

Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) y su probable función en las plantas

Natural eutectic solvents (NaDES), and their potential role in plants

Mariana Ruesgas-Ramon¹, Karlina García-Sosa¹, Luis Manuel Peña Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida
97205, Yucatán, México.

lmanuel@cicy.mx

Tel.: 52+(999)9428330

Fax: 52+ (999) 981 39 00

Resumen

El concepto de solventes eutécticos naturales (NaDES) fue introducido específicamente para hacer referencia a posibles mezclas eutécticas constituidas por metabolitos secundarios resistentes en altas concentraciones en las células vegetales. Este tipo de solventes alternativos en las células podrían ser claves para entender funciones fisiológicas específicas en las plantas, así como la capacidad de ciertos organismos a resistir o aclimatarse a las duras condiciones ambientales (e.g. resistencia al frío y/o a la sequía). Por otro lado, los NaDES podrían estar involucrados en otras funciones biológicas dentro de las células, como las relacionados con la regulación del funcionamiento celular. Aun cuando la elevada complejidad de los sistemas celulares hace difícil comprobar que los NaDES existen en las células, esta teoría ha abierto una interesante perspectiva que ofrece una explicación atractiva para algunos de los fenómenos que ocurren a nivel celular y que de otro modo serían difíciles de entender.

Palabras clave: Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES), plantas, regulación celular, solubilización, protección oxidativa.

Abstract

The concept of natural eutectic solvents (NaDES) was introduced to refer to possible eutectic mixtures made up of secondary metabolites in high cell concentrations. This type of alternative solvent in cells could be key to understanding specific physiological functions in plants, as well as the ability of certain organisms to resist or acclimatize to harsh environmental conditions (resistance to cold and/or drought). On the other hand, NaDES could be involved in other biological roles related to the regulation of cell function. Although given the high complexity of cellular systems, proving that NaDES actually exist in cells is challenging, this theory has opened up an interesting perspective that offers an attractive explanation for some phenomena that occur at the cellular level that would otherwise be difficult to explain.

Keywords: Natural eutectic solvents (NaDES), plants, cell regulation, solubilization, oxidative protection.

¿Qué son los DES y los NaDES?

Hace casi dos décadas se reportó por primera vez la posibilidad de formular mezclas a base de urea y cloruro de colina (ChCl), como una alternativa a los ya bien conocidos líquidos iónicos (IL's) (Abbott et al. 2003). Sin embargo, la caracterización de este nuevo tipo de solventes reveló que, aunque comparten propiedades fisicoquímicas de IL's como baja volatilidad y presión de vapor, estabilidad térmica y química y alta viscosidad (Smith, Abbott, and Ryder 2014)(Zhang et al. 2012), ambos tipos de disolventes difieren principalmente en la naturaleza de sus componentes y en sus procesos de formulación (Durand et al. 2020). Este nuevo tipo de disolventes se conoce actualmente como solventes eutécticos profundos o DES (por sus siglas en inglés). Los DES se pueden definir como la combinación de al menos dos componentes capaces de asociarse por medio de interacciones no covalentes (principalmente puentes de hidrógeno), para formar una mezcla líquida que permanece estable a temperatura ambiente. Aun cuando estas interacciones no covalentes involucran principalmente puentes de hidrógeno, también pueden estar presentes fuerzas electrostáticas o enlaces de *Van der Waals*.

Desde la introducción de los DES en 2003, y hasta la actualidad, se han utilizado un gran número de componentes para la síntesis exitosa de este tipo de solventes; los componentes más comúnmente utilizados son el cloruro de colina (ChCl) en combinación con urea, etilenglicol y/o glicerol. Más recientemente se ha reportado la posibilidad de formar combinaciones con estas características utilizando compuestos tales como alcoholes, aminoácidos, ácidos carboxílicos y azúcares (Figura 1; componentes comúnmente utilizados para la preparación de solventes eutécticos profundos) (Ruesgas-Ramon, Figueroa-Espinoza and Durand, 2017). Esta amplia diversidad química de componentes ofrece la posibilidad de ajustar las propiedades fisicoquímicas de los DES, por lo que éstos suelen ser solventes muy versátiles con aplicación en diferentes campos de la investigación como la electroquímica, la catálisis química y/o enzimática, la ciencia de los materiales, y como solventes de

extracción, entre otras (Tang and Ho 2013);(Zhang et al. 2012).

