



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis Enzimática de Poli-*L*-láctido en
líquidos iónicos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

PORRAS DOMÍNGUEZ JAIME RICARDO



MÉXICO, D.F.

Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: AGUSTÍN REYO HERRERA

VOCAL: MARICARME QUIRASCO BARUCH

SECRETARIO: MIQUEL GIMENO SECO

1ER. SUPLENTE: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

2° SUPLENTE: ISMAEL BUSTOS JAIMES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314 CONJUNTO E FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

SUSTENTANTE:

JAIME RICARDO PORRAS DOMÍNGUEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por brindarme una educación profesional de la más alta calidad.

Al Dr. Miquel Gimeno y al Dr. Sébastien Chanfreau, por todo el apoyo que me brindaron y por permitirme formar parte de este proyecto del cual salió esta tesis.

A la USAI-FQ-UNAM, por todos los análisis realizados que contribuyeron a la realización de esta tesis.

Al CONACyT, por todo el apoyo brindado a esta investigación con los recursos necesarios para que pudiese llevarse a cabo.

*A mis padres, quienes siempre me han apoyado
y sin ellos este camino no hubiese sido tan sencillo.*

One is not born wise; one becomes it....

Matthieu Ricard

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	
1.1 Poliláctido	3
1.2 Obtención del ácido láctico	4
1.3 Obtención del ácido Láctido.	5
1.4 Síntesis del Poliláctido	7
2.-OBJETIVOS	
3.-ANTECEDENTES	
3.1 Lipasas.....	10
3.2 Características estructurales y Sitio Activo.....	11
3.3 Aplicaciones de lipasas en medios micro acuosos.	12
3.4 Inmovilización de lipasas.	13
3.5 Propiedades Generales de los Líquidos iónicos.....	14
3.6 Actividad Enzimática en Líquidos iónicos	
3.6.1 Efecto de las propiedades de solventes de los líquidos iónicos	17
3.6.2 Inactivación de la enzima en líquidos iónicos	19
3.6.3 Toxicidad de Los Líquidos Iónicos	20
3.7 Polimerización Vía Apertura de Anillo.	21
3.8 Síntesis Enzimática de PLA en masa	23

4.-METODOLOGÍA

4.1 Materiales.....	27
4.2 Equipo.....	27
4.3 Procedimiento	
4.3.1 Diagrama General	29
4.3.2 Polimerización.....	30
4.3.3 Purificación del polímero.....	31
4.4 Caracterización de las muestras	
4.4.1 Preparación de las muestras RMN H, Rayos X y Análisis Térmico	32
4.4.2 ¹ H RMN	32
4.4.3 Análisis de polvos de Rayos X	34
4.4.4 Análisis térmicos	37
4.4.5 Determinación del Peso Molecular por GPC/SEC.....	38
4.4.6 Determinación de la viscosidad de los líquidos iónicos	40

5. - DISCUSIÓN Y RESULTADOS

5.1 Efecto de la concentración de ácido láctido.....	41
5.2 Efecto de la concentración de enzima.....	45
5.3 Efecto de la temperatura.....	50
5.4 Efecto del líquido iónico.	53
5.5 Caracterización térmica del PLLA obtenido.....	58
5.6 Caracterización por rayos X de polvos, determinación de la cristalinidad del PLLA obtenido.	62
6.- CONCLUSIONES y TRABAJO FUTURO	66

7.- BIBLIOGRAFÍA 68

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

BDMIM- 1-Butil-2,3-dimetilimidazolio

BF₄ – Tetrafluoroborato

BMIM - 1,3-Butilmetilimidazolio

CALB – Lipasa B de *Candida antarctica*

DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido

Enz – Enzima

GPC/SEC – Cromatografía de permeación de gel o cromatografía por exclusión de tamaños

HMIM – 1,3-Hexilmetilimidazolio

¹H RMN – Resonancia Magnética Protónica

LI – líquido iónico, Lis – líquidos iónicos

LLA – Ácido *L* láctido

M_n - Peso molecular promedio

M_w - Peso molecular ponderal

NTf₂-bis(trifluormetilsulfonil)amida

OMIM – 1,3-Octilmetilimidazolio

PDI – Índice de polidispersibilidad

PLA – Poliláctido

PLLA – Poli-*L*-láctido

PF₆ – Hexafluorofosfato

ppm –partes por millón

Oct – ácido bis-2-etilhexanóico

RX –Rayos x

Sn – Estaño

T_g - Temperatura de transición vítrea

T_f . Temperatura de fusión

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas isoméricas del ácido láctido	4
Figura 2. Obtención del ácido láctido.	6
Figura 3. Depolimerización	6
Figura 4. Catálisis de coordinación para la elaboración de PLA con un compuesto de Sn	7
Figura 5. Catálisis vía catiónica para la elaboración de PLA con un compuesto de Zn.	8
Figura 6. Esquema de la producción industrial del PLA	8
Figura 7. Estructura de la serina	11
Figura 8. Estructuras Típicas de los LI usados comúnmente en biocatálisis.	14
Figura 9. Estructuras de aniones y catión de LI	15
Figura 10. Relación entre el tamaño del catión, polaridad y viscosidad de los LI	16
Figura 11. Actividad enzimática de la alfaquimiotripsina y la CALB.	17
Figura 12. Estructura del catión.....	18
Figura 13. Actividad catalítica de la termolisina en función de la solubilidad en la formación del Z Aspartame.....	19
Figura 14 . Monómeros utilizados para las síntesis de polímeros por la apertura del anillo	21
Figura 15. Mecanismo enzimático polimerización vía aniónica.	22
Figura 16 Apertura del anillo vía enzimática.....	22
Figura 17. Polimerización vía enzimática por esterificación	23
Figura 18. Reacción vía apertura del anillo, por catálisis enzimática.	24
Figura 19. Síntesis en masa del poli-L-láctido.....	25
Figura 20. Señales correspondientes de las formas del láctido en el espectro de ¹ H RMN.....	33
Figura 21. Espectro RMN H1. Cinética a 65°C 70%LLA 10% enzima a 3 días....	34
Figura 22. Análisis por difracción de rayos x en polvo , de muestra 90°C 70%LLA, 15% enzima, 7 días.	36
Figura 23. Efecto de la concentración de láctido en rendimientos	42

Figura 24. Efecto de la concentración de LLA en pesos moleculares.....	44
Figura 25. Efecto de la concentración de LLA en PDI.....	44
Figura 26. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos a 35% de LLA	46
Figura 27. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos a 70% de LLA	47
Figura 28. Efecto de la concentración de enzima en Pesos moleculares a 35% de LLA.	48
Figura 29. Efecto de la concentración de enzima en Pesos moleculares a 70% LLA	49
Figura 30. Efecto de la temperatura en los rendimientos	51
Figura 31. Espectro de ¹ H RMN, de la mezcla de reacción a 65°C sin enzima a 9 días.....	51
Figura 32. Efecto de la temperatura en pesos moleculares.	52
Figura 33. Mecanismo de síntesis propuesto por Connor y colaboradores en la síntesis inducida por carbenos de PLLA.	53
Figura 34. Mecanismo formación de carbeno	54
Figura 35. Mecanismo, catálisis por formación de carbenos en el anillo de imidazolio.....	54
Figura 36. Estructura del BDMIM PF6.....	55
Figura 37. Variación de la viscosidad con respecto a la temperatura del [BDMIM][PF ₆] y del [HMIM][PF ₆]......	56
Figura 38. Mecanismo de la catálisis ácida	57
Figura 39. Diagramas de DSC de cada una de las muestras.....	59
Figura 40. Efecto tiempo, efecto molecular, % LLA y % Enz en la T _g	60
Figura 41. Efecto tiempo, efecto molecular, % LLA y % Enz en la T _f	61
Figura 42. Evolución de la Cristalinidad en la síntesis polimérica.	62
Figura 43. Fases de un polímero.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la polimerización en masa de Fujioka	26
Tabla 2. Variables a estudiar en la síntesis del polímero.	30
Tabla 3. Efecto de la concentración de LLA en rendimientos	41
Tabla 4. Efecto de la concentración de láctido en pesos moleculares, en experimentos realizados con 70% p/p y 35% p/p relación LLA/LI con 10% p/p de biocatalizador con respecto al monómero	43
Tabla 5. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos.	45
Tabla 6. Efecto de la concentración de enzima en pesos moleculares	48
Tabla 7. Efecto de la temperatura en rendimientos.....	50
Tabla 8. Efecto de la temperatura en pesos moleculares	52
Tabla 9. Efecto del líquido iónico [BDMIM][PF ₆] en las síntesis del PLLA	55
Tabla 10. Caracterización térmica del PLLA	58
Tabla 11. Resultados del porcentaje de cristalinidad.	63

RESUMEN

Los polímeros comúnmente usados en la industria y en la vida diaria son sintetizados a partir de derivados del petróleo, este tipo de materiales son en algunos casos sintetizados a través de procesos complejos que tienen un efecto negativo en el medio ambiente además de presentar una baja biodegradabilidad.

El uso de polímeros obtenidos a partir de fuentes naturales representa una alternativa para el medio ambiente debido a su mayor biodegradabilidad. Entre estos biopolímeros se encuentra el ácido poliláctido, que desde los últimos 20 años ha recibido mucha atención debido a que se ha encontrado que posee propiedades similares a las del poli-estireno (PS) y el poli-etilenperifalato (PET).

El poli-*L*-láctido (PLA) es un polímero semi-cristalino obtenido a través de la polimerización del ácido-*L*-láctido (LLA), este proceso es catalizado vía inorgánica, usando compuestos que no pueden ser removidos una vez llevada a cabo la catálisis y que pueden ser nocivos para la salud. También la propia síntesis de estos catalizadores genera residuos nocivos para el medio ambiente.

Es por eso que en este trabajo se estudió un nuevo método para la síntesis utilizando la llamada “química verde”, usando como catalizador la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada en una resina acrílica, en dos medios líquidos iónicos (LI): [HMIM][PF₆] y [BDMIM][PF₆].

Los LI son sales con puntos de fusión relativamente bajos, en donde la enzima posee una adecuada actividad catalítica, además de otras ventajas como una despreciable presión de vapor, lo que impide que se volatilice a altas temperaturas y lo más importante, que es considerado un compuesto que no daña el medio ambiente y que puede ser reutilizado.

Se llevaron a cabo estudios de la síntesis enzimática, variando: tiempo, concentración de monómero, concentración de enzima, temperatura y tipo de líquido iónico. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados por GPC (Cromatografía de Permeación de Gel) para determinar pesos moleculares, ¹H

RMN para determinar el porcentaje de conversión del monómero, DSC (calorimetría diferencial de barrido) para una caracterización térmica de los productos y Difracción de rayos X en polvo para determinar su cristalinidad.

Las mejores condiciones encontradas para llevar a cabo esta síntesis fueron a 90°C con una concentración de biocatalizador de 10% p/p (relación catalizador /monómero), con 70% p/p de LLA/LI a un tiempo de 7 días empleando [HMIM][PF₆], obteniéndose un rendimiento del 63%, con una conversión del monómero del 100%, un peso molecular promedio de 37,800 g/mol, con un 35% de cristalinidad, con una T_g de 56.7°C y dos puntos de fusión de 143.3 y 151.7°C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 POLILÁCTIDO

Actualmente los materiales poliméricos más utilizados son elaborados a partir de productos obtenidos del petróleo, este tipo de materiales resultan ser muy contaminantes, tanto el material por ser poco biodegradable, como su proceso de obtención por los residuos que se generan.¹

Desde la década de los setenta se han estado usando en el campo de la medicina una nueva clase de polímeros basados en ácido láctido, esta clase de polímeros son obtenidos de fuentes naturales y renovables. Además de que resultan ser biodegradables, presentan propiedades mecánicas similares a las del poli-estireno (PS) y polietileno tereftalato (PET) por lo que tiene una amplia gama de usos en las áreas de la medicina, de textiles y de empaques de alimentos, entre otros.¹

El punto de fusión, la tensión mecánica y la cristalinidad del PLA dependen de las características del polímero. La morfología del polímero y el peso molecular de éste dependen de las condiciones de síntesis.¹

Existen tres formas isoméricas del ácido láctido el L-láctido, el D-láctido y el meso-láctido, estas formas están dadas por los 2 carbonos quirales (Figura 1) que conforman la molécula del ácido láctido. Las resinas de PLA cuya composición está por arriba del 93% de LLA resultan ser semi-cristalinas, por lo que resultan ser las más demandadas, mientras que las formadas entre un 53 y 93% de LLA tienen una estructura amorfa, estas últimas son usadas en el área de la medicina para hacer prótesis o medicamentos de liberación controlada, debido a su mayor biodegradabilidad en comparación con las semi-cristalinas.

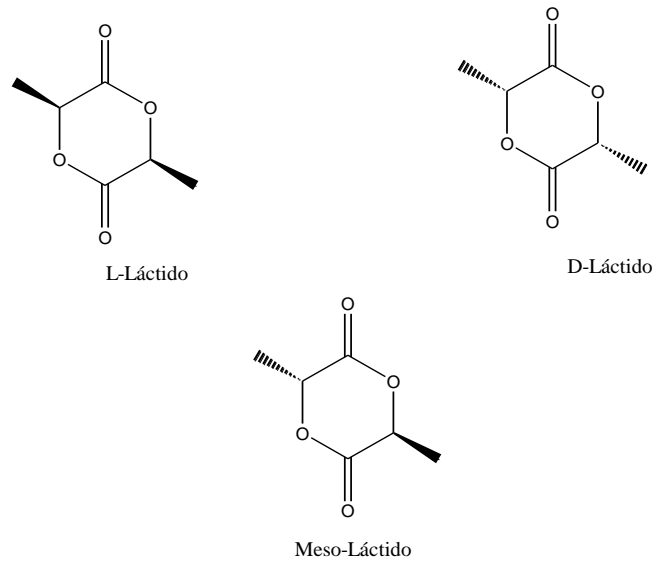


Figura 1. Formas isoméricas del ácido láctido

El PLA puede ser preparado de dos distintas formas, por la condensación del ácido láctico o por la polimerización vía apertura del anillo del ácido láctido.

1. 2 OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico fue aislado por primera vez en 1780 por un químico suizo llamado Scheele, lo aisló a partir de leche fermentada y comenzó a ser producido de forma industrial en el año de 1881.²

El ácido láctico es producido por medio de la fermentación de carbohidratos, usando microorganismos homolácticos del género de *Lactobacillus*. Dependiendo del tipo de bacteria que se use se puede tener dos tipos deferentes de ácido láctico L ó D, si se usa *Lactobacillus amylophilus*, *L. bavaricus*, *L. casei*, *L. maltaromicus*, y *L. salivarius*, se obtendrá ácido láctico con configuración L en mayor proporción mientras que con *L. delbrueckii*, *L. jensenii*, o *L. acidophilus* se obtendrá en mayor proporción ácido láctico con configuración D. Este tipo de

bacterias llevan a cabo la fermentación produciendo 1.8 moles de ácido láctico por cada mol de glucosa.²

Las fuentes de carbono pueden ser muy variadas dependiendo del tipo de cepa usada; puede usarse, glucosa, maltosa, dextrinas obtenidas de maíz o de almidón de papa o sacarosa obtenida de la caña. También se requieren de otro tipo de nutrientes como vitaminas y fuentes de nitrógeno para llevar a cabo la fermentación.²

Este proceso se lleva a cabo en un tiempo de alrededor de 3 a 6 días y se usan concentraciones de alrededor del 10-15% de azúcar, las cuales dan una productividad de alrededor de 2 gramos de ácido por litro de cultivo por hora.

Una vez terminado el proceso de fermentación, la separación del ácido láctico se hace por medio de una simple reacción ácido base agregándose hidróxido de calcio, para producir lactato de calcio que queda soluble en el medio y mediante una simple filtración se retira toda la biomasa. Finalmente tiene lugar un proceso de evaporación del agua, seguida de una recristalización y acidificación con ácido sulfúrico, para obtener finalmente el ácido láctico y sulfato de calcio que es removido por filtración.²

1.3 OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTIDO.

El proceso comienza con una condensación continua del ácido láctico en un medio acuoso, para obtener un polímero de bajo peso molecular, de alrededor de 5,000 g/mol (Figura 2).³

Esta primera etapa del proceso se lleva a cabo sólo de manera térmica. En este método se obtienen pesos moleculares bajos, esto se debe principalmente a la alta cantidad de agua, a la baja concentración de sustrato y a la presencia de impurezas.

Una vez obtenidos los oligómeros de ácido láctico, el siguiente paso es la reacción de ciclización intramolecular, esto se lleva a cabo utilizando estaño para catalizar el proceso, esta etapa del proceso es llamada depolimerización

(Figura 3). Finalmente la mezcla del dímero es purificada mediante una destilación al vacío.⁴

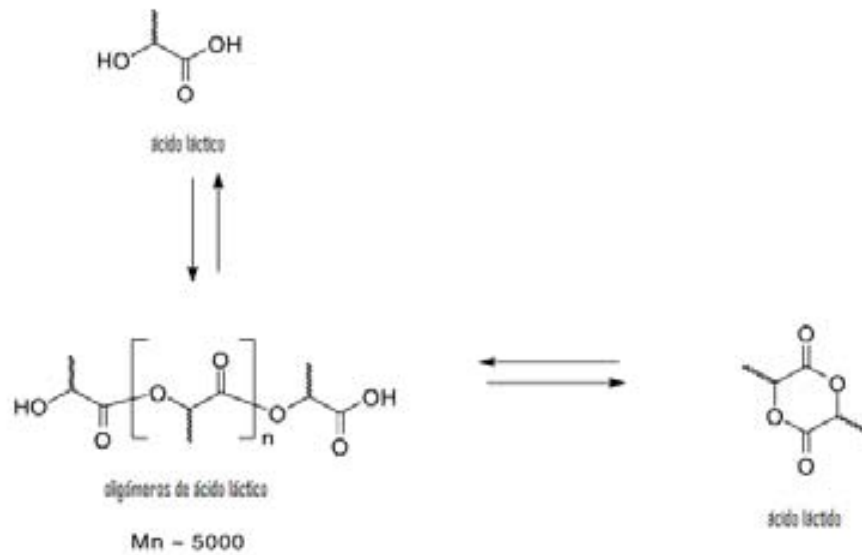


Figura 2. Obtención del ácido l ctido³.

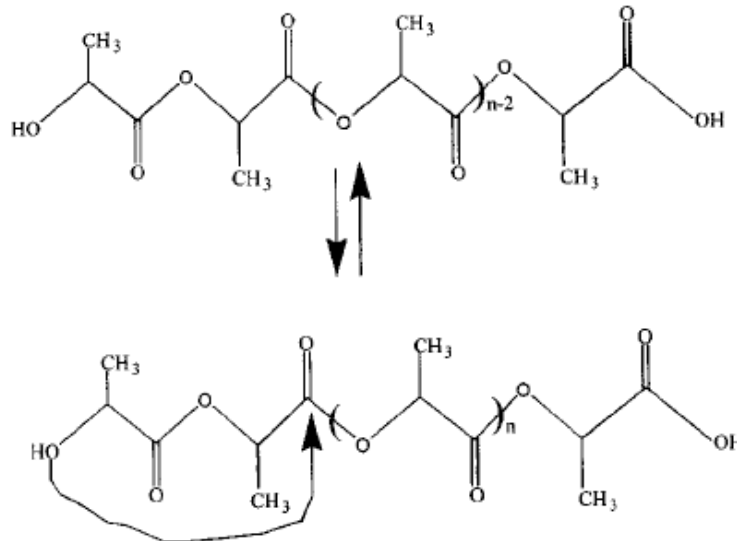


Figura 3. Depolimerizaci n³.

