



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E
INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

INVESTIGACIÓN DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y
POLIMERIZACIÓN DEL ÁCIDO ITACÓNICO

CURRICULAR

TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA

EMMANUEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

ASESOR

Q.F.B. FLOR DEL MONTE ARRAZOLA DOMÍNGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017

T-065-17

Ciudad de México, 19 de junio del 2017.

Al C. Pasante:

EMMANUEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Boleta:

2012610428

Carrera:

IQI

Generación:

2012-2016

Mediante el presente se hace de su conocimiento que la Subdirección Académica a través de este Departamento autoriza que la C. **Q.F.B. Flor del Monte Arrazola Domínguez**, sea asesora en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Curricular**, con el título y contenido siguiente:

"Investigación de los métodos de obtención y polimerización del ácido itacónico".

Resumen.

Introducción.

I.- Antecedentes sobre el ácido itacónico.

II.- Procesos de obtención.

III.- Métodos de polimerización.

IV.- Producción y comercialización.

Conclusiones.

Referencias.

Anexos.

Se concede un plazo máximo de un año, a partir de esta fecha, para presentarlo a revisión por el Jurado asignado.



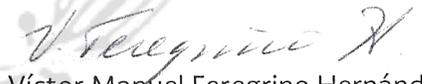
Ing. Víctor Manuel Martínez Reyes
Presidente de la Academia de
Química Orgánica y Polímeros.



Q. F. B. Flor del Monte Arrazola Domínguez
Directora del Trabajo
Ced. Prof. 186649



Ing. César Rodríguez Guerrero
Jefe del Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico.



Ing. Víctor Manuel Feregrino Hernández
Subdirector Académico

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos".
"60 Aniversario del CECyT 14 "Luis Enrique Erro".
"60 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones".
"50 Aniversario de la COFAA-IPN".
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología".

T-065-17

Ciudad de México, 10 de agosto de 2017.

Al C. Pasante:

EMMANUEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ
PRESENTE

Boleta:

2012610428

Carrera:

IQI

Generación:

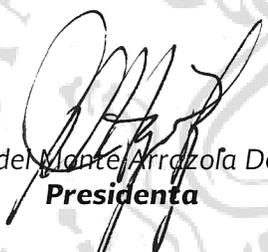
2012-2016

Los suscritos tenemos el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el borrador de la modalidad de titulación correspondiente denominado:

"Investigación de los métodos de obtención y polimerización del ácido itacónico".

encontramos que el citado Trabajo de **Opción Curricular**, reúne los requisitos para autorizar el Examen Profesional y **PROCEDER A SU IMPRESIÓN** según el caso, debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se le hicieron.

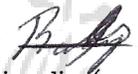
Atentamente
JURADO


Q.F.B. Flor del Monte Arzozola Domínguez
Presidenta


Ing. Víctor Manuel Martínez Reyes
Secretario


M. en C. Sergio Hernández Garrido
1er. Vocal


Dr. Ricardo Santillán Pérez
2º. Vocal


Dr. Rodrigo Jiménez Gallegos
3er. Vocal

c.c.i.- Expediente
CRG/rcr

RECONOCIMIENTOS

AL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Por ser la institución que pone LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA y contagiarme de ese espíritu de convicción y entrega por el conocimiento.

A LA ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

Por ser la mejor escuela en la que pude encontrar un refugio donde adquirí los conocimientos necesarios para formar parte de su élite de ingenieros, por las extraordinarias experiencias que por su causa viví, por la excelente formación académica que dentro de sus aulas recibí y por ayudar tanto a mi crecimiento personal como profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre presente en el camino que decidí tomar y por ser mi guía y protector en todo momento.

A mis padres por enseñarme los valores necesarios para llegar hasta este punto de mi vida, en el cual me siento orgulloso de ser su hijo y de poder darles la satisfacción de verme concluir mi preparación profesional. Por el apoyo que me brindaron durante estos años que se manifestó de diferentes formas. Por estar siempre conmigo y tenderme una mano amiga en tiempos de necesidad y en las situaciones difíciles que se me pudieron presentar a lo largo del camino.

A MDAVRS y familia por todo su apoyo incondicional que los hizo partícipes en este logro de mi vida. Por estar siempre conmigo a pesar de las adversidades.

A mi asesora, sin su apoyo el presente no hubiera sido posible.

A mis profesores en general por las enseñanzas que me dieron, los consejos que me brindaron y que ahora forman parte de mi visión del futuro.

ÍNDICE

	RESUMEN	iv
	INTRODUCCIÓN	v
		PÁG.
CAPÍTULO I	ANTECEDENTES SOBRE EL ÁCIDO ITACÓNICO	
	I.1 Desarrollo tecnológico	1
	I.2 Propiedades y aplicaciones	6
CAPÍTULO II	PROCESOS DE OBTENCIÓN	
	II.1 Obtención mediante <i>Aspergillus Terreus</i>	11
	II.2 Sustratos usados para la obtención	21
	II.3 Ruta de biosíntesis	42
CAPÍTULO III	MÉTODOS DE POLIMERIZACIÓN	
	III.1 Técnicas de polimerización	51
	III.2 Poliesterificación del ácido itacónico	55
CAPÍTULO IV	PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN	
	VI.1 Mercado	68
	VI.2 Ejemplo de costeo preliminar	74
	CONCLUSIONES	76
	REFERENCIAS	78
	ANEXOS	
	Glosario de términos	81

RESUMEN

En otros países se han realizado investigaciones sobre el ácido itacónico, no es el caso de México; por su muy similar estructura a la de los acrilatos se puede polimerizar y es versátil para obtener sustitutos de algunos derivados del petróleo.

Con el fin de analizar sus métodos de obtención y polimerización se requiere:

- Establecer el estado del arte.
- Describir los métodos.
- Presentar la situación de producción y comercialización del ácido.

Para la producción de este compuesto se utiliza un proceso de biosíntesis. Se trata de un proceso de fermentación con la ayuda de hongos de la familia *Aspergillus*, específicamente *A. Terreus*. Se pueden tomar carbohidratos de diferentes tipos de sustratos ricos en ellos; cáscara de tubérculos, almidón de maíz, jugo de caña de azúcar, por mencionar algunos. También se aborda el uso de enzimas y técnicas de ingeniería genética para su producción.

Se presentan algunos de los métodos de polimerización que se han estudiado hasta la fecha, tales como polimerización en solución acuosa, polimerización en dioxano, por hidrólisis del polianhidrido itacónico y por iniciación redox. Para cada uno de ellos se describen las condiciones en las que los investigadores han logrado polimerizarlo y obtener un material que por sí mismo o copolimerizado ofrece una gran variedad de aplicaciones.

También se mencionan algunas investigaciones que se han hecho respecto a los métodos de obtención de poliésteres derivados del ácido itacónico y sus aplicaciones como polímeros inteligentes, elastómeros, compositos, recubrimientos y en el área médica como dosificadores de medicamentos, por mencionar algunos ejemplos.

Por último, se describe la situación global del mercado del ácido itacónico a nivel mundial y cómo se espera que sea su crecimiento en los próximos años.

INTRODUCCIÓN

La polimerización de los ácidos orgánicos para la producción de polímeros es un método alternativo a los convencionales utilizados durante años. Adicionalmente, la industria de los polímeros ha crecido constantemente a través del tiempo para satisfacer las necesidades de la población. Debido a esta problemática se ha estudiado el ácido itacónico, sus métodos de obtención, así como su polimerización para sintetizar materiales de fácil degradación y amigables con el medio ambiente que es lo que más se necesita en la actualidad para corregir la situación de contaminación que se le atribuye a los plásticos.

Por lo anterior, se analizan los distintos métodos para la obtención de este ácido, así como conocer las distintas técnicas polimerización que se pueden utilizar. El alcance de esta investigación es la presentación de los métodos de obtención a escala laboratorio que contribuyan a trabajos posteriores.

La importancia de este estudio radica en encontrar otras alternativas de macromoléculas de origen biotecnológico a partir de ácidos orgánicos como lo es el itacónico. Además dar a conocer su producción y comercialización para presentar un panorama general de las ventajas de la producción del ácido para su posterior polimerización.

El crecimiento que ha tenido el mercado del ácido itacónico en el mundo se traduce en la creación de empresas exportadoras, la gran mayoría de ellas ubicadas en China, otras pocas en E.U.A. [21]. Aunado a esto se tiene previsto que su demanda incrementa debido a la gran cantidad de aplicaciones que tienen los polímeros derivados de este, lo que significa un nicho de mercado para nuestro país.

Las investigaciones que se han realizado acerca de los poliésteres derivados de este ácido apuntan hacia un futuro prometedor para estos biopolímeros que poseen mejores características y propiedades para cada una de sus aplicaciones.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES SOBRE EL ÁCIDO ITACÓNICO

La contaminación derivada de los materiales plásticos de difícil degradación y que no se reciclan sigue en incremento, esta es una situación preocupante, debido a que el medio ambiente sufre daños irreversibles. Afortunadamente existen otras alternativas que no son contaminantes, el obtener materiales plásticos con materias primas naturales es una de ellas.

En el presente trabajo se explican los beneficios de usar ácido itacónico que es una de las materias primas constructoras de materiales plásticos para la obtención ya sea de homopolímeros o copolímeros que sustituyan a los polímeros de origen fósil que, como se sabe, son difíciles de degradar.

Sus derivados constituyen una interesante familia de monómeros de origen renovable. El ácido itacónico, materia prima principal en la síntesis de los itaconatos, se obtiene mediante procesos de fermentación a gran escala de melazas, que por su estructura parecida a los acrilatos son el tipo de polímero que pueden ser sustituidos por estos polímeros [1].

I.1 Desarrollo tecnológico

La esterificación del ácido itacónico fue descrita por primera vez por Swarts en 1873 [1], mientras que la polimerización de estos compuestos no apareció publicada hasta 1967 por *Tate*. El origen no fósil de estas sustancias y su similitud estructural con los derivados acrílicos, les hacen sumamente interesantes como posible alternativa a ciertos monómeros de uso frecuente en la industria.

Kinoshita, 1932 [2] fue el primer autor que investigó acerca de los métodos de obtención. Descubrió que un hongo filamentoso era capaz de producir ácido itacónico y, en consecuencia, describió esta especie como *Aspergillus itaconicus*.

Se encontró el ácido itacónico aislado como un subproducto en la pirólisis de ácido cítrico. Mientras que el interés potencial se orientaba como monómero, se prepararon polímeros a partir de sus derivados.

Posteriormente Bentley and Thiessen (1957) [3] propusieron una ruta para la biosíntesis del ácido itacónico, empleando como sustrato un carbohidrato como la glucosa; las moléculas de carbono son procesadas vía glucólisis hasta piruvato. En este método el piruvato es metabolizado por la enzima Acetil-CoA para transformarlo en itaconato. [4]

En 1962 Robert C. Nubel et al. [5] publicaron la patente No. 3044941 “Proceso para producir ácido itacónico” en la cual se muestran cinco ejemplos distintos con los que se puede obtener a través de la fermentación con *Aspergillus terreus*:

- 1) Con melaza de remolacha diluida al 18% m/v.
- 2) Sustitución del hongo por *Aspergillus itaconicus* con la misma formulación.
- 3) Con mezcla de melaza de remolacha diluida y melaza de caña al 18% m/v.
- 4) Con mezcla de melaza de remolacha diluida y glucosa al 10% m/v.
- 5) Con mezcla de melaza de remolacha diluida y fructuosa al 10% m/v.

En la patente No. 3873425 de Kobayashi et al. (1975) [6] la innovación es la implementación de la electrodiálisis para mejorar los procesos anteriormente publicados. Con la electrodiálisis de la sal de ácido itacónico generada a partir del caldo de fermentación, a través de membranas de intercambio iónico, se pueden eliminar impurezas de alto peso molecular que están contenidas en el caldo de cultivo. El dializado que se recupera en la electrodiálisis tiene una cantidad considerable de ácido itacónico, azúcar y similares, los cuales pueden ser efectivamente reciclados para formar el siguiente medio de fermentación.

También se han realizado algunas investigaciones acerca de los métodos de polimerización como se mencionan a continuación.

Stawski y Polowinski (2005) [7] en su trabajo presentan la polimerización del ácido itacónico por cuatro métodos diferentes: polimerización en solución acuosa,

polimerización en dioxano, por hidrólisis del poli anhídrido itacónico y por iniciación redox.

Es importante comentar que el ácido itacónico es un ácido diprótico no saturado, la presencia del doble enlace le aporta características químicas activas, como por ejemplo puede polimerizar. Es soluble en agua, etanol y otros disolventes. Además es una sustancia procedente de materias primas renovables como el jugo de caña de azúcar, la piel de distintos tubérculos como el camote, maíz, entre otros [8].

La fórmula estructural de este ácido se muestra en la figura I.1:

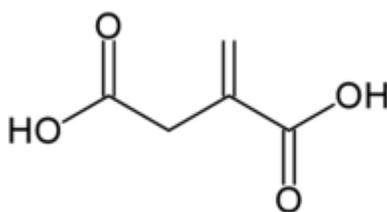


Figura I.1: Estructura química del ácido itacónico. [14]

Tiene un grupo metileno externo y un grupo carboxílico unido al carbono vinílico, lo que lo hace estructuralmente similar al ácido acrílico y al metacrílico como se puede observar en la figura I.2.

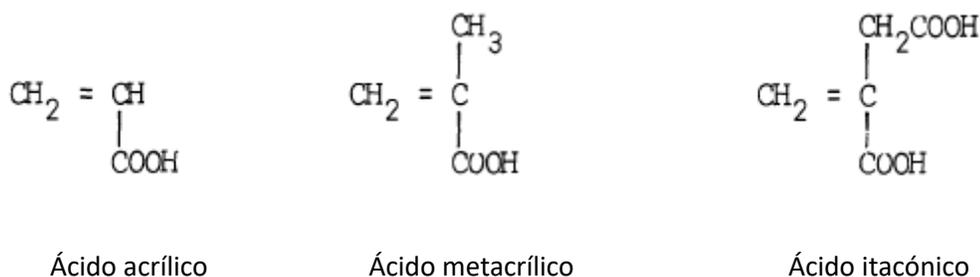


Figura I.2: Comparación del ácido itacónico con acrílicos. [9]

Un método mejorado se reportó más tarde por Calam et al. [9], quienes encontraron que *Aspergillus terreus* produce rendimientos mejores del ácido bajo condiciones de cultivo sumergidos y finalmente se lograron rendimientos de 40% a un 50% usando técnicas de este tipo.

En la actualidad se han desarrollado los procesos de fermentación a gran escala utilizando la melaza como fuente de carbohidratos, lo cual reavivó el interés por el ácido itacónico, cuando se descubrió que podría ser producido en cantidades sustanciales por medio de un proceso de fermentación.

El ácido itacónico se puede polimerizar en solución acuosa usando persulfato de potasio como iniciador, no es una reacción particularmente fácil y no ha sido ampliamente utilizada. [9]

Se ha encontrado que la mono-esterificación se puede controlar con relativa facilidad y que el ataque es casi exclusivamente en la unidad carboxilo unido a través del metileno. Esto significa que se pueden preparar tanto mono y diésteres y/o bien homopolimerizar o copolimerizar los monómeros abriendo así un gran número de posibles combinaciones en las propiedades físicas. Se muestra en la figura 1.3 la naturaleza de dichas combinaciones:

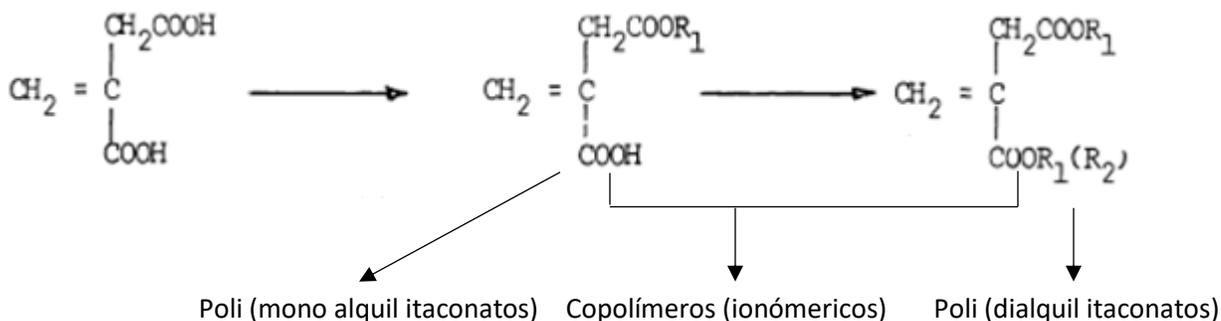


Figura 1.3: Posibles combinaciones de itaconatos derivados del ácido itacónico. [9]

Un ejemplo de los derivados son los llamados itaconatos, polímeros que poseen características particulares que los hacen compuestos interesantes que se describirán a continuación.

Los poliitaconatos también han sido estudiados durante décadas, [10] no solo por su similitud estructural con los poliacrilatos y metacrilatos, sino también porque el ácido itacónico, es de origen natural, no proviene de fuentes fósiles y es un proceso sustentable, lo que permite su fácil degradación.

Algunos itaconatos con sustituyentes alquílicos han sido copolimerizados exitosamente con monómeros vinílicos; así los diitaconatos de metilo y butilo, han sido copolimerizados con metacrilato de metilo y estireno, mientras que algunos monoitaconatos con sustituyentes *n*-alquílicos de 12 a 22 átomos de carbono y más. Recientemente el di-itaconato de hexadecilo fue polimerizado con estireno, observándose que las cadenas laterales de las unidades del itaconato eran capaces de cristalizar cuando alcanzaban cierta longitud.

La factibilidad de copolimerizar estos materiales con monómeros vinílicos, les confiere un campo de aplicación muy amplio, pudiéndose emplear en la fabricación de dispositivos de purificación, como filtros y membranas, o bien como material de relleno para columnas analíticas.

Si bien, los poliitaconatos que han recibido más atención durante el último lustro del siglo XXI son los que tienen cadenas alquílicas como sustituyentes; así como poliitaconatos con cadenas laterales tipo éter. Por ejemplo, los monoitaconatos de metoxietilo y etoxietilo fueron sintetizados y polimerizados vía radicalaria por Katime et al. [10], mientras que varios poli (diéteres itaconicos) han sido sintetizados y caracterizados por varios autores [10]. Las estructuras de los polímeros mencionados anteriormente se muestran en la figura I.4.

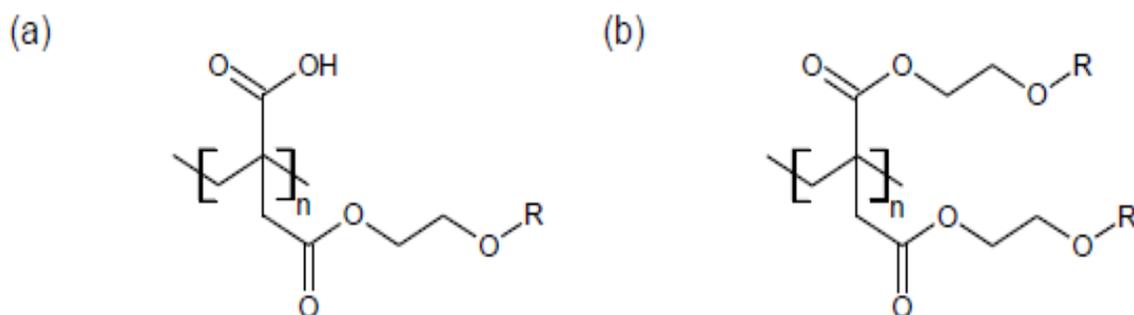


Figura I.4: (a) Poli (monoitaconato de alcoxi etilo), (b) Poli (diitaconato del alcoxi etilo). R es un grupo alquilo.

Los copolímeros sintetizados empleando itaconatos con sustituyentes tipo éter, como por ejemplo el monoitaconato o el diitaconato metoxietílico junto con monómeros vinílicos, podrían producir copolímeros con propiedades interesantes debido al

carácter polar que les confieren sus cadenas laterales etéricas. Como ejemplo de estas propiedades se menciona el arreglo estereoquímico tipo sondiotáctico, estabilidad térmica y la reducción de la capacidad de cristalización de las cadenas *n*-alquílicas como lo mencionan en su trabajo de investigación Rojas et al. [10]

Por último en un trabajo mucho más reciente, Robert y Friebel, 2016, [11] describen al ácido itacónico como un componente versátil para los poliésteres renovables con funcionalidad mejorada (grado de reticulación o entrecruzamiento). Explican que el enlace α - β insaturado presente en su estructura tiene una reactividad suficiente para una amplia gama de aplicaciones de reticulación, tales como administración de fármacos, polímeros con memoria de forma, elastómeros y recubrimientos, con propiedades comparables o incluso superiores a las composiciones de reticulación convencionales.

Mencionan también en su trabajo las aplicaciones que tienen los poliésteres derivados de ácido itacónico, algunos aspectos de la policondensación del ácido itacónico así como la modificación de los poliésteres derivados del ácido itacónico post-polimerización.

I.2 Propiedades y aplicaciones

Este ácido orgánico puede llamarse de distintas maneras: ácido metilensuccínico, ácido metilenbutanodioico, ácido propilendicarboxílico, ácido 2-propen-1,2-dicarboxílico.

Propiedades físicas y químicas [12]

Presenta las siguientes propiedades físicas y químicas:

- Fórmula molecular: $C_5H_6O_4$
- Peso molecular: 131.1 g/gmol.
- Apariencia física: Polvo blanco y cristalino.
- Olor: característico.
- Punto de fusión: 162-164°C

- Sublima a 268°C
- Densidad: 1.632 g/cm³
- Solubilidad en agua: 1 g en 12 mL de agua
- Solubilidad en solventes orgánicos: Soluble en alcohol 1g en 5 mL, ligeramente soluble en otros como benceno, cloroformo, disulfuro de carbono, entre otros.
- Estabilidad: Es estable en condiciones estándar. Sustancia higroscópica.

Aplicaciones

Como sus principales aplicaciones se tienen [13]:

- En las fibras de acrilonitrilo, como el tercer monómero, debido a que se puede teñir fácilmente.
- Si se combina con el estireno produce plásticos con propiedades interesantes como color tenue, impermeables y con efecto de anticorrosión. Se puede utilizar como recubrimiento de fibras de vidrio, de tejidos para alfombras y para cubiertas de libros.
- Empleo en pegamentos. Por ejemplo, una emulsión de ácido itacónico con ácido acrílico es un excelente pegamento para fibras textiles. Formulado junto con vinilo, sirve como pegamento para papel y celuloide.
- Como pegamento dental (combinado con ácido acrílico y óxidos metálicos) muestra una alta resistencia a la compresión y tiene una elevada adaptación fisiológica.
- Es el homopolímero del ácido itacónico posee buena transparencia y lustre especial que sirve para hacer gemas artificiales y lentes especiales.
- En detergentes, su copolímero con el ácido acrílico, actúa como agente quelante. Se puede emplear en la limpieza de calderas y equipos criogénicos.
- Los ésteres del ácido itacónico se emplean en resinas de intercambio catiónico y como tensoactivos.
- La pirrolidona adicionada con ácido itacónico es un excelente lubricante, y se usa también en la formulación de herbicidas y agentes de limpieza.

- Se emplea como co-monómero a un nivel de 1-5% para ciertos productos. Sus derivados se utilizan en la medicina y la preparación cosmética.

Otra de las aplicaciones que se tiene es la fabricación de pinturas para la cual la empresa ROYAL DSM [14] hizo un estudio en el que cerca del 20 a 30 % del anhídrido ftálico en la pintura convencional (Uradil AZ516 - 60 Z) fue sustituido por el ácido itacónico purificado para hacer una pintura blanca, a la que se le hicieron las siguientes pruebas de aplicación:

- Dureza
- Flexibilidad
- Reflexión
- Amarillamiento.

Un ejemplo de las mejoras que en dicha empresa encontraron en la pintura con ácido itacónico respecto a la pintura convencional se presentan en la Tabla I.1.

Tabla I.1

Comparación de la pintura con ácido itacónico vs pintura tradicional. [14]

PROPIEDAD EVALUADA	Pintura que contiene Ácido Itacónico.
Edurecimiento (100 μm y 150 μm de espesor de película húmeda) 1-21 días	Igual
Espesor de capa seca (DLT por sus siglas en inglés) en μm	16
Flexibilidad	Igual
Reflexión	Mejorada
Amarillamiento en el tiempo	Ligeramente mejorado
Grisura en el tiempo	Ligeramente mejorado

En la figura 1.5 se pueden observar las diferencias entre ambas pinturas. El panel de la derecha contiene ácido itacónico. El de la izquierda tiene pintura convencional.



Figura 1.5: Comparación entre la pintura convencional y la que contiene ácido itacónico. [14]

La pintura producida es de buena calidad. En comparación con la pintura convencional, revela una mejor opacidad y reflexión y está libre de anhídrido bórico y ftálico que son dañinos para la salud. [14].

Otro ejemplo de las aplicaciones son los poliésteres [15]. Se han realizado investigaciones en el área médica para usarlos como precursores de micro esferas de hidrogel cargadas con vacunas bio-erosionables. También se han diseñado poliésteres para la administración de fármacos, la ingeniería de tejido, entre otras aplicaciones biomédicas.

Se mencionan también los polímeros con memoria de forma (SMP) que son materiales poliméricos con la capacidad de recuperar su forma original. Este efecto está relacionado con la combinación de la estructura y la morfología del polímero junto con el proceso y tecnología de programación de inclusión, es decir, es necesario un entrenamiento del material para programar una forma determinada.

Alberto Requena [16] describe estos materiales inteligentes como polímeros que presentan un efecto unidireccional de memoria, inducido térmicamente. Las

aplicaciones en medicina y ciencia en general se vienen estudiando desde hace tiempo. El mecanismo de polimerización permite la incorporación de copolímeros que se pueden diseñar y de esta forma programar otros polímeros nuevos. La sutura inteligente incorpora materiales con memoria, que hacen su efecto de forma controlada y que pueden ser biodegradables, con lo que tienen la ventaja de no tener que intervenir de nuevo para eliminar el material del tejido intervenido.

La ingeniería de biopolímeros ha dado un paso más, previniendo los inconvenientes relacionados con la reabsorción. La posible combinación de materiales inteligentes con la bio-producción favorecerá las cirugías médicas.

