



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis de copolímeros de Glicólido y ϵ -
Caprolactona usando Lipasas como catalizadores
en medios no acuosos**

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico**

Presenta

Mario Víctor Alexander de la Rosa Estrada



MÉXICO, D.F.

2009



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 Q. Fernando León Cedeño**
VOCAL: **Profesora Dra. Araceli Peña Álvarez**
SECRETARIO: **Profesor Dr. Miquel Gimeno Seco**
1^{ER} SUPLENTE: **Profesora Dra. José Federico del Rio Portilla**
2^{DO} SUPLENTE: **Profesora Q. Gloria García Ramírez**

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio 314, Facultad de Química, Edificio E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria

ASESOR DEL TEMA

Miquel Gimeno Seco

SUSTENTANTE

Mario Víctor Alexander de la Rosa Estrada

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la Facultad de Química, la gran institución que me formó como profesional en el área de estudios, por todos los recursos que puso a mi alcance para mi desarrollo y el espíritu de superación que sembró en mí.

Agradezco de igual manera a la organización CONACyT que a través del proyecto 48641 brindó el financiamiento del trabajo de investigación, en la compra de reactivos y material, así como la beca a la cual tuve acceso durante mi estancia en el laboratorio. Al mismo tiempo extendiendo los agradecimientos a la unidad de análisis de RMN de la Facultad de Química en el departamento de la USAI en los trabajos analíticos solicitados.

Y por último, y a la vez mas grande agradecimiento al Dr. Miquel Gimeno Seco, por los momentos empleados en la tutoría y guía de este trabajo experimental, y sobre todo por su amistad y apoyo durante mi estancia.

Dedicatorias

Agradezco a Dios por cada día permitirme ver la luz del amanecer, disfrutar del aire, ver a mi familia y compartir con mis amigos.

A mis padres, Cruz y Armando, el gran regalo que Dios y la vida me dieron, y que cambiaron el destino de mi vida con su amor, cuidados, atención, y hasta uno que otro regaño, pero que sin toda esa entrega de su parte, no hubiera llegado la persona que soy yo.

A mis hermanos, primos, abuelos, tíos, porque cada uno de ustedes forman parte de mi vida al cuidar de mi, preocuparse de mi vida, por los gratos momentos de los que pude disfrutar con todos y cada uno de ustedes, y esencialmente por formar parte de mi familia.

A mi canita, a ti Clau, por grandiosísimos días que pasamos juntos durante esta carrera, por maravillosos momentos de los cuales formamos parte y que quedaran por siempre en mi mente y corazón, por tu apoyo incondicional en las buenas y en las malas, pues sin ellos mi pasado y presente no serían los mismos.

A todos y cada uno de mis amigos con los cuales me cruce en este largo camino estudiantil, Tomas, Ismael (Chino), Dulce, Ely, Sonia, Iris, Marisol, Laura, Leonor, Sergio (Cheko), y también a otros 2 grandes amigos, Kuri y Víctor, que aunque también desde fuera de la facultad, formaron parte de este transcurso. Gracias a todos ustedes por su amistad, apoyo, cariño y compañía.

I. ÍNDICE DE TEMAS

I) Índice general de temas	1
II) Índice de figuras	3
III) Índice de gráficas	5
IV) Resumen	6
V) Introducción	7
VI) Antecedentes	10
1) Polímeros y métodos de síntesis	10
a) Polimerización vía radicales libres	14
b) Polimerización iónica	15
c) Polimerización por condensación	18
d) Polimerización por apertura de anillo	19
e) Polimerización por coordinación	19
2) Polímeros biodegradables	21
a) Copolímeros biodegradables a base de ϵ -CLGA	23
3) Lipasas y su uso como catalizadores	25
4) Líquidos iónicos y su uso en síntesis enzimática	30
VII) Objetivos	36
VIII) Metodología experimental	37
1) Reactivos	37
2) Equipo de laboratorio	37
3) Procedimiento experimental	38
a) Purificación de los reactivos	38
b) Reacción de polimerización	38
c) Precipitación del polímero	38
d) Caracterización y cálculo del grado de incorporación de CL por RMN- ¹ H	39

IX) Análisis de resultados	41
1) Reacción control de polimerización	55
X) Conclusiones	57
XI) Bibliografía	59

II. Índice de figuras

Figura 1: Síntesis de CL por oxidación de ciclohexanona	9
Figura 2: Método de obtención de GA a partir de ácido glicólico	10
Figura 3: Algunos ejemplos de polímeros lineales simples no ramificados	12
Figura 4: Estructura básica de un polímero ramificado	12
Figura 5: Esquema de la estructura de un polímero entrecruzado	13
Figura 6: Estructuras de a) polímeros estrella, y b) dendrímeros	13
Esquema 1: Representación de la clasificación de los polímeros en función de la secuencia de sus monómeros	15
Figura 7: Etapa de iniciación y propagación de la polimerización vía radicales libres	15
Figura 8: Mecanismos de terminación de polimerización vía radicales libres	16
Figura 9: Mecanismo de reacción de iniciación para polimerización aniónica	16
Figura 10: Etapa de propagación para la polimerización aniónica	17
Figura 11: Procesos de terminación para la polimerización aniónica	17
Figura 12: Proceso de iniciación de la polimerización catiónica	18
Figura 13: Mecanismo de la etapa de propagación de la polimerización catiónica	18
Figura 14: Proceso de inhibición de la polimerización catiónica por transferencia de cadena	18
Figura 15: Proceso de terminación de la polimerización catiónica	19
Figura 16: Mecanismos de reacción para la polimerización por condensación por a) adición-eliminación al carbonilo, b) adición- sustitución al carbonilo y c) adición al doble enlace	20
Figura 17: Mecanismo de reacción para la polimerización por apertura de anillo	20
Figura 18: Mecanismos de reacción para las etapas de iniciación y propagación en una polimerización por coordinación	21
Figura 19: Mecanismo de reacción del proceso de terminación en la polimerización por coordinación	22
Figura 20: Estructura tridimensional por computadora de la proteína CALB	29

Figura 21: Mecanismo de reacción para la transesterificación catalizada por la enzima CALB.	30
Figura 22: Mecanismo de polimerización por apertura de anillo de lactonas catalizado por enzimas	31
Esquema 2 y 3: Estructuras de los iones más comunes en los Líquidos iónicos	32
Esquema 4: Representación del efecto de algunos iones de importancia biológica en la estabilización de las enzimas	34
Figura 23: Espectros de RMN- ¹ H del copolímero	40
Figura 24: Espectro de RMN-1H a 400MHz en un sistema TFA/CDCl ₃ para Poli(CL-co-GA).	43

III. Índice de gráficas

Gráfica 1: Representación de la cinética de la polimerización a tres diferentes relaciones molares empleadas de los reactivos.	41
Gráfica 2: Evolución de la intensidad de la señal de CL en función de la proporción de los monómeros.	43
Gráfica 3: Cálculo del grado de incorporación de CL en el copolímero.	44
Gráfica 4: Comportamiento de la viscosidad para [BMIM][PF ₆] como función del aumento de la temperatura.	45
Gráfica 5: Cinética de la síntesis de poli(CL-co-GA) en LI.	46
Gráfica 6: Evolución de la señal de CL en función de la cantidad de monómero.	47
Gráfica 7: Incorporación de CL en el copolímero usando LI como disolvente.	47
Gráfica 8: Rendimientos de la polimerización con exceso de CL.	48
Gráfica 9: Cálculo de la incorporación de CL con exceso de monómero.	49
Gráfica 10: Espectros RMN- ¹ H representativos de CL en función de la proporción molar de monómeros.	49
Gráfica 11: Rendimientos de la polimerización de CL:GA con Lipasa PS como catalizador.	51
Gráfica 12: Intensidad de las señales de CL en RMN- ¹ H en función de la concentración de monómeros.	52
Gráfica 13: Determinación del porcentaje de incorporación de CL.	53
Gráfica 14: Determinación del rendimiento de la polimerización de CL:GA con Lipasa PS en LI.	54
Gráfica 15: Intensidad de las señales de CL como función de la proporción molar de los monómeros.	55
Gráfica 16: Cálculo del contenido de CL en el copolímero catalizado por Lipasa PS en LI.	55

IV. RESUMEN

El presente proyecto tiene como finalidad estudiar la síntesis de copolímeros de Glicólido (GA) y ϵ -Caprolactona (CL) empleando Lipasas como catalizadores, el cual es un método novedoso enfocado a los intereses de la Química Verde, en medios de reacción no acuosos, así como también sin usar los disolventes orgánicos comunes.

Las variables que se introdujeron para el estudio fueron: tiempo de reacción de polimerización, temperatura del medio de reacción, influencia del uso de Líquido Iónico como disolvente y origen de la Lipasa de trabajo (*Candida antartica* y *Burkholderia cepacia*). Las mejores condiciones experimentales se determinaron en función del rendimiento obtenido y de la caracterización del material por RMN-¹H para determinar su composición.

Las condiciones experimentales óptimas para la enzima Novozym435 son: para el rendimiento un tiempo de reacción de 48 hr con una proporción de monómeros de 4:1 CL:GA, y para la mayor incorporación de CL una proporción 5:1 CL:GA con un tiempo de reacción de 48 hr en un sistema en *bulk*. En el caso de la Lipasa PS, las condiciones experimentales óptimas son: tiempo de reacción de 6 días a una proporción de monómeros 2:3 usando LI como disolvente para obtener un rendimiento de 25.4%, y para obtener un copolímero con mayor cantidad de CL se necesitó un tiempo de reacción de 72 hr a una proporción CL:GA 5:1 en un sistema en *bulk*.

En base a la reacción de blanco, se observó que la reacción es un proceso únicamente catalítico. La enzima exhibe mayor afinidad hacia GA independientemente del origen de esta, además de que no sufrió desnaturalización por parte del LI.

V. INTRODUCCIÓN

Los polímeros son compuestos químicos cuya estructura básica es la repetición estructural de una unidad simple denominada unidad de repetición, vieron la luz en el mundo químico a finales de la primera mitad del siglo XX. Su desarrollo tuvo un vertiginoso crecimiento debido a las amplias ventajas asociadas a sus propiedades mecánicas y de resistencia al desgaste, para su uso como embalaje, recubrimientos, fabricación de utensilios, e incluso en industrias de alto impacto económico como lo es el área automotriz. Sin embargo, la mayoría de estos materiales son altamente dependientes del petróleo y sus niveles de producción lo cual provocará que su producción disminuya.

Por otro lado, muchos de los polímeros obtenidos a partir de fuentes de petróleo tienen la propiedad de no ser biodegradables. Dada la gran cantidad de desecho que se genera a nivel mundial, calculado en miles de toneladas, ahora se enfrenta la comunidad ante un problema sanitario en los vertederos de basura, ya que se han ido acumulando grandes cantidades de estos disminuyendo los espacios para disposición de basura a nivel mundial.

Ante esta problemática, durante los últimos 30 años se han incrementado los esfuerzos en la investigación de materiales que puedan ser biodegradables en las condiciones ambientales. Este es el caso de los polímeros biodegradables, materiales que tienen la gran ventaja de poder ser eliminados en un tiempo considerablemente menor al que tienen los polímeros convencionales, siendo un tiempo común entre 5 a 10 años.(EPIC Technical Report, 2000)

Además, un área de investigación en la síntesis de estos materiales se ha enfocado al empleo de monómeros obtenidos de recursos renovables, ya sea su obtención de plantas, o de productos del metabolismo de microorganismos e incluso algunos de ellos como la CL es un derivado del petróleo (Kolybaba, 2003). En este sentido ha sido de gran interés el estudio de polimerización de lactonas de anillos pequeños, que se ha probado poseen tiempos de degradación considerablemente cortos, y algunas otras propiedades como flexibilidad, dureza y solubilidad, entre otros, para que se empleen en las áreas médico-quirúrgicas como elementos de suturas e implantes, y la industria farmacológica como

geles inyectables y otros portadores de suministro de principios activos. (Albertsson, 2008; EPIC, 2000; Jiang, 2009)

Comercialmente, ya se han establecido protocolos de producción de estos polímeros biodegradables, como es el caso de Monocryl, el cual contiene un 75% mol de GA y el resto de CL.

Los copolímeros bajo estudio, se obtienen a partir de un proceso de polimerización simultánea de los monómeros CL y GA, siguiendo un mecanismo de apertura de anillo, iniciado por un ataque nucleofílico al carbonilo. El primero es una lactona de 7 miembros, y la letra griega ϵ se debe a que el anillo se une al oxígeno a través del carbono 6, en función de su nomenclatura. Esta se produce a partir de una reacción de oxidación tipo Baeyer-Villiger de ciclohexanona con ácido peracético. (Fig. 1)

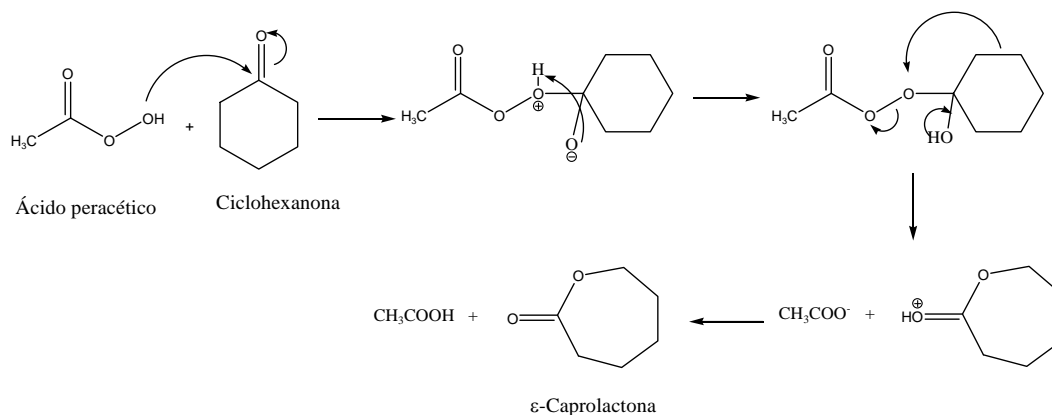


Figura 1: Síntesis de CL por oxidación de ciclohexanona

Por otro lado, el GL, dímero cíclico del ácido glicólico se encuentra en las agallas, en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. Se obtiene a partir de un proceso similar a la producción de D,L-Láctido, pues son estructuras similares. El proceso consta del tratamiento térmico de ácido glicólico, el cual puede obtenerse de la fermentación microbiana de carbohidratos o una reacción catalítica a partir de glicolonitrilo (<http://www.patentstorm.us/patents/7198927/fulltext.html>), para formar oligómeros de ácido glicólico, para después ser convertidos por medio de un proceso de deshidratación a través de reacciones de condensación, formando el GA (Fig. 2).

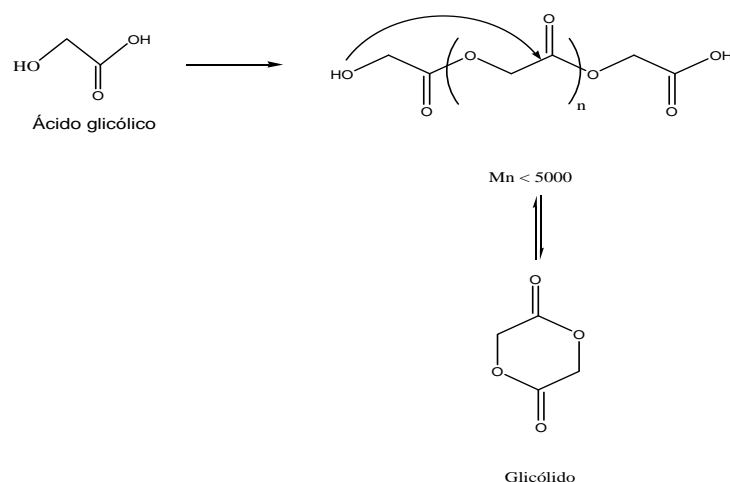


Figura 2: Método de obtención de GA a partir de ácido glicólico

Hasta el momento se han desarrollado distintos métodos de síntesis de estos copolímeros, empleando como catalizadores organometálicos de metales con orbitales “d” desocupados tales como Al, Sn, Sm y La, entre otros (Jeromé, 2008), y algunas sales orgánicas como Acetilacetato de calcio (Dobrzynski, 1999) para el control de la síntesis vía Polimerización por Apertura de Anillo (ROP por sus siglas en inglés). La desventaja que se encuentra en el empleo de estos catalizadores es su alta toxicidad tanto para el ambiente como para los seres humanos, además de la complejidad asociada al proceso de remoción de la matriz polimérica, aspecto esencial si se desean emplear en áreas clínicas. Debido a esto, se ha puesto énfasis en la sustitución de estos compuestos por enzimas, específicamente lipasas, que además de constituir un grupo de compuestos naturales y no tóxicos, no requieren de condiciones experimentales tan “limpias” como otros compuestos organometálicos, así mismo pueden ser recicladas y eliminadas con facilidad de la estructura de los polímeros (Albertsson, 2008).

Otro punto importante en el desarrollo “Verde” de estos métodos de síntesis, es la utilización de LIs, que son sales orgánicas con la propiedad de tener un punto de fusión bajo (<20 °C), una presión de vapor despreciable, alta estabilidad térmica, y en particular en el caso de catálisis enzimática, brindan estabilidad estructural a las enzimas (Rantwijk, 2007; Hua, 2005; Kubisa, 2004; Marcilla, 2006).

VI. ANTECEDENTES

VI.1 Polímeros y métodos de síntesis.

A lo largo de la historia de la civilización humana, las sociedades siempre han requerido del uso de materiales duros que le permitan o faciliten el llevar a cabo sus actividades cotidianas. Antes del inicio de la Segunda Guerra Mundial, existía una pequeña cantidad de materiales para manufactura, como son el acero, vidrio, madera, piedra y concreto que eran destinadas al área de la construcción y manufactura, mientras que el algodón, lana y otros productos derivados de la industria agrícola eran destinados a la manufactura de ropa. El rápido incremento en el área de la manufactura de productos después de la Segunda Guerra Mundial dio lugar al desarrollo de una amplia variedad de nuevas fibras, entre las cuales se encuentran los polímeros (Allcock, 2003).

Los Polímeros son macromoléculas constituidas por secuencias de unidades enlazadas entre sí. Los precursores de estas unidades se denominan monómeros (Odian, 1991). El término Polímero en general se usa para describir a las sustancias de altos pesos moleculares con estas características, es por eso que de manera más particular estas macromoléculas se clasifican según su peso molecular y la estructura que poseen. Típicamente, los pesos moleculares de los polímeros varían en un intervalo de 20'000 hasta varios millones de unidades, pero se pueden obtener polímeros con pesos moleculares menores a 10'000 para ciertas aplicaciones.

Los monómeros son todas aquellas sustancias que pueden reaccionar entre sí para dar lugar a la formación de los polímeros. Existen algunos monómeros que reaccionan entre sí en una secuencia limitada de pasos para formar dímeros (unión de 2 monómeros), trímeros (unión de 3 monómeros) y oligómeros (unión de una pequeña cantidad de monómeros inferior a 10 unidades de repetición). Los dímeros son usualmente moléculas lineales, pero los de mayor número de monómeros pueden ser lineales o cíclicos.

En función de su estructura, existen fundamentalmente dos tipos de polímeros: aquellos cuya estructura es lineal o ramificada, y aquellos que poseen entrecruzamientos entre las fibras que lo constituyen.

