

182
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

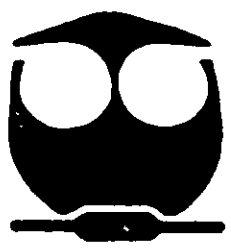


EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"BIOPOLIESTERES"

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A
ALBERTO VITERBO DE LA FUENTE



MEXICO, D. F.

268007

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE PROF. CARLOS GUZMAN DE LAS CASAS

VOCAL PROF. IRMA CRUZ GAVILAN GARCIA

SECRETARIO PROF. MARCO ANTONIO URESTI MALDONADO

1er. SUPLENTE PROF. HELIO FLORES RAMIREZ

2o. SUPLENTE PROF. ROSA MARIA DOMINGUEZ MARTINEZ

DICHO TEMA SE LLEVO A CABO EN LA FACULTAD DE QUIMICA, CIUDAD
UNIVERSITARIA, EDIFICIO E LAB. 213, Y EDIFICIO D LAB. 324



M. EN C. MARCO ANTONIO URESTI MALDONADO
ASESOR DEL TEMA



ALBERTO VITERBO DE LA FUENTE
SUSTENTATE

CONTENIDO

- 1. Introducción y objetivo
 - 2. Biotecnología
 - 2.1 Polímeros nuevos y tradicionales a partir de la biotecnología
 - 2.2 Biotecnología y polímeros industriales
 - 2.3 Biopolímeros
 - 3. Biopoliésteres
 - 3.1 Introducción
 - 3.2 Antecedentes
 - 3.3 Biosíntesis
 - 3.4 Separación
 - 3.4.1 Extracción por solventes
 - 3.4.2 Digestión con hipoclorito de sodio
 - 3.4.3 Digestión enzimática
 - 3.5 Propiedades
 - 3.5.1 Morfología
-

3.5.2 Morfología inicial

3.6 Degradación

3.6.1 Biodegradación intracelular

3.6.2 Biodegradación extracelular

3.6.3 Degradación térmica

3.6.4 Degradación hidrolítica

3.6.5 Degradación ambiental

3.6.6 Efectos en reciclado

3.7 Aplicaciones

3.8 Aspectos económicos

3.9 Perspectivas futuras

3.9.1 Otros PHAs bacterianos

3.9.2 PHAs sintéticos

3.9.3 Mezclas

3.9.4 Ingeniería genética

3.9.5 Desarrollos comerciales

• 4. Conclusiones

• 5. Apéndice

1 Introducción y objetivo

La Federación Europea de Biotecnología define a la biotecnología como: "el uso integrado de la ingeniería, bioquímica y microbiología para conseguir la aplicación tecnológica ó industrial de los microorganismos, células de tejido cultivado y sus partes". En resumen, la biotecnología es la aplicación de agentes biológicos ya sea en la industria manufacturera o en operaciones de servicio. El término biotecnología podría significar que se trata de una disciplina individual, pero la esencia de la biotecnología es su naturaleza multidisciplinaria, la cual requiere de amplias aportaciones de la ciencia y la ingeniería.

Los principales avances de la biotecnología, han sido los anticuerpos monoclonales y la ingeniería genética. Los anticuerpos monoclonales son los productos de la tecnología del hibridoma. Esta se basa en la fusión de células animales, del sistema inmune, con células cancerosas. Las líneas de células híbridas que se forman tienen la capacidad de crecer y producir anticuerpos altamente específicos, los cuales se conocen como anticuerpos monoclonales..

La ingeniería genética es la capacidad para transferir genes de un organismo a otro, lo cual no es posible mediante métodos genéticos ordinarios. Esta técnica ha encontrado una amplia aplicación en el campo de la medicina, en la agricultura y en la industria alimentaria.

Biopolímero es el nombre generalizado para los polímeros que son contenidos en, y constituyen, la vida de los organismos, y así se tienen: que las proteínas, los ácidos nucleicos, y los polisacáridos, son los miembros más predominantes de esta clase. Los biopolímeros consisten de unidades estructurales repetitivas tales como amino ácidos (proteínas), y azúcares (polisacáridos), los cuales son unidos por deshidratación. La estereoquímica en los biopolímeros es muy importante para entender sus funciones biológicas.

Dentro de la biotecnología la producción de polímeros biodegradables se ha vuelto importante dadas, las presiones de los grupos ambientalistas, dentro de los cuales se encuentran los biopolímeros.

Los biopolímeros son polímeros derivados de fuentes bacterianas, y se basan exclusivamente en ácidos β -hidroxialcanóicos, aunque se conocen también algunos derivados de ácidos γ -hidroxialcanóicos. Los polímeros enlazados al fragmento acilo no han recibido tanta atención como otros biopolímeros enlazados glicosídicamente, llamados polisacáridos.

El descubrimiento de los biopoliésteres representa una nueva clase de macromoléculas naturales - poli(hidroxicanoatos)-, conjuntamente con poliisoprenoides, poliglicósidos, polinucleótidos y polipéptidos. El gran interés en los biopoliésteres, se centra alrededor de que son amigables al medio ambiente, en oposición al extenso uso de plásticos no biodegradables.

Los poli- β -hidroxicanoatos, los cuales son usualmente copolímeros, son poliésteres biotecnológicos. El biopol, una versión comercial de PHA vendido por ICI, es un copolímero hecho de unidades repetitivas de butirato y valerato. El desarrollo comercial actual se basa en la tecnología de la fermentación, pero los ingenieros en genética están clonando genes en ciertas plantas, para su obtención.

En este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre los biopoliésteres, con la finalidad de contar con información actualizada sobre dichos materiales, para establecer la viabilidad de líneas de investigación, en este campo, por lo cual se establecieron los siguientes objetivos:

— Revisar algunos aspectos importantes sobre biotecnología.

- Estudiar los diferentes tipos de biopoliésteres y los métodos de obtención.

 - Establecer las relaciones estructura/propiedades de dichos materiales, así como las perspectivas para su aplicación.

 - Por último analizar las diferentes formas de biodegradación de biopoliésteres.
-

2 Biotecnología

Algunos han predicho que las próximas décadas serán las décadas de "la biotecnología", donde el cáncer, los defectos de nacimiento, el incremento del conocimiento de la vida, los cosméticos, la biodegradación, los derrames de petróleo y la exploración, y la disposición de residuos sólidos, y casi todos los aspectos de nuestra vida material serán afectados por esta área de la ciencia.

En las últimas décadas se han encontrado rápidamente desarrollos científicos e ingenieriles dentro del contexto de la biotecnología. Si el mundo económico se beneficiará totalmente a partir de los avances en biociencias e ingeniería bioquímica, éste deberá ser capaz de enfocar los nuevos conocimientos sobre objetivos comercialmente apropiados.

La biotecnología en un cierto sentido es el campo más viejo de la historia humana y pueden encontrarse referencias en los escritos más antiguos de la humanidad sobre el uso de materiales derivados de la biotecnología. En otro sentido, la biotecnología se enfoca al tratamiento directo de los materiales naturales o sus usos como un abastecedor de alimentos, incluyendo

las actividades biológicamente asociadas y las aplicaciones de estos materiales. Otro aspecto son los polímeros bioactivos los cuales ejercen algún tipo de actividad sobre la vida de los organismos. Estos polímeros son utilizados en agricultura, sistemas de liberación controlada, medicina y muchas otras áreas. Estos materiales también se describen como polímeros que combinan aspectos de biotecnología y bioactividad.

Es necesario, en este caso, definir el uso del término biotecnología dado que tiene diferentes significados dependiendo del área de aplicaciones. Así, por ejemplo, algunos la han considerado como otro aspecto meramente de la biología, ésta metodología es en la actualidad una nueva unión de la química y biología en una escala.

Recientemente, han surgido algunos factores adicionales los cuales podrían redirigir la atención hacia los sistemas biotecnológicos. Algunos de estos factores son: (1) obtención de recursos renovables a gran escala, (2) Posibilidad de una biodegradación natural.

Las reservas de petróleo y carbón son limitadas y muchos materiales diversos, incluyendo medicinas, tintes y combustibles dependen de estos recursos. En general, los polímeros a base de derivados del petróleo son poco biodegradables y por lo general representan un problema potencial en

en su disposición. Mientras que reciclando se puede aliviar este obstáculo, los factores económicos de el reciclado aún permanecen inciertos; muchos plásticos reciclados llevan un cierto costo de recuperación, haciendo el uso de plásticos virgenes más atractivos. Existen, naturalmente, consideraciones reguladoras para polímeros biotecnológicos así como para los completamente sintéticos.

La biotecnología moderna es una mezcla de innovación sobreimpuesta y fundamentos industriales, estos representan medios de producción con prospectos claros, desafiando problemas y estimulando la competencia.

Hoy se sabe que, la Biotecnología ocupa el primer lugar en los esfuerzos de investigación y desarrollo de el mundo moderno. Ni siquiera, hay muchas definiciones para este nuevo y moderno campo, la más ampliamente aceptada es la definición que dice así:

“la biotecnología es la aplicación de los principios científicos e ingenieriles para el procesado de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios.”

Sin embargo, el factor indiscutible es, que la biotecnología es la tecnología para el siglo 21; porque, como la definición claramente lo dice, ésta tiene el potencial para introducir nuevas perspectivas para la solución de los

principales problemas de hoy en día relacionados con la salud, con la agricultura, con el medio ambiente y la utilización de los recursos naturales. Desde el punto de vista de las próximas generaciones, la biotecnología indudablemente jugará un papel cada vez más importante, en el desarrollo de las sociedades futuras. Así, un gran número de científicos en el mundo constantemente han ido centrando sus esfuerzos en diferentes aspectos de este campo.

La biotecnología y particularmente su conocimiento y aplicación en todos los sectores de la industria, en esta década es una de las actividades líderes en alta tecnología. Los fundamentos de la biotecnología son un prerrequisito esencial, para extender ampliamente su aplicación en el beneficio de la sociedad y la industria. Por ejemplo, una área crucial en los 90's ciertamente es la biotecnología ambiental. Debido a que el descuido y el incremento de la contaminación del agua y del suelo, así como la industrialización y el desarrollo de los países han ocasionado una catástrofe ambiental. Algunas grandes ciudades tales como Sao Paolo y la Ciudad de México están ya en un estado de contaminación no-recuperable, la cual afecta seriamente la

salud de sus habitantes. Para evitar y detener este fenómeno, es necesario involucrar a todo el mundo (tanto en finanzas y tecnología). La biotecnología ambiental puede en este caso, jugar un rol principal en el control de la contaminación y en la remediación de sitios contaminados y particularmente en la biodegradación de compuestos químicos tóxicos.

2. 1 Polímeros Nuevos y Tradicionales a partir de la Biotecnología

Como se ha dicho la biotecnología puede ser definida como el uso, modificación ó imitación de materiales naturales. En este contexto, existen varios polímeros derivados de la biotecnología, aunque ellos no siempre se producen en masa (grandes cantidades). Tradicionalmente, los polímeros más antiguos usados por el género humano aparecieron a partir de lo que hoy se conoce como biotecnología. Estos polímeros incluyen algodón, cuero, derivados de la celulosa, plásticos caseíno y adhesivos, laca, almidones modificados, papel y productos de madera, cuero, lana, etc.. En efecto la

la industria primitiva de la pintura se basaba en aceites desecantes naturales.

La industria del curtido, parece ser la primera aplicación a gran escala de la modificación intencional de polímeros para mejorar sus propiedades y su durabilidad, aunque los curtidores estaban ajenos a los principios de la naturaleza polimérica del material. La goma laca, "shellac" es un poliéster natural aislado de los exudados de el insecto *Laccifer lacca*, tuvo gran uso como un recubrimiento (pintura) ó barniz. Todos estos materiales no fueron reconocidos como polímeros hasta tiempos comparativamente recientes, estos polímeros siguen siendo recursos valiosos.

2.2 Biotecnología y polímeros industriales

Como se ha visto la biotecnología fue el origen de los polímeros industriales más antiguos incluyendo: derivados de celulosa, algodón, almidón, seda, papel, gomas, laca, cuero y lana, etc.. Al inicio la industria de las pinturas utilizaba aceites monoméricos naturales y los primeros adhesivos se obtuvieron a partir de derivados de la caseína. En este siglo, los polímeros sintéticos han dominado por el incremento de los petroquímicos, pero los polímeros derivados de la biotecnología continuan en gran uso. Han surgido nuevos

polímeros incluyendo poliésteres naturales, quitina y quitosana, ácido hialurónico, polímeros semejantes a elastómeros, bioadhesivos, melamina, e imitación a las telarañas. Algunos de estos polímeros prometen ser materiales económicamente viables en cosméticos y usos relacionados a la medicina y para aplicaciones generales.

Algunas razones para el desarrollo de los polímeros sintéticos han sido el factor de a) la simplicidad de su estructura, b) su facilidad de obtención, y c) entender en teoría. Para los primeros químicos en polímeros, fue fácil deducir las relaciones estructura-propiedad en los polímeros sintéticos.

Otro factor que ha promovido la revolución de los polímeros sintéticos fue la facilidad de obtener un amplio intervalo de propiedades y aplicaciones, lo cual parecía imposible con los polímeros naturales.

Dentro de los polímeros biotecnológicos, los derivados de la celulosa han encontrado grandes áreas de aplicación, en cosmetología, alimentos, medicina y liberación controlada de fármacos, y así, se tienen la metil-celulosa, la etil-celulosa, la carboximetil-celulosa de sodio, así como el acetato de celulosa. El almidón es el principal modo de almacenamiento de energía en las plantas y ha sido empleado de diversas maneras en la industria.

Los polipéptidos tienen menos aplicaciones biotecnológicas que los polisacáridos porque tienden a degradarse más rápidamente, son de origen

animal, y tienen estructuras más complejas. Las aplicaciones más comunes son como pegamentos.

2.3 Biopolímeros.

Biopolímero es el nombre generalizado para los polímeros que son contenidos en, y constituyen, la vida de los organismos; proteínas, ácidos nucleicos, y polisacáridos son los miembros más prominentes de estos materiales. Los biopolímeros consisten de unidades estructurales repetitivas tales como amino ácidos (proteínas), azúcares (polisacáridos). La mayor diferencia entre los biopolímeros y polímeros sintéticos es que los primeros en su mayoría son polímeros isotácticos, con estructuras moleculares bien definidas, y generalmente son polielectrolitos. La estereoquímica en los biopolímeros es muy importante para entender sus funciones biológicas.

Dentro de estos materiales se tienen lo que se conoce como biopoliésteres, los cuales son poli(hidroxialcanoatos), aunque diversos investigadores han obtenido también algunos copolímeros derivados del ácido valérico como se verá más adelante. Son precisamente estos biopoliésteres el objeto de este estudio.

3 Biopoliésteres

3.1 Introducción

Los poliésteres se definen como polímeros formados por la condensación de alcoholes polihídricos, tales como glicol ó propilenglicol y ácidos polibásicos, tales como el ácido maléico o tereftálico. Por otra parte los biopoliésteres son poliésteres derivados de fuentes bacterianas, y se basan exclusivamente en ácidos β -hidroxialcanóicos. Aunque se conocen también, algunos derivados de ácidos γ -hidroxialcanóicos.

Aunque la función éster se presenta ampliamente en productos naturales, los poliésteres enlazados al fragmento acilo no han recibido tanta atención como otros biopolímeros enlazados glicosídicamente, llamados polisacáridos. El descubrimiento de los biopoliésteres representa una nueva clase de macromoléculas naturales -poli(hidroxialcanoatos)-, conjuntamente con poliisoprenoides, poliglicósidos, polinucleótidos y polipéptidos. El gran interés en biopoliésteres se centra alrededor de que son amigables al medio ambiente, en oposición al extenso uso de plásticos no biodegradables.

El miembro más simple y común de la familia de los poli(hidroxialcanoatos) es el poli(β -hidroxibutirato) (figura 1). Este material es biosintetizado en un gran número de bacterias, como una reserva de energía; análogo al almidón. En las plantas los biopoliésteres se encuentran como inclusiones sub-

micrónicas dentro de las células.

El desarrollo comercial actual esta basado en la tecnología de la fermentación, pero los ingenieros en genética estan clonando genes para reemplazar el almidón o los lípidos con biopoliésteres en ciertas plantas.

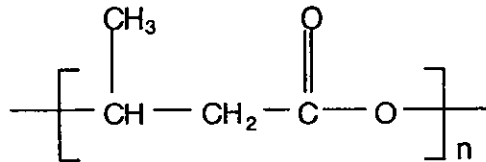


Figura 1. Estructura química del poli(β -hidroxibutirato).

Existe un cierto número de publicaciones que describen diversos aspectos de los biopoliésteres. A continuación se describe el desarrollo histórico del conocimiento de estos poliésteres y los aspectos técnicos y científicos más importantes en su desarrollo comercial. En esta etapa de desarrollo comercial, los biopoliésteres se obtienen comercialmente mediante fermentación, con una producción aproximada de 1,000,000 lbs por año. Las preocupaciones por el medio ambiente que han impulsado el reciclado y tecnologías de limpieza para el manejo de desperdicios, sugiere que la

producción de biopoliésteres debe incrementarse significativamente en las próximas décadas.

3.2 Antecedentes

El poli- β -hidroxibutirato (PHB) se menciona en la literatura microbiológica alrededor de 1901. Estudios detallados fueron reportados por Maurice Lemoigne a la división Lille de el Instituto Pasteur, a principios de 1925. Él observó inclusiones granulares en el fluido citoplásmico de una bacteria que no eran solubles en éter como los lípidos normales. Utilizando observaciones microscópicas, saponificación, número ácido, autólisis, solubilidad, variación del punto de fusión con el peso molecular, y actividad óptica, demostró que el material era un poliéster con una fórmula empírica $(C_4H_6O_2)_n$. También consideró que las diferencias observadas en el punto de fusión, en dos fracciones separadas, se deben a diferencias en el grado de polimerización.

