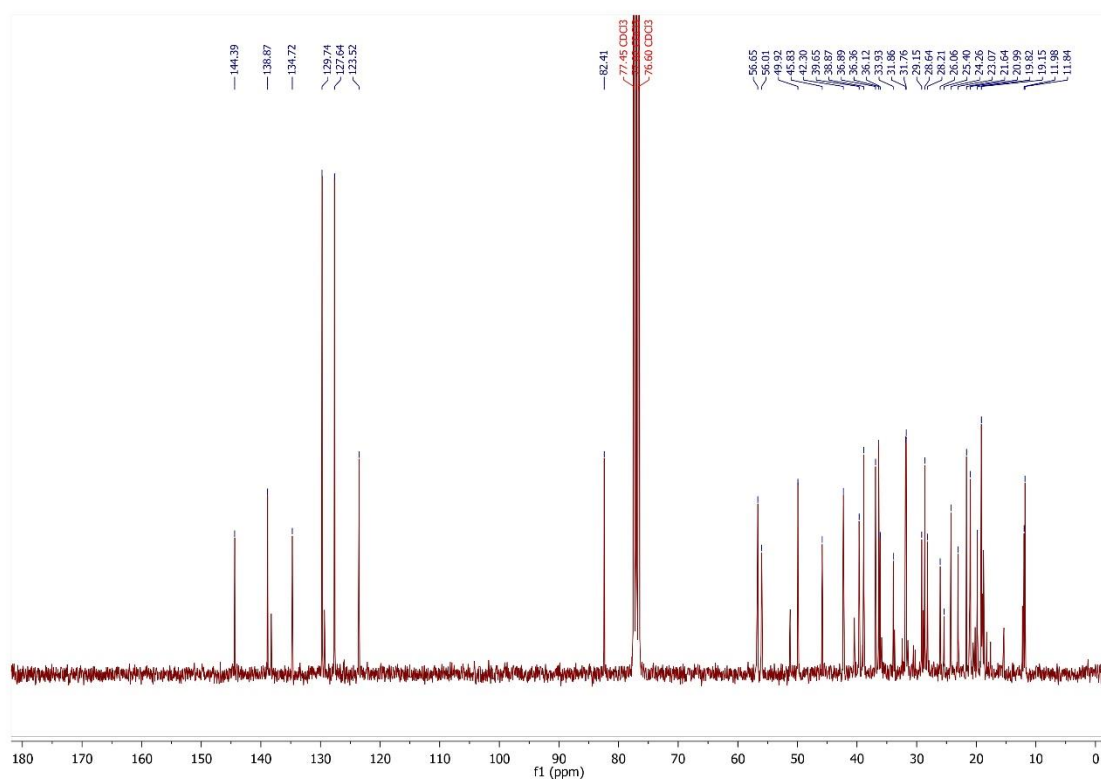
7.4 3-(4-metilfenil-1-sulfonil)-fitosterol



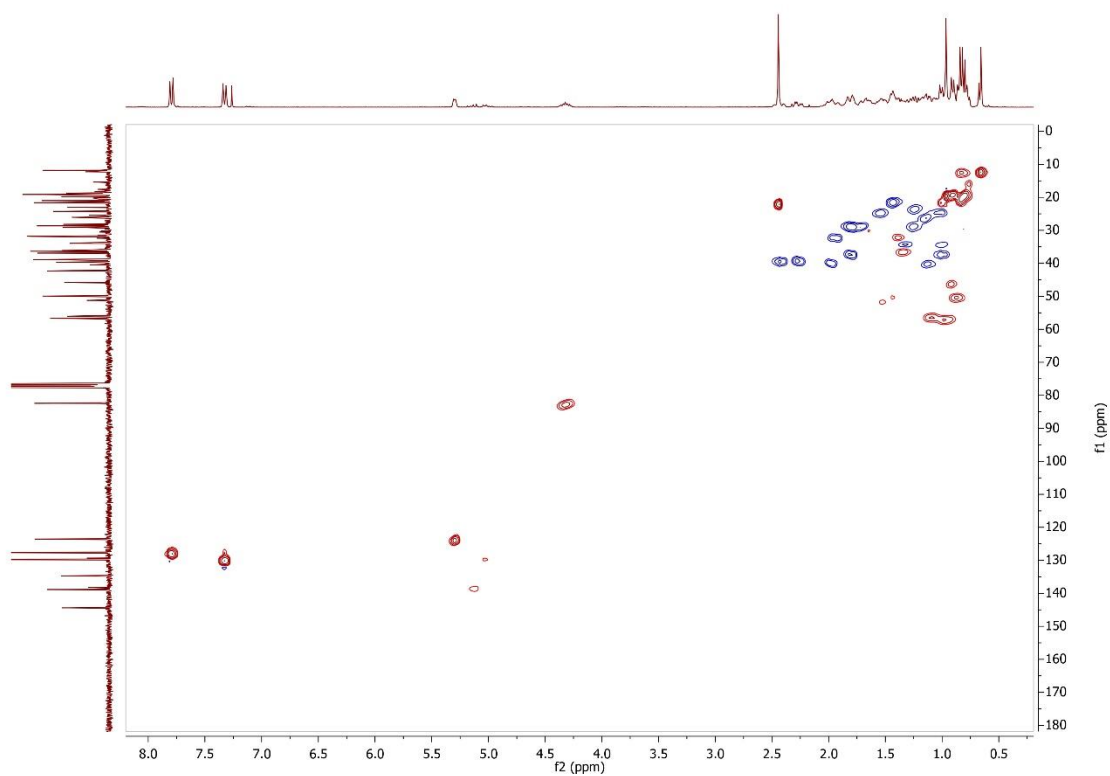
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7,80 (d, 2H, 8,3 Hz, H₃C-CH=CH-C-S); 7,33 (d, 2H, 8,3 Hz, H₃C-CH=CH-C-S); 5,30 (m, 1H, C6-H); 5,18-4,97 (m, 2H, H-C22=C23-H estigmasterol); 4,32 (m, 1H, C3-H); 2,45 (s (solapado), 3H, C3-SO₃-Ph-CH₃); 2,29 (m, 2H, C4-H₂); 1,01 (d, 3H, 6,8 Hz, C21-H₃); 0,96 (s, 3H, C19-H₃); 0,83 (d, 3H, 6,4 Hz, C27-H₃); 0,81 (d, 3H, 6,3 Hz, C26-H₃); 0,66 (s, 3H, C18-H₃).



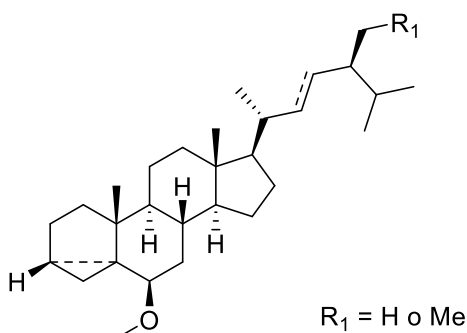
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 144,4; 138,9; 134,7; 129,7; 127,6; 123,5; 82,4; 56,7; 56,0; 49,9; 45,8; 42,3; 39,7; 38,9; 36,9; 36,4; 36,1; 33,9; 31,9; 31,8; 29,1; 28,6; 28,2; 26,1; 25,4; 24,3; 23,1; 21,6; 21,0; 19,8; 19,1; 12,0; 11,8.



HSQC editado

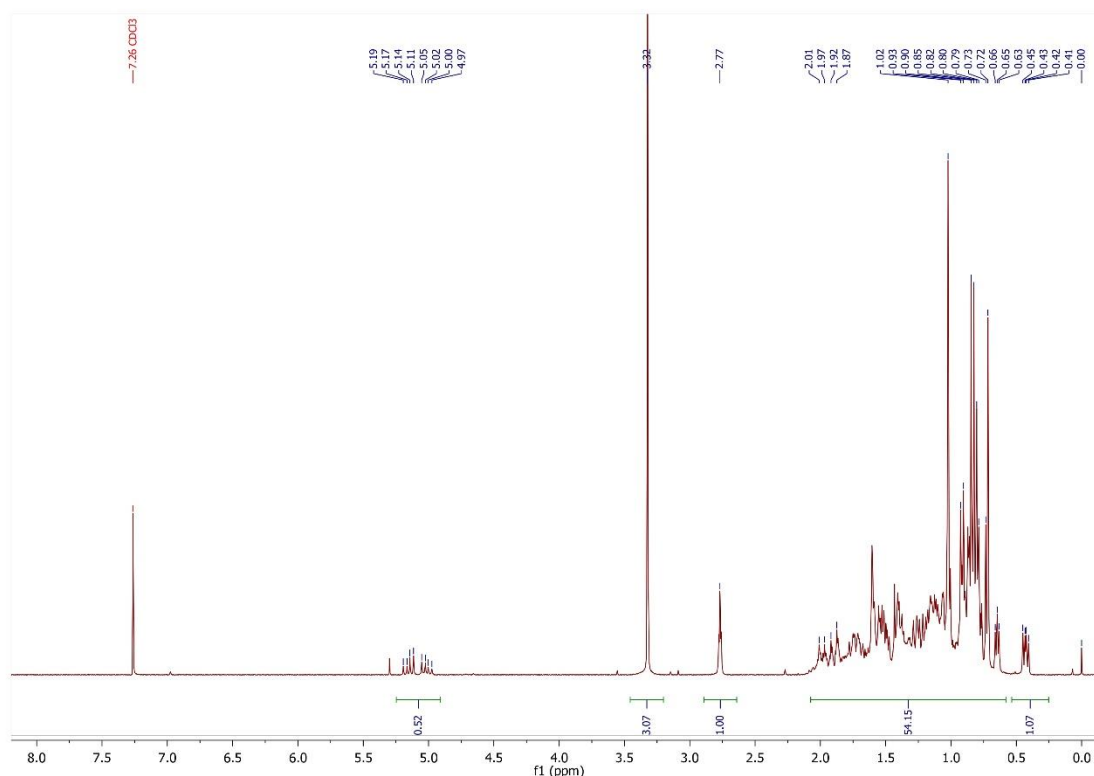


7.5 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-fitosteroles (2:1:1)

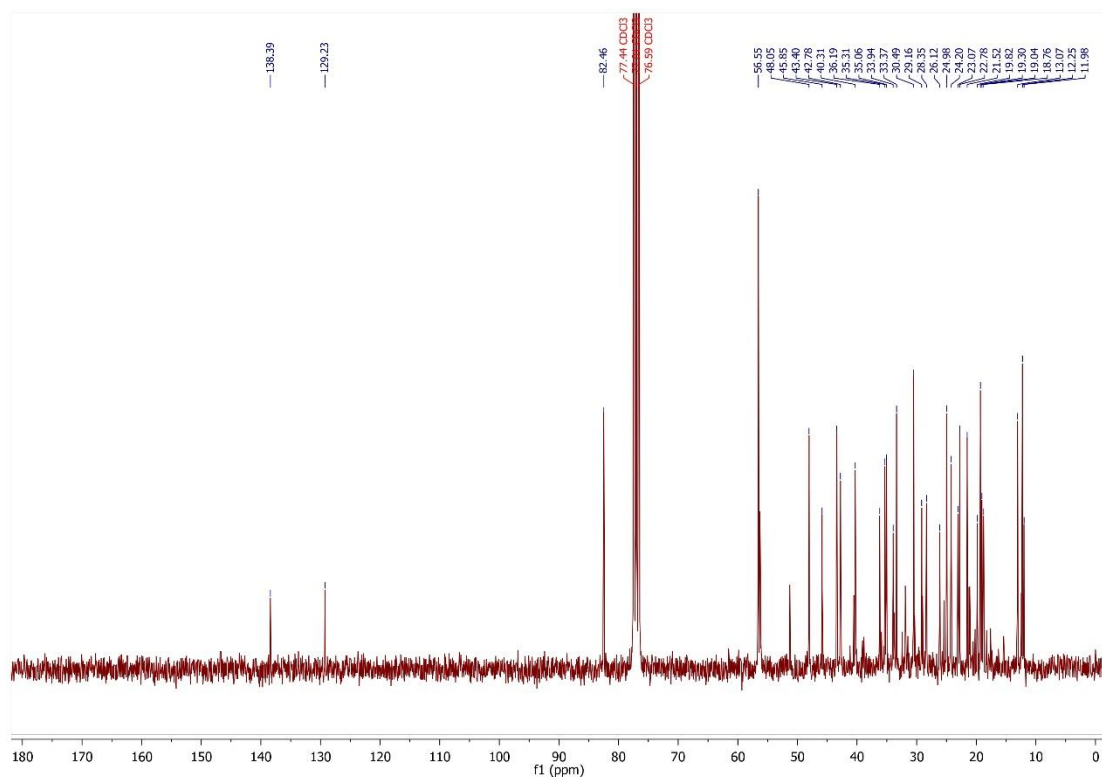


IR (cm⁻¹) = 2953,0; 2866,2; 1454,3; 1383,0; 1097,5; 1016,5; 970,2; 740,7; 497,6; 464,8; 449,4; 430,1; 414,7.

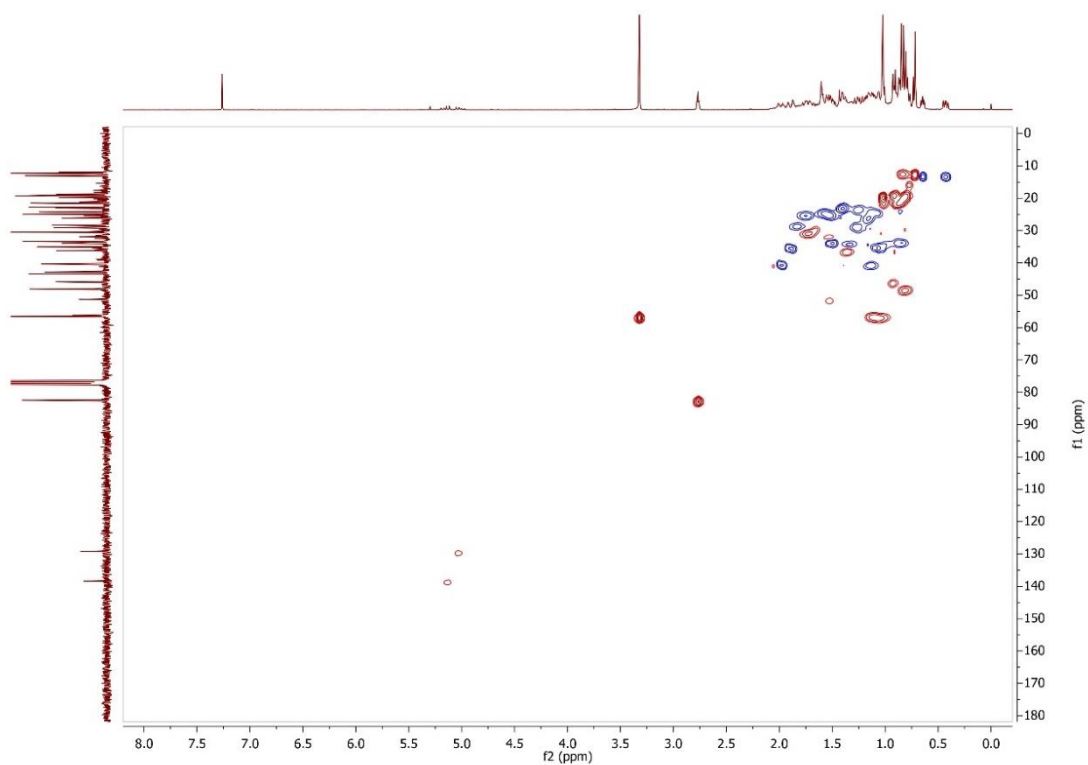
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,15 (dd, 15,2 Hz, 8,4 Hz, 1H, C22-H); 5,01 (dd, 15,1 Hz, 8,5 Hz, 1H, C23-H); 3,32 (s, 3H, OCH₃); 2,77 (m, 1H, C6-H); 1,02 (s, 3H, C19-H₃); 0,92 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,84 (d, 3H, 6,6 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,5 Hz, C26-H₃); 0,72 (s, 3H, C18-H₃); 0,65 (m, 1H, H_a-C); 0,43 (dd, 1H, 8,1 Hz, 5,1 Hz, H_b-C).



