



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE L-LÁCTIDO USANDO DIÓXIDO DE CARBONO
EN ESTADO SUPERCRÍTICO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

David Angel López Guerrero



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: EDUARDO BARZANA GARCIA

VOCAL: PROFESOR: RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

SECRETARIO: PROFESOR: MIQUEL GIMENO SECO

1ER SUP: PROFESOR: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

2DO SUP: PROFESOR: JORGE ARTURO ANELL

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

LABORATORIO 314, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA

Miquel Gimeno Seco

SUSTENTANTE

David Angel López Guerrero

Agradecimientos

A mi universidad por todo lo que me enseñó a lo largo de este camino

Agradecemos a CONACyT proyecto 48641 por el financiamiento. Agradecemos a la unidad de la USAI facultad de Química por la ayuda analítica en RMN, DSC y DRX. Agradecemos al instituto de Investigaciones en Materiales (UNAM) por el análisis de GPC.

Agradezco al Doctor Miquel Gimeno Seco, por brindarme la oportunidad, el apoyo y la tutoría para realizar este trabajo, así como su amistad. Muchas gracias.

Agradezco al Doctor Roeb Gracia Arrazola, por su asesoría técnica y consejos dados a lo largo del trabajo, así como a mis compañeros del laboratorio 314, por su amistad y apoyo. Gracias.

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

I.1. Índice de figuras, esquemas y dibujos.....	4
I.2. Índice de Tablas.....	6
II. Resumen.....	7
III. Abreviaturas.....	9
IV. Introducción.....	10
V. Objetivos.....	14
VI. Antecedentes.....	15
VI.1.Generalidades.....	15
VI.2.L-Láctico: fuente para la creación de polímeros biodegradables	15
VI.3.Métodos de polimerización.....	20
VI.3.1.Tipos de polimerización, de acuerdo al sistema de reacción.....	20
VI.3.1.1.La Polimerización en Bulk.....	20
VI.3.1.2.Polimerización en Disolución.....	21
VI.3.1.3.Polimerización en suspensión.....	22
VI.3.1.4.Polimerización por emulsión.....	22

VI.3.2.Polimerización por apertura de anillo (PAA).....	25
VI.3.2.1.Mecanismo Enzimático por esterificación.....	27
VI.3.2.2.Polimerización enzimática y uso de lipasas.....	28
VI.4.Efecto de la actividad acuosa (a_w) en la esterificación enzimática.....	30
VI.5.Fluidos supercríticos (FSC) una ruta limpia para la síntesis de polímeros.....	32
VI.6. Caracterización.....	37
VI.6.1.Determinación del peso molecular.....	37
VI.6.2.RMN	39
VI.6.3.Cristalografía de difracción de rayos X.....	40
VI.6.4.Métodos de Difracción de rayos X.....	42
VI.6.5.Análisis Térmicos.....	42
VII. Desarrollo experimental.....	44
VII.1.Materiales y Equipo Utilizados.....	44
VII.2.Reactivos Utilizados.....	44
VII.3.Procedimiento.....	45

VII.3.1.Estudio de la cinética de la polimerización enzimática del L-Láctico en scCO ₂ con humedad inicial baja $a_w < 0.16$...	45
VII.3.1.1.Recuperación y Purificación del polímero.....	46
VII.3.2. Estudio de la cinética de la polimerización enzimática del L-Láctido en scCO ₂ en emulsión variando: Concentración de monómero (p/v) y humedad inicial del medio.....	48
VII.3.3.Caracterización del Polímero.....	48
VII.3.3.2.Preparación de las muestras para análisis.....	48
VII.3.3.3.Análisis por ¹ H RMN del polímero.....	49
VII.3.3.4.Análisis de rayos X.....	49
VII.3.3.5.Análisis Térmico DSC.....	50
VII.3.3.6.Determinación del peso molecular por GPC.....	50
VIII. Discusión y resultados.....	51
VIII.1.Efecto del medio de reacción: Emulsión vs. Disolución	51
VIII.2.Efecto de la humedad inicial.....	56
VIII.3.Efecto de la concentración inicial de sustrato.....	60
VIII.4.Caracterización por ¹ H RMN: Determinación de % de conversión y apertura de anillo.....	62
VIII.5.Caracterización térmica del PLA.....	65

VIII.6.Caracterización por Rayos X en polvo: Determinación de porcentaje de Cristalinidad del PLA.....	68
IX. Conclusiones.....	71
X. Trabajo a Futuro.....	73
XI. Bibliografía.....	74
I.1. ÍNDICE DE FIGURAS ESQUEMAS Y DIBUJOS.	
Figura 1. Ciclo del PLA, producción y degradación.....	12
Figura 2. Síntesis de poli-L-Láctido a partir de L- Láctido.....	13
Figura 3. Rutas de polimerización del PLA.....	18
Figura 4. Esquema de la producción de poliláctido vía prepolimero y Láctido.....	18
Figura 5. Formas isoméricas del ácido láctido.....	19
Figura 6. Representación esquemática de un sistema de polimerización en emulsión.....	23
Figura 7. Monómeros utilizados para las síntesis de polímeros por la apertura del anillo.....	26
Figura 8.Síntesis vía catiónica del PLA.....	26
Figura 9. Mecanismo síntesis inorgánica de PLA.....	27
Figura 10. Polimerización vía enzimática por esterificación.....	28

Figura 11. Diagrama de fases para un fluido súper crítico.....	32
Figura 12 a) Isotermas para un FSC que indican cómo varía su densidad con la presión.	33
Figura 12 b) Representación gráfica de la densidad de un FSC.....	34
Figura 13. Cinética de polimerización de PLA, en los diferentes medios de tipo emulsión y disolución.....	53
Figura 14. Efecto del sistema en los pesos moleculares del polímero.....	55
Figura 15. Efecto del sistema en la PDI.....	55
Figura 16. Efecto de la humedad inicial en los rendimientos.....	57
Figura 17. Efecto de la humedad inicial en los pesos moleculares.....	58
Figura 18. Efecto de la humedad inicial en la PDI.....	59
Figura 19. Efecto de la concentración de LA en la cinética de polimerización PLA, en el medio tipo de emulsión ...	61
Figura 20. Espectros 1H RMN de la cinética en el medio de disolución...	63
Figura 21. Espectros 1H RMN de la cinética en el medio de emulsión.....	63
Figura 22. Comparación del porcentaje de conversión de LA a PLA en los diferentes medios emulsión y disolución.....	64
Figura 23. Comportamiento de la T_g con respecto al tiempo de reacción....	66
Figura 24. Efecto del peso molecular en los T_g	67

Figura 25. Comparación del Porcentaje de cristalinidad y el porcentaje de rendimiento para el sistema de tipo emulsión..... **69**

Figura 26. Evolución de la cristalinidad en la síntesis del polímero..... **69**

I.2. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Comparación de los sistemas de polimerización..... **24**

Tabla 2. Características de los polímeros obtenidos en los sistemas de solución y suspensión..... **25**

Tabla 3. Valores típicos para los fluidos supercríticos (FSC)..... **33**

Tabla 4. Propiedades críticas de diferentes fluidos. El CO₂ y el H₂O como los mas estudiados **35**

II. RESUMEN

La síntesis enzimática de polímeros biodegradables, basados en ácido láctico, ha despertado el interés desde hace más de 30 años, ya que es una solución viable al uso de polímeros derivados del petróleo. Además estos se sintetizan a partir de fuentes naturales renovables, aunado al hecho de que para su elaboración no implica el uso de materiales que resulten nocivos para el medio ambiente en el marco de la llamada química verde. Debido a esto existe el afán de encontrar nuevas y mejores técnicas para su producción, las cuales van desde cambios en los medios de reacción hasta la modificación de variables controlables y evaluación de diferentes enzimas para lograr un rendimiento óptimo.

La síntesis del poli-*L*-láctido (PLA) se realizó mediante la polimerización por apertura de anillo del ácido-*L*-láctido (LA) usando una lipasa como catalizador de la reacción y CO₂ en estado supercrítico. Con la realización del presente trabajo se pretendió buscar las mejores condiciones para la polimerización del PLA por este novedoso método. El PLA es utilizado como matriz en la composición de productos biodegradables y actualmente los métodos de síntesis utilizan catalizadores metálicos tóxicos que son difíciles de eliminar. Para este estudio inicialmente se evaluaron las diferentes condiciones de reacción, emulsión (20 %^{p/v} LA – 10 % Lipasa) y disolución (9.6%^{p/v} LA – 10 % Lipasa), y siguiendo la cinética de las mismas, se descubrió la mejor condición para la obtención de mejores rendimientos. En la primera el *L*-Láctido se encuentra totalmente disuelto, es decir un sistema homogéneo, en el medio de reacción, mientras que en el segundo gracias a una sobre-saturación de LA a condiciones adecuadas se logra un sistema heterogéneo, en donde el LA se encuentra parcialmente en estado líquido en forma de pequeñas partículas en el medio (gotas), tal como en una emulsión agua-aceite. Para alcanzar las condiciones óptimas del CO₂ supercrítico en la reacción se usaron reactores acondicionados a 65 °C y 300 bares de presión, el

catalizador es una lipasa obtenida de la levadura *Candida antártica* (CA). La lipasa B de CA se comercializa inmovilizada en una resina macroporosa de acrílico (Novozym 435), lo cual permitió que la recuperación de la misma fuera más fácil. Tomando en cuenta los resultados del mejor sistema, se estudiaron los efectos que tienen las siguientes variaciones en el sistema: % p/v, de monómero de LA, la actividad de agua inicial de la enzima (a_w), y tiempo.

Los compuestos obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas analíticas como la Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H), Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X en polvo (DRX), para así poder determinar el grado de transformación de monómero a polímero y el tamaño del polímero obtenido.

David Ángel López Guerrero, pasante de la carrera de Químico en Alimentos, estudiante de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, legnativad@live.com.mx

III. ABREVIATURAS.

CA (*Candida antarctica*)

CEP (Complejo enzima Polímero)

DSC (Differential Scanning Calorimetry o Calorimetría Diferencial de Barrido)

FSC (Fluidos supercríticos)

GPC (Gel Permeation Chromatography o Cromatografía de permeación por gel)

LA (ácido-*L*-Láctido)

PAA (Polimerización por apertura de Anillo)

PET (Polietileno tereftalato)

PLA (poliláctido)

PS (poliestireno)

RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

scCO₂ (Dióxido de carbono en condiciones supercríticas)

IV. INTRODUCCION

En los últimos años se han desarrollado un gran número de trabajos de investigación encaminados a disminuir las cantidades de residuos plásticos, es decir, materiales poliméricos elaborados a partir de productos obtenidos del petróleo, los cuales resultan ser muy agresivos con el ambiente debido a la baja biodegradabilidad. Por lo tanto, es de esperar que en el tercer milenio dispongamos de una amplia variedad de polímeros cuyos residuos sólidos no constituyan un problema ecológico.¹

La actual tendencia por el cuidado del ambiente y el desarrollo de nuevos materiales poliméricos basados en recursos naturales renovables a fomentado el crecimiento en el interés por encontrar nuevos métodos de síntesis que sean mas amigables con el medio ambiente y los cuales tengan las condiciones óptimas para una síntesis viable. Como respuesta a estas exigencias, la industria y la comunidad científica han potenciado proyectos de investigación y desarrollo sobre materiales biodegradables que no ataquen al medio ambiente. Los biomateriales son productos destinados a aplicaciones médicas que están en contacto con los sistemas biológicos como, marcapasos, plasmas, prótesis, fármacos encapsulados, suturas, grapas y material odontológico. Además, pueden ser una alternativa perfectamente viable en otros ámbitos como, agricultura y embalaje, donde existen problemas de reciclado y almacenaje. Algunos de los países en vías de desarrollo pierden una parte de su producción de alimentos debido a un envasado inexistente o deficiente. Materiales como MAKROLON, un policarbonato reciclable, hacen los envases más manejables, resistentes y económicos. Las bolsas biodegradables BAK, una resina termoplástica, comercializada por Bayer es una de las ultimas innovaciones químicas en el campo del envasado con menor impacto ambiental.¹

Desde la década de los setenta, en el campo de la medicina se han estado usando una nueva clase de polímeros basados en ácido láctico. Esta clase de polímeros se obtienen de fuentes naturales y renovables, además de ser biodegradables, presentan propiedades mecánicas similares a las del poliestireno (PS) y polietileno tereftalato (PET) por lo cual gozan de una amplia gama de usos en las áreas de la medicina, de textiles y de empaques.^{1,2}

El PLA es obtenido a partir de la polimerización del ácido láctico, que a su vez se obtiene de la fermentación de carbohidratos. El ácido láctico conseguido se somete a un tratamiento térmico para formar oligómeros de ácido láctico que posteriormente son convertidos a través de deshidratación a ácido láctido, que es el dímero heterocíclico. Posteriormente el ácido láctido es polimerizado por la apertura del anillo generalmente utilizando sales inorgánicas como catalizadores³ (Fig. 1).

Como ya habíamos apuntado el PLA puede adoptarse como un material alternativo con muchas aplicaciones, PLA puede obtenerse de diferentes isómeros comerciales de ácido láctido (LA), el dímero cíclico del ácido Láctido, (*L-LA*, *rac-LA* y *meso-LA*) dan como resultado a diferentes materiales con variaciones significativas en sus propiedades mecánicas y químicas. Poli-*L-LA* (PLA), puede ser obtenido del isómero *L-LA* puro, como una estructura semicristalina. Las variaciones en los grados de cristalinidad dependen en el proceso del sistema usado teniendo una influencia remarcable sobre sus propiedades.⁴

Generalmente, las propiedades mecánicas del PLA hacen a este material mas atractivo con mas aplicaciones que los PLAs amorfos.

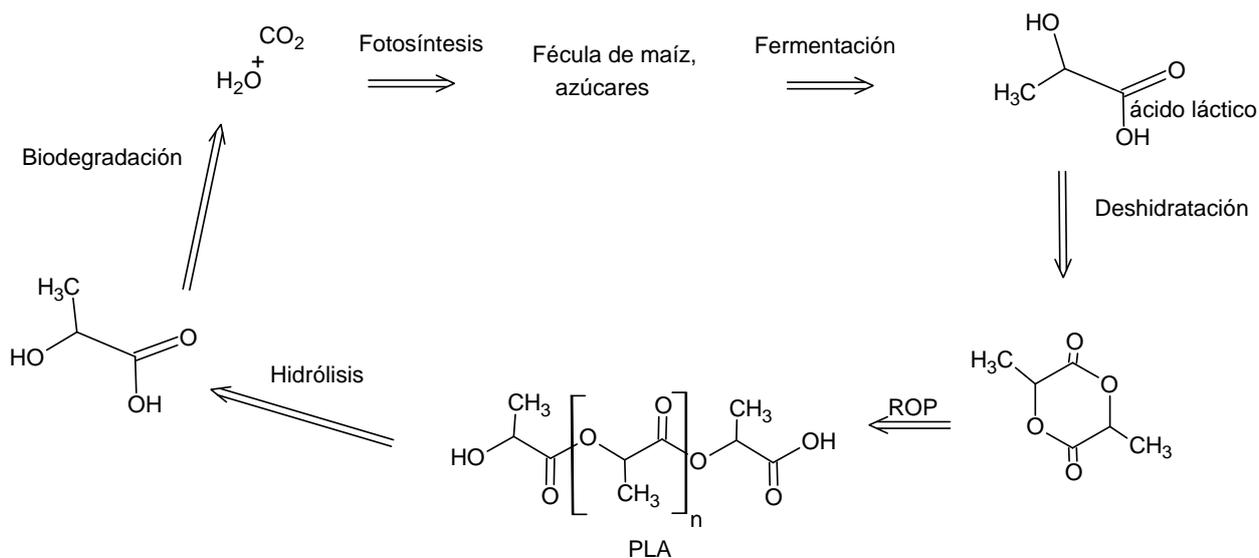


Figura 1. Ciclo del PLA, producción y degradación.

Por otro lado, al utilizar enzimas como catalizadores de la polimerización por Apertura de Anillo (PAA) para llevar a cabo la síntesis de estos compuestos, se evitan el uso de catalizadores tóxicos, ya que promueven un proceso limpio, evitando la generación de residuos que provoquen un daño al medioambiente y con la posibilidad de ser reutilizable. El método de polimerización del LA alternativo que aquí se propone está basado en el empleo de medios no tóxicos en donde se lleva a cabo la reacción, por ejemplo, el uso de gases comprimidos, tal es el caso del dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) que es uno de los fluidos comprimidos más versátil y estudiado, debido a su baja toxicidad, bajo costo y al no ser inflamable. Además, la disponibilidad de CO_2 como un subproducto de muchos procesos industriales, reciclaje viable y el fácil alcance de sus parámetros críticos ($P_c = 7.3 \text{ MPa}$; 304.25 K) deben tomarse en cuenta para expandir el uso de este gas. El scCO_2 presenta muy baja viscosidad y un alto coeficiente de difusión y densidades similares a la de los solventes orgánicos comunes.

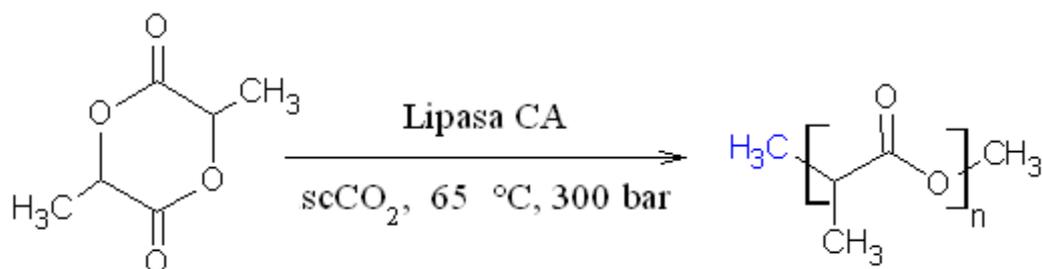


Figura 2. Síntesis de poli-L-láctido a partir de L- Láctido

Desde los primeros reportes por Zaks y Klibanov en 1984 sobre la actividad catalítica de las enzimas en medios no acuosos,⁵ la síntesis enzimática de varios compuestos orgánicos como son los polímeros han sido reportados.^{6,7}

A finales de la última década, muchas investigaciones se han dirigido al estudio de la actividad enzimática en medio no convencionales, incluyendo el scCO₂ como otros fluidos comprimidos,⁸⁻⁹ líquidos iónicos¹⁰ u otros sistemas.

En el campo de los polímeros, Loecker *et al*, reportó que la síntesis enzimática por PAA de *epsilon*-caprolactona (*-CL*) en scCO₂ a presiones sobre los 15 MPa, con rendimientos similares a los reportados con tolueno.

La síntesis de PLA ha sido reportada por varios autores usando catálisis inorgánica o inductores con un amplio rango de peso moleculares y altas solubilidades en solventes orgánicos polares convencionales, como el cloroformo.¹¹⁻¹² En el campo de las enzimas, los reportes están limitados a polymerizaciones en crudo (bulk) arriba de 90 °C en donde el LA fundido sirve como solvente a la par que como monómero.^{13, 14}

V. OBJETIVOS

Objetivo principal

- Determinar la viabilidad de la polimerización enzimática de ácido L-Láctido usando $scCO_2$.

