

BIODISOLVENTES SUPRAMOLECULARES DE RAMNOLÍPIDOS: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Encarnación Romera-García, Ana Ballesteros-Gómez, Soledad Rubio

UNIVERSIDAD DE CORDOBA, Departamento de Química Analítica, Grupo de Investigación de Química Analítica Supramolecular (FQM186). Edificio Anexo C3 Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071, Córdoba (España)

*E-mail: ana.ballesteros@uco.es

Se estima que el mercado de disolventes verdes, valorado en 7 billones de dólares en 2018, crecerá con un ritmo del 7.5% en la próxima década. [1] Esta alta demanda viene dada por la creciente preocupación sobre los impactos negativos sobre la salud y el medioambiente del uso de disolventes de origen petroquímico y las regulaciones cada vez más estrictas sobre emisiones de compuestos orgánicos volátiles (volatile organic compounds, VOCs).

La investigación en este campo ha crecido rápidamente en los últimos 20 años. Se han desarrollado así una amplia diversidad de disolventes, tales como líquidos iónicos, eutécticos, fluidos supercríticos y biodisolventes de fuentes renovables. Los disolventes verdes son aquellos que cumplen con los criterios de química verde y que están relacionados con la baja toxicidad y alta biodegradabilidad, eficiencia atómica, síntesis segura, eficiencia energética, procedencia de fuentes renovables, disponibilidad, posibilidad de reciclaje, etc. No obstante, no todos los disolventes verdes son capaces de cumplir todos los criterios y la selección se hace en base a un compromiso.

Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) también pueden considerarse en base a muchos aspectos disolventes verdes. Los SUPRAS son líquidos nanoestructurados que se generan a partir de dispersiones coloidales acuosas o hidro-orgánicas de sustancias anfífilas, mediante procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación (ver Figura 1). Para su síntesis se parte de una disolución de moléculas anfífilas en la que, al superarse una concentración de agregación crítica (*cac*), se forman agregados tridimensionales: micelas acuosas, inversas o vesículas. Este proceso ocurre por un balance entre el efecto solvofóbico (promueve la agregación favoreciendo la formación y crecimiento de los agregados) y la repulsión entre las cabezas polares (limita la agregación y la detiene llegado un punto). A continuación, el efecto de un estímulo externo (un cambio de temperatura o pH, adición de una sal o un disolvente), tiene como efecto la disminución de la repulsión entre los agregados, por neutralización de los grupos cabeza cargados o deshidratación de los mismos para reducir su área efectiva. Como consecuencia, los agregados crecen de nuevo mediante un proceso llamado coacervación. Primero se separan en forma de gotitas de coacervado que forman clústeres hasta que por último tiene lugar una separación líquido-líquido que da lugar a una nueva fase con una micro- o nanoestructura diferente (tipo esponja, lamelar, hexagonal inversa, etc.). A esta nueva fase, que es inmiscible con la disolución en equilibrio y

está formada por gotitas de coacervado independientes, se le ha denominado SUPRAS y se ha aplicado con éxito a procesos de extracción y limpieza en procesos analíticos. La fase en equilibrio (EqS) contiene una cantidad residual de anfifilo a su *cac*. [2-6]

