



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE BIOPOLÍMEROS
EN LÍQUIDOS IÓNICOS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

PRESENTA:

P R E S E N T A :

I.Q.I. MARÍA ENCARNACIÓN MENA MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

422;





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: DR. PEDRO ROQUERO TEJEDA.
Secretario: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL.
Xqecrr DR. SERGIO HUERTA OCHOA.
1^{er}. Suplente: DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA.
2^{do}. Suplente: DR. MIQUEL GIMENO SECO.

Lugar donde se realizó la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
LABORATORIO 314 CONJUNTO E

TUTOR DE TESIS.

DR. MIQUEL GIMENO SECO.

*A las personas más importantes en
mi vida, mi familia por su amor,
paciencia, y comprensión, pero sobre todo
por creer en mí y respetar mis decisiones.*

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres **Oswaldo y Filomena** quienes me han dado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor, quienes han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo, por esto y más...gracias.*

*A mi amado esposo **Carlos** por su apoyo incondicional, amor, comprensión y paciencia a lo largo de todos estos años pero sobretodo por compartir esta aventura conmigo.*

*A toda mi familia, en especial a **Roque, Trinidad y Adriana** por su cariño y apoyo a lo largo de mi vida.*

*A mis sobrinos, **Dinorah, Rashid, José, Yazely, Leonardo, Dayani, Edilberto y Abraham** por alegrarme enormemente la vida.*

*A mis suegros **Carlos e Irma** por todo su apoyo durante la realización de la maestría.*

*A **Miquel**, por asesorarme a lo largo de este proyecto, por compartir su conocimiento conmigo, brindarme su apoyo, enseñanza y paciencia pero sobre todo por su valiosa amistad.*

*Al Sr. **Alfredo Buenfil** y a su familia por su apoyo y generosidad al iniciar esta aventura.*

*A la técnica académica **I.A. Mariana Ramírez Gilly** y al Dr. **Alberto Tecante** por su ayuda en las determinaciones reológicas (Laboratorio L-313 del Depto. Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM).*

Al Dr. Sebastien Chanfreau y al I.Q. Alberto López Luna, M. en I., por sus valiosos consejos y apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

A los investigadores miembros del jurado por la revisión y sus amables comentarios y sugerencias en este trabajo.

A Rafa y Rosy por impulsarme a seguir con mis sueños.

A mis amigos, Santiago, Ricardo, Teddy, Geovanny, Germán, Yazmín y María de la Cruz por su apoyo y amistad a lo largo de la maestría.

A todo aquel que pudiera llegar a olvidar.

**"ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL
CONACyT NÚMERO 48641 Y DGAPA-UNAM A
TRAVÉS DEL PAPIIT IN-200109-3. SE AGRADECE
A CONACyT POR LA BECA DE MAESTRÍA"**

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Poliláctido	5
2.2. PGA	6
2.3. PLGA	10
2.3.1. Síntesis de PLGA	12
2.4. Polimerización por apertura de anillo	12
2.5. Lipasas	14
2.5.1. Características de las lipasas	16
2.5.2. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	17
2.5.3. Inmovilización de enzimas	18
2.5.4. Mecanismo de apertura de anillo catalizado por lipasas	20
2.6. Líquidos iónicos	21
2.6.1. Generalidades de los líquidos iónicos	21
2.6.2. Actividad enzimática en líquidos iónicos	24
2.7. Síntesis enzimática de PLLGA y PLA	26
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
3.1. Hipótesis	29
3.2. Objetivo general	29
3.3. Objetivos específicos	29
4. METODOLOGÍA	31
4.1. Materiales	31
4.2. Equipos	31

4.3.	Descripción del equipo	32
4.3.1.	Purificación del L-láctido	33
4.4.	Reacción de polimerización	33
4.5.	Purificación	35
4.6.	Viscosidad	35
4.7.	Caracterización de las muestras	35
4.7.1.	¹ H RMN	36
4.7.2.	Rayos-X	38
4.7.3.	Análisis térmicos	39
4.7.4.	GPC/SEC	41
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1.	Síntesis de PLLA y PGA	43
5.2.	Efecto de la relación inicial de monómeros y de los líquidos iónicos en los co-polímeros	45
5.3.	Efecto de la temperatura sobre los co-polímeros	51
5.4.	Análisis térmicos	61
5.4.1.	DSC	61
5.4.2.	TGA	64
5.5.	Determinación de la cristalinidad de los co-polímeros obtenidos	64
6.	CONCLUSIONES	70
7.	RECOMENDACIONES	72
8.	REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Formas isoméricas del ácido láctido.	5
Figura 2.2. Síntesis de poliglicólido por condensación del ácido glicólico.	7
Figura 2.3. Formación del glicólido derivado del ácido glicólico.	8
Figura 2.4. Síntesis del poliglicólido a partir de glicólido.	9
Figura 2.5. PLGA y sus monómeros.	10
Figura 2.6. Aplicaciones de polímeros biodegradables basados en láctido y glicólido.	11
Figura 2.7. Reacción general de polimerización por apertura de anillo.	12
Figura 2.8. Polimerización por apertura de anillo catiónica del glicólido.	13
Figura 2.9. Síntesis de poliláctido mediante polimerización de apertura de anillo por coordinación-inserción.	14
Figura 2.11. Rutas típicas de la producción de poliésteres utilizando enzima aislada como catalizador.	16
Figura 2.12. Sitio activo de una lipasa.	17
Figura 2.13. Mecanismo de polimerización enzimática del L-láctido.	21
Figura 2.14. Estructuras típicas de líquidos iónicos utilizados comúnmente en biocatálisis.	22
Figura 4.1. Sistema de reacción utilizado en la polimerización.	33
Figura 4.2. Cambios químicos (δ) característicos de los protones de L-láctico (H) y glicólido (H ₂).	36
Figura 4.3. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz) de PLGA.	37
Figura 5.1. Estructura molecular de los líquidos iónicos; a) [BMIM][PF ₆] y b) [HMIM][PF ₆].	43
Figura 5.2. Rendimiento de los co-polímeros de PLLGA contra el tiempo con el líquido iónico [HMIM][PF ₆].	45
Figura 5.3. Rendimiento de los co-polímeros de PLLGA contra el tiempo con el líquido iónico [BMIM][PF ₆].	46
Figura 5.4. Porcentaje de incorporación del L-láctido al co-polímero contra el tiempo con el líquido iónico [HMIM][PF ₆].	47
Figura 5.5. Porcentaje de incorporación del L-láctido al co-polímero contra el tiempo con el líquido iónico [BMIM][PF ₆].	48
Figura 5.6. Comparación del rendimiento y el porcentaje de incorporación del L-láctido con los dos líquidos iónicos evaluados.	49
Figura 5.7. Comparación de las viscosidades de los líquidos iónicos [HMIM][PF ₆] y [BMIM][PF ₆] en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C.	50
Figura 5.8. Reacción de co-polimerización a 90 °C, con y sin enzima.	54
Figura 5.9. Comparación de los rendimientos obtenidos a diferentes temperaturas.	54
Figura 5.10. Comparación de los porcentajes de incorporación del L-láctido en el co-polímero a diferentes temperaturas.	55
Figura 5.11. Espectro de ¹ H RMN del polímero obtenido a 90 °C a los 6 días.	57

<i>Figura 5.12. Comparación de los rendimientos obtenidos con y sin enzima a diferentes temperaturas.</i>	58
<i>Figura 5.13. Comparación de los pesos moleculares de los co-polímeros obtenidos a diferentes temperaturas.</i>	59
<i>Figura 5.14. Comparación de PDI de los co-polímeros a diferentes temperaturas.</i>	60
<i>Figura 5.15. Resultado del análisis de difracción de rayos-X con [BMIM][PF₆] a 65 °C.</i>	67
<i>Figura 5.16. Resultado del análisis de difracción de rayos-X con [BMIM][PF₆] a 75 °C con enzima (A) y sin enzima (B).</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2.1. Ejemplo de algunas de las lipasas más utilizadas en biotecnología.</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 4.1. Condiciones de reacción evaluadas.</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 5.1. Resultados de los polímeros obtenidos con los monómeros L-láctido y glicólido.</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 5.2. Resultados de M_n y PDI determinados por GPC de los co-polímeros sintetizados a 65 °C.</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 5.3. Resultados de la síntesis de los co-polímeros a 75 °C.</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 5.4. Resultados de la co-polimerización del PLLGA a 90 °C.</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 5.5. Comparación entre el porcentaje de alimentación y el porcentaje de los monómeros en el co-polímero.</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 5.6. Resultados del DSC para los homopolímeros.</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 5.7. Resultados del DSC de los co-polímeros obtenidos a 65 °C.</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 5.8. Resultados del DSC de los co-polímeros a 75 y 90 °C.</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 5.9. Porcentaje de cristalinidad de PLLAs y PGAs.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 5.10. Porcentaje de cristalinidad de los co-polímeros a 65 °C.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 5.11. Porcentaje de cristalinidad de los polímeros obtenidos a 90 °C.</i>	<i>68</i>

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

% p/p	Porcentaje peso/peso
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
Ac	Acetato
Asp	Aspartame
BF ₄	Tetrafluoroborato
BMIM	1-Butil-3-metilimidazolío
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipasa B
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E MIM	1-Etil-3-metilimidazolío
ELC	Complejo enzima-lactona inicial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramos
Glu	Glutamato
GPC/SEC	Cromatografía de permeación en gel
His	Histidina
HMIM	1-Hexil-3-metilimidazolío
K	Grados Kelvin
MeSO ₄	Metilsulfato
M _n	Peso molecular promedio numérico
MTOA	Metil trioctilamonio
M _w	Peso molecular promedio en peso
NO ₃	Nitrato
°C	Grados Celsius
p.f.	Punto de fusión
PDI	Índice de polidispersidad.
PDLA	Poli-D,L-láctido
PF ₆	Hexafluorofosfato
PLA	Poliláctido
PLLA	Poli-L-láctido
PLGA	Poliláctido-co-glicólido
PGA	Poliglicólido
PLLGA	Poli-L-láctido-co-glicólido
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
R-X	Rayos-X
Ser	Serina

T_f	Temperatura de fusión
Tf_2N	Bis[(trifluorometil)sulfonyl] amida
TFA	Trifluoroacetato
TfO	Trifluorometilsulfonato
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Termogravimetría

RESUMEN

Los materiales poliméricos son ampliamente utilizados en la actualidad, siendo obtenidos principalmente a partir de petróleo; a pesar de su gran utilidad, el uso de estos materiales conlleva grandes desventajas, principalmente su impacto negativo sobre el medio ambiente debido a la poca o nula biodegradabilidad de muchos de ellos, así como por los contaminantes generados durante su producción. Una alternativa al uso de estos materiales es sustituirlos por materiales biodegradables y derivados de fuentes naturales, conocidos como biopolímeros, con propiedades semejantes. Entre estos biopolímeros se encuentran los poliláctido-co-glicólidos (PLGA) que son ampliamente utilizados en el sector médico, industria de plásticos y farmacéutica. Éstos son obtenidos industrialmente por la polimerización por apertura de anillo empleando catalizadores químicos de difícil remoción lo que dificulta su uso en algunos sectores por la toxicidad asociada con su proceso productivo.

En esta tesis se llevó a cabo la síntesis enzimática de copolímeros poli-L-láctido-co-glicólido usando la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym® 435) y los líquidos iónicos, 1-Hexil-3-metilimidazolio hexafluoro fosfato [HMIM][PF₆] y 1-Butil-3-metilimidazolio hexafluoro fosfato [BMIM][PF₆], como medios de reacción. La utilización de líquidos iónicos conlleva grandes ventajas por su capacidad solvatante y nula presión de vapor, aunado a una adecuada actividad enzimática de lipasas. Se estudió la cinética enzimática variando la proporción inicial de monómeros, líquido iónico y temperatura. Los copolímeros obtenidos fueron caracterizados mediante ¹H RMN, difracción de rayos-X de polvo, análisis térmicos (DSC y TGA) y cromatografía de permeación en gel (GPC). Se encontró que las mejores condiciones de reacción fueron 90 °C, relación inicial de monómero de 3:1 (L-láctido:glicólido) y con el líquido iónico [BMIM][PF₆] obteniendo una recuperación de 61.3%, un porcentaje de incorporación de L-láctido de 75.0%, que coincide con la proporción inicial de monómeros. El máximo peso molecular obtenido fue de 18542 g/mol y un porcentaje de cristalinidad de 26.5%.

ABSTRACT

Polymeric materials are widely used currently and they are obtained mainly from crude oil. Despite their great utility, the use of these materials involves serious disadvantages, mainly from their negative impact on the environment due to their low biodegradability as well as the pollutants generated during their production. On the other hand, the use of biodegradable polymers from natural sources, known as biopolymers, represents an alternative to those synthetic ones with similar properties and applications than the latter. Among these biopolymers the polylactic-co-glycolic (PLGA) biopolymers are widely used in medical, pharmaceutical and plastic industries. These biopolymers are industrially obtained by ring-opening polymerization using chemical catalysts that are difficult to remove which makes difficult their use in some sectors due to the toxicity associated with the catalytic residues.

This thesis was based on the study of the enzymatic synthesis of copolymers of L-lactide and glycolide using lipase B from immobilized *Candida antarctica* (Novozymes® 435) as biocatalyst in ionic liquid media [HMIM][PF6] and [BMIM][PF6]. The use of ionic liquids as reaction media brings great advantages due to its high solvent power and the absence of vapor pressure, along with adequate enzymatic activities of lipases. The enzymatic reactions were studied by varying the initial monomers ratios, type of ionic liquid and reaction temperature. The copolymers obtained were characterized by ¹H RMN, Powder diffraction X-rays, thermal analysis (DSC and TGA) and size exclusion chromatography/gel permeation chromatography (SEC/GPC). The optimum reaction conditions were at 90 °C with an initial monomer ratio of 3:1 (L-Lactide:glycolide) and using the ionic liquid [BMIM] [PF6] to yield a 61.3% of co-polymer. The rate of incorporation L-lactide units was up to 75.0%, which coincides with the initial ratio of monomers. The maximum molecular weight was 18542 g/mol with a percentage of crystallinity of 26.5%.

1.INTRODUCCIÓN

Actualmente, los materiales poliméricos más utilizados son sintetizados a partir de monómeros derivados del petróleo, estos materiales son poco degradables y pueden contener sustancias de bajo peso molecular altamente tóxicas tales como catalizadores químicos y, al mismo tiempo, generar grandes cantidades de residuos muy contaminantes durante su producción.

En el campo de la medicina y desde décadas pasadas se han estado utilizando polímeros biodegradables obtenidos por fuentes renovables que pueden ser degradados por microorganismos como bacterias, algas y hongos.^{1,2} De la gran variedad de polímeros biodegradables conocidos, los poliésteres lineales alifáticos son particularmente atractivos y muy usados, especialmente los que derivan de ácido láctico y el ácido glicólico y sus co-polímeros.^{3,4} El gran interés en estos poliésteres como materiales biológicos podría ser atribuido a su gran biocompatibilidad y sus buenas propiedades mecánicas, así como su biodegradabilidad.⁵ Estos polímeros juegan un papel importante no sólo en aplicaciones médicas, sino también en la industria de plásticos y aplicaciones farmacéuticas, especialmente el uso de los poliláctido-co-glicólidos (PLGA). Los PLGA están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Debido a su biocompatibilidad han sido ampliamente empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales como tornillos de hueso, suturas reabsorbibles e implantes y como matriz para la liberación controlada de fármacos, por ejemplo: antígenos y hormonas.^{6,7}

El PLGA puede ser sintetizado por la policondensación directa de los hidroxiácidos láctido y glicólico o por la polimerización por apertura de anillo (aniónica, catiónica o coordinación-inserción). Debido a que este biopolímero es usado para aplicaciones médicas, es de gran interés obtenerlo sin el uso de

catalizadores metálicos altamente tóxicos, por lo que el empleo de enzimas ofrece una alternativa limpia. Hoy en día la catálisis enzimática en medios no convencionales como los disolventes orgánicos es muy utilizada, lamentablemente estos disolventes en su mayoría son nocivos para el medio ambiente y muy volátiles por lo que una buena alternativa es la utilización de líquidos iónicos, ya que, por su capacidad solvatante, por proporcionar un medio ambiente apropiado para que exista una adecuada actividad enzimática y por su muy baja presión de vapor, son excelentes medios de reacción dentro de la llamada química verde (*Green Chemistry*).

El presente trabajo se basó en la investigación de la síntesis enzimática del poli-L-láctido-co-glicólido (PLLGA), así como sus respectivos homopolímeros en líquidos iónicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Poliláctido

Los poliláctidos (PLA) son polímeros termoplásticos, biodegradables y biocompatibles que provienen de productos renovables tales como almidón y azúcar.⁸ El monómero de ácido láctico proviene de la fermentación de estos sustratos con microorganismos; la fermentación comercial es usualmente realizada en lotes y tarda de 3 a 6 días en completarse. La concentración de azúcar utilizada es de 5 a 10%, y resulta en una rapidez de producción de 2 gramos de ácido por litro de solución por hora. El mejor método de separación consiste en agregar carbonato de calcio e hidróxido de calcio para neutralizar el medio de fermentación y producir una disolución de lactato de calcio, que posteriormente se filtra para separar la biomasa celular y las partes insolubles. Posteriormente, el medio se evapora, re-cristaliza y acidifica con ácido sulfúrico para producir el crudo de ácido láctico.⁹ En esta fermentación se produce 99.5% del isómero L.¹⁰

El dímero cíclico del ácido láctico, llamado ácido láctido o simplemente láctido, se produce por la reacción de condensación continua del ácido láctico acuoso dando lugar a un polímero de bajo peso molecular, que posteriormente es convertido en una mezcla de estereoisómeros dímero-cíclicos (Figura 2.1) utilizando estaño como catalizador en una reacción de de-polimerización. La mezcla de láctido fundido es purificada mediante destilación al vacío.^{9,11,12}

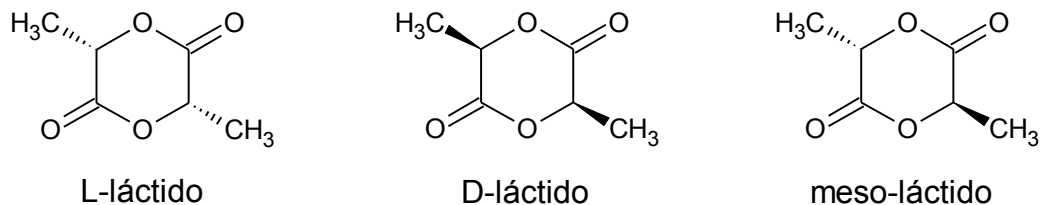


Figura 2.1. Formas isoméricas del ácido láctido.

Los PLAs pueden ser preparados por condensación directa de ácido láctico o por polimerización por apertura de anillo del ácido láctido. La primera presenta problemas de remoción de agua que produce polímeros de bajo peso molecular. En la polimerización por apertura de anillo generalmente se utiliza el 2-etil hexanoato de estaño (II) (octanoato de estaño) como catalizador y es por la vía de coordinación-inserción, ya que por esta vía se presenta un alto peso molecular del polímero, buena rapidez de reacción y bajos niveles de racemización. Las condiciones típicas de reacción son: 180-210 °C, octanoato de estaño en concentración de 100-1000 ppm y de 2 a 5 horas de reacción con un 95% de conversión.^{11,12} Industrialmente se producen alrededor de 14,000 toneladas por año en Norteamérica por la empresa Nature Works Inc. que es filial de Cargill Dow LLC.

Al polimerizar diferentes estereoisómeros, las propiedades de los polímeros obtenidos son diferentes, los polímeros de L-láctido son materiales semi-cristalinos, mientras que la polimerización de la muestra racémica (D,L)-láctido resulta en la formación de un material amorfo.^{4,10} El PLA tiene una temperatura de transición vítrea de cerca de 55 °C y una temperatura de fusión de aproximadamente 175 °C.⁹

Debido a su mecanismo de degradación, el PLA tiene muchas aplicaciones en las áreas de medicina, textiles y empaques. Muchas de estas aplicaciones dependen del estereoisómero usado en su preparación, por ejemplo: el PLLA es utilizado en suturas y en la producción de materiales ortopédicos donde es necesaria una alta resistencia mecánica.⁸

2.2. PGA

El PGA es el poliéster alifático lineal más simple. El PGA fue el primer polímero biodegradable desarrollado comercialmente y es un componente de los hilos de sutura reabsorbibles. Se introdujo en el mercado en 1970 bajo la marca comercial Dexona con la ventaja sobre el colágeno de que no presenta pérdida de

resistencia mecánica al humedecerse, da lugar a una baja respuesta inflamatoria y presenta mayor flexibilidad.¹³

La rigidez de este polímero, sin embargo, dificulta su uso para suturas. Las suturas de PGA pierden alrededor de 50% de su resistencia después de 2 semanas, el 100% en un mes, y son completamente absorbidas en 4-6 meses. Por este motivo, el glicólido ha sido co-polimerizado con otros monómeros para reducir la rigidez de sus fibras.¹⁵ Aunque en comparación con otros polímeros biodegradables, el PGA presenta excelentes propiedades mecánicas, se degrada rápidamente perdiendo sus propiedades en pocas semanas. Esta elevada rapidez de degradación se atribuye a su elevada hidrofiliidad, puesto que es un polímero muy cristalino. En el ámbito de las suturas quirúrgicas, los hilos de PGA son los de mayor rapidez de degradación. Como comercialmente se necesitan hilos con tiempos de reabsorción muy variados, se fabrican diversas suturas a base de co-polimerizar el glicólido con otros monómeros; estos co-polímeros son de degradación más lenta que el glicólido.

