

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA POR APERTURA DE ANILLO DE
L-LÁCTIDO EN LÍQUIDOS IÓNICOS BASADOS EN EL CATION
1-BUTIL-3-METILIMIDAZOLIO”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LETICIA DONÍS CASTRO

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Ruíz Terán
VOCAL: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
SECRETARIO: Dr. Miquel Gimeno Seco
1er. SUPLENTE: Dra. María de Lourdes Osnaya Suarez
2NDO. SUPLENTE: Dr. Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

SUSTENTANTE:

LETICIA DONIS CASTRO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia por su apoyo, guía, por los valores que me inculcaron, por ustedes entendí que la vida es mucho más que solo ver pasar el tiempo y porque ustedes me han llenado de inspiración y aspiraciones. Porque este éxito, también es suyo, gracias.

A la Honorable Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de tener una formación profesional y cultural de primer nivel. "Por mi raza hablara el espíritu"

A la Facultad de Química, por ser testigo de mi formación y por brindarme la mejor calidad educativa para mi formación, por sus muy buenos profesores y por permitirme tener tantos recuerdos agradables en ella.

Al Doctor Miquel por su apoyo y orientación para realizar este trabajo, así como por su trato siempre cordial y atento.

A mis compañeros José Antonio, por tu ayuda en los últimos pasos por la facultad y por los detalles que tuviste conmigo, Alberto por tu tiempo, paciencia, amabilidad y orientación para todos durante nuestra estancia en el laboratorio y por tu amistad y Don Pedro, por mantener ordenado y limpio y por su amabilidad y calidez.

A Donis Martínez S. C. Abogados por su paciencia y apoyo para poder concluir este proyecto.

A ti Emmanuel, por tu apoyo, ayuda y compañía durante este trayecto.

DEDICATORIAS

A mi familia María Luisa, Sergio, Sergio, Alejandro, Alexander, Eduardo, Leonardo, Michelle, Nallely y Laura.

Mamá, Papá, creo que este es el obsequio más significativo que he podido darles hasta hoy y les debo muchísimos más. En verdad es gracias a ustedes que tengo una familia tan linda, única, diferente y especial, es por su amor, guía, dedicación y fuerza que siempre estaremos unidos en las adversidades, por lo que nos han inculcado y enseñado desde pequeños, gracias a su esfuerzo y entrega sabemos que contamos los unos con los otros y que siempre habrá un lugar a donde acudir en los buenos y malos momentos; gracias a ustedes tenemos valores y preparación, podemos pensar en un mejor futuro, nos atrevemos y sabemos que siempre tendremos su respaldo, su guía y apoyo.

Sabiendo que jamás habrá una forma de agradecer su estímulo, su ejemplo de superación, porque han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera, porque sé que su ilusión ha sido verme convertida en una persona de provecho, por lo que ha sido y será...

Realmente los amo, los admiro y estoy orgullosa de ambos tanto por sus logros individuales, como de pareja.

Hermanitos, también es por ustedes que estoy aquí, pues de cada uno he aprendido y me he sentido orgullosa, confío en ustedes y sé que siempre estaremos unidos por la lealtad, el respeto, la admiración y por el amor.

Emmanuel, por todo lo que has aportado a mi vida.

“Se alcanza el éxito convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso”

A mis padres:

*Haré algo importante
con la vida que me dieron.*

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

ANTECEDENTES

METODOLOGÍA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. FIG1. LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTARTICA</i>	10
2. FIG 2. TIPOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	14
3. FIG 3. EFECTOS DE ORIENTACIONES DE CAL-B INMOVILIZADA	17
4. FIG 4. ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE PLA POR APERTURA DE ANILLO	18
5. FIG 5. OBTENCIÓN DE PLA	19
6. FIG 6. FUENTES DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES	20
7. FIG 7. ISOMEROS DEL ÁCIDO LÁCTICO	21
8. FIG 8. TIPOS DE CATIONES DE LIS	22
9. FIG 9. TIPOS DE ANIIONES DE LIS	22
10. FIG 10. ESQUEMA DE REACTOR DE EXTRACCIÓN DE FSC	35
11. FIG 11. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS LIS EN ESTUDIO	43
12. FIG 12. MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN INORGÁNICA	44
13. FIG 13. EJEMPLO DE ESPECTRO OBTENIDO POR ¹ H-RMN	46
14. FIG 14. EJEMPLO DE ESPECTRO DE RAYOS-X	50
15. FIG 15. ESPECTRO DE ¹ H-RMN DE LA EXTRACCIÓN CON ^{sc} CO ₂	52

ÍNDICE DE TABLAS

1. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS OBTENIDOS VARIANDO LOS LIS BMIMBF ₄ Y BMIMPF ₆	36
2. EFECTO CON EL USO DE BMIMPF ₆ CON RELACIÓN AL USO DE ENZIMA AL 70%	37
3. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIÓN AL 70% Y 100% LLA:LI CON BMIMPF ₆	39
4. PRUEBA DE LI DE BAJA VISCOSIDAD	41
5. PESOS MOLÉCULARES E ÍNDICES DE POLIDISPERSIDAD	47

INDICE DE GRÁFICAS

1. EFECTO EN EL RENDIMIENTO CON/SIN ENZIMA AL 70%, BMIMPF ₆	38
2. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS VARIANDO LAS CONCENTRACIONES	40
3. VISCOSIDAD DE LÍQUIDO IÓNICO	42
4. COMPARACIÓN DEL EFECTO EN LOS PESOS MOLECULARES RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN	38
5. ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD DE LOS POLÍMEROS OBTENIDOS	39

ABREVIATURAS

LIs	Líquidos iónicos
L-LA	Ácido L-Láctido
PLLA	Ácido poli-L-láctido
BMIMPF ₆	1-Butil-3-metil-imidazolio hexafluorofosfato
BMIMBF ₄	1 - Butil-3-metil-imidazolio tetrafluoroborato
BMIMNTf ₂	1-Butil-3-metil-imidazolio bistrifluoro-metilsulfonil-imida
p/v	Relación peso/volumen
p/p	Relación peso/peso
E	Enzima
S	Sustrato
CAL-B	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
ppm	Partes por millón
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno 1
CPG	Cromatografía de permeación en gel
M _n	Peso molecular número promedio
M _w	Peso molecular peso promedio
PDI	Índice de polidispersidad
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico

RESUMEN

La polimerización haciendo uso de herramientas como la catálisis enzimática con materias primas de origen natural para producir materiales de mayor biodegradabilidad, se ha vuelto un tema de investigación que se está ampliando debido al gran potencial de aplicación, sobre todo en la "Química verde", que es una corriente de la química que se enfoca en realizar reacciones más limpias y cuyos residuos (si los hay) deterioren lo menos posible al medio ambiente.

En la actualidad se hace uso de materiales plásticos derivados de hidrocarburos, provocando el agotamiento de algunos recursos naturales no renovables y mediante procesos que causan un efecto negativo al ecosistema, debido a ello se han hecho investigaciones encaminadas a evitar dañar el medio ambiente, en principio por reutilización y ahora llegando a producir materiales plásticos derivados de fuentes renovables que tienen mayor biodegradabilidad.

En este trabajo de tesis se llevó a cabo un estudio que pretende colaborar con la investigación de los procesos dentro de la "Química verde" y la obtención de materiales con mayor biodegradabilidad llevando a cabo la síntesis enzimática de Poli-L-Láctido, variando las condiciones de concentración del monómero, la utilización o no de enzima y el tipo de líquido iónico. El objetivo fue determinar con qué condiciones se obtenían mejores rendimientos del polímero, partiendo del L-LA, utilizando la enzima lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada y comparando los LIs: [BMIM][BF₄], [BMIM][PF₆], y [BMIM][NTf₂].

Se analizaron los resultados obtenidos en cada medio de reacción empleando herramientas analíticas como: ¹H-RMN, difracción de rayos x en polvos y cromatografía de permeación en gel; con lo cual se evidenció que el uso de la enzima favorece la

reacción aumentando el rendimiento, mejorando la polidispersidad y logrando los mejores pesos moleculares bajo las condiciones de reacción a una concentración de 70% p/p de L-LA usando el LI [BMIM][PF₆] y que la extracción mediante scCO₂ es una útil herramienta que debe seguir en estudio para llegar a las condiciones con las cuales se obtienen los mejores resultados.

Debido al amplio rango de aplicación, los análisis realizados para éste trabajo, pueden tomarse como un antecedente, que permita extender las investigaciones a fin de lograr mejorar el uso y/o aplicación de este tipo de reacciones, considerando que se hace uso de herramientas que pretenden no dañar el medio ambiente.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los desechos plásticos no son fácilmente degradables de manera natural y su material tarda cientos de años en degradarse. Debido a esto se llegó a establecer el [reciclado](#), que consiste básicamente en coleccionarlos, limpiarlos, seleccionarlos por tipo de material y fundirlos de nuevo para usarlos como materia prima adicional, alternativa o sustituta para el moldeado de otros productos. De esta forma la humanidad ha encontrado una forma adecuada para evitar la [contaminación](#) de productos que por su composición, materiales o componentes, no son fáciles de desechar de forma convencional.

Sin embargo, el empleo de petróleo para fabricar dichos plásticos implica que se agoten las reservas petroleras, procesos que generan residuos contaminantes y acumulación de estos materiales por su baja degradabilidad, con lo cual se afecta parte del medio ambiente.

Por ello se ha desarrollado un marco de estudio conocido como "Química verde" y el de "Ingeniería Química verde"; donde la primera está orientada al uso de la Química para la prevención de la contaminación a nivel molecular y la segunda tiene la misión de promover las innovaciones de las tecnologías químicas para reducir o eliminar el uso o generación de sustancias tóxicas o peligrosas desde la manufactura.

Actualmente se llevan a cabo reacciones controladas para generar polímeros utilizando materiales de origen natural y renovable que tengan una mayor degradabilidad empleando enzimas para favorecer las reacciones y aprovechando las ventajas que su empleo ofrecen en la catálisis.

1.1 ENZIMAS Y POLIMERIZACIÓN

Las enzimas son proteínas que tienen la función de catalizar reacciones químicas específicas en los sistemas vivos, acelerando la velocidad de las mismas. Debido a su papel de moléculas catalíticas se requiere muy poca cantidad de enzima para producir altos grados de transformación.

Las enzimas presentan una estructura tridimensional, su acomodo en el espacio es uno de los factores más importantes para determinar su reactividad; esta característica da como resultado que las enzimas sean moléculas muy selectivas.

Las reacciones de polimerización son principalmente de dos tipos: de adición y de condensación. Las más comunes en la industria son las reacciones de adición, mediante la conversión de un doble enlace en uno sencillo, donde se involucra la adición de monómero en monómero a la cadena en crecimiento. Las polimerizaciones por condensación involucran la eliminación de una pequeña molécula, que puede ser de agua o de ácido clorhídrico, al reaccionar entre monómeros.

1.2 BIOPOLÍMEROS

Un biopolímero es una macromolécula formada por unidades de repetición que se encuentran en la naturaleza. Los más comunes son la celulosa, almidón y quitina. Sin embargo, otro tipo de biopolímeros son aquellos que se sintetizan a partir de monómeros de origen natural y tienen en común con los primeros que también son altamente biodegradables y biocompatibles. De la gran variedad de biopolímeros de síntesis conocidos, los poliésteres lineales alifáticos son particularmente atractivos y muy usados, especialmente los que derivan de ácido láctido y de ácido glicólico, así como de sus copolímeros^{1, 2}. El gran interés en estos poliésteres como materiales biológicos podría ser

atribuido a su gran biocompatibilidad, biodegradabilidad y sus buenas propiedades mecánicas³ (como maleabilidad, compresión, deformación, dureza, porosidad, etc).

Con los biopolímeros naturales o de origen natural se tiene la opción de reemplazar los plásticos producidos a partir de petróleo por los producidos a partir de materias primas autóctonas de Latinoamérica, como la remolacha y el maíz. Tales reemplazos están dados por las características relacionadas con las propiedades de barrera, mecánicas y térmicas de estos polímeros naturales. Algunas aplicaciones específicas, están destinadas a la protección de alimentos y otros usos agroindustriales.

1.3 Líquidos Iónicos (LIs)

Se pueden definir como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de 100°C. La diferencia de éstos con las sales fundidas, es el amplio intervalo de temperatura (10-300°C) en el que se presentan líquidos.

Respecto a su composición química, de forma general, se puede decir que están compuestos por un catión orgánico (tetraalquilamonio, tetraalquilfosfonio, N-alquilpiridina y N, N'-dialquilimidazolio) y un anión inorgánico poliatómico (hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis{(trifluorometil)sulfonil}imida, trifluoroacetato, triflato).⁴

En los últimos años los LI han suscitado un gran interés, tanto en la investigación científica como entre los más diversos sectores tecnológicos e industriales; los LIs se han convertido en un elemento clave para los más diversos campos de la ciencia, entre los que destacan la "Química verde", la Electroquímica y los Nanomateriales.

Debido a su naturaleza iónica e híbrida orgánico-inorgánica, son buenos disolventes tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos, incluyendo sales metálicas, presentan una muy baja presión de vapor por lo que se les considera disolventes no volátiles, no son flamables y presentan una excelente estabilidad térmica superior a los 450°C en algunos

casos, y un alto calor específico, elevada conductividad iónica, alta estabilidad química. Esto hace de ellos una alternativa ambientalmente atractiva comparada con los solventes orgánicos volátiles convencionales. Una de las principales propiedades de los LIs es su alta polaridad, debido a la cual, presentan una gran capacidad de solvatación de todo tipo de compuestos polares. Además se ha demostrado que en los LI numerosas enzimas tienen actividad, entre ellas las lipasas, aun siendo disolventes relativamente polares.⁵

Los casos más investigados consisten en la utilización de los LIs como disolvente en procesos de síntesis y las propiedades fisicoquímicas de los LIs dependen tanto de la naturaleza química como del tamaño de los iones que los constituyen.

1. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- » Llevar a cabo la polimerización enzimática por apertura de anillo del L-Láctido en diversos LI de diferente viscosidad, usando la lipasa B de *Candida antarctica* en su forma inmovilizada.

2.2 PARTICULARES

- » Evaluar las relaciones de concentración de L-LA:LI y tipo de LI en la obtención del polímero.
- » Observar el efecto de los tres LIs con diferente viscosidad y que tienen en común el catión 1-butil-3-metilimidazolio al llevar a cabo la síntesis del polímero.
- » Conocer el efecto del uso del biocatalizador en el rendimiento de obtención del polímero.
- » Proporcionar la distribución de pesos moleculares de las muestras y los índices de polidispersidad por medio de cromatografía de líquidos empleando columnas de exclusión de tamaño.
- » Caracterización de la estructura molecular de los materiales por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón.
- » Evaluar el medio dióxido de carbono supercrítico como fluido para purificación “verde” de los materiales.

1. ANTECEDENTES

3.1 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA

La polimerización enzimática ha ganado una importancia considerable en los últimos años como un nuevo método de síntesis de polímeros, ya que con ayuda de las enzimas se pueden obtener materiales poliméricos difíciles de lograr con los métodos convencionales, que además son poco favorables para el medio ambiente.⁶

La acción de las enzimas se caracteriza por la formación de un complejo entre la enzima y un primer sustrato, dando lugar a un estado de transición. Seguidamente el complejo enzima sustrato puede reaccionar con otro sustrato generándose así el producto de la reacción y liberándose de nuevo la enzima:



La unión entre la enzima y el sustrato ocurre a través de interacciones débiles en un sitio específico de la enzima denominado "centro activo" que está constituido por una serie de residuos de aminoácidos capaces de interactuar con el sustrato.