Derivado de las investigaciones sobre DES, Choi *et al.* 2011 introdujeron la palabra "natural" al concepto de DES, al notar que ciertas moléculas simples siempre estaban presentes en cantidades considerables en las células de mamíferos, plantas o microorganismos. Por lo anterior, el término solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) se introdujo para referirse, específicamente, a las posibles mezclas eutécticas constituidas por metabolitos secundarios presentes en altas concentraciones en células vivas. Estas mezclas han sido observadas en determinados estadios de la vida de las plantas, donde podrían estar desempeñando funciones fisiológicas específicas. Esta hipótesis ha tomado fuerza después de observar tanto la consistencia, como la apariencia características de secreciones naturales como el néctar, la savia y la miel, cuyas propiedades físicas y el análisis cualitativo y estequiométrico de sus componentes (e.g. azúcares y/o aminoácidos) son muy similares a los descritos para NaDES formulados en laboratorio (Dai et al. 2013)

Los NaDES en las plantas.

Aunque la presencia de los NaDES en la naturaleza no está necesariamente limitada a las células vegetales, varios procesos fisiológicos que ocurren en las plantas, incluyendo la resistencia a factores abióticos como bajas temperaturas, estrés hídrico y la falta de luz, sugieren la existencia de otro tipo de líquido, además de agua, en las células (Choi et al. 2011). De esta forma, la presencia de NaDES dentro de las células vegetales puede explicar las altas concentraciones (hasta 30%) en las que se encuentran moléculas que suelen ser inestables y poco solubles en agua. Lo anterior sugiere que los NaDES podrían estar involucrados no solo en la estabilización, sino también en el almacenamiento de ciertos metabolitos (Jeong et al. 2017) (Bi et al. 2020) (Wikene, Bruzell, and Tønnesen 2015).

Las características fisicoquímicas de los NaDES permitirían establecer una red compleja de interacciones no covalentes bien