Un polímero lineal consiste de una larga cadena de átomos “esqueleto” a los cuales están unidos los grupos de sustitución. El Polietileno es el ejemplo más simple en esta categoría de los polímeros. Estos suelen ser solubles, sobre todo los de baja densidad o peso molecular en algunos solventes orgánicos, y en su estado sólido a temperaturas normales existen como elastómeros, materiales flexibles o termoplásticos similares al vidrio. Algunos otros ejemplos son el policloruro de vinilo (PVC), polimetacrilato de metilo y Nylon 66. (Fig. 3)

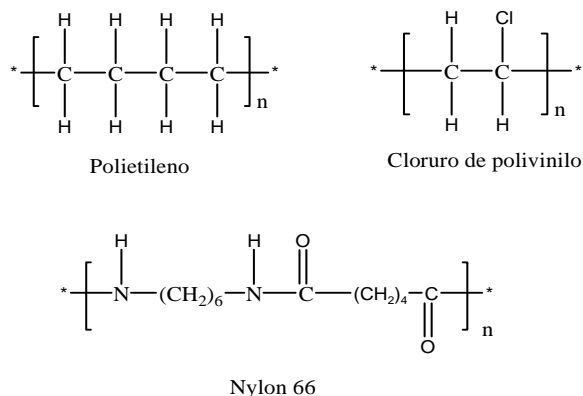


Fig. 3: Algunos ejemplos de polímeros lineales simples no ramificados.

Los polímeros ramificados pueden visualizarse como polímeros lineales a los cuales en algunos átomos de la cadena se ha enlazado un segmento con la misma estructura que la cadena principal. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son muy similares a las que presentan los polímeros lineales (Fig. 4). Se pueden distinguir de estos por su baja tendencia a cristalizar o porque presentan viscosidades diferentes.

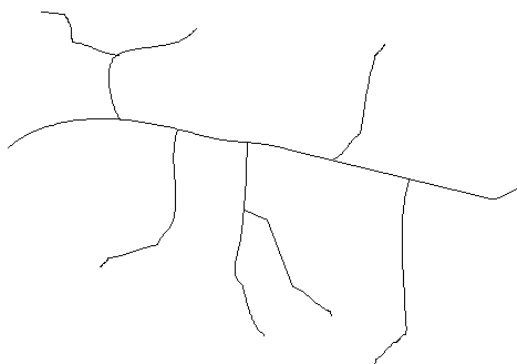


Figura 4: Estructura básica de un polímero ramificado.

Los polímeros entrecruzados, o también conocidos como “redes poliméricas”, son aquellos en los cuales los enlaces químicos en el polímero existen entre dos diferentes cadenas. Este tipo de polímeros son altamente insolubles, además de ser particularmente rígidos, debido a que las cadenas estructurales no pueden desplazarse entre sí, dando

así poca elongación de los polímeros. Esta capacidad mecánica puede ser modulada en función del grado de entrecruzamiento del polímero. (Fig. 5)

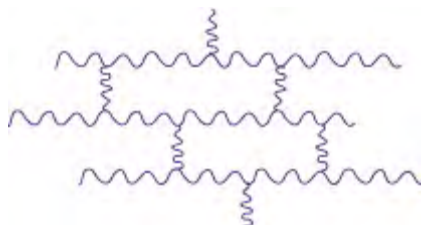


Figura 5: Esquema de la estructura de un polímero entrecruzado.

Además de estas 3 principales clasificaciones estructurales de los polímeros, existen 2 sub-tipos de polímeros denominado “polímeros estrella” y dendrímeros. Los primeros tienen estructuras en las cuales las cadenas divergen de un punto en común, con formas similares a una estrella de mar. El número de cadenas que divergen varía comúnmente de tres a seis, pero estas pueden ser más. Estos se preparan ya sea por el crecimiento de los brazos por polimerización a partir de un centro multifuncional, o por la unión de polímeros con un grupo funcional terminal que reaccionan entre sí para formar el centro.

Los dendrímeros son polímeros muy similares a los polímeros estrella, de igual manera son cadenas poliméricas que divergen de un mismo centro en común, pero a diferencia de estas poseen una estructura tridimensional con respecto al centro a partir del cual divergen. Su crecimiento puede dar lugar a estructuras tipo “árbol”, y el tamaño de dichas ramificaciones está limitada solo por el acomodo espacial de cada una de las cadenas (Allcock, 2003). Una representación esquemática de estas estructuras se muestra en la Figura 6.

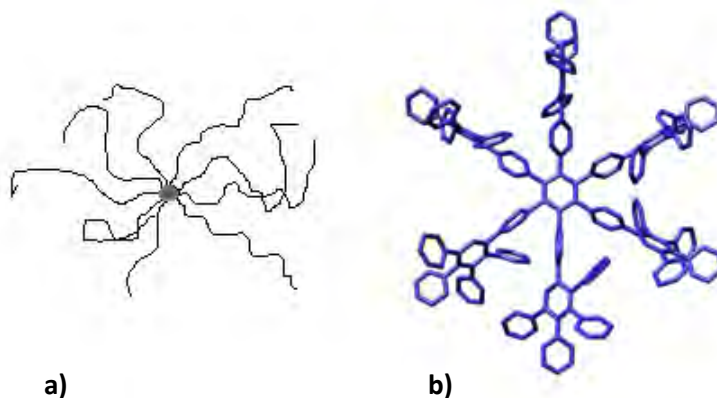


Figura 6: Estructuras de a) polímeros estrella, y b) dendrímeros

La secuencia de los monómeros a lo largo de toda la cadena del polímero puede ser constituida toda por una misma molécula, dando lugar a los Homopolímeros, o por 2 o más diferentes moléculas para en el caso de los Copolímeros.

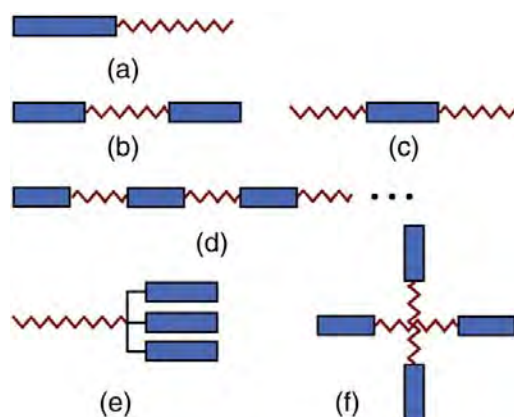
La secuencia de los monómeros en este último define 3 diferentes categorías (Escobar, 2008):

- a) Copolímero alternado: La secuencia de los monómeros es de tipo ABABAB....
- b) Copolímero al azar: No existe una tendencia periódica en la secuencia de los monómeros, teniendo una estructura tipo AABBBABBABAAA....
- c) Copolímero en bloque: La secuencia de los monómeros se observa en forma de bloques de un mismo tipo de molécula alternados, dando una estructura tipo AAABBBAABBBAABBB. La longitud de cada uno de los bloques es indefinida.
- d) Copolímero injertado: Su estructura base es la de un polímero ramificado, la cadena principal está constituida por un mismo monómero, y las ramificaciones están constituidas por el otro monómero que constituye el polímero.

Algunos polímeros están constituidos por monómeros que tienen un centro quiral siendo ópticamente activos. La regularidad en las configuraciones espaciales de los estereocentros sucesivos determina el orden de la cadena polimérica. Este orden recibe el nombre de Tacticidad (O'dian, 1991). En el caso en que la estructura de la cadena principal posee una secuencia aleatoria, o que carece de tal, de las configuraciones de los estereocentros a lo largo de esta se dice que son polímeros Atácticos.

Los polímeros pueden también ser Isotácticos, en el caso de que los centros quirales poseen la misma configuración a lo largo de la cadena. Si se representara la cadena en una proyección de Fisher, de tal manera que la secuencia de los monómeros estuviera en el plano de la superficie, los sustituyentes R de los monómeros estarían todos saliendo del plano. Si los sustituyentes R de cada uno de los monómeros están de manera alternada por encima y debajo del plano de la proyección a lo largo de la cadena, se dice que es un polímero Sindiotáctico (Ravve, 1995).

La construcción de copolímeros también puede dar lugar a 6 diferentes estructuras principales como consecuencia de la presencia de más de un solo tipo de monómero. Estas estructuras pueden designarse como: a) Dibloque AB, b) dibloque A-B-A, c) dibloque B-A-B, d) multibloque, e) tipo palmera y f) tipo estrella. En el esquema 1 puede observarse una representación gráfica de cada uno de estas estructuras de copolímeros (Jeromé, 2008).



Esquema 1: Representación de la clasificación de los polímeros en función de la secuencia de sus monómeros.

Los procesos y métodos de síntesis no enzimáticos de los polímeros pueden seguir diferentes mecanismos de reacción. Los mecanismos de polimerización que existen son:

- Polimerización vía radicales libres.
- Polimerización iónica.
- Polimerización por condensación
- Polimerización por apertura de anillo
- Polimerización por coordinación

VI.1.a Polimerización vía radicales libres.

Como su nombre lo indica, este proceso involucra la formación y reacción en cadena de especies orgánicas que poseen un radical libre en un carbono. La etapa de iniciación involucra la formación de un radical libre a partir del iniciador ya sea por acción de la luz o por aumento de temperatura. Los iniciadores más comúnmente empleados son los peróxidos. En la etapa de propagación se efectúa la reacción de adición del radical del iniciador al grupo vinílico del monómero, formándose un nuevo radical ahora en el monómero y se efectúa una reacción en cadena por la adición sucesiva de los radicales formados consecutivamente, hasta que el crecimiento de la cadena con el radical empiece a desactivarse. (Fig. 7)

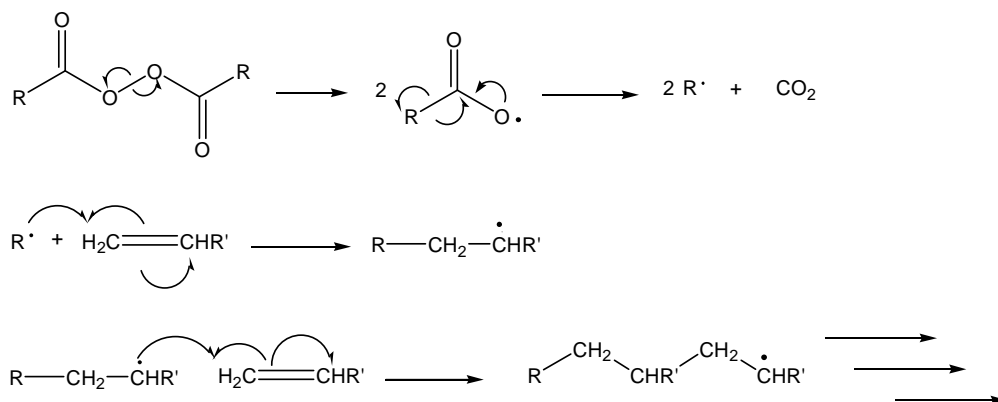


Figura 7: Etapa de iniciación y propagación de la polimerización vía radicales libres.

Al último la etapa de terminación puede concretarse de 3 diferentes formas:

- i) Por combinación con otra cadena radical
- ii) Por desproporción
- iii) Por transferencia, en el cual se forma un nuevo radical libre, con una especie ya sea un monómero, otro polímero, disolvente o un modificador.

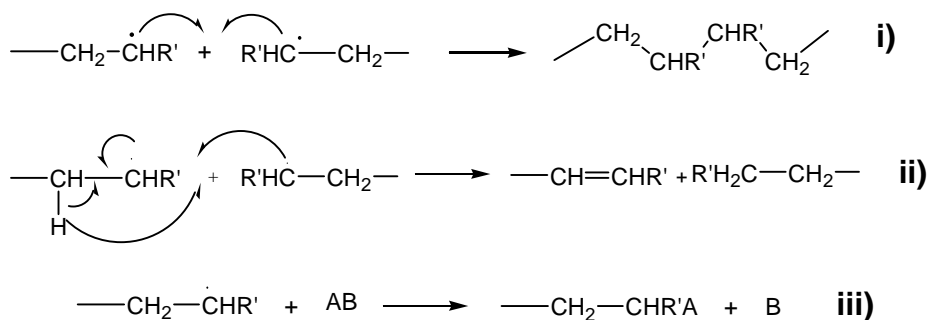


Figura 8: Mecanismos de terminación de polimerización vía radicales libres

VI.1.b Polimerización iónica

En esta vía de polimerización la reacción en cadena se lleva a cabo por la acción de especies cargadas, y según el signo de la carga de la especie que reacciona puede ser una polimerización catiónica o aniónica. La ruta por la cual procede tiene una estrecha relación entre la estructura del polímero y la reactividad del monómero de partida, dependiendo si los sustituyentes que posee son electroattractores o electrodonadores. Los monómeros más comúnmente usados son los compuestos vinílicos.

La polimerización aniónica en la mayoría de los casos se lleva a cabo mediante la reacción de un carbanión que es un carbono que posee una carga negativa, aunque también se pueden emplear monómeros que posean un grupo funcional con propiedades ácido-base, como el caso de un ácido carboxílico. Los iniciadores para la formación de estas especies son bases, complejos metálicos y metales libres que actúan como bases.

La etapa de iniciación se lleva a cabo por un mecanismo de ataque nucleofílico por parte de la especie de carga negativa del iniciador al carbono vinílico para formar el carbanión.

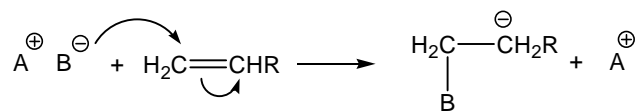


Figura 9: Mecanismo de reacción de iniciación para polimerización aniónica

La etapa de propagación puede considerarse análoga a la que ocurre vía radicales libres, excepto que el carbanión tiene un par de electrones desapareado para reaccionar. El mecanismo de acción se esquematiza en la Fig. 9.

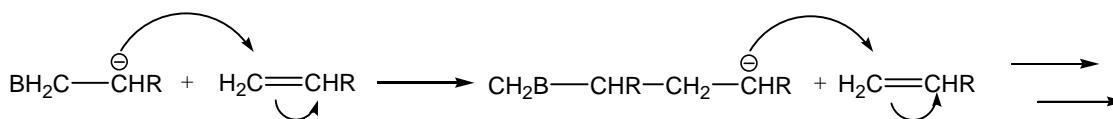


Figura 10: Etapa de propagación para la polimerización aniónica.

Por el contrario, la etapa de terminación de una polimerización aniónica es diferente a la vía radicales libres. Existen 3 diferentes formas de llevar a cabo esta etapa. La primera se realiza a partir de una eliminación de un hidruro (H) para eliminar el carbanión y formando un compuesto iónico, y el polímero con carga neutra, llevándose a cabo bajo condiciones de reacción extremas. El segundo proceso de terminación es a través de una reacción ácido-base con el disolvente, siempre y cuando este tenga propiedades ácidas. Por último la reacción de polimerización puede terminarse por reacción del carbanión con CO_2 para formar un anión carboxilato, el cual es mucho menos reactivo que un carbanión para el proceso de polimerización. Estos tres procesos se representan en la Fig. 10.

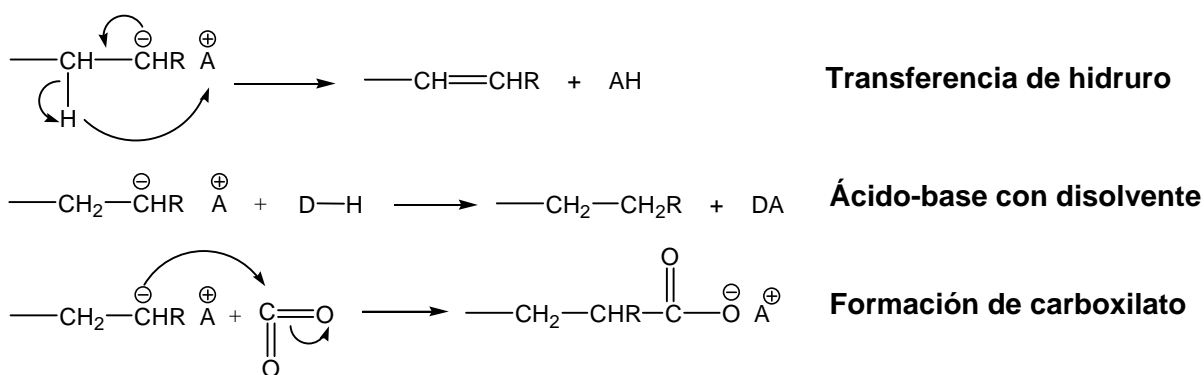


Figura 11: Procesos de terminación para la polimerización aniónica.

Un detalle característico de este tipo de polimerización es que los polímeros tienen una actividad indefinida de crecimiento de la cadena debido a que el carbanión que se forma puede quedar siempre estabilizado por el contra-ión formado desde el iniciador, por lo cual se suelen llamar Polímeros Vivos.

La ruta de polimerización catiónica de monómeros se lleva a cabo con la participación de un carbocatión, un carbono con una carga positiva, y los compuestos que se emplean para la formación del iniciador son ácidos de Lewis, como el BF_3 , AlCl_3 y SnCl_4 , con una base de Lewis, comúnmente agua, para formar un complejo con el metal. La formación del carbocatión se produce por la reacción de adición de un protón (H^+) al doble enlace del grupo vinílico, y estableciéndose la carga positiva en el carbono más sustituido.

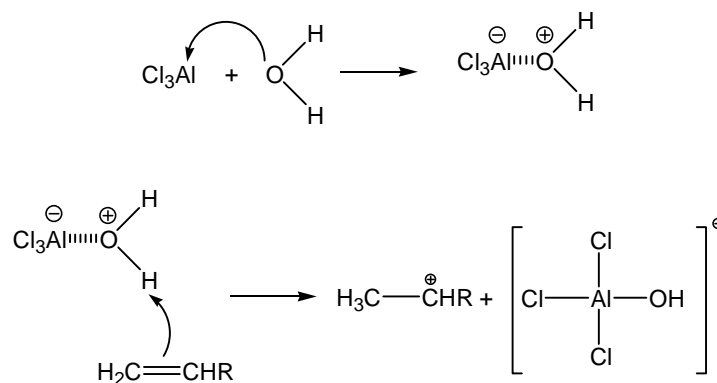


Figura 12: Proceso de iniciación de la polimerización catiónica

La etapa de propagación de la polimerización catiónica es análoga a la vía aniónica, por medio de la reacción del enlace π del vinilo con el carbocatión, formándose un nuevo enlace y un nuevo carbocatión en el monómero que se añadió a la cadena.

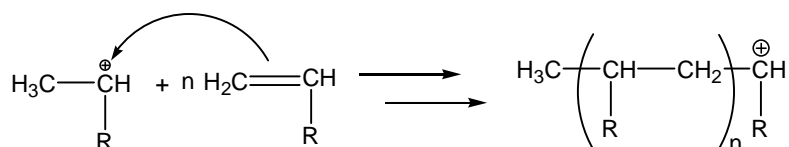


Figura 13: Mecanismo de la etapa de propagación en la polimerización catiónica.

Debido a la tendencia a estabilizar el carbocatión secundario formado en la cadena polimérica, los hidrógenos de carbonos adyacentes al carbocatión por su carácter ácido pueden reaccionar con otra molécula de monómero para por una parte terminar la propagación de la cadena, y por otra iniciar un nuevo carbocatión, a través de un proceso denominado transferencia de cadena. O también este mismo hidrógeno puede reaccionar con el contraión $(\text{AlCl}_3\text{OH})^-$ para restablecer el iniciador, y estabilizar el carbocatión a través de un enlace π .

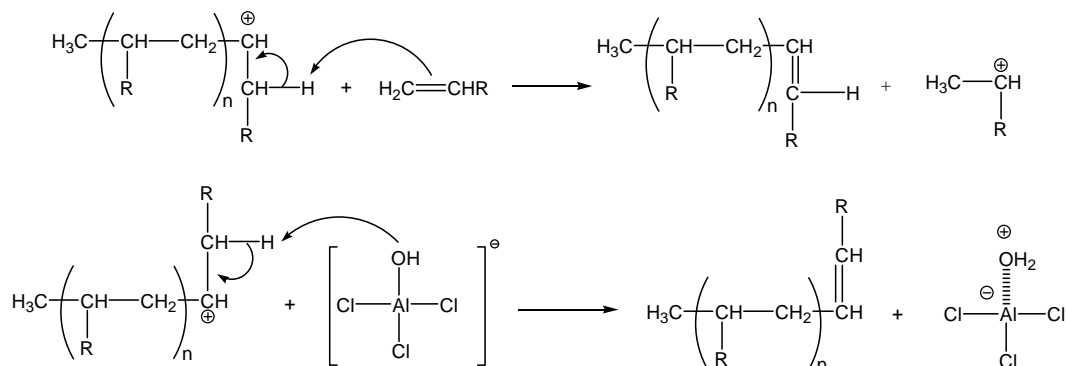


Figura 14: Proceso de inhibición de la polimerización catiónica por transferencia de cadena.