También en el campo de los elastómeros, [15] se han usado poliésteres derivados del ácido itacónico como componentes reticulables. Es debido a la similitud estructural con el ácido acrílico y el ácido metacrílico, que a menudo se utilizan como grupos reactivos en los aglutinantes de curado por radiación para aplicaciones de revestimiento y tintas de impresión, el ácido itacónico tiene un alto potencial para servir como una alternativa renovable en esta área.

Lo anterior permite que los polímeros derivados de dicho ácido tengan un mercado amplio. Los trabajos realizados hasta la fecha apuntan a que este compuesto, así como otros ácidos orgánicos, es el futuro para la fabricación de polímeros biobasados.

CAPÍTULO II

PROCESOS DE OBTENCIÓN

El ácido itacónico es materia prima para producir polímeros biodegradables por lo que los sustratos, medios y procesos que se utilizan para su obtención, también deben de ser de origen natural.

La obtención de este ácido se hace a través de la fermentación de diferentes sustratos con hongos de la familia *Aspergillus*, que se describirá a continuación. Ya se ha conocido la estructura química del ácido por lo cual es preciso detallar los distintos procesos de obtención.

II.1 Obtención mediante *Aspergillus terreus*

Por sus características, que se mencionan a continuación, el hongo denominado *Aspergillus terreus* es ideal para producir el ácido.

Características

Es un hongo telúrico que contribuye a la descomposición de la materia orgánica debido a sus actividades celulolíticas, lipolíticas y amilolíticas [17].

A. terreus pertenece al grupo *A. flavipes* con una distribución en todo el mundo, es la especie más comúnmente aislada de los suelos de cultivo, pero también ocurre en suelos no cultivados.

Muy a menudo se encuentra bajo climas tropicales y subtropicales como un contaminante en los sitios de almacenamiento de alimentos. Este hongo se ha aislado de diversos sustratos y hábitats, tales como:

- La madera (madera seca, la madera expuesta al agua de mar)
- Acondicionadores de aire
- Cuero
- Heces humanas frescas
- Materia vegetal en descomposición

- Materiales sintéticos (plastificantes)
- Nidos de aves
- Papel (papel y pasta de papel)
- Polvo atmosférico
- Productos alimenticios (granos almacenados, cereales, patatas, frutas y frutos secos, aceite de coco, especias, productos refrigerados, etc.)
- Suelo (cultivado o no)
- Textiles (fibras vegetales)
- Este microorganismo tiene la capacidad de crecer con rapidez, excretar gran número de enzimas, y su biomasa en forma de micelio puede separarse con facilidad de los caldos de cultivo.

En la figura II.1 se observa una toma microscópica del microorganismo.

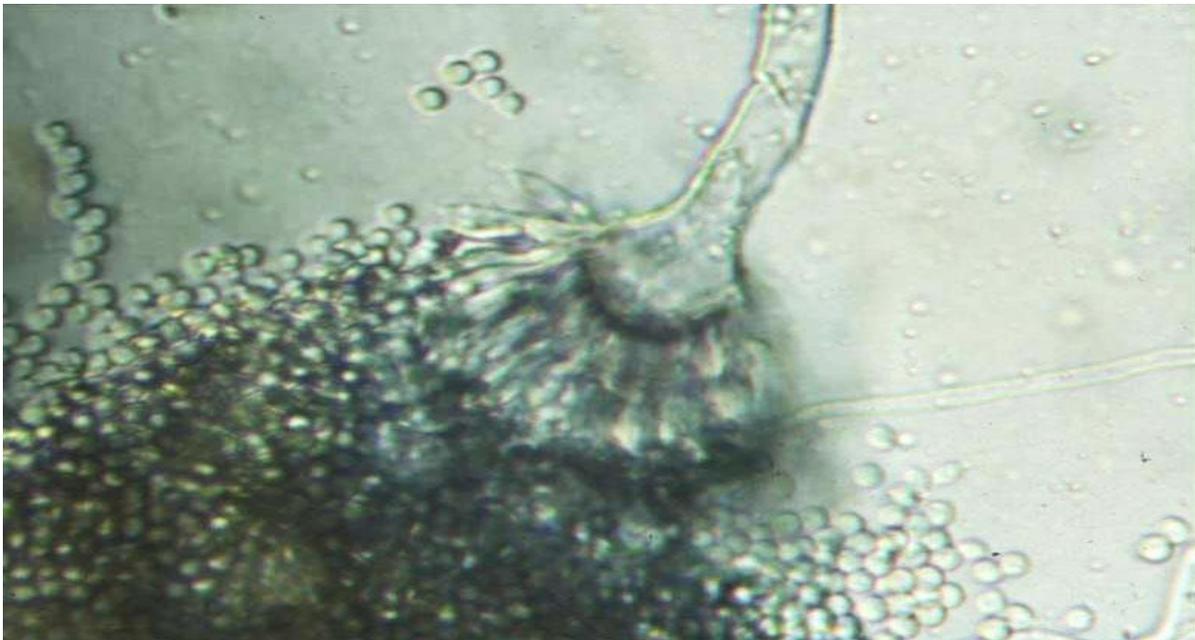


Figura II.1: Aspergillus Terreus visto al microscopio. [17]

Es también capaz de producir las siguientes enzimas:

- Lipasa(s)
- Fosfatasa(s)
- Fitasa(s)

El cultivo de micro hongos filamentosos [18] se lleva a cabo principalmente en un medio líquido que contenga los nutrientes necesarios para asegurar su crecimiento. Algunos de los factores que intervienen para su correcto desarrollo son: nivel de oxígeno, grado de humedad y pH adecuados.

El género *Aspergillus* comprende alrededor de 180 especies, son hongos filamentosos, hialinos y ubicuos.

Las colonias fúngicas formadoras producen zonas amarillas (0.5-1.5 cm) debido a la formación de ácido. Para el aislamiento de *Aspergillus* se utiliza un medio de cultivo que se prepara a partir de infusión de papa y dextrosa donde crece rápidamente.

El micelio es de color amarillo brillante y produce cabezas de conidios de color café oscuro. Las cabezas de los conidios tienen forma de globos. La estructura morfológica se muestra en la figura II.2.

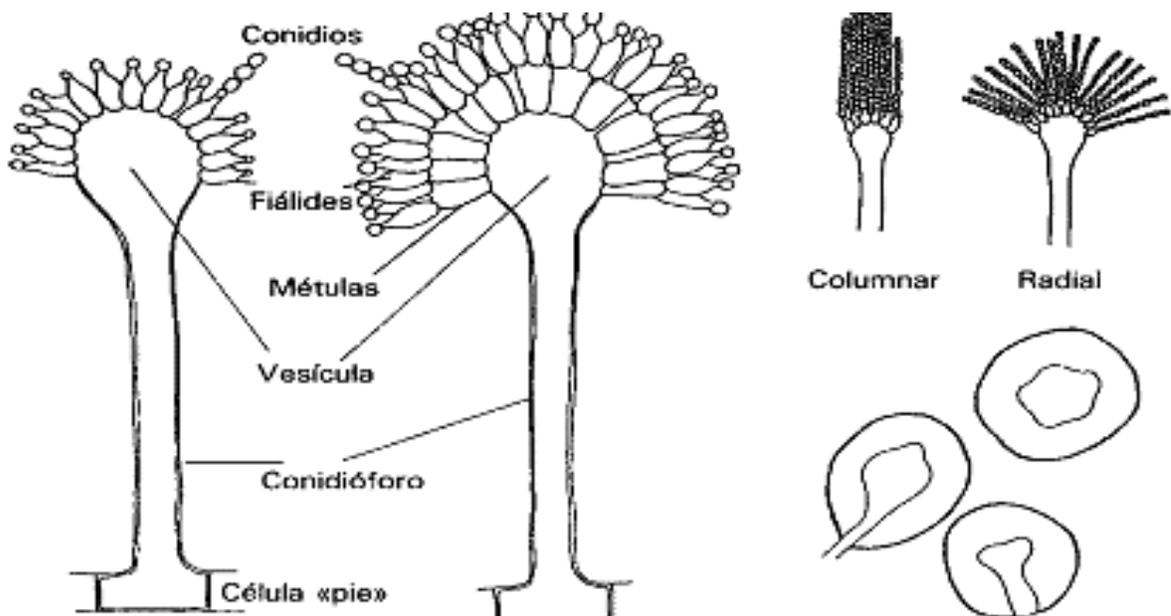


Figura II.2: Estructura Morfológica en *Aspergillus*. [18]

Existe una cepa en especial de *Aspergillus terreus* de las más utilizadas para la producción de ácido itacónico, que se ha sometido a diferentes estudios. Se trata de la cepa MJL05 [19].

Producción. En particular se presenta un fragmento de la investigación realizada por M. I. Juy et al. [19], en la cual la producción de ácido itacónico (AI) con *Aspergillus terreus* MJL05 se realizó por fermentación en lote para estudiar el efecto de la variación de las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono en el medio de producción.

El glicerol fue utilizado como la fuente de carbono y lo reporta como un sustrato eficiente para obtener altas productividades de AI.

Las condiciones ideales que se mencionan son: la temperatura (30-40°C), aireación continua, bajo pH de inicio (3-5), bajo pH operativo (2.2 a 3.8), altas concentraciones de glucosa (10-20%), suficiente nitrógeno, alta concentración de sulfato de magnesio (0.5%), bajo contenido de fosfato para limitar el crecimiento del micelio y adecuados niveles de trazas de metales como zinc, cobre y hierro.

En el mismo trabajo se utilizó *Aspergillus terreus* NRRL 1960 es una cepa para optimizar el proceso de fermentación. El crecimiento del micelio es sensible a la limitación de fosfato y de carbono y la disponibilidad de nitrógeno.

La glucosa y el glicerol se reportaron como sustratos adecuados para la producción de ácido itacónico, aunque los rendimientos observados y productividades del proceso eran estrictamente dependientes de la cepa seleccionada, las condiciones ambientales y la formulación del medio cultivo.

El objetivo principal de este trabajo fue mostrar el efecto de las relaciones de concentración de C: N, C: P y N: P presentes en los caldos de fermentación. Además se evaluaron rendimiento y productividad de *A. terreus* MJL05 a través de fermentación batch en cultivo sumergido con glicerol como sustrato de carbono. He aquí la descripción de los materiales que se usaron para este trabajo. [19]

Microorganismo. La cepa MJL05 de *Aspergillus terreus* fue aislada de las tierras de Vendée. El cultivo se mantuvo en tubos inclinados de agar de malta a 5°C y se cultivaron cada mes.

Inóculo. *Aspergillus terreus* MJL05 se inoculó en una placa de agar de extracto de malta y se incubó a 30°C hasta que se obtuvo la esporulación. Se obtuvo una suspensión de esporas por lavado de las cajas de Petri con 10 mL de solución salina estéril.

Los matraces Erlenmeyer que contenían 100 mL de medio M1 se inocularon con una alícuota de la suspensión de la spora concentrada a fin de obtener 5×10^7 esporas/mL en el medio de producción.

Los matraces se agitaron a 200 rpm a 30°C durante 24 h en un agitador orbital. Los “pellets” resultantes se utilizaron como inóculos para los ensayos de fermentación por lotes.

La composición de los medios de cultivo se muestra en la tabla II.1

Tabla II.1
Composición de los medios de cultivo. [19]

Medio de cultivo.	Composición (g/L)
M1	Glucosa 100.0, MgSO ₄ •7H ₂ O 2.0, CuSO ₄ •5H ₂ O 0.01, KH ₂ PO ₄ 0.2, NH ₄ NO ₃ 5.0, CaCl ₂ 2.0
M2	Glicerol 100.0, MgSO ₄ •7H ₂ O 2.0, CuSO ₄ •5H ₂ O 0.01, KH ₂ PO ₄ 0.2, NH ₄ NO ₃ 5.0, CaCl ₂ 2.0
M2a	Glicerol 90.0, KH ₂ PO ₄ 1.25, NH ₄ NO ₃ 1.0
M2b	Glicerol 90.0, KH ₂ PO ₄ 1.25, NH ₄ NO ₃ 3.0
M2c	Glicerol 90.0, KH ₂ PO ₄ 0.90, NH ₄ NO ₃ 3.0
M2d	Glicerol 120.0, KH ₂ PO ₄ 0.90, NH ₄ NO ₃ 5.0
M2e	Glicerol 105.0, KH ₂ PO ₄ 0.90, NH ₄ NO ₃ 6.5

En la tabla II.2 se muestran los distintos medios de cultivo, las relaciones de los elementos: carbono con nitrógeno y fósforo; además nitrógeno con fósforo, así como los resultados obtenidos.

Tabla II.2

Influencia de la relación C:N, C:P y P:N sobre la producción Ácido Itacónico. [19]

Medio de Cultivo	C:N	C:P	N:P	% Fuente de Carbono consumida	A. Itacónico (g/L)	Biomasa (g/L)
M1	23	888	38.8	30	13.00	3.47
M2	22	866	38.8	41	17.83	8.50
M2a	101	126	1.25	45	11.00	6.29
M2b	33	126	3.8	50	19.14	15.19
M2c	33	168	5	51	26.11	8.63
M2d	27	223	8.3	70	25.50	15.53
M2e	18	195	10.8	61	27.60	16.76

Como se observa en los resultados de este experimento, la producción de ácido itacónico con *Aspergillus terreus* MJL05 fue dependiente de las condiciones ambientales como temperatura y humedad, así como de la formulación de los medios de cultivo.

El proceso de fermentación para obtener ácido itacónico funciona mejor en condiciones de crecimiento limitado de fosfato pero también es necesario para mantener la relación de concentración N: P entre 5 a 10 para mejorar la producción del ácido.

Se pueden mejorar los rendimientos obtenidos en el trabajo de M. I. Juy et al. [19], como mencionan, cambiando el sistema de cultivo de alimentación por lotes y/o continuo; estos resultados pueden considerarse relevantes para formulaciones de caldos con diferentes relaciones de concentración de C:N, C:P y N:P, a fin de aumentar no sólo la concentración de ácido itacónico si no también los rendimientos del proceso.

Se debe considerar que este trabajo fue realizado a escala laboratorio razón por la cual para poder extrapolarla a una planta piloto o a escala industrial, se deben tener consideraciones importantes para las condiciones de operación sobre todo por el tamaño de los equipos así como las cantidades de materia prima que se utilizarían.

Una vez conocidas las condiciones en las cuales es favorable la producción del ácido se procede a mostrar, en la figura II.3, un diagrama de bloques en el cual se enlistan las etapas del proceso.

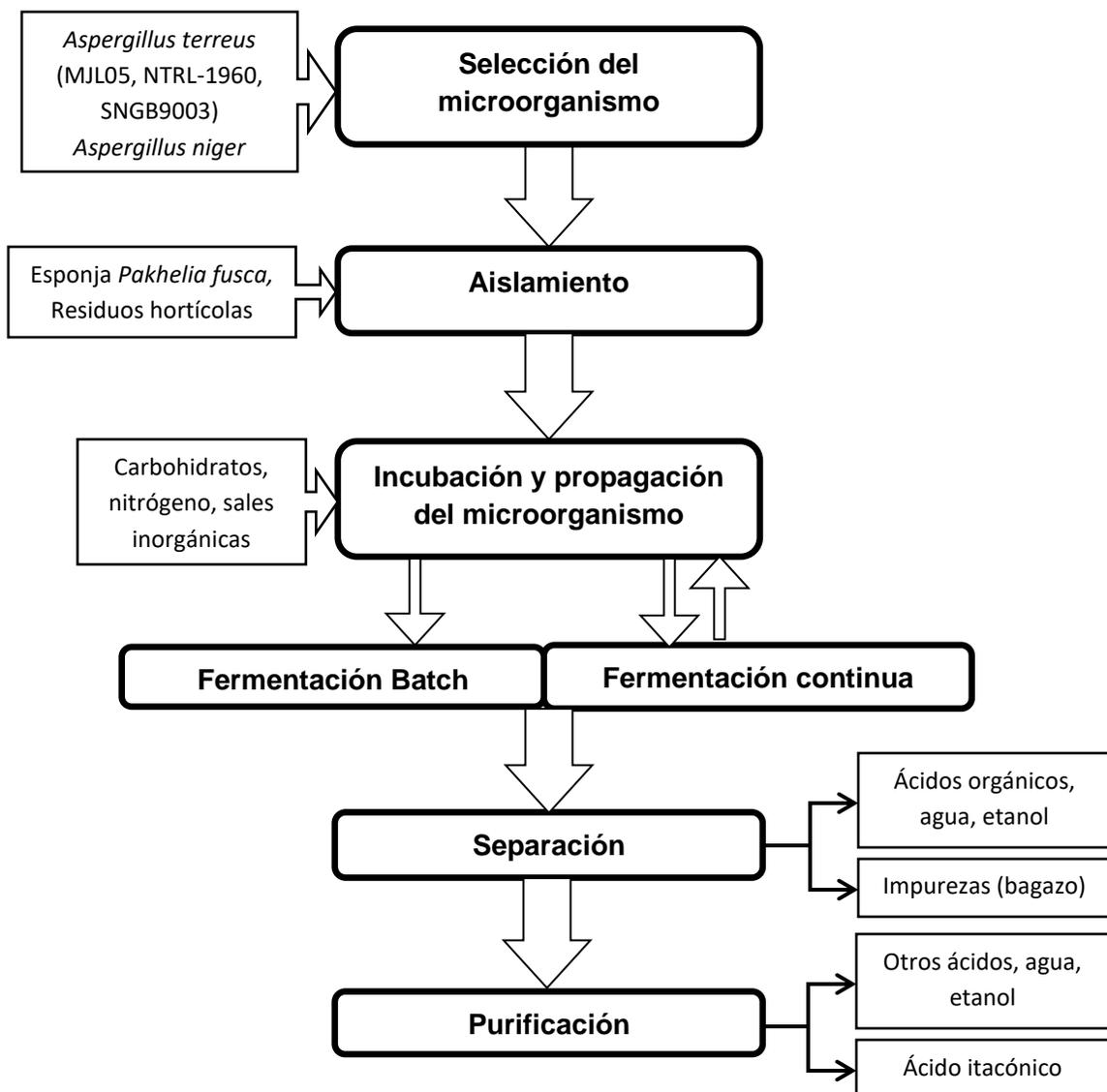


Figura II.3: Diagrama de bloques para la producción de ácido itacónico a partir de *Aspergillus terreus*. [21]

Cada una de estas etapas se describen a continuación y se presentan algunas consideraciones importantes que se deben tomar en cuenta para llevar a cabo una exitosa obtención éste ácido.

Selección del microorganismo. [21] Se sabe que existen distintos tipos de especies de *Aspergillus* como lo son *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* para la producción de ácido itacónico, a la vez de ellas se tienen distintos tipos de cepas, razón por la cual a partir de ensayo y error se determina la mejor cepa para proceder a su aislamiento.

Como se mostró en el trabajo de M. I. Juy et al., una de las mejores cepas para la obtención es la MJL05, aunque también se han usado otro tipo de cepas como la llamada NRRL 1960.

Aislamiento. Puede ser aislado a través de la esponja *Pakhelia fusca*. También ha sido aislado de muestras de suelo de zonas industriales de producción de aceite de palma y a partir de residuos hortícolas.

Incubación y propagación de microorganismos. La patente US 003873425 [20] indica que la incubación del microorganismo debe darse en un medio de cultivo con las siguientes características:

- Una fuente de azúcar
- Una fuente de nitrógeno
- Sales inorgánicas

Segura, A. [21] reporta las siguientes concentraciones:

- Glucosa: 60 g/L
- Nitrato de amonio: 4.0 g/L
- Fosfato de magnesio: 0.04 g/L

En cuanto a los sustratos, en la figura II.4 se muestra una gráfica del rendimiento que tienen algunos en el proceso de producción del ácido itacónico.

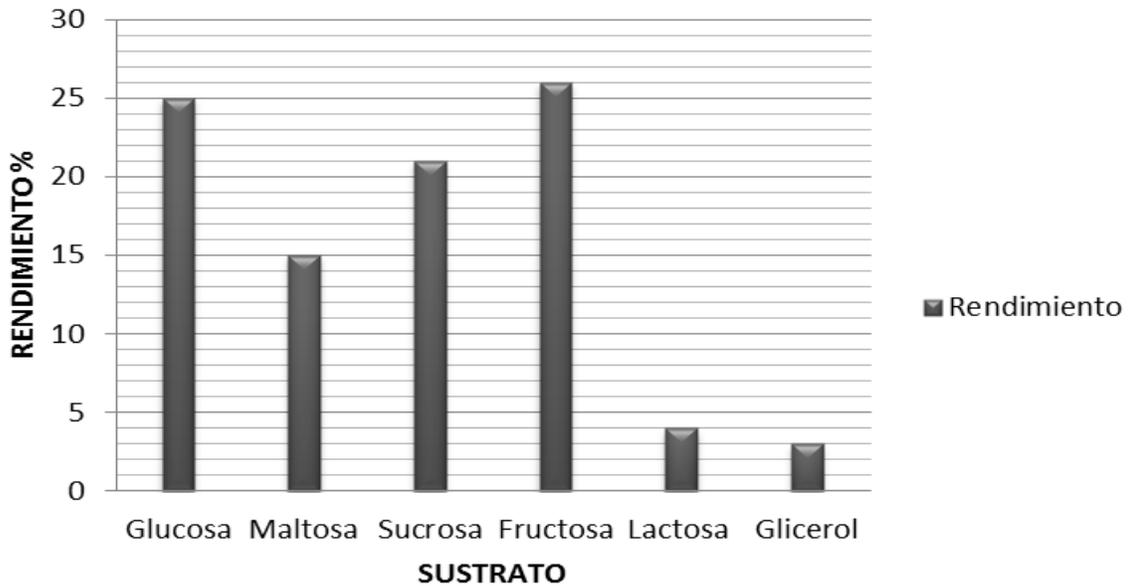


Figura II.4: Gráfica de rendimiento de AI utilizando diferentes sustratos de carbono. [21]

En la gráfica anterior se observa que los sustratos con mayor rendimiento para la producción de ácido itacónico son la glucosa y fructosa con 25 y 26% respectivamente.

Fermentación. Se consumen 1.5 moles de oxígeno por cada mol producido de ácido itacónico. Se recomienda aireación de baja intensidad con aire enriquecido de oxígeno. De preferencia utilizar un fermentador tipo Air Lift para alcanzar mayores tasas de producción debido a una reducción del estrés hidromecánico de la agitación.

Cabe destacar que el proceso de fermentación se puede realizar por lotes o en un tipo de producción continua de las cuales se mencionan a continuación algunas consideraciones importantes.

Fermentación Batch. Respecto a los tiempos y tipos de proceso, en el proceso de fermentación intermitente se debe tener claro que se debe prolongar el tiempo de fermentación lo suficiente para que la concentración de azúcar en el medio de cultivo sea inferior a 0.5%.

Fermentación continua. La consideración importante en este caso es que se puede hacer recirculación del medio de cultivo para rescatar el azúcar residual que no sea aprovechada por los microorganismos en la primera alimentación.

Separación y purificación del producto. A valores bajos de pH, el ácido itacónico puede ser fácilmente cristalizado por enfriamiento o por evaporación con posterior cristalización y filtrado.

En este proceso no se remueve los subproductos que contaminan y disminuyen la calidad del producto final por lo que es necesario adicionar un proceso de purificación.

La selección del método más adecuado de separación y purificación depende en gran parte de las condiciones finales del proceso (subproductos no deseados y las propiedades fisicoquímicas).

Segura, A. [21] encontró que el rendimiento obtenido varía de acuerdo a la especie de microorganismo, como se presenta en la tabla II.3.

Tabla II.3

Rendimiento de ácido itacónico usando diferentes especies de hongos. [21]

Proceso	Rendimiento (g/L)
<i>Aspergillus terreus</i> optimizado	86
Al inicio de la fermentación con <i>A. terreus</i>	24-27
Fermentación empleando <i>Ustilago</i>	53
Fermentación empleando <i>Candida</i> (diferentes especies)	35
Fermentación empleando <i>Tseudozyma antártica</i>	30

Para una producción exitosa de ácido itacónico, *A. terreus* es cultivado a altas concentraciones de sustrato y en condiciones limitadas de fosfato. Es posible obtener altas tasas de producción en cultivo continuo con células inmovilizadas de *A. terreus* sin incluir nitrógeno.

Aunque la limitación de nitrógeno o de fosfato induce diferentes estados metabólicos, ambas situaciones son formas viables para provocar la formación de ácidos orgánicos y el consumo de energía.

Respecto al pH óptimo, se recomienda un pH de 3 para aumentar la transferencia de oxígeno y por tanto el crecimiento de la biomasa. [21]

II.2 Sustratos usados para la obtención

La glucosa y el glicerol son algunos de los principales sustratos para la obtención del ácido como se describió anteriormente. Existen “desechos orgánicos”, por llamarlos así, que son ricos en estas sustancias y pueden ser aprovechables.

En las investigaciones de Huang, et al. [22], Omojasola, et al. [23] y Carabalí, D. [24] se mencionan sustratos que van desde el jugo de caña de azúcar hasta la cáscara de camote, por mencionar algunos ejemplos.

Se presentan fragmentos de estas investigaciones con el fin de ejemplificar la gran variedad de materias primas a través de las cuales se puede obtener el ácido itacónico, dejando en claro que no son las únicas.

Mediante un proceso de fermentación se pueden utilizar una gran diversidad de materias primas que contengan los elementos necesarios para la nutrición y desarrollo de los ya tan mencionados hongos *Aspergillus*.

Cabe destacar que el jugo de caña de azúcar y el almidón de maíz se han implementado como sustrato para el proceso de obtención a escala industrial. Otros como la cáscara de camote están aún en fase de investigación para su posible aplicación industrial [23].

De almidón de maíz licuado

El rendimiento de ácido itacónico más alto se obtiene cuando se utiliza glucosa como sustrato, sin embargo, es costoso utilizarla como materia prima en la producción comercial. El almidón de maíz es una de las mejores fuentes de carbono, ya que es puro, relativamente barato, y estable [22].