Artículos

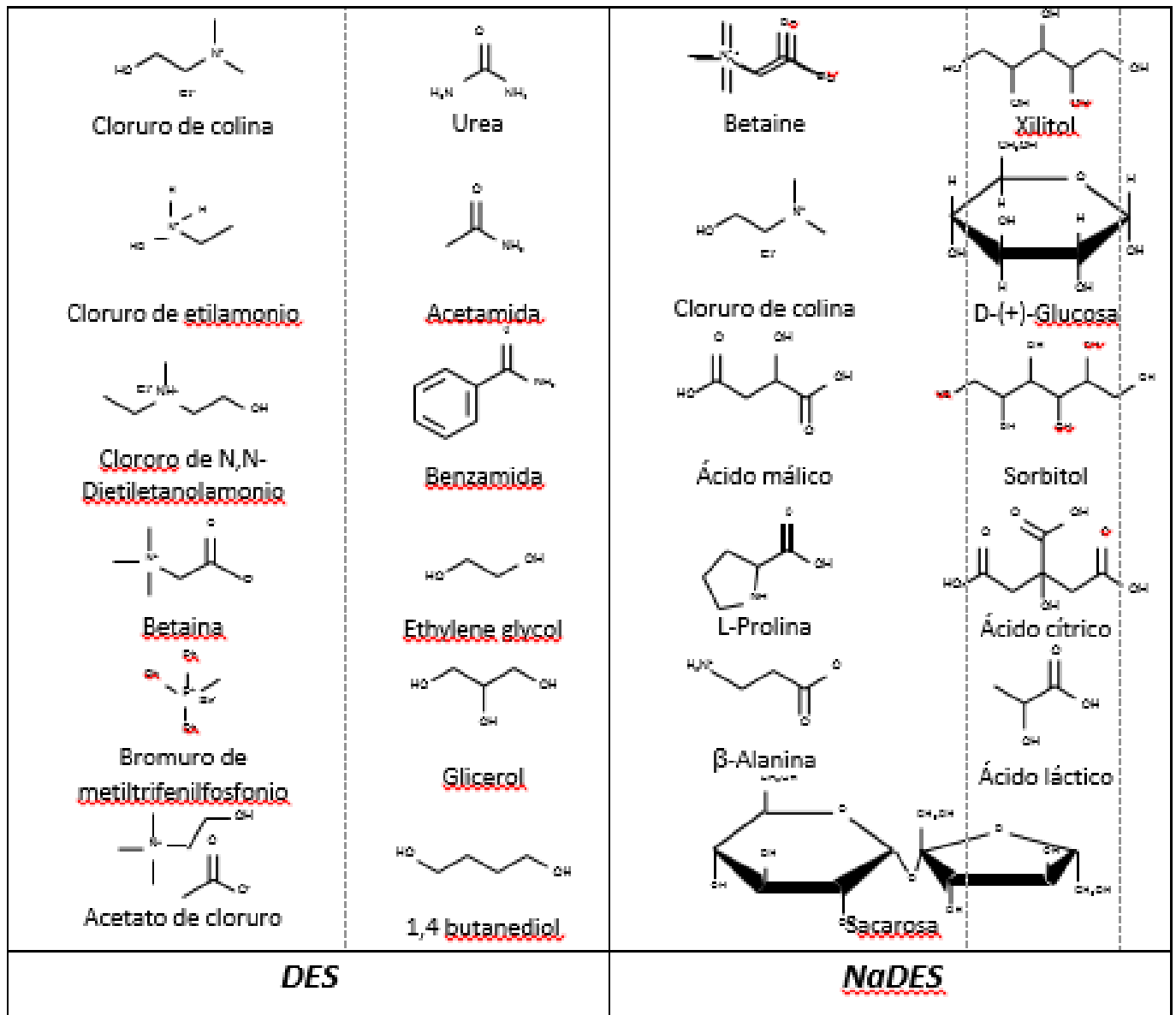


Figura 1. Compuestos comúnmente usados en la preparación de DES y NaDES

organizadas entre los metabolitos y los propios solventes (Verpoorte, Witkamp, and Choi 2021), dando como resultado una disminución en el movimiento de las moléculas, una reducción del contacto en las interfaces, e.g. con el oxígeno en el aire, y, como consecuencia, una menor degradación oxidativa. Los estudios de la solubilización de

pigmentos vegetales como cartamina, rutina, curcumina y algunas antocianinas, caracterizados por su inestabilidad y poca solubilidad en soluciones acuosas, demostraron que soluciones de los pigmentos en diferentes NaDES mostraron una mayor estabilidad aun bajo condiciones de estrés térmico y lumínico.

La presencia de puentes de hidrógeno entre las moléculas de interés y los componentes de los NaDES, detectados por espectrometría de masas y espectroscopia de FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier), sugiere que estas interacciones permiten que las moléculas adopten una conformación específica, dando como resultado una mayor fotoestabilidad (Zhao et al. 2015) (Dai, Verpoorte, and Choi 2014) (Grillo et al. 2020) (Jeliński, Przybyłek, and Cysewski 2019). En este mismo sentido, otros estudios han demostrado también la capacidad de los NaDES para solubilizar algunas macromoléculas, entre las que destacan la lignina, proteínas y algunos polisacáridos (Choi et al. 2011)(Dai et al. 2015)(Škulcová et al. 2016)(Kist et al. 2021)(Vigier, Chatel, and Jérôme 2015). Tomando en cuenta lo anterior, la presencia de NaDES en las células vegetales puede explicar como es que algunos metabolitos secundarios de naturaleza lipofílica se biosintetizan dentro de las células vegetales compuestas principalmente por agua (70% w/w). Un ejemplo de lo anterior está dado por el alargamiento de la cadena de polisacáridos donde su disolución debe ocurrir antes de cristalizar o precipitar; en este caso, los NaDES contienen las enzimas y los precursores necesarios para que se produzca el alargamiento, en tanto que los cambios en la composición de los NaDES ponen fin a la biosíntesis (Ramón and Guillena 2019). Recientemente se ha reportado que enzimas como la lacasa son completamente solubles en NaDES, permaneciendo en su estado nativo y, por lo tanto, siendo capaces de catalizar reacciones enzimáticas (Tang and Ho 2013)(Durand et al. 2013). Derivado de estas observaciones, se ha sugerido que la savia de ciertas plantas carnívoras actúa como un NaDES formado por azúcares y polialcoholes, donde las enzimas hidrolíticas útiles para la digestión de los insectos podrían permanecer en su estado nativo (Durand et al. 2020).

