



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PROPIEDADES BIOPLÁSTICAS DE LOS MONÓMEROS DE
LA CUTÍCULA DEL LIMÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

BRENDA BERENICE MARTÍNEZ VILLA

**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTORA JULIA CASSANI HERNÁNDEZ
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Martínez

Villa

Brenda Berenice

55 30 11 04

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

302084564

2. Datos del tutor

Dr.

Julia

Cassani

Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel

Arrieta

Baéz

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Manuel

Jiménez

Estrada

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Héctor Manuel

Luna

Contla

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Ana Lidia

Pérez

Castorena

7. Datos del trabajo escrito.

Propiedades bioplásticas de los monómeros de la cutícula del limón

87 p.

2010

ÍNDICE

1. Agradecimientos.....	1
2. Resumen	4
3. Introducción.....	5
4. Antecedentes.....	8
4.1 Biopolímeros.....	8
4.2 Características Generales de la Cutícula.....	9
4.3 Género <i>Citrus</i>	12
4.3.1 Características generales.....	12
4.3.2 Clasificación taxonómica.....	13
4.3.3 Limón mexicano y limón persa	13
4.3.4 Producción de limón.....	14
4.4 Alternativa para el uso de la cáscara de la fruta.....	15
4.5 Método para obtención de cutícula.....	16
4.6 Métodos para la despolimerización de las cutículas.....	17
4.6.1 Métodos químicos.....	17
4.6.2 Método enzimático.....	18
4.7 Estudios y Técnicas realizadas sobre cutículas y su composición química.....	19
4.8 Importancia de la catálisis enzimática.....	25
4.8.1 Lipasas.....	26
4.8.2 Utilidad de las hidrolasas.....	27
4.9 Métodos espectroscópicos de análisis.....	27
4.9.1 Técnicas analíticas.....	27
5. Objetivos.....	33
6. Metodología.....	34
6.1 Material Biológico.....	34

6.2 Tratamiento enzimático para obtener las cutículas.....	34
6.3 Evaluación de antioxidantes.....	35
6.4 Despolimerización química.....	35
6.4.1 Despolimerización química con Ácido Trifluoroacético (TFA).....	35
6.4.2 Despolimerización química con Hidróxido de Potasio (KOH).....	36
6.5 Polimerizaciones.....	36
6.5.1 Enzimática.....	36
6.5.2 Química.....	37
7. Reactivos.....	38
8. Resultados y Discusión.....	39
8.1 Procesamiento de la muestra.....	39
8.1.1 Colecta de las variedades de limón.....	39
8.1.2 Aislamiento de la Cutícula.....	40
8.2 Análisis Estructural.....	42
8.2.1 Obtención de la cutícula y su análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Sólidos (^{13}C NMR-CPMAS).....	42
8.3 Despolimerización de la Cutícula.....	45
8.3.1 Cutícula despolimerizada con Ácido Trifluoroacético (TFA).....	45
8.3.2 Cutícula despolimerizada con Hidróxido de Potasio (KOH).....	50
8.4 Polimerización.....	59
8.4.1 Polimerización enzimática.....	59
8.4.2 Polimerización química.....	63
9. Conclusiones.....	67
10. Anexos.....	69
11. Bibliografía.....	83

1. AGRADECIMIENTOS:

Mi reconocimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las bondades que permite la educación pública en este país, ya que me ha brindado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en todos los aspectos: científicos, culturales, sociales, políticos, deportivos, etc.

Por supuesto a mi familia, mi padre y madre, que en un principio no creían en el proyecto de estudiar Biología, pero hoy se han dado cuenta que esta es importante para la contribución del conocimiento científico y toma de decisiones razonables del país. A ellos, también porque desde que era pequeña creyeron en mi y me brindaron no solo lo económico si no también lo afectivo que es de las cosas fundamentales que me permitieron continuar con mis estudios y enfrentarme ante todo tipo de situación. Por supuesto no olvido mis raíces, mis abuelos y familia del campo que son parte integral de mi persona, el campo fue donde descubrí el amor a la naturaleza y motivo por el cual escogí esta área del conocimiento. A toda mi familia, a mi hermano, tíos, primos, y demás familiares que siempre se han preocupado por mi y que se interesan en las cosas que hago en la universidad, especialmente a mi tía Carmen que aunque este lejos del país siempre me manda mensajes de su apoyo incondicional para que me siga preparando. Todos los anteriores me motivan a luchar por un mejor país y mundo.

A mis amigos que hacen posible que me levante con el entusiasmo para realizar mis actividades, ya que me transmiten su buena energía todos los días por diferentes medios y que en distintos momentos de mi vida me han apoyado de una u otra forma para levantar mi ánimo y enfrentar mis problemas. Gracias mis amigas de la prepa 6 con las que pase estupendos momentos, y que me han apoyado a lo largo de mi carrera, a Isis, Idalia y Adriana, que son las que se han mantenido mas cercanas a mi.

Durante la carrera de Biología conocí grandiosas personas que mas adelante se convirtieron muchos de ellos en mis amigos, aquellos que están contigo en todos momentos, y me refiero que estuvieron o están conmigo, en las pachangas, en las desveladas por trabajos, en los ratos de tristeza, en mis alegrías de casi todos los días, a ustedes les digo que los adoro, sin ustedes no hubiese sido emocionante la carrera. Mis amigos del primer semestre, mis cómplices durante el tiempo que duro la carrera de Biología, a Bety, Vivis, María, Cristina, así como a Alfredito (te quiero amigo fuiste y eres un gran apoyo además de ser un ejemplo para mi, admiro tu fortaleza y tus ganas de luchar para ser mejor), al pájaro (Roberto), a Valerio, Edgar, Alan (gracias por regalarme Danna mi perra hermosa que la amo). A los otros chicos que conocí durante la carrera y que son de la misma importancia que los anteriores e hicieron inolvidable mi estancia en la Facultad de Ciencias, a Chelo, Betzy, Netzy, Ursula, Erandi, Licha, Paula (te conozco desde la prepa y que bueno que hasta hoy nos seguimos viendo), Sandra, Iris, Gaby, Tzitzí, Julieta, Carmen, Lety, Vania, Yuri, Jessica (güera), Eunice, Michel. A los chicos como Nicasio, Niko, Galvéz, a los Felipes, Víctor, Goyo, Oscar, Ruben, Rich, Luis, Louis Pierre, Daniel, Miguel, Fosy, Fer, Manuel,

Arturo, Mau, entre otros, que disculpen si olvide anotarlos. Varios de ustedes “barboleros para siempre”.

A mis profesores de paleobiología, materia de las que mas ame en la carrera, Catalina gracias porque aun me aceptas en tus prácticas y aunque no me pude desarrollar en ese ámbito de la paleontología, a tu lado sigo emocionándome y eso me ha demostrado que a pesar de haber estado en diferentes áreas de la Biología confirmo mi gusto en su totalidad por esta carrera. Por supuesto al Doctor Raúl Gío que me apoyo en muchos momentos, como en mi decisión de cambiarme de laboratorio y darme los mejores deseos en mis nuevos proyectos, además de ser un padre académico con el que desarrolle una publicación y mi interés por los fósiles.

A Daniel y Julia por creer en mi, para realizar una tesis que pareciera ser es para químicos, pero que los biólogos también podemos realizar. Daniel, no dudaste en ningún momento en mis capacidades, además de darme una beca y tener la confianza de enviarme a un congreso, donde no te defraude ni a ti ni a la universidad, porque obtuvimos una mención honorífica con el trabajo. A Julia también por creer en mi persona y apoyarme con conocimiento, así como con tu tiempo. Al doctor Manuel por aceptarnos en el laboratorio y brindarnos facilidades. Al doctor Héctor por su tiempo y paciencia conmigo en el desarrollo experimental de una parte del proyecto.

Del Instituto de Ciencias del Mar a Matí, por toda la buena vibra que me diste, a Barbariux, Adrianita, Toñito, Balam, mi Day, que son buenos cuates con los que compartí tiempo dentro y fuera de la universidad. Yemín, hubiese querido verte en mi titulación pero tu esencia siempre ira conmigo, gracias por apoyarme en mis decisiones y por toda tu ayuda, descansa en paz, todo forma parte del ciclo de la vida y tu llegaste al final.

A mis amigos que conocí por otros medios como Quetzal, Rubén, Mario, Andrés, que siempre se han preocupado por mi persona y me han socorrido en muchas situaciones de mi estancia en esta Universidad.

De mi laboratorio de Productos naturales en el Instituto de Química, a Jess, Serch, Armando, Rosario, Ada, Graciela, Erika, entre otros compañeros con quienes compartí el espacio y en el tiempo que estuve ahí me ayudaron en muchas cosas referentes con química, comida, así como diversos temas. A los chicos de la UAM-Xochimilco, Ricardo, Tania y Cony, que me brindaron su conocimiento, espacio y facilidades de material para la elaboración del proyecto en la corta estancia que estuve en esa universidad.

Amigos de hace años: Airiani, Tere, Mariana que aunque no las he visto, por otros medios nos hemos comunicado y están interesadas en lo que hago siempre, de igual manera a mis amigos de la secundaria: Karely, Nacho y Meche.

A mis compañeritos y amiguitos de la Facultad de Arquitectura que todos los días me daban la palmadita pa' que le echará ganas a la tesis, también ustedes son parte importante del desarrollo de este documento. Felipe, Ricardo, Alan, Oscar, Beto, Ilse, Alejandra, Saulo, Marcela, Raúl, Jessica, Raymundo, Gerardo y varios mas, perdón por no ponerlos a todos pero por cuestiones de ahorro de papel y la no destrucción de más árboles, evito poner mas letras, pero bueno a varios de ustedes, gracias. También Dannys que me ayudó con la edición de el documento y con mucha motivación, sin olvidarme de lo profesores que me demostraron interés al apoyarme de diversas formas, como Pachis, que es una excelente persona y profesor, Berenice y Alfredo, con los que comparto ideas y obviamente por su ayuda. No omito a los demás profesores que también son de gran importancia.

Al Proyecto PAPIIT – IN224508 del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo económico que obtuve. A las demás universidades: la UAM-Xochimilco donde desarrolle parte de mi proyecto experimental, así como el IPN donde se llevaron a cabo también algunos experimentos. En sí a todo el apoyo interinstitucional.

Y...

Dedicado a ti madre Tierra y a la naturaleza que aguardas, por soportarnos a nosotros la raza humana que te ha destruido a lo largo de nuestra existencia, y que aún tenemos quienes estamos luchando todos los días para salvar lo que queda de este planeta.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.

Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.”

- Bertolt Brecht

2. RESUMEN:

Se aislaron mediante una hidrólisis alcalina con KOH los principales monómeros de la cutícula de limón y se identificaron por RMN y EM como los ácidos 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico y 10,16-dihidroxihexadecanoico. Los monómeros extraídos se polimerizaron químicamente y enzimáticamente utilizando diferentes lipasas (CAL-B, PCL y PPL), lo que produjo polímeros lineales que se caracterizaron por RMN. El ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico fue consumido por la CAL-B y la PCL en un tiempo aproximado de 4 horas. La solubilidad de los productos obtenidos con la polimerización química es diferente en cada uno de los disolventes orgánicos. Los biopolímeros obtenidos representan una opción en la industria farmacéutica y cosmética principalmente, por su funcionalidad y sus propiedades biodegradables.

3. INTRODUCCIÓN:

Las cutículas de las plantas están constituidas por biopolímeros que forman una capa externa y actúan como una barrera en las plantas superiores, restringiendo la pérdida de agua en forma de vapor, así como también regulando el intercambio de gases (Kolattukudy, 1996), además de proteger a la planta contra patógenos, daños mecánicos, radiación ultravioleta y agentes contaminantes (Barnes *et al.*, 1996; Holroyd *et al.*, 2002).

La cutícula en los órganos aéreos de las plantas esta conformada por una matriz de cutina en la cual se entrecruzan las ceras intracuticulares y es cubierta por ceras epicuticulares. La composición química de la cutina es de biopoliésteres constituidos por cadenas alifáticas de ácidos grasos hidroxilados y/o hidroepoxilados de 16 y 18 carbonos (C₁₆ y C₁₈) unidos a través enlaces tipo éster (Deas and Holloway, 1977; Heredia, 2003; Franke *et al.*, 2005). Su composición monomérica varía de acuerdo con la diversidad de especies de plantas que existen.

Los estudios realizados a diversas cutículas han demostrado que estas son biodegradables y no tóxicas, por lo que considerando su amplia disponibilidad y de manera futurista, se ha visualizado su uso como bio-materiales prácticos en la industria para reemplazar aquellos materiales que se obtienen a partir del petróleo. Para ello se ha estudiado la composición monomérica de diversas cutículas, aunque en realidad se conoce poco a cerca de su estructura tridimensional debido principalmente a la presencia de un gran número de monómeros. Se ha demostrado que existe un vasto número de reacciones metabólicas que son catalizadas por enzimas en la vía biosintética, que sintetizan otros polímeros que se encuentran en la cáscara de la fruta, entre ellos, los polisacáridos, proteínas, poliésteres entre otros. Debido a sus propiedades biodegradables y al control estructural, así como sus propiedades no toxicas (Varma *et al.*, 2005), los biopolímeros han sido usados en varias aplicaciones biomédicas.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, normalmente en un medio acuoso en los sistemas vivos. Existen lipasas que son estables en disolventes orgánicos y por lo tanto se emplean como biocatalizadores en reacciones de esterificación y transesterificación. Las lipasas tienen la característica y ventaja de aceptar un gran número de substratos, siendo regio y enantioselectivas lo que hace posible la producción de poliésteres y policarbonatos. Entre las lipasas que han sido utilizadas en la síntesis de poliésteres se encuentran: Lipasa pancreática porcina (PPL), Lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B), Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL) entre otras. Así, la polimerización catalizada por medio de lipasas es una técnica o metodología eco-amigable para la preparación de poliésteres.

En cítricos como el limón o lima ácida (*Citrus aurantifolia*), se ha determinado la presencia de por lo menos 10 monómeros diferentes en la cáscara del fruto, siendo los más abundantes los ácidos 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico y 10,16-dihidroxihexadecanoico. Este fruto originario de Asia, ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia tanto por su consumo en fresco como por su uso industrial. El cultivo de limón es predominante en climas tropicales y subtropicales, siendo México y Brasil los principales productores.

México produce dos variedades de este fruto, el “limón mexicano” o con semilla (*Citrus aurantifolia*) y el “limón persa” o sin semilla (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle var. *latifolia* Tanaka). El limón mexicano es cultivado en los estados de la Costa del Pacífico como Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca, contribuyendo en un 60 % de la producción nacional. En el caso del limón persa, su cultivo se registra en entidades de la Costa del Golfo de México: Veracruz, Tabasco y Yucatán, contribuyendo con el 40 % de la producción total del cítrico.

En el presente trabajo se describen estudios dirigidos hacia la elucidación estructural de la cutícula del limón, por medio de la hidrólisis con ácido

trifluoroacético, así como la polimerización enzimática de los monómeros mayoritarios de la cutícula de las variedades de limón mexicano y persa por medio de las lipasas CAL-B, PCL y PPL. Además se describe una polimerización química que junto con la enzimática tienen el fin de estudiar su comportamiento en las reacciones de esterificación y obtener materiales que puedan tener utilidades bioplásticas en áreas industriales o biomédicas. Los polímeros obtenidos enzimáticamente y químicamente fueron caracterizados por RMN y FT-IR.

4. ANTECEDENTES:

4.1 BIOPOLÍMEROS.

Los biopolímeros son polímeros (unión de varios monómeros) que son generados por organismos vivos, es decir que se producen de manera natural. Los polímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosan), origen agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y origen microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxicanoatos (PHA)) (Tharanathan, 2003). Los polihidroxicanoatos son poliésteres de hidroxiácidos sintetizados como una reserva de carbón y energía en las bacterias, que aumentan cuando se encuentran en un medio limitado en nutrientes. Aproximadamente incluye 150 diferentes hidroxiácidos, y la mayoría esta compuesta de cadenas de 3 a 16 carbonos (Moire, *et al.*, 2003). Esto ha permitido buscar las diferentes aplicaciones por sus propiedades físicas en el ámbito de materiales para la industria.

Los biopolímeros naturales han atraído recientemente la atención en el campo de la investigación para su aplicación como nuevos bio-materiales, con un alto potencial que aborda lo concerniente a lo ambiental y a las aplicaciones biomédicas. Estos polímeros suelen ser degradados en un ambiente fisiológico por microorganismos aerobios y anaerobios, de macromoléculas a pequeños fragmentos, es decir un proceso activo biológicamente o un pasivo por una separación por medio de una hidrólisis. Los poliésteres alifáticos son los materiales biocompatibles y biodegradables que han recibido una gran atención, por sus potenciales aplicaciones en los campos tales como la agricultura, empaquetamiento de productos comerciales y fibras para la industria, así como en el campo biomédico donde se ha tenido una mejor visión por sus múltiples y futuras utilidades en aplicaciones como terapia génica,

ingeniería genética, suturas quirúrgicas y transporte de fármacos (Pan e Inoue, 2009).

Los poliésteres naturales son biopolímeros presentes en las plantas superiores y estudiando la estructura de estos se ha pretendido sintetizar polímeros a partir de su composición monomérica. Para su aplicación en la industria es necesario realizar estudios de las reacciones de esterificación de los monómeros aislados de sus fuentes naturales, de la manera más sencilla y natural, por ejemplo mediante catálisis enzimática (Olsson, *et al.*, 2007; Li y Beisson, 2009).

4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CUTÍCULA.

Cuando las plantas empezaron a colonizar el medio terrestre necesitaron de una cubierta que las protegiera de los intensos rayos solares y evitara su desecación, por lo que desarrollaron a través de los años una barrera protectora llamada cutícula, siendo una de las características evolutivas que les permitió a las plantas vasculares adaptarse al nuevo medio a colonizar.

Las células vegetales se caracterizan por contener a diferencia de la célula animal una pared celular, que le confiere forma y textura a cada tejido de la planta, esto a su vez le da sostén y protección. Esta pared se encuentra dividida en 3 capas, pared primaria, secundaria y lámina media, esta última une a la primaria y a la secundaria. La pared primaria está compuesta estructuralmente por celulosa (20-40%), hemicelulosa (25%) y pectina (35 %), además de la **cutina** y/ó **suberina** que conforman parte de la cutícula y que se encuentra en la epidermis (Taiz y Zeiger, 2006).

La cutícula es una membrana externa, de 0.1-10 μm de grosor, que actúa como barrera en las plantas superiores, y tiene como principal función restringir la pérdida de agua en forma de vapor, así como regular el intercambio de gases (Kolattukudy, 1996), proteger a la planta contra patógenos, daños mecánicos,

radiación ultravioleta y agentes contaminantes (Barnes *et al.*, 1996; Holroyd *et al.*, 2002). La estructura y composición de la cutícula varía ampliamente pero en todas las plantas siempre consta de una matriz polimérica lipofílica, membrana cuticular y lípidos cuticulares solubles (ceras) (Franke, 2005).

La composición química de la cutícula va a depender de la zona donde se encuentre en la planta: la cutina, está presente en hojas, frutos y tallos de crecimiento primario, en cambio la suberina, está localizada en tallos de crecimiento secundario, raíces y tubérculos (Fig. 1).

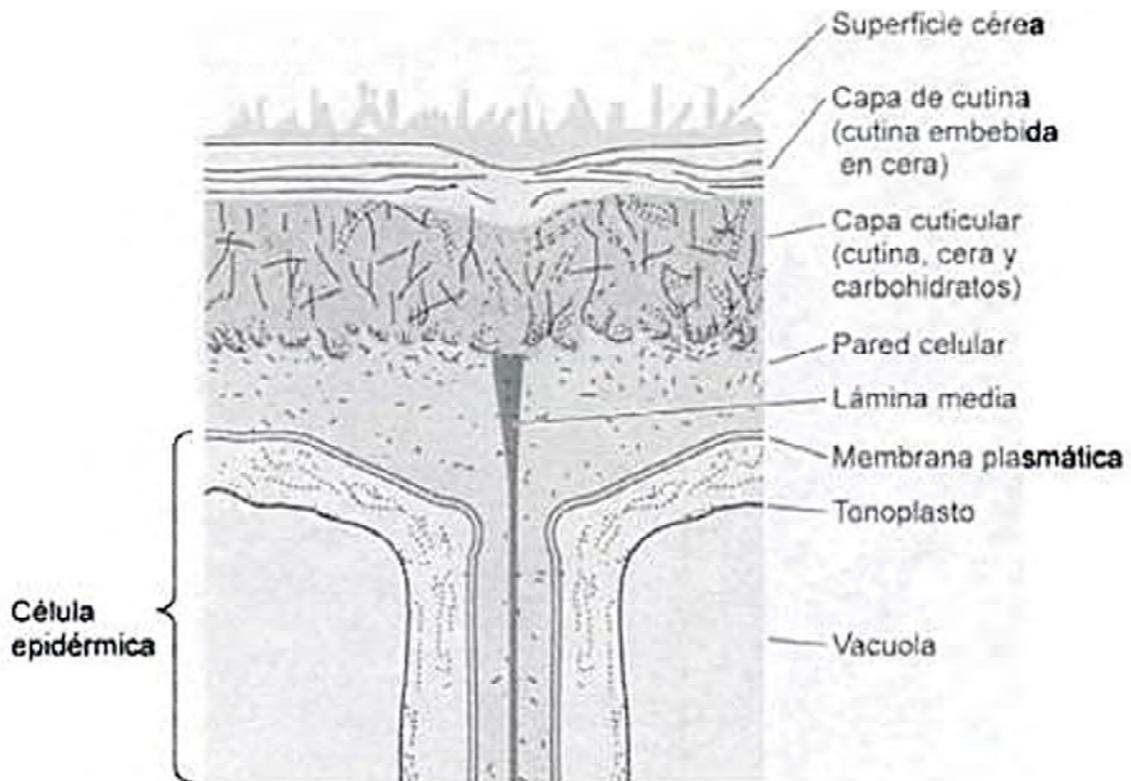


Figura 1. Esquema que representa la cutícula de *Lamium sp.*(Jeffre, 1996).

La cutina es un biopolímero insoluble constituido por cadenas alifáticas de 16 y 18 Carbonos (C_{16} y C_{18}) de ácidos grasos hidroxilados e hidroxiepoxilados unidos por enlaces tipo éster (Deas y Holloway, 1977; Heredia, 2003; Franke et

4.3 GÉNERO CITRUS:

4.3.1 Características generales.

El género *Citrus* ha sido cultivado en el Sudeste de Asia (India, China, Bután, Myanmar, Tailandia, Vietnam y Malasia) desde hace 4 mil años. Fue introducido al continente Europeo y al Norte de África durante la edad Media. Para el año 1500, mientras se realizaba el encuentro de los dos mundos, el género *Citrus* fue llevada a tierras americanas como parte de la acción colonizadora. Desde entonces este género se localiza en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, y es en estas últimas donde se obtiene la fruta de mejor calidad. Su cultivo requiere de un clima húmedo para el crecimiento del árbol y la producción del fruto, así como temperaturas moderadas que permitan la supervivencia del mismo. En la actualidad las regiones más importantes de producción de *Citrus* son los climas tropicales y subtropicales de América (Brasil, Estados Unidos de América, Argentina y México), la cuenca del Mediterráneo (sur de Europa, sudoeste de Asia y norte de África), Asia (incluyendo China y Japón) y Sudáfrica. Entre los cítricos más destacados se encuentran las limas, limones, mandarinas, narajas y toronjas.

La lima y el limón se producen comercialmente en 94 países en el mundo, cubriendo aproximadamente 0.8 millones de hectáreas. En climas del Mediterráneo, España, Italia y California, domina la producción de limón mientras en regiones tropicales y subtropicales como México y Brasil, domina la producción de lima, la cual es de aproximadamente 7.7 millones de toneladas, siendo México el principal productor con un 15% del total (Janick, *et al.*, 2008).

La composición química del género *Citrus* está influenciada por diversos factores como son sus condiciones de crecimiento, maduración, variedad y clima. Los principales grupos de compuestos que se han encontrado en las cutículas del

género *Citrus* son las cumarinas (distribuidas ampliamente en el reino Plantae), terpenoides, aceites esenciales y derivados de los flavonoides (Bruneton, 1999). También lo componen carbohidratos, lípidos, compuestos nitrogenados y microcomponentes (minerales, vitaminas, pigmentos, enzimas).

4.3.2 Clasificación taxonómica.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: Citrus

Especies:

- *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle
- *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle var. *latifolia* Tanaka

ó *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka

4.3.3 Limón mexicano y limón persa.

Lo que en México conocemos como limones taxonomicamente son limas ácidas. Las limas difieren de los limones porque en las primeras su sabor es más ácido y de menor tamaño en comparación al limón que su jugo suele ser más dulce y éste alcanza mayor tamaño en el fruto. Además, la diferencia principal radica en que las especies son distintas, el limón o mejor conocido como limón real pertenece a la especie *Citrus limon*, las limas pertenecen a la especie *Citrus aurantifolia*. Dentro de esta última especie se encuentran dos variedades el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) que es de tamaño menor y con semilla, y el limón persa (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle var. *latifolia*

Tanaka ó *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka)) tiene un mayor tamaño y no posee semilla, además de un contenido ligeramente mayor de vitamina C que el limón mexicano.

Una variedad según Linneaus (1751), es una adaptación de la especie provocada por cambios en su hábitat, originado por causas accidentales, como cambios climáticos, de suelo, presencia de plagas, como enfermedad, ataques de insectos, nemátodos, etc. Otros autores suelen definirla como una subdivisión de la especie, fundada en leves diferencias entre individuos de la misma especie, sin embargo, no son suficientes para definir una especie.

También existe diferencias en cuanto a la fisonomía de los árboles, siendo el del limón persa en general, más grande, al igual que sus hojas, sus ramas presentan menor cantidad de espinas (Gómez-Cruz, 1994).

Otros nombres comunes para el limón mexicano son limón colima, lima india, lima ácida, lima gallega, entre otros, mientras que para el limón persa también tiene sinónimos como lima Tahití y lima de Persia.

4.3.4 Producción del limón

Los limones y limas ácidas (limón mexicano y limón persa) participan en el mercado mundial, aproximadamente con un 9.6 % de la producción total (Lizárraga-Navarrete, 2001).