Objetivos secundarios.

- Evaluar las mejores condiciones para que se lleve a cabo la polimerización, siendo estas de disolución y tipo emulsión.
- Determinar la estructura del polímero y el grado de conversión de monómero polímero, por medio de un análisis de 1H RMN.
- Realizar estudios físicos mediante difracción de Rayos X, DSC y GPC

VI. ANTECEDENTES

VI.1.-Generalidades

Se entiende por polímeros biodegradables como aquellos que pueden ser degradados por procesos en los que participan microorganismos, lo que ha generado un gran interés, para su desarrollo y producción óptima.¹⁵ Los polímeros biodegradables pueden clasificarse básicamente en cuatro categorías principales:

- Polímeros naturales: como la celulosa, el almidón, y las proteínas.
- Polímeros naturales modificados: como el acetato de celulosa o los polialcanoatos.
- Materiales compuestos que combinan partículas biodegradables con polímeros sintéticos.
- Polímeros sintéticos: como los poliésteres, las poliésteramidas y los poliuretanos, entre otros.

Estos últimos ofrecen mayores ventajas sobre los naturales, ya que pueden ser diseñados de acuerdo a las propiedades que sean requeridas. Además, de que sus estructuras pueden ser estimadas o pronosticadas teóricamente.¹⁶ Los polímeros basados en LA pertenecen al grupo de los poliésteres, el poli-láctido o PLA es obtenido a partir del ácido láctico que se obtiene a partir de la fermentación de carbohidratos totalmente renovables.

VI.2.-L-Láctido: fuente para la creación de polímeros biodegradables

El ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, es un compuesto muy versátil utilizado en la industria química, farmacéutica, de alimentos y del plástico. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur

en 1874 y hasta 1881, Littelon inicia la fermentación a escala industrial. El ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos el D(-) láctico y L(+) Láctico, los cuales son metabolizados por el organismo, además existe una forma racémica constituida por mezclas equimolares de ambas formas.

Existen dos vías para la obtención de ácido láctico, la vía química o la biotecnológica. La producción química se basa en la reacción del acetaldehído con ácido cianhídrico para dar lacto nitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico; otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene la desventaja de que el ácido láctico producido es una mezcla racémica de D y L ópticamente inactivo, por lo que el 90% del ácido láctico producido en el mundo se elabora por métodos biotecnológicos. La producción biotecnológica esta basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar excesos enantiómericos, D (-) y L (+) ópticamente activos, esta depende de los siguientes parámetros¹⁷:

- Tipo de microorganismo utilizado para llevar a cabo la fermentación.
- La inmovilización o recirculación del microorganismo, en el medio de fermentación.
- pH
- Temperatura.
- La fuente de carbono.
- La fuente de nitrógeno.
- El modo de fermentación empleado.
- Formación de subproductos.

En la producción biotecnológica de ácido láctico, los sustratos más comunes a utilizar son los siguientes: sacarosa proveniente de caña y

remolacha de azucarera, lactosa proveniente de lactosuero y dextrosa procedente de almidón hidrolizado. La sacarosa refinada y glucosa son los más utilizados, pero debido a que el azúcar puro es de alto coste, se han venido investigando otros sustratos para disminuir los costes de producción. Materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos dañados, sustratos amiláceos disponibles en la forma de desechos agrícolas, así como porciones comestibles de granos y tubérculos que sirven como materia prima para su producción.

La producción de ácido láctico de estas fuentes renovables requiere de los siguientes pasos⁶:

1. Hidrólisis del sustrato hasta azúcares fermentables.
2. Fermentación de azúcares a ácido láctico.
3. separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación.
4. Purificación del ácido láctico obtenido.

El PLA puede ser preparado por condensación directa del ácido láctico y por PAA del ácido láctido, que es el dímero de forma cíclica del ácido láctico (Fig. 3). Muchos de los trabajos se han enfocado en las PAA, además de que por este método se pueden usar solventes de alto punto de ebullición para conducir la remoción de agua en el proceso y obtener altos pesos moleculares. Para obtener compuesto cíclico, el ácido láctico se somete a una condensación continua que produce prepolímero de bajo peso molecular, después, el prepolímero es convertido a una mezcla de estereo isómeros de láctico por medio de una catálisis para fomentar la velocidad y selectividad de la reacción intramoleculares de ciclización. La mezcla de láctido fundido es después purificada por destilación (Fig. 4).

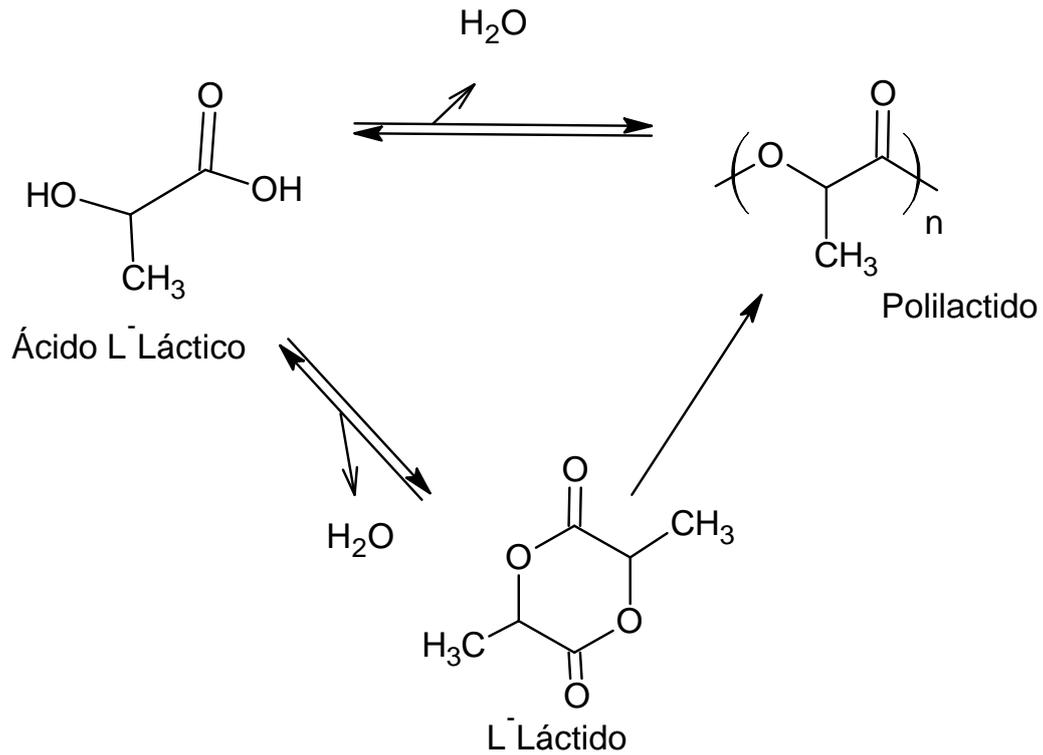


Figura 3. Rutas de polimerización del PLA

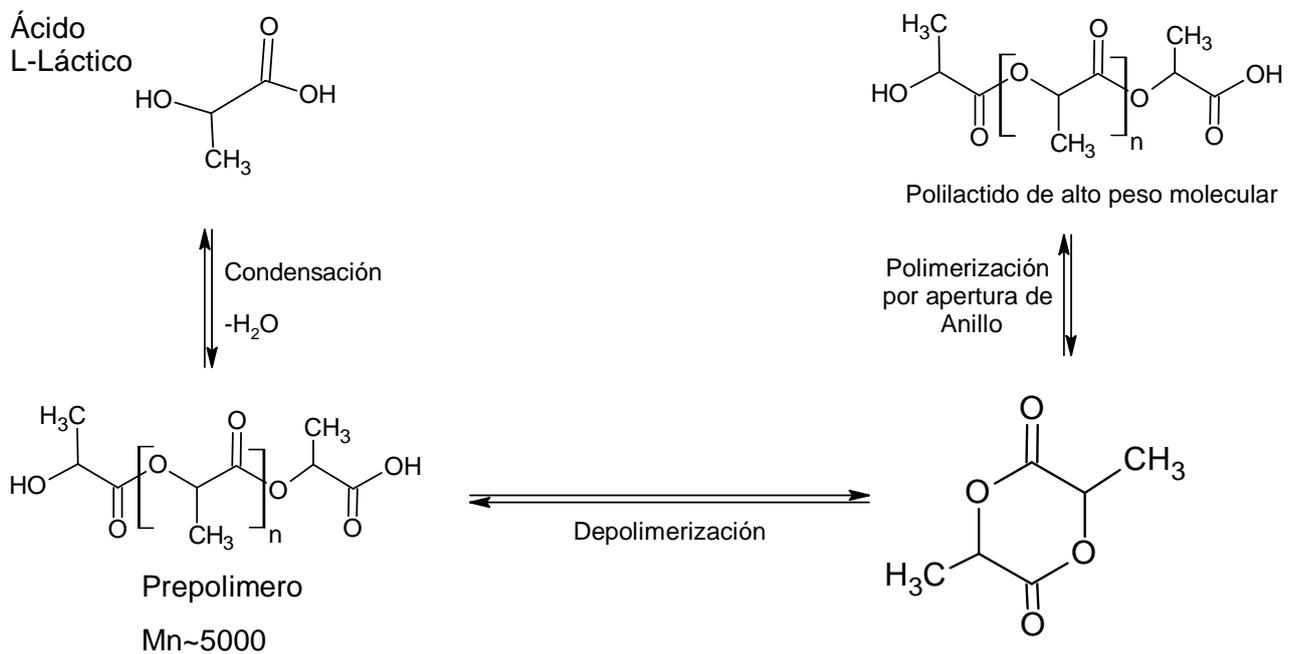


Figura 4. Esquema de la producción de poliláctido vía prepolimero y láctido

Cuando el di-láctido es preparado del ácido láctido racémico, las tres formas isoméricas que se forman son, el L-láctido, el D-láctido y el meso-láctido, estas formas están dadas por los 2 carbonos quirales (Fig. 4) que conforman la molécula del ácido láctido. Las resinas de PLA que tienen por arriba del 93% de LA resultan ser semi-cristalinas por lo que resultan ser las mas demandadas mientras que las formadas entre un 53 y 93% de LA tienen una estructura amorfa.

El punto de fusión, la tensión mecánica y la cristalinidad del PLA dependen de dos características del polímero como puedan ser su morfología y su peso molecular, la morfología del polímero está dada por las formas isoméricas del ácido láctido usado para sintetizarse mientras que el peso molecular del polímero depende de las condiciones que se utilicen para sintetizarlo.

Los procesos comerciales utilizan actualmente el LA producido del ácido L-Láctico.^{1,2}

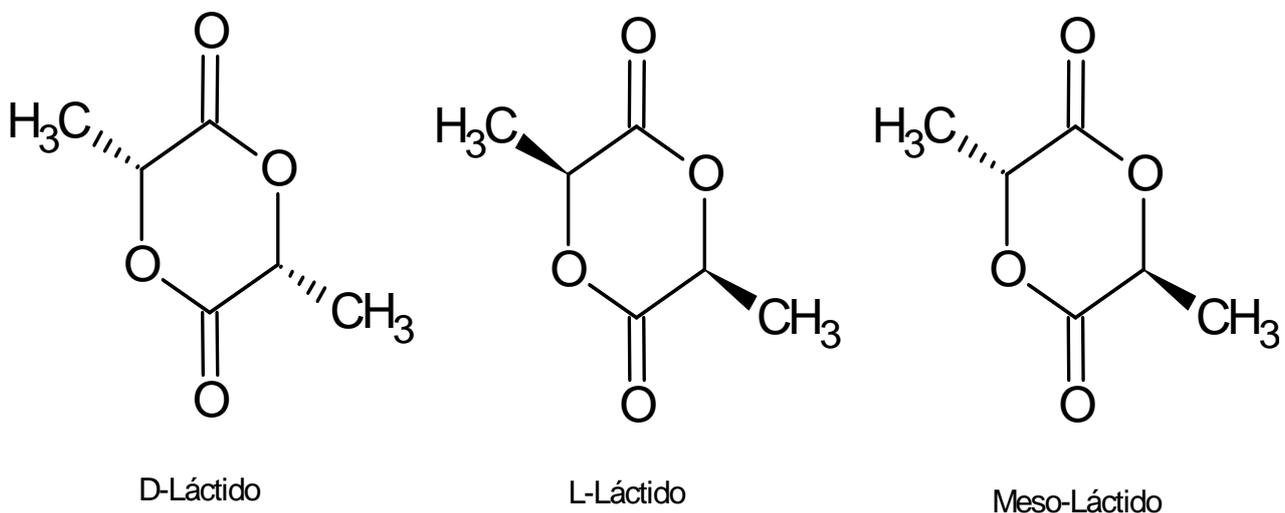


Figura 5. Formas isoméricas del ácido láctido

VI.3.-Métodos de polimerización.

VI.3.1.-Tipos de polimerización, de acuerdo al sistema de reacción.

Existen cuatro técnicas industriales empleadas para llevar a cabo la polimerización de un monómero, estas técnicas se basan en el medio de reacción y la interacción del monómero y polímero en el mismo, estos métodos se nombran de la siguiente manera:

- Bulk o en masa
- Disolución.
- Suspensión
- Emulsión.

Cada una de las técnicas mencionadas tiene condiciones específicas y dan origen a polímeros con características diferentes.

VI.3.1.1.-La polimerización en Bulk

Es una técnica simple, homogénea, en donde solo el monómero y el iniciador están presentes en el sistema. Ya sea que la polimerización sea iniciada térmicamente o por radiación. Por lo que la convierte en una técnica económica, además de producir polímeros con un alto grado de pureza. Esta polimerización es altamente exotérmica, por lo que acarrea dificultades en el control de la temperatura y de la agitación del medio de reacción, ya que rápidamente adquiere gran viscosidad desde el inicio de la polimerización. La agitación durante la polimerización debe ser vigorosa para que haya una dispersión del calor de formación del polímero, evitándose puntos sobrecalentados, que dan un color amarillento al producto. Este inconveniente puede ser evitado usándose inicialmente un prepolímero, (mezcla de polímero y monómero), que es producido a una temperatura más baja, con una baja conversión y condiciones moderadas.

- Si el polímero es insoluble en monómero, la iniciación, propagación y terminación ocurre en la fase del monómero.
- Si el polímero es soluble en el monómero, la concentración de monómero disminuye continuamente y la viscosidad cambia.

VI.3.1.2.-Polimerización en Disolución.

Además del monómero y del iniciador se emplea un disolvente, formando un sistema homogéneo, teniendo dos posibilidades:

- El monómero y el polímero son solubles en el diluyente.
- El monómero es soluble y el polímero es insoluble en el diluyente.

El disolvente ideal debe ser barato, de bajo punto de ebullición y de fácil extracción del polímero. Al final de la polimerización, el polímero formado debe ser soluble o no en el disolvente como ya veíamos anteriormente. Si es insoluble, se obtiene un lodo, que se separa fácilmente del medio de reacción, por medio de una simple filtración. Si el polímero fuese soluble, se utiliza un anti-solvente para precipitarlo.

La polimerización en solución tiene como ventaja la temperatura homogénea, es decir se tiene un mejor control, debido a la fácil agitación del sistema que evita problemas de sobrecalentamiento. Entretanto, el coste del disolvente y el retraso de la reacción son los inconvenientes de esta técnica.

VI.3.1.3.-Polimerización en suspensión.

También conocida como polimerización en perlas, por la forma en como los polímeros son obtenidos, es una polimerización heterogénea donde el monómero y el iniciador son insolubles en el medio dispersante, en

general agua. La fase acuosa es el medio de transferencia de temperatura. Aquí la polimerización ocurre dentro de las partículas en suspensión, donde se encuentra el monómero y el iniciador. La agitación del sistema es un factor muy importante en esta técnica, pues según la velocidad de agitación empleada, varía el tamaño de las partículas.

El mecanismo dentro de las partículas de monómero es muy parecido al mecanismo de la polimerización en bulk, pero velocidades de reacción más rápidas pueden ser toleradas sin fundir el monómero.^{18,19} Aunque se conoce bien el mecanismo por el cual actúa el sistema, en los casos cuando se usa como disolvente el scCO₂. ocurre un fenómeno distinto, al que algunos autores lo denominan de tipo emulsión (emulsion-like) tal es el caso de Hile-Pisko y Stassin-Jérôme, mientras que otros como Bratton y Howdle utilizan la denominación establecida.⁸

VI.3.1.4.-Polimerización por emulsión.

La polimerización por emulsión es una polimerización heterogénea en medio líquido, que requiere de los siguientes ingredientes:

- 1) Un iniciador soluble en agua.
- 2) Un emulsificante.
- 3) Un monómero poco soluble en agua.

El emulsificante tiene como propósito formar micelas, donde el monómero queda contenido. Algunas micelas son activas, o sea, la reacción de polimerización se procesa dentro de ellas, mientras que otras que son inactivas (gotas de monómero), constituyen una fuente de monómero. A medida que la reacción ocurre, las micelas inactivas suplen a las activas con monómero, que crecen hasta formar gotas de polímero, originando posteriormente el polímero sólido. La figura 6 representa el esquema de un sistema de polimerización en emulsión

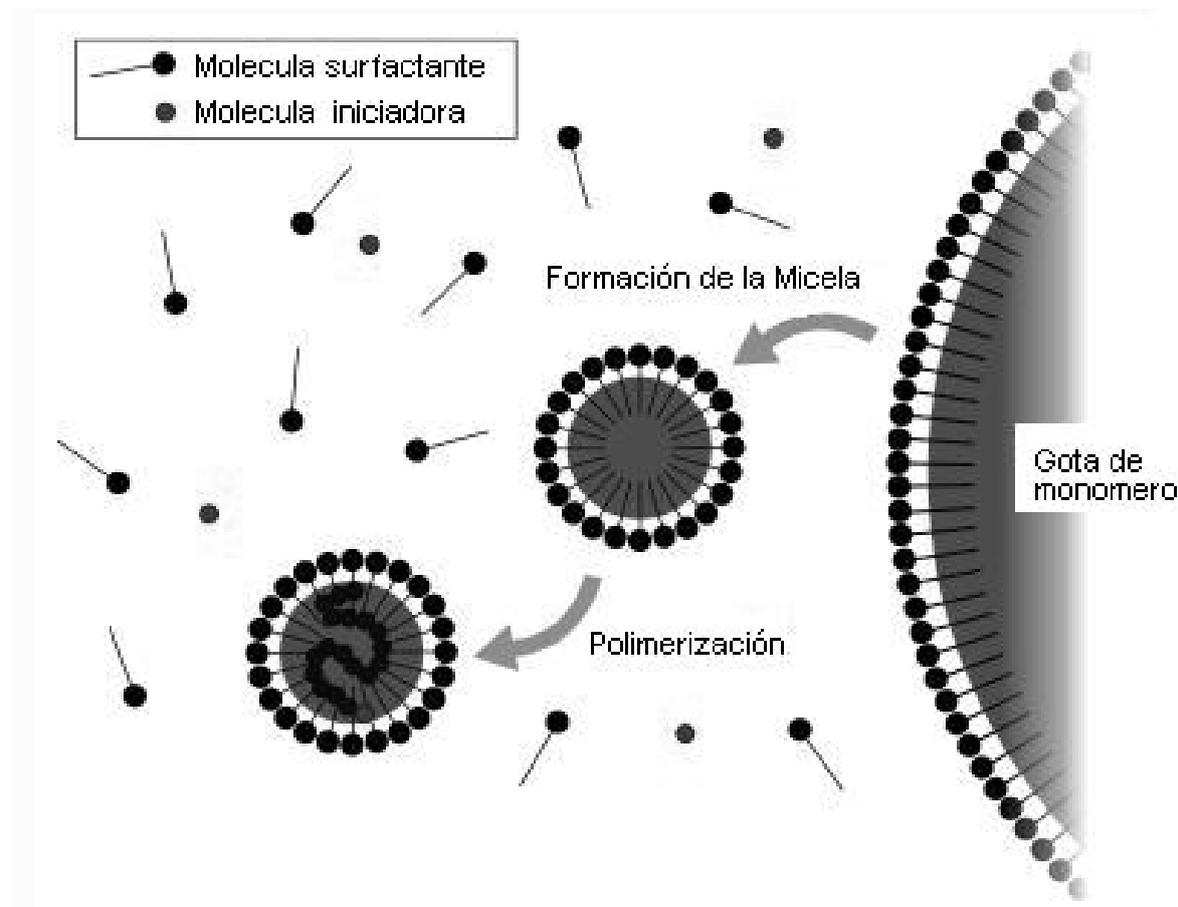


Figura 6. Representación esquemática de un sistema de polimerización en emulsión.