Las enzimas actúan naturalmente como catalizadores biológicos, por lo que su acción se da en medios acuosos y en condiciones muy suaves de presión, temperatura y pH (en la mayoría de los casos).

Como se mencionó, las enzimas trabajan en medios acuosos, por lo que necesitan una pequeña cantidad de agua para retener su estado conformacional tridimensional activo y poder interactuar con el sustrato. En los solventes orgánicos este ambiente acuoso se reduce a un microambiente que es conformado por el agua retenida por la enzima. La cantidad necesaria de agua varía significativamente dependiendo del origen de la enzima y del tipo de reacción.^{7,8}

Las lipasas son enzimas del tipo hidrolasas que actúan sobre el enlace éster de los acilglicéridos, debido a que su reacción es reversible pueden efectuar reacciones tanto de hidrólisis como de síntesis en función del potencial químico de las especies presentes.

Además de los animales y las plantas, varios microorganismos (naturales o genéticamente modificados) son capaces de sintetizarlas de forma endógena o exógena.⁹

Estas enzimas se utilizan ampliamente en la industria, tienen gran versatilidad y son de las más estudiadas y conocidas. Se sabe que las lipasas son estables en solventes orgánicos (medios no convencionales), manteniendo una alta actividad catalítica en medios con bajo contenido de agua y se pueden utilizar como biocatalizadores de diversas reacciones orgánicas como la esterificación, transesterificación, hidrólisis, aminólisis, politransesterificación o poliesterificación. Esta catálisis específica permite la producción de policarbonatos y poliésteres por varios modos de polimerización,¹⁰ ya que acepta un amplio rango de sustratos incluyendo lactonas para producir diversos ésteres. La polimerización catalizada por lipasas ha sido una de las aplicaciones más atractivas en el campo industrial en los últimos tiempos, ya que los poliésteres polimerizados enzimáticamente se espera sean potencialmente biodegradables.¹¹

La cepa de la *Candida antarctica* es capaz de producir dos distintas lipasas denominadas A y B. La estructura de la lipasa B de *Candida antártica*, se muestra en la Figura 1. La diferencia entre ambas lipasas está en que la A es no específica, es dependiente del calcio y de alta termoestabilidad; por el contrario, la lipasa B es independiente del calcio y es menos termoestable.¹² Básicamente todas las lipasas tienen una estructura básica común, compuesta por una lámina β central formada por más de 8 hebras β paralelas y unidas entre sí por más de 6 hélices α . La lipasa de *Candida antarctica* fracción B es un biocatalizador eficaz por su amplia especificidad hacia el sustrato. Ha demostrado gran actividad catalítica para una gran variedad de ésteres,

amidas y tioles en medios no convencionales. Los aminoácidos que componen su centro activo son una triada catalítica, Ser105-His224-Asp187, común a todas las serinas hidrolasas. El residuo nucleofílico de la Ser se localiza en el carbono terminal de la hebra $\beta 5$ en un pentapéptido GX SXG altamente protegido, formando una estructura característica tipo β -giro- α , llamado "codo nucleofílico".¹³



Figura 1. Lipasa B de *Candida antarctica*.

Generalmente el centro activo de las lipasas no está disponible para interactuar con el sustrato, ya que está recubierto de un bucle que lo hace totalmente inaccesible al disolvente, por lo cual requiere una "activación interfacial", la cual consiste en que durante el contacto con la interfase líquido/agua, el bucle sigue un reordenamiento conformacional, descubriendo el centro activo. Con este respecto, la lipasa de *Candida antarctica* no posee un bucle convencional, sino más bien una hélice de gran movilidad que actúa como tal, y la estructura parece estar en una conformación abierta con el centro activo accesible.¹⁴

3.2 MEDIOS NO CONVENCIONALES EN BIOCATÁLISIS

El medio acuoso se define como el "medio convencional" donde las enzimas desarrollan su acción naturalmente. Cuando se emplea el término "medios no convencionales" se hace referencia a medios no acuosos.

Las enzimas presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores. Además, por lo general las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves, como temperatura ambiente y pH neutro. Las enzimas son capaces de aumentar las velocidades de reacción E12 veces, además de que se consideran menos peligrosas, no contaminantes y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales. Sin embargo, en este sentido el medio convencional en el que generalmente actúan las enzimas, también conlleva ciertas desventajas. La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas como hidrólisis, racemización, entre otras, el agua es un solvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización, además, puede dar lugar a reacciones de desactivación enzimática irreversible.¹⁵

Se ha comprobado experimentalmente que determinadas lipasas funcionan como catalizadores en un medio prácticamente anhidro y que esta deshidratación les hace adquirir nuevas propiedades, aumentando su termoestabilidad y selectividad.¹⁶

Hace muchos años que ha crecido el interés en la utilización de disolventes no acuosos en reacciones biocatalíticas, entre los que destacan los disolventes orgánicos, que desde la década de los 70's en que se comprobó que altas proporciones de agua/líquido orgánico inmiscible eran compatibles con buena actividad de los biocatalizadores. Los medios orgánicos presentan la ventaja de permitir el desarrollo de procesos que, ya sea

por factores cinéticos o termodinámicos, son totalmente imposibles de realizar en medios acuosos.

La elección del disolvente orgánico adecuado debe hacerse considerando una serie de factores, dado que en todos los sistemas biocatalíticos que contienen un disolvente, la naturaleza del mismo influye considerablemente sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas. Un factor de gran importancia es su constante dieléctrica, ya que un aumento en la constante del medio implica un aumento de las interacciones electrostáticas con los residuos cargados de la enzima, lo que puede conducir a la pérdida de flexibilidad interna de esta última. Si los cambios en la constante dieléctrica son lo suficientemente grandes como para modificar el pK de todos los residuos ionizables en la superficie de la enzima, situados cerca o en el centro activo, la unión y/o la conversión de los sustratos se puede ver alterada. Finalmente, si este cambio es drástico, se puede llegar a afectar la estructura tridimensional de la enzima de forma irreversible, provocando su desactivación. No todas las enzimas responden de la misma manera al ser suspendidas en medios no acuosos y este hecho parece estar fuertemente relacionado con la capacidad del medio para separar las moléculas de agua de la superficie proteica.¹⁶

A pesar de las ventajas que presenta el medio orgánico frente al medio acuoso se han detectado problemas en el momento de recuperar los productos, pues se requieren operaciones posteriores de purificación, además de los efectos negativos del disolvente sobre la actividad y estabilidad de las enzimas. Otros inconvenientes son su inflamabilidad y toxicidad, por lo que deben ser exploradas otras alternativas que permitan su sustitución cuando sea posible.

De esta forma, se llega a los LI y el dióxido de carbono supercrítico, los cuales se han revelado recientemente como prometedores disolventes, compatibles con el medio

ambiente, alternativos a los disolventes orgánicos convencionales en procesos de catálisis enzimática; de ellos se comentará más adelante.^{17, 18}

3.3 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Con la inmovilización de enzimas (Figura 2) se han podido superar algunos inconvenientes, como la utilización de enzimas bajo condiciones de reacción diferentes a las convencionales, la reutilización de las mismas, entre otros; permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente, es un proceso en el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos o células, por su unión a un soporte.¹⁹

Dentro de las ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se pueden mencionar; el aumento de la estabilidad de las enzimas, la posible reutilización del derivado (por lo que disminuyen costos del proceso), la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.²⁰ Este método también puede presentar algunos inconvenientes como por ejemplo: la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte, suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización y que el biocatalizador es más caro que la enzima nativa.²¹

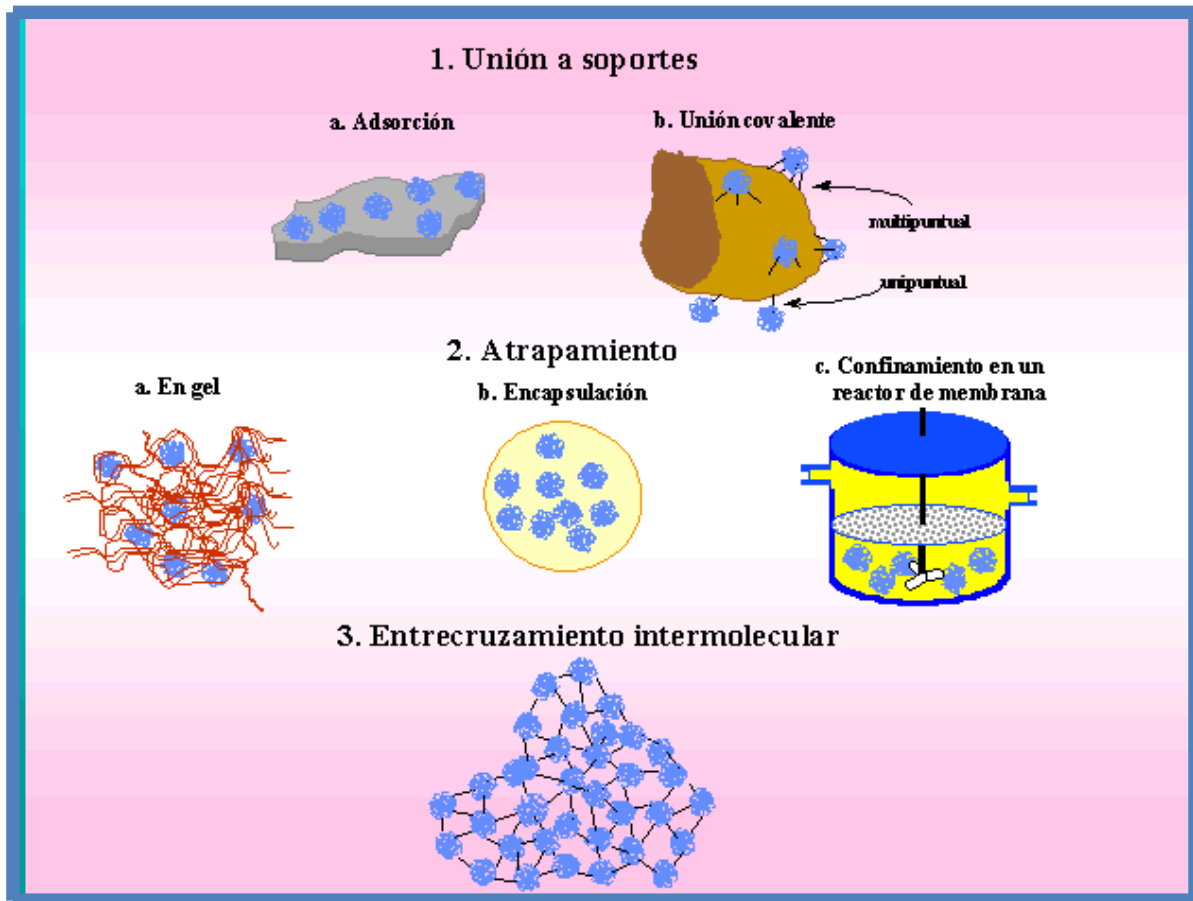


Figura 2. Tipos de inmovilización de enzimas.
(Fuente: "Sólidos inorgánicos para la inmovilización de enzimas con aplicaciones industriales", Profra: María Luisa Rojas Cervantes)

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos categorías: Retención física y unión química.

En el caso de la inmovilización por retención física esta el método de atrapamiento, el cual consiste en la retención de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. Igualmente se utiliza el método de inclusión en membranas, la cual está dividida en dos etapas: Microencapsulación, donde las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Y Reactores de membrana o sistemas que contengan enzimas atrapadas, estos reactores

emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y por definición impermeables a la enzima.²⁹

Dentro de los métodos por unión química los que están basados en la unión a soportes; son los más utilizados. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador; se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibilidades de contaminaciones microbianas, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para poder ser reutilizado. Los soportes pueden clasificarse en inorgánicos: naturales (arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice, entre otras) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc) y soportes orgánicos que se clasifican en polímeros naturales, divididos a su vez en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosan, etc) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina, entre otros); y polímeros sintéticos divididos en poliolefinas (como poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc) y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc). Dentro de la unión a soportes se puede hablar de unión covalente a un soporte, basada en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Las ventajas de este método son que la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla y la carga de la enzima permanece constante. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado y hay una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH. Los inconvenientes son la necesidad de conocer la densidad de los grupos activos por unidad de superficie, pues condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro

activo, para ello se usa un inhibidor que bloquee el centro activo, finalmente la inmovilización covalente no es aconsejable en enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

Por otra parte el reticulado, también denominado entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima, resultando enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.²⁹

Hay algunos efectos de la inmovilización que son relevantes, tal como lo es la alteración significativa del comportamiento de la enzima por cambios en su estabilidad; ²⁴ la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interface, como consecuencia, la actividad se ve afectada por efectos de tipo difusión, estérico y del microentorno.

Debido a que las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas; son analíticas (biosensores), médicas (tratamientos con enzimas inmovilizadas), e industriales (en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos) y considerando que las enzimas son comúnmente usadas en la industria en forma inmovilizada, se ha estado desarrollando una estrategia llamada "Ingeniería Conformacional", la cual está basada en los dramáticos cambios estructurales que las lipasas sufren durante la catálisis (activación interfacial). Ésta se basa en el hecho de que el uso de las diferentes técnicas de inmovilización, involucrando diferentes orientaciones, diferentes niveles de rigidez (unión covalente) o incluso generando un especial microambiente alrededor de la enzima (adsorción iónica), puede producir alteración del sitio activo provocando esto una alteración en las propiedades catalíticas, especialmente en

la selectividad. Por ejemplo la aplicación de 4 métodos distintos de inmovilización sobre CAL-B parece que da lugar a distinta orientación, microambiente y rigidez en cada caso (Figura 3).

