

29 24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RELACION ENTRE EL GRADO DE RESISTENCIA A LA DEGRADACION ENZIMATICA DE LA HIDROXIETILCELULOSA Y LA SUSTITUCION EN SU ESTRUCTURA PRIMARIA

T E S I S

Que para obtener el Título de

Q U I M I C O

P r e s e n t a

HORACIO MUÑOZ ALARCON

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

México, D. F.



1 9 9 0



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

Capítulo	Página
1.0. INTRODUCCION.	1
2.0. OBJETIVOS.	4
3.0. ANTECEDENTES TEORICOS.	
3.1. Celulosa	5
3.2. Hidroxietilcelulosa	19
3.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. Fundamentos.	24
3.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética de Carbono-13.	29
4.0. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	
4.1. Determinación del Grado de Resistencia a la Degradación Enzimática de Hidroxietilcelulosa	42
4.2. Obtención de Espectros de Resonancia Magnética de Carbono-13 de Hidroxietilcelulosa	44
5.0. RESULTADOS. DISCUSION.	45
6.0. CONCLUSIONES.	64
7.0. REFERENCIAS. BIBLIOGRAFIA GENERAL.	65

1.0. INTRODUCCION.

Los éteres celulósicos son polímeros que tienen una gran variedad de aplicaciones. Una de las propiedades más importantes que deben tener para poder ser utilizados, es su resistencia a la degradación a través del tiempo. Esta es provocada por el ataque de microorganismos mediante mecanismos enzimáticos.

Se han desarrollado numerosos estudios con respecto a los factores relacionados con la resistencia a la degradación enzimática de los éteres celulósicos. Se ha establecido que existe una estrecha relación entre el grado de resistencia a la degradación y la uniformidad de la sustitución sobre los grupos hidroxilo en las unidades de anhidroglucosa de la cadena ^{1,2,3}.

En este trabajo se propone un método viscosimétrico para evaluar en forma comparativa el grado de resistencia a la degradación enzimática de los éteres celulósicos ⁴. Para efectuar las determinaciones se eligió a la hidroxietilcelulosa (HEC), debido a que es un derivado no iónico y a su comportamiento en solución.

Mediante la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 del polímero no degradado, se obtuvo información sobre la sustitución a lo largo de la cadena glicosídica; y ésta se relacionó con los resultados obtenidos en la determinación de resistencia enzimática.

La tesis consta de siete capítulos. En el primer capítulo se hace una introducción al tema. A partir de ésta, se plantean los objetivos generales que se presentan en el siguiente capítulo.

Los antecedentes teóricos relacionados con la celulosa y sus derivados; así como los aspectos espectroscópicos inherentes a éstos, se presentan en el tercer capítulo.

En primer término se hace una revisión breve de las características y propiedades de la celulosa y sus derivados; así como de sus procesos de síntesis y del control del peso molecular de los productos. La segunda sección del capítulo resume las características, los procesos de síntesis y los usos de la hidroxietilcelulosa. A continuación se trata lo relacionado con la degradación enzimática de este polímero. Es aquí donde se describe el principio del método que evalúa la resistencia enzimática y se explican los modelos que correlacionan la sustitución global en la molécula de cualquier éter derivado de la celulosa y su resistencia a la degradación enzimática.

Las siguientes secciones del capítulo comprenden los aspectos relacionados con la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Se presentan sus fundamentos y se explican algunas de las características de la Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13. Se discuten brevemente los parámetros inherentes a un experimento de RMN-¹³C; así como los factores que afectan la obtención de espectros. Además, se hace una descripción de las principales características espectrales de algunos compuestos, cuyos grupos funcionales están contenidos en los éteres de celulosa. Finalmente, se describen los modelos que explican el desplazamiento químico en la hidroxietilcelulosa y las asignaciones de sus señales en el espectro.

En el cuarto capítulo se describe el procedimiento seguido para realizar las determinaciones de resistencia a la degradación enzimática y para obtener los espectros de RMN-¹³C.

La discusión de los resultados experimentales, a partir de la interpretación y el manejo de los datos obtenidos con las curvas de degradación enzimática y los espectros de RMN-¹³C, se presenta en el capítulo cinco. Se describe detalladamente el tratamiento de datos con los resultados obtenidos en cada método para la HEC-5 y se explican las diferencias y similitudes con el resto de las muestras.

Posteriormente se establecen las correlaciones entre el grado de resistencia a la degradación enzimática y la sustitución en la molécula; en base a los valores de grado de sustitución global y de sustitución en el grupo hidroxilo primario de la cadena lateral (C-6). Se discute acerca de la influencia del peso molecular en cada una de las muestras.

Las conclusiones del trabajo experimental se establecen en el capítulo seis.

El capítulo siete comprende las referencias bibliográficas.

2.0 OBJETIVOS.

- 1) Establecer un método para evaluar el grado de resistencia a la degradación enzimática de los éteres celulósicos.
- 2) Encontrar una correlación entre el grado de resistencia a la degradación enzimática y la sustitución en la estructura primaria de los éteres celulósicos.

Las áreas cristalinas tienen patrones de difracción distinguibles, mientras que las zonas amorfas generan diagramas de Rayos X difusos.

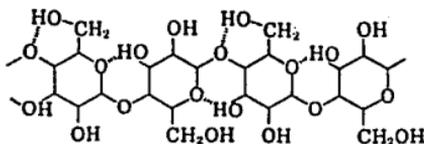


Figura 1. Enlace de hidrógeno intramolecular en la molécula de celulosa entre el grupo hidroxilo en el átomo de carbono 3 y el oxígeno del anillo.

Otra propiedad importante de la celulosa es el hinchamiento de la molécula. Este fenómeno reduce acentuadamente la cristalinidad y, por ende, aumenta la disponibilidad de los grupos funcionales reactivos en la molécula. La capacidad de los disolventes para hinchar la molécula de celulosa aumenta en el orden siguiente:

solvente orgánico < agua < sales < ácidos < bases.

Las celulosas alcalinas no reasumen su estado natural después de ser lavadas y secadas, pero tienden a establecerse bajo la estructura termodinámicamente más estable. Estas se emplean en la producción de derivados como la carboximetilcelulosa (CMC) y la hidroxietilcelulosa (HEC).

En la siguiente tabla se presentan algunas propiedades físicas de la celulosa:

TABLA I	
PROPIEDADES FISICAS DE LA CELULOSA	
PROPIEDAD	VALOR
Gravedad Específica en agua	1.504-1.509
Cristalinidad Promedio:	
Cruda	70 %
Regenerada	40 %
Densidad (por Rayos X)	
Porción Cristalina	1.500-1.530
Porción Amorfa	1.482-1.489
Calor Específico	1.22 J/g°C

3.1.2. ESTRUCTURA QUIMICA.

La celulosa es un polímero de la D-glucosa. En su configuración, existen enlaces entre unidades de glucosa de tipo 1.4- β -glicosídico. Su representación estructural es la siguiente:

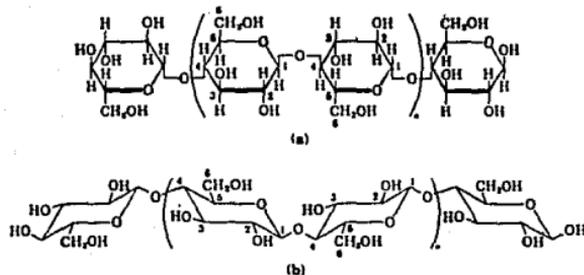


Figura 2. Representación estructural de la celulosa:
a) Estructura de Haworth.
b) Representación Conformacional.

La estructura de la celulosa se ha corroborado debido a que su hidrólisis en medio ácido conduce a la formación de D-glucosa y su tratamiento con anhídrido acético y ácido sulfúrico produce octa-O-metilcelobiosa; lo cual corrobora que los enlaces entre las unidades de D-glucosa son β -glicosídicos. Este tipo de enlaces, distribuidos de manera uniforme a lo largo de la molécula, confieren una estructura lineal a las cadenas que la conforman.

La metilación exhaustiva del algodón (que es una fibra natural formada principalmente por celulosa) produce 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa. De aquí se infiere que las posiciones reactivas en las unidades de anhidroglucosa (AHG) de la molécula están en los átomos de carbono de las posiciones 2,3 y 6, mientras que los carbonos 1,4 se encuentran formando el enlace glucosídico. El carbono 5 es un carbono hemiacetalico.

En las posiciones reactivas, cada anillo de anhidroglucosa tiene grupos hidroxilo libres, que se ven involucrados en distintas reacciones químicas. La reactividad de cada posición es diferente entre sí y frente a distintos reactivos debido a la conformación estructural de la molécula. Es por esto que la distribución de sustituyentes en la cadena polimérica de los derivados de la celulosa depende de la velocidad de reacción relativa de los diferentes grupos hidroxilo libres.

En el caso de la eterificación, la reacción en C-6 (grupo hidroxilo primario) es diez veces más rápida que en las posición C-3 y dos veces más rápida que en C-2. La diferencia de reactividad en la posición 6 está relacionada con la posibilidad de tener isómeros rotacionales alrededor del enlace C5-C6.

3.1.3. DEGRADACION DE LA CELULOSA.

La degradación de la celulosa y sus derivados puede ocurrir por hidrólisis ácida o alcalina, descomposición térmica, radiación electromagnética y por ataque enzimático.

El ataque enzimático produce cambios en la celulosa, como lo son la pérdida de la fuerza de tensado y la disminución del grado de polimerización. Para explicar el ataque enzimático se han propuesto varios mecanismos. El más aceptado es un mecanismo que emplea varias enzimas³.

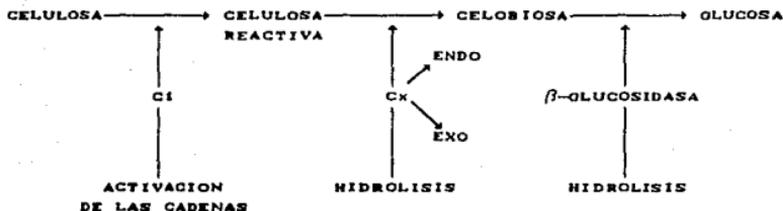


Figura 3. Mecanismo de degradación enzimática de la celulosa, propuesto por Lee y Fan.

Una enzima C_1 activa la molécula para su posterior hidrólisis por efecto de una enzima C_x , dando lugar a celobiosa. La celobiosa es degradada posteriormente a D-Glucosa por una β -glucosidasa. El efecto del ataque enzimático permite que la molécula se hinche en medio alcalino, pues se genera una capa semicristalina. Otras investigaciones sugieren que la celulosa se hidroliza por medio de un ataque conjunto de exo y endo glucanasas. Las enzimas exo eliminan los residuos terminales de D-glucosa en la cadena; mientras que las enzimas endo actúan dentro de la estructura primaria de la molécula.

En los derivados de la celulosa, los sustituyentes en las posiciones 2,3 y 6 están involucrados en la degradación de la cadena celulósica. Un factor muy importante que influye en la resistencia a la degradación enzimática es la distribución de los sustituyentes, la cual está en función de las constantes de velocidad relativas para la reacción de los tres grupos hidroxilo en cada unidad de glucosa.