1.4 SÍNTESIS DEL POLI LÁCTIDO

La síntesis de poliláctido se lleva a cabo actualmente a través de una catálisis catiónica, aniónica o de coordinación, dependiendo del tipo de catalizador usado, en la que se usan catalizadores con cationes metálicos como estaño, zinc, aluminio e incluso algunos lantánidos.⁴ El compuesto más usado de forma industrial es el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. La polimerización es en masa, y tiene lugar a temperaturas entre 180-210°C con una concentración de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ entre 100-1000ppm, regularmente se usa como iniciador el 1-octanol.⁴ (Figura 4)

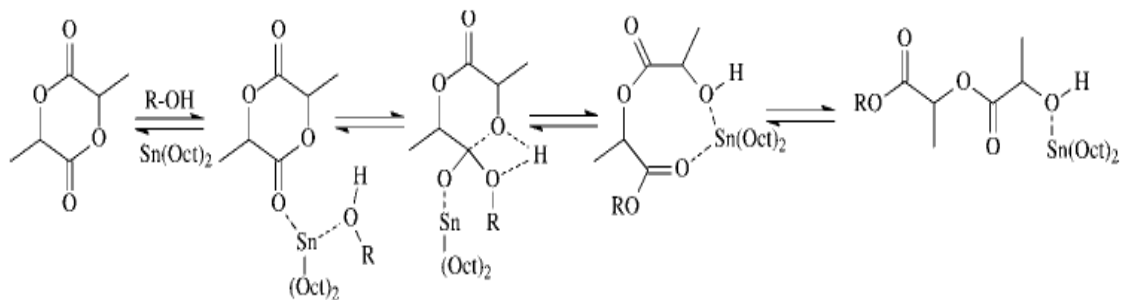


Figura 4. Catálisis de coordinación para la elaboración de PLA con un compuesto de Sn

Utilizando estas condiciones se obtiene una alta actividad catalítica, una baja racemización del polímero, con un importante porcentaje de conversión del monómero, por arriba del 90%, con polímeros de altos pesos moleculares mayores a 100,000 g/mol.²

Otro tipo de catálisis como ya se mencionó es la vía catiónica (Figura 5), en donde el catión (Zn) abre el anillo y desencadena la reacción de polimerización.⁵ Cabe mencionar que en ambos tipos de catálisis, el catalizador no es removido del producto final. La catálisis aniónica será descrita en capítulos posteriores cuando se explique la catálisis enzimática.

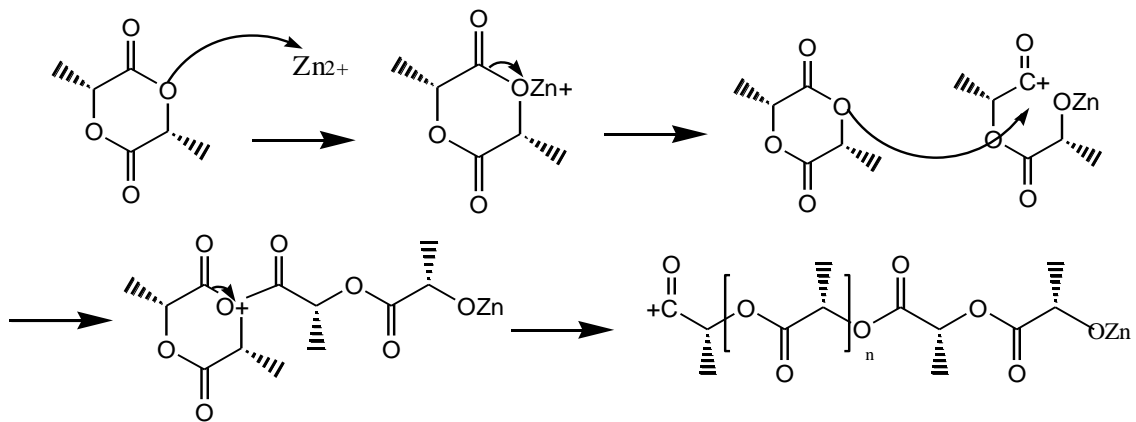


Figura 5. Catálisis vía catiónica para la elaboración de PLA con un compuesto de Zn.

La siguiente figura muestra de manera esquemática el proceso de obtención del PLA desde el proceso de fermentación hasta la polimerización que lleva a cabo la empresa Nature Works, filial de la multinacional Cargyll-Dow.

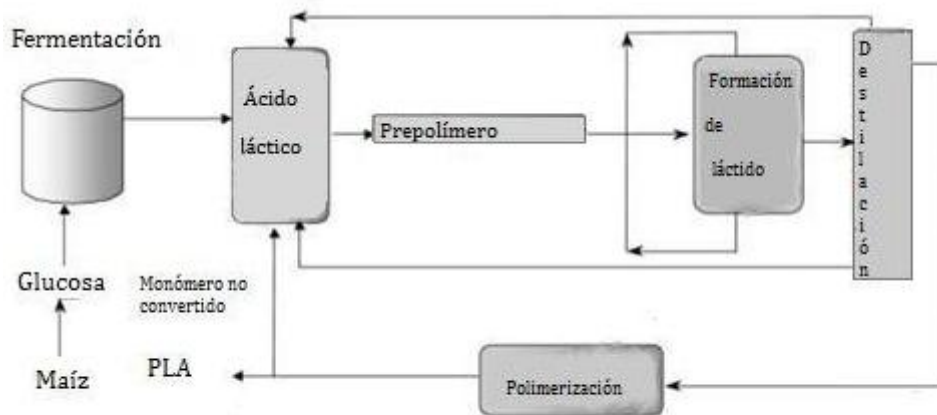


Figura 6. Esquema de la producción industrial del PLA³

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Llevar a cabo la síntesis enzimática de Poli-L-láctido en medio líquido iónico así como la caracterización del producto obtenido.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Observar el efecto de la concentración de monómero en la síntesis del polímero.
- Observar el efecto de la concentración de biocatalizador en la síntesis del polímero.
- Observar el efecto de la temperatura, en la síntesis del polímero.
- Observar el efecto del líquido iónico en la síntesis del polímero.
- Determinar el porcentaje de conversión del monómero en cada uno de los experimentos mediante $^1\text{H-RMN}$.
- Determinar los pesos moleculares de los polímeros mediante una cromatografía de exclusión de tamaños GPC/SEC.
- Caracterizar térmicamente a los polímeros obtenidos mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido DSC, para determinar la temperatura de transición vítrea de los polímeros así como los puntos de fusión.
- Caracterizar por difracción de rayos X en polvo las muestras obtenidas para determinar el porcentaje de cristalinidad en los polímeros sintetizados.

3. ANTECEDENTES

3.1 LIPASAS

Las lipasas son un tipo de enzimas que pueden actuar en medio no acuoso, son estables en medios de reacción tanto polares como no polares.

Estudios sobre las lipasas han demostrado que la activación de la enzima en un sistema de interfase resulta a partir de un cambio conformacional. El cambio en la conformación de la enzima se debe a un movimiento de “asa”, un fragmento en hélice con cerca de 20 aminoácidos, llamado “tapa” el cual sella o cierra el sitio activo de la enzima, evitando que las moléculas del sustrato puedan entrar. Sin embargo, esta tapa puede ser desplazada por un cambio conformacional y el sitio activo vuelve a ser expuesto al solvente y al sustrato. Todo esto fue demostrado con un estudio de cristalografía para observar las estructuras de las lipasa de *Rhizomucor miehei*.⁶

Las lipasas como proteínas, modifican su estructura dependiendo de las condiciones del medio en donde se encuentren. Este movimiento del asa es el que controla la actividad dependiendo del medio.

Las lipasas, pueden llevar a cabo dos tipos de reacciones, hidrólisis y esterificación, siempre dependiendo del contenido de agua en el medio. En este caso el agua juega un papel importante ya que no sólo sirve para mantener una estructura enzimática, sino también forma parte de los productos y reactivos de la reacción, por lo que interviene en el equilibrio y por lo tanto en la cinética de la reacción. Esto se explicará mas adelante con el mecanismo de la reacción para la síntesis del polímero vía enzimática.

3.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y SITIO ACTIVO

Se ha observado en estudios relacionados con la inhibición de lipasas por inhibidores de serina proteinasa, que el residuo de serina, es el encargado de llevar directamente la catálisis. Además basándose en la inhibición de actividad por medio de modificación química, las lipasas han sido clasificadas en serina hidrolasas. Estas enzimas tienen una secuencia en común GX SXG, la cual cuenta como ya se mencionó con un residuo de serina (Figura 7) y donde X representa cualquier tipo de aminoácido. En adición a esto otros residuos como la histidina y algún aminoácido ácido como el glutámico o el aspártico son requeridos para llevar a cabo la catálisis.⁶

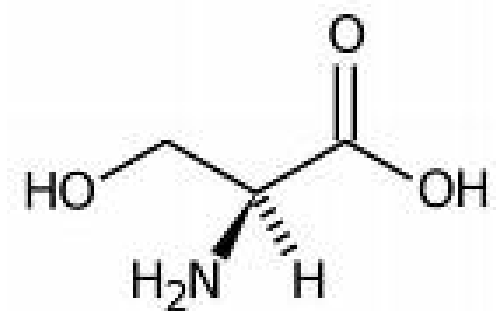


Figura 7. Estructura de la serina

Cabe mencionar que no todas las lipasas poseen la misma estructura, sino que ciertas características como la triada del sitio activo (Asp/Glu-His-Ser) es constante en la mayoría de las lipasas. Los estudios de cristalografía en diversos tipos de lipasas han demostrado que la estructura de éstas es una mezcla de beta plegadas en el centro rodeadas de un número de tapas de alfas hélices.⁶

El sitio catalítico de estas enzimas es cubierto por estas asas, las cuales impiden el acceso del solvente y del sustrato en la estructura nativa de la proteína. Un movimiento del asa expone el sitio activo de serina a una variedad de residuos hidrofóbicos al solvente y a los sustratos. Así este cambio conformacional incrementa la hidrofobicidad en la enzima en la vecindad del sitio activo. El cambio estructural o los movimientos del flap son iniciados por asociaciones con un sustrato o con la interfase del sustrato.⁶

3.3 APLICACIONES DE LIPASAS EN MEDIOS MICRO ACUOSOS.

Los sustratos de las lipasas en la naturaleza, como el mismo nombre de la enzima lo dice, son lípidos. Por su estructura los sustratos de éstas son insolubles en agua, esto ha llevado a experimentar con enzimas en medios no acuosos; en donde regularmente, los más usados han sido hexano, tolueno butanol y propanol, principalmente.

En reacciones de esterificación, las lipasas, son más activas en solventes inmiscibles al agua, ya que los solventes orgánicos miscibles en agua extraen la poca cantidad de agua que mantiene hidratada a la enzima, así la enzima pierde su estructura terciaria y por lo tanto su actividad.⁶

Las lipasas requieren de cierta cantidad de agua necesaria para su actividad. El estado de hidratación de las enzimas juega un papel importante, se requiere una cantidad mínima de agua para mantener la estructura terciaria de la proteína y así conservar su actividad. Por lo tanto, se requieren solventes orgánicos que permitan tener la cantidad de agua suficiente rodeándola.

Una de las ventajas más importantes de usar solventes orgánicos en las reacciones de esterificación es que el agua contenida puede ser controlada. A un a_w superior al 0.01 se ve favorecida la reacción de hidrólisis, mientras que a a_w menores al 0.0001 se previene la hidratación total de la lipasa reduciéndose así la actividad catalítica. Por lo tanto, a niveles de agua entre estos dos extremos se encuentra el a_w óptimo para las reacciones de esterificación.⁷

3.4 INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS.

Las ventajas de las enzimas inmovilizadas comparadas con las enzimas libres son varias, la más importante es la reusabilidad. La inmovilización de éstas facilita la separación de la enzima de los reactantes y de los productos, regularmente mediante una simple filtración. Otra ventaja no menos importante son los bajos costos, ya que estos biocatalizadores suelen producirse comercialmente, puesto que recientemente ha habido un notable incremento en su uso.

Los métodos de inmovilización son muy variados, pueden ser por métodos químicos donde la unión es a través de enlaces covalentes, o físicos por medio de adsorción en sólidos o atrapamiento en redes tridimensionales en matrices de gel o micro cápsulas.

Un factor importante en la inmovilización de las enzimas, es el material en el que éstas se inmovilizarán. Pueden ser de dos tipos: hidrofílicos e hidrófobos. Dentro de los primeros se incluyen celita, sílica gel, carbón activado y sefarosa, mientras que los hidrófobos son: polietileno, poliestireno y acrílicos. Cabe mencionar que dependiendo del tipo de reacción se elige el soporte adecuado para la enzima. Para el caso de las lipasas, los materiales adecuados para la inmovilización son los hidrófobos, ya que los hidrofílicos provocan una alta pérdida de actividad debida a los cambios de conformación de la lipasa, debido a que absorben la poca agua que hay en el sistema y que necesita la enzima para tener la conformación adecuada para su actividad, así como también impiden el acceso de sustratos hidrofóbicos.⁶

Otro factor importante en las enzimas inmovilizadas es la transferencia de masa, es decir a la capacidad del sustrato de difundirse a través del fluido dentro de la superficie y los poros de la estructura de soporte de la enzima para así llevar a cabo la catálisis. La difusión puede verse influenciada por varios factores, como el tamaño del poro de la estructura del soporte y su profundidad, así también como la solubilidad del producto obtenido.

3.5 PROPIEDADES GENERALES DE LOS LI

Una área concurrente en la investigación en biotecnología es la biocatálisis en medios no convencionales, implicando sistemas de reacciones con un contenido de agua reducido, como por ejemplo solventes orgánicos (hexano, tolueno, ciclohexano) o fluidos supercríticos por ejemplo el SC-CO₂. Sin embargo, el trabajar con solventes orgánicos puede resultar peligroso, por su toxicidad, por ser inflamables, y como estos líquidos son altamente volátiles, no se pueden utilizar a temperaturas altas a condiciones normales de presión atmosférica, por ellos una alternativa son los LI (líquidos iónicos).⁸

Los LI son sales orgánicas, es decir, están compuestos por iones, las cuales son líquidos a temperatura ambiente (Figura 8). Las principales propiedades que los hacen excelentes medios de reacción son: no son inflamables, debido a su baja presión de vapor no son volátiles y tienen una gran estabilidad térmica.

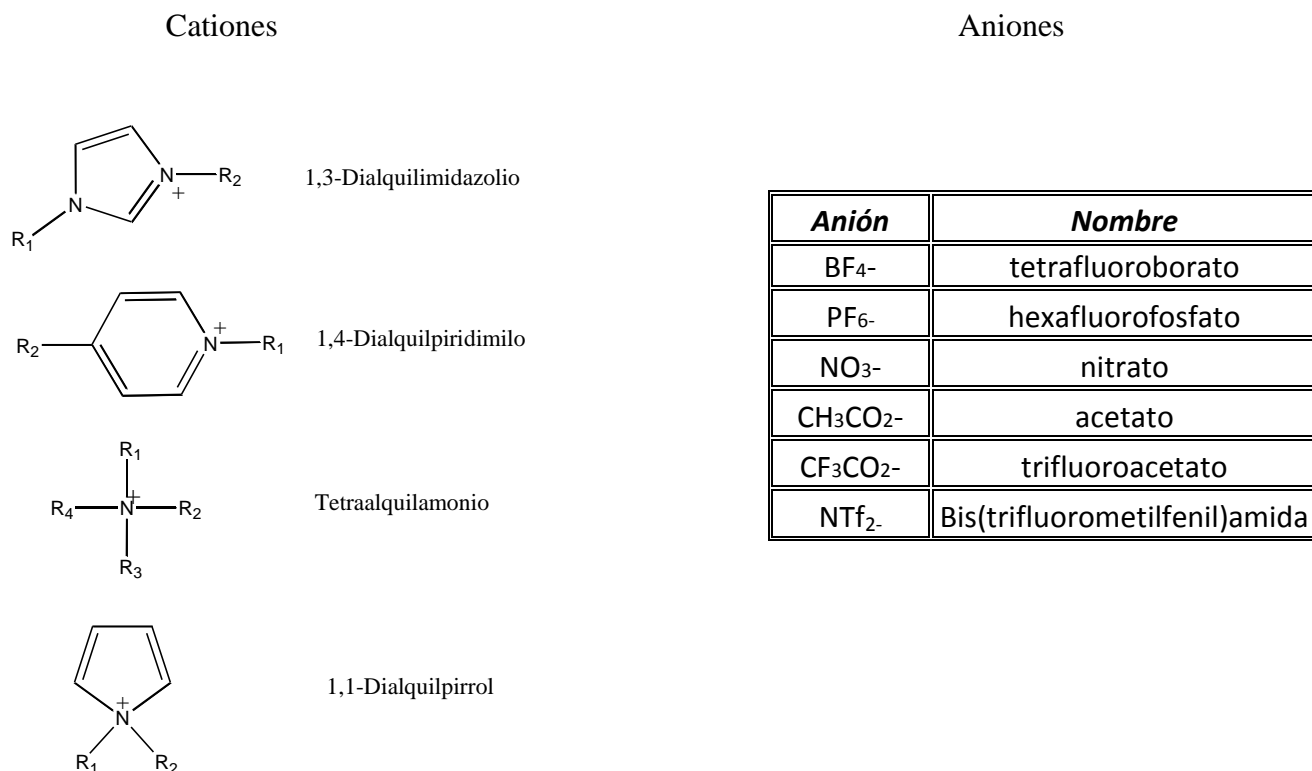


Figura 8. Estructuras típicas de los LI usados comúnmente en biocatálisis.

Una de las principales propiedades de los LI es su alta polaridad, la polaridad de estos compuestos es muy similar a la que presentan los alcoholes de bajo peso molecular como el metanol. Existe una correlación entre el tamaño de cadena de los grupos alquilo en el catión y el tamaño del anión, entre más grande sea el anión y mas grandes las cadenas de los grupos alquilo la polaridad será menor y viceversa.⁹

Independientemente de la polaridad, muchos de los LI son hidrofóbicos, pueden llegar a disolver hasta 1 % de agua, aunque la solubilidad del agua en LI varía impredeciblemente. Por ejemplo se tienen 3 LI con el mismo catión BMIM (1, 3 Butilmetilimidazolio) (Figura 9), con diferentes aniones: $-\text{BF}_4^-$, $-\text{PF}_6^-$, $-\text{NTf}_2^-$. Aunque los tres LI poseen la misma polaridad, su miscibilidad con el agua es completamente diferente. El $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ es completamente miscible en agua, $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ tiene una miscibilidad del 1.14% y $[\text{BMIM}][\text{NTf}_2]$ tiene una miscibilidad del 0.13%.¹⁰

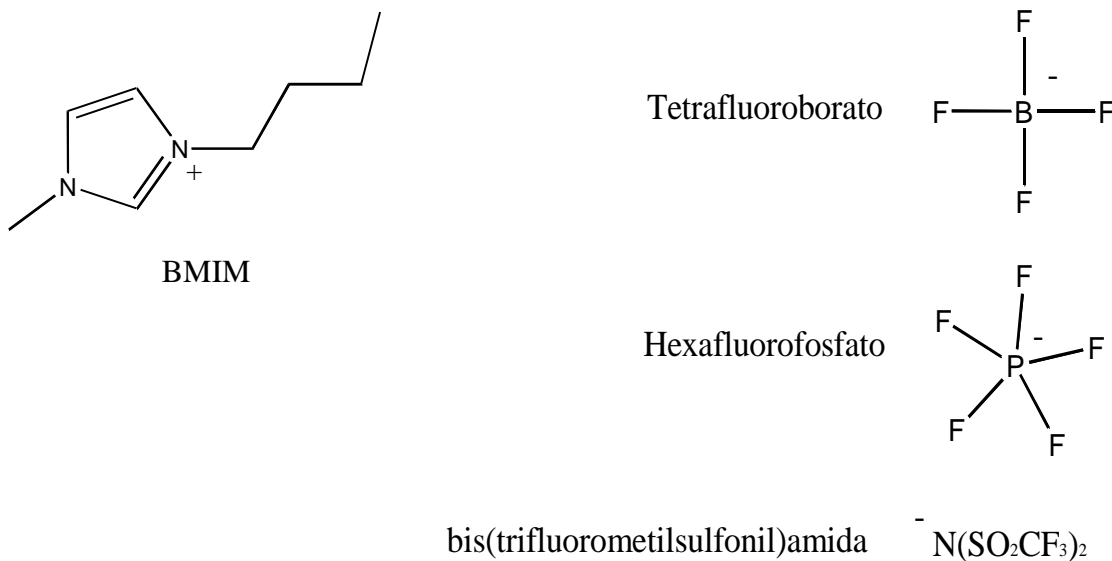


Figura 9. Estructuras de aniones y catión de LI

Aquí se observa una tendencia, en cuanto más grande es el tamaño del anión su miscibilidad con el agua disminuye.