En los siguientes treinta años, se estudiaron las inclusiones de PHB primordialmente como una curiosidad académica. En 1952, Kepes y Péaud Lenoël observaron que las fracciones separadas por Lemoigne eran los productos de la hidrólisis de un poliéster lineal de alto peso molecular con una temperatura de fusión de 180°C, que tenía un grupo ácido carboxílico en un extremo y un grupo alcohol en el otro. Weibull correlacionó la presencia de

gránulos lípidos intracelulares encontrados en varias bacterias con el PHB. En 1958 Williamson y Wilkinson revisaron los trabajos previos y fueron los primeros en reportar datos sobre el peso molecular y propiedades físicas. Macrae y Wilkinson observaron que la cantidad de PHB se incrementaba al limitar el nitrógeno en el medio de desarrollo; siguiendo estos trabajos, Merrick y Doudoroff examinaron la biosíntesis y procesos de degradación enzimática del polímero dentro de células bacterianas. Los científicos llegaron a la conclusión que las bacterias acumulan PHB como material de reserva de energía, así como el almidón y el glicógeno son acumulados por otros organismos; la naturaleza utiliza el almidón como el medio por el cual las plantas almacenan energía para uso posterior (la papa y los cereales contienen grandes cantidades de almidón); el glicógeno es un polisacárido que tiene en los animales la misma función de almacenamiento de energía que el almidón cumple en los vegetales.

A fines de los 50`s y principios de los 60`s, Baptist y Werber a W.R. Grace y Co. en los Estados Unidos de América empezaron a producir grandes cantidades de PHB para evaluación comercial. Ellos obtuvieron patentes por la producción y procesos de separación y desarrollaron artículos tales como suturas y prótesis. Sus innovaciones se extendieron al uso de productos de fermentación altamente impuros para la obtención de laminados plásticos. Sin

embargo, su producción de PHB por fermentación fue relativamente baja y su proceso de extracción por solventes era muy caro. Además, el polímero producido estaba fuertemente contaminado con residuos bacterianos, haciendo difícil su procesado. El proyecto fue abandonado y el interés comercial se perdió en una década. Como quiera, estos trabajos fueron los pioneros sobre el uso potencial del PHB como plástico y su aplicación como un material biocompatible.

En 1968, ICI (Imperial Chemical Industries) en el Reino Unido, comenzó a desarrollar una tecnología de proteínas de células simples (SCP), con la meta inicial de desarrollar un producto alimenticio altamente nutritivo para animales. Se obtuvo un producto alimenticio SCP llamado "Pruteen" mediante fermentación, con un alto costo inicial para su producción a gran escala comercial. Por lo que se decidió no comercializarlo, dejando la tecnología y facilidades a la mano para ser aplicadas a otros proyectos.

Combinando la experiencia en fermentación a gran escala de la División de Agricultura, con habilidades en procesamiento de polímeros y evaluación de la División de Plásticos, ICI se fue preparando para abordar la comercialización de PHB. La crisis de energía de la década de los 70's fué un incentivo para buscar sustitutos naturales de los plásticos sintéticos. ICI estableció condiciones tales que la bacteria *Alcaligenes eutrophus* era capaz de producir

hasta un 70% en peso de biomasa seca como PHB. Sin embargo, las propiedades mecánicas del PHB puro no mostraban ninguna ventaja particular sobre el polipropileno, debido a la excesiva fragilidad. Cuando se estabilizó el precio del petróleo, los costos de producción del PHB eran más altos que los del polipropileno, así la idea original de desarrollar PHB como un plástico de gran volumen, se terminó.

Como quiera, ICI ha avanzado de gran manera en la producción de PHB patentando procedimientos para la producción de copolímeros de β -hidroxibutirato (HB) y β -hidroxivalerato (HV) (figura 2). Esta familia de materiales, conocidos como PHBV o Biopol, han mejorado muchas propiedades de el PHB, incluyendo su fragilidad. El interés en desarrollar poliésteres bacterianos, también se incrementó debido a su biodegradabilidad. El trabajo de ICI sobre PHB fué publicado en 1981 en un

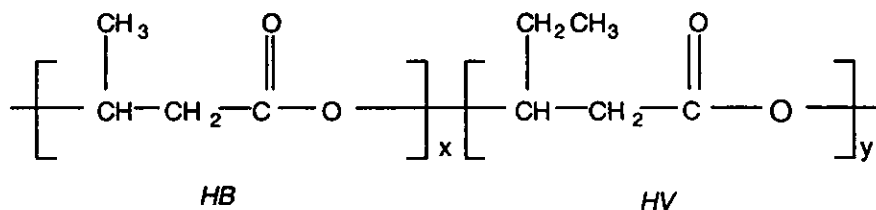


Figura 2. Estructura química del poli(β -hidroxibutirato-co- β -hidroxivalerato).

escrito sobre Peter King, y en 1983 ICI y MTM (Dirección Tecnológica Marlborough) se unieron llamándose Biopolímeros Limitados Marlborough (MBL) para explotar el Biopol. En 1990, el primer producto comercial hecho de Biopol fue lanzado en Alemania como una botella biodegradable para empacar un champú biodegradable de Wella.

3.3 Biosíntesis

Muchas especies bacterianas aeróbicas y anaeróbicas, bajo condiciones de escasez de nutrientes con un suministro de carbono suficiente, desarrollan cuerpos de inclusión sub-micrónicos los cuales están compuestos de poli- β -hidroxialcanoatos (PHAs). De los cuales el PHB se tiene en mayor cantidad. Los cuerpos de inclusión de PHB son normalmente esféricos, con diámetro de alrededor de $0.5 \mu\text{m}$, y juegan el papel de un electrón débil por el poder reductivo en exceso, desarrollado en un medio bacteriano aeróbico con limitación de oxígeno. En el caso de limitación de nitrógeno, las enzimas de depolimerasa PHB están ausentes, considerando la acumulación.

Las moléculas de PHB insolubles en agua ejercen una presión osmótica intracelular despreciable, haciendo de estos poliésteres materiales ideales de reserva. La cantidad de PHB en células bacterianas es normalmente 1-30% de su peso en seco; sin embargo, bajo condiciones de fermentación controlada donde se limita el nitrógeno ó el oxígeno, algunas especies -*Azotobacter* y

Alcaligenes- pueden acumular polímero hasta en un 90% de su biomasa seca. Trabajos recientes han mostrado que el PHB puede estar presente en las células de otras maneras que como cuerpos de inclusión y así se han aislado cadenas cortas (130-200 unidades repetitivas) del polímero en membranas bacterianas y también en una gran variedad de tejidos de plantas y animales. Este PHB se ha encontrado en pequeñas cantidades -menores al 0.001% de peso en seco- formando complejos con lípidos, proteínas o sales de aniones poliméricos, sugiriendo una función fisiológica diferente a la de un material de reserva.

Los complejos de PHB con sueros de albúmina o lipoproteínas de muy baja densidad, pueden servir para modificar la actividad de los transportadores de proteínas e interferir con la degradación de estas. El PHB en las membranas de plasma de bacterias forma un complejo con el calcio y con polifosfatos, por lo que se ha postulado es una hélice exolipofilicendopolarfilica cerca del sistema interior del polifosfato de calcio creando un canal continuo a través de la membrana. Este complejo se cree que juega un papel en la regulación de calcio y fosfato intracelular.

Muchos estudios se han realizado sobre la síntesis metabólica y degradación de PHB en microorganismos. El camino usado por *A. eutrophus* (figura 3) es la más conocido, y ha sido confirmado experimentalmente

utilizando carbono-13 y análisis espectral por resonancia magnética nuclear (NMR de C13). El bloque construido es el acetil-CoA, que se produce al alimentar glucosa, fructosa, sucrosa, metanol, ácido acético y mezclas de dióxido de carbono-hidrógeno. Una enzima β -cetotilasa condensa dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA, el cual es reducido a un R- β -hidroxibutiril por un NADPH-dependiente estereoselectivo acetoacetil-CoA reductasa. La tercera y última etapa de la biosíntesis es la acción de la enzima sintasa PHB, la cual toma el R- β -hidroxibutiril y junta el grupo β -hidroxil a el carboxilo final de una molécula de PHB preexistente para formar un enlace éster, incrementando la longitud de la cadena en una unidad.

Se han reportado un amplio intervalo de pesos moleculares y puntos de fusión para el PHB, dependiendo del método de separación y de la entidad bacteriana. Bajo condiciones suaves de aislamiento tales como extracción de solvente o aislamiento directo de gránulos nativos, se pueden obtener polímeros de alto peso molecular, con pesos moleculares ponderados promedio del orden de unos cuantos cientos de miles hasta un millón o más. En los primeros estudios al combinar el tamaño del gránulo con el peso molecular, permitieron estimar que existen varios cientos de moléculas por gránulo, una situación análoga a una polimerización por emulsión.

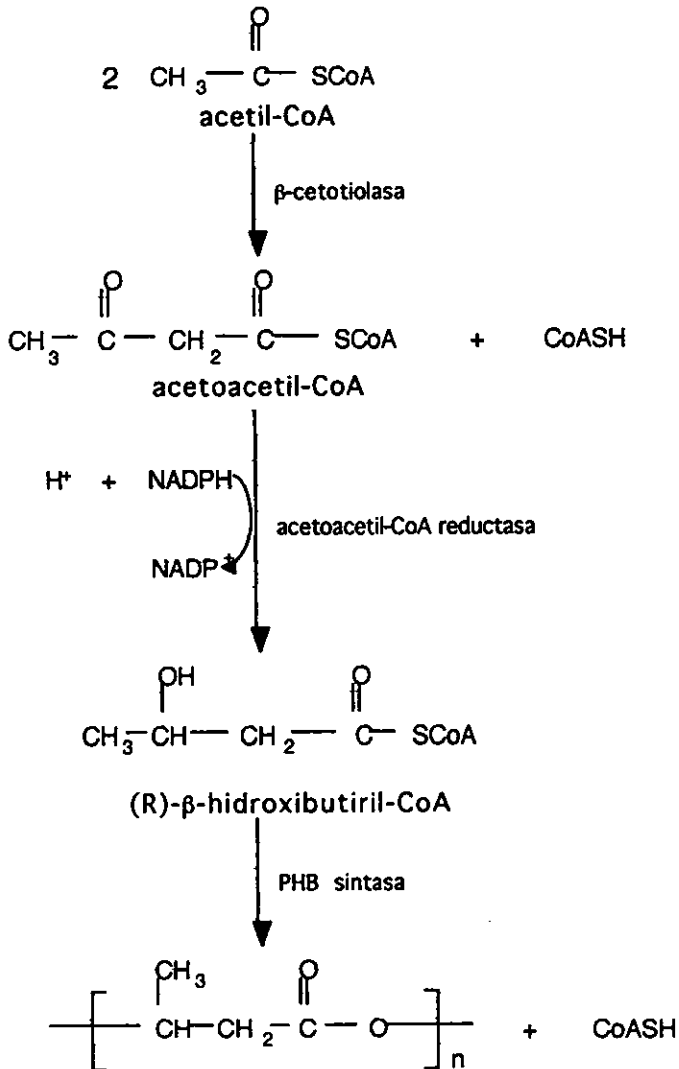


Figura 3. Papel biosintético de el poli(β-hidroxibutirato).

En un estudio más reciente, la relación del peso molecular de las moléculas de PHB con rendimiento total de PHB producido, permitió asegurar que hay 18 000 moléculas de polimerasa PHB por célula, y que este número permanece constante durante todo el periodo de acumulación de PHB.

Algunas bacterias en medios naturales tales como sedimentos de estuarios y aguas lodosas, pueden acumular tanto PHAs como PHB. Al añadir glucosa y ácido propiónico a cultivos con *Alcaligenes eutrophus* limitados en fósforo ó nitrógeno, ICI ha desarrollado un proceso para producir uno de estos materiales, PHBV, en grandes fermentadores. Si se incrementa la relación de unidades repetitivas HV a HB, se pueden disminuir los puntos de fusión de los copolímeros mejorando sus propiedades mecánicas y características termoplásticas.

El análisis NMR de C-13 de copoliéster aislado a partir de *Alcaligenes eutrophus* H16 en medios de cultivo conteniendo [1-13C]propionato, [1-13C]acetato y [2-13C]acetato, permite establecer el mecanismo de biosíntesis de copoliéster mostrado en la figura 4. Cuando el propionato es la única fuente de carbono en el medio de cultivo, el propionil-CoA selectivamente elimina el carbonil carbono, formando acetil-CoA. Dos moléculas de acetil-CoA pueden condensar para formar β -hidroxibutiril-CoA, o el acetil-CoA puede reaccionar con el propionil-CoA para formar

β -hidroxivaleril-CoA. Finalmente, bajo la acción de la polimerasa PHB, el β -hidroxibutiril-CoA y β -hidroxivaleril-CoA copolimerizan, formando un copoliéster al azar. La relación de unidades HV a HB, en el copoliéster se incrementa con la concentración de propionato en el medio de cultivo, sugiriendo que la relación β -hidroxivaleril-CoA a β -hidroxibutiril-CoA se incrementa con la concentración de propionil-CoA en la célula. Cuando ambos, acetato y propionato, son usados como fuentes de carbono, acetil-CoA en la célula puede ser producido por cualquiera de ellos, decreciendo la proporción de unidades HV en el copoliéster.

Es importante conocer los mecanismos de biosíntesis de copoliésteres para controlar su composición. Cuando el medio de cultivo contiene glucosa y ácido propiónico, los copoliésteres de PHBV aislados de cultivos de "*Alcaligenes eutrophus*" tienen composiciones del 0 al 47% de HV, Doi ha obtenido un copoliéster con 90% en mol de unidades HV; mezclando glucosa con ácido pentanóico en el medio de cultivo permite el control de la fracción de unidades HV en el producto. La *Alcaligenes eutrophus*, es la bacteria que en la actualidad se utiliza para la producción comercial de PHAs por ICI, pero muchos otros organismos acumulan estos poliésteres y pueden crecer estas fuentes de carbono al igual que los *A. eutrophus*. Algunos ejemplos son: *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus megaterium*, *methilobacterium*, unas

especies de *Aphanothece*, una cianobacteria *Nocardia* y *Pseudomonas cepacia*. Un cultivo de *Chromobacterium violaceum*, alimentado con fuentes de valerato de carbono en atmósfera limitada de nitrógeno, produjo la primer muestra bacteriana de 100% PHV, mientras que a partir de un cultivo de *Rhodococcus bacterium* se aisló un polímero con un 99% PHV al ser alimentado con ácido valérico.

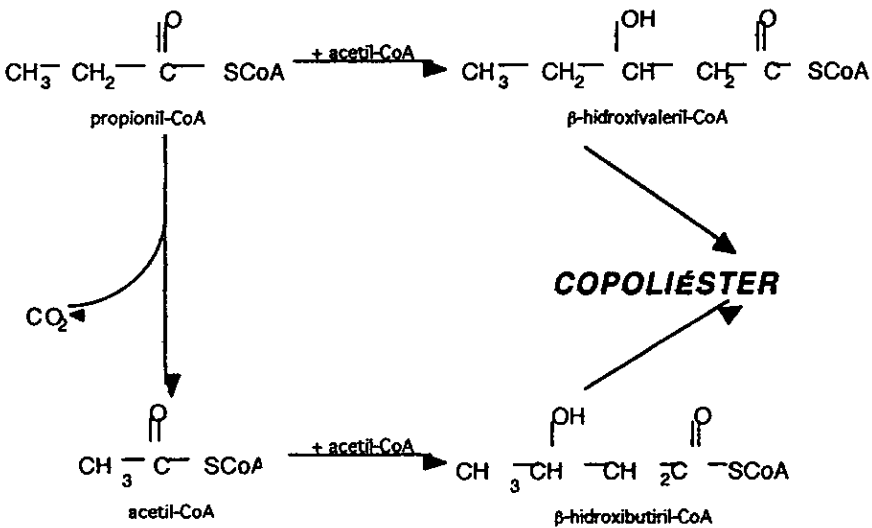


Figura 4. Papel biosintético del poli(β-hidroxi-β-butilirato-co-β-hidroxi-valerato).

En 1989, Ramsay evaluó la posibilidad de utilizar *Pseudomonas cepacia*, uno de los microorganismos nutricionalmente más versátiles, para producir PHAs por fermentación de un material de desperdicio barato. Esta bacteria es también resistente a los efectos tóxicos de pequeñas cantidades de ácidos carboxílicos, las cuales se pueden acumular localmente en concentraciones tóxicas, debido al mezclado imperfecto en los grandes fermentadores usados para la producción comercial de PHA, matando los microorganismos más sensibles. La *P. cepacia* cultivada en una sal mineral que contiene 0.5% fructosa como la única fuente de carbono permite obtener PHB de un alto peso molecular ($M_w = 5.4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$), con un 50% en peso celular seco. La adición de ácido propiónico a los cultivos produjo PHBV por encima del 30% del peso de biomasa seca; al incrementar la concentración de ácido propiónico se incrementa la relación HV/HB pero disminuye la cantidad total de polímero producido. Estos resultados sugieren que *P. cepacia* puede ser una alternativa adecuada para la producción comercial de PHA en lugar de *A. eutrophus*; aunque estos microorganismos pueden acumular PHB sobre mezclas de residuos y desperdicios, se requieren desperdicios que contienen una sola fuente de carbono para tener únicamente acetyl-CoA, para obtener copolímeros de composición controlada.

