

OBTENCION DE BIOPOLIMEROS A PARTIR DE RESIDUOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*) MEDIANTE CLORURO DE COLINA:2ZnCl₂ Y DCC/DMAP

BIOPOLYMERS OBTAINED FROM TOMATO WASTES USING CHOLINE CHLORIDE:2ZnCl₂ AND DCC/DMAP AS CATALYZERS

Mayra B. Gómez-Patiño¹, Maura A. Cruz-Barroso², María de J. Perea-Flores¹, Daniel Arrieta-Baez¹

(1) Instituto Politécnico Nacional - CNMN Luis Enrique Erro s/n, Gustavo A. Madero, Nueva Industrial Vallejo, 07738 Ciudad de México - México

(2) Instituto Politécnico Nacional – ENCB Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Miguel Hidalgo, Santo Tomas, 11340 Ciudad de México - México
(e-mail: darrieta@ipn.mx)

Recibido: 28/09/2017 - Evaluado: 02/12/2017 - Aceptado: 20/12/2017

RESUMEN

El ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico, monómero principal de la cutícula del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) obtenido a partir de residuos agro-industriales, se polimerizó usando un líquido iónico (cloruro de colina 2ZnCl₂) como catalizador y los polímeros obtenidos fueron comparados con los obtenidos por medio de DCC/DMAP, un método común de polimerización química. Los poliésteres resultantes obtenidos con ambas condiciones resultaron insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos y mostraron diferentes propiedades fisicoquímicas. De acuerdo con el análisis CP MAS ¹³C RMN y DSC, los polímeros mostraron una estructura lineal con un grado creciente de unidades de interconexión en la posición C-10. Sin embargo, la reacción con el líquido iónico resultó más eficiente, limpia, rápida y económica.

ABSTRACT

10,16-dihydroxyhexadecanoic acid, main monomer of the tomato cuticle (*Solanum lycopersicum*) obtained from agro-residual wastes, was polymerized using an ionic liquid (choline chloride.2ZnCl₂) as catalyst and the resulting polyesters were compared with those obtained by a common polymerization reaction catalyzed by DCC/DMAP. Polyesters obtained under these conditions were insoluble in most of the organic solvents and showed different physicochemical properties. According to the CP MAS ¹³C NMR and DSC analysis, polymers showed a linear structure with an increasing degree of interlinkage units in position C-10. However, the reaction with the ionic liquid was more efficient, clean, fast and economical.

Palabras clave: biopolímeros, cutícula, jitomate, agroresiduos
Keywords: biopolymers, cuticle, tomato, agroresidual wastes

INTRODUCCIÓN

Los polímeros biodegradables pertenecen a la clase de los biomateriales más atractivos debido a sus amplias aplicaciones en campos biomédicos. La mayor parte de la investigación sobre materiales renovables y biodegradables a base de poliésteres se ha concentrado en el poliláctido (PLA), el poliglicólido (PGA) y su copolímero poli (lactida-co-glicólida) (PLGA), los cuales son más utilizados debido a su buena biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y propiedades mecánicas satisfactorias (Albertsson & Verma, 2002; Nair & Laurencin, 2007; Philip *et al.*, 2007; Chen & Wu, 2005). Se ha demostrado que la presencia de grupos funcionalizables tales como hidroxilos y carboxilos en los poliésteres puede aumentar eficientemente su hidrofiliidad y degradabilidad, además de modular sus propiedades mecánicas, térmicas, químicas y biológicas (Lecomte *et al.*, 2006; Parrish & Emrick, 2006; Williams, 2007).