En 2004, México alrededor de un millón 164 mil 370 toneladas de limón, en una superficie cultivada de 145 mil 431 hectáreas. Dentro de las dos variedades que se producen se encuentra el “limón mexicano” o con semilla (*Citrus aurantifolia*) y “limón persa” o sin semilla (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle var. *latifolia* Tanaka ó *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka)), diferenciadas por zonas productoras, modalidad (riego o temporal y esquemas de comercialización). El limón mexicano se destina al mercado interno para su

consumo en fresco y otra parte se va a la industria para producir principalmente aceites esenciales para ser exportados a Estados Unidos. Los estados donde se encuentran grandes cultivos de este fruto son los estados de la Costa del Pacífico como Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca, contribuyendo en un 60 % de la producción nacional. En el caso del limón persa, su cultivo se registra en los estados de la Costa del Golfo de México, como Veracruz, Tabasco y Yucatán, que contribuyen con el 40 % de la producción total del cítrico. Al año, el país produce un promedio de 500 mil toneladas de limón persa, de las cuales 400 mil se exportan, con un valor comercial de 200 millones de dólares. En el 2005 se cosecharon un millón 792 mil toneladas, con un diferencial de crecimiento del 7.4 por ciento (SAGARPA, 2005). Actualmente el limón sin semilla esta en un rango de baja demanda, por el contrario del limón con semilla que se encuentra en una mayor demanda para el mercado nacional.

4.4 ALTERNATIVA PARA EL USO DE LA CÁSCARA DE LA FRUTA

En los últimos años se han desarrollado diferentes tecnología tanto en el campo industrial como en el académico con el fin de obtener a partir de la cutícula de las plantas y por medio de técnicas biotecnológicas diferentes compuestos biopolímeros que puedan sustituir algunos de los derivados del petróleo. Es por lo anterior que se ha estudiado tanto la biosíntesis de la cutina y la suberina principales componentes de la cutícula, para así poder conocer primordialmente su composición monomérica y con ello poder sintetizar polímeros naturales (Li y Beisson, 2009).

En la fruta existen componentes considerados como desperdicio que tienen potencial para ser recuperados económicamente, entre ellos la cáscara y la semilla. Para ello se estudian las propiedades químicas y físicas de cada una de las partes del fruto o la planta, considerando los diferentes usos que se les pueden dar en las distintas ramas de la industria.

4.5 MÉTODO PARA OBTENCIÓN DE CUTÍCULAS

Pacchiano y colaboradores (1993) utilizaron tratamientos enzimáticos para remover la pared celular de especies como la lima ácida y la papá (sustrato), optimizando las condiciones de hidrólisis enzimáticas con kits comerciales de celulasa, pectinasa y hemicelulosa (Fig. 4).

El método para remover la celulosa se indica a continuación: se pone la cáscara a una concentración de 50 mM en buffer de acetato de sodio a un pH de 5 a 37 °C y es tratado por dos horas con celulasa de *Aspergillus niger* controlada la temperatura y agitación en una incubadora. La siguiente hidrólisis para quitar pectina y la hemicelulosa, se realiza en forma similar a lo hecho para la celulosa, a diferencia del pH de 4 a 25 °C para la pectina y un pH de 5.5 a 37 °C para la hemicelulosa tratados respectivamente con pectinasa y hemicelulasa de *A. niger*.

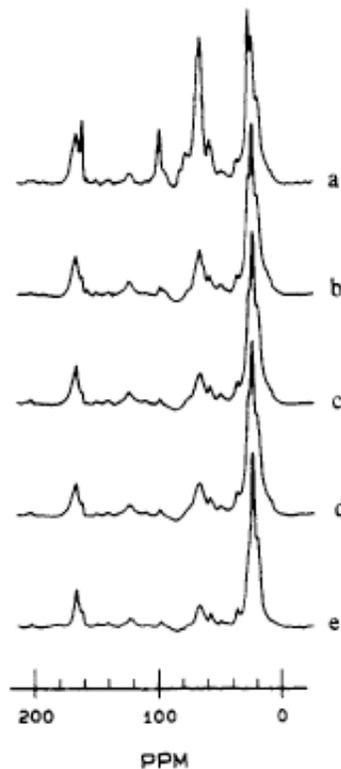


Figura 4. Espectros de ^{13}C RMN-CPMAS de la cutícula del limón con diferentes tratamientos sucesivos: con a) oxalato, b) celulasa, c) pectinasa, d) hemicelulasa, e) Soxhlet.

Es importante notar que en este trabajo se realizó una optimización del mejor disolvente para eliminar las grasas (ceras) de la cutícula para obtener la cutina, a través de un Soxhlet sucesivo con metanol, cloruro de metileno y tetrahidrofurano.

4.6 MÉTODOS PARA LA DESPOLIMERIZACIÓN DE LAS CUTÍCULAS

La despolimerización de poliésteres ha sido realizada por varios métodos tanto químicos como enzimáticos.

4.6.1 Métodos químicos

Dentro de estos se incluye la reducción con LiAlH_4 en tetrahidrofurano, hidrólisis alcalina con hidróxido de potasio (KOH), transesterificación con trifluoruro de boro o metóxido sódico en metanol (Fig. 5).

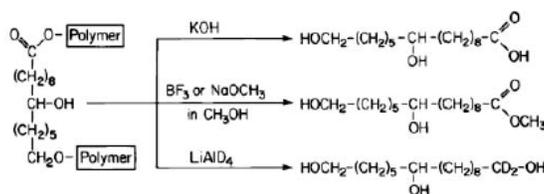


Figura 5. Distintos métodos químicos para la depolimerización de la cutícula.

La hidrólisis también es posible con ácido trifluoroacético (TFA), el cual ha sido utilizado como un reactivo alternativo para el análisis de polisacáridos. Sus características de ácido fuerte y su volatilidad para ser eliminado a presión reducida, lo han hecho el método de elección para el estudio de polisacáridos no celulósicos. De igual forma puede servir como un reactivo hidrolítico para el material no celulósico y lignocelulósico. Se ha probado que para el estudio estructural de la suberina de la papa, el uso de TFA fue eficaz para hidrolizar de forma controlada los dominios de polisacáridos y de alifáticos, demostrando que son espacialmente diferentes, e identificando uniones entre ambos dominios (Arrieta-Baez y Stark, 2006). La hidrólisis controlada de los dominios alifáticos resulta bastante interesante para ser utilizada en cutículas compuestas de

ácidos grasos de cadena larga, hidroxilados y/o epoxidados, como es el caso de las cutinas, lo cual se puede observar mediante los estudios de sólidos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en donde con el incremento de TFA hay una disminución en el dominio alifático (20-40 ppm) (Fig. 6).

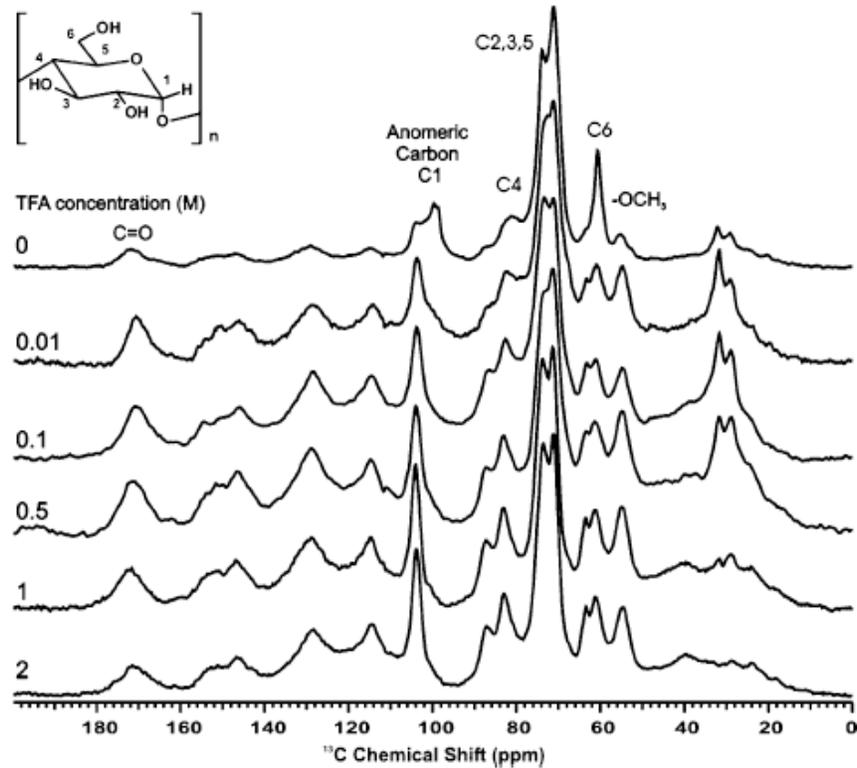


Figura 6. Espectros de ^{13}C RMN-CPMAS de la suberina de la papa en un tratamiento con diferentes concentraciones de TFA después de 90 minutos.

4.6.2 Método enzimático

Las principales enzimas que se han utilizado son las lipasas, específicamente lipasas pancreáticas, y/o cutinasas. Este método permite romper los enlaces éster y así obtener monómeros y/o derivados, la técnica a usar dependerá de lo que se quiera hidrolizar (Kolattukudy, 2001; Ray *et al.*, 1994).

4.7 ESTUDIOS Y TÉCNICAS REALIZADAS SOBRE CUTÍCULAS Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA :

Existen desde hace aproximadamente 3 décadas estudios sobre la extracción de cutículas, así como su composición química a través de diferentes técnicas que han sido actualizadas conforme avanza el tiempo y que nos han permitido comparar los resultados entre las especies de plantas (Tabla 1).

Especie	Monómeros presentes en las cutinas	
<i>Vicia faba</i>	10,16-dihidroxipalmitico	(Kolattukudy, 1970)
<i>Agave americana</i>	9,10,18-trihidroxi-octadecanoico	(Deschmuck <i>et al.</i> 2003)
	9,10-epoxi-18-hidroxi-octadecanoico	
	10,16-dihidroxihexadecanoico	
<i>Prunus avium</i>	9(10),16-dihidroxi-hexadecanoico	(Peschel <i>et al.</i> , 2007)
	9,10,18-trihidroxi-octadecanoico	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	10,16-dihidroxihexadecanoico	(Osman, <i>et al.</i> , 1995, Osman, <i>et al.</i> , 1999; Stark, <i>et al.</i> , 2000; Deschmuck, <i>et al.</i> 2003; Heredia, 2003).
<i>Citrus aurantifolia</i>	10,16-dihidroxihexadecanoico	(Holloway, 1982; Kolattukudy,
	16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico	1984; Zlotnik-Mazori and Stark 1988; Pacchiano, <i>et al.</i> , 1993; Ray, <i>et al.</i> , 1995; Ray, <i>et al.</i> , 1997; Fang, <i>et al.</i> , 2001).

Tabla 1. Diversos estudios en especies demuestran la composición de la cutina.

Uno de los pioneros sobre el estudio de la composición estructural de la cutícula, fue Kolattukudy, que en 1970 realizó un estudio sobre la obtención de la cutina de *Vicia faba* a través de la reducción con LiAlH_4 en tetrahidrofurano dando como resultado monómeros los cuales fueron identificados por cromatografía de capa fina (por sus siglas en inglés: Thin Layer Chromatography - TLC) en un sistema éter: hexano: metanol: ácido fórmico (40:10:1:2). El mayor componente de *V. faba* resultó ser el ácido 10,16-dihidroxipalmítico identificado por RMN, espectrometría de masas e infrarrojo (por sus siglas en inglés: Infrared radiation o infrared spectroscopy - IR), además de otras técnicas analíticas.

En *Arabidopsis*, planta modelo para la estudios de genética, también se ha estudiado la estructura de la cutina y la cutana (parte no hidrolizable), así como de la suberina (Franke, *et al*, 2005), además de estudiar la biosíntesis de estos compuestos. El procedimiento para obtener los monómeros se hizo por vía enzimática con pectinasa-celulasa y con Metanol y Ácido clorhídrico (MeOH-HCl). El reconocimiento de los monómeros se hizo a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), donde se observó que los mas abundantes en esta planta son de cadenas de C_{16} y C_{18} de ácidos hidroxilados.

En *Agave americana* se ha estudiado también la cutina y la cutana (Deschmuck *et al*. 2003), la primera consta de unidades monoméricas de 18 carbonos, como los ácidos 9,10,18-trihidroxiocadecanoico, 9,10-epoxi-18-hidroxiocadecanoico, y 10,16-dihidroxihexadecanoico y la segunda se trata de la parte no hidrolizable de la cutícula. Peschel y su equipo en el 2007 encontraron en la cereza (*Prunus avium*) un porcentaje considerable de los monómeros son cadenas de 18 y 16 carbonos. Los monómeros mas abundantes fueron el ácido 9(10),16-dihidroxihexadecanoico (53.6 %) y el ácido 9,10,18-trihidroxiocadecanoico (7.8%).

En el jitomate (*Lycopersicum esculentum*) se han realizado varios estudios sobre su estructura química para ver las características tanto de la cutícula como su

composición monomérica. Benítez y colaboradores en el 2004 estudiaron la estructura física y química del jitomate en crecimiento en comparación con el maduro, por medio de rayos X, RMN y FT-IR (por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared spectroscopy), además de microscopia de fuerza atómica (AFM). Del conjunto de resultados obtenidos por dichas técnicas se dedujo que la cutícula posee una estructura amorfa. De la composición monoméricas de la cutícula del jitomate se han realizado varios estudios que prueban que el mayor componente monomérico identificado es el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico de (Osman, *et al.*, 1995, Osman, *et al.*, 1999; Stark, *et al.*, 2000; Deschmuck, *et al.* 2003; Heredia, 2003).

El género *Citrus* generalmente posee una cutícula compuesta por varios monómeros, de los cuales 10 están en mayor proporción y se encuentran en el limón, lima, naranja, toronja y mandarina. En *Citrus aurantifolia* los principales monómeros o los mas abundantes de la cutina son el ácido 16-hidroxi-10-oxo hexadecanoico y 10,16-dihidroxihexadecanoico (Holloway, 1982; Kolattukudy, 1984; Zlotnik-Mazori and Stark 1988; Pacchiano, *et al.*, 1993; Ray, *et al.*, 1995 y 1998; Fang, *et al.*, 2001).

Ray en 1995 identificó los 10 monómeros con mayor presencia en la cutícula del limón (Tabla 2), por medio de una despolimerización química a través hidróxido de potasio y con una técnica alternativa a partir de una transesterificación con trifloruro de boro-metanol. Con lo anterior se obtuvieron los monómeros ya descritos para este género.

En 1998 Ray y col. utilizaron iodotrimetilsilano (TMSI) para romper éteres y obtuvieron 22% de 5 productos a partir de la cutina. Cuatro fueron separados por cromatografía y se identificaron por RMN y espectrometría de masas. A partir de este trabajo se reconoció que los monómeros mas comunes de la cutina del limón se encuentran unidos formando ésteres primarios (Fig. 7). Los sólidos no

reactivos de la cutina fueron recuperados y comparados con el polímero intacto usando ^{13}C NMR.

Monómero	Ácido	
	Tr (min)	Área (%)
Ácido :		
Hexadecanoico, octadecanoico	2.4	3.7
10-hidroxihexadecanoico	9.5	0.95
18-hidroxi octadeca-9,12-dienoico	13.8	0.8
18-hidroxi octadeca-9-enoide	14.4	1.7
16-hidroxihexadecanoico	15.5	2.8
16-hidroxi-9-oxo-hexadecanoico	21.7	4.8
16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico	22.7	51.0
9,16-dihidroxihexadecanoico	26.6	2.9
10,16-dihidroxihexadecanoico	28.1	27.9

Tabla 2. Principales monómero identificados en *Citrus* (Ray *et al.*, 1994).

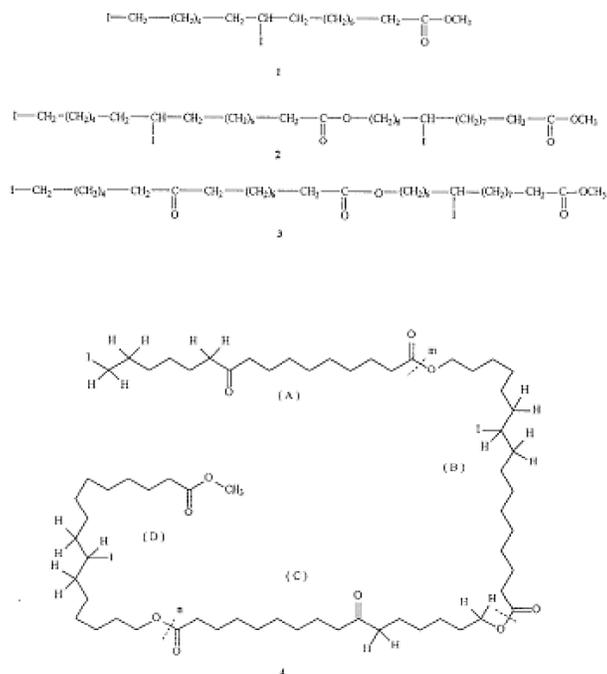


Figura 7. Estructura química propuesta de los productos solubles de la cutina del limón por la depolimerización con TMSI.

El mismo grupo obtuvo diferentes oligómeros a partir de una despolimerización con lipasa pancreática porcina y lipasa de *Rhizopus arrhizus*. Los pentámeros obtenidos incluyen como monómeros a los ácidos 10,16-dihidroxihexadecanoico y 10-hidroxihexadecanoico, además del alcohol 1,7,16-trihidroxihexadecanol. La resistencia de la cutina a la hidrólisis de sus ésteres, sugiere que hay una red de ésteres secundarios que limita o impide que la lipasa reaccione con los ésteres que se encuentran cubiertos por la red polimérica.

Fang y col. (2001) obtuvieron los oligómeros de la cutina del limón a través de un tratamiento degradativo con ácido fluorhídrico (HF), entre ellos los ya descritos, sumando a estos el ácido 16-hidroxihexadecanoico, además encontraron que las unidades glicosídicas están unidas a los ácidos grasos hidroxilados, ya que este protocolo sirve para separar los azúcares de la glicoproteínas. Su arquitectura básicamente se debe a la esterificación de los alcoholes y de fragmentos de CH.

Tian y col. (2008) probaron diferentes tratamientos para degradar la cutícula del limón. Utilizando HF obtuvieron dímeros y trímeros basados en el ácido 16-hidroxi-10-oxo hexadecanoico (Fig. 8). Cuando utilizaron KOH obtuvieron unidades triméricas del ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico y además una unidad del ácido 16-hidroxi-10-oxo hexadecanoico (Fig. 9). Observaron que con KOH la cutícula se degrada en un 60% y con HF solo se hidroliza un 23%. El estudio anterior provee una representación comprensiva de la arquitectura molecular de la cutina del limón a través de espectroscopia de RMN utilizando principalmente experimentos de HMBC (Tian, *et al.* 2008).

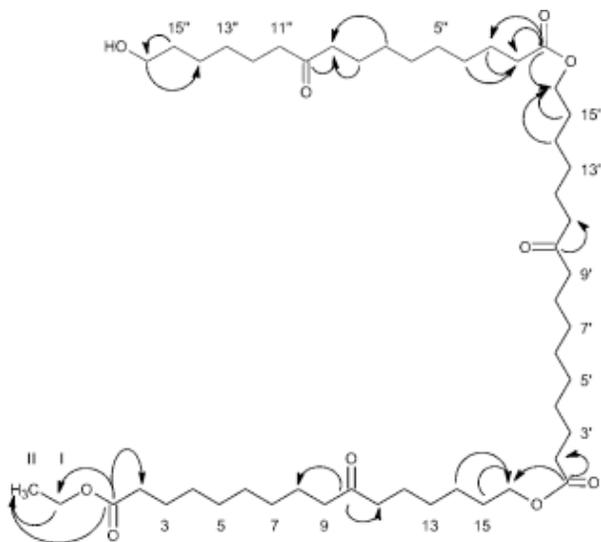


Figura 8. HMBC de un modelo del trímero del ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico obtenido a partir de HF.

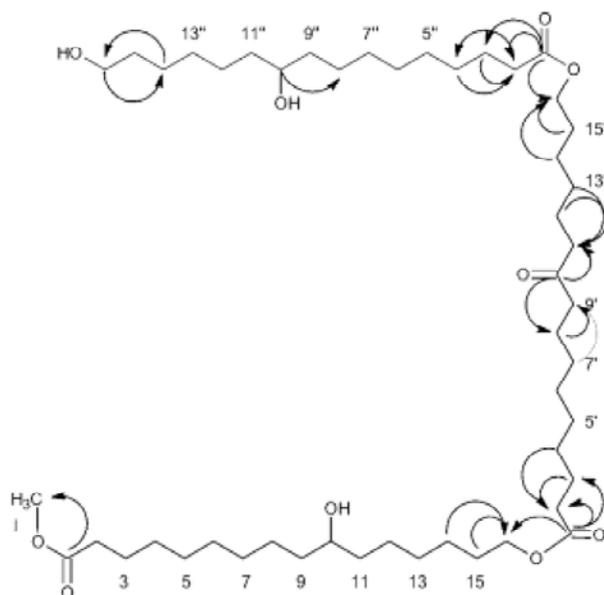


Figura 9. HMBC del trímero del ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico, obtenido por KOH.

Los estudios de la cutícula de *Citrus aurantifolia* y de *Lycopersicon esculentum*, han demostrado que existe un monómero en común, identificado como el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (Ray *et al.*, 1995; Deschmuck, *et al.*, 2003). Ahmed y colaboradores (2003) reportaron la primera síntesis química de los enantiómeros del (R)- y (S)-ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (10,16-DHPA).

4.8 IMPORTANCIA DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA.

En años recientes se ha incrementado el número de investigaciones en el campo de la catálisis industrial de origen biológico y química, debido a la gran demanda hacia la producción de materiales por procesos que sean más eficientes y adecuados para el medio ambiente.

La biocatálisis o catálisis biológica se lleva a cabo por enzimas que catalizan reacciones químicas específicas en los organismos vivos. Lo anterior representa una alternativa para sustituir a la catálisis química, debido a que la biocatálisis tiene una serie de ventajas, entre ellas una alta velocidad de reacción, condiciones de reacción más suaves, buena actividad sobre sustratos sintéticos, actividad catalítica en ambas direcciones de reacción, así como reacciones altamente regio y enantioselectivas (Campbell, 2000; Faber, 2000; Muderhwa *et al.*, 1988; Paques y Macedo, 2006; Fontes y Alves, 2009). Por lo que, a través de la catálisis enzimática derivada de fuentes renovables se pueden obtener materiales eco-amigables y no tóxicos.

Polímeros como polisacáridos, proteínas, poliésteres entre otros, son sintetizados de manera natural con enzimas. La naturaleza produce estos polímeros en grandes cantidades bajo ciertas condiciones de temperatura y presión en un medio acuoso. Estos, son altamente biodegradables y tienen un estructura específica y por tanto presentan propiedades específicas. (Varma *et al.*, 2005).

Las enzimas hidrolíticas (proteasas, celulasas, lipasas, amilasas y cutinasas) son las más empleadas dentro de la química orgánicas, y son muy atractivas por características como su bajo costo, especificidad de sustratos, amplia disponibilidad y actividad sin necesidad de cofactores (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

4.8.1 Lipasas

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, normalmente en un medio acuoso en los sistemas vivos. Algunas lipasas son estables en disolventes orgánicos y pueden ser usadas como catalizadores de reacciones de esterificación y transesterificación. Las lipasas en contraste con otras enzimas, aceptan un gran número de sustratos, son estables en disolventes orgánicos, catalizan reacciones de hidrólisis y síntesis de ésteres. Estas catálisis específicas hacen posible la producción de poliésteres y policarbonatos.

Las lipasas tienen funciones diversas en la degradación de la comida y grasa. Se han encontrado en muchos organismos, que incluye a animales, plantas y bacterias. Las lipasas comúnmente utilizadas en la síntesis de poliésteres se obtienen de diversas fuentes, como por ejemplo: Lipasa pancreática porcina (PPL) a partir de los mamíferos, de origen fúngico como la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL) (Fig. 10), *Candida rugosa* (CRL), *Candida cylindracea* (CCL), *Aspergillus niger* (ANL), *Penicillium roqueforti* (PRL), *Rhizopus delemar* (RDL), *Rhizomucor miehei* (RML) o de origen bacteriano como *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL), Lipasa de *Pseudomonas* sp. (PSL).

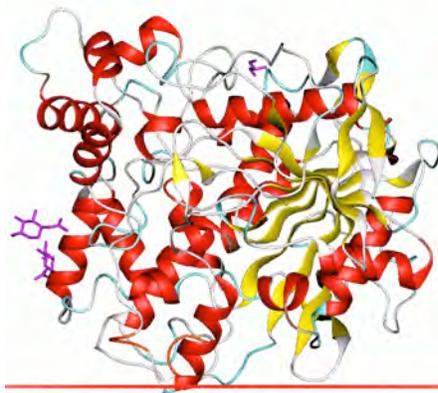


Figura 10. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica*.

Por medio de las lipasas se han obtenido poliésteres a partir de la apertura y posterior polimerización de lactonas, con diferente número de carbonos (anillos pequeños o grandes), de diésteres cíclicos (lactidos) y carbonatos cíclicos. Esto representa una metodología de síntesis importante y eco-amigable (Varma *et al.*, 2005).

4.8.2 Utilidad de las hidrolasas

Las cutinasas conocidas también como hidrolasas, son enzimas descubiertas en hongos fitopatógenos que crecen en la cutina como única vía de absorción del carbono, estas comparten propiedades con las lipasas y esterases, importantes para la biocatálisis en varios procesos con reacciones como la hidrólisis, esterificación y transesterificación. Además las cutinasas presentan alta estabilidad en disolventes orgánicos y líquidos iónicos. Estas características permiten aplicaciones enzimáticas dentro de las diferentes áreas como la industria de alimentos, cosméticos, químicos, herbicidas e insecticidas, tratamientos, lavado de textiles y química de polímeros (Li y Beisson, 2009; Fontes y Alves, 2009).

4.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLISIS

En varios trabajos experimentales se han utilizado diferentes técnicas analíticas para demostrar la composición monomérica de la cutícula así como su composición física. A continuación se describen algunas de estas técnicas.