El almidón de maíz sin procesar no se puede utilizar directamente para la producción de ácido itacónico por *A. terreus* debido a la gelatinización producida por la esterilización con calor. La producción de ácido itacónico a partir de almidón de maíz crudo incluye principalmente tres pasos: hidrólisis enzimática (o química) de almidón de maíz en un jarabe rico en glucosa, la fermentación y la recuperación del ácido.

La hidrólisis enzimática de almidón de maíz implica dos pasos: la licuefacción en el que el almidón de maíz es procesado por α -amilasa alrededor de 106°C y sacarificación donde el almidón licuado se hidroliza con glucosa por glucoamilasa a 60°C, que consume mucho tiempo y energía.

Aunque existen una gran cantidad de estudios sobre la producción de ácido itacónico a partir de hidrolizados de almidón, no se tiene información sobre la producción directa de ácido itacónico a partir de almidón crudo o licuado o soluble de *A. terreus*.

En su lugar, Kirimura et al. [22] generaron una cepa fusionada de *A. terreus* y *A. usarii* (un productor de glucoamilasa) que logró un máximo de 35.9 g/L de ácido itacónico de almidón soluble en el día 6 de cultivo, cuya productividad era cinco veces mayor que la de la cepa parental *A. terreus*. Sin embargo, la concentración de ácido itacónico es baja y el tiempo de fermentación es demasiado largo, por lo que no es adecuado para la producción industrial de ácido itacónico.

Además, como mencionan Huang, et al. [22], la adición de glucoamilasas es beneficiosa para la producción enzimática de ácido itacónico usando almidón licuado como el material de partida.

Existe la posibilidad de manipular *A. terreus* genéticamente para producir directamente el ácido itacónico a partir de almidón licuado a través de la integración de la sacarificación y fermentación en un solo paso, lo que se lograría mediante la sobreexpresión de glucoamilasa de *A. terreus*, de esta manera, la producción de ácido itacónico se puede realizar a partir de almidón licuado de manera directa.

Para lograr este objetivo, se requieren al menos tres partes biológicas:

- 1.-Un promotor eficiente para la sobreexpresión de la glucoamilasa en *A. terreus*.
- 2.- Un gen de glucoamilasa apropiado.
- 3.- Un péptido señal apropiado para la secreción de alto nivel de la glucoamilasa sobre expresada.

Los promotores constitutivos que no dependen de la fuente de carbono o nitrógeno o los inductores específicos, y los nativos que son más eficientes en la dirección de la expresión de genes que los heterólogos, son los preferidos para la ingeniería genética.

Hasta el momento, la única investigación de un promotor nativo de *A. terreus* es el promotor *gpd*, que ha sido aplicado con éxito en la conducción de *vgb* (el gen de la hemoglobina *Vitreoscilla*) para la sobreexpresión en *A. terreus*.

Huang et al. [22] mencionan que *PgpdA* de *A. nidulans* es el promotor más frecuentemente utilizado para la modificación genética de *A. terreus*.

Debido a que la citrato sintasa está estrechamente relacionada con el ácido cítrico precursor de itaconato y juega un papel importante en la biosíntesis de ácido itacónico, se espera que el promotor de la citrato sintasa de *A. terreus* constitutivo, fuerte y nativo bajo las condiciones de producción de ácido itacónico.

Se sabe que *A. niger* es un excelente productor de glucoamilasa, y puede secretar glucoamilasa en cantidades menores a 10 g/L. La glucoamilasa de *A. niger* se ha comercializado y a menudo se utiliza para la sacarificación.

Debido a que las glucoamilasas necesitan ser secretadas fuera de las células para la sacarificación eficaz de almidón licuado, la elección de los péptidos-senal apropiados es esencial para la secreción de alto nivel de glucoamilasas sobre expresadas.

En la investigación de Huang et al. [22], la producción directa de ácido itacónico a partir de almidón licuado por *A. terreus* se logró mediante la sobreexpresión de glucoamilasa de *A. niger*, bajo el control del promotor de la citrato sintasa nativa, y la concentración de itaconato ha mejorado aún más mediante el uso del péptido señal nativo de glucoamilasa y la optimización de las condiciones de fermentación.

En el mismo trabajo se utiliza un proceso de fermentación en dos etapas, el rendimiento de ácido itacónico del mejor productor genéticamente modificado alcanzó 77.6 g/L con el almidón de maíz licuado, que es comparable al nivel de producción de los hidrolizados de almidón sacarificado en la industria.

Por lo que con base en lo anterior, Huang et al. [22] establecieron que es factible la producción directa de ácido itacónico a partir de almidón de maíz licuado.

De cáscara de camote

Las grandes cantidades de residuos agrícolas y agroindustriales que se generan de diversas prácticas en el campo y en la industria representan uno de los recursos energéticos más importantes. La acumulación de esta biomasa en grandes cantidades cada año resulta no sólo en el deterioro del medio ambiente, sino en una pérdida de materiales potencialmente valiosos que pueden ser procesados para producir un cierto número de valor añadido por productos como el alimento y la variedad de productos químicos.

Generalmente consiste en polisacáridos que podrían convertirse en valiosos azúcares fermentables para la producción de ácidos orgánicos. Uno de estos productos es la cáscara de camote, término hispano que en México se le da a la papa dulce, que generalmente se desecha, se utiliza como abono natural o alimento para animales de granja.

Por otra parte, muchos microorganismos poseen la capacidad de convertir los carbohidratos en ácidos orgánicos de alto rendimiento, sin embargo, los hongos son los más utilizados en la fermentación debido a su capacidad para crecer a pH y

contenido de humedad bajos, alta tolerancia a los ácidos, capacidad para formar hifas que penetran en los sustratos y capacidad para producir diversas enzimas para la conversión de diferentes desechos en productos útiles.

La papa dulce (*Ipomoea batatas*) o camote es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia *Convolvulaceae*. Sus raíces son grandes, almidonadas, de sabor dulce y tuberosas, las hojas y los brotes jóvenes a veces se comen verdes, además tienen un alto contenido de carbohidratos. Todos los tipos de papas proporcionan carbohidratos complejos en forma de almidón y fibra.

. En la investigación que hicieron Omojasola et al. [23] los objetivos son:

- Valorar y usar los residuos del camote como sustrato celulósico para la producción de ácido itacónico a través de la fermentación.
- Analizar la capacidad de *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* para fermentar la cáscara del camote.
- Establecer las condiciones para una producción óptima.

Para realizar las pruebas, los camotes se lavaron y luego, se separó la cáscara y se secaron a temperatura ambiente. La muestra se trituró, después de lo cual se mantuvo en un desecador hermético con algunas bolsas de gel de sílice para evitar la absorción de humedad.

La cáscara de camote (SPP) se pre-trató utilizando el método de hidrólisis alcalina. La Carboximetilcelulosa (CMC) sirvió como control. Los organismos de ensayo utilizados fueron *Aspergillus niger* (ATCC 16404) y *Aspergillus terreus* (ATCC 20542). Se mantuvieron en agar de dextrosa y papa (PDA); se produjeron inóculos de esporas fúngicas suspendiéndolas en agua destilada estéril y ajustándose a aproximadamente $2.6 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ y $3.7 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ de *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* respectivamente. Después de la preparación anterior Omojasola et al. [23], llevaron a cabo su experimentación como se describe el diagrama de bloques de la figura II.5.

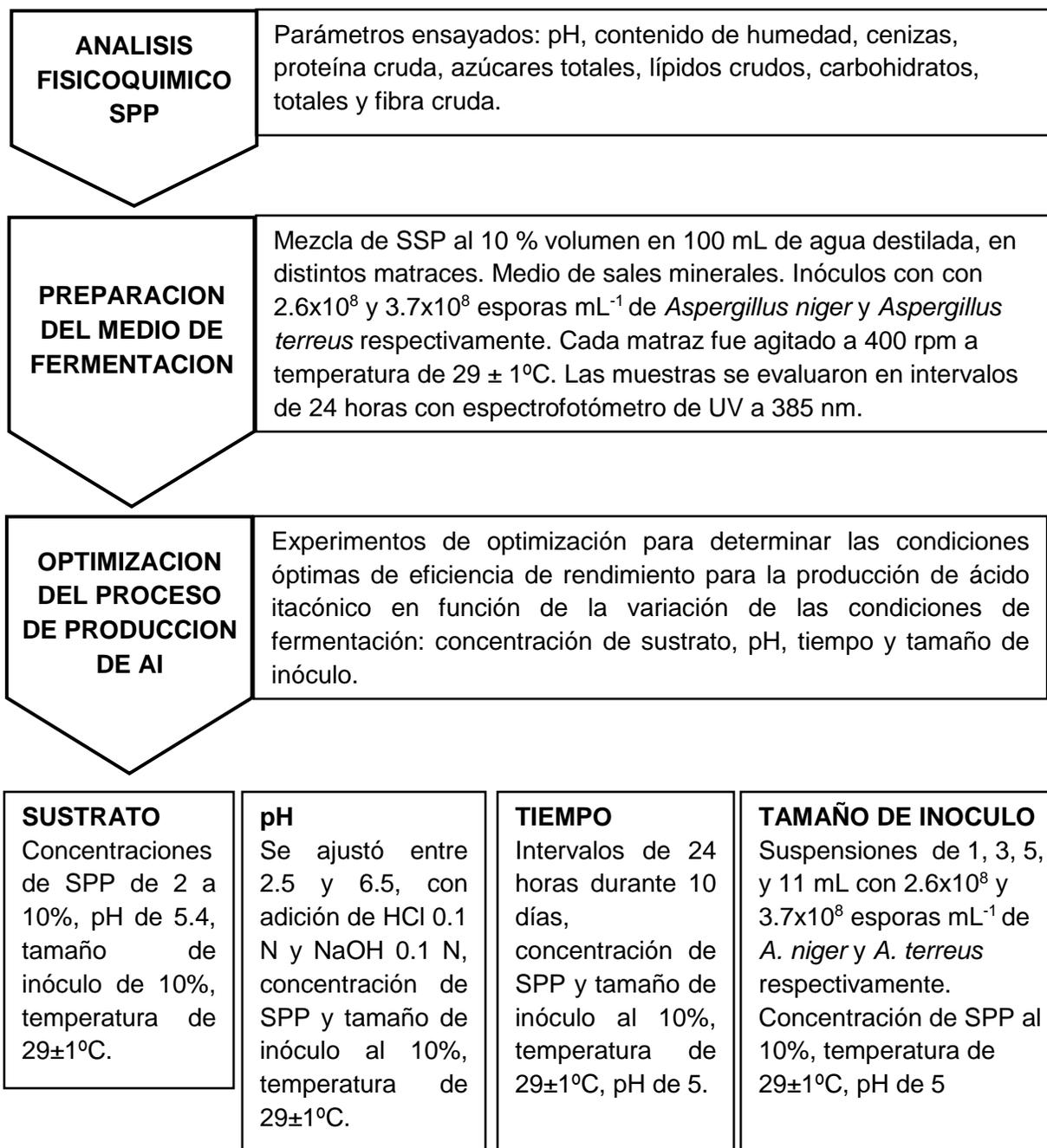


Figura II.5: Diagrama de bloques de la experimentación de Omojasola et al. [23] acerca de la obtención de ácido itacónico.

En la tabla II.4 se muestran los rendimientos obtenidos previos a la optimización del proceso de obtención. El día 5 de fermentación es cuando se obtienen los mayores rendimientos 55.00 ± 2.2 y 47.33 ± 3.0 para *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* respectivamente.

Tabla II.4

La fermentación de cáscara de camote por *A. terreus* y *A. niger* para la producción de ácido itacónico. [23]

Organismo analizado	Cantidad de ácido producido (g/L)		
	Periodo de fermentación (días)		
	2	5	10
<i>Aspergillus niger</i>			
Cáscara de camote	26.00±2.1	55.00±2.2	16.00±1.2
CMC	7.00±0.8	16.67±1.2	9.33±0.9
<i>Aspergillus terreus</i>			
Cáscara de camote	20.00±1.7	47.33±3.0	15.00±1.7
CMC	6.67±0.5	10.67±4.3	3.00±0.3

Parámetros de fermentación: concentración de sustrato 10%, pH de 5.4, tamaño de inóculo 10 mL y temperatura de 29±1°C

Los resultados de los experimentos de variación de las condiciones antes mencionados se presentan en las tablas II.5 a la II.8. Con la variación del tiempo de fermentación, la producción de ácido itacónico incrementó constantemente hasta un rendimiento máximo de 67.67±1.2 y 70.67±2.6 g/L en el día 5 (tabla II.5).

Tabla II.5

Efecto de la variación del tiempo en la fermentación de cáscara de camote por *A. terreus* y *A. niger* para la producción de ácido itacónico. [23]

Periodo de Fermentación (días)	Ácido itacónico g/L			
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus terreus</i>	
	SPP	CMC	SPP	CMC
1	16.33±1.8	3.00±1.2	22.33±1.9	2.67±1.2
2	20.33±1.5	8.00±1.2	32.33±1.5	8.67±1.5
3	26.33±1.5	16.67±1.2	49.33±3.0	13.33±0.9
4	30.00±2.1	22.67±1.8	63.67±2.3	21.00±0.6
5	67.67±1.2	30.00±0.6	70.67±2.6	29.00±1.7
6	59.00±2.1	24.00±1.5	59.33±1.2	20.00±0.6
7	48.33±1.5	14.67±0.9	50.00±2.1	15.33±1.5
8	40.67±2.2	11.33±0.9	33.33±2.4	10.00±0.6
9	27.67±1.2	7.00±0.6	21.33±1.4	5.67±1.8
10	17.67±1.5	4.67±1.3	15.00±1.7	1.67±0.6

SPP: cáscara de camote, CMC: carboximetilcelulosa. pH: 5.4, tamaño de inóculo: 10 mL.

Tabla II.6

Efecto de la variación de la concentración de sustrato en la fermentación de cáscara de camote por *A. terreus* y *A. niger* para la producción de ácido itacónico. [23]

Sustrato	Concentración de sustrato (% w/v)					
	0	2	4	6	8	10
<i>Aspergillus niger</i>						
Cáscara de camote	0	54.33±2.9	67.67±1.2	73.33±3.3	81.67±2.7	96.00±4.0
CMC (control)	0	11.00±1.2	15.00±1.2	17.33±1.8	20.00±2.3	23.33±3.3
<i>Aspergillus terreus</i>						
Cáscara de camote	0	56.00±2.1	65.00±1.5	81.33±1.5	90.00±1.7	104.67±3.2
CMC (control)	0	16.33±1.2	18.00±1.5	21.33±0.9	23.67±1.8	26.00±2.1

Tiempo: 5 días, pH: 5.4, tamaño de inóculo: 10 mL

Tabla II.7

Efecto de la variación de pH en la fermentación de cáscara de camote por *A. terreus* y *A. niger* para la producción de ácido itacónico. [23]

Sustrato	pH						
	2.5	3.5	4	4.5	5	6	6.5
<i>Aspergillus niger</i>							
Cáscara de camote	48.33±2.9	56.33 ±3.7	96.67±5.7	62.00±2.9	46.00±3.2	37.00±1.7	31.67±1.8
CMC (control)	17.00±2.1	19.33±2.9	24.33±3.3	21.00±2.3	15.00±1.8	13.00±1.5	11.00±1.2
<i>Aspergillus terreus</i>							
Cáscara de camote	59.00±1.2	83.00±3.2	167.00±3.9	65.00±3.6	57.33±2.6	48.00±1.7	40.00±0.6
CMC (control)	18.00±1.2	22.00±2.1	26.67±4.1	21.33±1.8	18.00±2.1	14.00±1.5	10.33±1.2

Tiempo: 5 días, tamaño de inóculo: 10 mL.

Tabla II.8

Efecto de la variación de tamaño de inóculo en la fermentación de cáscara de camote por *A. terreus* y *A. niger* para la producción de ácido itacónico. [23]

Sustrato	Tamaño del inóculo (mL)			
	1	3	5	11
<i>Aspergillus niger</i>				
Cáscara de camote	38.00±1.2	49.33±0.9	77.33±1.5	53.00±1.2
CMC (control)	15.00±1.2	18.00±1.5	23.33±2.1	20.67±1.2
<i>Aspergillus terreus</i>				
Cáscara de camote	56.00±2.1	66.67±2.9	88.33±4.3	75.33±2.2
CMC (control)	17.67±1.5	20.00±2.1	25.33±2.1	22.00±1.5

Tiempo: 5 días, pH: 5.4.

Para la concentración de sustrato de 10 % w/v el rendimiento máximo de producción fue de 96.00 ± 4.0 y 104.67 ± 3.2 g/L (tabla II.6). La variación del pH dio como resultado que con un pH de 4 se obtuvieron los mayores rendimientos, 96.67 ± 5.7 y 167.00 ± 3.9 g/L para *A. niger* y *A. terreus* respectivamente (tabla II.7). De acuerdo con la tabla II.8, el tamaño de inóculo con mayores rendimientos fue de 5 mL, con 77.33 ± 1.5 y 88.33 ± 4.3 g/L respectivamente.

A. terreus resultó ser mejor productor de ácido itacónico que *A. niger* en casi todas las fermentaciones. Omojasola et al. [23] encontraron que *A. terreus* es un productor natural del ácido itacónico y que en estos términos se han reportado rendimientos de entre 80 y 86 g/L.

Cuando las condiciones bajo las que se obtuvieron los máximos rendimientos de producción se combinan en una fermentación optimizada (concentración de sustrato de 10 % w/v, tamaño de inóculo de 5 mL, pH de 4 por 5 días a $29 \pm 1^\circ\text{C}$), los resultados muestran un incremento en los rendimientos de ácido itacónico de 112.67 ± 5.2 y 115.67 ± 5.3 g/L para *A. niger* y *A. terreus* respectivamente (tabla II.9). Esto representa un incremento de 75.8 y 125.27 % sobre los más altos rendimientos obtenidos durante la variación de las condiciones de fermentación; además incrementos de 104.85 y 144.39 % en la fermentación final que combina todos los parámetros optimizados.

Tabla II.9

Resultados de la producción optimizada de ácido itacónico por *A. terreus* y *A. niger*. [23]

	Ácido itacónico (g/L) /días	
	2	5
<i>Aspergillus niger</i>		
Cáscara de camote	57.00 ± 2.1	112.67 ± 5.2
CMC (control)	15.00 ± 1.2	27.00 ± 1.7
<i>Aspergillus terreus</i>		
Cáscara de camote	72.33 ± 4.9	115.67 ± 5.3
CMC (control)	29.67 ± 1.5	38.33 ± 1.2

Parámetros de fermentación: concentración de sustrato: 10%; pH: 4.0; tiempo: 5 días; tamaño de inóculo: 5 mL.

En el estudio realizado por Omojasola et al., [23] se muestra que la cáscara de *Ipomoea Batatas* es un sustrato adecuado para la producción de ácido itacónico a través de *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* con base en que los organismos producen más de 100 g/L a través del sustrato de cáscara de camote (SPP), y el rendimiento está entre el 75.9 y el 66.9 % de incremento en comparación con el rendimiento a través de Carboximetilcelulosa (CMC) el sustrato de control.

Adicionalmente este rendimiento es mayor al rendimiento de 80-86 g/L que se ha reportado en otros trabajos. El potencial de este residuo derivado de la agricultura puede ser explorado en la producción industrial de ácido itacónico. [23]

Basados en el trabajo de Omojasola et al. [23], se puede decir que en los residuos de cáscara de camote derivados de la actividad agrícola, se encuentra una fuente rica en carbohidratos a través de la cual las especies de *Aspergillus* pueden obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento y así producir el ácido de interés.

Por otro lado, es importante describir el proceso de obtención de ácido itacónico a partir de jugo de caña de azúcar, uno de los sustratos más usados hasta el momento para la fermentación, que se lleva a cabo como parte del proceso de obtención del ácido itacónico.

De jugo de caña de azúcar

Como bien es sabido, la sacarosa que comúnmente se utiliza para endulzar algunas bebidas como té o café, es obtenida a partir del jugo de caña de azúcar y, como su nombre lo dice, este tipo de sustrato es rico en carbohidratos de este tipo. Se había mencionado antes que algunos azúcares así como otros carbohidratos son buenos sustratos para la nutrición de los hongos *Aspergillus*.

En la figura II.6 se muestra un diagrama de flujo del proceso de obtención del ácido itacónico en el cual se presentan las principales operaciones unitarias involucradas. Este diagrama podría utilizarse para otro tipo de sustratos.

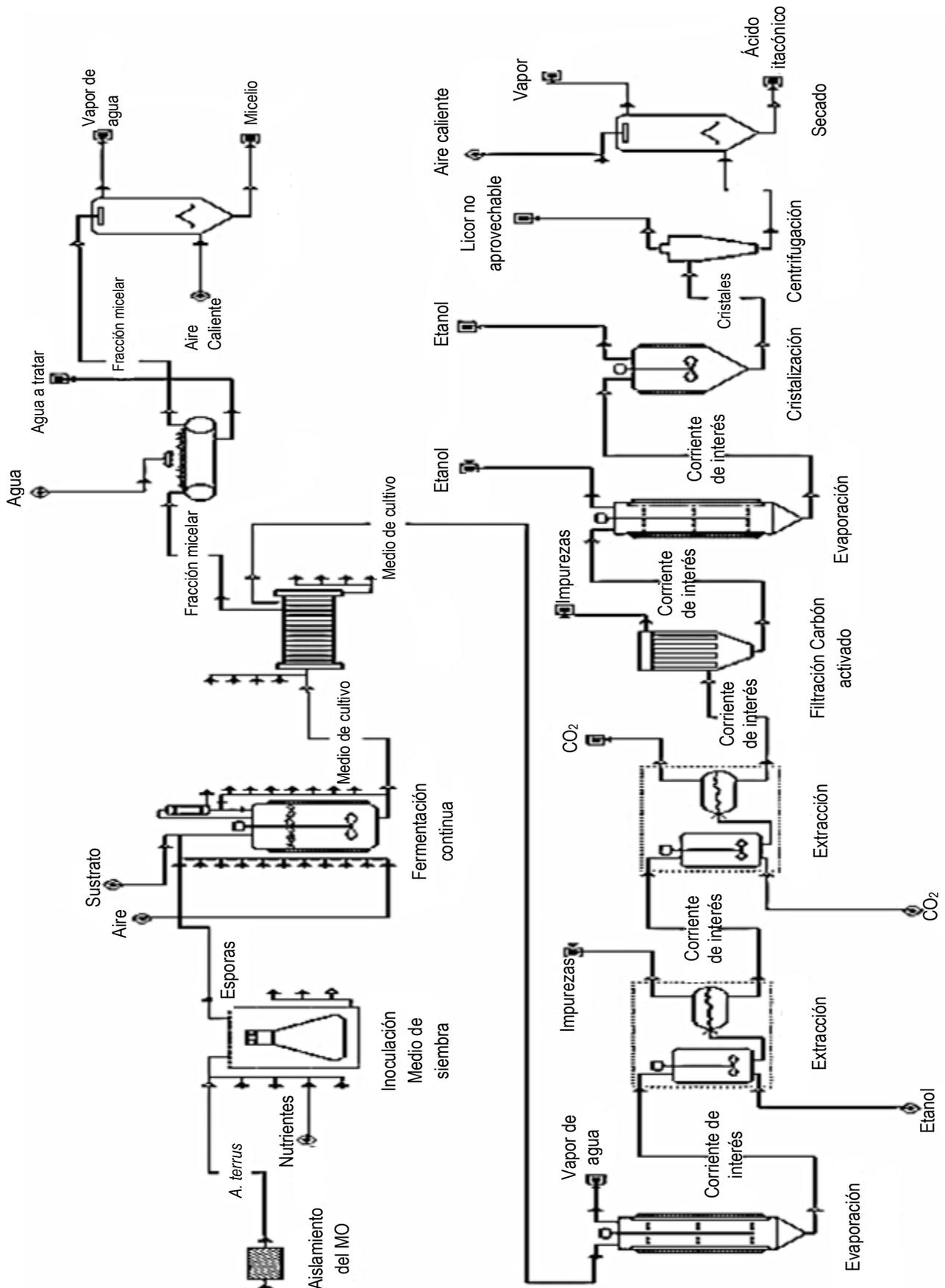


Figura 11.6: Diagrama de flujo de proceso para la obtención de ácido itacónico a partir de *Aspergillus Terreus*. [21]

Una parte interesante que se observa en el diagrama de flujo es que el micelio puede ser recuperado. Lo que permite reproducir más hongos *Aspergillus* a partir del micelio.

La mejor manera para empezar este proceso es por el tratamiento del jugo de la caña de azúcar, para eliminar contaminantes que puedan perjudicar el rendimiento de producción. Se resumen en el diagrama de bloques en la figura II.7 las operaciones unitarias que se pueden utilizar para la purificación del jugo.

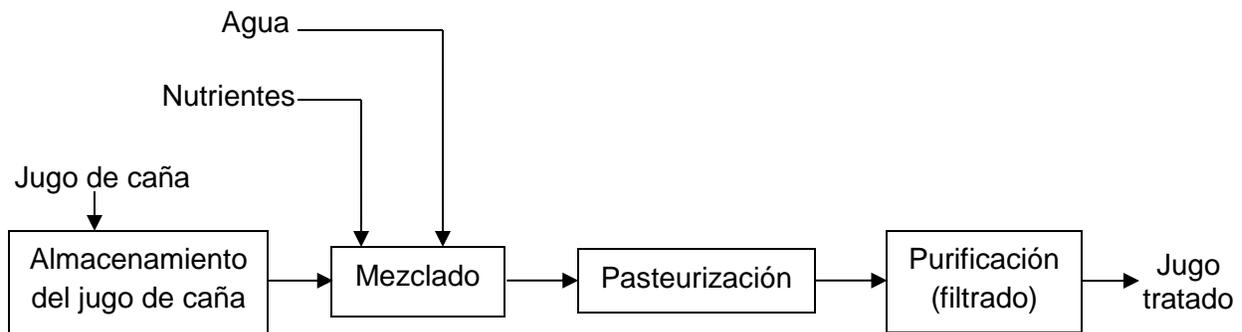


Figura II.7: Diagrama de bloques del tratamiento del jugo de caña de azúcar. [24]

Una de las operaciones importantes que suceden dentro del tratamiento del jugo de la caña de azúcar, es la adición de nutrientes. Se ha mencionado antes, que la composición del sustrato es de suma importancia, sobre todo las relaciones entre los elementos Carbono, Nitrógeno y Fósforo, que son los nutrientes necesarios para que los microorganismos crezcan, se desarrollen y produzcan el ácido de interés.