Los NaDES como estrategia para explicar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico

Las plantas se encuentran continuamente expuestas a estímulos ambientales que son determinantes para su crecimiento y desarrollo.

El déficit de agua es uno de los factores más comunes que provoca estrés en estos organismos y en casos extremos puede comprometer su supervivencia. Sin embargo, la tolerancia al estrés hídrico es un rasgo que existe en la mayoría de las plantas superiores, en tanto que algunas plantas se han adaptado a sobrevivir mediante fenómenos de resurrección (du Toit, Bentley, and Farrant 2021). Si bien estas adaptaciones involucran diferentes reacciones bioquímicas, aún no está claro como es que en etapas de deshidratación y sequía, donde el proceso de la fotosíntesis está limitado, algunas especies sobreviven permaneciendo en reposo hasta la rehidratación, tras lo cual el metabolismo se recupera rápidamente en los tejidos existentes.

Considerando que bajo condiciones de estrés hídrico el contenido de agua en las células vegetales puede reducirse hasta el 10%, los NaDES en la naturaleza podrían desempeñar un papel clave en la capacidad de estos organismos para resistir o aclimatarse a las duras condiciones ambientales, formando parte de un ambiente celular que proporcione estabilidad química, estructural y térmica, y que actúe con una capacidad amortiguadora de la célula y sus orgánulos durante la deshidratación.

Se ha reportado que, en especies tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico, los niveles de azúcares como la sacarosa y aminoácidos como la prolina, asociados con la protección y la estabilización celular en plantas bajo condiciones de estrés hídrico, aumentan considerablemente (du Toit, Bentley, and Farrant 2021), por lo que se ha sugerido que el agua en las células vegetales es reemplazada por componentes asociados en forma de NaDES (e.g. azúcares, aminoácidos y/o ácidos orgánicos), capaces de evitar la cristalización/congelación del agua al interior de las células (Durand et al. 2020). Esto permitiría estabilizar moléculas, enzimas y organelos, permitiendo mantener el estado nativo de las macromoléculas (Choi et al. 2011).

Esta teoría explica cómo es que, en los periodos de deshidratación y sequía, las plantas son capaces no solo de producir y acumular polifenoles, reconocidos por su

capacidad antioxidante y osmoprotectora para protegerse de posibles daños, también de movilizar este tipo de metabolitos en ambientes limitados en agua, manteniendo así su arquitectura molecular (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020). Ejemplos de lo anterior incluyen a *Selaginella bryopteris*, *Sporobolus stapfianus* y *Xerophyta schlecteri*, entre otras especies, donde la concentración de metabolitos como azúcares (e.g. fructuosa, sacarosa, trehalosa), aminoácidos (e.g. prolina, glicina, -alanina) y ácidos orgánicos (e.g. ácido cítrico, ácido málico) no solo aumentó dramáticamente durante el proceso de resurrección (du Toit, Bentley, and Farrant 2021), sino que las proporciones molares de estos metabolitos fueron muy similares a aquellas utilizadas a nivel experimental para la formulación de NaDES (Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Hollman, F., Choi, Y. H., & Verpoorte 2011).

Además de lo mencionado hasta ahora, recientemente, y como consecuencia del estudio de la relación entre los NaDES y el estrés en plantas, se ha propuesto que los NaDES participan en la regulación del funcionamiento celular (Verpoorte, Witkamp, and Choi 2021), incluyendo la organización de nano o microdominios dentro de la célula, en la protección de enzimas o proteínas, “especialmente en situaciones de estrés como anhidrobiosis, alta temperatura, congelación y alta presión hidrostática”, en la promoción de reacciones bioquímicas de enzimas o proteínas incrustadas en membranas, en la estabilización de macromoléculas a través de interacciones agua-soluto o soluto-macromolécula, en el transporte y/o difusión de moléculas o fluidos a través de las membranas y en la conductividad de la célula vegetal. Aun cuando estas evidencias sugieren la posibilidad de que los NaDES puedan formarse dentro de las células, su ubicación no está definida. Sin embargo, la consistencia de algunos organelos ofrece alguna evidencia de cómo y donde podrían formarse, e.g. la composición química de las vacuolas vegetales que incluye sacarosa y ácido málico como sus principales componentes, además de agua. Adicionalmente, y considerando que una de las funciones de estos organelos es el almacenamiento de productos potencialmente tóxicos para la célula, la