Por otro lado, generalmente los LI son inmiscibles con muchos solventes orgánicos, especialmente con los no polares, como el hexano, mientras que pueden ser miscibles con solventes más polares como el diclorometano, cloroformo o tetrahidrofurano.¹⁰

Una característica en contra de los LI comparando con los típicos solventes orgánicos comunes, es que los LI son mucho más viscosos. Mientras que el rango de viscosidad de los LI se encuentra entre 35 – 500 cP, la viscosidad de los solventes orgánicos, como ejemplo el tolueno es mucho menor con un valor de 0.6cP a 25°C.¹⁰

La viscosidad de un líquido iónico, se debe a la formación de enlaces de puentes de hidrógeno, por lo que estas interacciones pueden verse disminuidas con un incremento en la temperatura o por la adición de algunos solventes orgánicos.¹¹

Una de las ventajas del uso de LI sobre el uso de los solventes orgánicos comunes, es que las propiedades físicas de los LI vistas anteriormente como la viscosidad, la polaridad, la hidrofobicidad, pueden ser modificadas, combinando el tipo de catión, el tipo de anión o los grupos sustituyentes.¹⁰

Entre más largas sean las cadenas de los sustituyentes, la polaridad será menor, la viscosidad aumentará al igual que la hidrofobicidad y viceversa, cuando la cadena de los sustituyentes es menor, la polaridad es mayor y la viscosidad e hidrofobicidad disminuyen.¹² (Figura 10).

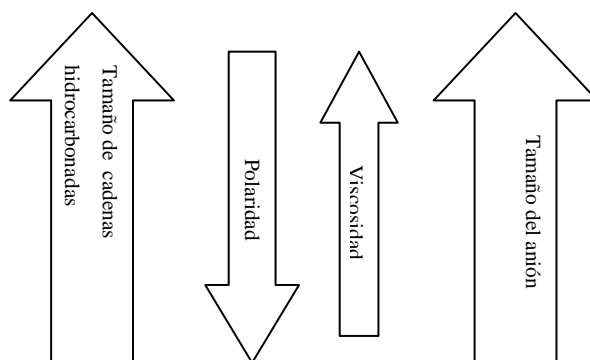


Figura 10. Relación entre polaridad, tamaño del anión, polaridad y viscosidad.

3.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LI

3.6.1 EFECTO DE LAS PROPIEDADES DISOLVENTES DE LOS LI

Muchas investigaciones han reportado la actividad enzimática de una gran variedad de enzimas en distintos LI, los resultados que se han encontrado demuestran que la actividad enzimática encontrada en estos medios es comparable con la observada en los medios orgánicos convencionales e incluso ésta tiende a ser más alta.¹²

En un estudio realizado, se comparó la actividad enzimática de la CALB y de la alfa quimiotripsina en la síntesis de butil butirato y del éster N-acetil-L-tirosina propílico respectivamente, con solventes orgánicos convencionales como: 1-butanol, hexano y 1-propanol, con diferentes LI.⁸ (Figura 11).

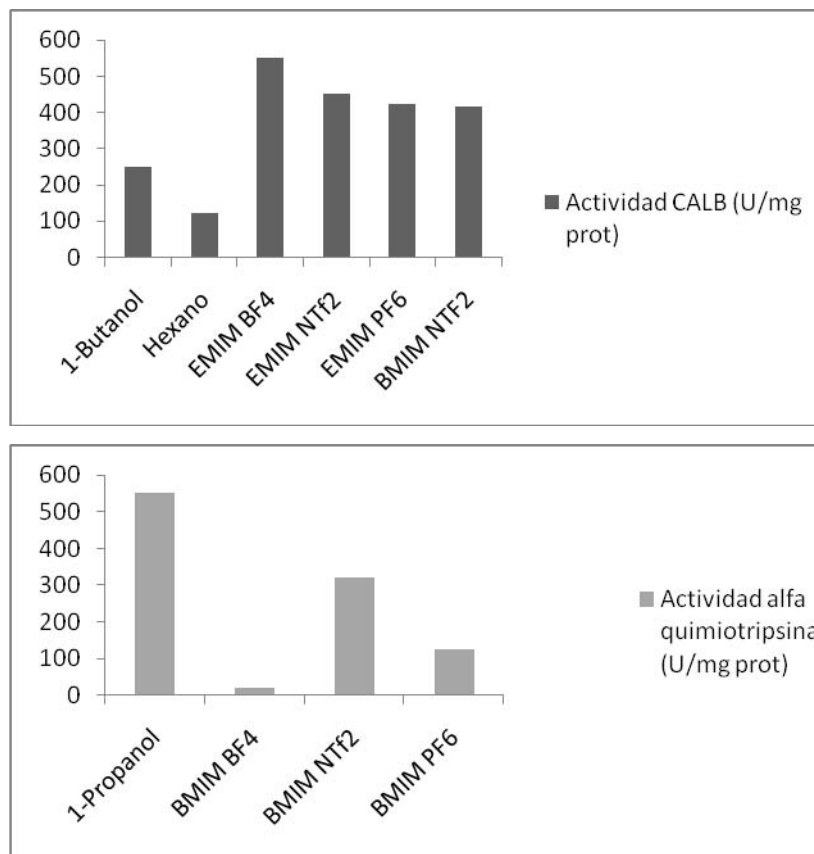
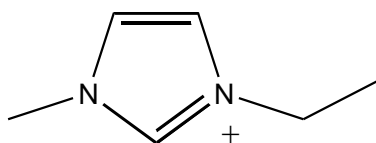


Figura 11. Actividad enzimática de la alfaquimiotripsina y la CALB.⁸

En la figura 11 se muestra una mayor actividad enzimática en [EMIM][BF₄] (estructura del catión EMIM, Figura 12) que en los medios orgánicos convencionales, mientras que en el resto de los LI, [EMIM][NTf₂], [EMIM][PF₆], [BMIM][NTf₂], se muestra un actividad ligeramente menor al valor más alto, esto en la reacción de síntesis del butil butirato con la CALB, mientras en la síntesis del éster N-acetil-L-tirosina propílico, la actividad enzimática se ve favorecida en el 1-propanol y solo en el [BMIM][NTf₂] se observa una actividad significativa.⁸



EMIM 1,3-etilmetilimidazolio

Figura 12. Estructura del catión.

La enzima modifica su estructura terciaria de acuerdo a las interacciones que tiene con el medio que lo rodea, por lo que ciertos solventes modifican la estructura de la enzima alterando el sitio catalítico disminuyendo así la actividad enzimática. En ciertos solventes como los LI, para el caso de la transesterificación catalizada por la CALB, se logra mantener la estructura terciaria adecuada para no alterar el sitio catalítico, permitiendo así la catálisis.¹³

Por otro lado la viscosidad en los medios de reacción puede afectar también la actividad enzimática por el efecto de la transferencia de masa, por lo que se esperaría una disminución en la velocidad de reacción en LI de alta viscosidad. En el mismo estudio realizado anteriormente, se observó una disminución en la actividad enzimática con el incremento de la viscosidad en el medio para el estudio de la quimiotripsina llevado a cabo en dos LI [EMIM][NTf₂] y [MTOA][NTf₂], con viscosidades de 34 y 574cP respectivamente.⁸

En conclusión, la relación entre el solvente en este caso, los LI con la actividad enzimática, parece ser mayormente afectada por la viscosidad que por la polaridad de los LI. Primero la polaridad de los LI varía en un rango más corto de

0.6-0.7 a comparación de la variación que existe en la viscosidad que como ya se mencionó está en un rango mayor.^{8,14}

3.6.2 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA EN LI

Las enzimas muestran actividad catalítica en los LI normalmente sin haberse disuelto. Sin embargo las enzimas que si se solubilizan en LI presentan, en algunos casos, una disminución de la actividad catalítica. Un ejemplo de esto son los datos reportados de la termolisina en $[BMIM][PF_6]$, en donde la enzima se disuelve en una cantidad de 3.2mg/mL (Figura 13), sin embargo no se observa una actividad enzimática hasta que la cantidad de enzima sobrepasa esta cifra, es decir la enzima esta activa sólo cuando no está soluble el medio.¹⁵

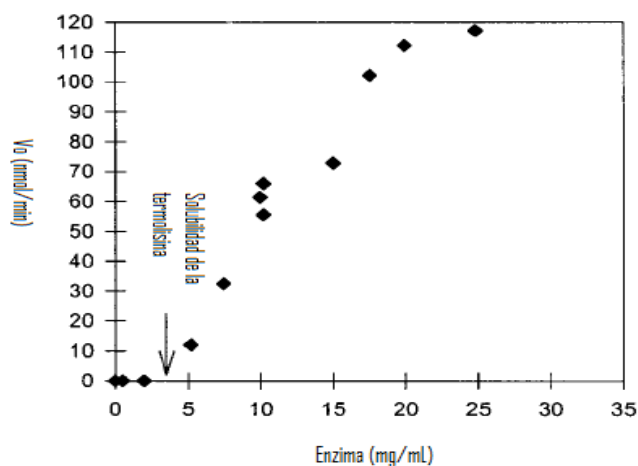


Figura 13. Actividad catalítica de la termolisina en función de la solubilidad en la formación del Z Aspartame.¹⁶

Por otro lado otros LI $[BMIM][NO_3]$, $[BMIM][lactato]$ y $[EMIM][EtSO_4]$ lograron disolver la CALB y de igual forma que en el caso anterior la enzima se inactivó totalmente.¹⁶

La cantidad de enzima desactivada es resultado de la desnaturalización de la estructura terciaria de la proteína, pero esta desnaturalización puede ser reversible, ya que al redisolverse en agua estas pueden recobrar su actividad.

La desnaturalización de la estructura de una proteína en un LI está presumiblemente relacionada con la naturaleza de los iones. Los aniones o cationes pueden interactuar con los grupos cargados de la enzima, ya sea en el sitio activo o en la periferia, causando cambios en la estructura proteica.¹⁰

El papel de los aniones es crucial en este aspecto, las enzimas son usualmente activas en LI que contienen BF_4 , PF_6 y NTf_2 , pero inactivas en líquidos cuyos aniones son NO_3 , CH_3CO_2 , CF_3CO_2 , y CF_3SO_3 . Existen dos posibles explicaciones a estas diferencias. La primera es que la enzima es compatible con aniones que muestran una baja tendencia a formar puentes de hidrógeno, lo cual minimiza la interferencia de los enlaces de hidrógeno internos que ayudan a mantener la estructura terciaria de la proteína.¹² Segundo que la enzima es compatible con los aniones poco nucleofílicos, lo que disminuye la tendencia de cambiar la estructura terciaria de la proteína por la interacción con sitios cargados positivamente en la proteína.¹⁶

3.6.3 TOXICIDAD DE LOS LI

Los LI como ya se mencionó poseen las características que los hacen aptos como solventes verdes, es decir que su potencial de contaminar es bajo, ya que son no volátiles, térmicamente estables y pueden ser reciclados. Sin embargo, hay otra característica que se tiene que analizar para comprobar que verdaderamente podemos usar estos solventes como verdes y es su toxicidad.

Los estudios reportados sobre la toxicidad de los LI como tales son muy pocos, no obstante se han llevado a cabo biotransformaciones en las cuales se han empleado células completas, en medios cuyo catión es un anillo de imidazolio. Como por ejemplo la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de

glucosa utilizando una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, usando al líquido iónico como un solvente de extracción en un sistema bifásico, para una remoción constante del material insoluble en agua producido durante la fermentación. Aunque los microorganismos se desarrollan en el medio acuoso, no se ven afectados por la extracción llevada a cabo con el LI. ⁸

3.7 POLIMERIZACIÓN VÍA APERTURA DE ANILLO.

Este tipo de síntesis es el más usado para producir poliésteres, este método está basado en el uso de lactonas, que al abrir anillo a través de un catalizador desencadenan la reacción de polimerización. Algunos ejemplos de lactonas que han sido utilizadas para sintetizar polímeros biodegradables por medio de este sistema son: ϵ -caprolactona, δ -valerolactona, glicólido (Figura 14), etc.

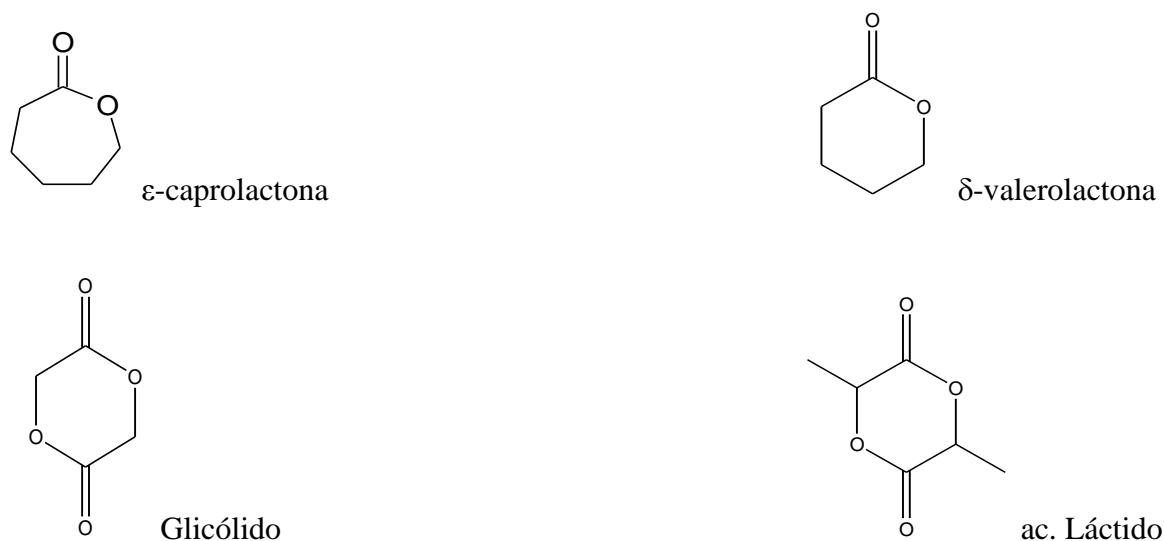


Figura 14. Monómeros utilizados para las síntesis de polímeros por la apertura del anillo

Este tipo de síntesis es catalizada normalmente utilizando sales inorgánicas, la síntesis puede ser llevada a cabo de tres formas diferentes: vía catiónica, por mecanismos de coordinación, como ya se explicó anteriormente y vía aniónica.

El mecanismo enzimático propone dos rutas una vía polimerización aniónica (Figura 15), como se muestra a continuación:

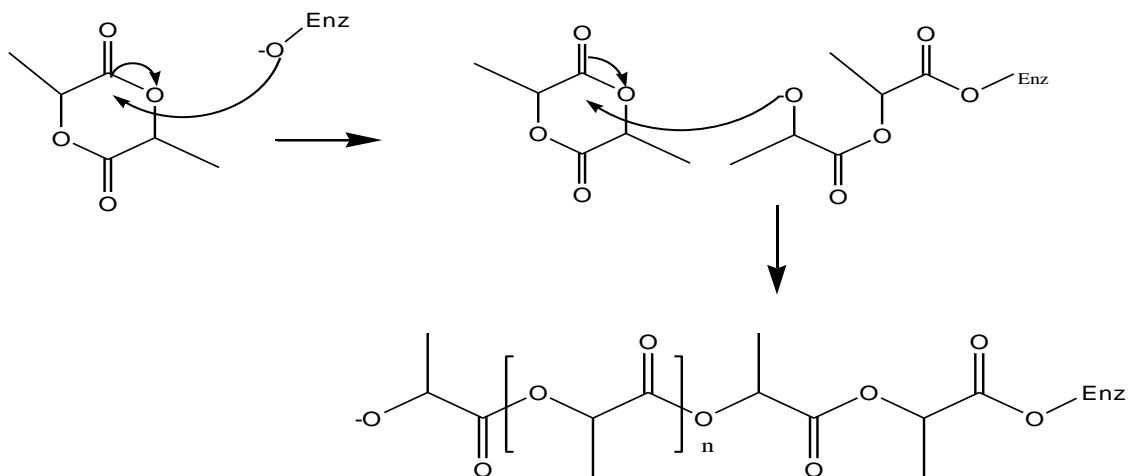


Figura 15. Mecanismo enzimático polimerización vía aniónica.

El residuo serínico de la enzima ataca al carbonilo, el anillo se abre y el oxígeno queda cargado negativamente y éste hace un ataque nucleofílico a un grupo carbonilo de otra molécula de ac. láctido iniciándose la propagación.

Las lipasas en su sitio activo poseen un residuo del aminoácido serina, que mediante una serie de reacciones se desprotona al grupo OH del residuo del aminoácido formándose un anión altamente nucleofílico, que ataca al carbonilo del anillo del láctido abriendo el ciclo. Posteriormente se presenta un ataque por parte del agua al carbonilo liberándose así la estructura abierta, es decir, el dímero del ácido láctico, de la enzima (Figura 16).

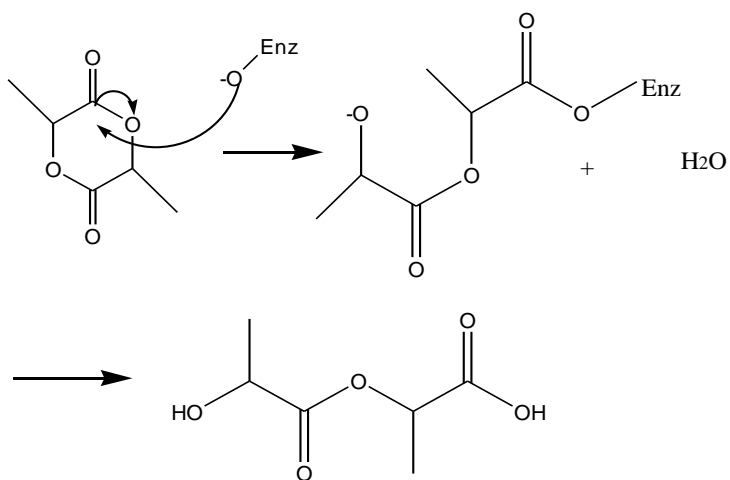


Figura 16 Apertura del anillo vía enzimática

Una vez abierto el grupo hidroxilo del ácido láctido, éste puede hacer un ataque nucleofílico al carbonilo de otro complejo acil-enzima, formándose el enlace éster e iniciando la polimerización (Figura 17). Cabe mencionar que para que se lleve a cabo la reacción de la apertura del anillo se requiere de una pequeña cantidad de agua, esta agua es suficiente con la que está atrapada en el sitio catalítico, además tras cada reacción de condensación se produce una molécula de agua aumentando así el agua en el sistema y favoreciendo la reacción inversa, es decir la hidrólisis del polímero.

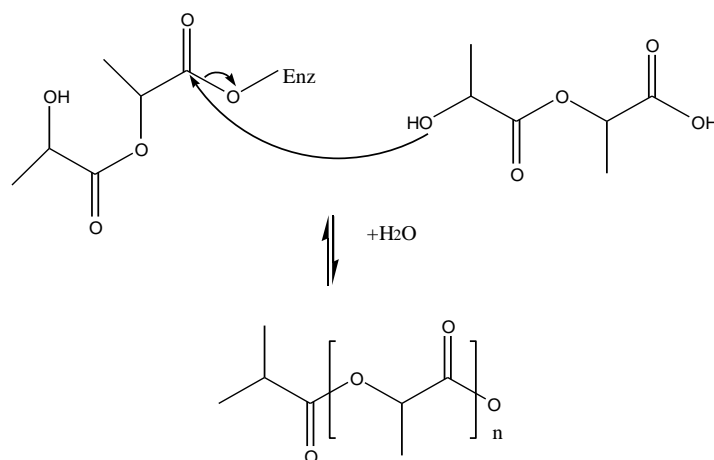


Figura 17. Polimerización vía enzimática por esterificación

3.8 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PLA EN MASA

Shuichi Matsumura y colaboradores en el año de 1997 en la Universidad de Keio (Japón) fue quien primero demostró que la síntesis polimérica del ácido láctido podía ser catalizada enzimáticamente. El realizó esta síntesis en masa, es decir en ausencia de disolvente (Figura 18). El probó con 4 enzimas diferentes a distintas temperaturas, empleando los 3 tipos de isómeros del ácido láctido, durante un tiempo de reacción de 7 días.¹⁷

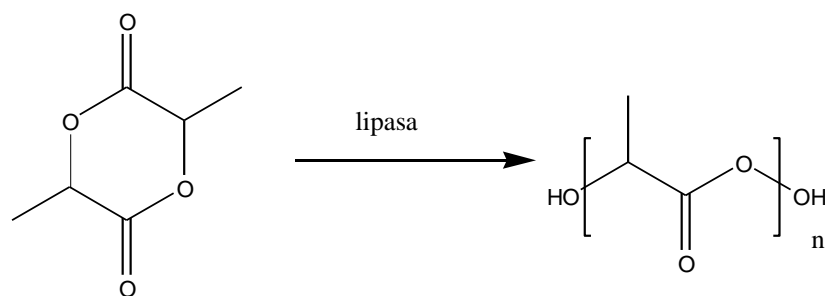


Figura 18. Reacción vía apertura del anillo, por catálisis enzimática.