La pasteurización del jugo de caña, es también de gran importancia para evitar la contaminación del producto final causada por microorganismos indeseables. Con la pasteurización se aseguran estas condiciones en las que el jugo queda libre de microorganismos contaminantes, tales como pedazos de bagazo o algunas otras partículas que la filtración se encargará de separar.

Se muestra en la figura II.8 el diagrama de flujo de la parte correspondiente al tratamiento del jugo de caña de azúcar donde se pueden observar las operaciones antes mencionadas.

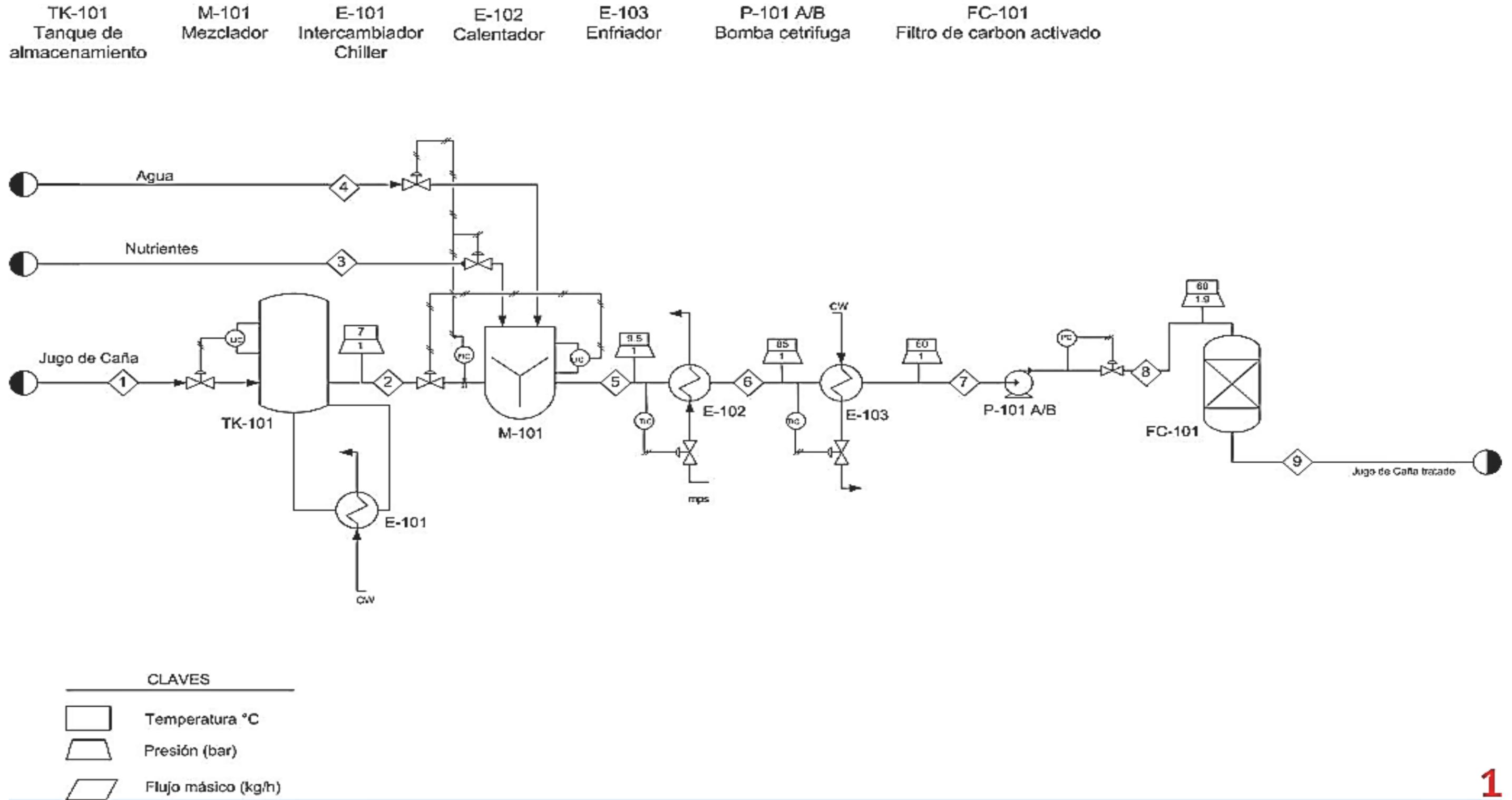


Figura II.8: Diagrama de flujo de proceso del tratamiento del jugo de caña de azúcar [24]

A continuación, en la tabla II.10 se pueden observar la composición volumétrica que se tendría en el jugo de caña de azúcar para su posterior fermentación.

Tabla II.10
Composición volumétrica del jugo de caña. [24]

COMPONENTE	%W
Agua	81.04
Sacarosa	17.58
Fructosa y Glucosa	0.48
Sólidos solubles:	
Sales inorgánicas	0.33
Sales orgánicas	0.17
Ácidos orgánicos	0.10
Otros	0.29
Compuestos fenólicos	0.0011

En la figura II.9 se muestra un diagrama de bloques que explica el proceso de fermentación y separación del micelio (*A. terreus*).

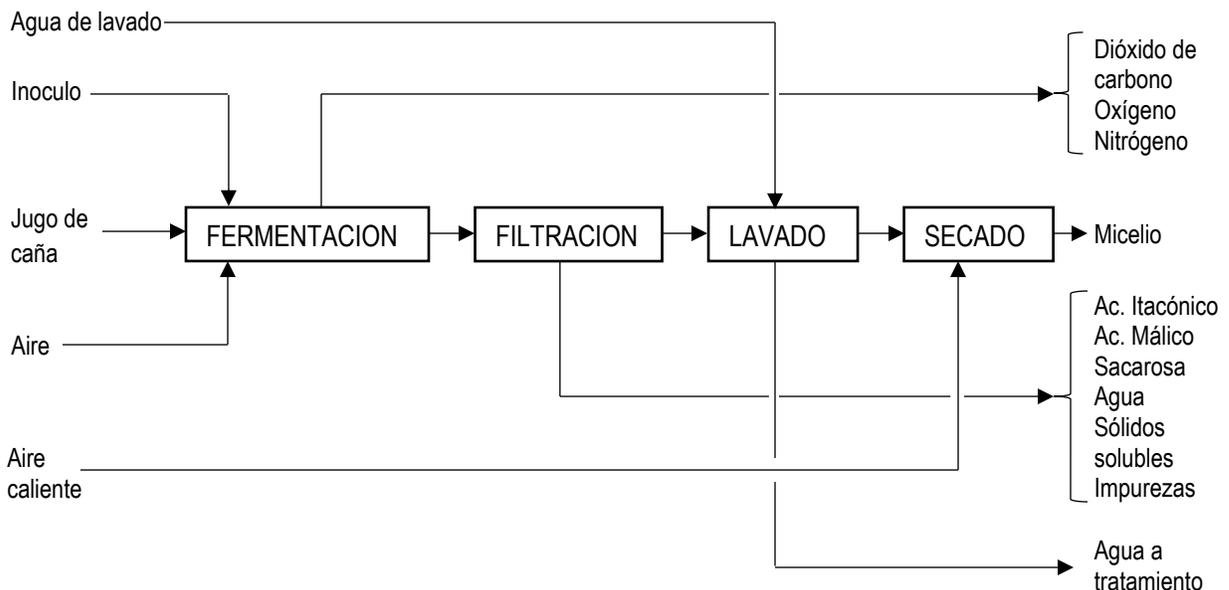


Figura II.9: Diagrama de bloques del proceso de fermentación en la producción de ácido itacónico. [24]

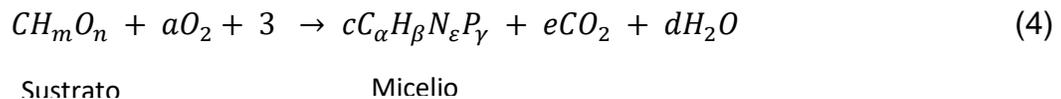
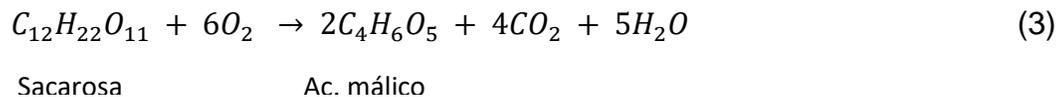
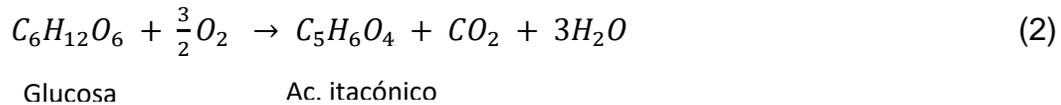
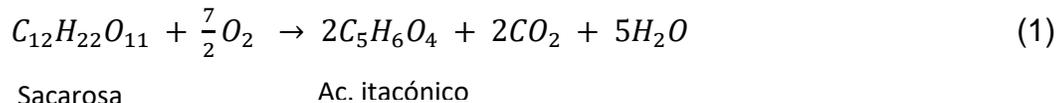
Se muestran en la tabla II.11 las condiciones de operación para la fermentación usando dos tipos distintos de cepa de *Aspergillus terreus*.

Tabla II.11

Condiciones de operación de dos distintos tipos de cepa de *Aspergillus terreus*. [24]

CARACTERISTICAS	ASPERGILLUS TERREUS NTRL-1960	ASPERGILLUS TERREUS SNGB9003
Temperatura de fermentación (°C)	35	37
Presión de operación (bar)	1.01	0.5
pH en fermentación	3.1	2.6
% Rendimiento	57.8	60
Tiempo de fermentación (horas)	184	49
Precio (USD/unidad)	175	287

Durante el proceso de fermentación se llevan a cabo las siguientes reacciones:



En la figura II.10 se muestra el diagrama de flujo de proceso de la parte del proceso correspondiente a la fermentación. [24]

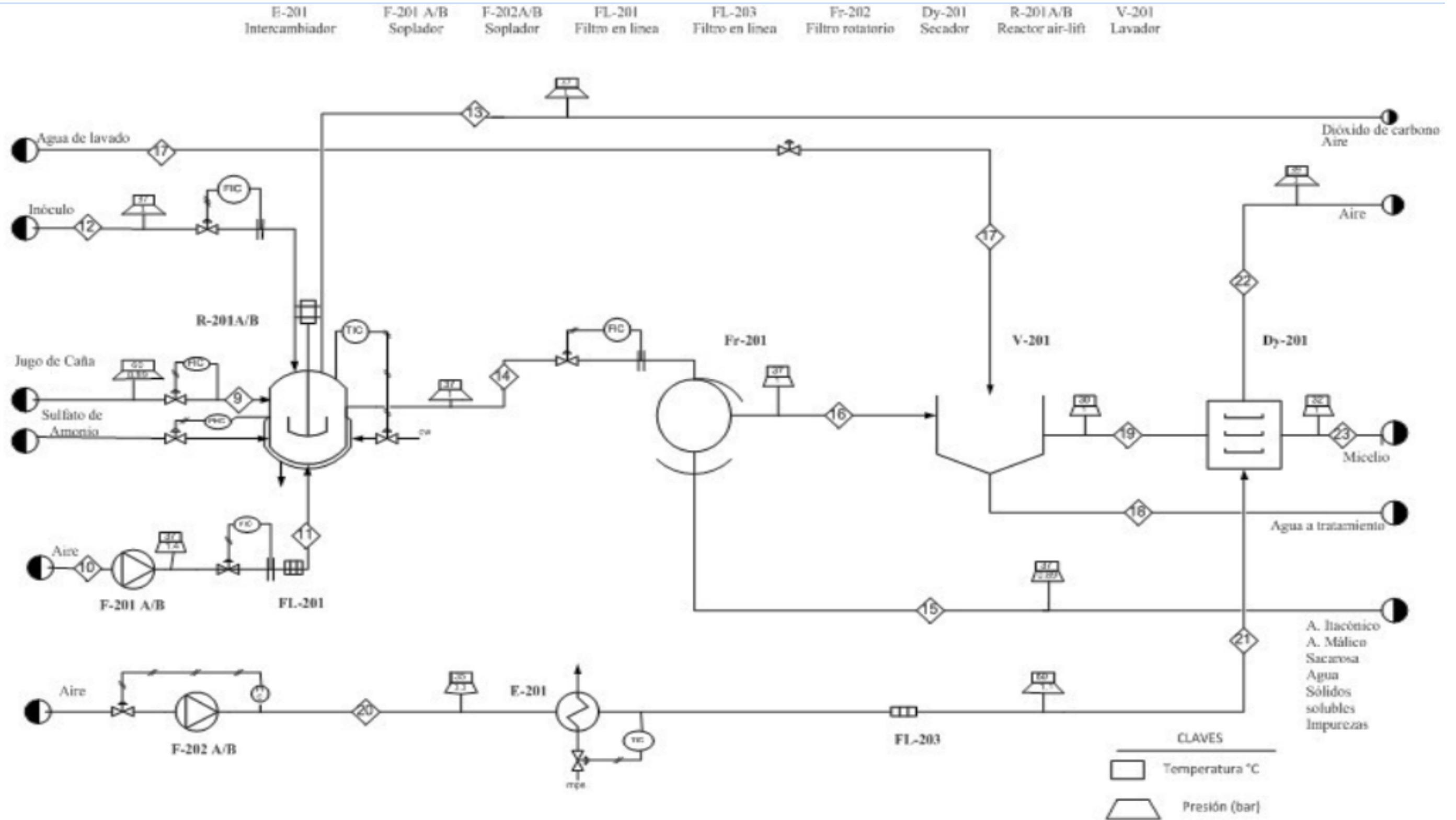


Figura II.10: Diagrama de flujo de proceso de la etapa de fermentación para la producción de ácido itacónico. [24]

Algo interesante en esta parte del proceso, es el tipo de reactor que se utiliza. Se trata de un reactor tipo Air-Lift del cual vale la pena explicar su funcionamiento.

Los reactores de tipo Air-Lift toman ventaja de la inyección de una corriente gaseosa (generalmente aire) para proporcionar el mezclado y una transferencia de sustancias gaseosas con la fase líquida, el diseño específico de los reactores Air-Lift originan que el líquido circule entre dos zonas interconectadas conocidas como la zona de ascenso y la zona descenso. Estas zonas permiten la circulación del líquido por un separador líquido-gas en la parte superior.

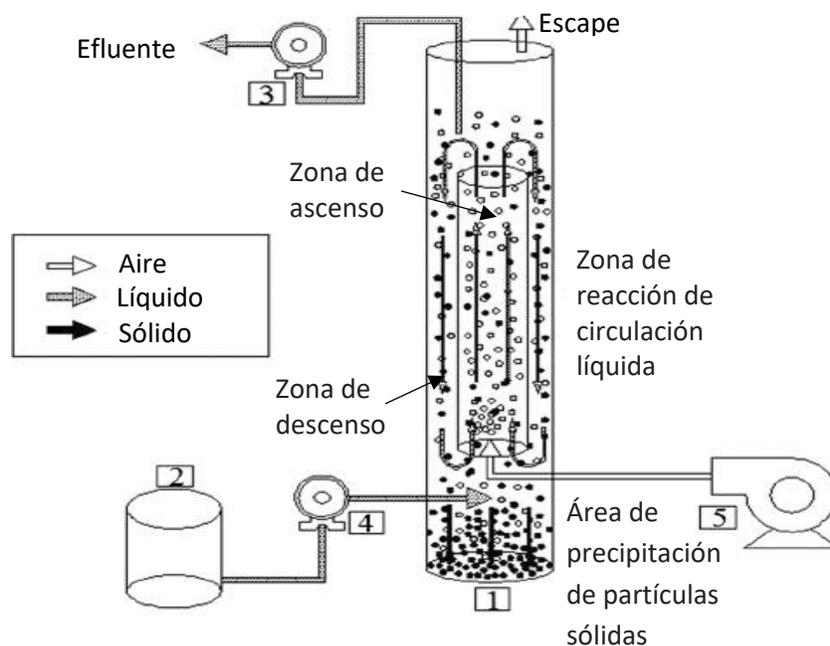


Figura II.11: Diagrama esquemático de un reactor de tipo Air-Lift. 1) Reactor, 2) Tanque de almacenamiento, 3) y 4) bombas de líquido, 5) Bomba de aire. [25]

El aire es inyectado por debajo de la zona elevada y la eliminación del gas en el separador genera un gradiente de densidad entre ambas zonas, causando la circulación del líquido. La función del separador de gas es apoyar la liberación eficiente de líquido-gas, las fracciones de gas introducidas en la sección bajante dependen del diseño y de las variables operacionales, este tiene un efecto significativo en el desempeño del reactor.

En comparación con los reactores clásicos que generan grandes gradientes de esfuerzo de corte (cizallamiento) que causan en las células tensión mecánica en áreas de alta turbulencia, en los reactores de tipo Air-Lift no hay puntos de disipación de energía y los esfuerzos de corte son homogéneos por lo que causan poco daño celular. [25]

La purificación del producto final es otra de las etapas importantes en el proceso de obtención de ácido itacónico. A través de la evaporación, filtración, cristalización, centrifugado y secado es como van retirando las impurezas del producto, ya sea para su posible reutilización en alguna otra parte del proceso o para ser desechadas definitivamente, como es el caso del licor no aprovechable. Con el fin de hacer más ilustrativa esta parte del proceso se muestra en la figura II.12 el diagrama de bloques correspondiente.

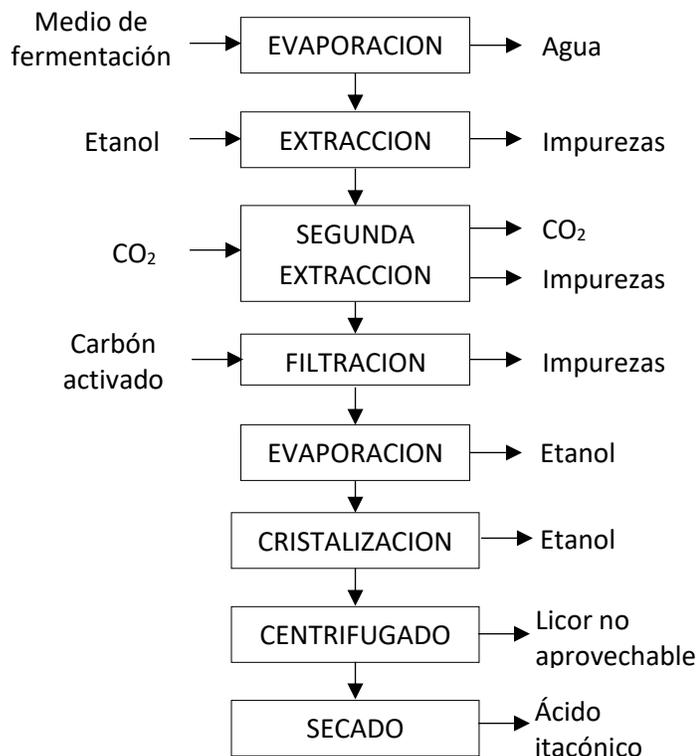


Figura II.12: Diagrama de bloques para la separación y purificación del ácido itacónico. [24]

Primero se elimina por evaporación el excedente de agua que puede contener el caldo proveniente de la fermentación. El resultado de esta evaporación es una corriente de agua y un caldo rico en la sustancia a purificar. Este caldo rico posteriormente se mezcla con una corriente de etanol con la que se pueden arrastrar algunas impurezas afines a esta sustancia, y así se completa la primera extracción.

Luego se hace una segunda extracción o re-extracción, pero en lugar de usar etanol nuevamente, se utiliza una corriente gaseosa de dióxido de carbono a alta presión para eliminar impurezas que el etanol no hubiera podido retirar.

Otra parte que es interesante en el proceso, es que se usa un filtro de carbón activado. De hecho, es la operación unitaria que le sigue a la re-extracción. Se sabe que el carbón activado o carbón activo es carbón poroso que atrapa compuestos, principalmente orgánicos, presentes en un gas o en un líquido. Lo hace con tal efectividad que este es uno de los purificantes más utilizados por el ser humano.

El uso de un segundo evaporador es indispensable para la eliminación de los restos de etanol utilizado en la primera extracción de impurezas. Se usa la operación de cristalización para ayudar con la eliminación del etanol restante de la evaporación anterior.

Con la centrifugación se elimina el llamado “licor no aprovechable” el que no puede ser reutilizado en otra de las fases del proceso de obtención del ácido itacónico.

Como última operación unitaria del proceso, aparece el secado con el cual se elimina cualquier resto de humedad o impureza que haya resistido las operaciones anteriores.

Las corrientes de etanol y agua residuales resultantes pueden ser aprovechadas nuevamente en el proceso, después de ser tratadas.

Con ayuda de la figura II.13 que muestra el diagrama de flujo de proceso de la etapa de purificación del ácido itacónico es más fácil comprender y seguir las operaciones descritas anteriormente.

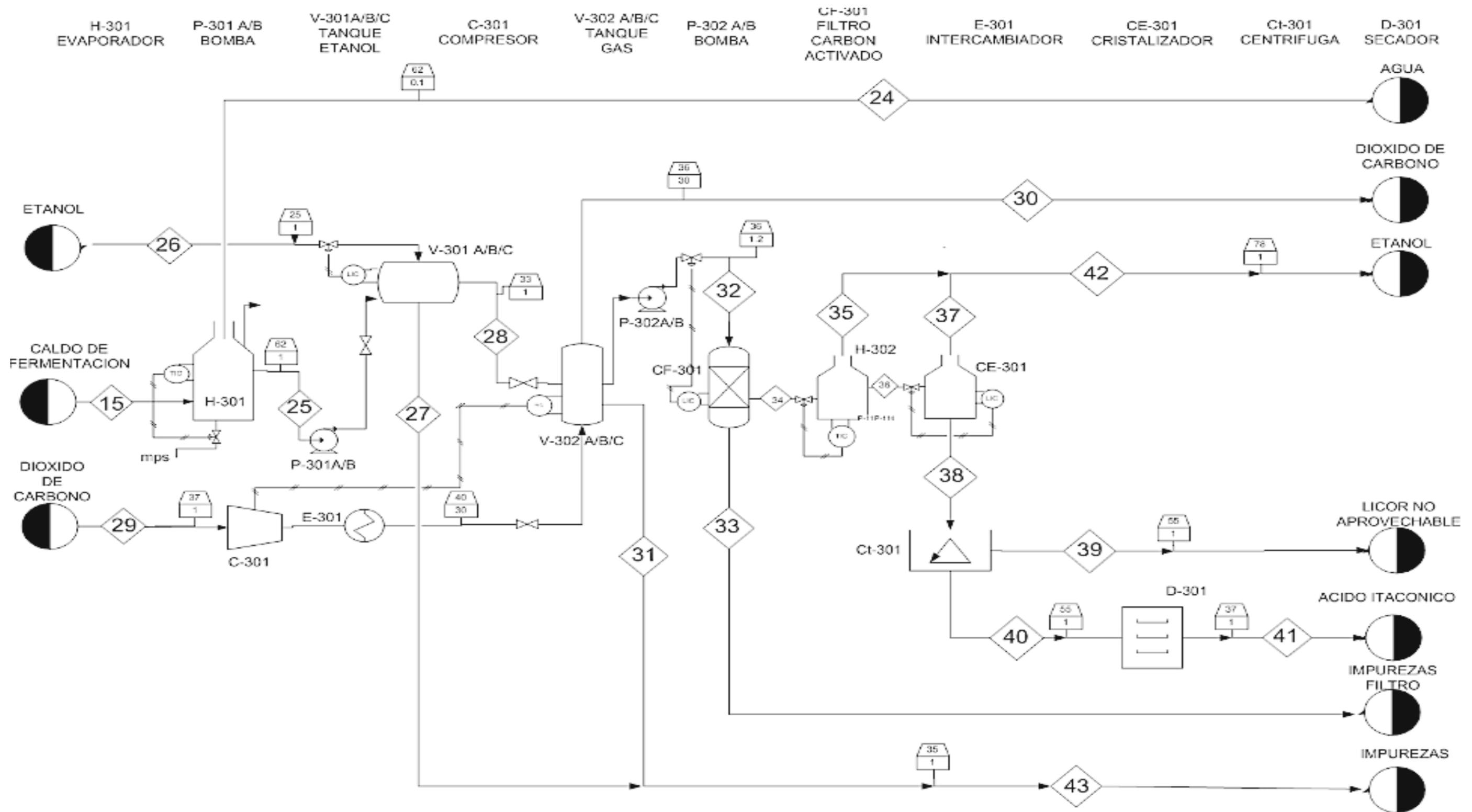


Figura II.13: Diagrama de flujo de proceso de la etapa de purificación del ácido itacónico. [24]

Un factor importante en esta parte de purificación del ácido itacónico es la solubilidad del mismo, así como la del ácido málico, en etanol, ya que este subproducto lo acompaña como impureza por lo que se tiene que filtrar, como se observa en la figura II.14 que representa la gráfica de solubilidad de dichos ácidos.

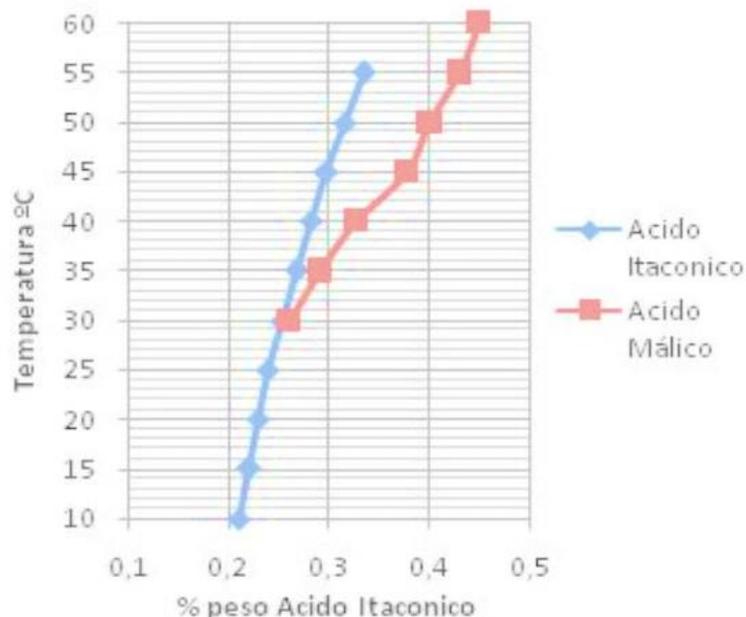


Figura II.14: Gráfica de solubilidad de los ácidos málico e itacónico en etanol. [24]

Se debe tomar en cuenta la solubilidad de estas sustancias porque dentro del proceso de purificación hay una fase de cristalización, y se sabe esta propiedad de las sustancias es un factor muy importante para establecer las condiciones de operación para obtener una pureza mayor del producto final.