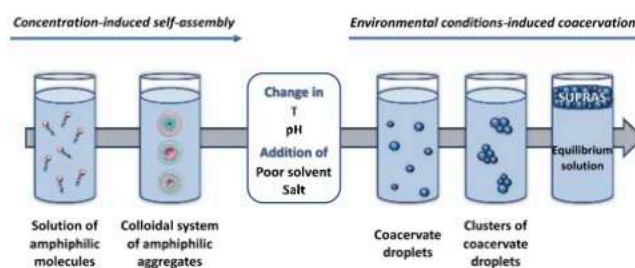


Figura 1. Representación esquemática de la formación de los SUPRAS

Los SUPRAS presentan muchas ventajas para procesos de separación/extracción: i) poseen regiones con diferente polaridad en los agregados supramoleculares, lo que le permite establecer mecanismos mixtos de interacción con los solutos (interacciones polares, puentes de hidrógeno e iónicas en los grupos polares e interacciones de dispersión en las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas del anfifilo); ii) tienen un elevado número de centros de solubilización disponibles (concentración de anfifilo 0.1-1 mg/ μ L) lo que posibilita la extracción eficiente de los compuestos utilizando bajos volúmenes de SUPRAS; iii) el área superficial es elevada debido a que están formados por gotitas independientes de coacervado, lo que facilita la transferencia de masa y acelera el proceso de extracción y iv) su composición y estructura es muy versátil y programable, lo que ha permitido el desarrollo de SUPRAS con propiedades de acceso restringido para macromoléculas así permitiendo su exclusión en los procesos de extracción y cierto grado de limpieza en las muestras. [6]

Los SUPRAS cumplen con muchos de los criterios de química verde, tales como síntesis poco costosa, eficiencia atómica (todo el anfifilo se incorpora a la fase SUPRAS en la síntesis a excepción de una cantidad mínima residual que queda en la disolución de equilibrio) baja volatilidad e inflamabilidad. Sin embargo hasta la fecha se han empleado principalmente anfifilos de origen petroquímico (procedentes de fuentes no sostenibles) y que son parcialmente biodegradables y/o ejercen cierta toxicidad (por ejemplo los tensioactivos de la serie Triton son disruptores endocrinos entre otros efectos tóxicos) o requieren condiciones muy drásticas

de formación (alta temperatura, medios muy ácidos) o presencia de disolventes orgánicos.

En este estudio se investiga por vez primera la producción de bioSUPRAS mediante la coacervación de biotensioactivos con agentes inductores inocuos, en concreto ramnolípidos en disoluciones acuosas salinas. Los biotensioactivos son moléculas anfifílicas que proceden de una fuente natural como los animales, las plantas o los microorganismos. Esta alternativa a los tensioactivos sintéticos está ganando fuerza en las últimas décadas debido a que presentan numerosas ventajas: mayor biodegradabilidad, baja o nula toxicidad, menor concentración crítica de agregación, excelente actividad superficial y efectividad bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Entre los biotensioactivos, los ramnolípidos, producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, son los más comunes y están disponibles comercialmente. Su estructura se caracteriza por tener una o dos moléculas de ramnosa unidas a uno o dos β -hidroxiácidos, cuya longitud de cadena es variable (ver Figura 2). En bibliografía se ha descrito su autoensamblaje en disoluciones acuosas, en forma de micelas, estructuras laminares y vesículas. Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios sobre coacervación o separación de fases para la producción de SUPRAS.

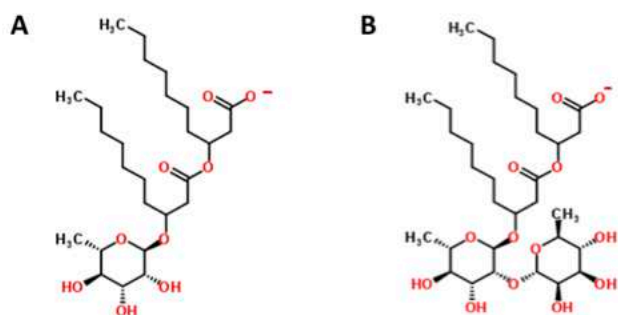


Figure 2. Estructuras químicas de los ramnolípidos mayoritarios en el producto comercial empleado para la síntesis del bioSUPRAS Rha-C10-C10 (A) and Rha-C10-C8 (B).

En este estudio se sintetizan y caracterizan diferentes bioSUPRASs, utilizando como tensioactivo una mezcla de mono y di-ramnolípidos con ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena (C_{10} y C_8) y como agentes coacervantes la sales de cloruro de sodio y sulfato de sodio.