4.9.1 Técnicas analíticas

- Espectrometría de Masas (*EM*). En el espectrómetro primero se ionizan las moléculas por colisión con una corriente electrónica de alta energía. A continuación todos los iones se fragmentan en piezas más pequeñas, las cuales se clasifican magnéticamente de acuerdo con su relación de masa

a carga (m/z). La molécula cuando ha perdido un electrón se le denomina ión molecular M^+ , su relación m/z corresponde a su peso molecular. El esquema de como sucede lo anterior se presenta a continuación (Fig. 11).

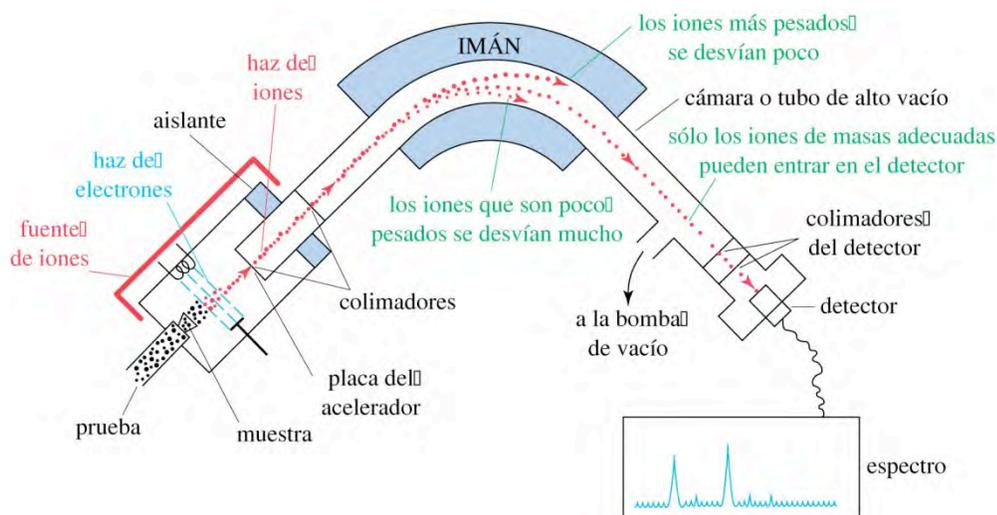


Figura 11. Proceso esquemático de la espectrometría de masas.

La espectroscopia (sea infrarrojo, ultravioleta o de resonancia magnética nuclear) se caracteriza por que las moléculas interactúan con la energía electromagnética.

- Espectroscopia Infrarroja (*IR*). A través de las vibraciones de los enlaces nos da información de los grupos funcionales, es decir, mide las frecuencias de la luz infrarroja que son absorbidas por un compuesto.

Todas las moléculas tienen una cierta cantidad de energía distribuida en su estructura, lo que hace que los enlaces se estiren y contraigan, que los átomos oscilen y que se presenten otras vibraciones moleculares. La cantidad de energía que contiene una molécula no es una variable continua sino que está cuantizada; es decir una molécula sólo se puede estirar o flexionar en determinadas frecuencias que corresponden a niveles de energía específicos.

Cuando la molécula es irradiada con radiación electromagnética absorbe energía cuando la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de la vibración. El espectro infrarrojo contiene docenas de bandas de absorción, y actúa como una huella digital única de un compuesto específico. En realidad, a la región compleja del espectro de infrarrojo, que va de 1500 a unos 400 cm^{-1} se llama región dactilar o huella digital. Si dos compuestos tienen espectros infrarrojos idénticos, casi seguramente son idénticos. Casi todos los grupos funcionales tienen bandas características de la absorción infrarroja que no cambian de un compuesto a otro. Las zonas importantes y generales de frecuencias de tensión en estudios de IR se indican en el siguiente cuadro (Fig. 12).

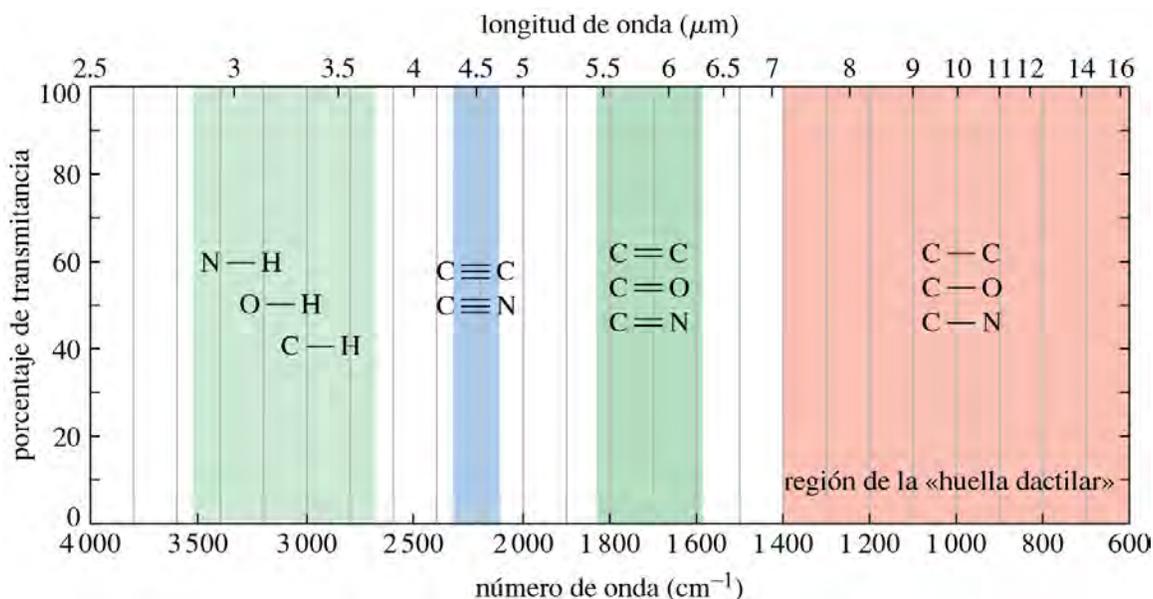


Figura 12. Frecuencias de tensión en el IR.

El nuevo espectrofotómetro con transformada de Fourier en IR (FT-IR), es más sensible porque en lugar de explorar las frecuencias una por una, puede medir todas de en forma simultánea, la información se digitaliza y con una computadora que determina su transformada de Fourier para finalmente producir el espectro FT-IR (Yurkanis, 2008).

- Resonancia Magnética Nuclear (*RMN*). Es de las técnicas más valiosas con que cuentan los químicos orgánicos y suele complementar a las otras técnicas ya que produce un mapa de la estructura de carbonos e hidrógenos de una molécula orgánica. Muchos tipos de núcleos atómicos se comportan como si giraran en torno de un eje, dado que tienen carga positiva, funcionan como si fueran pequeñas barras magnéticas por lo que interactúan con un campo magnético (B) externo (Fig. 13). No todos los núcleos se comportan así, es por eso que se ha escogido a los átomos de ^1H y ^{13}C , los cuales tienen un spin y un giro. Todos los núcleos con un número impar como ^1H , ^{15}N , ^{19}F , y ^{31}P , y todos los que tienen un número impar de neutrones como el ^{13}C poseen propiedades magnéticas. Los núcleos en las moléculas están rodeados por electrones, cuando se aplica un campo magnético externo a una molécula, los electrones en movimiento alrededor de los núcleos desarrollan por cuenta propia campos magnéticos locales, los cuales se oponen al campo magnético aplicado, de tal manera que el campo magnético efectivo que siente el núcleo es algo más débil que el campo aplicado.

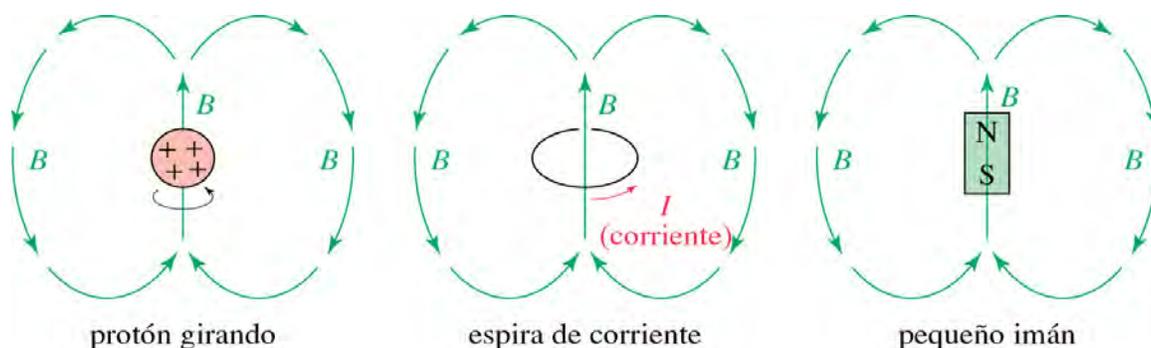


Figura 13. Visualización del momento magnético.

Al describir este efecto de campos locales, se dice que los núcleos están protegidos contra el efecto total del campo ampliado por electrones que lo rodean. Puesto que cada núcleo específico de una molécula tiene un

entorno electrónico distinto, cada núcleo está protegido en grado ligeramente diferente en su campo magnético efectivo para cada uno. Es posible detectar estas pequeñas diferencias entre los campos magnéticos efectivos que sienten los diferentes núcleos y por consiguiente, las señales para cada núcleo serán distintas químicamente en sus respectivas moléculas. Así el espectro de resonancia magnética nuclear de un compuesto orgánico produce un mapa de la estructura de carbonos e hidrógenos.

La información deducida para el caso de la espectroscopia de ^{13}C tiene una utilidad extraordinaria para determinar estructuras. No sólo se puede contar el número de átomos de carbono no equivalentes en una molécula, también se puede obtener la información sobre el ambiente electrónico de cada uno y aún determinar cuántos protones están unidos con cada uno. La mayoría de las resonancias de ^{13}C se encuentra entre 0 y 220 ppm a frecuencia baja, la línea de referencia por lo general el TMS, y el desplazamiento químico exacto de cada una de las resonancias de ^{13}C depende del ambiente electrónico de este carbono dentro de la molécula (Fig. 14). Los factores que determinan los desplazamientos químicos son complejos, una tendencia es que el desplazamiento químico de un carbono es afectado por la electronegatividad de los átomos cercanos: los carbonos unidos a oxígeno, nitrógeno o halógenos se encuentran a frecuencias altas comparados con los carbonos pertenecientes a los alcanos. En el caso del ^1H se determina cuántos tipos de hidrógenos no equivalentes están presentes (McMurry, 2008).

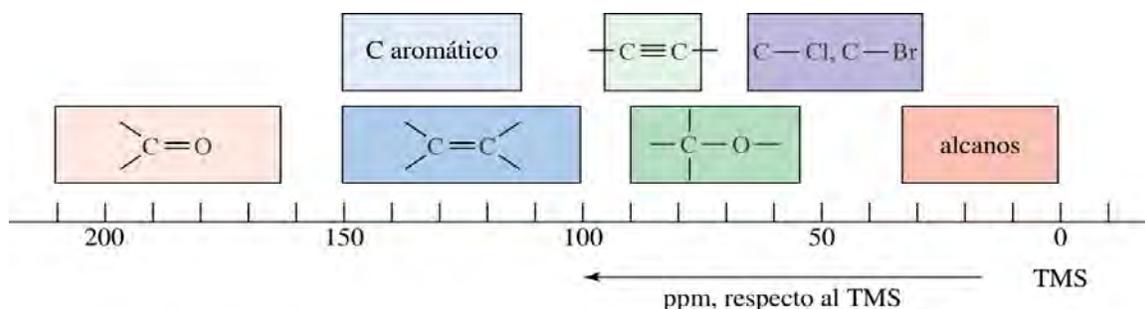


Figura 14. Desplazamiento químico aproximado de ^{13}C RMN.

Existen dos tipos de resonancia, la de solución y la de sólidos, en un RMN de líquido o una disolución está formado por señales muy estrechas y bien resueltas que contienen información molecular. Sin embargo, un experimento similar con un sólido produce señales muy anchas, que pueden llegar a ser de varios kHz o incluso MHz, lo que impide la obtención de información de manera fácil.

Dentro de la resonancia magnética de sólidos se encuentra aquella de tipo bidimensional (RMN-2d) que corresponde a la generación de espectros de RMN con dos frecuencias variables independientes. Estos espectros se generan registrando FID (t_2) al final de una secuencia de pulsos con variación sistemática de otro parámetro, más comúnmente el tiempo de evolución t_1 entre un par de pulsos. Los FIDs (conjunto de medidas que forman una función senoidal compleja) sucesivos se adquieren por incremento de los tiempos de evolución y se almacenan como archivos en una matriz de datos. El espectro 2D se obtiene por una doble transformación de Fourier (2D-TF).

- HMBC (Correlación heteronuclear de dos a tres enlaces de distancia) Establece la correlación entre protones y un heteroátomo separados por dos o tres enlaces. Con una alta sensibilidad resultado de la excitación y detección protónicas. Detecta acoplamientos débiles.

5. OBJETIVOS:

Generales

- Estudiar la estructura de las cutículas de dos variedades de limón (persa y mexicano).
- Obtener los monómeros principales para su polimerización.

Particulares

- Obtener las cutículas de las dos variedades de limón (persa y mexicano).
- Analizar las cutículas por medio de resonancia magnética nuclear de sólidos.
- Estudiar la reacción de hidrólisis de las cutículas con TFA y KOH.
- Analizar los componentes solubles por medio de métodos espectroscópicos.
- Estudiar la polimerización de los monómeros principales con lipasas.

6. METODOLOGÍA

A continuación se describe la metodología utilizada en esta tesis, la cual se basa en trabajos previos sobre la extracción de cutículas (Pacchiano, *et al.*, 1993).

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se utilizaron 2 variedades de limón o lima ácida, el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y el limón persa (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle var. *latifolia* Tanaka). Se obtuvo la cáscara a partir de la fruta, y se procesó mediante tratamientos enzimáticos, posteriormente se eliminaron residuos orgánicos mediante la extracción sucesiva con diferentes disolventes.

6.2 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA OBTENER LAS CUTÍCULAS

A la cáscara se le aplicó un primer tratamiento con la pectinasa de *Aspergillus niger* (3.05 mg/ml; 10 ml aprox. por litro) disuelto en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 4. Con HCl se ajusta el pH. En los matraces se pone la cáscara de limón y se cubre con la solución de pectinasa para después colocarla en un agitador mecánico a 44 °C por 5 días a 150 rpm.

Lo siguiente es filtrar y quitar el material no deseado a través de coladeras o tamices para obtener el material cuticular. Se somete a otro tratamiento enzimático con celulasa (0.4 mg/ml) y hemicelulasa (0.3 mg/ml) respectivamente, en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 5 en agitación a 150 rpm. por 6 días a una temperatura de 37°C. El material obtenido se filtra en coladeras o tamices con agua a chorro.

El material obtenido del proceso anterior se somete a un tratamiento desengrasante sucesivo, el primero con diclorometano:metanol (1:1 v/v, 2 h) con 2 repeticiones. La parte acuosa se concentra y guarda para su posterior

estudio. En el tratamiento final se realiza con un Soxhlet con diclorometano:metanol (1:1 v/v, 76 h). Se retira la cutícula de las cápsulas de extracción y se pesa el material obtenido.

La cutícula obtenida se analizó mediante CP-MAS NMR. La parte acuosa del lavado con diclorometano y metanol de la cutícula, se separó mediante una columna cromatografía con sílica gel (tamaño 0.063-0.200 mm) eluida con hexano:acetato de etilo (9:1 v/v). Las fracciones obtenidas de esta columna se monitorearon por medio de una cromatografía de capa fina (TLC) en un sistema hexano y acetato (7:3 v/v).

6.3 EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Para la evaluación de antioxidantes se tomó una alícuota de la fracción 9:1 de la columna de hexano:acetato, se realizó una cromatografía de capa fina eluida en acetato de etilo:metanol:agua (20:3:1 v/v) y se reveló con DPPH.

6.4 DESPOLIMERIZACIÓN QUÍMICA

6.4.1 Despolimerización química con Ácido Trifluoroacético (TFA)

La cutícula del limón mexicano se despolimerizó con el uso de ácido trifluoroacético a diferentes concentraciones (0.01, 0.1 y 2.0 M) a una temperatura de 110 °C en un tiempo aproximado de 2 horas.

Las reacciones se filtraron y las fracciones acuosas se concentraron en un rotavapor. Se analizó la fracción acuosa de cada una de las diferentes molaridades por medio de cromatografía de capa fina. Las placas de sílica gel se impregnan de una mezcla de dietanolamina 0.1 M y de ácido acético 10 mM, en acetonitrilo y se activan a temperatura ambiente por una hora. Las muestras se corren en butanol:ac. acético:agua (4:1:1 v/v) con los azúcares que se utilizaron de referencia como la glucosa, fructosa y sacarosa con los contenidos en la

cutícula de las diferentes molaridades y se revelan con α -Naftol al 4 %, estas placas se calentaron a 100 °C. La parte sólida sobrante se lavó con diclorometano y metanol (1:1 v/v). A la parte insoluble después del proceso anterior se analizó por medio de RMN-sólidos y FT-IR para su identificación estructural.

6.4.2 Depolimerización química con Hidróxido de Potasio (KOH)

La cutícula de limón (variedad mexicana y persa) se despolimerizó por medio de hidróxido de potasio (KOH) en metanol a una concentración de 1.5 M, con el fin de obtener compuestos monoméricos y estructuras oligoméricas.

La reacción se llevó a cabo a reflujo por 24 horas a temperatura. Al cabo de éste tiempo, se filtra la reacción y se neutraliza el pH con HCl concentrado. Los compuestos solubles se separaron por medio de diferentes técnicas de cromatografía como columnas cromatográficas (silica gel, tamaño 0.063-0.200 mm), cromatografía de capa fina (TLC revelado con sulfato cérico) y HPLC. La parte insoluble se analizó a través de FT-IR.

Los compuestos o monómeros se analizaron a través de RMN, FT-IR y Espectrometría de masas. Cuando se tiene reconocido el compuesto se procede a su polimerización.

6.5 POLIMERIZACIONES

6.5.1 Enzimática

Las polimerizaciones enzimáticas se realizaron bajo las siguientes condiciones: 20 mg del monómero, 20 mg de la enzima, 20 mg de la malla molecular y 1 ml de tolueno en tubos de ensaye a una temperatura de 60 °C y se agitaron a 200 rpm. con las enzimas *Pseudomona cepacia* (PCL), Lipasa pancreática porcina (PPL) y

Candida antarctica-B (CAL). La reacción se monitoreo mediante cromatografía de capa fina hasta la descripción del monómero.

Se evaporó el tolueno en el rotavapor y se lavó el material que quedo de la reacción enzimática con metanol para quitar cualquier resto de monómero ya que es soluble en este disolvente, luego se purificó con cloroformo para obtener el polímero y pasarlo a un vial limpio. Los polímeros obtenidos se analizaron por FT-IR y RMN.

6.5.2 Química

La polimerización química se realizó bajo las siguientes condiciones: 0.0169 g de 4-Dimetilamino piridina, 0.02861g de N,N'-Diciclohexil-carbodimida además de 40 mg del monómero **2** disueltos en tolueno o dimetilformamida. La reacción se dejó en agitación aproximadamente en una semana. Después se evaporó el disolvente en el rotavapor y se obtuvo el material sólido de la reacción, se lavó con metanol y luego con cloroformo. El material obtenido se analizó por RMN.

7. REACTIVOS:

Acetato de etilo

Acetato de sodio

Ácido acético

Ácido clorhídrico

Ácido sulfúrico

Ácido trifluoroacético

Agua

Alfa-naftol

Butanol

Celulasa de *Aspergillus niger*

Diclorometano

Dietanolamina

Dimetilformamida

DPPH

Hemicelulasa de *A. niger*

Hexano

Hidróxido de potasio

Metanol

Pectinasa de *A. niger*

Tolueno

4-Dimetilamino piridina

N, N'-Diciclohexil-carbodimida

Enzimas (Lipasas):

Candida antarctica

Pseudomonas cepacia sp.

Lipasa pancreática porcina

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

8.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

8.1.1 Colecta de las variedades del limón.

En este trabajo se utilizaron 2 variedades de limón o lima ácida, el limón mexicano y el limón persa, los cuales fueron conseguidos en el pasillo “M” de la Central de Abastos del Distrito Federal, con el fin de extraer de un mismo lugar una gran cantidad de la fruta y obtener información sobre el origen de producción, identificando así el lugar de cosecha de cada variedad. Los datos obtenidos indican que el limón mexicano, proviene de Apatzingán, Michoacán y el limón persa de Martínez de la Torre, Veracruz.

Al tratarse de la misma especie *Citrus aurantifolia* la única diferencia entre estas dos variedades a simple vista son el tamaño, el color y el sabor, ya que el limón mexicano presenta un menor tamaño un verde-amarillo mas intenso y un sabor mas ácido en comparación al limón persa (Fig. 15).

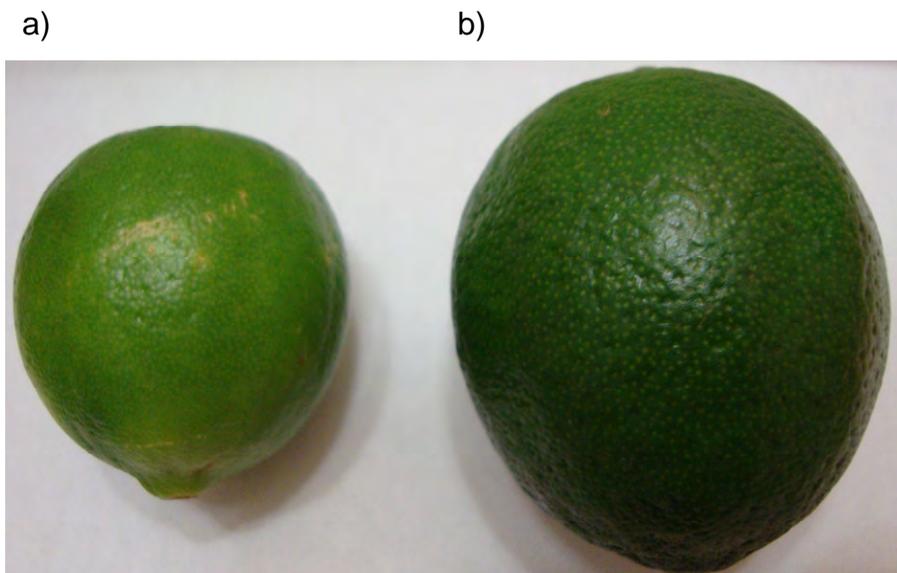
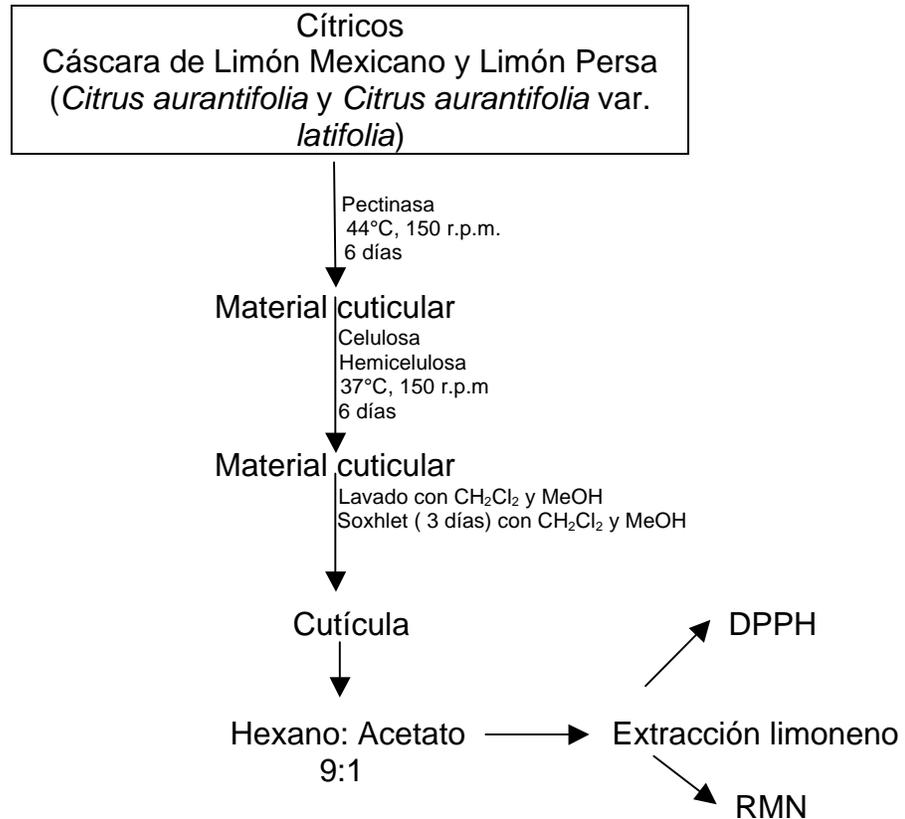


Figura 15. Fruto objeto de estudio: a) limón mexicano (con semilla) y b) limón persa (sin semilla).

8.1.2 Aislamiento de la Cutícula.

El aislamiento se llevo a cabo de a cuerdo con el siguiente diagrama de flujo:



Este proceso para aislar las cutículas, que en su mayoría es enzimático, fue tomado de un protocolo previo (Pacchiano, 1993) donde se menciona la composición de la cáscara de las frutas, señalando la presencia de la cutícula además de una capa de pectina, celulosa y hemicelulosa. Por lo anterior este proceso es indispensable para quitar por medio de enzimas esos componentes los cuales no forman parte de los objetivos del presente proyecto. Después de este procedimiento enzimático es necesario una extracción en Soxhlet y un período de agitación con disolventes, ya que quedan algunas ceras las cuales son removidas por medio de este proceso, obteniendo así, el material cuticular de ambas variedades (Fig. 16) lo más puro posible.