La etapa de terminación consiste en la reacción del carbocatión con uno de los átomos de cloro del iniciador, para restablecer la electroneutralidad de los compuestos, obteniendo

un polímero con un átomo de cloro terminal, y destruyendo el iniciador, por lo cual el proceso de polimerización queda por completo detenido.

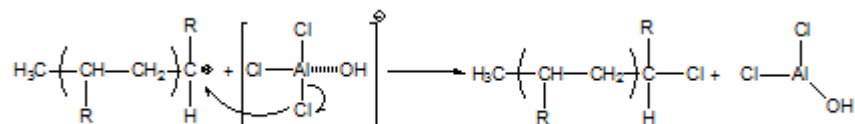


Figura 15: Mecanismo de terminación de la polimerización catiónica.

VI.1.c Polimerización por condensación.

Este tipo de polimerización ocurre de manera alterna, entre pares de grupos funcionales asociados a dos diferentes moléculas de monómeros, dejando como subproducto la formación de agua. Los mecanismos de reacción para esta polimerización se llevan a cabo por etapas que comprenden:

- Primera fase: Ataque nucleofílico el grupo funcional de uno de los monómeros para formar un dímero
- Segunda fase: El dímero reacciona en forma alterna con un tercer monómero vía un ataque nucleofílico y así de manera repetitiva hasta formar el polímero con un determinado peso molecular.

Debido a la diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en los monómeros, se presentan diversos mecanismos de reacción:

- Adición-eliminación al grupo carbonilo
- Adición-sustitución al grupo carbonilo
- Adición al doble enlace.

El primer tipo de los mecanismos puede ejemplificarse con el uso de monómeros con los grupos funcionales amina y ácido carboxílico terminales, para la formación de poliamidas.

El mecanismo de adición-sustitución es el método más ampliamente usado en la producción de poliacetales, a partir de la polimerización de aldehídos y alcoholes. La reacción de adición es a través de un ataque del grupo OH al carbonilo del aldehído, y la reacción de sustitución es vía un ataque nucleofílico del alcohol formado del aldehído con un monómero con grupo OH.

La polimerización por adición al doble enlace se lleva a cabo por reacciones en cadena de ataque nucleofílico por parte de un grupo funcional rico en electrones de un monómero y el carbono electrofílico de un doble enlace de un segundo tipo de monómero. Un ejemplo de este tipo de polimerización es la producción de poliuretanos, que utiliza un diisocianato como especie con doble enlace, y dioles como monómeros nucleofílicos.

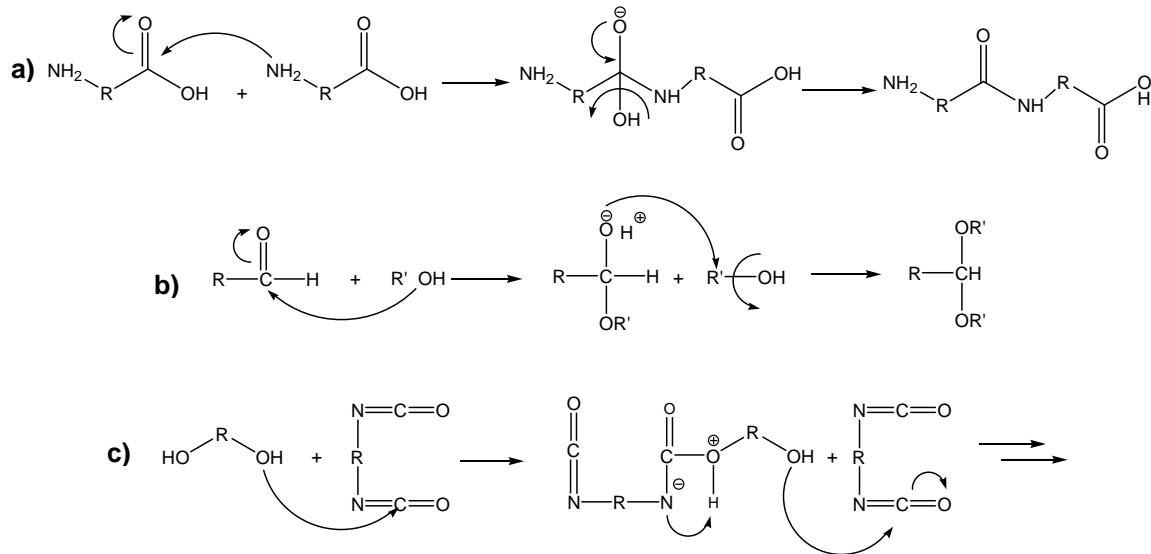


Figura 16: Mecanismos de reacción para la polimerización por condensación por a) adición-eliminación al carbonilo, b) adición- sustitución al carbonilo y c) adición al doble enlace.

VI.1.d Polimerización por apertura de anillo.

Todos aquellos monómeros que tienen una estructura cíclica, como las lactonas y lactamas, polimerizan vía apertura de anillo para formar estructuras lineales, y que dependiendo de la estructura del monómero, pueden tener diferentes grupos funcionales. La rapidez de la polimerización está relacionada con el tamaño del anillo y por la reactividad del grupo funcional que cierra el anillo.

La etapa de iniciación ocurre con un ataque nucleofílico, ya sea por una especie aniónica o electrofílica, al carbono unido al grupo funcional que cierra el anillo, para formar un monómero lineal aniónico. La etapa de propagación es la secuencia de reacciones de sustitución nucleofílica entre los monómeros cíclicos y la especie aniónica formada por la reacción de apertura de anillo. El proceso de terminación es una reacción de hidrólisis del polímero final y una molécula de agua.

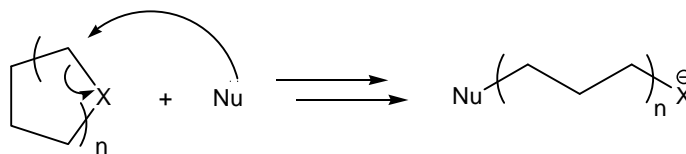


Figura 17: Mecanismo de reacción para la polimerización por apertura de anillo.

VI.1.e Polimerización por coordinación.

Este tipo de polimerización recibe este nombre debido a que se emplean catalizadores de metales de transición para producir la reacción en cadena de monómeros, por medio de enlaces de coordinación entre los orbitales π , σ o p ocupados de los monómeros con

orbitales d desocupados de los metales. Los elementos metálicos que se emplean mayormente pertenecen a los grupos IV-B al VII-B y de los grupos I-A al III-A de la tabla periódica.

Los compuestos de coordinación que más se usan en estos métodos de polimerización son haluros u oxihaluros de cromo, molibdeno, titanio, vanadio o zirconio, y compuestos aril o alquil derivados de aluminio, litio, magnesio o zinc conocidos como compuestos organometálicos, así como los hidruros de dichos elementos metálicos. Los catalizadores de este tipo más conocidos es el cloruro de Titanio, denominado catalizador de Ziegler-Natta, y el cloruro de Aluminio. Los sistemas de reacción en polimerización por coordinación son en una gran mayoría del tipo heterogéneos, con algunas excepciones como en el caso del uso de catalizadores de Vanadio.

Una ventaja del empleo de estos catalizadores es la alta estereoregularidad de los polímeros sintetizados, debido a la geometría específica de los orbitales atómicos del metal. Durante el proceso de polimerización, se adiciona una base de Lewis, por ejemplo una amina para ayudar a la estereoregularidad del polímero, el cual disminuye cuando el tamaño del grupo alquilo unido al metal aumenta.

Para ejemplificar el proceso de polimerización de coordinación, se considerará el caso del catalizador de Ziegler-Natta $TiCl_4/AlCl(CH_2CH_3)_2$, el cual se muestra en la Fig. 16. Esta estructura se observa posee un sitio vacante de coordinación, a través del cual se efectúa el enlace entre monómero y metal. La etapa de iniciación es la formación del enlace de coordinación del primer monómero con el centro metálico. La etapa de propagación inicia con un rearrreglo de los enlaces de manera que el monómero forma un enlace con el residuo $-CH_2CH_3$ del catalizador para iniciar el crecimiento de la cadena, y restablecer el sitio vacante de coordinación del Titanio, en el cual se podrá formar un nuevo enlace coordinado con un segundo monómero. El proceso de terminación es una migración de un hidruro del carbono β de la cadena polimérica hacia el centro metálico del catalizador y la subsecuente formación de un doble enlace terminal en la cadena polimérica y rompimiento del enlace polímero-catalizador. En este proceso aun sigue existiendo el sitio vacante del catalizador (Arrazola, 2002).

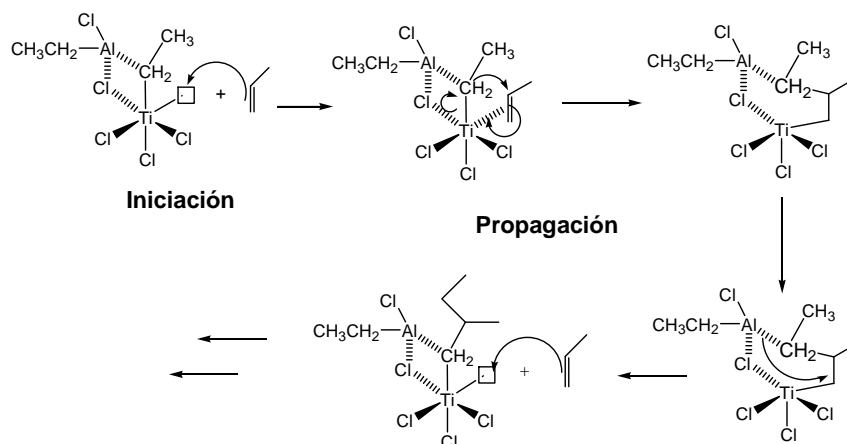


Figura 18: Mecanismos de reacción para las etapas de iniciación y propagación en una polimerización por coordinación.

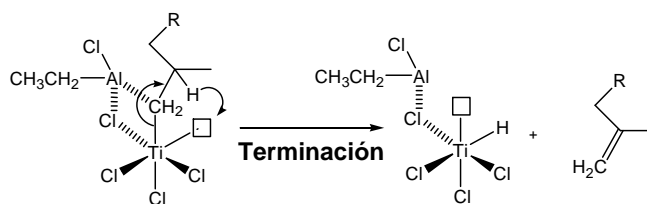


Figura 19: Mecanismo de reacción del proceso de terminación en la polimerización por coordinación.

VI.2 Polímeros biodegradables

En la actualidad existen 3 clases principales de materiales poliméricos en los que los investigadores han puesto su atención e interés. Estos materiales son denominados comúnmente como plásticos por los consumidores y la industria. Su diseño base es un compuesto conformado por una matriz de polímero que forma una fase predominante en torno a un material de relleno.

Los plásticos convencionales son resistentes a la biodegradación, debido a que los lugares en los que son depositados no contienen agentes químicos o microbiológicos que permitan este proceso, así como son resistentes ante el desgaste por la luz del sol (EPIC, 2000). Las bacterias presentes en estos suelos no son capaces de consumir una parte del plástico, lo cual causaría una degradación más rápida de la matriz de soporte. Este grupo de materiales usualmente tienen una matriz derivada del petróleo, la cual es reforzada con fibras de vidrio o carbono (Kolybaba, 2003).

La segunda clase de plásticos en consideración son parcialmente degradables. Estos son diseñados con el objetivo de tener una degradación más rápida que los plásticos sintéticos convencionales. La producción de esta clase de plásticos incluye fibras de polímeros de origen natural alrededor de una matriz convencional. Una vez que se desechan, los microorganismos consumen la parte exterior del material formada de macromoléculas naturales, dejando una matriz interna debilitada por la degradación del exterior.

La tercera y última clase de polímeros recibe actualmente una gran atención por parte de la industria y la comunidad científica. Estos plásticos están diseñados para ser completamente biodegradables. La matriz principal está derivada de fuentes naturales, como es el almidón y otros polímeros o biopolímeros de origen natural, con un refuerzo de fibras de origen vegetal tales como el cáñamo y lino. Los microorganismos son capaces de consumir estos materiales en su totalidad, dejando como productos de desecho agua y CO₂ (Kolybaba, 2003). En general, la posibilidad de que estos materiales sean atacados por agentes microbianos depende de la estructura molecular. Desde otro punto de vista, existen ciertos componentes que deben considerarse para que ocurra la biodegradación. Los más importantes, los microorganismos activados, deben estar presentes en el sitio de disposición de desechos. El tipo de microorganismos presentes determinan la temperatura adecuada para la degradación, la cual suele ser entre 20 y 60 °C. El sitio de

desecho deberá estar en contacto con oxígeno del aire, humedad y nutrientes minerales, así como tener un nivel de pH neutro, o ligeramente ácido (Kolybaba, 2003).

Durante la década de los 80's y en los inicios de los 90's la denominada "crisis de los vertederos" en muchas partes de los países desarrollados generó la noción de que esta crisis podía ser disminuida si una gran cantidad de los materiales que eran depositados podían degradarse y así dejar disponible el espacio que antes ocupaban. Ante esta situación, un pequeño grupo de compañías en todo el mundo desarrollaron ciertos materiales con la capacidad de degradarse por medios biológicos o luminosos. La mayoría de estos productos eran compuestos modificados de las resinas convencionales, las cuales podían desintegrarse con el paso del tiempo en pequeñas piezas, pero no presentaban las características de una degradación biológica.

En base a información de la ASTM, se consideran las siguientes definiciones sobre los materiales plásticos degradables:

- Un plástico biodegradable es aquel en el que ocurre una degradación por la acción metabólica de microorganismos como son hongos, algas o bacterias.
- Un plástico compostable es aquel que sufre una degradación por procesos biológicos durante el proceso de compost para producir agua, CO₂, compuestos inorgánicos y biomasa a una velocidad constante dejando residuos tóxicos no visibles (APIC, 2000).

Los biopolímeros que se obtienen de fuentes naturales provienen de 4 fuentes principalmente. Los dos primeros y más grandes rubros son las fuentes vegetales y animales, que proveen principalmente celulosa, almidón el primero, así como quitina, la cual puede ser procesada también para fabricar quitosano. Las dos restantes aun siendo las menos importantes, son sin embargo las áreas que reciben una mayor atención y las cuales tienen un potencial grande de desarrollo a largo plazo. El primer rubro de estos últimos es el desarrollo microbiológico, a partir del cual puede obtenerse ácido poliláctico, y una amplia variedad de polihidroxialcanoatos, por vías fermentativas de fuentes de carbono y nitrógeno. Y por último, están las materias primas agrícolas como fuente de biopolímeros, siendo ejemplos la celulosa o el almidón (Kolybaba, 2003).

De manera general, los polímeros obtenidos de fuentes naturales pueden clasificarse en 3 amplios grupos:

- Polisacáridos (almidón, celulosa)
- Poliésteres (polihidroxialcanoatos)
- Otros (gomas, lacas) (EPIC, 2000)

Los sectores en los que en los últimos años se ha introducido la aplicación de los biopolímeros incluyen el sector médico, la agricultura y las industrias de embalaje y automotriz, siendo el sector de la industria del embalaje la que ha recibido una mayor atención y desarrollo, estimando que un 41% de los plásticos se destina a este rubro.

Algunos materiales comerciales que se conocen son Ecoflex, producido a partir de almidón y poliéster, y Depat fabricado por Environmental Polymers, un alcohol polivinílico.

De igual manera, existe un amplio número de polímeros que se producen de materias primas provenientes de fuentes petroquímicas o biológicas que son biodegradables. Algunos de ellos ya se conocen desde hace algunos años, ya sea como materiales de “curiosidad” o materiales de comercio en nichos de mercado como por ejemplo materiales de sutura solubles para usos quirúrgicos.

Otros casos de materiales poliméricos de origen sintético son: polialquilenésteres, ácido poliláctico y sus copolímeros, ésteres de poliamidas, alcoholes polivinílicos y polianhídridos. Cada uno de estos poseen propiedades particulares como solubilidad, rigidez y biocompatibilidad, de la cual dependen sus posibles aplicaciones, además de que cada uno de ellos han mostrado una gran degradación promovida por microorganismos en combinación con métodos ya sean químicos o mecánicos (EPIC, 2000).

Los métodos de biodegradación de los polímeros pueden considerarse como parte de alguna vía específica de 3 procesos principales: Acción biológica, fotodegradación o ataque por medios químicos, y el proceso por el cual cada material se degrade, depende de la estructura química que posea, de las condiciones ambientales del sitio de desecho y del tipo de microorganismos presentes en el suelo en el cual son depositados. En algunos casos puede ocurrir alguna combinación de los procesos de degradación, como por ejemplo una primera etapa de degradación fotoquímica seguido de un ataque microbiológico (Kolybaba, 2003).

VI.2.a Polímeros degradables a base de CL y GA

Como se menciona anteriormente, los polihidroxialcanoatos (PHA's) ofrecen una amplia serie de propiedades físicas, son producidos de manera natural por bacterias por procesos fermentativos, y tienen la ventaja de ser biodegradables además de provenir de fuentes renovables. Sin embargo, estos PHA's tienen actualmente un elevado costo comercial, a razón principalmente de su compleja purificación que se requiere seguido de su síntesis *in vitro*, además de su muy baja solubilidad en solventes para extracción que presentan una muy baja o nula toxicidad al ambiente (Gorke, 2007). Ciertos poliésteres alifáticos, tales como el poli(CL) (PCL), el PLA y el poliGA, pertenecen a un grupo de polímeros biodegradables y biocompatibles que han recibido un gran interés en años pasados y que han sido ampliamente usados en campos de la biomedicina (Dai, 2009).

Los implantes médicos y quirúrgicos basados en polímeros biodegradables, particularmente aquellos preparados a partir de PG y sus copolímeros con poliláctido (PLA) son ampliamente usados en medicina dentro del área quirúrgica como implantes de tratamientos de fracturas o lesiones de órganos internos, para asegurar una función mecánica o terapéutica durante la reparación del tejido, así como soporte celular en Ingeniería de Tejidos (Dobrzynski, 1999). La preparación de termogeles a partir de estos materiales han encontrado un gran uso como acarreadores de principios activos aplicados

vía oral, dérmica, ocular y subcutánea, debido a su facilidad de formulación, liberación localizada, periodos prolongados de acción y comodidad para el paciente (Jiang, 2009).

PG y sus copolímeros han atraído un gran interés debido a su alta biodegradabilidad y una baja inmunogenicidad para el cuerpo y salud humanos. El PG presenta una alta rigidez, alta cristalinidad, rápida velocidad de absorción (cerca de 6 meses) y baja temperatura de fusión. La PCL igualmente se conoce por ser biocompatible y biodegradable siendo incluso ya aprobado por la FDA como un material para implantes anticonceptivos, pero por su propiedad hidrofóbica posee una velocidad de degradación muy lenta. Por otra parte, el poli(GA-co-CL) (PGCL) conforma un material flexible lo cual le permite ser empleado como suturas, y presenta bajas temperaturas de transición vítrea y de fusión (Puskas, 2009). Algunos otros polímeros biodegradables preparados también con láctido han sido ampliamente usados como transportadores de fármacos, siendo el caso específico del copolímero de láctido y GA como matriz de sistemas de liberación de fármacos el que ha tenido un rápido desarrollo (Huijser, 2006; Jiang, 2009). No obstante, hace pocos años el copolímero formado a partir de GA y CL ha despertado un interés, siendo hasta ahora utilizado satisfactoriamente como sutura quirúrgica. Pero aun se encuentra poca información referente a la aplicación de este para liberación de fármacos, debido a la poca solubilidad que presenta en medios biológicos (Cai, 2002). Los factores que afectan la degradación de estos polímeros son su masa molar, el grado de distribución de masa molar y su composición química y microestructura (Huijser, 2006). De manera general, varios materiales con un amplio espectro de propiedades puede obtenerse por la copolimerización de los monómeros modulando diferentes proporciones de cada uno de estos (Dobrzynski, 1999; Jiang, 2007).