La polimerización en emulsión tiene una alta velocidad de reacción y conversión, siendo de fácil control de agitación y temperatura. Los polímeros obtenidos con esta técnica presentan altos pesos moleculares, mas su purificación es difícil, por la cantidad de aditivos agregados. Sin embargo esta técnica tiene gran importancia industrial y es muy empleada en poli adiciones.^{5,6}

Las dos diferencias entre las polimerizaciones en emulsión y suspensión son:

- Una polimerización por suspensión es un proceso mecánico, y el uso de un estabilizante para formar las partículas no es necesario.
- La polimerización por emulsión es un proceso químico donde se requiere un surfactante para que el monómero emulsifique.

En la siguiente tabla se hace una comparación de las características de las polimerizaciones en bulk, solución, suspensión y emulsión.

Tabla 1. Comparación de los sistemas de polimerización⁶

Tipo	Ventajas	Desventajas
Bulk	<ul style="list-style-type: none"> - Alto grado de pureza - Requiere equipos sencillos 	<ul style="list-style-type: none"> - Control de Temperatura difícil - Distribución de peso molecular amplio
Solución	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil control de la temperatura. - La disolución polimérica formada puede ser utilizada directamente. 	<ul style="list-style-type: none"> - El disolvente causa reducción en el peso molecular y en la velocidad de reacción. - Dificultades en la extracción del disolvente.
Emulsión	<ul style="list-style-type: none"> - Polimerización rápida. - Obtención de polímeros con alto peso molecular. - Fácil control de la temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contaminación del polímero con agente emulsificantes y agua
Suspensión	<ul style="list-style-type: none"> - Control fácil de temperatura. - Obtención de polímero en forma de perlas 	<ul style="list-style-type: none"> -Contaminación del polímero por estabilizadores y agua - Requiere agitación continua.

En la tabla 2, se muestran la diferencia entre los polímeros obtenidos en solución y dispersión que son los sistemas que se tomaron en cuenta para el estudio.

Tabla 2. Características de los polímeros obtenidos en los sistemas de solución y suspensión.²⁰

Rasgos	Polímero en solución	Polímero en Suspensión
Apariencia	Claro	Opaco
Carácter	Macromoléculas enrolladas y estiradas	Partículas discretas consistentes de macromoléculas enrolladas
Peso molecular	< 20 000	> 100 000
Tamaño de partícula	< 0.01 μm	> 0.1 μm
Viscosidad	Alta, dependiente del peso molecular	Baja, independientemente del peso molecular
Contenido de sólidos	Relativamente bajo	Alto

VI.3.2.-Polimerización por apertura del anillo (PAA)

Esta síntesis es la más asistida para la producción de poliésteres, esta se basa en el uso de lactonas que permite acceder a poliésteres alifáticos, la apertura del anillo se da gracias a un catalizador que abre el anillo y desencadena la reacción de polimerización. Algunos ejemplos de lactonas que han sido utilizadas para sintetizar polímeros biodegradables por medio de este sistema son: ϵ -caprolactona, δ -valerolactona, glicolido, ac. Láctido (figura 7) etc.²¹

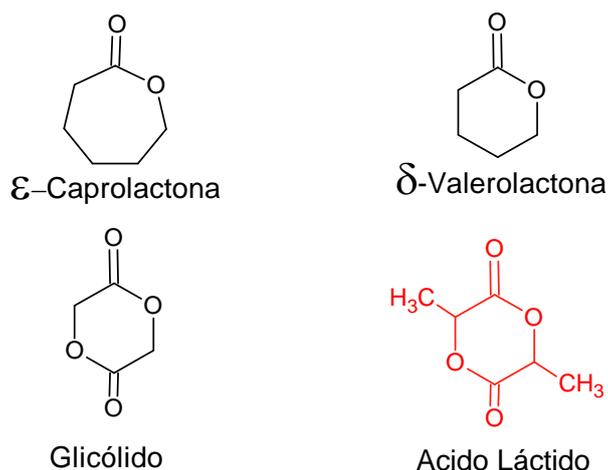


Figura 7. Monómeros utilizados para las síntesis de polímeros por la apertura del anillo.

Este tipo de síntesis generalmente conlleva el uso de iniciadores catiónicos, aniónicos y coordinados o en nuestro caso por vía enzimática. El PLA actualmente es sintetizado por este sistema utilizando una catálisis catiónica (figura 8), obteniendo rendimientos y pesos moleculares altos.

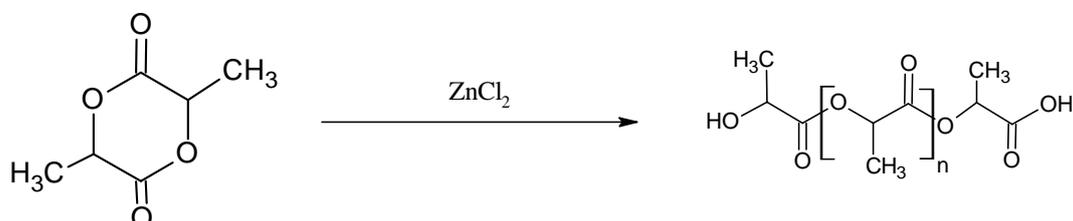


Figura 8. Síntesis vía catiónica del PLA

El mecanismo de este tipo de reacciones (figura 9) consiste en la formación de un complejo con zinc abriéndose el anillo y formándose un carbocatión carbonilo, que será atacado por un oxígeno de heterociclo de otra molécula de láctido formándose un enlace éster y originando nuevamente otro carbocatión desencadenando así la reacción de polimerización.²²

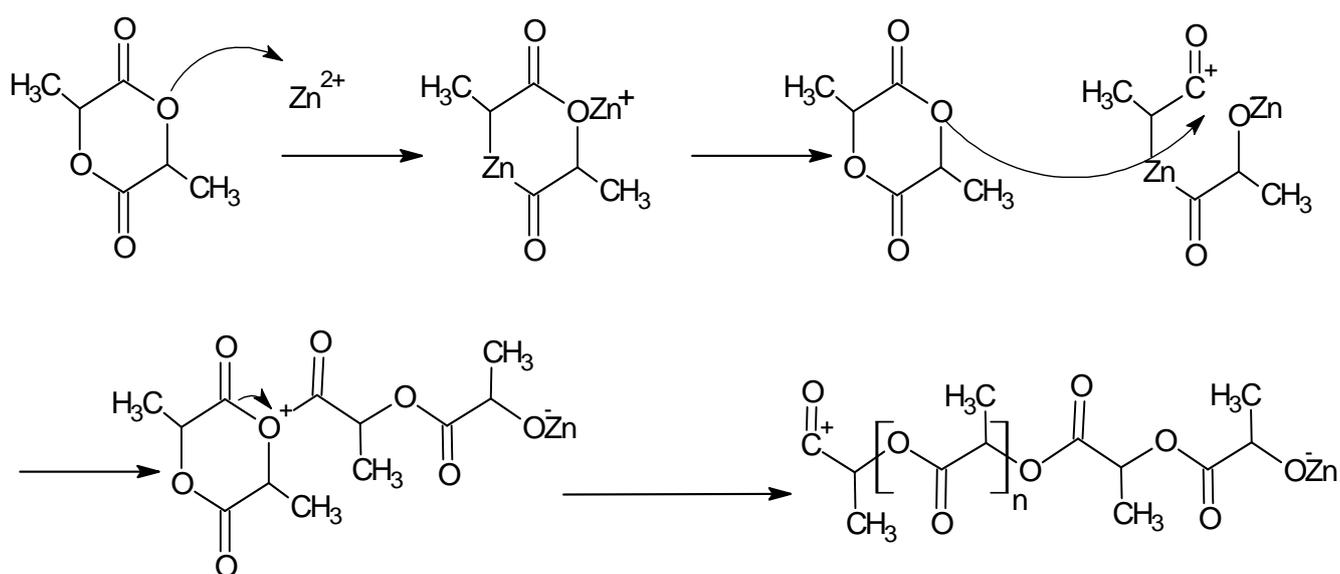


Figura 9. Mecanismo síntesis inorgánica de PLA

VI.3.2.1 Mecanismo Enzimático por esterificación.

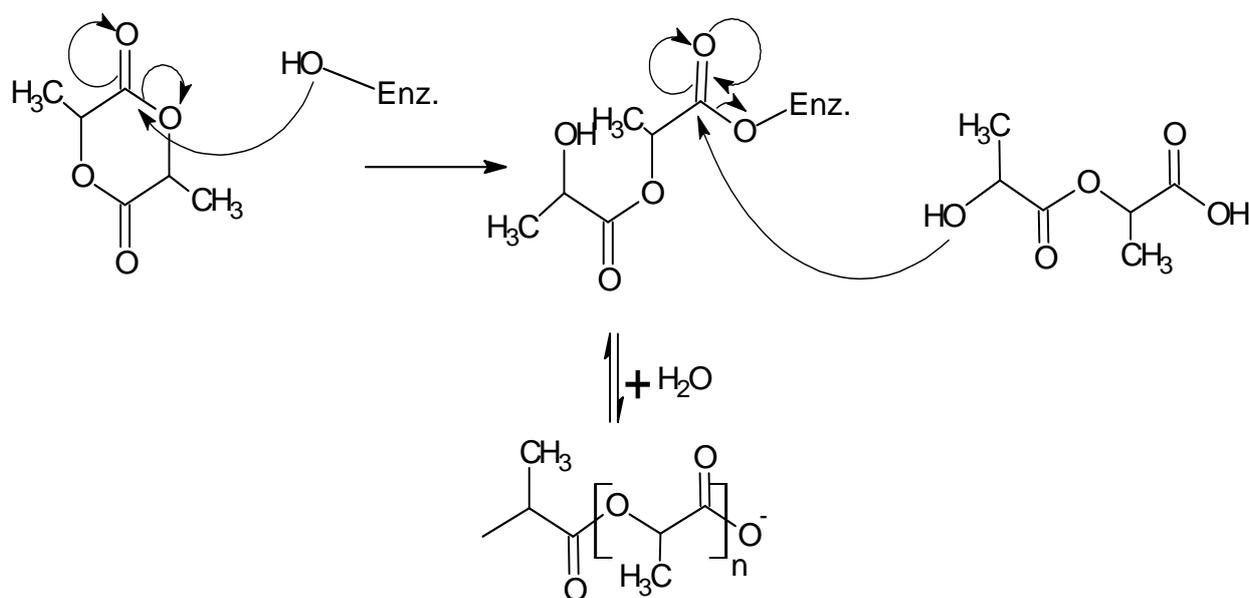
Las lipasas en su sitio activo poseen un residuo aminoácido de serina, que mediante un mecanismo donde interviene una molécula de agua hay una desprotonación del grupo OH del residuo del aminoácido formándose un anión $R-O^-$ nucleofílico el cual ataca al carbonilo del anillo del lactido abriendo el ciclo (figura 10).

Una vez abierto el grupo hidroxilo del ácido láctido puede incluir un ataque nucleofílico al carbonilo de un complejo acil-enzima, formándose el enlace éster e iniciando la polimerización (figura 10). Cabe mencionar que este es un mecanismo dinámico en cuanto a la acción de agua, para que se lleve a cabo la reacción de apertura del anillo esta se vería favorecida a altos contenidos de agua, y también altos contenidos de agua favorecerían las sucesivas formaciones de hidroxiácidos y regeneración de la enzima. Sin embargo, en las sucesivas poli-transesterificaciones, es decir el crecimiento de la cadena por condensación se produce moléculas de agua

y de forma contraria, la acumulación de moléculas de agua favorece la reacción inversa, es decir la hidrólisis del polímero.

Figura 10. Polimerización vía enzimática por esterificación.

Reportes previos basados en la síntesis enzimática de poliésteres indican que bajos contenidos de agua dan grupos o poliésteres de mayor peso molecular.⁷



VI.3.2.2. Polimerización enzimática y uso de Lipasas.

La polimerización enzimática se ha ganado una importancia considerable en los últimos años como un nuevo método de síntesis de polímeros, ya que con ayuda de las enzimas podemos obtener materiales poliméricos difíciles de obtener con los métodos convencionales que son hostiles con el ambiente, gracias a su especificidad.²³

Hay dos tipos de polímeros y poliésteres, que se han realizado por polimerizaciones enzimáticas in vitro. Los poliésteres alifáticos se han estudiado muy extensamente desde el primer reporte de polimerización

enzimática de lactonas, por apertura de anillo por Uyama y Kobayashi²⁴
25.

En estos estudios, algunas lipasas fueron usadas para la polimerización, la lipasa B de CA (lipasa extraída de la levadura *Candida Antarctica*) es conocida por catalizar la polimerización enzimática de lactonas por apertura de anillo. La lipasa B de CA es inmovilizada por resinas de macro poros y comercialmente es conocida con el nombre de novozym 435, ya que de esta forma se logran obtener muchas ventajas en comparación con las enzimas libres como son: la posibilidad de reutilizar la enzima, una determinación mas rápida de la reaccione, bajos costos y una fácil separación de la enzima de la mezcla de productos y reactivos.¹² Los factores que afectan la actividad de las enzimas inmovilizadas son dos, sean estos la transferencia de masa y la estabilidad frente a diversas condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica. Otra lipasa que se ha reportado con éxito en la síntesis de poliésteres es la lipasa de *Burkholderia cepacia*, principalmente no inmovilizada.

La transferencia de masa se basa en la capacidad del sustrato para difundirse en el solvente que en este caso se trata del scCO₂ dentro de la superficie y los poros de la estructura de soporte de la enzima para así llevar acabo la catálisis. Dicha difusión se ve influenciada por el tamaño del poro de la estructura de soporte.

Tratándose de un medio no acuoso, la reacciones que se llevan a cabo no se ven influenciadas por el pH ni por la fuerza iónica, solo por la temperatura en cuanto a lo que se refiere con la actividad catalítica de la enzima. Al incrementar la temperatura, la rapidez de la esterificación se aumentará, pero si el incremento de temperatura es muy alto se reduce la rapidez de la reacción debido a una desnaturalización de la enzima, proceso que en ocasiones es irreversible. El rango óptimo de actividad de de las lipasas en general está aproximadamente en el rango de entre 30 y

70 °C. Las lipasas inmovilizadas resultan ser más resistentes a la desactivación térmica que las lipasas libres.

Estudios llevados a cabo para observar la actividad enzimática a diferentes temperaturas de la lipasa B obtenida de *C. antarctica* demostraron que esta enzima es capaz de llevar a cabo una esterificación entre el octadecanol y el esterato de palmitilo a temperaturas de hasta 130 °C por un largo periodo de tiempo con un máximo en la actividad catalítica a 65 °C ²⁶.

En el caso de la Novozym 435 para la síntesis de PLA en un medio libre de disolvente se demostró que esta enzima aun posee actividad a una temperatura de 100 °C. ¹²

VI.4. Efecto de la actividad acuosa (a_w) en la esterificación enzimática

La actividad acuosa es un parámetro usado para los alimentos, que está estrechamente ligado a su humedad, es por esa razón que lo usamos para determinar de alguna forma la humedad disponible en el medio de reacción. La actividad acuosa se define como la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento dado en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Se denomina por regla general como a_w .

Una definición más formal de la actividad acuosa, representada por a_w :

$$a_w = p / p_0$$

Donde p es la presión de vapor de agua en la sustancia o matriz, y p_0 es la presión de vapor del agua pura.

Relación entre a_w y Humedad relativa (RH):

$$RH = a_w \times 100\%$$

La esterificación catalizada por lipasas en solventes orgánicos, es una reacción donde el agua juega un papel crucial. Una mínima concentración de agua es necesaria para que la enzima asegure su conformación y actividad óptimas. Pero un exceso de agua disminuye la actividad catalítica desde el punto de vista cinético y termodinámico. Para que una lipasa catalice una reacción de esterificación es necesario que el medio contenga poca cantidad de agua, se requieren contenidos de agua por debajo del 1% para llevar a cabo una reacción de esterificación efectiva, por arriba de este porcentaje la enzima tiende a catalizar la reacción inversa, es decir hidroliza los enlaces éster o lactónicos. El nivel óptimo de hidratación depende de cada enzima, se ha demostrado que para una lipasa inmovilizada, la liposima, valores de hidratación del soporte enzimático de 8-10/100 (g/g de soporte enzimático seco que corresponde a una a_w de 0.5) es el óptimo para la esterificación de ácido oleico por etanol en n-hexano y en dióxido de carbono en estado supercrítico²⁷. Si sumamos que el agua es un producto de la reacción de esterificación y que su acumulación en el solvente causa variaciones como el progreso de la reacción, afectando no solo a la actividad enzimática, también el equilibrio termodinámico de la reacción.²⁷

VI.5. Fluidos supercríticos (FSCs) una ruta limpia para la síntesis de polímeros.

Los Fluidos Supercríticos.