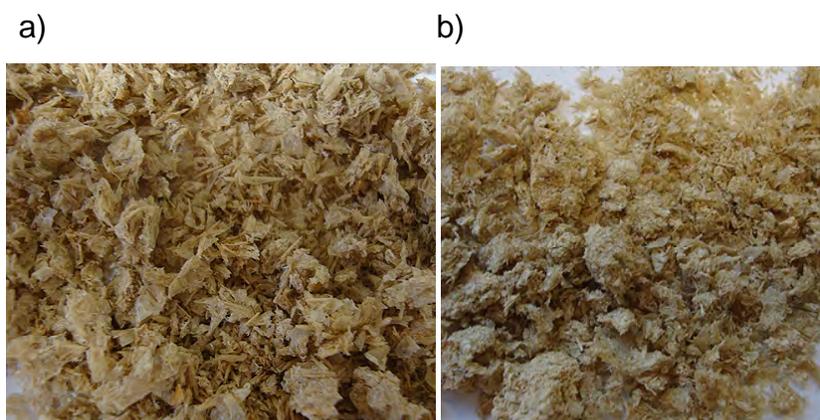


Figura 16. Cutícula del a) limón Persa y b) limón mexicano.

Los disolventes utilizados para lavar el material cuticular (diclorometano-metanol) fueron evaporados por medio de un rotavapor y el concentrado obtenido fue objeto de un análisis de cromatografía de placa fina para determinar la presencia de compuestos antioxidantes por medio del radical libre estable 2,2, difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Lo que se observa en el estudio de antioxidantes por medio de DPPH es un cambio de color de morado a amarillo señalando que el compuesto tiene propiedades antioxidantes, la absorbancia decrece cuando el radical DPPH es secuestrado por un antioxidante, mediante la donación de un hidrógeno (Herrera-Hernández, 2006).

De lo anterior se deduce la presencia de antioxidantes a partir de la placa revelada con DPPH, el extracto que presentó compuestos con actividad antioxidante por ccf, fue separado mediante una columna cromatografía en sílica gel (tamaño 0.063-0.200 mm) que nos permitiera aislar e identificar los compuestos mayoritarios. El compuesto mayoritario fue obtenido entre las fracciones 13 a la 19 con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1). Las fracciones también se analizaron por medio de EM, lo que confirmo la presencia del Limoneno (Fig. 17)

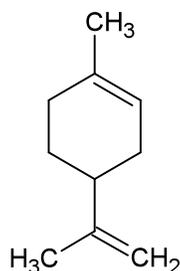


Figura 17. Limoneno obtenido a partir del lavado de diclorometano-metanol.

Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de las moléculas inhibiendo el inicio de la propagación de este proceso en la reacción en cadena. Aquellos antioxidantes presentes en plantas reducen daños y ayudan a prevenir mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento debido a los radicales libres, provocados por rayos ultravioleta.

8.2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

8.2.1 Obtención de la cutícula y su análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Sólidos (^{13}C NMR-CPMAS).

De la cáscara procesada del limón mexicano y persa, se obtuvieron las siguientes cantidades:

Variedad de lima ácida o limón	Peso inicial de la cáscara (g)	Peso de la cutícula obtenida (g)	Rendimiento %
Limón mexicano	374	2.1525	0.57%
Limón persa	300	2.1693	0.72%

Tabla 3. Cantidad en gramos de la obtención de la cutícula a partir de la cáscara del limón mexicano y persa.

En la tabla (Tabla 3) de porcentajes se observa un rendimiento de menos de 1% para la obtención de la cutícula en ambas variedades después del tratamiento con enzimas para remover de la cáscara la pectina, hemicelulosa y celulosa.

El porcentaje que se presenta es relativo, ya que la cutícula se presenta en peso seco, mientras que el peso de la cáscara inicial es peso húmedo, por lo tanto variará para cada procedimiento de extracción.

Después de obtener la cutícula, se analizó por medio de RMN de sólidos (^{13}C NMR-CPMAS), para comprobar si el material obtenido correspondía al tejido cuticular deseado, además de ser comparados con trabajos anteriores (Ray, *et al.* 1997). El análisis se realizó en el Instituto de Química de la UNAM por ^{13}C NMR-CPMAS en un espectrómetro Varian Unityplus 300 equipado para análisis de sólidos. La frecuencia de resonancia fue de 74.443 MHz, con un tiempo de adquisición de 30 ms, un tiempo de retraso (delay time) de 2s entre las adquisiciones sucesivas y un tiempo de contacto (CP) de 1.5 ms. Un experimento rutinario incluye la inserción de 30-60 mg de muestra empacada en un rotor de 5 mm y colocado en una velocidad de giro de 7 khz a temperatura ambiente por 12 hrs. El resultando da un espectro típico que asigna de acuerdo a señales características de los dominios presentes: compuestos alifáticos (20-40 ppm) en seguida se observan señales para un grupo de polisacáridos (60-80 ppm) con los carbonos anoméricos a 100 ppm y finalmente se encuentra un pico de carbonilos (180 ppm) (Fig. 18).

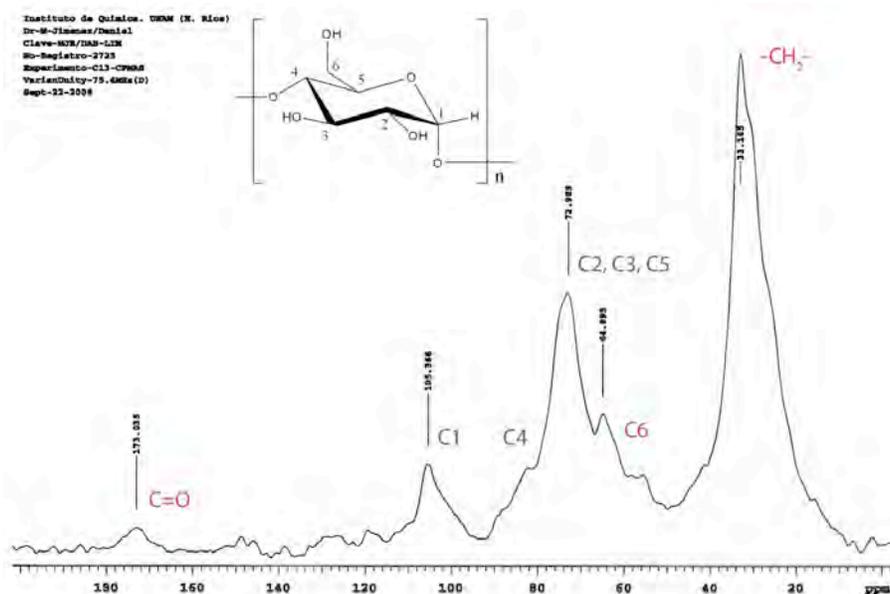


Figura 18. ^{13}C CPMAS NMR de la cutícula de *Citrus aurantifolia* de la cutícula del limón.

Al comparar los espectros de resonancia de ambas variedades se puede notar que existen grandes similitudes entre ellas en cuanto a las señales emitidas de la cutícula y éstas a su vez son similares a las ya reportadas en trabajos anteriores (Ray *et al.*, 1997)(Fig. 19), lo que nos llevó a la conclusión de que la composición macromolecular de la cáscara es la misma que se ha analizado en trabajos anteriores.

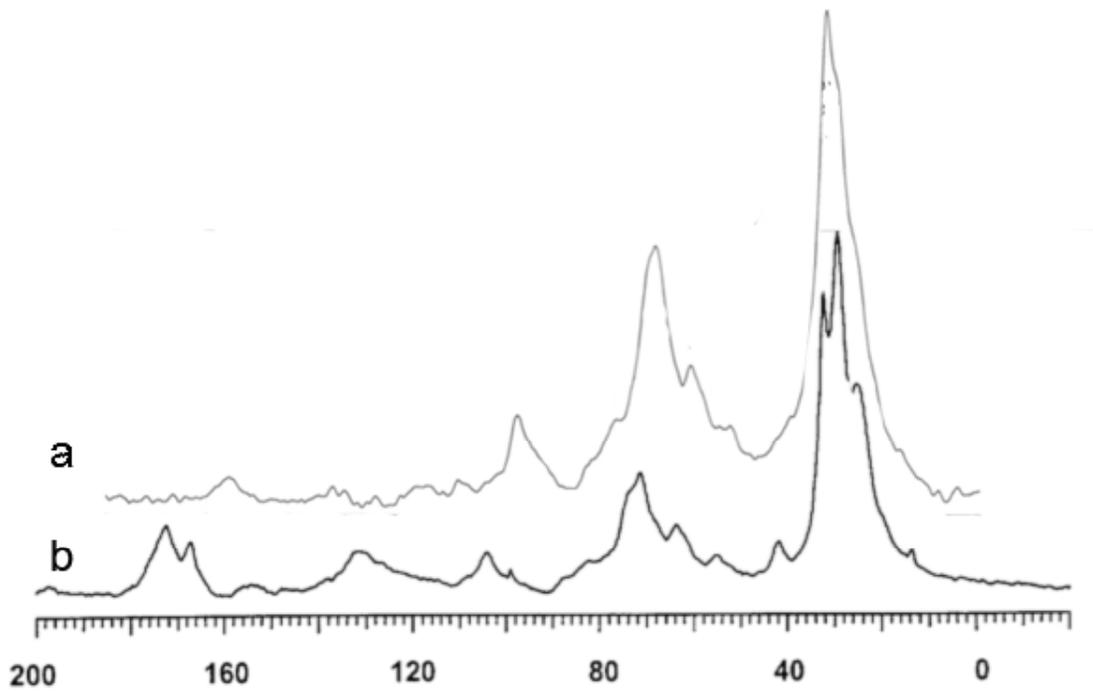


Figura 19. a) ^{13}C CPMAS NMR de la cutícula obtenida para este proyecto. b) ^{13}C CPMAS NMR de la cutícula de *Citrus aurantifolia* reportada por Ray y colaboradores, 1997.

Así mismo se compararon los espectros de las dos variedades de limón con las que se trabajaron, limón persa y limón mexicano, donde se observa que no hay diferencias significativas entre ambas variedades (Fig. 20).

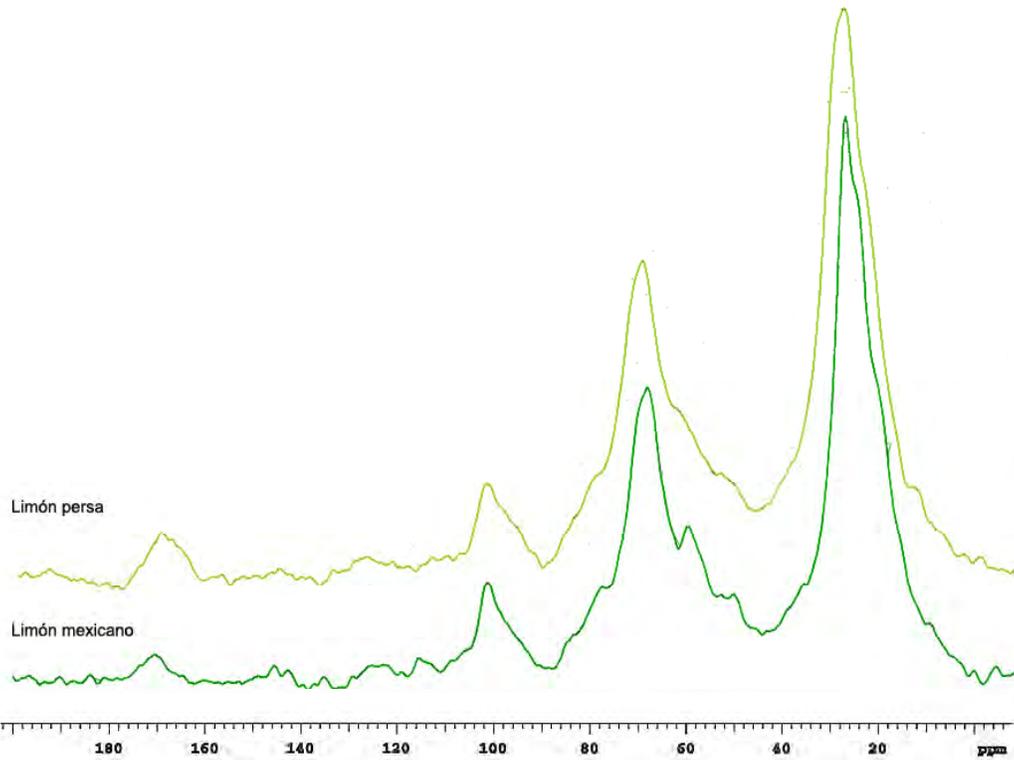
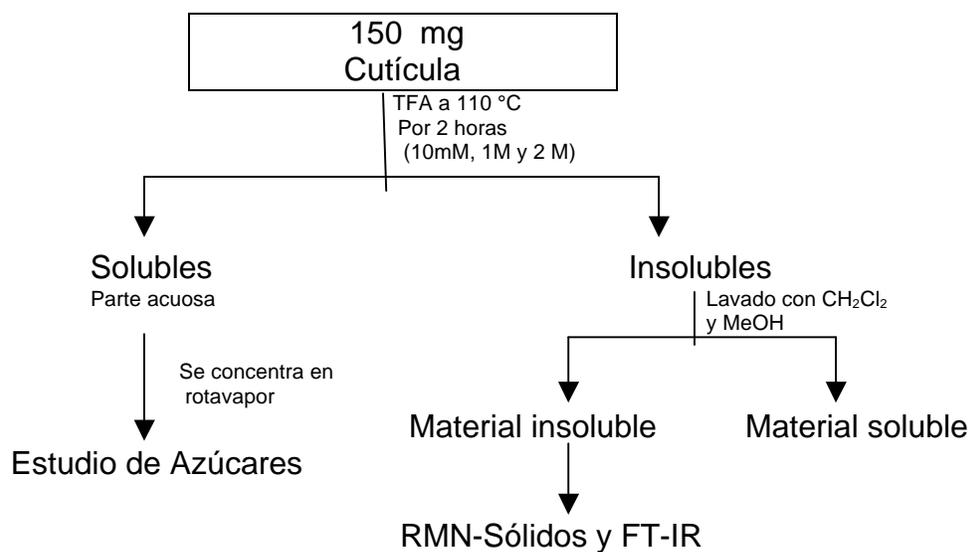


Figura 20. ^{13}C CPMAS NMR de la cutícula de *Citrus aurantifolia* o variedad limón mexicano y *Citrus latifolia* o limón persa.

8.3. DESPOLIMERIZACIÓN DE LA CUTÍCULA.

8.3.1 Cutícula despolimerizada con Ácido trifluoroacético (TFA)



La cutícula obtenida se hidrolizó con ácido trifluoroacético (TFA), de acuerdo con el diagrama de flujo anterior. El TFA actúa sobre enlaces covalentes de polisacáridos no celulósicos (Morrison y Stewart, 1998). Sin embargo, Arrieta-Baez y R. Stark en 2002 demostraron que el TFA hidroliza el dominio alifático de cadena larga en la suberina de la papa, motivo por el cual es utilizado en cutículas con componentes alifáticos tal como las cutinas de algunas frutas.

Las cutículas de las dos variedades de limón al ser similares (de acuerdo a los espectros de resonancia magnética de sólidos), se decidió seguir la presente investigación con una sola variedad (limón mexicano) para llevar a cabo el estudio de la hidrólisis ácida. Se obtuvieron los estudios de RMN de sólidos (^{13}C NMR-CPMAS) a partir del material insoluble de la cutícula despolimerizada a diferentes concentraciones de TFA (10 mM, 1 M y 2 M), se compararon con las obtenidas de la cutícula sin depolimerizar.

A diferencia de lo observado por Arrieta-Baez y R. Stark (2002) el dominio alifático no fue hidrolizado, sin embargo la región de polisacáridos presentó una disminución en las señales. Al observar los espectros de las diferentes concentraciones de TFA, podemos señalar que en la concentración de 10 mM existe una reducción mínima de todos los dominios, mientras que a las concentraciones 1 y 2 M se observa una mayor reducción en los dominios de azúcares y una mínima en la de alifáticos debido a que existe una elevada hidrólisis y una notable disminución en los picos del espectro (Tabla 4).

Limón mexicano		
Concentración TFA	Sólido residual (%)	Fracción acuosa TFA (%)
10mM	53	36
1M	56	24
2M	39	38

Tabla 4. Parte insoluble obtenida.

De estos resultados observamos que las cutículas de limón, aún cuando existe pérdida de material con cada una de las concentraciones de TFA utilizadas, los espectros de sólidos obtenidos en cada caso son similares (Fig. 21). Estos resultados nos sugieren que los dominios alifáticos y de polisacáridos pueden estar alternados. Si la hidrólisis se da en la parte de azúcares como se propone, al llevar a cabo la reacción esta implicaría también una hidrólisis en la parte del dominio alifático contiguo, pero la composición de dominios alternados no se vería alterada obteniéndose las mismas características espectrales en cada concentración de TFA.

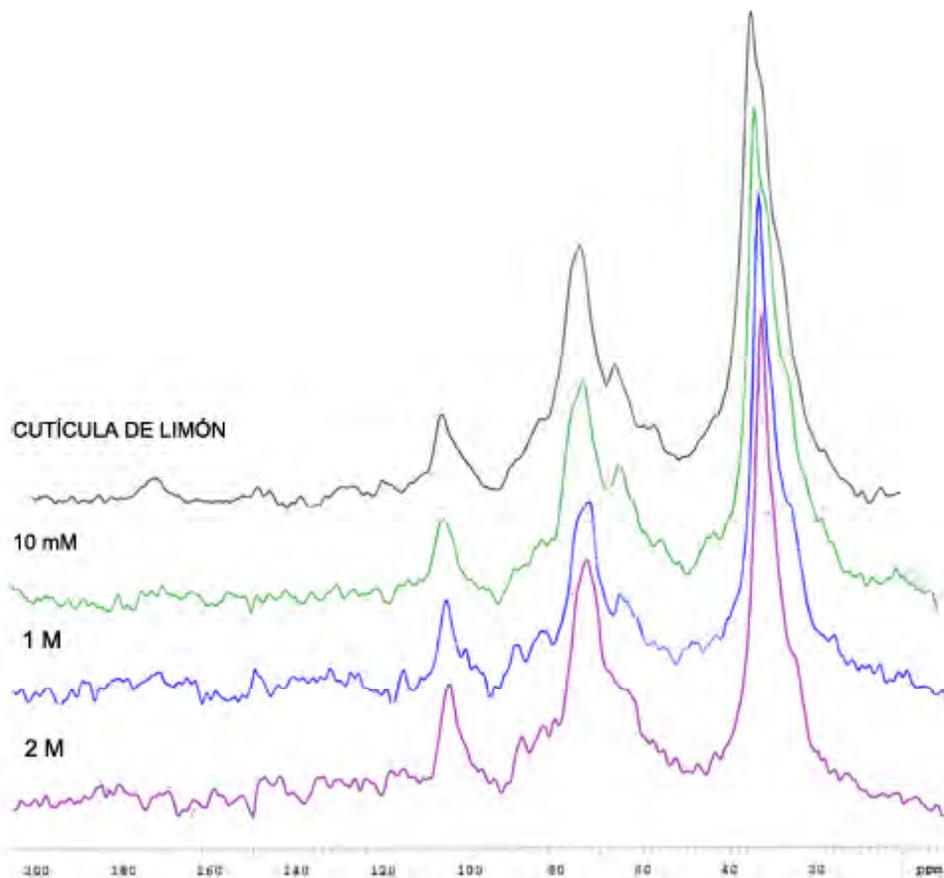


Figura 21. Espectros de ^{13}C CPMAS NMR de las diferentes molaridades de la cutícula depolimerizada con TFA.

En otros trabajos realizados al mismo tiempo con las cutículas de jitomate y toronja, se observó un comportamiento diferente: la hidrólisis o “liberación” de los azúcares presentes en los materiales cuticulares, deja la presencia de un

dominio compacto de compuestos alifáticos (Fig. 22). Gómez-Patiño en el 2010 reporta que en la toronja se pueden observar bloques sin intercalamiento, es decir, se encuentra un núcleo de polisacáridos pertenecientes a la pared celular primaria, después un núcleo de compuestos alifáticos y finalmente otro de polisacáridos, es por eso que cuando el TFA se aplica en mayor concentración, las intensidades de las señales correspondientes a los polisacáridos se ven reducidas, también se empiezan a romper los enlaces que restan, es decir, los azúcar-alifático. Lo anterior se observa en el espectro debido a la desaparición de la zona de azúcares entre 60 y 90 ppm.

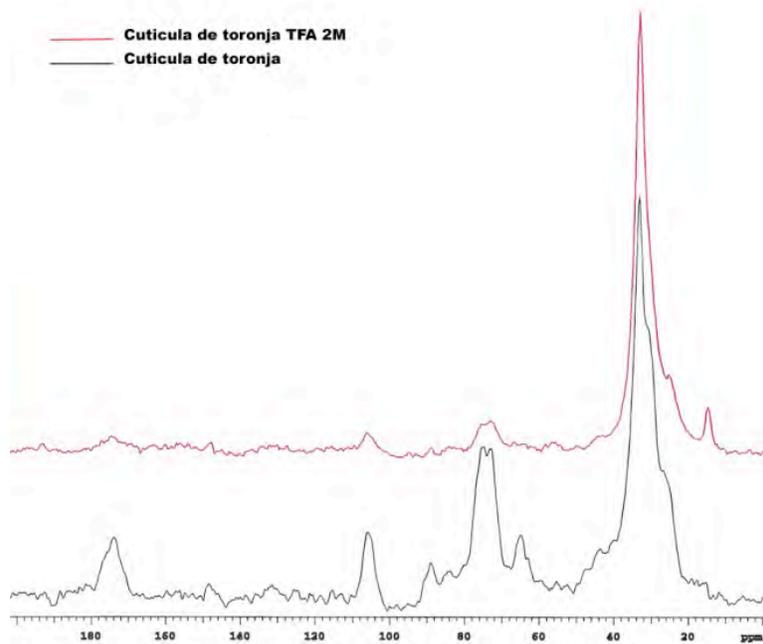


Figura 22. Análisis de los espectros de sólidos del material cuticular de la toronja (Gómez-Patiño 2010).

Los estudios anteriores demuestran que el uso de TFA para el caso de limón afecta al dominio de polisacáridos, como ha sido sugerido por diferentes autores, es decir, éste actúa a bajas concentraciones disolviendo o “liberando” a los azúcares que pudieran quedar atrapados en las redes cuticulares al momento de su obtención. En el caso de concentraciones mayores, éste tiene la capacidad de hidrolizar dichos polisacáridos que tengan la característica de no ser celulósicos. Muy probablemente los azúcares residuales que observamos en los

materiales cuticulares después de las hidrólisis correspondan a este tipo de azúcares.

Con base a lo anterior se ha propuesto un modelo de conformación estructural de la cutícula de *Citrus aurantifolia* y *Citrus latifolia*, la cual estaría compuesta por los bloques de polisacáridos y de alifáticos que se van alternando (Fig. 23).

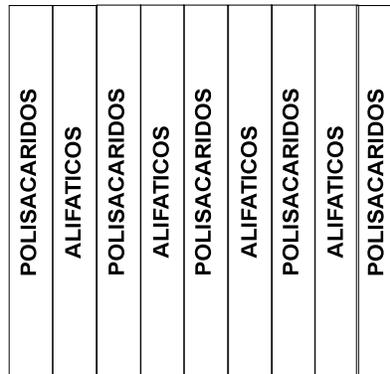


Figura 23. Modelo propuesto de la cutícula del limón.

De la fracción soluble o acuosa se analizaron la parte correspondiente a los azúcares presentes en la cutícula a partir de la hidrólisis con TFA. También se obtuvieron los porcentajes tanto de la fracción acuosa como de la insoluble a partir de 150 mg de cutícula.

Para identificar los carbohidratos se realizó un análisis cualitativo por cromatografía de capa fina de sílica gel aminada y se utilizó como revelador α -naftol, usando como estándares la Fructosa, Galactosa y Glucosa, que son monosacáridos que generalmente se encuentran en las cutículas frutales. En la placa se observaron otras manchas cuyos Rf. son superiores a los estándares (Fig. 24).

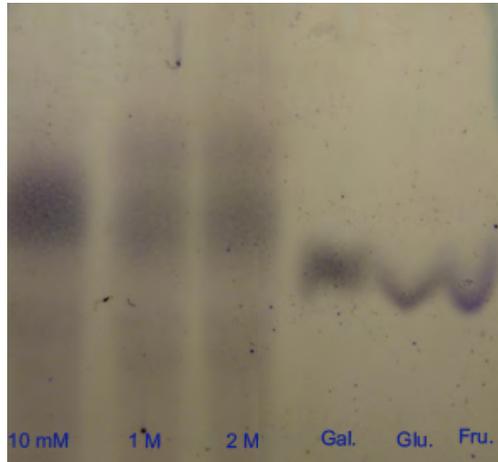
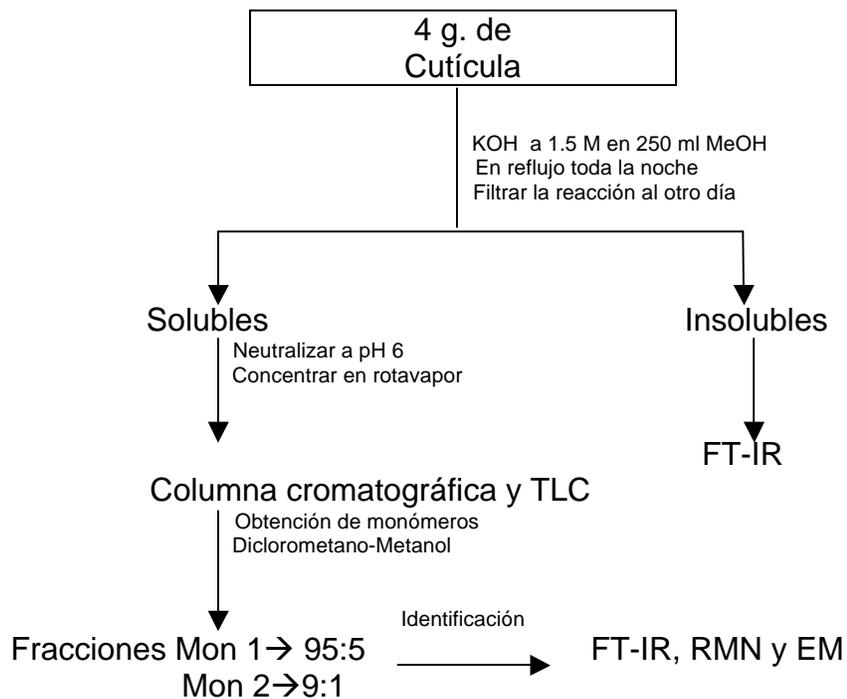


Figura 24. Análisis de azúcares y comparación de la parte acuosa de la cutícula con la Fructosa, Galactosa y Glucosa

8.3.2 Cutícula depolimerizada con Hidróxido de Potasio (KOH)



Con el fin de obtener los componentes alifáticos mayoritarios de la cutícula se llevo a cabo una hidrólisis básica con KOH. Estas condiciones hidrolizan preferentemente ésteres de alcoholes primarios y secundarios, lo cual se

traduce en la remoción de fragmentos de cadenas largas, que finalmente dan como resultado monómeros solubles (Ray *et al.*, 1995).