La mayoría de los métodos reportados para la síntesis de estos polímeros y sus copolímeros siguen una ruta de polimerización por coordinación con compuestos organometálicos de estaño como catalizador. Existe una amplia cantidad de iniciadores aniónicos, catiónicos u organometálicos reportados para el método de Polimerización por Apertura de Anillo (ROP). De manera general, los iniciadores iónicos son los que presentan una mayor reactividad. Un gran número de derivados organometálicos de metales con orbitales *d* desocupados, tales como Al, Sn, Nd, Y, Sm, La, Fe, Zn, Zr, Ca, Ti y Mg ofrecen los mejores resultados para el control de la polimerización en contraparte a sus especies iónicas, sin embargo presentan varias desventajas operativas en su uso. Hasta el momento, el octoato de estaño y algunos alcóxidos han sido los catalizadores organometálicos más usados para métodos de ROP de lactonas. De manera concreta a nuestro estudio, Kricheldorf produjo una copolimerización de GA y CL empleando catalizadores de Fe, Zn y Al a temperaturas de 100 °C, mientras que con catalizadores de Sn se realizó a temperaturas de 160 – 220 °C (Jerome, 2008; Varma, 2005; Bero, 1999).

Sin embargo, la situación ambiental ha provocado que se busque el uso de catalizadores que no impliquen un impacto tóxico en el proceso de desecho. Además de que en caso de que los materiales sean enfocados a su uso en aplicaciones biomédicas, estos deben estar completamente libres de la presencia de estos elementos metálicos, lo cual implica un proceso altamente complejo durante la síntesis de estos materiales.

En base a esto último, se han buscado métodos que impliquen el uso de reactivos mas amigables con el ambiente y menos tóxicos para el cuerpo humano, esencialmente aquellos que están implicados en procesos metabólicos como son Ca, Mg y Fe. En este aspecto, Kricheldorf y Dobrzynski han desarrollado métodos que emplean iniciadores de Fe y Acetilcetonato de Calcio respectivamente (Dobrzynski, 1999). Pero aun más recientemente, se ha abierto una serie de investigaciones que involucran el uso de enzimas como catalizadores.

VI.3 Lipasas y su uso como biocatalizadores en la síntesis de poliésteres.

Las lipasas son un grupo de enzimas, pertenecientes a la familia de estearasas, solubles en medios acuosos que catalizan la hidrólisis de enlaces éster y debido a que presentan una actividad reversible, pueden también catalizar reacciones de esterificación. Este comportamiento está en gran medida regulado por la concentración de agua en el medio en que actúa, ya que además de estar involucrada en la estructura enzimática y mantener la actividad catalítica, forma parte de los reactivos o productos de las reacciones que cataliza, por lo cual puede favorecer alguno de los sentidos del equilibrio químico. Se ha demostrado que estas enzimas pueden actuar tanto en medios acuosos como no acuosos, y poseen cierta estabilidad tanto en ambientes polares como no polares. Se ha demostrado que el proceso de activación de la enzima resulta de un cambio conformacional de su estructura. Este cambio se explica como un movimiento de “asa” por un fragmento de α -hélice formado por una secuencia de 20 aminoácidos llamado “tapa”, el cual cierra el sitio activo de la enzima impidiendo el paso de los sustratos, y de la misma forma se reactiva dejando al descubierto el sitio activo de la enzima, dejando así una superficie hidrofóbica a la cual se unen sustratos con la misma propiedad. El sitio activo de la enzima está compuesto de un residuo nucleofílico de serina activado por un puente de hidrógeno con residuos de histidina, aspartato o glutamato. El residuo nucleofílico se localiza en una sección entre una α -hélice y una β -lámina. Los pesos moleculares de las lipasas, medidos en kDa, van desde 60 hasta 30 (Albertsson, 2008; Varma, 2005; Porras, 2009).

Las lipasas constituyen el grupo de biocatalizadores más importante para aplicaciones biotecnológicas, entre las que destacan la síntesis de biopolímeros y biodisel, la producción de fármacos enantioméricamente puros, agroquímicos y saborizantes. Hace aproximadamente 100 años el microbiólogo C. Eijkman reportó que varias clases de bacterias producen y secretan estas lipasas. Hoy día grandes cantidades de lipasa son obtenidas a partir de bacterias y hongos, con grandes rendimientos en su producción a través de un proceso llamado “sobreexpresión”, o por un segundo método conocido como “doblamiento y secreción” (Jaeger, 2002).

Su gran importancia como biocatalizadores se debe principalmente a que las lipasas pueden aceptar una gran cantidad de sustratos manteniendo un alto reconocimiento quiral y regioselectividad. Indistintamente del organismo a partir del cual han sido aisladas y las variaciones en su peso molecular, todas las lipasas poseen una marcada similitud estructural y funcional (Albertsson, 2008).

La catálisis enzimática *in vivo* posee características altamente específicas en comparación con la catálisis *in vitro*. Debido a que fueron diseñadas por la naturaleza, el primer tipo de catálisis procede bajo condiciones suaves, en la mayoría de los casos en medio acuoso en valores de pH neutro, a bajas temperaturas y conversiones cuantitativas. En el caso *in vitro* la catálisis se realiza en masa o “bulk” en agua o empleando solventes no acuosos. Las enzimas presentan diferentes propiedades en disolventes orgánicos, y su selectividad es distinta a la que tienen en agua. El problema asociado con los solventes orgánicos, que normalmente involucran la síntesis de enlaces éster o amida, es la posible desactivación de la enzima. Además en disolventes orgánicos son menos reactivas, pero por el contrario pueden catalizar reacciones que en medios acuosos sería imposible de realizar. Otras posibles causas de la baja actividad es la inaccesibilidad de los sustratos hacia el sitio activo por la formación de sistemas heterogéneos por la insolubilidad de la enzima, o por cambios conformacionales de la enzima en estos medios (Varma, 2005).

La reciente introducción de las enzimas durante la última década para la síntesis de polímeros en solventes orgánicos tales como los poliésteres catalizado por enzimas ha llevado a un aumento en las investigaciones en esta área. Lo atractivo del enfoque biocatalítico en los materiales tiene 2 fundamentos: 1) el desarrollo de nueva tecnología que no dependa de recursos provenientes del petróleo y 2) su potencial para sintetizar materiales que no están disponibles por métodos químicos. La regioselectividad de las enzimas puede ser aprovechada para la síntesis de polímeros funcionales con características únicas (Marcilla, 2006). Inicialmente, la mayoría de los procesos de poliesterificación enzimática fueron vía poli-condensación. Recientemente se han desarrollado métodos de polimerización que involucran los métodos de apertura de anillo y de poliadición / policondensación. Otros de los beneficios de utilizar las enzimas para biocatálisis en medios orgánicos frente a medios acuosos son: a) Incremento de la estabilidad térmica debido a una mayor rigidez de la enzima, b) Mayor solubilidad de los sustratos en el medio de reacción y c) No es necesario un ajuste del pH para realizar la reacción (Bisht, 2007; Kobayashi, 1998).

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de poliésteres biodegradables por medios químicos ha implicado el uso de catalizadores organometálicos los cuales deben ser completamente eliminados para aplicaciones biomédicas, lo cual es prácticamente imposible de realizar. Además de requerir monómeros extremadamente puros y condiciones totalmente anhidras para que la reacción se lleve a cabo, además de usar temperaturas mayores a 200 °C en combinación con otros métodos para remover las moléculas de agua producto de la reacción. Por otro lado, la polimerización catalizada por enzimas es un proceso mucho más sencillo y que puede efectuarse a temperaturas mucho más bajas y con bajas presiones, además de no ser necesario eliminar el agua del medio de reacción, ya que esta influye en la estructura de la enzima por enlaces tipo puente de hidrógeno. El uso de enzimas contribuye a una sustentabilidad global por el uso de sustratos de origen no petroquímico y renovable, incluso desde el hecho de que las enzimas se obtienen de recursos renovables y se consideran desechos no tóxicos. Se ha probado que la inmovilización de la enzima en un soporte poroso ya sea por adsorción o

deposición es una técnica eficiente para aumentar su actividad en comparación con el uso de las enzimas en su forma libre, con la ventaja de que pueden ser recuperadas del medio de reacción para re-uso, así como para aumentar la estabilidad térmica de las enzimas, estabilizando la estructura terciaria de la enzima (Albertsson, 2008;Varma, 2005; Puskas, 2009).

Ha existido un incremento muy acelerado en la investigación dentro del área de la polimerización enzimática no solo de sustratos naturales, sino también de muchos otros compuestos sintéticos. Las lipasas han sido reportadas como catalizadores para la polimerización de apertura de anillo. El primer trabajo que se presentó tuvo lugar en el año de 1993 para la polimerización por apertura de anillo de lactonas catalizada por lipasas, por los grupos de trabajo de Kobayashi y Knani de manera independiente, y a partir de estos trabajos esta técnica ha sido desarrollada como un nuevo método de síntesis de polímeros a partir de lactonas, láctidos y macrólidos, carbonatos cíclicos, oxiranos y depsipéptidos. La lipasa que más ha sido empleada es la Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada físicamente y disponible comercialmente (Albertsson, 2008; Varma, 2005).

La secuencia de aminoácidos y la estructura tanto del sitio activo como de la enzima ha sido definida en el año de 1994 por Uppenberg, la cual se muestra en la Fig. 19. Posee un sitio activo relativamente estrecho y profundo que consiste de serina (ser105), histidina (His224) y aspartato (Asp187) como la triada catalítica. Está compuesto por dos diferentes canales, uno recibe la sección carboxílica y el otro la fracción alcohólica del sustrato, siendo el primero de estos el más espacioso. En base a estudios cinéticos, se ha logrado descifrar el mecanismo de reacción de la CALB para la polimerización de monómeros cíclicos con un grupo funcional carboxilo, el cual consta de 4 pasos:

- El primer paso es la formación de un intermediario tetraédrico formado por el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina al grupo carbonilo del monómero, formando un oxianión el cual es estabilizado por 3 puentes de hidrógeno con glutamina (Gln106) y con treonina (Thr40).
- El segundo paso es la ruptura del enlace en el cual se realiza la apertura del anillo del monómero, formando así un complejo acil-enzima.
- El tercer paso es la formación de un segundo intermediario tetraédrico ya sea por una molécula de agua, la cual puede ser del agua residual de la enzima o el agua de residuo de la reacción y liberar el derivado del monómero, o por algún otro derivado de monómero que previamente ha sido obtenido de una reacción enzimática previa. Nuevamente se forma un oxianión estabilizado por puentes de hidrógeno con Gln106 y Thr40, tal como se describió en la primera etapa del mecanismo.
- Para finalizar, el complejo acil-enzima es hidrolizado dejando libre ya sea el polímero formado o el monómero en su forma libre.

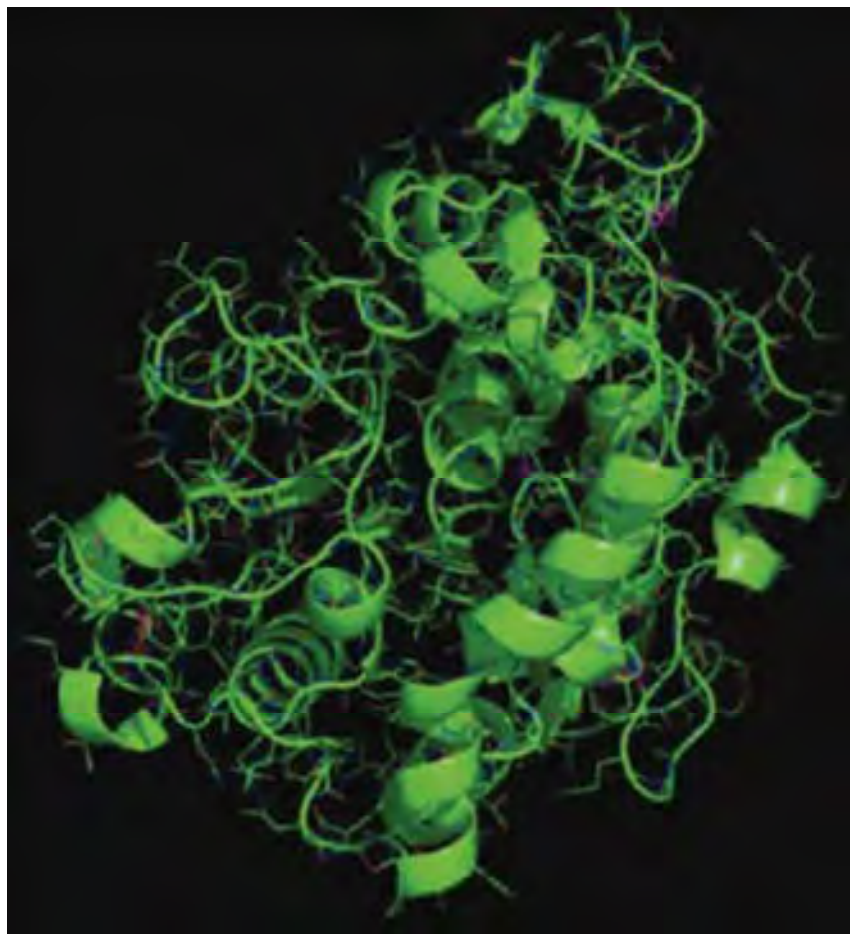


Figura 20: Estructura tridimensional por computadora de la proteína CALB

Experimentalmente, se ha encontrado que el intervalo óptimo de temperatura para la estabilidad de CALB es de 40 – 60 °C. En la Fig. 20 se esquematiza el mecanismo de reacción de la enzima usando como modelo una reacción de transesterificación (Puskas, 2009).

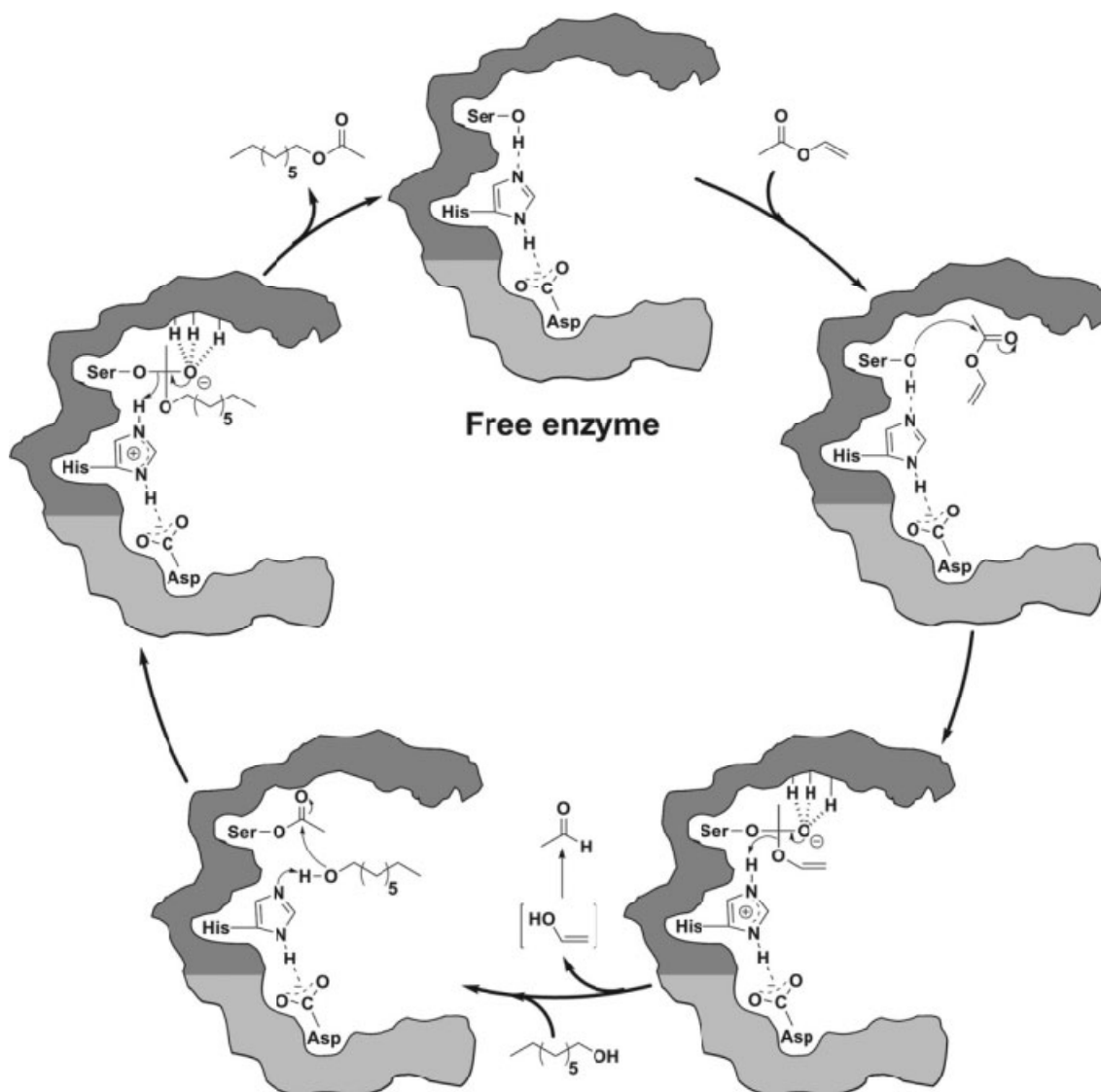


Figura 21: Mecanismo de reacción para la transesterificación catalizada por la enzima CALB.

Siguiendo el mecanismo de reacción de la transesterificación catalizada por la enzima CALB descrito anteriormente, se puede explicar el proceso de polimerización de lactonas por un mecanismo de apertura de anillo ROP, el cual se ejemplifica en la Figura 22.

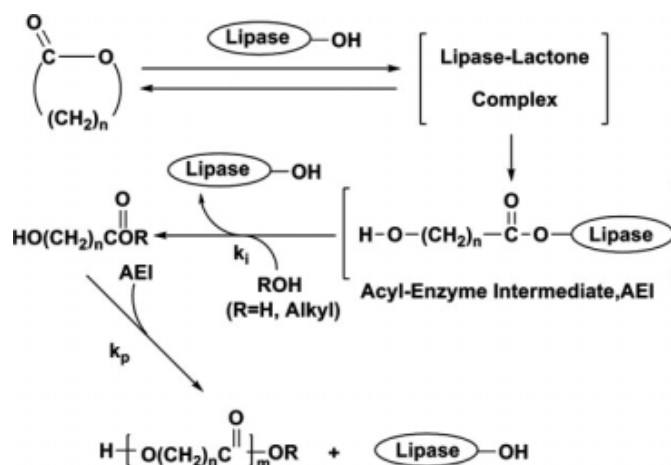
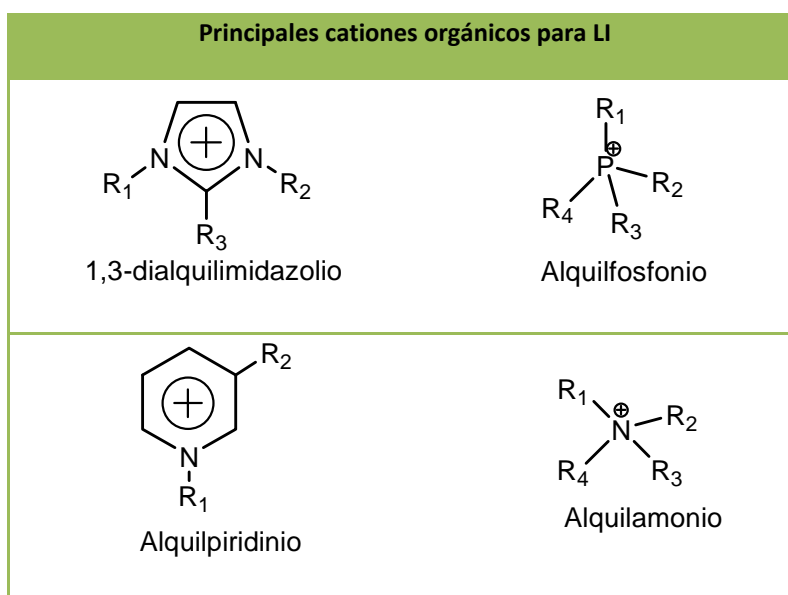


Figura 22: Mecanismo de polimerización por apertura de anillo de lactonas catalizado por enzimas

VI.4 Líquidos iónicos y su uso como medio de reacción en síntesis enzimática empleando lipasas.