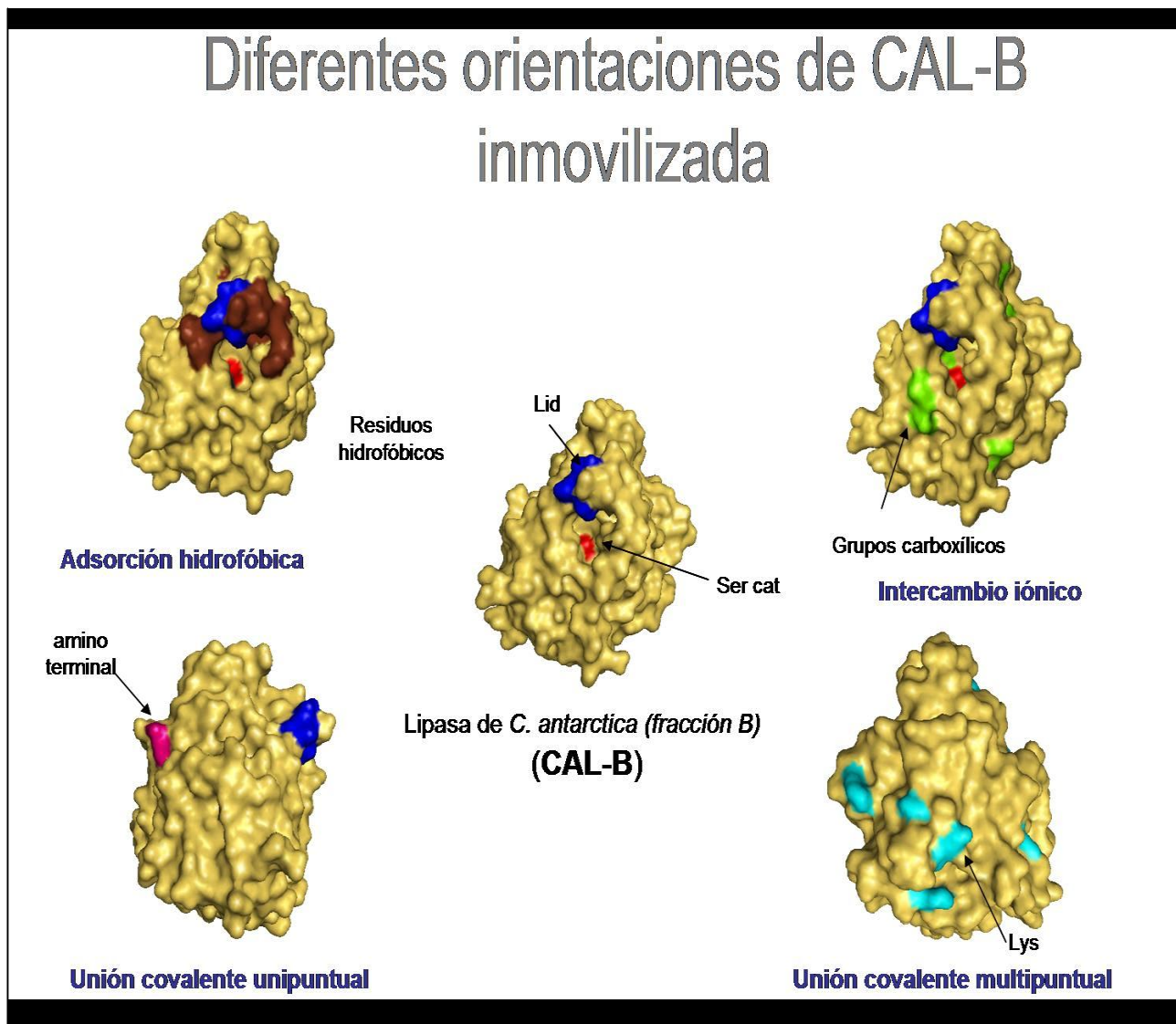


Figura 3. Algunos efectos de orientaciones de CAL-B inmovilizada causados por diferentes métodos de inmovilización.
(Fuente: Publicaciones seleccionadas: Palomo, J. M., et al., 2003, Cabrera, Z., et al., 2007)

3.4 SÍNTESIS DE POLÍMERO POR APERTURA DE ANILLO.

La polimerización por apertura de anillo es un tipo de polimerización en la cual el monómero cíclico es convertido en un polímero lineal.

Este tipo de síntesis es muy utilizado en biocatálisis de lactonas siendo catalizada por sales inorgánicas y se lleva a cabo por tres mecanismos distintos: aniónico, catiónico o por mecanismos de coordinación inserción.

El mecanismo catiónico se da con la formación de cationes que son atacados por el monómero, desencadenando la reacción de polimerización; este mecanismo tiene una cinética que dificulta poder controlarla fácilmente y sólo permite la formación de polímeros de bajo peso molecular. Por otro lado, la polimerización por coordinación-inserción, es un proceso ligeramente más complejo y con el cual se obtiene menor racemización y polímeros de mayor peso molecular.^{1,2}

En la Figura 4 se muestra el esquema de reacción de la polimerización del L-LA.

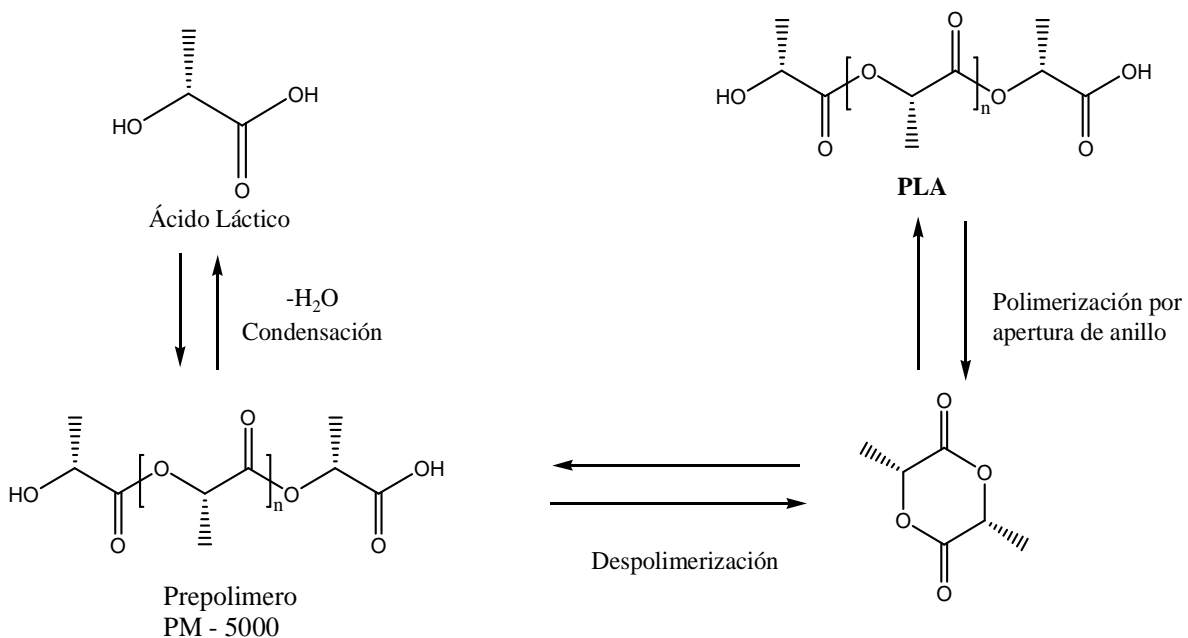


Figura 4. Esquema de producción de PLA por apertura de anillo.

3.5 FORMACIÓN DEL L-LA

Los polímeros sintéticos están siendo gradualmente reemplazados por materiales biodegradables específicamente de fuentes naturales en algunas aplicaciones, como puede ser el embalaje y conservación de alimentos o en biomedicina. Más que el origen, la estructura química de los biopolímeros es la que determina la biodegradabilidad. El uso de tales biopolímeros presenta un gran potencial económico y benéfico en el área de los empaques, dada la similitud de los materiales naturales con los sintéticos por sus excelentes propiedades mecánicas, de barrera y transmisión de luz. La innovación en técnicas de conservación e integridad estructural de los alimentos, así como la completa biodegradación deben ser adaptadas a los constituyentes de los bio-empaques. Cabe destacar el hecho de que la mayoría de estos empaques han sido aprobados por la FDA. En la Figura 5 se muestra la síntesis de poli-L-Lláctido a partir de ácido láctico.

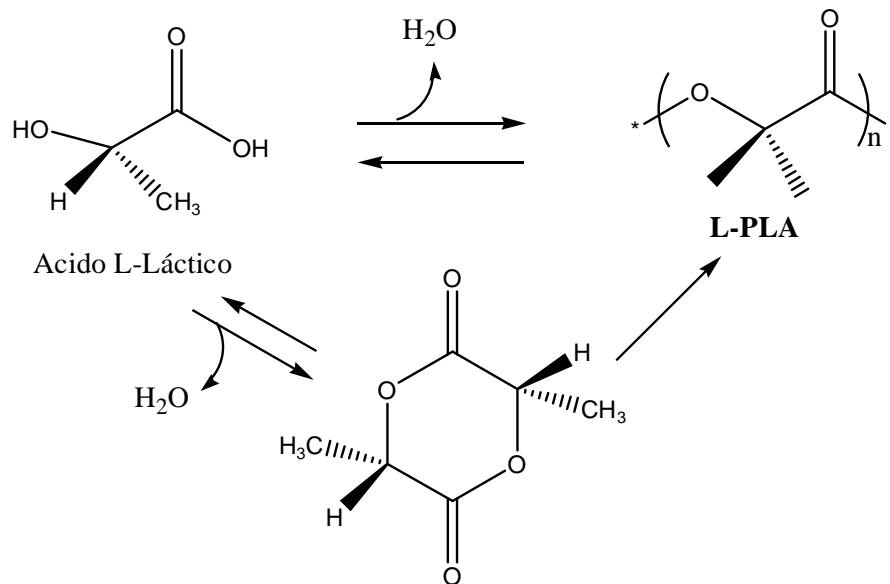


Figura 5. Obtención del PLA.

Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes:

- a) Origen animal (colágeno/ gelatina),
- b) Origen marino (de crustáceos y moluscos: quitina/quitosan),
- c) Origen agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y
- d) Origen microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxicanoatos (PHA))

En la figura 6 se muestra un esquema de los diferentes orígenes de los biopolímeros.

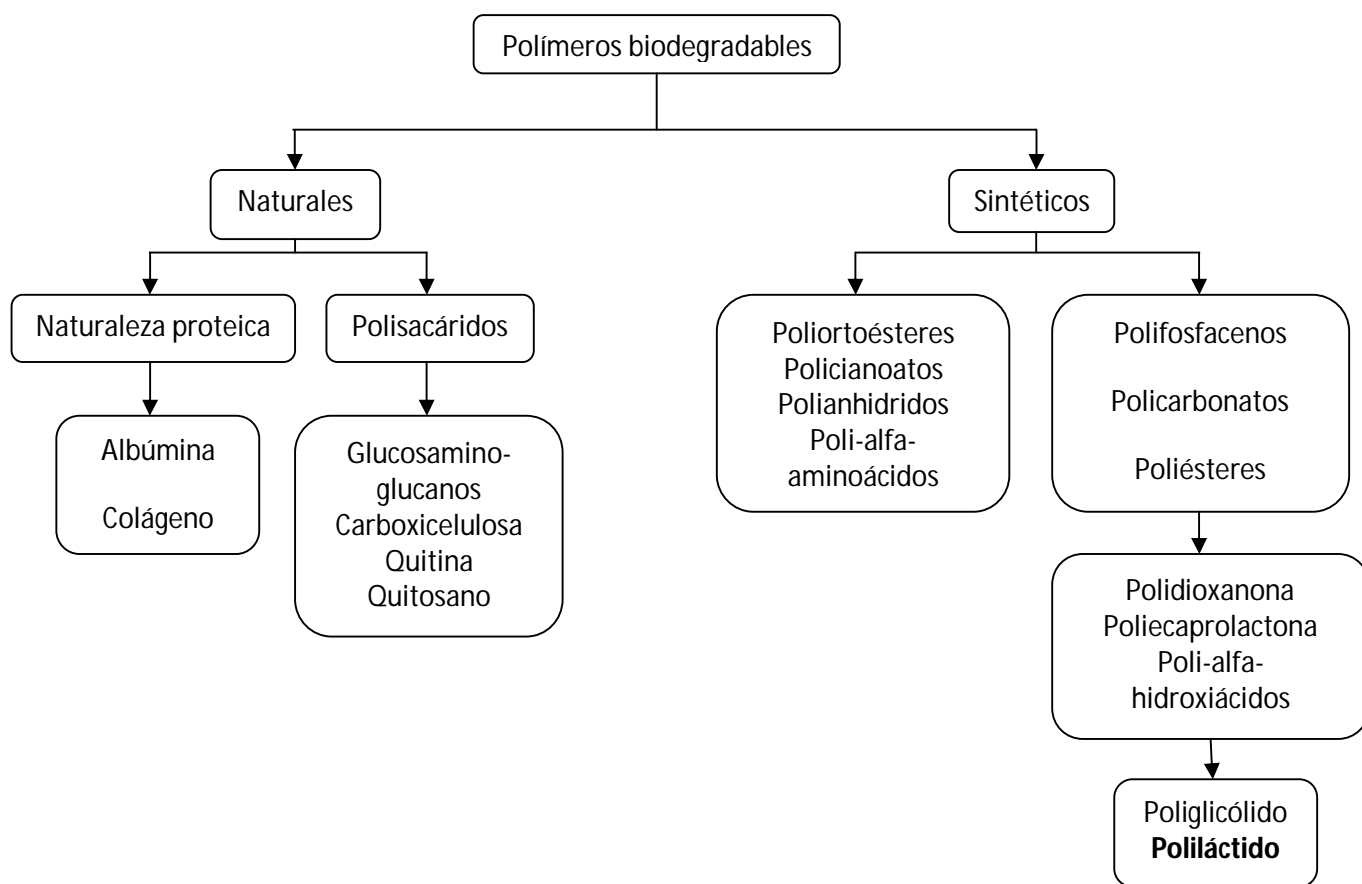


Figura 6. Fuentes de polímeros biodegradables.

El ácido poliláctido está formado por la condensación de dos moléculas de láctico (Figura 7), es un polímero alifático muy versátil, termoplástico, biodegradable y biocompatible que proviene de recursos renovables tales como el almidón y el azúcar, reemplazando así el uso de los derivados de petróleo como materia prima.

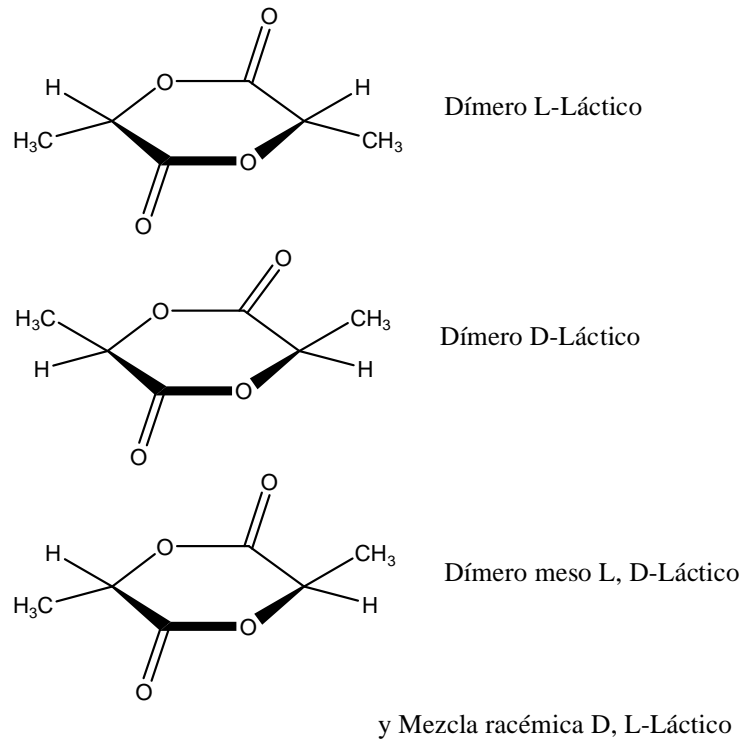


Figura 7. Isómeros del Láctico

El PLA puede ser preparado por condensación directa de ácido láctico o por polimerización por apertura de anillo de los dímeros del láctido. Debido a que la ruta de condensación directa presenta problemas de remoción de agua durante las últimas etapas de polimerización limita la obtención del polímero pues produce polímeros de bajo peso molecular.²⁵

3.5.1 OBTENCIÓN DEL L-LA

El ácido láctico es producido por medio de la fermentación de carbohidratos usando microorganismos homolácticos del género *Lactobacillus*, para lo cual, según la cepa se obtienen los isómeros del ácido láctico (Figura 7), L o D. De esta manera se producen 1.8 moles de ácido láctico por cada mol de glucosa, pero también se pueden usar como fuentes de carbono la maltosa, dextrinas o sacarosa, las cuales proceden de fuentes como el maíz, la papa o la caña.²⁶

Durante la etapa final de la fermentación, se separa el ácido láctico por medio de una reacción ácido-base agregando hidróxido de calcio, para producir lactato de calcio, el cual es filtrado para retirar la biomasa. Posteriormente se evapora el agua, se recristaliza y acidifica con ácido sulfúrico, para obtener el ácido láctico y sulfato de calcio que es filtrado.