Los agroresiduos presentan una fuente potencial de sustancias como lípidos, polisacáridos y compuestos aromáticos que pueden ser utilizados para la creación de materiales poliméricos (Heredia-Guerrero *et al.*, 2017). El ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (10,16-DHPA), monómero principal de la cutícula del jitomate, se ha extraído eficientemente a partir de agroresiduos (Arrieta-Báez *et al.*, 2011). Estos residuos representan aproximadamente el 20% de las pérdidas de cosechas y son una buena fuente de este ácido alifático de cadena larga, que podría utilizarse incluso para obtener otros monómeros. El 10,16-DHPA se ha polimerizado con éxito utilizando la lipasa CAL-B para obtener poliésteres con $M_w = 814$ y $M_n = 1,206$ Da (Gómez-Patiño *et al.*, 2013). Los métodos enzimáticos representan métodos que proporcionan un control eficiente de la polimerización, dando como resultado polímeros de masas molares requeridas y con los grupos finales deseados. Sin embargo, ha sido muy difícil preparar poliésteres alifáticos de cadena larga por policondensación directa debido a la degradación térmica a alta temperatura y baja estabilidad hidrolítica en un solo paso (Akinori *et al.*, 2003).

Se han reportado diferentes sistemas de polimerización, los cuales incluyen catalizadores basados en metales ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, ZnCl_2) y ácidos orgánicos (ácido p-toluensulfónico, PTSA), con ellos se han obtenido poliésteres de elevado peso molecular y baja polidispersidad (Barouti *et al.*, 2017). La mayoría de estas reacciones se llevan a cabo en disolventes orgánicos de los cuales algunos eventualmente terminan contaminando el ambiente por evaporación. Los líquidos iónicos (Seddon, 1997; Welton, 1999) y otros sistemas de disolventes no convencionales tales como cloruro de colina/ácidos oxálicos (Abbott *et al.*, 2004) y ZnCl_2 han llamado la atención ya que ofrecen un método potencialmente limpio para llevar a cabo reacciones o procesos químicos. Todavía existen retos en buscar nuevos catalizadores para la obtención de los poliésteres alifáticos de cadena larga con el fin de lograr la síntesis en un solo paso bajo condiciones más suaves (temperatura más baja y tiempo corto), las cuales son muy importantes desde el punto de vista tecnológico-ambiental (Shu *et al.*, 1994).

El presente trabajo describe la síntesis de poliésteres alifáticos a partir de ácido 10,16-hidroxihexadecanoico obtenido a partir de residuos agroindustriales del jitomate, utilizando dos métodos de poliesterificación: mediante el uso de líquido iónico (Cloruro de colina. 2ZnCl_2) y un método químico común utilizando dimetilaminopiridina (DMAP) y N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Estos poliésteres alifáticos mostraron características fisicoquímicas particulares, sin embargo, el uso de líquidos iónicos, tales como cloruro de colina 2ZnCl_2 , resulto más eficiente, rápido y económico, a la vez que puede ser reutilizado para el mismo proceso.

MÉTODOLOGIA

Aislamiento de ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (10,16-DHPA, 1)

El 10,16-DHPA (**1**) se obtuvo por hidrólisis de la cutina del jitomate como se ha reportado previamente (Arrieta-Baez *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2003).

Preparación de cloruro de colina.2ZnCl₂

El líquido iónico se preparó mediante una mezcla de cloruro de colina (20 mmol) con cloruro de zinc (40 mmol), la cual se calentó hasta 150 °C con agitación hasta obtener un líquido incoloro transparente (Sunitha *et al.*, 2007).

Procedimiento general para la reacción de poliesterificación

La reacción de poliesterificación se llevó a reflujo en un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un agitador magnético, termómetro, un adaptador Dean Stark y un condensador para reflujo. La reacción se mantuvo a 80° C, con diferentes tiempos de reacción (6, 12, 24 y 36 h) usando IL, Cloruro de Colina.2ZnCl₂ como catalizador. Los polímeros se precipitaron con metanol frío, se extrajeron y se caracterizaron por RMN y FTIR. Los rendimientos obtenidos en las diferentes reacciones fueron cercanos al 95%.

Poliesterificación con dimetilaminopiridina (DMAP) y N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Los polímeros obtenidos se compararon con los obtenidos mediante una reacción regular de poliesterificación. Para ello, a una solución de 10,16-DHPA (50 mg, 0,08 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 ml), se añadieron DMAP (5,7 mg, 0,04 mmol) y DCC (17,5 mg, 0,08 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 36 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo, se vertió en una solución de NH₄Cl (5 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 20 ml), después de lo cual el extracto se lavó con agua (2 x 10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a vacío. El rendimiento de la reacción fue del 33%.