De las 4 enzimas que se emplearon, se encuentra la que se usó para la investigación, las otras tres fueron: la lipasa pancreática de porcino, la lipasa de *Candida cylindracea* y la Proteinasa K. Cabe mencionar que las 3 enzimas a pesar de ser comerciales no son inmovilizadas como la CALB en su forma comercial Novozym 435®.

Los resultados que arrojó la investigación de Matsumura y colaboradores, demostraron que las mejores condiciones para obtener un alto peso molecular, y con un 100% en la conversión del monómero en la forma abierta, fueron utilizando la lipasa pancreática de porcino a una temperatura de 130°C con solo 3% de enzima. En estas condiciones se obtuvieron utilizando el isómero D, mientras que al utilizar el isómero L, el porcentaje de conversión no fue total, incluso al utilizar un 10% de concentración de enzima, cabe mencionar que el autor no se reportó rendimientos de masa del polímero obtenido, sólo rendimientos de conversión del monómero.¹⁷

Al emplear la Novozym 435®, Matsumura encontró, que esta enzima no era capaz de convertir el monómero a su forma abierta, utilizando el isómero L, a una temperatura de 80°C durante 7 días de reacción.

Se concluyó entonces que era posible realizar una catálisis enzimática en la polimerización y que la Novozym 435® a las condiciones especificadas no era capaz de catalizar la reacción.

Por otro lado, Fujioka reportó recientemente que el LLA puede ser polimerizado en masa, es decir en un medio libre sin disolvente, con el LLA fundido a una temperatura de 100°C. El LLA funde a una temperatura de 92°C¹⁸

(Figura 19). Como catalizador se usó la misma enzima, que se utilizó en este proyecto.

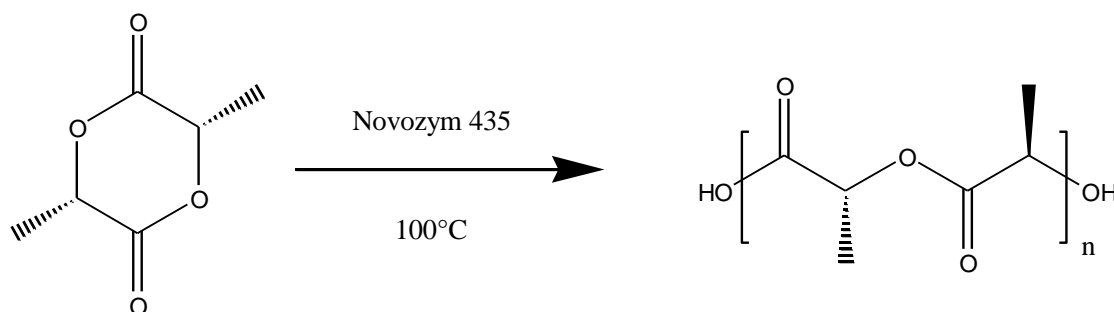


Figura 19. Síntesis en masa del poli-L-láctido

Cabe mencionar que Fujioka llevó a cabo la experimentación, entre los resultados obtenidos se demostró, que los rendimientos obtenidos a partir del porcentaje de la apertura del anillo, determinado por ^1H RMN. Fujioka y colaboradores encontraron un máximo del 91% en conversión del monómero empleando enzima a los 10 días de reacción. Mientras que la misma reacción llevada a cabo sin enzima muestra un máximo de 72% a los 7 días.¹⁸

Para observar el efecto enzimático se realizó un blanco, donde se obtuvo un 72% de conversión en la misma reacción a 7 días sin enzima, mientras que con enzima a los 7 días el porcentaje de conversión fue del 87%, (véase Tabla 1)¹⁸. Esto demuestra que la catálisis enzimática es casi nula, no hay un gran efecto enzimático en la síntesis del polímero, sumando a esto, pesos moleculares promedios bajos de alrededor de 2000 g/mol (los más altos), por lo que se concluyó que la síntesis que se lleva a cabo es mayormente inducida por la alta temperatura de la reacción.

Tabla 1. Resultados polimerización en masa de Fujjioka¹⁸.

Enzym %	Tiempo de reacción (días)	Rendimiento %	Mn	Mw/Mn
6	1	26	550	1.2
6	2	27	710	1.1
6	3	47	1040	1.4
6	4	59	1120	1.6
6	5	64	1260	1.7
6	6	73	1560	1.6
6	7	87	1820	2.1
6	8	84	2060	1.8
6	9	90	2190	2.1
6	10	91	2440	2.6
-	1	0	-	-
-	3	27	710	1.6
-	6	67	1250	2.0
-	7	72	1550	2.1

Huijser y colaboradores obtuvieron resultados semejantes al llevar a cabo la síntesis de un co-polímero basado en ácido láctido y glicólido, ellos también obtuvieron rendimientos en ausencia de catalizador, esto fue atribuido a una posible catálisis catiónica llevada a cabo por trazas de hidroxiaácidos presentes en el monómero, es decir ácido di-láctico o di-glicólico, que a temperaturas altas son capaces de abrir los anillos de lactonas, esto se explicara mas a detalle en los apartados 5.3 y 5.4.¹⁹

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

- Novozym 435, lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina porosa de acrílico, donada por Novozymes México.
- (L,L) Láctido (3S, (cis)-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona, con un 98% de pureza comprado en Aldrich. Fue purificado por medio de una recristalización en metanol.
- HMIMPF₆ 1-Hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, de pureza >97%, comprado en Aldrich.
- BDMIMPF₆ 1-butil-2,3-dimetilimidazolio hexafluorofosfato, de pureza >97% comprado en Fluka.
- Cloroformo, grado técnico, comprado en Química Barsa México.
- Metanol, grado técnico, comprado en Química Barsa México.
- DMSO Dimetil sulfóxido, grado espectrofotométrico, comprado en J.T. Baker México.

4.2 EQUIPO

- Baño de Glicerina
- Frascos viales de vidrio capacidad de 10mL.
- Parrilla con temperatura y agitación controlada. Ika RTC Basic ETS-D4 de 10 a 400°C.
- Agitador magnético.
- Balanza analítica. Balanza OHAUS Analytic Plus.
- Liofilizador Aeto FD10 CT6Oe
- Bomba de vacío.

- Congelador REVCO -78°C
- Matraz Kitasato capacidad de 1L.
- Equipo Millipore, con membranas de filtro de 0.45µm
- Tamiza Alfa Aesar. Numero de malla 400.
- Rotavapor Büch Rotavapor R-124 con Büch waterbath B-481.
- Bomba para disolventes. Vacuubrenel PZ3 con condensador de volátiles incorporado

Equipos para análisis:

GPC/SEC

- GPC-DMSO con PL-ELS-1000/Horno/ Bombas Marca HP1050.
- Inyector manual marca Rheodyne.
- Detector Evaporative light Scattering Detector PL-ELS 1000. Polymer Laboratories (US).

RMN

- Variant Unity INOVA (400MHZ). Servicio a cargo de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM).

RX

- Equipo Siemens D-5000, K α radiación de Cu, servicio a cargo de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM).

DSC

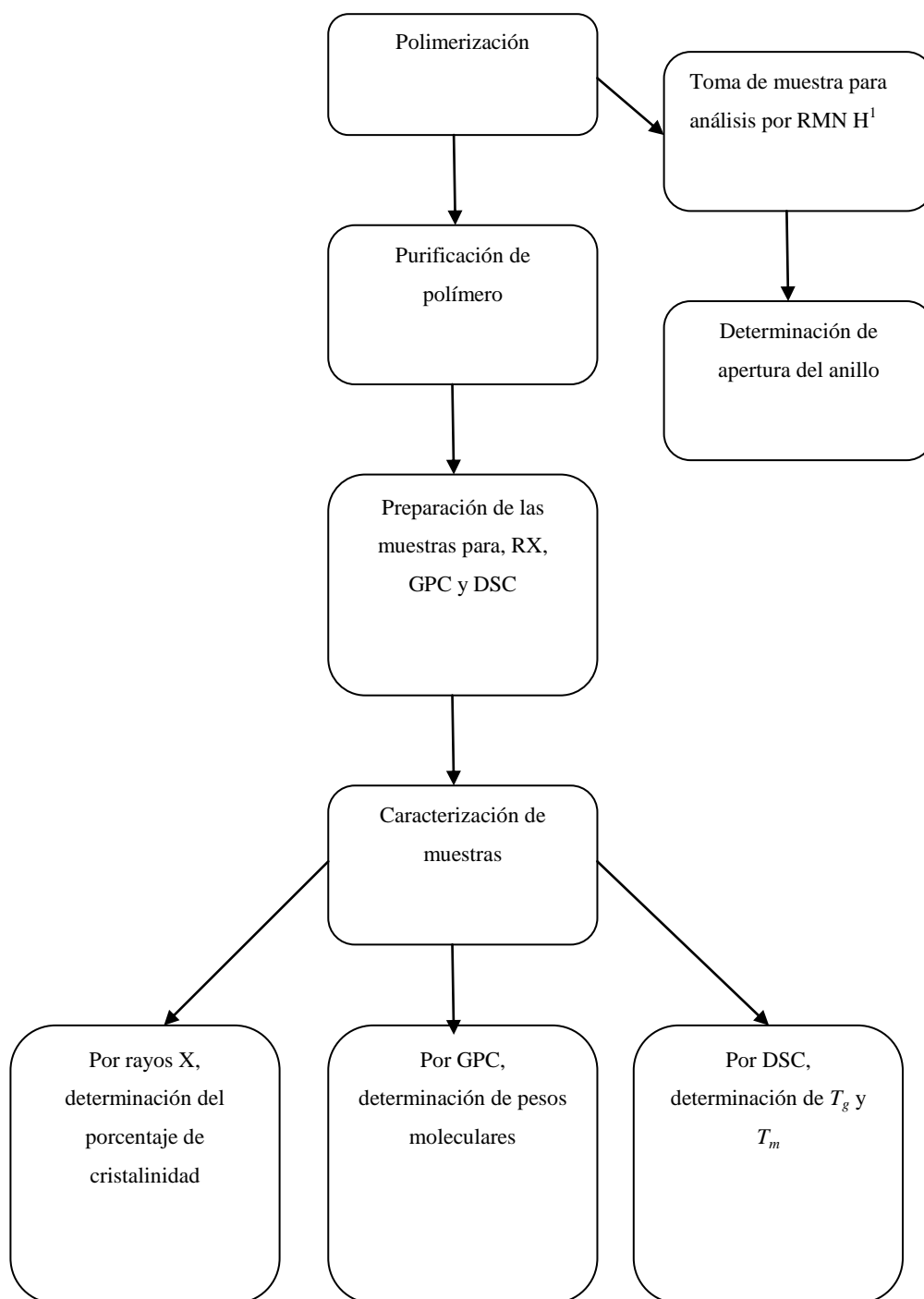
- Equipo Dupont DSC 2100, servicio a cargo de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM).

REÓMETRO

- Equipo ARES, RFS III TA Instruments, servicio a cargo de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM).

4.3 PROCEDIMIENTO

4.3.1 DIAGRAMA GENERAL



4.3.2 POLIMERIZACIÓN

- Se pesó para cada reacción en un frasco de vidrio de 10mL, la cantidad necesaria de LLA y de Novozym 435® en una balanza analítica, esto de acuerdo a las variables a evaluar. (véase Tabla 2).

Tabla 2. Variables en la Síntesis del polímero.

Líquido iónico	Temperatura	Concentración de LLA % p/p LLA/LI	Concentración de Enz % p/p Enz/LLA	Peso de LLA (g)	Peso de Enz (g)	Peso de LI (g)
HMIMPF6	90	70	10	3.5	0.3500	5
HMIMPF6	90	35	10	1.25	0.1250	5
HMIMPF6	90	35	15	1.25	0.1875	5
HMIMPF6	90	70	15	3.5	0.5250	5
HMIMPF6	65	70	10	3.5	0.3500	5
HMIMPF6	65	70	0	3.5	-	5
HMIMPF6	90	70	0	3.5	-	5
BDMIMPF6	90	70	10	3.5	0.3500	5
BDMIMPF6	90	70	0	3.5	-	5

- El frasco fue tapado, y se mantuvo a -78°C en un congelador (REVCO) por 2 horas, para posteriormente liofilizarse durante dos horas más.
- Al finalizar la liofilización se agregaron 5g de uno de los LI, junto con un agitador magnético al vial de 10mL.
- La mezcla de los reactivos se introdujo en el baño de glicerina, con la parrilla con agitación eléctrica y temperatura controlada.
- Los variables analizadas, durante 1,3,5 y7 días, con excepción de la reacciones a 65° que fueron evaluadas a 3,5,7 y 9 días, y el blanco realizado con [BDMIM][PF₆] que fue evaluado solo al séptimo día.

4.3.3 PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO

- Después de haber transcurrido el tiempo de reacción en cada una de los experimentos, los frascos se retiraron del baño de glicerina, y mediante lavados con cloroformo, se extrajo la mezcla del vial.
- La mezcla es filtrada a través de un tamiz de tamaño de malla 400, para retirar la enzima.
- Una vez retirada la enzima se eliminó el cloroformo en el rota-vapor y se tomó una pequeña muestra para análisis de RMN.
- Posteriormente se redisolvió la mezcla en cloroformo, 50mL aproximadamente, en un vaso de precipitado de 100mL se mantuvo en agitación constante hasta que todo el polímero se observó disuelto.
- Posteriormente la mezcla en cloroformo se precipitó en un volumen de 500mL de metanol, para obtener el polímero.
- El polímero se filtró en membranas (Millipore) de $0.45\mu\text{m}$, hasta que se obtuvo el producto seco.
- El polímero obtenido se volvió a disolver en cloroformo y a precipitar en metanol bajo las mismas condiciones, para eliminar las trazas de líquido iónico.

- El polímero fue secado en una bomba al vacío para disolventes durante 3 horas, para finalmente obtener el producto final, se pesó y se obtuvieron los rendimientos correspondientes para cada reacción multiplicando el peso final del producto por 100 y dividiendo entre la cantidad inicial de monómero.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

4.4.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS RMN H, RAYOS X Y ANÁLISIS TÉRMICO

El polímero fue pulverizado en un mortero, se tomaron muestras de 50mg, por cada una de las reacciones y para cada una de las pruebas realizadas.

Los análisis mencionados fueron a cargo Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM).

4.4.2 ^1H RMN

- RMN – Las muestras se disolvieron en DMSO, con un calentamiento previo para la disolución total del polímero, el análisis se realizó a una frecuencia de 400MHz.
- Se analizó el polímero para determinar su pureza, es decir que ya no existiera líquido iónico en la muestra.

Además también se analizó por medio de esta técnica la muestra de reacción que se tomó después de eliminar el cloroformo, como se indicó en la parte de purificación del polímero. Esto para determinar el porcentaje la conversión del

monómero a la forma abierta mediante la integración de las señales a 5.0ppm correspondiente al hidrógeno del metileno del monómero, es decir la forma cíclica y a 5.2ppm correspondiente al hidrógeno del metileno de las formas abiertas. ¹⁷

La integración de los espectros se realizó mediante el software MestreC .

I0 = Integración de la señal a 5.0ppm

I2 = Integración de la señal a 5.2ppm

%con = porcentaje de conversión del monómero a forma abierta.

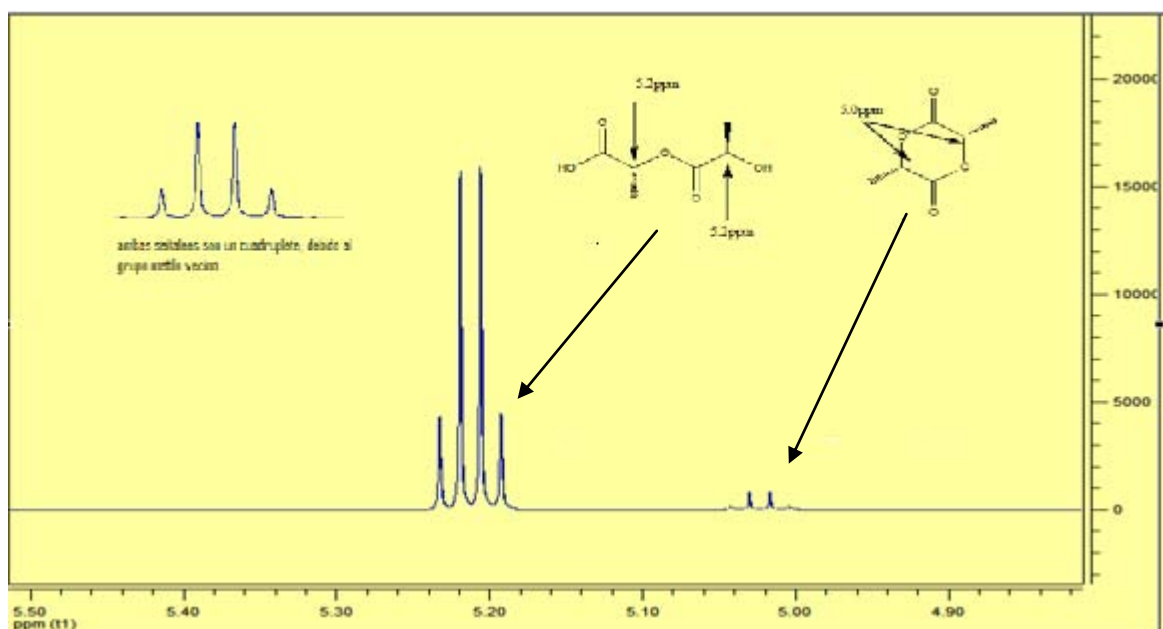


Figura 20. Señales correspondientes de las formas del láctido en el espectro de ¹H RMN.

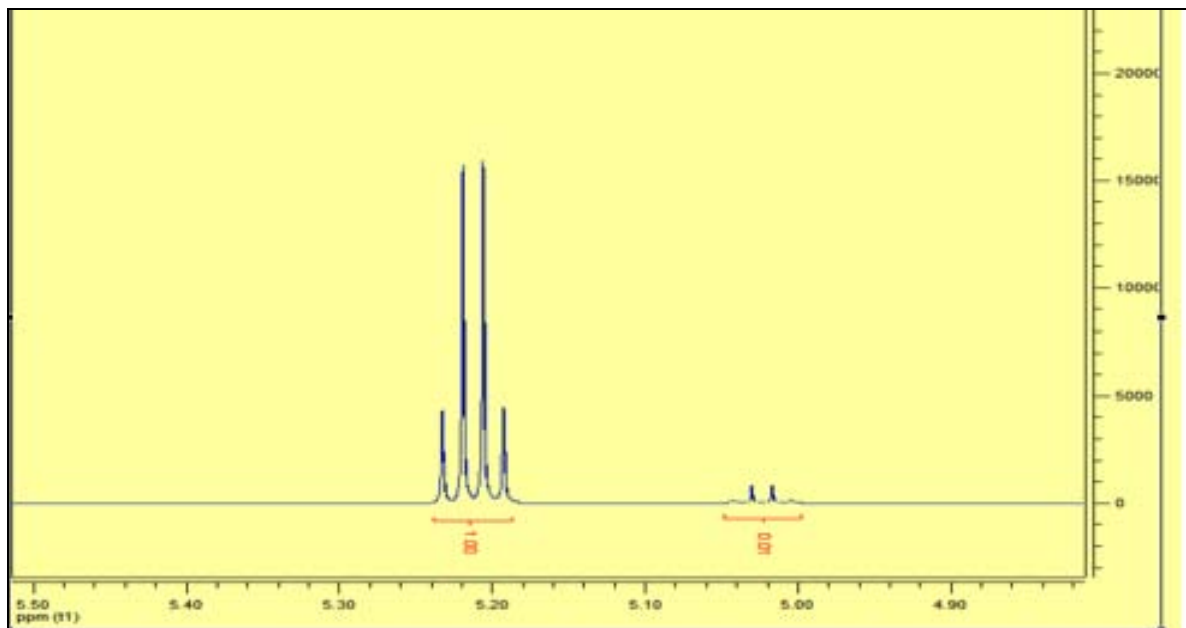
$$\%con = \frac{I2}{I0 + I2} \times 100$$

Ejemplo 1

Obsérvese la Figura 21.

$$\%con = \frac{1}{0.01 + 1} \times 100$$

$$\%con = 99\%$$



$\% con = 99\%$

Figura 21. Espectro RMN H1. Cinética a 65°C 70%LLA 10% enzima a 3 días

4.4.3 ANÁLISIS DE RAYOS X EN POLVO.

- Rayos X – Fue llevada a cabo en un equipo Seimens D-5000, K α radiación de Cu a $\lambda=1.5406$ Amstrogns.