3.4 Separación

Una vez que los poliésteres se han acumulado en células bacterianas, las paredes de estas deben romperse para separar el polímero de los restos de la célula. Se debe tener mucho cuidado, para evitar la depolimerización durante estos procesos; las primeras mediciones de las propiedades físicas del PHB aislado mostraron grandes variaciones en los pesos moleculares, lo cual, luego se probó, era principalmente debido a los métodos utilizados para la separación. También se pueden llevar a cabo ciertos grados de hidrólisis enzimática "in vivo" antes de la separación.

En general para la separación de PHAs, se han seguido tres aproximaciones: a) extracción por solventes, b) digestión química con hipoclorito de sodio y c) enzimólisis selectiva. Se mejora la eficiencia mediante centrifugación del caldo de fermentación, donde las concentraciones de las células es de 50 g/l, y se obtiene pasta de células concentradas que se utiliza como punto de partida para la separación de polímero.

3.4.1 Extracción por solventes

También conocida como la aproximación física para la extracción de PHA, el método de extracción por solventes usualmente produce polímeros con alto peso molecular.

El PHA se extrae de la pasta de células bacterianas por disolución en un solvente orgánico como cloroformo, cloruro de metileno, 1,2-dicloroetano, 1,1,2-tricloroetano carbonato de propileno. La solución se filtra para eliminar los desperdicios de células y entonces el PHA se precipita por enfriamiento lento de la solución o por adición de un no-solvente como metanol, dietil-éter o hexano. Los poliésteres se pueden purificar posteriormente por redisolución en cloroformo y reprecipitación con hexano o dietil-éter. SEW mejora la pureza del PHA si previamente, a la extracción por solventes, es tratada la biomasa con metanol o acetona, ya que se incrementa la permeabilidad de la membrana celular y permite remover lípidos y desnaturalizar algunas proteínas de bajo peso molecular que usualmente se extraen durante la separación del polímero.

El PHB obtenido por este método es un polvo blanco, altamente cristalino, de alto peso molecular, mientras que otros PHAs con menores rapidez de cristalización forman películas o agregados los cuales cristalizan generalmente a tiempos mayores. Como quiera, el método requiere grandes volúmenes de solventes y no-solventes, para extraer y para precipitar el polímero; por consiguiente este método no es adecuado para grandes operaciones comerciales, y sólo se recomiendan cuando se requiere una alta pureza del polímero.

3.4.2 Digestión con hipoclorito de sodio

También conocida como la aproximación química, este método fue utilizado primero por Williamson y Wilkinson para separar gránulos de PHB a partir de *Bacillus cereus*. Las células bacterianas se tratan por 30-60 minutos, con una solución de hipoclorito de sodio, degradando y disolviendo la pared celular y otros componentes no-PHA, pero dejando los gránulos de poliéster aparentemente intactos. El polímero se puede purificar, lavándolo con dietiléter o metanol para remover los lípidos. Debido a la alta alcalinidad se puede causar desdoblamiento de la cadena, afectando las propiedades superficiales y el peso molecular de las cadenas poliméricas.

Se han efectuado diferentes aproximaciones para minimizar el daño causado al polímero por este método. Nuti mostró que liofilizando (congelar secando) células de *Azotobacter chroococcum* antes del tratamiento con hipoclorito, se logró disminuir la depolimerización causada por este método. Nuti et. al., observaron que liofilizando las células disminuían la actividad de la depolimerasa y que tratando las células con ácido fenilacético, antes de la liofilización se estabilizaba el peso molecular. Controlando con cuidado el pH y el tiempo de digestión, Berger fue capaz de aislar PHB de alta pureza (95%) con un alto peso molecular (600 000). El pretratamiento con un surfactante incrementa tanto la pureza como el peso molecular de los gránulos aislados.

A pesar de estos avances, se tienen algunos problemas con este método, como la dificultad para eliminar completamente las trazas de hipoclorito de sodio de el polímero, y por consiguiente contaminación del medio ambiente por el mismo.

3.4.3 Digestión enzimática

Esta aproximación bioquímica para la separación de PHA fue desarrollada en 1964, cuando Merrick y Doudoroff usando lisozimas y deoxirribonucleasa para solubilizar el peptidoglycans y ácidos nucleicos, respectivamente, de células de *B. cereus*. Las paredes celulares debilitadas fueron entonces rotas por ultrasonido para liberar los gránulos de PHB en una suspensión amortiguadora. Los gránulos separados por este método son todavía capaces de la síntesis enzimática y degradación de las cadenas de PHB ya que están muy cercanas a su estado "in vivo". Se encontró que el 98% del gránulo está constituido de PHB y el 2% sobrante fueron proteínas con trazas de lípidos. Una modificación de este método ha sido utilizada recientemente con *A. eutrophus*.

La versión más avanzada del proceso de enzimólisis selectivo, ha sido descrita por Holmes et. al. El proceso se enfoca a una alta producción de biomasa, con un alto porcentaje en peso de PHA por peso de biomasa seca

(% PHA). La digestión enzimática de los componentes de la célula usualmente causan una liberación repentina de los ácidos nucleicos (DNA) en el medio de suspensión, por lo que esta se vuelve altamente viscosa y virtualmente imposible de tratar posteriormente. Para prevenir esta situación, se utiliza una etapa de calentamiento previa a la digestión enzimática para desnaturalizar y solubilizar el DNA. Siguiendo este pretratamiento, se usan varias enzimas (alcalasa, fosfolipasa, lecitasa y lisosomas) las cuales se separan de una u otra forma, en etapas secuenciales. Se controlan cuidadosamente el pH y la temperatura y así se obtiene la actividad óptima de las diferentes enzimas.

Los productos obtenidos por este procedimiento de separación, usualmente contienen un mínimo de 90% de material PHA, 1-3% de "peptidoglycans" y 6-7% de proteínas. El PHA separado es sometido a un paso de purificación extra por extracción de solvente -como se describió anteriormente- o un secado con esparcido, resultando gránulos de 0.2 - 0.5 μm de diámetro. La cristalización es iniciada, a un mínimo hasta la superficie del gránulo, por el tratamiento de calentamiento. Esta etapa del proceso se puede controlar para producir el nivel deseado de depolimerización.

3.5 Propiedades

El homopolímero PHB es un material termoplástico, es una resina altamente viscosa y moldeable a temperaturas cercanas al punto de fusión (mayores). Estas propiedades frecuentemente son comparadas con las del polipropileno (Tabla 1), como ambos polímeros tienen puntos de fusión, grado de cristalinidad y temperaturas de transición vítrea (t_g) similares. Aunque, el PHB es más rígido y más quebradizo que el polipropileno. La fragilidad del PHB es grande debido a la presencia de cristales grandes en la forma de esferulitas, los cuales se forman durante el enfriamiento a partir del fundido, un tratamiento en rodillos calientes para remover grietas del interior de las esferulitas puede reducir su fragilidad, permitiendo la producción de películas dúctiles (flexibles). Los materiales también difieren en sus propiedades químicas, ya que el PHB presenta una baja resistencia a solventes, pero también una mucho mayor resistencia natural a la radiación ultravioleta que el polipropileno.

Las primeras evaluaciones de PHB incluían la producción de molduras, extrudados, películas y fibras, cuyas propiedades fueron generalmente satisfactorias pero no espectaculares. Las películas para empaque tienen excelentes propiedades de barrera para gases, siendo cinco veces menos permeable al dióxido de carbono que el poli(tereftalato de etileno) (PET), y

Tabla 1. Propiedades de PHB comparadas con las de polipropileno (PP).

	<i>PHB</i>	<i>PP</i>
Punto de fusión cristalino (°C)	175	176
Cristalinidad (%)	80	70
Peso molecular (Daltons)	5×10^5	2×10^5
Temperatura de transición vítrea (°C)	-4	-10
Densidad (g cm ⁻³)	1.250	0.905
Módulo de Young (GPa)	4.0	1.7
Fuerza de tensión (MPa)	40	38
Extensión al romper	6	400
Resistencia ultravioleta	buena	pobre
Resistencia solvente	pobre	buena

fue más resistente que las películas de polipropileno pero no tanto como las de PET. El PHB se puede reforzar usando fibra de vidrio; las molduras con refuerzo de fibra de vidrio fueron resistentes y más flexibles que las contrapartes de nylon similares, pero su resistencia al calor no fue adecuada bajo las especificaciones de ingeniería.

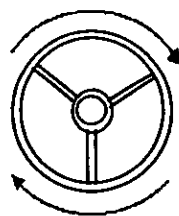
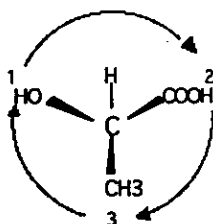
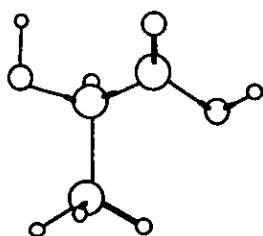
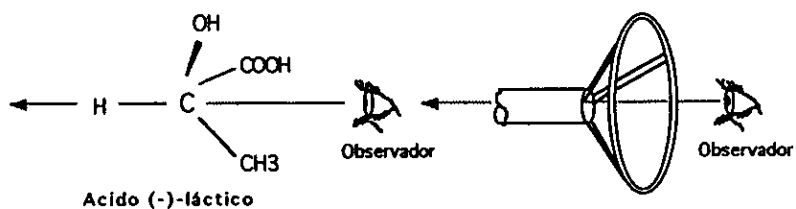
Las propiedades de los copolímeros de PHBV mejoran sustancialmente, al incrementarse la concentración de unidades de HV desde un 0-25%. Existe un decremento en el punto de fusión (tabla 2), aumentando el tamaño de la ventana de procesamiento en la cual el polímero puede ser fundido sin degradarse. La temperatura de transición vítrea también decrece, permitiendo el uso de estos materiales a bajas temperaturas sin que resquebrajen y se pongan vidriosos. El decremento en el módulo de Young - módulo de flexión- indica un mejoramiento de la flexibilidad. La resistencia al impacto también se incrementa al incrementar la concentración de HV, indicando que la flexibilidad del material aumenta.

Tabla 2. Propiedades físicas de los copolímeros P(HB-co-HV)

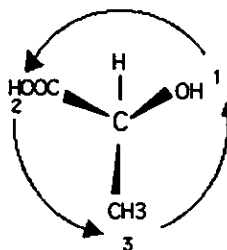
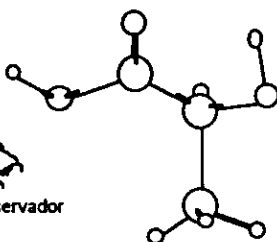
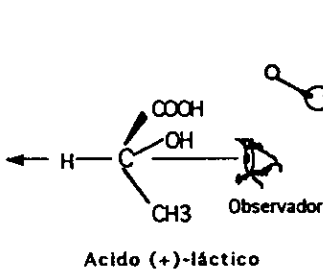
<i>P(HB-co-HV)</i> (% en mol HV)	<i>Punto de fusión</i> (°C)	<i>Transición vítrea</i> (°C)	<i>Módulo de Young</i> (GPa)	<i>Fuerza de tensión</i> (MPa)	<i>Cortes.* fuerza de impacto Izod</i> (J/m)
0	179	10	3.5	40	50
3	170	8	2.9	38	60
9	162	6	1.9	37	95
14	150	4	1.5	35	120
20	145	-1	1.2	32	200
25	137	-6	0.7	30	400

* El corte con 1 mm de diámetro

Además de su origen biosintético de los copolímeros de PHBV, se suman a estos materiales, un cierto número de propiedades interesantes, en relación a polímeros púramente sintéticos. Al haber sido hechos por bacterias, estos materiales termoplásticos también pueden ser degradados por bacterias, colocandose entre los pocos completamente biodegradables. Otro efecto de sus orígenes biosintéticos, es la actividad óptica, significando que las películas o soluciones de PHBV pueden rotar el plano de la luz polarizada que incide sobre ellos. Esto se debe a que el carbono- β en todo monómero en una cadena PHB o PHBV tiene una configuración R absoluta (Figura 5, ejm. de configuración R y S), así, el polímero es perfectamente isotáctico y puede alcanzar un alto nivel de cristalinidad. Estos cristales no tienen centro de simetría, resultando en un cambio en la dirección del momento dipolo promedio si los cristales son deformados en una dirección particular, por lo que se produce una polarización tal que se genera una carga superficial en respuesta a la deformación bajo esfuerzo cortante, estos materiales generan un voltaje cuando son comprimidos, o se deforman cuando se les aplica un voltaje. Esta propiedad es conocida como piezoelectricidad, y es típica de muchos sistemas biológicos, pero no usualmente de plásticos.



Configuración *R*
(rotación a la derecha del volante)



Configuración *S*
(rotación a la izquierda del volante)

Figura 5. Asignación de la configuración al ácido (*R*)-(-)-láctico y al ácido (*S*)-(+)-láctico.

3.5.1 Morfología

Diversos programas de investigación, se han enfocado al estudio de la estructura cristalina de PHAs. Estudios de WAXD (difracción de rayos X en ángulo amplio) sobre fibras orientadas y sobre cristal único PHB producen patrones de difracción una distancia repetida de 0.596 nm , lo que requiere que las cadenas tengan una conformación de helicoidal. Por microscopía electrónica de transmisión, se ha observado que el espesor de

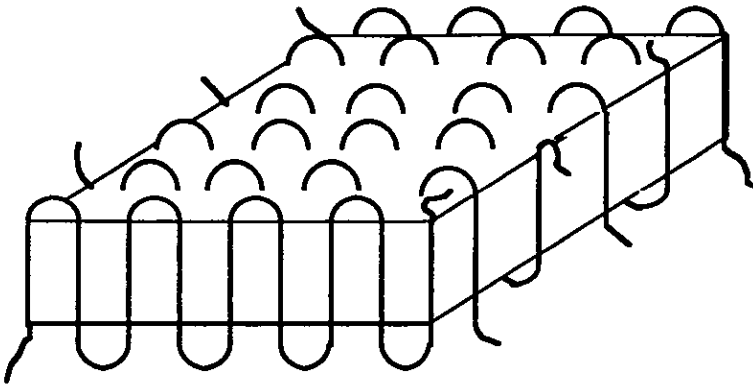


Figura 6. Esquema de cristal laminar de cadena plegada de poli(β -hidroxibutirato).

los cristales laminares en forma de listón es de 5 nm , estos cristales estan formados por cadenas plegadas, con el eje de la fibra normal a la superficie laminar (Figura 6). Este tipo de arreglo de cadena plegado se forma fácilmente cuando las cadenas de PHB se precipitadas a partir de soluciones diluidas, y es un rasgo común de la morfología cristalina de la mayoría de los polímeros sintéticos. El PHB esta propenso a asumir esta morfología laminar. El PHV forma cristales cuadrados correspondiendo a una diferente celda unitaria.

Estudios posteriores, incluyendo difracción de rayos-X de las fibras, análisis de minimización de energía, y análisis diagonal de mínimos cuadrados, permiten concluir que las moléculas cristalinas de PHB estan empaçadas en una celda unitaria ortorrómbica en forma de helicoidal, con su eje de rotación a lo largo de la dirección de propagación de la cadena. Aunque los primeros estudios proponen hélices con giro, los últimos concluyen que las hélices tienen giros a la izquierda. Los primeros parámetros de la celda unitaria reportados son aún validos, con $a = 0.576$ nm, $b = 1.320$ nm y $c = 0.596$ nm. Dos cadenas de polaridad opuesta pasan por la celda unitaria de acuerdo con el grupo espacial $P2_12_12_1$ (Figura 7).

Los oligómeros de PHB adoptan la misma conformación helicoidal y los mismos parámetros de red cristalina que el PHB de alto peso molecular,

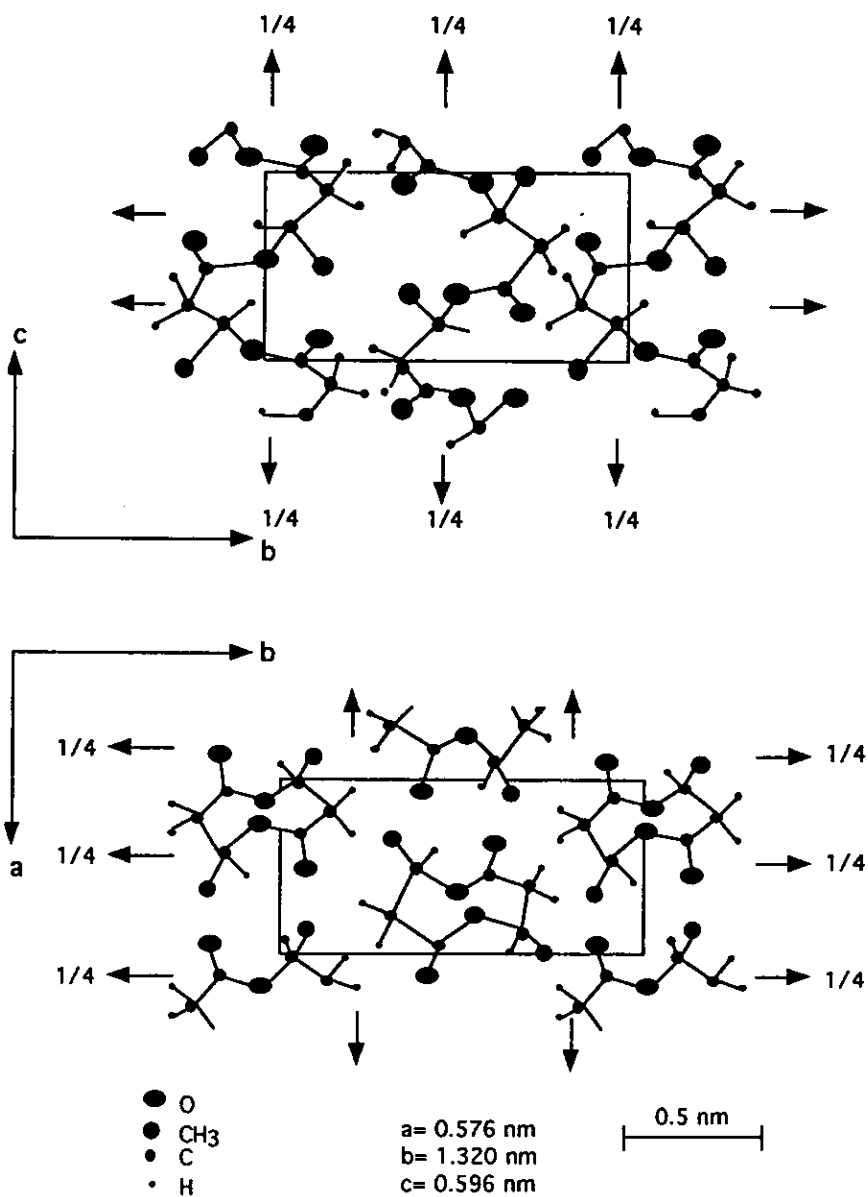


Figura 7. Proyecciones sobre las caras ab y bc de la celda unitaria de poli(β -hidroxibutirato).

aunque la temperatura de fusión disminuye al disminuir el grado de polimerización.