Espectroscopía de RMN en estado sólido (Cross Polarization Magic Angle Spinning; CP MAS ¹³C NMR)

Los polímeros insolubles se analizaron usando experimentos convencionales de RMN de CP MAS ¹³C llevados a cabo en un espectrómetro Varian Instruments Unityplus 300 (Palo Alto, CA) equipado para RMN en estado sólido. La frecuencia de resonancia fue 74,443 MHz, con un tiempo de adquisición habitual de 30 ms, un tiempo de retraso de 2 s entre adquisiciones sucesivas y un tiempo de contacto CP de 1.5 ms. Típicamente, 30 mg de la muestra se envasaron en un rotor de 5 mm y se colocaron en una sonda MAS supersónica de Doty Scientific (Columbia, SC). Se utilizó una velocidad de giro de 6.00 ± 0,1 kHz, a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 h.

Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido se realizó con un Instrumento TA 2010 con módulo de DSC (New Castle, DE, EE.UU.). Una muestra de aproximadamente 10 mg se colocó en una bandeja de aluminio y se calentó de 30 a 220 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C min⁻¹ con una purga de nitrógeno de 50 ml min⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacciones de polimerización

Los poliésteres (Figura 1) derivados del 10,16-DHPA (**1**), se sintetizaron a través de un líquido iónico, usando cloruro de colina:2ZnCl₂ como catalizador. Previamente se analizaron las mejores condiciones para obtener estos biopolímeros y se compararon con aquellos obtenidos mediante reacciones enzimáticas anteriormente descritas (Gómez-Patiño *et al.*, 2013; Gómez-Patiño *et al.*, 2015). Se demostró que ambos poliésteres son completamente diferentes.

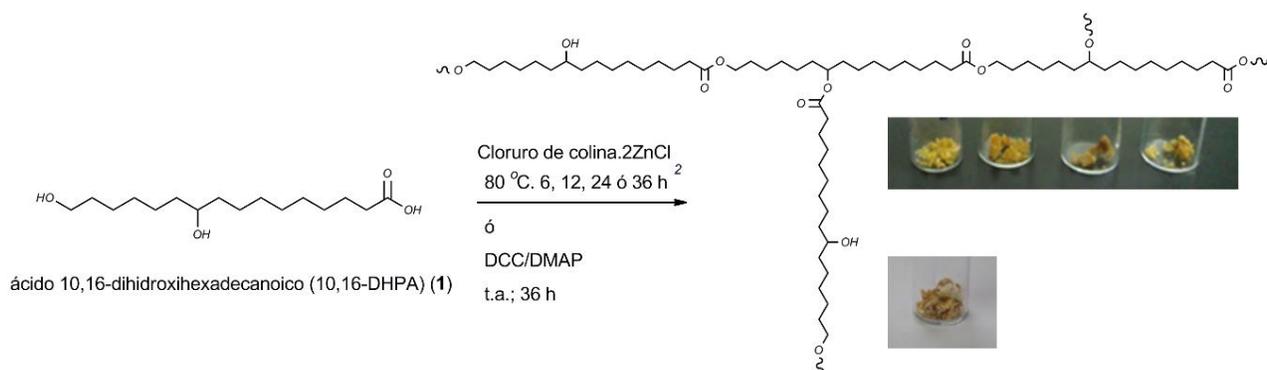


Fig. 1: Esquema de reacción del ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (10,16-DHPA) utilizando cloruro de colina o DCC/DMAP

Después de la reacción, el poliéster se precipitó con metanol y se separó del líquido iónico. Los poliésteres obtenidos se lavaron con agua, metanol y cloroformo y se secaron para caracterizarlos mediante técnicas de RMN y DSC. El líquido iónico se sometió a una extracción con acetato de etilo para recuperar el monómero sin reaccionar y después se calentó a 150 °C para evaporar disolventes permanecidos. Después de esto, el líquido iónico se usó al menos cuatro veces sin ninguna pérdida significativa de actividad.