El PGA puede sintetizarse por condensación del ácido glicólico mediante calentamiento al vacío (Figura 2.2), produciéndose un polímero de bajo peso molecular (<10,000), reduciendo las aplicaciones posibles.^{13,14}

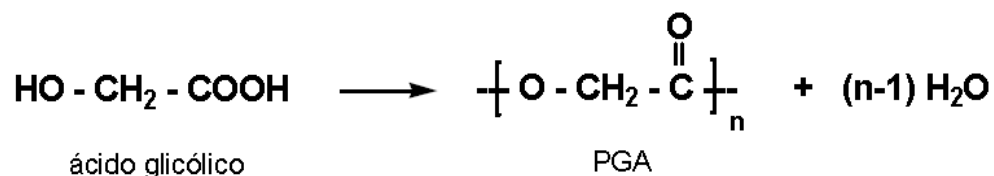


Figura 2.2. Síntesis de poliglicólido por condensación del ácido glicólico.

Una manera de obtener PGA de alto peso molecular es mediante la polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico (glicólido) derivado de ácido glicólico. La formación del glicólido se produce mediante una reacción de condensación en dos etapas (Figura 2.3). La primera consiste en la

policondensación del ácido glicólico para dar un poliéster de bajo peso molecular, y en un segundo paso se realiza una de-polimerización (ciclación intramolecular) a temperaturas relativamente elevadas para dar el glicólido.^{13,15}

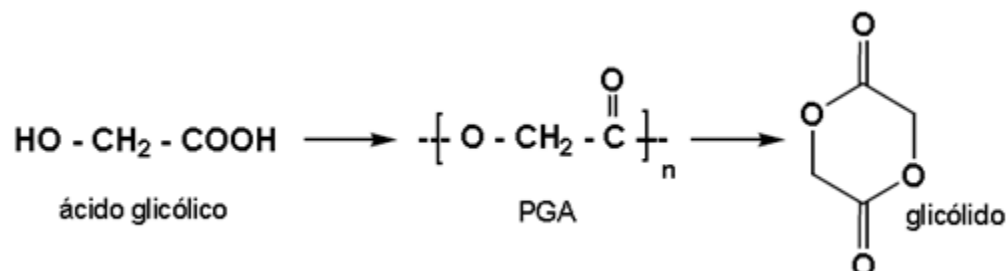


Figura 2.3. Formación del glicólido derivado del ácido glicólico.

La polimerización por apertura de anillo se realiza utilizando catalizadores típicos de la polimerización catiónica, tales como ácidos de Lewis o sales de estaño (cloruro de estaño dihidratado u octanoato de estaño). Si se usa octanoato de estaño se requiere una temperatura aproximada de 175 °C durante un período de 2 a 6 horas.^{13,15}

Cuando la polimerización se realiza mediante la apertura de anillo del glicólido (Figura 2.4) se obtienen polímeros de alto peso molecular ($20000 < M_n < 140000$), y con un porcentaje de 1-3% de monómero residual. El polímero resultante se caracteriza por una elevada cristalinidad (45-55%), un alto punto de fusión (220-225 °C) y una temperatura de transición vítrea de 35-40 °C. Este polímero tiene el inconveniente de no ser soluble prácticamente en ningún disolvente orgánico debido a su alta cantidad de oxígeno y alta cristalinidad, con excepción de algún organofluorado como el hexafluoroisopropanol, incluso en este último se disuelve con mucha dificultad si su peso molecular es elevado.¹⁵

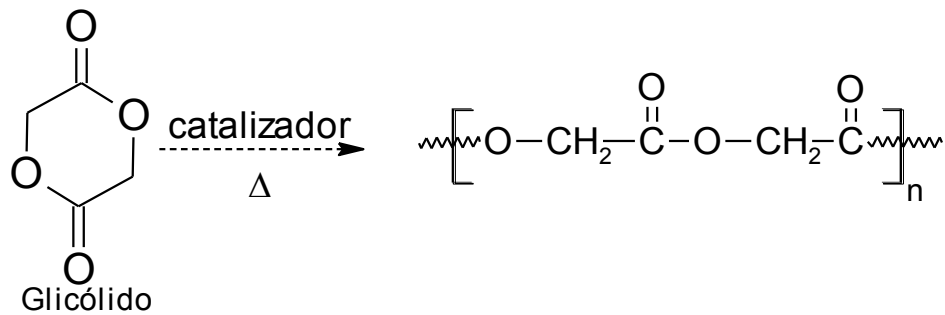


Figura 2.4. Síntesis del poliglicólido a partir de glicólido.

Otra forma de síntesis de PGA menos mencionada es la polimerización en estado sólido a partir de ácido glicólico y existe un número considerable de este tipo de reacciones descritas en la literatura. Esta técnica también puede ser utilizada para la preparación del PGA, siendo este caso concreto uno de los primeros trabajos de policondensación inducida térmicamente que fueron publicados.¹⁵ El PGA se obtuvo por calefacción del cloroacetato potásico en un proceso descrito por Hoffman en 1887. Recientemente, este método ha sido revisado, pudiéndose obtener PGA a partir de otras sales del ácido cloroacético. La policondensación en estado sólido de cloroacetatos se basa en la eliminación de halogenuros metálicos a alta temperatura, conduciendo a la formación del poliéster correspondiente, con un grado de polimerización inferior al que se obtiene mediante la polimerización térmica o en disolución.

El peso molecular del PGA resultante varía en función del halogenuro y el metal seleccionados. En todos los casos, sin embargo, es mucho menor que los pesos moleculares que se obtienen por apertura de anillo. Además, no todas las combinaciones conducen a la formación de polímero, debido principalmente a la estructura cristalina de la molécula.¹⁵

2.3. PLGA

El término co-polímero se utiliza para describir materiales poliméricos que contienen dos diferentes tipos de unidades de repetición en su estructura molecular, provenientes de la reacción de 2 tipos de monómeros distintos.

Los co-polímeros PLGA están formados de monómeros de láctido y glicólido en proporciones variables (Figura 2.5). Variando la composición molar de glicólido en el PLGA entre 25 y 0%, la vida media del co-polímero cambia de 2 semanas a 6 meses.¹⁶ Por ejemplo, un co-polímero con 50% de glicólico y 50% de D,L-láctico se degrada más rápidamente que sus homopolímeros puros. El co-polímero más importante en la industria contiene 90% de glicólido y 10% de L-láctido y es desarrollado por Ethicon como sutura absorbible con el nombre de VICRYL®.^{10,15} El co-polímero formado por 30% de glicólido, registrado bajo el nombre comercial de LACTOMER®, ha sido seleccionado como la composición óptima para la fabricación de clips y grapas, debido a que presenta la resistencia máxima de las formulaciones posibles, así como una rapidez relativamente alta de bioabsorción.¹⁵

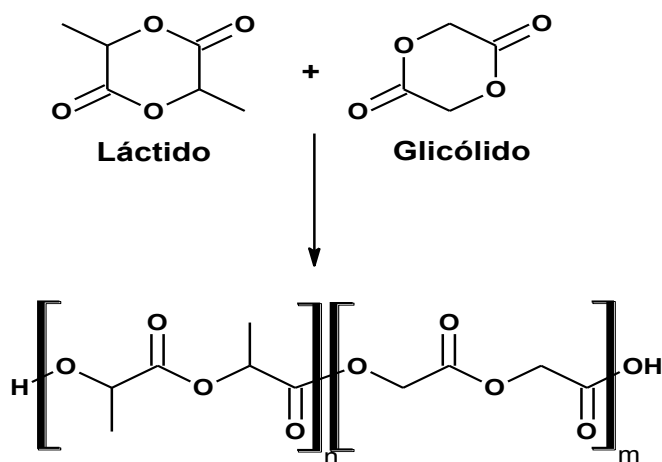


Figura 2.5. PLGA y sus monómeros.

La cristalinidad resultante del co-polímero PLGA depende del tipo y de la relación de monómeros (láctido y glicólido): los PLGAs sintetizados a partir de L-

láctido y glicólido son co-polímeros cristalinos, mientras que los sintetizados con D-láctido son amorfos. Los co-polímeros más amorfos con bajo peso molecular se utilizan preferentemente en sistemas de liberación controlada de fármacos, mientras que los más cristalinos con elevado peso molecular son utilizados en la fabricación de tornillos y clavos útiles en la fijación temporal de huesos, así como en la fabricación de fibras para suturas quirúrgicas.^{4,15}

Las formulaciones de co-polímeros con diferentes composiciones conducen a propiedades térmicas intermedias entre los correspondientes homopolímeros.

Tanto los homopolímeros de láctido como de glicólido y los co-polímeros de PLGA tiene diversas aplicaciones industriales (Figura 2.6), encontrándose éstas en la industria del plástico y en la farmacéutica; además, gracias a su biocompatibilidad, han sido ampliamente empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales como tornillos de hueso, suturas reabsorbibles e implantes y como matriz para la liberación controlada de fármacos, por ejemplo: antígenos y hormonas.^{6,7}

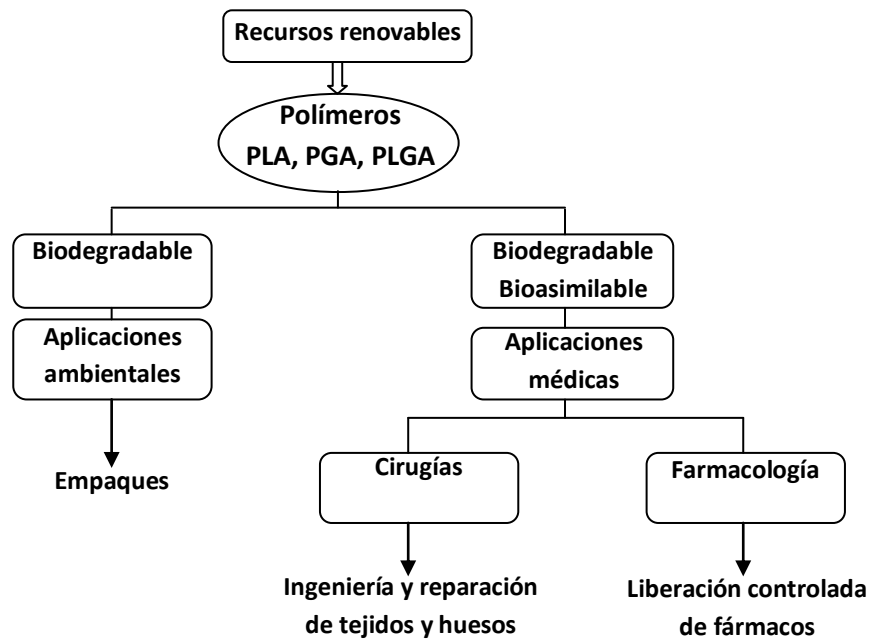


Figura 2.6. Aplicaciones de polímeros biodegradables basados en láctido y glicólido.

2.3.1. Síntesis de PLGA

El PLGA puede ser sintetizado de dos formas diferentes: por la policondensación directa de los hidroxiácidos láctico y glicólico o por la polimerización por apertura de anillo. Se sabe que la ruta de policondensación presenta baja conversión al equilibrio y que el agua producida en esta reacción es de difícil remoción, lo cual generalmente limita el peso molecular del polímero. Por el contrario, la polimerización por apertura de anillo es preferida por su alto grado de polimerización, la menor distribución de pesos moleculares que puede ser obtenida y la estéreo-regioselectividad de la polimerización.^{17,18}

2.4. Polimerización por apertura de anillo

La polimerización por apertura de anillo de lactonas es un atractivo método para sintetizar poliésteres alifáticos, porque proporciona una ruta para controlar las propiedades físicas y el índice de polidispersidad (PDI por sus siglas en inglés) de los polímeros.⁹ Esta polimerización puede ser catiónica, aniónica y por coordinación-inserción. Este tipo de polimerización se expresa en forma generalizada por la ecuación mostrada en la Figura 2.7, en la que el monómero cíclico es abierto para producir un polímero lineal que contiene el grupo funcional X en la cadena principal.¹⁹

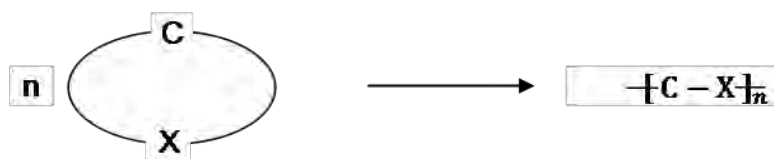


Figura 2.7. Reacción general de polimerización por apertura de anillo.

La polimerización de lactonas por apertura de anillo catiónica implica la formación de iones con carga positiva, los cuales son posteriormente atacados por el monómero, desencadenando la reacción de polimerización; en la Figura 2.8 se muestra un esquema de la polimerización por apertura de anillo catiónica del

glicólido. La polimerización de lactonas con este método suele ser muy difícil de controlar y sólo permite la formación de polímeros de bajo peso molecular.^{3,4}

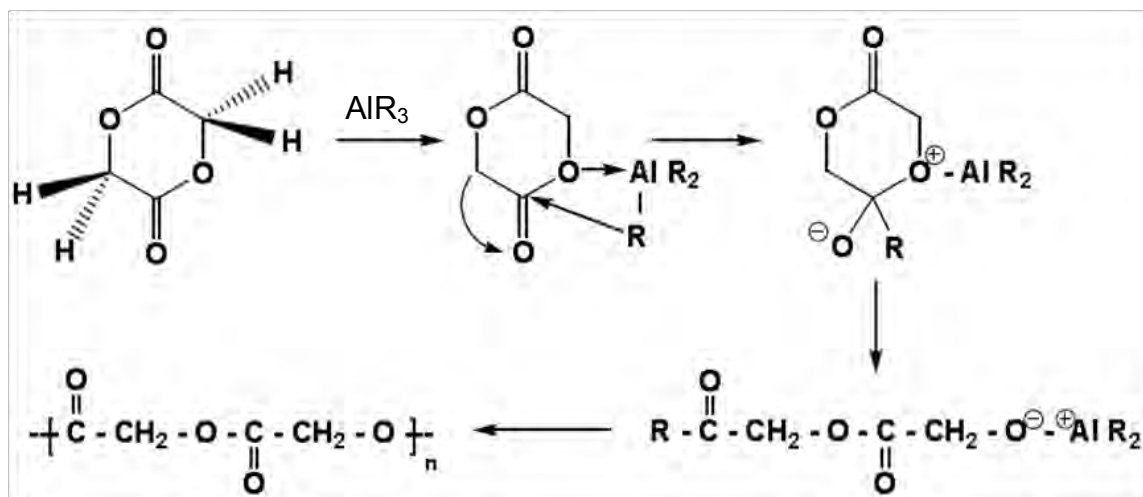


Figura 2.8. Polimerización por apertura de anillo catiónica del glicólido.

La polimerización por apertura de anillo aniónica de ésteres cíclicos se lleva a cabo por el ataque nucleofílico de un compuesto con carga negativa sobre el átomo de carbono del grupo carbonilo o bien sobre el carbono adyacente al oxígeno acilo, dando como resultado un poliéster lineal.⁴

La polimerización de lactonas por coordinación-inserción es ampliamente investigada y utilizada, ya que permite la obtención de polímeros de alto peso molecular con altos rendimientos. En la Figura 2.9 se puede observar un mecanismo de apertura de anillo por coordinación–inserción del láctido utilizando como catalizador octanoato de estaño.^{3,4}

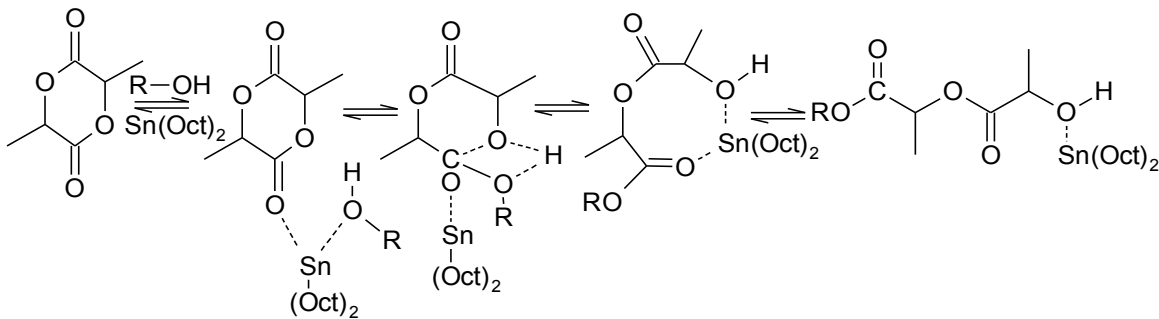


Figura 2.9. Síntesis de poliláctido mediante polimerización de apertura de anillo por coordinación-inserción.

Comúnmente, los catalizadores utilizados en la producción de PLGAs son 2-etil hexanoato de estaño (II) conocido como octanoato de estaño ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), estaño (II) alkóxidos, e isopropóxido de aluminio. El complejo más utilizado Industrialmente para la preparación de PLA y PLGA es, sin duda, el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, ya que se encuentra disponible comercialmente, es de fácil manejo y es soluble en disolventes orgánicos y monómeros fundidos. Es altamente activo (los tiempos de reacción típicos en masa a 140-180°C, van desde minutos a pocas horas) y permite la preparación de polímeros de alto peso molecular. No obstante que el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ha sido aceptado como aditivo alimentario por la FDA norteamericana, la toxicidad asociada con la mayoría de los compuestos de estaño no se considera conveniente en el caso de las aplicaciones biomédicas.⁴

La polimerización industrial de lactonas para obtener poliésteres de elevado peso molecular no es un proceso sencillo, ya que por ejemplo, hay que tener en cuenta que las impurezas en el monómero pueden limitar el peso molecular, por lo que el monómero debe ser altamente puro.

2.5. Lipasas

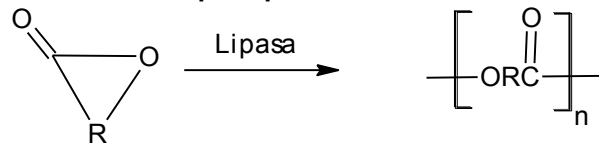
Las enzimas son catalizadores empleados en síntesis orgánica ya que son altamente específicas respecto a su sustrato, presentan alta actividad catalítica, su origen se encuentra en fuentes renovables, no son tóxicas y utilizan condiciones suaves de reacción (temperatura, presión y pH).^{20,21} Hace algunas décadas, se

pensaba que las enzimas solamente podían ser utilizadas en disoluciones acuosas. Sin embargo, Dastoli y Price en 1966, observaron por primera vez que algunas enzimas son activas en disolventes orgánicos, Klibanov en 1984, demostró que algunas hidrolasas pueden ser más activas y estables en disolventes no acuosos.²²

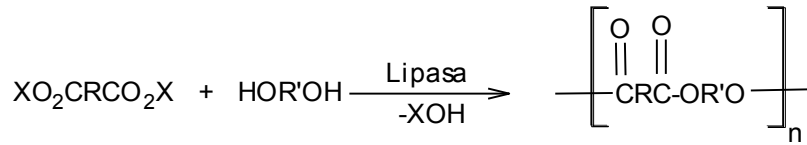
Las enzimas necesitan una pequeña cantidad de agua para retener su estado conformacional tridimensional activo y poder interactuar con el sustrato aun cuando la enzima esté covalentemente unida al soporte. El agua contribuye a la integridad estructural, a la polaridad del sitio activo y a la estabilidad de la proteína. Ésta provee interacciones hidrofóbicas con los residuos polares en la molécula enzimática, la cual podría, de otro modo, interactuar con otra, creando una estructura conformacional incorrecta. El agua también puede limitar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos alrededor de la enzima. En los disolventes orgánicos este ambiente acuoso se reduce a un microambiente que es conformado por el agua retenida por la enzima. La cantidad necesaria de agua varía significativamente dependiendo del origen de la lipasa y del tipo de reacción.^{23,24}

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, normalmente en un medio acuoso, en los sistemas vivos. Sin embargo, las lipasas son estables en disolventes orgánicos (medios no convencionales), manteniendo una alta actividad catalítica en medios con bajo contenido de agua y se pueden utilizar como biocatalizadores de diversas reacciones orgánicas como: esterificación, transesterificación, hidrólisis, aminólisis, politransesterificación o poliesterificación. Esta catálisis específica permite la producción de policarbonatos y poliésteres por varios modos de polimerización,²¹ ya que acepta un amplio intervalo de sustratos incluyendo lactonas cíclicas para producir diversos ésteres. La polimerización catalizada por lipasas (Figura 2.10) podría ser una de las aplicaciones más atractivas en el campo industrial para la siguiente generación de procesos, ya que los poliésteres polimerizados enzimáticamente se espera sean potencialmente biodegradables.²⁵

Polimerización por apertura de anillo de lactonas

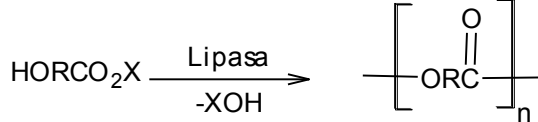


Policondensación de ácidos dicarboxílicos o sus derivados con glicoles



X: H, alquilo, alquilo halogenado, vinil, etc.

Policondensación de hidroxiácidos o sus ésteres



X: H, alquilo, alquilo halogenado, vinil, etc.

Figura 2.10. Rutas típicas de la producción de poliésteres utilizando enzima aislada como catalizador.

2.5.1. Características de las lipasas

Las lipasas son enzimas ubicuas que están presentes en la mayoría de los organismos microbianos, plantas y animales. Las lipasas comerciales son de origen microbiano, principalmente de bacterias, hongos y levaduras.²⁶ En la Tabla 2.1 se presentan las lipasas que se emplean con mayor frecuencia para fines biotecnológicos.