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperatura críticas, alcanza el estado supercrítico. En este estado, la línea de separación de fases líquido-gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas: así pues, mientras se mantiene una gran difusividad (propia de los gases), se consigue una alta densidad y solvatación (cercana a la de los líquidos).²⁸

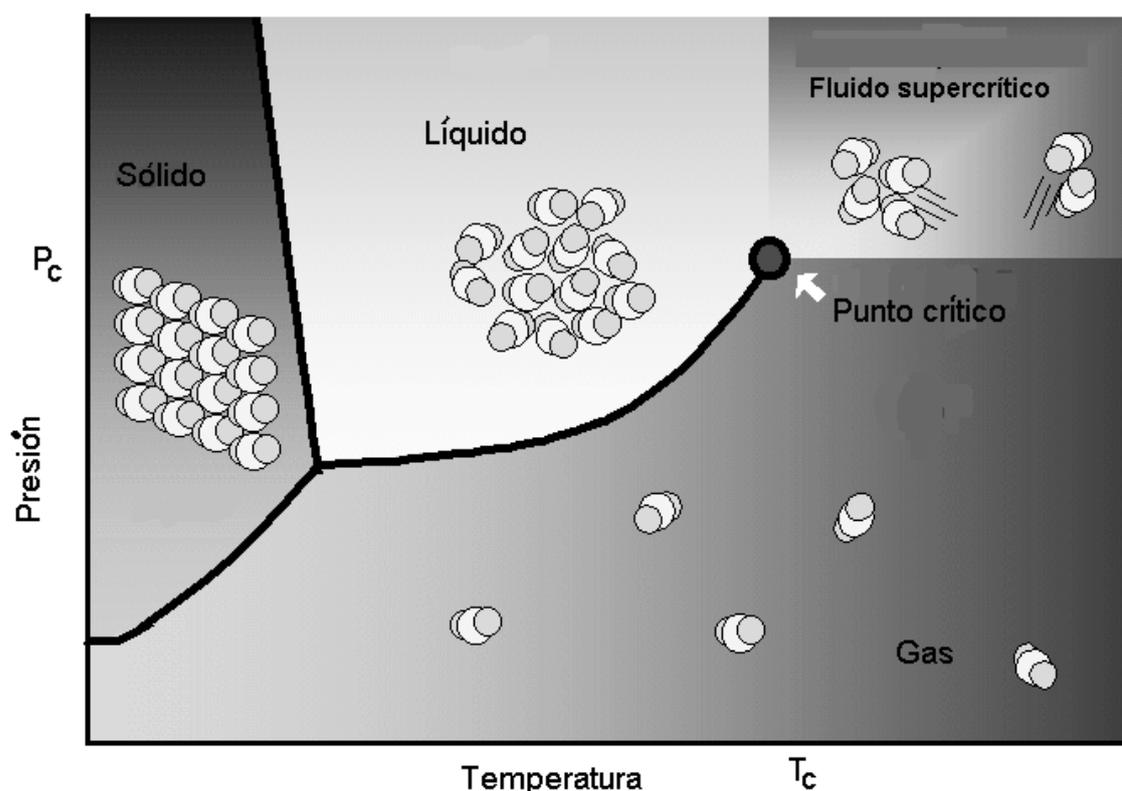


Figura 11. Diagrama de fases para un fluido supercrítico

Tabla 3. Valores típicos para los fluidos supercríticos (FSC)

Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (kg/m^3)	1	100-800	1000
Viscosidad (cP)	0.01	0.05-0.1	0.5-1.0
Difusividad (mm^2/s)	1-10	0.01-0.1	0.001

Al igual que los gases, la densidad de los FSC varía enormemente con la presión y la temperatura, aunque se alcanzan densidades muy cercanas a las de los líquidos. De esta forma, la propiedad más característica de los fluidos supercríticos es el amplio rango de densidades que pueden adoptar dependiendo de las condiciones de presión y/o temperatura (a diferencia de los líquidos que son prácticamente incompresibles y de los gases que poseen densidades siempre muy bajas). Figura 12.

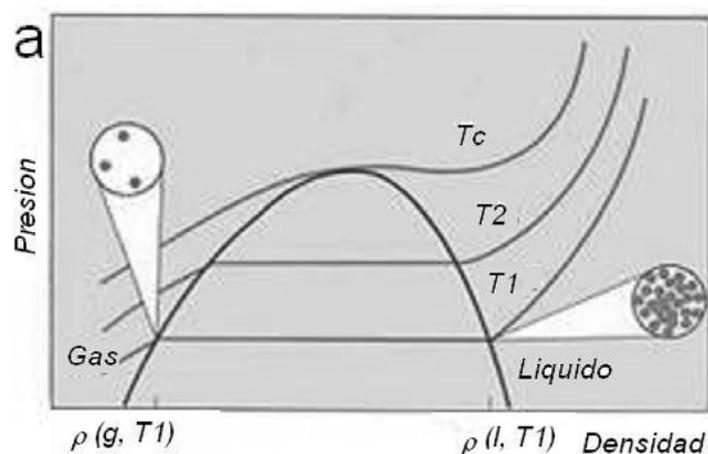


Figura 12 a). *Isotermas que indican cómo varía su densidad con la presión de un fluido. Vemos que por encima del punto crítico existe una sola fase, y que para densidades altas (lado derecho) la curva se mantiene muy plana, lo que implica grandes variaciones de densidad para pequeños incrementos de presión.*

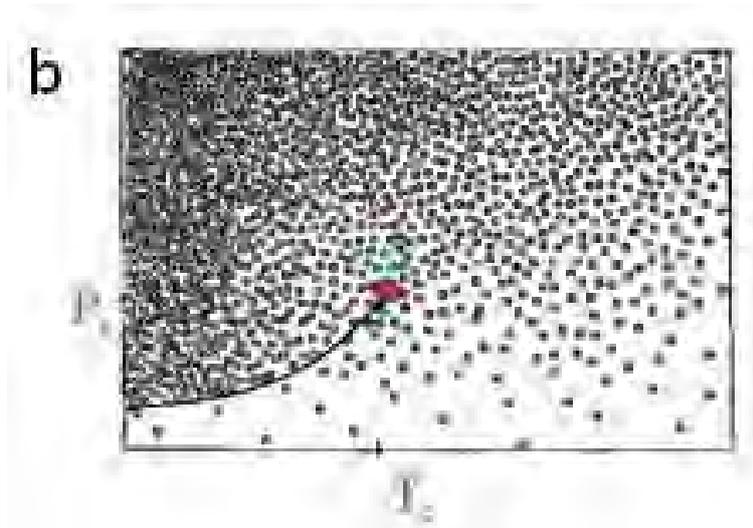


Figura 12 b) Representación gráfica de la densidad de un fluido. A través de la línea de transición líquido-gas el cambio de densidad es abrupto. Cerca de la temperatura crítica, desaparece esa transición y se puede variar de forma continua la densidad en función de la presión.

Teniendo en cuenta estas características, los FSC se convierten en disolventes ideales puesto que su enorme difusividad les permite penetrar perfectamente a través de matrices porosas y su capacidad de solvatación modulable les permite una gran versatilidad y selectividad según las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan. Sus aplicaciones principales son:

- Extracción (especialmente de productos naturales): no deja residuos, se obtienen extractos de alta pureza y no requiere altas temperaturas
- Precipitación: obtención de cristales con morfología muy uniforme, alta pureza y libres de residuos de disolvente
- Medio de reacción: la existencia de una sola fase permite una óptima transferencia de masa y de energía.

Recientemente la búsqueda de solventes alternativos a los usados convencionalmente se ha optado por usar a los fluidos supercríticos ya

que representan un medio atractivo para llevar a cabo reacciones de biocatálisis. Muchos beneficios se pueden esperar al usar este medio.²⁹ Por ejemplo la resistencia de la transferencia de masa entre la mezcla de reacción y los sitios activos en las enzimas se ven reducidos si el reactante esta disuelto en FSC. Adicionalmente la densidad de un FSC es muy sensible a cambios de temperatura y presión, con esto se alteran otras propiedades del solvente, como la constante dieléctrica, la solubilidad y el coeficiente de partición, por lo tanto, es muy posible controlar el ambiente de la reacción y también la actividad y especificidad de las enzimas con solo variaciones de presión y temperatura.³⁰

Tabla 4. Propiedades críticas de diferentes fluidos. El CO₂ y el H₂O como los más estudiados

Fluido	Temperatura Crítica [°C]	Presión Crítica [bar]	Densidad Crítica [kg/m ³]
Etileno	9.3	50.4	220
Xenón	16.6	58.4	120
Dióxido de Carbono	31.1	73.8	470
Etano	32.2	48.8	200
Óxido Nitroso	36.5	71.7	450
Propano	96.7	42.5	220
Amoníaco	132.5	112.8	240
I-Propanol	235.2	47.6	270
Metanol	239.5	81.0	270
Agua	374.2	220.5	320
Tolueno	318.6	41.1	290

Últimamente ha crecido el interés en el desarrollo de scCO₂ como un solvente para polimerizaciones por dispersión. scCO₂ es un solvente versátil, aceptable ambientalmente y como una ruta viable para disminuir los residuos de disolventes tóxicos, El uso de dióxido de carbono en estado supercrítico (scCO₂) ha tenido una atracción particular por las siguientes razones³¹:

- CO₂ no es tóxico, no inflamable, químicamente inerte y económico.
- Las condiciones supercríticas son fáciles de obtener: T_c (CO₂) = 31.1 °C; P_c (CO₂) = 73.8 bar
- El solvente puede removerse con una simple despresurización.
- La densidad del solvente puede ser modificada con simples variaciones de presión.
- Varios polímeros se hacen más esponjosos y plastificados en la presencia de CO₂

En cuanto al uso de scCO₂ para la polimerización del L-láctido, Stassin y Jerome³² reportan que la solubilidad del LA en scCO₂ es de 6.15 w/vol% de Láctido a 333 °K en una presión de 216 bar, para así formar una solución. En sus experimentos se demostró que la cinética de la polimerización de LA fue llevada a 343 K y 290-300 bar. La concentración de LA fue de 1.39M (20 w/vol%) a 343 K que es la temperatura de fusión del LA, bajo estas condiciones y basados en diagramas de fase, la solubilidad que determinaron para el LA era aproximadamente de **0.67M**, lo cual significaba que solo el 48% del LA estaba disuelto en scCO₂, mientras que el exceso formaba las partículas de monómero fundido, a lo que Hide y Pishko llamaron una polimerización tipo emulsión, mientras que Bratton y Howdle se refieren a esta como una polimerización en suspensión.³³

VI.6. Caracterización.

VI.6.1. Determinación de peso molecular

Uno de los parámetros a comparar en este trabajo es la variación del peso molecular de acuerdo al medio de reacción y variables que se modificaron para la polimerización de PLA, que como ya fue revisado, el medio en el que se lleva a cabo la reacción y la modificación de parámetros, influyen en las características del producto final.

El método más utilizado para determinar la distribución de pesos moleculares y pesos moleculares promedio es la cromatografía de permeación en gel (GPC), también conocida como cromatografía de exclusión de tamaño. El principio de este método se basa en la separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño molecular en solución en función del volumen hidrodinámico de las mismas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Las muestras perfectamente disueltas se inyectan en una columna, la cual en su interior está empacada con materiales porosos de distinto tamaño de poro, según el rango de dimensiones de las partículas del material que pase a través de la misma por efecto de una fase móvil (disolvente).

El tamaño de las cadenas del polímero, es el principio por el cual se rige el sistema, pues al tratarse de cadenas pequeñas, estas se alojarán en los poros del material de empaque, por lo tanto, el tiempo que tardan en recorrer la columna será mayor, entonces se trata de una relación inversamente proporcional, en la cual mientras más pequeña sea la molécula más tiempo tardará en salir de la columna y en caso de ser moléculas grandes el tiempo de salida será menor, es decir las columnas son selectivas en relación al tamaño y por consiguiente al peso molecular. Mas que por el peso de las moléculas, la separación está precisamente basada en el volumen hidrodinámico de las moléculas, que es el tamaño

resultante de las cadenas en solución, ya que las moléculas del polímero se encuentran solvatadas por el solvente lo que provoca que las moléculas pequeñas difunden a través de los poros del gel y las mas grandes difunden deficientemente y salen primero.

La mayoría de las columnas utilizadas en polímeros no acuosos como empaques de partículas de gel de poliestireno – divinilbenceno entrecruzado las cuales funcionan para separar polímeros con pesos moleculares entre 10^3 y 10^7 . Acoplado al GPC se requiere un detector para monitorear continuamente la concentración de las moléculas de soluto en el disolvente y permitir así el análisis de los constituyentes en el compuesto. Los tipos mas comunes de detectores son el diferencial del índice de refracción y el de espectroscopia de ultravioleta-visible o viscosímetro, y seguido de este se encuentra un integrador para calcular la curva de distribución.

El GPC no proporciona valores absolutos de peso molecular, si no valores relacionados con estándares de polímeros de pesos moleculares conocidos y polidispersidad muy estrecha, los cuales son analizados bajo las mismas condiciones (columna solvente y temperatura), para así realizar una curva patrón donde los datos serán comparados, esta es una de las limitaciones de este método, ya que solo tiene muy pocos estándares. Los estándares más usados son de poliestireno o polimetacrilato.

A partir de entonces los pesos moleculares se realizan los siguientes cálculos para la interpretación. El peso molecular promedio M_n , se calcula dividiendo la suma de los valores de los pesos moleculares individuales por el número de moléculas que se expresan como:

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

El peso molecular promedio en peso, M_w , es determinado por medio de experimentos en los que cada molécula contribuye a la media final de acuerdo a su tamaño. Este valor es más sensible al número de moléculas pesadas y se expresa como:

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

La relación M_w/M_n es una medida de la polidispersidad (PDI) de las especies poliméricas en la muestra y consecuentemente también se correlaciona con las prioridades de los polímeros.

VI.6.2. RMN

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es un importante método para la caracterización de materiales y para determinar la composición de los materiales poliméricos. Esta técnica tiene la peculiaridad de que las señales que brinda pueden asignarse a átomos específicos a lo largo de la cadena del polímero. Dichas señales dependen del ambiente magnético de los núcleos activos y de los campos locales que estos experimentan. Dado que el espectro de RMN es determinado por fuerzas locales, este método provee información única e invaluable para los polímeros a una escala atómica.

La sensibilidad del RMN depende del radio giro magnético y de la abundancia natural del núcleo activo. Sin embargo, a pesar de la baja abundancia de sus isótopos detectables por RMN, los núcleos como el carbono, silicio y fósforo son ampliamente estudiados. Los parámetros espectrales de la RMN proveen información detallada para la caracterización de polímeros. Son de importancia primaria la frecuencia (o

cambio químico) intensidad, ancho de la línea, constante de acoplamiento (J) y rapidez de relajación.

La RMN en solución para ^1H y ^{13}C es una de las herramientas más usadas para la caracterización de materiales. La importancia de este método es debido a la extrema sensibilidad de las señales de RMN con pequeños cambios en la estructura química de los polímeros, tal como aquellos que surgen de la estereoquímica, defectos y otros tipos de microestructura de polímeros. La resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN nos dará la información de la estructura del polímero con base a los hidrógenos que lo componen. Por medio de este método sabremos la capacidad de transformación de monómero a polímero. La presencia del LA en el polímero se puede observar mediante la señal cuadruplete a 5 ppm correspondiente al hidrógeno anular y a un doblete a 1.4 ppm correspondiente a los hidrógenos extranulares en los grupos metilo.

VI.6.3. Cristalografía de difracción de rayos X.

La cristalografía de rayos X es una técnica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través del material que se somete a estudio. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, aplicando la ley de Bragg. Sus mayores limitaciones se deben a la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos, por lo que no es aplicable a disoluciones, a sistemas biológicos *in vivo*, a sistemas amorfos o a gases. Es posible trabajar con monocristales o con polvo microcristalino, consiguiéndose diferentes datos en ambos casos. Para la resolución de los parámetros de la celda unidad puede ser suficiente la difracción de rayos X en polvo, mientras que para una elucidación precisa de las posiciones atómicas es conveniente la difracción de rayos X en monocristal. El fenómeno de difracción es debido esencialmente a la relación de fases entre dos o más

ondas. Las diferencias de camino óptico conducen a diferencias de fase que a su vez producen un cambio en la amplitud. Cuando dos ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí, ya sea porque sus vectores sean cero o porque estos sean igual en magnitud pero en sentido contrario. Por el contrario, cuando dos ondas están en fase, la diferencia de sus caminos ópticos es cero o un número entero de la longitud de onda. Cuando consideramos la difracción de rayos x monocromáticos y paralelos en estructuras ordenadas, existen diferencias de camino óptico. Esto sucede por dispersión y no por alguna interacción entre los rayos x y los átomos de las estructuras. La difracción de rayos x es descrita completamente por la Ley de Bragg.

La difracción de rayos x ocurre sólo cuando la longitud de onda es del mismo orden que los centros de dispersión. Así, para estas ondas electromagnéticas se necesitan rejillas de dispersión del orden de Å. Sólo en la naturaleza y, en particular, en las separaciones interatómicas se encuentran estas distancias. Lo anterior se deduce de la ley de Bragg.

Se debe cumplir que $\text{sen}(\theta)$ sea menor que uno entonces se tiene que

$$\frac{n\lambda}{2d} = \text{sen}(\theta) < 1$$

Donde:

n = entero que denota el orden de fracción.

λ = longitud de onda de la radiación.

θ = espaciamiento entre planos de átomos que provocan reflexión.

Por consiguiente $n\lambda$ debe ser menor que $2d$. Para el primer máximo de difracción $n=1$ y se debe cumplir para que haya difracción que $\lambda < 2d$

VI.6.4. Difracción de Rayos X en polvo

El cristal a analizar es reducido a polvo de tal manera que forme un conjunto de pequeños cristales. Si se tuviese un cristal y en él se hiciera incidir un haz monocromático, el haz se difractaría a un ángulo en particular. Al hacer girar este cristal de 0° a 360° , el haz formará un cono cuyo eje coincide con el del haz incidente. El interés de este método en tomar varios cristales, es formar este cono con las distintas orientaciones posibles de los diversos cristales

VI.6.5. ANÁLISIS TÉRMICOS

La calorimetría diferencia de barrido, es una técnica termo analítica en la que la diferencia de calor entre la muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. En esta la muestra y la referencia son mantenidas aproximadamente a la misma temperatura. Generalmente la temperatura aumenta linealmente en función el tiempo, la referencia debe contar con una capacidad calorífica bien definida en el intervalo de temperaturas que vaya a tener lugar el barrido

El principio básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico o endotérmico. Por ejemplo, en tanto que una muestra sólida funde a líquida se requerirá que fluya más calor a la muestra para aumentar su temperatura a la misma velocidad que la de referencia. Esto se debe a la absorción de calor de la muestra en tanto ésta experimenta la transición de fase endotérmica desde sólido a líquido. Por el contrario, cuando la muestra experimenta procesos exotérmicos (tales como una cristalización) se requiere menos calor para alcanzar la temperatura de la muestra. Determinando la

diferencia de flujo calorífico entre la muestra y la referencia, los calorímetros DSC son capaces de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado durante tales transiciones.

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 314 del departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química (UNAM). Se llevo a cabo el estudio de las cinéticas de reacción para la síntesis de PLA en CO₂ en estado supercrítico, en los medios de reacción: emulsión y disolución.

VII.1. Materiales y Equipos Utilizados.

- Balanza analítica. Balanza OHAUS Analytic Plus.
- Reactores imitación Parr de 100 y 40 ml, con orificios para termopares y equipado con barómetros para verificar la presión.
- Bomba de inyección de alta presión (ISCO corp. modelo 100X).
- Chaqueta de calentamiento conectados una caja reguladora y verificadora de temperatura.
- Higrómetro Rotronic Instrument Corp. Aw Quick
- Bomba de vacío, para solventes orgánicos
- Bomba de vacío.

VII.2. Reactivos Utilizados.