Algunos estudios han tratado de establecer la relación entre la distribución de los sustituyentes, las constantes de velocidad relativas de los grupos hidroxilo y la reactividad de éstos; además de sus propiedades en solución. Los primeros métodos se basaron en la hidrólisis hasta D-glucosa y la identificación por Cromatografía de Gases o por análisis por Vía Húmeda de los monómeros. Actualmente se utiliza la Resonancia Magnética Nuclear para efectuar el análisis estructural.

3.1.4. SINTESIS DE LOS ÉTERES DERIVADOS DE LA CELULOSA.

Dentro de los derivados de la celulosa, ocupan un lugar de importancia sus éteres, los cuales son obtenidos por alquilación de los grupos hidroxilo de los carbonos en las posiciones 2,3 y 6 del anillo de AHG. Generalmente son solubles en agua o disolventes orgánicos.

Para efectuar la síntesis de los éteres celulósicos, debe purificarse la celulosa. Los procedimientos más comunes son los procesos de sulfito y sulfato.

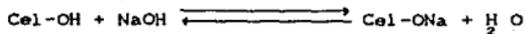
La obtención de éteres celulósicos implica condiciones alcalinas, con uno o varios agentes de alquilación. Se trata de mecanismos de sustitución nucleofílica. Dependiendo del agente alquilante, es el derivado resultante. La siguiente tabla muestra algunos ejemplos:

TABLA II

ETERES DERIVADOS DE LA CELULOSA

AGENTE NUCLEOFILICO	DERIVADO
Haluro de Alquilo (Cloroacetato de sodio)	Carboximetilcelulosa (CMC)
Cloruro de Metilo	Etilcelulosa
Haluro de Alquill-Arilo (Cloruro de Bencilo)	Bencilcelulosa
Epóxido (Oxido de Etileno)	Hidroxiethylcelulosa (HEC)

Los derivados obtenidos pueden ser iónicos (CMC) o no iónicos (HEC). La síntesis de los derivados iónicos es un proceso de varias etapas. En la primera etapa se efectúa una reacción de alcalinización:



y en la segunda se lleva a cabo una alquilación:



en ambos casos se tienen reacciones en equilibrio.

La concentración del hidróxido de sodio y la relación molar tienen una influencia decisiva en la transformación de la celulosa a celulosa alcalinizada. En esta etapa se define la homogeneidad y el grado de sustitución que tendrá la molécula ².

En la segunda etapa de la reacción se fija el tipo de éter de celulosa, de acuerdo al tipo de sustituyente.

Los éteres insolubles en agua fría, como la etilcelulosa, se purifican por extracción con soluciones acuosas frías. La carboximetilcelulosa (CMC) o la hidroxietilcelulosa (HEC), que son solubles en agua fría o caliente, se purifican por extracción con una mezcla de un disolvente orgánico con agua (acetona-agua).

3.1.5. MEDICION Y CONTROL DEL PESO MOLECULAR DE LOS ETERES CELULOSICOS.

En un compuesto polimérico existen especies moleculares con diferente longitud y, consecuentemente, con distinto peso molecular. Su distribución estadística tiene la forma:

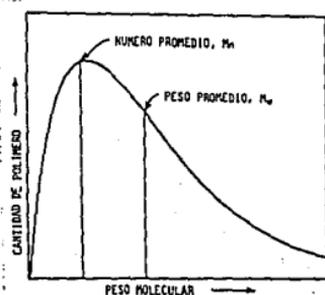


Figura 4. Distribución estadística de Pesos Moleculares.

En un polímero con una cierta distribución de pesos moleculares (donde N_i es el número total de moléculas correspondientes a un peso molecular M_i y W_i es el peso total de las especies presentes), el peso molecular número-promedio (M_n) es el cociente del peso total y el número total de moléculas, que en términos de cualquier población es :

$$M_n = \sum N_i M_i / \sum N_i = \sum W_i / \sum (W_i / M_i)$$

$$\text{dado que } W_i = N_i M_i$$

El peso molecular número promedio mide propiedades debidas a fracciones de bajo peso molecular. Para estudiar otras propiedades importantes de los polímeros como la viscosidad o la dureza, debidas a fracciones de mayor peso molecular, se utiliza con mayor frecuencia el término peso molecular peso-promedio (M_w), que se encuentra definido por :

$$M_w = \sum W_i M_i / \sum W_i$$

El cociente M_w/M_n es el índice de polidispersidad (ID) que toma valores entre 0 y 1; y es una medida de la distribución de pesos moleculares de un compuesto polimérico.

Los métodos más utilizados para la determinación de pesos moleculares en un polímero son la medición de la dispersión de la luz y la medición de la presión osmótica. Sin embargo, la determinación de la viscosidad de soluciones diluidas de polímeros es la manera más común de obtener datos de peso molecular. El valor medido por viscosidad (M_v), es un peso molecular intermedio entre M_n y M_w .

La ecuación empírica de Mark-Houwink es una medida cuantitativa de la correlación entre el peso molecular y la viscosidad:

$$[\eta] = K Mv^a$$

donde η es el valor de la viscosidad intrínseca, Mv el peso molecular promedio debido a la viscosidad y K y a son constantes empíricas determinadas para cada polímero.

La ecuación anterior es solamente aplicable a soluciones diluidas, dado que bajo estas condiciones existe un intervalo lineal, en donde su comportamiento es de carácter Newtoniano.

Para estimar las distribuciones de peso molecular en un polímero, la Cromatografía de Permeación en Gel (CPG) es una técnica que tiene gran utilidad. Esta se basa en la separación de las moléculas de un soluto, a través de una columna cromatográfica empacada con partículas porosas, en función de su tamaño. Cuando la muestra de polímero es arrastrada por el disolvente a través de la columna, las moléculas de mayor tamaño eluyen rápidamente pues no se retienen en los poros. Conforme el tamaño molecular decrece, la retención aumenta; de tal manera que es posible separar las especies en función de su peso molecular.

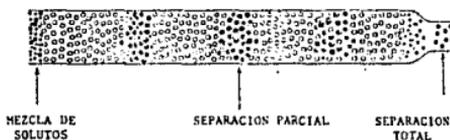


Figura 5. Principio de la separación por Cromatografía de Permeación en Gel (CPG).

Para relacionar los tiempos de retención con los pesos moleculares, se calibra una serie de columnas (con distinto tamaño de poro) para obtener una relación gráfica entre la cantidad de soluto y el volumen de retención. Estas curvas representan la variación del peso molecular en función del volumen [$\log M = f(V_r)$]; y se obtienen con estándares con una distribución estrecha de peso molecular y un tamaño molecular semejante al de las moléculas por separar.

La separación de las diversas fracciones de peso molecular se logra cuando un conjunto de columnas cubre un amplio intervalo de tamaño de poro. A éste se le conoce como intervalo de fraccionamiento y se encuentra entre los límites de máxima y mínima retención de una columna.

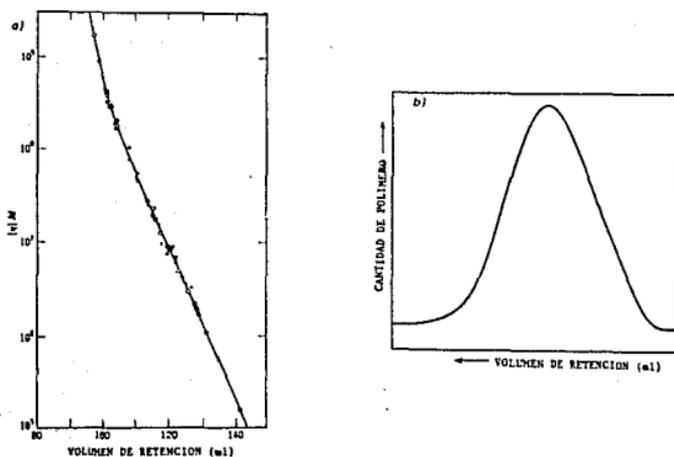


Figura 6. a) Curva de calibración para CPG.

b) Cromatograma obtenido por CPG.

La viscosidad de las soluciones y su concentración influyen significativamente en la utilidad industrial de los éteres de celulosa. Por eso es necesario controlar el peso molecular del polímero, dado que si el peso molecular es elevado, la solubilidad del polímero tiende a ser baja. En el mejor de los casos, las soluciones tardan largos periodos en homogenizarse; y su viscosidad es tal que su manejo es difícil.

Los métodos para regular el peso molecular de los derivados de la celulosa están basados en la hidrólisis parcial homolítica (por tratamiento térmico, acción mecánica o irradiación) o heterolítica (por medio de una hidrólisis catalizada por ácidos o enzimas) de los enlaces glicosídicos.

La oxidación con peróxidos orgánicos e inorgánicos es el método principal para reducir el peso molecular de la celulosa y sus derivados. Sin embargo, puede reducirse por tratamiento del sustrato celulósico con hidróxidos alcalinos durante la reacción de eterificación o durante la purificación del éter.

3.1.6. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LOS ETERES CELULOSICOS.

Los éteres celulósicos se caracterizan por la viscosidad de sus soluciones, la naturaleza química de los sustituyentes de la molécula, el grado de sustitución (GS), la sustitución molar (SM), la pureza, la solubilidad y sus propiedades reológicas.

El grado de sustitución (GS) es un parámetro estadístico definido como el número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por unidad de anhidroglucosa. Su valor máximo es 3.

Los éteres de celulosa obtenidos con reactivos alquilantes con un sitio de reacción alternativo, capaz de producir cadenas laterales, se describen por medio de la sustitución molar (SM), que es el número de moles de sustituyente por mol de AHG.

La sustitución hidroxialquílica se expresa como SM. La relación SM/GS es una medida del tamaño promedio de la cadena lateral.

La solubilidad de los éteres celulósicos es semejante a la de los polímeros más comunes. Los que son solubles en agua ven afectada su solubilidad o la viscosidad de sus soluciones por efecto de iones metálicos polivalentes o por una alta fuerza iónica. Los éteres iónicos como la carboximetilcelulosa (CMC), sufren modificaciones. Los éteres no iónicos, como la hidroxietilcelulosa (HEC), no ven alterada su solubilidad. En general, el grado de solvatación de los éteres celulósicos depende del grado de sustitución (GS) y, de la naturaleza y distribución de los sustituyentes.

Las principales reacciones de sustitución se efectúan en las regiones amorfas de la molécula. Al principio de la reacción, la molécula es insoluble en agua. Conforme la reacción avanza, hay un aumento en la sustitución que provoca rupturas en la zona cristalina, lo cual implica un incremento de la solubilidad.

En los éteres hidrosolubles, la mayor hidrofiliidad del sustituyente aumenta la solvatación, en cambio en los éteres solubles en disolventes orgánicos, la solvatación depende de la afinidad del sustituyente por el disolvente.

Las soluciones diluidas de éteres celulósicos de alto peso molecular presentan altas viscosidades. La viscosidad se incrementa exponencialmente con la concentración, como en el caso de la HEC.

3.2. HIDROXIETILCELULOSA.

3.2.1. CARACTERISTICAS.

La hidroxietilcelulosa es un polímero no iónico, soluble en agua fría y caliente, con buena tolerancia por los electrolitos. Sus soluciones son estables en un intervalo amplio de pH y temperatura. La viscosidad de sus soluciones depende del tamaño molecular y de la temperatura a la que se efectúe la medición. A pH = 8, la viscosidad es alta y puede disminuir si se trabaja en un pH mayor que 10 o menor que 6. Si las soluciones se someten frecuentemente a cambios de temperatura, el polímero se degrada y la viscosidad de las soluciones disminuye.