Tabla 2.1. Ejemplo de algunas de las lipasas más utilizadas en biotecnología.

Fuente	Peso (kDa)	Especificidad
<i>Rhizomucor miehei</i>	30	sn-1,3
<i>Geotrichum candidum</i>	60	Cis- Δ^9
<i>Candida rugosa</i>	60	No específica
<i>Pseudomonas glumae</i>	33	No específica
<i>Humicola lanuginosa</i>	30	No específica
<i>Burkholderia cepacia</i>	33	No específica
<i>Candida antarctica B</i>	60	sn-1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	41	sn-1,3

Estas lipasas a pesar de que poseen diferentes secuencias de aminoácidos y difieren en tamaño, se pliegan de una forma similar y poseen centros activos parecidos. Este plegamiento corresponde al modelo α/β hidrolasa en el que es característico un grupo de láminas β (en su mayoría dispuestas paralelamente) rodeadas por α hélices.²⁷ Este plegamiento incluye la tríada catalítica típica de las lipasas compuesta por un residuo serina (Ser) nucleofílica, activado por un puente de hidrógeno formado con histidina (His) y aspartame (Asp) o glutamato (Glu); esta tríada catalítica constituye el sitio activo de las lipasas (Figura 2.11).²⁸

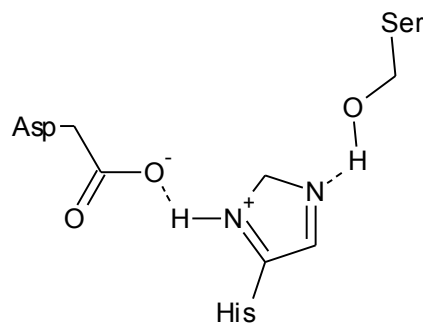


Figura 2.11. Sitio activo de una lipasa.

La acción catalítica de la lipasa se divide en dos etapas. En disolución acuosa, un segmento helicoidal de la cadena proteínica denominado “tapadera” cubre el centro activo de la lipasa (túnel hidrofóbico). En presencia de una interfase o en un medio orgánico, la “tapadera” se abre exponiendo el sitio activo dando lugar a una estructura catalíticamente activa favoreciendo la interacción de la enzima con el sustrato.²⁷

2.5.2. Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

La cepa de *Candida antarctica* es capaz de producir dos distintas lipasa denominadas A y B. La diferencia entre estas lipasas es que la A no es específica, es dependiente del calcio y de alta termoestabilidad; por el contrario, la lipasa B es independiente del calcio y es menos termoestable; tiene un peso molecular de 60 kDa y fue la primera obtenida de la *Candida antarctica*.²⁹

La lipasa de *Candida antarctica* fracción B es un biocatalizador eficaz por su amplia especificidad hacia el sustrato, comercialmente se vende con el nombre de Novozym® 435 suministrada por la empresa Novozymes de origen danés. La lipasa B ha demostrado gran actividad catalítica para una gran variedad de ésteres amida y tioles en medios no convencionales. Su cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es de aproximadamente 30 x 40 x 50 Å; su sitio activo está formado por Ser-His-Asp. Esta lipasa tiene una α/β hidrolasa como “tapadera”.^{29,30,31}

2.5.3. Inmovilización de enzimas

En las reacciones catalizadas por enzimas la separación de los sustratos y productos es difícil. Las enzimas no se pueden reutilizar y como son estructuras lábiles e inestables frente a factores físicos (calor, radiación), químicos (oxidación, reducción, disolventes orgánicos, iones metálicos, fuerza iónica y pH) o biológicos (proteólisis, modificación y degradación enzimática) disminuyen su actividad catalítica y solubilidad a medida que transcurre el tiempo.

Las lipasas son solubles en disoluciones acuosas pero sus sustratos naturales, los lípidos, no lo son. Aunque el uso apropiado de un disolvente orgánico ayuda a sobrepasar el problema de un íntimo contacto entre el sustrato y la enzima, el uso práctico de las lipasas en tal sistema de reacción posee dificultades tecnológicas (contaminación de los productos con actividad residual de la enzima) y dificultades económicas (uso de la enzima para un solo paso en el reactor).³²

Se ha encontrado que la inmovilización es de gran utilidad para brindar estabilidad a las enzimas; permite además su reutilización, la operación continua, y la posibilidad de mejor control de las reacciones. Por ende, se pueden esperar factores económicos favorables.

Si la lipasa es inmovilizada, entonces ésta llega a ser una fase independiente dentro del sistema de reacción, la cual podría ser fácilmente retenida en el reactor por medios mecánicos con las ventajas de prevenir contaminación de los productos y extender la vida activa de la enzima. La producción con lipasas inmovilizadas ha llamado la atención porque se aminoran las condiciones de operación y se limita la formación de productos de reacciones paralelas.³³

Las lipasas han sido inmovilizadas por diferentes métodos: adsorción, entrecruzamiento, unión covalente y atrapamiento físico, utilizando como soporte diferentes materiales orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, la actividad y la estabilidad operacional de las lipasas dependen de varios parámetros como la fuente de la lipasa, el tipo de soporte y el protocolo de inmovilización. Dentro de las técnicas de inmovilización, la adsorción es la de mayor potencial comercial ya que los soportes utilizados en otros métodos de inmovilización presentan resistencia mínima en las mezclas reaccionantes mientras que los soportes que se pueden utilizar para la adsorción son mecánicamente resistentes y pueden reutilizarse.³³

Dentro de la tecnología de la inmovilización y según la síntesis biológica que se desee realizar juegan un papel primordial: el soporte, la enzima y el método de inmovilización.

Al considerar un soporte para una enzima se deberá pensar en factores tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, agitación y el proceso de separación del sustrato del producto. Los soportes pueden variar de forma (láminas, tubos, cilindros, esferas), tamaño, propiedades físicas o químicas (hidrofílicos o hidrofóbicos), encontrándose una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, clasificándose cómo:³⁴

Soportes inorgánicos

- ❖ Naturales: (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice).
- ❖ Manufacturados: (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice).

Soportes orgánicos

- ❖ Polímeros naturales: Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano); proteínas fibrosas (colágeno, queratina).
- ❖ Polímeros sintéticos: Poliolefinas (como el poliestireno); polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos); otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas).

2.5.4. Mecanismo de apertura de anillo catalizado por lipasas

Como se mencionó anteriormente, la lipasa es una enzima perteneciente a la familia de las hidrolasas, la cual cataliza la hidrólisis de ésteres por medio de una "tríada catalítica", compuesta de un residuo de serina nucleofílico activado por un puente de hidrógeno en el enlace con histidina y aspartato o glutamato. Es esta "tríada catalítica" la responsable de la polimerización por apertura de anillo de lactonas. El residuo de serina nucleofílico participa en el ataque al carbonilo de la lactona para formar un complejo enzima-lactona inicial (ELC). Posteriormente, ocurre un ataque nucleofílico del agua, que se cree está presente dentro de la enzima, en el carbonilo del ELC para producir una estructura abierta de la lactona. Después ocurre un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo terminal de la lactona abierta al carbonilo de ELC; esto conduce a la formación de un polímero de cadena larga. Cabe mencionar que en este tipo de reacción, el agua contenida en la enzima participa en dos diferentes rutas. El agua contenida en la enzima decrece a medida que se utiliza en la hidrólisis del ELC, por otro lado, el contenido

de agua se incrementa debido a las policondensaciones entre los ELCs y la forma abierta de la lactona (Figura 2.12).²⁸

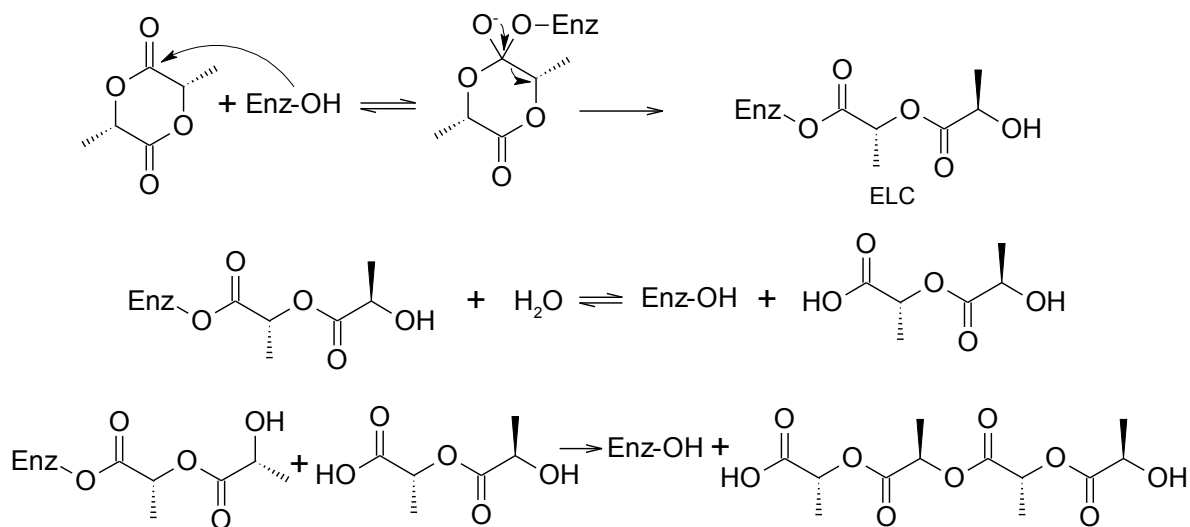


Figura 2.12. Mecanismo de polimerización enzimática del L-láctido.

2.6. Líquidos iónicos

2.6.1. Generalidades de los líquidos iónicos

La biocatálisis en entornos no convencionales con bajo contenido de agua ha sido ampliamente debatida durante más de dos décadas, y su importancia y aplicación han sido muy reconocidas. Entre los medios no convencionales se emplean, por ejemplo disolventes orgánicos (hexano, tolueno) y fluidos comprimidos considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*), los cuales se pueden emplear en su estado supercrítico, como es el caso del scCO_2 . Sin embargo, los disolventes orgánicos son por lo general líquidos inflamables y volátiles que se evaporan en la atmósfera, con efectos perjudiciales para el ambiente y la salud humana. Por otro lado, los fluidos comprimidos requieren de complejos equipos de alta presión que incrementan los costos de producción y ponen en entredicho la viabilidad económica de los procesos. Los líquidos iónicos podrían ser una alternativa a éstos en las síntesis catalizadas por enzimas suministrando un medio ambiente de reacción amigable debido a su insignificante

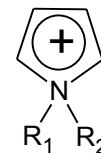
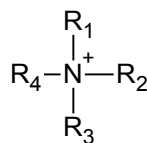
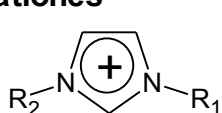
presión de vapor, lo cual facilita su reutilización, propiedades disolventes excelentes y estabilidad química y térmica.³⁵

Los líquidos iónicos son sales orgánicas líquidas a temperatura ambiente. A diferencia de los disolventes, que pueden describirse como líquidos moleculares, los líquidos iónicos están compuestos de un anión y un catión orgánicos (Figura 2.13).³⁶

Aniones

Anión	Nombre completo	Abreviatura
BF_4^-	Tetrafluoroborato	[BF ₄]
PF_6^-	Hexafluorofosfato	[PF ₆]
NO_3^-	Nitrato	[NO ₃]
CH_3CO_2^-	Acetato	[Ac]
CF_3CO_2^-	Trifluoroacetato	[TFA]
CH_3SO_4^-	Metilsulfato	[MeSO ₄]
CF_3SO_3^-	Trifluorometilsulfonato	[TfO]
$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	Bis[(trifluorometil)sulfonyl]amida	[Tf ₂ N]

Cationes



1,3-dialquilimidazolio 1,4-dialquilpiridinio Tetraalquilamonio 1,1-dialquilpirrolidino

Figura 2.13. Estructuras típicas de líquidos iónicos utilizados comúnmente en biocatálisis.

Sus propiedades únicas como poca volatilidad, no inflamabilidad y una excelente estabilidad térmica y química han hecho de ellos una alternativa atractiva comparada con los disolventes orgánicos comunes. Los líquidos iónicos tienen un bajo punto de fusión (<100 °C) y se mantienen como líquidos dentro de un amplio intervalo de temperatura (10-300 °C).³⁶

Una de las principales propiedades de los líquidos iónicos es su alta polaridad. Se puede observar una correlación entre el decrecimiento, tanto de la longitud de la cadena de los sustituyentes del anillo de imidazolio del catión y del tamaño del anión, con el incremento en la polaridad del líquido iónico.³⁶

Debido a la gran polaridad, los líquidos iónicos presentan un medio de reacción ideal para reacciones químicas y bioquímicas a causa de su habilidad para disolver un amplio intervalo de diferentes sustancias incluyendo orgánicas polares y no polares, inorgánicas y compuestos poliméricos.³⁶

A pesar de su gran polaridad, muchos de los líquidos iónicos son hidrofóbicos y pueden disolver hasta 1% de agua, y la presencia de agua puede afectar las propiedades físicas de los líquidos iónicos. Sin embargo, la solubilidad del agua en líquidos iónicos varía impredeciblemente. Por ejemplo, aun cuando el [BMIM][BF₄], [BMIM][PF₆], y [BMIM][Tf₂N] son similares en polaridad, la forma uno es completamente miscible en agua mientras las dos otras son parcialmente solubles en agua (0.13% v/v y 1.4% v/v, respectivamente).^{36,37}

Comparados con los disolventes orgánicos típicos, los líquidos iónicos son más viscosos; por ejemplo, la viscosidad de líquidos iónicos comúnmente utilizada es de 35-500 cP. mientras que para el tolueno es de 0.6 cP. y para el agua 0.9 cP. a 25 °C. La viscosidad de un líquido iónico representa su tendencia a formar puentes de hidrógeno y su interacción por fuerzas de van der Waals y puede ser reducida por un incremento de la temperatura o por adición de algunos co-disolventes orgánicos. Normalmente un líquido iónico con una larga cadena alquilo del catión y un gran tamaño de anión presenta una gran viscosidad.³⁶

Una ventaja obvia del uso de los líquidos iónicos sobre los disolventes orgánicos tradicionales es que las propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos, incluyendo su polaridad, hidrofobicidad, viscosidad y miscibilidad en disolventes, pueden ser fijadas con precisión por la alteración del catión, anión o sustituyentes. Es importante notar que la manipulación de las propiedades del

disolvente, permite diseñar un líquido iónico para condiciones de reacción específicas, tales como incrementar la solubilidad del sustrato, modificar la selectividad enzimática o adaptar la rapidez de reacción.^{36,38}

2.6.2. Actividad enzimática en líquidos iónicos

Como se mencionó anteriormente, los líquidos iónicos poseen una alta viscosidad; la viscosidad del medio de reacción puede afectar limitando la transferencia de masa en la reacción. De manera, que con una mayor viscosidad puede esperarse una menor rapidez de reacción. Por ejemplo, cuando la α -quimiotripsina fue evaluada con una reacción de transesterificación en dos líquidos iónicos de diferentes viscosidades: [EMIM][Tf₂N] con una viscosidad de 34 cP. y el [MTOA][Tf₂N] con 574 cP a 50 °C, se observó una reducción en la actividad enzimática en el líquido iónico con mayor viscosidad.³⁶

Aunque los disolventes orgánicos polares y relativamente hidrofóbicos, como cloroformo, diclorometano o tetrahidrofurano afectan negativamente a la actividad de las lipasas en cuanto a las reacciones de formación de enlaces éster, es sorprendente que los líquidos iónicos no. Además, hay que tener en cuenta que la capacidad de utilizar disolventes con una mayor polaridad aumenta la solubilidad de los sustratos polares, dando lugar a reacciones más rápidas.³⁹

Lozano y col. (2003) al estudiar la transesterificación de la α -quimiotripsina en 5 líquidos iónicos; ([EMIM][BF₄], [EMIM][Tf₂N], [BMIM][BF₄], [BMIM][PF₆] y [MTOA][Tf₂N]) observaron una mayor rapidez de reacción en los líquidos iónicos más polares. El mismo grupo de investigación comparó la actividad de la *Candida antarctica* B libre en 4 líquidos iónicos ([EMIM][BF₄], [EMIM][Tf₂N], [EMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N]) y los disolventes orgánicos 1-butanol y hexano en presencia de 2% (v/v) de agua y también encontraron que la actividad de la enzima se incrementó con el aumento de la polaridad (decremento en el largo de la cadena del radical alquilo en el catión y el tamaño del anión) y la actividad enzimática fue mayor en los líquidos iónicos que en los disolventes orgánicos.³⁵ Sin embargo, otros

estudios con otras reacciones en líquidos iónicos no muestran relación entre la rapidez de reacción y la polaridad del disolvente como por ejemplo la transesterificación catalizada por la lipasa *Candida rugosa*.⁴⁰

Este fenómeno entre la polaridad y la actividad enzimática, tal vez se deba a que la actividad enzimática puede estar más relacionada con la viscosidad y menos con la polaridad de los líquidos iónicos. En primer lugar, la polaridad de los líquidos iónicos varía en un estrecho intervalo (0.6-0.7) en comparación con su viscosidad, que va cambiando a través de una gama mucho más amplia (35-500 cP). En segundo lugar, parece existir una correlación entre la polaridad y la viscosidad de los líquidos iónicos. Como se mencionó anteriormente, un líquido iónico con cadenas más cortas alquilo en el catión y un menor tamaño del anión puede tener una baja viscosidad y una alta polaridad. Esto sugiere que una ligera reducción de la polaridad de líquidos iónicos puede corresponder con un aumento enorme en su viscosidad. En tercer lugar, los índices de reacción por lo general han sido comparados en diferentes líquidos iónicos con la misma cantidad de agua presente en la reacción del sistema (por ejemplo, 2%, v/v, en el estudio descrito anteriormente). En tales condiciones, el disolvente con una mayor polaridad podría tener menos agua asociada con la enzima y más agua remanente en el disolvente: lo primero podría resultar en una menor rapidez de reacción, mientras que lo último daría lugar a una reducción de la viscosidad del líquido iónico y, a su vez una mejora de la movilidad de la molécula de proteína, lo que se traduciría en un aumento de la actividad enzimática.³⁶

No todos los líquidos iónicos son adecuados para la biocatálisis, ya que se ha encontrado que la actividad enzimática en líquidos iónicos es dependiente del anión. Las enzimas son usualmente activas en líquidos iónicos que contienen los aniones BF_4^- , PF_6^- , y NTf_2^- , pero su actividad decrece significativamente en líquidos iónicos que contiene aniones tales como: NO_3^- , CF_3SO_3^- , CH_3CO_2^- , Cl^- y CF_3CO_2^- .³⁸ Hay dos posibles explicaciones para esta diferencia. La primera, los aniones compatibles con la enzima presentan una baja nucleofilicidad y por esto podrían presentar una baja tendencia a causar cambios conformacionales en la enzima

que son debidos a su interacción con los sitios cargados positivamente en la estructura proteínica.³⁸ Una segunda explicación es que los aniones compatibles con la enzima presentan una baja basicidad en los puentes de hidrógeno, lo cual minimiza la interferencia con los puentes de hidrógeno internos de la enzima; consistente con esta noción, por ejemplo, las enzimas son inactivas en [BMIM][Cl], el cual tiene una alta basicidad en los puentes de hidrógeno.³⁹

2.7. Síntesis enzimática de PLLGA y PLA

Matsumura y colaboradores reportaron en 1997 la polimerización en masa o, es decir, en ausencia de disolvente por encima del punto de fusión del monómero (T_f . aprox. 95-100 °C) en donde éste, en estado líquido, actúa también como medio disolvente, del PLA utilizando la lipasa de páncreas de porcino; entre los resultados esta investigación, con una concentración de enzima de 3% y una temperatura de 130 °C, se obtuvo un poli-D,L-láctido (PDLA) con un peso molecular de 126,000 g/mol y un rendimiento de 16%. Sin embargo, a 100 °C y 3% de enzima, se obtuvo un PLLA con un peso molecular de 48,000 g/mol y un rendimiento de 8%. Igualmente, se realizaron las reacciones sin enzima, manteniendo constantes las otras condiciones, obteniendo un PDLA con un peso molecular de 3,300 g/mol, mientras que la síntesis del PLA no se llevó a cabo; estos resultados indican que la lipasa promueve significativamente la polimerización. Todos los resultados anteriores fueron obtenidos a los 7 días de reacción.²⁵

En esta investigación también se evaluó la polimerización del PDLA con la enzima Novozym® 435 con una concentración de enzima de 3% a una temperatura de 80 °C a 7 días de reacción; sin embargo, bajo estas condiciones de reacción no se llevó a cabo la polimerización.²⁵

Otra polimerización en masa reportada es la de Huijser y colaboradores (2006); la polimerización enzimática por apertura de anillo del L-láctido y glicólido (80L/20G) se llevó a cabo utilizando lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Lipasa PS)

en dos estados: libre (PS) e inmovilizada (PS-DI), a temperaturas de 100 y 130 °C. Los resultados se pueden observar en la Tabla 2.2.¹⁸

Tabla 2.2. Resultados de la síntesis de PLLGA catalizada por lipasas.

Polímero ^a	Enzima	T (°C)	M _w ^b	PDI ^b	Conversión ^c (%)	T _g ^d (°C)
1. PLLGA	PS	100	11.7	1.8	95	47.5
2. PLLGA	PS-DI	100	8.7	1.5	82	44.7
3. PLLGA		100	1.9	1.3	25	ND
4. PLLGA	PS	130	20.6	4	98	45.6
5. PLLGA	PS-DI	130	13.1	2.7	94	45.6
6. PLLGA		130	2.2	1.2	12	ND

^a Tiempo de reacción (1 a 3: 7 días; 4 a 6: 2 días). ^b Determinado por SEC.