Para una hidrólisis más efectiva realizamos dos pruebas con las cutículas de limón. La primera consistió en realizar la hidrólisis a temperatura ambiente y la segunda se dejó a reflujo durante 22 a 24 horas aproximadamente, para saber cuál de las dos resultaría mas efectiva para obtener un mayor porcentaje de alifáticos hidrolizados y por lo tanto un mejor análisis de los componentes mayoritarios. Con la reacción a reflujo obtuvimos un mayor porcentaje de compuestos solubles y una mayor cantidad de monómeros.

En condiciones generales, 4 gramos de cutícula de ambas variedades del limón fueron hidrolizados a reflujo en un período de 22 a 24 horas en una solución de KOH a 1.5 M. En comparación al trabajo realizado por Gómez-Patiño (2010) donde después de la hidrólisis con TFA consecutivamente seguía la hidrólisis con KOH, para este experimento con el limón no se hizo de la misma manera, ya que en una prueba realizada en el mismo laboratorio de la hidrólisis con TFA seguida por una hidrólisis con KOH obteníamos la misma cantidad de monómeros que si lo hacíamos sin TFA, por esta razón procedimos hacerla directamente con KOH.

Pasado el tiempo de reflujo, se filtró la fracción insoluble y se dejó secar a temperatura ambiente, esta a su vez fue analizada por medio de ^{13}C RMN CPMAS y FT-IR. El análisis del espectro de FT-IR de la fracción insoluble obtenida de la hidrólisis con KOH muestra la presencia de una gran banda en la región de 3300 cm^{-1} indicativo de una gran presencia de grupos OH (Fig. 25).

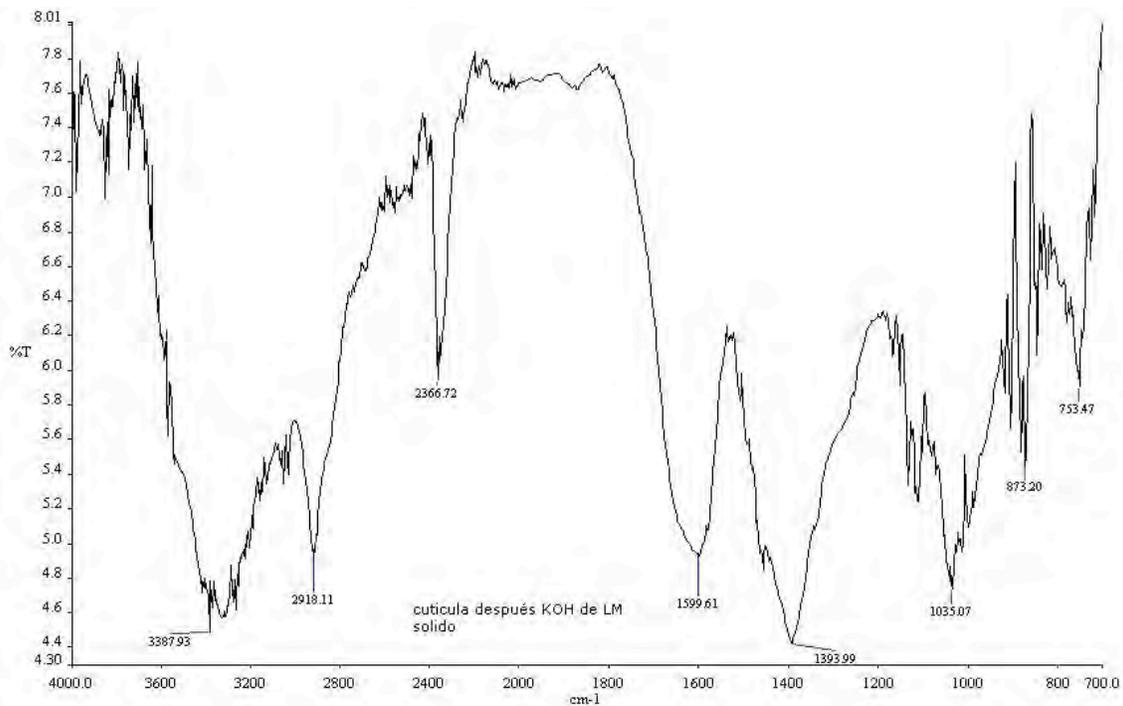


Figura 25. Espectro de FT-IR del material residual de la cuticula de limón mexicano, después de la hidrólisis con KOH.

De la parte sólida restante (insoluble) se pudo observar que al momento de pesarla cuando ya se había secado a medio ambiente, se obtenía un peso mayor al que se había puesto inicialmente en la reacción, por lo que procedimos a llevar este material a la estufa para tratar de eliminar la humedad, sin embargo en el momento que el material era sacado de la estufa para pesarlo, este aumentaba su peso considerablemente con el paso de los minutos, lo anterior nos indica que se trata de material altamente higroscópico y no nos permitió realizar el análisis cuantitativo.

La fracción soluble se concentró a presión reducida en un rotavapor y el concentrado fue objeto de una cromatografía en columna de sílica gel (tamaño de poro de 0.063-0.200mm), se eluyó con los siguientes sistemas: diclorometano-metanol (98:2, 95:5, 9:1, v/v), para obtener el monómero 1 (3.5 %); y el monómero 2 (10.2 %) tomando en cuenta el promedio de las dos variedades del limón (Tabla 3).

Variedades	Fracción soluble KOH (%)	Monómero 1 (%)	Monómero 2 (%)
Limón mexicano	92.48	3.3	6.9
Limón persa	62.5	3.8	13.6

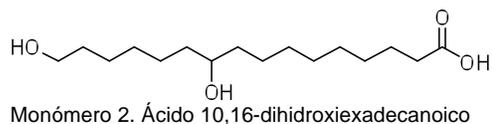
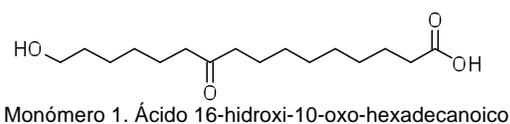
Tabla 3. Cuadro de porcentajes de la fracción soluble de KOH a partir de 4 g., el cual fue el punto de partida para sacar los porcentajes de los monómeros 1 y 2.

La separación fue seguida por cromatografía en capa fina eluída en un sistema de cloroformo-metanol (9:1, v/v), los compuestos obtenidos se analizaron por espectroscopias tales como EM, FT-IR y ^1H RMN (Fig. 26).



Figura 26. Placa de que muestra la separación de los monómeros de la columna cromatográfica. M1: monómero 1; M2: monómero 2; 1,2,3,4,5,6,7-fracciones del sistema 95:5 (Dicloro:Metanol).

Los monómeros obtenidos a partir de la fracción acuosa para fines prácticos en este trabajo han sido catalogados como el monómero **1** y monómero **2** además de haber sido previamente reportados para el género Citrus (Ray *et al.*, 1995).



El monómero **1** fue obtenido en mayor cantidad en la fracción 95:5 y se identificó como el ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico mediante el análisis de masas y RMN.

El espectro de IE de masas del compuesto mayoritario **1** (monómero **1**) no mostró un ion molecular a m/z 286 correspondiente a $C_{16}H_{30}O_4$. Sin embargo la fragmentación observada a m/z 269 $[M - OH]^+$, 251 $[M - 2H_2O]^+$, 185, indican la presencia de un compuesto con esta fórmula condensada (Fig. 27).

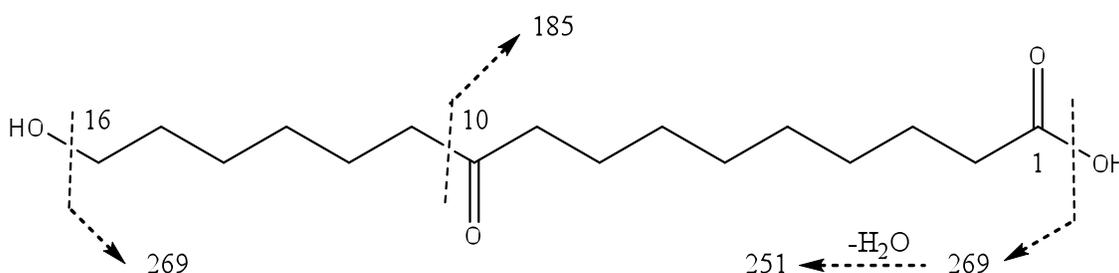
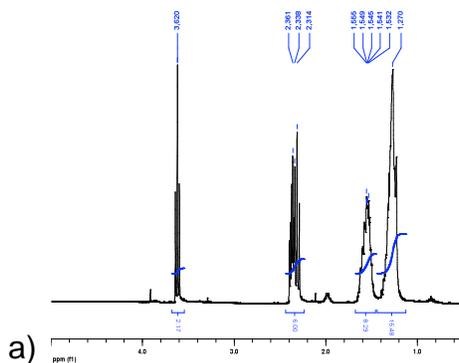


Figura 27. Esquema de fragmentación del monómero **1**.

El espectro de 1H RMN muestra un triplete a δ 3.64 ppm, con una integración para 2 hidrógenos, correspondientes a la posición 16. Un multiplete a 2.37 ppm que integra para 6 hidrógenos, los cuales fueron asignados a las posiciones 2,9 y 11 de acuerdo al análisis del espectro de HMBC donde se observan correlaciones entre estas señales y dos carbonilos diferentes a δ 179.6 y 212.0 ppm correspondientes al ácido carboxílico y a la cetona respectivamente (Fig. 28).



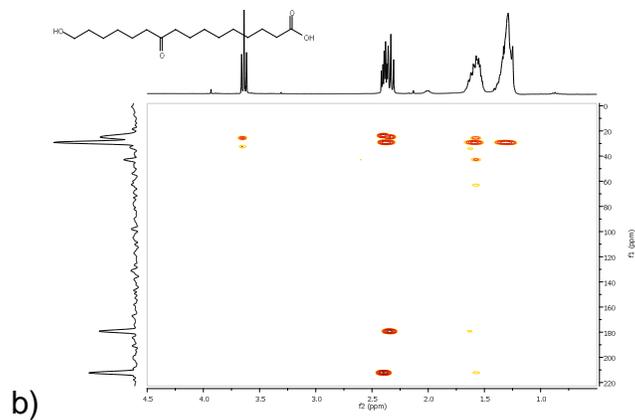


Figura 28. a) ^1H RMN. del Monómero **1**, b) Espectro de HMBC del monómero **1**.

Grupo funcional	δ ^1H
$\begin{array}{c} \text{- C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	11.0
$\text{- CH}_2\text{- OH}$	3.60
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R-CH}_2\text{-C-CH}_2\text{-R} \end{array}$	2.40
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{-CH}_2\text{-C=O} \end{array}$	2.30
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-CH}_2\text{-CH}_2 \end{array}$	1.53
$\text{CH}_2\text{- CH}_2\text{- OH}$	
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{- CH}_2\text{-C=O} \end{array}$	1.52
$\text{CH}_2\text{- CH}_2\text{- CH}_2\text{- OH}$	1.43
$\text{CH}_2\text{- CH}_2\text{- CH}_2\text{- CH}_2$	1.29

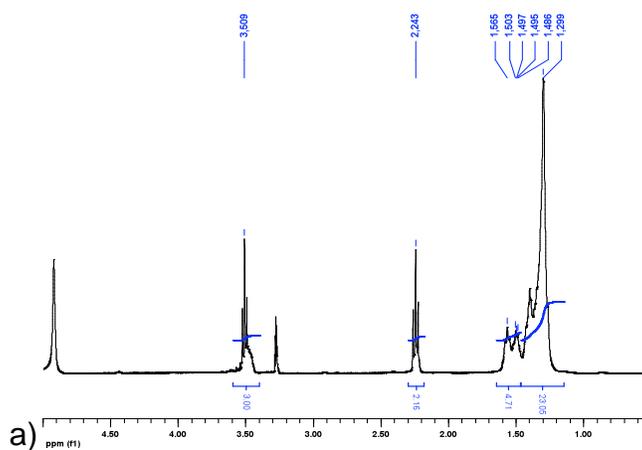
Tabla 4. Desplazamientos aproximados de ^1H -RMN del monómero **1** (Chem Draw V.12).

La posición de la cetona en el monómero **1** fue asignada de acuerdo a la fragmentación observada en el espectro de masas de impacto electrónico a m/z 185 entre el C-10 y el C-11, y confirmando la presencia del ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico (monómero **1**).

El monómero **2** se obtuvo en mayor cantidad en la fracción 9:1. Este monómero tiene un color amarillo más intenso y fue identificado como ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico.

Los espectros de masas de IE y de FAB muestran un ion molecular a m/z 289 correspondientes a la fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_4$.

El espectro de 1H RMN muestra un triplete y un multiplete a δ 3.53 ppm, con una integración para 3 hidrógenos, correspondientes a la posición 10 y 16. Un triplete a 2.28 ppm que integra para 2 hidrógenos, asignado a la posición 2 de acuerdo al análisis del espectro de HMBC donde se observan correlaciones entre esta señal y el grupo carbonilo a δ 176.5 ppm correspondientes al ácido carboxílico (Fig. 29).



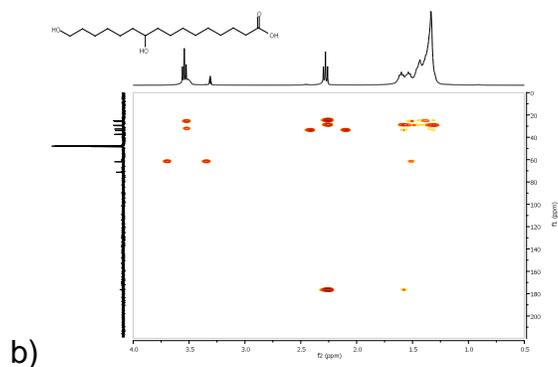


Figura 29. a) ^1H RMN del monómero 2, b) Espectro de HMBC del monómero 2.

Grupo funcional	δ ^1H
$\begin{array}{c} - \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	11.0
$- \text{CH}_2 - \text{OH}$	3.65
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	3.58
$- \text{CH}_2 - \text{OH}$	3.50
$\begin{array}{c} - \text{CH}- \\ \\ \text{OH} \end{array}$	3.21
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ - \text{CH}_2 - \text{C}=\text{O} \end{array}$	2.30
$\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$	1.53
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}=\text{O} \end{array}$	1.52
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1.44
$\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$	1.43
$\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$	1.29
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1.25

Tabla 5. Desplazamientos aproximados de ^1H -RMN del monómero 2 (Chem Draw V.12).

El análisis de la fragmentación en el espectro de masas de IE nos indica la presencia del OH intermedio en la posición 10 (m/z 169, 131) y nos corrobora la presencia del ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico (monómero **2**) (Fig. 30).

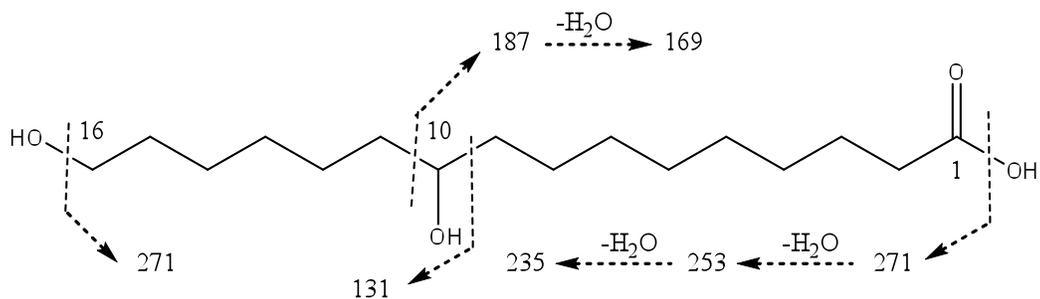


Figura 30. Esquema de fragmentación del monómero **2**.

La cutícula de la toronja, al igual que la cutícula del limón, está compuesta principalmente por los dos monómeros anteriormente descritos, pero sus proporciones son inversas, en la toronja el monómero 1 es el más abundante, a diferencia del limón, donde el monómero 2 es el componente mayoritario (Tabla 6) (Ray *et al.*, 1995).

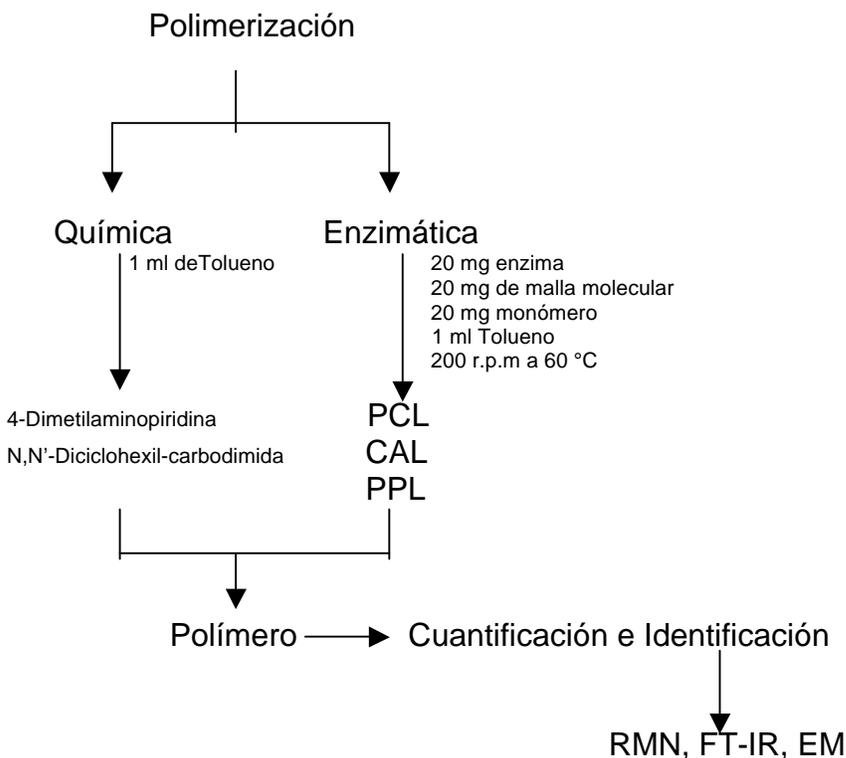
Fruto	Monómero 1 (%)	Monómero (%)
Toronja	21.7	14.7
Limón	3.5	10.2

Tabla 6 . Composición monomérica de la cutícula del limón y la toronja (Gómez-Patiño, 2010).

A pesar de obtener esta cantidad de monómeros, realizamos separaciones sucesivas para la mezcla de monómero 1 y 2 que se obtenían en la cromatografía en columna del sistema 95:5 de las fracciones 3 a 7 que era la transición en la que el monómero 1 ya aparecía en menor cantidad y empezaba a visualizarse el monómero 2. Por esta razón se tuvo que llevar a cabo una separación a partir de una cromatografía flash con diclorometano:metanol (98:2, 95:5, 9:1, 85:15, 8:1, v/v) con lo que se logro purificar en su mayoría los monómeros, aún así se obtuvieron pequeñas cantidades de mezclas y esto lo

comprobamos a partir de cromatografía en capa fina (diclorometano:metanol, 9:1, v/v).

8.4. POLIMERIZACIÓN.



8.4.1 Polimerización enzimática.

A partir de los monómeros obtenidos de la hidrólisis con KOH se realizaron polimerizaciones enzimáticas a través de lipasas con el monómero 2, compuesto que se obtuvo en mayor cantidad de la cutícula del limón, y con una mezcla del monómero 1 y 2.

Las lipasas son enzimas estables en disolventes orgánicos y que se utilizan en reacciones de esterificación y transesterificación. Estas mismas aceptan una amplia gama de sustratos, así que dependiendo del disolvente pueden ser aplicadas para reacciones de hidrólisis o síntesis (Varma *et al.*, 2005). En estas

reacciones utilizamos las lipasas que anteriormente han sido reportadas para síntesis de poliésteres, como el caso de *Candida antarctica* (CAL) proveniente de hongos, *Pseudomonas cepacia* (PCL) que se obtiene de bacterias y Lipasa pancreática porcina (PPL) de mamíferos.

La polimerización enzimática del monómero 2 se llevo a cabo en diferentes tiempos en reacciones separadas, las cuales fueron seguidas por cromatografía en capa fina (cloroformo: metanol, 95:5 v/v). Las reacciones se monitorearon a cada hora, sin embargo se observo que a las 4 horas CAL consumió la mayor parte del monómero, a partir de esto lo monitoreamos a las 8, 24, 48 y 72 horas para ver la evolución de las otras enzimas (Fig. 31).

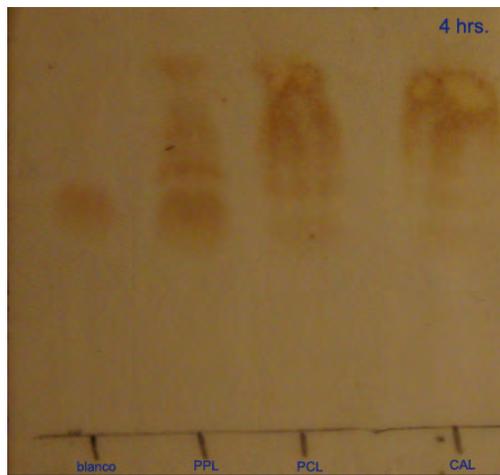


Figura 31. Placa del monitoreo a las 4 en que se llevo a cabo el consumo del monómero 2 por las enzimas ,PPL, PCL y CAL.

La enzima que polimerizó en un menor tiempo fue CAL, al observarse que a las 4 horas había consumido la mayor parte del monómero y en el que aparentemente ya no se observan residuos de este último. La segunda enzima más eficiente fue PCL en un tiempo aproximado de 48 horas, y la última fue PPL hasta las 96 horas. En la toronja se observo que CAL y PCL son igualmente los mas eficientes para la polimerización del monómero 1, pero en un menor tiempo, es decir, aproximadamente en 1 hora se llevo a cabo dicha reacción (Gómez-

Patiño, 2010). Aún así para esta polimerización las 3 lipasas utilizadas para este trabajo resultaron igual de eficientes, aún con la diferencia de tiempos que les llevo consumir al monómero, el rendimiento coloca a PPL con mayor porcentaje del polímero (Tabla 7).

Lipasa	Polímero (%)
CAL	41
PCL	40
PPL	59

Tabla 7. Porcentajes de rendimiento en la obtención de polímero, a partir de 20 mg de monómero para cada enzima.

Los productos de las polimerización enzimática del monómero 2 o 10,16-dihidroxihexadecanoico fueron aislados y analizados por medio de resonancia magnética nuclear.

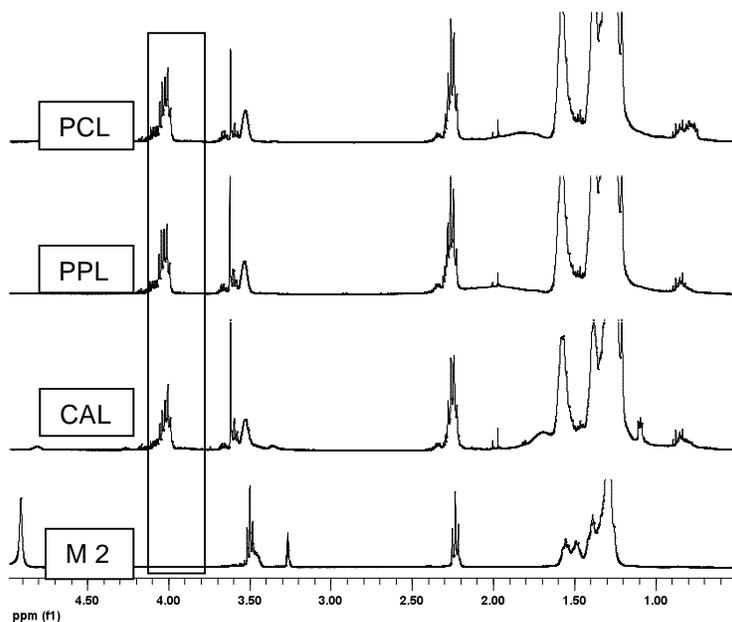


Figura 32. ¹H RMN de los polímeros formados con el monómero 2 y las enzimas, PCL, PPL y CAL.

En las resonancias al comparar el espectro del monómero 2 con la de los polímeros resultado de la polimerización enzimática, tanto con PCL, PPL y CAL, se observa una señal en a δ 4.05 ppm indicativo de la formación de enlaces

éster, el cual fue confirmado por medio de la correlación de este protón con el grupo de carbonilo en experimentos de HMBC (Fig. 32).

Para el caso de la polimerización de la mezcla del monómero 1 y 2, en la misma cantidad para la reacción con las enzimas CAL y PPL, se observó que al igual que sucede con el monómero 2, CAL reacciona en un menor tiempo aproximadamente de 4 horas, que PPL, el cuál consumió en su mayor parte al monómero a las 96 horas (Fig. 33). En este caso con CAL se observa un mayor porcentaje de producción del polímero que para PPL, y sin embargo la diferencia es mínima entre las dos lipasas, pero el tiempo para la polimerización es mayor en PPL (Tabla 8).

Lipasa	Polímero (%)
CAL	66.6
PPL	64

Tabla 8. Porcentajes de rendimiento en la obtención de polímero, a partir de 20 mg de monómero para cada enzima.



Figura 33. Placa del monitoreo a las 4 horas en que se llevo a cabo el consumo de la mezcla del monómero 1 y 2 por las enzimas ,PPL y CAL.

Los productos de las polimerizaciones enzimáticas con la mezcla de los monómeros 1 y 2 fueron aislados y analizados por medio de resonancia magnética nuclear.