- El porcentaje de cristalinidad fue obtenido en cada espectro integrando el área total de las zonas cristalinas.

El fundamento de esta técnica se basa en que cuando una muestra de material cristalino es irradiada con un haz de rayos X, el arreglo tridimensional cristalino dispersa la radiación electromagnética, de tal forma que las ondas dispersadas se refuerzan en ciertas direcciones mientras que en otras ocurren interferencias destructivas. Las direcciones en las que se refuerzan las ondas son características de la orientación del cristal y de las distancias interatómicas dentro de los cristales.²⁰

El fenómeno de dispersión se rige por la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

n = entero que denota el orden de fracción.

λ = longitud de onda de la radiación

θ = ángulo de incidencia y reflexión

d = espaciamiento entre planos de átomos que provocan la reflexión

h, k, l = índices de Miller

La determinación cuantitativa de cristales en una muestra se obtiene a partir de relaciones entre señales producidas por la parte cristalina y del halo de dispersión de la fase amorfa.²⁰

$$\alpha_{cr} = \frac{I_c}{I_c + I_a}$$

I_c = intensidad de dispersión de la fase cristalina

I_a = intensidad de dispersión de la fase amorfa

α_{cr} = Cristalinidad

Ejemplo 2

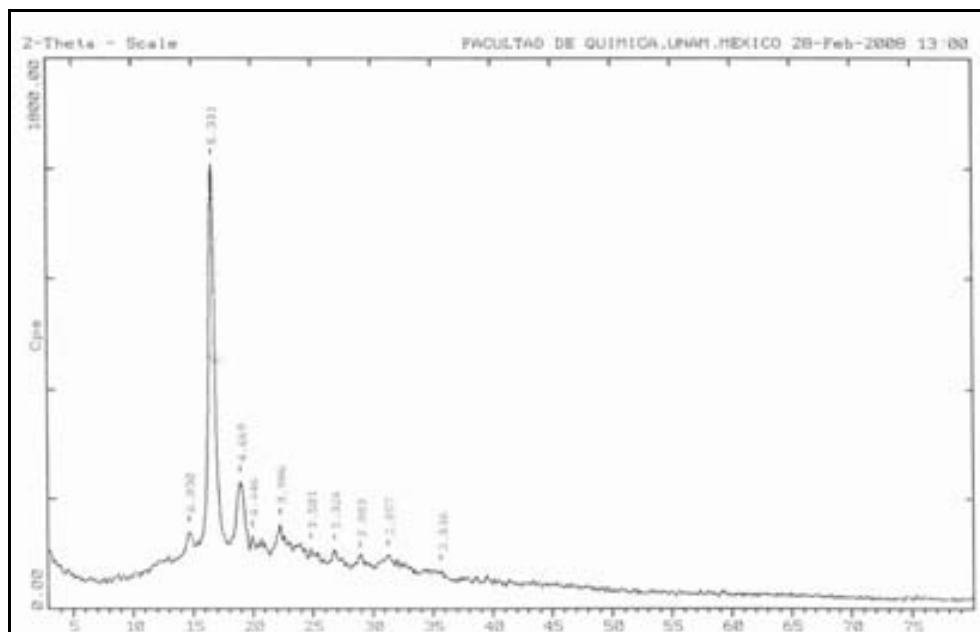


Figura 22. Análisis por difracción de rayos x de polvos, de muestra 90°C 70%LLA, 15% enzima, 7 días.

$$I_c = 1280.25$$

$$I_a = 2853.24$$

$$\alpha_{cr} = \frac{1280.25}{1280.25 + 2853.24} \times 100$$

$$\alpha_{cr} = 30.97\%$$

4.4.4 ANÁLISIS TÉRMICOS

- El análisis por DSC, fue llevado a cabo en un equipo DuPont DSC 2100 con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, bajo una atmósfera de nitrógeno hasta una temperatura de 0 a 300°C.

La calorimetría diferencial de barrido, conocida por sus siglas en inglés como DSC, es una técnica basada en comparar la energía liberada o necesaria para efectuar un cambio físico o químico en un compuesto, con un material de referencia. Es decir se monitorea la cantidad de calor necesaria para mantener las condiciones isotérmicas, en función del tiempo o de la temperatura, en nuestro caso fue en función de la temperatura.²¹

El T_g se entiende como la temperatura debajo de la cual un determinado polímero se comporta como un material vítreo y por arriba de la cual se comporta como un material elástico. Este concepto sólo es aplicable a materiales amorfos, ya que si el polímero tiene un alto grado de cristalinidad, este cambio puede ser no apreciable.

Se considera que a temperaturas muy bajas las cadenas polimérica solamente pueden moverse alrededor de posiciones determinadas. A medida que se eleva la temperatura de la muestra el movimiento es mayor hasta que al llegar a la T_g es

posible que se muevan secciones de la cadena y el material presenta un comportamiento elástico o similar al del cuero.

Las determinaciones de la T_g dependen tanto de la velocidad de calentamiento como de la historia térmica del material, es decir, de las condiciones de temperatura a las cuales haya sido sometida la muestra previamente.

Existen 3 teorías para explicar la T_g una de ellas se adecua a la explicación del por qué se puede detectar por la técnica de DSC, esta es la teoría de la relajación. En esta teoría se explica que segmentos de la cadena que se mueven de un estado energético a otro, estos segmentos requieren de la existencia de huecos o espacios vacantes que a su vez necesitan de una cierta energía para ser creados, por lo que se requiere absorber energía lo que es detectado por medio de la DSC observándose gráficamente un descenso en la línea inicial como se observará más adelante en el apartado de resultados y discusión.²¹

4.4.5 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR GPC/SEC

- El polímero fue pulverizado en un mortero y disuelto en 5mL de DMSO.
- Se calentó a una temperatura de 80°C para la disolución total del polímero, para filtrar en filtros de membrana de 0.45 μm antes de inyectar en el cromatógrafo.

Condiciones de GPC:

- Dos columnas PLGEL 10cm MIXED-B 300 x 7.5mm montadas sobre una columna en un termostato a 333.15K con elución de DMSO a una velocidad de 1mL/min a 333.15K y calibrado con estándares de polímero de polidispersibilidad estrecha (Pollulan, Varian).
- Detector de dispersión de luz PL-S 1000 (Polymers Labs, VARIAN).

La Cromatografía de Permeación por Gel (GPC), es un tipo de cromatografía sólido-líquido, que separa los polímeros en fracciones de diferentes pesos moleculares, a través de un gel de poli-estireno. El gel es la fase estacionaria y está formado por una red de orificios de diferentes tamaños por donde pasará el polímero disuelto en la fase móvil. Los polímeros de menor peso molecular tienen una mayor retención en la fase estacionaria y tardan más tiempo en salir.²⁰

Para explicar cómo funciona el detector, primero hay que explicar el fenómeno de dispersión de la luz, que es la forma en la cual se calcula el peso molecular. Al incidir un rayo de luz sobre una partícula está dispersa la luz en un ángulo diferente al incidente, la intensidad con que la luz es dispersada está directamente relacionada, con la forma y el tamaño de la partícula.

En la determinación de la media ponderada del peso molecular M_w de las moléculas de un polímero en una disolución, se mide la intensidad de la luz dispersada de una lámpara de arco de mercurio a diferentes concentraciones y diferentes ángulos.²⁰

Ahora bien, en esta técnica lo que se determina son dos tipos de pesos moleculares, estos son dos diferentes formas de promediar. Primero tenemos el peso molecular ponderal M_w que se define como:

$$M_w = \frac{\sum M_i W_i}{\sum W_i}$$

En donde W_i representa el peso de las especies i , cuyo peso molecular es M_i .

El otro peso molecular que se determina, es el peso molecular numeral, este se define como el peso total en gramos del polímero, dividido por el número de todas las especies que hay en el soluto.

$$M_n = \frac{W}{\sum N_i}$$

Que también puede expresarse de la siguiente forma

$$M_n = \frac{\sum N_i W_i}{\sum N_i}$$

El peso molecular M_w siempre será más grande que el correspondiente para M_n , en una mezcla heterogénea, es decir con polímeros de distintos pesos moleculares, cuando M_n y M_w son iguales implica que la mezcla es totalmente homogénea.

Por lo que el cociente de M_w y M_n nos da la medida del índice de polidispersibilidad mejor conocido como PDI.

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

Por lo que entre más grande sea este valor, la mezcla será más heterogénea y mientras se obtengan valores más cercanos a uno la mezcla será más homogénea.

Los resultados fueron generados automáticamente a través de un software acoplado al Software Cirrus, GPC (Versión para ChemStation).

4.4.6 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

- La viscosidad de los líquidos iónicos fue examinada en un rango entre 25° y 90°C en platos paralelos con diámetro de 25cm.
- El análisis corrió a cargo de la USAI-FQ-UNAM.

5. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

5.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTIDO

Experimentos llevados a cabo por Loeker y colaboradores, demostraron que la óptima polimerización de la ϵ -caprolactona se da con un 35% de monómero y un 10% de enzima.²²

Para llevar a cabo esta experimentación, se utilizaron inicialmente dos concentraciones diferentes de LLA, 35% p/p LLA/LI (tomando en cuenta los estudios anteriores) y 70% p/p LLA/LI (siendo el doble de la concentración inicial), con un 10% de enzima con respecto al peso del láctido.

Ambos estudios se llevaron a cabo a una temperatura de 90°C, temperatura a la que se demostró en estudios previos que la enzima aún posee actividad, así se disminuyó también la viscosidad del medio en este caso fue [HMIM][PF₆] a valores de 0.028Pa.s, valores relativamente bajos.

El primer efecto a observar fue rendimiento obtenido en cada una de las reacciones (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la concentración de LLA en rendimientos

RENDIMIENTOS %		
Tiempo (días)	35% p/p LLA/LI	70% p/p LLA/LI
1	<5	<5
3	8.5	28.8
5	8.1	49.1
7	20.8	63.2

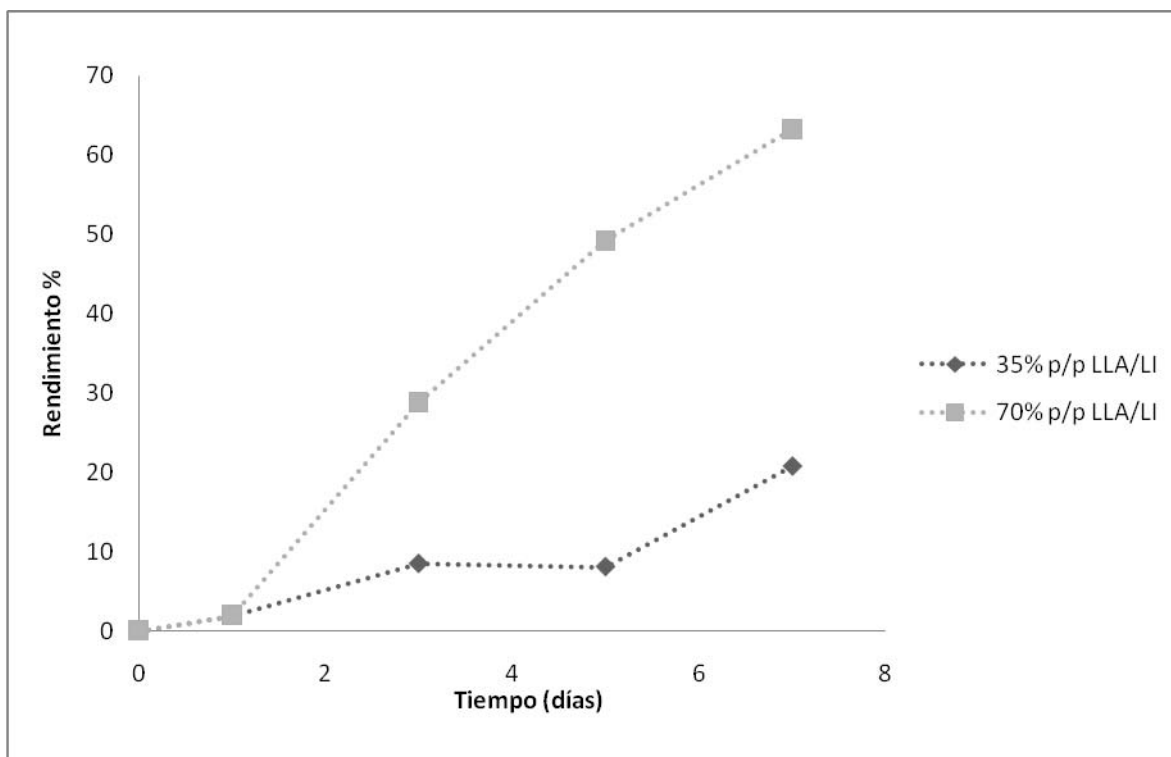


Figura 23. Efecto de la concentración de láctido en rendimientos

Como se puede observar (Figura 23), los rendimientos obtenidos con un 70% de LLA resultaron ser mayores, a partir del tercer día es cuando comienza a verse la diferencia con rendimientos 3 veces mayores a 70% que a 35%. Esto es atribuido a que, a mayor concentración de sustrato, la velocidad de reacción será mayor, obteniendo un mayor rendimiento. La mayor proporción de LLA en el medio aumenta la interacción entre las moléculas, lo que aumenta la cantidad de producto obtenido. Cabe mencionar que el análisis por ^1H RMN, de la apertura del anillo reveló que para ambos casos, desde el primer día prácticamente sólo se encontraron formas abiertas con un 98% de conversión.

Ahora al analizar incremento del peso molecular con respecto al tiempo se observó lo siguiente (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la concentración de láctido en pesos moleculares, en experimentos realizados con 70% p/p LLA/LI y 35%p/p LLA/LI , con 10% p/p Enz/LLA de biocatalizador con respecto al monómero.

Tiempo (días)	Mn (g/mol)		PDI	
	35% p/p LLA/LI	70% p/p LLA/LI	35% p/p LLA/LI	70% p/p LLA/LI
3	1400	2800	1.42	1.66
5	3300	3800	2.17	2.96
7	4400	37800	1.41	1.35

En la Figura 24 podemos observar para ambos casos un incremento del peso molecular con respecto al tiempo como era de esperarse, sin embargo a una concentración del 35% el peso molecular obtuvo su máximo a 4400 g/mol, mientras que a un 70% de concentración al séptimo día se obtuvo un peso molecular a 37800 g/mol, una notable diferencia entre ambos casos. Esto puede deberse a que en las últimas etapas de la cinética, es decir a partir del 5 día la enzima enlaza cadenas de polímeros u oligómeros que están en mayor concentración a 70%, obteniéndose así mayores rendimientos y un peso molecular mucho más alto.

Al analizar los resultados obtenidos del PDI (Figura 25), es decir del índice de polidispersibilidad, para el caso de 35%, se observa una tendencia directamente proporcional durante el 3 y 5 día; es decir se forman polímeros de diversos tamaños ocasionando un alto valor en el PDI, sin embargo al 7 día el valor disminuye debido a la formación de polímeros de un tamaño más uniforme. A la concentración del 70% se observa el mismo efecto, pero al haber una mayor cantidad de LLA, en el medio los valores de PDI son mayores; debido a que al haber una mayor concentración de LLA aumenta la cantidad de cadenas poliméricas de diferentes tamaños durante los primeros días, a pesar de esto finalmente se llega a una uniformidad de tamaño al llegar al séptimo día.

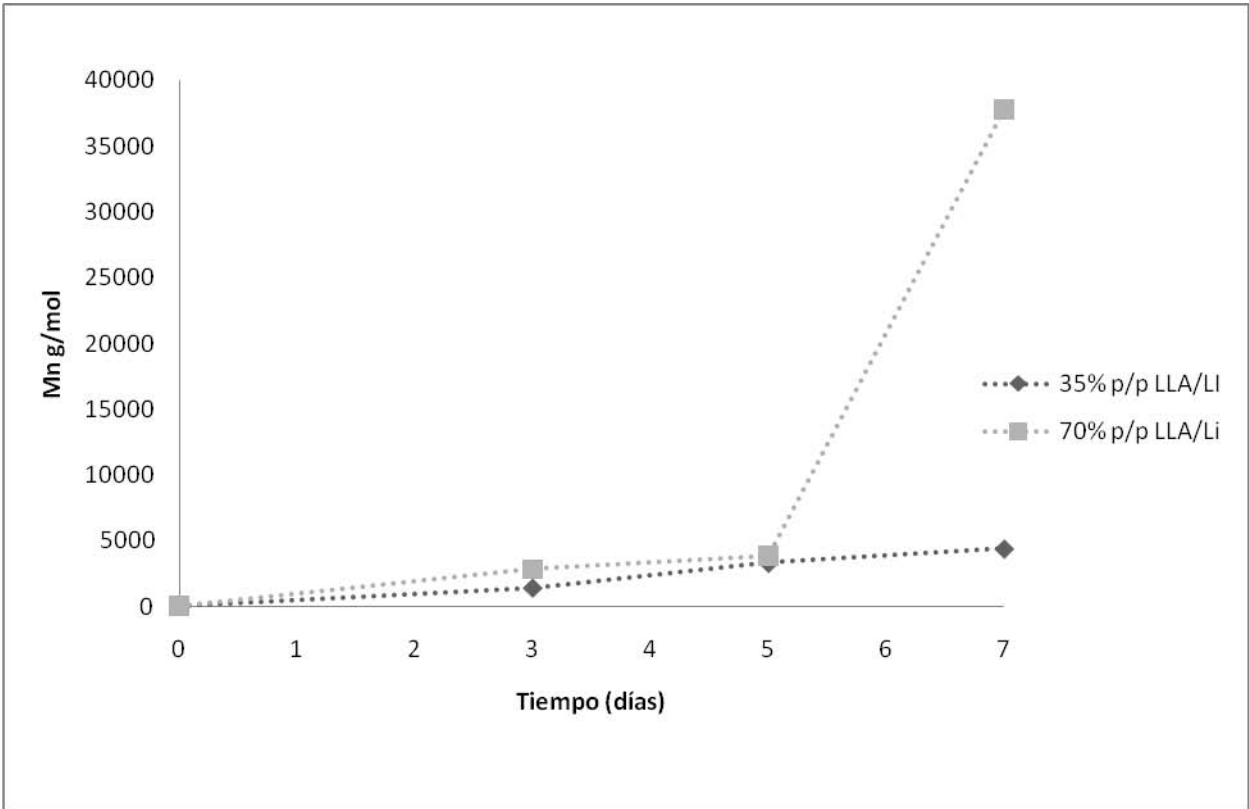


Figura 24. Efecto de la concentración de LLA en pesos moleculares.

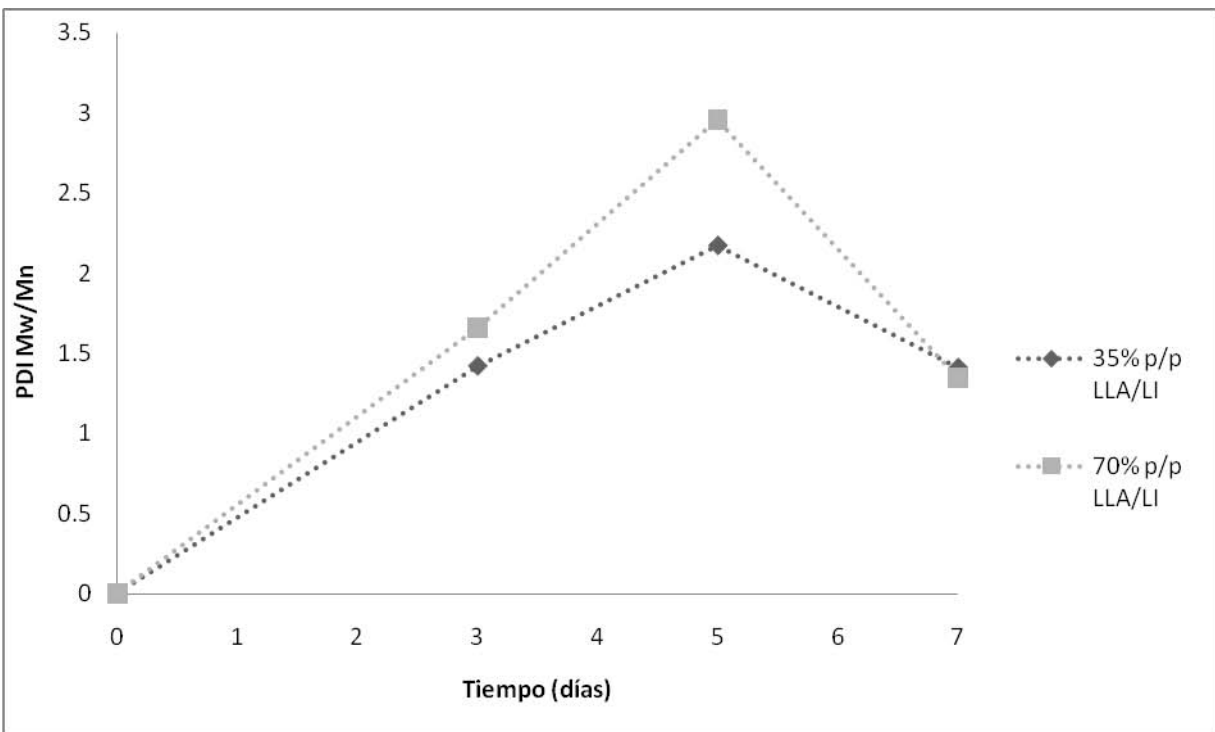


Figura 25. Efecto de la concentración de LLA en PDI

5.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

El siguiente efecto a observar en la síntesis del PLLA fue la concentración de enzima, para esto se usó la cinética anterior a 70% y 35% de LLA con 10% de enzima a 90°C, utilizando una variante del 15% de enzima y dos blancos sin enzima a cada concentración de láctido. Los resultados en cuanto a la apertura del anillo obtenidos a 15% demostraron lo mismo que a un 10% de concentración de enzima, los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento se comparan en la tabla 5 y figura 26.