- (L,L) Lactido (3S, (cis)-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona, (99% Sigma Aldrich), purificado por medio de recristalización en metanol.
- Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada, Novozym 435, (Novozymes México SA de CV)
- Dióxido de Carbono grado analítico 3 ppm de agua, Praxair
- Hexano grado industrial
- Metanol grado industrial
- Cloroformo grado industrial
- Dimetilsulfoxido (DMSO), extra puro grado cromatográfico
- Acetato de etilo.

VII.3. Procedimiento

VII.3.1. Estudio de la cinética de la polimerización enzimática del L-Láctido en $scCO_2$ en medio de baja humedad $a_w < 0.16$.

Con base a estudios previos la cinética se evaluó en un transcurso de 7 días, para cada uno de los sistemas a evaluar.

Para establecer las condiciones de cada sistema fue necesario el uso de reactores de acero inoxidable capaces de resistir 300 bares de presión y a 65 °C, condiciones a las cuales se trabajó.

**A****B**

Imagen 1. Inyectores de CO_2 de alta presión (A). Cajas controladoras de temperatura (B)

Se trabajaron dos condiciones inicialmente y se utilizaron distintas concentraciones de LA, 20 % p/v, con el que se logró un sistema tipo emulsión y 9.6 % p/v en el cual el monómero está totalmente disuelto en el medio de CO_2 . La cantidad de enzima utilizada para ambas reacciones corresponde al 10 % p_{Novo}/p_{LA} . Para estos ensayos tanto la enzima como el LA se secaron al vacío para tener una humedad correspondiente a una $a_w < 0.16$. Ya limpio el reactor y con el monómero y la enzima secos, se inyectó el CO_2 a alta presión con ayuda de una bomba se ajustó la

temperatura con un regulador y se inició a la reacción con agitación continua.



Imagen II. Reactor de acero inoxidable montado en la parrilla de agitación con la chaqueta de calentamiento, bajo condiciones de trabajo

VII.3.1.1. Recuperación y Purificación del polímero.

Al finalizar el tiempo programado para cada reacción, se suspendió el calentamiento apagando las cajas controladoras y retirando la chaqueta de calentamiento la presión del reactor fue disminuida mediante enfriamiento, primero al colocarlo en un cuarto frío a 5 °C y luego en un congelador por una hora o hasta que la presión que marca el barómetro baje a 50 o presión cercana a la atmosférica. Después de esta operación, se libero algo de presión abriendo las llaves del reactor, posteriormente se aflojaron los tornillos y se desmontó el equipo.

El LA no reaccionado y enzima se recolectó del interior del reactor. Para separar la enzima de la mezcla monómero-polímero, se agregó cloroformo para disolver el LA y se filtro en un tamiz de malla (80 micras), realizando así tres lavados de la enzima. El filtrado se vertió en un volumen 1:10 de hexano grado industrial. Para llevar a cabo la precipitación de la mezcla

monómero-polímero, ésta se filtro nuevamente en un equipo Millipore con membranas de 0.5 μm , y posteriormente el producto se secó durante 3 horas en una bomba de vacío. Una muestra de este precipitado seco, se tomo para su análisis de RMN.

Para retirar el LA del PLA, se disolvió la mezcla en 50 ml de cloroformo en agitación, posteriormente la mezcla disuelta se vació en un volumen 1:10 de metanol, para precipitar el polímero, el cual se filtró una vez mas en el equipo Millipore y secado en la bomba de vacío. Una muestra se tomó para RMN, el producto final fue pesado y se calcularon los rendimientos correspondientes para cada experimento.

El rendimiento para cada experimento se calculó, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M_{\text{polimero}}}{M_{\text{monomero}}} \times 100$$

Donde:

$M_{\text{monómero}}$ = masa del L-Láctido inicial.

$M_{\text{polímero}}$ = masa del PLA obtenido.

VII.3.2. Estudio de la cinética de la polimerización enzimática del L-Láctido en scCO₂ en emulsión variando: Concentración de monómero (p/v) y humedad tanto del monómero como de la enzima.

Después de llevar a cabo el estudio de las cinéticas en los medios de emulsión y solución se determinó que el medio mas eficaz era el de emulsión, por lo que se tomó la decisión de evaluar la cinética en ese medio, modificando variables que tuvieran efecto en los rendimientos de la misma. Estos parámetros fueron la humedad del medio de reacción y la concentración inicial del monómero.

Para este estudio se empleó la reacción del 20 % p/v del monómero respecto al volumen del reactor, mientras que la enzima se siguió utilizando en las proporciones ya mencionadas (10 % p/p) , por lo que para este caso se peso 12 gramos de LA.

El procedimiento que se realizó fue exactamente el mismo que para los experimentos pasados.

Para evaluar el efecto de la humedad en el sistema no se realizó un proceso de secado previo a iniciar la reacción. El a_w determinado para este sistema fue de 0.34.

VII.3.3. Caracterización del Polímero.

VII.3.3.2. Preparación de las muestras para análisis.

Cada una de las muestras colectadas para el análisis, tanto el precipitado en hexano como el precipitado en metanol, se secaron en la bomba de vacío, Una vez secos, se pulverizaron en un mortero y se pesaron 50 mg de cada una, se guardaron en viales etiquetados con la clave del

experimento correspondiente para su análisis en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM).

VII.3.3.3. Análisis por 1H RMN del polímero.

El material colectado de la precipitación con hexano y el polímero, ya etiquetado y pesado se envió a la USAI-UNAM par su análisis de RMN de protón.

Las muestras se disolvieron en DMSO (dimetil sulfoxido) deuterado para su análisis a una intensidad de 400MHz.

El análisis de los precipitados en hexano con este método ayudó a determinar el porcentaje de conversión del monómero a su forma abierta mediante la integración de las señales a 5.0 ppm, que corresponde al hidrógeno del metileno en la forma cíclica del monómero y a 5.2 ppm correspondiente al metileno de la forma abierta.

Los precipitados en metanol se analizaron para obtener la pureza del polímero.

I_0 = Integración de la señal a 2.5 ppm

I_1 = Integración de la señal a 5.2 ppm

$\%_{con}$ = porcentaje de conversión del monómero a forma abierta

$$\%_{con} = \frac{I_1}{I_0 + I_1}$$

VII.3.3.4. Análisis de rayos X

El polímero ya seco y purificado, se llevó a la USAI para su análisis en rayos X para obtener el porcentaje de cristalinidad de los polímeros obtenidos por el método que se califico como el mejor.

- El polímero ya pulverizado se analizó en un equipo Siemens D-5000, $K\alpha$ radiación de Cu a $\lambda = 1.5406$ Amstrongs.
- El porcentaje de cristalinidad fue obtenido en cada espectro integrando el área total de las zonas cristalinas.

La relación entre las señales producidas por la parte cristalina y el halo de dispersión de la fase amorfa, nos dan una determinación cuantitativa de cristales de la muestra analizada.

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

I_c = Intensidad de dispersión de la fase cristalina.

I_a = Intensidad de dispersión en la fase amorfa

a_{cr} = Cristalinidad

VII.3.3.5. Análisis térmico DSC (Calorimetría diferencial de barrido)

El polímero seco y purificado se pulverizó, se etiquetó y se llevó a la USAI para su análisis.

VII.3.3.6. Determinación del peso molecular por GPC (Cromatografía de permeación en gel).

El polímero seco y purificado (2 mg) se pulverizó y se disolvió en 5 mL de diclorometano grado HPLC para su determinación.

Condiciones de GPC: El equipo está compuesto de dos columnas PLGEL 10 cm MIXED-B 300 x 7.5 mm (VARIAN) montadas sobre una columna en un termostato a 333.15K con elusión de cloroformo a una velocidad de 1mL/min (333.15K) (AGIENT) y calibrado con estándares de poliestireno (P). El detector utilizado es un UV-visible (HP).

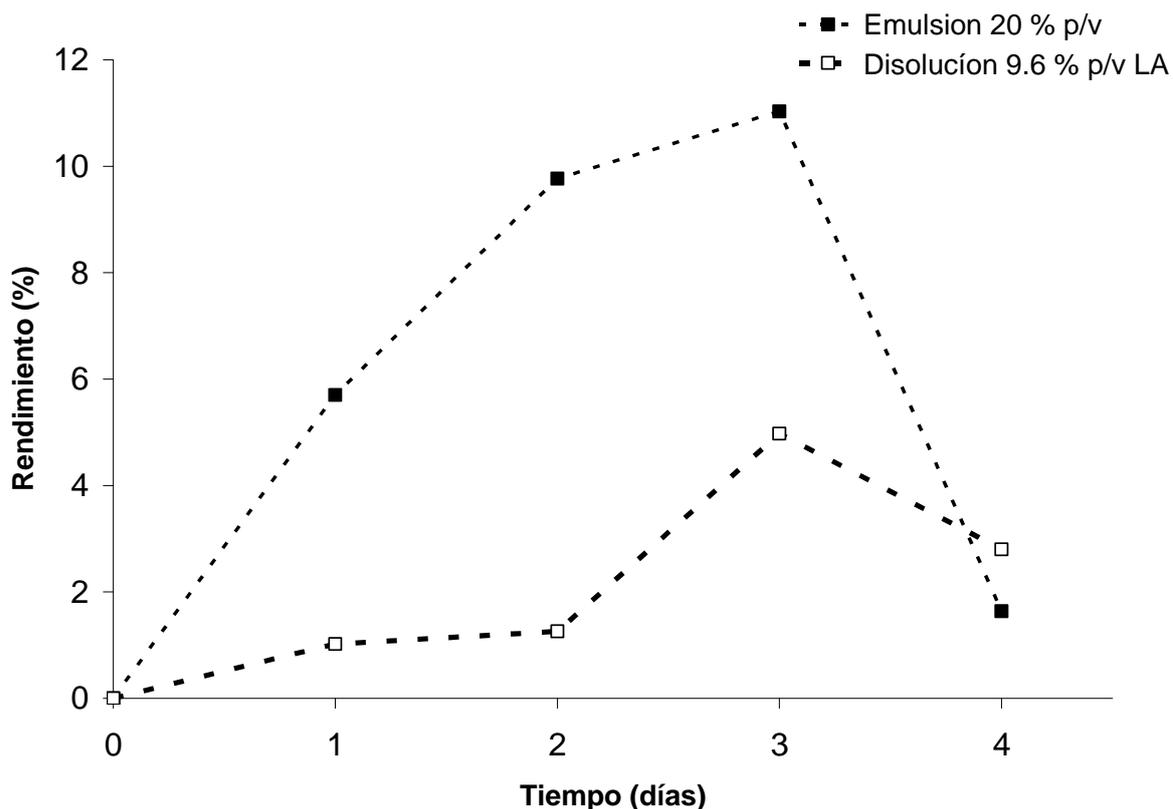
VIII. Discusión y Resultados.

VIII.1. Efecto del medio de reacción: Emulsión vs. Disolución.

El propósito de este estudio fue evaluar dos sistemas de reacción en condiciones secas, es decir con un $a_w < 0.16$, para ver cual de ellos es más adecuado para la polimerización por apertura de anillo del LA. Se obtuvieron dos sistemas uno en tipo emulsión y otro en solución, de acuerdo con trabajos previos de Stassin y Jerome⁷, nosotros nos referimos a un sistema de tipo emulsión al hecho de que en el medio se encuentra LA no disuelto, en condiciones de sobresaturación, pero debido a las condiciones de presión y temperatura, está en estado líquido no miscible en el CO₂ que debido a la agitación se encuentra disperso en forma de gotas para este caso al usar 20% $p_{LA}/V_{reactor}$ estamos muy por arriba de las condiciones normales con las que se alcanza este tipo de sistema esperando obtener mejores resultados al tener mas monómero en el medio. En el caso de disolución entendemos que el LA esta completamente disuelto en el medio con un 6.5 % $p_{LA}/V_{reactor}$. Como ya se mencionó ambas reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 65 °C y 300 Pa bajo condiciones supercríticas del CO₂. El efecto observado fue el rendimiento obtenido en cada una de las reacciones:

Figura 13. Cinética de polimerización de PLA, en los diferentes medios de emulsión y disolución.

	Emulsión (20 % LA/10% Enzima)	Disolución (9.6 % LA/10% Enzima)
1	5.7	1.022
2	9.77	1.26
3	11.03	4.976
4	1.64	2.8



Al observar (Figura 13), el gráfico comparativo para ambos sistemas, los rendimientos para el sistema de emulsión son mas grandes que los obtenidos para el sistema en disolución. Desde el primer día de reacción podemos observar que la pendiente que dibuja la curva del sistema de tipo emulsión nos dice que la velocidad de la reacción es mayor alcanzando rendimientos mucho mayores, aun así guardan cierta similitud en su comportamiento ya que ambas reacciones obtienen su mejor rendimiento al tercer día de reacción después del cual ambas presentan un decaimiento en los rendimientos muy notable. Esto podría deberse a que en el mecanismo de la reacción como ya se ha apuntado con anterioridad, se desprende agua, la cual además de modificar la acción enzimática, hidroliza los enlaces éster del PLA.

De antemano esperábamos que este sistema revelara mejores rendimientos en comparación con el sistema en solución, partiendo de la idea que el sistema en emulsión al estar sobresaturado para crear las

gotas de LA, vuelve mas disponible el monómero a la enzima favoreciendo el equilibrio hacia PLA. Además, en este sistema la enzima interactúa con el monómero disuelto como con el que forma las gotas de LA, es decir, la reacción se lleva a cabo en ambas fases.

El efecto que tienen ambos sistemas en los pesos moleculares en función del tiempo, se muestran a continuación:

Días	Mn (g/mol)		PDI	
	Emulsión (20 % LA/10% Enzima)	Disolución (9.6 % LA/10% Enzima)	Emulsión (20 % LA/10% Enzima)	Disolución (9.6 % LA/10% Enzima)
1	-	-	-	-
2	12008	3342	1.12	1.14
3	11182	10991	1.24	1.22
4	8384	8046	1.2	1.43

Si ponemos atención a la figura 14, se observan para ambos casos comportamientos distintos, ya que para el sistema de tipo-emulsión el mayor peso molecular se obtiene al segundo día de reacción, para después bajar gradualmente con el paso de los días. En cuanto al sistema en disolución tenemos un comportamiento creciente, es decir el peso molecular va incrementando con respecto a los días. Ahora bien, el incremento del peso molecular no guarda relación con los rendimientos para este sistema, mientras que en el caso de emulsión podemos encontrar ciertas similitudes. Por ejemplo, la velocidad de esta reacción es mayor, de aquí, que obtengamos en poco tiempo pesos moleculares mas altos, hasta llegar al rendimiento máximo, para después decaer en rendimiento y peso molecular, debido a la posible hidrólisis antes

comentada. En contraparte el sistema en disolución, al ser más lento, la enzima podría seguir enlazando las cadenas aun después de su rendimiento máximo.

En la figura 15, se analiza el índice de polidispersibilidad (PDI), para el sistema en emulsión. La tendencia va de la mano con el rendimiento y lo explicado anteriormente. Para el segundo día tenemos el mayor peso molecular por parte del sistema y la menor PDI, mientras que para los días siguientes la PDI es mayor con sus respectivos pesos moleculares menores, lo que sugiere la presencia de polímeros de diversos tamaños. En cuanto al sistema de disolución el efecto es distinto, ya que el PDI incrementa con respecto a los días de reacción.

A lo anterior podemos decir que mientras mas LA haya la reacción se lleva a cabo con mayor rapidez, se obtienen rendimientos mas altos y después de llegar al punto máximo la cantidad de agua formada es tal que empieza a romper las cadenas en polímeros y/u oligómeros.

Después de analizar estos resultados se determinó que el sistema que ofrece mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de polimerización es el de sistema tipo emulsión.

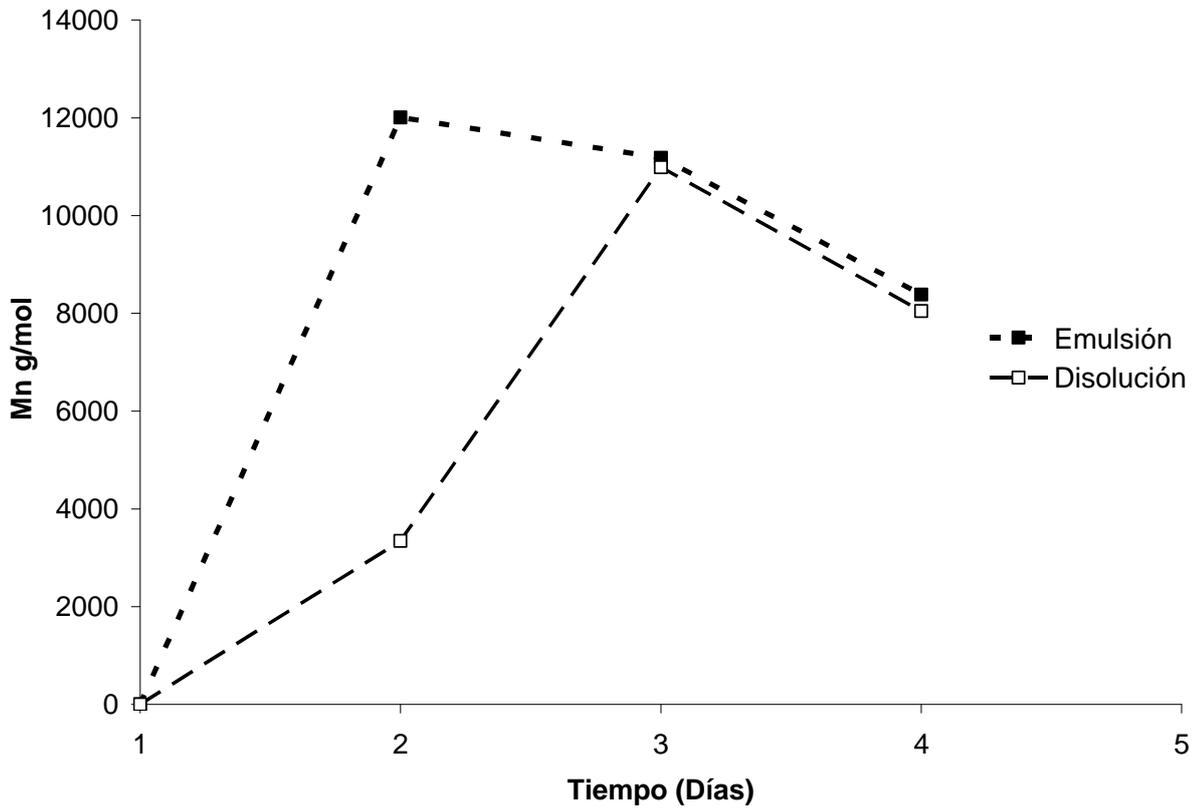


Figura 14. Efecto del sistema en los pesos moleculares del polímero,

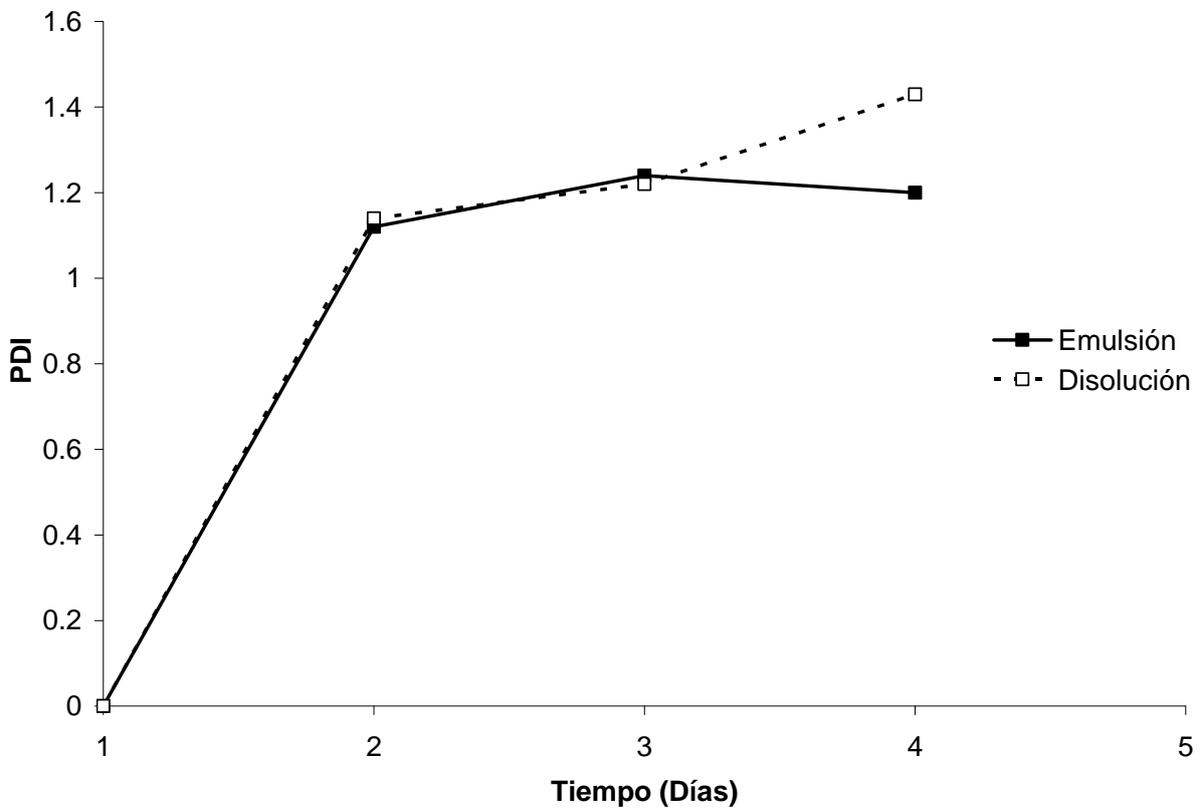


Figura 15. Efecto del sistema en la PDI

VIII.2. Efecto de la humedad inicial.