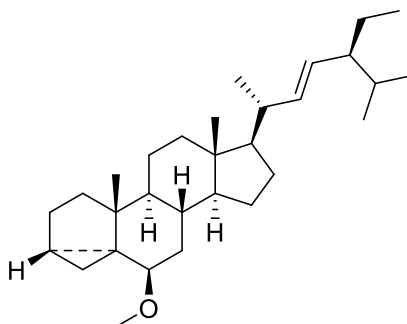
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 138,4; 129,2; 82,5; 56,5; 48,0; 45,9; 43,4; 42,8; 40,3; 36,2; 35,3; 35,1; 33,9; 33,4; 30,5; 29,2; 28,3; 26,1; 25,0; 24,2; 23,1; 22,8; 21,5; 19,8; 19,3; 19,0; 18,8; 13,1; 12,3; 12,0.



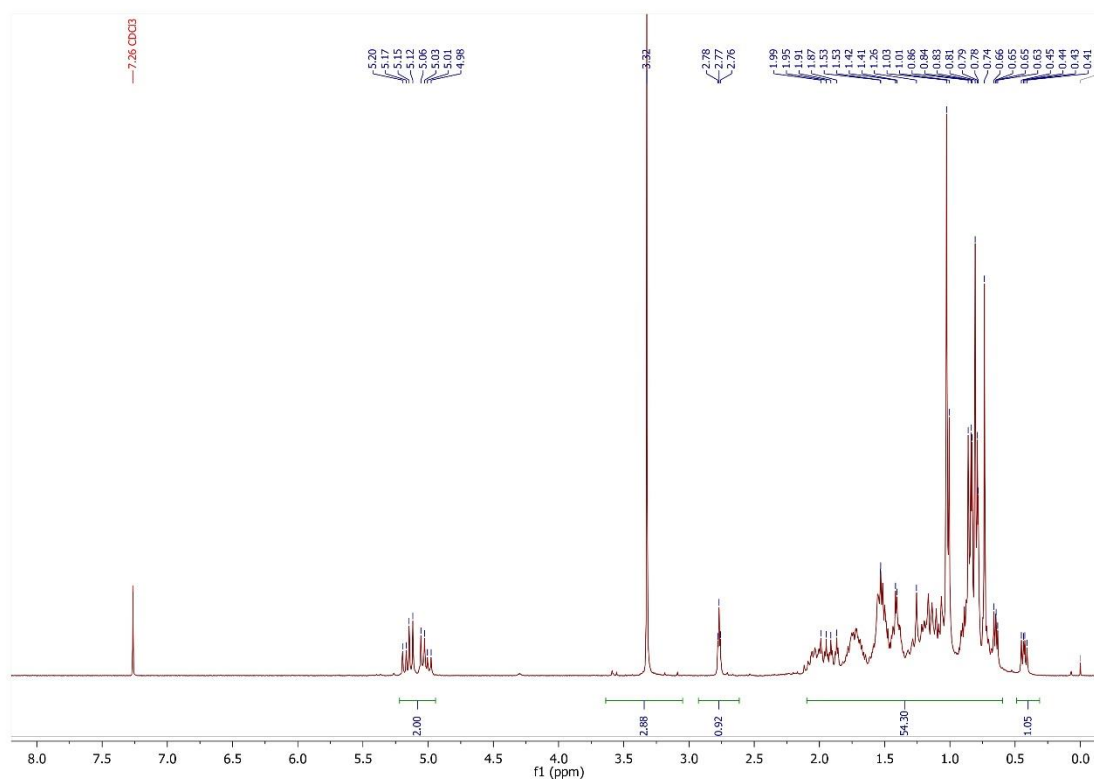
HSQC editado



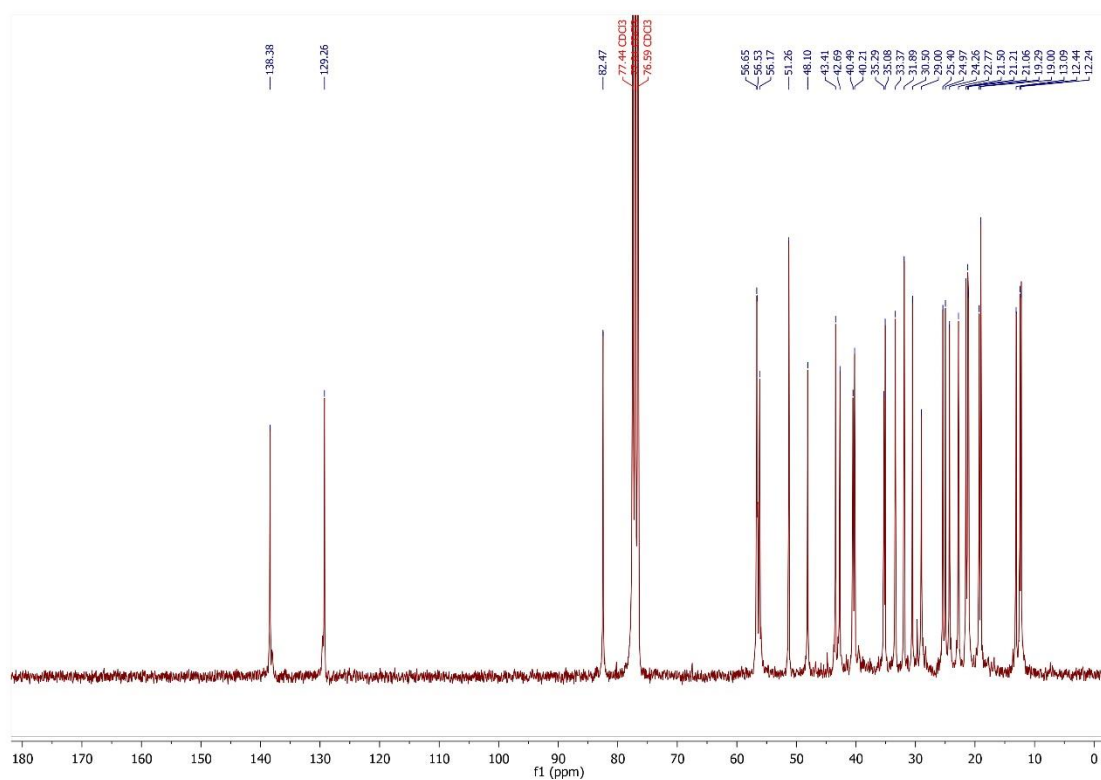
7.5' 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-estigmasterol



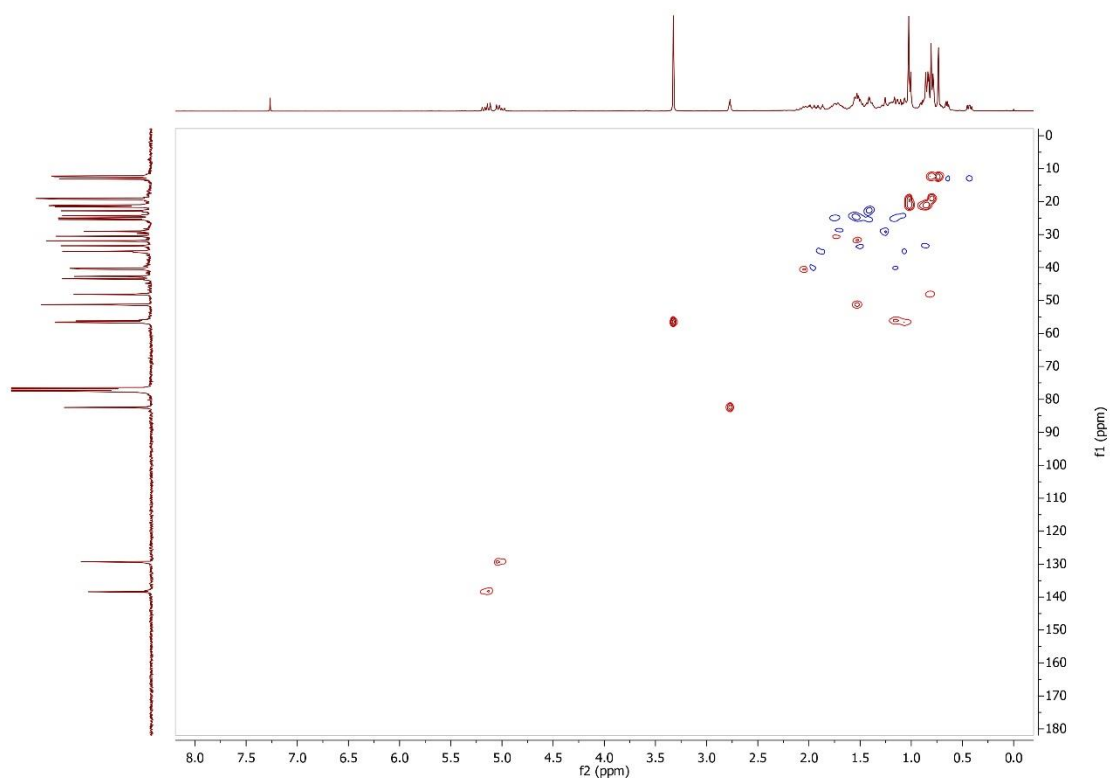
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 5,16 (dd, 15,2 Hz, 8,4 Hz, 1H, C22-H); 5,02 (dd, 15,2 Hz, 8,5 Hz, 1H, C23-H); 3,32 (s, 3H, OCH_3); 2,77 (t, 1H, 2,9 Hz, C6-H); 1,03 (s, 3H, C19- H_3); 0,85 (d, 3H, 6,4 Hz, C27- H_3); 0,74 (s, 3H, C18- H_3); 0,65 (m, 1H, C-H_a); 0,43 (dd, 1H, 8,0 Hz, 5,0 Hz, C-H_b).



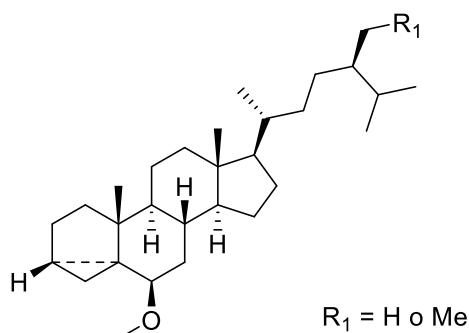
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 138,4; 129,3; 82,5; 56,7; 56,5; 56,2; 51,3; 48,1; 43,4; 42,7; 40,5; 40,2; 35,3; 35,1; 33,4; 31,9; 30,5; 29,0; 25,4; 25,0; 24,3; 22,8; 21,5; 21,2; 21,1; 19,3; 19,0; 13,1; 12,4; 12,2.



HSQC editado

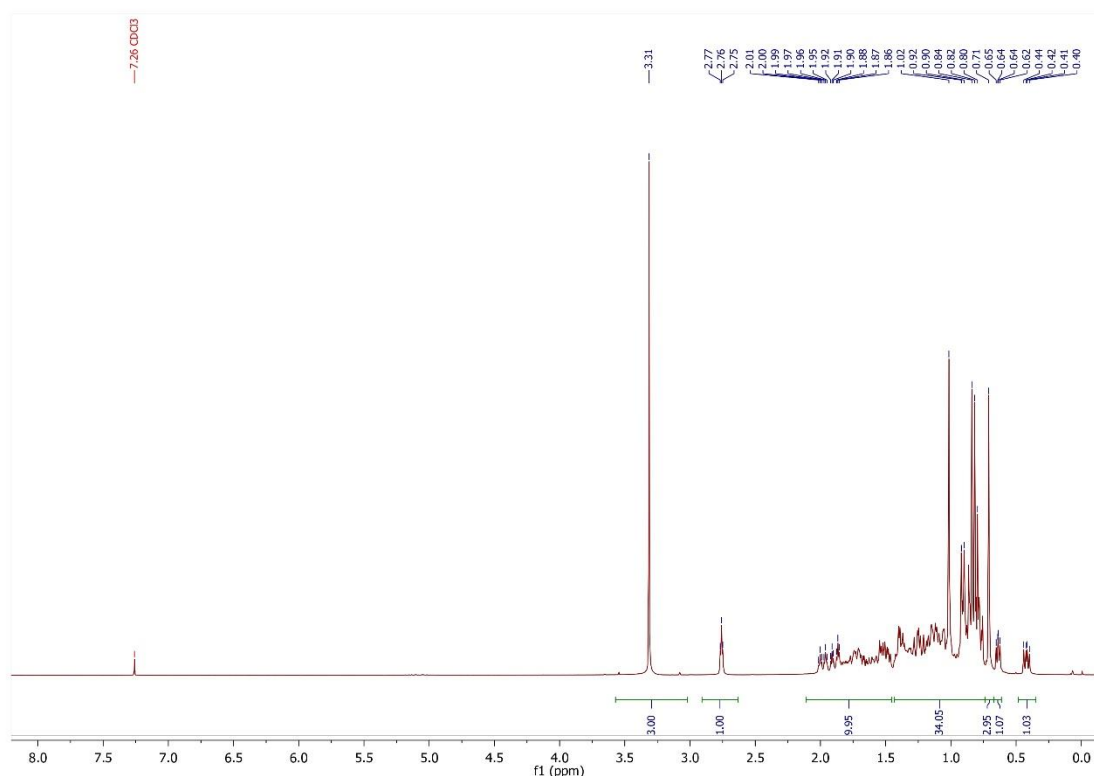


7.5'' 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-fitosterilo (2:0:1)