La hidroxietilcelulosa puede representarse según se muestra en la figura 7. Los sustituyentes en las posiciones 2,3 y 6 se encuentran en posición ecuatorial.

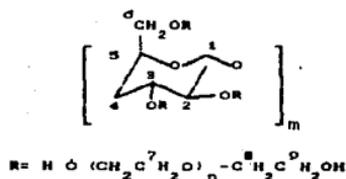
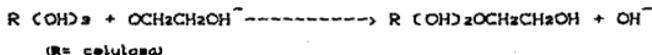


Figura 7. Estructura de la Hidroxietilcelulosa.

3.2.2. SINTESIS. SUSTITUCION EN LA MOLECULA.

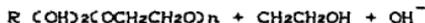
La síntesis de hidroxietilcelulosa es semejante a la de los alquil-éteres derivados de la celulosa. En la reacción deben controlarse la temperatura y la concentración de catalizador (NaOH) y óxido de etileno. El mecanismo de reacción implica en primera instancia, la formación del etilenglicolato, que es un buen nucleófilo. Este reacciona con la celulosa mediante un mecanismo SN^2 para dar el producto alquilado y la base:



La velocidad de reacción es proporcional a la concentración del óxido de etileno y de la base:

$$K \propto [epóxido][OH^-]$$

El grupo hidroxilo primario terminal formado puede reaccionar con otra molécula de epóxido para formar cadenas laterales:



El agua compete con la celulosa por el reactivo. En la reacción ocurre la formación de etilenglicol:



Dado que la reacción se lleva a cabo en fase heterogénea, la sustitución en el producto no es uniforme. Por lo tanto, para un determinado valor de sustitución molar, pueden presentarse diferentes valores de grado de sustitución. Por otro lado, existen factores cinéticos que determinan la sustitución a lo largo de la cadena de anhidroglucosa. La velocidad de esterificación de los grupos hidroxilo no es la misma ⁷, y se ve afectada en el transcurso de la reacción.

3.2.3. DEGRADACION ENZIMATICA DE LA HIDROXIETILCELULOSA.

Una propiedad importante de la hidroxietilcelulosa es su grado de resistencia al ataque enzimático.

Los estudios efectuados sobre la resistencia a la degradación enzimática de HEC, muestran una relación entre las rupturas en la cadena molecular y la sustitución en la molécula, bajo una relación constante enzima/unidad de anhidroglucosa(AHG). Se ha establecido que la resistencia a la degradación está en función del grado y la uniformidad de la sustitución de los grupos hidroxilo en las unidades repetitivas de AHG de la cadena celulósica.

La uniformidad de la sustitución se refleja en el valor de grado de sustitución (GS), que es un parámetro estadístico ². Se ha propuesto que el ataque enzimático ocurre en los enlaces entre unidades de anhidroglucosa adyacentes no sustituidas ¹. No obstante, se ha sugerido que la ruptura en la cadena polimérica puede ocurrir en enlaces adyacentes a unidades aisladas de AHG, por lo que los fragmentos resultantes son cadenas no sustituidas ³.

También se ha propuesto que existen rupturas adicionales en sitios que contienen la secuencia residuo de AHG no sustituido-residuo sustituido únicamente en C-6; es decir β -AHG-[1 \rightarrow 4]-6-O-(AHG sustituida). La secuencia inversa (β -6-O-(AHG sustituida)-[1 \rightarrow 4]-AHG) es resistente al ataque enzimático⁸. Esto se representa en la siguiente figura:

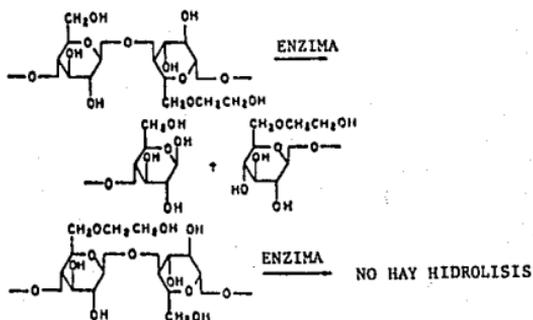


Figura 8. Mecanismo de hidrólisis enzimática propuesto por Klop y Kooiman.

Se ha comprobado que las secuencias adyacentes de AHG no sustituidas son atacadas durante el período de degradación más rápido; mientras que el ataque sobre las unidades aisladas ocurre en la fase lenta de la degradación⁹.

3.2.4. USOS DE LA HIDROXIETILCELULOSA.

Los usos de la hidroxietilcelulosa están basados en algunas de sus propiedades específicas. La variedad de aplicaciones que pueden presentarse están en función de la sustitución molar en la molécula. Las hidroxietilcelulosas más utilizadas tienen un intervalo de sustitución molar entre 2.0 y 2.5. Se emplean como espesantes de pinturas, alimentos y productos cosméticos; como endurecedores de pinturas; en el tratamiento de acabado de pieles; como adhesivos; en la manufactura de papel como retenedor de pigmentos y recubrimiento; en la industria farmacéutica para la preparación de tabletas, supositorios y emulsiones; como recubrimiento en electroplatinado; como carga en productos cerámicos y de vidrio; en la fabricación de fibras textiles y como desensibilizador en litografía, entre otros usos.

3.3. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR. FUNDAMENTOS.

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN) fue observado por primera vez en 1946 y ha sido aplicado de manera rutinaria en el análisis instrumental desde 1960. La introducción de la Transformada de Fourier a la técnica, ha incrementado significativamente su capacidad de análisis.

El principio de la resonancia magnética se basa en que algunos núcleos tienen espín nuclear (I). En presencia de un campo magnético externo (B_0), los núcleos se alinean con respecto a la dirección de éste, en virtud de campos magnéticos autogenerados. El número de orientaciones de un núcleo con respecto a B_0 dependen del valor de I, y es igual a $2I+1$. Los núcleos con $I = 1/2$ tienen dos orientaciones (^1H , ^{13}C , ^{19}F). La más estable y de mayor energía es la que tiene la componente $I_z = -1/2$.

La diferencia de energía entre ambas orientaciones es:

$$\Delta E = h\gamma B_0/2\pi$$

donde h es la constante de Planck, B_0 la intensidad del campo magnético aplicado y γ la relación magnetogirica; que es característica de cada núcleo.

En el campo magnético, un núcleo se comporta como un imán en el campo gravitacional. El eje del espín (que coincide con el vector del momento magnético μ) precesa a su alrededor. La frecuencia de precesión se conoce como frecuencia de Larmor (ν_0). Esta puede calcularse por medio de la relación:

$$\nu_0 = \gamma B_0/2\pi$$

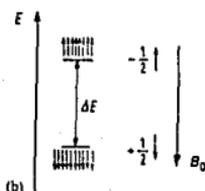
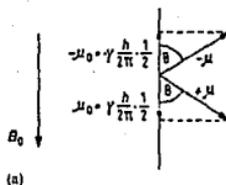


Figura 9. a) Alineamiento de núcleos en un campo magnético ($I=1/2$)
 b) Niveles de energía y población de espines.

Para observar la resonancia magnética, una muestra con espines nucleares (^1H , ^{13}C) se coloca en un campo magnético estático. Se aplica un campo alterno de radiofrecuencia ν_1 , perpendicular a B_0 . La frecuencia de barrido se incrementa o decrecienta lenta y continuamente durante la observación. Cuando ésta alcanza el valor de la frecuencia de Larmor de los núcleos, se detecta una señal de absorción en el espectrómetro.

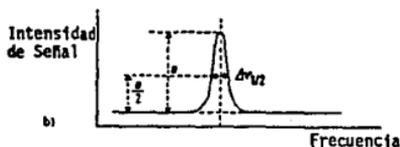
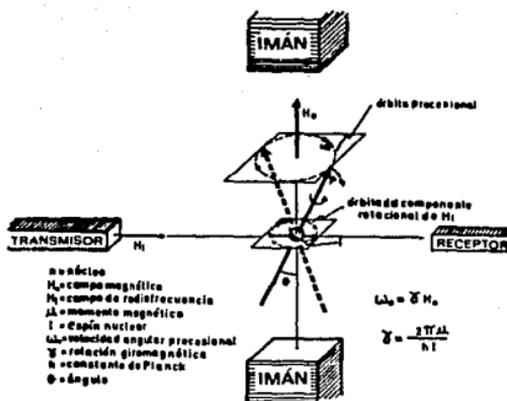


Figura 10. a) Comportamiento de un núcleo en resonancia.
 b) Señal de resonancia magnética nuclear.

En el equilibrio, los niveles energéticos están poblados de acuerdo a una distribución de Boltzmann, que favorece el estado energéticamente más bajo. En las dos orientaciones relativas a los núcleos con $I = 1/2$, las poblaciones de espín se simbolizan como N_+ y N_- . Su distribución puede expresarse por medio del factor de Boltzmann:

$$N_+/N_- = e^{\Delta E/kT}$$

A temperatura ambiente, la diferencia de energía no es mayor a 4.2 joules, por lo cual el segundo término es despreciable y la distribución es ligeramente superior a 1. Este ligero exceso es el que permite observar la resonancia magnética.

Cuando hay resonancia, el campo de radiofrecuencia ν_1 produce una transferencia de espines del menor al mayor nivel de energía. La absorción alcanza un valor finito; no obstante permanece constante hasta que los núcleos en el estado de alta energía pierden el exceso de energía tan rápido como la absorben. Existen mecanismos, conocidos como relajación, que tienden a restituir la población de Boltzmann original.

Uno de los mecanismos, durante el cual el núcleo excitado transfiere energía hacia sus alrededores (retículo), se conoce como relajación espín-retículo. Es un proceso de primer orden que tiene una constante de velocidad $1/T_1$, característica de cada núcleo. A T_1 se le denomina tiempo de relajación espín-retículo y cubre un intervalo de 10^{-4} a 10^4 segundos. T_1 es una medida del tiempo de vida de un núcleo en un estado de espín determinado.

Existen contribuciones adicionales a la relajación espín-retículo del núcleo. La que mayor influencia tiene es la relajación dipolo-dipolo, dado que proviene de las interacciones de dipolo del núcleo de interés con núcleos magnéticos vecinos o electrones no apareados. Las otras contribuciones presentes son la relajación espín-rotación, la anisotropía de desplazamiento químico y el acoplamiento escalar. Estas son debidas a los estados rotacionales de una molécula, al apantallamiento de los núcleos y a la interacción con otros núcleos, respectivamente.

El otro mecanismo de relajación se conoce como espín-espín. Es un proceso de primer orden, caracterizado por la constante $1/T_2$ (T_2 es el tiempo de relajación espín-espín).

La relajación espín-espín se debe a las interacciones entre espines nucleares que generan intercambios de energía entre los núcleos y un menor tiempo de vida de los estados de espín, lo cual genera ensanchamiento de banda.

Los procesos de relajación compiten entre sí, pero uno predomina. Cuando la relajación no puede compensar el rompimiento del equilibrio de espines (T_1 es largo), la diferencia de población entre los niveles de energía decrece y lo mismo ocurre con la señal de absorción. A este fenómeno se le denomina saturación.