Tabla 5. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos.

RENDIMIENTOS						
%						
Tiempo (días)	Blanco 35% p/p LLA/LI	10% Enz 35% p/p LLA/LI	15% Enz 30% p/p LLA/LI	Blanco 70% p/p LLA/LI	10% Enz 70% p/p LLA/LI	15% Enz 70% p/p LLA/LI
1	0	<5	12.9	0	<5	9.3
3	0	8.5	12.8	26.9	28.8	17.7
5	3	8.1	44.8	40	49.1	53.2
7	11.3	20.8	41.1	62.9	63.2	60.7

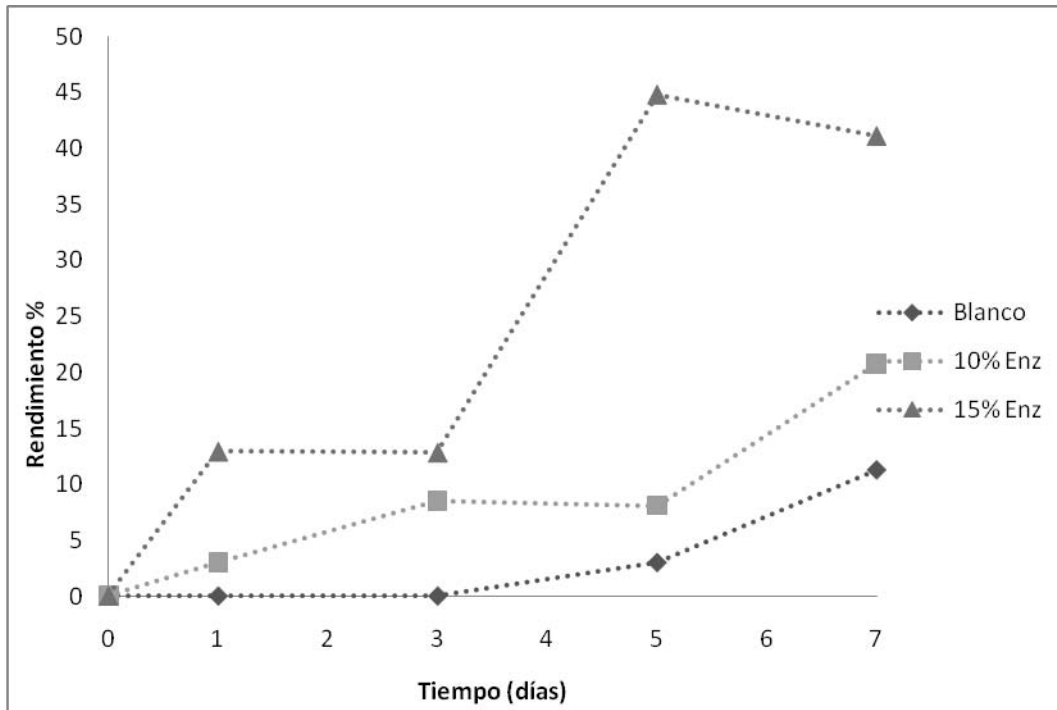


Figura 26. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos a 35% de LLA

Mediante estos experimentos se pudo observar que a 35% de LLA el efecto en la concentración de enzima es notable, como se muestra en la figura 26, un aumento del 5% en enzima incrementa el doble de rendimiento final del producto, sin embargo cabe mencionar que el blanco, presentó un rendimiento final al séptimo día del 11.3 % lo que nos indica que la síntesis del polímero no es del todo enzimática. A una concentración del 70% de LLA se observó (Figura 27) que no hubo efecto alguno al variar la concentración de enzima en cuanto a rendimiento, es decir en ambos casos a 35% y 70% a estas condiciones síntesis no es únicamente enzimática.

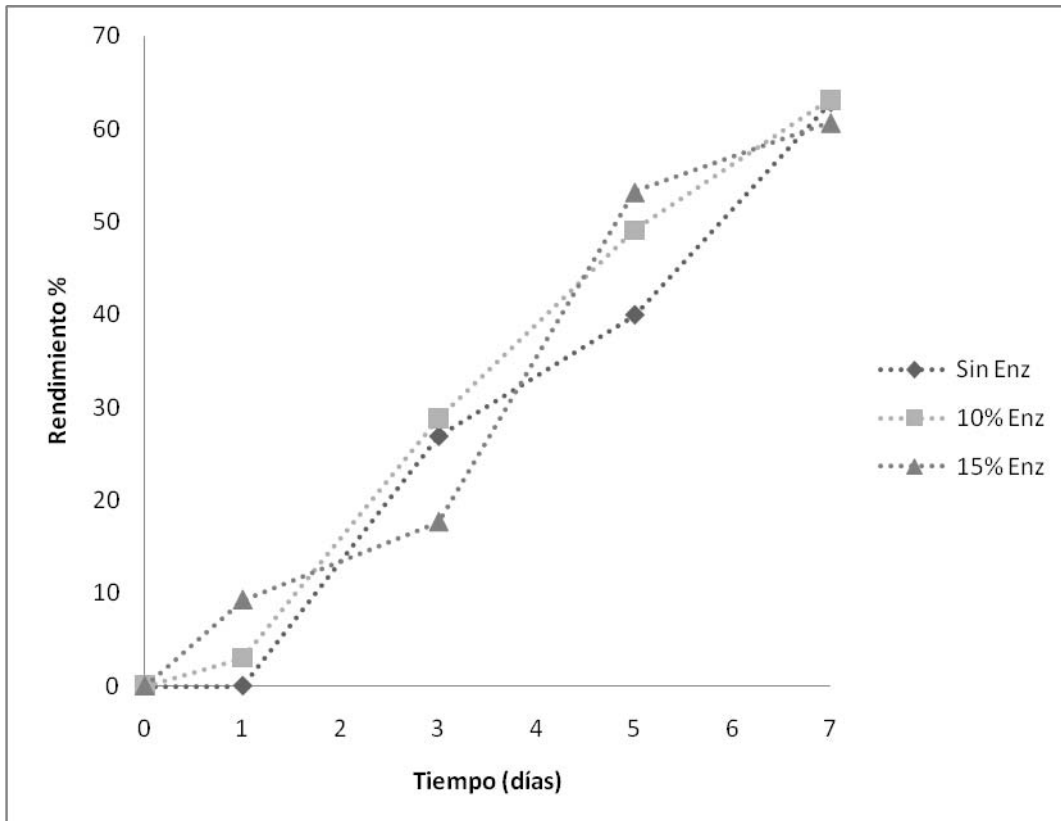


Figura 27. Efecto de la concentración de enzima en rendimientos a 70% de LLA

Al determinar los pesos moleculares se observó el verdadero efecto en la concentración de enzima, trabajando a una concentración de 35% de LLA (Figura 28 y tabla 6) se observó que al aumentar la concentración de enzima en un 5% los pesos moleculares aumentan del primer al quinto día de reacción, sin embargo al llegar al séptimo día prácticamente ambos valores se cruzan.

Tabla 6. Efecto de la concentración de enzima en pesos moleculares

Tiempo (días)	Pesos moleculares (g/mol)					
	Blanco 35% p/p LLA/LI	10% Enz 35% p/p LLA/LI	15% Enz 30% p/p LLA/LI	Blanco 70% p/p LLA/LI	10% Enz 70% p/p LLA/LI	15% Enz 70% p/p LLA/LI
1	-	-	1400	-	-	3100
3	-	1400	2100	1400	2800	5400
5	-	3300	4300	1700	3800	6000
7	2200	4400	4600	1500	37800	25200

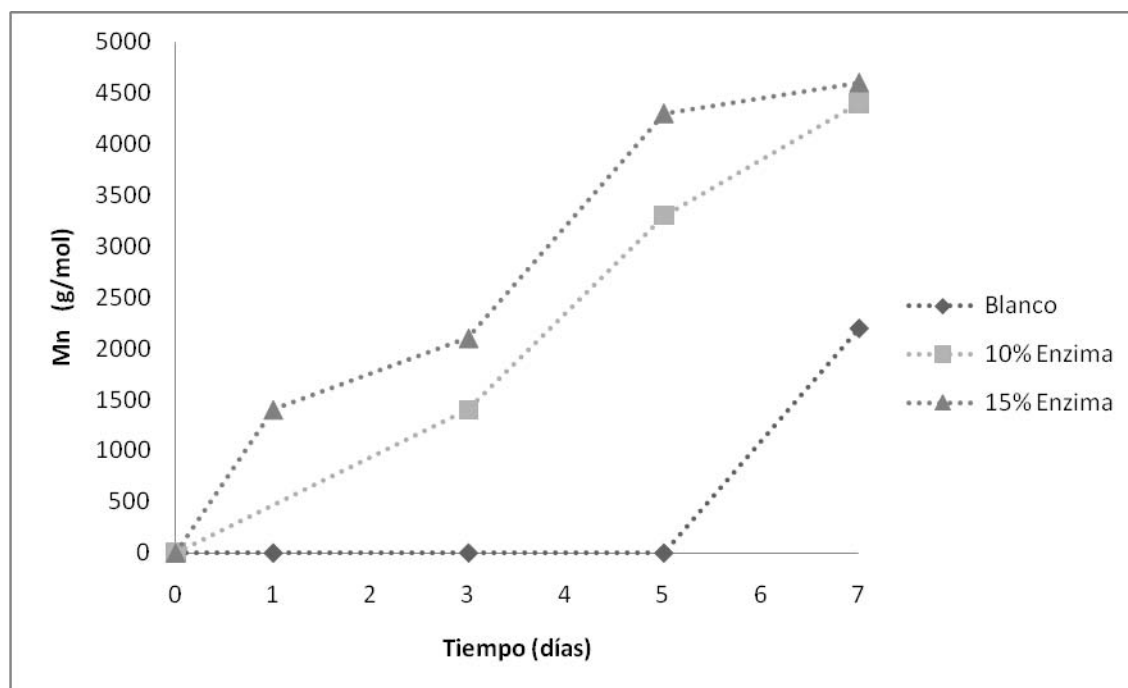


Figura 28. Efecto de la concentración de enzima en Pesos moleculares a 35% de LLA.

En el blanco sólo se analizó la muestra a 7 días, que fue en la única donde se obtuvo producto, obteniéndose un peso molecular relativamente bajo similares a los reportados por Fujioka en la síntesis de PLLA en masa.¹⁸

Cabe mencionar que en ambas condiciones la síntesis es limitada por la viscosidad, después del séptimo día la mezcla de reacción se vuelve completamente sólida.

El comportamiento fue notablemente diferente utilizando una concentración de 70% de LLA (Figura 30), se observó que hasta el quinto día el peso molecular se mantiene prácticamente constante a 10 y 15% de concentración de catalizador, pero en el séptimo día, hay un despunte en ambas cinéticas.

En los pesos moleculares obtenidos del blanco sin enzima a esta concentración, se observan valores bajos constantes, es decir por este mecanismo no se pueden obtener grandes rendimientos, por lo tanto la enzima juega un papel importante para la obtención de pesos moleculares más altos.

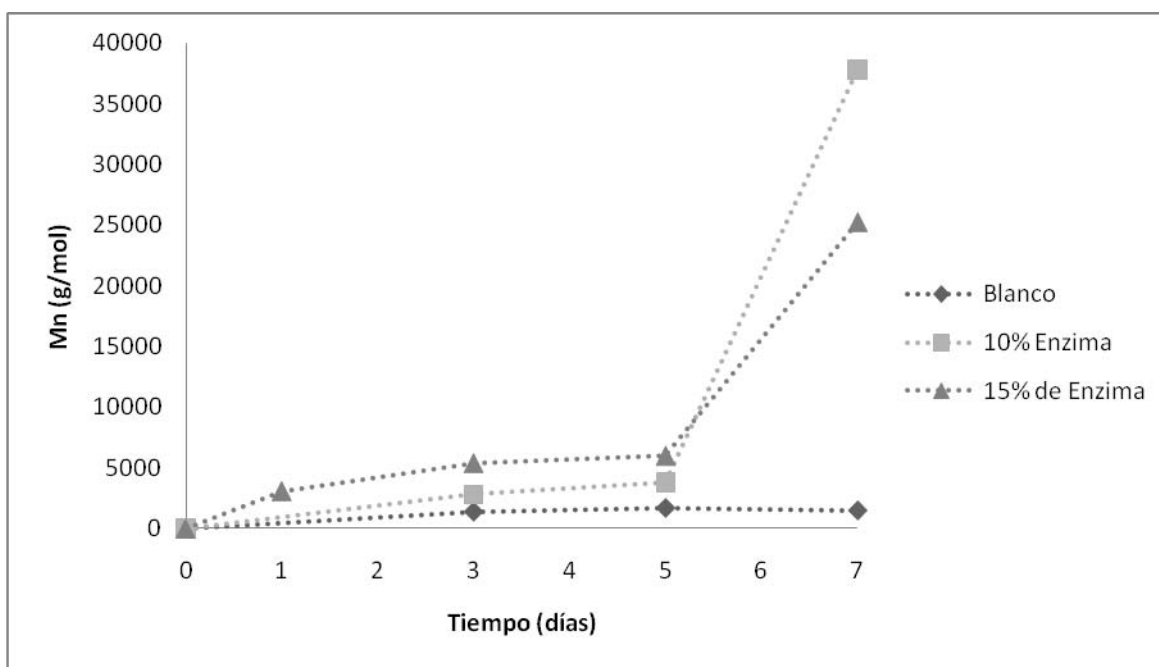


Figura 29. Efecto de la concentración de enzima en Pesos moleculares a 70%LLA

A un 35% de LLA/LI a pesar de tener una concentración alta de enzima las cadenas se encuentran más dispersas en el medio, lo que dificulta la progresión.

5.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Para evaluar esta variable, se tomo en cuenta los valores óptimos obtenidos a 90°C es decir, a una concentración del 70% p/p de LLA/LI y 10% p/p de enzima. En estudios anteriores se ha demostrado que la CALB inmovilizada tiene su temperatura óptima de catálisis a los 65°C.²⁴ Debido a esto se decidió usar esta variable en la síntesis polimérica, realizándose un blanco de igual forma que en el caso anterior.

Al llevar a cabo los estudios a 65°C, se observó un comportamiento totalmente diferente al observado a 90°C, después del séptimo día se pudo observar que el rendimiento todavía podía incrementarse si la reacción se dejase más tiempo, sumando a esto que a un día de reacción no hubo rendimiento alguno, a pesar de que desde el primer día prácticamente todo el LLA se encontraba en forma abierta con un 98% de conversión. Cabe mencionar que durante el proceso de purificación de metanol, sólo se obtiene ciertos pesos moleculares, el resto de los polímeros quedan disueltos en el metanol, sin embargo, los análisis de GPC indican que las fracciones solubles en metanol están en el rango de oligómeros.

En la tabla 7 y la figura 30 se observan los resultados obtenidos a 65°C con un 70% p/p LLA/LI con un 10% de enzima, comparados con los obtenidos previamente a esas mismas condiciones a 90°C.

Tabla 7. Efecto de la temperatura en rendimientos.

Tiempo (días)	RENDIMIENTOS %		
	Blanco 65°C	65°C 10% enz	90°C 10% Enz
1	0	0	2.3
3	0	10.8	28.8
5	0	11.5	49.1
7	0	24.3	63.2
9	0	51.1	-

Al observar ambas cinéticas (Figura 30) y al ver que a 65°C sin enzima, en los blancos realizados, no se obtuvo rendimiento alguno a lo largo de los 9 días, además de que los estudios en RMN revelaron que a estas condiciones no hay apertura del anillo (Figura 31), por lo que a esta temperatura la catálisis es 100% enzimática.

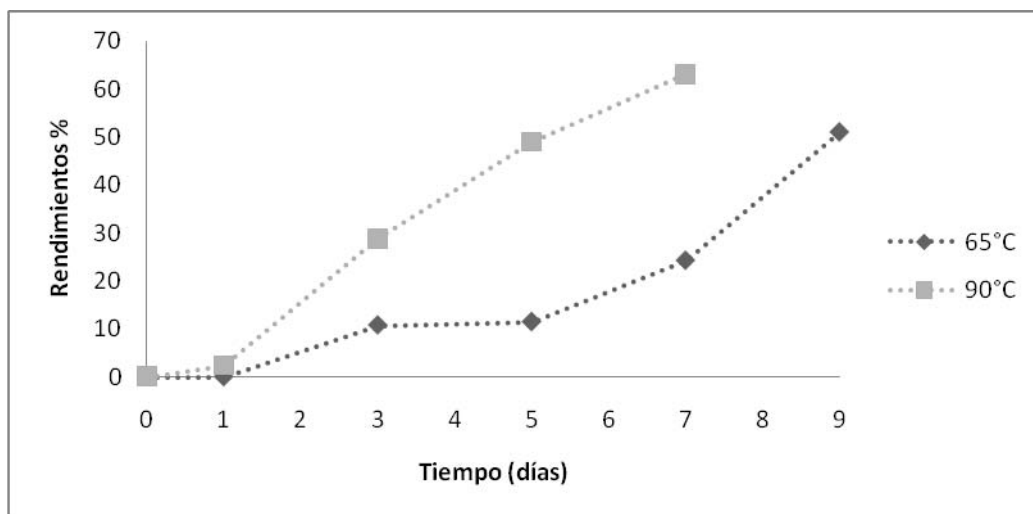


Figura 30. Efecto de la temperatura en los rendimientos

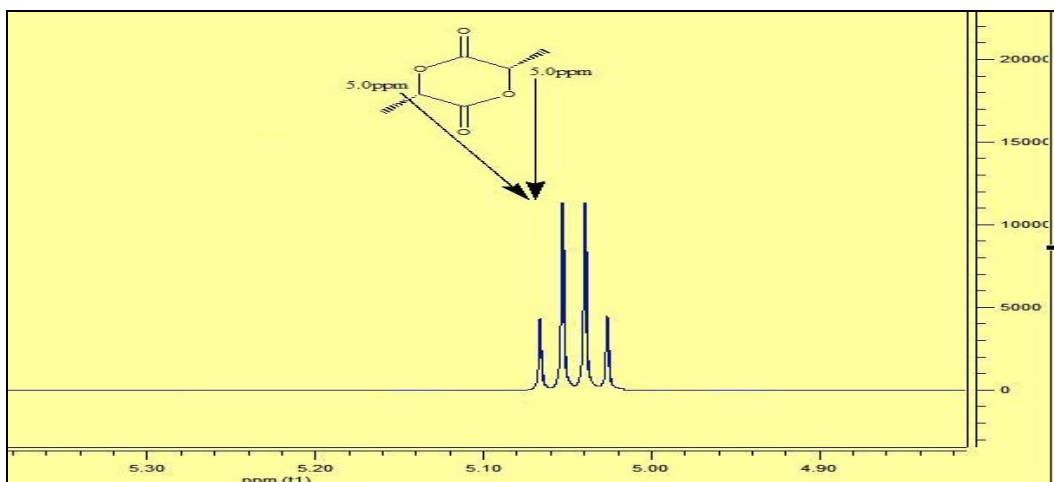


Figura 31. Espectro de ¹H RMN, de la mezcla de reacción a 65°C sin enzima a 9 días

Al analizar cinética tomando en cuenta los pesos moleculares obtenidos se observó que la sinergia que existe entre ambas catálisis es necesaria para obtener polímeros de alto peso molecular (Tabla 8 y Figura 32).