El desarrollo de procesos seguros y benignos para el ambiente ha jugado un papel importante en los procesos de manufactura y remediación medioambiental. En la búsqueda de procesos químicos más eficientes y limpios recientemente se ha extendido la atención a una nueva clase de solventes con alto potencial denominados LI (Moon, 2006). Los LI's son sustancias que están completamente compuestas por iones, ya sea tanto de sales orgánicas como de mezclas de sales, siendo el catión una especie orgánica y el anión un compuesto inorgánico, y a pesar de su naturaleza iónica son líquidos a temperatura ambiente. Estos electrolitos son líquidos debido a que este estado físico es el más estable termodinámicamente debido al gran tamaño de los iones y la flexibilidad conformacional que presentan (Seoud, 1999; Kubisa, 2004). Una convención actual es considerar como LI a todas aquellas sales cuyo punto de fusión es menor al punto de ebullición del agua (100 °C), o también se les conoce con los nombres menos comunes: fluido iónico, sal fundida, sal fluida, o solventes neotéricos (Seoud, 1999). El primer registro que se tiene de un LI data de 1974 cuya fórmula es (EtNH₃)(NO₃) (Moon, 2006). Típicamente los LI comerciales están compuestos de sales de 1,3-dialquilimidazolio, alquilamonio, alquilfosfonio o alquilpiridinio y los aniones más comunes son AlCl₄⁻, BF₄⁻ o PF₆⁻, algunos ejemplos se muestran en los esquemas 2 y 3. Desde entonces, ha habido un gran desarrollo de nuevos LIs debido a que sus propiedades pueden ser moduladas con la estructura química de los cationes orgánicos pudiendo ser aplicados en diferentes áreas como lo son la petroquímica, la industria farmacéutica y la catálisis química (Kubisa, 2004; Moon, 2006).

Principales aniones en Líquidos Iónicos		
Anión	Nombre	Abreviación
BF_4^-	Tetrafluoroborato	$[\text{BF}_4]$
PF_6^-	Hexafluorofosfato	$[\text{PF}_6]$
NO_3^-	Nitrato	$[\text{NO}_3]$
CH_3CO_2^-	Acetato	[Ac]
CF_3CO_2^-	Trifluoroacetato	[TFA]
CH_3SO_4^-	Metilsulfato	$[\text{MeSO}_4]$
CF_3SO_3^-	Trifluorometilsulfonato	[TfO]
$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	Bis[(trifluorometil)sulfonyl]amida	$[\text{Tf}_2\text{N}]$



Esquema 2 y 3: Estructuras de los iones más comunes en los Líquidos iónicos

Las propiedades típicas de los LI son las siguientes (Moon, 2006):

- 1) Son sales cuyo punto de fusión es menor a los 100 °C.
- 2) Son considerados “solventes verdes” debido a que no son flamables ni volátiles bajo condiciones ambientales de trabajo.
- 3) Se mantienen en estado líquido en un amplio intervalo de temperaturas, incluso por arriba de 300 °C debido a que su presión de vapor es extremadamente baja considerando para aspectos prácticos que no poseen presión de vapor, y además son térmicamente muy estables, lo cual amplía el margen de su uso frente a disolventes orgánicos comunes e incluso el agua.

- 4) Son solventes diseñables, debido a que sus propiedades químicas o físicas tales como punto de fusión, viscosidad, densidad, hidrofobicidad y polaridad pueden ser modificados alterando la naturaleza de los cationes y los aniones.
- 5) Los LI son capaces de disolver una gran cantidad de compuestos orgánicos, inorgánicos, organometálicos y polímeros
- 6) Estos disolventes pueden ser reciclados y reutilizados
- 7) Normalmente, los LI que poseen cadenas alquílicas largas del catión y aniones voluminosos tienen una mayor viscosidad y más baja polaridad.

Una de las propiedades particulares de los LI es su alta polaridad. Se observa una correlación entre la polaridad y la estructura química del mismo: la polaridad disminuye en función del incremento de la cadena alquílica del catión y del aumento del tamaño del anión. Debido a esto los LI forman un medio de reacción adecuado para reacciones químicas y bioquímicas (Yang, 2005). A pesar de ser muy polares, la mayoría de estos suelen ser hidrofóbicos y pueden disolver un máximo de 1% p/p de agua, a su vez la presencia de agua puede alterar las propiedades fisicoquímicas de los LI e incluso reaccionar con estos por hidrólisis del anión. A su vez, algunos compuestos orgánicos e inorgánicos son inmiscibles con estos, lo que plantea la posibilidad de realizar reacciones en sistemas heterogéneos. (Kubisa, 2004).

Aunque algunos de los LI están actualmente disponibles comercialmente, muchos requieren ser sintetizados en el laboratorio. Este proceso involucra 2 etapas: la primera es una reacción de Sustitución Nucleofílica entre un haluro terciario y un haluro de alquilo o un metanosulfonato de alquilo. La segunda etapa del proceso consiste en una metátesis del contraión del haluro formado (Seoud, 1999).

Las impurezas generadas como subproductos de las reacciones de síntesis así como por su uso como disolventes, tales como el agua, los haluros, sales orgánicas sin reaccionar y otros compuestos orgánicos fácilmente se acumulan en los LI, de los cuales se debe tener cuidado ya que pueden alterar sus propiedades o alterar o interferir los reactivos o catalizadores.

Otra propiedad interesante de los LI es su viscosidad, ya que puede alterar la cinética de una reacción debido a procesos lentos de transferencia de masa. El valor de la viscosidad de un LI aumenta con el incremento del tamaño de la cadena alquílica principalmente, y a su vez éste disminuye al aumentar la temperatura a la que se somete el LI (Rantwijk, 2007; Yang, 2005).

Estos disolventes han emergido como una alternativa a los solventes orgánicos en catálisis enzimática, pues han mostrado que algunos de ellos favorecen la estabilidad de las enzimas más eficientemente que los disolventes convencionales, así como de incrementar la actividad catalítica y la vida útil de estas.

Por tanto, el uso de LI como disolventes en síntesis enzimática de polímeros puede reducir sustancialmente el costo de los procesos al reducir la cantidad de enzima requerida, así como por la posibilidad de reciclarlos (Gorke, 2007). Otros procesos

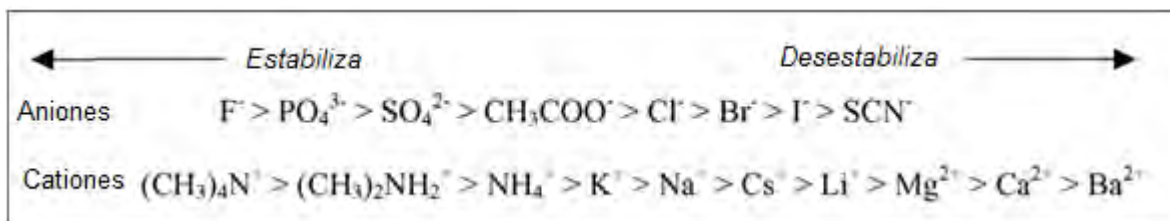
catalíticos que se han llevado a cabo con buenos resultados en LI son: transesterificación, conversión, alcoholólisis, amoniólisis, hidrólisis, epoxidación, resolución, oxidación, reducción y desracemización (Moon, 2006).

Se ha encontrado que las enzimas que muestran cierta actividad catalítica en LI no son solubles en estos, y por otro lado aquellas enzimas solubles en estos disolventes pierden su actividad, como lo es el caso de la CALB que se disuelve en [BMIM][NO₃], [BMIM][lactato] y [EMIM][EtSO₄]. Esta pérdida de la actividad puede deberse a la desnaturalización de la enzima, la cual puede ser reversible. La desnaturalización de una enzima está presuntamente relacionada a la naturaleza iónica del LI: los cationes o aniones pueden interactuar con los residuos cargados de la enzima o por solvatación con las moléculas de agua de la estructura enzimática (Yang, 2005). La estabilidad y actividad de una enzima en los LI puede ser discutido en términos del efecto Hoffmeister (Rantwijk, 2007).

Hace más de un siglo, Hoffmeister encontró que los iones presentan diferentes habilidades para precipitar proteínas. La secuencia de los iones ordenados en función de su habilidad para precipitar las proteínas se conoce como la Serie Hoffmeister. El efecto de los iones en la estabilidad de las proteínas se debe a interacciones químicas entre las proteínas y los iones para formar complejos, de la misma forma que con los iones usados como sustratos, co-sustratos y co-factores. Este efecto de los iones puede atribuirse a su capacidad de modificar la “estructura” del agua por efectos de solvatación lo cual influye en el ambiente de hidratación de la proteína. Aquellos iones fuertemente hidratados que incrementan la estructura del agua se denominan cosmótopos, y los iones débilmente hidratados se conocen como caótopos. Los primeros son usualmente iones pequeños y con cargas eléctricas altas, y los últimos son iones de gran tamaño con cargas pequeñas.

A través de diferentes estudios, se ha encontrado que los aniones fuertemente cosmótopos estabilizan las proteínas, y los cationes fuertemente caótopos las desestabilizan. De esta forma, se puede encontrar el mejor sistema para estabilizar proteínas usando sales con combinaciones diferentes de cationes y aniones, ya que para diferentes proteínas los iones no tienen el mismo comportamiento en el mismo orden de cosmotropicidad. También los cosmótopos producen un gran cambio de la viscosidad a mayores concentraciones en contraste a los iones que se consideran caótopos.

En el Esquema 4 se muestran algunos ejemplos de iones y su efecto en la estabilidad de las enzimas.



Esquema 4: Representación del efecto de algunos iones de importancia biológica en la estabilización de las enzimas.

Los aniones multivalentes son cosmótopos más fuertes y por lo tanto son mejores estabilizadores y activadores de las enzimas, teniendo como ejemplo los aniones SO_4^{2-} , SO_3^{2-} y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ para el caso de la fosfofructocinasa de hígado de cerdo.

Sin embargo, a altas concentraciones, se cree que tanto los aniones cosmótopos como los caotrópicos inhiben una enzima por diferentes mecanismos. Los aniones cosmótopos disminuyen la constante de Michaelis e incrementan la barrera de activación, mientras que los aniones caotrópicos tienen el efecto opuesto. Otro factor que es parte fundamental en la actividad enzimática es la flexibilidad que tiene el sitio activo de la enzima. Los aniones cosmótopos inducen alta rigidez a la enzima, mientras que los cationes caotrópicos inducen una alta flexibilidad. Ambas situaciones disminuyen la actividad de la enzima.

Una gran cantidad de procesos biocatalíticos que emplean lipasas realizados en presencia de LI se llevan a cabo en ausencia de agua o con pequeñas trazas de esta, además la mayoría de los LI que tienen el anion PF_6^- usados en estos procesos son hidrofóbicos. Cuando el proceso biocatalítico se lleva a cabo en un LI hidrofóbico o un hidrofílico anhidro la actividad enzimática no sufre los efectos predichos por la serie de Hoffmeister. La hidrofobicidad puede ser descrita por el valor de $\log P$, un concepto derivado del coeficiente de partición de los LI entre agua y octanol. Generalmente, las enzimas son más estables en solventes con un mayor valor para $\log P$ (>3) que con aquellos con valores pequeños. Este hecho puede explicar de cierta manera porque la alta hidrofobicidad de los LI's puede ser benéfica para la actividad enzimática. Entre más hidrofóbico sea un LI, menor será la cantidad de agua requerida para mantener la actividad enzimática óptima y la enantioselectividad. Y si el LI es hidrofílico, una mayor concentración de agua es requerida para mantener su actividad debido a que el LI tiende a removerla del sitio activo de la enzima lo que provoca su desactivación.

De igual manera, se ha observado una mayor actividad por parte de las enzimas en aquellos LI's que poseen cationes de mayor cadena alquílica, como lo es el $[\text{OMIM}]^+$ que en LI's con cadenas cortas, como por ejemplo $[\text{BMIM}]^+$. Las cadenas alquílicas hidrofóbicas largas tienen una menor tendencia de remover el agua de la estructura de la enzima. Esta propiedad de los LI hidrofóbicos es comparable con la de los disolventes orgánicos polares. Desde un punto de vista molecular, la estabilización de las enzimas por parte de los LI inmiscibles en agua se explica debido a una formación de una conformación más compacta de la enzima, y por lo tanto un aumento de la actividad catalítica, producida por la evolución de las estructuras α -hélice a hojas- β en su estructura. En conclusión, 1) los LI hidrofóbicos remueven el agua esencial de la estructura de las enzimas de manera similar a la que lo hacen los solventes orgánicos, 2) los iones que conforman a los LI interactúan con la enzima a través de fuerzas de tipo coulombicas y 3) los LI deben interactuar con los residuos o los productos de manera inerte.

Como se ha observado, tanto los cationes como los aniones que conforman la estructura de los LI juegan papeles igualmente importantes en la actividad enzimática, por lo cual la

combinación adecuada de estos será crucial para obtener los mejores resultados en la catálisis (Hua, 1005).

Rantwijk y Sheldon (Rantwijk, 2007) plantean otra teoría. Se considera que los puentes de hidrógeno conforman los cimientos de la estructura de las enzimas tanto en su forma hidratada como deshidratada. Cualquier cambio estructural requiere que un gran número de estos puentes de hidrógeno se disocien al mismo tiempo, lo cual puede contribuir de manera significativa a la estabilidad de la enzima y puede también explicar la “memoria” estructural y los efectos de histéresis. Es común observar que las enzimas en un disolvente orgánico mantienen su actividad en mayores periodos de tiempo que cuando se suspenden en solución acuosa. La razón es porque la ruptura y la formación de estos enlaces es menor en medios que no favorecen su formación. En resumen, los medios orgánicos reducen la estabilidad termodinámica de la enzima pero mejoran la estabilidad cinética. Este efecto es aun más pronunciado en los LI. Estos, en particular los aniones que los conforman, que forman fuertes puentes de hidrógeno no pueden disociar los enlaces de este tipo que mantienen la integridad estructural de las secciones de α -hélices y hojas- β .

La aplicación de las enzimas en LI tiene una historia relativamente corta. Uno de los primeros estudios data del año 1984, demostrando la actividad y estabilidad de la alcalinofosfatasa en $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$. Sin embargo, existen pocos reportes de la aplicación de LI para polimerización enzimática, a pesar de que ha sido probada su utilidad para polimerización vía radicales libres o por crecimiento de cadena. Ha sido reportada la policondensación catalizada por lipasa de *Pseudomona cepacia* de dietilenoctan-1,8-dicarboxilato y 1,4-butanodiol en $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$, la polimerización por apertura de anillo de CL y la policondensación de diésteres alifáticos catalizada por CALB en $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ y $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$, dando como producto los polímeros correspondientes con rendimientos mayores a 97%, con lo cual queda demostrado que la catálisis enzimática en LI tiene una importante aplicación.

VII. OBJETIVOS

VII.1 Objetivo general

Realizar la síntesis de Poli(GA-co- ϵ CL) usando lipasas como catalizadores de la reacción de polimerización en el líquido iónico [BMIM][PF₆].

VII.2 Objetivos particulares

Estudiar la reacción de polimerización catalizada por lipasas determinando la influencia de dos variables independientes, que son tiempo de reacción y concentración de los monómeros en función del rendimiento químico y de la composición del polímero.

Comparar los resultados obtenidos en el empleo de 2 diferentes lipasas (*Burkolderia cepacia* y B de *Candida antarctica*) como catalizadores de la polimerización.

Comparar los resultados obtenidos en una síntesis en masa (*Bulk*).

Caracterizar el polímero por la técnica de RMN-¹H para obtener el porcentaje de incorporación de cada uno de los monómeros a la estructura polimérica.

VIII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VIII.1 Reactivos

- Lipasa PS (*Burkholderia cepacia*) libre (Amano, Japón y distribuida por Sigma-Aldrich)
- Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en resina macroporosa (Novozym435), Novozymes de México.
- GA g.p. >99%, Sigma-Aldrich.
- CL g.p. 99%, Aldrich.
- Líquido iónico, BMIMPF₆, hexafluorofostafo de 1-butil-3-metil imidazolio, Fluka Analytical.
- Hidruro de calcio grado reactivo (95%), Sigma.
- Dimetilsulfoxido grado industrial, J. T. Baker.
- Metanol grado industrial, Química Barsa.
- Cloroformo deuterado, 99.8%-D, Sigma.
- Ácido trifluoroacético deuterado, 99%-D, Aldrich.

VIII.2 Equipo de laboratorio

- Viales de vidrio de 10 mL.
- Parrilla con calentamiento y agitación controlada (IKA labortechnik RTC Basic ETS-D4 de -10 a 400 °C).
- Agitador magnético.
- Baño María de glicerina
- Tamiz Alfa Aesar con poro de 75 µm.
- Balanza analítica OHAUS Analytic Plus.
- Balanza analítica Sartorius.
- Vasos de precipitado de 25, 50, 250 y 1000 mL.
- Probeta de 50, 250 y 500 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL y 1000 mL.
- Equipo Millipore para filtración.
- Membranas de filtración Millipore con poro de 45 µm.
- Bomba de vacío para secado de disolventes.
- Ultracongelador REVCO (-80 °C)
- Liofilizadora HETO CD. 60e

VIII.3 Procedimiento experimental

VIII.3.a Purificación de los reactivos.

Para asegurar la pureza de algunos de los reactivos y remover inhibidores, estos se sometieron a un proceso de purificación previo a su uso. La CL se purificó por destilación al vacío empleando una bomba de aceite de alto vacío después de someterlo a agitación con Hidruro de Calcio durante todo un día para eliminar las trazas de agua, y fue almacenada sobre tamiz molecular a 5 °C.

El LI igualmente se secó al vacío durante toda una noche para eliminar el contenido de agua.

El GA se usó sin una previa purificación.

VIII.3.b Reacción de polimerización

Se empleó una concentración de enzima del 10% con respecto al peso de los reactivos.

El estudio de la cinética se realizó en periodos de tiempo en los que el medio de reacción permaneciera fluido permitiendo la agitación magnética del mismo por un aumento de la viscosidad del sistema. Con ayuda de la parrilla de calentamiento con agitación magnética, se calentó el vial de reacción en un baño de glicerina hasta una temperatura constante de 65 °C.

Se llevó a cabo la reacción en LI o *bulk* empleando los dos tipos de lipasas y los dos tipos de monómeros a diferentes concentraciones.

En este sistema, se llevó a cabo las reacciones en intervalos de tiempo desde 6 hasta 24 hr de reacción.

VIII.3.c Precipitación del polímero

Una vez que se terminaba el tiempo de reacción programado para cada uno de los ensayos, al vial se le agregaban 25 mL de DMSO en fracciones de 8 mL y se dejaba en agitación para disolver el polímero formado, así como los monómeros sin reaccionar. Después de cada lavado, se filtraba con ayuda de un tamiz de malla de poro de 75µm para separar la enzima, recolectando los lavados en un vaso de precipitados de 250 mL.