Cuando los copolímeros de PHBV cristalizan, se observa un fenómeno interesante. La espectroscopía NMR C13 de estos copolímeros muestra una distribución Bernoulliana de comonómeros de todas las composiciones. Normalmente esto podría impedir la cristalización del polímero; sin embargo, después del templado, todos los copolímeros de PHV son casi igualmente cristalinos. Esto es posible debido a un fenómeno conocido como isomorfismo, por medio del cual dos componentes del comonómero cristalizan en la misma red, como el del homopolímero de PHB. En el caso de PHBV, se tienen dos tipos de redes: cuando se incrementa el contenido de HV, la red cambia de repente al del PHV. Este fenómeno es conocido como isodimorfismo. Este comportamiento no ha sido visto en todos los copolímeros; para exhibir este comportamiento, los dos comonómeros deben tener formas y volúmenes similares, y las conformaciones de cadena de ambos homopolímeros deben ser compatibles en cualquiera de las redes.

Como resultado del comportamiento isodimórfico de PHBV, el punto de fusión y la entalpía de fusión de los copolímeros decrece con el incremento de contenido de HV, pasa a través de un mínimo a ~ 40% de HV, entonces

aumenta el valor para homopolímero PHV. Estos efectos fueron demostrados cuando los valores obtenidos de PHBV sintético se incluyeron, para tener resultados a todas las concentraciones de HV (Figura 8); posteriormente esto se obtuvo utilizando materiales biosintéticos. Estos resultados son expresados como una depresión del punto de fusión del PHB y de la entalpía de fusión causada por inclusión de unidades de HV dentro de la red del PHB. Inevitablemente, el reemplazo de un grupo CH_3 por C_2H_5 da lugar a la deformación de la red; cuando se transforma el entrelazado a el de homopolímero de PHV, la inclusión de unidades HB en la red del homopolímero de PHV, no tiene un efecto similar. Correspondientemente, hay un incremento lineal en los parámetros de la red al incrementarse el contenido de HV hasta un 40%.

El fenómeno de isodimorfismo ha dado a los copolímeros con composiciones del 0-25% HV -los cuales son de interés comercialmente- con mayor importancia que la que cabría esperar. Normalmente, al cristalizar con exclusión de la unidad agregada, 10-20% de una unidad repetida diferente, causa una marcada caída en el grado de cristalinidad.

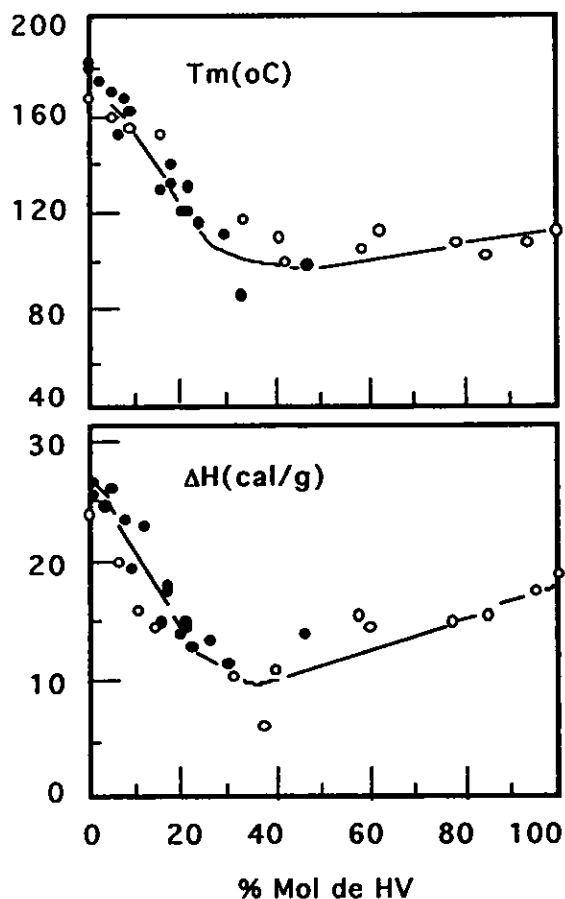


Figura 8. Variación del punto de fusión (T_m) y la entalpía de fusión (ΔH_f) con la composición bacteriana (círculos rellenos) y el poli(β -hidroxibutirato) sintético fraccionado (círculos vacíos).

Redibujado y adaptado, con permiso de Bloembergen *et al.* [9]. Copyright 1989 American Chemical Society.

En este caso, la unidad agregada es incluida en la red, proveyendo una familia de polímeros con puntos de fusión que van desde 180 hasta 100 °C, los cuales mantienen un grado de cristalinización por encima del 50%. La deformación de la red, debido a la cocrystalización de una unidad repetida ligeramente mayor que la del HB, es también responsable de su mejor tenacidad.

Desde una perspectiva de la tecnología de los plásticos, el control de la velocidad de cristalinización y degradación térmica son muy importantes. Porque el PHB y PHBV cristalizan lentamente (con respecto al polietileno) , se utilizan aditivos de nucleación para promover la formación rápida de cristales en la muestra. Estudios fundamentales sobre cinética de cristalinización, han proporcionado datos referentes a los cuales PHB tiene una velocidad de nucleación mucho menor que la de polietileno.

3.5.2 Morfología inicial

Otra área de la investigación de PHA es la de morfología inicial, para determinar que tan fuertemente se asemejan los poliésteres recién biosintetizados, a los modelos propuestos. Como el proceso comercial para la obtención de PHBV es la separación de gránulos dentro de una suspensión

acuosa, entender el estado inicial y su evolución en función de las diferentes etapas del proceso es importante económicamente. Por ejemplo, el PHBV se puede separar sin secar, como una suspensión concentrada de gránulos o como un látex; se requiere entender las propiedades de este látex para optimizar el procesado posteriormente.

Se han encontrado evidencias de la presencia de una membrana de 2.5-4 nm de espesor, en los alrededores de los cuerpos de inclusión de PHB, los cuales se han reportado para las especies bacterianas como: *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus cereus*, *ferrobacillus ferroxidans*, *Azotobacter chroococcum* Beij, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas oleovorans* y en el alga azul-verde *Chlorogloea fritschii*. Las actividad de la sintasa y depolimerasa parecen estar relacionadas con esta membrana, como lo muestran varios estudios sobre la modificación de la morfología inicial de los gránulos purificados. Por ejemplo, tratamientos físicos y químicos de los gránulos, tales como hipoclorito de sodio, acetona, tripsina, y congelación y descongelación, dañan la membrana y causan transformación morfológica irreversible de la superficie granular. Son necesarias más investigaciones para evaluar la naturaleza de esta membrana y su papel en la actividad enzimática de los cuerpos de inclusión de PHB naturales.

La colocación superficial de las enzimas de la sintasa, implican un crecimiento aposicional de las cadenas de PHA en el desarrollo de la morfología inicial de las inclusiones. Basado en modelos de morfología de cadena extendida de polímeros sintéticos, la ausencia de entrelazamientos es una característica importante de la morfología inicial de la inclusión. Un intento, en parte exitoso, para explotar esta característica fué crear fibras de cadena extendida de PHA. Otra importante propiedad funcional es la movilidad segmental, la cual permite la interacción enzimática dentro de la inclusión y la superficie exterior. Dada la naturaleza cíclica de la acumulación de PHA, la acción de la depolimerasa esta probablemente en yuxtaposición con sintasa sobre la superficie de inclusión.

La morfología de las inclusiones de PHA, se propuso originalmente podrían ser cristalinas, semejante a las de separación de gránulos secos. Sin embargo, un estudio reciente de alta resolución de C13 NMR demostró que hasta un mínimo de 70% de las moléculas eran móviles; por lo que las inclusiones de PHA deben ser principalmente no cristalinas. Un estudio de microscopía de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) de gránulos de PHB congelados y deformados, obtenidos en suspensión de un cultivo de *A. eutrophus*, reveló que los gránulos estan compuestos de una coraza cristalina encerrando un núcleo de material no-cristalino.

La coraza esta formada por cristales laminares traslapados, mientras el núcleo sufrió una deformación flexible a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C). Estos núcleos de moléculas rápidamente se rearreglan en cristales laminares aislados cuando se deforman a 150-190 °C, sugiriendo que estan en un estado metaestable en el material naciente.

Por otra parte, se ha propuesto que moléculas de agua forman una pseudorred con las moléculas de PHB in vivo (figura 9); debido a la separación, el cambio del medio da lugar a una cristalización topotáctica a partir de la superficie granular, produciendo la coraza sólido alrededor del núcleo de morfología no-cristalino. Los cristales laminares en la superficie no fomentan la cristalización en el núcleo, a menos que el gránulo sea calentado por el agua al difundirse hacia afuera. Una hipótesis alternitava para la falta de cristalinidad en el núcleo, se basa en un argumento puramente cinético, es que la nucleación homogénea es altamente improbable en el PHB.

La falta de cristalinidad en inicial en los gránulos modifica la solubilidad, por lo cual los gránulos se hinchan en mezclas de acetona/agua o metanol/cloroformo y precipitan como cristales laminares al secarse. Esta morfología inusual esta de acuerdo con el modelo de un gránulo mostrado en

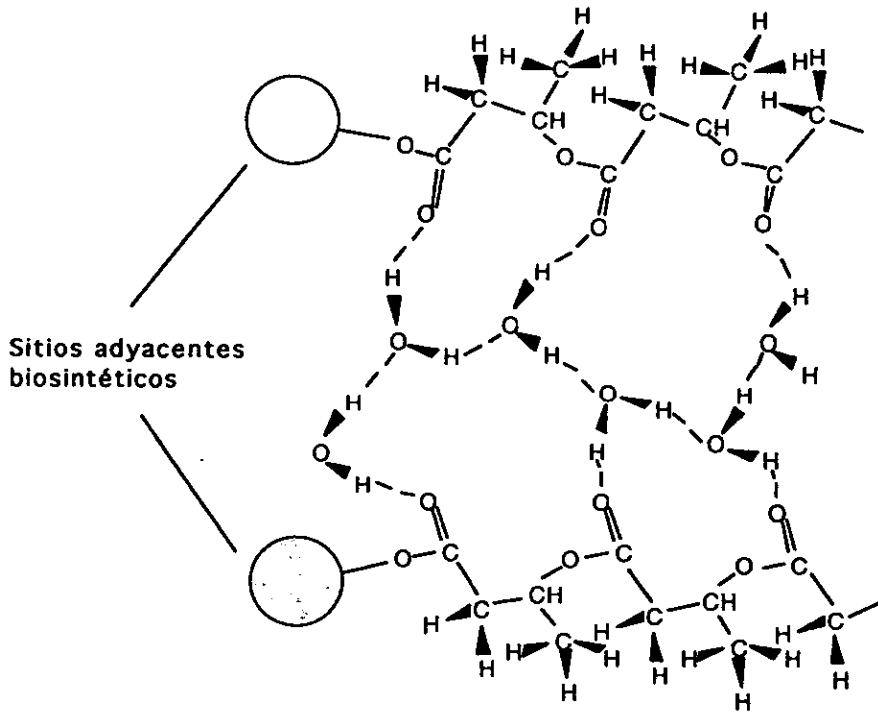


Figura 9. Modelo representativo de hidrógenos enlazados de moléculas de agua a dos cadenas de poli(β -hidroxibutirato) desde dos sitios adyacentes en una primera etapa de la biosíntesis.

la figura 10. Si los gránulos son liofilizados o secados con espreado, se provoca la cristalinidad. La liofilización físicamente fuerza la morfología, mientras que el secado con espreado es el equivalente a un tratamiento de calor. El efecto de varios tratamientos destructivos (ultrasonido, choque de

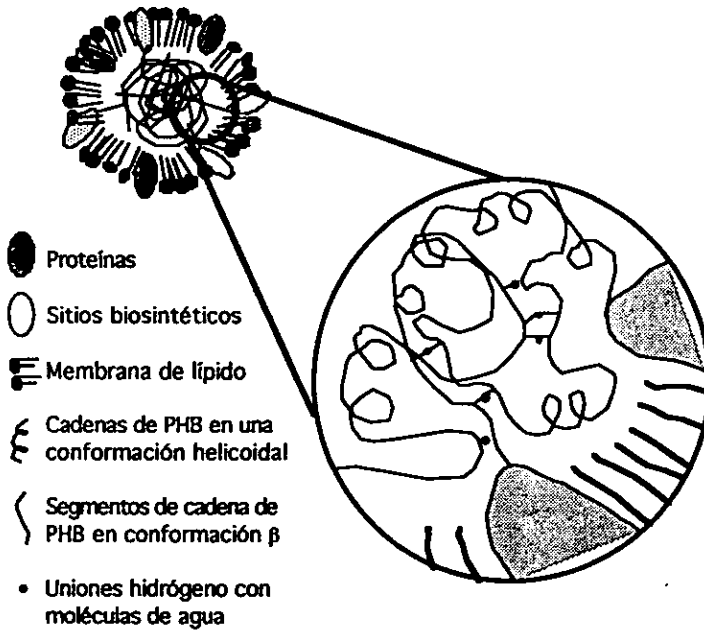


Figura 10. Modelo representativo de la localización de los sitios biosintéticos y otras proteínas en las cercanías de la membrana del cuerpo de inclusión. El acercamiento muestra los diferentes arreglos conformacionales que las cadenas de polímero pueden adoptar.

calor, etc) y varios procesos de secado (secado con esparcido, congelar secando, etc) sobre la morfología granular no se ha entendido aún todavía.

3.6 Degradación

La razón principal por el interés general en los PHAs, es su biodegradabilidad.

Ya que habiendo sido hechos por bacterias, pueden ser completamente degradados a dióxido de carbono y agua por la acción bacterial continua.

Los procesos de biodegradación se dividen en dos categorías: a) intracelular y b) extracelular.

También son de interés para los procesadores y usuarios de artículos hechos de PHAs los procesos de degradación no-biológicos, así como su estabilidad térmica e hidrolítica. Se han reportado numerosos estudios de la biodegradación de materiales PHBV bajo diferentes condiciones ambientales.

3.6.1 Biodegradación intracelular

Estudios sobre degradación se han realizado sobre *Bacillus megaterium* con extractos de *Rhodospirillum rubrum*, y sobre *Alcaligenes eutrophus*, *Zoogloea ramigera* y *Azotobacter beijerinckii*. Generalmente, estos procesos son más desconocidos que la biosíntesis, pero la trayectoria más conocida para la degradación intracelular es el que se ha representado en la figura 11, el cual se combina con el camino biosintético mostrado en la figura 3, para formar el ciclo completo del metabolismo del PHB. El PHB es depolimerizado por una enzima PHB-depolimerasa, frecuentemente en conjunción con un dímero hidrolasa, para dar ácido R- β -hidroxibutírico. Este ácido es oxidado por una

enzima dehidrogenasa para dar acetilacetato, el cual es esterificado a acetoacetyl-CoA por una enzima acetoacetyl-CoA-sintetasa. Este es degradado por acetyl-CoA por una reacción retro-Claisen catalizada por una enzima β -cetotilasa; esta enzima es la única usada tanto en biosíntesis como en la biodegradación, y se puede involucrar en la regulación de los dos caminos. En la presencia de oxígeno, el acetyl-CoA puede entonces entrar al ciclo del ácido tricarbóxico (también conocido como el ciclo del ácido cítrico) para ser completamente oxidado a dióxido de carbono, con la correspondiente liberación de energía.

Sin embargo, se requieren más investigaciones para determinar los detalles finos de este proceso. Por ejemplo, *A. eutrophus* es el único microorganismo en el cual el ácido R- β -hidroxibutírico es el producto directo de la depolimerización por la depolimerasa; en otros microorganismos, la depolimerasa degrada el PHB a dímeros, los cuales son subsecuentemente unidos por un dímero hidrolasa. Enzimas depolimerasa han sido aisladas desde *A. eutrophus*, *B. megaterium* y *R. rubrum*, pero su modo de acción no es bien conocido; la degradación de gránulos naturales de PHB, separados desde *B. megaterium*, al exponerse a extractos de *R. rubrum* requieren de tres componentes: una esterasa, un activador termoestable y una depolimerasa termolabil.