Este estudio se realizó debido a que se presentó una variabilidad de la actividad enzimática de acuerdo a la humedad en el sistema. Se acondicionó un sistema en tipo-emulsión donde la enzima y el LA se encontraran inicialmente con una actividad acuosa (a_w) de 0.34 y se comparó con los ensayos anteriores que podemos considerar como un sistema seco $a_w < 0.16$. Los resultados son los siguientes:

(20 % LA/10% Enzima)		(20 % LA/10% Enzima)	
Días	Humedad: $a_w < 0.16$ seco	Días	Humedad ambiental $a_w 0.34$
1	5.7	1	0.39
2	9.77	3	0.33
3	11.03	5	7.55
4	1.64	7	7.28
		9	3.8

Para este estudio fue necesario extender los días para la cinética del sistema a humedad ambiente hasta observar la tendencia observada en los experimentos anteriores. Como podemos observar en la figura 16, el máximo rendimiento para dicha condición se alcanza hasta el quinto día de reacción para después tener el ya conocido decaimiento de producto. El resultado de aumentar la humedad en el medio no fue favorable, ya que la tendencia que siguió la reacción al incrementar el contenido inicial de agua en el sistema, fue el de disminuir la velocidad y por consiguiente obtener el máximo rendimiento dos días después de obtener el máximo para su similar en condiciones iniciales secas. Además de ser este menor al presentado para la cinética a $a_w < 0.16$, como ya sabemos el sistema seco muestra mayor velocidad en la cinética de polimerización, por lo que podemos decir que entre más agua haya en el medio de reacción menor será el rendimiento y la cinética será más lenta.

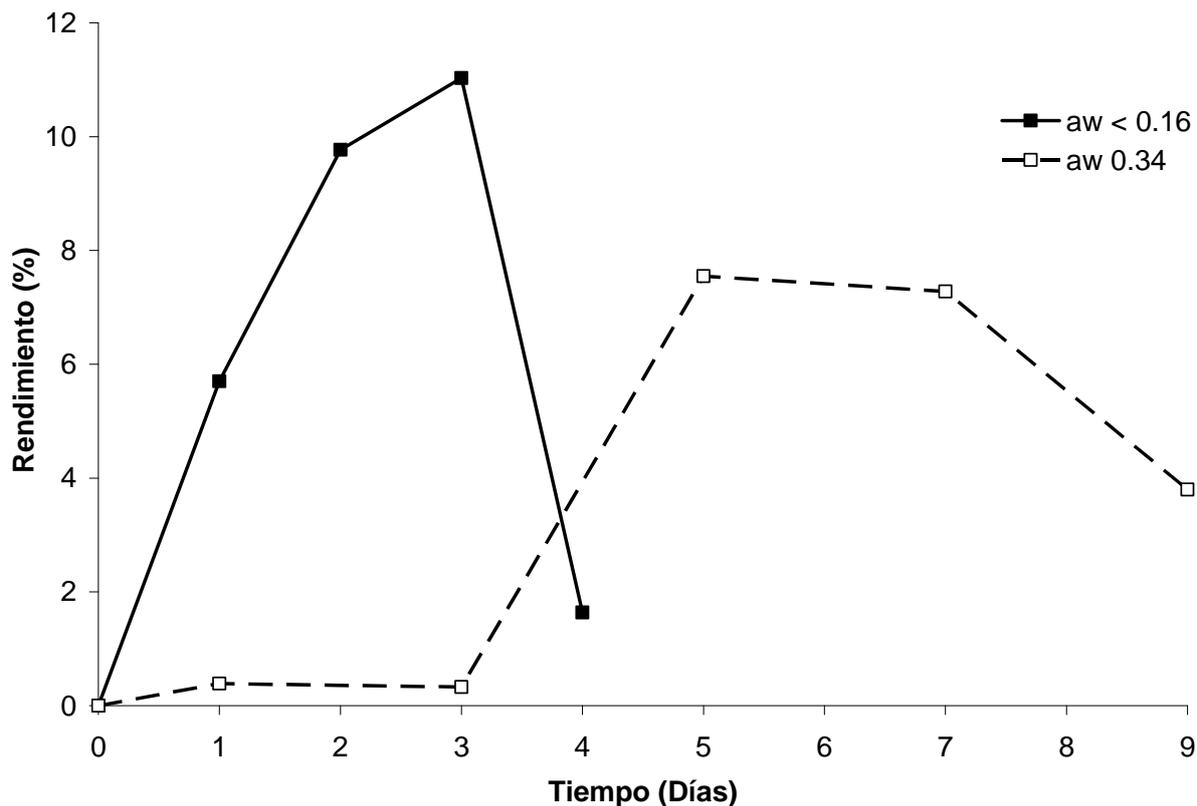


Figura 16. Efecto de la humedad inicial en los rendimientos.

Estos resultados confirman que el agua juega un papel importante en el mecanismo de polimerización del LA. Esto puede explicarse debido que los productos ocurren por resultado de un ataque nucleofílico de la lipasa o cadenas propagadas sobre el complejo enzima monómero (CEM). Por ejemplo, esto se ha reportado por Panova *et.al.*, 2003 para la polimerización de ϵ -CL, donde esterificaciones incompletas de agua en la reacción con ϵ -CL pueden originar competencia de nucleófilos, residuo OH del sustrato o H_2O , en atacar al CEM³⁴.

En cuanto el efecto que tiene sobre los pesos moleculares de acuerdo a la figura 17, podemos observar que siguen un comportamiento similar aunque desplazado por los días, pero si comparamos los rendimientos, encontramos cierta relación con los pesos obtenidos, en el caso del PDI para el sistema $a_w = 0.34$ Después de llegar a su punto máximo esta va

en aumento (figura 18) aunque no significativamente, De hecho podría considerarse similar a observado para el sistema con $a_w < 0.16$.

Días	$a_w < 0.16$		Días	$a_w 0.34$	
	Mn g/mol	PDI		Mn g/mol	PDI
1	-	-	1	-	-
2	12008	1.12	3	-	-
3	11182	1.24	5	2265	1.18
4	8384	1.2	7	13264	1.24
			9	11316	1.33

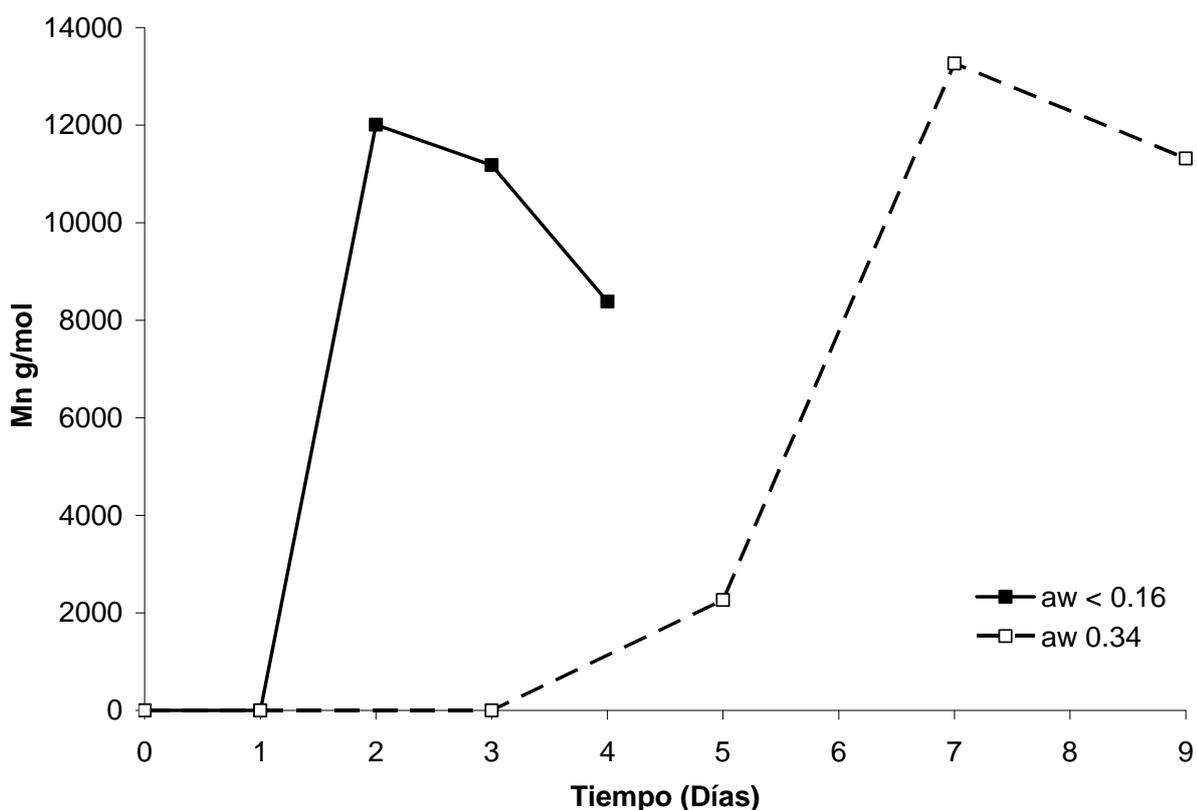


Figura 17. Efecto de la humedad inicial en los pesos moleculares

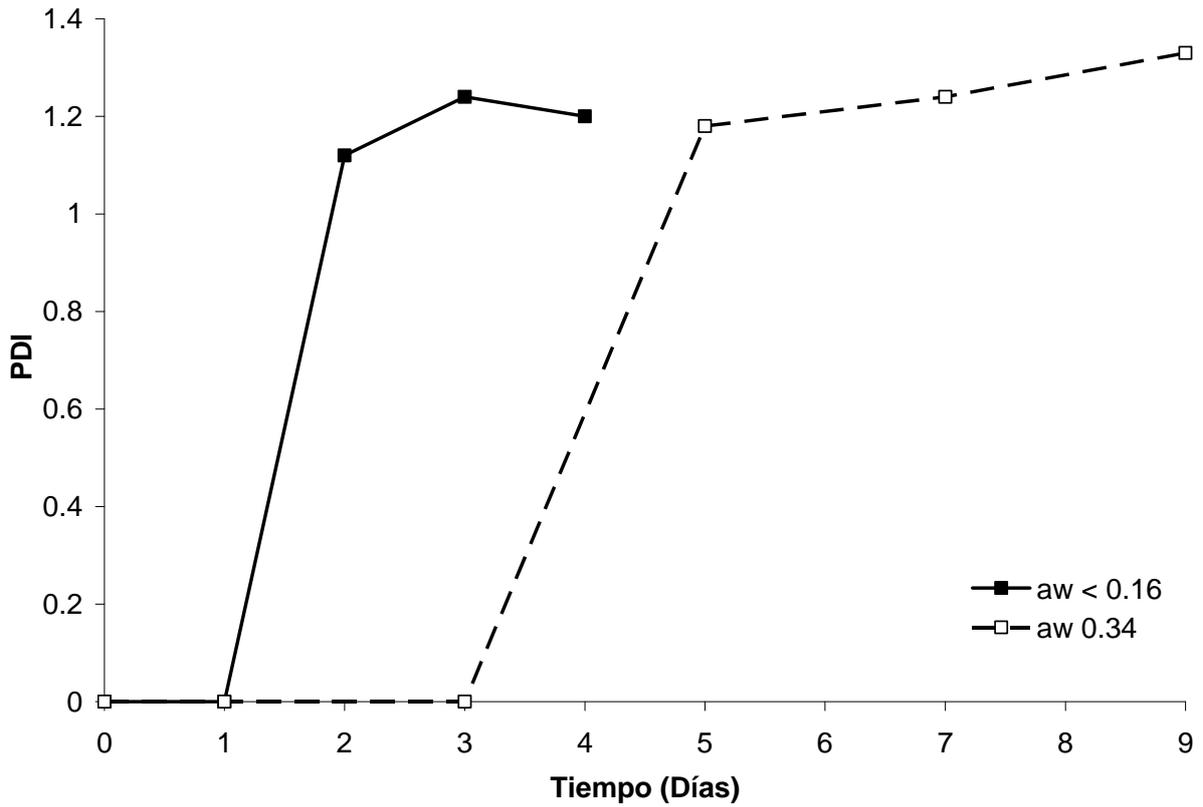


Figura 18. Efecto de la humedad inicial en la PDI

Con este estudio pudimos darnos cuenta que el mejor sistema para llevar a cabo la reacción es aquel que presenta una concentración de agua inicial mínima detectable, es decir $a_w < 0.16$.

VIII.3. Efecto de la concentración inicial de sustrato.

El siguiente punto a estudio fue el efecto de la concentración del monómero en la reacción manteniendo fija la concentración inicial de biocatalizador (10 p/p%). Se resumió a estudiar los cuatro primeros días basándonos en los resultados previos, esperando para esta serie de experimentos que el rendimiento de la reacción se acrecentara, ya que al tener mas monómero para llevar a cabo la polimerización la reacción se desplazara favorablemente a la producción de poliláctido. Los resultados se muestran a continuación

Días	20 % LA/10% Enzima	30 % LA/10% Enzima	40 % LA/10% Enzima
1	5.7	< 0.1	0.21
2	9.77	0.19	-
3	11.03	1.09	1.22
4	1.64	0.78	-
5	-	-	0.32

Al evaluar los resultados de este estudio, nos dimos cuenta que al aumentar la concentración del monómero (Figura 19), los rendimientos obtenidos son inferiores a los obtenidos por la concentración de trabajo inicial de 20 % p/v de LA. Nosotros esperábamos que entre mas sustrato existiera en el sistema en emulsión podríamos obtener mayores rendimientos, por que como ya lo hemos dicho antes, esto inclinaría el equilibrio hacia el PLA, sin embargo, lo observado fue completamente opuesto. La relación en cuanto al día que se obtiene el mayor rendimiento sigue siendo la misma, teniendo así que para el sistema con 30% $p_{LA}/V_{reactor}$ el rendimiento al tercer día es 90.11 % mas bajo y para 40% $p_{LA}/V_{reactor}$ es 88.94 %, menor al obtenido por el sistema con la mitad de monómero.

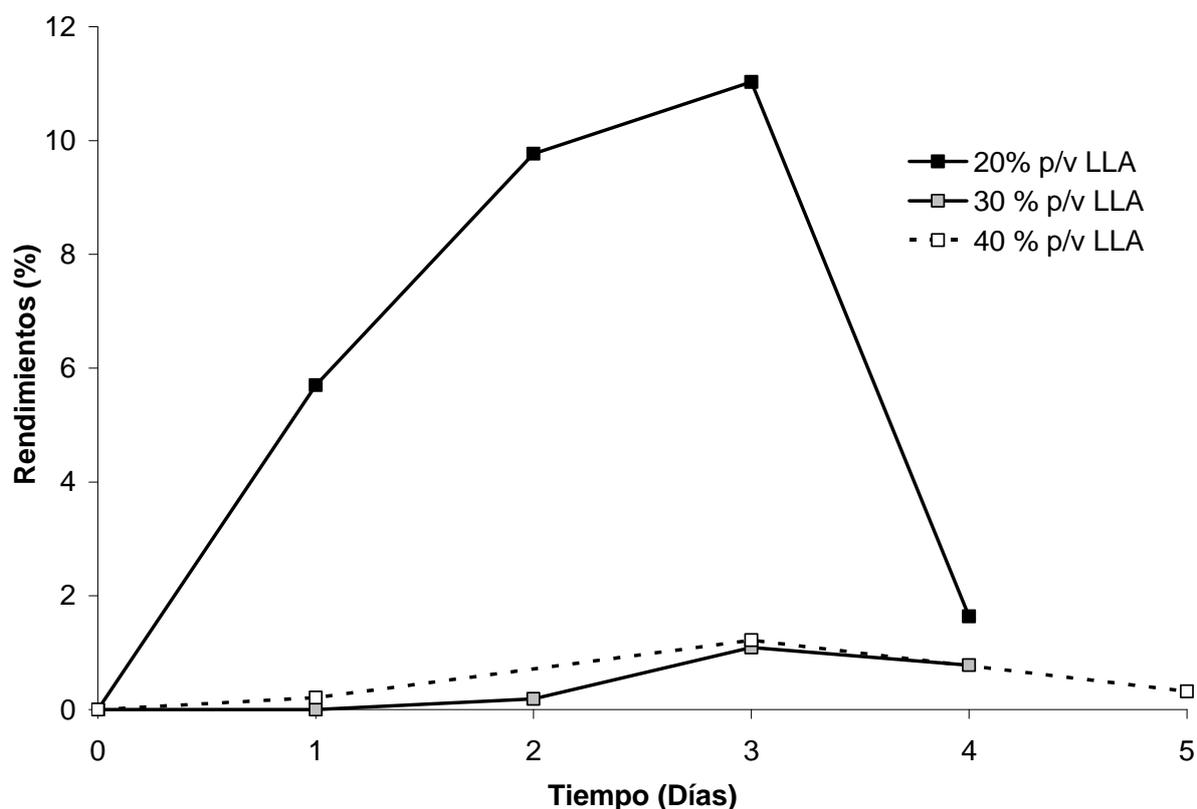


Figura 19. Efecto de la concentración de LA en la cinética de polimerización de PLA, en el medio de emulsión

La baja conversión en soluciones concentradas de monómero es explicada por Panova *et al.*, 2003 por la inhibición de la lipasa por el producto de la reacción, cadenas de PCL, y/o difusión insuficiente del monómero hacia el sitio activo de la enzima. Proporciones altas de monómero-enzima no producen cadenas largas de polímero debido a la disminución de la conversión de monómero y la correspondiente disminución de rendimiento. Esto es congruente con lo obtenido para este ensayo.