^c Determinado por ¹H RMN. Medido por DSC. ND No determinado.

Se puede observar que a 130 °C se obtuvo un peso molecular de 20,600 g/mol con enzima, mientras que sin enzima se obtuvo un peso molecular de 2,200 g/mol; un resultado similar se presentó a los 100 °C; esto fue atribuido a las trazas de hidroxácido presentes en los monómeros que podrían ser suficientes para iniciar o catalizar la polimerización de acuerdo con el mecanismo de polimerización por apertura de anillo catiónica.¹⁸

Yoshizawa-Fujita y colaboradores (2008) realizaron la polimerización de L-láctido catalizada por lipasa en 4 líquidos iónicos ([BMIM][BF₄], [BMIM][PF₆], [BMIM][NTf₂] y [BMIM][N(CN)₂]). La síntesis enzimática se llevó a cabo en todos los líquidos iónicos excepto en el [BMIM][N(CN)₂], ya que la lipasa se desnaturalizó por la fuerte interacción con el anión.⁴¹

Con el [BMIM][BF₄] a 110 °C se obtuvo un peso molecular de 54,600 g/mol con un rendimiento de 35%, para el [BMIM][NTf₂] a 120 °C se obtuvo un polímero con un peso molecular de 50,100 g/mol y una recuperación de 10% y con el [BMIM][PF₆] a 120 °C se obtuvo un polímero con un peso molecular de 3,900 g/mol y 1% de recuperación; en este mismo estudio, se realizó la polimerización en masa, obteniéndose un polímero con un peso molecular de 40,000 g/mol y 54%

de recuperación a 130 °C, y con tolueno, obteniéndose un polímero con un peso molecular de 44,100 g/mol y 26.9% de recuperación a 100 °C. De los resultados, se puede ver que la especie aniónica del líquido iónico influye tanto en la recuperación como en el peso molecular del polímero. Con los líquidos iónicos [BMIM][BF₄] y [BMIM][NTf₂] se obtuvieron los mayores pesos moleculares, incluso más que en la polimerización en masa y con tolueno; sin embargo, el rendimiento fue menor que en la polimerización en masa, esto fue atribuido a la alta solubilidad del polímero en los líquidos iónicos.⁴¹

Fujioka y colaboradores (2006) realizaron una polimerización del L-láctido por apertura de anillo catalizada por la Novozym® 435, esta catálisis se llevó a cabo a 100 °C en masa en una atmósfera de argón con 6% de enzima. En este trabajo, se obtuvo un polímero con un peso molecular de tan solo 2,440 g/mol en 7 días y un PDI de 2.6, lo cual parece estar en contradicción con el trabajo previamente mencionado de Yoshizawa-Fujita y colaboradores;⁴¹ de igual manera, se llevó a cabo la síntesis sin enzima y a los 7 días se obtuvo un polímero con peso molecular de 1,550 g/mol. Ellos concluyeron que la reacción sin enzima se llevó a cabo por polimerización térmica, ya que el L-láctido participó en la reacción en estado líquido (p.f. 97 °C); sin embargo, el polímero obtenido con enzima presentó mejores características que el obtenido sin enzima.⁴² Cabe recalcar que en estos estudios la actividad de las lipasas se pueda ver reducida a dichas temperaturas de reacción y en el medio láctido.

En este trabajo se pretende estudiar el uso de líquidos iónicos como un medio alternativo de reacción debido a sus propiedades y características para llevar a cabo una adecuada síntesis enzimática con la lipasa B de *Candida antarctica* de copolímeros y homopolímeros del L-láctido y glicólido.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Es factible utilizar líquido iónico como medio de reacción para la polimerización enzimática de copolímeros de poli-L-láctido-co-glicólido y sus homopolímeros así como obtener diferentes propiedades en los copolímeros obtenidos al variara el líquido iónico, la relación inicial, la temperatura y el tiempo usando la lipasa B de *Candida antarctica*.

3.2. Objetivo general

Llevar a cabo la síntesis enzimática de los co-polímeros poli-L-láctido-co-glicólido y sus homopolímeros usando la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym® 435) en líquidos iónicos y su caracterización en función del tipo de líquido iónico, la relación inicial de monómeros, la temperatura y el tiempo. Con el fin de evaluar una reacción de polimerización alternativa a las actualmente empleadas.

3.3. Objetivos específicos

- ❖ Efectuar la síntesis de los co-polímeros variando la relación inicial de monómeros, el líquido iónico, el tiempo y la temperatura, para evaluar su efecto sobre las características de los biopolímero obtenidos.
- ❖ Determinar las viscosidades de los líquidos iónicos para conocer su comportamiento de flujo en un intervalo de 0 a 90 °C.
- ❖ Realizar un estudio de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H) para determinar el porcentaje de incorporación de L-láctido en el co-polímero (estructura del biomaterial).
- ❖ Realizar un análisis de difracción de rayos-X de polvos para determinar el porcentaje de cristalinidad de los biomateriales.

- ❖ Determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión cristalina (T_m) por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el porcentaje de degradación del polímero por termogravimetría (TGA), para determinar la estabilidad térmica del polímero.
- ❖ Determinar el peso molecular de los biopolímeros mediante cromatografía de permeación en gel (GPC/SEC), para determinar si se llevó a cabo la polimerización.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

El biocatalizador utilizado fue Novozym® 435. Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre soporte acrílico poroso Lewatit® (BASF), donado por Novozym® México con una actividad específica de 7,000 PLU/g (μ moles de laurato de n-propilo producidos por minuto por gramo de catalizador empleado). Los monómeros empleados en la copolimerización fueron: L-láctido ((3S)-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), 98% (Aldrich) y glicólido 99% (Sigma). Se utilizaron dos líquidos iónicos: 1-Hexil-3-metilimidazolio hexafluoro fosfato ([HMIM][PF₆]), 97% (Aldrich) y 1-butil-3-metilimidazolio hexafluoro fosfato ([BMIM][PF₆]), 96% (Fluka). Entre los disolventes empleados se encuentran: metanol, grado industrial (Química Barsa), cloroformo, grado industrial (Química Barsa), dimetil sulfóxido (DMSO), grado industrial y grado HPLC (J.T. Baker) y glicerina grado industrial (Química Barsa).

4.2. Equipos

Entre los equipos utilizados para la reacción y purificación se encuentran: Balanza analítica (marca Ohaus, modelo AP2105), congelador REVCO a -78 °C, Liofilizador (marca Heto, modelo FD1.0.), parrilla con temperatura y agitación controlada (IKA RTC basic ETS-D4), bomba de vacío (difragma) intermedio Millipore, equipo Millipore, con filtro de membrana de 0.45 μ m, bomba de vacío para disolventes, marca Vacuubrand modelo PC3-RZS2.5 con condensador de volátiles incorporado para hielo seco/acetona, capacidad total de vacío de 4×10^{-4} mbar.

Para la caracterización de los copolímeros se utilizaron los siguientes equipos: Cromatógrafo de permeación en gel GPC-DMSO con PL-ELS-1000/Horno/Bombas 1050 (HP, EUA), Inyector manual 7725i (Rheodyne, EUA), detector Evaporative light Scattering Detector PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, EUA), equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) modelo Unity Inova 400 MHz (Varian, EUA), este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química de la UNAM), difractor de rayos X, modelo D-5000, $k\alpha$ radiación de Cu (Siemens, Alemania), este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), equipos de análisis térmicos, Calorimetría diferencial de barrido (DSC) modelo DuPont DSC 21000 (Instruments, EUA) (USAI) y Termogravimetría (TGA) TA 2950 TGA (TA Instruments, EUA) (USAI).

Para determinar la viscosidad de los líquidos iónicos se utilizó el reómetro de deformación controlada ARES-RFS III (TA Instruments, EUA).

4.3. Descripción del equipo

El sistema de polimerización constó de un vial de 8 mL (2 cm de diámetro y 5 cm de largo) y agitación continua (mediante un agitador magnético en cruz). El vial fue colocado dentro de un baño de glicerina, la cual a su vez estuvo sobre una placa de calentamiento a temperatura y agitación controlada (Figura 4.1).

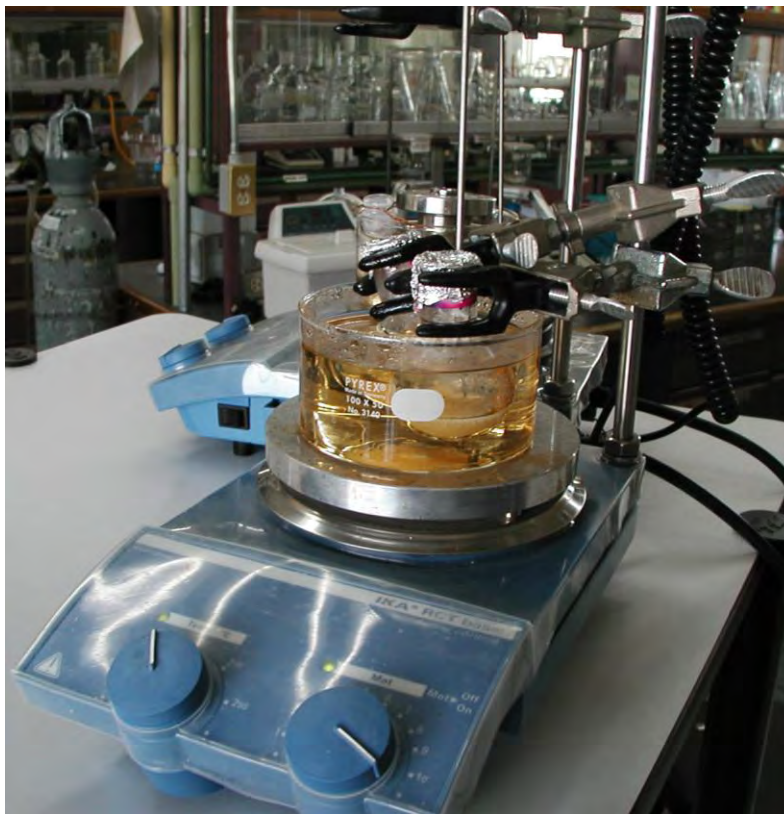


Figura 4.1. Sistema de reacción utilizado en la polimerización.

4.3.1. Purificación del L-láctido

El (3S)-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona fue purificado previamente a su uso; 100 g se disolvieron en 600 mL de metanol y fue puesto en el congelador durante 24 horas, posteriormente se filtró al vacío, después fue secado mediante una bomba de alto vacío durante 4 horas para eliminar las trazas de metanol.

4.4. Reacción de polimerización

Se pesó en un vial 3.5 g de monómero (L-láctido y/o glicólido, Tabla 4.1) con 10% p/p de biocatalizador Novozym® 435 con respecto al monómero. El vial con el monómero y la enzima fue congelado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, posteriormente fue liofilizado por 2 horas. Al terminar la liofilización se le agregó 5

g de líquido iónico junto con el agitador magnético y se colocó en el equipo descrito anteriormente a las condiciones descritas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones de reacción evaluadas.

Monómeros	Líquido iónico	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (días)	Enzima
L-láctido	[HMIM][PF ₆]	65	4	Si
L-láctido	[HMIM][PF ₆]	65	----	No
Glicólido	[HMIM][PF ₆]	65	1.8	Si
Glicólido	[HMIM][PF ₆]	65	9	No
L-láctido	[BMIM][PF ₆]	65	4	Si
L-láctido	[BMIM][PF ₆]	65	----	No
Glicólido	[BMIM][PF ₆]	65	12	Si
Glicólido	[BMIM][PF ₆]	65	11	No

Condiciones de reacción de los co-polímeros				
Relación de monómeros (L-láctido:glicólido)	Líquido iónico	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (días)	Enzima
*3:1	[HMIM][PF ₆]	65	11	Si
*1:1	[HMIM][PF ₆]	65	9	Si
*1:3	[HMIM][PF ₆]	65	5	Si
*3:1	[BMIM][PF ₆]	65	12	Si
*1:1	[BMIM][PF ₆]	65	10	Si
*1:3	[BMIM][PF ₆]	65	12	Si
3:1	[BMIM][PF ₆]	65	12	No
*3:1	[BMIM][PF ₆]	75	9	Si
*3:1	[BMIM][PF ₆]	75	9	No
*3:1	[BMIM][PF ₆]	90	6	Si
*3:1	[BMIM][PF ₆]	90	6	No

* A estas condiciones se realizó el seguimiento de la reacción a diferentes tiempos.

Primero se efectuó la reacción para determinar el tiempo máximo de reacción, este tiempo máximo se determinó cuando el agitador magnético dejó de girar (se consideró que en este momento la transferencia de masa fue muy limitada); una vez conocido este tiempo de reacción se repitieron las reacciones a diferentes tiempos intermedios para monitorear el desarrollo de ésta.

4.5. Purificación

Transcurrido el tiempo de reacción al contenido del vial se le agregó cloroformo o DMSO (se utilizó cloroformo para disolver el PLA y DMSO para disolver el poliglicólido y los co-polímeros) y se agitó para disolver totalmente, posteriormente, se filtró con un tamiz para remover la enzima y el agitador magnético, a continuación la enzima fue lavada y filtrada dos veces con cloroformo o DMSO con el fin de recuperar la mayor cantidad del polímero remanente. Esta mezcla fue vertida en metanol frío (5 °C) gota a gota en una relación de volumen 1:15 para precipitar el polímero y eliminar trazas de residuos, posteriormente esta mezcla fue filtrada con un filtro Millipore con un tamaño de poro de 0.45 μm, hasta que el polímero estuvo suficientemente seco. Por último, el polímero fue secado con una bomba de alto vacío para eliminar las trazas de metanol.

Después de la purificación el polímero fue pesado para determinar el rendimiento de la reacción, con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del polímero recuperado (g)}}{3.5 \text{ (g)}} \times 100$$

4.6. Viscosidad

Se determinó la viscosidad de los líquidos iónicos para conocer su comportamiento de flujo en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C. Para este estudio se utilizó el reómetro de deformación controlada ARES-RFS III (TA Instruments, EUA) con una geometría de placas paralelas de 50 mm de diámetro y separación de 0.5 mm. El intervalo de velocidad de deformación fue de 1 a 200 s⁻¹

4.7. Caracterización de las muestras

Los polímeros fueron caracterizados por medio de los siguientes análisis:

- ❖ Resonancia magnética nuclear de ^1H
- ❖ Rayos-x
- ❖ Análisis térmicos DSC y TGA
- ❖ GPC/SEC

4.7.1. ^1H RMN

El análisis de ^1H RMN se realizó disolviendo previamente 50 mg de muestra en $\text{d}_6\text{-DMSO}$; posteriormente se calentó para facilitar la disolución del polímero, este análisis fue realizado a una frecuencia de 400 MHz.

El análisis de ^1H RMN se utilizó para la determinación de la composición de los co-polímeros de PLGA (% de incorporación de los monómeros), se llevó a cabo con base en el cambio químico característico de los protones del grupo metino perteneciente a la unidad de repetición del L-láctido ($\delta = 5.2$ ppm) y del grupo metileno perteneciente al glicólido ($\delta = 4.9$ ppm) en el campo electromagnético, los cuales son diferentes para cada monómero y por consiguiente, pueden ser identificados por resonancia magnética nuclear de ^1H (Figura 4.2).^{4,16}

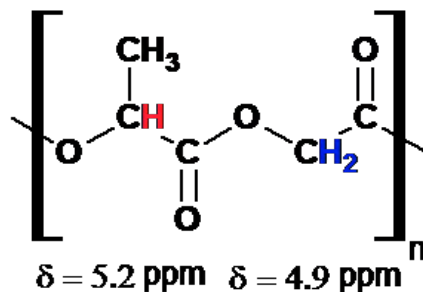


Figura 4.2. Cambios químicos (δ) característicos de los protones de L-láctico (H) y glicólido (H_2).

En la Figura 4.3 se puede observar un espectro de ^1H RMN de un co-polímero de PLGA.

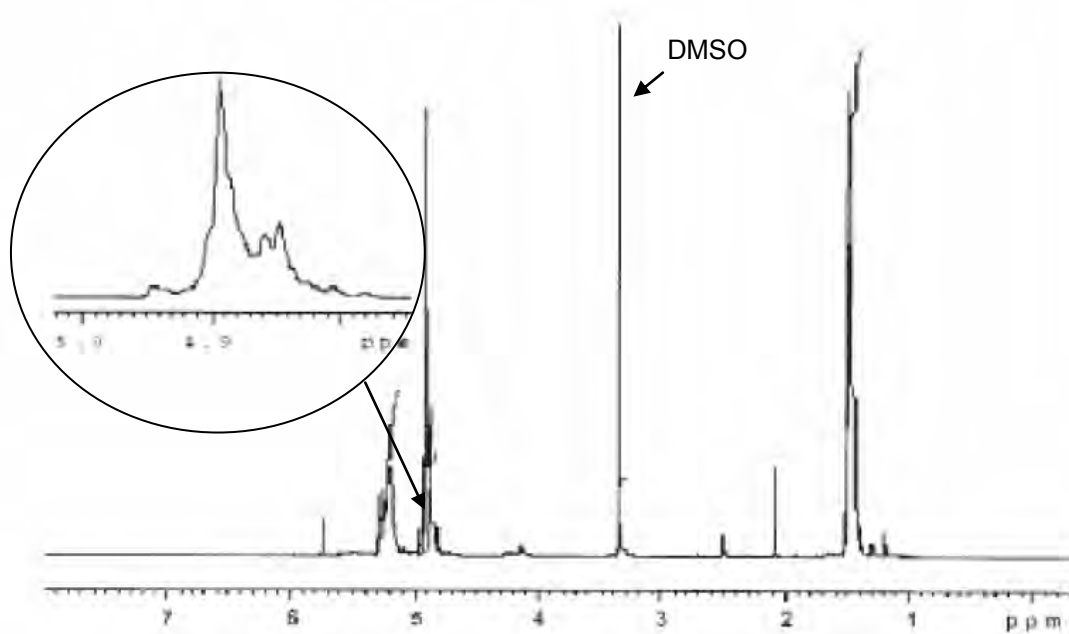


Figura 4.3. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) de PLGA.

Para calcular el porcentaje de incorporación de los monómeros en el copolímero se tuvo que integrar el área de cada uno de los picos, lo que se realizó mediante la ayuda del software MestReC, para realizar el cálculo se utilizaron las siguientes ecuaciones:^{4,16}

$$\% \text{ molar del L-láctido} = \frac{I_1}{(I_1 + I_2/2)} \times 100$$

$$\% \text{ molar del glicólido} = \frac{I_2/2}{(I_1 + I_2/2)} \times 100$$

donde:

I_1 =integración de la señal 5.2 (L-láctido).

I_2 = integración de la señal 4.9 (glicólido).

4.7.2. Rayos-X

Para la determinación del porcentaje de cristalinidad, la muestra fue perfectamente pulverizada. Para este análisis se utilizó un equipo Siemens D-5000, ka radiación de Cu I = 1.5406 Angstroms (Å).

El porcentaje de cristalinidad se puede calcular por medio de la aplicación de la técnica de difracción de rayos X. Ésta se fundamenta en que cuando un haz de rayos X de determinada longitud de onda λ incide sobre una estructura cristalina, 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 las ondas se refuerzan son características de la orientación del cristal y de las distancias interatómicas dentro de los cristales.⁴³

Esta difracción está descrita por la ley de Bragg, según la ecuación.

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

θ = ángulo formado por el rayo incidente y el refractado.

λ = longitud de onda de la radiación utilizada.

n = orden de difracción.

d = distancia entre los planos cristalinos implicados en la difracción.

Siendo h , k y l los índices de Miller del plano cristalino.

En un diagrama de rayos X para un polímero semi-cristalino, puede verse la intensidad de los rayos X dispersados frente al ángulo de difracción θ . Los picos relativamente más estrechos son debidos a la dispersión producida por las

regiones cristalinas, mientras que el pico más ancho (llamado halo amorfo), sobre el que los demás picos descansan, es debido principalmente a la dispersión producida por las zonas amorfas. Se puede calcular el grado de cristalinidad w_c con la fórmula: ⁴⁴

$$w_c = \frac{A_c}{A_c + A_a}$$

donde:

A_c = Área de los picos cristalinos

A_a = Área de la fase amorfa.

4.7.3. Análisis térmicos

4.7.3.1. DSC

El análisis térmico de los polímeros obtenidos se realizó mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Utilizando el equipo DuPont 2100 con una rampa de calentamiento de 10 °C /minuto, las muestras se analizaron en un intervalo de temperatura de -10 a 300 °C en atmósfera de nitrógeno.

En el DSC una pequeña cantidad de muestra problema es puesta en una cápsula, generalmente de aluminio, y colocada en un pequeño crisol metálico. En otro crisol metálico se coloca otra cápsula que se toma como referencia del mismo material empleado para encerrar la muestra problema; esta cápsula usualmente está vacía o con un material inerte, que no sufre ninguna transición térmica en el intervalo de temperatura de interés para realizar el análisis. Estas cápsulas son calentados individualmente en diferentes cámaras y la temperatura de ambos es registrada. Los equipos de DSC disponibles actualmente miden el flujo de calor manteniendo un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra; esto se hace alterando la corriente que pasa a través de los calentadores de ambas cámaras.