El polímero se hacía precipitar en metanol en una proporción 10:1 con respecto al DMSO usado para disolver el polímero, y dejando en disolución los monómeros sin reaccionar o sustancias de bajo peso molecular. Este precipitado se aislaba por filtración con un equipo Millipore con membranas con tamaño de poro de 0.45µm, lavando el precipitado con las

aguas madres obtenidas. El polímero se secó en la bomba de vacío por un tiempo de 2 hr y posteriormente se obtuvo el rendimiento por peso de producto obtenido.

VIII.3.d Caracterización y cálculo del grado de incorporación de CL por RMN-¹H

Los análisis de las muestras del polímero se efectuaron en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la USAI de la Facultad de Química.

De cada una de las reacciones efectuadas, se tomó una muestra de 10mg para realizar los análisis de RMN. Cada muestra se disolvió en 0.8 mL de ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d), o en caso de no obtener una solución homogénea, se agregó una mayor cantidad de TFA-d hasta un máximo de 1.3 mL. Para ayudar a disolver el polímero, se agitó con ayuda de un vórtex. Posteriormente, a cada una de las muestras se le agregó de 0.5 a 0.7 mL de CDCl₃ para completar un volumen de 1.5 mL totales. Para obtener los espectros de RMN-¹H, se utilizó un equipo Varian de 400 MHz.

En dos trabajos independientes, Qing Cai y Zhiqiang Jiang caracterizaron un copolímero tribloque de CL, GA y etilenglicol vía RMN-¹H. La caracterización del copolímero es la siguiente:

¹H- RMN (400MHz, CDCl₃), δ/ppm: 4.9(s, 2H), 4.05 (t, 2H), 2.27 (t, 2H), 1.7 (m, 4H), 1.4 (m, 2H).

En la Fig. 23 se muestran los espectros de RMN-¹H que obtuvieron ambos equipos de trabajo.



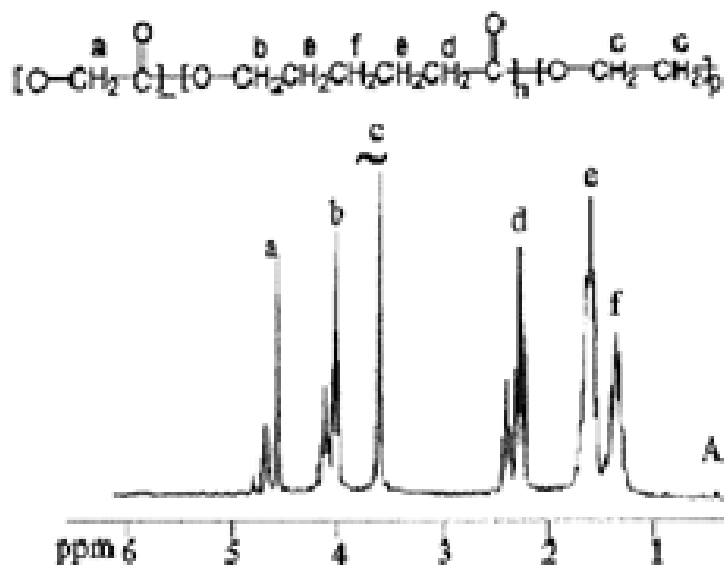


Figura 23: Espectros de RMN- 1H representativos del copolímero Poli(CL-co-GA).

El cálculo del porcentaje de inserción se obtuvo a partir de los valores de la integral de cada una de las señales. Los FID obtenidos se procesaron con la paquetería SpinWorks3. Las señales seleccionadas del espectro de RMN para cuantificar la proporción de las diferentes unidades de repetición en el polímero tenían el desplazamiento químico de aproximadamente 5ppm, correspondiente a la señal del protón anular del GA, y de 1.7 ppm, que corresponde a dos señales de protones de CH_2 de CL.

El cálculo del grado de inserción de los monómeros se hizo aplicando la siguiente ecuación:

$$G.I. = \frac{\frac{I_{5ppm}}{2}}{\frac{I_{1.7ppm}}{4}}$$

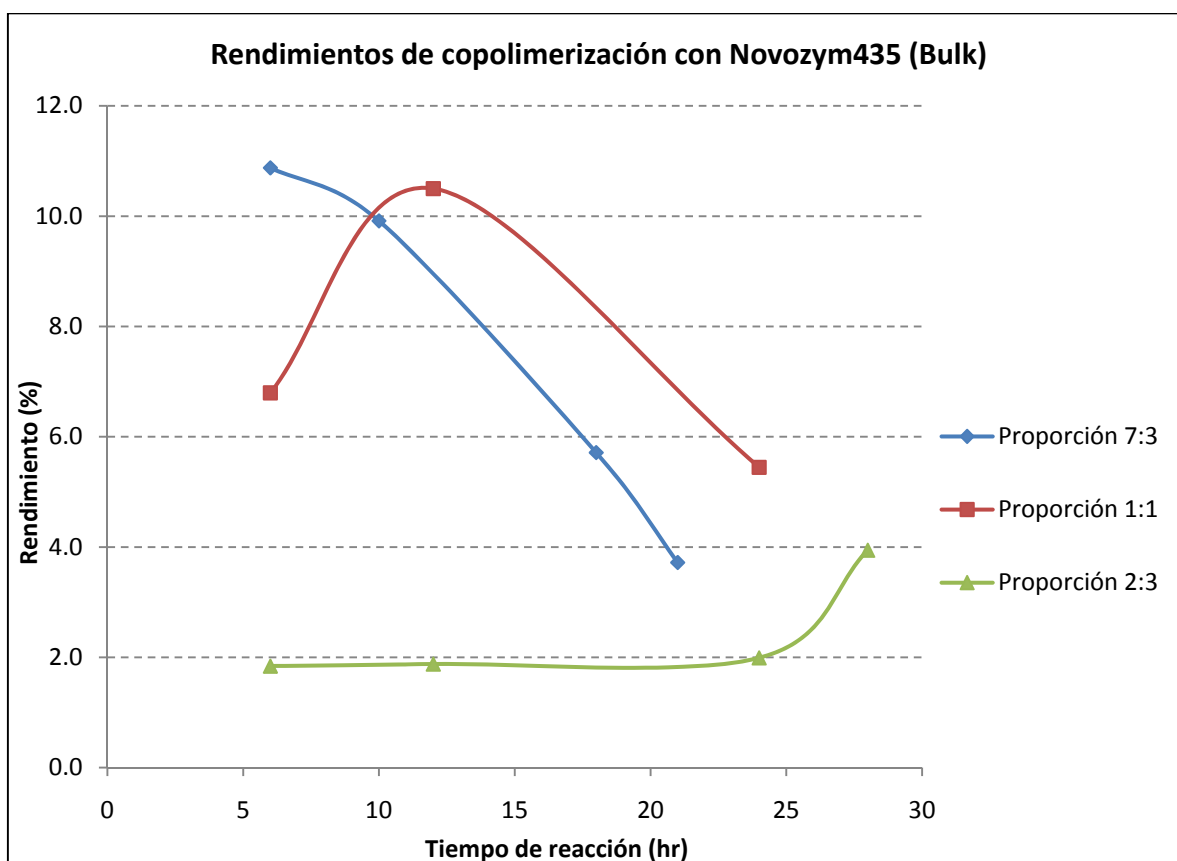
En donde el término del dividendo corresponde al valor de la integral referente al GA, y el término del divisor se refiere a la integral de la señal representativa de la CL. El resultado se puede entender como la proporción de cada uno de las unidades de repetición monoméricas en la estructura total del polímero, mas no se refiere a la secuencia exacta de cada una de estas ni al porcentaje de incorporación de los monómeros. Alternativamente, también puede obtenerse el porcentaje de incorporación de CL en la estructura del copolímero, de una manera similar al cálculo anterior, a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Inc = \frac{\frac{I_{1.7ppm}}{4}}{\frac{I_{5ppm}}{2} + \frac{I_{1.7ppm}}{4}} * 100$$

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que las mejores condiciones experimentales para la catálisis enzimática de la polimerización de monómeros cíclicos es con un 10% p/p de enzima y 60 °C de temperatura de reacción, por lo cual serán esta temperatura y concentración de enzima las que se establecerán como condiciones de trabajo.

La primera fase del estudio correspondió a evaluar el efecto de la concentración y relación molar de los monómeros y el tiempo de reacción en los rendimientos de polimerización en un sistema en *bulk*. Las relaciones molares que se estudiaron fueron 7:3, 1:1 y 2:3 de CL:GA. La enzima que se usó fue la CALB inmovilizada en una resina acrílica macroporosa (Lewatit VP OC 1600 Lanxess, GER) en su forma comercial, Novozym435. Los resultados de este estudio de la relación de rendimiento en función del tiempo de reacción en la polimerización se muestran en la gráfica 1.



Gráfica 1: Representación de la cinética de la polimerización a tres diferentes relaciones molares empleadas de los reactivos.

Como se puede observar, en las 3 proporciones molares se obtuvieron rendimientos menores al 12%. Para las proporciones 7:3 y 1:1, el máximo rendimiento se obtuvo a tiempos de reacción cortos, siendo de 5 y 12 hr respectivamente, y posterior a este tiempo

se obtiene una rápida degradación del polímero, posiblemente debido al desplazamiento de la reacción hacia la hidrólisis del propio polímero a causa de las cantidades de agua que se obtienen como producto de la reacción de polimerización. Cabe recordar que el mecanismo de la reacción de poliestерificación enzimática es reversible por lo que es posible que la lipasa sea capaz de hidrolizar las cadenas crecientes del polímero a través de los enlaces éster. Por otro lado, en la relación 2:3 de los monómeros, no se observó un cambio en los rendimientos en los distintos tiempos de reacción evaluados.

Estos ensayos en *bulk* mostraron que a tiempos de reacción cortos, la viscosidad del sistema aumentaba de manera drástica, de manera que después de un tiempo mayor a 20 hr el medio de reacción se tornaba sólido, impidiéndose así la agitación del medio. Esto conlleva al problema de la transferencia de masa, pues para viscosidades mayores el transporte de las moléculas de los monómeros hacia la enzima es más lento. Esto se traduce a cinéticas más lentas y es por esta razón que los rendimientos son tan bajos, tal como se observa para las relaciones 1:1 o 2:3 que tienen un mayor contenido de GA. Cabe recordar que el GA es sólido a esta temperatura de reacción, luego en la reacción en ausencia de disolvente era la CL (líquida a c.n.) que fungía como tal además de cómo un co-monómero.

La caracterización por RMN-¹H de los copolímeros se centró en determinar la cantidad de cada monómero presente en la estructura del copolímero. El principal cambio se observó en la intensidad de la señal relacionada a CL, mientras que la señal del protón angular de GA siempre fue una señal intensa. En la figura 24 se muestra el espectro de RMN-¹H obtenido para el Poli(CL-co-GL) sintetizado durante el proyecto, así como la correspondencia entre las señales y la estructura del polímero. La evolución de las señales de CL en función de la proporción molar de los monómeros y el valor de la integral correspondiente se muestra en la gráfica 2, mientras que los resultados de los cálculos del porcentaje de incorporación de CL se representan en la gráfica 3.

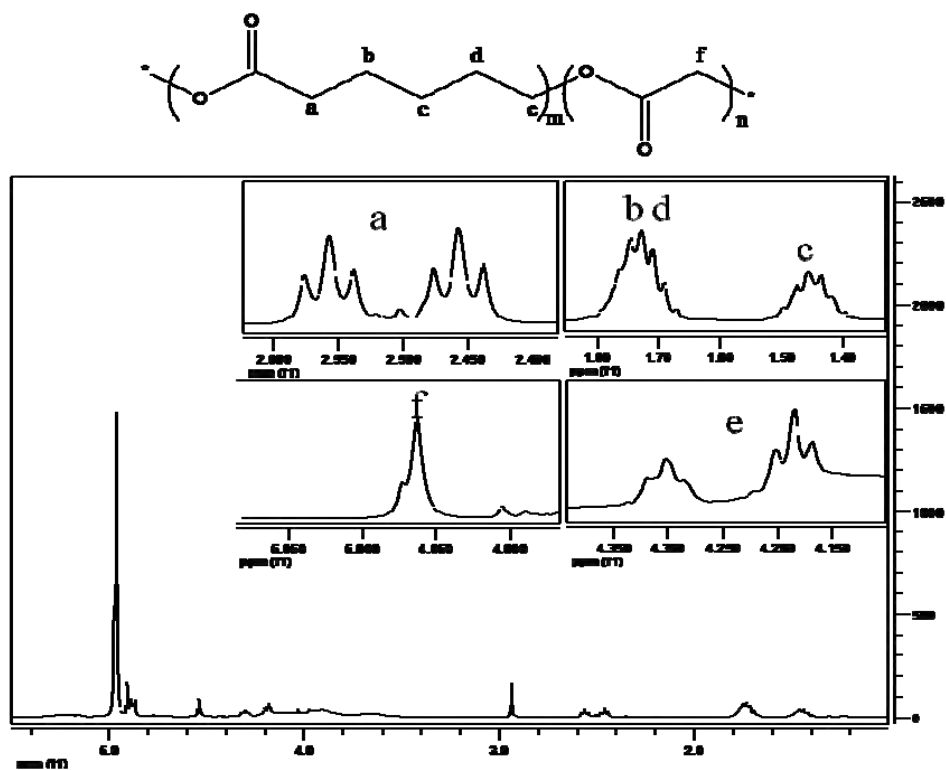
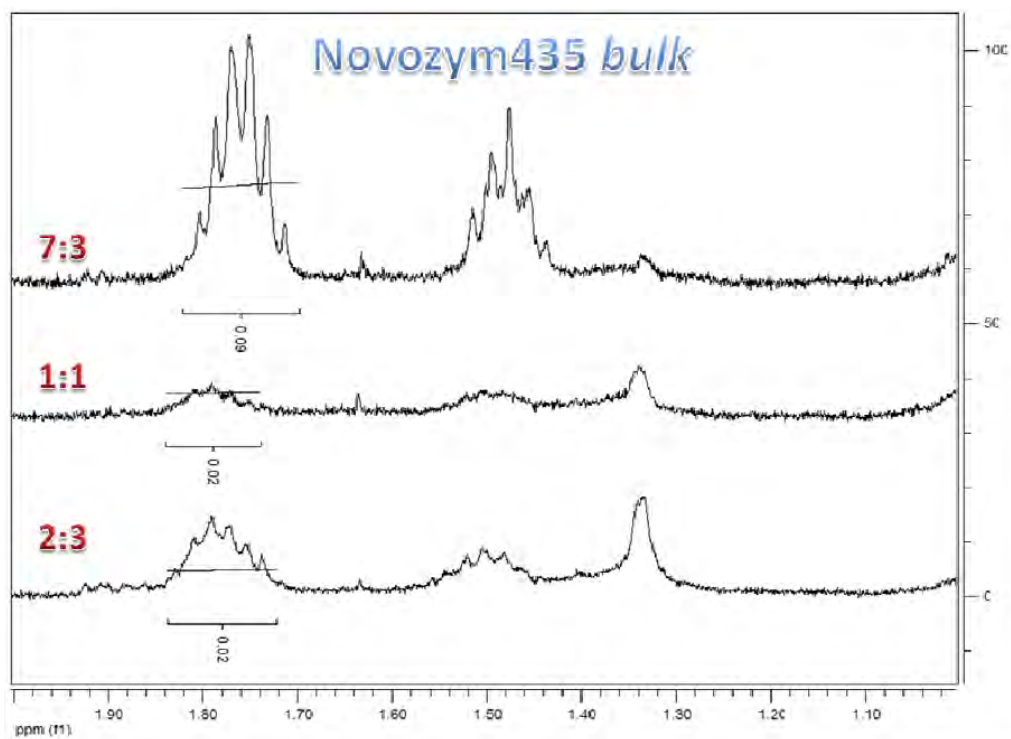
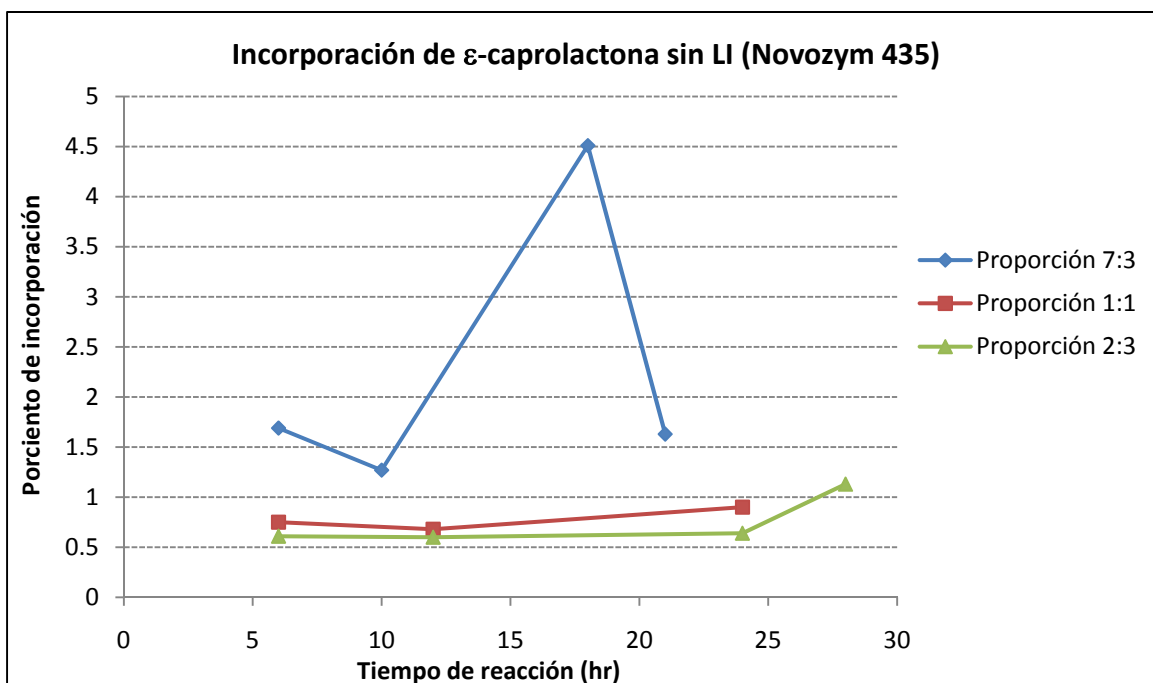


Figura 24: Espectro de RMN-¹H a 400MHz en un sistema TFA/CDCl₃ para Poli(CL-co-GA).



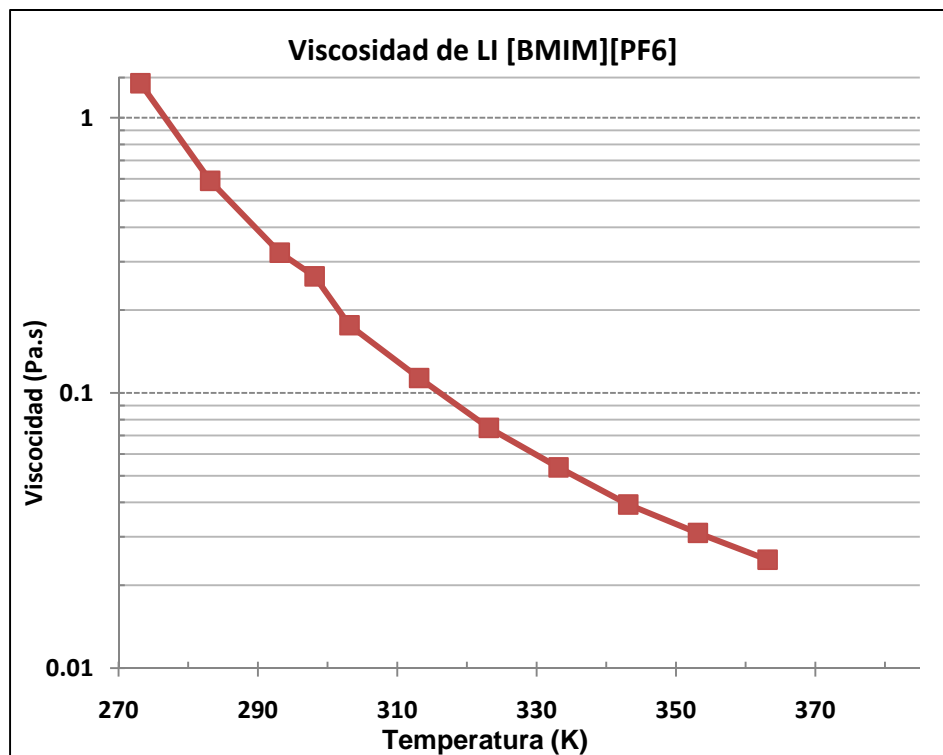
Gráfica 2: Evolución de la intensidad de la señal de CL en función de la proporción de los monómeros.