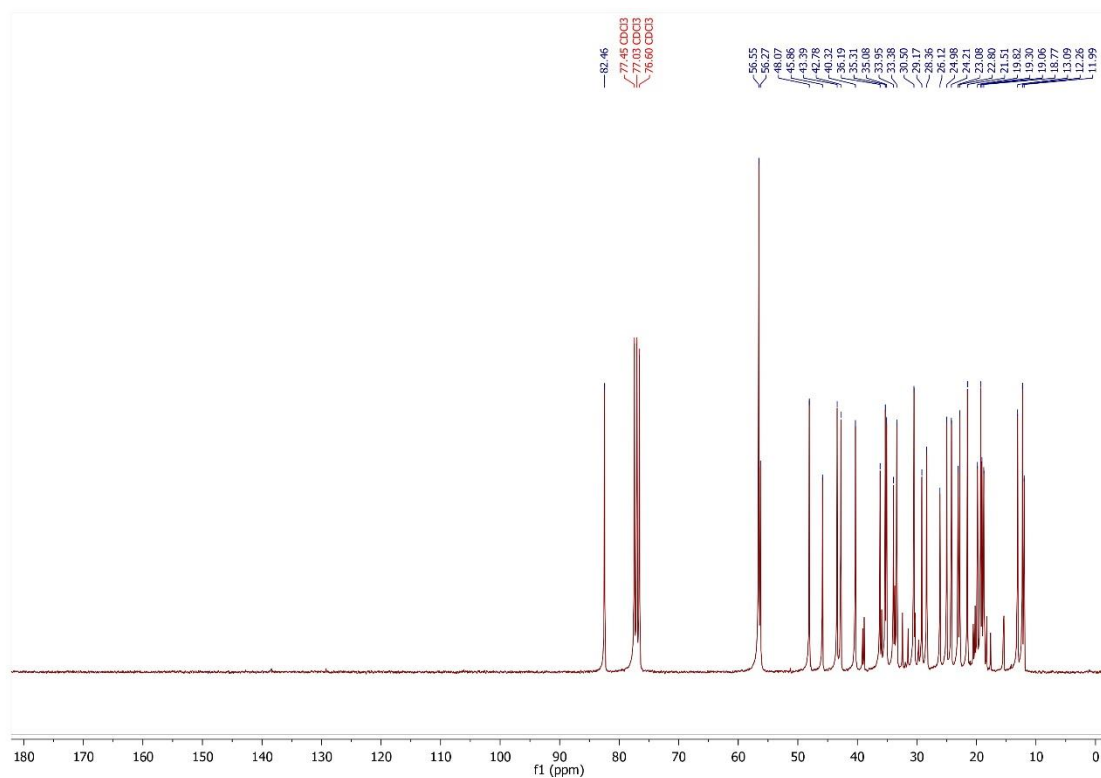


IR (cm⁻¹) = 2933,7; 2868,2; 1458,2; 1383,0; 1097,5; 906,5; 734,9; 499,6; 464,8; 449,4; 430,1; 410,8.

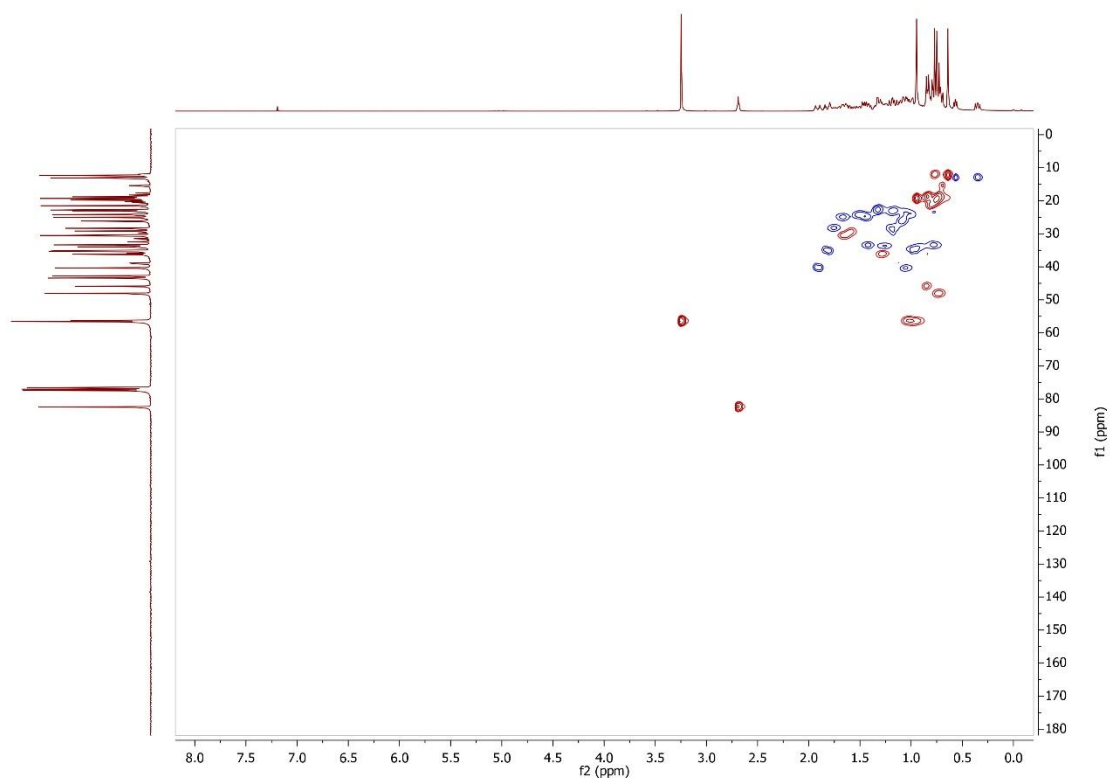
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,31 (s, 3H, OCH₃); 2,76 (t, 1H, 2,9 Hz, C6-H); 1,98 (dt, 1H, 12,5 Hz, 3,4 Hz, C4-H_a); 1,89 (dt, 1H, 13,5 Hz, 3,1 Hz, C4-H_b); 1,02 (s, 3H, C19-H₃); 0,91 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,83 (d, 3H, 6,5 Hz, C27-H₃); 0,81 (d, 3H, 6,6 Hz, C26-H₃); 0,76 (s, 3H, C18-H₃); 0,64 (dd, 1H, 5,0 Hz, 3,8 Hz, C-H_a); 0,42 (dd, 1H, 8,0 Hz, 5,1 Hz, C-H_b).



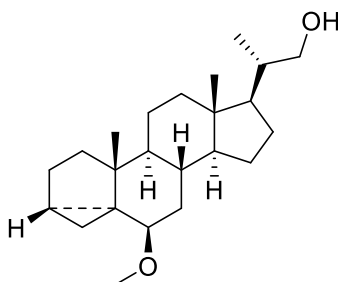
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 82,5; 56,5; 56,3; 48,1; 45,9; 43,4; 42,8; 40,3; 36,2; 35,3; 35,1; 33,9; 33,4; 30,5; 29,2; 28,4; 26,1; 25,0; 24,2; 23,1; 22,8; 21,5; 19,8; 19,3; 19,1; 18,8; 13,1; 12,3; 12,0.



HSQC editado

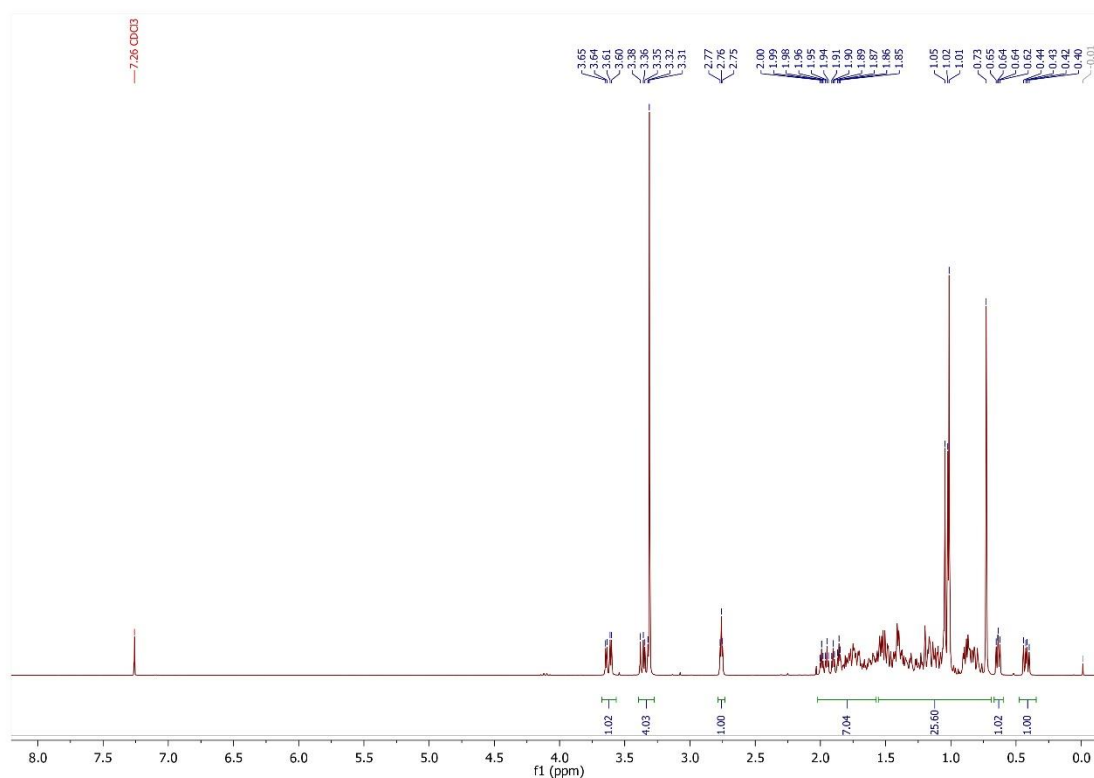


7.6 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-22-OH-23,24-bisnor-colesterol

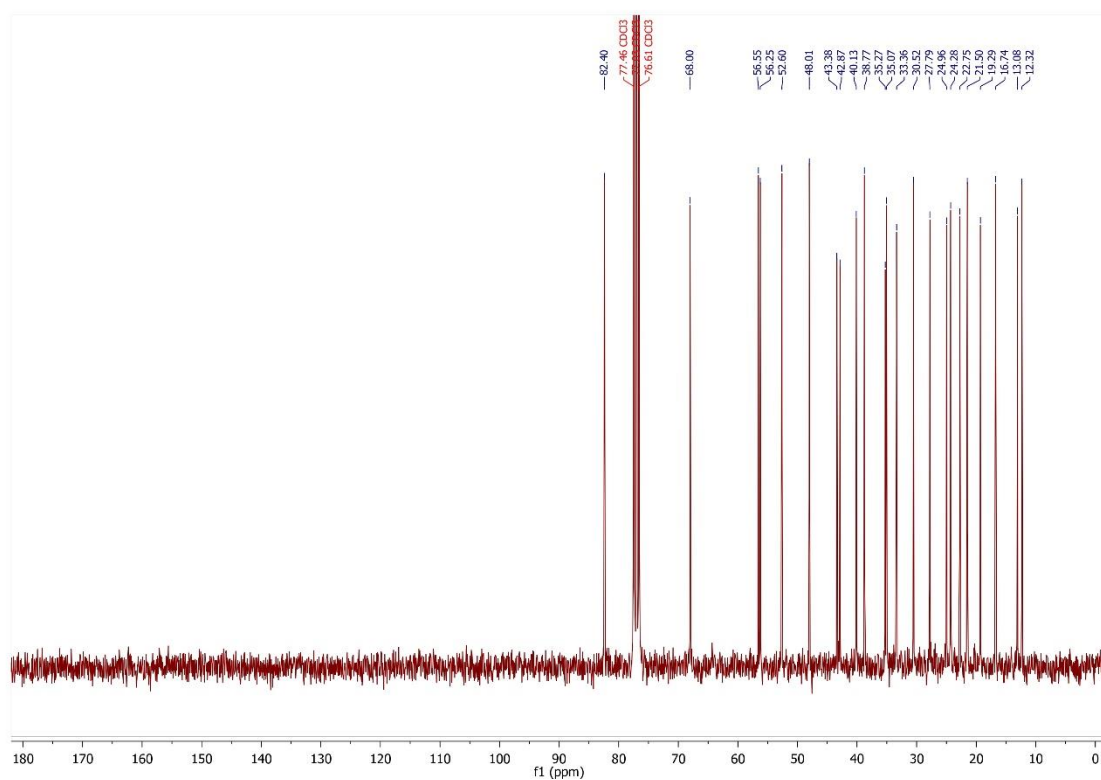


IR (cm⁻¹) = 3400,5; 2931,8; 2866,2; 1454,3; 1381,0; 1093,6; 1041,6; 1018,4; 995,3; 908,5; 733,0.

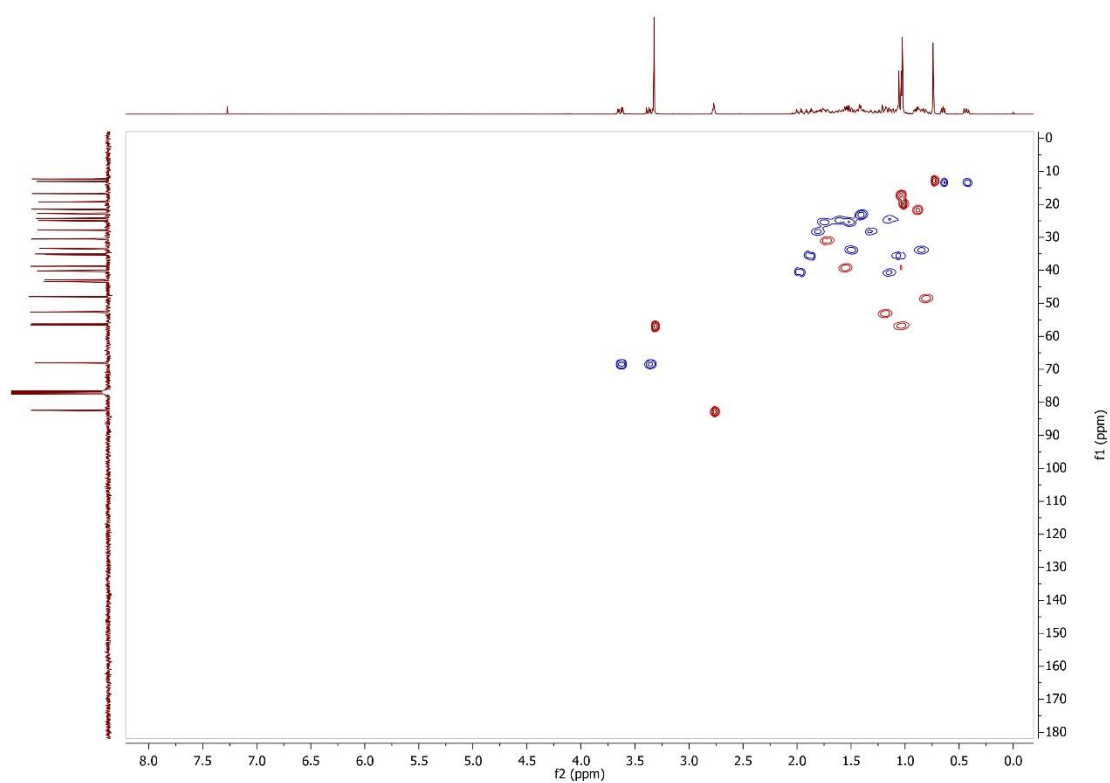
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,62 (dd, 1H, 10,5 Hz, 3,3 Hz, C22-H_a); 3,35 (dd, 1H, 10,5 Hz, 6,8 Hz, C22-H_b); 3,31 (s, 3H, OCH₃); 1,97 (dt, 1H, 12,4 Hz, 3,4 Hz, C4-H_a); 1,88 (dt, 1H, 13,5 Hz, 3,1 Hz, C4-H_b); 1,03 (d, 3H, 6,6 Hz, C21-H₃); 1,01 (s, 3H, C19-H₃); 0,73 (s, 3H, C18-H₃), 0,64 (dd, 1H, 5,1 Hz, 3,8 Hz, C-H_a); 0,42 (dd, 1H; 8,0 Hz, 5,1 Hz, C-H_b).