Por ejemplo, una referencia y una muestra se calientan a una rapidez determinada hasta que la muestra empieza a emitir o consumir calor, si se trata de un suceso endotérmico la temperatura de la muestra será menor que la de referencia. Los circuitos están programados para mantener a la misma temperatura la muestra y la referencia, se suministra por lo tanto una corriente adicional a la muestra para elevar su temperatura a la temperatura de referencia. Se registra la corriente necesaria para mantener la temperatura constante entre la muestra y la referencia. El área bajo la curva resultante es una medida del calor de transición. Es decir, se monitorea la cantidad de calor necesaria para mantener las condiciones isotérmicas en función del tiempo o la temperatura.⁴⁴

Esta técnica de DSC se puede utilizar para obtener la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión de un polímero.

La temperatura de transición vítrea es la temperatura en la cual un polímero pasa de ser un material vítreo (duro, rígido y quebradizo) a un material elástico. Una interpretación molecular de la T_g es considerar que a temperaturas muy bajas los átomos que constituyen la cadena polimérica solamente pueden vibrar alrededor de posiciones determinadas. A medida que se eleva la temperatura el movimiento es mayor hasta llegar a la T_g , a la que es posible que se muevan secciones de la cadena.^{43, 44}

4.7.3.2. TGA

Para el análisis termogravimétrico fue utilizado un equipo TA Instruments Hi-Res TGA 2950 en una atmósfera de nitrógeno usando una rampa de calentamiento de 10 °C/minuto. El intervalo de temperatura donde se analizaron las muestras fue de 25 a 400 °C.

La termogravimetría es una técnica para evaluar el cambio en la masa de una muestra en función de la temperatura. En este análisis se usa una balanza

muy sensible para seguir la variación de peso de un polímero en función del tiempo y la temperatura.⁴⁵

4.7.4. GPC/SEC

Para realizar la cromatografía de permeación en gel se utilizó un equipo de GPC con un detector evaporativo Light Scattering (Polymers Laboratories PL-LS 1000 Varian, USA) y con dos columnas PLGEL 10 cm MIXED-B x 7.5 mm (1106-6100 LS, Varian, USA) montadas sobre una columna en un termostato (1200-G316A, Agilent, USA) a 80 °C con elución de DMSO a una rapidez de flujo de 0.8 mL/minuto. Para la curva de calibración se utilizaron estándares del polímero Pollulan (Varian) de PDI estrecha.

Las muestras fueron disueltas previamente en DMSO y calentadas para una mayor disolución hasta 100 °C; antes de inyectar la muestra en el GPC se filtró con filtros de membrana (0.45 µm).

La cromatografía de permeación en gel o GPC es un tipo de cromatografía sólido-líquido cuyo principio consiste en separar los polímeros polidispersos en fracciones de acuerdo a su tamaño molecular. Las muestras en disolución se introducen en una columna empacada con un material poroso (gel, fase estacionaria) y fluyen a través de ella por efecto de una fase móvil (disolvente).⁴⁵

El principio de la separación se basa en la diferencia de tamaño de las cadenas, las cuales con la solvatación del disolvente forman un volumen hidrodinámico diferente para cada longitud o peso molecular del polímero, pues las cadenas más pequeñas se alojarán en los poros del material de empaque y tardarán más tiempo en salir de la columna que las moléculas con cadenas más grandes, ya que éstas no tienen acceso a los poros del material y pasan a través de la columna por el espacio que ocupa el disolvente entre las partículas del empaque; por consiguiente, las moléculas más grandes emergerán de la columna

antes que las pequeñas, por lo que se puede decir que las columnas son selectivas en relación al tamaño y por consecuencia al peso molecular.⁴³

El peso molecular y la polidispersidad son parámetros muy importantes en la caracterización de los polímeros; mediante el GPC se puede determinar: el peso molecular promedio numérico (M_n), el peso molecular promedio en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (PDI).

El primero se define como el peso molecular en gramos del polímero, dividido por el número de moléculas, se expresa como:⁴⁵

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i}$$

El peso molecular promedio en peso, M_w , se determina a través de experimentos en los que cada molécula o cadena contribuye a la medida final de acuerdo con su tamaño y se expresa como:⁴⁵

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i^2 N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}$$

La relación de $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$ es una medida de la polidispersión en los sistemas heterodispersos y se denomina el índice de polidispersidad. Las relaciones entre los valores de los pesos moleculares se utilizan a menudo para dar una idea de la heterogeneidad del peso molecular en las muestras de polímeros, ya que entre más grande sea el PDI, hay mayor dispersión entre los pesos moleculares y mientras, el valor se acerque más a uno el polímero es más homodisperso.⁴⁵

Los cálculos para obtener estos valores fueron realizados mediante un software acoplado al software Cirrus, GPC (versión para ChemStation).

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de PLLA y PGA

En primer lugar se llevó a cabo la polimerización de los monómeros puros a 65 °C con los dos diferentes líquidos iónicos, [HMIM][PF₆] y [BMIM][PF₆] cuya estructura molecular se muestra en la Figura 5.1.

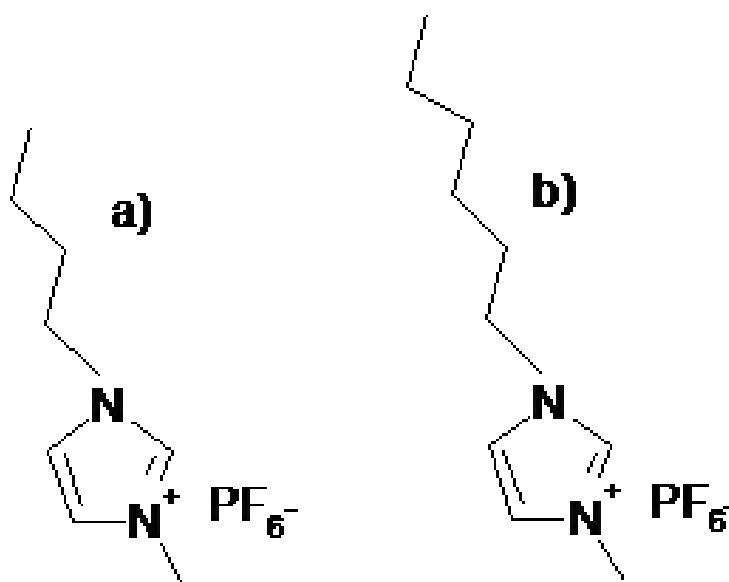


Figura 5.1. Estructura molecular de los líquidos iónicos; a) [BMIM][PF₆] y b) [HMIM][PF₆].

Como se puede deducir de su estructura molecular según los antecedentes descritos anteriormente, el [BMIM][PF₆] es más polar que el [HMIM][PF₆] debido a la diferente longitud de la cadena alquílica lateral. Ambos poseen el mismo anión hexafluorofosfato siendo éste uno de los aniones más estables, compatible con la actividad enzimática y en general estos líquidos iónicos son los más usados comercialmente debido a su bajo costo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Resultados de los polímeros obtenidos con los monómeros L-láctido y glicólido.

Monómero	Tiempo de reacción (días)	Enzima	Rendimiento (%)
[HMIM][PF₆]			
Glicólido	1.8	sí	40.3
Glicólido	4	no	54.8
L-láctido	9	sí	40.6
L-láctido	9	no	0
[BMIM][PF₆]			
Glicólido	4	sí	49.0
Glicólido	12	no	54.3
L-láctido	11	sí	29.5
L-láctido	11	no	0

Se puede observar que en el caso del L-láctido, a esta temperatura, sin enzima no se llevó a cabo la polimerización en ambos líquidos iónicos mientras que con enzima la polimerización se llevó a cabo, por lo que se puede decir que la polimerización del L-láctido es completamente enzimática; además se obtuvo un mayor rendimiento (40.63%) en el líquido iónico [HMIM][PF₆] que en el [BMIM][PF₆] (29.50%), por el contrario, en el poliglicólido se obtuvo un rendimiento mayor con el [BMIM][PF₆], esta discrepancia puede deberse al error experimental. En esta misma tabla se puede ver que en el caso del glicólido la reacción se llevó a cabo con y sin enzima, pero en la reacción enzimática se obtuvo un mayor rendimiento en un menor tiempo, esto podría deberse a que el glicólido es mucho más reactivo que el L-láctido o, de acuerdo con lo reportado por Huijser y col. (2006), que este tipo de reacción en el blanco se debe a trazas de hidroxácidos presentes en el monómero.¹⁷

5.2. Efecto de la relación inicial de monómeros y de los líquidos iónicos en los co-polímeros

Por otro lado, en el caso de los co-polímeros, como se mencionó en materiales y métodos, se probaron tres relaciones iniciales de los monómeros (L-láctido:glucólido): 3:1, 1:1 y 1:3 en relación de peso, y para cada una de estas relaciones se evaluaron dos líquidos iónicos [HMIM][PF₆] y [BMIM][PF₆] a 65 °C a diferentes tiempos de reacción.

Con el líquido iónico [HMIM][PF₆] se obtuvo un mayor rendimiento en la relación inicial de monómeros 1:3 que en las otras dos relaciones (Figura 5.2); en esta relación la reacción finalizó en el día 5 y se obtuvo un rendimiento del 40.2%, mientras que en la relación de 1:1 y 3:1 se obtuvieron 28.0 y 37.0% en 11 y 9 días, respectivamente. Esto concuerda con la mayor polimerizabilidad del glucólido.

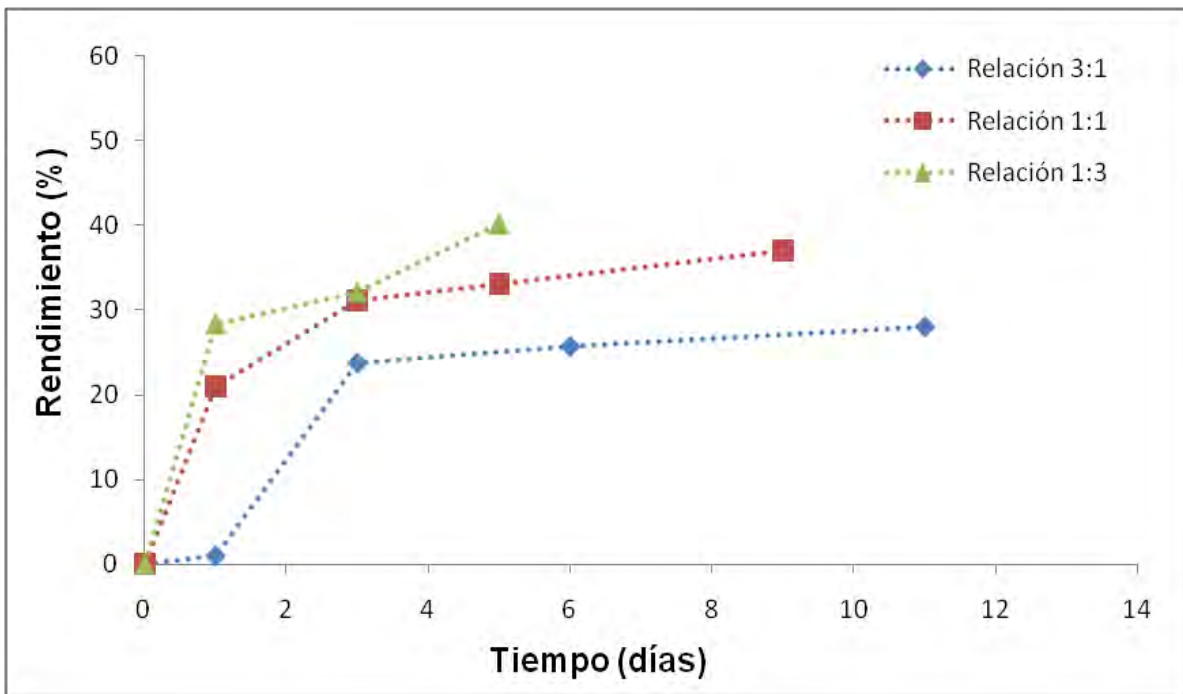


Figura 5.2. Rendimiento de los co-polímeros de PLLGA contra el tiempo con el líquido iónico [HMIM][PF₆].

Análogamente, con el líquido iónico [BMIM][PF₆] (Figura 5.3) se presentó un comportamiento similar, obteniéndose el mayor rendimiento de 54.3% en la relación 1:3 a los 12 días de reacción, mientras en las relaciones 3:1 y 1:1 se obtuvieron rendimientos de 31.7 y 40.0% a los 12 y 10 días, respectivamente. Puede observarse, además, que en estas reacciones que se llevaron a cabo en [BMIM][PF₆] se obtuvieron mayores rendimientos que en las que se utilizó el [HMIM][PF₆] como se explicará más adelante.

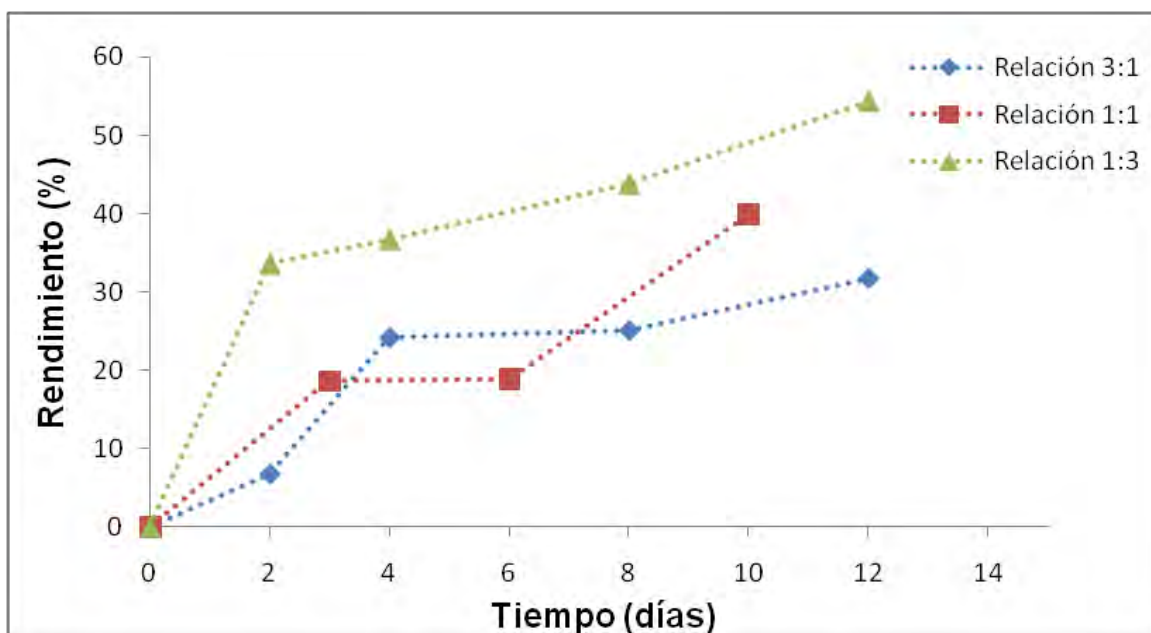


Figura 5.3. Rendimiento de los co-polímeros de PLLGA contra el tiempo con el líquido iónico [BMIM][PF₆].

Por otro lado, mediante la resonancia magnética nuclear se pudo obtener el porcentaje de incorporación del L-láctido en el co-polímero, con ambos líquidos iónicos (Figura 5.4 y Figura 5.5).

Se puede observar que el porcentaje de incorporación del L-láctido en los co-polímeros a las relaciones iniciales de monómero 1:3 y 1:1 es casi nulo y cerca de 10%, respectivamente, lo cual puede deberse a que el glicólido tiene una mayor rapidez de polimerización que el L-láctido,⁴⁶ o bien, que la actividad enzimática se ve inhibida en presencia de éste, por lo que a altas concentraciones

iniciales de glicólido, éste se polimeriza tan rápido que sólo una pequeña cantidad de L-láctido puede ser incorporado al co-polímero; además, la transferencia de masa en el medio de reacción se limita a medida que avanza la polimerización debido al aumento de la viscosidad del medio (a 90 °C la μ inicial fue de 0.02476 Pa.s) .

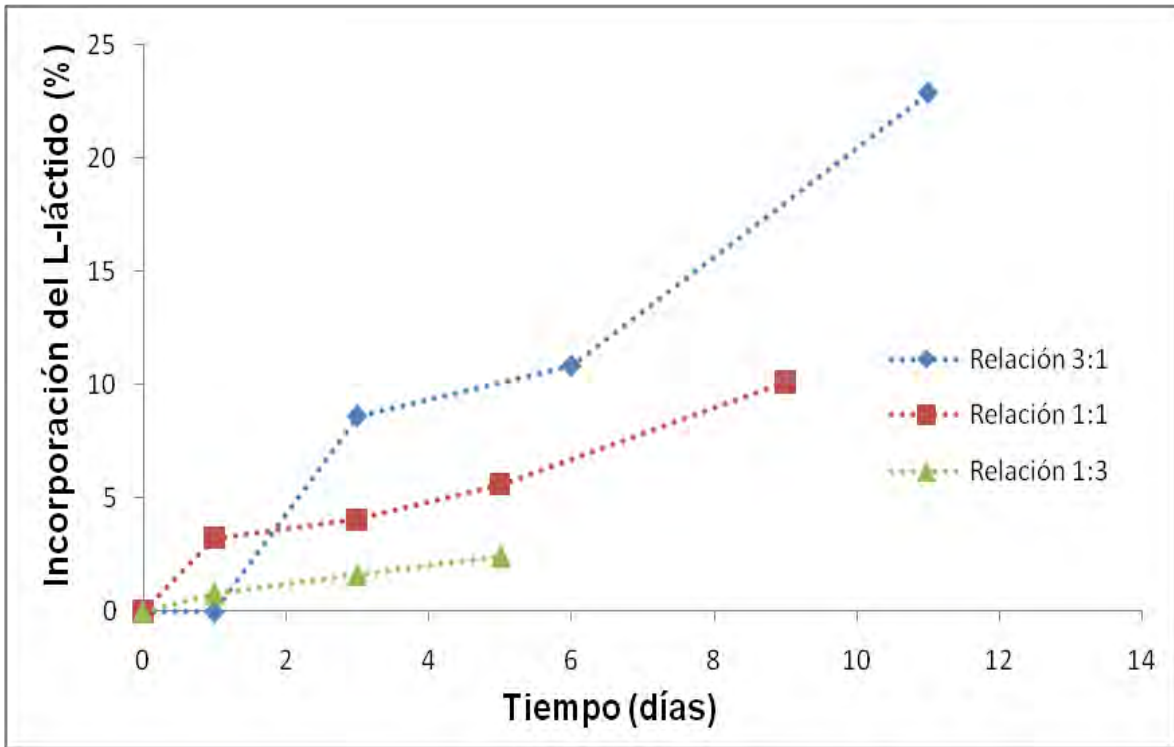


Figura 5.4. Porcentaje de incorporación del L-láctido al co-polímero contra el tiempo con el líquido iónico [HMIM][PF₆].

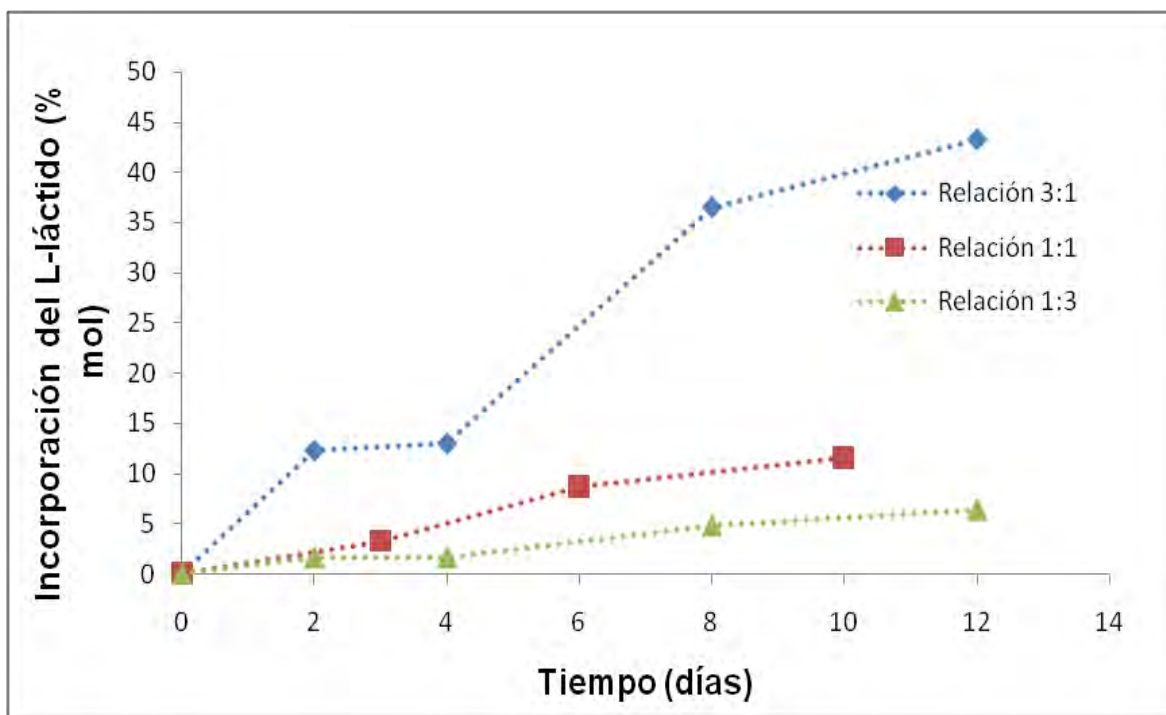


Figura 5.5. Porcentaje de incorporación del L-láctido al co-polímero contra el tiempo con el líquido iónico [BMIM][PF₆].