2. Metodología.

2.1 Diagramas de fases de las mezclas ternarias ramnolípidos/agua/sal. Los diagramas de fases se construyeron para delimitar por inspección visual las proporciones de ramnolípidos (RL)/agua/sal bajo las cuales se produjo la formación de los bioSUPRAS. El estudio se realizó para porcentajes de tensioactivo (g tensioactivo/100 mL mezcla) comprendidos entre el 0,1% y el 10% y concentraciones de sal comprendidas entre 0 M y 3 M.

2.2. Composición química de los bioSUPRAS. La concentración de agua en los bioSUPRASs se determinó mediante la valoración de Karl Fischer. El contenido de RL se obtuvo por análisis elemental, utilizando un EuroVector Elemental Analyser EA3000 (EuroVector SpA, Milán, Italia). El contenido en Cl^- y SO_4^{2-} se determinó por turbidimetría (LP 2000 Turbidity Meter, Hanna Instruments, Guipúzcoa, Spain) y por valoración potenciométrica (848 Titrino plus from Metrohm, Herisau, Switzerland), respectivamente, en las disoluciones de equilibrio.

2.3 Estructura de los bioSUPRAS. Para estudiar la forma y tamaño de los agregados se hicieron medidas por cryo-SEM (EVO LS 15 scanning electron microscope, Zeiss, Oberkochen, Germany) y DLS (Zetasizer NANO ZSP, Malvern Panalytical, Madrid, Spain).

2.4 Potencial en aplicaciones analíticas: extracción de contaminantes orgánicos. Con el fin de evaluar la capacidad de los bioSUPRAS para la extracción de compuestos orgánicos en muestras líquidas, los disolventes sintetizados se utilizaron para la extracción de dos colorantes en agua de bebida: verde de malaquita (catiónico) y azul de tripano (aniónico). La eficacia de extracción se determinó por espectrofotometría (UV-Vis spectrophotometer model 99-90287, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 607 para azul de tripano y 617 nm para verde malaquita. Se midieron las concentraciones residuales en el agua después del proceso de extracción.

3. Resultados.

3.1 Diagramas de fases de las mezclas ternarias ramnolípidos/agua/sal.

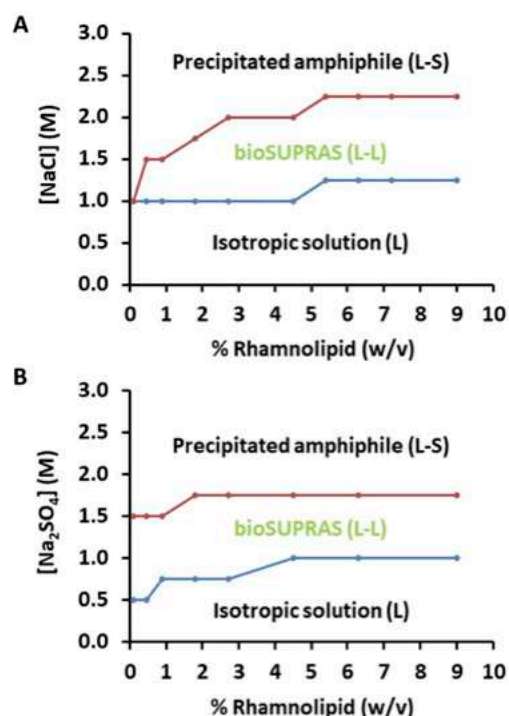


Figura 3. Diagramas de fases de las mezclas ramnolípidos/agua/NaCl (A) y Na_2SO_4 (B).