El proceso de obtención del ácido itacónico a través de esta ruta es un proceso natural y amigable con el ambiente. Además de que el sustrato usado es fácil de obtener y es una fuente renovable. Una de las grandes ventajas que posee este proceso es precisamente que se obtiene de forma natural.

Como ya se describió, si se siguen los consideramos parámetros adecuados (temperatura, pH, concentración del sustrato) se pueden obtener altas eficiencias de proceso, así como altas tasas de rendimiento.

II.3 Ruta de biosíntesis

El primer descubrimiento fue el hecho de que un hongo filamentoso fue capaz de producir ácido itacónico y, por consiguiente se denominó esta especie como *Aspergillus itaconicus* [26].

La biosíntesis de ácido itacónico fue durante mucho tiempo muy debatida, ya que no estaba claro si el ácido itacónico surge de una ruta que incluye partes del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o de otra alternativa a través de citramalato o la condensación de la acetil-CoA. Bentley y Thiessen (1957) [26] propusieron una ruta para la biosíntesis del ácido itacónico, que se representa en la figura II.15.

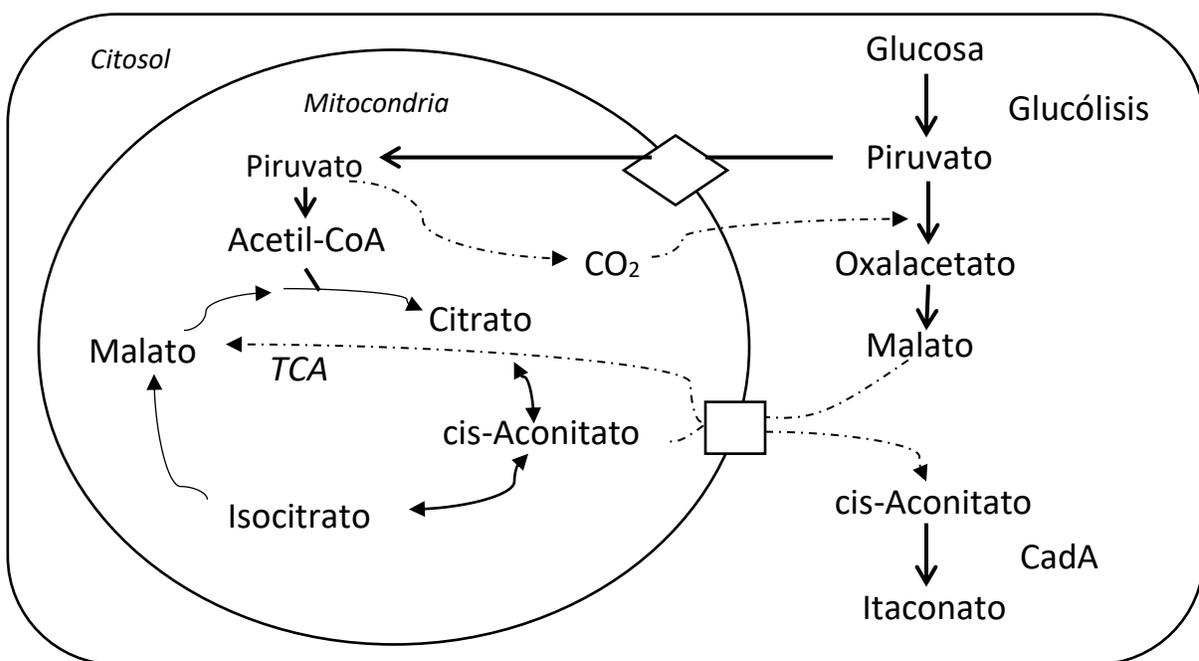


Figura II.15: Ruta de biosíntesis de itaconato y su compartimentación entre el citosol y la mitocondria en la célula de *A. terreus*. Nota: el transporte cis-aconitato es especulativo. [26]

A partir de un sustrato de azúcar como la glucosa, se procesan las moléculas de carbono, a través de la glucólisis, a piruvato. A continuación, la ruta se divide y una parte del carbono se metaboliza a la Acetil-CoA con la liberación de una molécula de dióxido de carbono. La otra parte se convierte en oxalacetato, de modo que la molécula de dióxido de carbono mencionada anteriormente se incorpora de nuevo.

En las primeras etapas del ciclo del ácido cítrico, se forman citrato y cis-aconitato. En la última etapa, la única delicada de la ruta, la cis-aconitato descarboxilasa (CadA) forma ácido itacónico y se libera dióxido de carbono. Esta ruta fue confirmada por experimentos con trazadores ^{14}C y ^{13}C , sustratos marcados y también las actividades enzimáticas necesarias han sido determinados.

La formación de ácidos carboxílicos, como el ácido cítrico y el ácido itacónico, implica la generación de metabolitos intermedios entre los diferentes compartimentos intracelulares y utiliza las distintas capacidades enzimáticas del compartimento respectivo.

El mecanismo propuesto es que el cis-aconitato se transporta a través del malato-citrato en el citosol. Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado si el cis-aconitato usa el malato-citrato mitocondrial o utiliza otra proteína mitocondrial portadora para ser trasladado al citosol.

En el caso de ácido itacónico, Bentley y Thiessen [26] reportan que la compartimentalización de la ruta se analizó por extractos de células fraccionadas que distinguen la actividad enzimática mitocondrial de una enzima citosólica. Ellos encontraron que la enzima clave de la ruta, CadA, no existe en las mitocondrias, sino en el citosol, mientras que las enzimas citrato sintasa y aconitasa si se encuentran en las mitocondrias. Sin embargo, un nivel residual de la aconitasa y la actividad de la citrato-sintasa también se localizan en la fracción citosólica.

Además de *A. terreus*, se conoce que el ácido itacónico puede ser producido también por otros hongos como *U. zaeae*, *U. maydis*. No existen más investigaciones acerca de los principios de reacción subyacentes que conducen a la formación de ácido itacónico en esas especies. Sin embargo, la evidencia reciente apunta en dirección de que la actividad de CadA constituye el camino general hacia la formación del ácido itacónico en la naturaleza. También se ha detectado [26] ácido itacónico en células de mamífero, se encontró en células derivadas de macrófagos. Estas células poseen también actividad de CadA y tienen la capacidad de formar

ácido itacónico. Pero, hasta ahora no ha sido identificado el gen de codificación específico para esta actividad enzimática en células de mamífero.

Sin embargo, el papel fisiológico de ácido itacónico en células de mamífero es aún desconocido. Strelko et al. [26] especularon sobre el papel del ácido itacónico como un inhibidor de las rutas metabólicas, ya que se describe como un inhibidor enzimático. El ácido itacónico es conocido por inhibir la isocitrato liasa, que es la parte crucial de la derivación del glioxilato, y por lo tanto puede actuar como un agente antibacteriano.

Enzimas y genes específicos de la ruta del ácido itacónico

La reacción catalizada por la descarboxilasa del ácido cis-aconítico ha sido descrita desde 1957. Posteriormente se realizaron experimentos de marcaje con ^{13}C y ^{14}C que confirmaron el esquema de reacción representado en la figura II.16.

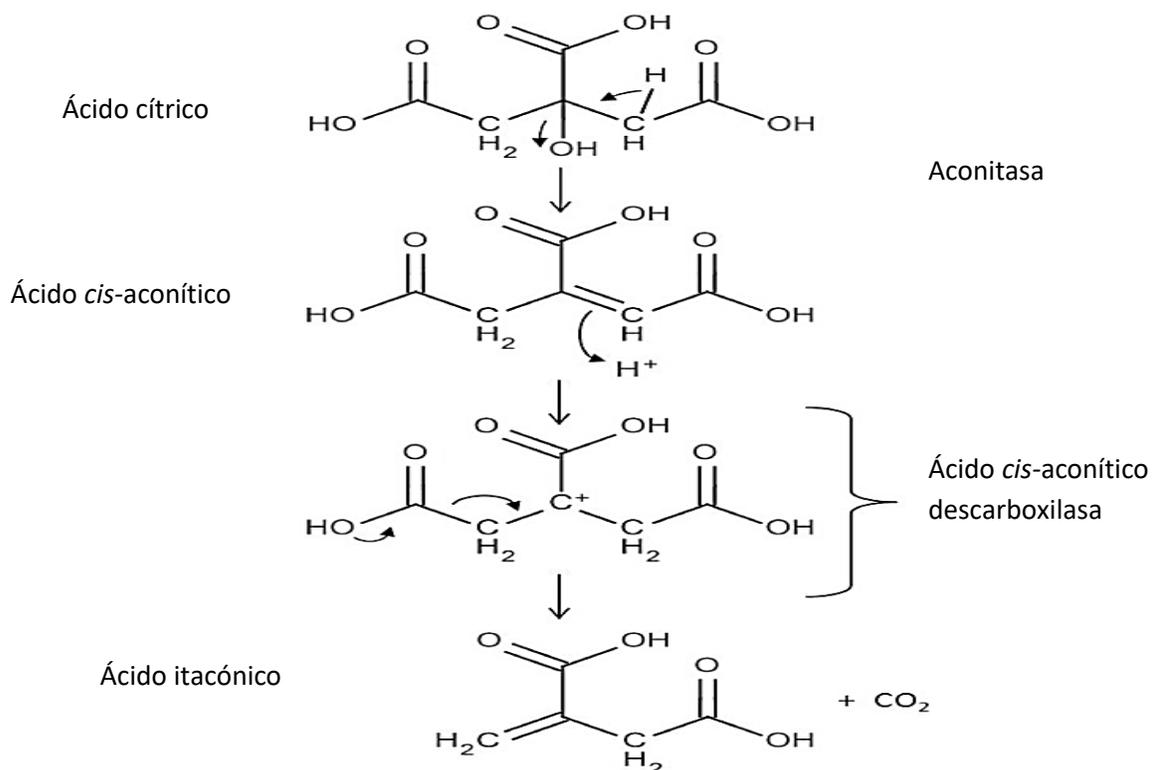


Figura II.16: En el ciclo del ácido cítrico se forma ácido cis-aconítico como producto intermedio durante la conversión de ácido cítrico en ácido isocitrato. El ácido cis-aconítico es descarboxilado por la enzima CadA formando ácido itacónico y liberando CO_2 (Bentley y Thiessen, 1957). [26]

El ácido itacónico está formado por un reordenamiento alílico y descarboxilación a partir del ácido cis-aconítico eliminando carbono C₁ o C₅ de la molécula de ácido cítrico de partida (debido a la simetría de la molécula).

Además, Dwiarti et al. (2002) [26] reportan que se determinaron ciertas propiedades de la enzima CadA de *A. terreus*, como lo son: un valor de K_m de 2.45 mM (37°C, pH 6.2) y un pH óptimo de 6.2. En un pH de 7.5 la actividad se reduce significativamente y es inferior a 20% del valor máximo.

Hasta 2008, la secuencia de la enzima CadA era desconocida, debido a que presenta una baja estabilidad. Kanamasa et al. (2008) [26] fueron capaces de purificar una cantidad sustancial de la enzima. La literatura reporta que mediante la secuenciación de la proteína se determinaron el N-terminal y cuatro secuencias internas, que produjeron en una sola etapa, ATEG_09971, en la base de datos del genoma de *A. terreus*. El gen se denominó *cadA*.

La actividad de la enzima como descarboxilasa del ácido cis-aconítico se confirmó después de la expresión heteróloga del gen en *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima CadA es una proteína de 490 amino ácidos (55 kDa).

En contraste con la estrategia de purificación de la enzima, utilizaron un método transcriptómico para identificar el arreglo de los genes de la enzima. Cultivaron un clon de la cepa NRRL1960 de *A. terreus* en diferentes condiciones (pH, oxígeno disuelto, etc.), los cuales obtuvieron distintos rendimientos para el ácido itacónico.

Las condiciones, que presentaban la mayor diferencia en el rendimiento, se analizaron nuevamente por el método transcriptómico en una micromatriz con la suposición de que los genes implicados en la ruta del ácido itacónico muestran un nivel alterado (superior) de expresión durante las condiciones de producción.

El gen *cadA* fue altamente puntuado en este análisis y por lo tanto puede ser identificado en un análisis de este tipo.

Debajo del gen *cadA* se puede encontrar otro transportador que se anota como un supuesto integrante de la Superfamilia Principal de facilitadores (MFS por sus siglas

en inglés). Jore et al. (2011), [26] detectaron la proteína transportadora mitocondrial en el análisis transcriptómico y ha demostrado tener una influencia positiva directa en la producción de ácido itacónico.

Sin embargo, el mecanismo y sustratos de este transportador son aún desconocidos y su papel necesita ser aclarado, pero se puede especular que los intermedios de la ruta de biosíntesis como el ácido cis-aconítico se transportan con esta proteína.

La actividad de la descarboxilasa del ácido cis-aconítico es crucial para el funcionamiento de la ruta de biosíntesis completa del ácido itacónico. En una cepa de sobre-producción de ácido itacónico, que se obtuvieron Yahiro et al. [26], mediante una selección a altos niveles de itaconato, se encontraron niveles de transcripción cinco veces mayores del gen *cadA* que en una cepa comparable de tipo salvaje, pero no ha sido detectado ningún cambio en la secuencia de aminoácidos. La expresión del gen *cadA* en *A. niger* bajo diversos promotores constitutivos de diferente intensidad de expresión demostró que la productividad del ácido itacónico se correlaciona directamente con el nivel de transcripción *cadA*.

Catabolización del ácido itacónico

Se sabe mucho sobre la biosíntesis del ácido itacónico y los mecanismos enzimáticos subyacentes, pero para una imagen bioquímica completa de un determinado metabolito, también es necesario conocer su degradación. Desafortunadamente, la información sobre la ruta de degradación del ácido itacónico es escasa, pero en células de mamífero (hígado de cobaya y de rata) se encontró que el itaconato se convierte en itaconil-CoA hidratasa y se procesa posteriormente a través de citramalil-CoA a piruvato y acetil-CoA.

También se encontró que el malonato tiene un efecto inhibitorio y su adición evita la degradación del ácido itacónico. El primer paso de esta ruta de degradación puede ser catalizado por la succinil-CoA sintetasa presente. El tercer paso de la ruta es catalizado por citramalil-CoA citasa, en la que se han clonado genes de *Chloroflexus aurantiacus* y de *Pseudomonas putida*.

Sin embargo, hasta ahora no se ha identificado ninguna secuencia proteica y génica, que pueda catalizar la segunda etapa de la ruta de degradación, que es una itaconil-CoA hidratasa.

Los niveles de ácido itacónico que se alcanzan con *A. terreus* se limitan actualmente a aproximadamente 85 g/L. Aunque esto ya es una cantidad sustancial, no puede compararse con la producción de ácido cítrico, donde se obtienen concentraciones de más de 200 g/L.

En *A. terreus*, se ha demostrado que el gen influye en el rendimiento de la producción de ácido itacónico, que es una enzima clave de la glucólisis. Otro enfoque de ingeniería, se refiere al suministro de oxígeno intracelular, la producción de ácido itacónico requiere oxigenación continua y una corta interrupción de oxígeno disminuye el rendimiento de ácido itacónico.

Existe la posibilidad de que la composición genética de *A. terreus* no sea tan eficiente como para soportar la producción de concentraciones más altas de ácidos orgánicos. Por lo tanto, una de las estrategias es generar genéticamente la ruta de biosíntesis de ácido itacónico en otro organismo huésped, el cual ya se sabe que soporta la producción de rendimientos altos de ácidos orgánicos. Como ya se ha mencionado, *A. niger* es un candidato.

Una cepa de *A. niger* que expresa el gen *cadA* solo tiene la capacidad de producir aproximadamente 0.7 g/L de ácido itacónico. Este nivel no es comparable con las cepas de producción actuales de *A. terreus*, pero es un punto de partida prometedor para otras etapas de ingeniería. Otros intentos de elevar el rendimiento son expresar genes como la proteína portadora mitocondrial mencionada anteriormente junto con el gen *cadA*. [26]

CAPÍTULO III

MÉTODOS DE POLIMERIZACIÓN

Debido a la similitud estructural con el ácido acrílico y el ácido metacrílico, el ácido itacónico y los ésteres correspondientes, como el dimetilitaconato y el dibutilitaconato, han sido estudiados en las últimas décadas Robert et al. [27] como monómero o co-monómero alternativo a polimetacrilatos (Figura III.1 a).

Las aplicaciones para este tipo de polímeros son muy extensas y van desde la inhibición de la corrosión hasta los materiales dentales, elastómeros, y la administración de fármacos.

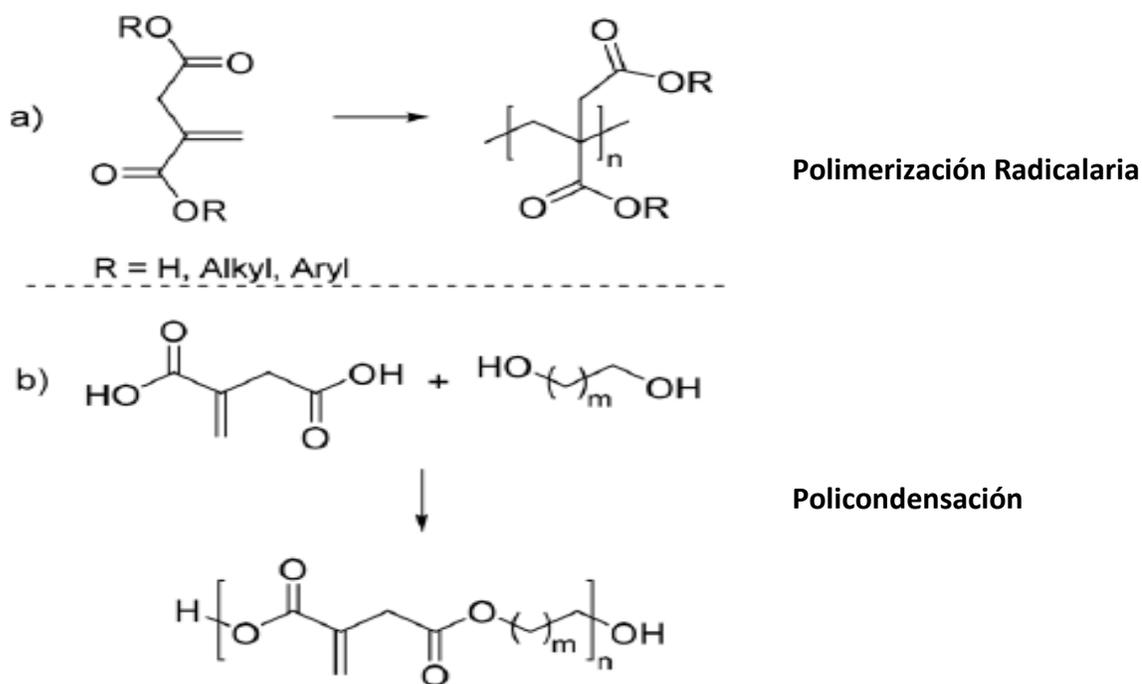


Figura III.1: Métodos de polimerización del ácido itacónico. [27]

Sin embargo, se han estudiado muy poco los poliésteres basados en ácido itacónico (Figura III.1 b). Esto es algo interesante ya que es un ácido dicarboxílico con una funcionalidad α, β - insaturada. Estas características estructurales permiten una variedad de nuevas aplicaciones, tales como una alternativa para poliésteres acrilados o bloques de construcción modulares para poliésteres con propiedades

sintonizables. Por lo tanto, los polímeros basados en poliéster derivados del ácido itacónico podrían ser útiles en diferentes campos de aplicación, tales como resinas con curado UV, térmico o reticulación, así como polímeros de memoria de forma (SMP por sus siglas en inglés), entre otros.

También la posibilidad de modificar el doble enlace insaturado después de la policondensación presenta un alto potencial para desarrollar nuevos materiales con propiedades sin precedentes, tales como inhibidores de la corrosión, materiales dentales, o para la administración de fármacos. [27]

En el trabajo de investigación de Stawski et al. [28] se ha preparado Poli (ácido itacónico) (PIA por sus siglas en inglés) por distintos métodos: con el uso de agua o dioxano como medio de reacción, o por poli hidrólisis (anhídrido itacónico), así como por iniciación con sistema redox. El objetivo principal fue investigar el efecto del método de síntesis en la estructura química del producto.

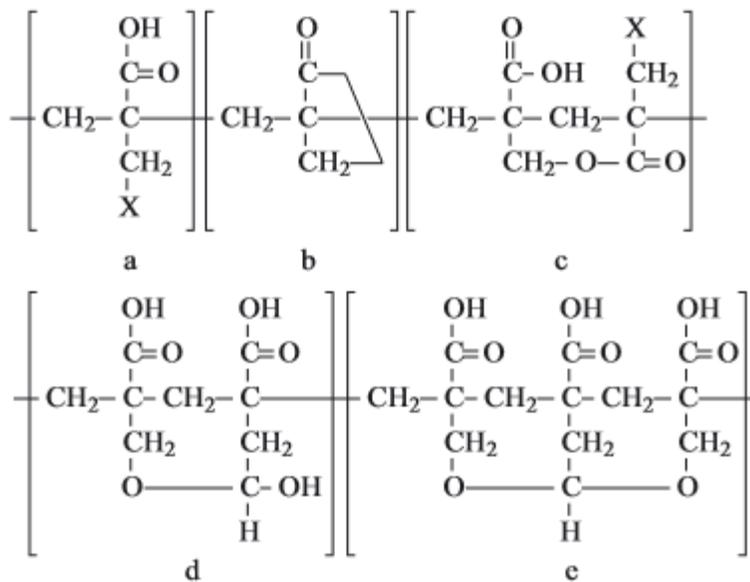
La homopolimerización por radicales de ácido itacónico (AI) conduce a un producto de estructura complicada. Shepherd et al. [28] trabajaron con la polimerización del ácido itacónico en HCl 0.5M iniciado por persulfato de potasio a 50°C y resultaba un poliácido itacónico (PIA), pero el proceso toma un tiempo bastante largo.

De acuerdo con los autores, el producto se hidrata con una molécula de agua por una unidad y cuando se seca sobre pentóxido de fósforo a 100°C y bajo 1 mmHg, es decir, 133 Pa de presión, este tratamiento resulta en la formación de anhídrido en un grado de aproximadamente 30%.

Braun et al. [28] examinaron más profundamente la estructura del producto de la polimerización de ácido itacónico en una solución de dioxano. Los autores utilizaron el peróxido de benzoilo, también llamado 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN), como iniciador. Sin embargo, en todos los casos el proceso de polimerización tomó un tiempo muy largo, hasta 720 horas, es decir, un mes.

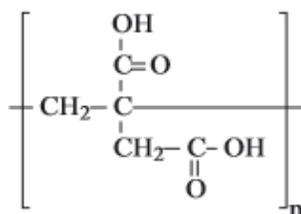
En la valoración potenciométrica de los productos obtenidos, Braun et al. [28] encontraron que los polímeros contienen sólo la mitad de los grupos ácidos hipotéticos en PIA.

Ellos sugieren la formación de grupos anhídrido, que se descarboxilan y proponen un esquema basado en un conjunto de reacciones de transferencia de cadena, los autores sugieren que por este método se pueden formar los siguientes grupos:



Dónde: X= -OH ó -CHO

Con el fin de obtener el poli (ácido itacónico) con la siguiente estructura:



Anteriormente Yokota et al. [28] propusieron un método de síntesis: en un primer paso, se obtiene polianhídrido itacónico y con la hidrólisis se pudo obtener poliácido itacónico con dos grupos carboxílicos en una sola unidad de polímero.

En 2002 Lárez C. et al., [28] reportaron que el PIA se puede obtener por polimerización en medio acuoso con un pH igual a dos usando como iniciador persulfato de potasio.

Mao Ziping et al., [28] han informado que el PIA se podría obtener por polimerización de AI en agua, iniciada con el sistema redox: K₂S₂O₈ y NaH₂PO₂. No aislaron PIA pero aplicaron su solución para la impregnación de la tela de algodón.

III.1 Técnicas de polimerización

En su artículo Stawski et al. [28] describen la obtención de PIA por diferentes métodos y condiciones de síntesis para comprobar la estructura de los productos resultantes. Ellos evaluaron cuatro distintas formas de polimerización del ácido itacónico que se describirán a continuación.

1-. En solución acuosa

En este tipo de polimerización en solución acuosa se requiere un solvente para disolver al monómero y al iniciador y así formar un sistema homogéneo. El solvente ideal debe tener bajo costo, bajo punto de ebullición y de fácil separación del polímero; finalizada la polimerización, el producto formado puede ser soluble o no en el disolvente usado.

La insolubilidad del polímero produce una pasta, que puede ser extraíble por filtración. Si el polímero es soluble se introduce un no-disolvente para provocar la precipitación en forma de fibras o polvo. La polimerización en solución tiene la ventaja de operar con una temperatura homogénea debido a la agitación sencilla del sistema, que evita el sobrecalentamiento. Sin embargo, el costo del disolvente y la lentitud de la reacción son inconvenientes. Esta técnica se emplea mucho en polimerización por condensación. [29]

En el caso de Stawski et al. [28] usaron agua como disolvente y colocaron 10g (77 mmoles) de ácido itacónico en un matraz, 50 cm³ de HCl 0.5 M y 2.2 mili moles de persulfato de amonio. Después calentaron la mezcla a una temperatura de 60°C durante 30 horas, el producto (PIA) precipitó con acetona, y se secó durante la noche a 50°C bajo presión de 1 hPa. El rendimiento que obtuvieron fue del 16%, con un peso molecular promedio (\bar{M}_n) de 16,290.