presencia de los NaDES podría tener un rol crucial al incrementar la solubilidad de estos metabolitos, formando una capa en la membrana vacuolar interior o, alternativamente, formando un complejo con el compuesto tóxico que aumente su solubilidad en agua (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020) (Ramón and Guillena 2019). Una evidencia adicional de que los NaDES podrían formarse en las vacuolas está dada por el hecho de que es justo en este organelo donde se acumulan importantes concentraciones de productos con actividad antioxidante cuando las plantas se enfrentan a condiciones de sequía, e.g. en el caso de *Myrothamnus flabellifolia*, el ácido 3,4,5-tri-O-galoylquínico, almacenado en las vacuolas, incrementa su concentración hasta en un 50% actuando como un potente amortiguador redox durante condiciones de sequía (Moore et al. 2004).

Por otra parte, la síntesis de antocianinas en plantas expuestas a condiciones de sequía y/o deshidratación también se ha relacionado con protección celular. Las antocianinas son pigmentos que se sintetizan en el citoplasma, cerca de la superficie exterior del retículo endoplásmico (RE), antes de que se reubiquen en vacuolas de almacenamiento y otros organelos. Dado que el nivel de antocianinas reportado en los antocianoplastos suele ser más alto del que permite su solubilidad en agua, se ha sugerido que el RE podría ser un NaDES con enzimas disueltas en el que los sustratos con polaridad media se disuelven preferentemente (Choi et al. 2011) (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020).

Finalmente, dada la alta concentración de agua en las células y el hecho de que en ambientes con concentraciones mayores al 50% (v/v) de agua se produce la ruptura de la superestructura característica de los NaDES, surge la pregunta de cómo es que los NaDES pueden mantenerse. Recientemente se ha sugerido que los componentes capaces de asociarse para formar un NaDES, dentro de las células, podrían converger para interconectarse a escala nanométrica, formando una capa o un cúmulo líquido en diferentes formas o regiones celulares (Durand et al. 2020). Esta teoría se ajusta muy bien a pequeños organelos como los plástidos y las vesículas;

de hecho, estas últimas consisten en un líquido encerrado por una bicapa de fosfolípidos que tiene una composición similar a NaDES, involucrados en el transporte intercelular de metabolitos secundarios como alcaloides (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020).

Evidentemente, y dado la elevada complejidad de los sistemas celulares, la evidencia obtenida hasta ahora es solo indirecta, por lo que comprobar que los NaDES realmente existen en las células resulta desafiante. Sin embargo, esta teoría ha abierto una nueva e interesante perspectiva, que ofrece una explicación atractiva para algunos fenómenos que ocurren a nivel celular, que de otro modo sería complicado de entender.

REFERENCIAS

Abbott, Andrew P et al. 2003. "Novel Solvent Properties of Choline Chloride / Urea Mixtures." *Chemical Communications* 1: 70–71.

Bi, Yanhong et al. 2020. "Highly Efficient Extraction of Mulberry Anthocyanins in Deep Eutectic Solvents: Insights of Degradation Kinetics and Stability Evaluation." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 66(December 2019): 102512. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102512>.

Choi, Young Hae et al. 2011. "Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?" *Plant Physiology* 156(4): 1701–5.

Dai, Yuntao et al. 2013. "Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology." *Analytica Chimica Acta* 766: 61–68. <http://www.elsevier.com/copyright>.

Dai, Yuntao, Robert Verpoorte, and Young hae Choi. 2014. "Natural DESs Providing Enhanced Stability of Natural Colorants from Safflower (*Carthamus Tinctorius*)." *Food Chemistry* 159: 116–21.

Dai, Yuntao, Geert Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. 2015.

"Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications." *Food Chemistry* 187: 14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

Durand, Erwann, Jérôme Lecomte, Bruno Baréa, and Pierre Villeneuve. 2013. "Towards a Better Understanding of How to Improve Lipase- Catalyzed Reactions Using Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride." *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115.