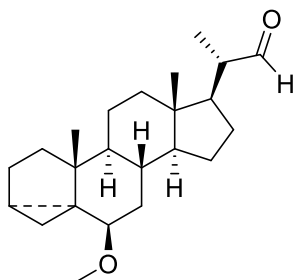
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 82,4; 68,0; 56,5; 56,2; 52,6; 48,0; 43,4; 42,9; 40,1; 38,8; 35,3; 35,1; 33,4; 30,5; 27,8; 25,0; 24,3; 22,8; 21,5; 19,3; 16,7; 13,1; 12,3.



HSQC editado

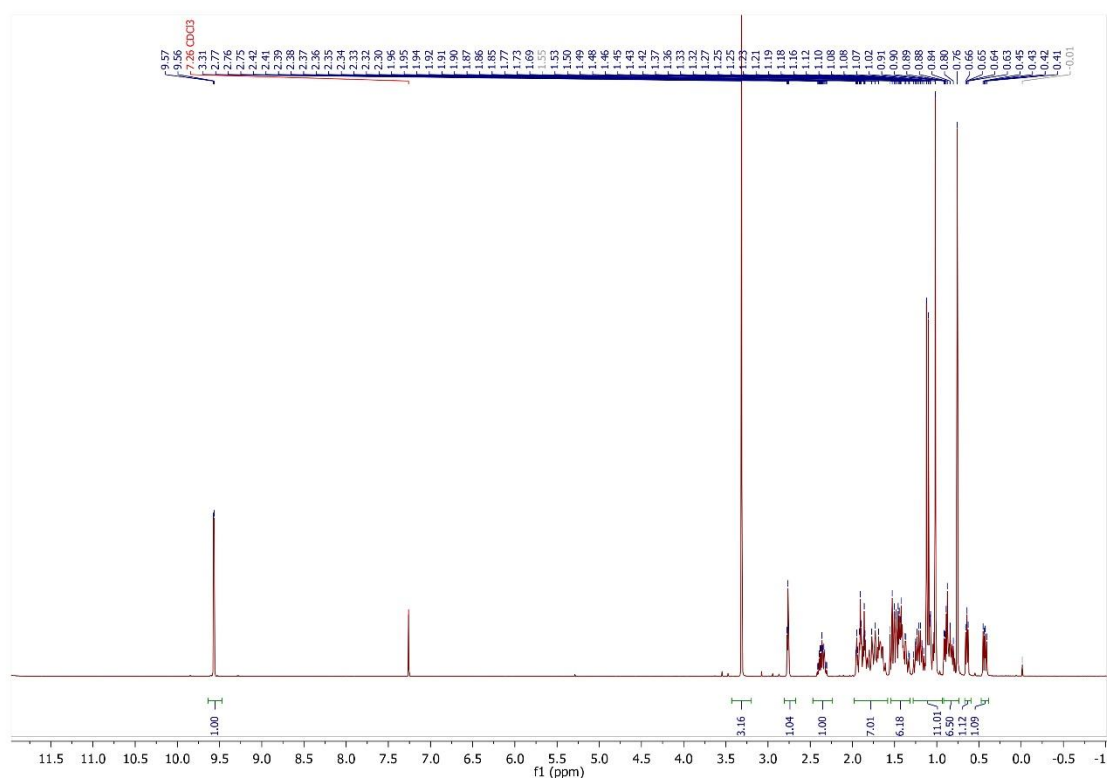


7.7 3,4,5-ciclopropil-6-metoxi-22-aldehído-23,24-bisnor-colesterol

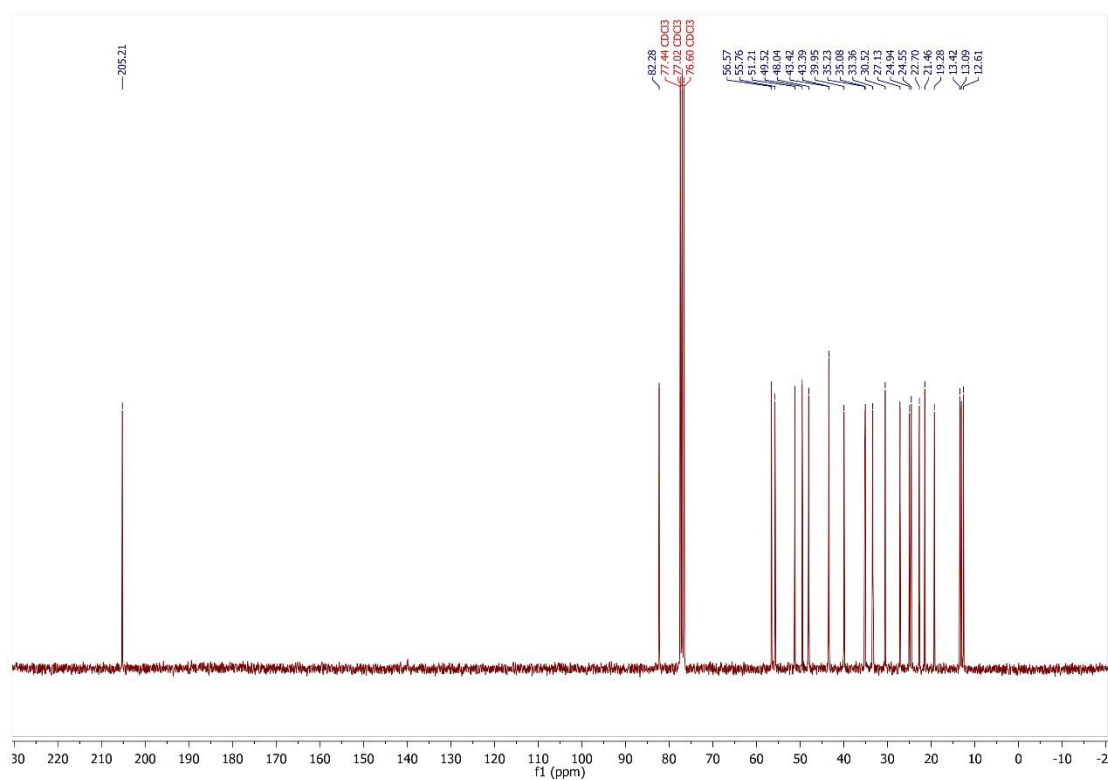


IR (cm⁻¹) = 3444,9; 2931,8; 2868,15; 1722,4; 1653,0; 1456,3; 1095,6.

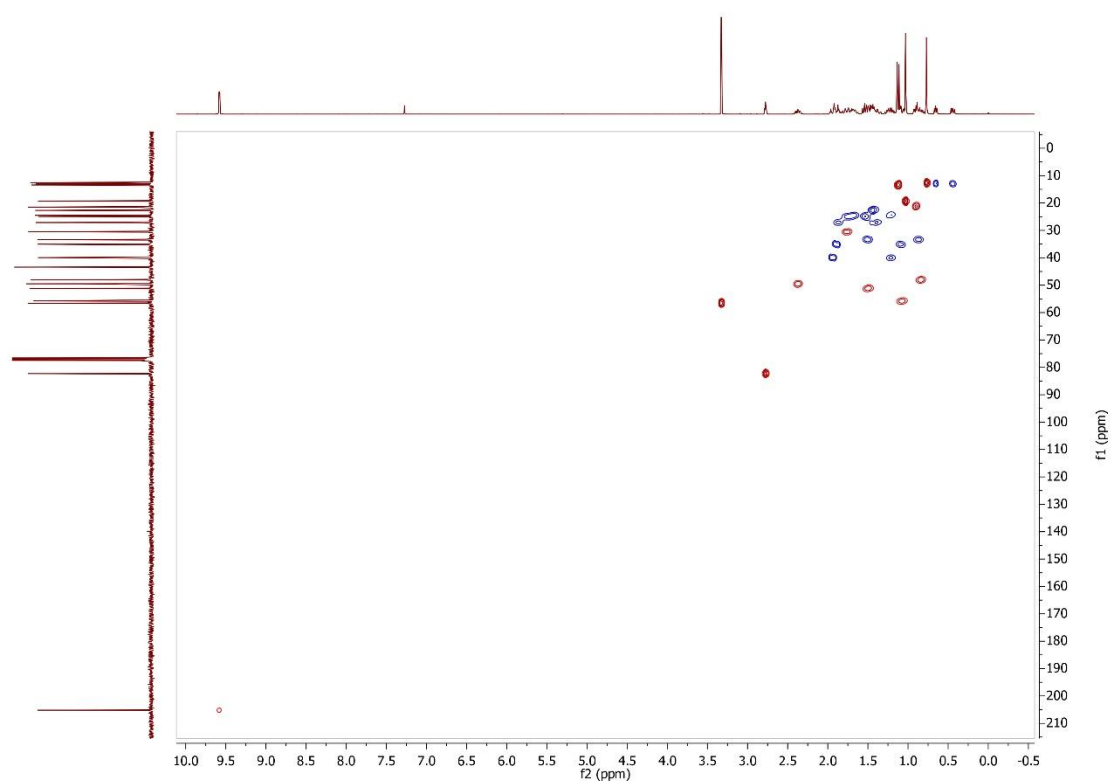
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 9,57 (d, 3H, 3,2 Hz, C22-H); 3,31 (s, 3H, OCH₃); 2,76 (t, 1H, 2,8 Hz, C6-H); 2,36 (dq, 1H, 3,2 Hz, 6,8 Hz, 10,2 Hz, C20-H); 1,11 (d, 3H, 6,8 Hz, C21-H₃); 1,02 (s, 3H, C19-H₃); 0,76 (s, 3H, C18-H₃); 0,64 (dd, 1H, 5,1 Hz, 3,7 Hz, C-H_a); 0,43 (dd, 1H; 8,1 Hz, 5,1 Hz, C-H_b).



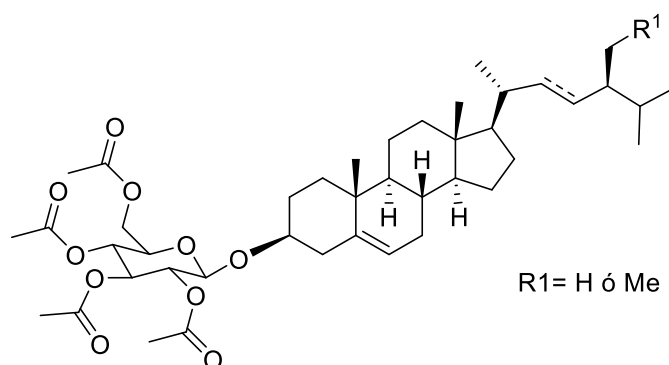
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 205,2; 82,3; 56,6; 55,8; 51,2; 49,5; 48,0; 43,4; 40,0; 35,2; 35,1; 33,4; 30,5; 27,1; 24,9; 24,5; 22,7; 21,5; 19,3; 13,4; 13,1; 12,6.