Teniendo el ácido láctico, éste se condensa de manera continua en un medio acuoso, con lo que se obtiene el polímero de bajo peso molecular y que se someterá a reacciones de ciclización intramolecular y finalmente será purificado mediante una destilación al vacío.²⁷

El ácido láctido es el dímero cíclico del ácido láctico, se produce por la condensación continua del ácido láctico acuoso. Con estas reacciones se produce un polímero de bajo peso molecular, el cual contiene una mezcla de estereoisómeros: L, D y la mezcla racémica de ambos.^{27, 28}

3.6 LIQUIDOS IONICOS

La mayor ventaja de los LI es su presión de vapor prácticamente nula, además presentan una alta estabilidad química y térmica.

Los primeros LIs estaban basados en nitratos de alquilamonio, se prepararon mediante la adición de ácido nítrico a alquilaminas, con lo que se puede decir que un método simple para la obtención de los LI es la protonación de determinados compuestos tales como aminas y fosfinas, sin embargo este método solo puede ser utilizado para un pequeño número de sales, ya que muchas descomponen cuando ocurre su desprotonación.

Podemos hablar de dos etapas para la obtención de un LI, la primera es la formación del catión que constituirá el líquido iónico, mediante reacciones de cuaternización

(protonación con un ácido o por cuaternización de una amina o fosfina, con un haloalcano) y la reacción de intercambio iónico (las que consisten en tratamiento directo de las sales de haluro con ácidos de Lewis y las que se conocen como reacciones de metátesis aniónica) que generará el producto deseado. La primera etapa solo es necesaria para algunas síntesis, ya que en general el catión se puede adquirir de forma comercial a un costo razonable. Las sales de alquilpiridinio han sido sustituidas por las sales de imidazolio, alquilamonio o pirroles (Figura 8 y 9).³⁰

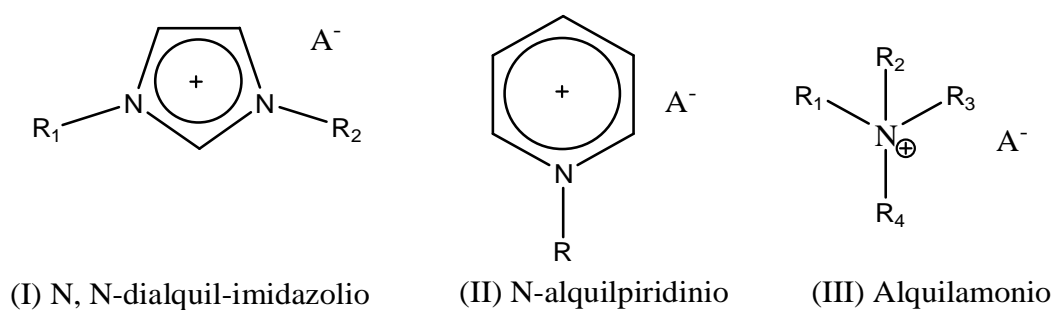


Figura 8. Tipos de cationes de Lls.

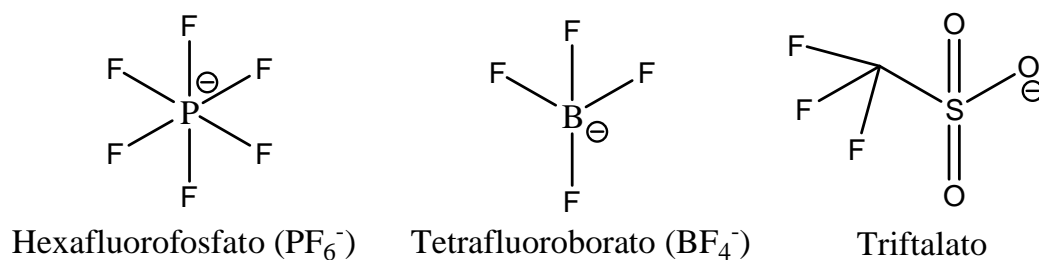


Figura 9. Tipos de aniones en Lls.

3.6.1 PROPIEDADES

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la posibilidad de modular sus propiedades físicas y químicas variando la naturaleza de los cationes y aniones presentes en sus estructuras específicas es lo que los hace tan peculiares y atractivos, además de las características que se mencionan a continuación:

Baja presión de vapor- la ausencia del fenómeno de evaporación hace que sean fácilmente manejables, además, hace posible la recuperación de los productos o sustratos disueltos en ellos durante los procesos por medio de una destilación.

Estabilidad térmica- El límite superior de temperatura está determinado normalmente por la temperatura de descomposición térmica del mismo, que normalmente se encuentra entre 350 y 400°C en LI que contienen cationes orgánicos.

Estabilidad química- Los basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio son compuestos no inflamables y químicamente inertes; los basados en cloro-aluminatos son muy sensibles a la humedad, muchos complejos de metales de transición y sustratos orgánicos no son inertes a los cloro-aluminatos, pudiendo reaccionar con ellos.³⁰

Bajo punto de fusión- En algunos casos puede ser de -100°C. Depende de forma muy importante del tamaño del líquido iónico, de su simetría, de su carga y de la distribución de la misma, así, al aumentar el tamaño del anión y del catión disminuye el punto de fusión. En relación a la dependencia del punto de fusión con la carga se puede decir, de forma general, que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de carga conducen a un aumento del punto de fusión.

Densidad superior a la del agua- varían entre 1.12 g/cm³ y 2.24 g/cm³. Para el caso de los cationes, la densidad aumenta cuando el tamaño del anión se incrementa. Cabe destacar que esta es la propiedad física menos sensible a la variación de la temperatura.

Viscosidad elevada- En general, los LI tienen una viscosidad mayor que la de los disolventes moleculares convencionales y está comprendida entre 10-500cP; siendo que la del agua a temperatura ambiente es de 0.890cP. La viscosidad presenta una marcada dependencia con la temperatura y se afecta por la presencia de impurezas que contenga el líquido iónico. Para el mismo catión, el cambio del anión afecta de manera muy importante a la viscosidad; los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo, así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de Van Der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. Aunque la influencia del catión en la viscosidad es menor, se ha observado que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas muy ramificadas.

Propiedades electroquímicas- Son buenos disolventes en procesos electroquímicos, por su estabilidad a la oxidación/reducción, resistiendo un amplio rango de potenciales y relativamente buena conductividad eléctrica.^{29, 31}

pH variable- Pueden encontrarse LI ácidos, neutros o básicos.

Color- Incoloros en estado puro, aunque a veces presentan ciertas tonalidades.

Elevado poder de disolución- Son considerados como disolventes polares. Su polaridad suele ser intermedia entre la del agua y la de los disolventes orgánicos clorados y varía dependiendo de la naturaleza del líquido iónico.²⁹

Solubilidad de gases- Es generalmente buena para gases como H₂, CO y O₂. Son atractivos disolventes para hidrogenaciones catalíticas, carbonilaciones, hidroformilaciones y oxidaciones aeróbicas.

Hidrofilicidad/hidrofobicidad- Todos los LI son higroscópicos, depende en gran medida de la naturaleza del anión, debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre éste y el agua; el catión tiene un efecto secundario en esta propiedad.

Toxicidad y biodegradabilidad- La mayoría de los LI investigados son irritantes y tienen una toxicidad comparable a los disolventes orgánicos convencionales, sin embargo algunos estudios han mostrado que es posible el diseño de LI no tóxicos mediante la adecuada selección del catión y el anión, aunque aparentemente la toxicidad está determinada fundamentalmente por el catión.³⁰

Aunque este tipo de líquidos, no son completamente favorables para el medio ambiente, si se puede afirmar que es notable la reducción en la generación de residuos después de las evaporaciones por la posibilidad de ser reutilizados y también se favorece el ahorro de energía gracias a la fácil recuperación de estos productos.

3.6.2 LI EN REACCIONES DE BIOCATÁLISIS

Durante los últimos 10 años, el empleo de los LI en las reacciones enzimáticas está atrayendo un enorme interés, ya que están apareciendo como los sustitutos más adecuados a los disolventes orgánicos al no causar problemas de desactivación enzimática y evitar los efectos medioambientales derivados de la alta volatilidad.

Las lipasas, que poseen una importante tolerancia a los medios no acuosos, se muestran como las candidatas más próximas y convenientes a ser utilizadas en LI. Las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en LI transcurren con eficacia y de las que más se han estudiado son la lipasa B de *Candida antarctica*, termolisina, lipasas de *Pseudomonas cepacia* (PCLnativa) y *Pseudomonas fluorescens* (AK).

3.7 FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS

En función de las condiciones de presión y temperatura, la materia puede encontrarse en tres estados: sólido, líquido o gaseoso; pero desde hace algún tiempo se han introducido a esta lista dos nuevos estados, el plasma y los fluidos supercríticos.

El plasma se define como un gas ionizado compuesto por electrones, protones y neutrones libres. Se puede obtener por calentamiento de un gas o sometiendo el mismo a grandes campos magnéticos. El 99% de la materia del universo se encuentra en dicho estado (e.g. el Sol).

Si consideramos el fenómeno de expansión térmica de un líquido hasta llegar a su temperatura de ebullición y el proceso de evaporación, la densidad del líquido disminuirá mientras que la del gas aumentará. Si se continúa con el proceso se llega a un punto en el que las densidades de ambas fases se hacen iguales y no es posible diferenciar la fase líquida de la gaseosa, a ese punto se le llama "punto crítico", el cual se caracteriza por una presión, temperatura y volumen molar críticos (P_c , T_c y V_{mc}). El punto de corte en un diagrama de fases, entre las tres líneas, se denomina "punto triple" y representa las condiciones en las que coexisten las tres fases. El punto crítico se sitúa al final de la línea de equilibrio líquido-gas, y cuando se superan esas condiciones se le denomina "Fluido supercrítico (FSC)".

En estado supercrítico se puede variar la densidad modificando las condiciones, pues en esta zona, la densidad aumenta continuamente. En dicho estado, la materia es compresible y se comporta como un gas, aunque tiene una densidad similar a la de los líquidos (0.1-1.0 g/cm³). Entonces, el poder disolvente de una sustancia en estado supercrítico, depende directamente de su densidad, ergo de su presión y temperatura.²⁹

En el caso del CO₂, sus parámetros críticos son relativamente fáciles de alcanzar, son 31.3°C y 72.9 bar. Aunado a esto, su facilidad de transporte, lo convierte en una opción notablemente barata y segura, en comparación con el resto de los FSCs; así también, se ha hecho de los más utilizados en el mundo por su no-toxicidad, y por no generar residuos. Ofrece muy buenas características como disolvente por su baja reactividad, alta densidad, gran poder de solvatación, baja viscosidad, alta difusividad y baja tensión superficial. También tiene ciertas desventajas como son: su baja constante dieléctrica (problemas para disolver sustratos polares), es un ácido de Lewis (puede reaccionar con bases fuertes), es denso, produce bajos pH's (aprox. 2.85), en presencia de agua forman H₂CO₃ y en presencia de metales nobles puede reducirse a CO.

3.8 SISTEMA BIFÁSICO LÍQUIDO IÓNICO/DIÓXIDO DE CARBONO SC

El éxito de estos sistemas bifásicos está basado en la alta solubilidad del scCO₂ en el LI, que está controlada por la presión y la insolubilidad del monómero en scCO₂. A diferencia de los disolventes orgánicos moleculares; la combinación de las buenas propiedades por parte de los LI como disolventes donde llevar a cabo numerosas reacciones y las buenas cualidades del scCO₂ como agente de extracción, permiten realizar cualquier reacción en un líquido iónico y recuperar los productos disueltos en el CO₂ de una forma sencilla, rápida y limpia.

Recientemente se ha demostrado la posibilidad de llevar a cabo procesos biocatalíticos en estos sistemas bifásicos, por las características mencionadas y mientras que la enzima, libre o inmovilizada, se pueda separar del líquido iónico mediante un proceso de filtración.

También se ha demostrado que en este tipo de sistemas se pueden llevar a cabo reacciones enzimáticas en condiciones extremas (150°C y 100 bar) con buenas

velocidades de reacción y altas selectividades, esto puede atribuirse a que el líquido iónico es capaz de proporcionar el microambiente necesario para la acción catalítica de la enzima y al mismo tiempo actuar como soporte de inmovilización, contribuyendo a mantener la conformación activa de la misma ante el potencial de desnaturalización de condiciones tan extremas. ³¹

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

- » Enzima Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre soporte acrílico poroso Lewatit® (Lanxess): Novozym® 435
- » Monómeros: L-láctido ((3S)-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), 98 % (Aldrich) y glicólido 99% (Sigma).
- » LI: 1-Butil-3-metilimidazolio hexafluoro fosfato ([BMIM][PF₆]), 97 % (Aldrich) y 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoro borato ([BMIM][BF₄]), 96 % (Fluka), 1-butil-3-metilimidazolio bi-trifluorometil, sulfonil imida ([BMIM][NTf₂]), 98%.
- » Metanol, grado industrial (Química Barsa).
- » Cloroformo, grado industrial (Química Barsa).
- » Glicerina grado industrial (Química Barsa).
- » Tanque de bióxido de carbono grado industrial (PRAXAIR, México)
- » Frascos viales.
- » Baño de Glicerina.
- » Parrilla con temperatura y agitación controlada, IKA RTC basic ETS-D4.
- » Agitadores magnéticos en forma de cruz.
- » Balanza analítica, marca Ohaus, modelo AP2105.
- » Congelador REVCO a -78 °C.
- » Liofilizador, marca Heto, modelo FD10 CT6Oe.
- » Bomba de vacío (diafragma) intermedio Millipore.
- » Equipo Millipore, con filtro de membrana de 0.22 µm.
- » Bomba de vacío para solventes, marca Vacuubrand modelo PC3-RZS2.5 con condensador de volátiles incorporado para hielo seco/acetona.

4.3 EQUIPOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZACIÓN

- » Cromatógrafo de líquidos HP 1050 con autosampler. Equipado con columnas de permeación en gel (GPC/SEC) y detector de difracción de luz evaporativa PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, EEUU). Fase móvil de cloroformo grado HPLC y se usaron estándares de poliestireno de polidispersidad muy estrecha como calibración.