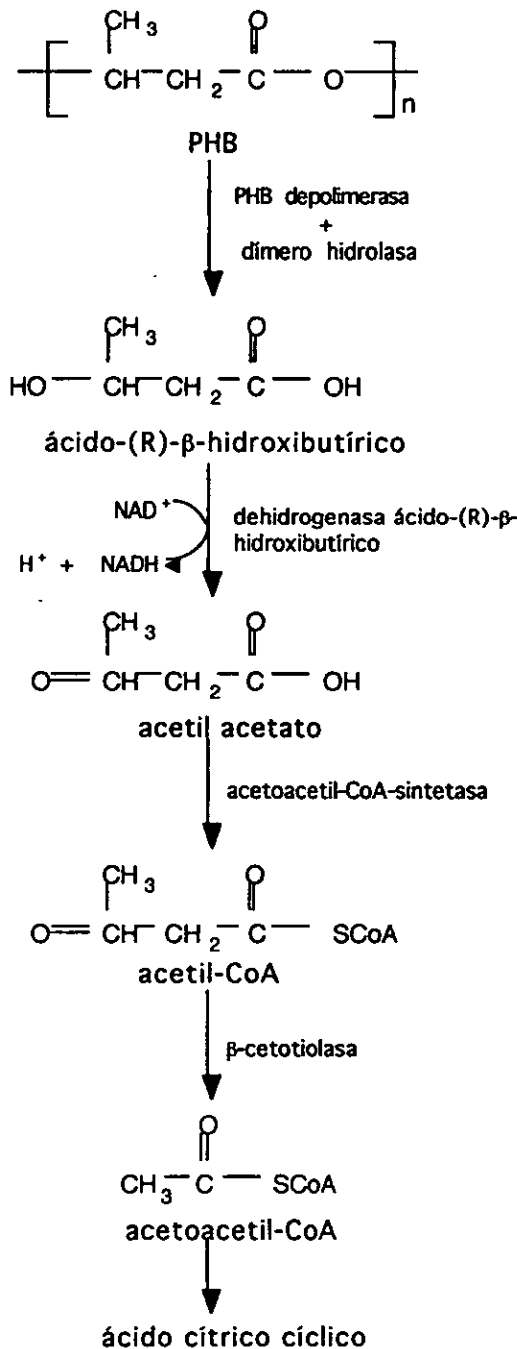


Figura 11. Biodegradación intracelular del poli(β-hidroxibutirato).

Se tienen más conocimientos acerca de la dímero-hidrolasa. Esta enzima ha sido separada a partir de *Zoogloea ramigera* y *R. rubrum*, y puede hidrolizar no solo el dímero (R,R), sino también, más lentamente, dímeros (R,S) y (S,R) (el último por *Z. ramigera* solamente). El dímero (S,S) no es atacado por cualquiera de las dos enzimas. Oligómeros (trímeros, tetrámeros y pentámeros) son atacados más rápidamente que el dímero; por ejemplo, el dímero hidrolasa de *R. rubrum* hidroliza trímeros cuatro veces más rápido que dímeros. El dímero intracelular hidrolasa aislado de *Pseudomonas lemoignei* muestra ser altamente específico para la configuración R de β -hidroxibutirato.

La naturaleza cíclica de la biosíntesis y biodegradación ha sido demostrada por *A. eutrophus*. Siempre que un exceso de una fuente de carbono este presente en el medio de cultivo bacteriológico, una limitación en nitrógeno trae un desbalance de desarrollo el cual causa la acumulación de inclusiones de PHB en las células. Aunque la acumulación de PHB es predominante bajo tales condiciones, la degradación continúa, dando una continua desaparición de PHB dentro de los cuerpos de inclusión. Un estudio separado mostró que PHB de alto peso molecular se produjo en la primera etapa de acumulación (arriba de las 10 horas), entonces el peso molecular

decrece lentamente durante el periodo restante de acumulación. Estos resultados soportan la naturaleza cíclica de acumulación de PHB, así mismo implicando la alta movilidad de los segmentos de PHA dentro de las inclusiones.

3.6.2 Biodegradación extracelular

Por liberación de enzimas de depolimerasa en el medio, algunas bacterias, semejantes a *P. lemoignei* o *Alcaligenes faecalis*, pueden crecer sobre PHA extracelular. La depolimerasa degrada al polímero en oligómeros, principalmente dímeros. Un dímero hidrolasa es producido intracelularmente o es liberado ó excretado -extracelularmente- junto con la enzima de depolimerasa la cual degrada subsecuentemente estos oligómeros a unidades monoméricas. La depolimerasa aislada a partir de *Comamonas sp.* parece tener un mecanismo diferente de hidrólisis de PHB, ya que el producto directo de la hidrólisis de PHB por la enzima purificada es β -hidroxibutirato.

La depolimerasa producida por *P. lemoignei* muestra ser una exoenzima, excretada en pequeñas cantidades durante la fase de crecimiento pero principalmente al cesar este. La presencia del producto de hidrólisis, ácido β -hidroxibutírico, también suprime la excreción de enzima. La depolimerasa ha

sido purificada en cuatro enzimas separadas, cada una de las cuales fue capaz de hidrolizar PHB y sus oligómeros, pero fue incapaz de degradar al éster dimérico. El análisis de los productos de hidrólisis permite llegar a la conclusión de que la depolimerasa tiene más afinidad con la terminal hidroxilo que con el carboxilo de los oligómeros, y que el desdoblamiento de los grupos éster ocurre siempre en el segundo y tercer enlace a partir del grupo terminal hidroxilo.

Una enzima de depolimerasa aislada y purificada desde *A. faecalis* mostró estricta especificidad hacia polímeros PHB que han sido químicamente purificados pero no con los gránulos naturales. El análisis de los productos de hidrólisis de el R- β -hidroxibutirato designado a el hidroxilo terminal mostró que las enzimas se unen sólo al segundo enlace del éster desde el hidroxilo terminal del trímero y tetrámero y actúan como una enzima endotipo hacia el pentámero y oligómeros mayores. Su afinidad hacia los PHB, en substratos anfifílicos, se considera debido a la presencia de un sitio hidrofóbico en la enzima que interactúa con el polímero.

La enzima depolimerasa T1, purificada desde *A. faecalis* fue usada en tres estudios separados para monitorear la degradación de una solución de películas obtenidas por colado de PHB y de PHBV. Estos estudios mostraron

que la degradación superficial de las películas era aparente sin una pérdida significativa de peso y que la actividad hidrolizadora era mayor para el PHB que para el PHBV. Esto sugiere que la depolimerasa del *A. faecalis* primero hidroliza las cadenas en las regiones no-cristalinas, y luego procede a depolimerizar las cadenas en las regiones cristalinas.

3.6.3 Degradación térmica

Se requiere entender la degradación térmica de PHAs para diseñar el procesado para minimizar los daños estructurales. El mecanismo de degradación térmica de PHAs es bien entendido en términos de el rearreglo Mclafferty; en efecto, el PHBV es susceptible a rompimientos térmicos, produciendo mediante pirólisis ácido crotonico en aproximadamente un 90%. Para controlar este aspecto de degradación durante el procesado son necesarios aditivos adecuados; sin embargo, es necesario tomar precauciones si los productos de PHBV van a ser expuestos por periodos prolongados al calor. Los primeros estudios sobre degradación térmica de PHB fueron reportados por Morikawa, Marchessault y también por Hauttecoeur. Estos dos estudios recalcan degradación controlada para obtener oligómeros con dobles enlaces terminales en lugar de la hidrólisis.

Un estudio detallado de degradación térmica de PHB identificó los productos volátiles de la degradación. Cuando se calentó desde 0 a 338 °C bajo vacío, el PHB libera ácido isocrotónico (0.9% en peso), ácido crotónico (35.2% en peso) y el dímero (41.2% en peso), trímero (12.5% en peso) y tetramero (2.9% en peso) de PHB. Cuando el calentamiento se continúa hasta 500 °C, se observan trazas (4% en peso) de los productos de degradación de estos volátiles: dióxido de carbono, propeno, ceteno, acetaldehído y β -butirolactona. Mediciones de la pérdida de peso molecular de PHB durante la degradación isotérmica 170-200 °C mostraron que la degradación térmica ocurre a través de un proceso de rompimiento al azar involucrando la descomposición de un anillo de éster de seis miembros similar a la reacción Chugaev. Esta reacción da un incremento en el peso molecular en las etapas tempranas del proceso de degradación.

3.6.4 Degradación hidrolítica

Como la bacteria y hongo que utiliza PHB no están presentes en el cuerpo humano, la degradación in vivo debe proceder por otras rutas, tales como hidrólisis. Esta puede ser catalizada por enzimas, por sistemas de cuerpo inmunes. La degradación hidrolítica de PHB y PHBV ha sido estudiada tanto

"in vivo" como "in vitro". Estudios in vitro, de la velocidad de degradación de una solución y películas de PHBV obtenidas por colado y por fundido en un medio amortiguador de fosfato mostraron un aumento en la rapidez de degradación al incrementarse el contenido de HV, o al aumentar la temperatura. El proceso de fusión previo afectó significativamente la rapidez de degradación hidrolítica. Aunque el peso de muestra y la resistencia a la tensión permanezcan constantes por varios meses, la modificación superficial y el incremento en porosidad de la matriz ocurrida durante este tiempo permite después degradación acelerada. Estudios de degradación in vivo de monofilamentos de PHB mostraron que el material debe ser predegradado con 10 Mrad γ -irradiación. El incremento del contenido de HV en los copolímeros de PHBV no incrementa la rapidez de degradación in vivo, y aún retarda la rapidez de hidrólisis a altas temperaturas.

Estudios de la degradación heterogénea de películas de PHB y PHBV -68% en mol de HV- en un medio amortiguador confirmaron que el rompimiento de cadenas al azar se lleva a cabo tanto en los dominios cristalinos como en los no-cristalinos. Se ha sugerido un proceso hidrolítico de dos etapas: rompimiento al azar de las cadenas que da lugar a una disminución en el peso molecular, causando pérdida de peso de las películas por debajo de un peso

molecular de 13 000. Un aparente incremento en la cristalinidad con tiempo de hidrólisis se explicó debido a la cristalización de fragmentos de cadena en regiones amorfas hidrolizadas; una explicación alternativa es que hidrólisis preferente de cadenas en las regiones amorfas deja una mayor cantidad de cadenas en las zonas cristalinas. Un estudio de degradación hidrolítica posterior sobre fibras de PHBV (14% en mol de HV) mostró que la resistencia a la tensión de las fibras solo comenzaba a decrecer cuando el peso molecular era inferior a 70 000, alcanzando un valor de cero cuando el peso molecular era alrededor de 17 000; el peso de la fibra disminuía sólo cuando el peso molecular era inferior a 17 000.

Estudios recientes sobre la hidrólisis de PHB en una solución 0.1N de ácido clorhídrico a 104.5 °C han mostrado que el ácido ataca a las uniones éster tanto de la coraza cristalina como del núcleo amorfo. Durante las primeras seis horas, la pérdida de peso fue moderada y la cristalinidad aumenta regularmente; después de este tiempo, la rapidez de pérdida de peso es casi constante duplicando y disminuye la cristalinidad. Fué notable en este estudio, la retención de la textura del gránulo después de un desdoblamiento extenso de cadena, y la alta cristalinidad después de la hidrólisis del residuo.

3.6.5 Degradación ambiental

La gran relevancia para los usuarios de artículos de PHB o PHBV, es la rapidez de degradación de estos artículos bajo diferentes condiciones ambientales. La biodegradación normalmente procede vía ataque superficial por bacterias, hongos y algas. Estos organismos pueden excretar enzimas extracelulares que solubilizan la superficie de PHB sobre la cual se desarrollan. Los productos solubles de degradación son entonces absorbidos a través de la pared celular y metabolizados. El porque de la importancia del ataque superficial, la rapidez de biodegradación depende en parte sobre la facilidad de colonización superficial. El área superficial y espesor son importantes, ya que según sea la textura superficial en ciertos casos las colonias bacterianas pueden ser lavadas fácilmente de superficies uniformes.

La degradación real a veces depende del medio involucrado, así como del espesor del artículo. Estos factores controlan la demanda biológica de oxígeno y el suministro de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano, tales como nitrógeno y fósforo. Estudios realizados en diferentes ambientes muestran que la velocidad de degradación de PHB decrece progresivamente en medios anaeróbicos tales como aguas fecales, suelos muy húmedos, sedimentos de agua de mar, etc. Tanto en pruebas in vivo

como in vitro se observaron velocidades de degradación lentas (>70 días).

Un ejemplo de las velocidades de biodegradación se muestra en la figura 12 para una película de PHBV enterrada en suelo húmedo (C14-marcado); aproximadamente el 50% de carbono contenido fue perdido a CO₂ en el espacio de 16 semanas. Una moldura de resina de espesor de 1 mm probada como pastilla se reportó destruida completamente en un espacio de seis semanas en aguas fecales aeróbicas; este tiempo se incrementó a 60-70 semanas en aguas fecales y suelo a 25 °C, y a 350 semanas en agua de mar a 15 °C. Películas para empaque de 50 µm de espesor son totalmente degradadas en 1-2 semanas en aguas fecales anaeróbicas, 7 semanas en aguas fecales aeróbicas, 10 semanas en suelo a 25 °C y 15 semanas en agua de mar a 15 °C. Una botella de champú moldeada hecha de PHBV se degrada casi completamente después de 15 semanas en una pila de compost. En rellenos sanitarios se tiene una degradación significativa en 40 semanas.

Dado que el PHBV se degrada bajo tal gran variedad de condiciones, la pregunta pertinente es ¿Cuál será su vida de anaquel?. Afortunadamente, la velocidad de degradación de PHB en aire húmedo es insignificante, teniendo una duración aceptable en un anaquel. Lo más serio es la falta de

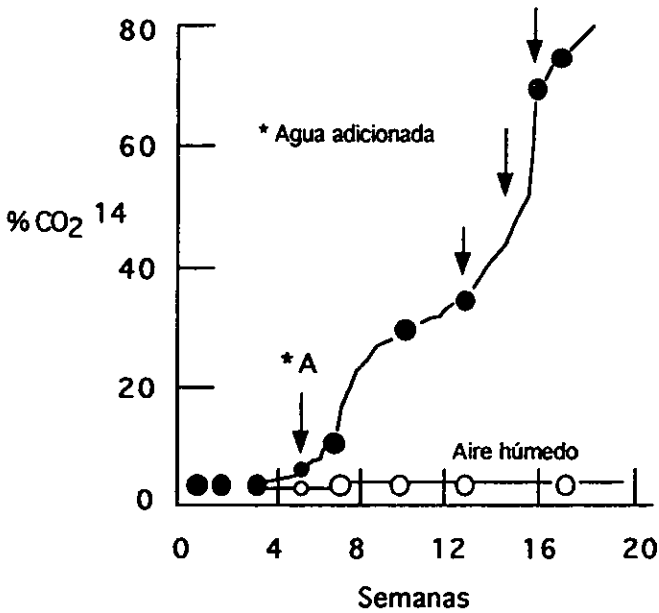


Figura 12. Biodegradación de C₁₄-marcado de poli(β-hidroxibutirato-co-β-hidroxivalerato) en suelo húmedo.

procedimientos de pruebas estandarizadas para la evaluación de biodegradación lo que hace difícil poder comparar resultados de diferentes

investigadores que trabajan en condiciones diferentes sobre distintos tipos de muestras. Esta limitación puede ser resuelta, utilizando el PHBV como uno de los materiales patrones de referencia para así poder correlacionar pruebas a escala laboratorio. De este modo, otros materiales degradables tipo poliéster, pueden ser calibrados al compararlos con muestras de referencia de PHBV. Resultados preliminares indican que entre todos los termoplásticos biodegradables, solamente poli(ϵ -caprolactona) degrada a la misma velocidad que PHBV.

3.6.6 Efectos en reciclado

Como el interés general en PHB se basa generalmente sobre su biodegradabilidad, el considerar reciclado a gran escala de este polímero es ignorar una de sus propiedades más importantes. Sin embargo, es útil considerar los efectos potenciales de PHB como un contaminante en el reciclado corriente de polímeros sintéticos convencionales, tales como las poliolefinas. Los tratamientos térmicos casi sin duda acusan efectos térmicos y mecánicos sobre el polímero, con pérdida significativa del peso molecular del PHB. Esto puede producir ácido crotónico libre a partir el hidroxibutirato y dobles enlaces al final de las cadenas de PHB. Así como un posible

entrecruzamiento debido al carácter vinílico de este sistema. Si la cantidad de PHB no es grande, entonces no tendrá un efecto significativo sobre la mezcla reciclada. Para grandes cantidades de PHB, las metodologías convencionales de reciclado para polímeros sintéticos convencionales probablemente no sean aplicables, en este caso, un composteo o manejo de un sistema de relleno sanitario sería más apropiado.

3.7 Aplicaciones

Se han contemplado una gran variedad de aplicaciones para el PHB y el PHBV, gracias al amplio intervalo de propiedades especializadas de estos materiales. Aunque el interés primario en estos materiales fué debido a su biosíntesis a partir de recursos renovables y por lo tanto independiente de la petroquímica, sin embargo, el interés más general esta relacionado a su biodegradabilidad. Esto permite la reducción de desperdicios, así como la creación de materiales con un mayor valor agregado ya que la degradación es la característica funcional de el producto. La quiralidad del polímero permite también usarlo en aplicaciones más comunes, tales como bloques quirales en síntesis orgánicas.