Los poliésteres obtenidos resultaron insolubles en cloroformo, metanol, agua, DMSO y DMF, lo que dificultaba su análisis mediante Espectrometría de masas con el fin de obtener el peso molecular.

Polímeros obtenidos de la reacción con DCC y DMAP

Con el fin de comparar con otra reacción de poliesterificación, se ha utilizado una condensación química catalizada por DCC/DMAP para polimerizar el 10,16-DHPA. La reacción con DCC/DMAP se ha utilizado para obtener selectivamente dímeros y trímeros derivados del 10,16-DHPA (Arrieta-Baez *et al.*, 2011). A partir de la reacción con DCC/DMAP, se obtuvo un polímero después de 36 h el cual fue obtenido usando tolueno como disolvente. El polímero obtenido resultó similar al obtenido con cloruro de colina.2ZnCl₂ a 80 °C, 36 h, el cual se caracterizó como un poliéster funcionalizable con grupos hidroxilo libres y cuyas propiedades fisicoquímicas y biológicas pueden ser importantes en su potencial uso industrial (You *et al.*, 2010).

Caracterización de los polímeros

Los polímeros obtenidos a partir de líquido iónico cloruro de colina.2ZnCl₂ y los obtenidos de la reacción con DCC/DMAP, resultaron ser principalmente polvos, todos ellos insolubles en la mayoría de los disolventes. Sin embargo, la reacción con el líquido iónico resultó más eficiente que la realizada con DCC/DMAP. Los productos obtenidos fueron caracterizados por RMN y DSC.

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido (CP MAS ¹³C NMR).

Para caracterizar los poliésteres, se obtuvieron los espectros de RMN en estado sólido CP MAS ¹³C (Figura 2). El pico de carbonilo principal a 174,2 ppm correspondiente a la formación de ésteres, resulta más evidente en los polímeros obtenidos con DC/DMAP. El pico de éster debería estar acompañado por otro decreciente correspondiente a grupos -COOH libres a ~177 ppm. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de este pico, lo que indica el alto grado de esterificación. Los espectros de CPMAS ¹³C NMR de estado sólido en la región C-O también muestran que la mayoría de los hidroxilos primarios están esterificados (pico intenso a 65,0 ppm, -CH₂-CO-O-CH₂- frente a la contribución débil a 63 ppm, HO-CH₂-). Por consiguiente, la esterificación de los hidroxilos secundarios tiene que ser una minoría debido al desequilibrio de COOH/OH en las mezclas de

monómeros. El pico a 75,0 ppm se debe entonces a grupos hidroxilos secundarios libres y las señales débiles alrededor de 73 ppm y 82 ppm revelan una menor formación de ésteres en esta posición.

Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La técnica de DSC se realizó para conocer las propiedades térmicas de los polímeros, con la finalidad de obtener una idea sobre la dinámica molecular de sus cadenas. En la Figura 3 se muestran los termogramas de los polímeros obtenidos a 80 °C (6, 12, 24 y 36 h) y con la reacción de DCC/DMAP. Para los polímeros obtenidos a 80°C con tiempos de reacción de 12 y 24 h se observaron dos transiciones entre los 93°C y 121 °C respectivamente. Las curvas correspondientes a los tiempos de 6 y 36 h fueron las únicas que presentaron tres transiciones. A medida que se tiene un mayor tiempo de reacción, el número de transiciones disminuye hasta llegar a las 36 h donde se observó un pico amplio muy similar al obtenido en los polímeros de la reacción con DCC/DMAP a 36 h.