En un experimento convencional de RMN, el campo de radiofrecuencia es aplicado continuamente, pero debe ser de baja intensidad para evitar la saturación. El espectro se obtiene al hacer un barrido del campo ν a través del intervalo de frecuencias de Larmor del núcleo que se observa. La corriente de inducción nuclear se amplifica y se graba en función de la frecuencia. Este método se conoce como RMN de Onda Continua.

La otra metodología se conoce como RMN de Pulsos por Transformada de Fourier y está basada en la aplicación de pulsos de radiofrecuencia, que generan señales que se acumulan y se transforman en un espectro de RMN.

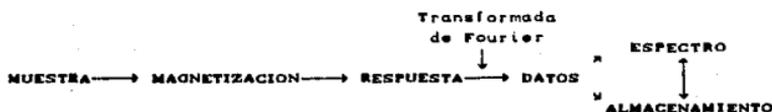


Figura 11. Diagrama conceptual del experimento de RMN de Pulsos por Transformada de Fourier.

3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA DE CARBONO-13.

3.4.1. Sensibilidad.

La resonancia magnética de carbono-13 (RMC) tiene una sensibilidad menor que la resonancia protónica debido a que la constante magnetogirica del carbono es cuatro veces menor que la de los protones. Esto se manifiesta en la menor intensidad de las señales de los núcleos de carbono, si se comparan con las señales correspondientes a los núcleos protónicos sometidos a la misma excitación.

El aumento de la sensibilidad (incremento de la relación señal a ruido, S/N) se logra si se incrementa el número de núcleos de ^{13}C por concentración de la muestra, si disminuye la temperatura de obtención del espectro o bien si se aumenta la intensidad del campo magnético. Sin embargo, los métodos más eficientes para incrementar la sensibilidad en un experimento de RMC son la transferencia de polarización y las técnicas de doble resonancia o desacoplamiento.

La polarización consiste en la transferencia de magnetización del protón hacia el núcleo de carbono -que es un núcleo débilmente polarizado- por efecto de las fluctuaciones del campo magnético provocadas por la relajación.

La doble resonancia se observa experimentalmente cuando se elimina el acoplamiento de los espines entre los núcleos de carbono y los protones vecinos o distantes. Este desaparece cuando se irradia un grupo de núcleos con una frecuencia adicional (ν_2) a la de radiofrecuencia ν_1 , que incide en los núcleos de hidrógeno por desacoplar (*Desacoplamiento Protónico de Banda Ancha* o $^{13}\text{C}\langle\text{H}\rangle$).

Esto convierte los sistemas de señales múltiples ^{13}C - ^1H en señales sencillas y permite el desacoplamiento de todos los protones de la muestra, de modo que se obtiene una señal única para cada núcleo de carbono, que es más intensa debido a que se acumulan las señales múltiples.

Sin embargo, la sensibilidad del experimento se incrementa si se presenta el *Efecto Nuclear Overhauser* (ENO). Este resulta de la relajación dipolar provocada por el movimiento molecular. Este induce una relajación adicional del ^{13}C a través del enlace con el protón. Como resultado, la población en el estado energético basal aumenta, hay un equilibrio con exceso de núcleos en el nivel de baja energía y las señales de los carbonos protonados se intensifican. El ENO se calcula a partir de las intensidades máximas de las señales obtenidas cuando éste se presenta (I_D) y las señales que se generan sin su aparición (I_O), según la siguiente relación:

$$\text{ENO} = (I_D/I_O) - 1$$

En un experimento con desacoplamiento protónico, las señales se intensifican tres veces debido al ENO, si este actúa en su totalidad. El ENO no es el mismo en todos los carbonos, ya que está en función del número de protones unidos a estos. En los carbonos menos protonados el efecto es menor y sus señales tienen intensidades más bajas.

En el caso de compuestos poliméricos, las señales de éstos últimos tienden a ser muy intensas, puesto que tienen valores máximos de ENO. En los carbonos de una cadena lateral o cercanos a ella, como en los derivados de la celulosa, el ENO disminuye notablemente.

3.4.2. Efecto de la Temperatura.

La temperatura es una variable importante a controlar durante el experimento de RMC. Su efecto sobre la resolución de los espectros es notable, puesto que a bajas temperaturas el ensanchamiento de las bandas es mayor y, como consecuencia, la relajación es más lenta y la resolución disminuye. Las temperaturas altas favorecen una mayor velocidad de relajación, un menor ensanchamiento y una mejor separación de las señales.

En el caso de muestras poliméricas, se trabaja con soluciones de baja concentración. Si bajo éstas condiciones la viscosidad de la solución es tal que las señales del espectro son anchas, se debe aumentar la temperatura con la finalidad de eliminar el ensanchamiento por reducción de la viscosidad. Sin embargo, no siempre es conveniente el aumento de temperatura, puesto que éste provoca menor magnetización (decrece la diferencia de población entre los niveles energéticos) y, como consecuencia, el aumento de T_1 y la disminución de la relación S:N. De igual manera, el polímero puede sufrir una degradación o puede inducirse su precipitación. Es por esto que se prefiere disminuir la viscosidad de una muestra, al introducirla en un baño de ultrasonido.

3.4.3 Tratamiento de la Muestra.

Para obtener un espectro es muy importante la preparación de la muestra. Los sólidos suspendidos deben eliminarse mediante filtración. El disolvente usado debe ser químicamente inerte, tener baja viscosidad para evitar la obtención de señales anchas y un punto de ebullición elevado para recuperar la muestra. En general, se utilizan disolventes deuterados, puesto que pueden solubilizar un gran número de compuestos, incluso polímeros.

3.4.4. Areas de las Señales. Integración.

La medición de las áreas de las señales presenta ciertas dificultades en la RMC. Cuando ésta es posible, no se encuentran correlaciones entre las áreas integradas y el número de carbonos correspondientes a cada señal, debido principalmente a los largos tiempos de relajación espin-retículo y al Efecto Nuclear Overhauser.

La diferenciación del efecto de ambas contribuciones en los espectros de RMN han sido estudiadas ampliamente ¹⁰.

En los espectros de polímeros, las señales son anchas debido a que su tiempo de relajación aumenta en función de su elevado peso molecular y al menor movimiento molecular que presentan ¹¹.

En general, el efecto de los tiempos de relajación se elimina dependiendo del intervalo entre los barridos.

En la técnica de Onda Continua, éste es corto, de manera que los núcleos con T_1 largos permanecen parcialmente saturados por los barridos previos. Es por ello que las señales de estos núcleos tienen menor intensidad que las señales de aquellos cuyo T_1 es menor que el tiempo empleado en cada barrido.

En la técnica de Pulsos con Transformada de Fourier, tal intervalo es menor. Como los valores de T_1 del carbono-13 en la mayoría de los compuestos orgánicos son superiores a 0.2 segundos, se generan diferencias significativas entre las áreas de las señales. Para la adecuada medición de éstas, la velocidad de barrido debe ser al menos cinco veces más grande que el T_1 de los núcleos por medir.

3.4.5. Desplazamientos Químicos.

En la resonancia protónica, la información generada por los desplazamientos químicos (δ), las constantes de acoplamiento y el área de las señales, tienen el mismo interés para la determinación de estructuras moleculares. En la RMC, los parámetros más útiles son los desplazamientos químicos, pues se obtienen señales que corresponden a cada carbono de la molécula; con una frecuencia característica, debido a lo cual se obtiene información estructural más precisa. Además, las señales de los carbonos aparecen en un intervalo más amplio (200 ppm) hacia campos bajos con respecto a la señal de referencia del tetrametilsilano (TMS), que en la RMN-¹H.

Los desplazamientos químicos del ¹³C están relacionados con algunas propiedades del carbono dentro de su entorno químico. La hibridación del carbono es el factor predominante en el desplazamiento. Otras propiedades que lo afectan son la electronegatividad de sus sustituyentes, los efectos estéricos y de resonancia; y en menor grado la densidad electrónica, los efectos de isotopía y la anisotropía de grupos vecinos.

En los éteres de celulosa, como en la mayoría de los polímeros, se conjuntan características espectrales de varios compuestos, que determinan las frecuencias de desplazamiento químico de sus señales. A continuación se presentan las características espectrales de alcanos, alcoholes, éteres y carbohidratos.

3.4.8. RMN-¹³C de Alcanos.

En los alcanos, la sustitución en el átomo de carbono influye en la magnitud de δ . Los carbonos sp^3 se desplazan hacia campos altos y se observan en el intervalo de 0 a 90 ppm. En los hidrocarburos se observa el efecto sobre los desplazamientos de los sustituyentes, según la distancia que los separa. los carbonos α y β desplazan 9 ppm hacia campos bajos y los carbonos γ lo hacen hacia campos altos con una magnitud cercana a 2 ppm. En la RMC, los desplazamientos son aditivos y se derivan del número de carbonos en las distintas posiciones de la molécula ¹².

Los compuestos alicíclicos presentan isomería conformacional y de posición. Los valores de δ del anillo de ciclohexano se han estimado en base a sus características geométricas y conformacionales. Los átomos de carbono impedidos estéricamente en las posiciones axiales 1,3 y 5 se desplazan hacia campos más altos que aquellos que no lo están.

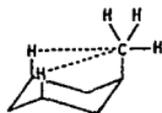


Figura 12. Impedimento estérico en el metilciclohexano.

En la tabla III se presentan los valores de δ de los cicloalcanos. En el caso del ciclopropano y al ciclobutano, la tensión del anillo influye significativamente sobre el desplazamiento químico.

TABLA III

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE LOS CICLOALCANOS EN RMC

COMPUESTO	δ (ppm)	COMPUESTO	δ (ppm)
C ₃ H ₆	-2.8	C ₆ H ₁₂	27.6
C ₄ H ₈	22.4	C ₇ H ₁₄	28.2
C ₅ H ₁₀	25.8	C ₁₀ H ₂₀	25.0

El los alcanos, la influencia de un sustituyente se manifiesta en un intervalo reducido en la escala de δ . En los alquilciclohexanos, la influencia sobre los carbonos en las posiciones 3 y 5 es mayor que en otras. Cuando se sustituye un grupo metilo por un grupo polar, se modifica el desplazamiento del carbono que soporta al sustituyente. En la siguiente tabla se resumen los desplazamientos esperados para C-1, C-2 y C-3 en el ciclohexano cuando se encuentran sustituidos por grupos polares:

TABLA IV

VARIACION EN EL DESPLAZAMIENTO QUIMICO DEL CICLOHEXANO AL SUSTITUIR UN GRUPO METILO POR UN GRUPO POLAR

SUSTITUYENTE	C-1	C-2	C-3
-OR	+ 45	- 3	- 1
-OH	+ 40	+ 1	- 1
-COOR	+ 10	- 1	- 1
-NH ₂	+ 20	+ 2	- 1
-Cl	+ 23	+ 2	- 1

Los valores positivos indican desplazamientos hacia campos bajos. La electronegatividad del sustituyente determina la magnitud del desplazamiento. Un grupo éter es el que tiene la influencia más marcada sobre éste.

3.4.7. RMN-¹³C de Alcoholes y Eteres.

Los grupos hidroxilo sufren un ligero cambio negativo en su desplazamiento, si se compara un alcano con su alcohol correspondiente. El efecto es positivo si se comparan los alquinos con sus respectivos alcoholes.