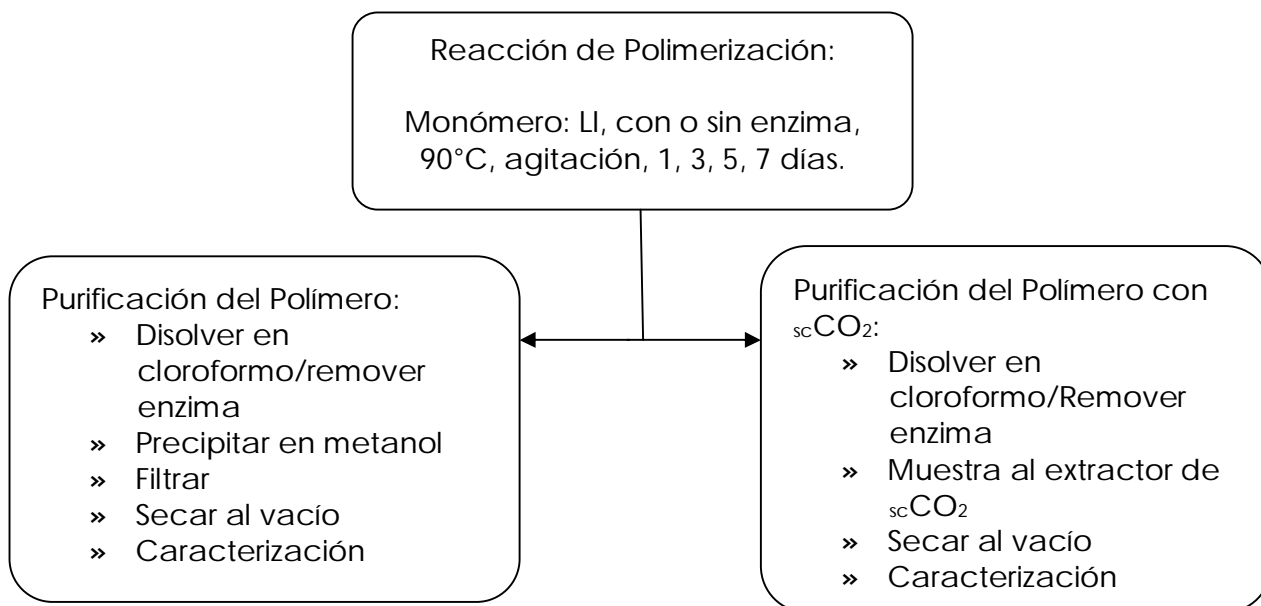
- » Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN), Varian Unidad Innova (400 MHz). Este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química de la UNAM. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado.

- » Equipo de difracción de rayos X, Siemens D-5000, $k\alpha$ radiación de Cu. Este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI). Facultad de Química, UNAM.

- » Extractora de alta presión de Supercritical Fluid Technologies, Inc., Newark, Del., USA (SFT-250, SFE/SFR System).

- » Reómetro de deformación controlada ARES-RFS III (TA Instruments, EUA). Este análisis fue realizado por el laboratorio 313 Conjunto E, Depto. de Reología, Facultad de Química, UNAM.

Esquema del procedimiento general



4.4 POLIMERIZACIÓN

Se prepararon muestras a las cuales se les varió la concentración del Monómero:Líquido iónico, como disolventes, se siguió una cinética de 1, 3, 5 y 7 días, un ejemplo se explica a detalle a continuación. Todas las reacciones se hicieron a 90 °C, debido a que esta es la temperatura óptima reportada por Chanfreau y col. ³².

- » Para las reacciones al 70% p/p L-LA/LI se prepararon 8 viales con muestras, para cada uno se pesaron 3.5 g de monómero L-láctido y 0.35g de biocatalizador Novozym® 435, 10% p/p con respecto al monómero (Experimentos sin enzima se realizaron de forma idéntica pero sin la adición del biocatalizador). Todas las muestras se taparon con papel aluminio perforado para permitir la evaporación posterior del agua. Estos viales se sometieron a congelación a -78°C durante dos horas, para posteriormente

someterlos a liofilización durante 2 horas. Concluido este tiempo a cada frasco vial se le agregaron 5 g del líquido iónico.

- » Posteriormente, las muestras se colocaron dentro de un baño de glicerina; dicho baño se colocó sobre una placa de calentamiento 90°C y con agitación magnética constante, utilizando una mosca en forma de cruz, estas fueron las condiciones a las que se dejaron seguir las diferentes cinéticas propuestas, de 1, 3, 5 y 7 días.

4.5 PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO OBTENIDO USANDO DISOLVENTES ORGANICOS

- » Transcurrido el tiempo de reacción al contenido del vial se le agregó cloroformo, y se sometió a agitación hasta disolver totalmente, luego, se filtró con un tamiz para remover la enzima (si contenía) y el agitador magnético, a continuación la enzima fue lavada y filtrada dos veces con cloroformo a fin de recuperar la mayor cantidad del polímero remanente.
- » La solución del polímero en cloroformo fue recristalizada en metanol a 5°C en una relación de volumen de 1:15, el polímero recristalizado se filtró en un equipo Millipore con un tamaño de poro de 0.22 µm, para eliminar la mayor cantidad posible de disolventes,
- » Finalmente el polímero fue secado con una bomba de alto vacío para eliminar las trazas de metanol.

Después de la purificación se calculó el rendimiento de la reacción, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = [(\text{Peso del polímero (g)} - \text{Peso del monómero (g)}) / \text{Peso del monómero (g)}] \times 100$$

- » Para las reacciones con una concentración del 100% monómero/líquido iónico, se siguió el mismo procedimiento, con la misma cinética.

- » Paralelamente se realizaron experimentos con el líquido iónico [BMIM][BF₄] siguiendo el mismo procedimiento a 90°C y agitación constante y controlada durante los periodos de tiempo establecidos, con y sin enzima.
- » También se utilizó el líquido iónico [BMIM][NTf₂] a 90°C, montando solamente dos reacciones, una a la concentración de 70% y la otra al 100%, ambas con enzima durante 11 días y siguiendo el resto del procedimiento que en los casos anteriores.
- » Una vez conociendo las condiciones de reacción más favorables (70 %, 90°C), éstas se reprodujeron, para purificar el polímero obtenido, mediante la extracción con scCO₂.
- » Obteniendo estos resultados, se procedió a la caracterización de las muestras por: CPG, 1H-RMN y Rayos X.

4.6 PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO OBTENIDO USANDO scCO₂

Los experimentos de extracción supercrítica con CO₂ se realizaron en un extractor de alta presión SFT-250 SFE/SFR (Supercritical Fluid Technology, Inc., Newark, Del., USA) con un vaso de extracción de 0,5 L (Fig 10). La muestra del material contenido en el vial después de la reacción fue purificada mediante disolución en cloroformo, a fin de separar la enzima por filtración, y posterior rotaevaporación del disolvente clorado, luego de esto se tomo una pequeña muestra para enviarla a 1H-RNM, el resto del material fue colocado en el vaso de extracción dentro de un saco de papel de celulosa ultra poroso. Luego de una purga de aire inicial, se estableció en el equipo el valor requerido de temperatura (40 °C) y presión (120 bar). Cuando la temperatura alcanzó el valor deseado, el CO₂ líquido fue bombeado hacia el vaso de extracción mediante una bomba de pistones (Haskel) hasta el valor requerido de presión. Hecho esto, se abrió la válvula restrictora o control de

caudal, momento a partir del cual se comenzó a tomar el tiempo del experimento que fue de 4 horas.

En la Figura 10, se muestra el ejemplo de un equipo básico para extracción con fluidos supercríticos.

Los residuos extraídos y el extracto que fue recuperado en el vaso colector se pasó a rotaevaporación para eliminar el disolvente clorado, finalmente se secó en la bomba de vacío para solventes y el material se dispuso para análisis de $^1\text{H-RMN}$.

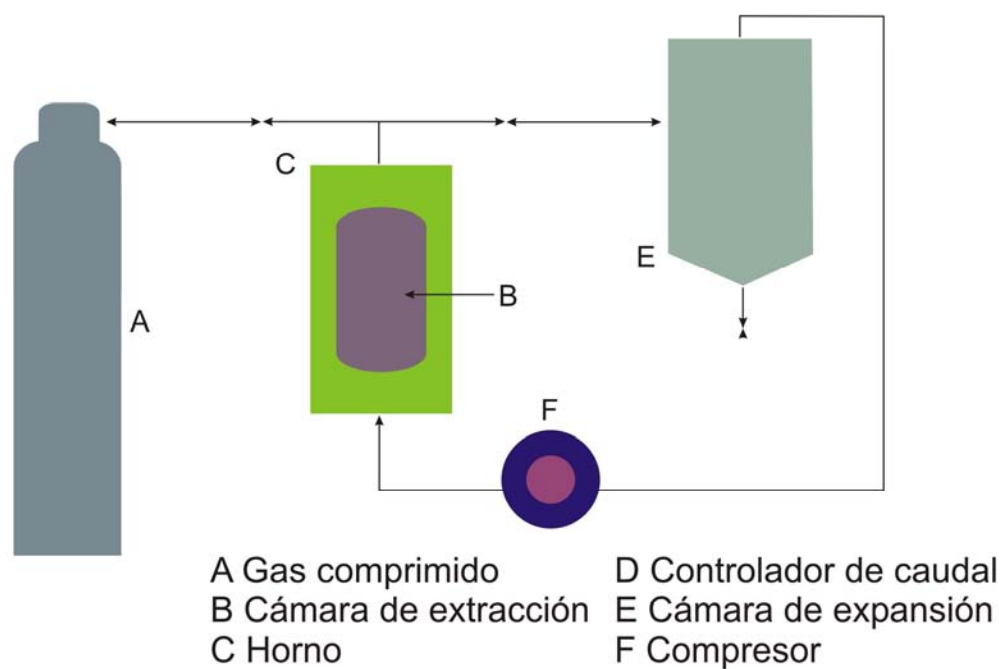


Figura 10. Esquema de un reactor de extracción supercrítica

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RENDIMIENTO DE PLLA

Se han llevado a cabo anteriormente en este laboratorio experimentos probando los líquidos iónicos 1-Butil-3-metil-imidazolio tetrafluoroborato, 1-Butil-3-metil-imidazolio hexafluorofosfato, 1,3- hexilmetilimidazolio hexafluorofosfato y 1-Butil-2,3-dimetilimidazolio hexafluorofosfato, para polimerizar láctido, glicólido, así como sus co-polímeros; en dichos experimentos se han probado las concentraciones de reacción y se llegó a demostrar que la mejor relación es utilizando 70 % p/p de L-LA y LI y una relación del 10% p/p de biocatalizador (Novozym 435) respecto al sustrato inicial (L-LA)³⁴.

Partiendo de esto, primero se realizaron pruebas con los LIs BMIMBF₄ y BMIMPF₆ para conocer el tiempo de reacción que permite la formación del polímero y al cual se detendrá la reacción, así como para saber con cuál de los dos se obtienen mejores rendimientos.

Tabla 1. Comparación de rendimientos obtenidos variando los LIs BMIMBF₄ y BMIMPF₆ a las condiciones de reacción: 70% p/p L-LA/LI

LI	Enzima (%)	Tiempo (días)	Promedio de rendimientos de PLA obtenidos (%)
BMIMBF ₄	10	11	25.52
BMIMBF ₄	0	11	21.62
BMIMPF ₆	10	7	55.40
BMIMPF ₆	0	7	57.07

De la Tabla 1, se puede observar la diferencia de los rendimientos obtenidos, siendo mayores casi el doble del valor al emplear el líquido iónico BMIMPF₆ a pesar de que se dejó llevar a cabo la polimerización por un periodo de tiempo mayor con el BMIMBF₄. Una posible explicación es que el LI BMIMBF₄ es considerado hidrofílico, de esta forma las moléculas de agua de la lipasa pueden estar disolviendo parte de éste y desfavoreciendo de esta manera la actividad catalítica. Sin embargo, el estudio de la reacción con este líquido iónico resultó de interés para evaluar la viscosidad del medio para reacciones de politransesterificación aún siendo hidrofílico. También es notable que la reacción de polimerización se lleva a cabo tanto en presencia como en ausencia de la enzima y con valores de rendimiento muy cercanos al agregar o no biocatalizador. Considerando que los rendimientos fueron mayores y en menor tiempo con BMIMPF₆ se continuo trabajando con éste. Para tener la cinética completa y complementar el análisis se realizaron pruebas con y sin enzima, a 1, 3, 5 y 7 días, para poder observar la evolución de la reacción y posteriormente caracterizarlos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

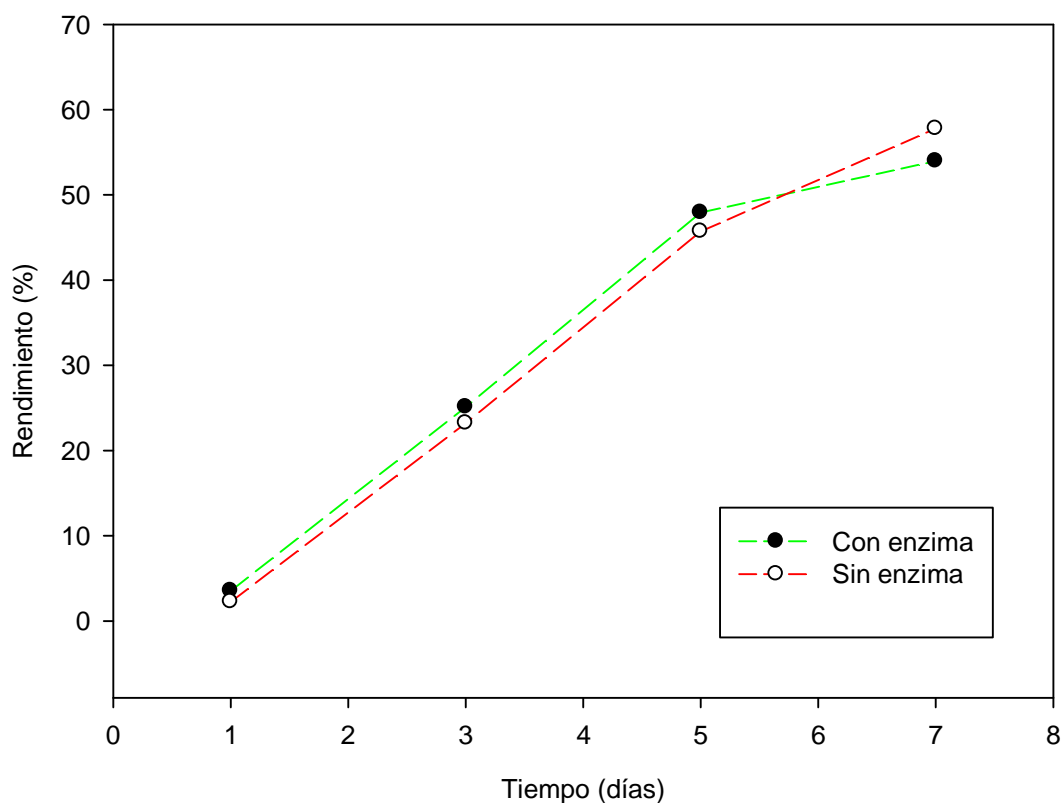
Tabla 2. Efecto con el uso del líquido iónico BMIMPF₆ con relación de 70% p/p de L-LA:LI

Tiempo (días)	Promedio de los Rendimientos obtenidos con enzima (%)	Promedio de los Rendimientos obtenidos sin enzima (%)
1	3.54	2.26
3	25.1	23.21
5	47.91	45.70
7	53.96	57.78

En la Tabla 2 se observa que el uso de la enzima acelera la reacción en los primeros días, pero al final la formación del polímero es mayor sin enzima; también se puede ver que la

variación del rendimiento obtenido al agregar o no la enzima es muy pequeña; esto también fue reportado por Chanfreau, S. *et al*, 2009.

En la Gráfica 1, se puede ver la similitud de los rendimientos empleando o no la enzima y cómo hacia el final de la cinética, el rendimiento es ligeramente mayor en la reacción sin catalizador. De acuerdo con los estudios realizados por Chanfreau y col. 2009, entre otros investigadores, el mecanismo no enzimático puede deberse a trazas de hidroxiaácido del monómero que pueden inducir un mecanismo de polimerización catiónico.³² Sin embargo el peso molecular del polímero en el caso de las reacciones sin biocatalizador es menor, como se verá más adelante.