HSQC editado

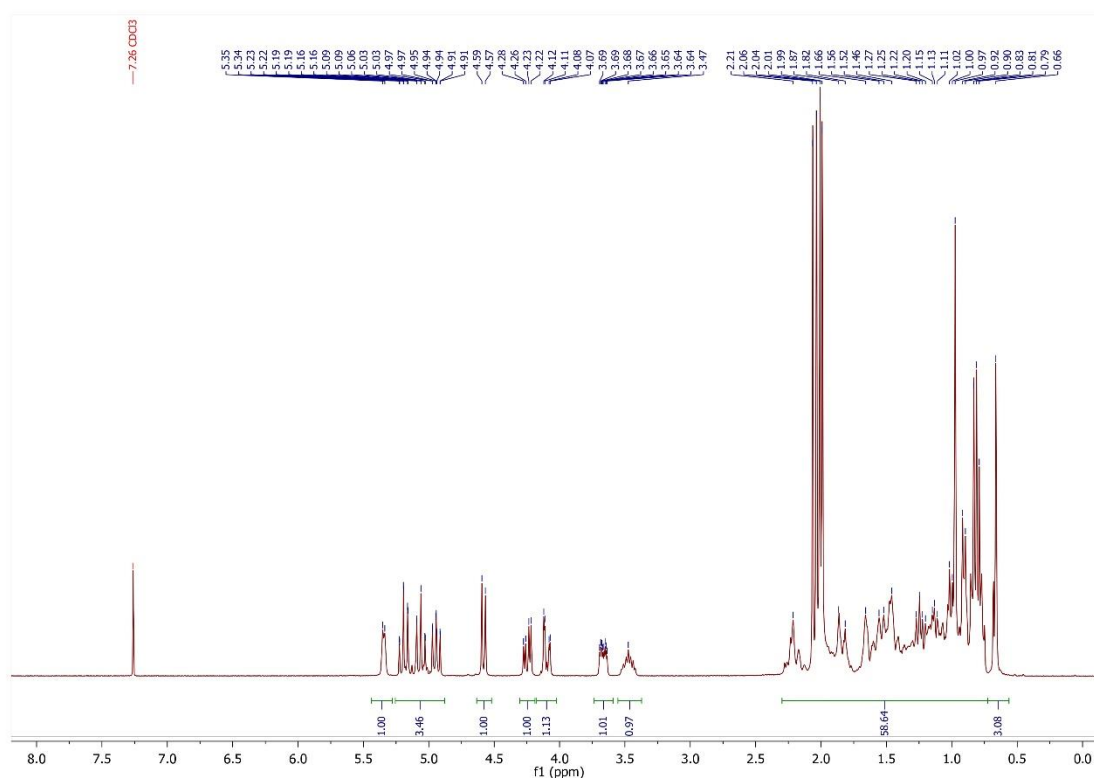


7.8 2,3,4,6-tetraacetyl esterilglucósidos



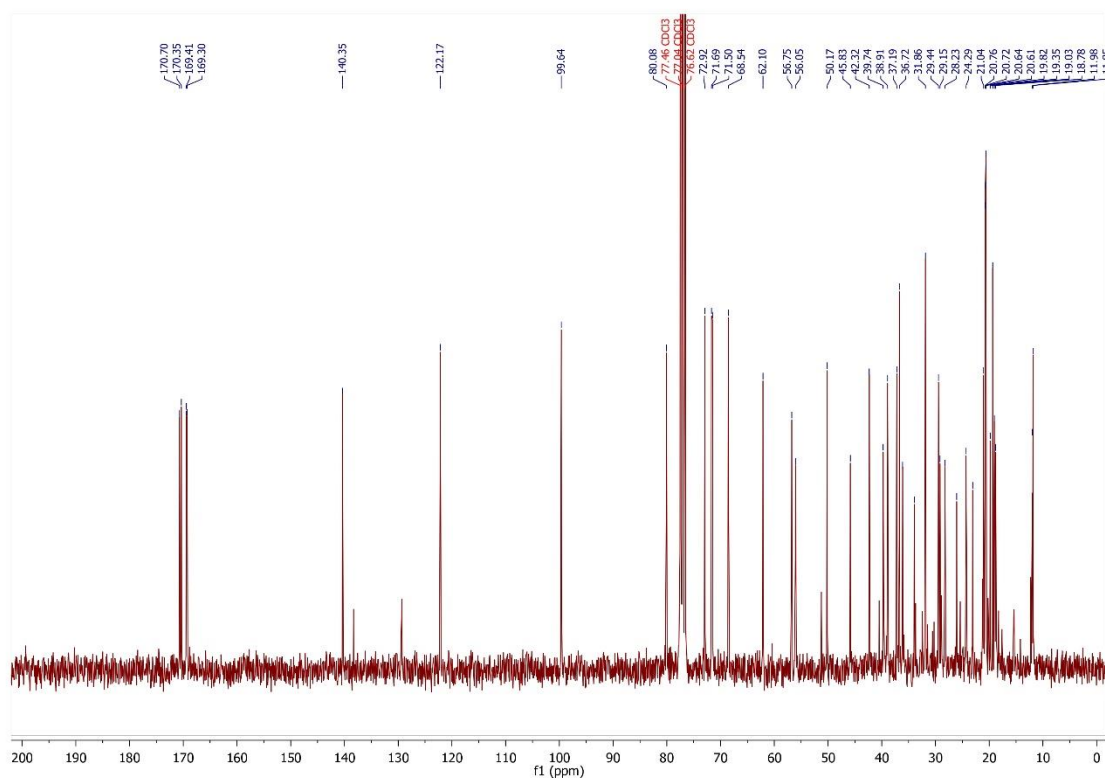
IR (cm⁻¹) = 2935,7; 2868,2; 1753,3; 1464,0; 1435,0; 1377,2; 1230,6; 1039,6; 908,5; 736,8.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,34 (m, 1H, C6-H), 5,19 (m, 1H, C3'-H); 5,06 (m, 1H, C4'-H); 4,94 (ddd, 1H, 9,3 Hz, 8,0 Hz, 0,8 Hz, C2'-H); 4,58 (d, 1H, 8,0 Hz, C1'-H); 4,25 (dd, 1H, 12,2 Hz, 4,8 Hz, C6'-H_a); 4,10 (dd, 1H, 12,1 Hz, 2,5 Hz, C6'-H_b); 3,66 (ddd, 1H, 9,8 Hz, 4,8 Hz, 2,5 Hz, C5'-H); 3,47 (m, 1H, C3-H); 2,21 (m, 2H, C4-H₂); 2,06-1,99 (s, 3H, OC-C-H₃); 0,97 (s, 3H, C19-H₃); 0,91 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,82 (d, 3H, 6,5 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,3 Hz, C26-H₃); 0,66 (s, 3H, C18-H₃).

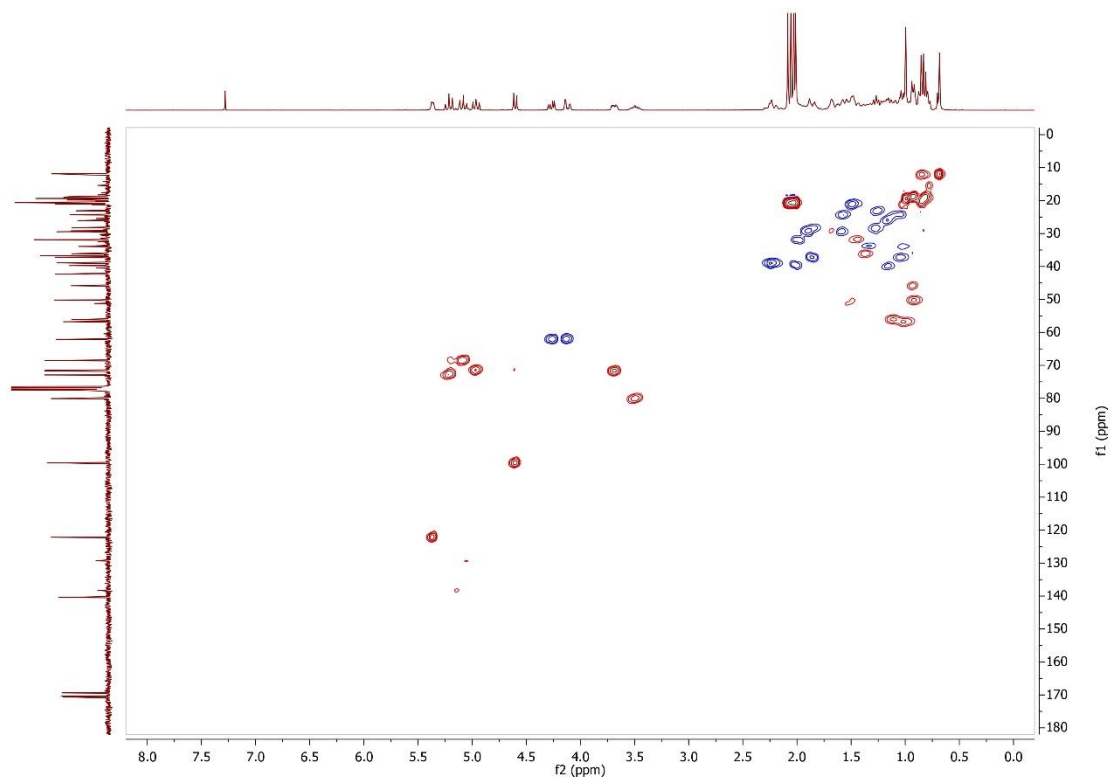


¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170,7; 170,4; 169,4; 169,3; 140,3; 122,2; 99,6; 80,1; 72,9; 71,7; 71,5; 68,5; 62,1; 56,7; 56,0; 50,2; 45,8; 42,3; 39,7; 38,9; 37,2; 36,7; 36,1; 33,9;

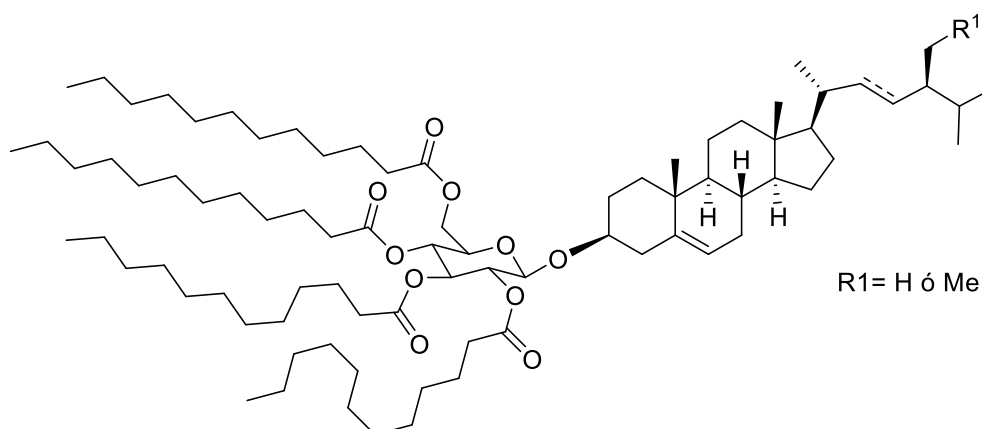
31,9; 29,4; 29,1; 28,2; 26,1; 24,3; 23,1; 21,0; 20,8; 20,7; 20,6; 20,6; 19,8; 19,4; 19,0; 18,8; 12,0; 11,9.



HSQC editado

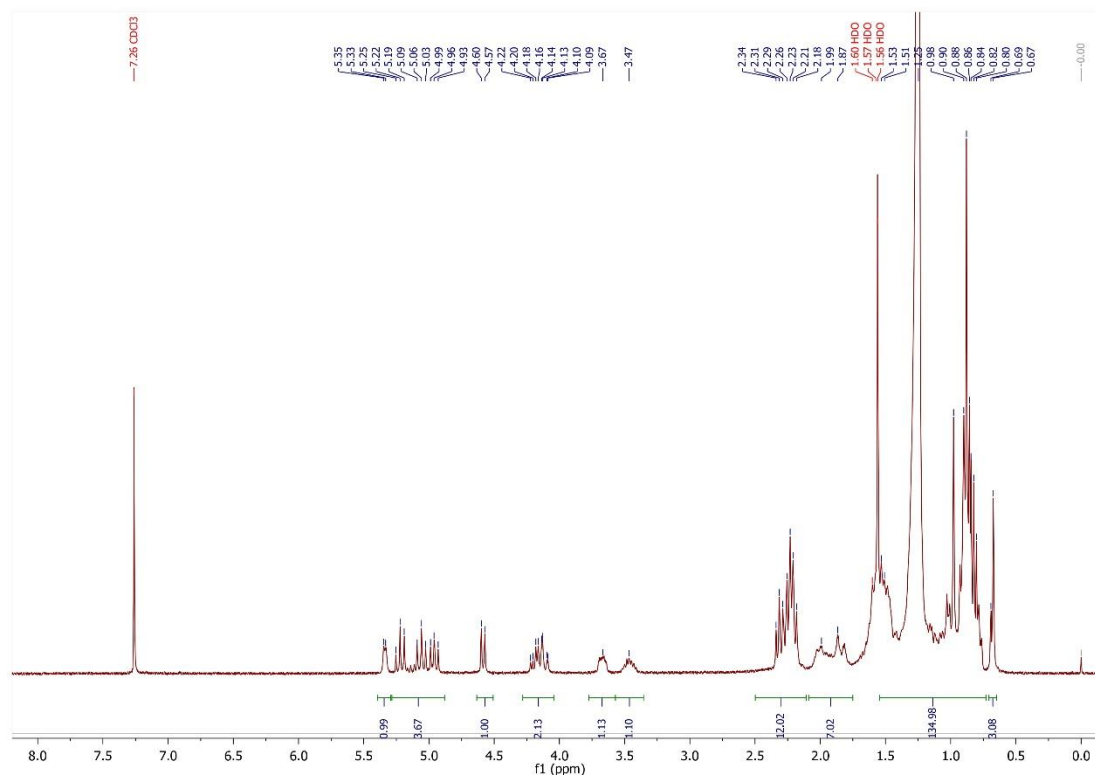


7.9 2,3,4,6-tetralauril esterilglucósidos



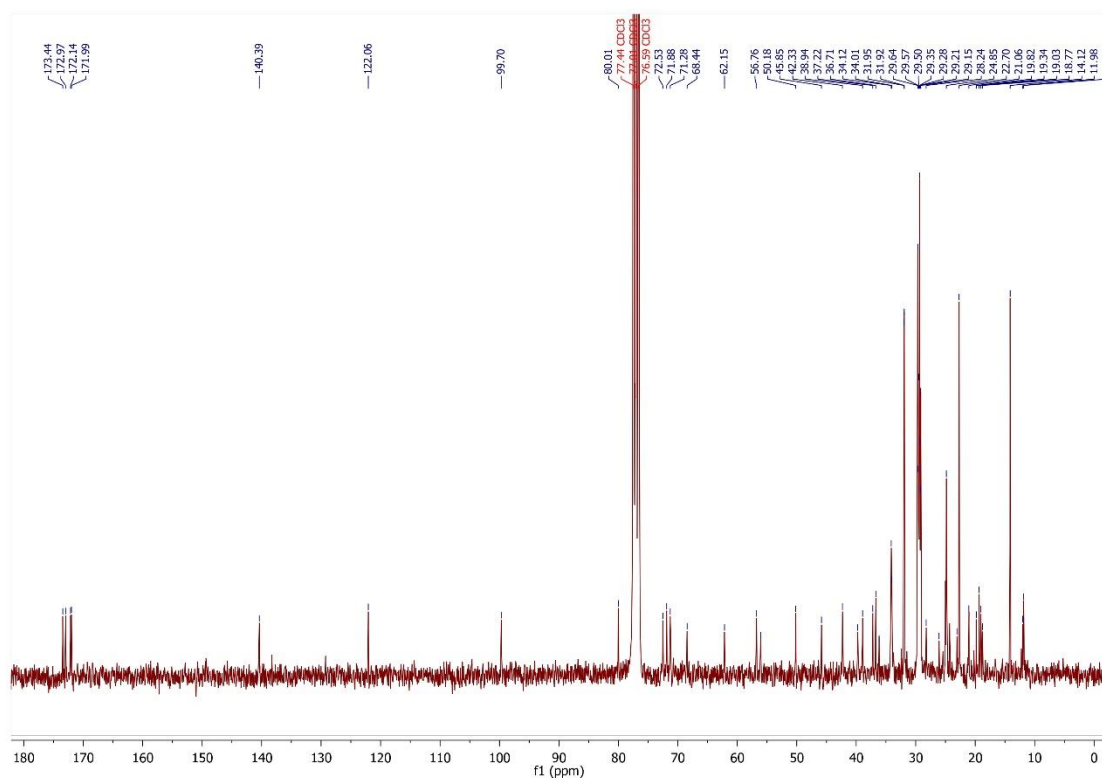
IR (cm⁻¹) = 2926,0; 2852,7; 1749,4; 1464,0; 1367,5; 1265,3; 1157,3; 740,7; 705,95.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,34 (m, 1H, C6-H), 5,22 (m, 1H, C3'-H); 5,06 (m, 1H, C4'-H); 4,96 (dd, 1H, 9,3 Hz, 8,0 Hz, C2'-H); 4,59 (d, 1H, 8,0 Hz, C1'-H); 4,19 (dd, 1H, 12,2 Hz, 5,3 Hz, C6'-H_a); 4,11 (dd, 1H, 12,1 Hz, 2,6 Hz, C6'-H_b); 3,66 (ddd, 1H, 8,3 Hz, 5,2 Hz, 2,6 Hz, C5'-H); 3,47 (m, 1H, C3-H); 1,25 (señal ancha, CH₂ cadenas alifáticas); 0,98 (s, 3H, C19-H₃); 0,89 (d, 3H, 6,5 Hz, C21-H₃); 0,87 (d, 3H, 6,9 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,4 Hz, C26-H₃); 0,67 (s, 3H, C18-H₃).