En la Fig. 3 están representados los diagramas de fases de las mezclas ternarias ramnolípido/agua/sal, en ellos pueden distinguirse tres regiones. A concentraciones bajas de sal se observó que los tres componentes permanecen en una única fase, el sistema resultante es una disolución isotrópica. Al aumentar la concentración de sal se alcanza la región de coacervación distinguiéndose en el sistema resultante dos fases: el bioSUPRAS y la disolución en equilibrio. En la tercera región del diagrama la concentración de sal es tan elevada que el tensioactivo se insolubiliza y precipita. El proceso de coacervación para la formación del SUPRAS y separación de fases se basa en la neutralización de la carga aniónica del RL por el Na⁺ con la consiguiente disminución de la repulsión entre agregados lo cual favorece su crecimiento y ensamblaje. Además hay que tener en cuenta los mecanismos de deshidratación de los grupos polares del RL (-COO⁻ y ramnosil) lo cual disminuye su área efectiva y favorece su empaquetamiento así como los procesos de *salting-out* (que disminuyen la solubilidad de los agregados) ambos ejercidos por los aniones de la sal. La mínima cantidad de sal que se requiere para la coacervación indica la fuerza de la misma como inductor del auto-ensamblaje y fue por tanto mejor agente coacervante la sal de Na₂SO₄ que la de NaCl. Teniendo en cuenta que ambas sales comparten el mismo catión, la diferencia debe asociarse al anión y se explica por el hecho de que SO₄²⁻ tiene un mayor poder de deshidratación y de *salting-out* (anión cosmotrópico) que el Cl⁻ (anión caotrópico).

3.2 Volumen y densidad de los bioSUPRAS.

El volumen de de bioSUPRAS incrementó con la concentración de RL en la síntesis y disminuyó con la de sal. Se obtuvieron ecuaciones para predecir el volumen generado de bioSUPRAS bajo diferentes condiciones de síntesis con el fin de facilitar su aplicación a procesos extractivos:

$$V_{\text{bioSUPRAS}} = \frac{\text{Rhamnolipid}}{(0.0200 \pm 0.0007) \cdot \text{NaCl} - (0.010 \pm 0.001)} - \frac{(292 \pm 21)}{\text{NaCl}} + (117 \pm 13)$$

$$V_{\text{bioSUPRAS}} = \frac{\text{Rhamnolipid}}{(0.0319 \pm 0.0006) \cdot \text{Na}_2\text{SO}_4 - (0.0123 \pm 0.0007)} - \frac{(94 \pm 6)}{\text{Na}_2\text{SO}_4} + (112 \pm 4)$$

En estas ecuaciones los porcentajes de RL se expresan en tanto por ciento en peso y el de sal en concentración molar. El volumen obtenido se expresa en µL por mL de disolución de síntesis. El R² de las regresiones no lineales fue mayor de 0.999. La densidad de los bioSUPRAS fue de 1.08±0.02 g·mL⁻¹ y 1.11±0.04 g·mL⁻¹ para NaCl y Na₂SO₄, siendo el primero menos denso y el segundo más denso que su disolución de equilibrio.

3.3 Composición química de los bioSUPRAS.

Los bioSUPRAS mostraron un alto contenido en agua (58-77%) a pesar de su insolubilidad en medio acuoso (ver Tabla 1). El agua del SUPRAS mantuvo un contenido en sal similar al empleado en la síntesis. La concentración de anfífilo residual en las disoluciones de equilibrio después de la formación y separación de fases estuvo por debajo de los límites de detección de la técnica de análisis elemental, con lo cual se estimó un rendimiento de incorporación del anfífilo al bioSUPRAS cercano al 100%.

A medida que aumentó la sal en la síntesis se obtuvieron bioSUPRAS de menor contenido en agua y mayor contenido en anfífilo. Estos disolventes son por tanto sensibles al ambiente, es decir, la composición química de los mismos dependen de la proporción agua/sal utilizada para su síntesis.