2-. En dioxano

El 1-4 Dioxano (C₄H₈O₂), también llamado dióxido de etileno es un líquido incoloro, inflamable y con olor a éter. Entre los usos más frecuentes que tiene se pueden mencionar los siguientes: como disolvente en la fabricación de lacas, barnices,

preparación de productos de limpieza y detergentes, adhesivos, cosméticos, productos fumigantes, emulsiones y composiciones para pulir, fabricación de pasta de madera, como medio de extracción de aceites animales y vegetales, productos químicos de laboratorio (eluyente en cromatografía), cintas, plástico, caucho, insecticidas y para herbicidas. También forma parte de los catalizadores, por ejemplo, en la polimerización de cloruro de vinilo en cloruro de polivinilo. [30]

Para este caso los autores colocaron en un matraz 10 g de KI en 20 cm³ de dioxano y lo calentaron durante 22 horas a 60°C. La cantidad del iniciador (AIBN) fue 0.8% mol, en relación con el monómero.

El producto PIA obtenido se separó del monómero por precipitación, se lavó con acetona y se secó durante la noche a 50°C bajo presión de 1 hPa. El rendimiento fue de aproximadamente 32%, con un peso molecular promedio (\bar{M}_n) de 5,138 [28].

3-. A partir de anhídrido itacónico

El anhídrido itacónico se produce a partir de la pirólisis de ácido cítrico o mediante la fermentación de carbohidratos formando ácido itacónico seguido de su deshidratación para formar el anhídrido.

Stawski et. al, [28] llevaron a cabo la síntesis del polímero mediante tres etapas: síntesis de anhídrido itacónico, la polimerización de anhídrido itacónico e hidrólisis de poli (anhídrido itacónico) (PIAn) a PIA.

- Primera etapa: 26 g de Al, 20 mL de cloruro de acetilo y 120 mL de xileno en reflujo a 70°C durante 20 h. Después de ese tiempo la solución se enfrió y el producto cristalino se recristalizó en xileno caliente.
- Segunda: 7.5 g de anhídrido itacónico de la primera etapa, 83 ml de xileno y 0.17 g de AIBN se calentaron a 60°C durante 16 h. PIAn se filtró, se lavó con xileno y etil éter, y se secó bajo presión reducida.

- Finalmente el producto (PIA) se obtuvo mezclando el poli (anhídrido itacónico) con exceso de agua. La solución transparente se mantuvo durante la noche y el exceso de agua se evaporó a temperatura ambiente bajo presión reducida. Después se secó a 50°C bajo presión de 1 hPa, con un peso molecular promedio (\bar{M}_n) de 12,810.

En un trabajo de investigación diferente, Shang et al. [31] describen la síntesis de copolímeros de anhídrido itacónico con metacrilato de estearilo como sigue.

El anhídrido itacónico se puede polimerizar o copolimerizar con otros monómeros diferentes mediante reacciones vía radicales libres. Debido a que forma radicales terciarios altamente reactivos, el anhídrido itacónico es más reactivo que el anhídrido maleico y es un monómero alternativo para introducir la funcionalidad polar en polímeros.

La copolimerización de radicales libres de anhídrido itacónico y metacrilato de estearilo fue descrita previamente por Wallach, [31] pero las propiedades de esos materiales no han sido caracterizadas; este trabajo forma parte de un programa de investigación dirigido a la preparación de ionómeros a partir de monómeros renovables.

El interés de es la introducción de la funcionalidad polar en biopolímeros relativamente no polares tales como PLA (ácido poliláctico) para aumentar la temperatura de transición vítrea, T_g , para mejorar la adhesión y compatibilidad con sustratos o polímeros más polares; de esta manera proporcionar sitios de injerto polares en andamios biodegradables y para preparar polímeros anfífilicos para las aplicaciones de liberación de fármacos.

El procedimiento de copolimerización siguió a la reacción de radicales libres descrita por Wallach como se representa en la figura III.2. El anhídrido itacónico tiene una reactividad más alta que el ácido itacónico, pero se hidroliza fácilmente, por lo que es necesario utilizar materiales y reactivos secos, antes de la copolimerización, y se usó acetato de etilo anhidro como disolvente.

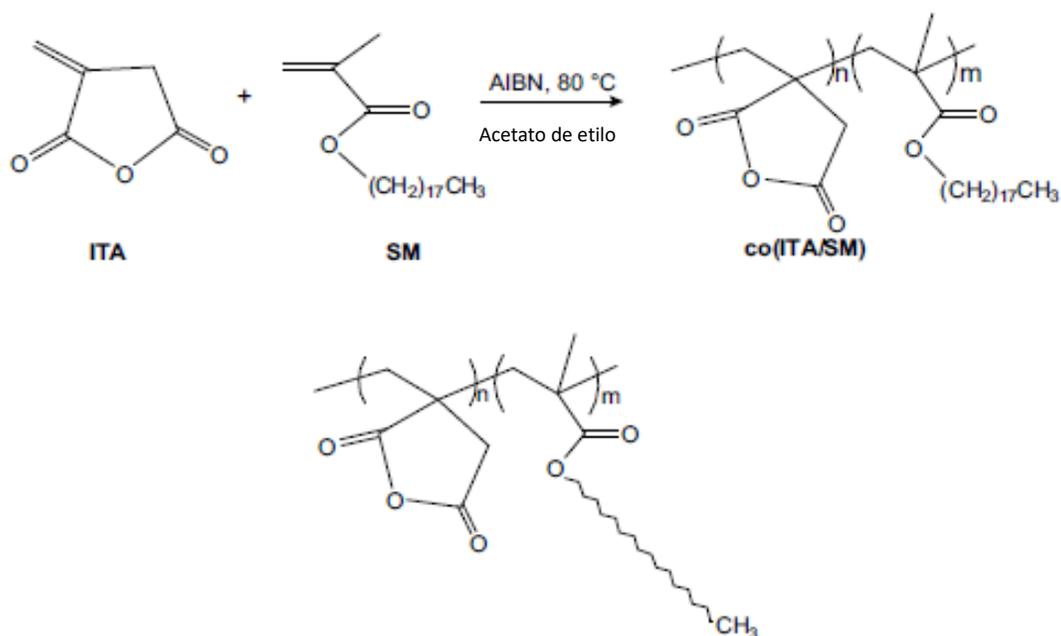


Figura III.2: Copolimerización del anhídrido itacónico (ITA) y metacrilato de estearilo (SM). [31]

Disolvieron varias relaciones molares de anhídrido itacónico y metacrilato de estearilo en acetato de etilo a 80°C en un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación magnética y un condensador con una salida de desecante y una entrada de nitrógeno. La concentración total de monómero fue de 66.7% en peso, y la concentración de iniciador (AIBN) fue de 4% en moles basado en la concentración de los dos co-monómeros. Las reacciones se llevaron a cabo durante 12 h con agitación bajo una atmósfera de nitrógeno.

Después de que las polimerizaciones se completaron, la solución de reacción se precipitó a -20°C en hexano para una concentración de alimentación de anhídrido itacónico > 70% en moles o metanol para una concentración de alimentación de anhídrido itacónico ≤ 70% en moles. El precipitado se filtró, se lavó con hexano o metanol adicional a temperatura ambiente y lo secaron en un horno al vacío durante 48 h. Los copolímeros se re-precipitaron a partir de una solución al 30% (p/v) de acetato de etilo con exceso de hexano o metanol a -20°C, se filtraron y se secaron en un horno al vacío. [31]

Por lo tanto, no sólo se puede producir el poliácido itacónico a partir de anhídrido itacónico sino también copolímeros de otros compuestos para distintas aplicaciones.

4-. Por iniciación redox

Stawski et. al, [28] llevaron a cabo la primera parte de la síntesis con 12.5 g de Al, 32.5 mL de agua y 5 g de NaH_2PO_2 que se calentaron a 65°C . A continuación añadieron 1.6 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en 10 mL de agua y la solución se calentó durante 60 min. El polímero (PIA) obtenido se precipitó y se lavó con acetona y se secó durante la noche a 50°C bajo presión de 1 hPa.

III.2 Poliesterificación del ácido itacónico

Para sintetizar poliésteres existen varias combinaciones de reactivos y condiciones del proceso. Los poliésteres pueden ser producidos por esterificación directa de un diácido con un diol o auto-condensación de un ácido hidroxicarboxílico.

La poliesterificación, como muchas polimerizaciones por etapas, es una reacción de equilibrio, el agua debe ser eliminada de forma continua para alcanzar altos grados de conversión y altos pesos moleculares.

El control de la temperatura de reacción es importante para minimizar las reacciones secundarias tales como la deshidratación del diol para formar dietilenglicol.

Para este tema en particular se retomará el artículo de Robert et al., [32] en el que se exponen las propiedades de los poliésteres derivados del ácido itacónico así como los métodos que se han seguido para la producción de los mismos.

En este sentido las investigaciones que se han realizado se numeran de acuerdo a las aplicaciones específicas de los polímeros obtenidos, así se tienen los poliésteres del área médica, los de memoria de forma (SPM), elastómeros y compositos, pinturas o recubrimientos, entre otras aplicaciones.

En la tabla III.1 se exponen las investigaciones que se han realizado para el caso de los poliésteres con aplicaciones médicas.

Tabla III.1

Poliésteres derivados de ácido itacónico con aplicaciones médicas. [32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Singh et al.	Uso de ácido p-toluenosulfónico como catalizador e hidroquinona como inhibidor para evitar la reticulación	Poliésteres con un grado de entrecruzamiento regulado.	Como precursores para microesferas de hidrogel cargadas con vacunas bio-erosionables.
Yousaf et al.	Policondensación térmica de ácido itacónico, un segundo ácido dicarboxílico y trimetilolpropano (TMP) sin catalizadores e inhibidores.	Pesos moleculares razonablemente altos (hasta $2,200 \text{ g mol}^{-1}$) e índices de polidispersidad (\bar{M}) bastante estrechos.	Administración de fármacos, ingeniería de tejidos, y otras aplicaciones biomédicas.
	Catalizada enzimáticamente. Seguida de reticulación por UV	Pesos moleculares aún mayores hasta $12,000 \text{ g mol}^{-1}$, se volvieron más flexibles, menor módulo de Young y menor resistencia a la tracción final, mientras que la tensión de rotura aumentó. Citotoxicidad y moldeo adecuados	
Takasu et al.	Baja temperatura. Policondensación de poliésteres insaturados anhídridos maleico e itacónico. Reacción de ambos anhídridos con 3-metil-1,5-propanodiol en presencia de bis-naftafluorobutanosulfonil imida (Nf_2NH). Seguido de una foto-reticulación.	Pesos moleculares altos de hasta $16,000 \text{ g mol}^{-1}$. Isomería Z/E tiene influencia en el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles.	Poliésteres insaturados en forma de hidrogeles que se pueden utilizar como vehículos para la administración de fármacos.
Liu et al.	Combinación de tetraisopropóxido de titanio (TTP) y el ácido difenilfosfónico (DPPA). Sustitución parcial del ácido succínico por el ácido itacónico.	Pesos moleculares elevados de hasta $34,000 \text{ g mol}^{-1}$ (5% en moles del contenido total de diácidos). Disminución a $14,600 \text{ g mol}^{-1}$ con ácido itacónico al 40% mol. Reticulación con el 50% mol de ácido itacónico.	Co-poliéster tipo polibutileno succinato(PBS) con potencial para aplicaciones biomédicas

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2923.

Como un ejemplo de las reacciones antes mencionadas se muestra en la figura III.3 la reacción que llevaron a cabo Takasu et al. [32]

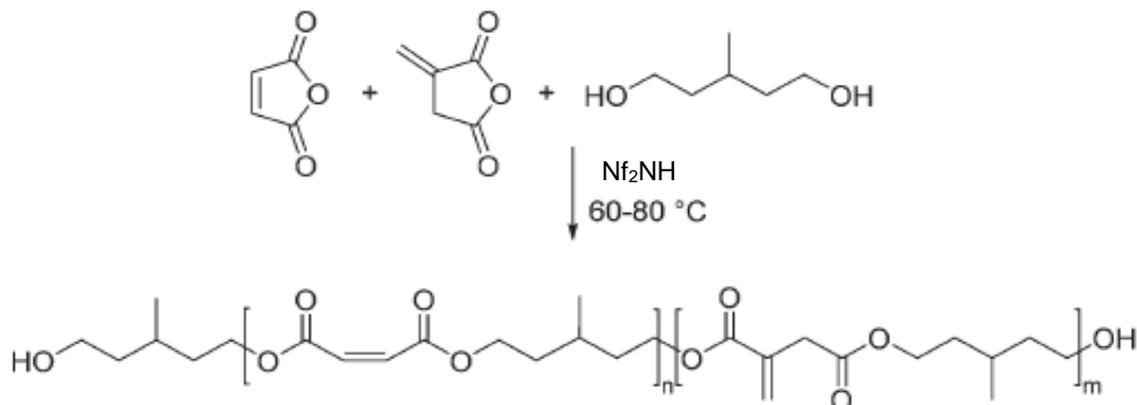


Figura III.3: Policondensación de poliésteres insaturados anhídridos maleico e itacónico a baja temperatura con Nf_2NH como catalizador. [32]

Estos poliésteres también pueden funcionar como polímeros con memoria de forma de acuerdo a la información que se muestra en la tabla III.2.

Tabla III.2

Poliésteres con memoria de forma (SMP por sus siglas en inglés) derivados de ácido itacónico.[32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Guo et al.	Policondensación de ácido itacónico, ácido sebácico y 1,3-propanodiol presencia de 0.5% en peso de 4-metoxifenol como inhibidor y 0.5% en peso de butilóxido de Ti (IV) como catalizador. A temperaturas bastante altas de hasta 220°C bajo vacío.	Poliésteres con pesos moleculares altos de $30,000-40,000\text{ g mol}^{-1}$.	Se sometieron a moldeado por compresión con peróxido de dicumilo como iniciador que resultó en un conjunto de SMP con interesantes propiedades y potenciales campos de aplicación.
Ritter et al.	Mezcla equimolar de ácidos dicarboxílicos y dioles en tolueno en presencia de 0.5% mol de ácido sulfúrico como catalizador y 0.25% mol de fenotiazina (PTZ) como inhibidor. Con un aparato de Dean-Stark a 140°C durante 48 h	Rendimientos muy bajos por debajo del 10% y bajos pesos moleculares de $500-800\text{ g mol}^{-1}$. Mejora utilizando la irradiación de microondas 17% y 1200 g mol^{-1} después de 4 h.	Los poliésteres se reticularon y mostraron un efecto de memoria de forma con una deformación a temperaturas por debajo de la T_g . Más frágil el SMP obtenido por Guo et al.

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2925.

La reacción que llevaron a cabo Ritter et al. antes mencionada se muestra en la figura III.4. [32]

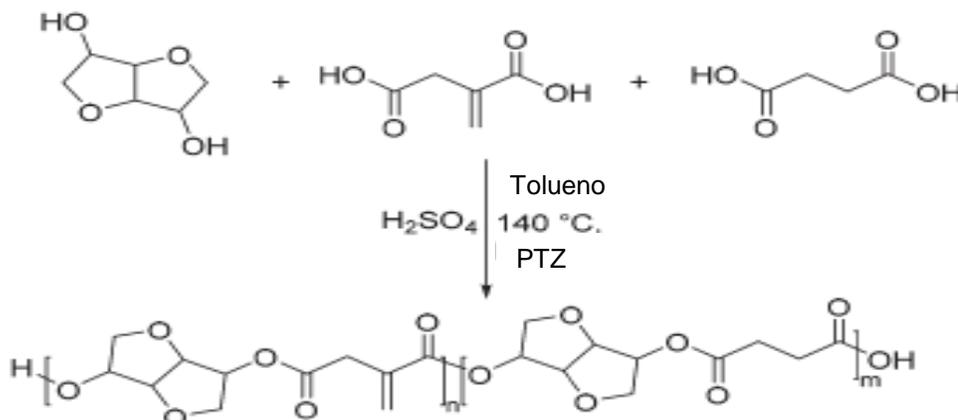


Figura III.4: Policondensación de isosorbida, ácido itacónico y ácido succínico. [32]

Otras reacciones importantes son la obtención de elastómeros y composites a partir de poliésteres tal como se muestra la tabla III.3.

Tabla III.3

Poliésteres derivados de ácido itacónico, elastómeros y composites. [32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Wei et al.	Síntesis de un poliéster derivado de ácido succínico, ácido sebáico, 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol con 5-15%mol de Al. MeHQ y ácido fosfórico como inhibidores. Durante 2 h a 180°C antes de añadir butóxido de Ti (IV) como catalizador y la reacción se continuó a 220°C a presión reducida.	Peso molecular medio numérico (Mn) de 33,000 g mol ⁻¹ . Se reticuló con de peróxido de dicumilo como iniciador. En el último paso, el material se reforzó con nanosilica. Material similar al caucho transparente con una baja Tg de -54°C y buenas propiedades mecánicas	Podrían competir o incluso superar a los elastómeros comercialmente disponibles.
Sakuma et al.	Tres compuestos diferentes se sintetizaron haciendo reaccionar el poliéster insaturado con polisilsesquioxanos sustituidos con metacrilato (Me-PSQ) en diferentes proporciones en presencia de peróxido de benzoilo.	Más estables a la temperatura, hasta 100°C más alto que el poliéster no curado. Además, los híbridos exhibieron un módulo de almacenamiento más alto en el estado gomoso (T>Tg)	Desarrollo de compuestos híbridos orgánicos e inorgánicos con mejores propiedades térmicas.

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2926.

Gracias a la similitud estructural con el ácido acrílico y el ácido metacrílico, que se usan a menudo como grupos reactivos en aglutinantes de curado por radiación para aplicaciones de revestimiento y tintas de impresión, el ácido itacónico tiene un alto potencial para servir como una alternativa renovable en esta área. En la tabla III.4 se muestran algunos ejemplos de trabajos de investigación sobre ello.

Tabla III.4

*Poliésteres derivados de ácido itacónico usados como recubrimientos. * [32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Dai et al.	Se formaron los primeros prepolímeros en presencia de ácido p-toluensulfónico (PTSA) al 0.5% en peso. Después de 2 h, como segundo catalizador, se añadió 1 % en peso de dilaurato de dibutilestano (DBTL) y se eliminó el agua al vacío. Para evitar la reticulación del doble enlace insaturado, se utilizó 0.5% en peso de 4-metoxifenol como inhibidor.	Poliésteres terminados con COOH con pesos moleculares bastante bajos (750-1,250 g mol ⁻¹). Alta dureza y buena resistencia al agua y a disolventes. Adhesión y flexibilidad insuficientes mejoradas con glicerol y aceite de soja.	Recubrimientos para superficies metálicas.
Tobias et al.	En presencia de ácido metanosulfónico (MSA) al 0.4% en peso como catalizador y una mezcla de mequinol (MeHQ) y Butil hidroxitolueno (BHT) como inhibidores. Usando n-heptano como agente de arrastre, la reacción se desarrolló suavemente bajo condiciones de Dean-Stark entre 120 y 180°C en 8 horas dependiendo de la elección de los monómeros. El curso de la reacción se controló mediante análisis del nivel de acidez.	Pesos moleculares que oscilaban entre 3100 y 5600 g mol ⁻¹ sin signo de reticulación detectable. Además de índices de polidispersidad de entre 1.9 y 4.	Resinas de poliéster derivadas de ácido itacónico y otros como el ácido adípico (AA), el anhídrido hexahidroftálico (HPSA), el 1,6-hexanodiol (HDO), el 1,3-propandiol (PDO) y el neopentilglicol (NPG). Se utilizaron para sintetizar dispersiones de poliuretano a base de agua para aplicaciones de revestimiento de madera presentando excelentes propiedades.

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2926.

Cont...Tabla III.4

*Poliésteres derivados de ácido itacónico usados como recubrimientos (continuación). *[32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Jain et al.	Se utilizó un poliéster con sólo un 2% en peso de ácido itacónico como esqueleto para una resina acrílica. En detalle, los enlaces dobles insaturados del poliéster se hicieron reaccionar con metacrilato de metilo, acrilato de butilo y estireno por medio de polimerización radical. Estos poliésteres modificados con acrílico se mezclaron con 20-30% de una resina de melamina-formaldehído.	Posteriormente se aplicaron a una superficie de acero y se curaron durante 30 minutos a 140°C. Los acabados de horneado resultantes mostraron propiedades muy prometedoras.	Podrían ser una adición a los materiales existentes en el campo de recubrimientos para metales.

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2926.

Para ilustrar la tabla III.4, se muestra como ejemplo en la figura III.5 la reacción a detalle llevada a cabo por Tobias et al. [32] para la síntesis de resinas de poliéster como recubrimientos para madera.

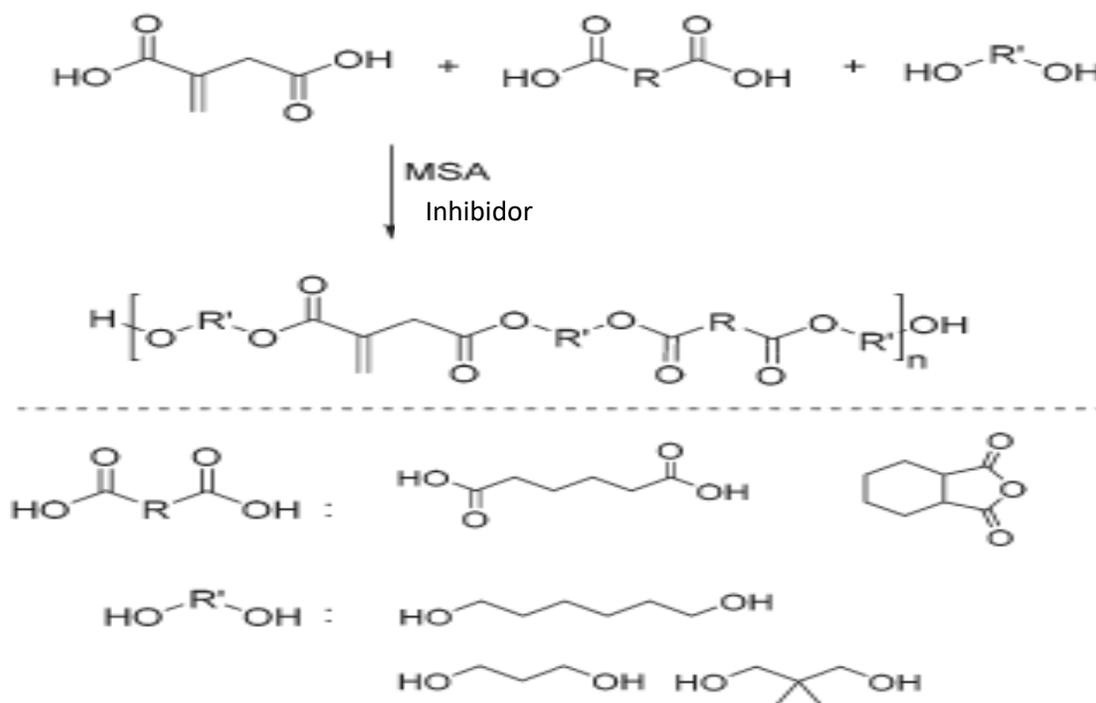


Figura III.5: Síntesis de poliésteres naturales (bio-basados).

Además de los estudios antes mencionados, Tobias et al. [32] reportan otras investigaciones acerca de la policondensación del ácido itacónico que no entran en ninguna de las aplicaciones que se han manejado hasta ahora. Se muestran en la tabla III.5 los resultados de dichos trabajos de investigación.

Tabla III.5

*Otros estudios sobre la policondensación del ácido itacónico *[32]*

Investigadores	Condiciones de reacción	Resultados obtenidos y propiedades	Aplicación
Retuert et al.	Ácido insaturado con etilenglicol en presencia de una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico e hidroquinona como inhibidor a 120°C bajo vacío parcial. Conversión debajo del 85% para evitar reticulación.	Los pesos moleculares eran bajos (hasta 1200 g mol ⁻¹)	Experimentos preliminares de reticulación, los poliésteres obtenidos se copolimerizan fácilmente con una gama de polímeros vinílicos tales como estireno, acrilatos, etc.
Teramoto et al.	Se incorporaron 5, 10 y 15% de ácido maleico o itacónico en prepolímeros como polibutileno succinato que se reticularon posteriormente utilizando peróxido de benzoilo como iniciador térmico.	Una mayor cantidad de ácido el poliéster conduce a una mayor densidad de reticulación. La mayor cantidad de fracción insoluble del 90.9% se obtuvo con el 15% de ácido itacónico presente en el poliéster. La biodegradabilidad disminuye con el aumento de la densidad de reticulación. Menor tiempo de curado con ácido itacónico.	Estudios acerca de la influencia de la densidad de reticulación sobre la solubilidad y biodegradabilidad de prepolímeros como polibutileno succinato.
Ma et al.	Reaccionaron el ácido itacónico con un exceso de epiclohidrina para obtener una resina epóxica de poliéster.	Los poliésteres con pesos moleculares bajos que se curaron con anhídrido metil hexahidroftálico con diferentes aditivos tales como divinil benceno o aceite de soja epoxidado con acrilato.	Alternativa renovable. Las resinas curadas pueden competir con las comerciales derivadas de éter diglicídico de bisfenol A (BADGE).

*Ref: Robert et al. Green Chemistry. 2016, 18, 2928.

Como ejemplo de las reacciones mencionadas en la tabla III.5 se muestra en la figura III.6 el esquema de la reacción utilizada por Ma et al., para la síntesis de las resinas renovables que podrían sustituir a las derivadas de BADGE más comúnmente utilizadas.