VIII.4. Caracterización por RMN 1H: Determinación del % de conversión y apertura de anillo.

Al término de los estudios realizados para lograr mejores condiciones de reacción y en consecuencia mejores rendimientos, se determinó que las condiciones óptimas para la polimerización de PLA en CO₂ en estado supercrítico, son las siguientes:

- 20 % p_{LA}/V_{reactor}
- 10 % p/p de biocatalizador con respecto al LA.
- Condiciones iniciales secas a_w < 0.16

Por lo que solo se caracterizaron las muestras correspondientes al estudio principal de este trabajo comparar los sistemas de emulsión y disolución.

Los espectros que resultaron del análisis de 1H RMN para el sistema en disolución (figura 20) no muestran continuidad en las señales. Además cabe destacar que las señales características para la forma cíclica del LA y su forma abierta están ligeramente recorridas, siendo estas de 5.1 y 4.9 ppm, respectivamente. Por otro lado en los espectros para el sistema en emulsión (figura 21), es evidente una continuidad en las señales lo que nos indica que en este medio la reacción se lleva a cabo mas uniformemente con respecto a su semejante en el medio en solución. Se puede ver que para el espectro del tercer día, la señal de 5.1 ppm, correspondiente al PLA esta mas marcada.

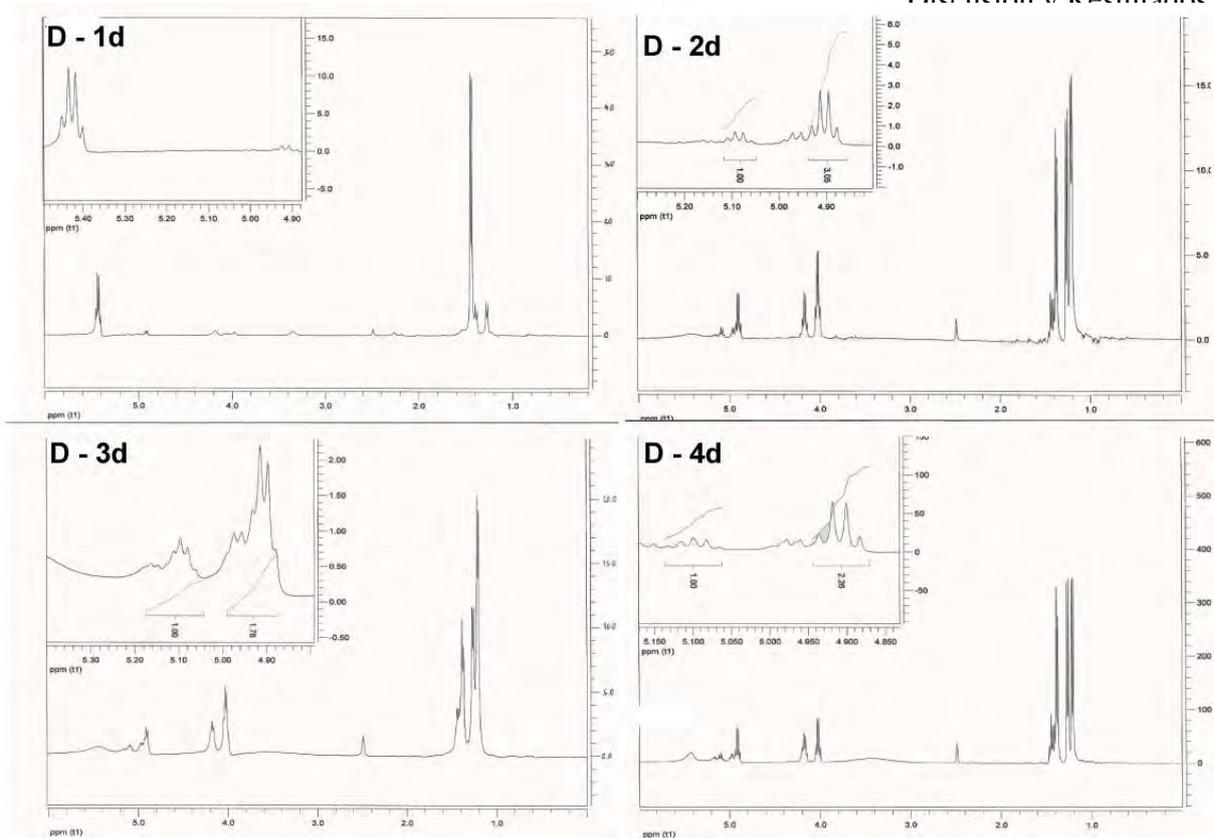


Figura 20. Espectros ¹H RMN de la cinética en el medio de disolución

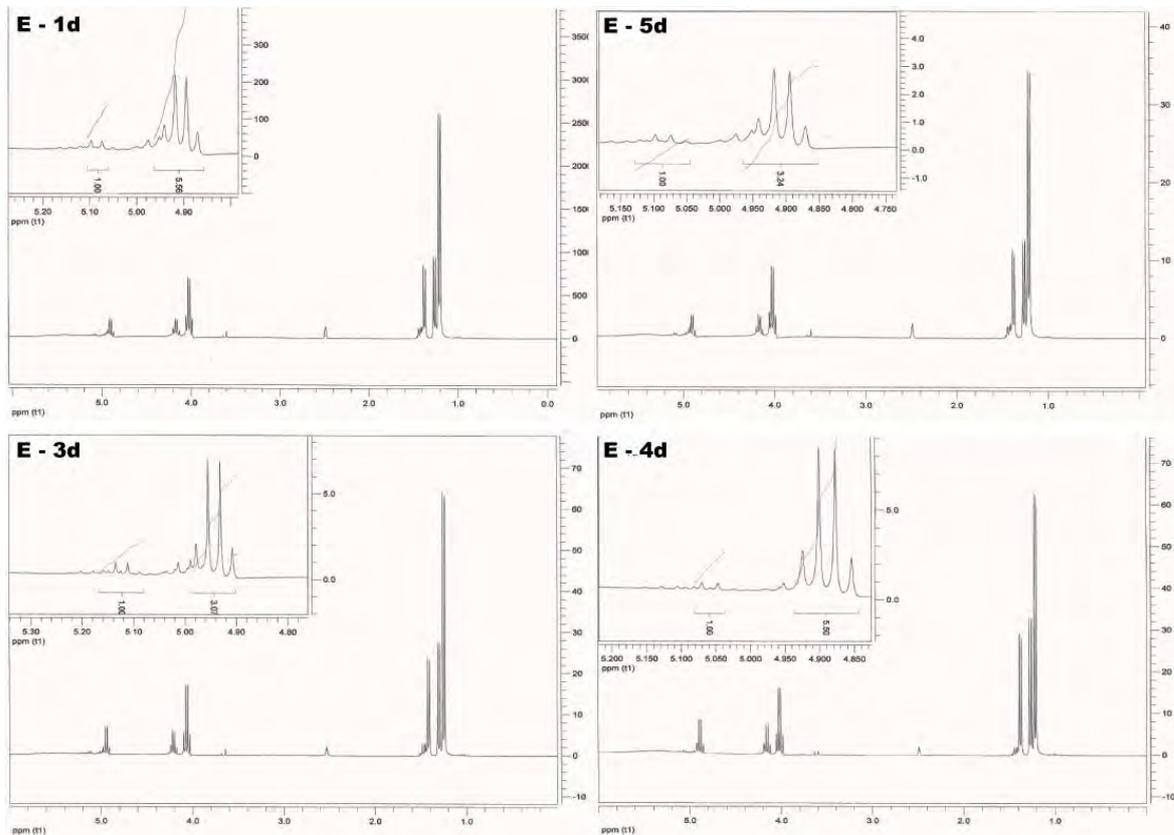


Figura 21. Espectros ¹H RMN de la cinética en el medio de emulsión

Para hacer un análisis mas detallado se verifico la apertura del anillo del LA determinando el porcentaje de conversión de monómero a polímero los resultados se muestran a continuación.

Días	Disolución (9.6LA/10% Enzima)	Emulsión (20 LA/10% Enzima)
1	-	15.24
2	24.69	23.58
3	35.97	24.57
4	42.7	27.8

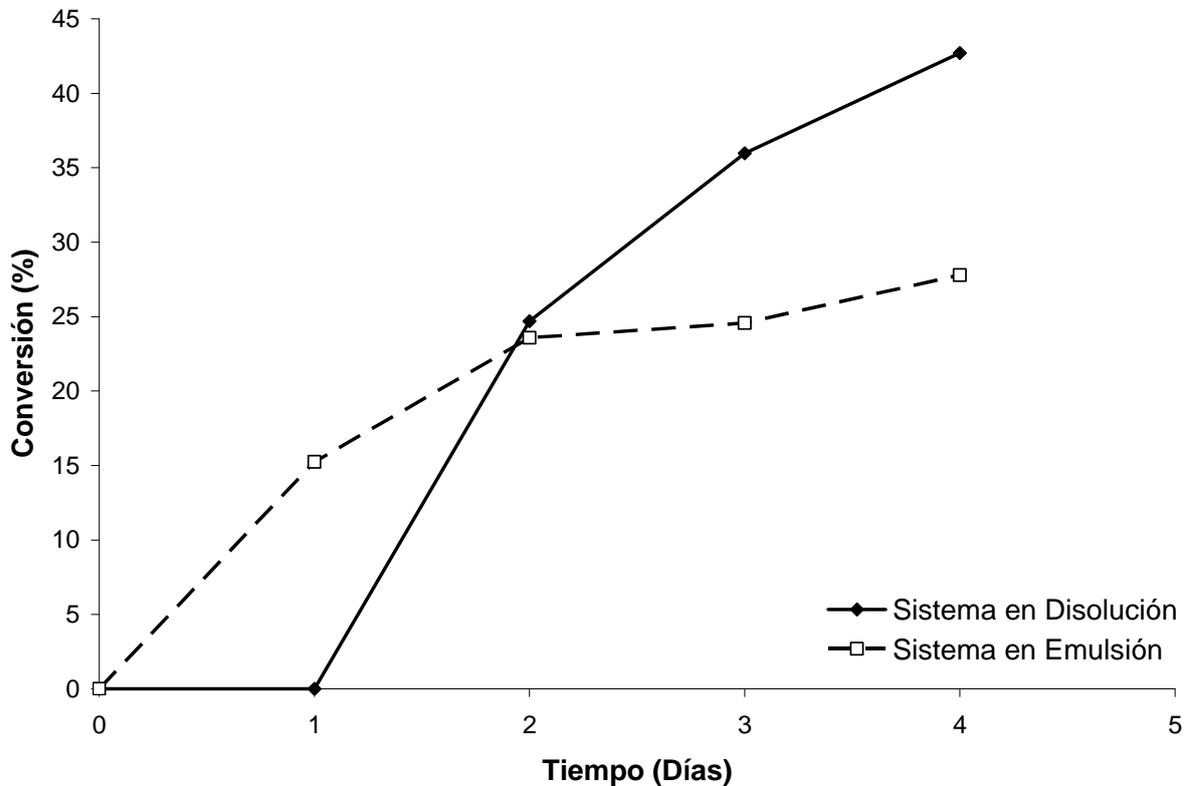


Figura 22. Comparación del porcentaje de Conversión de La a PLA en los diferentes medios de emulsión y disolución

Al graficar los porcentajes de conversión de ambos sistemas encontramos que el sistema de solución ofrece mas apertura de anillo para el tercer día, mientras que en el sistema de emulsión permanece un tanto estático este proceso. Aun así este medio ofrece condiciones mas favorables para la polimerización del PLA, tal vez debido a que al saturar el medio logramos desplazar el equilibrio a la formación del PLA.

VIII.5. Caracterización térmica del PLA.

De igual forma que para la RMN, las muestras que se analizaron fueron las correspondientes a los sistemas de tipo emulsión (20 % $p_{LA}/v_{reactor}$) y disolución (9.6 % $p_{LA}/v_{reactor}$), ambas en condiciones iniciales secas. Nos encontramos que las señales obtenidas por el análisis fueron muy débiles y apenas perceptibles, además de que, como ya mencionamos, se presentan distintas temperaturas de fusión. También podemos atribuir este comportamiento a que tal vez en las muestras recolectadas, existan polímeros más cortos con puntos de fusión diversos, ya que como sabemos la T_g esta relacionada con el peso molecular.

En el sistema en disolución obtenemos valores de T_g superiores a los expuestos para el sistema de emulsión, solo que para este caso después del segundo día dicho valor se mantiene prácticamente estable, mientras que para el sistema en disolución sigue elevándose.

% LA	Tiempo (días)	Tg °C	Tf °C	
9.6	1	53.39	153.45	154.27
9.6	2	-	147.73	151.36
9.6	3	55.15		
9.6	4	61.46		
20	1	36.61		
20	2	46.21		
20	3	46.53	153.45	154.27
20	4	-	135.95	137.1

Los datos marcados con (-) no se pudieron observar en el diagrama de DSC, las casillas marcadas con >3 son las muestras que tuvieron mas de tres temperaturas de fusión.

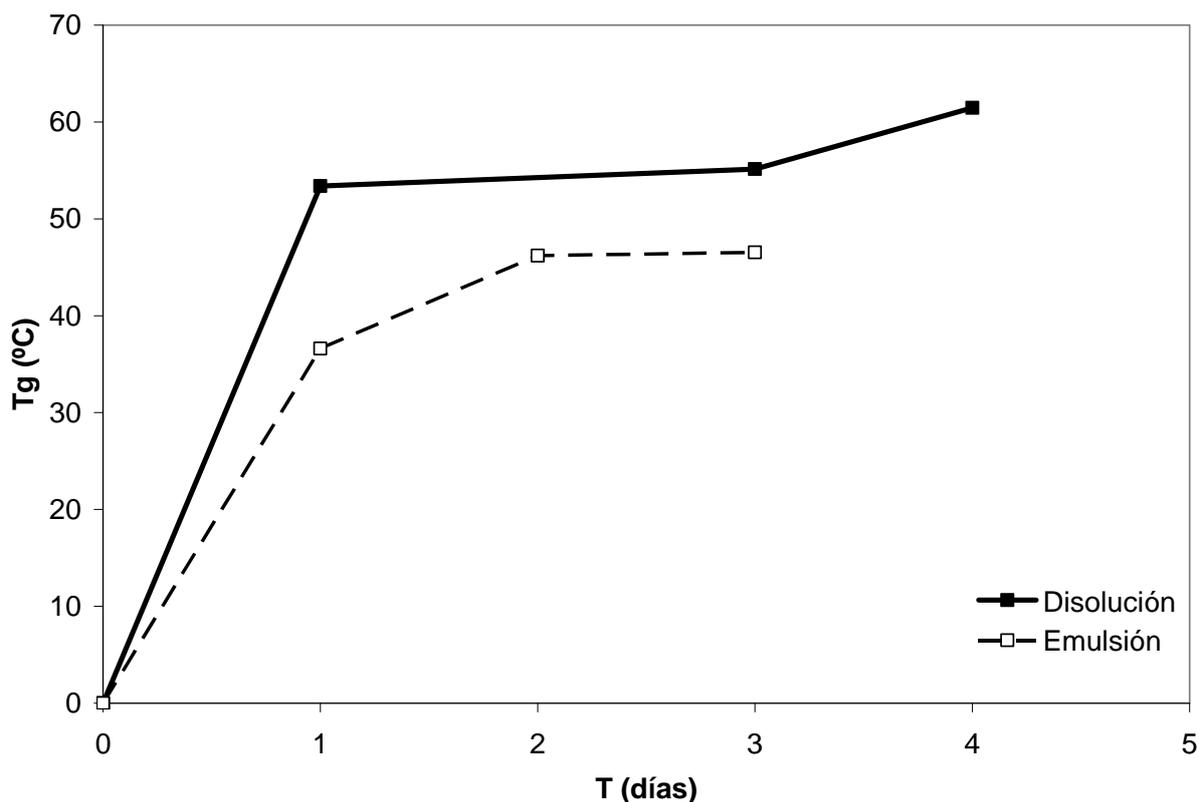


Figura 23. Comportamiento de la T_g con respecto al tiempo de reacción.

La temperatura de transición vítrea T_g se ve afectada por distintos factores, como el caso del peso molecular y la cristalinidad, por lo cual se realizó una gráfica (Figura 24) del peso molecular en función a la T_g para encontrar la existencia de alguna tendencia.

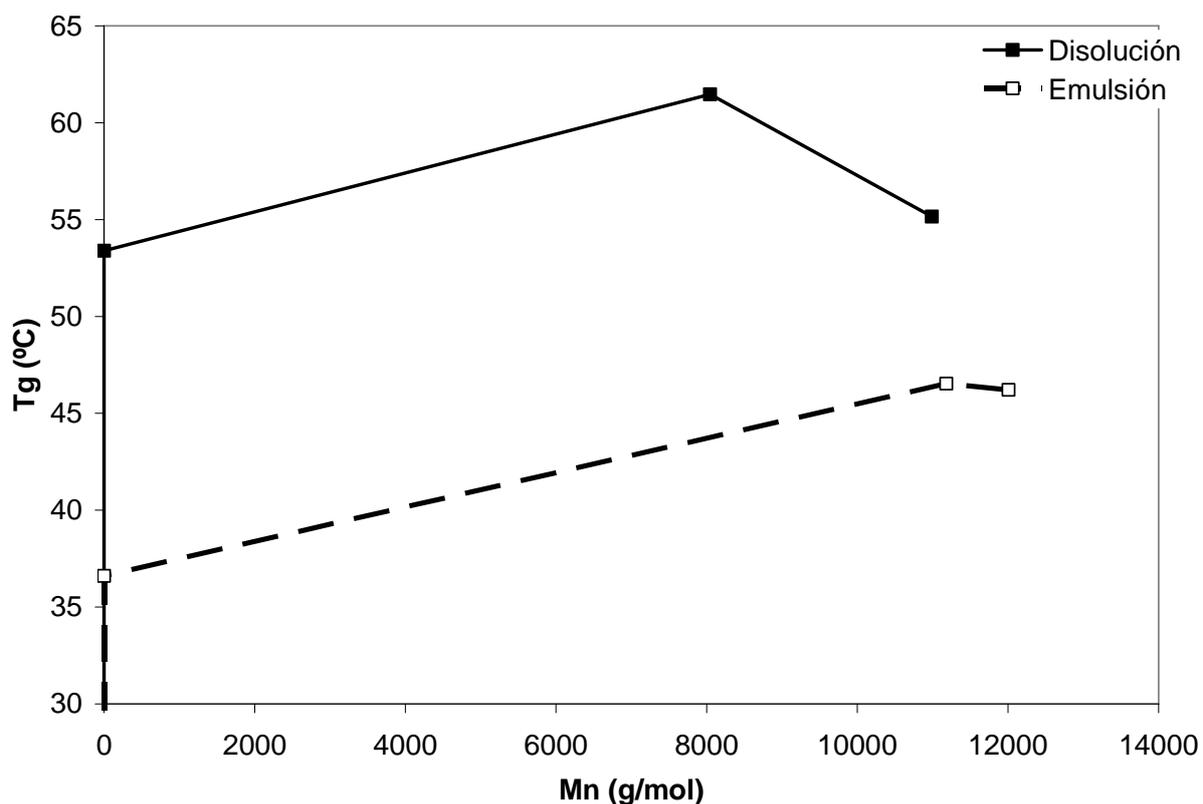


Figura 24. Efecto del peso molecular en los T_g .