Gráfica 1: Efecto en el rendimiento con la adición o no de enzima a la concentración de 70%

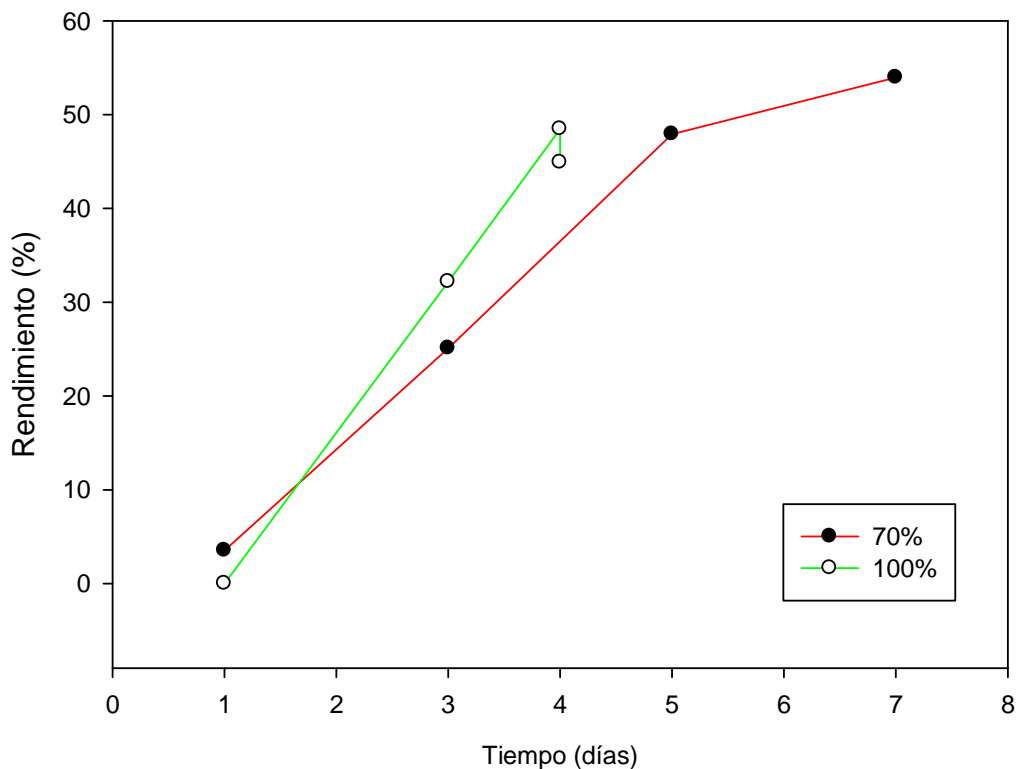
Se llevó a cabo la comparación al variar la concentración L-LA:LI a 100% p/p manteniendo la concentración de enzima del 10% respecto al peso del monómero y bajo estas condiciones se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de concentración al 70% y al 100% de L-LA:LI con BMIMPF₆ (10% Novozym 435)

Tiempo (días)	Rendimiento (70% p/p)	Tiempo (días)	Rendimiento (100% p/p)
1	3.54	1	0
3	25.1	3	32.18
5	47.91	4	48.47
7	53.96		

En la Tabla 3, se presentan los rendimientos respecto a la concentración LI:Monómero, resalta que a la concentración del 100% la reacción se detuvo a los cuatro días, cuando el agitador magnético dejó de girar debido a la solidificación del medio que impidió su movimiento.

Una posible explicación es que al haber mayor cantidad del monómero disponible hay mayor actividad y la polimerización se lleva a cabo más rápidamente en primera instancia, pero en algún momento de la reacción, la solidificación no permite que se sigan formando las moléculas debido al incremento de la viscosidad del sistema, lo que afecta en la transferencia de masa, ergo la propagación de las cadenas crecientes del polímero, pues también se observa que el valor del rendimiento parece ser mayor mientras se forma libremente el polímero con una mayor concentración.



Gráfica 2: Comparación de rendimientos variando las concentraciones entre L-La:LI.

En la Gráfica 2, se puede ver que se llega más rápido al máximo de la reacción cuando la concentración fue del 100% (48.47 en promedio), sin embargo al haberse detenido antes la reacción por el impedimento de movimiento libre del agitador, el rendimiento obtenido con la concentración al 70% a los 7 días es más alto (53.96%). Esto deja una pauta para adaptar el tamaño del vial e investigar qué pasa si dan las condiciones adecuadas para que esta reacción siga.

Más adelante al tabular los pesos moleculares obtenidos para ambas condiciones, se observa que la formación del polímero se ve afectada negativamente al aumentar la concentración al 100%.

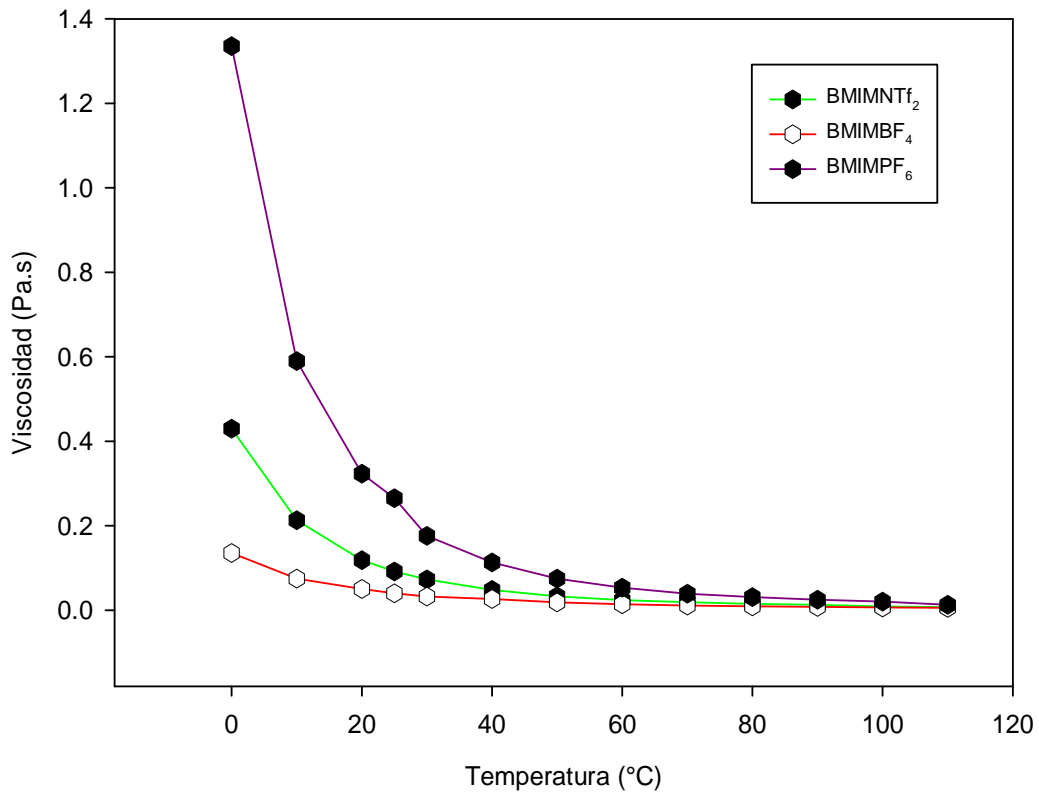
Finalmente se probó con el LI BMIMNTf₂, el cual es de menor viscosidad en comparación con los otros dos que han sido analizados en este trabajo de tesis. Este líquido iónico

también es hidrofóbico como el BMIMPF₆. Se analizaron dos condiciones de reacción con 70% y 100% L-LA:LI, manteniendo el 10% p/p de biocatalizador para ambos casos y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4. Prueba de LI de baja viscosidad BMIMNTf₂

Tiempo (días)	Enzima	Concentración (%)	Rendimiento (%)
11	10%	70%	3.76
11	10%	100%	1.8

Al realizar la prueba utilizando el LI BMIMNTf₂ se esperaba que la baja viscosidad de éste permitiera una mejor evolución de la reacción; sin embargo, como se observa en la Tabla 4 los resultados muestran que la polimerización se obtuvo en muy bajos rendimientos. Se puede notar que igualmente la mejor concentración es al 70% L-LA:LI, pues a pesar del poco rendimiento obtenido en las reacciones, hay una proporción de aproximadamente 2:1 entre una y otra. En la Gráfica 3 se muestran las viscosidades de los LIs, donde los valores más bajos son del BMIMNTf₂, luego del BMIMBF₄ y los más altos son del BMIMPF₆, líquido iónico con el cual se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la formación del polímero.



Gráfica 3. Viscosidad de los LI's

Con la Gráfica 3 se puede inferir que la viscosidad del LI no es un factor determinante en la reacción de polimerización que se plantea en este trabajo de tesis, ya que se creía que la diferencia de las viscosidades podría tener una influencia positiva en la reacción afectando la transferencia de masa.

Cabe mostrar las estructuras químicas de los tres LIs (Figura 11) pues como se menciona en los antecedentes para el mismo catión, el cambio del anión afecta de manera muy importante la viscosidad.

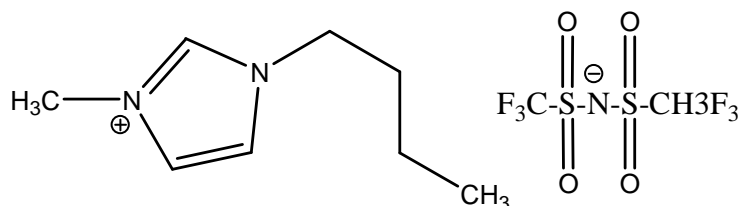
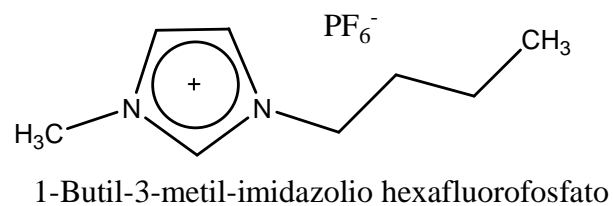
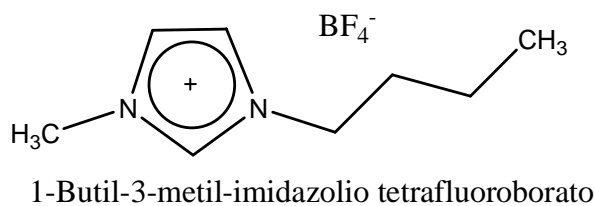


Figura 11. Estructuras químicas de los LIs empleados en esta investigación.

Sin embargo, debido a que la actividad enzimática en LI depende de la interacción enzima-medio y puede ser diferente en cada caso, podemos ver que en la utilización del BMIMNTf₂ no se observa la polimerización no enzimática observada en BMIMPF₆. Esto puede deberse a que el primero, es más estable y de menor viscosidad, además puede que las interacciones electrostáticas a través de puentes de hidrógeno formados con el agua presente en la enzima y la misma estructura del monómero, también tengan alguna repercusión en la catálisis.

De acuerdo a estos resultados experimentales podría deducirse que en esta polimerización enzimática tiene influencia la acción del LI, ya que este tiene la capacidad de iniciar una polimerización de tipo iónico debido a su estructura de sal orgánica, más que a trazas de hidroxiacidos del monómero como reportó Chaufreau y col. 2009.³² En la polimerización de tipo catiónico en medio con LI en concreto no hay evidencias reportadas en la literatura, pero si se conoce la polimerización catiónica del L-LA por Zn²⁺

activado, cuyo mecanismo se muestra esquemáticamente representado en la Figura 12. Más evidencias al respecto de la acción aparentemente no inerte de Li en esta reacción podrían ser estudiadas en trabajos posteriores.

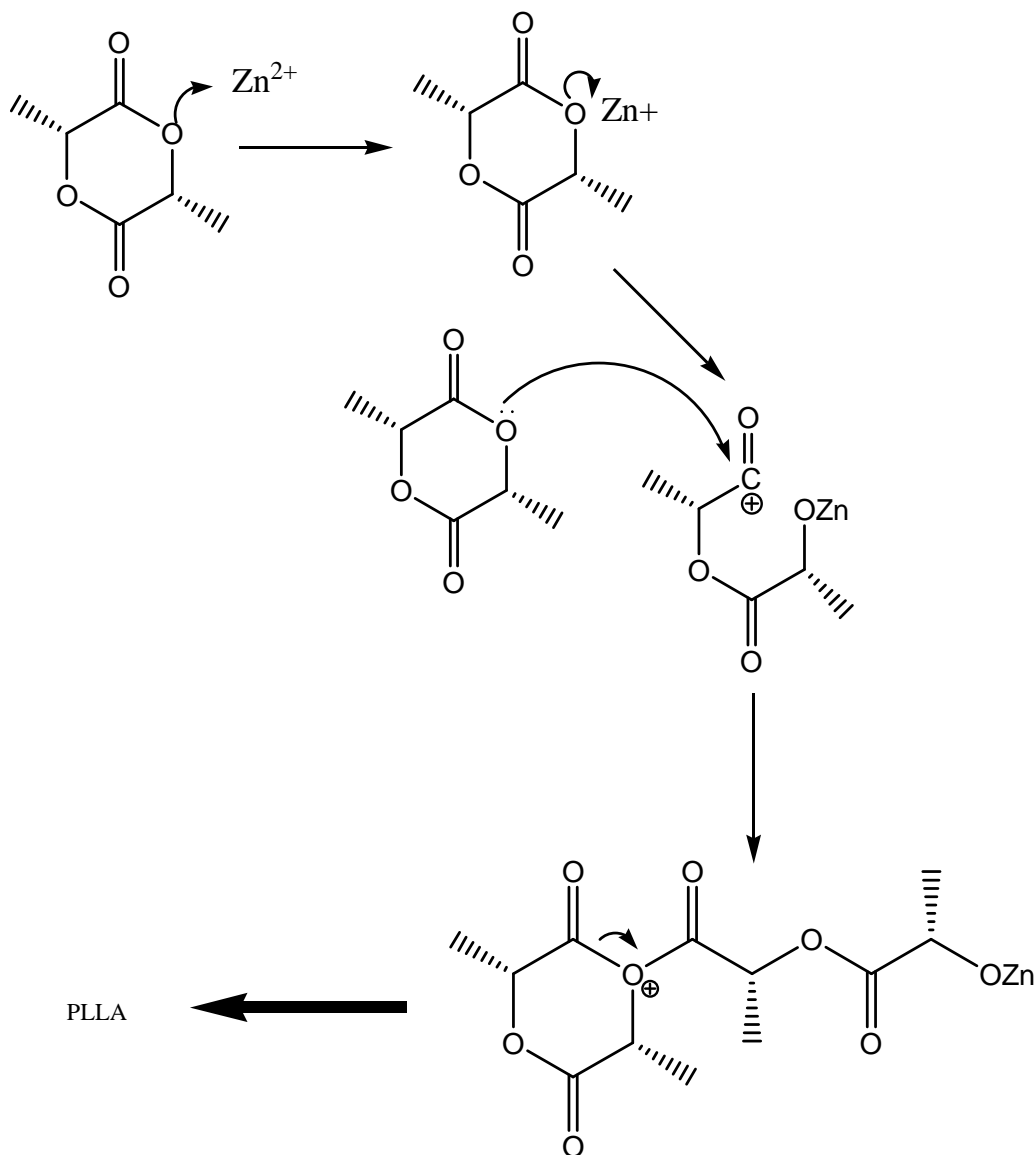


Figura 12. Mecanismo de polimerización inorgánica

5.2 CARACTERIZACIÓN O PRUEBAS ANALÍTICAS

Debido a que en algunos casos, los rendimientos obtenidos fueron muy bajos, no se les pudo realizar las pruebas analíticas correspondientes. Sin embargo se analizaron los casos en los cuales los rendimientos obtenidos fueron mayores en cuanto a la cantidad de producto obtenido.