Con el [HMIM][PF₆] en la relación 3:1 se presentó un porcentaje de incorporación de 22.9% a los 11 días y con el [BMIM][PF₆] un porcentaje de 43.3% a los 12 días de reacción. Al parecer, para esta relación la co-polimerización ocurre mejor en el líquido iónico [BMIM][PF₆] que en el [HMIM][PF₆], ya que tanto en el rendimiento como en el porcentaje de incorporación presentó mejores características usando el [BMIM][PF₆] (Figura 5.6).

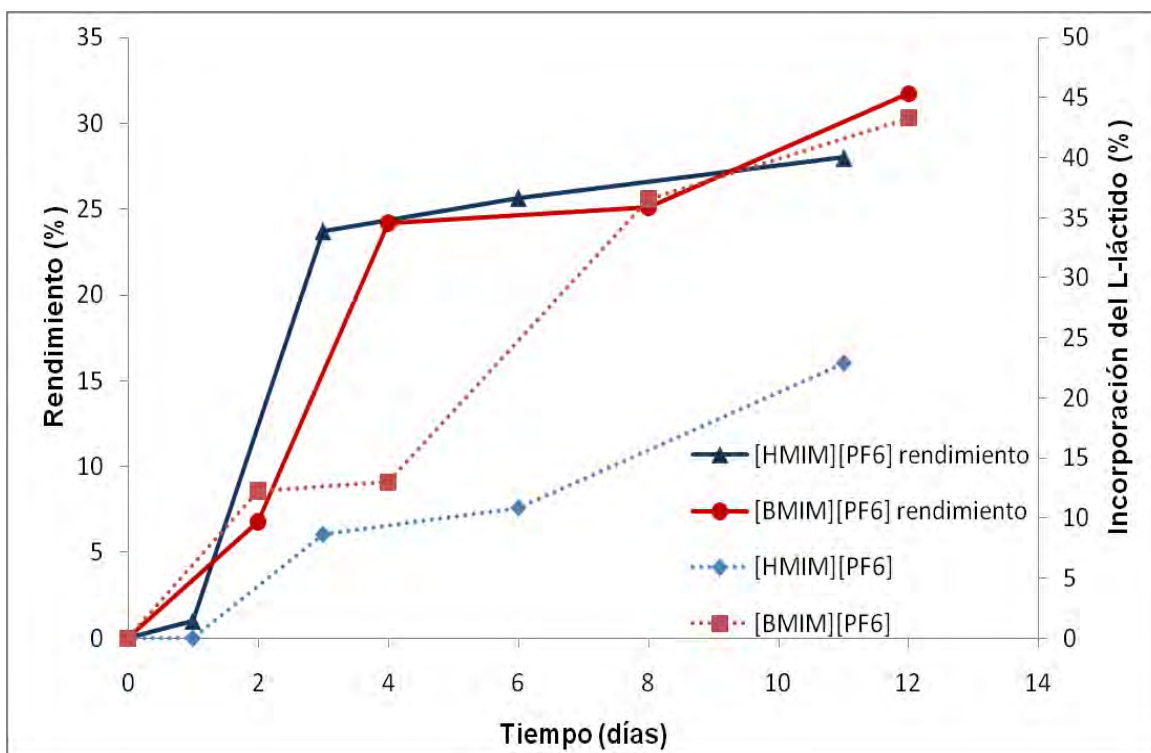


Figura 5.6. Comparación del rendimiento y el porcentaje de incorporación del L-láctido con los dos líquidos iónicos evaluados.

Como se había mencionado en los antecedentes, hay dos factores que influyen mucho en las reacciones enzimáticas en líquidos iónicos: la viscosidad y la polaridad del líquido iónico. Debido a esto, se decidió hacer un estudio de viscosidad de los líquidos iónicos en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C (Figura 5.7). Se puede ver que no existe diferencia entre las viscosidades de los líquidos iónicos evaluados, aunque el [BMIM][PF₆] tiene una ligera menor viscosidad que el [HMIM][PF₆] y también se puede apreciar que la viscosidad de ambos líquidos iónicos disminuyó significativamente a medida que la temperatura aumentó. Ambos líquidos iónicos exhibieron un comportamiento Newtoniano entre 25 °C y 90 °C en el intervalo de 1 a 200 s⁻¹. Sin embargo, esta dependencia no pudo expresarse por arreglo de tipo Arrhenius en todo el intervalo de temperaturas, de todas formas, a temperaturas altas la viscosidad de cada líquido iónico es relativamente baja (< 100 mPa·s) y no se esperaba que ésta fuera un

factor relevante durante la síntesis enzimática, sin embargo éste podría no ser el caso a temperaturas más bajas.

Debido a que ambos fluidos presentan viscosidades similares en función de la temperatura, la diferencia entre los resultados obtenidos en la polimerización con los diferentes líquidos iónicos se debe principalmente a la diferencia de polaridad, ya que para muchas enzimas, como por ejemplo la lipasa B de *Candida antarctica*, ha sido demostrado que la actividad enzimática aumenta con la polaridad de los líquidos iónicos. En este estudio, el [BMIM][PF₆] presenta una menor longitud de cadena del catión que el [HMIM][PF₆] y tiene por tanto, una mayor polaridad y esto con cuerda con los datos reportados por Reichardt, 2005.⁴⁷

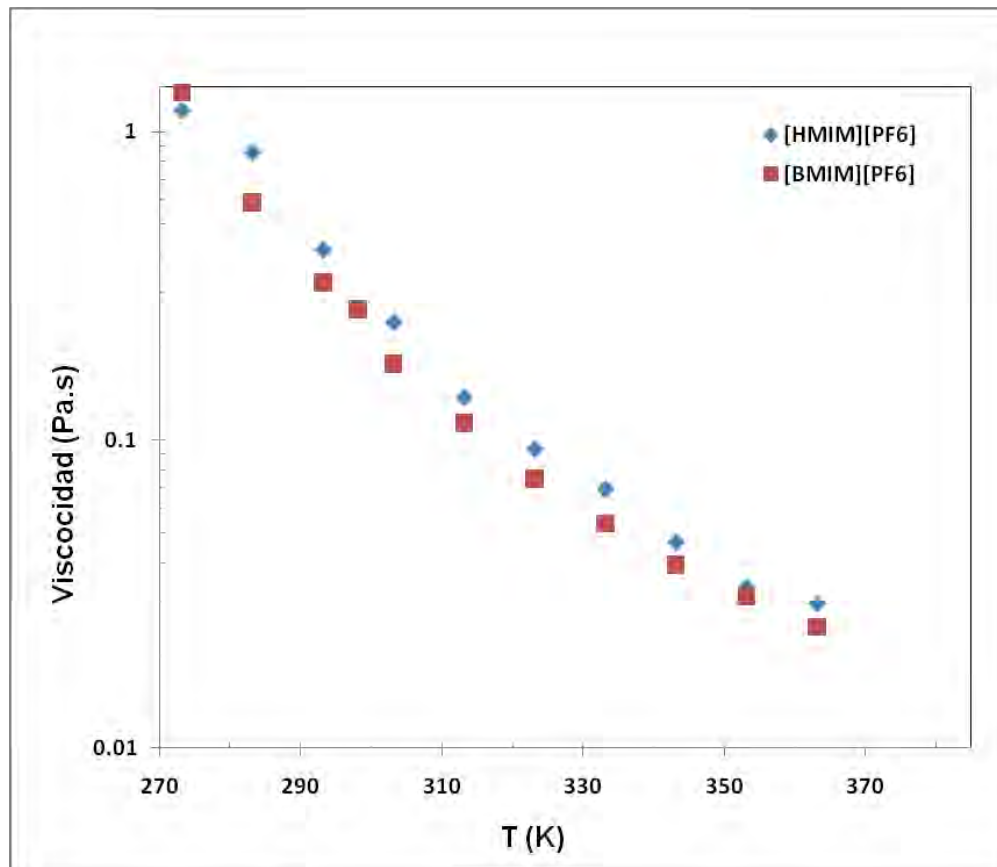


Figura 5.7. Comparación de las viscosidades de los líquidos iónicos [HMIM][PF₆] y [BMIM][PF₆] en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C.

Al realizar el análisis de GPC a los co-polímeros obtenidos se determinó que sus pesos moleculares (Tabla 5.2) son demasiado bajos con ambos líquidos iónicos en comparación con los obtenidos por síntesis química,⁴ así como aquellos reportados por Huijser y col. (2006) usando la lipasa PS a temperaturas superiores de 100 °C en un sistema en masa.¹⁸ Por esta razón, se decidió aumentar la temperatura 10 °C, para determinar si hay algún efecto relacionado con la temperatura y el peso molecular del polímero.

Tabla 5.2. Resultados de M_n y PDI determinados por GPC de los co-polímeros sintetizados a 65 °C.

[HMIM][PF ₆]				[BMIM][PF ₆]			
Relación	Tiempo (días)	M_n (g/mol)	PDI	Relación	Tiempo (días)	M_n (g/mol)	PDI
3:1	1	----	----	3:1	2	773	1.3777
3:1	3	1210	1.1934	3:1	4	649	1.7304
3:1	6	1215	1.251	3:1	8	981	1.6402
3:1	11	788	1.6751	3:1	12	495	2.3737
1:1	1	1363	1.2443	1:1	3	864	1.5625
1:1	3	938	3.258	1:1	6	888	1.473
1:1	5	1509	1.4201	1:1	10	731	1.8741
1:1	9	1167	1.6238	1:3	2	1154	1.2106
1:3	1	1021	1.2703	1:3	4	2383	1.0995
1:3	3	2358	1.0742	1:3	8	2029	1.1316
1:3	5	3536	1.1165	1:3	12	1026	1.4425

Debido a los resultados del porcentaje de incorporación y de los rendimientos obtenidos, se decidió utilizar el [BMIM][PF₆] para realizar los siguientes experimentos, así mismo y debido al bajo porcentaje de incorporación en dos de las tres relaciones probadas, se decidió trabajar con la relación 3:1.

5.3. Efecto de la temperatura sobre los co-polímeros

Las reacciones a 75 °C se llevaron a cabo con el líquido iónico [BMIM][PF₆] y la relación inicial de monómeros de 3:1 (Tabla 5.3). Se puede observar, en primer lugar, que la reacción se detiene a los 9 días con un rendimiento de 50.9%

que es mucho mayor que el obtenido a de 65 °C que fue de 31.7% a los 12 días; además, la incorporación del L-láctido al co-polímero aumentó aproximadamente en 13.0% y los pesos moleculares obtenidos a esta temperatura fueron mayores que los obtenidos a 65 °C.

Tabla 5.3. Resultados de la síntesis de los co-polímeros a 75 °C.

Enzima	Tiempo (días)	Rendimiento (%)	L-láctido (%)	M_n (g/mol)	PDI
Sí	3	21.3	41.1	1613	1.75
	5	22.8	44.5	1370	1.76
	7	30.5	60.5	2619	1.7
	9	41.3	56.3	1477	1.74
No	3	1.19	---	---	---
	5	5.40	7.5	---	---
	7	10.1	12.3	2487	1.88
	9	22.9	43.2	1111	2.71

Asimismo, en la Tabla 5.3 se puede observar el seguimiento de las dos reacciones a 75 °C con y sin enzima; puede verse que los rendimientos sin enzima son aproximadamente 50% menores comparados con las reacciones enzimáticas en el mismo tiempo; también, se obtuvo un mayor porcentaje de incorporación de L-láctido en las reacciones con enzima que en las otras.

Respecto al peso molecular, se observó que los polímeros obtenidos sin enzima en los primeros días no se pudieron disolver en DMSO, esto probablemente se debió a que este tipo de reacción generó un co-polímero muy rico en glicólido que es muy poco soluble en DMSO y por ende no se pudo determinar su peso molecular por cromatografía GPC/SEC. Sin embargo, se observó que a medida que transcurrió el tiempo de reacción los co-polímeros obtenidos se hicieron más solubles ya que tienen una mayor cantidad de L-láctido incorporado. Por otro lado, el PDI en la reacción con enzima se mantuvo constante a través del tiempo mientras que en la reacción sin enzima aumentó con el tiempo;

esto significa que los pesos moleculares de los co-polímeros obtenidos en la reacción sin enzima fueron más heterogéneos.

Sin embargo, aun a 75 °C, los pesos moleculares obtenidos son más bajos comparados con la síntesis química y algunas investigaciones similares descritas en la literatura.^{4,18}

Se decidió evaluar la temperatura de 90 °C, siendo ésta una temperatura máxima, debido a que los puntos de fusión de los monómeros están ligeramente por arriba de esta temperatura, y a una mayor temperatura la reacción de polimerización podría transcurrir por otra vía; asimismo, una temperatura mayor podría provocar la desnaturalización térmica de la enzima. Los resultados obtenidos en la co-polimerización a 90 °C se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Resultados de la co-polimerización del PLLGA a 90 °C.

Enzima	Tiempo (días)	Rendimiento (%)	L-láctido (%)	M_n (g/mol)	PDI
Sí	2	28.8	40.1	12477	1.33
	4	38.3	71.1	15262	1.35
	6	61.3	75.9	18542	1.14
No	2	9.4	28.9	939	2.70
	4	10.2	44.3	2967	1.83
	6	14.9	59.2	3723	1.92

Como se puede observar, se obtuvo un rendimiento de 61.3% en 6 días y una incorporación del L-láctido de 75.9%; en la reacción sin enzima se obtuvo una recuperación menor 14.9% y un 56.3% de incorporación de L-láctido a los 6 días. Aunque estas diferencias resultaron interesantes, en el peso molecular del polímero existió una mayor diferencia (Figura 5.8) ya que en la reacción enzimática se obtiene un peso molecular del polímero 10 veces superior que en la reacción sin enzima. Por otro lado, el índice de polidispersidad en la reacción con enzima se mantuvo constante hasta el día 4 y en el último día bajó, lo que indica

que en el último día hay una mayor homogeneidad entre los pesos moleculares mientras que en la reacción sin enzima la polidispersidad varía con el tiempo.

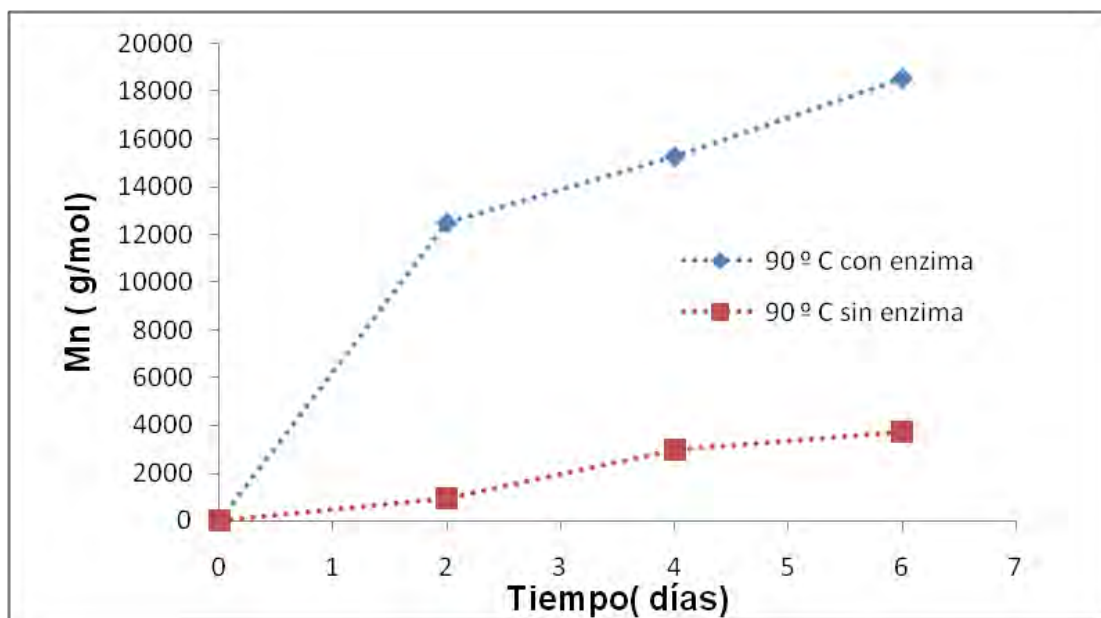


Figura 5.8. Reacción de co-polimerización a 90 °C, con y sin enzima.

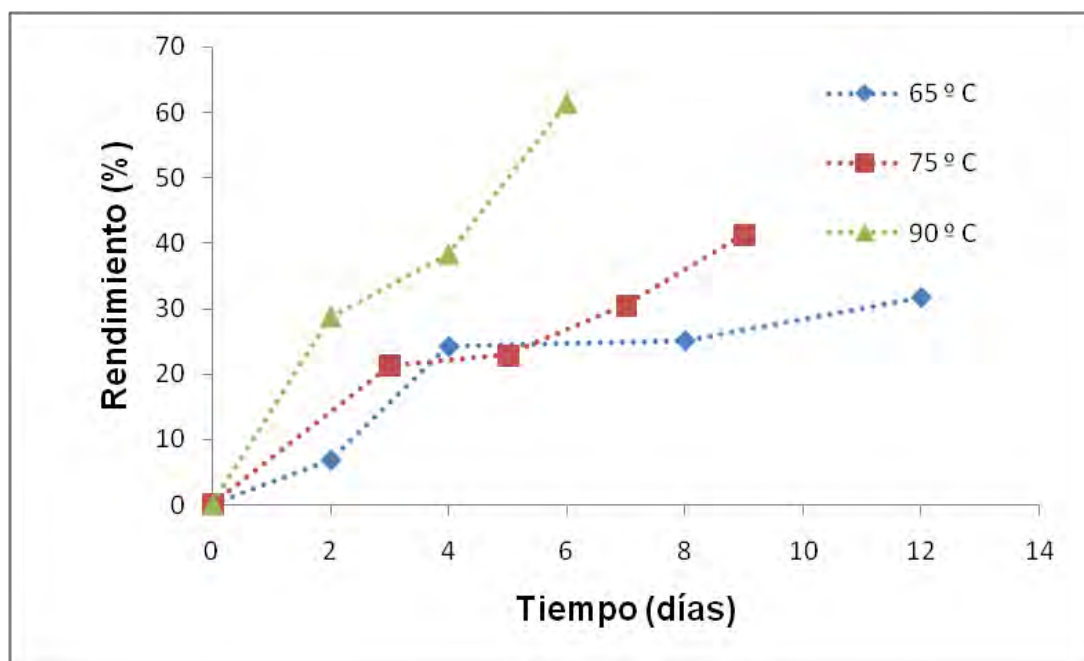


Figura 5.9. Comparación de los rendimientos obtenidos a diferentes temperaturas.

Comparando estos resultados a 90 °C con los obtenidos en las temperaturas anteriores se puede ver que el rendimiento de la reacción biocatalizada se incrementó significativamente, de 31.7% a 65 °C a 61.3% a 90 °C (Figura 5.9). Este incremento en la rapidez de la reacción y en el rendimiento probablemente se puede deber a que a la temperatura de 90 °C el líquido iónico [BMIM][PF₆] tiene una viscosidad de 0.02476 Pa.s, ya que a una menor viscosidad hay una mayor transferencia de masa entre el soluto y la enzima y posiblemente a una mayor inducción térmica.

Comparando los resultados de incorporación del L-láctido a diferentes temperaturas, puede verse (Figura 5.10) que existe una tendencia de incremento al incrementar la temperatura, lo que indica que a una mayor temperatura la rapidez de polimerización del L-láctido se incrementa hasta llegar a los 6 días a 75.9%; este valor es casi el doble del valor obtenido a los 65 °C.

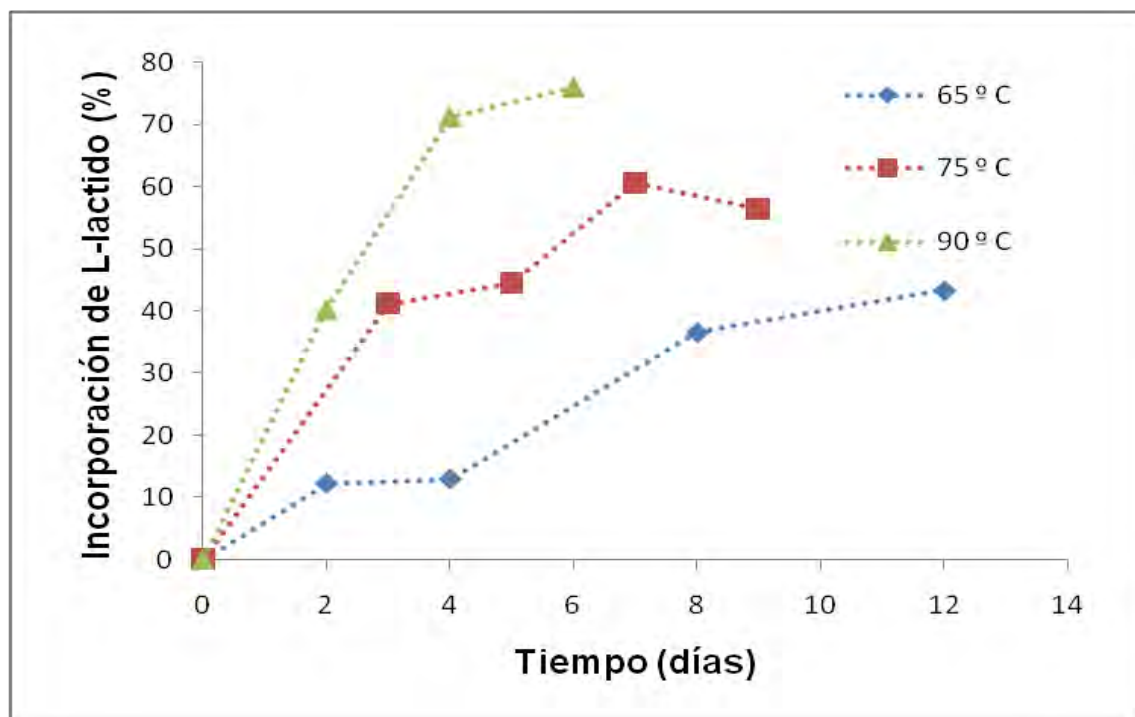


Figura 5.10. Comparación de los porcentajes de incorporación del L-láctido en el copolímero a diferentes temperaturas.