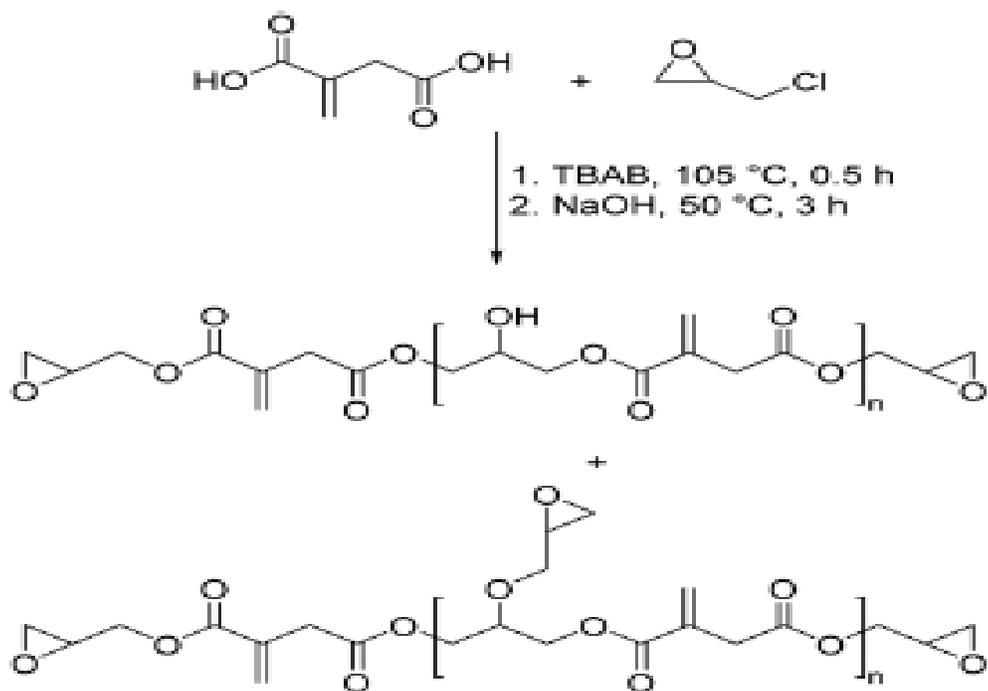


Figura III.6: Síntesis de una resina epóxica basada en ácido itacónico, en presencia de Bromuro de tetrabutilamonio e hidróxido de sodio. [32]

Policondensaciones enzimáticas del ácido itacónico

Además de las rutas de síntesis “clásicas”, los poliésteres derivados del ácido itacónico también pueden sintetizarse mediante catálisis enzimática. A continuación se mencionan algunos ejemplos de investigaciones que se han realizados con el fin de entender este tipo de reacciones.

Yousaf y sus colaboradores [32] realizaron algunas de sus policondensaciones mediante catálisis enzimática. Utilizando la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB), fueron capaces de obtener poliésteres lineales derivados de diferentes dioles con pesos moleculares de 200-11 900 g mol⁻¹. Sin embargo, se necesitaron largos

tiempos de reacción (94 h) y altas temperaturas de reacción (90°C), lo que podría dar lugar a una degradación de las enzimas.

Bajo condiciones algo similares, Loos y colaboradores [32] pudieron obtener co-poliésteres derivados de 1,4-butanodiol, ácido itacónico y un segundo ácido dicarboxílico saturado con pesos moleculares muy altos hasta 58 000 g mol⁻¹. Con este estudio pudieron demostrar que los pesos moleculares de los co-poliésteres resultantes son muy dependientes de la longitud de cadena del otro ácido dicarboxílico y usualmente disminuyen con cantidades crecientes de ácido itacónico.

Gardossi et al. [32] desarrollaron un nuevo tipo de catalizador enzimático inmovilizado mediante la unión covalente de CaLB a una resina metacrílica epoxi funcionalizada. Los autores pudieron demostrar que este catalizador puede ser utilizado en la policondensación de itaconato de dimetilo con butanodiol. Sin embargo, sólo se obtuvieron pesos moleculares bajos de los correspondientes poliésteres incluso después de 96 h de tiempo de reacción.

Un elemento clave para una alta reactividad es la transferencia de masa optimizada y la dispersión homogénea de la enzima. Esto se ve obstaculizado por la necesidad de inmovilizar la enzima para evitar la contaminación del producto y asegurar la reciclabilidad del costoso catalizador. Sin embargo, los autores pudieron demostrar que la reactividad también puede estar influenciada por la concentración y la estructura de los dioles utilizados. Tanto los estudios teóricos como los experimentales mostraron que el diol cíclico más rígido, el 1,4-ciclohexanodimetanol es un sustrato más prometedor para conseguir poliésteres de mayor peso molecular.

Con un enfoque enzimático algo diferente, Yamaguchi et al. [32] utilizaron una policondensación de adición por apertura de anillo catalizada por lipasa (ROACP por sus siglas en inglés) a 25°C durante 2 horas para obtener poliésteres con pesos moleculares que oscilaban entre 560 y 3690 g mol⁻¹. Además del anhídrido itacónico, el anhídrido succínico y el anhídrido glutárico en combinación con diferentes dioles, tales como 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol y 1,10-decanodiol. [32]

En la figura III.7 se muestra la reacción que el equipo de Yamaguchi utilizó para la obtención de poliésteres.

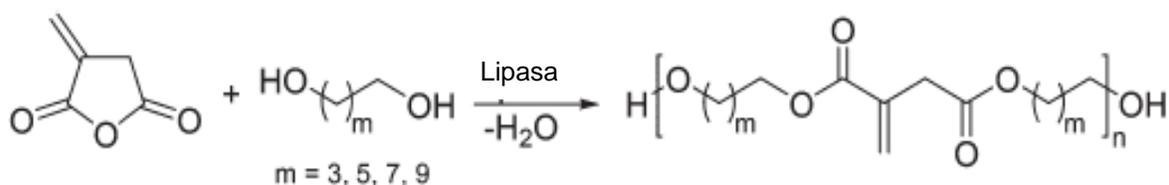


Figura III.7: Síntesis de poliésteres por policondensación de adición por apertura de anillo catalizada por lipasa (ROACP). [32]

Para esta reacción los autores demostraron que el enlace C-C α , β - insaturado en los poliésteres no se ve afectado por la polimerización catalizada por lipasa y puede modificarse adicionalmente después de la reacción de policondensación. Como prueba inicial, un poliéster de anhídrido itacónico y glutárico con 1,8-octanodiol se calentaron sin ningún iniciador a 150°C. La gelificación se produjo después de 3 h. La reacción de reticulación se completó después de 27 h.

Desafortunadamente, la reticulación sólo se examinó con un poliéster y no se realizaron experimentos adicionales con iniciadores térmicos o fotoiniciadores para investigar la reactividad de estos poliésteres.

Como se sabe, los estudios acerca de la reticulación de los polímeros son de suma importancia pues se trata de una reacción química por la que los polímeros se unen en cadenas tridimensionalmente formando una especie de red. Tras esta reacción, las propiedades químicas del polímero inicial cambian.

Después de la reticulación las moléculas adquieren mayor rigidez, ya que los movimientos de relajación se encuentran impedidos. En el caso de los elastómeros esto ayuda a que las propiedades de resiliencia incrementen.

CAPÍTULO IV

PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Hoy en día, el ácido itacónico se produce a escala industrial a través de la fermentación de *Aspergillus terreus* con un rendimiento de producción de 80 g/L. Se estima la producción mundial en alrededor de 80,000 toneladas por año, con un precio de alrededor de 2 dólares por kg. Debido al alto potencial de este compuesto, se espera que la capacidad de producción crezca un 5.5% cada año entre 2016 y 2023. [33]

Con base en un trabajo de investigación diferente, se muestra en la figura IV.1 el porcentaje de empresas productoras de ácido itacónico por zona geográfica de un total de aproximadamente 60 a nivel mundial.

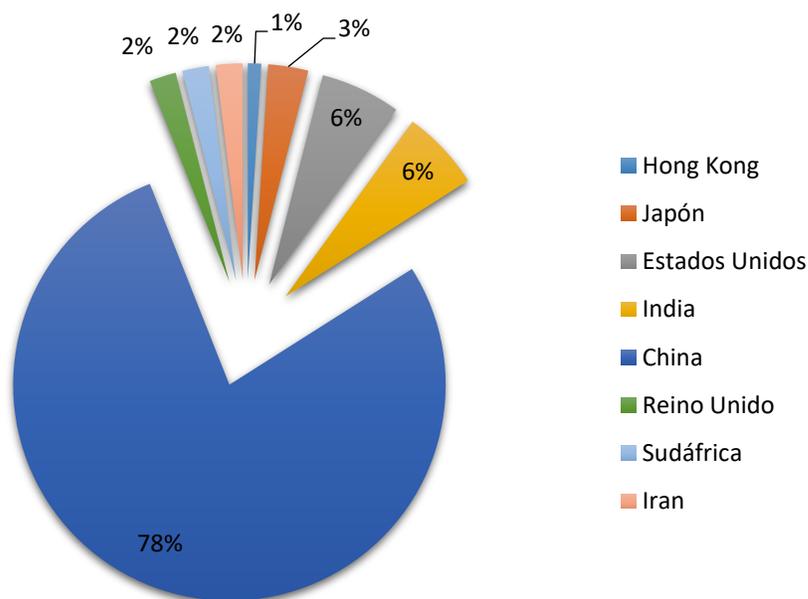


Figura IV.1: Gráfica de la ubicación de las principales empresas productoras de ácido itacónico por zona geográfica en el mundo. [34]

Se puede observar que es en China donde se encuentra la mayor concentración de empresas productoras y exportadoras de ácido itacónico en el mundo.

Así como existen países en los cuales se realiza la investigación, producción y exportación de este producto, existen también lugares en los cuales no se tiene la información y tecnología necesaria para su producción, mucho menos la iniciativa o el interés por recurrir a este tipo de materia prima alternativa.

México un ejemplo de país donde no se produce este ácido razón por la cual eso significa un nicho de mercado. De hecho en la figura IV.2 se puede observar que Norteamérica no aparece como importador, la razón es que en E.U.A. se produce y exporta este ácido al igual que en China. No debe suponerse que México sea también exportador por el simple hecho de pertenecer a esta zona del continente americano.

La gráfica de la figura IV.2 representa los porcentajes de importaciones por zona continental de un total de aproximadamente 100,000 ton/año [34]:

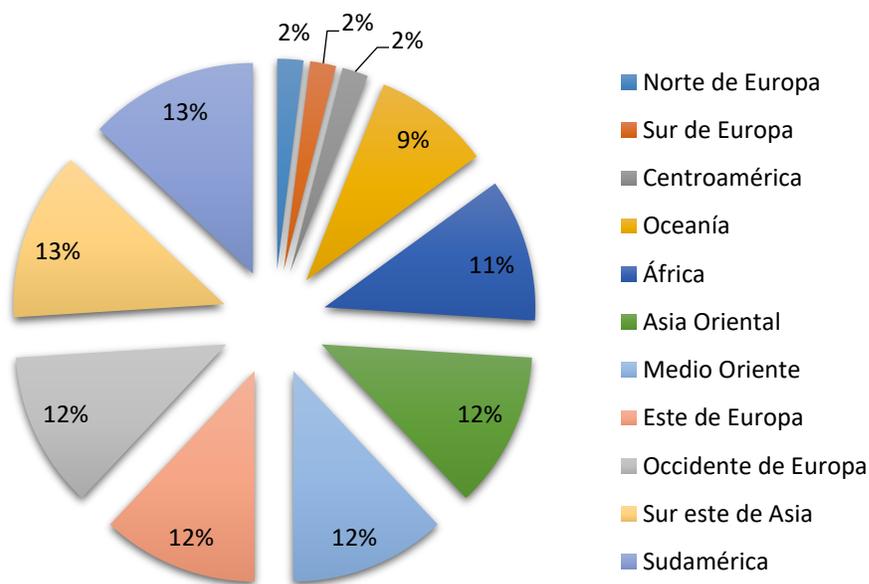
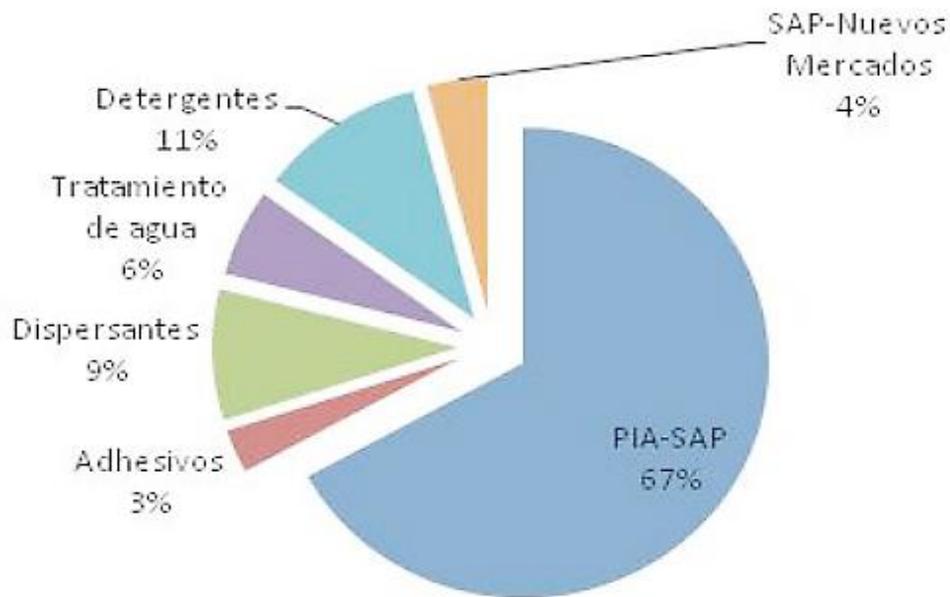


Figura IV.2: Gráfica de las principales zonas continentales de importación de ácido itacónico en el mundo. [34]

El poliácido itacónico (PIA por sus siglas en inglés) es llamado a ser un reemplazo atractivo de los bien establecidos acrilatos a base de petróleo. Los usos que se le dan a este y otros polímeros derivados del ácido itacónico son muchos como se describe a continuación.

De acuerdo con Itaconix, una empresa americana dedicada a la producción del ácido itacónico y sus polímeros derivados, el potencial de mercado global para PIA ha sido estimado en 1.65 miles de toneladas/año con SAP (polímeros súper absorbentes) ocupando el 67% del mercado; 3% adhesivos, dispersantes 9%; tratamiento de agua 6%; 11% detergentes; y el 4% para los nuevos mercados de SAP.

Se muestran en la figura IV.3 los porcentajes que ocupan cada una de estas aplicaciones:



Total = 100000 ton/año

Figura IV.3: Gráfica de las principales aplicaciones del ácido itacónico en el mercado. [35]

Con el fin de desplazar los acrilatos, la empresa Itaconix dice que se debe llegar a un costo de producción por debajo de 1.5 USD/Kg usando biomasa como materia prima.

El poliácido itacónico ha sido producido por Itaconix usando ácido itacónico comercial obtenido de la fermentación de dextrosa típicamente derivada de maíz o arroz. Bajo tal estructura no integrada, PIA puede ser producido a un costo de 3 dólares por Kg. [35]

Todo esto visto desde la perspectiva de la empresa Itaconix. Ahora de acuerdo con un informe de la organización Transparency Market Research (TMR), [36] en general, el mercado mundial de ácido itacónico fue valorado en 126.4 millones de dólares en 2014 y se espera que alcance 206 millones de dólares en 2023, creciendo a una tasa compuesta anual de 5.5% entre 2015 y 2023.

El ácido itacónico se considera un intermediario importante en la síntesis de combustibles y productos químicos biológicos. Se produce comercialmente bajo condiciones de nitrógeno limitado a partir de jarabe de glucosa derivado de almidón de maíz, también se emplea en varias aplicaciones de uso final en industrias tales como látex sintético, resinas de poliéster insaturado, detergentes, polímeros súper absorbentes, aceite lubricante y pinturas y revestimientos. Se prevé que el precio del ácido itacónico juegue un papel importante en la determinación de la tasa de crecimiento de esta sustancia química bio-basada entre 2015-2023.

IV.1 Mercado

El informe de Transparency Market Research (TMR) [36] proporciona una descripción detallada del mercado mundial del ácido itacónico en términos de volumen de toneladas (toneladas) e ingresos (USD) para el período de 2015 a 2023. Destaca los factores que contribuyen al crecimiento del mercado. También enumera restricciones que enfrenta el mercado.

En términos de aplicación, el mercado del ácido itacónico ha sido segmentado en látex sintético, resinas de poliéster insaturado, detergentes, polímeros súper absorbentes y otros. Este reporte proporciona previsiones y estimaciones para cada segmento de aplicación en términos de ingresos y volumen durante el período de previsión de 2015 a 2023. Cada uno de los segmentos de aplicación se ha analizado más a nivel regional y nacional de 2014 a 2023 en términos de volumen e ingresos.

La segmentación global del mercado de ácido itacónico, por aplicación y geografía se muestra de manera resumida en la figura IV.4, en la que se incluyen las aplicaciones del ácido itacónico antes mencionadas.

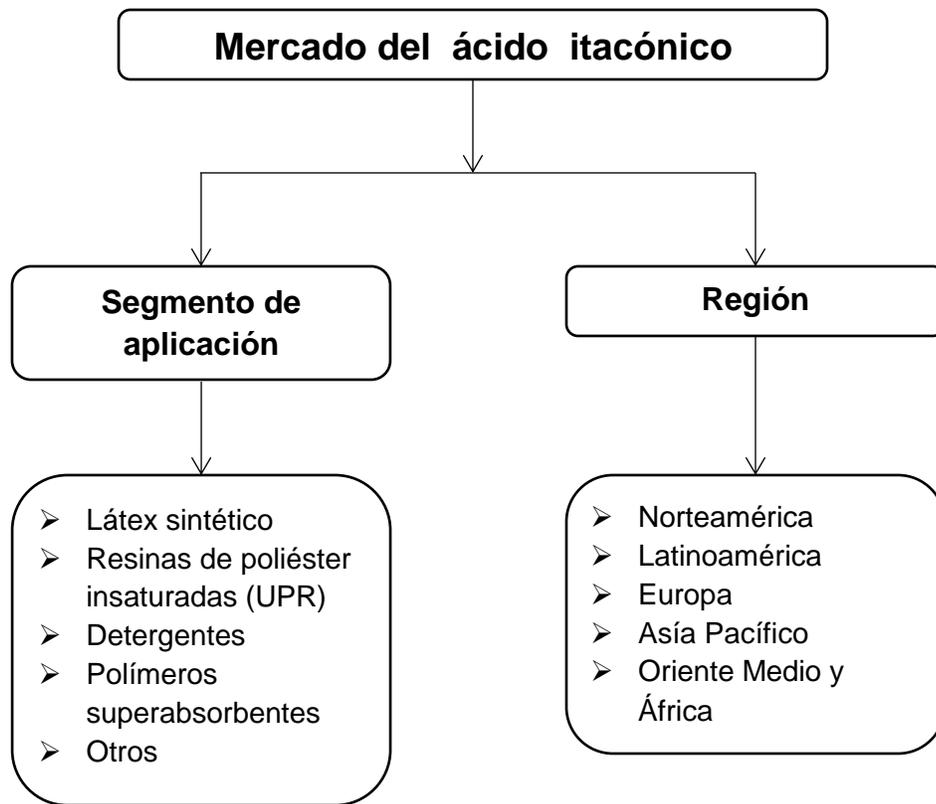


Figura IV.4: Segmentación global del mercado de ácido itacónico, por aplicación y geografía.

El informe incluye el análisis de la cadena de valor y el Modelo de cinco fuerzas de Porter. Estos ayudan a proporcionar una visión integral del mercado. Estos también arrojan luz sobre la dinámica de la estructura de la industria, además de proporcionar una visión general del grado de competitividad en el mercado.

También se incluye el análisis de las tendencias de precios del ácido itacónico de 2014 a 2023. Además, el informe cubre las principales conclusiones de la investigación a través de entrevistas primarias con expertos clave de la industria y líderes de opinión para sustentar la investigación secundaria.

El informe también ofrece un panorama competitivo del mercado en general con perfiles de los principales actores globales como Itaconix Corporation, Nanjing Huajin productos biológicos Co., Ltd., Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Chengdu Jinkai Biología Engineering Co., Ltd., Qingdao Langyatai Zhujiang Guoguang

Biochemistry Co., Ltd. Los perfiles de las empresas incluyen parámetros tales como visión general de la compañía, descripción financiera, estrategias de negocios, desarrollos recientes, instalaciones próximas y grandes fusiones y adquisiciones.

Alcance y supuestos de la investigación de mercado.

- El volumen del mercado de ácido itacónico es una medida estimada de la demanda de ácido itacónico en toneladas.
- Los precios del ácido itacónico varían en cada región. Los precios regionales se han considerado para estimar y pronosticar el mercado global del ácido itacónico en términos de rédito.
- El tamaño del mercado global del ácido itacónico se ha presentado tanto en términos de volumen como de ingresos. El volumen de mercado se da en toneladas, mientras que los ingresos del mercado se proporcionan en USD.
- Otras aplicaciones incluyen aceite lubricante, adhesivos, pinturas y revestimientos, productos farmacéuticos, herbicidas, emulsionantes, productos químicos de impresión y fibra acrílica.
- Se incluyen cotizaciones en tiempo real para precios históricos y pronosticados de fabricantes.
- El precio considerado para el cálculo de los precios medios se obtiene mediante cotizaciones primarias de numerosos proveedores regionales, distribuidores y productores regionales de venta directa.
- Se han considerado tasas de cambio constantes para pronosticar el mercado.
- Se espera que el precio promedio del ácido itacónico disminuya durante el período de pronóstico debido al aumento en la utilización de sus capacidades como resultado de los avances tecnológicos.

Como metodología de investigación, en la Transparency Market Research (TMR) [36] se realizaron entrevistas y discusiones con una amplia gama de participantes clave de la industria y líderes de opinión para dar a conocer este informe de investigación.

Análisis de la Industria

El ácido itacónico, también conocido como ácido metilsuccínico, es uno de los principales químicos bio-basados. Se utiliza como un componente importante en la industria química. Un informe publicado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) en 2004 enumera el ácido itacónico como uno de los 12 productos químicos prometedores obtenidos a través de biomasa. Por ello se considera que la producción del ácido itacónico significa un nicho de mercado, debido al limitado consumo en diversas industrias.

Sin embargo, se espera que la demanda aumente en 2020, ya que es un producto químico de base biológica. Desde el punto de vista de mercado, las aplicaciones principales del ácido itacónico incluyen látex sintético, detergentes, aglutinantes y aditivos lubricantes. El ácido itacónico también se utiliza como plastificante en la industria del plástico y como reactivo en la reacción de poliesterificación.

El ácido itacónico se emplea como plastificante en polímeros para mejorar las propiedades físicas tales como la plasticidad y la fluidez del polímero. Por lo tanto, sirve como un sustituto para el ácido metacrílico o ácido acrílico derivado de la petroquímica. El ácido itacónico se utiliza principalmente en la producción de látex de caucho de estireno butadieno (SBR), que es una categoría de látex sintético. Se copolimeriza fácilmente con el caucho y actúa como agente adhesivo en la producción de SBR. El ácido itacónico proporciona un equilibrio de elasticidad y propiedad viscosa al caucho. Está disponible en varios grados tales como grado electrónico, alimenticio, y grado industrial para diversos propósitos comerciales.

El costo de producción es un determinante importante en el precio del ácido itacónico. Se anticipa que el costo de producción del ácido itacónico disminuirá significativamente en un futuro próximo, debido a la evolución en curso en el proceso de producción del ácido. Como resultado, se prevé que el uso de ácido itacónico en varias industrias de aplicación aumentará durante el período de pronóstico de 2015 a 2023. La disminución de precio haría factible el ácido para su uso en la producción

de metacrilato de metilo (MMA), que es un polímero termoplástico utilizado ampliamente en aplicaciones ópticas.

El mercado global del ácido itacónico estuvo muy concentrado en 2014. Actualmente, existe un grado significativo de concentración de mercado debido a la presencia de algunas compañías privadas clave que fabrican ácido itacónico para satisfacer la demanda global.

Dichas compañías dominantes del mercado incluyen Itaconix Corporation, Chengdu Jinkai Biología Engineering Co., Ltd., Qingdao Langyatai (Group) Co., Ltd., Nanjing Huajin productos biológicos Co., Ltd., Ronas Chemicals Ind., Ltd., Shandong Kaison Biochemical Co Ltd., Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Zhejiang Guoguang Bioquímica Co., Ltd. y Alpha Chemika.

El maíz y *Aspergillus terreus* son las principales materias primas utilizadas en la fabricación de ácido itacónico. La demanda de producir ácido itacónico a través de la ruta microbiológica ha cobrado impulso durante la última década. Compañías como Cargill, Inc., Grain Millers, Inc., Syngenta y MyBioSource, Inc. son los principales proveedores de materias primas para su fabricación. [36]

La demanda de este ácido es alta para la fabricación de polímeros súper absorbentes (SAP). El ácido itacónico se utiliza como un agente de reticulación debido a su capacidad de tomar parte de manera eficiente en la polimerización por adición.

Los SAP se utilizan en pañales para la incontinencia de adultos, y productos de higiene femenina. También tienen gran aplicación en el recubrimiento de semillas, inmersión de raíz, jardines ornamentales, el envasado de alimentos, y en la nieve artificial. Por otra parte, se espera que el aumento de la demanda de resinas de poliéster insaturado (UPR) en tubos, piedras artificiales, armarios eléctricos, y resinas de laminación incrementará la demanda de ácido itacónico.

El alto precio de ácido itacónico es el principal factor que dificulta el crecimiento de su respectivo mercado. Los precios del ácido itacónico son actualmente más altos

que sus homólogos y, por tanto, el potencial para la sustitución es poco significativo. Sin embargo, el potencial de crecimiento está previsto que aumente en el futuro próximo debido al continuo desarrollo y la exploración de las nuevas tecnologías de producción.

El látex sintético fue el segmento más grande de aplicaciones en el mercado de ácido itacónico en términos de volumen, en 2014 [36] y se mantuvo más del 55% de cuota del mercado mundial. Se espera que este segmento sea testigo de la tasa de crecimiento más rápida durante el segundo período de pronóstico.

Para el segmento de detergentes se prevé que sea un mercado en crecimiento lento entre 2015 y 2023. Poliácido itacónico (polímero del ácido itacónico) tiene el potencial de reemplazar tripolifosfato de sodio en detergentes. Sin embargo, la fuerte creación de otros detergentes sin fosfatos impide el crecimiento de ácido itacónico en esta aplicación.

En la figura IV.5 se puede observar la tendencia que se tiene prevista para el periodo antes mencionado respecto al mercado del ácido itacónico a nivel mundial.