Tabla 1. Composición de los bioSUPRAS

Synthesis conditions		bioSUPRAS composition		
¹ [NaCl] (M)	% H ₂ O±SD (w/w)	% Rhamnolipid±SD (w/w)	% Salt±SD (w/w)	
1.00	77±2	19±3	4.5±0.3	
1.25	73±5	24±5	5.3±0.2	
1.50	68±4	31±4	6.0±0.1	
1.75	64±5	33±4	6.5±0.1	
2.00	60±3	37±3	7.0±0.4	
2.25	55±3	40±2	7.2±0.6	
² [Na ₂ SO ₄] (M)	% H ₂ O±SD (w/w)	% Rhamnolipid±SD (w/w)	% Salt±SD (w/w)	
1.00	71±7	19±2	10.1±0.4	
1.15	65±3	26±1	10.7±0.7	
1.35	60±4	29±1	11.4±0.7	
1.50	56±5	36±3	12±1	
1.75	50±6	40±2	12±1	
³ % Rhamnolipid±SD (w/v)	% H ₂ O±SD (w/w)	% Rhamnolipid±SD (w/w)	% Salt±SD (w/w)	
2.7	58±4	38±1	6.8±0.4	
4.5	59.9±0.8	37±3	7.0±0.2	
5.4	60±4	38±2	7.0±0.3	
6.3	60.7±0.4	38±4	7.1±0.1	
9.0	60.9±0.9	37±1	7.1±0.7	
⁴ % Rhamnolipid±SD (w/v)	% H ₂ O±SD (w/w)	% Rhamnolipid±SD (w/w)	% Salt±SD (w/w)	
1.8	59±4	30±3	11.3±0.7	
2.7	60±4	28±2	11.4±0.7	
4.5	59±3	28±2	11.3±0.3	
6.3	60±3	29±3	11±1	
9.0	59±2	29±2	11±1	

¹Percentages of H₂O and rhamnolipid in the bioSUPRAS are mean values for RL concentrations in the interval of 1.8-9 % (w/v); ²NaCl: 2 M; ³Na₂SO₄: 1.35 M.

3.4 Estructura de los bioSUPRAS.

Se observaron tres rangos de tamaño de los agregados en los bioSUPRAS por DLS (5-14 nm, 42-400 nm y 500-4500 nm, ver Fig. 4) los cuales se hicieron más grandes a mayor concentración de sal (por ejemplo, 23-170/200 nm, 300-1500/2000 nm; 2500/3000-6500 nm).

Las imágenes de cryo-SEM (Fig. 5) muestran agregados esféricos con cavidades internas que podrían corresponderse a vesículas.

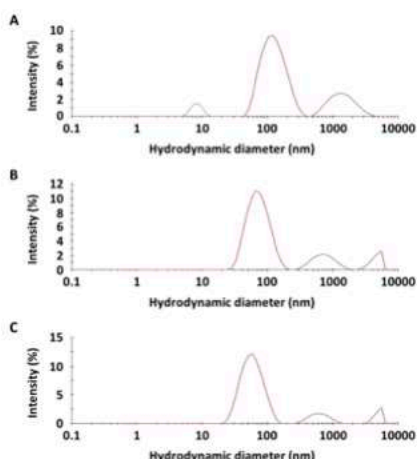


Figura 4. Medidas del radio hidrodinámico de los agregados en el bioSUPRAS de NaCl (A: 1.25 M; B; 1.50 M; C: 1.75 M).