Gráfica 3: Cálculo del grado de incorporación de CL en el copolímero.

Se puede observar que en todos los ensayos realizados, el copolímero está en términos prácticos conformado únicamente por unidades provenientes del GA. Esta es la razón por la cual el medio de reacción se tornaba sólido al poco tiempo de reacción, ya que el PG es altamente insoluble, incluso en la misma CL. A partir de la gráfica 3 se observa que la cantidad de CL en la estructura es en extremo baja, lo que significa que es el GA el monómero que reacciona más rápidamente, y que al haber una mayor cantidad de GA el medio solidifica a un menor tiempo lo que perjudica cada vez más la transferencia de masa, lo cual se traduce en cinéticas más lentas. A su vez, es también el PG la estructura en la que ocurre la hidrólisis del polímero por lo cual se presenta la disminución del rendimiento. Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis ocurre de manera simultánea a la polimerización, y en base a la observación de la solidificación del medio de reacción, se puede pensar que hay un aumento del peso molecular del polímero por unión de cadenas más pequeñas del copolímero lo que provoca el aumento gradual de la viscosidad hasta la solidificación del medio.

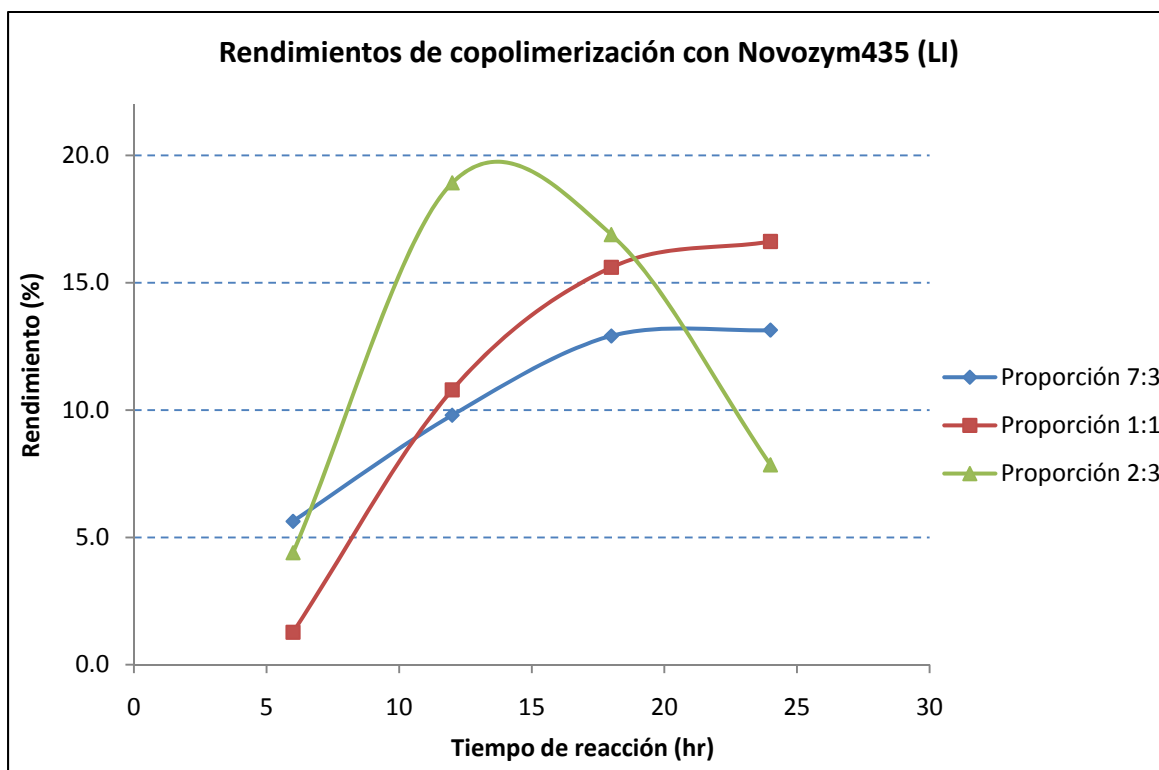
El proceso en *bulk* presentó una gran desventaja, ya que el medio de reacción solidificaba muy rápido e impedía el transporte de masa. Por esta razón, se realizó nuevamente la copolimerización, usando ahora [BMIM][PF₆] como disolvente. El estudio reológico de este disolvente se efectuó en un trabajo previo de laboratorio, donde se obtuvo la gráfica de la viscosidad en función de la temperatura (Gráfica 4).



Gráfica 4: Comportamiento de la viscosidad para [BMIM][PF₆] como función del aumento de la temperatura.

A la temperatura de trabajo, que es de 60 °C, el LI tiene una viscosidad de 0.054 Pa.S, y como dato comparativo, la viscosidad del agua a temperatura ambiente es de 0.01Pa.S lo cual significa que a la temperatura de trabajo el LI es 5 veces más viscoso que el agua a 20° C, facilitando el transporte de masa en el medio de reacción usándolo como disolvente. De esta manera, se busca siempre mantener una buena agitación en el medio evitando que solidifique y con esto poder ampliar el tiempo de reacción para realizar la copolimerización en un medio constante.

Nuevamente, las proporciones que se trabajaron de CL:GA fueron 7:3, 1:1 y 2:3 para poder comparar los resultados con el sistema en *bulk*. El primer estudio que se hizo con este sistema fue el de la cinética de reacción a 60 °C, y los resultados obtenidos son mostrados a continuación en la gráfica 5.



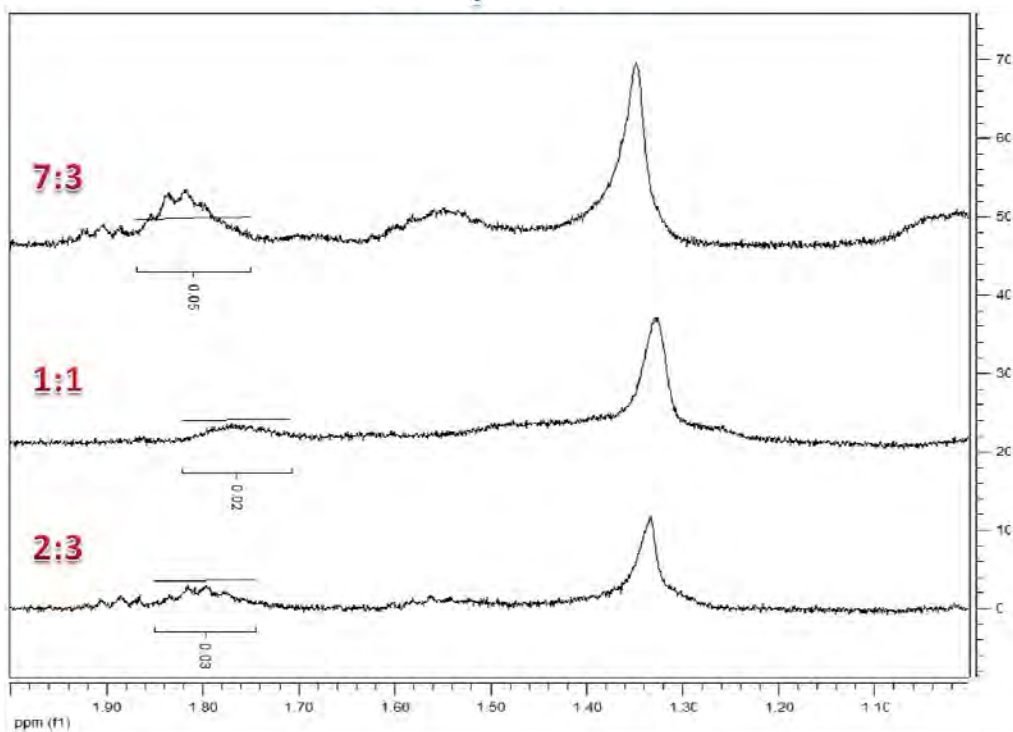
Gráfica 5: Cinética de la síntesis de poli(CL-co-GA) en LI.

La primera observación que se tuvo en esta fase del trabajo, es que en todos los sistemas se pudo mantener el estado fluido del medio de reacción bajo una agitación constante, teniendo así un transporte de masa continuo a lo largo de todo el tiempo de reacción. En base a la gráfica, se observa que el rendimiento en la síntesis del copolímero aumenta en función del incremento de la cantidad inicial de GA. Así también, la velocidad de la polimerización aumenta con el incremento de la concentración inicial de GA. Sin embargo, se observa también que el rendimiento desciende rápidamente después de alcanzar el máximo para la proporción CL:GA 2:3, lo que indica una mayor hidrólisis del copolímero con mayor cantidad de GA.

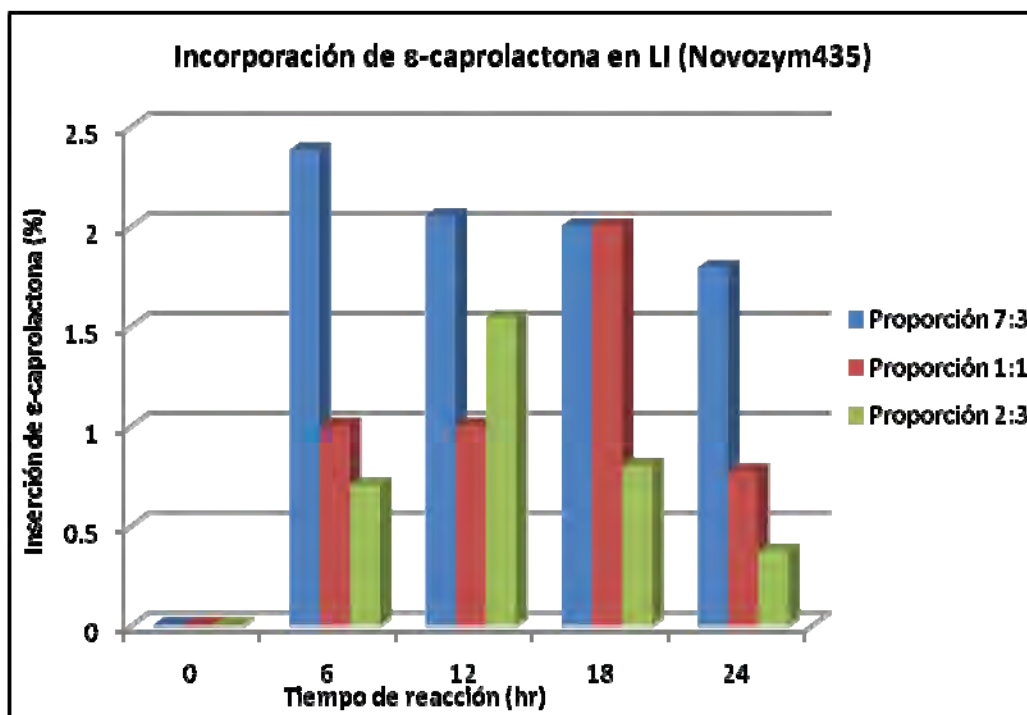
Comparando con los resultados del sistema en *bulk*, se pudo aumentar el rendimiento de la polimerización para las proporciones 2:3 y 1:1, logrando un máximo de 19% y de 16% a tiempos de reacción de 15 hr y de 24 hr, respectivamente. En el caso de la proporción 7:3, el rendimiento no mejora en la misma magnitud que los casos anteriores, pasando solo de 11% en un sistema *bulk* a 13% usando LI, además en un tiempo de reacción 20 hr mayor, por lo cual se apunta a una cinética más lenta en el caso de reacciones en disolución empleando LI.

En la segunda fase del estudio de este sistema de reacción al igual que en el anterior se determinó el porcentaje de inserción de CL. Los espectros de RMN-¹H correspondientes a las señales de CL en función de la proporción molar de monómeros se muestran en la gráfica 6, y el cálculo de la cantidad de CL presente en el copolímero se muestra en la gráfica 7.

Novozym435 LI



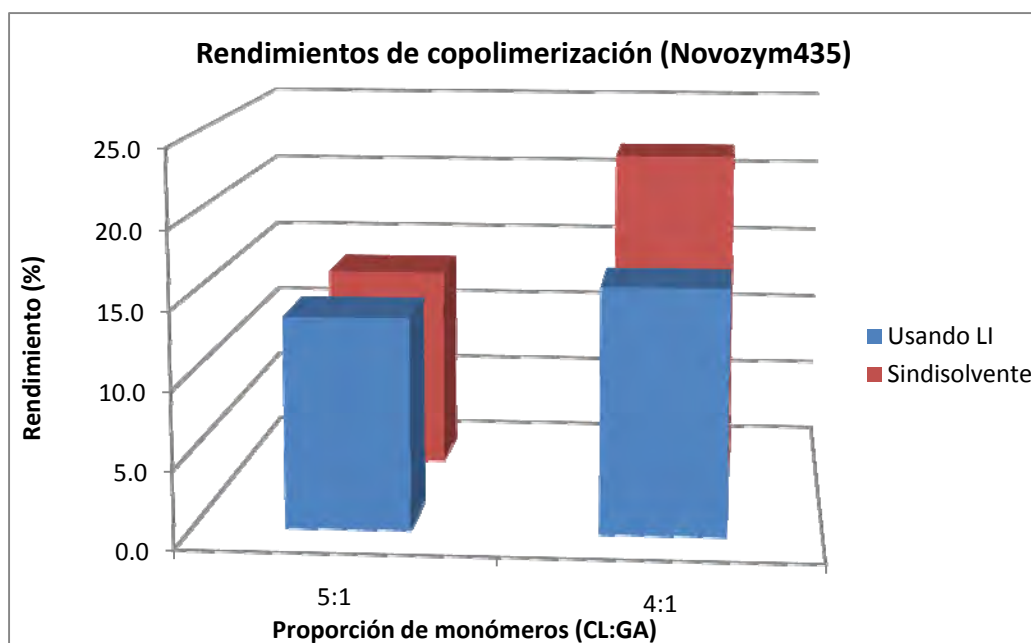
Gráfica 6: Evolución de la señal de CL en función de la cantidad de monómero.



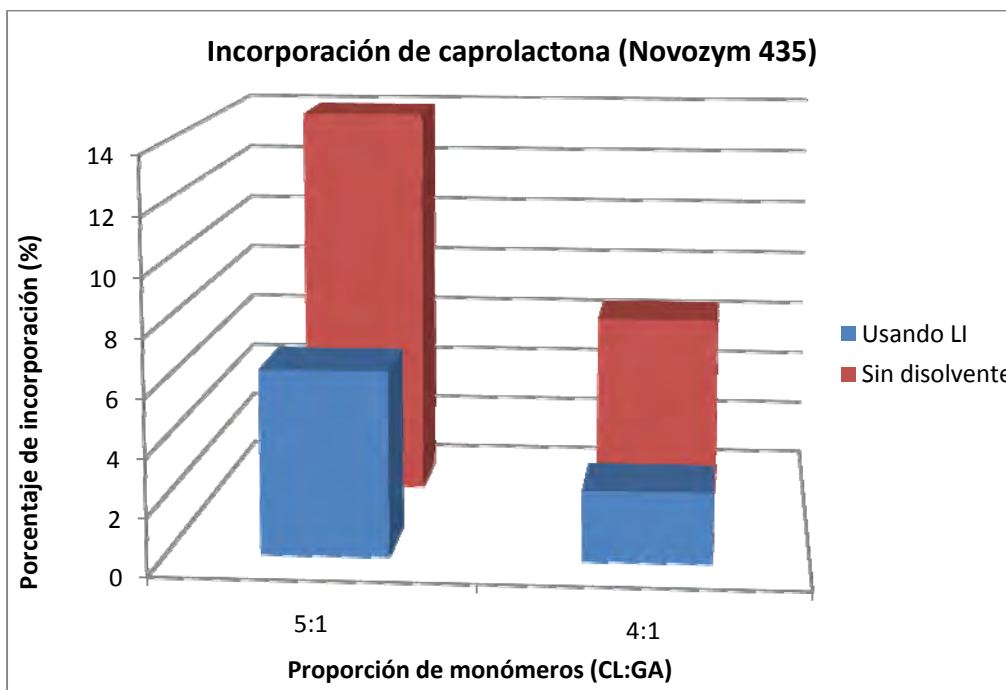
Gráfica 7: Incorporación de CL en el copolímero usando LI como disolvente.

Como se puede observar en la gráfica 7, a diferencia de los rendimientos, la cantidad de CL que se pudo incorporar a la estructura del copolímero no se vio incrementada en comparación a las reacciones sin disolvente, siendo en promedio un porcentaje de incorporación de 1.3%. Analizando la proporción 7:3 que fue la que mayor cantidad de CL incorporó al copolímero en tiempos de reacción muy cortos, se ve disminuida conforme la reacción avanza, contrario a lo que ocurre con la cinética que va aumentando hasta un máximo a 24 hr. Para la proporción 1:1 el aumento en la cantidad de CL en el copolímero aumenta al igual que en la cinética, coincidiendo los máximos obtenidos en ambos. Sin embargo después de alcanzar el máximo de contenido de CL, esta disminuye, con lo cual se puede concluir en base a que el rendimiento se mantiene constante, que solo se incorporan unidades de GA después de tiempos de reacción largos. Este mismo comportamiento se presentó para la proporción de monómeros 2:3, teniendo un máximo de incorporación de CL al mismo tiempo de reacción que el máximo de rendimiento, y posteriormente disminuye este porcentaje en tiempos de reacción largos.