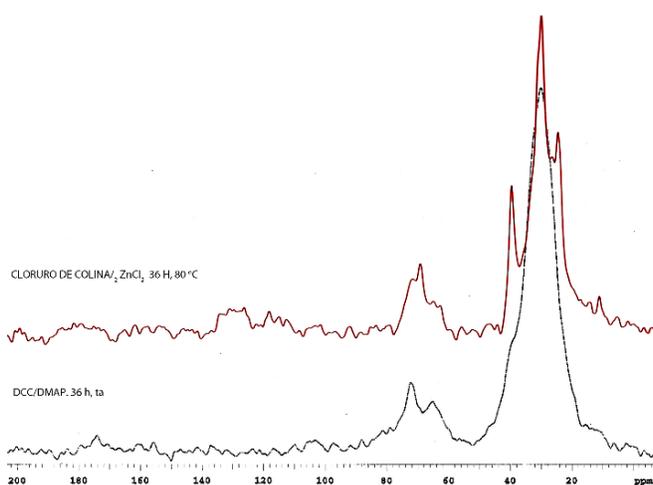


Fig. 2: Espectro de CP MAS ^{13}C NMR del polímero obtenido utilizando cloruro de colina/2 ZnCl_2 y el obtenido con DCC/DMAP

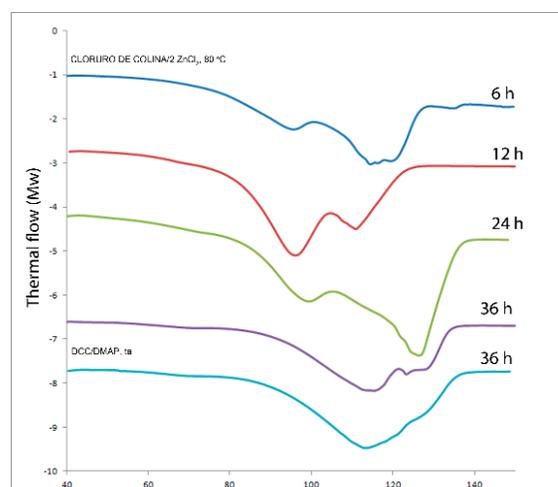


Fig. 3: Termograma de DSC de los polímeros obtenidos utilizando cloruro de colina/2 ZnCl_2 y el obtenido con DCC/DMAP

CONCLUSIÓN

El ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (10,16-DHPA) se obtuvo a partir de residuos agroindustriales del jitomate y se usó para comparar dos sistemas de polimerización y determinar su eficiencia. Un proceso de polimerización con un líquido iónico, cloruro de colina. 2ZnCl_2 , y la polimerización tradicional con DCC/DMAP. La alta polimerización y el entrecruzamiento presentes en los polímeros podría ser la razón de la insolubilidad observada en diferentes disolventes. El uso de cloruro de colina. 2ZnCl_2 en la polimerización de 10,16-DHPA fue más eficiente que los procesos comunes para ácidos grasos de cadena larga esterificados, como la reacción de DCC/DMAP. Además, es barato, muy fácil de preparar y puede reutilizarse durante al menos seis ciclos sin ningún tratamiento previo o pérdida significativa de actividad. Los polímeros obtenidos a partir de estas reacciones tienen un uso potencial para una amplia gama de aplicaciones biomédicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT 253570) y por financiamiento institucional del IPN (SIP 20160331, 20164793, 20171827 y 20171564).