En los cicloalcanos, la sustitución de un hidrógeno por un grupo hidroxilo desprotege las posiciones α y β y protege la posición γ al hidroxilo. La isomeria cis-trans también afecta el desplazamiento. Sus valores son más positivos en los grupos OH ecuatoriales que en los grupos axiales. Los valores de δ de los átomos de carbono de algunos cicloalcanoles se presentan en la tabla V.

TABLA V

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS EN RMC DE CICLOALCANOLES

COMPUESTO	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH ₃
CICLOBUTANOL	45.7	5.8					
CICLOHEXANOL	70.8	33.4	12.2				
<i>cis</i> -2-METIL-CICLOHEXANOL	71.1	35.8	29.3	24.2	21.5	31.8	18.2
<i>trans</i> -2-METIL-CICLOHEXANOL	76.6	39.7	34.0	25.8	25.4	35.1	18.1

Al comparar los alcoholes con sus éteres correspondientes, se observa que el carbono α al éter se desprotege y se desplaza de 10 a 12 ppm hacia campos bajos. El carbono β queda protegido y su desplazamiento hacia bajo campo es menor (3 ppm).

3.4.8. RMN-¹³C de Carbohidratos.

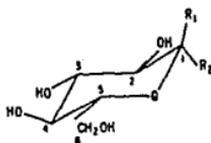
Las señales espectrales originadas por los mono, di y polisacáridos se basan en las siguientes consideraciones:

- 1) Las señales de los carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios se distinguen al aplicar desacoplamiento protónico.
- 2) Algunas señales se asignan por comparación con los valores de δ de series análogas de azúcares o sus derivados.
- 3) Las señales se desplazan hacia campos bajos cuando aumenta la sustitución con radicales alquilo y el número de sustituyentes electronegativos.
- 4) Los átomos de carbono unidos a grupos metoxi se desplazan hacia campos más bajos que los unidos a grupos hidroxilo libres.
- 5) Los átomos de carbono de un anillo sustituido con grupos hidroxilo axiales generan señales a campos más altos que los que están sustituidos con grupos ecuatoriales.
- 6) En el ciclohexano, si hay una transferencia de un grupo hidroxilo hacia una posición axial, los carbonos γ con átomos orientados axialmente en el mismo lado del anillo se desplazan hacia campos más altos.

La asignación de los desplazamientos de los carbonos en los anómeros de la glucosa ilustra las principales características espectroscópicas de los carbohidratos en RMC. Estos valores, asignados por Koch y Perlin ¹³, se resumen en la tabla VI.

TABLA VI

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS EN RMC DE LOS ANOMEROS DE LA GLUCOSA



ANOMERO α : $R_1 = OH$; $R_2 = H$.
 ANOMERO β : $R_1 = H$; $R_2 = OH$.

NUCLEO	ANOMERO α	ANOMERO β
C-1	93.3	97.2
C-2	72.8	75.5
C-3	74.2	77.1
C-4	70.9	70.9
C-5	72.8	77.1
C-6	62.3	62.3

Los carbonos C-1, unidos a dos átomos de oxígeno, son los que aparecen a más bajo campo. Sus señales se asignan en base a su altura y a la predominancia de la forma β . Las señales de C-4 y C-5 se presentan como dos pares cercanos. La asignación de C-6 se logra por deutерación del carbono metilénico.

Los carbonos 2,3 y 5 se desplazan hacia campos altos en presencia de un grupo OH axial en C-1 del anómero α . El comportamiento de C-3 y C-5 es análogo al descrito en el caso del desplazamiento provocado por impedimento estérico 1-3 en el ciclohexano. El desplazamiento de C-2 también es debido a éste. Para diferenciar C-3, éste se metila y se genera un desplazamiento hacia campos bajos de 10 ppm. Para distinguir C-5 se efectúa una deutерación.

3.4.0. RMN-¹³C de Éteres de Celulosa.

La RMC es una técnica poderosa para determinar la estructura y los patrones de sustitución en los éteres de celulosa. La mayor parte de los trabajos reportados se basan en la obtención de espectros con el polímero hidrolizado, con lo cual se establecen algunas correlaciones con respecto a la sustitución y la estructura molecular ^{14,15}. Sin embargo, existen pocas investigaciones que reporten resultados a partir de los polímeros no degradados ¹⁶. Esto se debe a las dificultades que implica la preparación de las muestras y, principalmente, a la aparición de señales anchas en el espectro. En el caso de HEC, solamente se ha reportado un estudio, en el que los espectros son obtenidos a partir de la muestra intacta ¹⁷.

En los éteres celulósicos, la introducción de grupos alquilo promueve una fuerte desprotección del carbono que soporta al hidroxilo sustituido. En sus espectros, esto se refleja en un desplazamiento hacia bajo campo, cercano a 9 ppm, de las señales de los carbonos sustituidos del anillo de AHG. Las intensidades de éstas dan información acerca de la localización y el contenido de grupos sustituyentes en la molécula.

En el caso de los trabajos efectuados con HEC sin degradar, en el espectro resultante se distinguen once señales, cuyas asignaciones se basan en su analogía con los espectros de otros compuestos, como la maltosa, la celobiosa, la amilosa y el óxido de polietileno ¹⁷. En la Tabla VII se presentan los valores correspondientes a tales asignaciones y a las de HEC. La notación C^{n,N} es utilizada para referirse a los carbonos equivalentes en el dímero de AHG, como se observa en la figura 13.

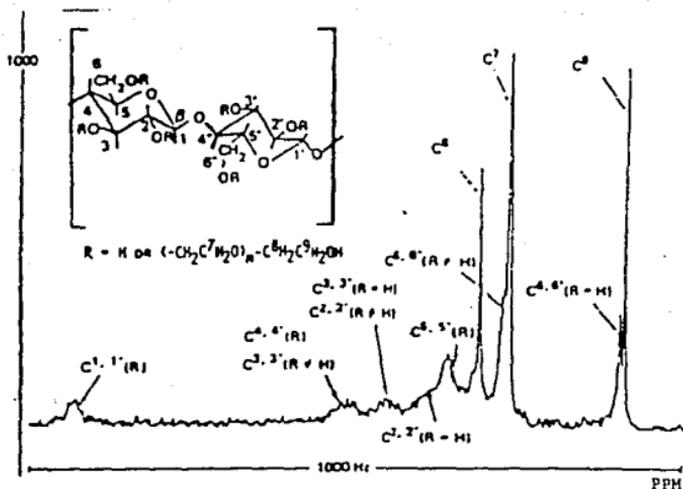


Figura 13. Espectro de RMC de Hidroxiethylcelulosa ¹⁷.

Según Demmer, las señales asignadas a los carbonos del anillo de AHG sufren un ensanchamiento que está relacionado con la anisotropía asociada a la sustitución parcial de los grupos OH. No obstante, los carbonos 1 y 5 no generan señales muy anchas; debido a la posición relativamente lejana que guardan con respecto a los sitios de sustitución. La señal del carbono 4 se ve afectada de manera similar; sin embargo no se observa debido a la señal ancha del carbono 3. ¹⁷.

TABLA VIII

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS EN RMC DE LA HIDROXIETILCELULOSA
Y ALGUNOS COMPUESTOS MODELO.

SUSTANCIA	C ^{1,1'}	C ^{2,2'}	C ^{3,3'}	C ^{4,4'}	C ^{5,5'}	C ^{6,6'}	C ^{7,7'}	C ^{8,8'}	C ^{9,9'}
CELOBIOSA	103.5	74.3	76.9	70.7	76.9	61.8			
OXIDO DE POLIETILENO							70.8	72.5	61.2
MALTOSA	100.9	73.8	73.8	70.7	73.0	61.9			
AMILOSA	100.9	73.8	72.7	82.9	73.2	61.8			
HEC SM=2.5	103.0	79.0	82.0	82.0	73.0	70.8	70.6	72.6	61.6

Los desplazamientos a bajo campo de los carbonos no sustituidos (C^{2,2'} y C^{3,3'}) se asignaron en base a los espectros de celobiosa, amilosa y maltosa. Haciendo un analogia con estos mismos, se encuentran desplazamientos semejantes para C^{1,1'}, C^{4,4'} y C^{6,6'}. Este último corresponde al número de grupos hidroxilo primarios no sustituidos (R=H). Los desplazamientos de C^{1,1'}, C^{4,4'} y C^{5,5'} son independientes de los grupos radicales unidos a la cadena lateral. Su desplazamiento a bajo campo es debido a la influencia de C^{6,6'}; con respecto al óxido de polietileno. La asignación espectral de C^{7,7'}, C^{8,8'} y C^{9,9'} está basada también en el modelo anterior. Estas señales son las más intensas y mejor resueltas en el espectro.

La asignación exacta de la señal a 61.8 ppm (C^{6,6'}_{R=H}) se ha corroborado en base a estudios de tiempo de relajación. Los carbonos terminales unidos a cadenas flexibles (C^{9,9'}) tienen un T₁ mayor que aquellos unidos a estructuras rígidas, como el C-6. el valor de T₁ para éste es de 80 ms. y para el C-9 de 160 ms⁴⁷.

4.0. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Las muestras de hidroxietilcelulosa de peso molecular conocido (determinado por Cromatografía de Permeación en Gel) ¹⁹, fueron sintetizadas a partir de celulosa y óxido de etileno; siguiendo los métodos tradicionales. Las muestras fueron lavadas con etanol caliente durante 72 horas en un equipo de extracción Soxhlet, para eliminar impurezas orgánicas. Posteriormente se secaron en una estufa a 80°C.

4.1. Determinación del Grado de Resistencia a la Degradación Enzimática de Hidroxietilcelulosa.

Se prepararon soluciones acuosas al 0.3% de cada muestra, de la siguiente manera: 0.3 gramos de HEC se agregaron a 50 ml. de agua destilada, bajo agitación en un vaso de precipitados. La agitación se mantuvo hasta lograr la disolución total, a temperatura ambiente. Se vertió el contenido del vaso dentro de un matraz volumétrico de 100 ml. aforando con agua destilada hasta la marca.

Se preparó una solución amortiguadora de pH 4.5, a partir de la mezcla de una solución 0.4 N de ácido acético y otra a la misma concentración de acetato de sodio.

La enzima empleada (CELLULEX G-123, donada por ENMEX S.A.), es una solución acuosa de una mezcla de endocelulasas, que se diluyó hasta alcanzar una relación 1:10000 v/v.

Para estabilizar las soluciones, se empleó un baño de temperatura controlada y recirculación Forma Scientific CH/P Modelo 2067 a 40 ± 0.1 °C.

El viscosímetro en el que se hicieron las determinaciones fue un Cannon-Fenske Modelo B7 Tamaño 100; de constante $K = 0.0127$.

Se utilizaron dos cronómetros para seguir el curso de la reacción enzimática.

La determinación de la resistencia a la degradación enzimática se efectuó en base al siguiente procedimiento experimental:

1) Se vertieron 10 ml. de agua destilada en el viscosímetro. Se dejaron estabilizar a la temperatura del baño durante diez minutos, y enseguida se succionó el agua con una propieta unida al brazo más estrecho del aparato. Con un cronómetro, se efectuaron cinco mediciones del tiempo que ocupa la muestra en fluir entre las marcas superior e inferior del viscosímetro. El valor de la fluidez del agua (T_v) se obtuvo del promedio de las lecturas.