Una de las aplicaciones más simples para PHBV es como un sustituto biodegradable para recipientes de poliolefinas, películas de plástico y bolsas. El primer uso comercial de PHBV fué desarrollado por Wella AG, Darmstadt (Alemania) los cuales han desarrollado una botella, moldeada por inyección por soplado, para empacar un champú de cabello biodegradable. El PHBV también ha sido usado para recipientes de aceite de motor y mangos desechables para navajas de afeitar. Tales aplicaciones de PHBV son particularmente una ventaja en artículos difíciles de separar por reciclado, tales como películas de cocina, servilletas y toallas sanitarias.

Las propiedades de PHBV, como barrera para gases permiten aplicaciones en empackado de alimentos, o como un reemplazo para poli(tereftalato de etileno) para botellas de plástico en bebidas. Esta propiedad de barrera también la tienen los copolímeros de PHBV, por lo que se puede utilizar en recubrimiento de papel ó cartón, tales como envases para leche tipo "tetrapack". El revestimiento de polietileno usado generalmente para estos propósitos es no-biodegradable, previendo además la degradación del cartón y el reciclado rutinario de los componentes fibrosos; el material recubierto con PHBV muestra ser completamente biodegradable y también más fácil de reciclar que el "tetrapack" de papel convencional.

Una técnica poco usual de electrodeposición de polvos, ha sido utilizada para para depositar PHB sobre sustratos de baja constante dieléctrica como el papel. El polvo adherido electrostáticamente se funde posteriormente y es calandreado para producir una película con propiedades de barrera contra gases, de alta transparencia. La adhesión de ésta capa es muy superior a la película laminada en fundido. La deposición del polvo y la biodegradación son objeto de una patente reciente para el uso de PHBV como toner en xerigrafía, las dificultades para el desprendimiento de tintas plásticas en papel se facilita por métodos químicos y enzimáticos, durante las operaciones de reciclado de papel.

Aplicaciones más especializadas del PHBV incluyen liberación controlada, donde se requiere la biodegradación mientras el artículo esta en uso. Como el *Alcaligenes eutrophus*, organismo usado para la producción comercial de PHBV, fué el primero en ser aislado desde el suelo, el PHBV, es naturalmente adecuado para aplicaciones en la agricultura donde se requiere su biodegradación en el suelo. Por ejemplo, insecticidas incorporados dentro de gránulos de PHBV y esparcido con la segadora serían liberados a una velocidad variable relacionada con el nivel de actividad de la plaga, como las bacterias degradan el polímero, este será afectado por los mismos factores

ambientales que las plagas del suelo. Similarmente, como el PHBV se degrada bien en el estómago del ganado, este puede ser usado como una matriz biodegradable para liberación de fármacos en medicina veterinaria.

El PHBV también puede ser usado internamente en humanos, como el polímero mismo es no-tóxico y compatible con el tejido vivo, y el único producto de degradación es el ácido R- β -hidroxibutírico, el cual es un metabolito normal en mamíferos, encontrado en concentraciones de 3-10 mg/100 ml de sangre en humanos adultos saludables. También se ha detectado PHB de bajo peso molecular, unido principalmente a albúmina pero también a lipoproteínas de baja densidad, en el suero sanguíneo humano. Estudios de pacientes obesos sufriendo hambre terapéutica han mostrado que β -hidroxibutirato de sodio puede ser usado como una fuente de carbono vía intravenosa u oral; mejorando la conservación de proteínas en el cuerpo, sin reducir la rapidez de pérdida de peso. Un derivado acilo del polímero se ha patentado para utilizarlo como emulsificante de alimentos ó auxiliar en la elaboración de mantequilla.

Para aplicaciones de liberación controlada de fármacos en medicina, el PHBV se puede utilizar no como una pastilla, sino como microcápsulas, las cuales se inyectan subcutáneamente como una suspensión ó como un

comprimido que se administra oralmente. Como un material médico, un rasgo más del PHBV es que es muy biocompatible, produciendo una respuesta extremadamente ligera del organismo, y que la rapidez de biodegradación in vivo es lenta. Por ejemplo, un monofilamento de sutura quirúrgica requeriría varios años para ser totalmente reabsorbido por el cuerpo; como el tiempo tomado por la biodegradación es relacionado al área superficial, suturas de multifilamentos o microcápsulas se absorben mucho más rápido.

Aplicaciones típicas de PHBV en hospitales podrían ser como limpiadores quirúrgicos, polvos para heridas y polvos lubricantes para guantes de cirujano. Se ha propuesto también una membrana compatible a la sangre. ICI ha desarrollado un proceso de hilado centrífugo para hacer productos de algodón semejantes a la lana y gasas a partir de una solución concentrada de PHBV; tratadas después con surfactantes biocompatibles, las fibras intrínsecamente hidrofóbicas, las cuales son muy semejantes a la lana-algodón absorbente. Como quiera, a diferencia de las fibras de algodón, las partículas de fibras de PHBV de las gasas o de algodón pueden ser dejadas sin afectar la herida, ya que son biodegradables.

Un uso de alta tecnología futurística de PHBV podría ser como injertos vasculares o vasos sanguíneos, compuesta de fibras muy finas arregladas

para formar un tubo impermeable al agua de diámetro interno adecuado, actuaría como un entablillado para nuevos tejidos en desarrollo, siendo completamente reemplazado por tejido natural. Esto evitaría el problema de formación de trombos y bloqueo eventual en arterias sintéticas, lo cual se debe a la respuesta del organismo de cuerpos extraños no-degradables en las paredes vasculares. Se han desarrollado ya implantes quirúrgicos de PHB y PHBV para conexión de partes del cuerpo tubulares, así como hojas o resortes de PHBV para separar tejidos en las heridas.

Otras aplicaciones de PHBV pueden ser posibles debido a su respuesta piezoeléctrica. Como el tamaño de este efecto es un orden de magnitud menor que el de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF); es difícil que pueda reemplazarlo en equipos electrónicos de alta fidelidad; sin embargo, el PHBV puede ser útil donde se requiere una respuesta independiente a la temperatura. Por ejemplo, el PHBV puede ser adecuado como un sensor de presión en un aparato de sellado por calor, donde el PVDF podría no ser adecuado ya que su respuesta piroeléctrica podría interferir con el efecto del esfuerzo de deformación piezoeléctrico.

Además, siendo las propiedades piezoeléctricas del PHBV similares a las de los huesos y ya que se sabe que estos pueden ser reforzados y reparados

por estimulación eléctrica; por lo tanto, el tratamiento de una fractura mediante la fijación con una placa, hecha de un compuesto reforzado de PHB con propiedades mecánicas semejantes, podría estimular el crecimiento del hueso y su curación. Una ventaja adicional de tales placas es que estas son biodegradables, y pueden ser dejadas donde serán reabsorbidas lentamente por el cuerpo, en lugar de requerir una segunda operación para removerlas.

Otras aplicaciones de PHB pueden surgir de su actividad óptica y potencial sintético. La cromatografía es potencialmente una de tales aplicaciones, ya que una fase quiral estacionaria se puede usar en cromatografía para separar isómeros ópticos. El PHB puede también ser hidrolizado para proveer monómeros ópticamente puros para utilizarlos como bloques constructores en síntesis orgánicas quirales; en este caso se han reportado compuestos que incluyen los fungicidas norpirenoforin, pirenoforin y vermiculina, el componente macrocíclico del antibiótico elaiofilin, el enantiómero del producto natural grahamimicin A1 y feromonas del pequeño escarabajo europeo de la corteza de olmo y el gusano de raíz del maíz del oeste. La biosíntesis de PHBV también forma las bases de un proceso para denitrificar agua de beber.

Comercialmente, el PHBV esta disponible como un polvo secado por espreado, con un contenido de HV del 0-25%. La concentración de unidades

de HV, afectan ambas propiedades y la velocidad de degradación de los materiales, haciendo ciertas aplicaciones más factibles a ciertas concentraciones de HV. El PHB puro (0% de HV) es considerado útil para aplicaciones donde la fragilidad no es un problema, y se requiere el monómero puro: esto incluye implantes médicos, aplicaciones farmacéuticas, y su uso como bloques constructores quirales. Una ligera reducción en fragilidad (5%HV) hace el material adecuado para molduras obtenidas por inyección soplado, si el contenido de HV del polímero es igual o mayor a 10%, es útil para molduras rígidas obtenidas por inyección, extrusión e inyección por soplado para empaques de materiales. Finalmente, el PHBV con 20% de HV es adecuado para liberación controlada y aplicaciones veterinarias y médicas. Se tienen también disponibles diferentes grados de PHBV en función del uso requerido. Los más económicos son los grados técnicas o estandar con un 95-96% de pureza y pesos moleculares de 400 000- 750 000, estos pueden ser procesados sin aditivos, aunque para el procesado en fundido se recomienda el uso de agentes de nucleación como: el nitrato de boro, talco, mica micronizada o yeso. Si se desea modificar sus propiedades se pueden utilizar plastificantes, cargas, pigmentos los cuales se unen en fundido con el PHBV. Para medicamentos y usos farmacéuticos, se tienen especialmente

grados con un 99.5% de pureza con pesos moleculares del orden de 30 000 a 750 000. Grados que contienen hidroxiapatita, como carga, tienen usos médicos. Si se almacenan en condiciones de limpieza, en seco, no es necesario un tratamiento previo, del polvo o de los gránulos antes del procesado.

3.8 Aspectos económicos

El factor principal detrás de la aplicación de las resinas de PHBV como resina de especialidad y no de gran volumen, es su costo. A niveles de producción general (660 000 lb/año), el precio es de 8 a 10 US \$/lb; el cual ha sido disminuido, para 1996, hasta US\$4/lb, cuando se puso en operación una nueva planta capaz de producir 10-20 millones lb/año. Este precio lo hace competir difícilmente con el polipropileno que cuesta de 0.30 a 0.45 US \$/lb.

Existen numerosos ejemplos de mejoras tecnológicas y que junto con la economía de escala reducen dramáticamente el costo de nuevos materiales; como quiera, con precios bajos, alto-valor-agregado, aplicaciones especiales, en vez de producirlo como plástico de gran volumen, son las posibles salidas para la producción del PHBV.

El costo de producción de PHBV tiene tres componentes principales: materiales, principalmente fuentes de carbono; el proceso de fermentación en

sí mismo, incluyendo la separación y purificación del polímero; y los costos adicionales relacionados con el capital. La mejora en el proceso de fermentación y en las tecnologías de extracción del polímero, así como la economía de escala, tienden a mejorar la competitividad del biopoliéster; ahora el alto costo se debe principalmente al alto costo del sustrato y del proceso de separación. Alternativas para menores costos de sustratos incluyen materiales como metanol, hemicelulosa hidrolizada y melaza. El costo de sustrato por tonelada métrica de PHB producido se ha calculado para una gran variedad de sustratos (tabla 3). Claramente se puede ver que reemplazando la glucosa, como sustrato podría reducir en gran medida el costo; por ejemplo, el uso de lactosa en lugar de glucosa reduciría los costos del sustrato en un 86%. Aún más económico en términos de costo de sustrato sería el uso de bacterias fotosintéticas como *Rhodobacter* o *Rhodospirillum* para producir PHB con luz del sol; esto es sólo práctico si se pueden realizar mejoras substanciales en la productividad.

3.9 Perspectivas futuras

En la actualidad, muchos investigadores se encuentran estudiando los PHAs y se han obtenido nuevos miembros de esta familia. Se cuenta ahora con una

evaluación más detallada de las propiedades de los homopolímeros y se pueden diseñar, a partir de síntesis química, un gran número de estructuras. Mezclas de PHAs con otros polímeros, permiten la modificación de propiedades y ajustar las velocidades de degradación, así como una reducción en los costos. También se tienen progresos en transgenética, los cuales pueden algún día permitir la producción de PHAs en plantas tales como tabaco y nabo silvestre. Las cuales producen hasta un 40% en peso de lípidos y los mecanismos de biosíntesis de los lípidos y del PHB son casi idénticos.

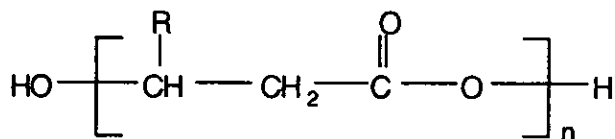
3.9.1 Otros PHAs bacterianos

El PHB y PHV son sólo los dos primeros miembros de la familia de biopoliésteres cuya estructura general se muestra en la figura 13. El PHB bacteriano con cadenas largas laterales, fue separado primero por Wallen y Rohwedder a partir de sedimentos de estuarios; en 1983, De Smet descubrieron que cultivos bacterianos de *Pseudomonas oleovorans* podrían ser alimentados con un substrato n-octano, para producir terpolímeros β -hidroxiocetanoato principalmente.

Tabla 3. Efecto del costo de sustrato por tonelada métrica (t.m.) sobre el costo de producción total de PHB.

<i>Substrato</i>	<i>Costo aproximado (\$US/t.m. de sustrato fermentable)</i>	<i>Producción de PHB/sustrato</i>	<i>Costo de sustrato/PHB (\$US/t.m. PHB)</i>
Metanol	184	0.18	1020
Etanol	502	0.50	1005
Glucosa	493	0.33	1495
Fructosa	517	0.33	1565
Sucrosa	790	0.33	2395
Melaza de caña	220	0.42	524
Lactosa (suero de queso)	71	0.33	215
Hemicelulosa hidrolizada	69	0.20	345
Acido láctico (suero de queso fermentado)	173	0.33	525
Acido acético	705	0.33	2135

Esto ha dirigido los esfuerzos de un gran número de estudios bioquímicos, en los cuales varias fuentes de alimentación fueron suministrados para una amplia variedad de bacterias en orden a obtener un rango de poliésteres con



R= metil; β-hidroxi butirato (HB)

R= etil; β-hidroxi valerato (HV)

R= propil; β-hidroxi caproato (HC)

R= butil; β-hidroxi heptanoato (HH)

R= pentil; β-hidroxi octanoato (HO)

R= hexil; β-hidroxi nonanoato (HN)

R= heptil; β-hidroxi decanoato (HD)

R= octil; β-hidroxi undecanoato (HUD)

Figura 13. Estructura química generalizada para los poli(β-hidroxi alcanoatos).

diferentes longitudes laterales de cadena. Principalmente se ha reportado la obtención de polialcanoatos con cadenas laterales de nueve carbonos, a partir de *Pseudomonas oleovorans* ó por *Pseudomonas putida*; alimentadas

con n-alcanos y ácidos alcanóicos. Sin embargo, copolímeros de PHB y poli(3-hidroxi-2-butenato) pueden también ser producidos por unas especies de *Nocardia* desarrolladas sobre butano, y el uso de *Bacillus megaterium* también ha sido reportado. Las bacterias que producen PHA-LSC no producen PHB bajo pruebas taxonómicas microbianas estandar.

Tabla 4. Propiedades físicas de los poli(3-hidroxi-alcanoatos)_n

Muestra	Promedio en masa de monómero (g/mol)	Promedio de longitud de lado de cadena (C átomos)	Tg comienzo (° C)	Tf (° C)	Densidad (g/ml)
PHB	86.09	1.00	5	180	1.2430
PHV	100.12	2.00	-11	105-108	1.20
PHC	121.16	3.50	-25	N/A	N/A
81.5% en mol de HC					
PHH	128.17	4.00	-33	45	N/A
93.5% en mol de HH					
PHO	141.8	4.99	-36	61	1.019
86.1% en mol de HO					
PHN	146.69	5.32	-39	54	1.026
58.4% en mol de HN					
PHD	153.00	6.25	-40	54	1.033
11.1% en mol de HD					

En la tabla 4 se reportan las propiedades de PHAs LSC. A diferencia de los

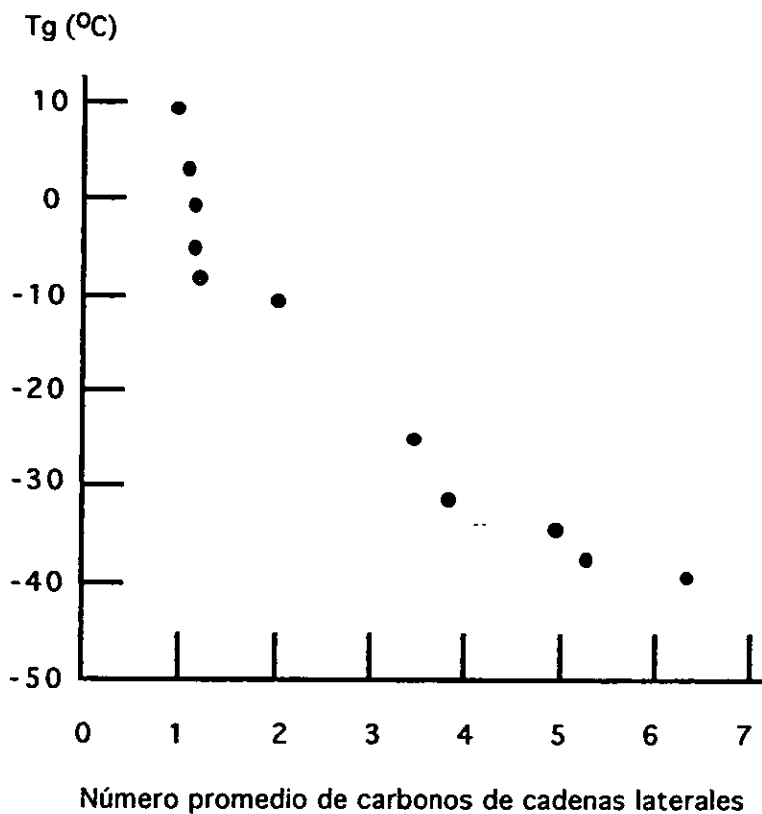


Figura 14. Temperatura de transición vítrea (T_g) de los poli(β -hidroxialcanoatos) en función de el número de carbonos en las cadenas laterales.

termoplásticos PHB y PHBV, los PHAs LSC son elastómeros termoplásticos, con puntos de fusión del orden de 45–60 °C y Tgs por debajo de 40 °C (figura 14). Los PHAs LSC no son homopolímeros, pero son nombrados a partir de su componente principal por razones de simplicidad. Por ejemplo, PHO producido por *P. oleovorans* puede contener más de un 85% en mol de unidades de HO, probablemente mezclado al azar con otras unidades repetitivas, tales como β -hidroxicaproato (HC) y β -hidroxidecanoato (HD). La unidad repetida predominante en los PHAs LSC tiene el mismo número de carbonos que el substrato, mientras las otras unidades repetidas difieren por lo menos en dos o más carbonos debido a el proceso de β -oxidación de fisiología bacteriana.