REFERENCIAS

1. Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L. & Rasheed, R.K. (2004). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *126*, (9) 9142.
2. Ahmed, A., Crawford, T., Gould, S., Ha, Y.S., Hollrah, M., Noor-E-Ain, *et al.* (2003). Synthesis of (R)- and (S)-10,16-dihydroxyhexadecanoic acid: Cutin stereochemistry and fungal activation. *Phytochemistry*, *63*, 47–52.
3. Akinori, T., Yoshika, O., Yoshitaka, I., Yoshihito, I. & Tadamichi, H. (2003). Synthesis of Aliphatic Polyesters by Direct Polyesterification of Dicarboxylic Acids with Diols under Mild Conditions Catalyzed by Reusable Rare-Earth Triflate. *Macromolecules*, *36*, 1772-1774.
4. Albertsson, A.C. & Verma, I.K. (2002). *Aliphatic polyesters: synthesis, properties and applications*, in Degradable aliphatic polyesters. Berlin: Springer-Verlag; p. 1–40.
5. Arrieta-Baez, D., Cruz-Carrillo, M., Gómez-Patiño, M.B. & Zepeda-Vallejo, L.G. (2011). Derivatives of 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) as potential material for aliphatic polyesters. *Molecules*, *16*, 4923–4936.
6. Barouti, G., Jaffredo, C.G. & Sophie, M.G. (2017). Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers. *Progress in Polymer Science*, *73*, 1-31.
7. Chen, G.Q. & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, *26* (33), 6565–78.
8. Gómez-Patiño, M.B., Gutiérrez-Salgado, D.Y., García-Hernández, E., Mendez-Mendez, J.V., Andraca Adame, J.A., Campos-Terán, J., *et al.* (2015). Polymerization of 10,16-Dihydroxyhexadecanoic Acid, Main Monomer of Tomato Cuticle, Using the Lewis Acidic Ionic Liquid Choline Chloride·2ZnCl₂. *Frontier in Materials*, *2*, 67.
9. Gómez-Patiño, M.B., Cassani, J., Jaramillo-Flores, M. E., Zepeda-Vallejo, L. G., Sandoval, G., Jimenez-Estrada, M., *et al.* (2013). Oligomerization of 10, 16-dihydroxyhexadecanoic acid and methyl 10, 16-dihydroxyhexadecanoate catalyzed by lipases. *Molecules*, *18*, 9317–9333.
10. Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., Domínguez, E., Cingolani, R., Bayer, I.S., Athanassiou, A., Benítez, J.J (2017). Cutin from agro-waste as a raw material for the production of bioplastics. *J. Exp. Bot.*, *68* (19), 5401-5410.
11. Nair, L.S. & Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, *32* (8,9), 762–98.
12. Lecomte, P., Riva, R., Schmeits, S., Rieger, J., Van Butsele, K. & Jerome, C. (2006). New prospects for the grafting of functional groups onto aliphatic polyesters. Ring opening polymerization of alpha- or gamma-substituted epsilon-caprolactone followed by chemical derivatization of the substituents. *Macromol Symp.*, *240*, 157–65.
13. Osman, S.F., Irwin, P., Fett, W.F., O'Connor, J.V. & Parris, N. (1999). Preparation, isolation, and characterization of cutin monomers and oligomers from tomato peels. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, (2) 799–802.
14. Osman, S.F., Gerard, H.C., Fett, W.F., Moreau, R.A. & Dudley, R.L. (1995). Method for the Production and Characterization of Tomato Cutin Oligomers. *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 2134–2137.

15. Parrish, B. & Emrick, T. (2006). Strategies in aliphatic polyester synthesis for biomaterial and drug delivery applications. *ACS Symp. Ser.* 939, Chapter 16, 248–66.
16. Philip, S., Keshavarz, T. & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 3, 233–47.
17. Seddon, K.R. (1997). Ionic liquids for clean technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, 351-356.
18. Shu, K., Iwao, K. & Yoshinori, Y. (1994). Repeated Use of the Catalyst in Ln(OTf)₃-Catalyzed Aldol and Allylation Reactions. *Journal of the Chemical Society of Japan*, 67(8), 2342-2344.
19. Sunitha, S., Kanjilal, S., Reddy, P.S. & Prasad, R.B.N. (2007). Liquid–liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride. 2ZnCl₂. *Tetrahedron Letters*, 48, 6962–6965.
20. Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*, 99, (8) 2071-2084.
21. Williams, C.K. (2007). Synthesis of functionalized biodegradable polyesters. *Chem. Soc. Rev.*, 36 (10), 1573–80.
22. You, Z., Cao, H., Gao, J., Shin, P.H., Day, B.W. & Wang, Y. (2010). A functionalizable polyester with free hydroxyl groups and tunable physiochemical and biological properties. *Biomaterials*, 31, 3129–3138.