2) En cada caso, se vertieron en un vial 20 ml. de la solución de HEC al 0.3% y se agregaron 4 ml. de solución amortiguadora. Se agitaron y posteriormente se añadió 1 ml. de agua destilada. Se mantuvo la solución a 40°C durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml. se introdujo en el viscosímetro. Después de diez minutos se succionó la muestra y se midió el tiempo de flujo cinco veces. El valor del tiempo de flujo del estándar (T_e) se obtuvo del promedio de las mediciones.

3) Se vertieron 20 ml. de la solución de HEC en un vial y se agregaron 4 ml. de solución amortiguadora. La solución se estabilizó en un vial a 40°C durante quince minutos. Al término de este período, se agregó a la mezcla 1.0 ml. de la solución de enzima. El vial se agitó y rápidamente 10 ml. de solución fueron introducidos en el viscosímetro. En cuanto se agregó la enzima se comenzó a medir el tiempo de reacción (T_r) con el cronómetro 1.

Al cabo de dos minutos, se succionó la muestra hasta una altura mayor que la de la marca superior. Se midió el tiempo que tardó la muestra en fluir entre las dos marcas. Al pasar el menisco de la solución por la marca superior se arrancó el cronómetro 2 y simultáneamente se registró el tiempo de reacción transcurrido en el cronómetro 1 (en minutos). Cuando el menisco pasó por la marca inferior se registró el tiempo de flujo, T_f (en segundos). Se procedió de la misma manera cinco veces. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

4.2. Obtención de los Espectros de RMC de Hidroxietilcelulosa.

Para obtener los espectros de HEC, se siguió el siguiente procedimiento ¹⁷: en tubo de 5 mm de diámetro interno, se introdujeron aproximadamente 0.2 ml de agua deuterada (D_2O) y se agregaron 80 mg del polímero. Se agregó un exceso de D_2O y el tubo con la muestra se calentó a $80^{\circ}C$ en un baño de agua hasta solubilizarla. Se eliminaron las burbujas mediante agitación manual. Se completó con D_2O hasta alcanzar un nivel de solución superior a 4 cm. Las muestras se dejaron reposar por 4 días.

Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro Varian XL-300 GS, y para un mejor análisis de las señales se hizo una ampliación del intervalo de 58 a 82 ppm. Para lograr una integración confiable de las señales en el espectro y compensar las contribuciones del tiempo de relajación y del Efecto Nuclear Overhauser (NOE), se empleó el método de saturación recuperada a 56° . El intervalo entre pulsos fue de 200 ms. La amplitud espectral fue de 16500 Hz. Se utilizó una frecuencia normal para ^{13}C de 75.43 Hz. El tiempo de adquisición del pulso fue de 3 s. El número de barridos empleados para obtener los espectros osciló entre 1000 y 4000.

5.0 RESULTADOS. DISCUSION.

La mayoría de los estudios que se han efectuado acerca de la degradación enzimática de la HEC, miden el cambio en la viscosidad del sustrato en función del tiempo. En estas circunstancias es difícil establecer diferencias en la resistencia enzimática de muestras de HEC cuyos pesos moleculares se encuentren dentro de un intervalo cerrado ^{1,18}. Para lograr establecerlas, es necesario utilizar ciertos parámetros relacionados con la viscosidad y el tiempo de reacción del sustrato con la enzima.

El método empleado en este trabajo, relaciona el cambio en la fluidez relativa -que es un parámetro relacionado linealmente con la viscosidad intrínseca de cualquier solución- a través del tiempo de reacción total con una celulosa, en soluciones acuosas de HEC, bajo condiciones de pH y temperatura que aseguran la máxima actividad enzimática. Este cambio puede explicarse mediante la interpretación de las curvas que representan la variación de la fluidez relativa (Fr) en función del tiempo de reacción (Tn).

Las expresiones que definen a Fr y Tn son:

$$Fr = (\bar{T}_s - \bar{T}_v) / (\bar{T}_i - \bar{T}_v).$$

$$T_n = (\bar{T}_i / 120) + \bar{T}_r.$$

donde:

\bar{T}_s es el promedio de las mediciones del tiempo de flujo de las soluciones estándar.

\bar{T}_v es el promedio de las mediciones del tiempo de flujo del agua.

\bar{T}_i es el promedio de las mediciones del tiempo de flujo de las mezclas de reacción.

\bar{T}_r es el promedio de las mediciones de la variación del flujo de cada solución, desde el momento que comienza la reacción hasta que se miden los tiempos de flujo de las mezclas de reacción.

A continuación se presenta el tratamiento de los resultados experimentales para obtener los valores de F_r y T_n de la muestra S. Se midieron los siguientes parámetros:

El tiempo de flujo del agua que, medido en el viscosímetro empleado a 40°C, es constante y tiene un valor $\bar{T}_v = 53.0$ segundos.

El valor promedio del tiempo de flujo de las soluciones estándar, que en el caso de HEC-5 al 0.3%, es de $T_s = 619.59$ segundos.

Los valores de T_r y T_i , se determinaron a 40°C con la solución de HEC-5 al 0.3% y una dilución de enzima 1:10000, dentro de un lapso no mayor a quince minutos, para evitar la degradación total del sustrato. De esta manera, la determinación de la resistencia a la degradación enzimática se efectúa dentro de un intervalo lineal. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

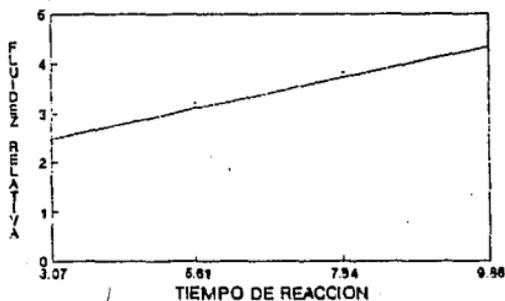
TABLA VIII					
RESULTADOS EXPERIMENTALES DE HEC-5					
1		2		3	
T_r	T_t	T_r	T_t	T_r	T_t
2.23	135.62	2.20	136.19	2.27	135.12
5.22	105.30	5.17	104.48	5.25	105.25
7.72	95.58	7.77	94.97	7.82	94.92
9.83	89.43	9.97	88.24	9.92	88.87
11.88	85.00	11.95	84.62	11.82	85.24

De los triplicados, se obtienen los valores promedio y, con estos datos, los valores de F_r y T_n (Tabla IX); que se grafican para obtener la curva de hidrólisis correspondiente.

TABLA IX			
VALORES DE \bar{T}_r , \bar{T}_t , F_r Y T_n DE HEC-5			
\bar{T}_r	\bar{T}_t	$T_n = \bar{T}_t/120 + \bar{T}_r$	$F_r = (\bar{T}_s - \bar{T}_v)/(\bar{T}_t - \bar{T}_v)$
2.23	135.64	3.36	6.88
5.22	105.35	6.09	10.82
7.77	95.15	8.58	13.44
9.90	88.65	10.64	15.80
11.88	84.65	12.59	17.73

A continuación se presentan las curvas de hidrólisis enzimática de las muestras de HEC:

HEC-1 (PENDIENTE = 0.27)



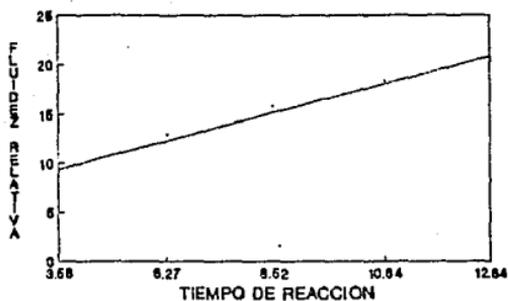
Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-1

HEC-2 (PENDIENTE = 0.80)



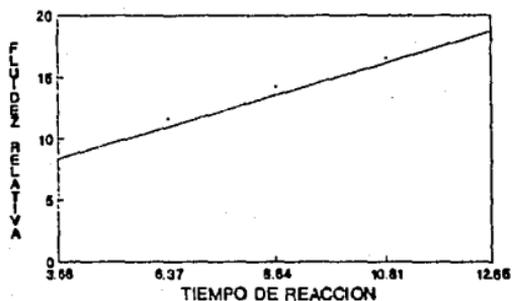
Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-2.

HEC-3 (PENDIENTE = 1.28)



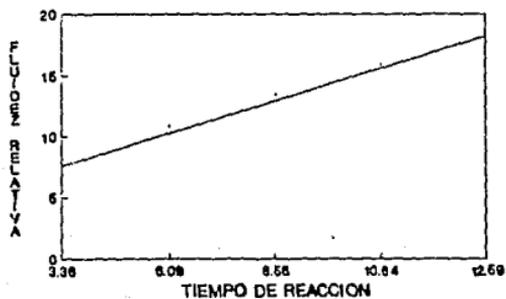
Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-3

HEC-4 (PENDIENTE = 1.14)



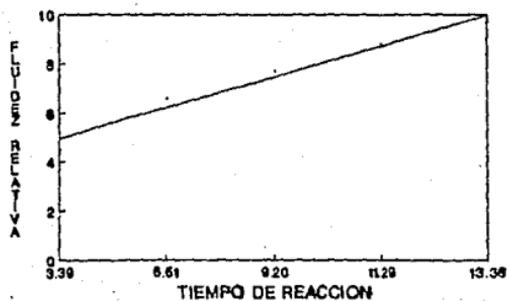
Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-4

HEC-5 (PENDIENTE = 1.16)



Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-5

HEC-6 (PENDIENTE = 0.51)



Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-6

HEC-7 (PENDIENTE = 0.22)



Curva de Hidrólisis Enzimática HEC-7.

En las gráficas se observa que conforme el tiempo de reacción aumenta, la fluidez relativa del sustrato se incrementa por efecto de la enzima que rompe la estructura de la HEC. Cuando se alcanza la degradación total, se tiene una fluidez constante, durante la cual no es posible medir tiempos de flujo, pues estos oscilan y no tienen un comportamiento lineal.

A partir de cada curva de degradación enzimática se obtuvieron los valores de las pendientes (velocidad de degradación). Estos resultados, junto con los correspondientes al peso molecular peso promedio (M_v) ^{4p} y al tiempo de flujo de las soluciones estándar se resumen en la Tabla X.

TABLA X

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RESISTENCIA A LA DEGRADACION ENZIMATICA DE MUESTRAS DE HIDROXIETILCELULOSA DE PESO MOLECULAR CONOCIDO

MUESTRA	PESO MOLECULAR (Mv)	TIEMPO DE FLUJO DEL ESTANDAR (Ts)	PENDIENTE
HEC 1	500,000	195.05 s.	0.27
HEC 2	550,000	478.09 s.	0.80
HEC 3	750,000	689.73 s.	1.28
HEC 4	780,000	628.76 s.	1.14
HEC 5	820,000	619.58 s.	1.18
HEC 6	1,100,000	498.52 s.	0.51
HEC 7	1,130,000	545.40 s.	0.22

Como puede observarse, con excepción de la muestra 1, el resto de las soluciones estándar de HEC, se encuentran dentro de un intervalo reducido de tiempo de flujo; es decir tienen una viscosidad semejante bajo estas condiciones de concentración. Por esto es posible efectuar un estudio comparativo, en base a los valores de las pendientes de las curvas de hidrólisis enzimática, que reflejan el grado de resistencia a la degradación.