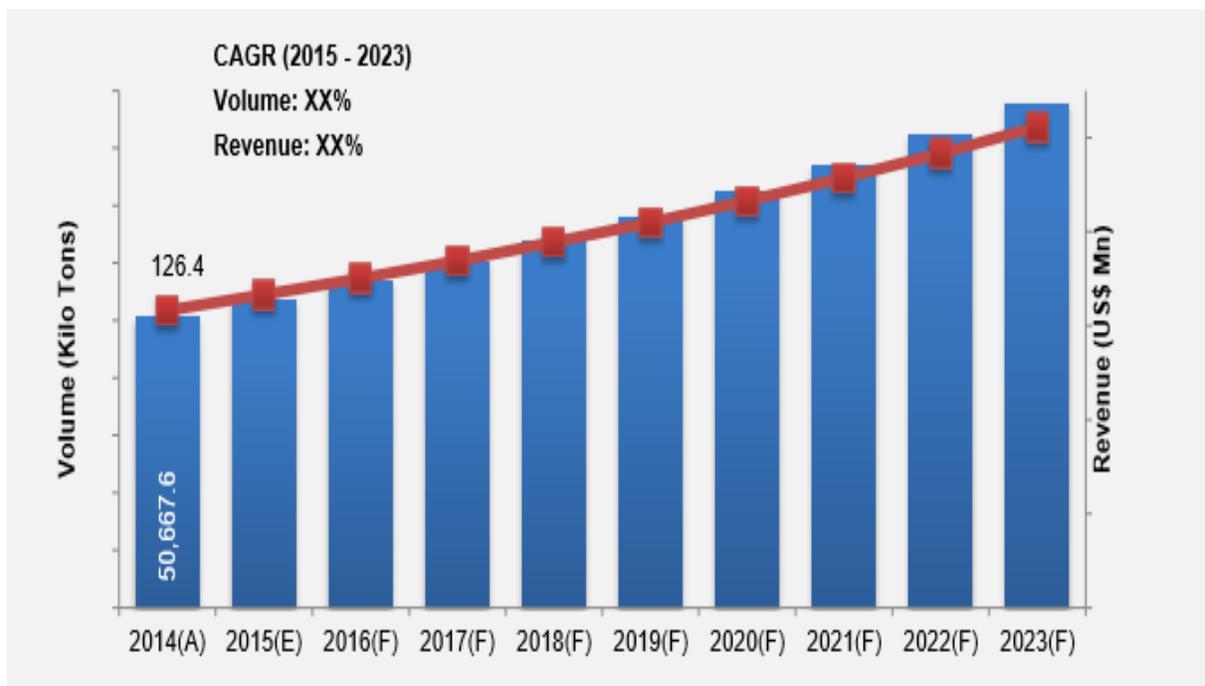


Figura IV.5 Gráfica de la tendencia que se espera del año 2015 al 2023 para la producción de ácido itacónico. [36]

Como se mostró en la gráfica de tendencia de la figura IV.5, si la situación sigue el curso que hasta ahora ha llevado, la demanda del producto aumentará considerablemente pues se pretende sustituir gran parte de los polímeros derivados del petróleo por compuestos de origen natural y de degradación más rápida como lo son el poliácido itacónico y sus copolímeros.

Otros segmentos de aplicación tales como aceites lubricantes, adhesivos, pinturas y recubrimientos, productos farmacéuticos, emulsionantes, herbicidas, productos químicos para impresión, y fibra acrílica se espera que crezcan a un ritmo moderado en el periodo 2015-2023.

IV.2 Ejemplo de costeo preliminar

Además del almidón de maíz licuado utilizado como sustrato en el proceso de obtención del ácido itacónico, se puede usar el jugo de caña de azúcar con el mismo fin. A continuación se presenta un ejemplo de costeo preliminar que contiene los principales costos que se deben tomar en cuenta para la construcción y mantenimiento de una planta de producción de ácido itacónico a partir de jugo de caña de azúcar.

Se empieza por mencionar los costos de manufactura que se dividen en materia prima, costos de operación, mano de obra y costos de administración que corresponden al 62.22%, 35.19%, 1.72%, y 0.87% respectivamente del total de costos.

De los costos totales de manufactura, las materias primas abarcan los siguientes porcentajes: el jugo de caña de azúcar 11.27%, fosfato monopotásico 0.40%, nitrato de amonio 0.18%, licor de maíz 0.16%, sulfato de magnesio 0.40%, carbón activado 0.02%, etanol 49.62% y agua 0.01%.

Los costos de operación, se pueden subdividir en variables y fijos. Los costos variables abarcan el 12.24% del total de costos de manufactura y de éstos se tienen los servicios con el 8.51%, de los cuales el vapor de agua se lleva el 3.65%, el agua de enfriamiento el 0.40 %, la energía eléctrica el 2.02 %, el tratamiento de aguas el

2.42% y la activación del carbón el 0.02%. Otros costos variables son los de mantenimiento que abarcan el 3.73% del total de costos de manufactura.

Se tienen también los siguientes porcentajes para los costos fijos: depreciación 5.53%, el mercadeo 8.32% y otros 9.10%.

El mayor porcentaje de los costos totales de manufactura lo lleva la materia prima, sobre todo el etanol, con el que se llevan a cabo las operaciones unitarias de purificación del producto final.

Todo lo anterior tomando en cuenta una producción total anual de 4,788.5 ton/año y considerando el costo del producto en 3,616.3 USD/ton para el año 2013 de acuerdo con lo que nos muestra Carabalí, D. [34] en su trabajo. Además se debe considerar la depreciación del peso frente al dólar en los últimos años.

CONCLUSIONES

- El ácido itacónico tiene una estructura química similar al ácido acrílico lo que le da la versatilidad para suplir este tipo de compuestos en aplicaciones como: látex sintético, resinas de poliéster insaturadas, detergentes, polímeros súper absorbentes (SAP), biomedicina, recubrimientos, entre otras.
- Se obtiene de carbohidratos provenientes del almidón de maíz, del jugo de caña de azúcar o de la cáscara de camote, mediante un proceso de fermentación con el hongo *Aspergillus terreus*.
- Se obtiene del almidón de maíz licuado un rendimiento de 77.6 g/L, de cáscara de camote 100 g/L, de jugo de caña de azúcar se reporta un 60% y por último, a través de la biosíntesis hasta 85 g/L.
- Se encontró que con ayuda de la ingeniería genética podría alcanzarse una concentración teórica máxima de aproximadamente 240 g/L.
- Existen diferentes técnicas de polimerización tales como: en solución acuosa, con dioxano, a partir de anhídrido itacónico y por iniciación redox. La polimerización en solución acuosa con un rendimiento del 16%, en dioxano 32%, a partir de anhídrido itacónico sólo se reporta un peso molecular promedio de 12,810, por iniciación redox se reporta un polímero de estructura complicada.
- El mayor peso molecular promedio (\bar{M}_n) reportado de 16,290 se obtuvo mediante polimerización en solución acuosa.
- La producción comercial promedio es de 80 g/L, y su costo de producción es alrededor de 2 a 4 dólares por Kg.
- El mercado mundial de ácido itacónico se evalúa en 126.4 millones de dólares en 2014 y se espera que alcance 206 millones de dólares en 2023, creciendo a una tasa compuesta anual de 5.5% entre 2015 y 2023.
- La mayor cantidad de industrias que lo producen se encuentran en China y Estados Unidos.

- Los derivados importantes del ácido itacónico son los poliésteres que tienen una amplia aplicación en el área biomédica, polímeros inteligentes, elastómeros, recubrimientos, entre otros.
- En la actualidad es imprescindible continuar los estudios acerca de los poliésteres derivados del ácido itacónico así como de otros derivados que surjan de las investigaciones, debido a que el desarrollo tecnológico exige materiales poliméricos con mejores propiedades para sus distintas aplicaciones y la tendencia del mercado es hacia los compuestos renovables.
- Este trabajo se considera que será punto de partida para investigaciones sobre procesos de obtención y transformación sustentables del poliácido itacónico y sus copolímeros, así como de otros polímeros bio-basados.

REFERENCIAS.

- [1] Katime, I. (2009). Monoderivados del ácido itacónico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(3), 131-142.
- [2] Kinoshita (1932) en G. Steiger M., L. Blumhoff, M., Mattanovich, D. y Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiologic*, 4(23), 1
- [3] Bentley, R. y Thiessen (1957) en G. Steiger M., L. Blumhoff, M., Mattanovich, D. y Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiologic*, 4(23), 1-2.
- [4] Strelko et al (2011) en G. Steiger M., L. Blumhoff, M., Mattanovich, D. y Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiologic*, 4(23), 2.
- [5] C. Nubel, R. y J. Rtajak, E. (1962). E.U.A. *Process for producing itaconic acid. No. 3044941. Washington, DC: Oficina de patentes y marcas de E.U.A.*
- [6] Kobayashi, T. et al. (1975). Japón. *Process for producing itaconic acid. No. 3873425. Pág. 1-2 Washington DC: Oficina de patentes y marcas de E.U.A.*
- [7] Stawski, D., y Polowinski, S. (2004). *Polymerization of itaconic acid. Polimery*, 50(2), 118
- [8] Producción de Ácido Itacónico. España: Obtenido el 12 de abril del 2016, en: http://www.ugr.es/~iquimica/PROYECTO_FIN_DE_CARRERA/lista_proyectos/p182.htm
- [9] Cowie, J. (1979). Physical properties of polymers based on itaconic acid. *Pure Appl. Chem.*, 51, 2331-2343.
- [10] Rojas et al. (2011). Copolimerización metacrilato con itaconatos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(1), 23-31
- [11] Robert, T. y Friebel S. (2016) Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18, 2923.
- [12] Itaconic acid. E.U.A.: *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=811*. Obtenida el 5 de Abril del 2016, en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Itaconic_acid#section=Top
- [13] Op. Cit. Producción de Ácido Itacónico. España: Obtenido el 12 de abril del 2016, en: http://www.ugr.es/~iquimica/PROYECTO_FIN_DE_CARRERA/lista_proyectos/p182.htm
- [14] Raamsdonk, L. (2014). Tomorrow's Biorefineries in Europe. Bélgica: *DSM*. Obtenido el 08 de Marzo del 2016 en: http://www.biocore-europe.org/file/2_3%20BIOCORE%20L%20Raamsdonk%20DSM%20Itaconic%20acid.pdf
- [15] Op. Cit. Robert, T. y Friebel S. (2016) Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18, 2923.
- [16] Requena, A. (2008). *Tríadas. Nuevas Lecturas en Ciencia y Tecnología*. La Coruña, España: Netbiblo, S. L.

- [17] *Aspergillus Terreus*. E.U.A.: *Mycota*. Obtenido el 18 de Abril del 2016 en: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=96#ancre5>
- [18] García, L. et al. (2015) Protocolo de aislamiento de cepas de *Aspergillus Niger* a partir de un fruto cítrico y su identificación. México: *Prezzi*. Obtenido el 19 de Abril del 2016 en: <https://prezi.com/5wvhupccmd3c/protocolo-de-aislamiento-de-cepas-de-aspergillus-niger-a-par/>
- [19] M. I. Juy et al. (2010). Estudio de la producción de ácido itacónico con *Aspergillus terreus* de la cepa MJL05 con diferentes variables. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 187-193.
- [20] Op. Cit. Kobayashi, T. et al. (1975). Japón. *Process for producing itaconic acid*. No. 3873425. Pág. 1-2 Washington DC: Oficina de patentes y marcas de E.U.A.
- [21] Segura, A. (2015). Producción de ácido itacónico. México: *Prezzi*. Obtenido el 25 de abril de 2016 en: https://prezi.com/h_laxoynly6d/copy-of-produccion-de-acido-itaconico/
- [22] Huang, X. et al. (2014). Direct production of itaconic acid from liquefied corn starch by genetically engineered *Aspergillus terreus*. *Microbial Cell Factories*, 13:108. DOI: 10.1186/s12934-014-0108-1
- [23] Omojasola, P. y Adeniran, E. (2014). The Production of Itaconic Acid from Sweet Potato Peel Using *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Albanian j. agric. sci.* 13(4) 72-77
- [24] Carabalí, D. (2013). Producción de ácido itacónico a partir de jugo de caña de azúcar. Colombia: *Prezzi*. Obtenido el 15 de Marzo del 2016 en: <https://prezi.com/nb0h-2zhkfd-/copy-of-produccion-de-acido-itaconico-a-partir-de-jugo-de-cana-de-azucar/>
- [25] Biorreactores de tipo Air-Lift. (2005). España: *Biorreactores*. Obtenido el 27 de abril en: <http://documents.mx/documents/biorreactores-de-tipo-air-lift.html>
- [26] Op. Cit. G. Steiger M., L. Blumhoff, M., Mattanovich, D. y Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiologic*, 4(23), 2-4.
- [27] Op. Cit. Robert, T. y Friebel S. (2016) Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18, 2923.
- [28] Op. Cit. Stawski, D., y Polowinski, S. (2004). *Polymerization of itaconic acid*. *Polimery*, 50(2), 118-120
- [29] Procesos de fabricación de polímeros sintéticos. (2013) España: *Textos científicos*. Obtenido el 7 de Mayo del 2016 en: <http://www.textoscientificos.com/polimeros/fabricacion-polimeros-sinteticos>
- [30] Documentación Límites Exposición Profesional 61(2011) *Dioxano*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España.
- [31] Shang, S., Huang, S. y Weiss, R.A. (2009) Synthesis and characterization of itaconic anhydride and stearyl methacrylate copolymers, *Polymer*, 50, 3119-3127.

- [32] Op. Cit. Robert, T. y Friebel S. (2016) Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18, 2923-2930.
- [33] Op. Cit. Robert, T. y Friebel S. (2016) Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. *Green Chemistry*, 18, 2923-2922.
- [34] Op. Cit. Carabalí, D. (2013). Producción de ácido itacónico a partir de jugo de caña de azúcar. Colombia: *Prezzi*. Obtenido el 15 de Marzo del 2016 en: <https://prezi.com/nb0h-2zhkfd-/copy-of-produccion-de-acido-itaconico-a-partir-de-jugo-de-cana-de-azucar/>
- [35] De Guzmán, D. (2009). What is Itaconic acid? E.U.A.: *ICIS blogs*. Consultado el 28 de Marzo del 2016, en: <http://www.icis.com/blogs/green-chemicals/2009/10/what-is-itaconic-acid/>
- [36] Itaconic Acid Market (2015). Global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast, 2015–2023. E.U.A.: *Transparency Market reseach*. Obtenido el 1 de Abril del 2016 en: <http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/itaconic-acid-market.htm>

ANEXO

GLOSARIO DE TÉRMINOS

α -amilasa: enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces alfa-glucosídicos del almidón de maíz para la obtención de ácido itacónico.

AA: ácido adípico.

Acetil-CoA: molécula intermediaria en la ruta de biosíntesis del ácido itacónico.

ácido cis-aconítico: este ácido puede ser descarboxilado por la enzima *CadA* para formar ácido itacónico.

ácido citracónico: derivado del ácido itacónico.

ácido málico: subproducto del proceso de obtención del ácido itacónico a través de la fermentación del jugo de caña de azúcar.

ácido mesacónico: derivado del ácido itacónico.

ácido sebácico: materia prima que usaron Guo et al. junto con ácido itacónico para la obtención de poliésteres SMP.

aconitasa: o aconitato hidratasa, enzima que cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a isocitrato a través de cis-aconitato en la biosíntesis del ácido itacónico (ciclo de Krebs).

AI: ácido itacónico.

AIBN: azobisisobutironitrilo, llamado también 2,2'-azobis (2-metilpropionitrilo).

análisis de la cadena de valor: herramienta gerencial para identificar fuentes de Ventaja Competitiva.

anhídrido itacónico: ampliamente utilizado en los promotores de la cohesión del metal, resina sintética, catalizadores de la esterificación, agentes de la prevención de la color-pérdida, herbicidas, pesticidas, entre otros. Materia prima para la obtención de poliácido itacónico.

aparato de Dean Stark: se utiliza en combinación con un condensador de reflujo y un matraz colector para eliminar de manera continua el agua que se produce durante una reacción química que tiene lugar a la temperatura de reflujo.

Aspergillus flavipes: grupo biológico al que pertenece *Aspergillus terreus*.

Aspergillus itaconicus: hongo capaz de producir ácido itacónico descubierto por Kinoshita [2].

Aspergillus nidulans: de este se obtiene el gen *PgpdA* que es el promotor más frecuentemente utilizado para la modificación genética de *Aspergillus terreus*.

Aspergillus niger: tipo de hongo que también se ha utilizado para la producción de ácido itacónico.

Aspergillus terreus: hongo ampliamente utilizado para la obtención de ácido itacónico a través de la fermentación de diferentes sustratos.

Aspergillus usamii: hongo productor de glucoamilasa que Kirimura et al. [21] fusionaron en una cepa con *A. terreus* para la producción de ácido itacónico.

ATEG_09971: secuencia genética usada en *A. terreus* para la producción de ácido itacónico en la ruta de biosíntesis.

BADGE: éter diglicídico de bisfenol A.

BHT: butilhidroxitulueno.

bioerosionable: polímeros que a través de erosión mecánica por acción del agua o de procesos de oxidación se degradan fácilmente.

biosíntesis: Conjunto de reacciones químicas que permiten a un ser vivo elaborar sustancias orgánicas complejas, como las proteínas, grasas, etc., a partir de otras más sencillas.

cadA: denominación que se le da al gen modificado de *A. terreus* que se utiliza en el proceso de biosíntesis para la obtención de AI.

CadA: cis-aconitato descarboxilasa, forma ácido itacónico a partir del cis-aconitato y libera dióxido de carbono en la ruta de biosíntesis.

CaLB: lipasa B de *Candida antártica*.

Candida: género de hongos unicelulares también llamados levaduras.

CH_αO_βN_εP_γ: composición del micelio en el proceso de fermentación para la obtención de AI.

Chloroflexus aurantiacus: bacteria fotosintética aislada en fuentes hidrotermales, que pertenece al grupo de las bacterias verdes no sulfurosas.

Cis-aconitato: ácido carboxílico cuyo ácido conjugado, el aconitato o cis-aconitato, es un intermediario de isomerización del citrato a isocitrato durante el ciclo del ácido cítrico.

citramalato: sal del ácido citramálico.

citramanil-CoA: citramanil coenzima A que procesa la itaconil-CoA a piruvato.

citrato: sal del ácido cítrico.

citrato sintasa: enzima que existe en casi todas las células y cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs.

CMC: carboximetilcelulosa, compuesto orgánico, derivado de la celulosa, compuesto por grupos carboximetil, enlazados a algunos grupos hidroxilo.

compartimentalización: función de la membrana que define, limita la célula y mantiene las diferencias entre el contenido citosólico y el exterior celular.

Convolvulaceae: familia de la campánulas o gloria de la mañana, con unos 60 géneros y más de 650 especies. Las hojas y el almidón de las raíces tuberosas de unas determinadas especies se utilizan como alimento (ejemplo patata dulce y la espinaca de agua).

Cte: corriente de proceso en el diagrama de la figura II.5.

DBTL: dibutil estaño.

dibutil itaconato: éster derivado del ácido itacónico.

dimetil itaconato: éster derivado del ácido itacónico.

dioxano: éter cíclico con la fórmula $C_4H_8O_2$ con un esqueleto de 4 átomos de carbono y 2 átomos de oxígeno en posiciones opuestas dentro de un hexágono. En condiciones normales se trata de un líquido volátil e incoloro.

DOE: departamento de energía de E.U.A.

DPPA: ácido difenil fosfórico.

enzima citosólica: enzima que realiza su actividad enzimática en el citosol celular.

enzima mitocondrial: enzima que realiza su actividad enzimática en la mitocondria celular.

estrés hidrodinámico: comúnmente se hace referencia a este término para explicar cambios negativos en los cultivos, por ejemplo, se compara el comportamiento de un cultivo en un biorreactor aireado y agitado mecánicamente con su comportamiento en matraces agitados con aireación superficial.

expresión génica: proceso por medio del cual todos los microorganismos procariontes y células eucariotas transforman la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo, funcionamiento y reproducción con otros organismos.

expresión heteróloga: expresión génica de un gen que tienen diferente origen y función.

fitasas: así han sido denominadas las enzimas que pueden hidrolizar o degradar secuencialmente el complejo fitato.

fosfatasa: enzima del grupo de las esterasas que cataliza la eliminación de grupos fosfatos de algunos sustratos.

glioxilato: intermediario del ciclo del glioxilato, el cual permite a algunos organismos tales como las bacterias, hongos, y plantas convertir ácidos grasos en carbohidratos.

glucoamilasa: tipo de enzima que parte o desprende una molécula de glucosa libre de las cadenas formadas a partir de azúcares complejos que forman el almidón o de un azúcar más simple como la maltosa.

gpd: promotor nativo de *A. terreus* que ha sido aplicado con éxito para su sobreexpresión.

HDO: 1,6 hexanodiol.

heterólogo: Dícese de todo aquello derivado o procedente de una especie distinta de la especie de referencia, en este caso genes.

HPSA: anhídrido hexahidroftálico.

***Ipomea batatas*:** llamada comúnmente batata (del taíno), papa dulce, patata dulce, camote (del náhuatl camohtli) o boniato, es una planta de la familia *Convolvulaceae*, cultivada en gran parte del mundo por su raíz tuberosa comestible.

inductor: (genética) molécula efectora que activa la transcripción.

isocitrato: metabolito del ciclo de Krebs que se genera después de la reacomodación del ácido cítrico (C₆H₈O₇), por acción de la enzima aconitasa.

isocitrato liasa: enzima que fragmenta el isocitrato en glioxilato y succinato en el ciclo del glioxilato.

isosorbida: 1,4-dianhidrosorbitol, proveniente del sorbitol.

itaconato: derivado del ácido itacónico.

itaconil CoA hidratasa: se deriva del itaconato y se procesa posteriormente a través de citramalil-CoA a piruvato y acetil-CoA, dentro del mecanismo de degradación del AI.

lipasa: enzima que se usa en el organismo para disgregar las grasas de los alimentos de manera que se puedan absorber.

malato: forma ionizada del ácido málico, interviene en la biosíntesis del ácido itacónico.

Me-HQ: mequinol.

Me-PSQ: polisilsesquioxanos sustituidos con metacrilato.

MFS: Principal Superfamilia de transportadores facilitadores génicos.

micromatriz: chip de ADN (del inglés *DNA microarray*) es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN.

MJL05: Cepa de *A. terreus* utilizada para la producción del AI.

MMA: metacrilato de metilo.

Modelo de las cinco fuerzas de Porter: modelo estratégico elaborado por el ingeniero y profesor Michael Porter de la Escuela de Negocios Harvard, en el año 1979. Este modelo establece un marco para analizar el nivel de competencia dentro de una industria, y poder desarrollar una estrategia de negocio.

MSA: ácido p-toluensulfónico.

nativo: término de la genética referido a lo intacto, tal cual como se encuentra en el organismo vivo.

Nf₂NH: bis -nonafluorobutanosulfonilimida.

NPG: neopentilglicol ó 2,2-dimetilpropano-1,3-diol.

NRRL 1960: cepa de *A. terreus* utilizada para la obtención del ácido itacónico.

oxalacetato: forma ionizada del ácido oxalacético, importante metabolito intermediario en múltiples rutas metabólicas, entre ellas la biosíntesis de ácidos grasos.

Pakhelia fusca: tipo de esponja con la que puede ser aislado el microorganismo *A. terreus*.

PBS: polibutileno succinato.

PDA: agar de dextrosa y papa, medio de cultivo para hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos.

PDO: 1,3 propanodiol.

péptido señal: está constituido por unos 5 a 30 aminoácidos que están colocados en un orden particular y que son los primeros que aparecen cuando se está sintetizando la cadena polipeptídica. Decide sobre el destino, la ruta de transporte y la eficiencia de secreción de una proteína.

PgpdA: promotor más frecuentemente utilizado para la modificación genética de *A. terreus*.

PIA: poliácido itacónico.

PIAn: poli (anhídrido itacónico).

piruvato: anión del ácido pirúvico. Es una pequeña molécula, de tan solo 3 carbonos, que es el eje central del metabolismo celular de todos los seres vivos.

promotor: en genética un promotor es una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN a ARN. Un promotor por lo tanto, promueve la transcripción de un gen.

propiedades sintonizables: propiedades que se pueden armonizar o ajustar, o hacer coincidir unas propiedades con otras de un polímero a otro.

Pseudomonas putida: bacterias que tienen potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de formar biopelículas y es manejable desde el punto de vista genético.

PTSA: ácido p-toluensulfónico.

PTZ: fenotiazina.

ROACP: policondensación de adición por apertura de anillo catalizada por lipasa.

Saccharomyces cerevisiae: hongo unicelular, un tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino.

SAP: polímeros súper absorbentes.

SBR: caucho estireno-butadieno.

SMP: polímeros con memoria de forma.

sobre expresa: término genético que se refiere a la sobreexpresión de proteínas en el genoma de alguna especie.

sobre expresión: elaboración de demasiadas copias de una proteína u otra sustancia.

SPP: cáscara de camote, del inglés, *Sweet Potato Peel*.

TBAB: bromuro de tetrabutilamonio.

TCA: ácido tricarbóxico.

TMP: trimetilopropano.

TMR: Transparency Market Research, proveedor de investigación personalizada y servicios de consultoría.

transcriptómico: método de análisis de los perfiles de expresión de todos los genes presentes en el genoma de una especie.

trifosfato de sodio: compuesto inorgánico de fórmula $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ que se produce a gran escala como un componente de muchos productos domésticos e industriales, especialmente detergentes.

TTP: tetraisopropóxido de titanio.

U. maydis: (*Ustilago maydis*), hongo de la familia *Ustilaginaceae* conocido en México como huitlacoche. Se trata de un parásito que crece entre los granos del maíz.

U. zae: (*Ustilago zae*), hongo de la familia *Ustilaginaceae* tizón del maíz es un hongo muy pequeño que se cría en los maizales.

UPR: resinas de poliéster insaturado.

Vendée: o Vandea es un departamento francés situado al oeste del país, en la región de Países del Loira.

vgb: gen de la hemoglobina, de la especie *Vitreoscilla*.

Vitreoscilla: género de las bacterias aeróbicas Gram-negativas.