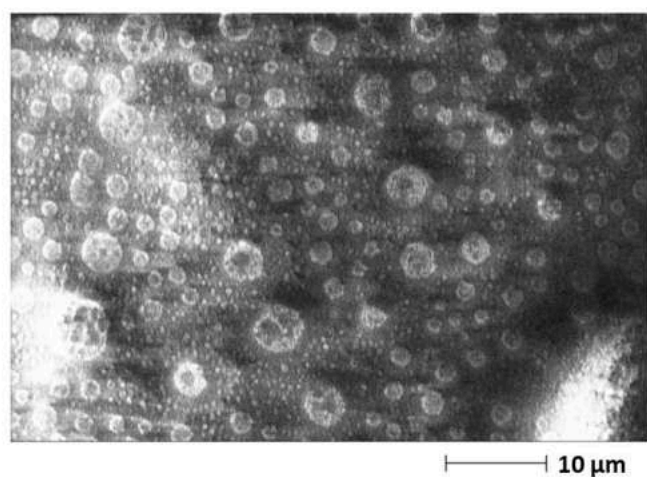
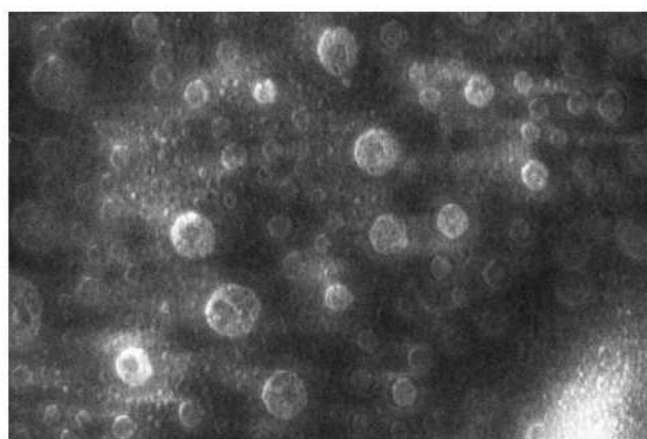


Figura 5. Imágenes de crio-SEM de un bioSUPRAS de NaCl (1.75M).

3.5. Extracción de contaminantes orgánicos.

Utilizando el bioSUPRAS constituido por ramnolípido/agua/NaCl se alcanzaron eficacias medias de extracción de hasta el 100% para el colorante verde de malaquita y del 94% para el azul de

tripano (ver Tabla 2.) Estas sustancias cargadas son muy solubles en agua, mostrando así la alta capacidad extractiva de los bioSUPRAS que ofrecen interacciones iónicas, polares, puentes de hidrógeno y dispersivas para la solubilización de estos compuestos.

Tabla 2. Rendimientos de extracción de los bioSUPRAS de colorantes en agua

	Synthesis conditions		bioSUPRAS	Recovery±SD (%)	
	% Rhamnolipid (w/v)	[NaCl] (M)	% Rhamnolipid (w/w)	Trypan blue	Malachite green
1	0.9	1	19	53±3	100.3±0.3
2	0.9	1.5	31	94.2±0.1	100.1±0.4
3	4.5	1.5	31	90.8±0.5	92±2

4. Conclusiones.

Se ha demostrado que los ramnolípidos forman bioUPRASs en disoluciones acuosas de NaCl y Na₂SO₄, mediante mecanismos de auto-ensamblaje y coacervación. Estos disolventes son sensibles al ambiente, es decir, el volumen y la composición química de los mismos dependen de la proporción agua/sal utilizada para su síntesis. El carácter “verde” y biocompatible de estos SUPRASs los convierte en excelentes alternativas a los disolventes convencionales.

Bibliografía.

- [1] I. T. Horváth, Green Chem., 2008, 10, 1024–1028.
- [2] D. F. Evans and H. Wennerström, The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet, Wiley-VCH, New York, 1999.
- [3] D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù and P. Calandra, Adv. Cond. Matter Phys., 2015, 1-22.
- [4] H. G. Bungenberg de Jong and H. R. Kruyt, Proc. Acad. Sci. Amsterdam, 1929, 32, 849-856.
- [5] N. Vlachy, M. Drechsler, J. M. Verbavatz, D. Touraud and W. Kunz, J. Colloid Interface Sci., 2008, 319, 542-548.
- [6] C. Caballo, M. D. Sicilia and S. Rubio, in The application of green solvents in separation processes, ed. F. Pena-Pereira and M. Tobiszewski, Elsevier, Amsterdam, 2017, 5, 111-137.

Agradecimientos: Los autores agradecen al MINECO (CTQ2014-53539-R) y a los Fondos FEDER la financiación recibida. E. Romera-García agradece al MECED la beca FPU15/03704. A. Ballesteros-Gómez agradece a MINECO su contrato RYC-2015-18482.