Los PHAs con grandes cadenas laterales, es decir, grupos alquilo entre pentilo y heptilo son propuestos para tener una conformación mínima de energía con un eje de helicoidal de doble-entrelazado y para cristalizar en una red ortorrómbica o monoclinica con dos moléculas por unidad celular, justamente como el PHB y PHBV. El extremo helicoidal de 0.455 nm es mucho menor que los valores de 0.596 nm y 0.556 nm para PHB y PHV, respectivamente, como un resultado del incremento en la interacción de la cadena lateral. Estos polímeros cristalizan con cadenas laterales alquílicas en una conformación extendida, para formar láminas ordenadas en uno o el otro

de los posibles modelos, como se muestra esquemáticamente en la figura 15.

Los poliésteres con cadenas laterales funcionalizadas, son atractivos por ser sistemas novedosos para liberación controlada de fármacos, se han producido por bacterias alimentadas con substrato modificado. Los poli(β -hidroxialquenoatos), los cuales contienen insaturación en las cadenas laterales, se pueden producir alimentando *Pseudomonas oleovorans* con 1-alcenos y ácidos alquénicos. Estos materiales, son semejantes al PHA LSC saturado, tienen también una menor cristalinidad comparados con los PHB y los PHBV, y son también elastómeros térmicos más que termoplásticos. El grado de insaturación puede ser variado desde 0 a aproximadamente 50% mediante.

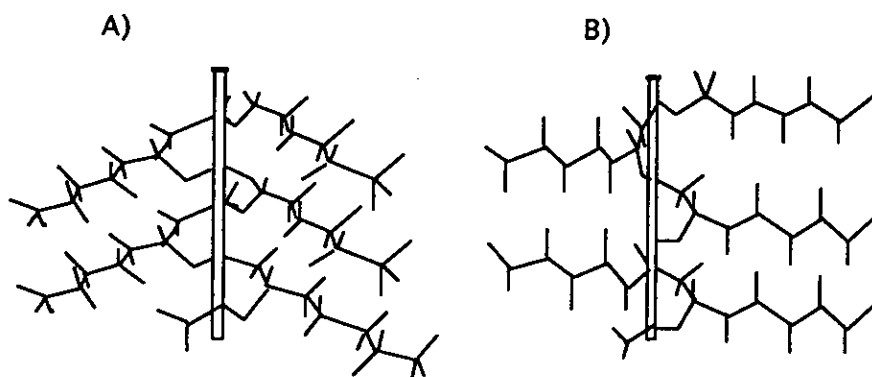


Figura 15. Dos modelos de poli(β -hidroxialcanoato) helicoidal: A) espigado; B) peine doble.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

el uso de diferentes relaciones de n-alcanos a 1-alquenos como substratos. Cuando 1-octeno y 1-deceno son usados como la fuente de carbono, el poliéster formado consiste de ambos β -hidroxialcanoato y β -hidroxialquenoato insaturado terminálmente, de la cadena del cual cuelgan varios grupos de longitudes desde el propilo al heptilo. También se han preparado PHAs con cadenas laterales de cinco-carbonos metilo-ramificados, así se tienen también PHAs con cadenas laterales alcano bromadas y con contenido ciano.

Recientemente, copolímeros de 3-hidroxiбутирато (β -hidroxibutirato) y 4-hidroxiбутирато (γ -hidroxibutirato), P(3HB-co-4HB), se han obtenido a partir de *Alcaligenes eutrophus* alimentado sobre ácidos 4-hidroxiбутírico y 4-clorobutírico ó γ -hidroxibutirato (figura 16). Estos copoliésteres pueden ser preparados con diferentes composiciones de comonomero similar a PHBV, y tienen una distribución secuencial al azar de monómeros. El comportamiento de los polímeros va desde cristalino hasta elastomérico, dependiendo de la composición; la incorporación de hasta el 27% de unidades 4HB aumenta la velocidad de biodegradación enzimática en relación al PHB ó PHBV. Si se incrementa el contenido de 4HB de 0 a un 85% en mol en películas cristalizadas obtenidas por colado a temperatura ambiente por dos semanas resulta en disminución de la cristalinidad desde un 59 a un 29%, y una caída en el punto de fusión desde 180 a 48 °C. El P(3HB-co-94%4HB) fué

notable por tener una velocidad de cristalización idéntica a la del homopolímero P(3HB), pero con una unidad celular correspondiente a poli(4-HB). Este sistema de copolímeros no muestra el fenómeno de isodimorfismo, porque el rasgo conformacional cristalino de las unidades repetidas de 4-HB son diferentes de aquellas de 3-HB.

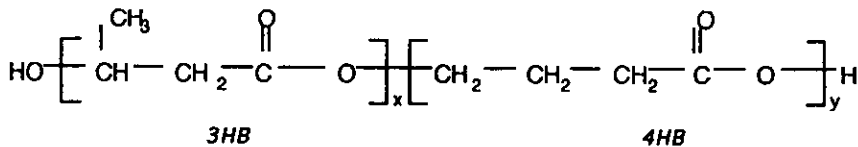


Figura 16. Estructura química del poli(3-hidroxi-*butirato-co-4*-hidroxi-*butirato*).

Adicionalmente se ha biosintetizado el P(4HB) a partir de *Alcaligenes eutrophus* usando un sustrato de ácido 4-hidroxi-*butírico*, citrato y sulfato de amonio. Un nuevo terpoliéster (figura 17) que contiene unidades 3HB, 4HB y 3HV se ha producido en cultivos de *Alcaligenes eutrophus* alimentados con ácido 4-hidroxi-*butírico* y ácido pentanóico. La fracción 4HB en los terpoliésteres se incrementa con el aumento en la fracción de ácido 4-hidroxi-*butírico*, mientras la fracción de 3HV se aumenta al incrementar la

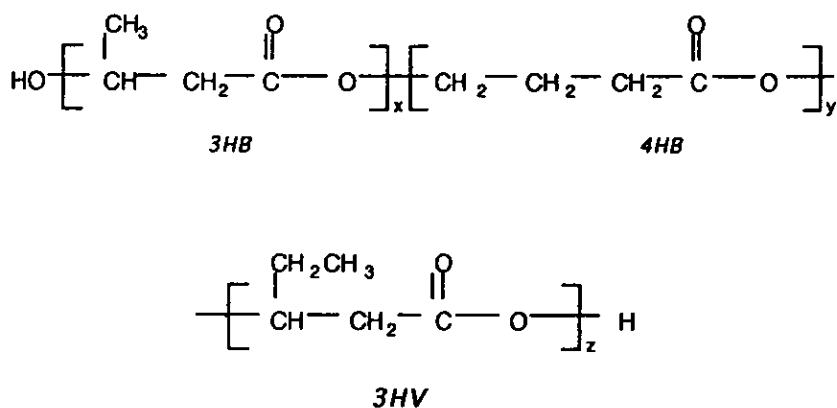


Figura 17. Estructura química del poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato).

relación con el ácido pentanóico. Otro copoliéster de 3-hidroxibutirato y cerca de 7% de 3-hidroxipropionato fue reportado en 1991 [59]; este también tiene más susceptibilidad hacia la biodegradación enzimática que PHB bacteriano. Del gran número de polialcanoatos obtenidos en la última década, la mayoría se basan en alcanoatos β -sustituídos. La obtención de alcanoatos γ -sustituídos tales como el P(4HB) es notable porque la polimerización abriendo el anillo de γ -lactonas es virtualmente desconocida (en condiciones ambientales naturales). Hasta la fecha, los únicos polialcanoatos sintéticos de esta familia, con propiedades adecuadas para ser considerados comercialmente, son la polipivalolactona y poli(ϵ -caprolactona). El último se

produce comercialmente y presenta buenas características en cuanto a su biodegradabilidad.

3.9.2 PHAs sintéticos

Se han llevado a cabo numerosos estudios para la preparación de PHAs sintéticos abriendo anillo de las β -lactonas. Sin embargo, en la actualidad no están disponibles a una escala de producción comercial, en comparación con la fermentación bacteriana, debido a lo caro de la preparación de monómeros de lactona y, más particularmente, al catalizador para la polimerización. El catalizador alquilo de aluminio, que produce los poliésteres sintéticos más parecidos a los de origen bacteriano, produce solamente de un 10 a un 20% de polímero isotáctico estereoregular. El uso de un catalizador de isobutilaluminiooxano mejora el rendimiento hasta 37%. La importancia inmediata de los PHAs sintéticos estriba en una producción a escala de poliéster termoplástico, sino como un modelo para entender mejor las propiedades de los materiales biosintéticos.

Un ejemplo de PHAs sintético que se ha utilizado para ayudar a entender los materiales biosintetizados, fue la preparación del copolímero de PHBV sintético con un amplio intervalo de composiciones, desde el 0 a 100% de HV, en orden para demostrar el fenómeno de isodimorfismo en PHBV; sólo fue

posible obtener muestras biosintetizadas con un contenido de hasta el 47% de HV. Otro avance de los poliésteres sintéticos es que pueden producir los homopolímeros; el mayor número de polímeros bacterianos, especialmente aquellos que contienen grandes cadenas laterales alquilo, son generalmente terpoliésteres. Así, las propiedades físicas y químicas específicas para los homopolímeros bacterianos LSC son medibles solamente a partir de los poliésteres sintéticos. Estas medidas son importantes para la predicción de las relaciones estructura/propiedades para el diseño de materiales para aplicaciones específicas.

El potencial de los PHAs sintéticos también está en la posibilidad de obtener un poliéster con sustituyentes en carbono- β del centro, el cual no es posible obtenerlo a partir de fuentes biológicas. Un ejemplo es el copoliéster sintético de β -hidroxibutirato y malato de β -bencilo. Este material no ha sido reportado que tenga un análogo bacteriano y es un material potencialmente biodegradable, ya que puede sufrir desbencilación para producir un copolímero de ácido hidroxibutirato-maléico.

Otro aspecto de los PHAs sintéticos es que los estereocopolímeros pueden ser obtenidos para uso racémico y monómero de lactona ópticamente activo. Por ejemplo, el PHB atáctico es fácilmente preparado desde β -butirolactona racémica y un catalizador zincorgánico, mientras

análogos isotácticos de los polímeros bacterianos pueden ser hechos usando catalizadores organozinc y organoaluminio con β -butirolactona pura ópticamente.

Polímeros isotácticos conteniendo bloques de secuencias R y S a lo largo de la cadena pueden también obtenerse desde β -butirolactona racémica y catalizador de organoaluminio. Recientemente, se ha preparado PHB sindiotáctico, con centros R y S alternados. Estos estereobloques de copolímeros sufren biodegradación a rapidezces las cuales son comparables a las de polímeros biosintetizados. Además, la rapidez de biodegradación es una función de la tacticidad del polímero, muestras con tacticidad intermedia son mucho más biodegradables que las muestras con alta isotacticidad. La figura 18 muestra los resultados de hidrólisis heterogénea de PHB sintético por una depolimerasa extracelular a partir de *A. faecalis*. La conjunción favorable de baja cristalinidad y alta movilidad de cadena en agua es una explicación propuesta del por qué muestras de tacticidad intermedia son rápidamente degradadas por enzimas.

3.9.3 Mezclas

Otra aproximación para modificar las propiedades de PHB y PHBV, la cual

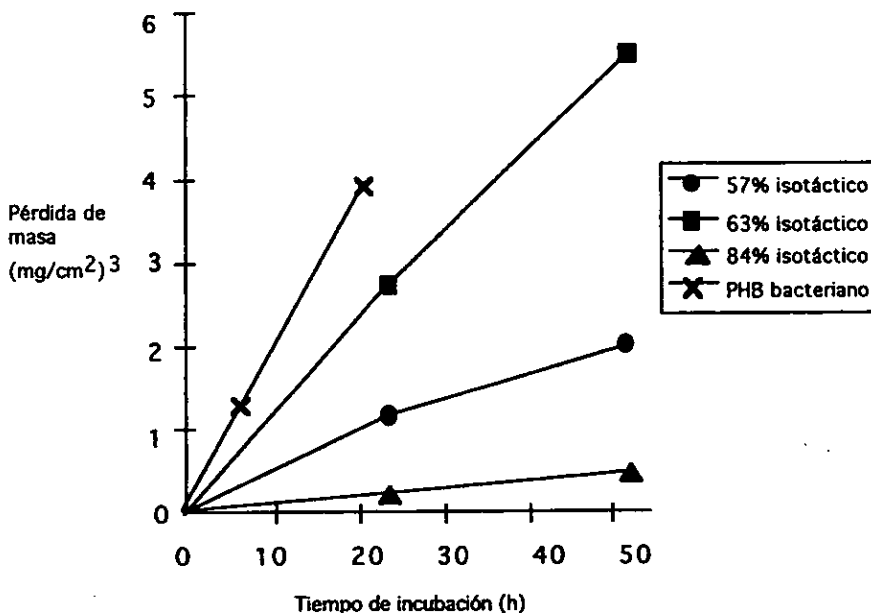


Figura 18. Degradación enzimática de bacterias (100% isotáctico) y poli(β -hidroxibutirato) como una función de la tacticidad. Depolimerasa extracelular se utilizó a partir de *Alcaligenes faecalis*

biopoliéster con otros materiales. Diferentes estudios han demostrado la miscibilidad del PHB con: poli(óxido de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(fluoruro de vinilideno) y poli(cloruro de vinilo). Mezclas completamente biodegradables de PHA y almidón también se han investigado. La presencia

de almidón se utilizó para incrementar la velocidad de degradación de PHA, obteniéndose eventualmente una degradación del 100%; para mantener propiedades mecánicas aceptables, la concentración del almidón debe ser inferior al 40%.

También han sido elaboradas mezclas entre diferentes PHAs, o entre diferentes estereoisómeros de PHB. Las cuales es probable que tengan buena miscibilidad. Así, si el PHB bacteriano se mezcla en solución con PHBV (8% HV), dando una compatibilidad cristalina (co-cristalización) la cual da sólo una endotérma de fusión. Mezclas de PHB sintético atáctico con PHB bacteriano mejoran significativamente la susceptibilidad de el biopolimero para la degradación enzimática, con una mezcla de 50% en peso se tiene la más alta rapidez de degradación. Estas películas obtenidas por colado son también más duras y menos flexibles que las de homopolímeros de PHB bacteriano. Cuando una muestra parcialmente isotáctica de PHB sintético se mezcló con PHB bacteriano, se observó un solo punto de fusión, entre los valores de los puntos de fusión de los componentes puros, a todas las composiciones. Esto es debido, evidentemente a la miscibilidad de las fases cristalinas de estos materiales, debido a la cristalización isomórfica.

La miscibilidad de PHBV al fundir con termoplásticos comerciales está bajo investigación activa; de interés particular es el caso cuando el mismo

termoplástico comercial es biodegradable. En estudios donde PHB ó PHBV fueron mezclados en fundido con butirato acetato de celulosa (CAB) ó propionato acetato de celulosa (CAP), las mezclas con un 50% de PHB ó PHBV fueron miscibles y amorfas, mientras que mezclas con cantidades mayores al 50% de PHB ó PHBV fueron semimiscibles y semicristalinas. El PHBV en estas mezclas cristaliza en una morfología diferente a PHBV puro, estas mezclas tienen diferentes propiedades físicas, por lo mismo, como mejor resistencia al rasgado, que cualquiera de los dos componentes puros. Se pueden obtener diferentes morfologías de estas mezclas por tratamiento térmico de las mismas, las cuales pueden permitir el arreglo de la morfología según sean los requerimientos de biodegradabilidad.

3.9.4 Ingeniería genética

Un desarrollo excitante en síntesis de PHA es la clonación de los genes en *A. eutrophus* que determinan cuanto PHB puede acumular la bacteria. Estos genes han sido transferidos a *Escherichia coli*, una bacteria estandar de laboratorio, lo que permite utilizar todas las herramientas desarrolladas para trabajar la *E. coli*, tiene células que son diez veces mayores que las de una normal; si se ponen los genes de PHB en este mutante de *E. coli* (mutante), se puede producir una bacteria que acumulará diez veces más que las de uno

normal; poniendo los genes de PHB en esta forma de *E. coli* (mutante) para poder producir una bacteria que acumulará 10 veces más polímero por célula, haciendo el polímero fácil de producir. La separación del polímero también puede simplificarse introduciendo los genes de PHB dentro de un *E. coli* deformado, el cual se revienta cuando se calienta a una cierta temperatura. Una vez que las células se han desarrollado y rellenado con PHB, se incrementa la temperatura desde 28 a 42 °C abriéndose la célula y liberándose el polímero. Inicialmente, los productos de PHB obtenidos a partir de *E. coli* fueron mucho menores que los reportados, lo mismo que la obtención de PHBV por un mutante.