Durand, Erwann, Pierre Villeneuve, Claire Bourlieu-lacanal, and Frédéric Carrière. 2020. "Natural Deep Eutectic Solvents: Hypothesis for Their Possible Roles in Cellular Functions and Interaction with Membranes and Other Organized Biological Systems." *Advanced in Botanical Reserach*.

Grillo, Giorgio et al. 2020. "Deep Eutectic Solvents and Nonconventional Technologies for Blueberry-Peel Extraction: Kinetics, Anthocyanin Stability, and Antiproliferative Activity." *Antioxidants* 9(11): 1–28.

Jeliński, Tomasz, Maciej Przybyłek, and Piotr Cysewski. 2019. "Natural Deep Eutectic Solvents as Agents for Improving Solubility, Stability and Delivery of Curcumin." *Pharmaceutical Research* 36(116): 1–10.

Jeong, Kyung Min et al. 2017. "Multi-Functioning Deep Eutectic Solvents as Extraction and Storage Media for Bioactive Natural Products That Are Readily Applicable to Cosmetic Products." *Journal of Cleaner Production* 151: 87–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>.

Kist, Jennifer A., Hua Zhao, Katie R. Mitchell-Koch, and Gary A. Baker. 2021. "The Study and Application of Biomolecules in Deep Eutectic Solvents." *Journal of Materials Chemistry B* 9(3): 536–66.

Moore, John P. et al. 2004. "The Predominant Polyphenol in the Leaves of the Resurrection Plant *Myrothamnus Flabellifolius*, 3,4,5 Tri-O-Galloylquinic Acid, Protects Membranes against Desiccation and Free Radical-Induced Oxidation." *Biochemical Journal* 385(1): 301–8. <https://doi.org/10.1042/BJ20040499>.

Ramón, Diego J., and Gabriela Guillena, eds. 2019. *Deep Eutectic Solvents*. Weinheim, Germany: Copyright © 1999-2020 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527818488>.

Ruesgas-Ramon, Mariana, Maria Cruz Figueroa-Espinoza, and Erwann Durand. 2017. "Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(18): 3591–3601. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b01054>.

Škulcová, Andrea et al. 2016. "Deep Eutectic Solvents as Medium for Pretreatment of Biomass." *Key Engineering Materials* 688: 17–24.

Smith, Emma L., Andrew P. Abbott, and Karl S. Ryder. 2014. "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications." *Chemical Reviews* 114(21): 11060–82.

Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Hollman, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. 2011. "Process for Extracting Materials from Biological Material."

Tang, Baokun, and Kyung Ho. 2013. "Recent Developments in Deep Eutectic Solvents in Chemical Sciences." *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 144(10): 1427–54.

du Toit, S. Francois, Joanne Bentley, and Jill M. Farrant. 2021. "NADES Formation in Vegetative Desiccation Tolerance: Prospects and Challenges." *Advances in Botanical Research* 97(May 2021): 225–52.

Vanda, Henni, Robert Verpoorte, and Peter G L Klinkhamer. 2020. "Natural Deep Eutectic Solvents : From Their Discovery to Their Applications." In *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, eds. Diego J. Ramón and Gabriela Guillena. , 61–81.

Verpoorte, Robert, Geert-Jan Witkamp, and Young Hae Choi, eds. 2021. *Eutectic Solvents and Stress in Plants*. Academic P. London, United Kingdom: Kruze, Zoe.

Vigier, Karine De Oliveira, Gregory Chatel, and François Jérôme. 2015. "Contribution of Deep Eutectic Solvents for Biomass Processing: Opportunities, Challenges, and Limitations." *ChemCatChem* 7(8): 1250–60.

Wikene, Kristine Opsvik, Ellen Bruzell, and Hanne Hjorth Tønnesen. 2015. "Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 80: 26–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.013>.

Zhang, Qinghua, Karine De Oliveira Vigier, Sébastien Royer, and François Jérôme. 2012. "Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications." *Chem. Soc. Rev.* 41(21): 7108–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806597>.

Zhao, Bing Yi et al. 2015. "Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora Japonica*." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 3(11): 2746–55.