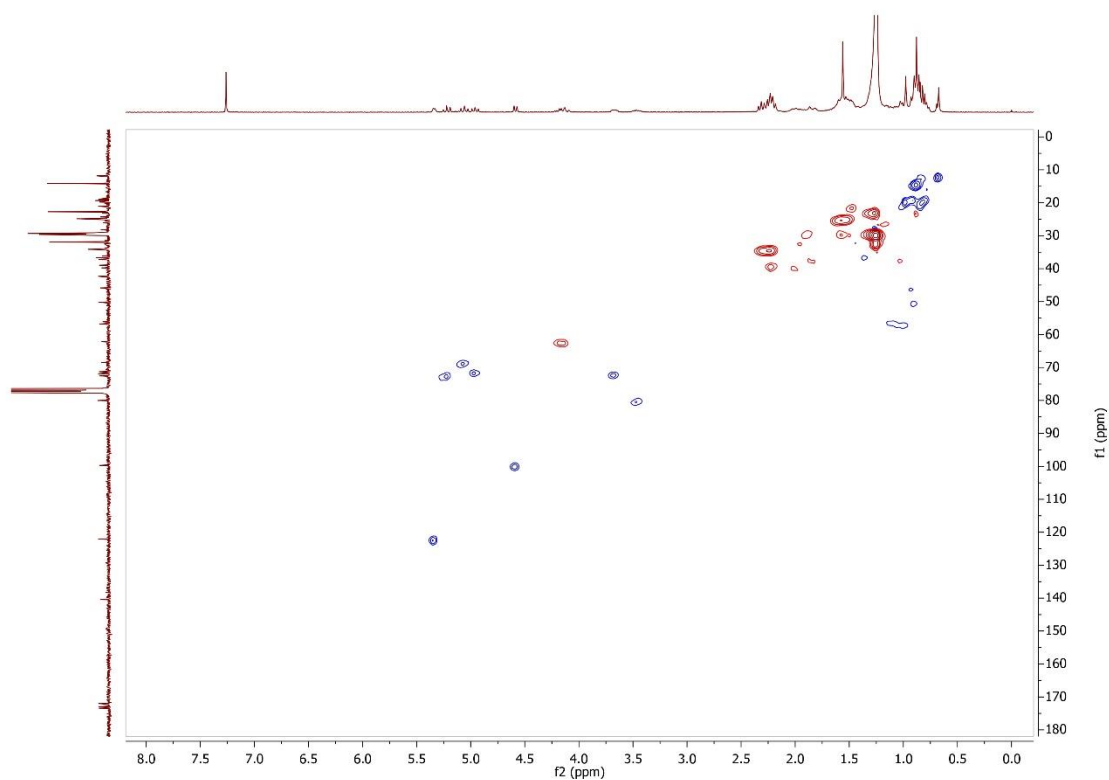


¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173,4; 173,0; 172,1; 172,0; 140,4; 122,1; 99,7; 80,0; 72,5; 71,9; 71,3; 68,4; 62,2; 56,8; 56,1; 50,2; 45,8; 42,3; 39,8; 38,9; 37,2; 36,7; 36,2; 34,1;

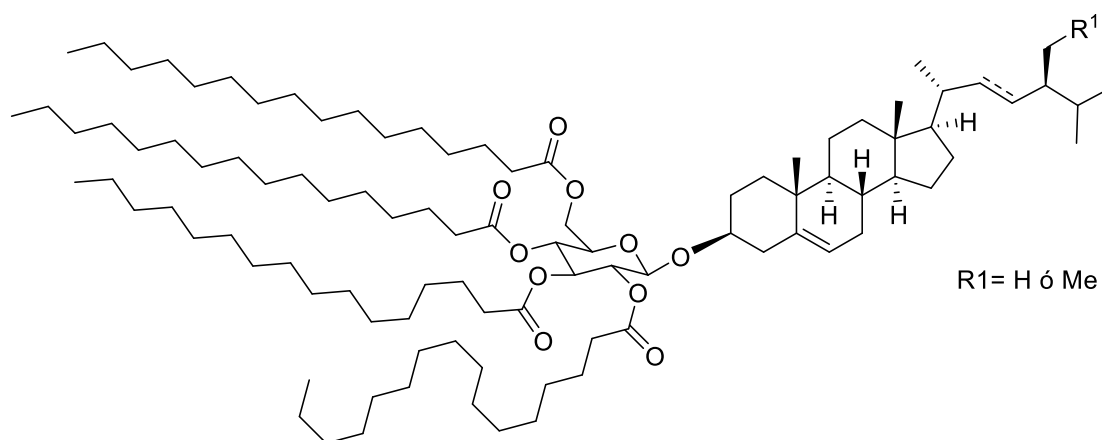
34,0; 32,0; 31,9; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 28,2; 26,1; 24,8; 23,1; 22,7; 21,1; 19,8; 19,3; 19,0; 18,8; 14,1; 12,0; 11,8.



HSQC editado

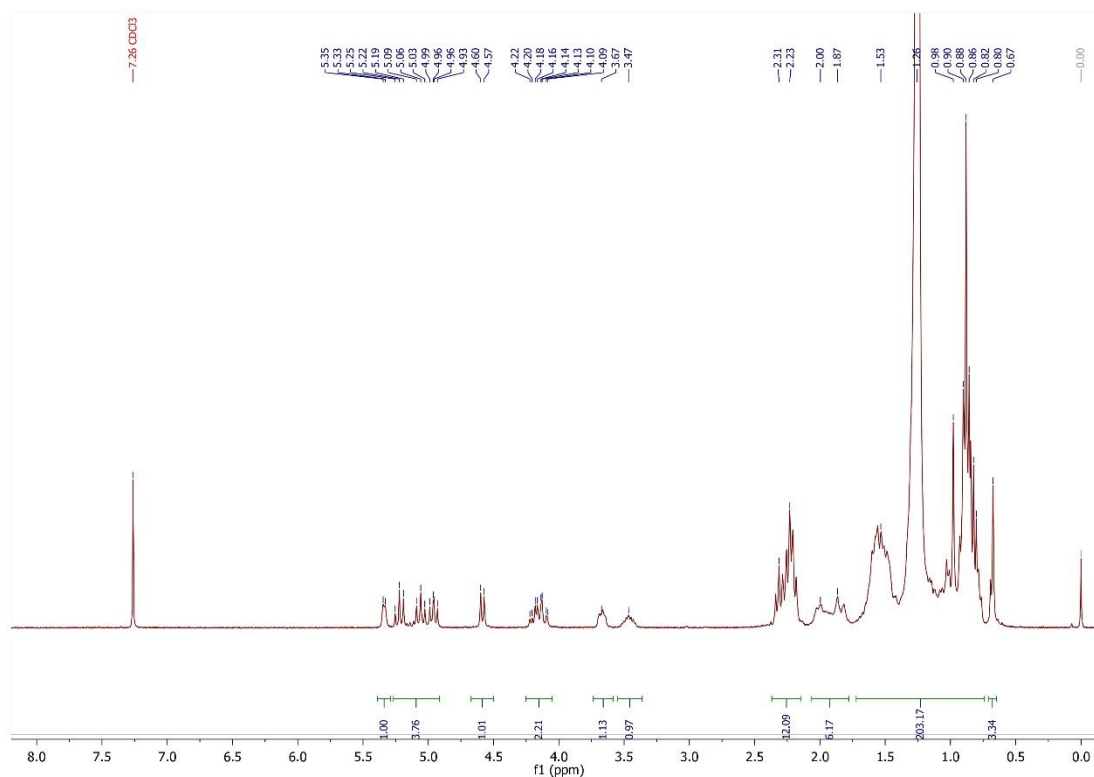


7.10 2,3,4,6-tetrapalmitoil esterilglucósidos



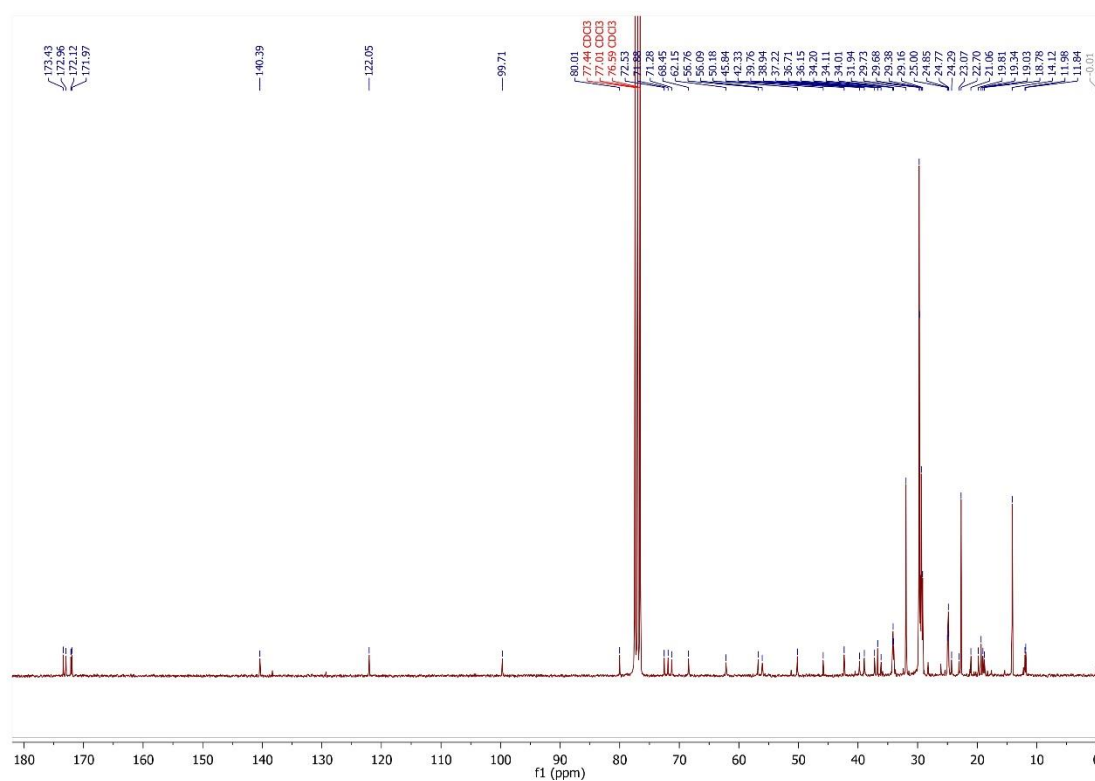
IR (cm⁻¹) = 2918,3; 2848,9; 1745,6; 1465,9; 1168,9; 493,8; 430,1; 414,7; 406,7.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,34 (m, 1H, C6-H), 5,22 (m, 1H, C3'-H); 5,06 (m, 1H, C4'-H); 4,96 (dd, 1H, 9,6 Hz, 8,0 Hz, C2'-H); 4,59 (d, 1H, 8,0 Hz, C1'-H); 4,19 (dd, 1H, 12,2 Hz, 5,3 Hz, C6'-H_a); 4,11 (dd, 1H, 12,2 Hz, 2,6 Hz, C6'-H_b); 3,66 (m, 1H, C5'-H); 3,47 (m, 1H, C3-H); 1,26 (señal ancha, CH₂ cadenas alifáticas); 0,98 (s, 3H, C19-H₃); 0,89 (d, 3H, 6,3 Hz, C21-H₃); 0,87 (d, 3H, 6,8 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,3 Hz, C26-H₃); 0,67 (s, 3H, C18-H₃).

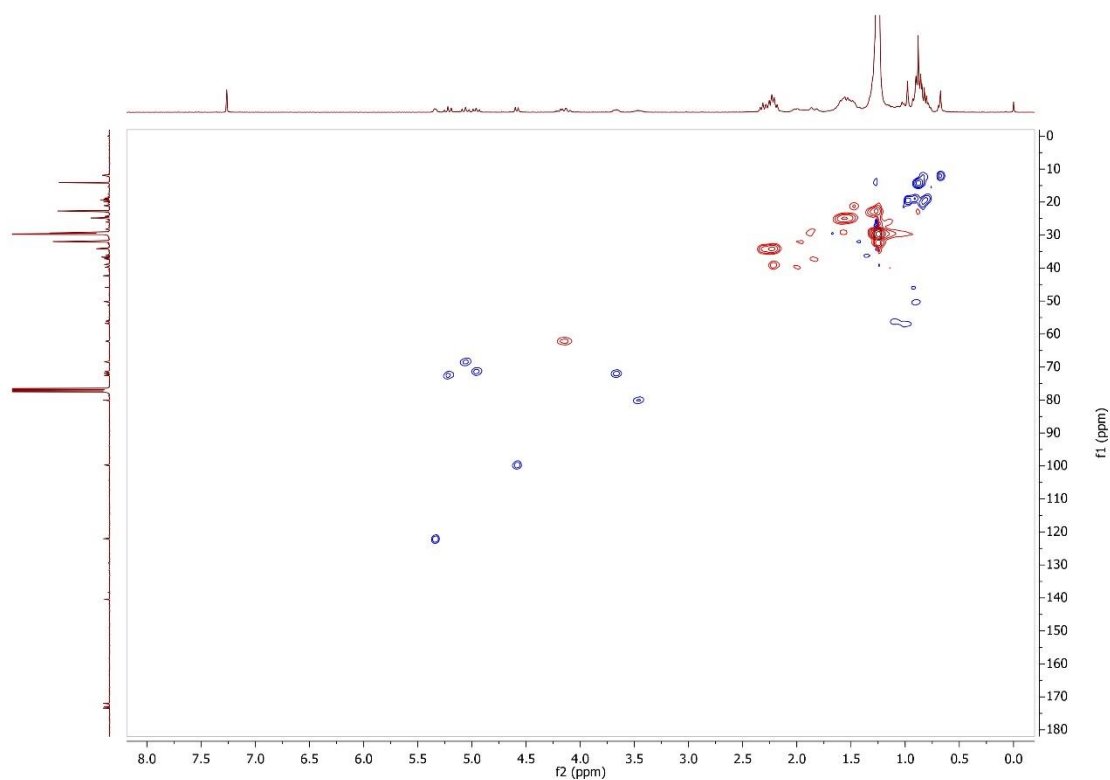


¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173,4; 173,0; 172,1; 172,0; 140,4; 122,1; 99,7; 80,0; 72,5; 71,9; 71,3; 68,5; 62,2; 56,8; 56,1; 50,2; 45,8; 42,3; 39,8; 38,9; 37,2; 36,7; 36,1; 34,2;

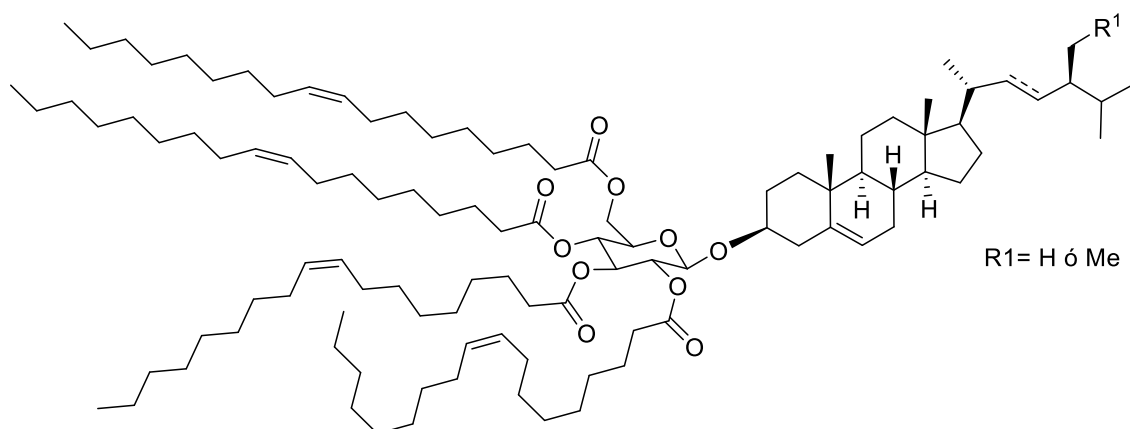
34,1; 34,0; 31,9; 29,7; 29,7; 29,4; 29,2; 25,0; 24,8; 24,8; 24,3; 23,1; 22,7; 21,1; 19,8; 19,3;
19,0; 18,8; 14,1; 12,0; 11,8.