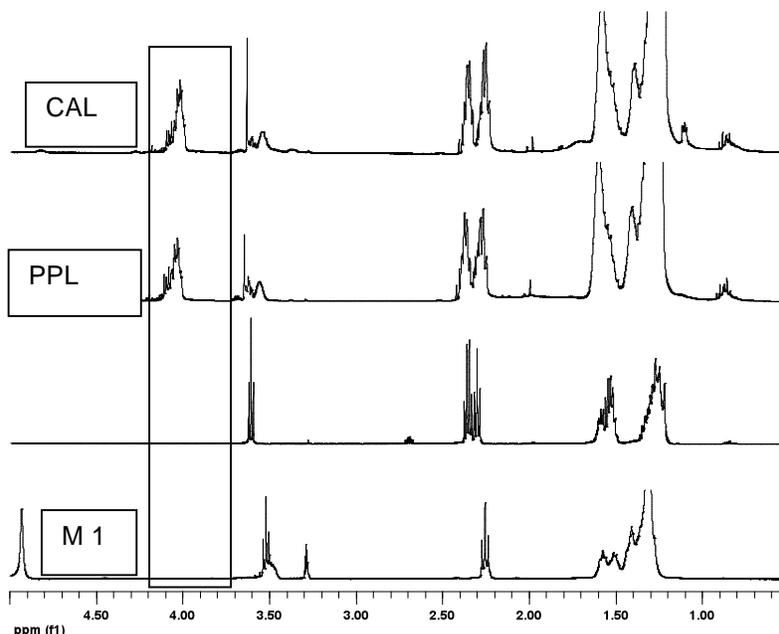


Figura 34 . ^1H RMN de los polímeros formados con la mezcla de los monómeros 1 y 2 con las enzimas, PPL y CAL.

Para los polímeros formados con la mezcla de los monómeros 1 y 2 a partir de las enzimas PPL y CAL muestran en las resonancias de ^1H en la señal de 4.05 la formación de enlaces éster, que a su vez también fue confirmado por medio de la correlación de este con el grupo de carbonilo en experimentos de HMBC, donde como se describió anteriormente, la señal de 220 ppm nos muestra que hay una cetona intermediaria lo que nos lleva a deducir que en su mayor parte se une el monómero 1 al formar el polímero (Fig. 34).

Las enzimas se escogieron a partir de trabajos ya realizados sobre el jitomate donde se observó que estas tuvieron un buen funcionamiento para la obtención de polímeros.

8.4.2 Polimerización química

En la polimerización química, la cual se llevó a cabo con el monómero 2, que resulta ser el mismo encontrado en mayor proporción en la cutícula del jitomate, se probaron dos disolventes para llevar a cabo las reacciones, la dimetilformamida y el tolueno, de los cuales este último resultó ser el mejor

disolvente para la reacción, mientras que en la dimetilformamida no resulto ser conveniente ya que no se obtuvieron productos de reacción. Olsson y col. (2007) reportaron la síntesis de poliésteres de la suberina con varios disolventes, entre ellos el tolueno con el que se observó de mejor comportamiento pues en presencia de este se obtuvieron productos con mayor peso molecular. Por lo tanto el tolueno fue el disolvente de elección para llevar a cabo las reacciones químicas y enzimáticas, por su comportamiento para llevar a cabo reacciones de polimerización con los monómeros de la cutina y suberina.

En la reacción química se observó una producción de polímero más evidente, el cual resulto ser un 65.83 % del producto que se obtuvo con el total del monómero y la cantidad que se polimerizó, es decir, aproximadamente un 10 % mas del que se obtiene en la polimerización enzimática. En forma general la polimerización química es mas efectiva que la polimerización enzimática.

La principal diferencia entre ambos tipos de polimerizaciones (química y enzimática), es que en la primera se obtiene un polímero insoluble en diferentes disolventes y los productos de la enzimática son solubles en cloroformo (Fig. 35). Lo anterior indica la formación de polímeros diferentes.



Figura. 35. Polímero insoluble producto de la reacción química.

También debe hacerse notar que en el caso de la polimerización enzimática del monómero 2, en base a los resultados del espectro de la resonancia se llegó a la conclusión que el polímero formado es lineal y en los resultados de la polimerización química las cadenas aparentemente son de mayor peso molecular, lo cual será confirmado posteriormente por medio de espectrometría de masas.

Estos resultados son de gran valor ya que nos permiten ver qué métodos son los más eficaces para la producción de polímeros biodegradables o para mejorar las técnicas de obtención. Existen trabajos de polímeros o poliésteres provenientes de microorganismos que son derivados de fuentes biorgánicas como son las grasas y los almidones los cuales son completamente biodegradables en suelo, ríos y mares.

Otros polímeros biodegradables basados en los polisacáridos, sobretudo en almidones pueden ser producidos a bajo costo y a gran escala, sin embargo los polisacáridos no tienen plasticidad y generalmente se les adiciona un polímero sintético para su mejor funcionamiento

En años recientes se ha estudiado la manera de obtener polímeros biodegradables sintéticos a partir de poliésteres alifáticos, de los cuales se han desarrollado o producido comercialmente algunos y diseñado para aplicaciones prácticas pero aún en condiciones prematuras. Lo que se busca es obtener polímeros resistentes a la biodegradación y con un alto peso molecular. Recientemente el uso de la catálisis enzimática en la síntesis orgánica, ha sido estudiada para realizar mas reacciones que sean específicas para la polimerización *in vitro* como método efectivo para la síntesis de polímeros benignos al medio ambiente (Okada, M., 2002).

La utilización de precursores provenientes de fuentes naturales en la producción de polímeros, químicos orgánicos y combustibles se ha incrementado

recientemente, ya que recursos como lo es el petróleo cada vez son más escasos. Por lo tanto el presente estudio pretende hacer una aportación al conocimiento de fuentes alternas en la generación de poliésteres de alifáticos obtenidos a partir de fuentes naturales los cuales pudiesen tener importantes aplicaciones como biomateriales con uso industrial y comercial.

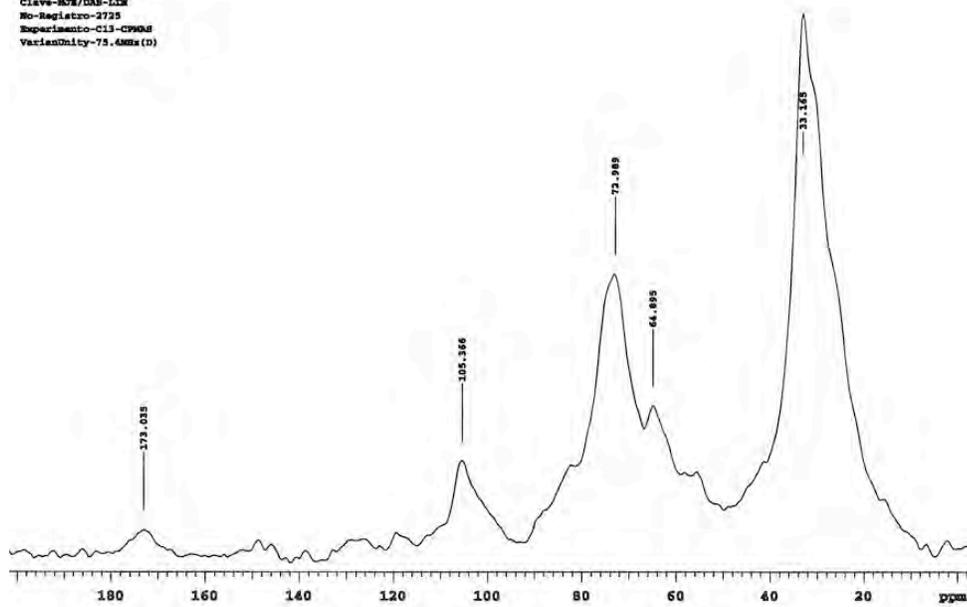
9. CONCLUSIONES:

- De la extracción de la cutícula se obtuvo un compuesto mayoritario con actividad antioxidante, identificado como limoneno, el cual tiene la función de proteger al fruto contra los rayos ultravioleta.
- Se observó un mayor porcentaje en la obtención de cutícula de la variedad de limón persa respecto al limón mexicano.
- Los espectros de resonancia magnética de sólidos de las cutículas de ambas variedades muestra una gran semejanza entre ellas.
- La hidrólisis con TFA en el caso del limón no demostró efecto significativo en la hidrólisis del dominio de los polisacáridos no celulósicos.
- Se propone un modelo de la composición de la cutícula del limón con base a los espectros de resonancia obtenidos de la hidrólisis de TFA, donde se observan bloques de dominios de polisacáridos y alifáticos alternados.
- En la reacción de hidrólisis con KOH a reflujo se obtuvo una mejor eficiencia que la que se llevó a cabo a temperatura ambiente, lo que llevó a un mayor porcentaje de producto de la fracción soluble y de este una mayor cantidad de monómero.
- De la hidrólisis con KOH se obtuvieron dos monómeros principales: el monómero 1 en un 3.5 % y el monómero 2 en un 10.2 % de la cutícula del limón. Estos monómeros se encuentran presentes en el género *Citrus* y en la toronja están presentes los mismos pero en forma invertida es decir el monómero 1 se presenta en mayor porcentaje que el 2.

- El monómero 1 resultó ser el ácido 16-hidroxi-10-oxo-hexadecanoico y el monómero 2 el ácido 16,10-dihidroxihexadecanoico en relación a los datos espectroscópicos obtenidos y comparados con los reportados en trabajos anteriores.
- Se obtuvo de manera eficiente el polímero a partir del monómero 2 mediante polimerización enzimática con tres lipasas, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* y lipasa pancreática porcina. Tomando en cuenta el tiempo en que se consumió el monómero en su totalidad, la más eficiente resultó ser *Candida antarctica*, siguiéndole *Pseudomonas cepacia* y por último la lipasa pancreática porcina. Para la mezcla del monómero 1 y 2, *Candida antarctica* fue más eficiente en cuanto a la cantidad de polímero y el tiempo en que se generaron los polímeros.
- El polímero obtenido químicamente presenta ramificaciones esterificadas en el carbono secundario a diferencia del polímero obtenido enzimáticamente que es mayoritariamente lineal. El primer polímero resultó insoluble en la mayoría de disolventes (agua, DMSO, metanol, cloroformo).
- Este estudio aporta conocimientos a la producción de biopolímeros a partir de lo que se consideraría el desperdicio de la fruta, es decir, la cáscara lo cual podría ser de importancia en el uso de nuevos biomateriales para diferentes industrias incluyendo la sustitución gradual de productos derivados del petróleo los que serían más amigables con el medioambiente. Es más eficiente por la mayor cantidad de producto.

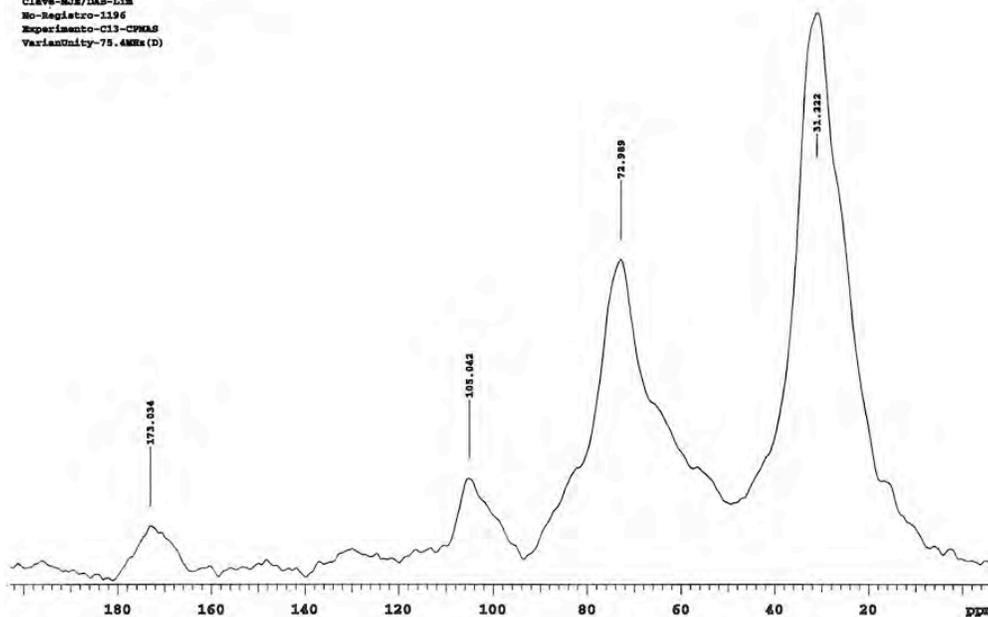
10. ANEXO:

Instituto de Química, UNAM (N. Rico)
Dr.-M-Jimenes/Daniel
Clave-MQI/DAS-LIM
No-Registro-2735
Experimento-C13-CPMAS
VarianteDity-75.4MHz(D)

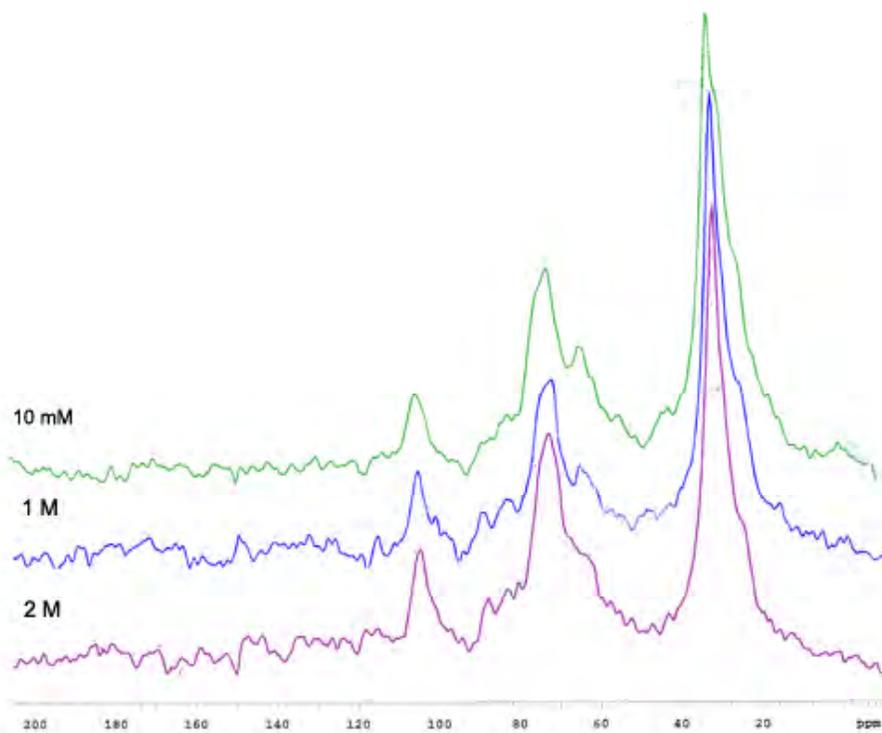


Espectro 1. ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula del limón mexicano.

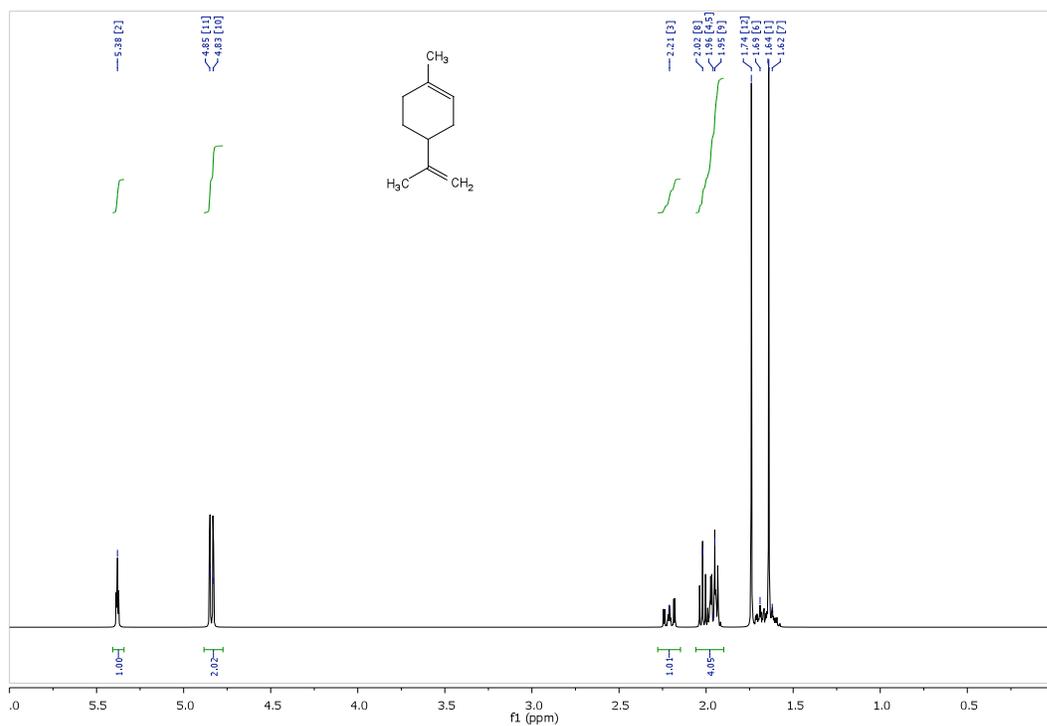
Instituto de Química, UNAM (N. Rico)
Dr.-M-Jimenes/Daniel
Clave-MQI/DAS-Lim
No-Registro-1196
Experimento-C13-CPMAS
VarianteDity-75.4MHz(D)



Espectro 2. ^{13}C NMR-CPMAS de la cutícula del limón persa.



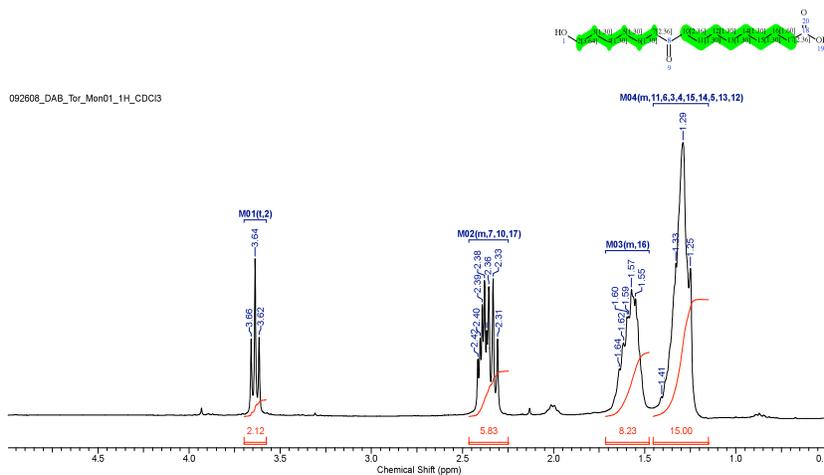
Espectro 3. ^{13}C NMR-CPMAS de masas de las diferentes molaridades de TFA de la cutícula del limón.



Espectro 4. ^1H NMR del monómero del Limoneno.

1D HNMR Verification Status Automatic		1D HNMR Verification Result Consistent	
Formula	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	FW	286.4070
Acquisition Time (sec)	1.9980	Comment	Std Proton parameters
Date Stamp	Sep 26 2008	File Name	C:\Documents and Settings\ARRCANO\My Documents\RMN\2008\RMN\Lin\Tor092608_DAB_Tor_Mon01_1H_CDCl3.ftd
Frequency (MHz)	300.10	Nucleus	1H
Points Count	16384	Number of Transients	64
Spectrum Offset (Hz)	1800.6250	Original Points Count	8592
		Pulse Sequence	s2pul
		Receiver Gain	30.00
		Solvent	CHLOROFORM-d
		Spectrum Type	STANDARD
		Sweep Width (Hz)	4800.77
		Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

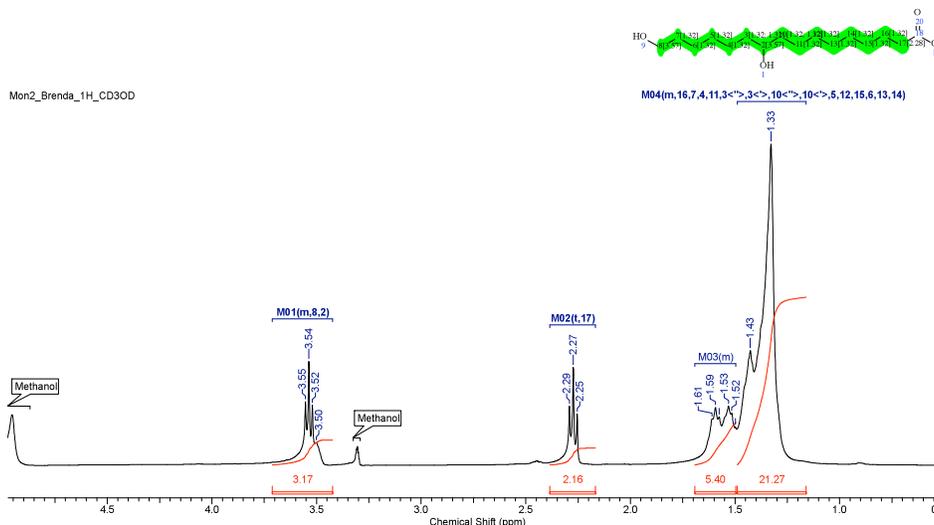
¹H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-d) [ppm 1.15 - 1.45 (m, 15 H) 1.48 - 1.71 (m, 8 H) 2.25 - 2.46 (m, 6 H) 3.64 (t, J=6.45 Hz, 2 H)



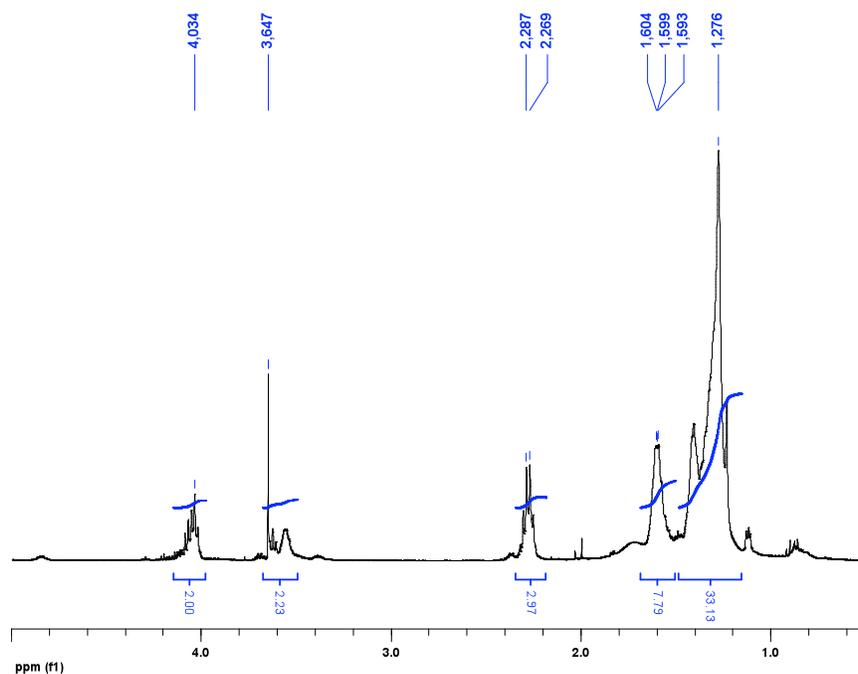
Espectro 5. ¹H NMR del monómero 1. Análisis FID con el programa ACD- Prediictor para confirmar la estructura.

1D HNMR Verification Status Automatic		1D HNMR Verification Result Consistent	
Formula	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	FW	286.4229
Acquisition Time (sec)	1.9950	Comment	UAM-X
Date Stamp	Mar 27 2009	Date	Mar 27 2009
File Name	C:\Documents and Settings\ARRCANO\My Documents\RMN\2009\Tor\Lin NMR\Mon2_Brenda_1H_CD3OD.ftd	File Name	Settings\ARRCANO\My Documents\RMN\2009\Tor\Lin NMR\Mon2_Brenda_1H_CD3OD.ftd
Frequency (MHz)	400.10	Frequency (MHz)	400.10
Points Count	16384	Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	16.00
Spectrum Offset (Hz)	2001.0193	Solvent	METHANOL-d4
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	6006.01
		Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

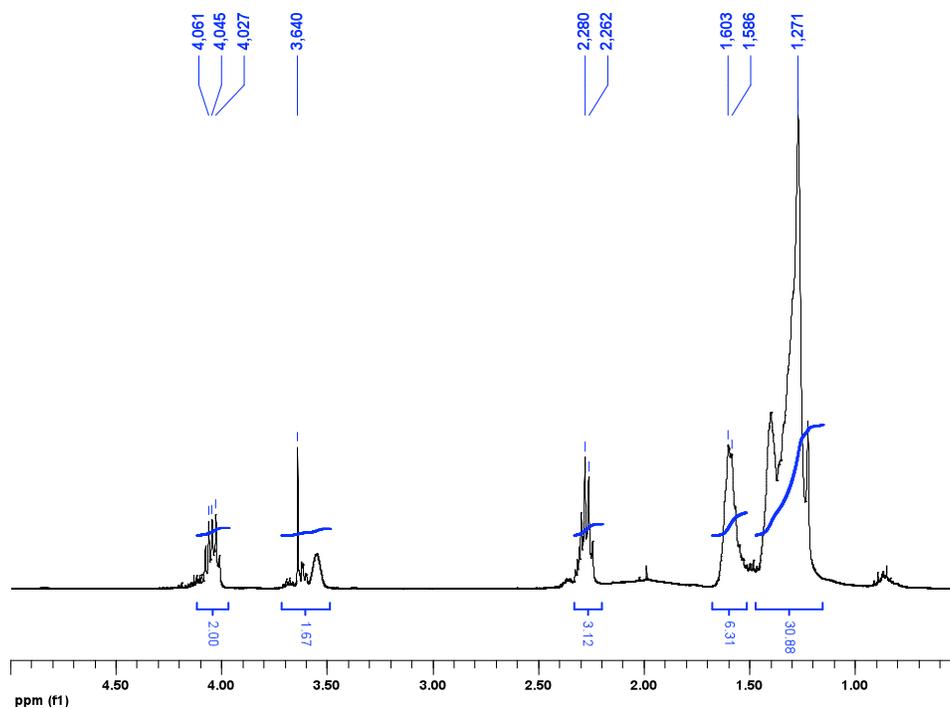
¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) [ppm 1.16 - 1.49 (m, 21 H) 1.50 - 1.69 (m, 6 H) 2.27 (t, J=7.52 Hz, 2 H) 3.42 - 3.71 (m, 3 H)



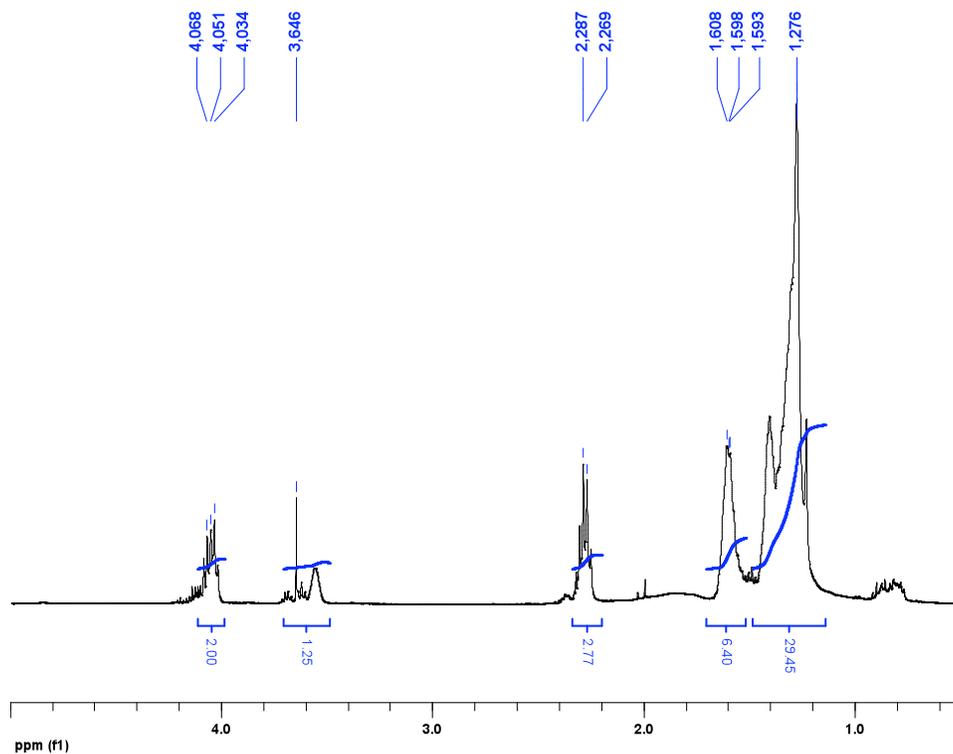
Espectro 6. ¹H NMR del monómero 2. Análisis FID con el programa ACD- Prediictor para confirmar la estructura.