Tabla 8. Efecto de la temperatura en pesos moleculares

Tiempo (días)	Pesos moleculares g/mol	
	65°C	90°C
1	-	-
3	1600	2800
5	1600	3800
7	1200	37800
9	1500	-

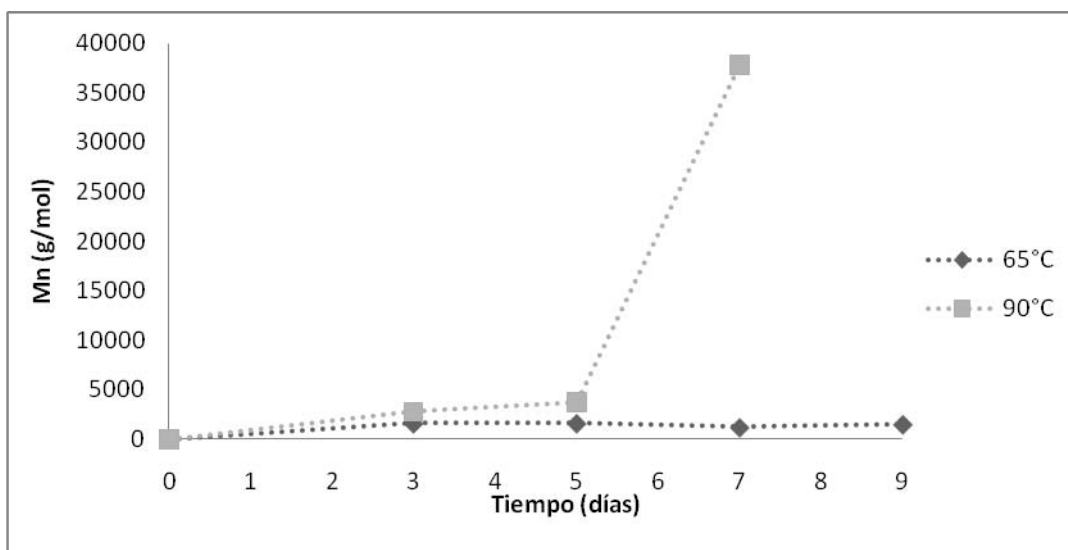


Figura 32. Efecto de la temperatura en pesos moleculares.

Como se puede observar en el gráfico anterior los pesos moleculares obtenidos a 65°C son muy bajos manteniéndose constante a lo largo de la cinética, esto puede deberse a una mayor viscosidad de 0.06 Pa.s, el doble que a 90°C, 0.028Pa.s, impidiendo una favorable transferencia de masa en la catálisis, esto

sumado a un posible efecto de catálisis ácida llevada a cabo a altas temperaturas, explicada en el siguiente apartado.

5.4 EFECTO DEL LÍQUIDO IÓNICO.

Connor y colaboradores demostraron, que era posible llevar a cabo una síntesis vía apertura del anillo tanto del LLA como de la ϵ -caprolactona, obteniendo porcentajes de conversión de alrededor del 90% y pesos moleculares altos.²⁴ Ellos utilizaron el 1,3-Bis-(2, 4,6-trimetilfenil)imidazolio-2-ylideno, capaz de formar un carbeno en la posición 2 que actuó como nucleófilo capaz de abrir el anillo, utilizando como agente iniciador y producir formas abiertas (Figura 33).²⁴

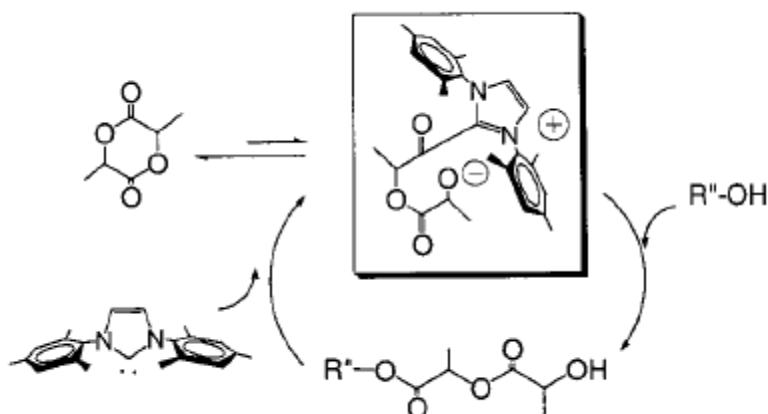


Figura 33. Mecanismo de síntesis propuesto por Connor y colaboradores en la síntesis inducida por carbenos de PLLA.

Como ya se mencionó, al encontrar que la síntesis se pudo llevar a cabo al no utilizar enzima a pesar de haber obtenido pesos moleculares bajos cuando esto se realizó a 90°C, se estudió la posibilidad, de una posible catálisis debida a una posible formación de un carbeno en el anillo de imidazolio, que al ser altamente nucleofílico tiene la capacidad de atacar al carbonilo. En la siguiente figura se muestra el mecanismo de la posible formación de un carbeno.^{24, 25}

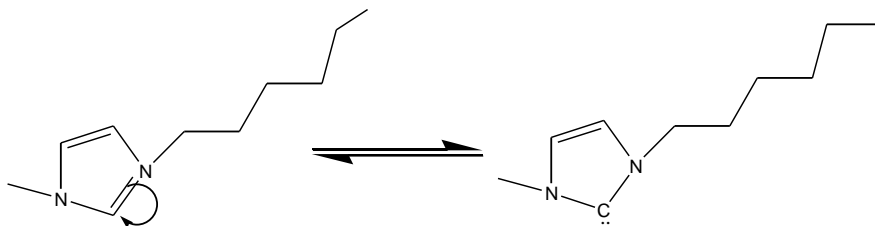


Figura 34. Mecanismo formación de carbeno

Una vez formado el carbeno, lo que se pensó que podía ocurrir es un ataque nucleofílico a uno de los carbonilos del LLA, abriendo de esta forma el anillo, pudiendo seguir el camino de una catálisis aniónica similar a la mostrada en la figura 4.2, o simplemente la formación de LLA abierto (Figura 35).

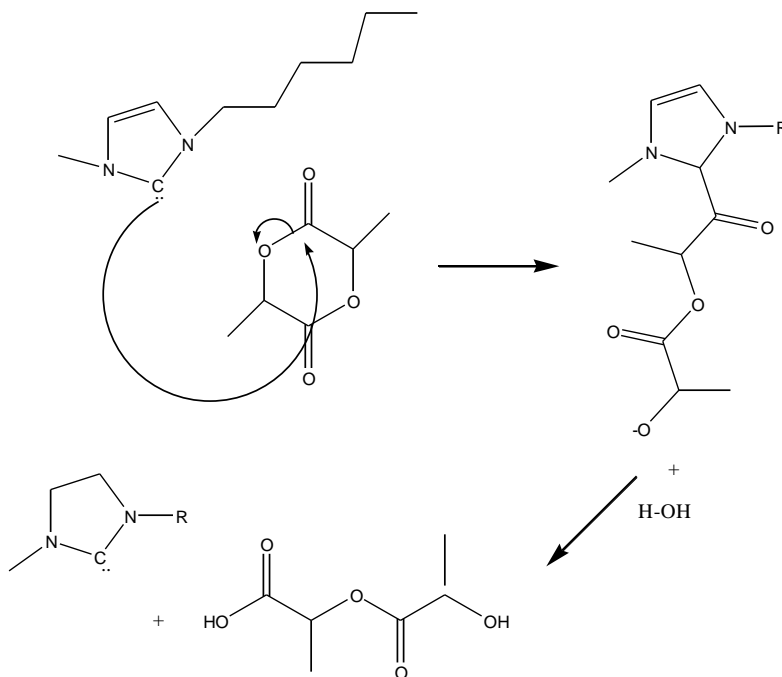


Figura 35. Mecanismo, catálisis por formación de carbenos en el anillo de imidazolio.

Con base a estas hipótesis para descartar la catálisis por formación de carbenos se probó con el líquido iónico [BDMIM][PF₆] incapaz de formar carbenos por la presencia de un grupo metilo en la posición 2 (Figura 36).

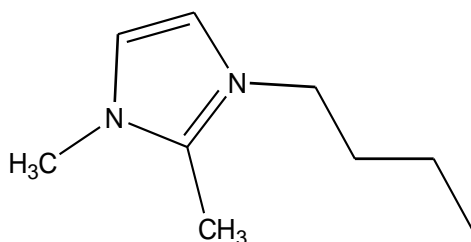


Figura 36. Estructura del BDMIM PF₆

Con base en esto se realizó un estudio a 7 días a las condiciones en donde e obtuvieron los mejores rendimientos y un blanco sin enzima donde sólo se realizó un punto a 7 días, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Efecto del líquido iónico [BDMIM][PF₆] en la síntesis del PLLA.

Tiempo Días	Enzima	Rendimiento %	Mn(g/mol)	PDI
1	10%	0	-	-
3	10%	0	-	-
5	10%	2.3	2400	1.90
7	10%	59.2	5200	1.29
7	Sin enzima	41.2	1800	1.23

Al realizar el blanco de reacción se observó que a 7 días pudo llevarse a cabo la síntesis del polímero, con esto se pudo descartar la formación del carbeno en la polimerización del LLA.

Ahora al observar ambos estudios en donde se usaron enzimas, se encontró que tienen un comportamiento completamente diferente. Empleando el [BDMIM][PF₆] durante los 5 días no se obtuvo rendimiento alguno, sin embargo el valor obtenido al séptimo día fue semejante al obtenido con el [HMIM][PF₆], aunque el peso molecular con [BDMIM][PF₆] fue mucho más bajo (5200g/mol).

Esto puede ser debido a la mayor viscosidad del [BDMIM][PF₆] (0.080Pa.s) comparada con la del [HMIM][PF₆](0.028 Pa.s), lo que desfavorece la transferencia de masa y propagación de la polimerización (Figura 37).

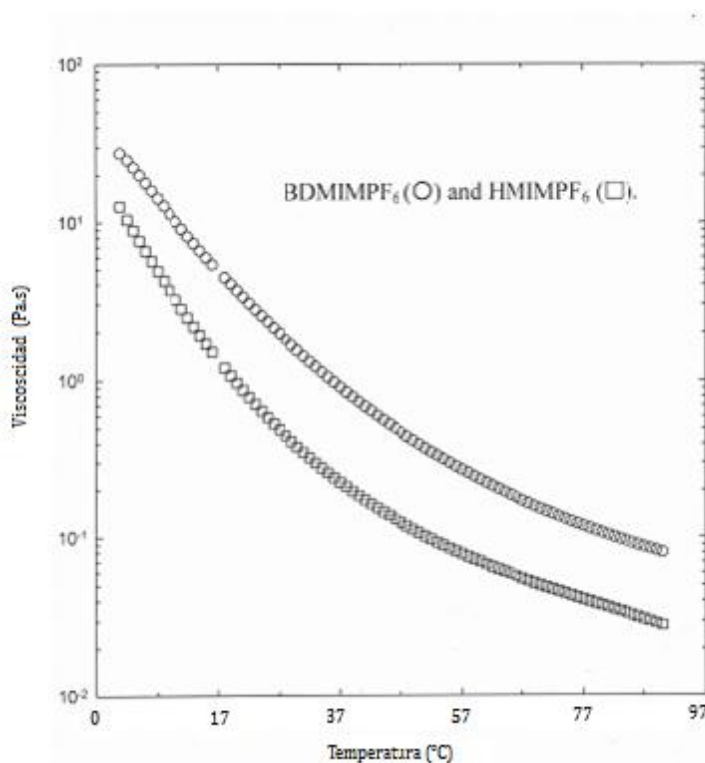


Figura 37. Variación de la viscosidad con respecto a la temperatura del [BDMIM][PF₆] y del [HMIM][PF₆].

La polimerización no enzimática puede deberse a una progresión catiónica (Figura 38) promovidas por trazas de hidroxilácido del monómero, es decir impurezas de ácido láctico, la cual es favorecida a temperaturas altas, según reportaron Huijser y colaboradores.²⁰

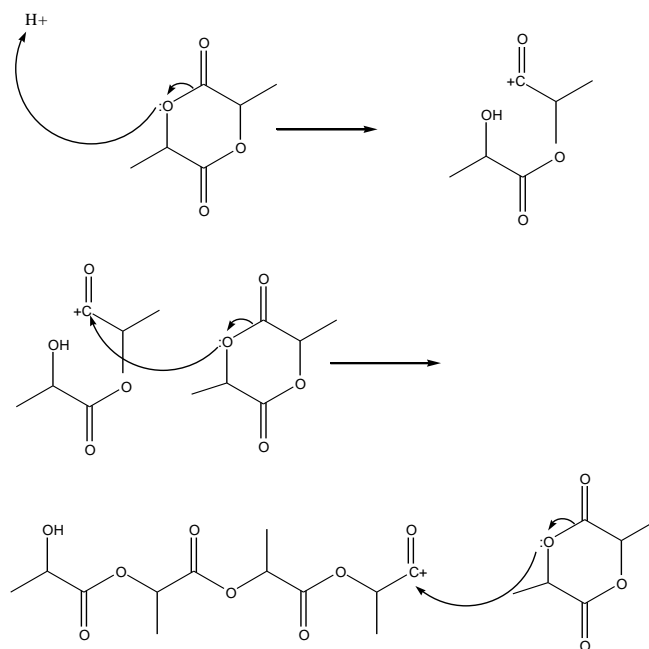


Figura 38. Mecanismo de la catálisis ácida.

A $90^\circ C$ ambas rutas, enzimática y catálisis ácida, actúan simultáneamente a una viscosidad baja $0.028 Pa.s$, obteniéndose rendimientos altos del 63% con un peso molecular promedio alto de $37,800 g/mol$.

5.5 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA DEL PLLA OBTENIDO

Después de haber llevado a cabo el estudio de las variables en la síntesis del PLLA, y determinado los pesos moleculares se caracterizaron los polímeros obtenidos térmicamente para determinar la temperatura de transición vítrea T_g y sus temperaturas de fusión T_f . La tabla 10 y la figura 39 muestra los resultados obtenidos en las cinéticas utilizando 70% y 35% de LLA con 15 y 10% de enzima en ambos casos.

Tabla 10. Caracterización térmica de PLLA

T°C síntesis	Enzima	%LLA	Tiempo (días)	Tg°C	Tf °C	Tf°C
65	10	70	3	55.7	-	-
65	10	70	5	71.6	-	-
65	10	70	7	71.8	133.7	139.6
65	10	70	9	59.4	126.6	135.9
90	10	35	3	44.6	-	-
90	10	35	5	57.9	133.9	
90	10	35	7	36.4	147.6	152.8
90	10	70	3	64.2	142.7	147.5
90	10	70	5	65.7	139.3	148.4
90	10	70	7	56.7	143.3	151.7
90	15	35	5	-	131.5	142.6
90	15	35	7	-	144.9	150.8
90	15	70	3	38.2	133.7	139.7
90	15	70	5	63.0	143.4	149.7
90	15	70	7	58.5	144.3	153.2

El dato en negritas muestra las condiciones en las que se obtuvo un mayor rendimiento y mayor peso molecular, los datos vacíos fueron pruebas en donde no se pudo observar en los diagramas de DSC las temperaturas determinadas.

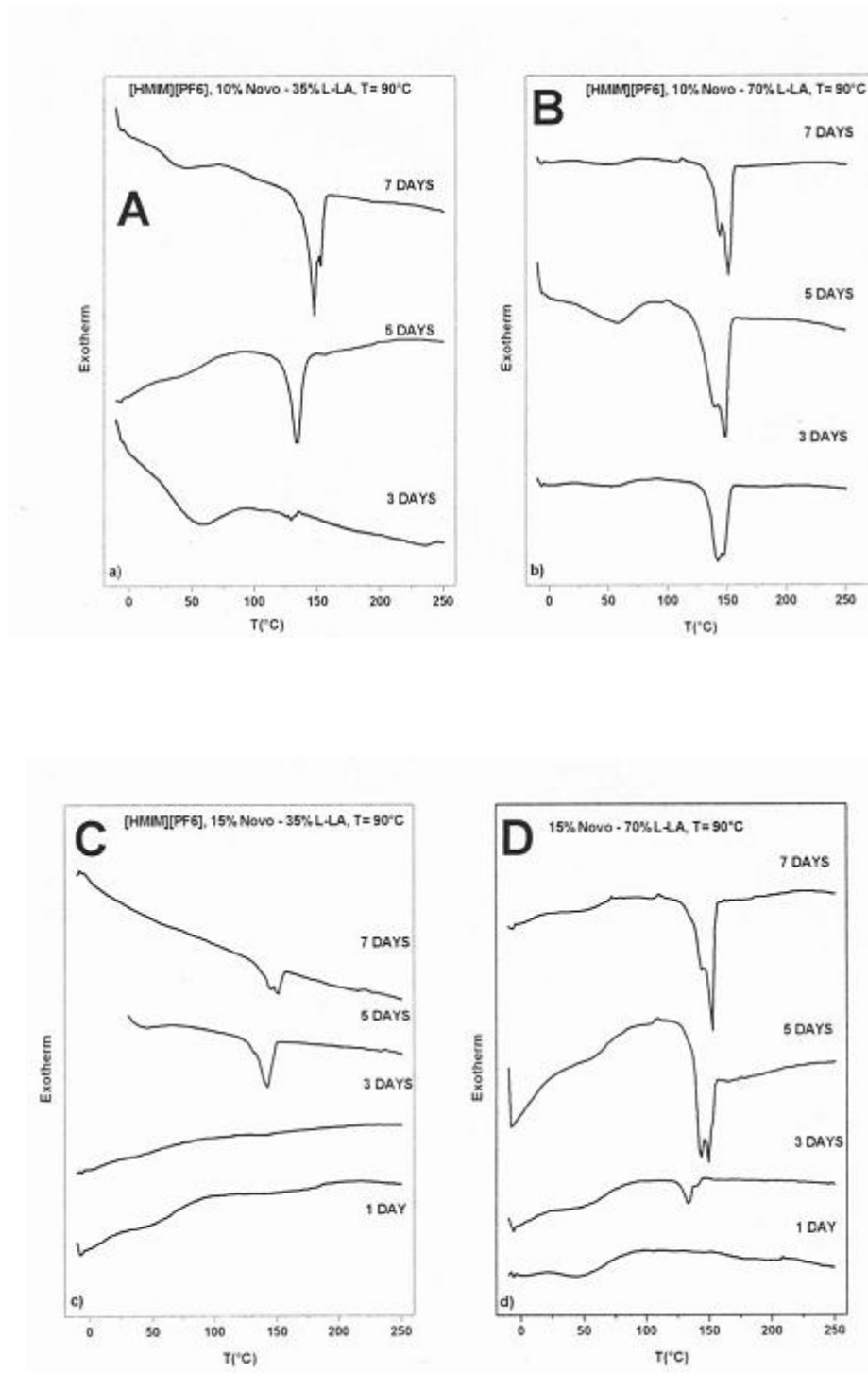


Figura 39. Diagramas de DSC de cada una de las muestras

- A) 90°C con 10% Enz 70% LLA, B) 90°C 15%Enz 30% LLA, C) 90°C 15% Enz 70%LLA, D) 65°C con 10% Enz 70% LLA, E) 90°C sin enzima

La temperatura de transición vítrea T_g depende de varios factores como el peso molecular del polímero, la historia térmica de este y la cristalinidad. A simple vista no se observa tendencia alguna en los resultados anteriores, los valores obtenidos en estos 4 experimentos varían de 36.40 a 65.70°C, para observar claramente la tendencia de los datos se gráfico el peso molecular en función de la temperatura de transición vítrea (Figura 40).