HSQC editado

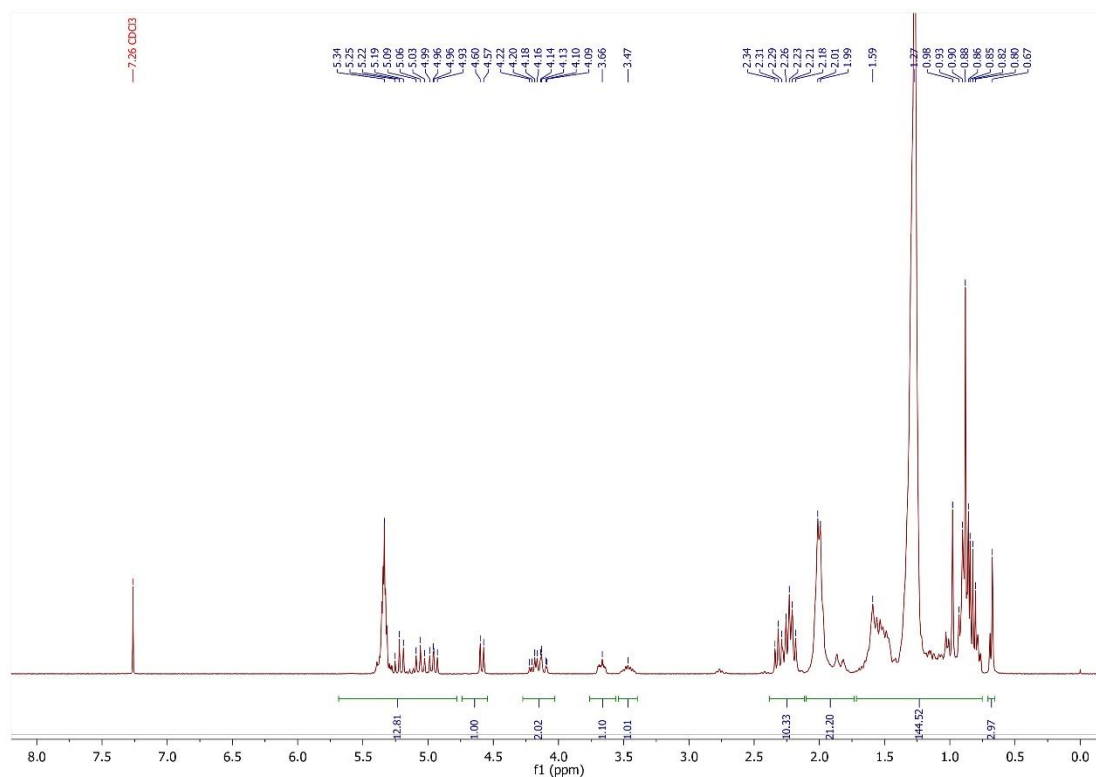


7.11 2,3,4,6-tetraoleil esterilglucósidos



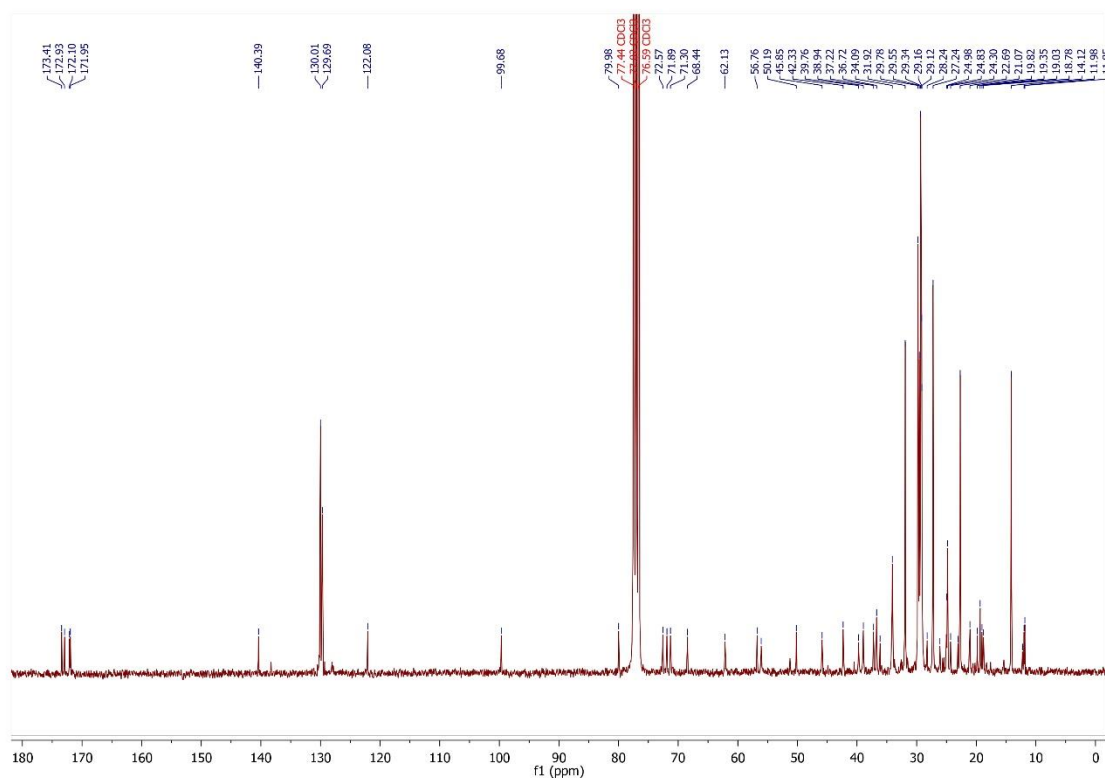
IR (cm⁻¹) = 2924,1; 2852,7; 1749,4; 1464,0; 1377,2; 1163,1; 738,7.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,34 (m, 8H, H-C=C-H oleilo), 5,22 (m, 1H, C3'-H); 5,06 (m, 1H, C4'-H); 4,96 (dd, 1H, 9,6 Hz, 8,0 Hz, C2'-H); 4,59 (d, 1H, 8,0 Hz, C1'-H); 4,19 (dd, 1H, 12,2 Hz, 5,3 Hz, C6'-H_a); 4,11 (dd, 1H, 12,2 Hz, 2,6 Hz, C6'-H_b); 3,66 (m, 1H, C5'-H); 3,47 (m, 1H, C3-H); 1,26 (señal ancha, CH₂ cadenas alifáticas); 0,98 (s, 3H, C19-H₃); 0,89 (d, 3H, 6,3 Hz, C21-H₃); 0,87 (d, 3H, 6,8 Hz, C27-H₃); 0,80 (d, 3H, 6,3 Hz, C26-H₃); 0,67 (s, 3H, C18-H₃).

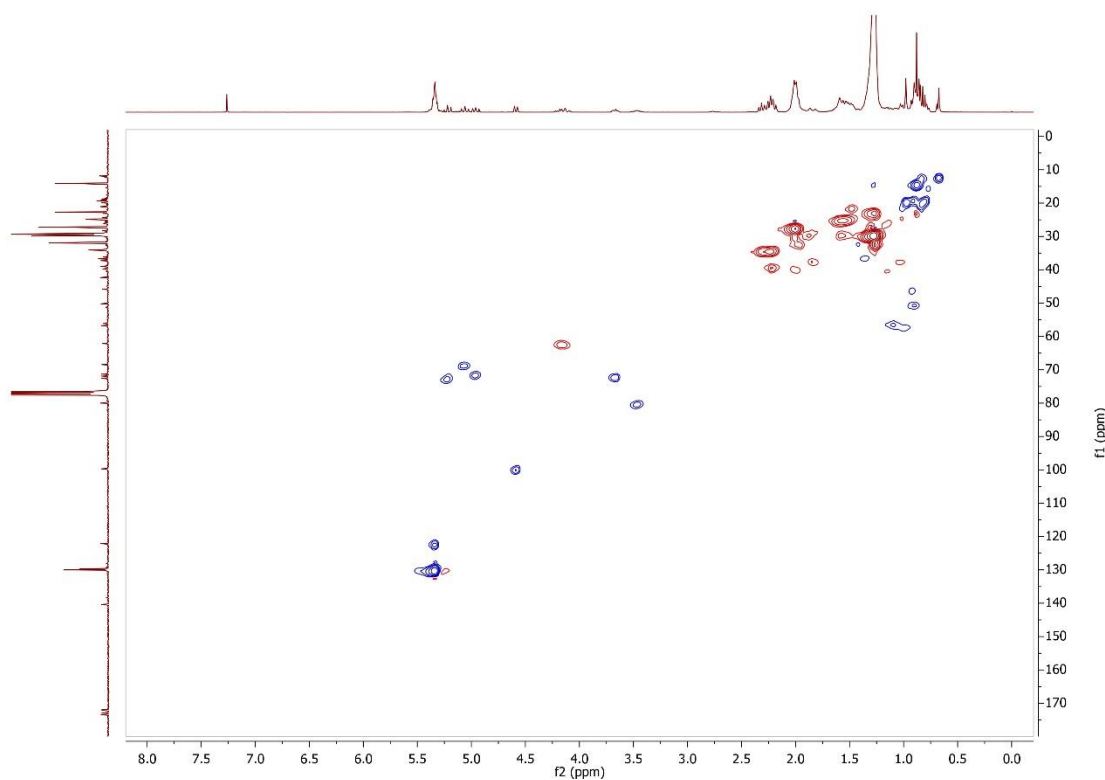


¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173,4; 172,9; 172,1; 171,9; 140,4; 130,0; 129,7; 122,1; 99,7; 80,0; 72,6; 71,9; 71,3; 68,4; 62,1; 56,8; 56,1; 50,2; 45,8; 42,3; 39,8; 38,9; 37,2; 36,7;

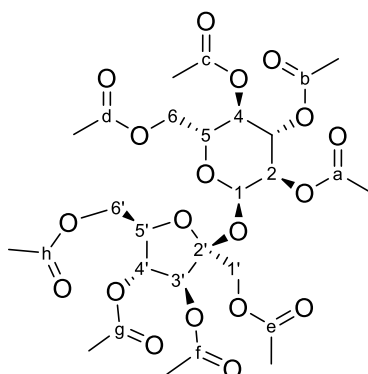
36,1; 34,1; 31,9; 29,8; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1; 28,2; 27,2; 26,1; 25,0; 24,8; 24,3; 23,1; 22,7;
21,1; 19,8; 19,3; 19,0; 18,8; 14,1; 12,2; 12,0; 11,9.