Un desarrollo muy reciente es la transferencia de genes de PHB dentro de plantas de maíz y papa, así ellas producen el biopolímero termoplástico en vez de almidón. Como sea, aún existen muchos obstáculos por vencer antes que pueda ser perfeccionada esta técnica; el insertar los genes es relativamente simple en comparación con las dificultades de regularlos en las plantas. Una vez que las plantas puedan producir PHB, sería necesario desviar la producción de almidón de modo que las plantas puedan aprovechar toda su energía para la producción del PHB. La separación del polímero de las células de la planta puede ser más difícil, y en el caso de producción de PHB

por maíz, la reproducción de las plantas se convierte en un problema, ya que las plantas no pueden metabolizar el PHB para permitir el desarrollo de semillas.

El enfoque más sencillo para obtener la producción de PHB en plantas, es poder comenzar con papas y nabos. En estas plantas, los camotes o raíces sirven sólo como órganos de almacenamiento, y no son necesarios para la reproducción. Por lo tanto, sería posible modificar la papa para manufacturar el polímero en el camote en lugar de almidón, pero el resto de las funciones fisiológicas de la papa permanecerían de la manera usual. El primer paso en este proceso ya ha sido realizado, con la producción de PHB en *Arabidopsis thaliana*, una hierba pequeña relacionada a la planta de la mostaza. Eventualmente, el PHA puede ser económicamente producido por granjeros a gran escala. Transgeneticistas sugieren que la planta de nabo silvestre, la cual produce grandes cantidades de aceite sobre unas bases comerciales, puede ser la planta más adecuada para este propósito.

3. 9.5 Desarrollos comerciales

El desarrollo activo de productos de PHBV ha sido facilitado por disponibilidad de grandes cantidades producidas por Zeneca (antes ICI Biopolymers Division), Billingham, Reino Unido, cuya capacidad de producción es de 660 000

lb/año. El producto está disponible en suspensión concentrada de gránulos (látex), en un polvo obtenido por secado por esparado o formulado en gránulos. Otro tipo de obtención es reportado por Chenie-Linz en Austria, que utiliza un proceso de extracción de solvente para la separación del polímero; hasta ahora, Chenie-Linzen ha producido varias toneladas de PHB por fermentación con *Alcaligenes latus*, pero la preparación de PHBV, P(3-HB-co-4HB) y P(3HB-co-4HB-co-3HV) se realiza a escala de laboratorio. Chenie-Linzen propone la tecnología del uso de agentes nucleótidos inocuos biológicamente y plastificantes para tener un rango de propiedades de PHB comparable a los copoliésteres de PHBV.

La presentación en látex se propone como un reemplazo para los usos otros polímeros en látex, con aplicaciones comerciales, tales como en encuadernación (empastador) o el recubrimiento de papel y cartón o como fibra en el campo de la construcción. Otro camino novedoso es la electrodeposición de los PHAs como una película soportada por la aplicación directa del polvo PHA, seguida por fusión y calandreado. Se han reportado buenas propiedades de barrera a la humedad de papel envoltorio, han utilizado látex y con revestimientos en polvo, reteniendo tanto la biodegradabilidad y la reciclabilidad de las fibras de papel. Similarmente, la

extrusión de gránulos formulados para papel envoltorio se ha desarrollado activamente para producir copas biodegradables y envolturas de alimentos para el mercado alimenticio. Reportes de la biodegradabilidad y de propiedades de barrera de tales películas están disponibles [28].

El uso más prometedor, hasta ahora, ha sido la biodegradabilidad de botellas para shampoo en la industria. El moderno champú de cabello es usualmente también biodegradable, de aquí que la botella sea completamente biodegradable por el ambiente natural. Aplicaciones similares de recipientes para aceites lubricantes ó detergentes líquidos domésticos se han demorado un poco probablemente por razones de costo más que por factibilidad. La lámina de papel envoltorio de PHBV puede ser un atractivo con menor costo que las aplicaciones para empaçado (con recipientes). La tecnología de fabricación esta bien desarrollada en papel envoltorio en el campo del empaçado.

Hasta el presente el PHBV se ha desarrollado exitosamente sólo como un termoplástico el cual es biodegradable y biocompatible, la principal razón para retrasar sus usos generales es debido a factores económicos. Mientras tanto, otros numerosos termoplásticos semi-biodegradables de bajo costo son rivales para el mercado comercial; estos son frecuentemente mezclas de almidón gelatinizado con termoplásticos sintéticos.

Digno de atención es el termoplástico poli(ϵ -caprolactona), la biodegradabilidad y termoplaticidad del cual son comparables con las de PHBV. Sin embargo, este material es de bajo peso molecular, tiene más bajo punto de fusión que el PHBV, y es menos versátil en términos de sus propiedades físicas.

4 Conclusiones

A partir de este siglo los polímeros sintéticos han dominado el mercado, debido al desarrollo de la petroquímica, pero los polímeros derivados de la biotecnología continúan en uso. Recientemente, han surgido algunos factores que han hecho necesario dirigir nuevamente la atención hacia los sistemas biotecnológicos ante la necesidad de uso y conservación de recursos naturales así como por su biodegradabilidad. Por otra parte debido a que las reservas de petróleo y carbón no son ilimitadas y muchos materiales dependen de estos recursos, se están buscando alternativas viables para la obtención de nuevos materiales. Por ello se ha incrementado el interés en desarrollar poliésteres bacterianos debido a sus excelentes propiedades y a su biodegradabilidad.

El homopolímero PHB es un material termoplástico, es una resina altamente viscosa y moldeable a temperaturas cercanas al punto de fusión (mayores). Estas propiedades se comparan con las del polipropileno, ya que ambos tienen puntos de fusión, grado de cristalinidad y temperaturas de transición vítrea similares. Aunque, el PHB es más rígido y quebradizo que el polipropileno.

Se han obtenido películas para empaque de PHB, las cuales tienen excelentes propiedades de barrera para gases, siendo 5 veces menos permeable al dióxido de carbono que el PET, y son más resistentes que las de polipropileno.

Los copolímeros de PHBV o biopol, han mejorado muchas propiedades del homopolímero PHB, incluyendo su fragilidad. Al incrementarse la concentración de unidades HV desde un 0-25%. Existe una disminución del punto de fusión, la temperatura de transición vítrea, permitiendo el uso de estos materiales a bajas temperaturas sin que resquebrajen y se pongan vidriosos. La resistencia al impacto se incrementa al aumentar la concentración de HV, indicando que la flexibilidad del material se incrementa.

Al haber sido hechos por bacterias, los biopolímeros (PHA's) también pueden ser degradados por bacterias, colocándose entre los pocos materiales termoplásticos completamente biodegradables. Pueden ser degradados a dióxido de carbono y agua por la acción bacteriana continua.

El factor principal de la aplicación de las resinas de PHBV como resina de especialidad y no de gran volumen, es su costo. Existen numerosos ejemplos

de mejoras tecnológicas y que junto con la economía de escala reducen el costo de estos nuevos materiales.

En 1990, el primer producto comercial hecho de biopol fue lanzado en Alemania como una botella biodegradable para empacar champú biodegradable, lo que indica que si se incrementan las investigaciones y se encuentra el proceso más económico los PHA's tienen un gran futuro por su biodegradabilidad.

Otro aspecto es modificar las propiedades de PHA's, mediante la obtención de mezclas del biopoliéster con otros materiales, lo cual también reduce el costo del material final. Se ha demostrado la miscibilidad del PHB con: poli(óxido de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(fluoruro de vinilideno) y poli(cloruro de vinilo). También se tienen mezclas de PHA y almidón completamente biodegradables. La presencia de almidón incrementa la velocidad de degradación de PHA.

Con la ingeniería genética se ha estudiado la transferencia de genes de PHB dentro de plantas como maíz, papa y nabo silvestre. Con el objeto de que estas puedan producir PHB, para lo cual sería necesario desviar la producción de almidón de modo que las plantas puedan aprovechar toda su energía para la producción del PHB.

Por otra parte el PHBV se ha desarrollado exitosamente sólo como un termoplástico el cual es biodegradable y biocompatible, la principal razón para retrasar sus usos generales son factores económicos. Mientras tanto, se han desarrollado termoplásticos semi-biodegradables de bajo costo a partir de mezclas de almidón gelatinizado con termoplásticos sintéticos, que son rivales en el mercado.

5 Apéndice

Abreviaturas utilizadas en el trabajo

Abreviatura	Significado
A. eutrophus	Alcaligenes eutrophus
A. faecalis	Alcaligenes faecalis
B. cereus	Bacillus cereus
B. megaterium	Bacillus megaterium •
CAB	Butirato acetato de celulosa
CAP	Propionato acetato de celulosa
- Co A	- Coenzima A
DNA	Acido desoxiribonucleico
E. coli	Escherichia coli
HB	β -hidroxibutirato
HC	β -hidroxicaproato
HD	β -hidroxidecanoato
HO	β -hidroxioctanoato
HV	β -hidroxivalerato
ICI	Imperial Chemical Industries
LSC	Longitudes laterales de cadena
MBL	Biopolimeros Limitados Marlborough
MTM	Dirección Tecnológica Marlborough
Mw	Peso molecular promedio en peso
•N	Concentración normal
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotido fosforilada
NMR	Resonancia magnética nuclear
P. cepacia	Pseudomonas cepacia
PET	Poli(tereftalato de etileno)
pH	Potencial de hidrógeno
PHA's	Poli-hidroxialcanoatos
PHA-LSC	PHA con longitudes laterales de cadena
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
P(3HB)	Poli-3-hidroxibutirato
P(4HB)	Poli-4-hidroxibutirato
PHBV	Poli- β -hidroxibutirato-co- β -hidroxivalerato

Abreviaturas utilizadas en el trabajo

Abreviatura	Significado
PHO	Poli- β -hidroxiocetanoato
PHV	Poli- β -hidroxivalerato
P. lemoignei	Pseudomonas lemoignei
PVDF	Poli(fluoruro de vinilideno)
R. rubrum	Rhodospirillum rubrum
SCP	Proteínas de células simples
SEM	Microscopía por barrido de electrones
TEM	Microscopía de transmisión de elect.
Tg	Temperatura de transición vítrea
WAXD	Difracción de rayos X en ángulo amplio.

Referencias

1. Ravve, "Principles of Polymer Chemistry", Plenum Press, New York, (1995), págs. 394-401.
 2. Stephen L. Rosen, "Fundamental Principles of Polymeric Materials", Jhon Wiley & Sons, InC, (1993), págs. 13-19.
 3. Haywood, G.W., Anderson, A.J., Chu, L. and Dawes, E.A., Biochem. Soc. Trans., (1988), 16, págs. 1046-1047.
 4. Reusch, R.N., and Hiske, T.W. and Sadoff, H.L. Journal of Bacteriology, (1986), 168(2), págs. 553-562.
 5. Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 270-275.
 6. Doi, T., Kanesawa, Y., Kunioka, M. and Saito, T., Macromolecules, (1990), 23, págs. 26-31.
 7. Byron, D., Trends Biotechnology, (1987), 5, págs. 246-250.
 8. Matavulj, M., Moss, S.T. and Molitors, H.P. FEMS Microbiology Reviews, (1992), 103, págs 465-466.
 9. Bloembergen, S., Holden, D.A., Bluhm, T.L., Hamer, G.K., and Marchessault, R.H., Macromolecules, (1989), 22, págs.1663-1669.
 10. Kamiya, N., Yamamoto, Y., Inoue, Y., Chûjô, R., and Doi, Y., Macromolecules, (1989), 22, págs. 1676-1682.
 11. Orts, W.J., Marchessault, R.H. and Bluhm, T.L., Macromolecules, (1991), 24, págs. 6435-6438.
 12. Scandola, M., Ceccorulli, G., Pizzoli, M. and Gazzano, M., Macromolecules, (1992), 25, págs. 1405-1410.
 13. Yoshie, N., Sakurai, M., Inoue, Y. and Chûjô, R., Macromolecules, (1992), 25, págs. 2046-2048.
 14. Preusting, H., Nijenhuis, A. and Witholt, B., Macromolecules, (1990), 23, págs. 4220-4224.
 15. Morin, F.G. and Marchessault, R.H., Macromolecules, (1992), 25, Págs. 576-581.
-

16. Kim, Y.B., Lenz, R.W. and Fuller, R.C., *Macromolecules*, (1992), 25, págs. 1852-1857.
 17. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K., *Macromolecules*, (1988), 21, págs. 2722-2727.
 18. Nakamura, S., Doi, Y. and Scandola, M., *Macromolecules*, (1992), 25, págs. 4237-4241.
 19. Gross, R.A., Zhang, Y., Konrad, G. and Lenz, R.W., *Macromolecules*, (1988), 21, págs. 2657-2668.
 20. Zhang, Y., Gross, R.A. and Lenz, R.W., *Macromolecules*, (1990), 23, págs. 3206-3212.
 21. Kemnitzer, J.E., McCarthy, S.P. and Gross, R.A., *Macromolecules*, (1993), 26, págs. 1221-1229.
 22. Doi, Y. and Abe, C. *Macromolecules*, (1990), 23, págs. 3705-3707.
 23. Kemnitzer, J.E., McCarthy, S.P. Gross, R.A., *Macromolecules*, (1992), 25, págs. 5927-5934.
 24. Ravve, "Principles of Polymer Chemistry", Plenum Press, New York, (1995), págs. 142-146.
 25. Marchessault, R.H. and Monasterios C.J., "Biotechnology and Polymers", Edited by C.G. Gebelein, (1991), págs. 48-96.
 26. Soaneed, "Polymer Applications for Biotechnology", Prentice-Hall, (1990).
 27. Vardar-Sukan and S.S. Sukan, "Recent Advances in Biotechnology", (1992), págs. 343-357.
 28. Lauzier, C.A., Monasterios, C.J., Saracovan, I., Marchessault, R.H. and Ramsay, B.A., (1993), *Tappi*, 76(5), págs. 71-77.
 29. F.Vardar-Sukan and S.S. Sukan, "Recent Advances in Biotechnology", (1992), págs. 425-430.
 30. Gebelein, "Biotechnology and Polymers", Edited by C.G. Gebelein, (1991), págs. 1-9.
 31. Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 318-331.
-

- 32.Griffin, G.J.L., "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers", (1994).
 - 33.Dordick, J.S., Linhardt, R.J. and Rethwisch, D.G., American Chemical Society, January 1995, págs. 33- 39.
 - 34.http://www.ugr.es/~eianez/Microbiología/09_Micro.html
"Citoplasma.Inclusiones Citoplásmicas".
 - 35.Bössier, "Optical Techniques to characterize Polymer Systems", Elsevier, (1989), págs. 336-339.
 - 36.Ravve,"Principles of Polymer Chemistry", Plenum Press, New York, (1995), págs. 24-26.
 - 37.Tadayuk, Uno and Saburo, S., "Biopolymers (Overview)", págs. 645-651.
 - 38.Salamone, J.C., "Polymeric Materials Encyclopedia", Vol, 1,3,5,7,8,9,10,12., Editor-in-Chief, (1994).
 - 39.Ravve,"Principles of Polymer Chemistry", Plenum Press, New York, (1995), págs. 390-391.
 - 40.Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 3-10.
 - 41.Präve, P., Faust, U., Sittig, W. and Sukatsch, D.A., "Fundamental of Biotechnology", VCH, (1987), págs. 382-395.
 - 42.Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 102-127.
 - 43.Alan Scragg, "Biotecnología Básica Para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos", Limusa, (1996), págs. 20-25.
 - 44.Jackson, A.T., "Process Engineering in Biotechnology", Prentice Hall, (1991), págs. 28-57.
 - 45.Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 192-195.
 - 46.Anderson, A.J. and Dawes, E.A., Microbiological Reviews, (1990), 54(4), págs. 450-472.
 - 47.Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 398-411.
-

48. Chiellini, E. and Solaro, R., American Chemical Society, July 1993, págs. 29-36.
 49. Bu'Lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, (1987), págs. 398-411.
 50. Greco, P. and Martuscelli, E., Polymer, (1989), 30, págs. 1475-1483.
 51. Scandola, M., Ceccorulli, G. and Pizzoli, M., Macromolecules, (1992), 25, págs. 6441-6446.
 52. Pearce, R., Jesudason, J., Orts, W., Marchessault, R.H. and Bloembergen, S., Polymer, (1992), 33(21), págs. 4647-4649.
 53. Buchanan, C.M., Gedon, S.C., White, A.W. and Wood, M.D., Macromolecules, (1992), 25, págs. 7373-7381.
 54. Fidler, S. and Dennis, D., FEMS Microbiology Reviews, (1992), 103, págs. 231-236.
 55. Slater, S.C., Voige, W.H. and Dennis, D.E. Journal of Bacteriology, (1988), 170(10), págs. 4431-4436.
 56. Schubert, P., Krüger, N. and Steinbüchel, A., Journal of Bacteriology, (1991), 173(1), págs. 168-175.
 57. Hrabak, O. FEMS Microbiology Reviews, (1992), 103, págs. 251-256.
 58. Schubert, P., Steinbüchel, A. and Schlegel, H.G. Journal of Bacteriology, (1988), 170(12), págs. 5837-5847.
 59. Kunioka, M., Tamaki, A. and Doi, Y., Macromolecules, (1989), 22, págs. 694-697.
 60. Ravve, "Principles of Polymer Chemistry", Plenum Press, New York, (1995), págs. 10-12.
-