En orden creciente, se listan los valores de las pendientes de las muestras de HEC:

HEC-7 > HEC-1 > HEC-6 > HEC-2 > HEC-3 > HEC-5 > HEC-4

Las muestras que tienen los valores máximos y mínimos de peso molecular (1,2,6 y 7) son las que tienen las pendientes más bajas. Es decir, son las que menos se degradan, debido a que la actividad de la enzima sobre el sustrato es menor. Esto se debe a que hay una mayor uniformidad en la sustitución, independientemente de la disponibilidad de grupos hidroxilo; de tal suerte que a pesar de la magnitud del peso molecular, la enzima dispone de pocos sitios para romper la molécula de HEC (unidades de AHG adyacentes no sustituidas ¹ o enlaces adyacentes a unidades aisladas de AHG ²).

En cambio, las muestras de peso molecular intermedio (3,4 y 5), presentan poca uniformidad en la sustitución y una mayor disponibilidad de sitios de ruptura, por lo cual son las que más se degradan (sus pendientes tienen valores mayores).

En base a lo anterior, se puede afirmar que el grado de resistencia al ataque enzimático está vinculado no solamente con el peso molecular de cada polímero, sino también con la sustitución a lo largo de la molécula. Para obtener información acerca de la sustitución y la estructura de la HEC, se utilizó la Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13.

A partir de la integración de las señales de los espectros de las muestras de hidroxietilcelulosa, se tiene información sobre algunos aspectos estructurales.

Los espectros fueron obtenidos con muestras de HEC no degradada. Se fijó un intervalo entre los pulsos adecuado para evitar la saturación y tener espectros reproducibles.

Por integración de las señales en los espectros amplificados entre 55 y 85 ppm, se obtuvieron las áreas correspondientes a $C^{O, O'}$ (R=H), $C^{7,7'}$, $C^{8,8'}$ y $C^{9,9'}$. Con estos valores se determina:

a) el cociente del número de átomos de carbono en la cadena lateral y los carbonos terminales en la ramificación:

$$\rho = [C^{7,7'} / C^{0,0'}]$$

b) la relación entre los átomos de carbono terminales de la ramificación y aquellos unidos a grupos hidroxilo primarios no sustituidos (en la posición C-8):

$$q = [C^{0,0'}] / ([C^{0,0'}] + [C^{0,0'}_{(R=H)}])$$

Con ρ , q y el valor de la sustitución molar se calculan:

a) el grado de sustitución:

$$GS = SM / [(p/2) + 1]$$

b) el número de unidades en las cadenas laterales: $n = p/2$.

c) el promedio de grupos hidroxilo primarios no sustituidos:

$$[C^{0,0'}_{(R=H)}] = [GS (1-q)] / q$$

d) el promedio de los grupos hidroxilo secundarios no sustituidos, (en las posiciones C-2 y C-3):

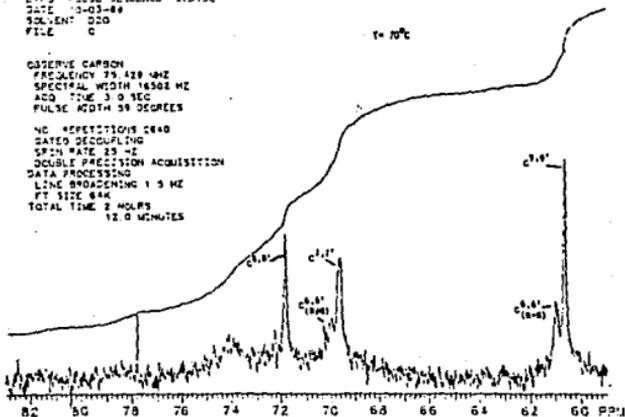
$$[C^{2,2'}] + [C^{3,3'}] = 3 - GS - [C^{0,0'}_{(R=H)}]$$

A continuación se presentan los espectros de RMC de las siete muestras de HEC:

EXP2 PULSE SEQUENCE STD13C
DATE 18-03-89
SOLVENT D2O
FILE C

OBSERVE CARBON
FREQUENCY 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 16502 MHz
AQ TIME 3.0 SEC
PULSE WIDTH 39 DEGREES
NO. REPETITIONS 2840
GATED DECOUPLING
SPIN RATE 25 Hz
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.5 Hz
FT SIZE 64K
TOTAL TIME 2 HOURS
12.0 MINUTES

1-70°C

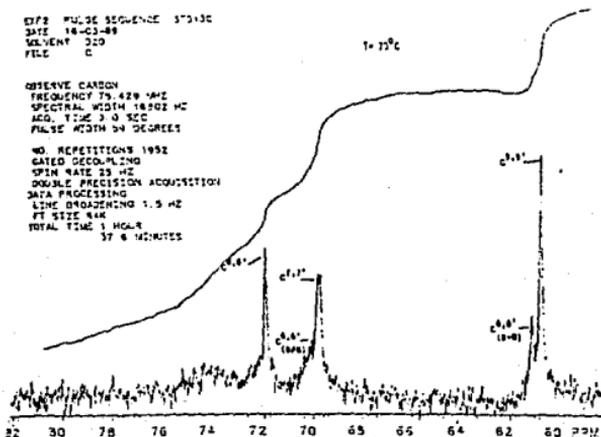


Espectro de RMC de HEC-1.

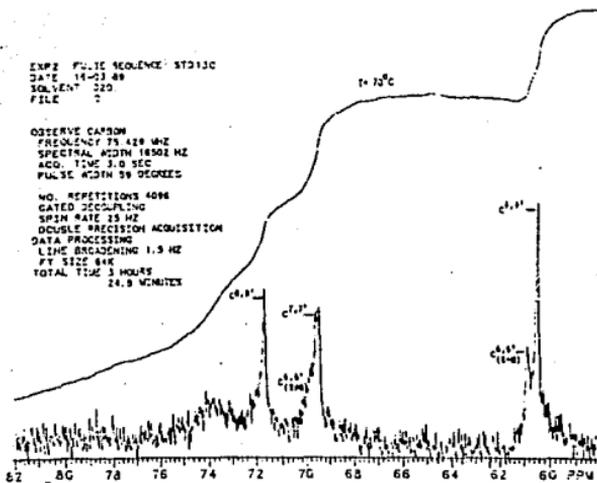
EXP2 PULSE SEQUENCE STD13C
DATE 18-03-89
SOLVENT D2O
FILE C

OBSERVE CARBON
FREQUENCY 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 16502 MHz
AQ TIME 3.0 SEC
PULSE WIDTH 39 DEGREES
NO. REPETITIONS 1952
GATED DECOUPLING
SPIN RATE 25 Hz
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.5 Hz
FT SIZE 64K
TOTAL TIME 1 HOUR
37.6 MINUTES

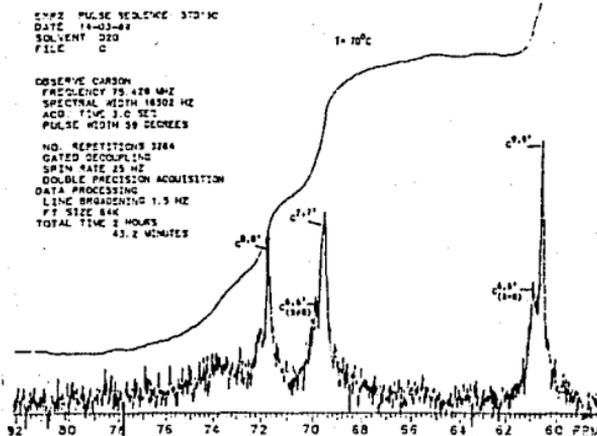
1-70°C



Espectro de RMC de HEC-2



Espectro de RMC de HEC-3

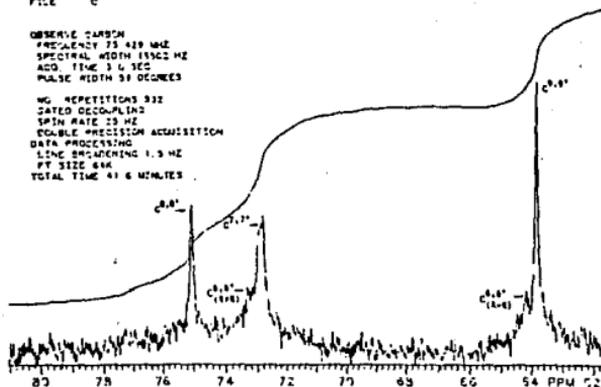


Espectro de RMC de HEC-4

EXPI PULSE SEQUENCE STD10C
 DATE 17-13-88
 SOLVENT CD3
 FILE C

1-20°C

OBSERVE CARBON
 FREQUENCY 75.428 MHz
 SPECTRAL WIDTH 15362 HZ
 ACQ. TIME 3.6 SEC
 PULSE WIDTH 59 DEGREES
 NO. REPETITIONS 332
 GATED DECOUPLING
 SPIN RATE 15 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 1.5 HZ
 FT SIZE 64K
 TOTAL TIME 41.6 MINUTES

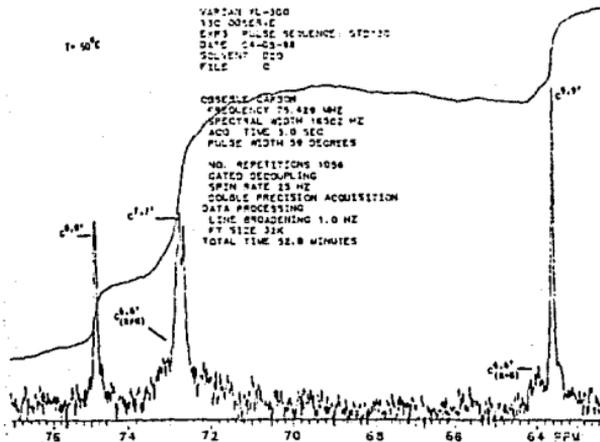


Espectro de RMC de HEC-5

VARIAN XL-300
 VIC OBSERVE
 EXPI PULSE SEQUENCE STD10C
 DATE 14-03-88
 SOLVENT CD3
 FILE C

1-20°C

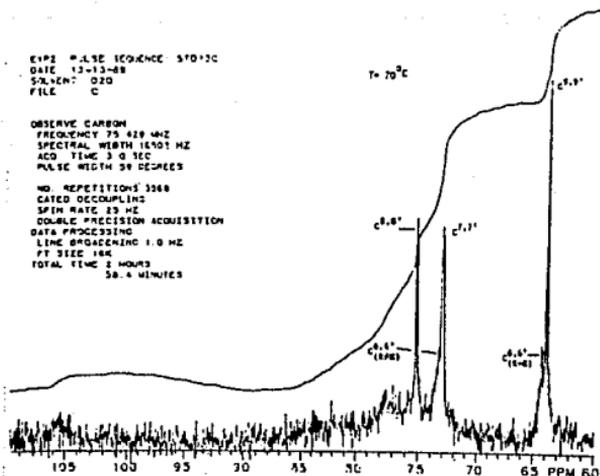
OBSERVE CARBON
 FREQUENCY 75.428 MHz
 SPECTRAL WIDTH 16362 HZ
 ACQ. TIME 3.0 SEC
 PULSE WIDTH 59 DEGREES
 NO. REPETITIONS 1056
 GATED DECOUPLING
 SPIN RATE 15 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 1.0 HZ
 FT SIZE 32K
 TOTAL TIME 32.8 MINUTES



Espectro de RMC de HEC-6

EPIE = LSE SEQUENCE STD JC
DATE 12-13-88
SOLVENT: D2O
FILE C

OBSERVE CARBON
FREQUENCY 75 819 MHz
SPECTRAL WIDTH 15001 HZ
AQD TIME 3 0 SEC
PULSE WIDTH 39 DEGREES
NO REPEATITIONS 3268
GATED DECOUPLING
SPIN RATE 13 HZ
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.0 HZ
PT SIZE 18K
TOTAL TIME 2 HOURS
58.4 MINUTES



Espectro de RMC de HEC-7

En los espectros se observa que la intensidad de la señal del carbono $C^{6,6}$ (R=H) es muy semejante en todas las muestras, a excepción de la HEC-6, cuya señal es menos intensa. Esto implica que la muestra 6 tiene una mayor sustitución en sus grupos hidroxilo primarios.