Por otro lado, el porcentaje de incorporación obtenido a esta temperatura es muy cercano a la relación inicial de monómeros utilizada, 3:1 o 75 y 25% p/p (Tabla 5.5). Esto significa que a la temperatura de 90 °C, el L-láctido y el glicólido tienen la misma rapidez de polimerización ya que polimerizan en la misma proporción. Esto es muy importante, ya que podemos asumir que a estas condiciones de reacción puede fijarse el porcentaje de los monómeros en el polímero desde el inicio y así tener un cierto control sobre la incorporación final, en otras palabras, sobre la estructura molecular del material resultante, pudiendo diseñar así diferentes tipos de materiales con propiedades distintas para aplicaciones específicas.

Tabla 5.5. Comparación entre el porcentaje de alimentación y el porcentaje de los monómeros en el co-polímero.

Monómeros	Relación alimentada (% p/p)	% (p/p) obtenido
L-láctido	3 (75%)	75.9
Glicólido	1 (25%)	24.1

En la Figura 5.11 se puede apreciar un espectro de ¹H RMN del co-polímero obtenido a los 6 días de reacción a 90 °C con enzima. Como se mencionó en materiales y métodos (sección 4) la señal obtenida a los 4.9 ppm es la señal de los protones (2) del metileno en el monómero de glicólido en la forma abierta y la señal de 5.2 ppm es la señal del protón del metino de L-láctido en su forma abierta; mediante la integración de estas señales se obtuvieron los resultados anteriores y posteriormente se hicieron los cálculos necesarios para pasar esos valores a porcentaje peso.

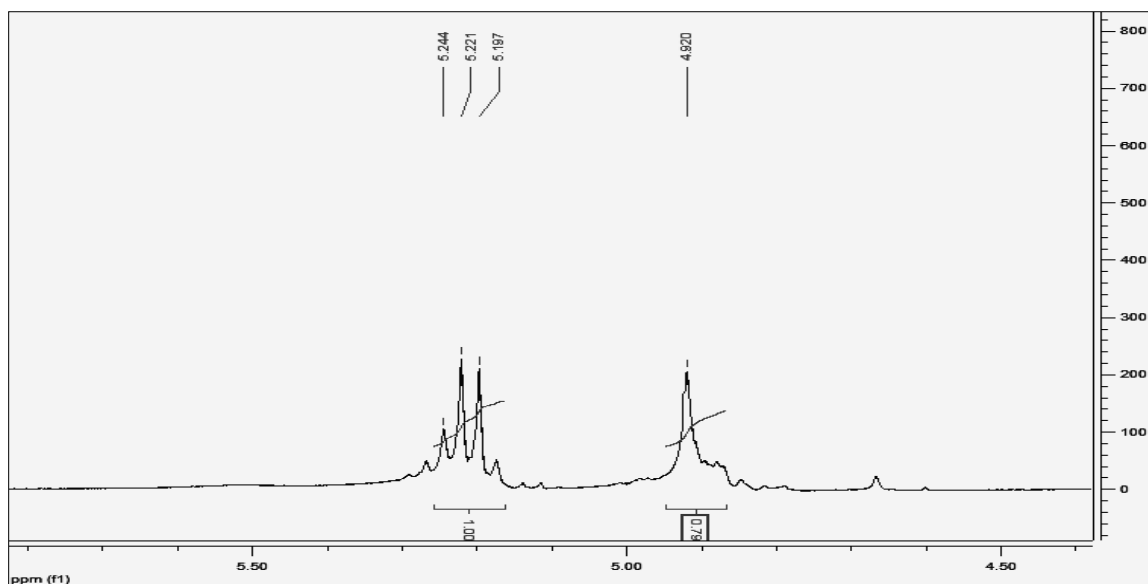


Figura 5.11. Espectro de ^1H RMN del polímero obtenido a 90 °C a los 6 días.

Como se pudo ver en todos los resultados anteriores, las mejores condiciones de reacción se dan al utilizar enzima, como ya se mencionó sin enzima la reacción ocurre por otra vía, probablemente vía catiónica inducida por los residuos de hidroxiaácidos en los monómeros, los cuales podrían producirse térmicamente, en otras palabras, trazas de degradación de las formas cíclicas cuando el sustrato inicial se ve sometido a dichas temperaturas relativamente altas, ya que los rendimientos obtenidos y los pesos moleculares en estas reacciones son menores que en las reacciones con enzimas (Figura 5.12).

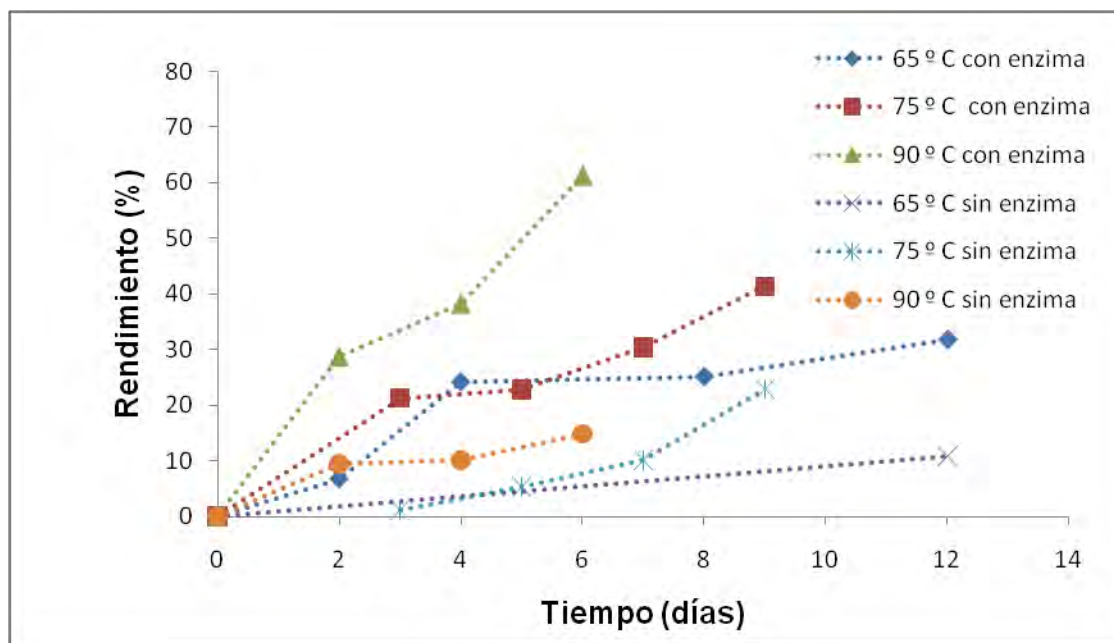


Figura 5.12. Comparación de los rendimientos obtenidos con y sin enzima a diferentes temperaturas.

En la Figura 5.13 se puede apreciar la comparación de los pesos moleculares en la reacción con el [BMIM][PF₆] con una relación inicial de monómeros de 3:1. Se puede ver que a la temperatura de 90 °C desde el segundo día de reacción se tiene un peso molecular bastante elevado en comparación con los polímeros obtenidos a las otras temperaturas evaluadas. En esta reacción el peso molecular llega en el día 6 a 18,542 g/mol; esto puede deberse a que a una mayor temperatura los monómeros se enlazan a una mayor rapidez y como se mencionó anteriormente a esta temperatura la menor viscosidad del líquido iónico ayuda a la transferencia de masa. Este peso molecular obtenido no es tan alto como los que se obtienen en la síntesis química (alrededor de 40000 g/mol)⁴, pero es comparable con el peso molecular de los co-polímeros obtenidos por Huijser y col. (2006).¹⁸ Además, como estos co-polímeros tienen múltiples aplicaciones en el sector médico, la aplicación depende de sus características.

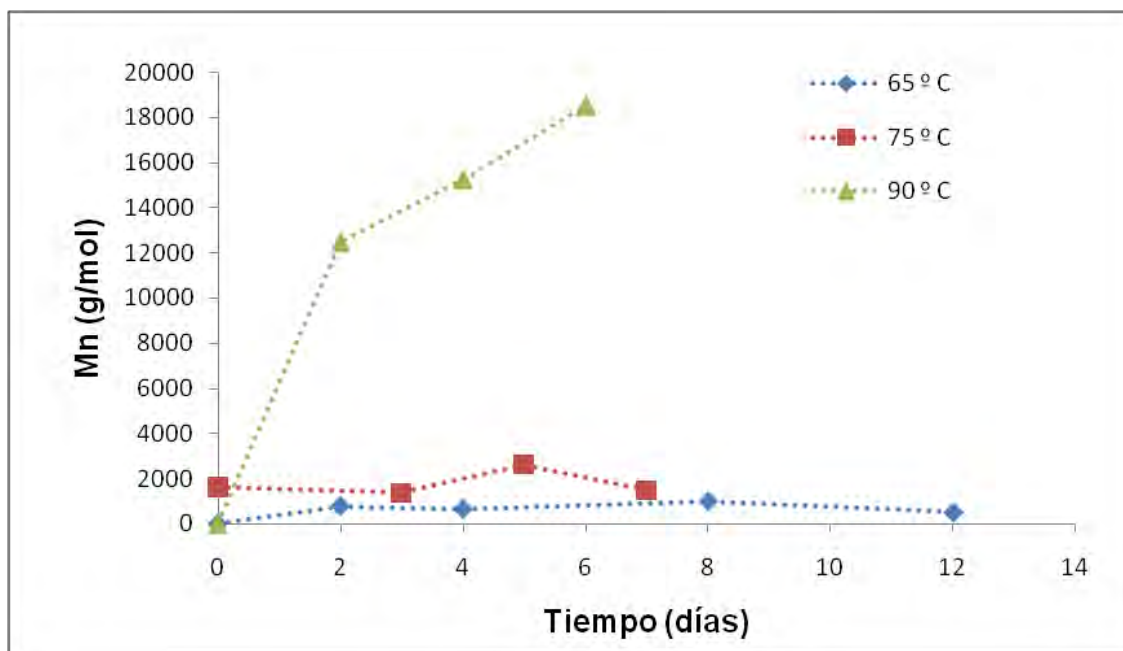


Figura 5.13. Comparación de los pesos moleculares de los co-polímeros obtenidos a diferentes temperaturas.

Un resultado muy interesante se da con respecto al PDI (Figura 5.14), ya que a 65 °C y al último día de reacción (12) se obtuvo el mayor PDI comparado con las otras temperaturas. A 75 °C y 90 °C este índice se mantiene casi constante durante toda la reacción, sin embargo, a 90 °C es menor que a las otras temperaturas y más cercano a 1; esto significa que se obtienen polímeros más homogéneos en peso molecular a 90 °C que en las demás temperaturas.

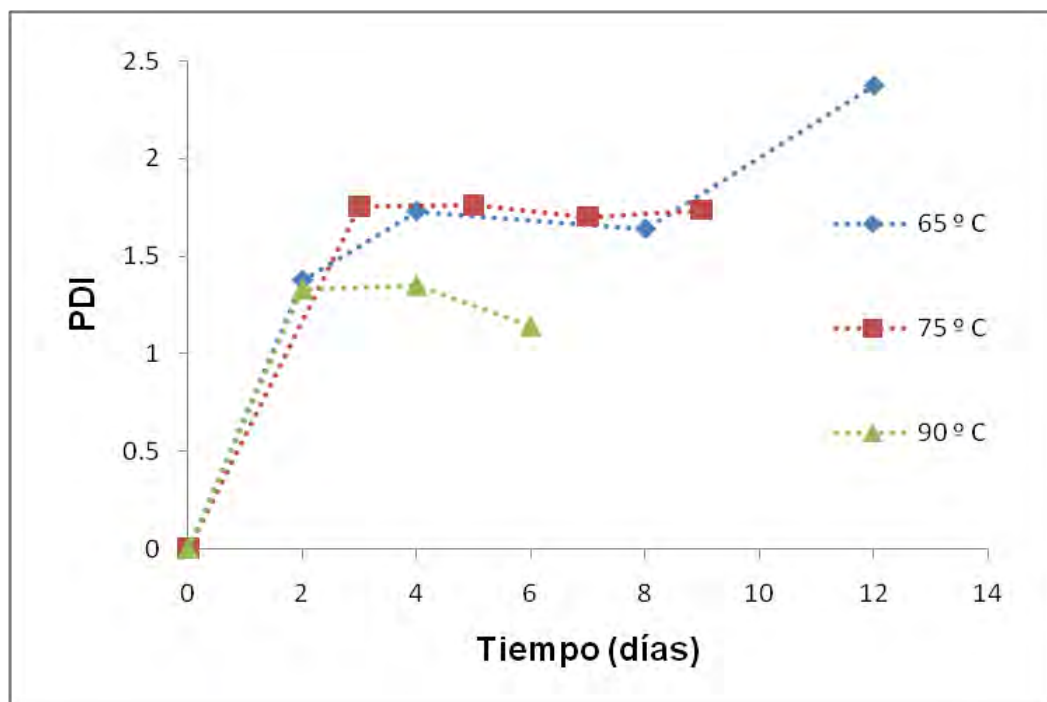


Figura 5.14. Comparación de PDI de los co-polímeros a diferentes temperaturas.

Los resultados aquí obtenidos nos conducen a un tema importante que es el incremento de la estabilidad de las enzimas en líquidos iónicos comparado con otros sistemas. Desde los reportes iniciales basados en reacciones enzimáticas en líquidos iónicos,^{36,48,49} ha habido un interés creciente basado en el estudio del incremento de la estabilidad de algunas enzimas en ciertos líquidos iónicos, lo cual ha sido explicado por algunos investigadores en términos de la nucleofilidad de los líquidos iónicos, basicidad de los enlaces de puentes de hidrógeno que se forman, y en definitiva la interacción enzima-sustrato-líquido iónico.⁵⁰ Ulbert y colaboradores han reportado recientemente tiempos de vida media más largos de la lipasa de *Candida rugosa* en [BMIM][PF₆] que en disolventes orgánicos.⁵¹

Este efecto se atribuyó a la polaridad del disolvente y la estabilidad térmica del mismo. En otro estudio, se encontraron tiempos de vida media para la lipasa B de *Candida antarctica* 100 veces más largos en [EMIM][BF₄] que en disolventes orgánicos.⁵² Por otro lado, el grupo de investigación del Dr. José Luis Iborra en la Universidad de Murcia (España) reportó recientemente un interesante trabajo en el

cual, el incremento de la estabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* y α -quimiotripsina en varios líquidos iónicos, incluidos los basados en catión imidazolio, se atribuyó a la conservación de la estructura nativa de la proteína incluso a temperaturas relativamente altas, siendo esto corroborado por técnicas espectroscópicas.⁵³

Puede concluirse que la estabilización térmica para un biocatalizador determinado puede variar dependiendo del tipo de líquido iónico y de las interacciones entre éste, el sustrato y la enzima, siendo éstas diferentes en el caso de encontrarse en forma libre o inmovilizada en soportes. Debido a esto, podría ser interesante profundizar en un estudio más detallado de los parámetros involucrados en esta reacción en particular u otras de igual interés.

5.4. Análisis térmicos

5.4.1. DSC

Como se mencionó en el capítulo anterior se realizó una caracterización térmica mediante el análisis de DSC para determinar la T_g y la temperatura de fusión (T_f) de los polímeros obtenidos. En la Tabla 5.6 se pueden observar los resultados obtenidos de los homopolímeros.

Tabla 5.6. Resultados del DSC para los homopolímeros.

Temperatura (°C)	Monómero	Tiempo de reacción (días)	T_g (°C)	T_f (°C)
[HMIM][PF₆]				
65	Glicólido	1.8	ND	182.0
65	L-láctido	9	ND	123.5, 124.7
[BMIM][PF₆]				
65	Glicólido	4	58.1	205.2
65	L-láctido	11	67.3	115.2, 128.3
90	L-láctido	6	48.3	119.6

*ND: No determinado.

Puede verse que el PGA, en general, tiene puntos de fusión más altos que el PLLA, lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura.⁵³ También puede observarse que existen dos temperaturas de fusión para el PLLA obtenido a 65 °C, los dobles puntos de fusión pueden deberse a la formación de diversas fases cristalinas en el polímero.⁵⁴

Este mismo análisis se realizó a los co-polímeros y se obtuvieron a 65 °C los resultados mostrados en la Tabla 5.7. Como se puede observar, las T_g se encuentran en un intervalo de 35 a 70 °C y no se encontró una correlación entre ellas y el peso molecular o el porcentaje de incorporación de los monómeros.

Tabla 5.7. Resultados del DSC de los co-polímeros obtenidos a 65 °C.

[HMIM][PF ₆]				[BMIM][PF ₆]			
Relación	Tiempo (días)	T_g (°C)	T_f (°C)	Relación	Tiempo (días)	T_g (°C)	T_f (°C)
3:1	1	ND	ND	3:1	2	35.3	174.2
3:1	3	56.2	131.9, 182.8	3:1	4	50.7	155.8
3:1	6	52.3	169.0	3:1	8	65.3	147.5
3:1	11	55.3	ND	3:1	12	63.2	166.2
1:1	1	ND	148.4, 190.7	1:1	3	59.4	197.7
1:1	3	71.5	164.1	1:1	6	58.7	173.0
1:1	5	41.4	145.5, 187.3	1:1	10	42.0	192.1
1:1	9	61.1	176.4	1:3	2	65.4	154.4
1:3	1	38.5	148.9	1:3	4	67.2	164.2
1:3	3	34.8	199.5	1:3	8	62.4	197.2
1:3	5	52.2	196.7	1:3	12	55.3	155.7, 198.1

*ND: No determinado.

Respecto a la temperatura de fusión, se observan diversas puntos para algunos casos (principalmente con el [HMIM][PF₆]). Esto puede ser a causa de que el PLLA y el PGA difieren en su temperatura de fusión provocando que algunos polímeros presenten este comportamiento. También se puede ver que se presentan temperaturas de fusión de más de 190 °C en algunos casos, principalmente en los que tuvieron una menor incorporación de L-láctido, ya que en la relación 3:1, donde hay mayor incorporación del L-láctido no se encuentran temperaturas tan altas.

En la Tabla 5.8 se pueden apreciar los resultados de los co-polímeros obtenidos a las temperaturas de 75 y 90 °C; se puede ver que las T_g estuvieron en un intervalo de 49 a 70 °C cuando los experimentos se llevaron a cabo a 75 °C con enzima y en un intervalo de 45 a 60 °C cuando se realizaron a 90 °C. Respecto a la temperatura de fusión, se observó que ésta se mantuvo casi constante a través de los días, a 90 °C a diferencia de los puntos de fusión encontrados en los co-polímeros obtenidos a las otras temperaturas; esto puede estar relacionado con los mayores pesos moleculares obtenidos a 90 °C y una incorporación más uniforme de los monómeros en los experimentos realizados a la mayor temperatura.

Al igual que en los experimentos realizados a 65 °C, no se encontró correlación entre estas temperaturas y el peso molecular de los co-polímeros obtenidos. Esto puede deberse a la polidispersidad entre los pesos moleculares en la muestra de co-polímero analizada.

Tabla 5.8. Resultados del DSC de los co-polímeros a 75 y 90 °C.

Temperatura (°C)	Enzima	Tiempo (días)	T_g (°C)	T_m (°C)
75	Sí	3	ND	151.3, 173.3
		5	ND	ND
		7	49.5	156.9
		9	69.8	181.5
75	No	3	ND	ND
		5	ND	ND
		7	ND	90.3
		9	57.1	169.1
90	Sí	2	45.7	168.8
		4	ND	164.0
		6	59.8	168.1
90	No	2	51.8	167.9
		4	49.7	167.9
		6	ND	152.7

*ND: No determinado.

5.4.2. TGA

Se determinó mediante esta técnica el porcentaje en peso de degradación del polímero en función de la temperatura.

El PLLA sintetizado a 65 °C con los dos líquidos iónicos y a 90 °C con el [BMIM][PF₆] tuvo un porcentaje de degradación de cerca de 5% a 200 °C en todos los casos. El PGA sin embargo, tuvo un mayor porcentaje de degradación a esta temperatura, cerca de 8% con el [HMIM][PF₆] y 15% con el [BMIM][PF₆] a 65 °C, lo cual es una característica conocida para este material y que limita sus aplicaciones.⁵⁴ Como se puede observar en estos resultados, el PGA tiene una menor estabilidad térmica que el PLLA. En las reacciones a 65 °C en la relación 3:1 para el co-polímero sintetizado con [HMIM][PF₆] se obtuvo cerca de 25% de degradación a 200 °C y con el [BMIM][PF₆] 15% de degradación. A 75 °C con el [BMIM][PF₆] se obtuvo cerca de 20% de degradación a 200 °C y a 90 °C se obtuvo cerca de 19% de degradación a la misma temperatura.

Esta baja estabilidad térmica en los co-polímeros tal vez se deba a que la menor estabilidad térmica del PGA contribuye mayormente a la inestabilidad térmica de los co-polímeros. Además, la temperatura a la cual se lleva la reacción parece influir en el porcentaje de degradación del polímero ya que a 75 y 90 °C fue 5% mayor que a 65 °C.