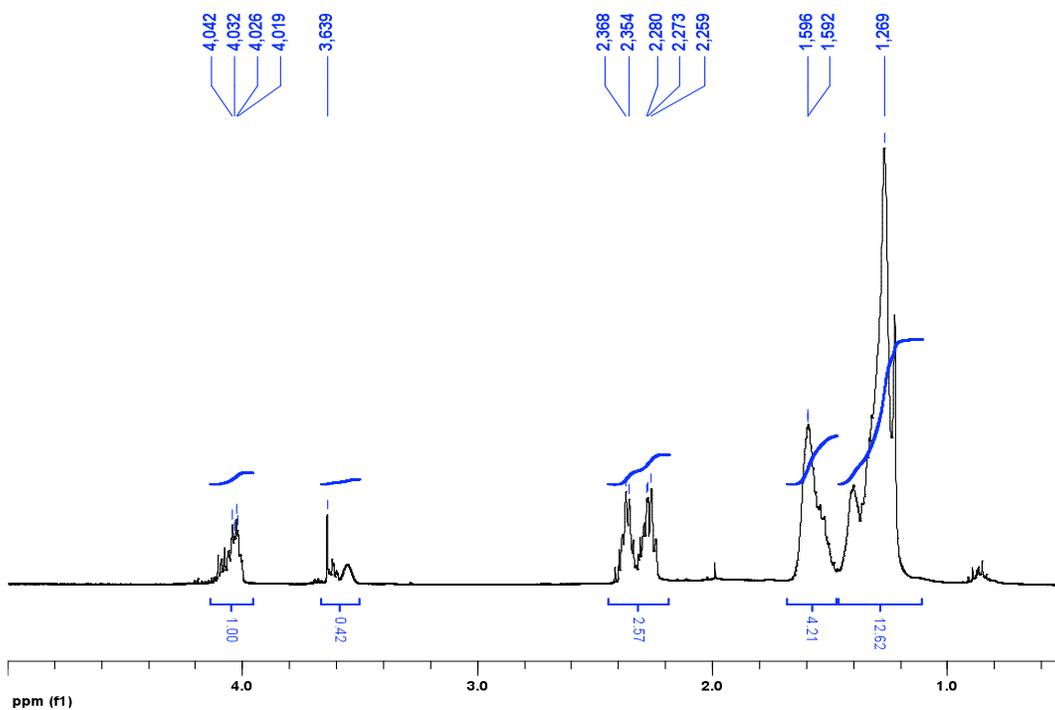
Espectro 7. ^1H NMR del polímero formado con CAL a partir del monómero 2.



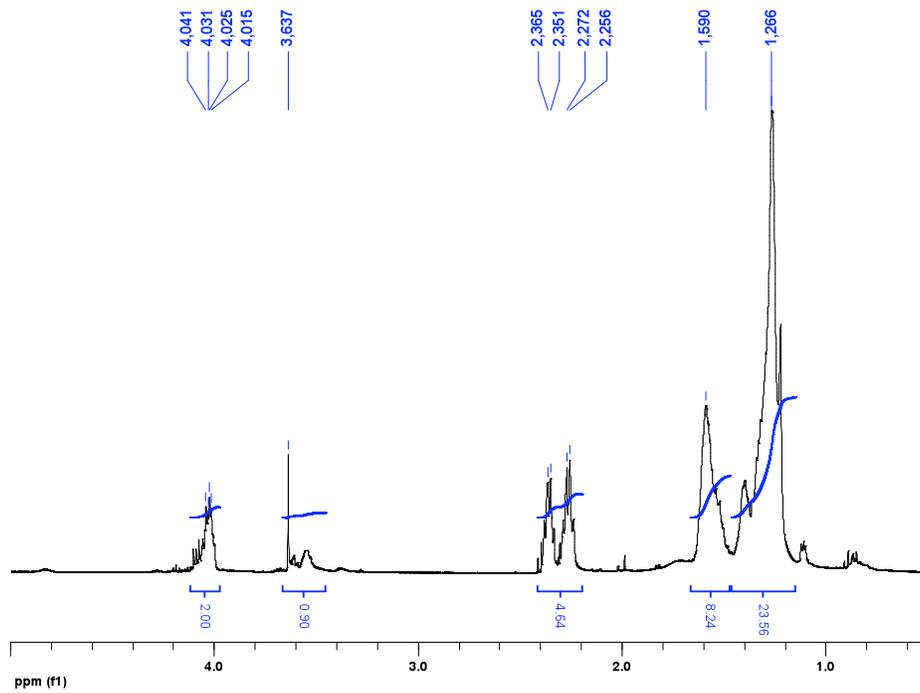
Espectro 8. ^1H NMR del polímero formado con PCL a partir del monómero 2.



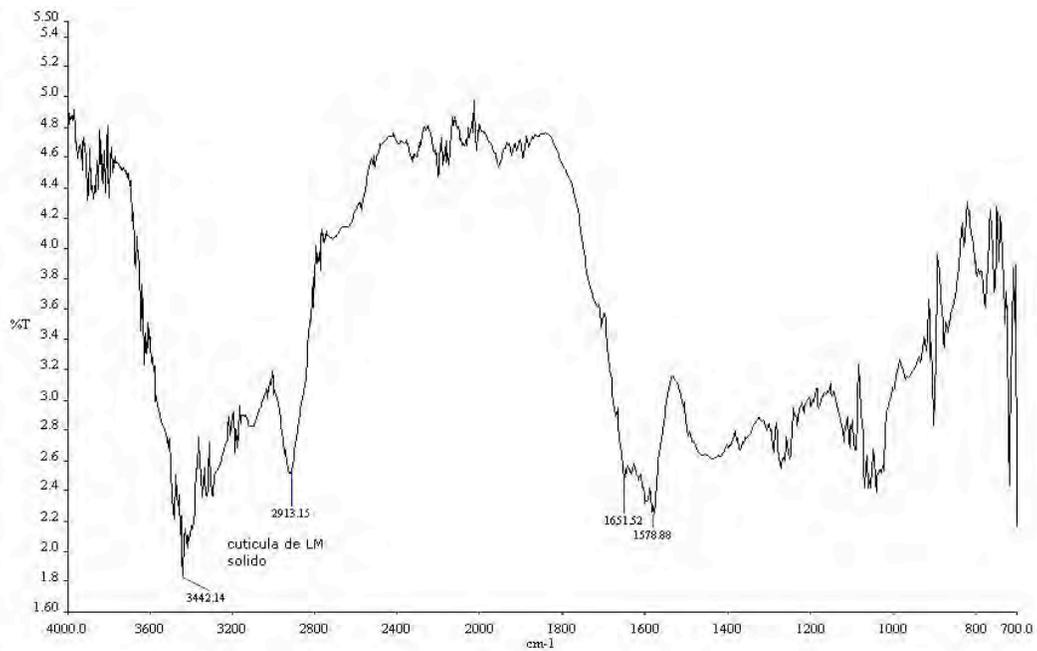
Espectro 9. ^1H NMR del polímero formado con PPL a partir del monómero 2.



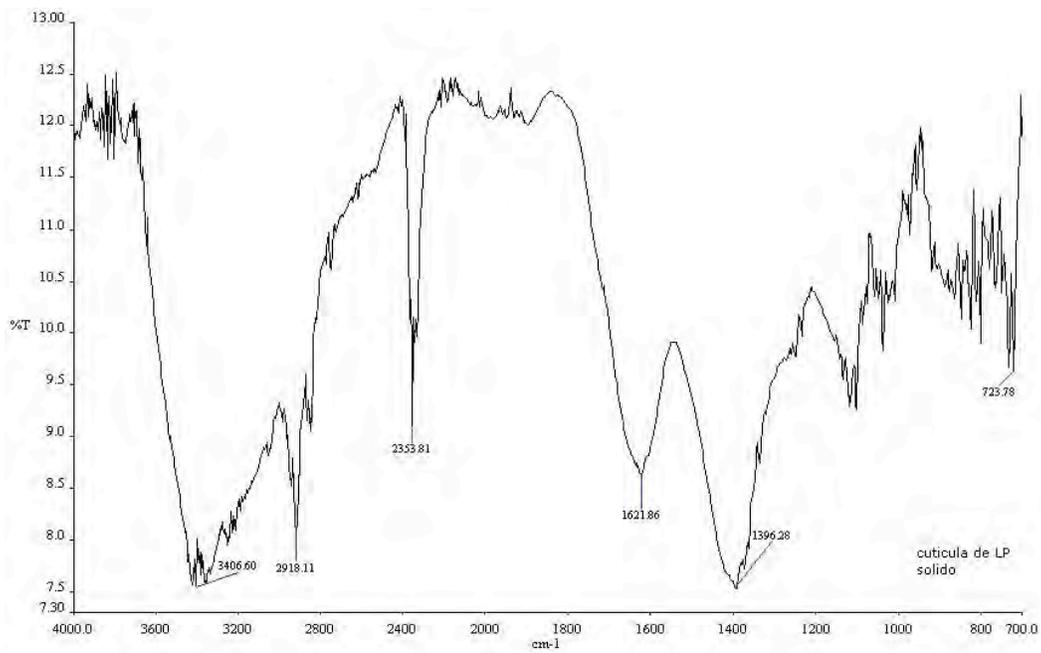
Espectro 10. ^1H NMR del polímero formado con PPL a partir de la mezcla del monómero 1 y 2.



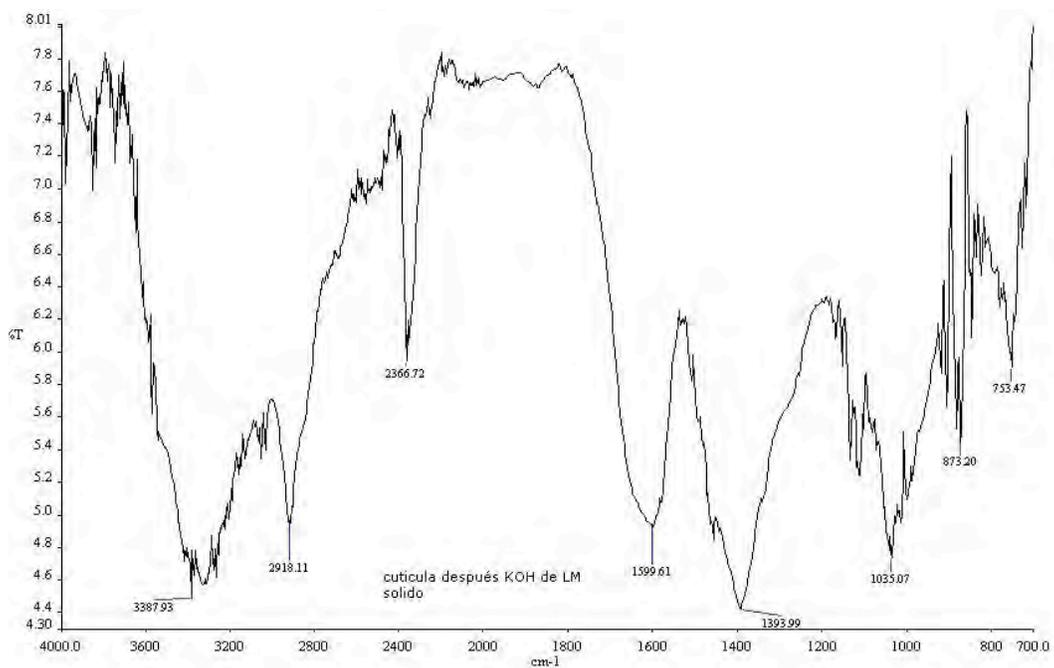
Espectro 11. ^1H NMR del polímero formado con CAL a partir de la mezcla del monómero 1 y 2.



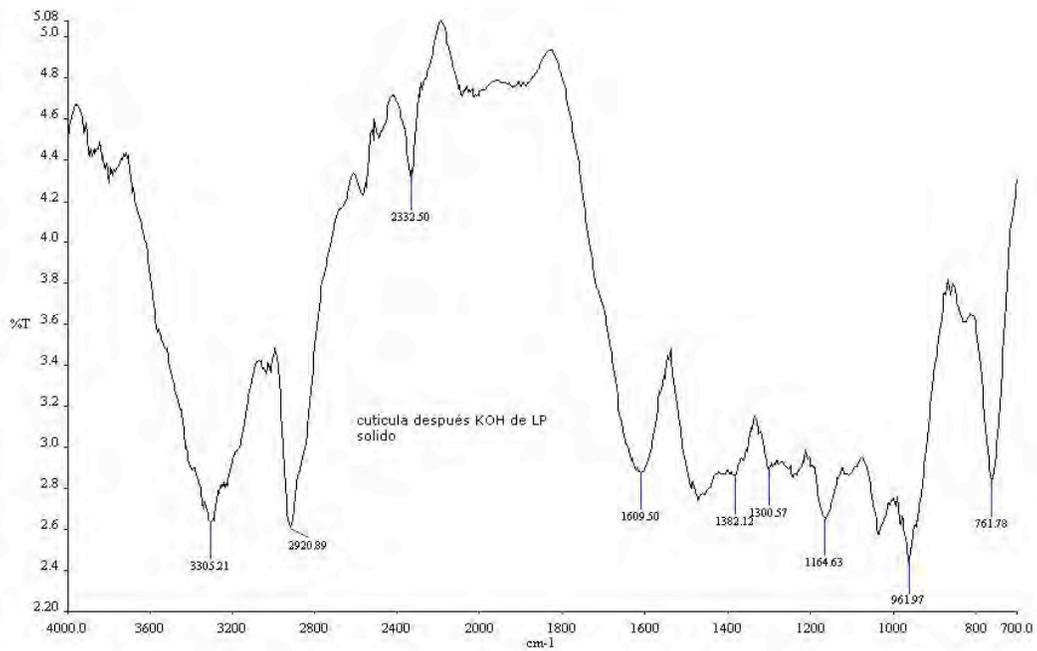
Espectro 12. FT-IR de la cutícula de limón mexicano .



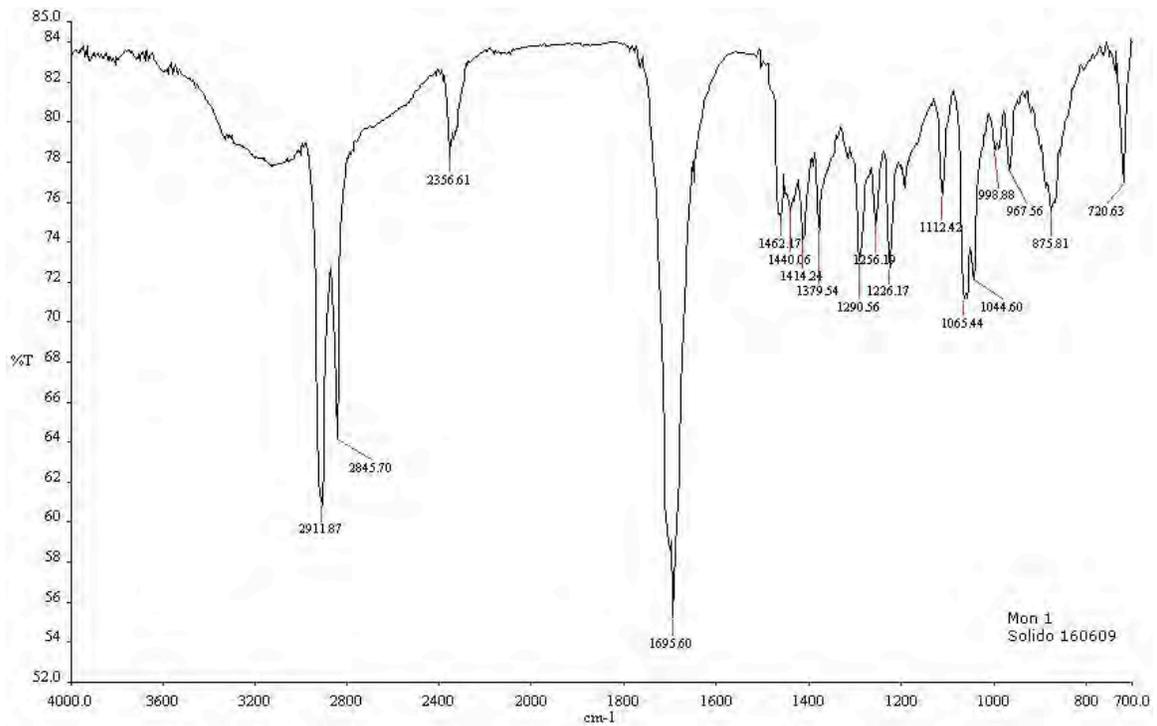
Espectro 13. FT-IR de la cutícula de limón persa.



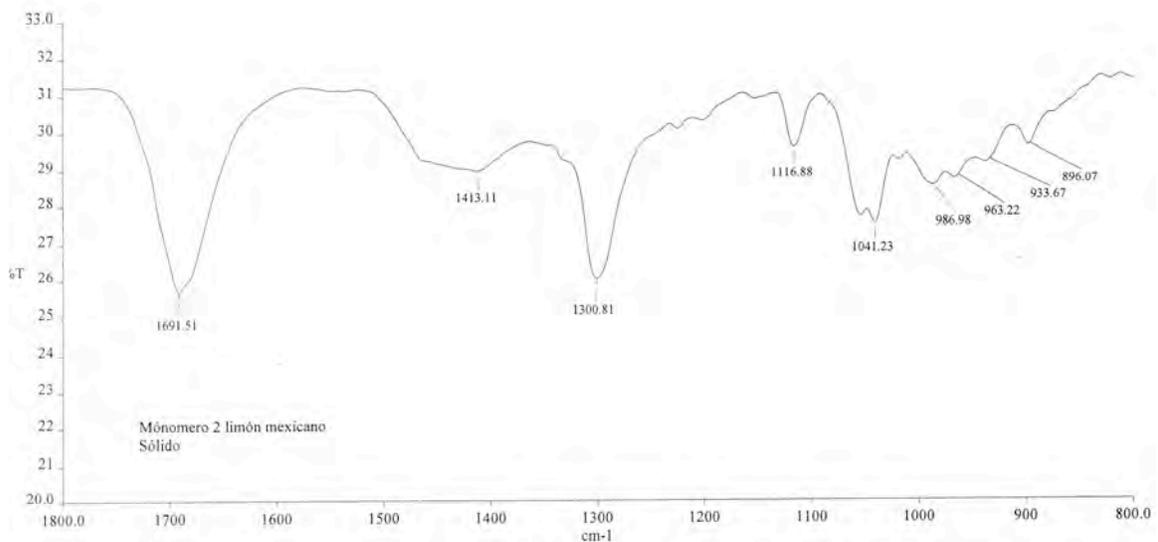
Espectro 14. FT-IR de la cutícula de limón mexicano después de KOH.



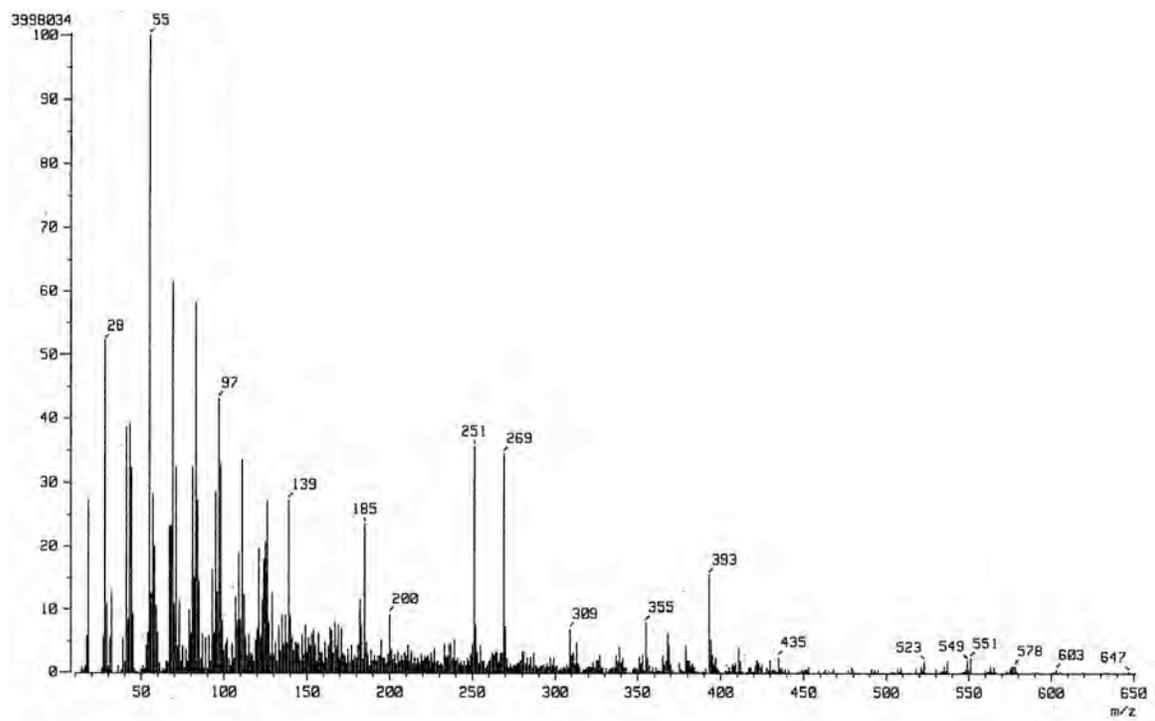
Espectro 15. FT-IR de la cutícula de limón persa después de KOH.



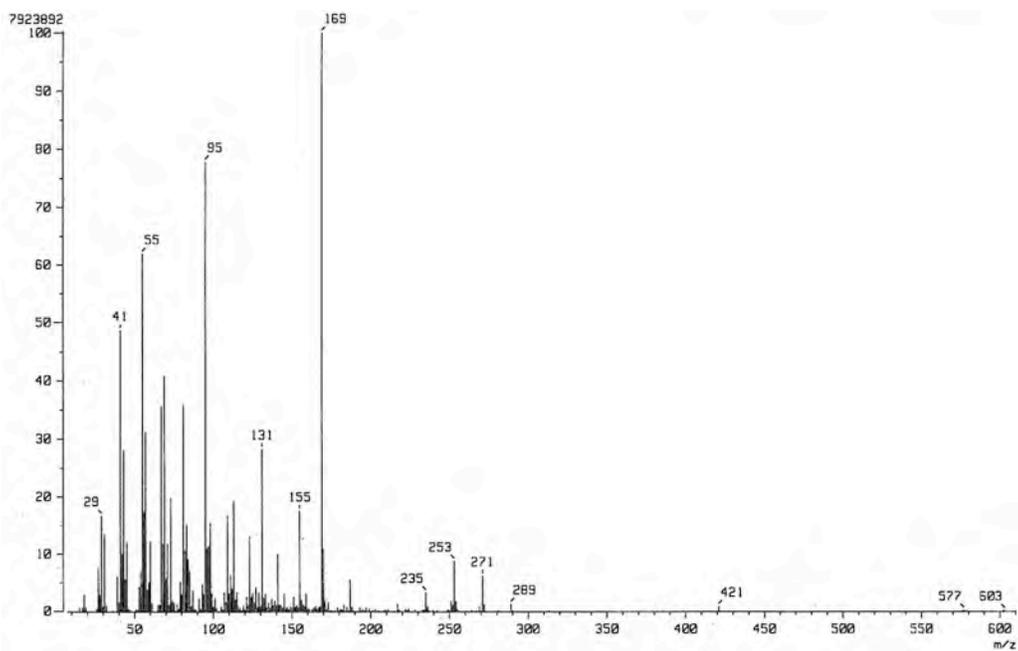
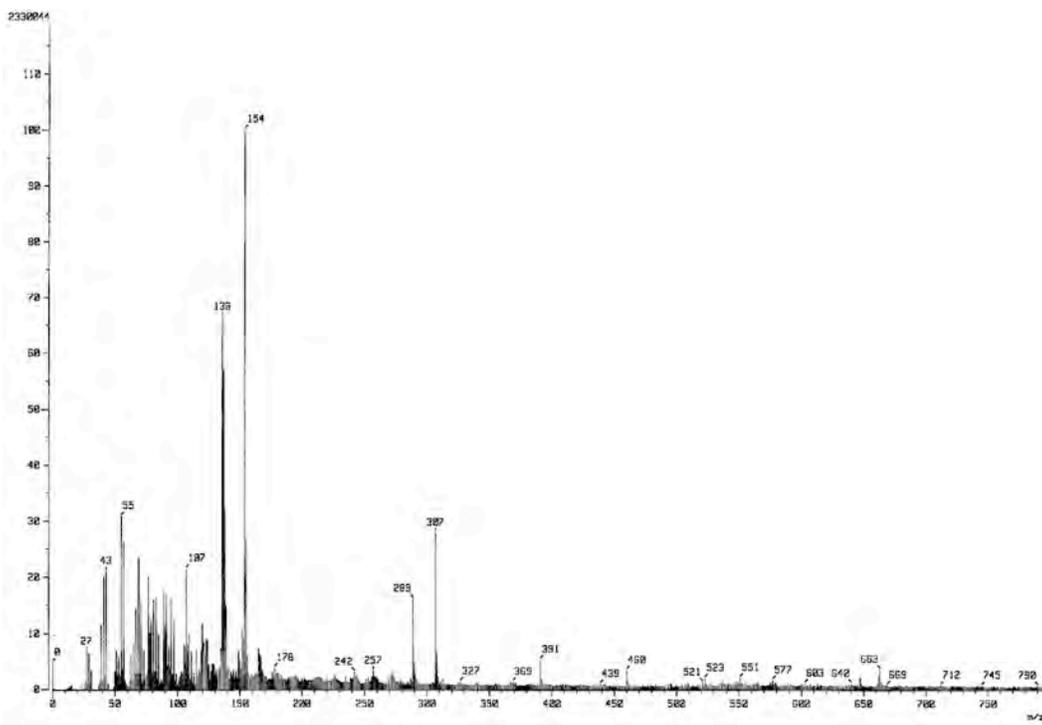
Espectro 16. FT-IR del monómero 1.