HSQC editado

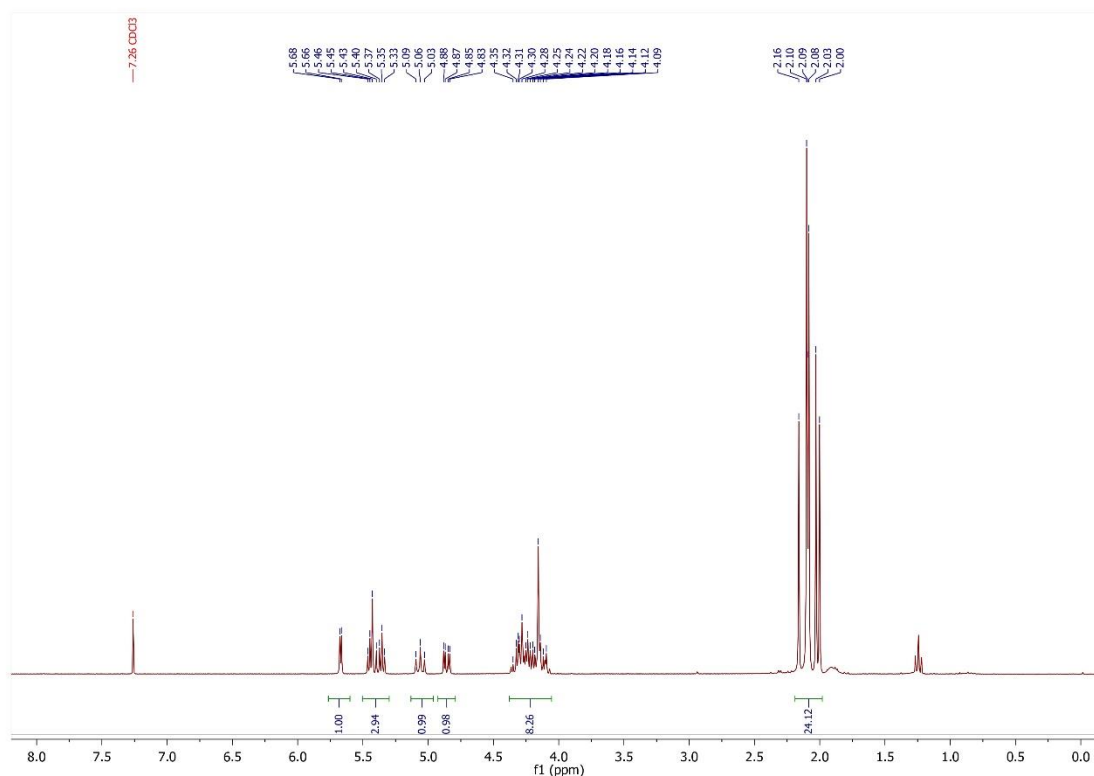


7.12 octaacetilsacarosa

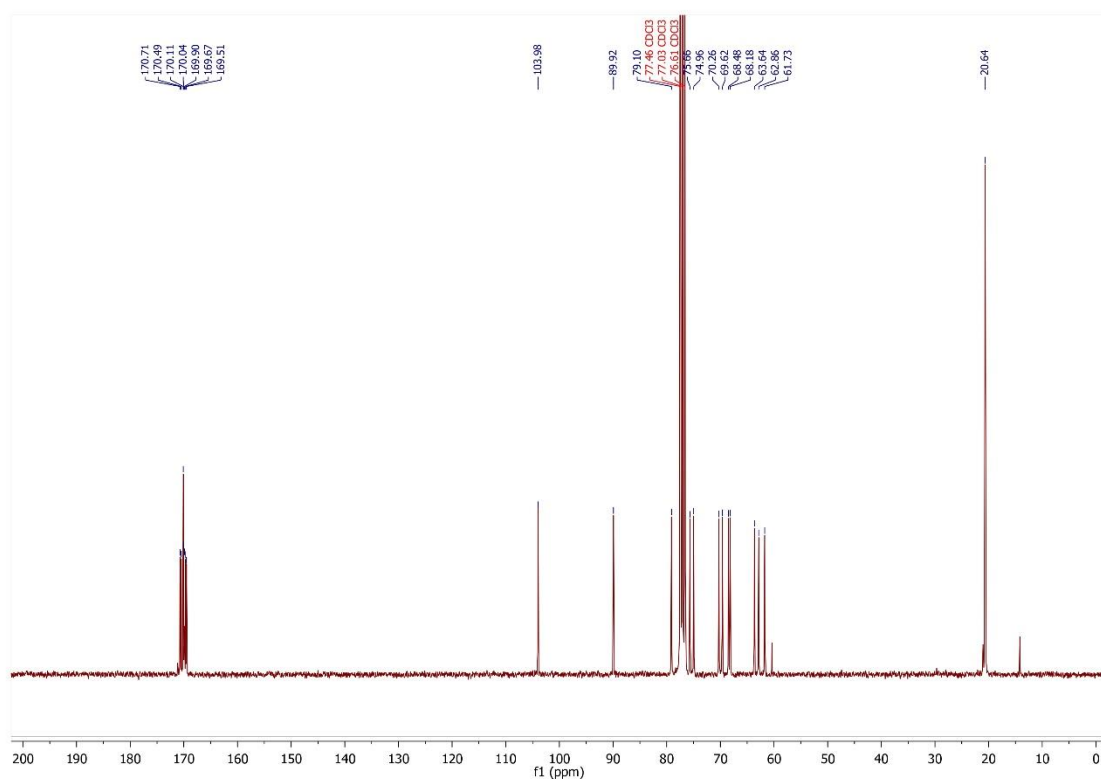


IR (cm⁻¹) = 2960,7; 1747,5; 1645,3; 1435,0; 1371,4; 1226,7; 1039,6; 898,8; 736,8; 702,1.

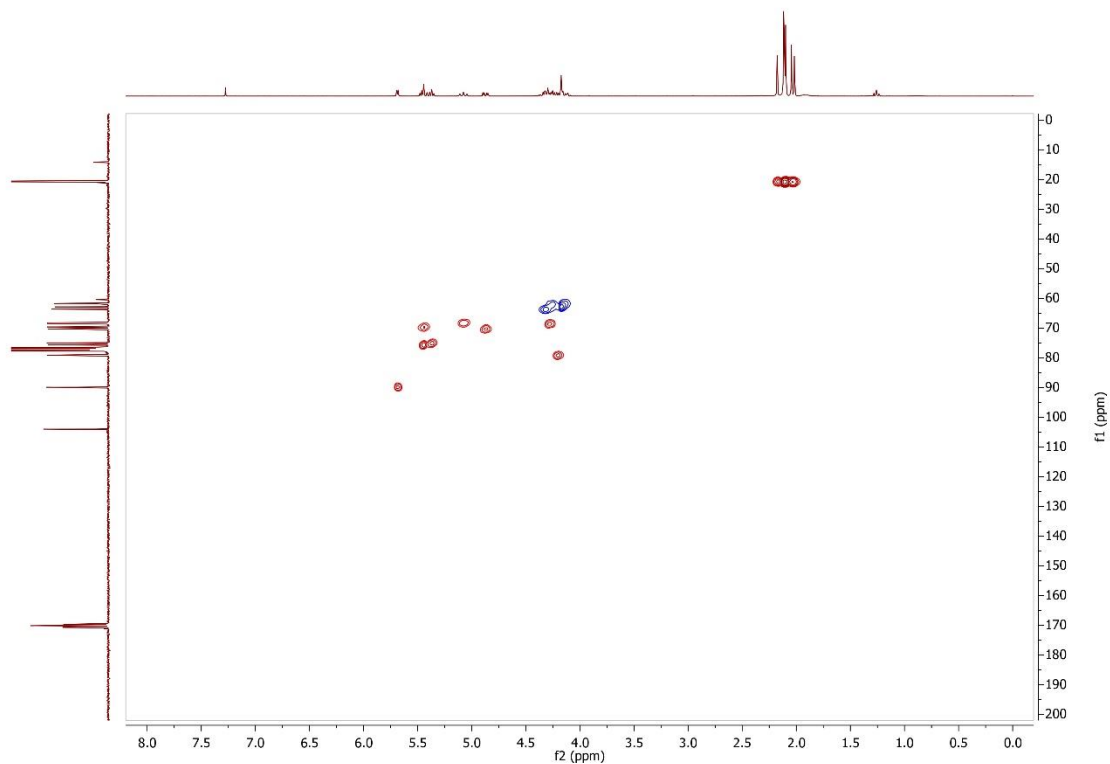
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,67 (d, 1H, 3,7 Hz, C1-H); 5,46-5,33 (señales superpuestas, 3H, C3-H/C3'-H/C4'-H); 5,08 (m, 1H, C4-H); 4,86 (dd, 10,3 Hz, 3,7 Hz, C2-H); 4,16 (s, 2H, C1'-H₂); 2,16-2,00 (s, 3H, C^{a-h}O-CH₃).



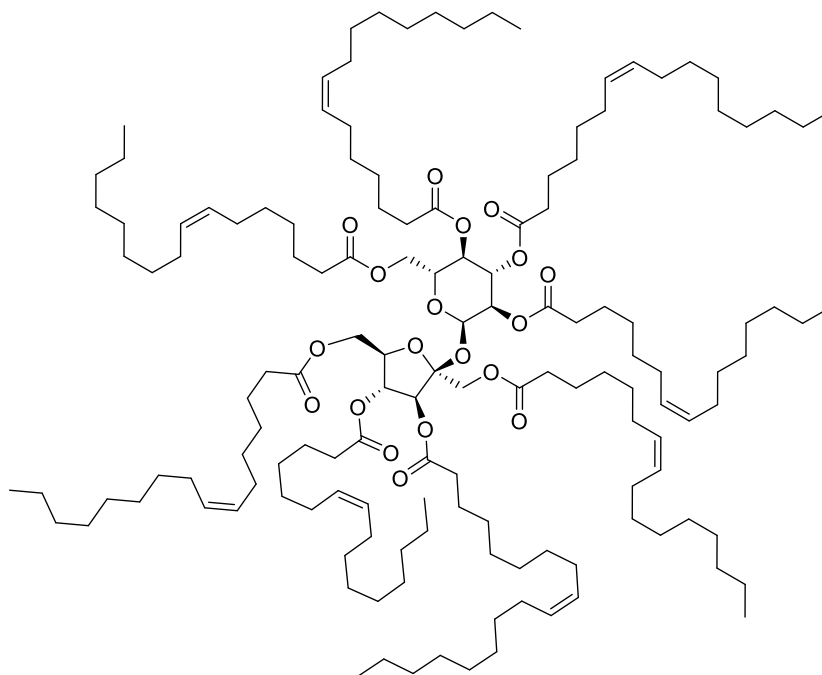
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170,7; 170,5; 170,1; 170,0; 169,9; 169,7; 169,5; 104,0; 89,9; 79,1; 75,7; 75,0; 70,3; 69,6; 68,5; 68,2; 63,6; 62,9; 61,7; 20,6.



HSQC editado

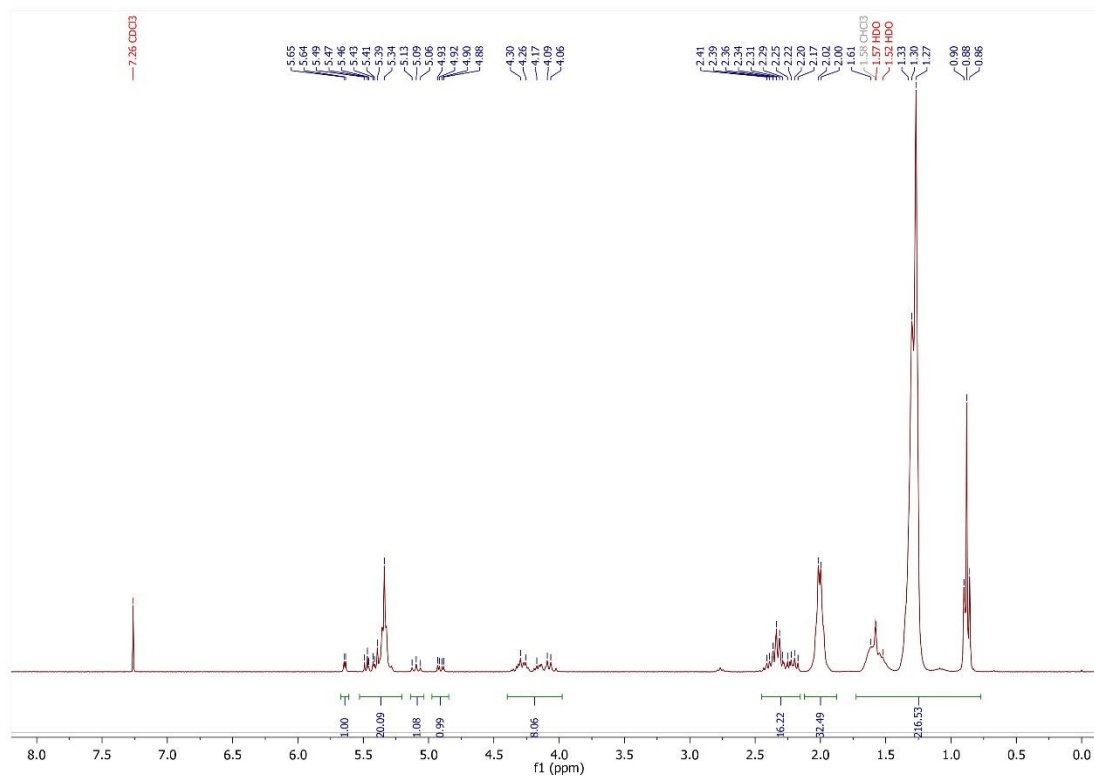


7.13 octaoleilsacarosa

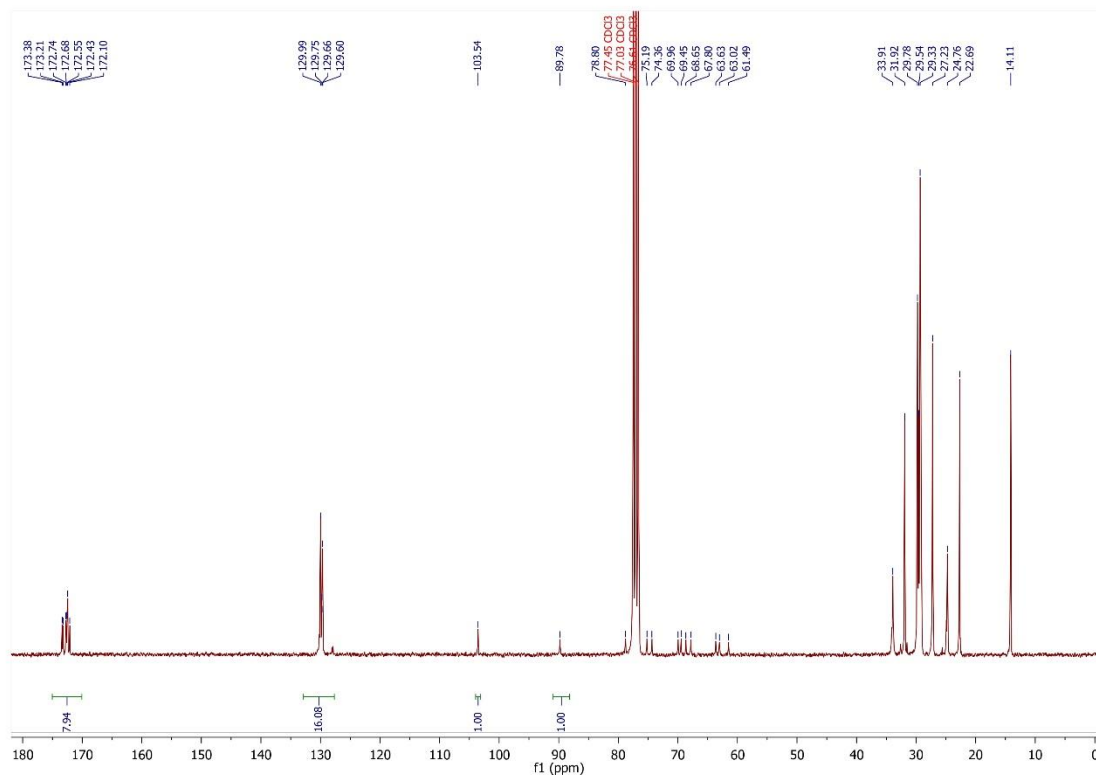


IR (cm⁻¹) = 2922,2; 2852,7; 1747,5; 1645,3; 1464,0; 1377,2; 1240,2; 1161,2; 723,3.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5,65 (d, 1H, 3,7 Hz, C2-H); 5,46-5,28 (señales superpuestas, 3H, C3-H/C3'-H/C4'-H); 5,34 (m, 16H, H-C=C-H oleilo); 5,09 (m, 1H, C4-H); 4,91 (dd, 10,4 Hz, 3,7 Hz, C1-H); 4,30 (s, 2H, C1'-H₂); 0,88 (t, 24H, 6,7 Hz, CH₃).



^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 173,4; 173,2; 172,7; 172,7; 172,5; 172,4; 172,1; 130,0; 129,8; 129,7; 129,6; 103,5; 89,8; 78,8; 75,2; 74,4; 70,0; 69,4; 68,6; 67,8; 63,6; 63,0; 61,5; 33,9; 31,9; 29,8; 29,5; 29,3; 27,2; 24,8; 22,7; 14,1.



HSQC editado