5.5. Determinación de la cristalinidad de los co-polímeros obtenidos

La determinación de la cristalinidad se realizó mediante el análisis de difracción de rayos-X de polvos, en la Tabla 5.9 se muestran los resultados de los polímeros PLLA y PGA obtenidos a la temperatura de 65 °C.

Tabla 5.9. Porcentaje de cristalinidad de PLLAs y PGAs.

Monómero	Tiempo de reacción (días)	Enzima	Cristalinidad (%)
[HMIM][PF₆]			
Glicólido	1.8	No	37.1
Glicólido	4	Sí	43.7
L-láctido	9	Sí	35.2
L-láctido	9	No	0
[BMIM][PF₆]			
Glicólido	4	Sí	35.7
Glicólido	12	No	36.3
L-láctido	11	Sí	26.0
L-láctido	11	No	0

En esta tabla se puede ver que los polímeros de glicólido y L-láctido tienen un porcentaje de cristalinidad elevado, pudiendo considerarse por tanto semi-cristalinos y como se puede ver, el PGA es un poco más cristalino que el PLLA. Sin embargo, en los siguientes resultados (Tabla 5.10) se puede ver que la cristalinidad de los co-polímeros obtenidos a 65 °C es menor.

Tabla 5.10. Porcentaje de cristalinidad de los co-polímeros a 65 °C.

[HMIM][PF₆]			[BMIM][PF₆]		
Relación	Tiempo (días)	Cristalinidad (%)	Relación	Tiempo (días)	Cristalinidad (%)
3:1	1	ND	3:1	2	26.2
3:1	3	19.9	3:1	4	13.2
3:1	6	19.7	3:1	8	18.8
3:1	11	12.6	3:1	12	15.0
1:1	1	13.5	1:1	3	11.9
1:1	3	16.3	1:1	6	15.9
1:1	5	13.8	1:1	10	11.4
1:1	9	11.4	1:3	2	20.5
1:3	1	16.4	1:3	4	15.1
1:3	3	12.6	1:3	8	13.5
1:3	5	17.8	1:3	12	12.2
			1:3 sin enzima	12	40.8

*ND: No determinado.

En estos resultados se puede observar que el porcentaje de cristalinidad no está relacionado con el tiempo, ni con la concentración inicial de monómeros, ni con líquido iónico, ya que en las diferentes condiciones de reacción se obtuvieron porcentajes variables de cristalinidad en un intervalo de 11.4 a 26.2% sin ninguna correlación. Sin embargo, en la reacción conducida sin enzima, la cristalinidad a los 12 días es mucho mayor (40.8%) que en todas las demás reacciones enzimáticas.

Este resultado está de acuerdo con observaciones anteriores de Chanfreau y colaboradores (2009), en donde se descubrió que en la síntesis PLLA en el medio [HMIM][PF₆] la cristalinidad de los materiales resultantes en experimentos realizados sin la adición de enzima presentaban igual o mayor cristalinidad que aquellos realizados en presencia del biocatalizador.⁵⁵ Siendo, al igual que en este caso, el peso molecular mayor en materiales sintetizados en la presencia de enzima, no se puede relacionar el porcentaje de cristalinidad con el mecanismo enzimático ni con el peso molecular de los polímeros o co-polímeros en este sistema.

En la Figura 5.15 se puede apreciar que el porcentaje de cristalinidad tuvo ligeras variaciones a través de los días, de acuerdo con el comportamiento de sus espectros de difracción; y aunque en los últimos días este tuvo una mayor cantidad de picos, esto no indica que la cristalinidad haya variado. Todas las reacciones enzimáticas a 65 °C mostraron resultados muy similares en el transcurso del tiempo de reacción, sobre todo en los últimos días.

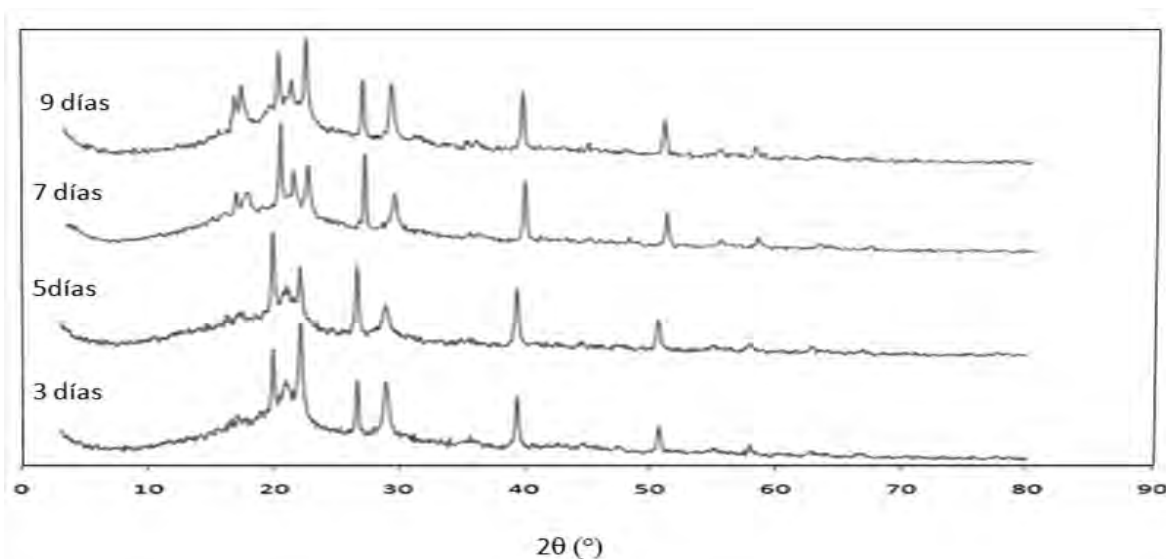


Figura 5.15. Resultado del análisis de difracción de rayos-X con [BMIM][PF₆] a 65 °C.

En la Figura 5.16 se puede apreciar el comportamiento de la cristalinidad de los co-polímeros sintetizados a 75 °C con el [BMIM][PF₆]; la gráfica A muestra un comportamiento similar al de 65 °C, a estas condiciones, el porcentaje de cristalinidad varió de 15.1 a 26.0%. La gráfica B corresponde a la reacción sin enzima, y puede observarse que, sin enzima, la cristalinidad del polímero disminuye notablemente el último día (de 40.0 a 27.0%). Comparando los resultados a 65 °C con los de 75 °C se observaron porcentajes de cristalinidad similares y nuevamente, bajo condiciones de reacción sin enzima, se obtuvo un mayor porcentaje de cristalinidad.

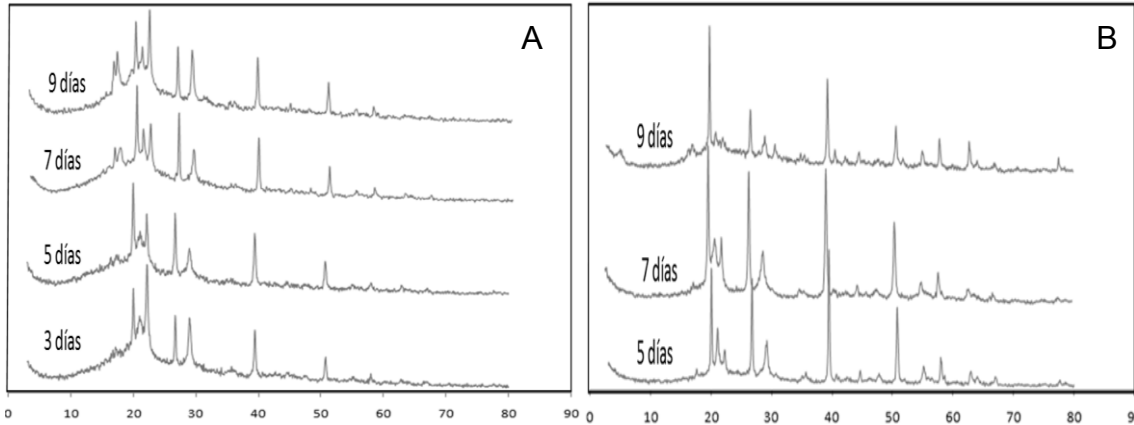


Figura 5.16. Resultado del análisis de difracción de rayos-X con [BMIM][PF₆] a 75 °C con enzima (A) y sin enzima (B).

Los resultados del porcentaje de cristalinidad de las reacciones llevadas a 90 °C se pueden apreciar en la Tabla 5.11, se puede ver que no hubo una gran variación, solamente un ligero aumento de ésta en el transcurso de los días para ambas reacciones, con enzima y sin enzima. Sin embargo, se puede notar que, al igual que en las reacciones llevadas a cabo a las otras temperaturas, la cristalinidad es mayor en las reacciones sin enzima. Además, cabe señalar que tampoco se encontró un gran aumento de la cristalinidad con respecto al aumento de temperatura.

Tabla 5.11. Porcentaje de cristalinidad de los polímeros obtenidos a 90 °C.

Enzima	Tiempo (días)	Cristalinidad (%)
Sí	2	17.1
	4	21.0
	6	26.5
No	2	ND
	4	26.1
	6	31.3

*ND: No determinado.

Como se puede ver en los resultados anteriores no existe ninguna correlación entre la cristalinidad y las otras variables (porcentaje de incorporación y peso molecular).

El bajo porcentaje de cristalinidad en los co-polímeros puede estar asociado con el bajo peso molecular de estos, ya que si los co-polímeros tienen una disposición de unidades de repetición al azar, la disparidad en la longitud de la cadena dificulta la cristalización. Además, se sabe que los homopolímeros (PLLA y PGA) presentan mayor grado de cristalinidad que los co-polímeros. Otro factor que puede dar este resultado es que si uno de los monómeros no puede cristalizar, queda confinado en dominios amorfos.⁴³

6. CONCLUSIONES

Se logró llevar a cabo de forma exitosa la síntesis enzimática del PLLGA utilizando la enzima lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym® 435) en ambos líquidos iónicos [HMIM][PF₆] y [BMIM][PF₆].

Se determinó mediante ¹H RMN que la relación inicial 3:1 de L-láctido y glicólido es la más adecuada, ya que en comparación con las otras relaciones se obtuvo un mayor porcentaje de incorporación del L-láctido.

Se encontró que en el líquido iónico [BMIM][PF₆] hubo un mayor porcentaje de incorporación del monómero L-láctido (casi el doble) que en el [HMIM][PF₆], así como un mayor porcentaje de recuperación a 65 °C.

Se determinó que a 75 °C el porcentaje de incorporación del L-láctido, la recuperación y el peso molecular del polímero aumentaron notablemente; asimismo, a 90 °C se lograron las mejores condiciones de reacción, con una recuperación de 61.3%, un porcentaje de incorporación del L-láctido de 75.0%, que coincide con la proporción inicial de monómeros y un peso molecular de 18542 g/mol.

Se determinó que al elevar la temperatura de 75 °C a 90 °C hubo un aumento en el peso molecular de los polímeros de alrededor de 1 orden de magnitud.

En la caracterización térmica no se encontró ninguna relación con los pesos moleculares y el porcentaje de incorporación del monómero con la T_g; las T_g obtenidas estuvieron en un intervalo de 35 a 70 °C. A 65 °C, a un mayor porcentaje de incorporación del L-láctido las temperaturas de fusión eran menores, mientras que a 90 °C las temperaturas de fusión fueron constantes a través del tiempo, alrededor de 68 °C.

Mediante el TGA se encontró que el porcentaje de degradación de los co-polímeros fue mayor al del PLLA y muy similar al del PGA; estos co-polímeros se degradaron en cerca de un 20% a 200 °C.

Se determinó que el porcentaje de cristalinidad de los homopolímeros fue de 35.0% y el porcentaje de cristalinidad de los co-polímeros estuvo en un intervalo de 13.0 a 26.0% en las reacciones con enzima y de cerca de 40.0% en las reacciones sin enzima. En las reacciones con enzima no se observó una variación de este porcentaje respecto a la temperatura.

7.RECOMENDACIONES

A continuación se proponen algunas ideas que pueden ser sujetas a estudio en el futuro.

1. Realizar la purificación del co-polímero por medios supercríticos como por ejemplo $scCO_2$ y comparar los resultados obtenidos con la purificación con solventes.
2. Probar líquidos iónicos de diferentes propiedades y/o en combinación con otros medios (como los supercríticos) para aumentar la transferencia de masa sobre todo en los últimos días de reacción.
3. Proponer y estudiar un método de recuperación del líquido iónico utilizado durante la reacción para mejorar la viabilidad económica.
4. Realizar un estudio más profundo de los parámetros involucrados (tanto los estudiados en este trabajo como cualquier otro adicional) en esta reacción en particular u otras de igual interés para comprender mejor su efecto sobre las características finales de los polímeros obtenidos.

8. REFERENCIAS

1. Kolybaba, M., Tabil, L., Panigrahi, S. y Crerar, W. (2003). Biodegradable polymers: past, present, and future. 2003 CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & Suites 301, USA, october 3-4.
2. Enviromental and plastic industrial council (15/04/2009). Biodegradable polymers: a review. URL: <http://www.cpia.ca/anti-litter/pdf/BIODEGRADEABLE%20POLYMERS%20A%20REVIEW%2024%20Nov.%202000.%20Final.PDF>
3. Dechy-Cabaret, O., Martin-Vaca, B. y Bourissou, D. (2004). Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chemical Reviews*, 104(12): 6147-6176.
4. Tapia, G. (2007). Síntesis y caracterización de polímeros de ácido láctico-co-glicólico como soporte para sistemas farmacéuticos de larga duración. Tesis de Maestría en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F.
5. Kaihara, S., Matsumura, S., Mikos, A. y Fisher, J. (2007). Synthesis of poly(L-lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization. *Nature Protocols*, 2(11):2767-2771.
6. Rosas, J. y Pedraz, J. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 36(2):134-153.
7. Hile, D. y Pishko, M. (1999). Ring-opening precipitation polymerization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) in supercritical carbon dioxide. *Macromolecular Rapid Communications* 20(10):511–514.
8. Williams, C. (2007). Synthesis of functionalized biodegradable polyesters. *Chemical Society Reviews*, 36:1573–1580.

-
9. Garlotta, D. (2001). A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2):63-84.
 10. Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H y Upadhyay, S. (2005). Synthesis of poly(lactic acid): a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 45(4):325–349.
 11. Drumright, R., Gruber, P., y Henton, D. (2000). Polylactic Acid Technology. *Advanced Materials*, 12(23):1841-1846.
 12. Gruber, P., y O'Brien, M. (2004). Biopolymers; Polylactides "Natureworks™ PLA". Steinbüchel, A., 1a Ed., USA, WILEY-VCH, 4:235-250.
 13. Arrazola, F. y Martínez, E. (2002). Química y propiedades de los polímeros. 5a Ed., México, Instituto Politécnico Nacional.
 14. Martínez, M. (2008). Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y ω -hidroxiácidos. Tesis de doctorado de Ing. Quím. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona.
 15. Rifé, M. (2007). Síntesis de co-polímeros a partir de glicolida y p-dioxanona. Tesis de licenciatura de Ing. Quím. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona.
 16. Mazarro, R., de Lucas, A., Gracia, I. y Rodríguez, J. (2008). Copolymerization of D,L-lactide and glycolide in supercritical carbon dioxide with zinc octoate as catalyst. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*, 85B(1):196-203.
 17. Huijser, S., Staal, B., Huang, J., Duchateau, R. y Koning C. (2006). Topology characterization by MALDI-TOF-MS of enzymatically synthesized poly(lactide-co-glycolide). *Biomacromolecules*, 7(9):2465- 2469.
 18. Huijser, S. (2006). Chemical composition and topology of poly(lactide-co-glycolide) revealed by pushing MALDI-TOF MS to its limit. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(25):4104-4108.

-
19. Young, R. y Lovell, P. (1991). Introduction to polymers. 2ª Ed. USA, CRC Press.
 20. Kobayashi S. y Uyama H. (2004). Biopolymers. Enzymatic polymerization to polyesters. Steinbüchel, A., 1a Ed., USA, WILEY-VCH, 3A:373-394.
 21. Kobayashi, S., Uyama, H. y Kimura, S. (2001). Enzymatic polymerization. Chemical Reviews, 101(12):3793-3818.
 22. Gallardo, R., Rojas, A. y Valerio-Alfaro, G. (2004). Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de amino ésteres en disolvente orgánico. Revista de la Sociedad Química de México, 48(4):300-304.
 23. Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, 409(6817):241-246.
 24. Yahya, A., Anderson, W. y Moo-Young, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enzyme and Microbial Technology, 23(7-8):438-450.
 25. Matsumura, S., Mabuchi, K. y Toshima, K. (1997). Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide. Macromolecular Rapid Communications, 18(6): 477-482.
 26. Schmid, R. y Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angewandte Chemie International Edition, 37(12):1608-1633.
 27. Arroyo, M. (2000). Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. Anales de la Real Sociedad Española de Química, 1:19-24.
 28. Albertsson, A. y Srivastava, R. (2008). Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. Advanced Drug Delivery Reviews, 60(9):1077-1093.
 29. Mora, M. (2007). Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua. Tesis de Doctorado en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F.

-
30. Gotor-Fernández, V., Busto, E. y Gotor, V. (2006). *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 348(7-8):797-812.
31. Kumar, A. y Gross, R. (2000). *Candida antarctica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature. *Biomacromolecules*, 1(1):133-138.
32. Montenegro, M. (2007). Hidrólisis enzimática de diésteres de luteína en un reactor enzimático de lecho empacado empacado con recirculación. Tesis de Maestría en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F.
33. Cortés, A., Mora, R. y Vargas, J. (15/04/2009). Inmovilización de lipasas: estudio de la actividad catalítica en la esterificación de ácidos grasos. URL: http://www.ciiq.org/varios/peru_2005/Trabajos/I/2/1.2.11.pdf.
34. Cifuentes, A. y Rojas, D. (2005). Inmovilización de lipasa *Candida rugosa* en soporte de quitosano. Trabajo para optar el título de Ingeniero Químico, modalidad: Participación en proyecto de investigación, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
35. Lozano P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier M. e Iborra J. (2003). Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(1-2):9-13.
36. Yang, Z. y Pan, W. (2005). Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1):19-28.
37. Berthod, A. y Carda-Broch, S. (2003). Líquidos iónicos: descripción y aplicaciones de esta nueva clase de disolventes en el análisis químico. *Cromatografía y Técnicas Afines*, 24(2):36-44.
38. Kaar J., Jesionowski, A., Berberich, J., Moulton, R., y Russell A. (2003). Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society*, 125(14):4125-4131.
39. Park, S. y Kazlauskas, R. (2003). Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4):432-437.

-
40. Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. (2001) Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters*, 23(18):1529-1533
41. Yoshizawa-Fujita, M., Saito, C., Takeoka, Y. y Rikukawa, M. (2008). Lipase-catalyzed polymerization of L-lactide in ionic liquids. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(10):1396-1400.
42. Fujioka, M., Hosoda, N., Nishiyama, S., Noguchi, H., Shoji, A., Kumar, S. Katsuraya, K., Ishii, S. y Yoshida, Y. (2006). One-pot enzymatic synthesis of poly(L,L-lactide) by immobilized lipase catalyst. *Sen'i Gakkaishi*, 62(3):63-65.
43. Angulo, J. (1995). Caracterización físicoquímica de polímeros. 1ª Ed. México, Editorial LIMUSA.
44. Areizaga, J., Cortázar M., Elorza J. e Iruin J. (2002). Polímeros. 1ª Ed. España, Editorial Síntesis, S.A.
45. Raymond, S. y Charles C. (1995). Introducción a la química de los polímeros. 1ª Ed. España, Editorial Reverté.
46. Kreiser-Saunders, I. y Kricheldorf, H. (1998). Zn lactate-catalyzed copolymerization of L-lactide with glycolide or ϵ -caprolactone. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 199(6):1081-1087.
47. Kaar, J., Jesionowski, A., Berberich, J., Moulton, R., y Russell, A. (2003). Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability. *Journal of the American Chemical Society*, 125(14):4125-4131.
48. Reichardt, C. (2005). Polarity of Ionic Liquids Determined Empirically by Means of Solvatochromic Pyridinium N-Phenolate Betaine Dyes. *Green Chemistry*, 36(49):339-351.
49. Erbedinger, M., Mesiano, A.J., Russell, A.J., (2000). Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid - An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnology Progress*. 16(6):1129-1131.

-
50. Madeira, R., Rantwijk, F., Seddon, K. y Sheldon, R. (2000) Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Organic Letters* 2(26):4189-4191.
51. Fehér, E., Major, B., Bélafi-Bakó, K. y Gubicza, L.. (2007). On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochemical Society Transactions*, 35(2):1624-1627.
52. Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., Tonova, K., y Gubicza, L. (2005). Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformations*, 23(3):177-183.
53. Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. (2001). Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnology Letters*, 23 (18):1529-1244.
54. De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., e Iborra J. (2005). Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*, 6(16):1457-1464.
55. He, Y., Fan, Z., Hu, Y., Wu, T., Wei, J. y Li, S. (2007). DSC analysis of isothermal melt-crystallization, glass transition and melting behavior of poly(L-lactide) with different molecular weights. *European Polymer Journal* 43(2):4431-4439.
56. Chanfreau, S., Mena, M., Porras-Domínguez, J., Ramírez-Gilly, M., Gimeno, M., Roquero, P., Tecante, A. y Bárzana, E. (2009). Enzymatic synthesis of poly-L-Lactide and Poly-L-Lactide-co-Glycolide in Ionic Liquid. Enviado a *Journal of Biotechnology*. Aceptado octubre 2009.