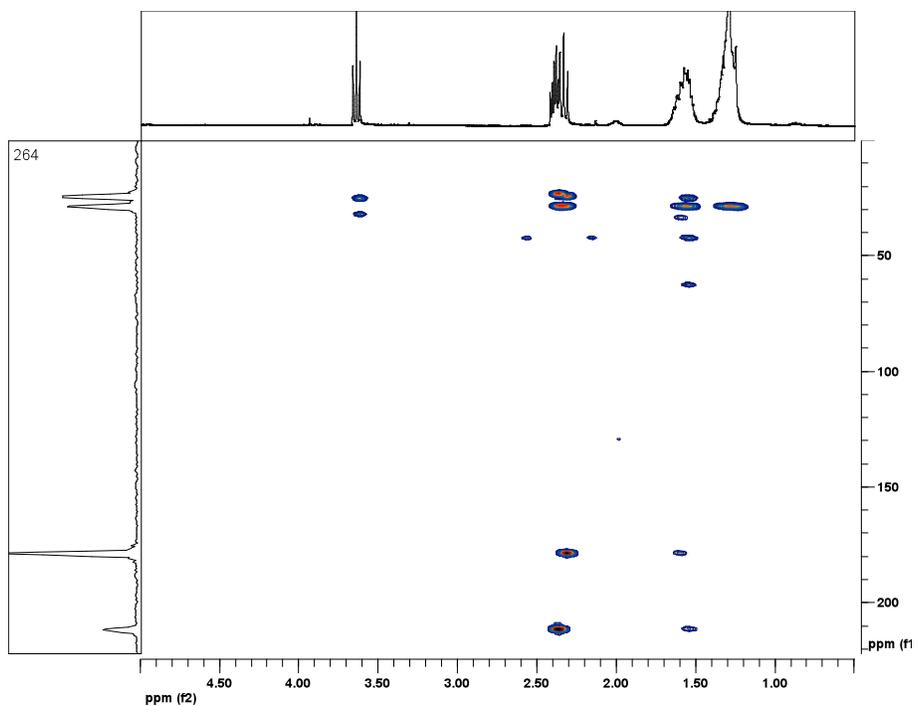
Espectro 17. FT-IR del monómero 2.



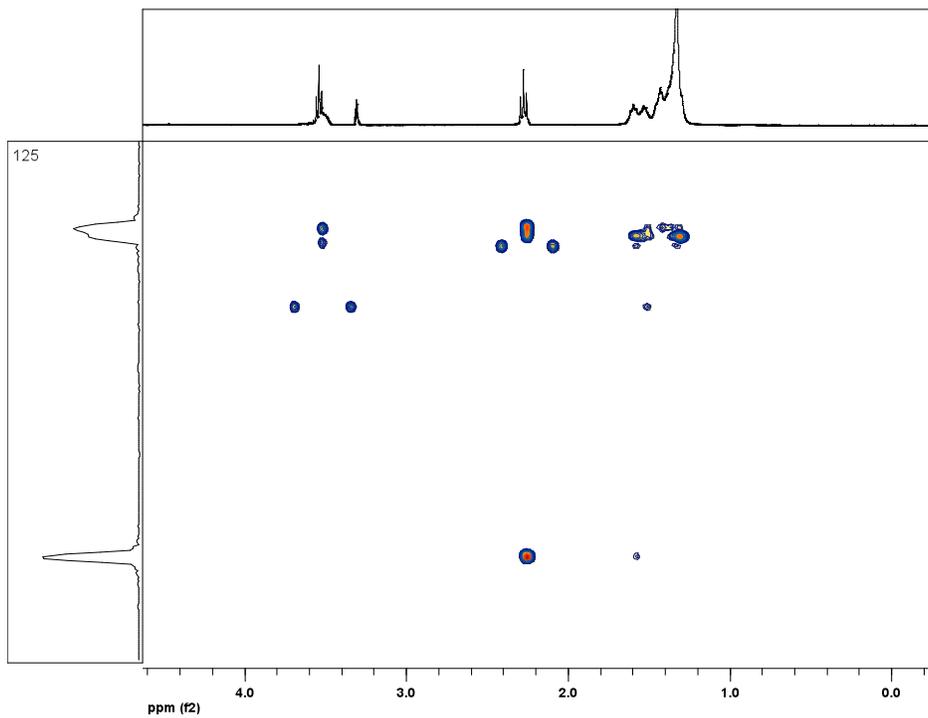
Espectro 18. Espectrometría de masas (IE) del monómero 1.



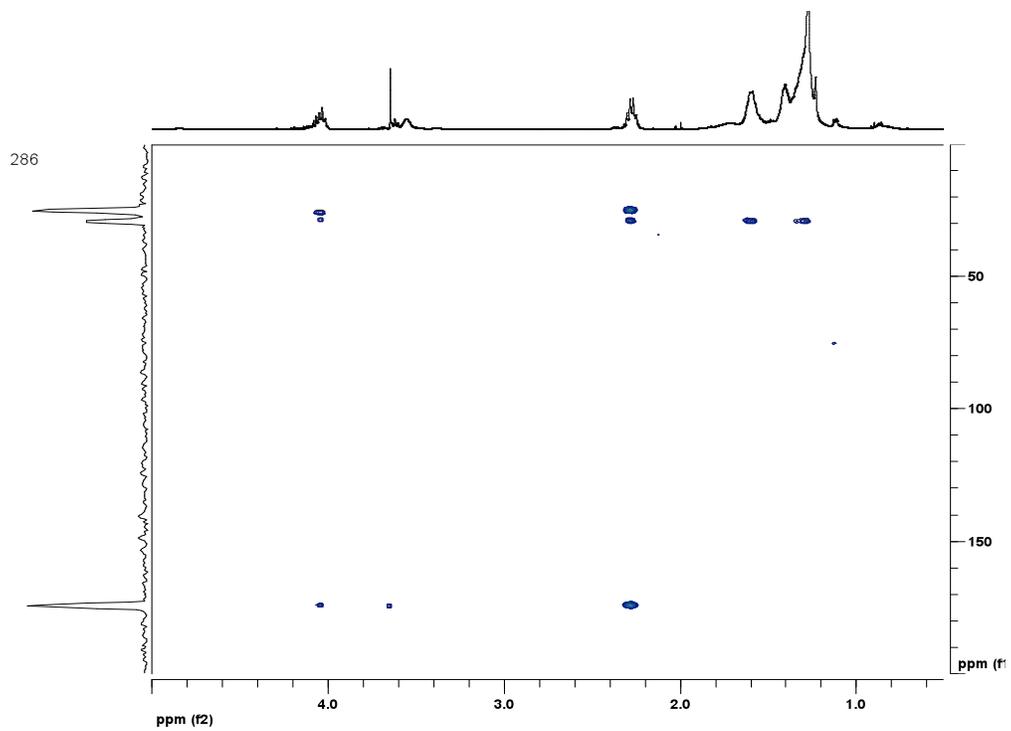
Espectro 19. Espectrometría de masas (IE) del monómero 2.



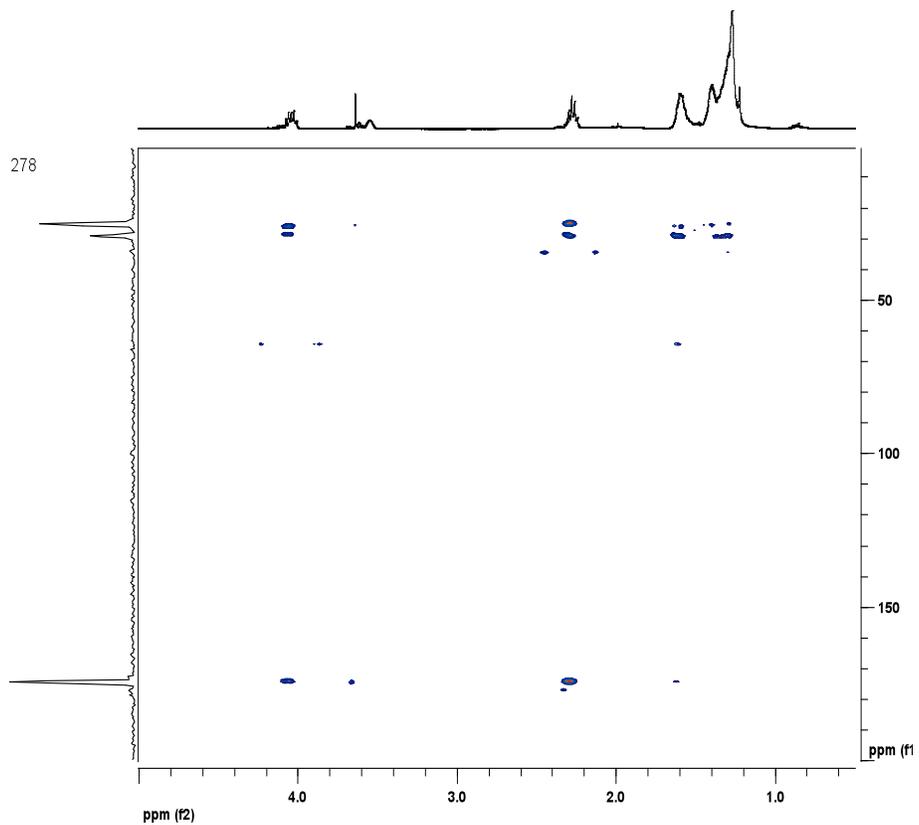
Espectro 20. HMBC del monómero 1.



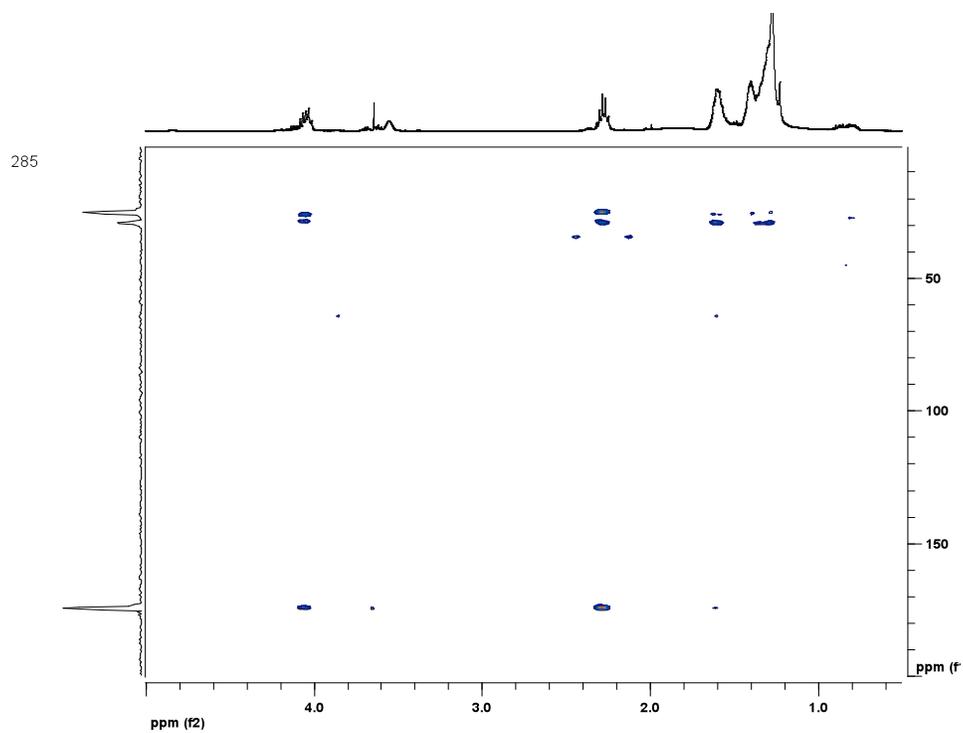
Espectro 21. HMBC del monómero 2.



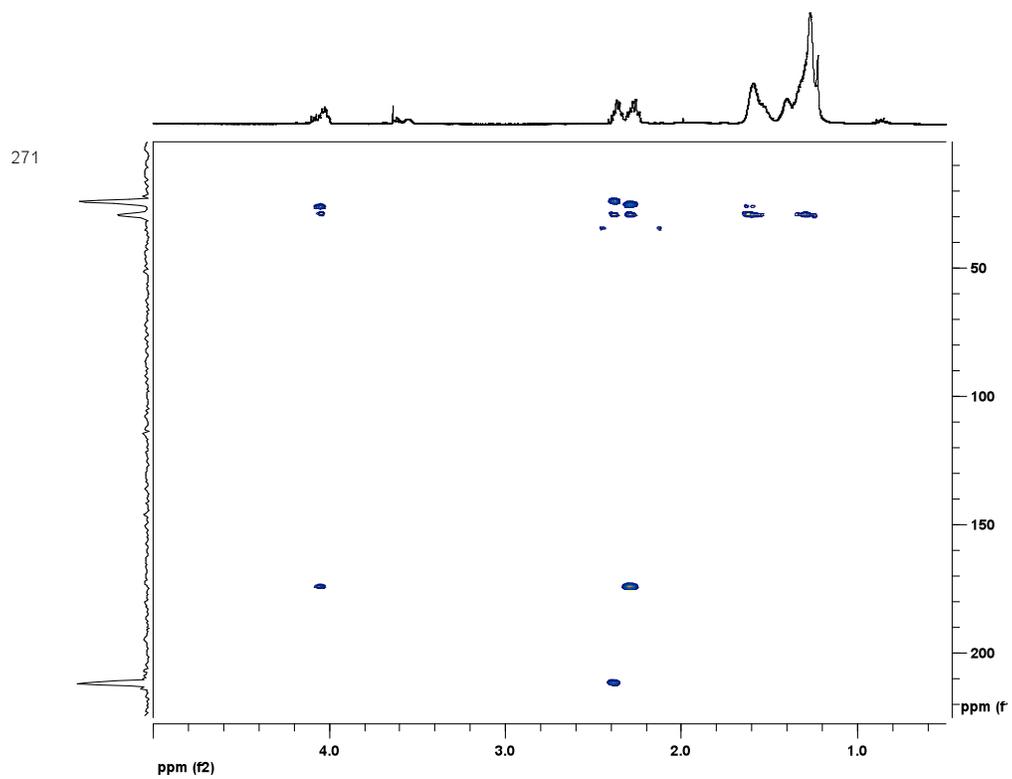
Espectro 22. HMBC del polímero formado con CAL a partir del monómero 2.



Espectro 23. HMBC del polímero formado con PCL a partir del monómero 2.



Espectro 24. HMBC del polímero formado con PPL a partir del monómero 2.



Espectro 25. HMBC del polímero formado con PPL a partir de la mezcla del monómero 1 y 2.

11. BIBLIOGRAFÍA:

Adachi, S., and Kobayashi, T. 2005. Synthesis of Esters by Immobilized-Lipase-Catalyzed Condensation Reaction of Sugars and Fatty Acids in Water-Miscible Organic Solvent. 2005. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99(2), 87-94.

Ahmed, A., Crawford, T., Gould, S., Ha, Y. S., Hollrach M., Noor-E-Ain, F., Dickman, M. B., Dussault, P. H. 2003. Synthesis of (R)- and (S)- 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid: cutin stereochemistry and fungal activation. *Phytochemistry*. 63, 47-52.

Arrieta-Baez, D. and Stark, R. E. 2006. Using Trifluoroacetic Acid to Augment Studies of Potato Suberin Molecular Structure. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9636-9641

Barnes, J., Percy, K., Paul, J., McLaughlin, C., Mullineaux, P., Creissen, G., Wellburn, A. 1996. The influence of UV-radiation on the physiochemical nature tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surface. *J. Exp. Bot.* 47:99-109.

Benitez, J. J., García-Segura, R. and Heredia, A. 2004. Plant biopolyester cutin: a tough way to its chemical synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674, 1-3.

Benitez, J. J., Matas, A. J., and Heredia, A. 2004. Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques. *Journal of structural Biology*. 147, 179-184.

Bernards, M. A. 2002. Demistifying Suberin. *Can. J. Bot.* 80, 227-240.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy. Lavoisier, Londres. Cap. 2.

Campbell, M. K. 2000. Bioquímica. 3rd. ed. Artmed Editora Ltda, Porto Alegre.

Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. g., and Souidi, V. 2004. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*. 27, 623-630.

Deas, A. and Holloway, B. 1977. The intermolecular structure of some plants cutins. In: *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*; Trevini, M., Lichenthaler, H.K., Eds.; Springer-Verlag: Berlin. Pp 293-299.

Deschmukh, A. P., Simpson, A. J. and Hatcher, P. G. 2003. Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. 64, 1163-1170.

- Deschmuck, A. P., Simpson, A. J., Hadad, C. M., and Hatcher, P.G. 2005. Insights into the structure of cutin and cutan from *Agave americana* leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Organic Chemistry*. 36, 1072-1085.
- Douliez, J. P. 2004. Cutin and suberin monomers are membrane perturbants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 271, 507-510.
- Faber, K. 2000. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 4th ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Fang, X., Qiu, F., Wang, H., Mort, A. J. and Stark, P. E. 2001. NMR Studies of molecular structure in fruit cuticle Polyester. *Phytochemistry*. 57, 1035-1042.
- Fontes P., T. and Alves M., G. 2009. Chapter 4 Cutinases: Properties and Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. 66: 77-95.
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., and Schreiber, L. 2005. Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues – A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*. 66, 2643-2658.
- Franke, R. and Schreiber, L. 2007 Suberin, a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current opinion in Plant biology*. 10, 252-259.
- Gandini, A., Pascoal-Nieto, C., Silvestre, A.J.D. 2006. Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materias. *Prog. Polym. Sci*. 31, 878-892.
- Gómez-Cruz, M. A., Schwentesius, R., y Barrera-González, A. 1994. El limón Persa en México una opción para el trópico. SARH. México. pp. 18-186.
- Gómez-Patiño, M. B. 2010. Análisis Estructural de la cutícula de Toronja, *Citrus paradisi* (Macf.) Tesis de Licenciatura (Biología), UNAM, Facultad de Ciencias.
- Heredia, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristic of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys. Acta*. 1620, 1-7.
- Herrera-Hernández, M. E. 2006. Semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): obtención de concentrado de fibra dietética con poder antioxidante. Tesis de Licenciatura (Químico de Alimentos), UNAM, Facultad de Química.
- Holroyd, G., Hetherington, A., and Gray, J. 2002. A role for the cuticular waxes in the environmental control of stomatal development. *New Phytol*. 153:433-439.
- Holloway, P. J. 1982. The chemical constitution of plant cutins. In: *The Plant cuticle*; Cutler, D. F., Alvin, K. L. Price, C. E., Eds.; Academic Press: New York.

Janick, J., and Paull, R. E. 2008. *Citrus spp.* En *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*. Cambridge University press. U.K. pp.773-788

Jeffree, C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In Kerstiens G ed; *Plant cuticle: an integrated functional approach*. BIOS scientific publishers, Oxford. p 33-82

Kolattukudy, P. E. 1970. Cutin biosynthesis in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol.* 46:759-760.

Kolattukudy, P. E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Botany.* 62: 2918-2933

Kolattukudy, P. E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, their sensitivity to environmental stresses. In: *Plant Cuticles, as integrated functional approach*, Kerstiens G (ed.). BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. pp. 83-108.

Kolattukudy, P. E., 2001. Polyesters in higher plantas . *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 1-49.

Li, Y., and Beisson, F. 2009. The biosynthesis of cutin and suberin as an alternative source of enzymes for the production of bio-based chemicals and materials. *Biochimie.* 91, 685-691.

Linko, Y. Y., Lämsä, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppäia, J., and Linko, P. 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis.

Linnaeus, C. 1751. *Philosophia Botanica. Terminorum.* Stockholm, Acad. Imperial. Monspel. Berol. Tolos. Upsala. 67 p.

Lizarraga-Navarrete, J. A. 2001. Respuesta al daño por frío del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) con y sin recubrimientos. Tesis de Licenciatura (Químico de Alimentos), UNAM, Facultad de Química.

Lu, F. and Ralph, J. 1997. Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method) a New Method for Lignin Analysis. Protocol for Analysis of DFRC Monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2590-2592.

Matas, A. J, Cuartero, J. and Heredia, A. 2004. Phase transition in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochimica Acta.* 409, 165-168.

Mcmurry, J. 2008. *Química Orgánica.* 7ª ed. Ed. Cengage Learning. México. 1172 p.

Moire, L., Rezzonico, E. And Porier, Y. 2003. Synthesis of novel biomaterials in plants. *J. Plant Physiol.* 160, 831-839.

- Morrison I. M. and Stewart D. 1998. Plant wall fragments released on solubilisation in trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*. 49, 1555-1563.
- Muderhwa, J., Pina, M., and Graille, J. 1988. Aptitude à la transesterification de quelques lipases regioselectives 1-3. *J. Oléagineux*. 43, 385-392.
- Okada, M. 2002. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 27, 87-133.
- Olsson, A., Lindström, M., Iversen, T. 2007. Lipase-catalyzed synthesis of an epoxy-functionalized polyester from the suberin monomer cis-9,10-epoxy-18-hydroxyoctadecanoic acid. *Biomacromolecules*. 7, 6-9.
- Osman, S. F., Gerard, H. C., Fett, W. F., Moreau, R. A. and Dudley, R. L. 1995. Method of production and characterization of Tomato Cutin Oligomers. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2134-2137.
- Osman, S. F., Irwin, P., Fett, W. F. O'Connor, J. V. and Parris, N. 1999. Preparation, Isolation, and characterization of cutin monomers and Oligomers from Tomato Peels. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 799-802.
- Pacchiano , R.A., Sohn, W., Chlanda, V. L., Garbow, J. R. and Stark, E. R., 1993. Isolation and Spectral Characterization of Plant Cuticle Polyester. *J. Agric. Food. Chem.* 41, 78-83.
- Pan, P., and Inoue Y. 2009. Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters. *Progress in Polymer Science*. 34: 605-640.
- Paques, F. W. and Macedo, G. A. 2006. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química nova*. 29:93-99
- Peschel, S., Franke, R., Schreiber, L. and Knoche, M. 2007. Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry*. 68, 1017-1025.
- Petit-Jimenez, D., González-León, A., Gonzáles-Aguilar, G., Sotelo-Mundo, R. y Báez-Sañudo, R. 2007. Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica*. L. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol 30(1), 51-60.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y. and Ohlrogge, J. B. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in plant science*. 13(5), 236-244.
- Ray, A. K., Lin, Y. Y., Gerard, H. C., Chen, Z., Osman, S. F., Fett, W. F., Moreau, R. A. and Stark, R. E. 1995. Separation and identification of Lime Cutin Monomers by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Phytochemistry*. 38 (6), 1361-1369.

Ray, A. K., Chen, Z. J. and Stark, R. E. 1998. Chemical depolymerization studies of the molecular architecture of lime fruit cuticle. *Phytochemistry*. 49 (1), 65-70.

SAGARPA. Banderazo de salida para exportación de limón persa con el sello "México calidad suprema" a países de Europa, Japón y EUA. 2005.

Schreiber, L., Schönherr, J. 1999. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles. The effects of temperature on structure and function. *Planta*. 182, 186-193.

Varma, I. K., Albertsson, A. C., Rajkhowa, R., and Srivastava, R. K. 2005. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 30, 949-981.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Publicacions de la universitat Jaume I., Castelló de la Plana. 1265 p.

Tharanathan, R. N. 2003. Review-biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*. 14, 71-78.

Tian, S., Fang, X., Wang, W., Yu, B., Cheng, X., Qiu, F., Mort, A. J., and Stark, R. E. 2008. Isolation and Identification of Oligomers from Partial Degradation of Lime Fruit Cutin. *J. Agric. Food Chem.* 56 (21), 10318-10325.

Yurkanis, P. 2008. Espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja y espectroscopia ultravioleta/visible y Espectroscopia de RMN. En Química Orgánica. Ed. Pearson. 5ª ed. México. Pp. 513-638.

Zlotnik-Masori, T. and Stark, R. E. 1988. Nuclear magnetic resonance studies of cutin, an insoluble plant polyester. *Macromolecules*. 21: 2412-2417.

Páginas web consultadas:

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/name/28101543>.

Septiembre 2009

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resource Information Network*. – GRIN. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?314291>.

Septiembre, 2009.