De acuerdo a la gráfica de la figura 24, no se encuentra relación entre el peso molecular y la T_g , pues dicho valor no está relacionando con el tamaño de la cadena polimérica.

VIII.6. Caracterización por Rayos X en polvo: Determinación del porcentaje de cristalinidad del PLA.

Para determinar la cristalinidad del polímero se realizó un estudio de difracción de rayos X en polvo a la serie de polímeros obtenidos por el sistema de tipo emulsión, pues que fueron los experimentos que dieron mejores resultados. Con este estudio pretendíamos ver la evolución de la cristalinidad del polímero obtenido a lo largo de la cinética. En la figura 29, podemos apreciar el efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de cristalinidad del PLA obtenido.

Días	Cristalinidad (%) sistema Tipo Emulsión (20 % LA/10% Enzima)
1	21.94
2	21.55
3	71.69
4	60.41

Cláramente vemos como la línea punteada de la figura 25, describe la evolución de la cristalinidad del polímero conforme avanza el tiempo de reacción, hasta llegar a un punto máximo que corresponde de igual forma al día en el cual tenemos el mayor rendimiento para este sistema y el estudio en general. Después de este punto, el PLA empieza a ser más amorfo.

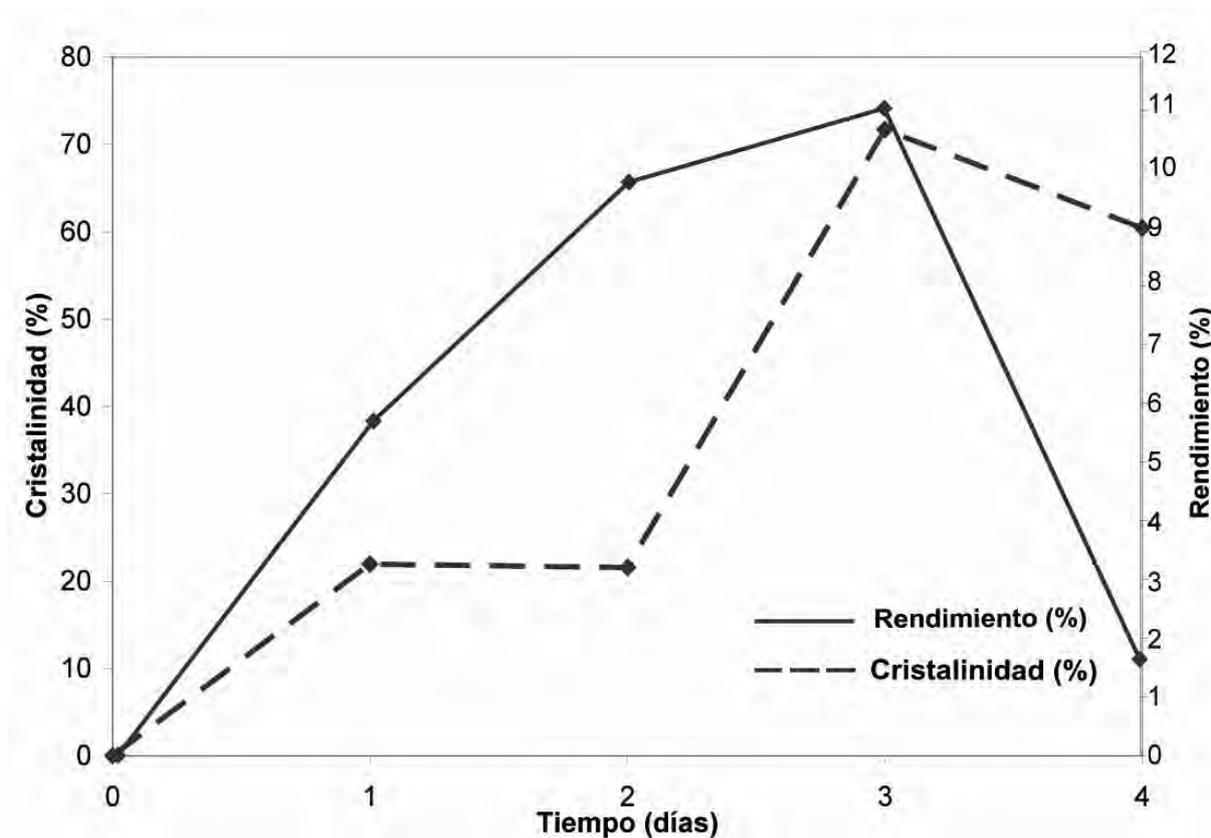


Figura 25. Comparación del Porcentaje de cristalinidad y el porcentaje de rendimiento para el sistema de tipo emulsión.

20 % p/v LLA - 10 p/p % Novo

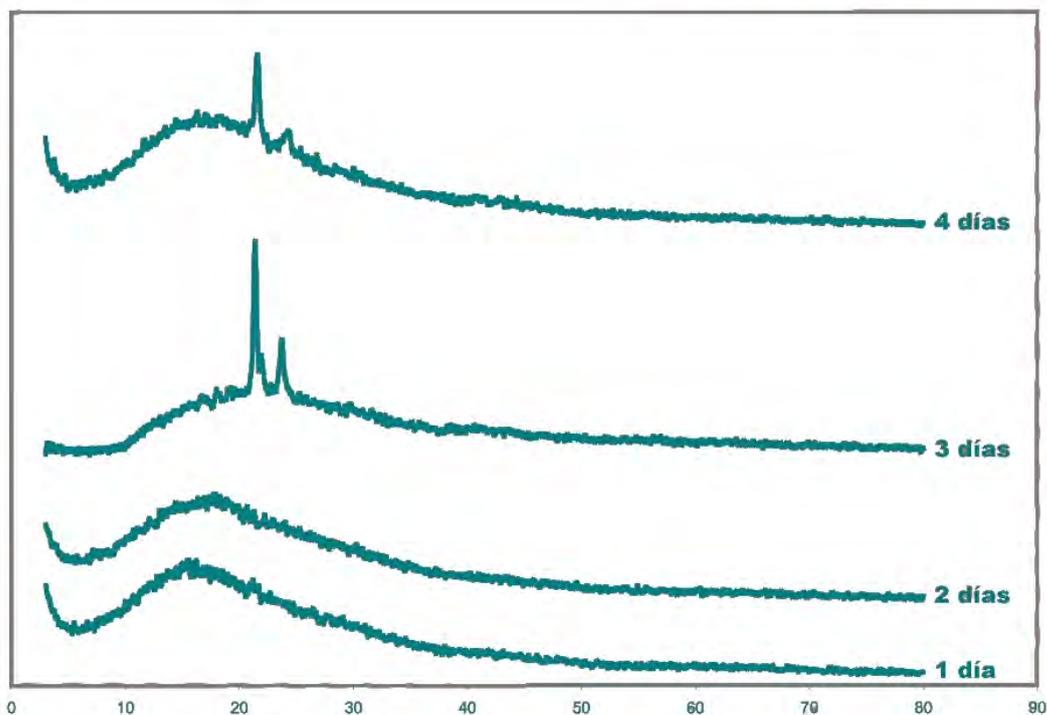


Figura 26. Evolución de la cristalinidad en la síntesis del polímero.

IX. CONCLUSIONES.

- Se logro llevar a cabo la síntesis enzimática de PLA, usando como medio de reacción el scCO₂ (300 bares, 65 °C) , bajo las condiciones establecidas para el estudio las cuales fueron de a_w Inicial < 0.16, manejando dos concentraciones 20 % $p_{IA}/V_{reactor}$ y 9.6 % $p_{IA}/V_{reactor}$, siendo la primera de tipo emulsión y la segunda en disolución, utilizando como catalizador de la reacción 10 % p_{Novo}/p_{LA} de la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica*. Dentro de estos parámetros los mejores resultados se obtuvieron al tercer día, siendo el sistema de tipo emulsión el que obtuvo mayor rendimiento (11.03 %), registro los mayores pesos moleculares y un porcentaje de cristalinidad superior al de las demás muestras analizadas (71.69%).
- Se observa una evidente relación, entre la concentración de monómero y los rendimientos y pesos moleculares obtenidos, pues al usar el doble de monómero para tener el sistema de tipo emulsión, tomando en cuenta el sistema en solución como base, obtenemos mejores rendimientos. Pero si aumentamos un 50 % de éste la saturación del medio afecta el rendimiento disminuyéndolo.
- Se encontró que al llevar a cabo la reacción a condiciones de humedad iniciales equivalentes a un a_w < 0.16, los resultados fueron mas favorables, ya que al aumentar la humedad inicial de la reacción, la velocidad de la reacción disminuye y desplaza los mejores rendimientos y pesos moleculares dos días después de los obtenidos en condiciones secas.
- Después de evaluar los diferentes sistemas de trabajo, se determinó que usando scCO₂ (300 bares, 65 °C), 20 % $p_{IA}/V_{reactor}$, 10 % p_{Novo}/p_{LA} en condiciones secas se obtienen mejores rendimientos,

pesos moleculares y porcentajes de cristalinidad, en el menor tiempo de reacción.

- Teniendo en cuenta que el sistema de tipo emulsión representa nuestro mejor caso, se encontró por ^1H RMN que para este sistema no se logra una total apertura de anillo, lo que explica los rendimientos relativamente bajos para la síntesis, obteniendo para el tercer día el 36 % de apertura.
- Los polímeros obtenidos presentan varios grados cristalinos según se desprende de los análisis térmicos, lo cuales no mostraron valores de T_g claros, además de presentar varias temperaturas de fusión. Tampoco se encontró relación alguna entre los valores de T_g y los pesos moleculares, pero en cambio se notó una relación entre T_g y los rendimientos obtenidos.
- En la caracterización por rayos X, encontramos una clara relación entre el porcentaje de cristalinidad y los rendimientos obtenidos para el sistema de tipo emulsión ya que la tendencia que sigue la gráfica de su comportamiento es similar para ambos, y por ende con los pesos moleculares.
- El tener un sistema sobresaturado ($20\% \text{ } p_{IA}/V_{\text{reactor}}$) en condiciones secas, que favorezca el equilibrio de la reacción hacia la producción de PLA, además de que la reacción se lleve a cabo en dos fases distintas, promueve la obtención de mejores rendimientos en comparación con los sistemas en donde la reacción se lleva a cabo solo en una fase. Tal es el caso del medio en solución.
- El estudio de nuevas variables y sistemas de reacción basándose en la química verde, para obtener polímeros biodegradables son de gran importancia, para abrir nuevas puertas a la investigación y una

retroalimentación para así optimizar procesos, que se traduzcan en acciones benéficas para el medio.

X. TRABAJO A FUTURO.

El presente trabajo abrió nuevas ventanas a la investigación, pues se han considerado las siguientes alternativas y/o avances:

- Llevar a cabo una polimerización con la incorporación gradual de LA al medio.
- Experimentar bajo la posibilidad de poder purificar al PLA usando CO₂ comprimido, para así evitar el uso de solventes orgánicos y hacer un proceso mas limpio.
- Llevar a cabo estudios de la estabilidad operacional de la enzima.
- Ver la posibilidad de recuperación del biocatalizador para su reuso en nuevas reacciones

XI. Bibliografía.

- ¹ Armelin, Elaine, *Síntesis y caracterización de nuevas poliésteramidas: estudio de sus propiedades*, UPC, 26.04.2002.
- ² Auras R, Harte B, Selke S, “Poly(lactide); a Natural “Green” Alternative for Plastic Packaging Materials”, Proceeding of 4 th International Plant Biomechanics Conference, July 20-25,2003, East Lansing, MI.
- ³ E. Drumright, Patrick R. Gruber and David E.Henton, *Polylactic Acid Technology*, Advanced Materials, **2000**, 12, No. 23 December 1, pp 1841-1846.
- D. Bratton, M. Brown and S.M. Howdle, Suspension polymerization of l-lactide in supercritical carbon dioxide in the presence of a triblock copolymer stabilizer, *Macromolecules* **36** (2003), pp. 5908–5911.
- ⁴ Garlotta, D., Brown, M., Howdle, Direct synthesis of poly(L-lactic acid) in supercritical carbon dioxide with dicyclohexyldimethylcarbodiimide and 4-dimethylaminopyridine, D.M. 2001, 9(2), 63-84.
- ⁵ Zaks A., Klivanov A.M. *Science* **1984**, 224, 1249-1251
- ⁶ Giles, M.R., Griffiths R.MT., Aguilar-Ricardo, A., Silvia, M., Howdle, S.M. *Macromolecules* **2001**,34, 20-25
- ⁷ Stassin, F, Jérôme, Polymerization of (L,L)-lactide and copolymerization with ϵ -caprolactone initiated by dibutyltin dimethoxide in supercritical carbon dioxide, R. . *Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2005**, 43. 2777-2789
- ⁸ Garcia-Arrazola, R., Gimeno, M., Bárzana, Use of liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane as solvent media for enzyme-catalized ring opening polymerization of lacones,E., *Macromolecules*, **2007**, 40, 4119-4120
- ⁹ S. Saul, S. Corr and J. Micklefield “Biotransformations in low-boiling hydrofluorocarbon solvents” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5519-5523
- ¹⁰ Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J Am Chem Soc* 2003;125(14):4125-4131.
- ¹¹ Pack, J.W., Kim, S.H., Park, D.Y., Lee, Y., Kim, Y.H. Effects of Pressure and Temperature on the Kinetics of L-Lactide Polymerization in Supercritical Chlorodifluoromethane *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 340-345.

- ¹² Yoda, S., Brattom, D., Howdle, Direct synthesis of poly(L-lactic acid) in supercritical carbon dioxide with dicyclohexyldimethylcarbodiimide and 4-dimethylaminopyridine D.M. *Polymer* **2004**, 45, 7839-7843.
- ¹³ Matsumura, S., Mabuchi, K., Toshima, K., *Macromol Rapid Commun* **1997**, 18, 477-482.
- ¹⁴ Fujioka, M., Hosoda, N., Hishiyama, S., Noguchi, H., Dhoji, A., Kumar, D.S., Katsuraya, K., Ishii, S., Yoshida, Y., *Sen' i Gakkaishi* **2006**, 62(3), 63-65.
- ¹⁵ Graciela Tapia Morales, *Síntesis y caracterización de polímeros de ácido láctico-co-glicólido como soporte para sistemas farmacéuticos de larga duración* Tesis de Maestría, facultad de química, **2007**
- ¹⁶ G. H. Mehl, *Polymer Synthesis*, Modulo 06530/50/90, **2005/2006**, pp 3-6
- ¹⁷ Serna-Cock, L., Rodríguez-de Stouvenel, A. *Producción Biotecnológica de ácido Láctico: estado Del arte*. Ciencia y Tecnología De alimentos, Vol. 5, No. 1, pp. 54-65, **2005**.
- ¹⁸ *Practical Aspects of How to Make An additon Polmer*, <http://web.mst.edu/wlf/CHEM381/chap21.html>
- ¹⁹ CBIP, Lección 5, *Clasificación y procesos de obtención de polimeros*, <http://www.jorplast.com.br/cbipep/cbip5ep.html>.
- ²⁰ *Polímero en solución vs polímero en dispersión*, <http://www.textoscientificos.com/polimeros/polimerizacion-emulsion>.
- ²¹ Wahlber J. Persson V., olosson T., Hedenstöröm E., Iversen T., *Structural Characterization of a Lipase-Catalyzed Copolymerization of e-Caprolactone and D,L-Lactide*. *Biomacromolecules* **2003**, 4 1068-1071.
- ²² Nobuyoshi N., Atsuko T., Ayumi N.e, Takashi T. Masahiko O., *Ring-opening polymerization of lactones by rare-earth metal triflates and by their reusable system in ionic liquids*. *Tetrahedron* 63 (2007) 8478–8484.
- ²³ Rahul Chelikani, Kim Dong Shik, *Enzymatic Polymerization and Curing of Natural Phenolic Compounds*, #462 - Green Chemistry and Reaction Engineering (20014)
- ²⁴ Masayori F, Naoki H, et al. *one-pot enzymatic Synthesis of Poly(L,L-lactide) by immobilizaed Lipase Catalyst*, The Society of Fiber Science and Technology, Japan, Coden: senga 5, ISSN 0037-9875, **2005**.

-
- ²⁵ Anna A. David L. Kaplan, *Mechanistic Limitations in the synthesis of polyesters by lipase-catalyzed Ring-opening polymerization*, Julio **2003** Wiley InterScience.
- ²⁶ Nigel A. Turner, Evgeny N. *What temperature can enzymes maintain their catalytic activity?* Enzyme and Microbial Technology 27 (**2000**) 108–113.
- ²⁷ Sophie Colombié, Russell J. Tweddell, Jean-Stéphane Condoret, Alain Marty, *Water Activity Control: A Way To improve The efficiency of Continuous Lipase esterification*, biotechnology and bioengineering, vol. 60, no. 3, november 5, **1998**, pp. 365-366
- ²⁸ Nalawade Sameer P.; Picchioni Francesco; Janssen L. P. B. M; *Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts : Processing aspects and applications*, Progress in polymer, **2006**, vol. 31, n^o1, pp. 19-43.
- ²⁹ S. Howdle, *Supercritical Fluids: A clean Route to Polymer Synthesis and polymer Processing*, Jerwood Salters' Environmental Award **2001**, RSC publishing.
- ³⁰ L. Calvo, M.D. Romero, C. Alba, F. Ortiz, and M. Gutierrez. *Enzymatic synthesis of food additives in supercritical carbon dioxide*. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
- ³¹ Andrew Cooper, *Clean polymer Synthesis and processing using scCO₂*, The Royal Society of Chemistry, Green Chemistry, December **1999** pp. 167-168
- ³² Fabrice Stassin, Robert Jerome, *Polymerization of (L,L)-Lactide and Copolymerization with ε-Caprolactone Initiated by Dibutyltin Dimethoxide in Supercritical Carbon Dioxide*, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 43, 2777–2789 (**2005**), pp 2777 – 2789
- ³³ Hile, D. D.; Pishko, M. V. *Macromol Rapid Commun*, 1999, 20, 511.
- ³⁴ Panova, AA., Kaplan, DL. *Biotech & Bioeng.* **2003**, 84(1), 103-113