La intensidad de la señal de $C^{6,6}$ permanece constante en todos los espectros con respecto a las señales de $C^{7,7}$ y $C^{8,8}$. La relación entre últimas varía en cada muestra, puesto que la intensidad de la señal del carbono 7 está en función del incremento de la cadena lateral y este a su vez depende del aumento de la sustitución molar. Las muestras 4 y 6 son las que tienen una mayor longitud de cadena y la muestra 6 es la que tiene la mayor SM. El resto de las muestras presenta una relación entre ambas señales prácticamente constante.

El tratamiento de los datos calculados por integración de las señales para la muestra 5, es el siguiente:

Los valores del área para cada señal (obtenidos por planimetría) son:

$$\text{Area } C^{d,d'}_{(R=H)} = 1.0.$$

$$\text{Area } C^{7,7'} = 2.3.$$

$$\text{Area } C^{8,8'} = 1.6.$$

$$\text{Area } C^{p,p'} = 2.3.$$

La magnitud aproximada de los parámetros estructurales de la molécula de HEC-5 es:

$$\rho = 2.3 / 2.3 \implies \rho = 1.0$$

$$q = 2.3 / (2.3 + 1.0) \implies q = 0.70$$

$$GS = 2.0 / (0.5 + 1.0) \implies GS = 1.33$$

$$n = 0.50$$

$$[C^{d,d'}_{(R=H)}] = 1.33(1.0 - 0.70) / 0.70 \implies [C^{d,d'}_{(R=H)}] = 0.57$$

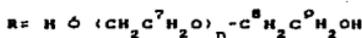
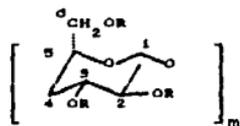
$$[C^{2,2'}] + [C^{3,3'}] = 3 - 1.33 - 0.57 \implies [C^{2,2'}] + [C^{3,3'}] = 1.10$$

De la misma forma, se calculan los parámetros estructurales aproximados de las muestras de HEC restantes. Los resultados se resumen en la Tabla XI.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

T A B L A X I

RESULTADOS DE RMN-¹³C PARA HIDROXIETILCELULOSA.



Muestra	SM ± 1.5	GS ± 0.7	ρ	n ± 0.3	$[C^{d,d'}]_{R=H}$ ± 0.2	$[C^2 + C^3]$ ± 0.2
HEC-1	1.9	1.34	0.82	0.41	0.60	1.05
HEC-2	1.8	1.24	0.90	0.45	0.61	1.15
HEC-3	1.84	1.21	1.02	0.51	1.00	0.79
HEC-4	2.0	1.29	1.10	0.55	0.70	1.01
HEC-5	2.0	1.33	1.00	0.50	0.57	1.10
HEC-6	2.5	1.37	1.64	0.82	0.53	1.10
HEC-7	2.2	1.45	1.04	0.52	0.62	0.93

Como puede observarse, a medida que aumenta el valor de la sustitución molar (SM), se incrementan también los valores de ρ y de n , por lo que se espera un incremento en el número de ramificaciones a lo largo de la molécula. Es decir, las cadenas laterales aumentan de tamaño. Sin embargo, la tendencia no se conserva en lo que se refiere a la sustitución en el carbono 6 y en los carbonos del anillo con grupos hidroxilo secundarios.

De la misma forma y como se mencionó anteriormente, el grado de sustitución (GS) puede tener varios valores para una determinada sustitución molar, ya que es un parámetro determinado por la cinética de la reacción de síntesis.

En el caso de las muestras 4 y 5, que tienen la misma sustitución molar, es claro que la que tiene un menor GS (HEC 4), es la que tiene una menor sustitución en el grupo hidroxilo primario (el valor mayor de $C^{O,H}$ (H=H)) y mayor sustitución en los carbonos secundarios C-2 y C-3.

El parámetro más importante que se consideró para comparar las muestras de HEC es el grado de sustitución; sin embargo se tomó en cuenta también la sustitución en el grupo hidroxilo primario.

En orden decreciente de GS, se listan las muestras de HEC:

HEC7 > HEC 6 > HEC 1 > HEC 5 > HEC 4 > HEC 2 > HEC 3

En general, las muestras con mayor GS son las que, como se esperaba, tienen un peso molecular más alto. Aquellas de peso molecular intermedio tienen menor GS. Sin embargo, en las muestras de bajo peso molecular, no existe una congruencia en el valor de GS de la muestra 1, puesto que se espera que, al igual que la HEC-2, tenga un bajo GS.

Para establecer una correlación entre el grado de resistencia a la degradación enzimática y la sustitución global en la HEC, se resumen los resultados en la siguiente tabla:

TABLA XII

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE DETERMINACION DEL GRADO DE RESISTENCIA A LA DEGRADACION ENZIMATICA Y CON LOS ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA DE CARBONO-13 DE HIDROXIETILCELULOSA.

MUESTRA	PENDIENTE	GS	$C^{13} \text{R}=\text{H} \approx 0.2$
HEC-1	0.27	1.34	0.62
HEC-2	0.80	1.24	0.60
HEC-3	1.28	1.21	1.00
HEC-4	1.14	1.29	0.70
HEC-5	1.18	1.33	0.57
HEC-6	0.51	1.37	0.53
HEC-7	0.22	1.45	0.62

En general, las muestras con mayor grado de sustitución (GS) y que están más sustituidas en los grupos hidroxilo de la cadena lateral ($C^{13} \text{R}=\text{H}$) tienen mayor resistencia al ataque enzimático. Sin embargo, la muestra 5 presenta estas características y no es muy resistente al ataque enzimático.

La muestra que más resiste la hidrólisis enzimática es la HEC-7. Esta tiene la mayor sustitución global en la molécula y una alta sustitución en sus grupos hidroxilo primarios. Además, es la muestra que tiene el peso molecular más elevado.

Como se discutió anteriormente, las muestras de pesos moleculares altos y las de bajo peso molecular son las más resistentes a la acción de las celulasas y, consecuentemente, las más sustituidas.

Las muestras menos sustituidas en el grupo hidroxilo primario (valor más grande de $C^{\delta}_{R=H}$) y con una menor sustitución global son las que más se degradan. Estas HEC son a su vez, las que presentan un peso molecular intermedio.

La muestra de HEC-4 es la que presenta la menor resistencia enzimática, tiene un valor de GS bajo y la menor sustitución en el carbono 6 (el máximo valor de $[C^{\delta}_{R=H}]$).

6.0. CONCLUSIONES.

1) El método en el que se basa la determinación del grado de resistencia a la degradación enzimática permite evaluar y comparar el comportamiento de muestras de hidroxietilcelulosa y, en general, de éteres celulósicos.

2) Existe una correlación entre la resistencia al ataque enzimático y la sustitución en la molécula de HEC.

3) Las muestras más resistentes son las que tienen una mayor sustitución en sus grupos hidroxilo primarios y, consecuentemente, las que están más sustituidas a lo largo de su estructura.

4) Las muestras con menor uniformidad de sustitución son las que más se degradan; y corresponden a los pesos moleculares intermedios de las muestras de HEC.

7.0. REFERENCIAS.

- ¹ Wirick, M. G. , *J. Polym. Sci., Part A-1*, **6**, (1968), 1705.
- ² Glass, J. E. et al, *Carbohydr. Res.*, **87**, (1980), 245.
- ³ Reese, E. T. et al, *J. Bacteriol.*, **59**, (1950), 485.
- ⁴ Miles Laboratories, *Technical Information: Viscometric Cellulase Assay*, (1975).
- ⁵ Lee, Y. H. et al, *Advances in Biochemical Engineering*, **17**, (1980), 14.
- ⁶ Li, L. H. et al, *Arch. Biochim. Biophys.*, **111**, (1965), 439.
- ⁷ Reuben, J. and Casti, T. E. , *Carbohydr. Res.*, **183**, (1987), 81.
- ⁸ Klop, W. and Koolman, P. , *Biöchim. Biophys. Acta*, **99**, (1965), 102.
- ⁹ Reuben, J. , *Macromolecules*, **17**, (1984), 156.
- ¹⁰ Schaefer, J. and Natusch, D. F. S. , *Macromolecules*, **5**, (1975), 416.
- ¹¹ Tchir, M. F. and Rudin, A. , *Water-Soluble Polymers (ACS)*, (1988), 72.
- ¹² Grant, D. M. and Paul, E. G. , *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, (1964), 2484.
- ¹³ Koch, H. J. and Perlin, A. S. , *Carbohydr. Res.*, **15**, (1970), 403.
- ¹⁴ Lee, D. S. and Perlin, A. S. , *Carbohydr. Res.*, **106**, (1982), 1.
- ¹⁵ Parfondry, A. and Perlin, A. S. , *Carbohydr. Res.*, **57**, (1977), 39.
- ¹⁶ Zadorecki, P. and Hjeterberg, T. , *Makromol. Chem.*, **188**, (1987), 513.
- ¹⁷ Demember, J. R. et al, *J. Appl. Polym. Sci.*, **21**, (1977), 621.
- ¹⁸ Klug, W. et al, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **2**, (1973), 187.
- ¹⁹ Delgadillo González, M. A. , "Caracterización del Peso Molecular de Hidroxietilcelulosa", *Reporte MG-01-MADG, Celanese Mexicana S. A.*, (1989).

BIBLIOGRAFIA GENERAL.

1. Kirk, R.E. and Othmer, D.F., *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol.3, The Interscience Encyclopedia, New York, 1981.
2. Rodriguez, F., *Principles of Polymer Science*, McGraw-Hill International Book Company, Second Edition, New York, 1983.
3. Billmeyer, F., *Textbook of Polymer Science*, John Wiley and Sons, Third Edition, New York, 1984.
4. Snyder, L.R. and Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Second Edition, New York, 1979.
5. Joseph-Nathan, P., *Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1 y de Carbono-13*, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía No.9, Serie de Química, Segunda Edición, México, 1982.
6. Levy, G.C., *Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 para Químicos Orgánicos*, Ediciones Bellaterra S.A., Primera Edición, México, 1982.
7. Breitmaier, E. and Voelter, W., *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, VCH Publishers, Third Edition, New York, 1987.
8. Sanders, J.K.M. and Hunter, B.K., *Modern NMR Spectroscopy; A Guide for Chemists*, Oxford University Press, First Edition, New York, 1987.