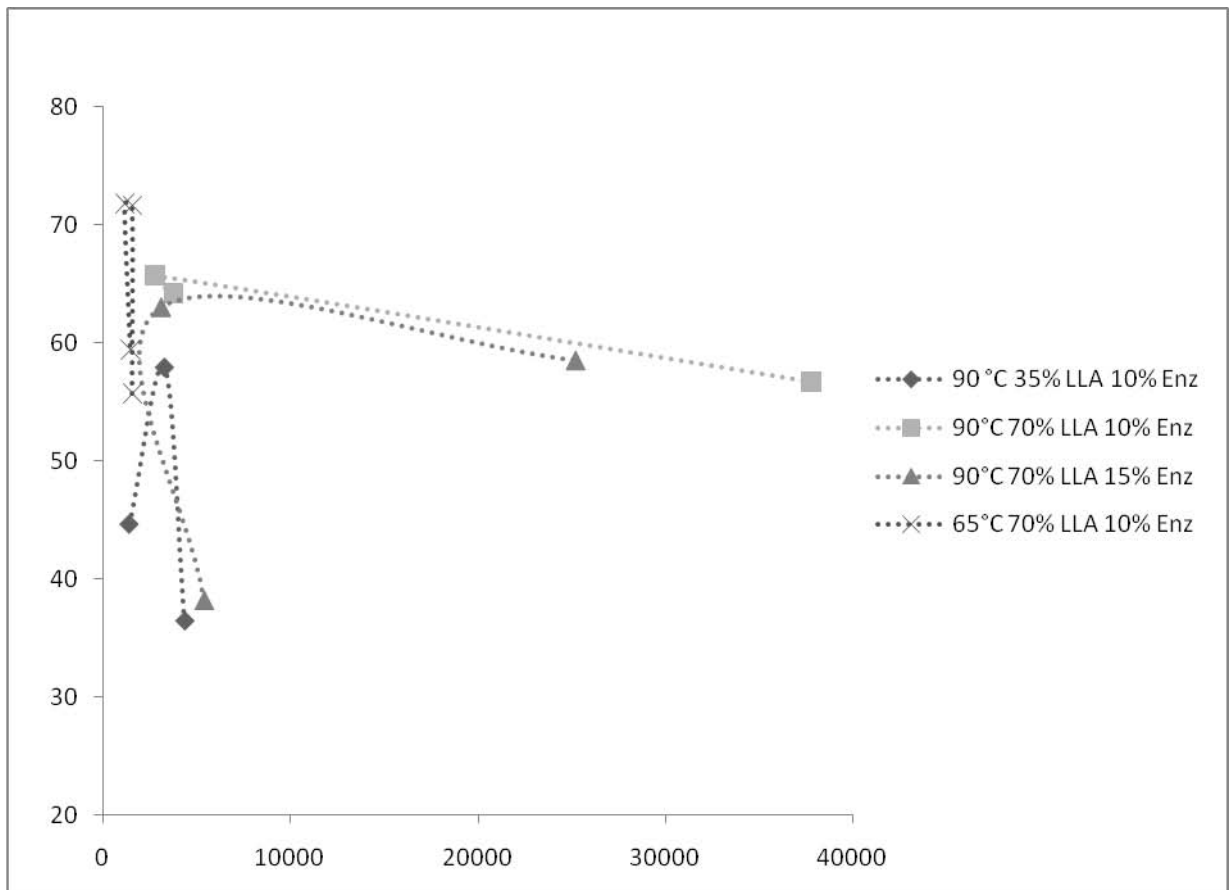


Figura 40. Efecto tiempo, efecto molecular, % LLA y % Enz en la T_g

Se observa en esta gráfica, que no existe tendencia alguna, o relación alguna entre el peso molecular y la T_g como se esperaba, ya que este valor no está directamente relacionado con el tamaño de la cadena polimérica. Si analizamos los dos valores distanciados del resto, que son los valores en donde se obtuvieron mayores rendimientos y mayores pesos moleculares las T_g muestran valores

similares. Una causa a la dispersión del resto de los valores puede deberse al índice de polidispersibilidad, ya que el M_n no es una medida exacta y puede haber una gran variedad de pesos moleculares en la mezcla que se analiza originando así una variabilidad en los datos de T_g . Otro factor a esta dispersabilidad es simplemente el error experimental, como se podrá observar más adelante en los diagramas del DSC en algunos casos fue casi imperceptible la curva correspondiente al T_g .

En cuanto a la temperatura de fusión T_f (Figura 41), los valores obtenidos en cada una de las condiciones, y muestra la relación que hay entre estas temperaturas y el peso molecular, cabe mencionar que en casi todos los casos se observaron dos valores de T_f , debido a la formación de fases cristalinas, esto se comenta en el apartado 5.6.

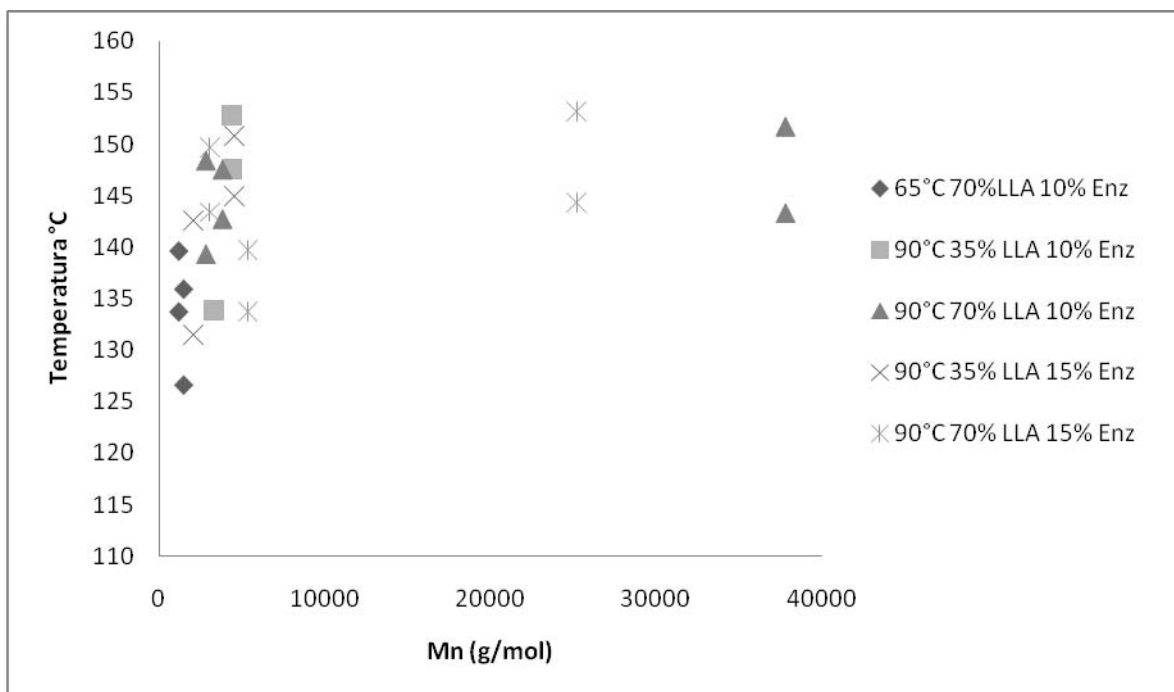


Figura 41. Efecto tiempo, efecto molecular, % LLA y % Enz en la T_f .

Las temperaturas son muy variadas y a simple vista no se observa tendencia o relación alguna con el peso molecular o con la condición de síntesis, las

temperaturas van en un rango de 126°C a 153°C, observándose los valores más por arriba de 150°C los polímeros cuyo peso molecular es mayor a 4400 g/mol, mientras que los polímeros con mayor peso molecular, muestran un comportamiento similar en sus dos puntos de fusión, el primero de estos incluso es idéntico de 143.3°C y el segundo muestra una ligera variación de 151.7°C y 153.2°C. Por lo que podemos decir que a pesos moleculares mas grandes comienza a observarse una tendencia más clara y nuevamente el factor de la PDI puede afectar estos valores, al ser esta mayor indicando la presencia de una gran variedad de polímeros de diferente tamaño. La relación entre la temperatura de fusión y la cristalinidad el polímero será analizada en el siguiente apartado.

5.6 CARACTERIZACIÓN POR RAYOS X EN POLVO, DETERMINACIÓN DE LA CRISTALINIDAD DEL PLLA OBTENIDO.

La determinación de la cristalinidad del polímero se realizó a través de la difracción de rayos X en polvo determinándose así la evolución de la cristalinidad a lo largo de la cinética.

La figura 42 muestra los análisis hechos a las muestras de polímero obtenidos con 10% y 15% de enzima, utilizando 70% p/p LLA/LI, en donde se graficó el ángulo de incidencia contra la intensidad de la dispersión.

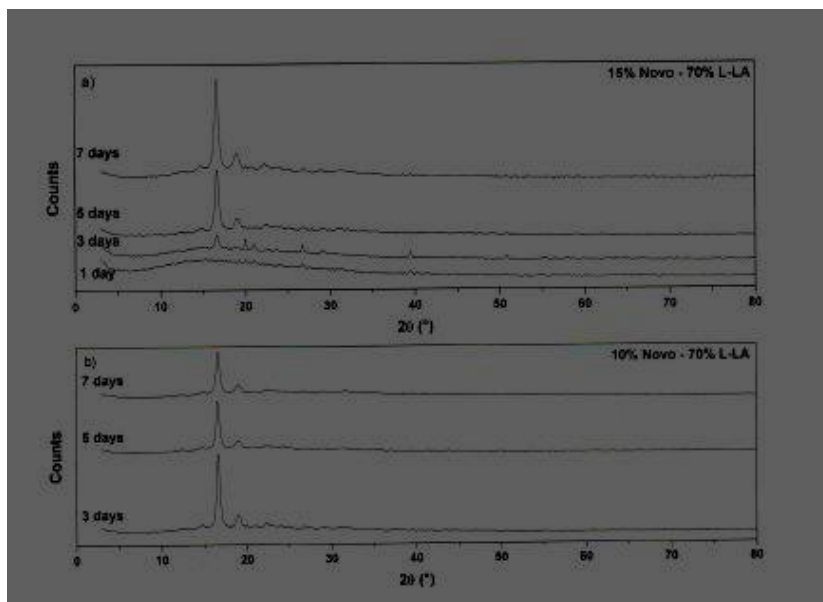


Figura 42. Evolución de la Cristalinidad en la síntesis polimérica.

Como puede observarse en el gráfico anterior, conforme pasa el tiempo, el área de la dispersión de la fase cristalina va en aumento, manteniéndose constante después del quinto día. En la tabla 11 se observan el resto de los resultados obtenidos.

Como puede observarse en la mayoría de los casos se observa un incremento en la cristalinidad del polímero, observándose valores constantes alrededor de 35% en los dos últimos días de reacción, en los casos en donde se empleo enzima, incluso en los casos en donde se obtuvieron los valores con más altos pesos moleculares el porcentaje de cristalinidad se encuentra dentro de este rango.

Tabla 11. Resultados de porcentaje de Cristalinidad.

T°C síntesis	Enzima	%LLA	Tiempo (días)	T_f °C	T_f °C	% Cristalinidad
65	10	70	3	-	-	6.5
65	10	70	5	-	-	9
65	10	70	7	133.7	139.6	35.1
65	10	70	9	126.6	135.9	35.2
90	10	35	3	-	-	15.1
90	10	35	5	133.9		35.1
90	10	35	7	147.6	152.8	35.6
90	10	70	3	142.7	147.5	33.6
90	10	70	5	139.3	148.4	31.8
90	10	70	7	143.3	151.7	33.7
90	15	35	5	131.5	142.6	28.9
90	15	35	7	144.9	150.8	29.4
90	15	70	3	133.7	139.7	15.7
90	15	70	5	143.4	149.7	34.9
90	15	70	7	144.3	153.2	31
90	0	70	3	132.1	138.1	42.5
90	0	70	5	143.0	152.1	42.6
90	0	70	7	133.8	147.6	40.0

Sin embargo, en el experimento llevado a cabo sin enzima se observó una cristalinidad constante, en los tres tiempos analizados, además de que esta presenta un valor más alto de cristalinidad de alrededor de un 40%.

Para poder explicar esto, antes hay que explicar cómo está conformado un polímero en sus dos fases. Los polímeros que generalmente se encuentran en su fase cristalina, están constituidos generalmente por cadenas lineales y con grupos laterales pequeños, permitiendo así el acomodo de las cadenas poliméricas de una forma plegada, mientras que en una fase amorfa el acomodo de la cadena o cadenas poliméricas es de forma irregular (Figura 43).

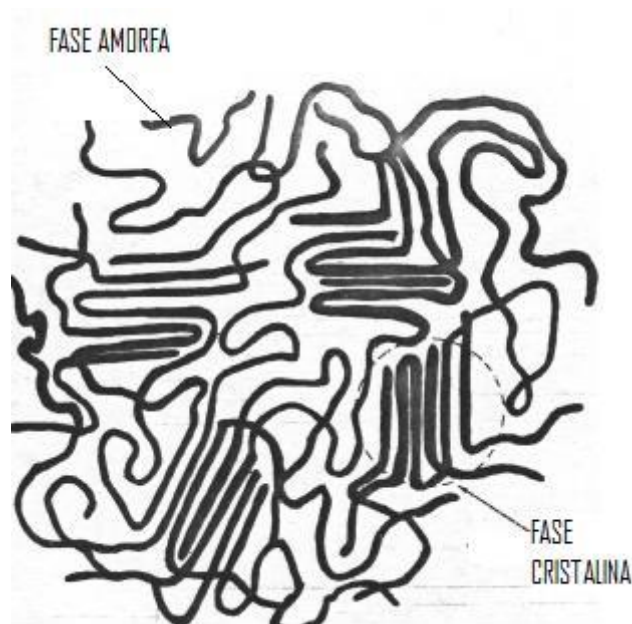


Figura 43. Fases de un polímero.²¹

En este caso el PLLA posee grupos laterales pequeños, grupos metilos al exterior de la cadena, todos con una misma configuración, lo que permite un acomodo de las cadenas para facilitar la formación de fases cristalinas.²⁶

La formación de diferentes fases cristalinas explicaría la obtención de diferentes T_f en los polímeros.

6. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

- Se logró llevar a cabo la síntesis enzimática de PLLA con un nuevo método de síntesis, utilizando como catalizador la CALB inmovilizada de *Candida antarctica* en medio líquido iónico [HMIM][PF₆]. Dentro de los parámetros analizados para llevar a cabo esta síntesis, los mejores resultados se obtuvieron a 7 días, a una temperatura de 90°C, al utilizar un 10% en peso del biocatalizador con un 70% p/p LLA/LI, un rendimiento del 63% con un peso molecular de 37,800 g/mol y un porcentaje de cristalinidad del 35%.
- Al estudiar el efecto de la concentración del monómero se observó que tanto los rendimientos como el peso molecular son proporcionales a la concentración del monómero. Al incrementar la concentración de enzima en un 5% p/p, la velocidad de la reacción aumenta a bajas concentraciones de monómero mientras que a una concentración del 70% LLA la diferencia es despreciable. Al aumentar la concentración de enzima en un 5% p/p el peso molecular final al séptimo día disminuye.
- Se encontró que a 65°C la síntesis del polímero es únicamente enzimática, mientras que a 90°C existen dos tipos de mecanismos uno de ellos el enzimático y el otro que es inducido térmicamente.
- Se descartó la hipótesis de la formación de un carbeno en el anillo de imidazolio del catión del líquido iónico, empleando el [BDMIM][PF₆], demostrándose que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la síntesis no enzimática no es por esta vía.

- Por ^1H RMN se determinó que la apertura del anillo es de un 100% a las 24 horas de reacción a 90°C con y sin enzima, mientras que a 65°C la apertura del anillo solo se da con enzima.
- En la caracterización térmica de los polímeros no se encontró relación alguna entre las condiciones de síntesis y estas, e incluso ni con los pesos moleculares, donde se obtuvieron valores de T_g de entre 36 y 70°C aproximadamente, de igual forma con la temperatura de fusión no se encontró relación alguna con alguna otra variable, los valores obtenidos se encuentran en un rango entre 126 - 150°C .
- En la caracterización por rayos X para la determinación de la cristalinidad, se observó que la cristalinidad aumentaba con el tiempo en casi todas las cinéticas en donde se utilizó biocatalizador, hasta llegar a valores alrededor del 35%, mientras en los que no se uso enzima como catalizador el porcentaje de cristalinidad fue mayor y constante a lo largo de la cinética, con valores de alrededor del 42%. Algunos materiales presentaron más de un punto de fusión atribuible a la formación de diferentes fases cristalinas.
- Para finalizar se pudo llevar a cabo una nueva síntesis basada en el concepto de química verde, para un polímero que puede ser de gran importancia. Esta investigación fue solo el inicio, para abrir puertas a nuevas investigaciones para encontrar la forma de optimizar este proceso, para poder emplearlo a una mayor escala, logrando así verdaderos beneficios para el medio ambiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Auras R., Harte B., Selke S., Polylactide a Natural Green Alternative for Plastic Packaging Materials. Scholl of Packaging, MSU, East Lansing, USA.
2. Garlota Dornald. *A Literature Review of Poly(Lactic Acid)*. Journal of the Polymers and Enviorement. Vol 9 No2 April 2001. 63-83pp.
3. Drumright R., Gruber P., Genton D. *Poly(lactic Acid) Technology*. Advanced Materials 2000, 12, No 23. 1841-1846pp.
4. www.natureworks.com
5. Mehta R., Kumar V., Bhunia H., Upadhyay S. *Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review*. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 2005, 45:325–349pp.
6. Min Kuo T., W.Gardner H., *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker Inc. New York Basel. 2002 357-387pp.
7. Kang J., Pfromm P., Rezac M. *Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane*. Journal of Biotechnology. 119, 2005 , 147-154pp.
8. Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., L. Inorra J. *Enzymatic ester Synthesis in ionic liquids*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic 21. 2003. 9-13pp.
9. Klibanov AM. *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature 2001; 409:241-346pp.
10. Zhen Yang, Wubin Pan. *Ionic Liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis*. Enzym and Microbial Technology 37, 2005. 19-28 pp.
11. Elliot J., Parkin K. *Lipase-mediated acyl-exchange reactions with butteroil in anhydrous media*. Journal of the American Oil Chemists' Society. Volume 68, Number 3 / March, 1991. 171-175pp.

12. Moon Y., Lee S., Ho Ha S., Yoon Mo Koo. *Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids*. Journal of Chemical Eng., 2006, 247p.
13. Kaar J., Jesionowski A., Berberich J., Moulton R., Rusell J.A. *Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability*. JACS. 2003, 4125-4131pp.
14. Rantwijk F, Lau RM, Sheldon RA. *Biocatalytic Transformations in ionic liquids*. Trends Biotechnol 2003; 21. 131-138 pp.
15. Erbeldinger M., Mesian A.J., Rusell A.J., *Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents*. Biotechnol Prog 2000;16. 1129-1131pp.
16. Sheldon RA, Lau RM, Sorgedraeger MJ, van Rantwijk F, Sedon KR. *Biocatalysis in ionic liquids*. Green Chem 2002;4. 147-151pp.
17. Matsumura S., Mabuchi K., Toshima K., *Lipase-catalyzed ring-opening of lactide*. Macromolecules January 1997. 477-482pp.
18. Fujioka M., Hosada N., Nishiyama S., Noguchi H., Shoji A., Kumar D. S., Katsuraya K., Ishi S., Yoshida Y. One-pot Enzymatic Synthesis of Poly (L,L-lactide) by Immobilized Lipase Catalyst. The Society of fiber science and technology. 2005.
19. Huijser S. Bastian B.P. ,Huang J. ,Duchateau R. *Topology characterization by MALDI-ToF-MS of Enzymatically Synthesized Poly(lactide-co-glycolide)*. Biomacromolecules. Vol 7. 2006 2465-2469pp.
20. Seymour B., Carraher C. *Introducción a la Química de los Polímeros*. Editorial Reverté. España 1995. 98-102pp.
21. Sánchez A. *Caracterización Fisicoquímica de Polímeros*. Editorial Limusa México 1994.
22. Loeker C., Duxbury C., Kumar R., Gao W., Gross R., Howdlw S. *Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of E-Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide*. Macromolecules, July 2003 2450-2453pp.

23. Nigel A. Turner, Evgeny N. *What temperature can enzymes maintain their catalytic activity?* Enzyme and Microbial Technology 27 (2000) 108–113pp.
24. Connor E., Nyce Gregory W., Myers M., Möck A., Hendrick J., *First Example of N-Heterocyclic Carbenes as Catalysts for living Polymerization: Organic ROP of Cyclic Esters.* JACS 19, 2001 914-915pp.
25. Sentman A., Csihony S., Waymouth R., Hendrick J., *Silver(I)-Carbene Complexes/Ionic Liquids: Nove N-Heterocyclic Carbene Delivery Agents for Organocatalytic Transformations.* JOC Note. 2004. 2391-2393pp.
26. Tapia Morales G. *Síntesis y Caracterización de polímeros de ácido láctido-co-glicólido como soporte para sistemas farmacéuticos de larga duración.* Tesis para obtener el grado de Maestría en Ingeniería. Facultad de Química UNAM 2007.