5.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (¹H-RMN)

Para todas las situaciones analizadas a lo largo de este trabajo, con los diferentes LIs utilizados: BMIMBF₄, BMIMNTf₂ y BMIMPF₆, así como en los casos con y sin biocatalizador y variando la concentración, se puede observar la apertura del anillo del monómero, desde el primer día. Esto se hace evidente pues se muestran las señales características de dicho fenómeno (Figura 13), estas son dos señales; una señal es a 5.0 ppm correspondiente al hidrógeno del metileno de la forma cerrada del L-LA y la otra a 5.2 ppm que corresponde al hidrógeno del metileno de la forma abierta de la molécula.

Desde el tercer día, que es cuando la cantidad de polímero se pudo analizar, se nota una mayor proporción de polímero en forma abierta que cerrada, lo que nos indica que la apertura del anillo se da enseguida por las condiciones en que se ha evaluado la reacción y como ya se mencionó parece haber apertura de anillo por la vía catiónica por influencia tanto de la catálisis enzimática, como del líquido iónico.

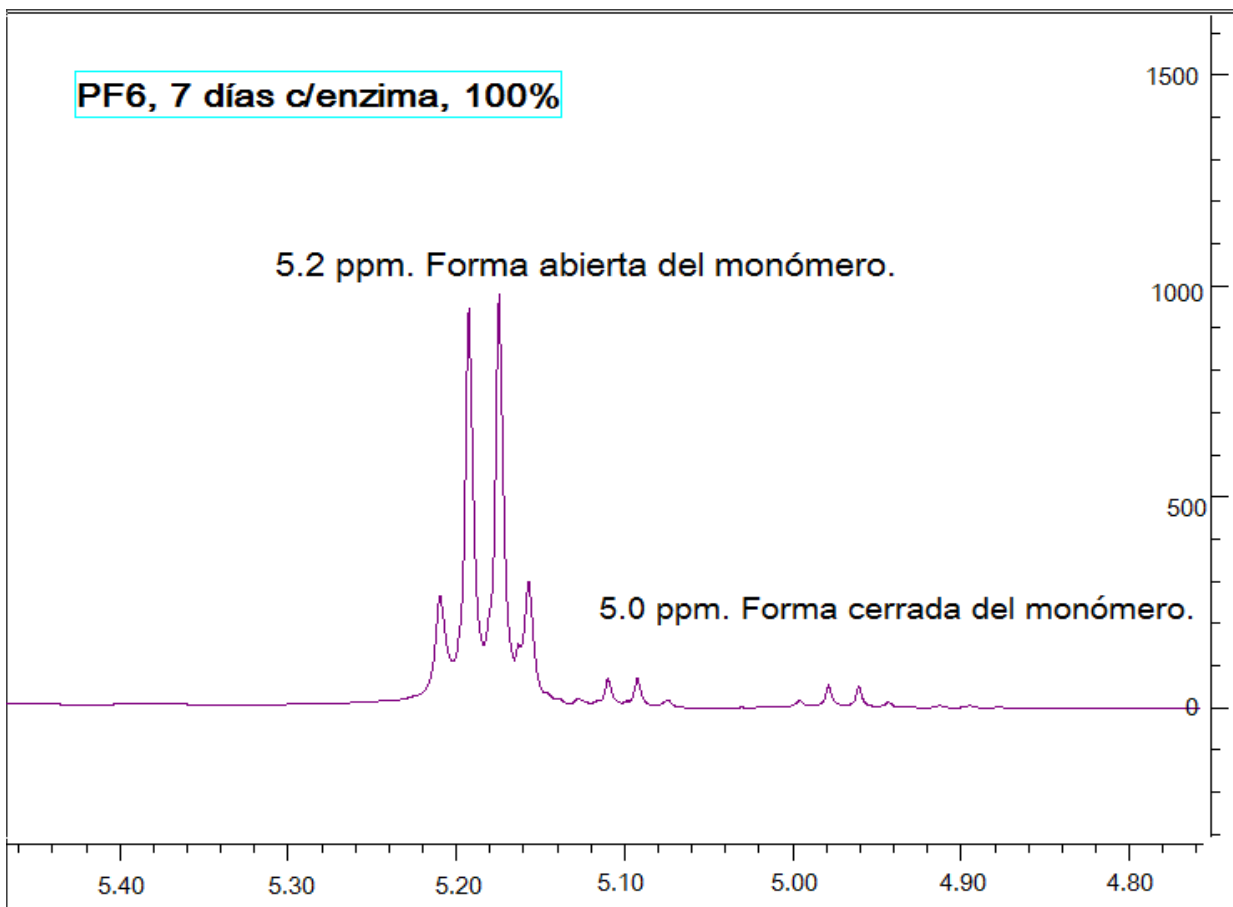


Figura 13. Ejemplo de espectro obtenido por ^1H -RMN.

5.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES POR CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN EN GEL (GPC)

Con respecto a los pesos moleculares obtenidos mediante el análisis por GPC se observa un aumento con respecto al avance de la reacción en el transcurso del tiempo, en la Tabla 5 se pone de manifiesto que estos valores son mayores cuando se trabajó a concentración de 70% LI:L-LA y agregando enzima.

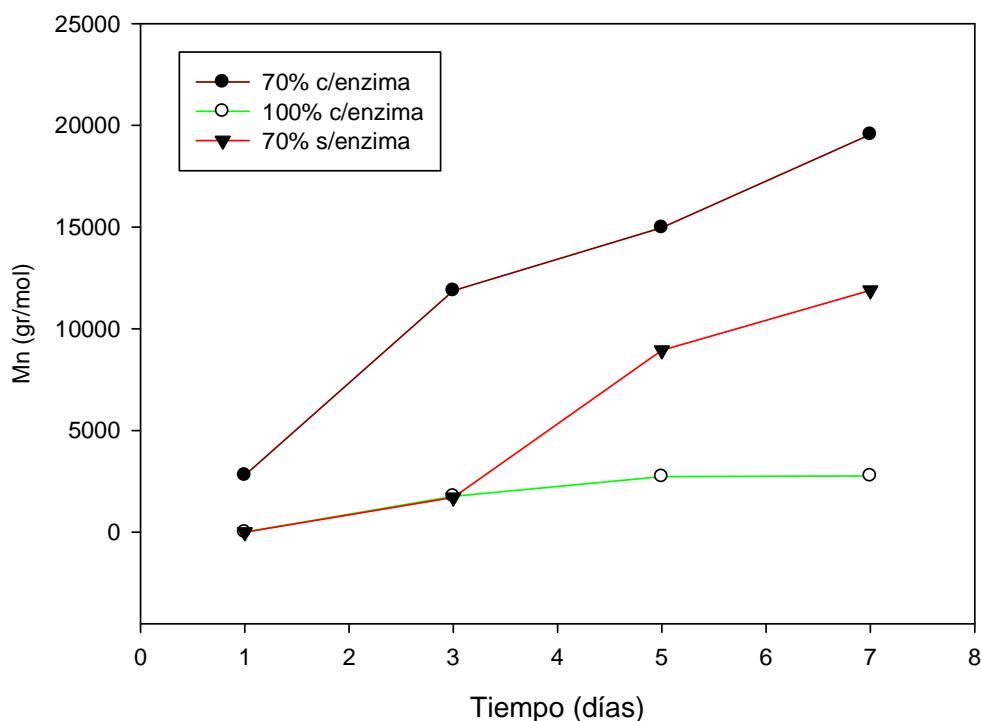
Tabla 5: Pesos moleculares y PDI's con BMIMPF₆ al 100% y 70 % p/p L-LA:LI con y sin enzima.

L-LA:LI (%p/p)	Tiempo (días)	Biocatalizador	Mn (g/mol)	PDI
70	1	10%	2,800	1.80
70	3	10%	11,876	1.43
70	5	10%	14,969	1.80
70	7	10%	19,552	1.08
70	1	0	--	--
70	3	0	1,705	1.10
70	5	0	8,940	1.20
70	7	0	11,887	1.23
100	1	10%	--	--
100	3	10%	1,762	1.01
100	4	10%	2,729	1.06

A pesar de que los rendimientos obtenidos con la reacción al 100% fueron mayores, los pesos moleculares han sido muy bajos, dichos resultados de menor peso molecular del polímero al trabajar con 100% p/p pueden tener explicación debido a que al aumentar la concentración del monómero implicaría que el medio de reacción la formación de cadenas sea tal que se dan cadenas pequeñas en mayor velocidad y originen que el

medio sea más viscoso, suscitando una menor transferencia de masa, luego menor propagación de las cadenas del polímero.

En la Gráfica 4 se muestra con mayor claridad la diferencia en los pesos moleculares comparando las concentraciones del 70% y 100%, así como al no adicionar biocatalizador al 70%.

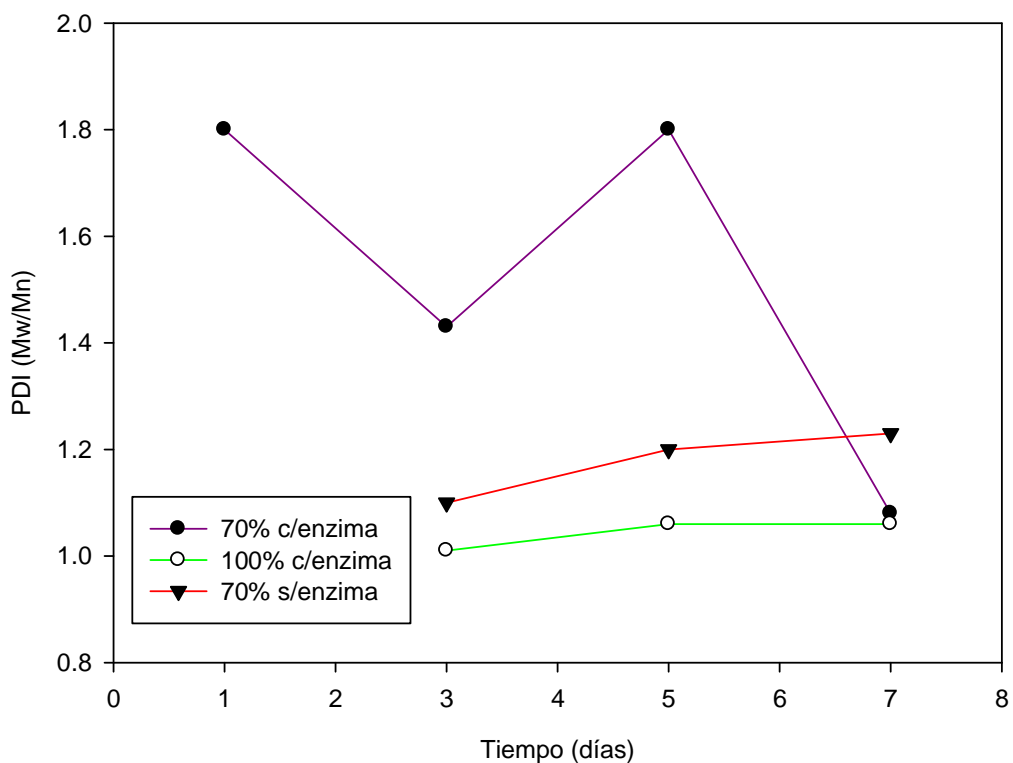


Gráfica 4: Comparación del efecto de la concentración y uso de enzima en los pesos moleculares de las cadenas de PLLA.

Los análisis de GPC arrojan pesos moleculares inferiores en el caso de usar 70 % p/p en reacciones llevadas a cabo sin la adición de enzima. Este parámetro nos permite evaluar cualitativamente el efecto de la biocatálisis en esta reacción. A fin de evaluar de forma más cuantitativa la aportación enzimática, me parece interesante plantear trabajo futuro

en este sentido, pues se ha visto que el aumento de la concentración de enzima, tiene un efecto positivo en los rendimientos obtenidos en este tipo de polimerización.

Los índices de polidispersidad indican la uniformidad de tamaños moleculares de las cadenas poliméricas lineales formadas, donde los valores más cercanos a uno expresan una mezcla más homogénea y mientras más grande este valor, la mezcla es más heterogénea. En la Tabla 4, se muestra que los PDIs son más grandes en los casos de la concentración 70% Li:Monómero además de que varían más sus valores en el tiempo, aunque a los 7 días el valor se reduce lo cual indica que la diversidad de tamaños de cadena decrece o tiende a no ser tan dispersa, tal como se muestra en la Gráfica 5.



Gráfica 5: Índices de polidispersidad de los polímeros obtenidos.

Al observar la Gráfica 5 parece no haber relación alguna entre los diferentes PDI, pues la concentración de monómero y la inclusión o no de enzima parece no estar relacionada con la manera en que se van acoplando las cadenas en el sistema de reacción.

5.2.3 DIFRACCIÓN DE RAYOS-X EN POLVO

Respecto al análisis por medio de la difracción de Rayos X en los polvos obtenidos, se pudo constatar que la estructura del polímero formado es semicristalina en cada uno de los ensayos bajo las condiciones en que se analizaron.

En la Figura 14 se muestra un espectro del material obtenido en los ensayos realizados, a modo de ejemplo.

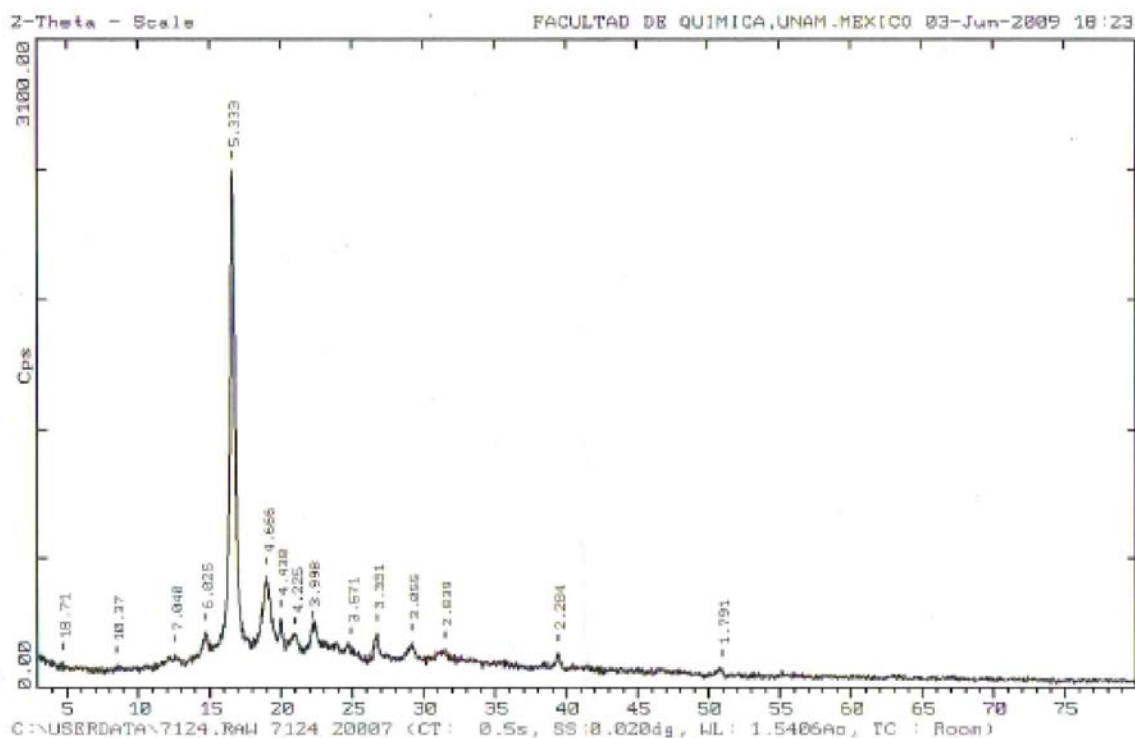


Figura 14. Ejemplo de espectro de Rayos-x.

Un polímero semicristalino es un polímero que contiene dos regiones claramente definidas en su estado sólido. Una de estas regiones es [amorfa](#) y la otra es [cristalina](#). En el espectro se muestran las señales de radiación características del polímero con lo cual se percibe que el área de dispersión de la fase cristalina se mantuvo constante con el paso de los días y en las diferentes condiciones.

Los resultados fueron muy similares tanto con enzima como sin agregarla, haciendo notar que no hay relación en la cristalinidad con alguno de los parámetros analizados pues la estructura semicristalina del polímero al final es independiente del uso o no de la enzima, así como de la variación de la concentración.

5.2.4 PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO USANDO DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Una de las premisas de la química verde consiste en usar elementos de purificación de los materiales post-reacción lo menos tóxicos posible. Muchas reacciones de purificación de polímeros emplean disolventes orgánicos volátiles. En este trabajo se llevó a cabo la purificación del polímero utilizando $scCO_2$. Con esta prueba se buscó probar la eficacia del $scCO_2$ para llevar a cabo la extracción del polímero sin hacer uso de los disolventes orgánicos. Está reportado que el PLLA es insoluble en $scCO_2$ e incluso el monómero L-LA tiene una solubilidad muy baja,³³ sin embargo es sabido que el líquido iónico BMIMPF₆ es muy miscible con el $scCO_2$. Debido a esto se puede pensar en la consecución de un sistema empleando $scCO_2$ para purificación del material sintetizado vía extracción del LI.

El mejor caso, sea este la reacción a 7 días usando BMIMPF₆ con 70 % p/p L-LA:LI y 10% biocatalizador, se repitió y una vez finalizada la reacción los componentes del vial de reacción se trataron como se describe en la sección de metodología. El análisis mediante ¹H-RMN se realizó con tres muestras diferentes; una muestra de la mezcla antes de la

extracción, una muestra de la mezcla del medio posterior a la extracción y la tercera muestra fue del producto ya extraído.

Los resultados del análisis mediante ^1H -RMN se muestran en la Figura 13, donde del lado superior izquierdo se encuentra la imagen de la muestra después de llevar a cabo el proceso de extracción; en esta imagen se pueden notar las señales características del LI, debajo de ésta se presenta la imagen de la muestra antes de realizarle el proceso de extracción haciendo uso del dióxido de carbono supercríticos; ahí aún se observa la señal característica del monómero. A modo comparativo en esa misma figura del lado derecho se muestran los espectros de ^1H -RMN del LI, en medio, del L-LA abajo, así como en la parte superior derecha la sustancia extraída que corresponde a señales que pueden ser del LI con algo de monómero.

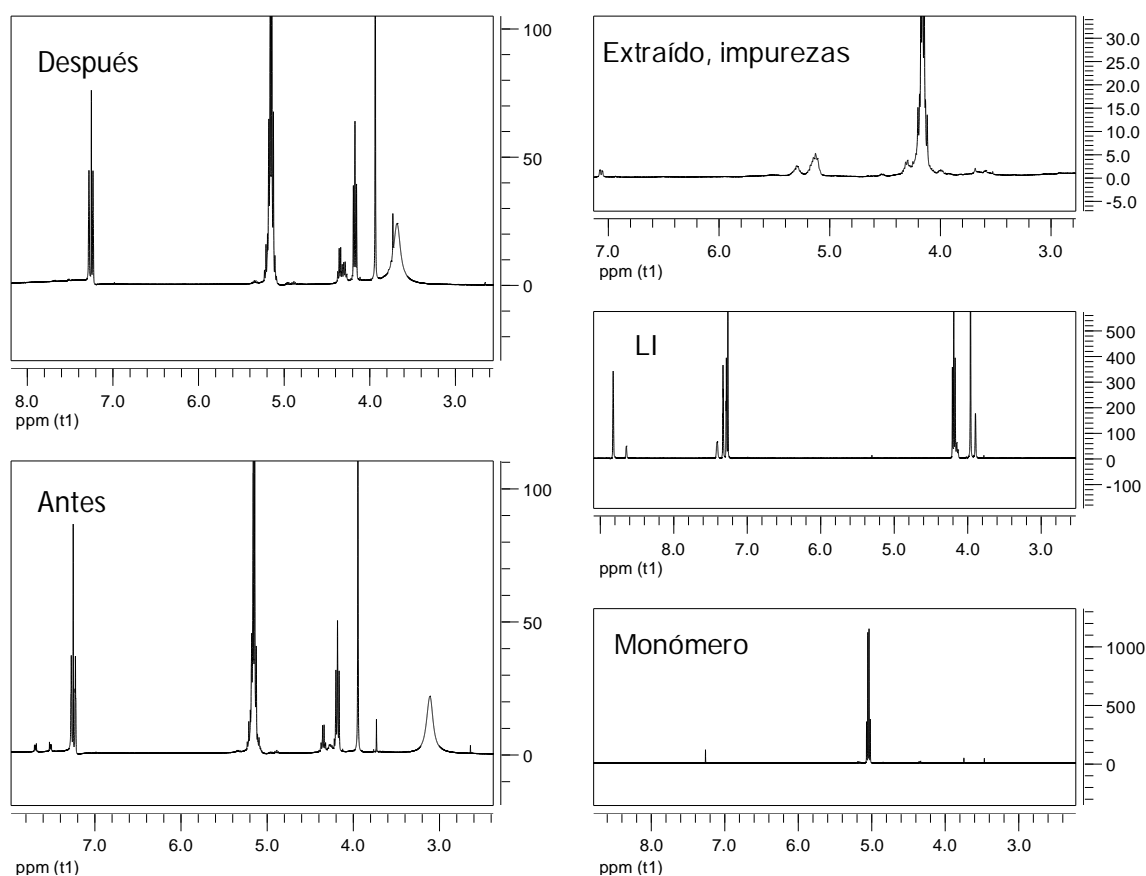


Figura 15. Espectros de ^1H -RMN de la extracción con scCO_2

Si bien la combinación de las propiedades de los LI como disolvente y las cualidades del scCO₂ como agente de extracción puede evitar la utilización de disolventes orgánicos,³⁰ aquí se demuestra que la remoción completa del LI y quizá compuestos de bajo peso molecular, como residuos de monómero u oligómeros, requiere de condiciones más enérgicas o sistemas mejorados, pues bajo las condiciones con las cuales se trabajó (40°C, 120 bar, 4 h) no fueron suficientemente satisfactorias aunque si se dan pautas para continuar la investigación en este respecto, pues en el espectro del extracto, se puede ver que si hay remoción de parte de las impurezas y algo de monomero.

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Se llevó a cabo la polimerización del L-Láctido, mediante la apertura de anillo y en LI, utilizando como catalizador la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada y bajo los parámetros analizados en este trabajo se obtuvieron como las mejores condiciones de reacción para llevar a cabo la polimerización del ácido L-Láctido hacia el poliláctido, los parámetros de concentración de 70% L-LA:LI, 10% de la lipasa Novozym® 435 y en un medio disolvente de líquido iónico BMIMPF₆ a 90°C, pues se obtuvieron rendimientos más uniformes y en menor tiempo a pesar de que este LI es el de mayor viscosidad en comparación con el BMIMBF₄ y el BMIMNTf₂, llegando a un rendimiento de 53.96% en 7 días, con pesos moleculares de 19,000 (g/Mol) y con índices de polidispersidad de 1.08 hacia el momento en que se detuvo la reacción. Además se puso de manifiesto que el uso del biocatalizador permite obtener pesos moleculares más altos que sin la inclusión de éste en la reacción, aunque mediante los espectros de 1H-RMN se puso de manifiesto que la apertura del anillo se da aún sin la presencia de la enzima por lo que parece estar ligado con el aporte del medio LI, el cual provoca una polimerización de tipo iónico. Así mismo, se pudo notar que al aumentar la concentración al 100 % L-LA:LI, se afecta negativamente la reacción, pues disminuyen los rendimientos y los pesos moleculares también se ven afectados.

La reacción no necesariamente depende directamente de la disminución de la viscosidad de los LI, pues con el LI menos viscoso (BMIMNTf₂), se presentó el menor rendimiento de polimerización y con el más viscoso (BMIMPF₆) se mejoran los resultados en cuanto a rendimientos, pesos moleculares e índices de polidispersidad.

El uso del ^{sc}CO₂ para realizar la extracción del polímero y remoción del LI e impurezas fue promisorio pues se ha dejado la pauta para modificar y mejorar los parámetros para

continuar el estudio de dicho método de extracción ya que puede ser exitoso y dentro de las premisas de la química verde.

Como trabajo futuro se propone seguir indagando en esta reacción de polimerización enzimática haciendo énfasis en el efecto de la enzima así como establecer métodos de purificación en ausencia de disolventes orgánicos convencionales y los métodos de extracción supercrítica.

REFERENCIAS

1. Dechy-Cabaret, O., Martin-Vaca, B. y Bourissou, D. "Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide". *Chemical reviews*, Vol 104, No. 12, 2004, pags: 6147-6176.
2. Tapia, G. "Síntesis y caracterización de polímeros de ácido láctico-co-glicólico como soporte para sistemas farmacéuticos de larga duración". Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2007
3. Kaihara, S., *et al.* "Synthesis of poly(L-Lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization". *Nature protocols*, vol. 2, no. 11, 2007, pags: 2767-2771.
4. Hernández Fernández, Francisco José. "Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de LI, fluidos supercríticos y tecnología de membranas". Tesis Doctorado, Universidad de Murcia, 2008.
5. Yang, Z. y Pan, W. "Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis". *Enzyme and microbial technology*, vol. 37, no.1, 2005, pags:19-28.
6. Rahul Chelikani, Kim Dong Shik. "Enzymatic Polymerization and Curing of Natural Phenolic Compounds". No. 462- *Green Chemistry and Reaction Engineering*. 2004
7. Klibanov, A. "Improving enzymes by using them in organic solvents". *Nature*, vol. 409, no. 6817, 2001, pags: 241-246.
8. Yahya, A., Anderson, W. y Moo-Young, M. "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions". *Enzyme and microbial technology*, vol. 23, 1998, pags:438-450.
9. V. M. Balcao, A. L. Paiva, F. X. Malacata. "Bioreactors with immobilized lipases: State of the art". *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 18, 1998, pags: 392-416.

10. Kobayashi, S., Uyama, H. y Kimura, S. "Enzymatic polymerization". Chemical Reviews, vol. 101, no. 12, 2001, pags:3793-3818.
11. Matsumura, S., Mabuchi, K. y Toshima, K. "Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide". Macromolecular rapid communications, vol. 18, no. 6, 1997, pags: 477-482.
12. Mora, M. "Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua". Tesis Doctorado, Facultad de Química, UNAM, 2007.
13. D. M. Lawson, A. M. Brzozowski, S. Rety, C. Vernma, G. G. Dodson. "Probing the nature of substrate binding in Humicola lanuginose lipase through X-ray crystallography and intuitive modeling". Prot. Eng. Vol. 7, 1994, pags: 543-550.
14. A. Salis, I. Svensson, M. Monduzzi, V. Solinas, P. Adlercreutz. "The atypical lipase B from Candida antarctica is better adapted for organic media tan the typical lipase from Thermomyces lanuginose". Biochim. Biophys. Vol. 1646, 2003, pags: 145-151.
15. J. S. Dordick. "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents". Enzyme Microb. Technol. Vol.11, 1989, pags: 194-211.
16. A. Zaks, A. M. Klivanov. "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents". Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 82, 1985, pags: 3192-3196.
17. P. Lozano, T. De Diego, J. L. Iborra. "Influence of water-miscible aprotic solvents on a-chymotrypsin stability". Biotechnol. Prog. Vol. 12, 1996, pags: 488-493.
18. W: Chulalaksananukul, J. S. M. Condoret, D. Combes. "Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide". Enzyme Microb. Technol. Vol.15, 1993, pags: 691-698.

19. Taylor, R.F. "Protein Immobilization: fundamentals and applications". Marcel Dekker, New York. 1991.
20. Hartmeier, W. "Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems". *Trends Biotechnol.* vol. 3, 1985, pags: 149-153.
21. Martinek, K.; Mozhaev, V.V."Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry". *Adv. Enzymol. Vol. 57*, 1987, pags: 179-249.
22. Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S."Solid Phase Biochemistry". Wiley Pub., New York. 1983.
23. Klei, H.E. Sundstrom, D.W.; Shim, D. "Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*" J. Woodward, ed. IRL Press, 1985. Pags: 49-54.
24. Klibanov, A.M. "Immobilized enzymes and cells as practical catalysts". *Science vol. 219*, 1983, pags: 722-727.
25. Mehta, R. et al. "Synthesis of poly(lactic acid): a review." *Journal of macromolecular science, Part C: Polymer reviews*, vol. 45, no. 4, 2005, pags: 325-349.
26. Garlotta, Dornald. "A literature review of poly(lactic acid)". *Journal of polymers and the environment*, vol. 9, no. 2, 2001, pags: 63-84.
27. Drumright, R., Gruber, P., y Henton, D. "Polylactic acid technology". *Advanced materials*, vol. 12, no. 23, 2000, pags: 1841-1846.
28. Gruber, P., y O'Brien, M. "Biopolymers; Polylactides, Natureworks™ PLA". Steinbüchel, A., 1a Ed., USA, WILEY-VCH, vol. 4, 2004, pags: 235-250.
29. Arroyo Miguel. "Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications". Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complulense de Madrid. Ed. Ars Pharm. 1998.

30. Zhen Yang, Wubin Pan. "Ionic Liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis". *Enzym and Microbial Technology*. Vol. 37, 2005, pags: 19-28
31. Alain Berthod, Samuel Carda-Broch. "LI: descripción y aplicaciones de esta nueva clase de disolventes en el análisis químico". Universidad de Lyon I, Francia, Universidad Jaime I, España. Vol. 24, no. 2, 2003.
32. Chanfreau, S., Porras, J., Martínez Gilly, M., Mena, M., Gimeno, M., Tecante, A., Barzana, E. "Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid". *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Aceptado 2009.
33. F. Stassin, R. Jérôme, "Polymerization of (L,L)-Lactide and Copolymerization with ϵ -Caprolactone Initiated by Dibutyltin Dimethoxide in Supercritical Carbon Dioxide", *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem*. Vol. 43, 2005, pags: 2777-2789.
34. Porras Dominguez Jaime Ricardo. "Síntesis enzimática de Poli-L-Láctido en líquidos iónicos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Marzo 2009.