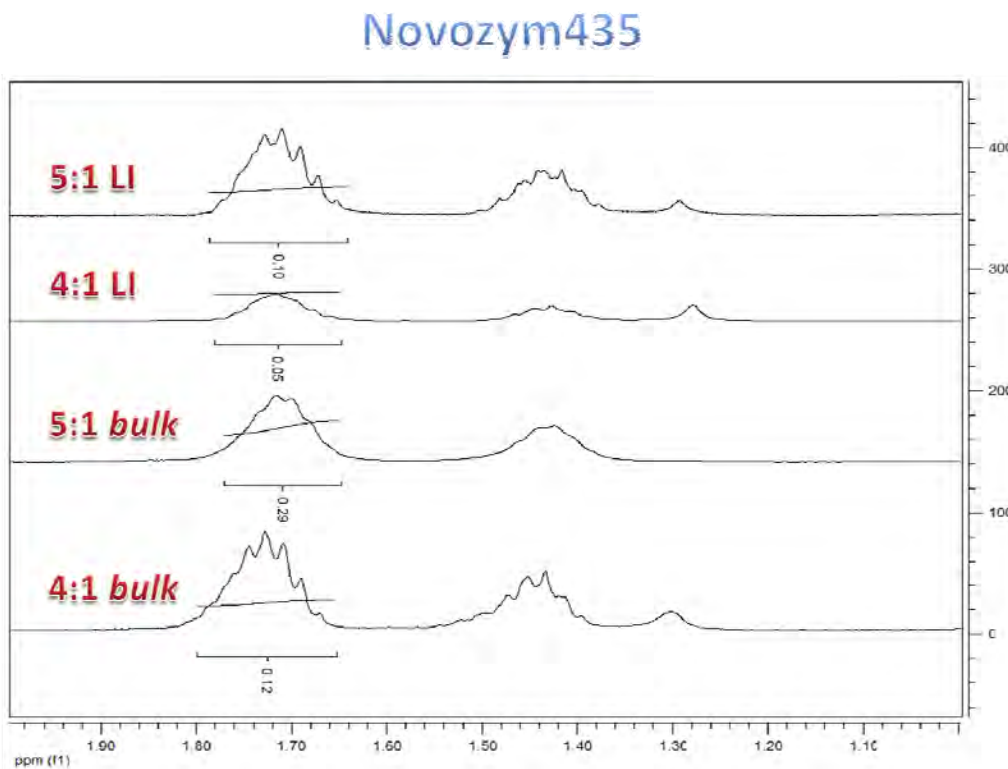
A partir de los resultados obtenidos tanto en un sistema *bulk* como con el uso de LI, se puede concluir que la enzima CALB inmovilizada, Novozym435, tiene una afinidad mayor hacia el GA tanto para la polimerización como la hidrólisis del PG formado. Por lo tanto los rendimientos son bajos. Buscando incrementar la cantidad de CL incorporada al copolímero, se aumentó la cantidad de este monómero en el sistema de reacción para que por exceso de sustrato la enzima pueda incorporar una mayor cantidad de CL. Las proporciones de CL:GA que se estudiaron fueron 4:1 y 5:1 en ausencia de disolvente y en LI. Los resultados obtenidos de la cinética y de la incorporación de CL se muestran en las gráficas 8 y 9. Así también, en la gráfica 10 se muestra las señales de RMN-¹H representativas de la CL y su evolución en función de la cantidad de monómeros agregados al medio de reacción.



Gráfica 8: Rendimientos de la polimerización con exceso de CL.



Gráfica 9: Cálculo de la incorporación de CL con exceso de monómero.



Gráfica 10: Espectros RMN-¹H representativos de CL en función de la proporción molar de monómeros.

En los datos obtenidos se puede observar que los resultados mejoraron significativamente con respecto a las proporciones anteriores. Primero, cabe mencionar que en ninguno de los casos el medio de reacción se tornó sólido, lo cual permitió mantener una agitación continua del medio e incluso incrementar el tiempo de reacción de cada experimento hasta 48 hr.

En primer lugar, los rendimientos aumentaron de 11% hasta 13.5% y 22% para las proporciones 5:1 y 4:1 con respecto al más alto en 7:3 en un sistema *bulk* debido a que el tiempo de reacción aumentó hasta 48 hr y además se observa que el rendimiento aumenta en función del incremento de la cantidad relativa del GA, lo cual confirma la afinidad de la enzima hacia este monómero. Por otro lado, cuando se hizo uso del LI como disolvente se observó que el rendimiento no aumenta de manera tan considerable respecto a la proporción 7:3, quedando como máximo un 16% de rendimiento por lo cual parece ser que la enzima alcanza un equilibrio en la polimerización y solo aumenta ligeramente el rendimiento con el aumento de la cantidad relativa de GA.

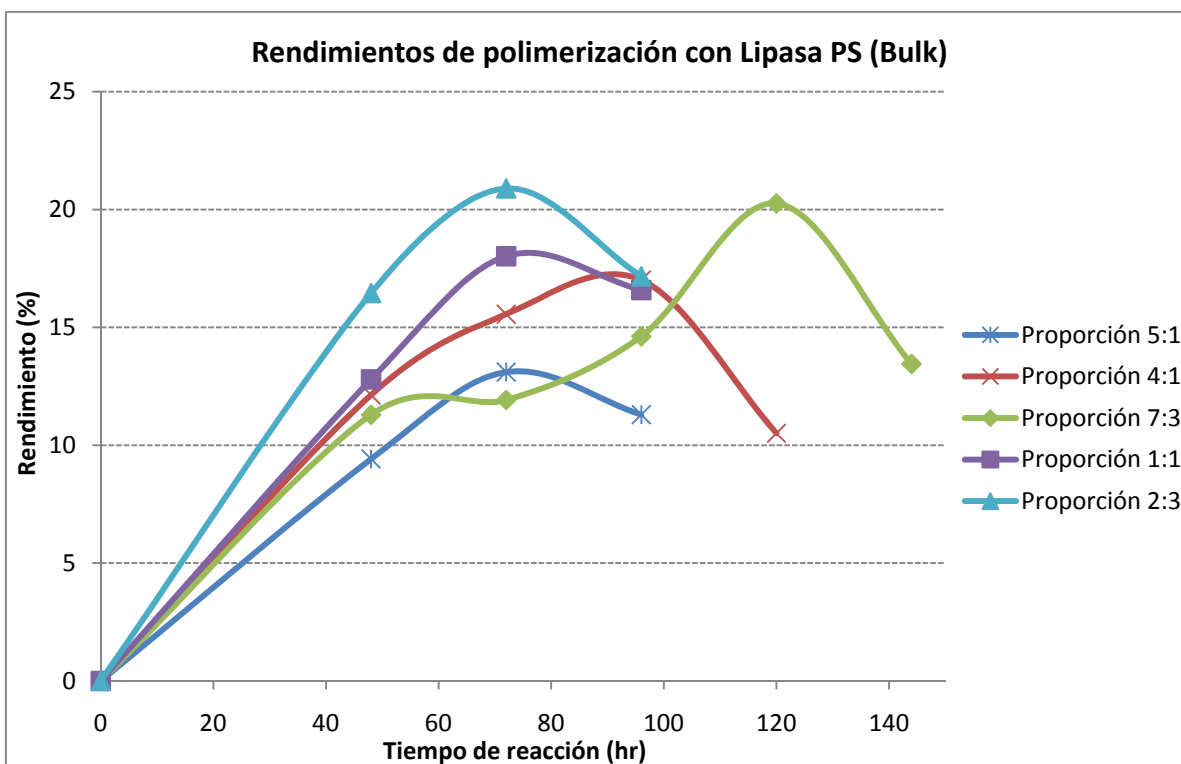
Los cambios más importantes obtenidos son las unidades de repetición provenientes de CL presente en la estructura del copolímero. La cantidad de CL que se incorporó al copolímero en el sistema sin disolvente subió al 14% y 6.5% para la proporción 5:1 y 4:1 respectivamente, aumentando considerablemente con las proporciones anteriormente estudiadas. También se observó que a mayor cantidad de GA la cantidad de CL incorporada disminuye, debido a la afinidad hacia el GA que presenta la enzima. Por otro lado, en presencia del LI contrario a lo que sucedió en las proporciones 7:3, 1:1 y 2:3, la cantidad de CL incorporada fue inferior respecto al sistema *bulk*, sin embargo aumento respecto al sistema 7:3 en LI. También se observa que a mayor cantidad relativa de GA en el medio de reacción la incorporación de CL disminuye. Se hace notar que además de mantener fluido el medio y permitir el transporte de masa de la reacción, el LI también tiene la ventaja de no inhibir la enzima por desnaturalización en comparación con otros disolventes orgánicos comúnmente usados como diclorometano o tetrahidrofurano.

Con todos estos resultados, se pudo determinar que las mejores condiciones experimentales para sintetizar poli(CL-co-GA) son usando una proporción molar de CL:GA 5:1 con una concentración de biocatalizador del 10% en una temperatura de trabajo de 60 °C y a un tiempo de reacción de 48 hr. De esta forma los resultados obtenidos fueron un rendimiento de 13.5% de la síntesis de un copolímero con 14% de CL en su estructura. Se decidió esto por encima de la proporción molar 4:1 porque a pesar de que el rendimiento es mayor, la cantidad de CL presente en el copolímero es menor a la proporción 5:1.

En la segunda etapa del trabajo de esta tesis, se evaluó también la síntesis de poli(CL-co-GA) usando como catalizador la Lipasa PS de *Pseudomona cepacia* o *Burkholderia cepacia*, para analizar su utilidad en esta síntesis y evaluar los resultados con los obtenidos en la síntesis con Novozym435. Las condiciones experimentales son las mismas que se han usado, una temperatura de reacción de 60 °C, usando una

concentración de enzima al 10% p/p respecto a los monómeros y LI al 100% p/p de los monómeros, para los casos en que se utilice.

Para poder comparar los resultados que se obtuvieron con la enzima Novozym 435 con los de la enzima Lipasa PS, los monómeros se agregaron en proporciones molares 5:1, 4:1, 7:3, 1:1 y 2:3. El primer análisis que se hizo con esta segunda enzima fue el del rendimiento de la polimerización en función del tiempo de reacción. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la gráfica 11.

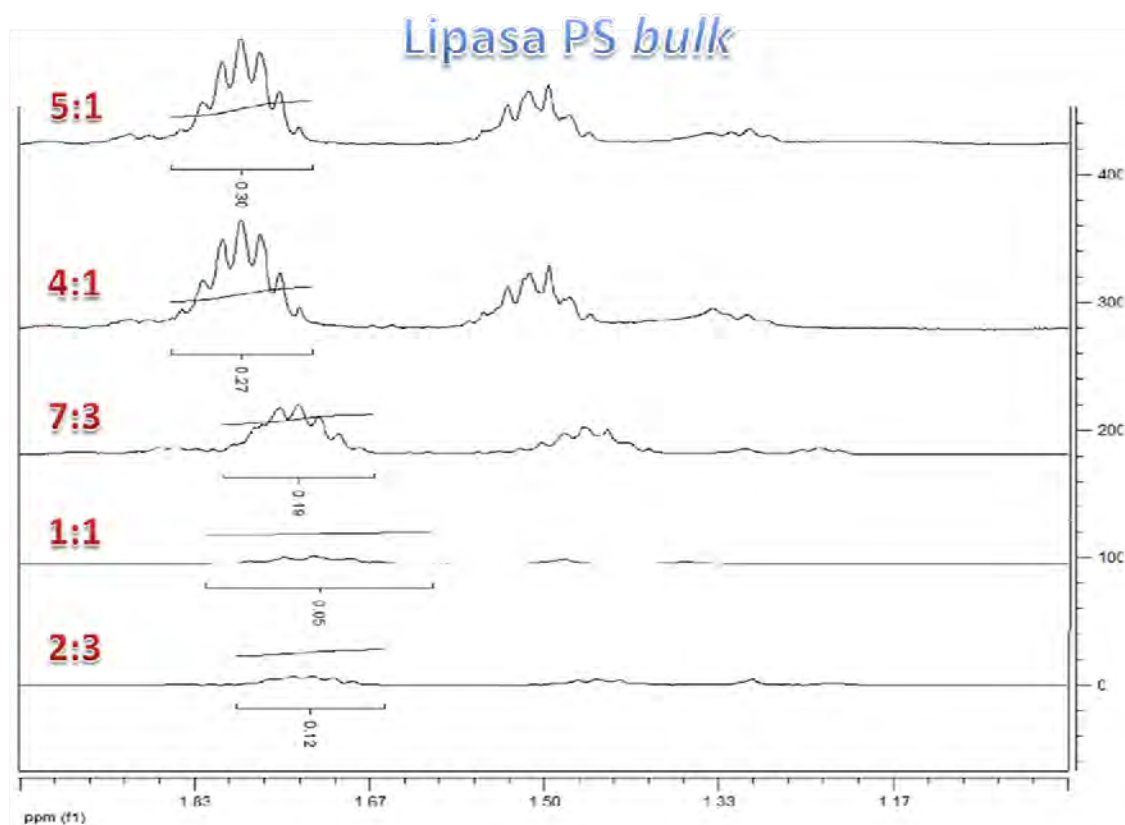


Gráfica 11: Rendimientos de la polimerización de CL:GA con Lipasa PS como catalizador.

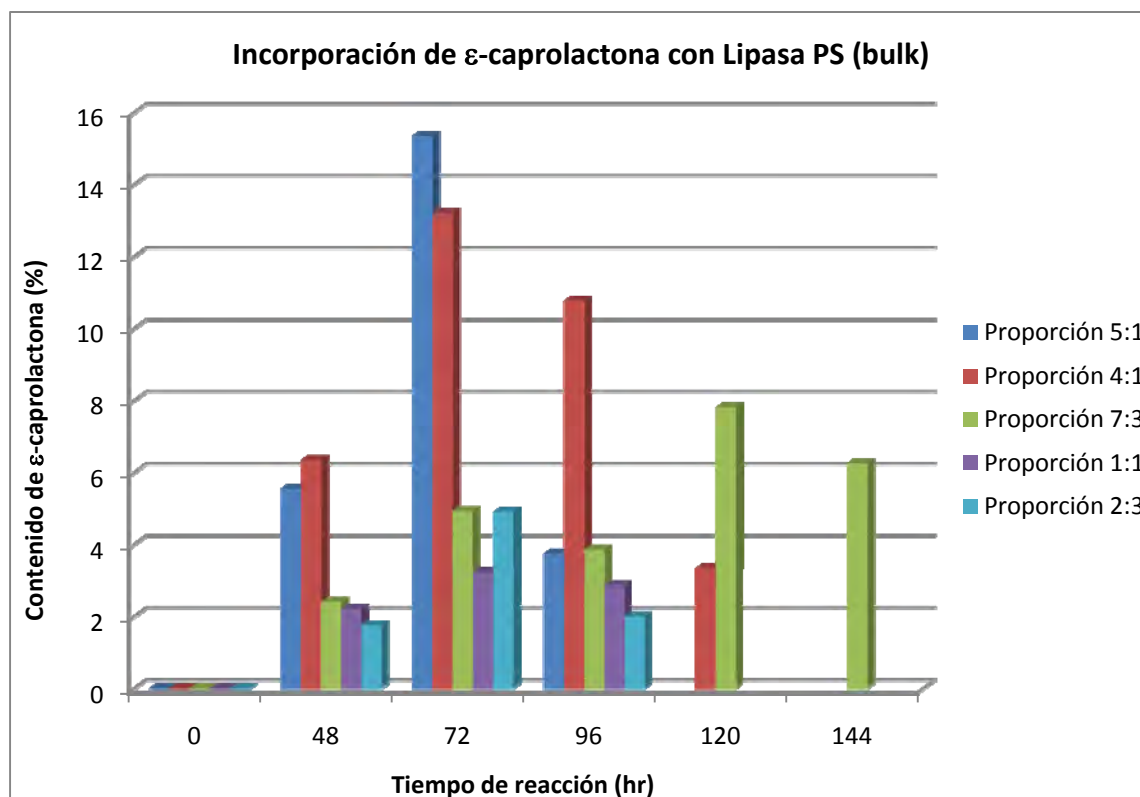
El primer resultado que se obtuvo con esta enzima, es que a diferencia de Novozym435 el medio de reacción sin disolvente nunca se solidificó, lo cual podría indicar que los pesos moleculares de los polímeros sintetizados fueron menores a los primeros. Por esta razón los tiempos de reacción pudieron prolongarse hasta 5 días. De manera general, los máximos rendimientos obtenidos con esta enzima son mucho mayores que con Novozym435 por claras razones de tiempo de reacción y difusión de los monómeros, yendo desde el menor rendimiento de 13% para la proporción 5:1, hasta el mayor de 21% para la relación molar 2:3. El comportamiento que se mantiene, es que a una mayor cantidad relativa de GA en el medio aumenta el rendimiento máximo de la reacción, solo con excepción de la proporción 7:3. Como se puede observar en la gráfica 11, el máximo rendimiento en las proporciones molares 5:1, 4:1 y 2:3 se obtiene al mismo tiempo máximo de reacción, que es de 3 días, y para las proporciones 4:1 y 7:3 el máximo se obtiene hasta los 4 y 5 días de reacción respectivamente. Nuevamente se observa que

después de alcanzar un máximo, los rendimientos tienden a disminuir, lo cual indica que a partir de este tiempo ahora ocurre la reacción inversa de hidrólisis.

En la gráfica 12 se muestra la evolución de la intensidad de la señal representativa a CL en los espectros de RMN- ^1H en función de la proporción de CL y GA empleados en cada reacción, y en la gráfica 13 se muestran los resultados del cálculo del porcentaje de incorporación de CL en función del tiempo de reacción con Lipasa PS.



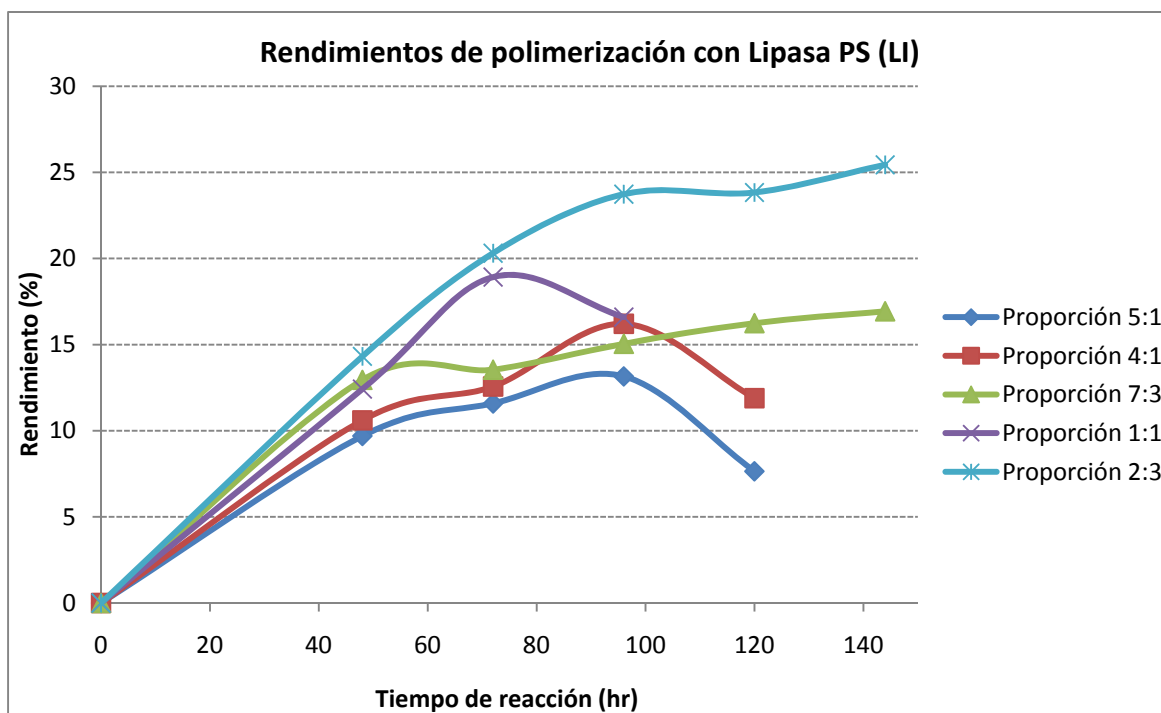
Gráfica 12: Intensidad de las señales de CL en RMN- ^1H en función de la concentración de monómeros.



Gráfica 13: Determinación del porcentaje de incorporación de CL.

Comparando los resultados obtenidos con la CALB inmovilizada, se puede observar que la incorporación de la CL fue más eficiente usando la Lipasa PS alcanzando incluso un porcentaje de incorporación de 15.3% en la proporción 5:1. El comportamiento en el aumento del contenido de este monómero en la estructura del copolímero sigue el mismo patrón que el rendimiento de la síntesis, observándose máximos de CL incorporada al mismo tiempo de reacción que el máximo rendimiento obtenido, solo teniendo una excepción en la proporción 4:1. También se puede observar que el porcentaje de incorporación de CL es directamente proporcional al aumento de la concentración de este monómero, pero a pesar de incrementarse la cantidad de CL que se polimeriza, esta enzima aun muestra mayor afinidad hacia GL. De manera general la enzima Lipasa PS ofreció un mejor rendimiento en la síntesis de poli(CL-co-GA) así como una mayor incorporación de CL en la estructura en el sistema *bulk* en comparación con la enzima anterior, a pesar de requerir tiempos de reacción mayores, además de que el medio no solidificó.

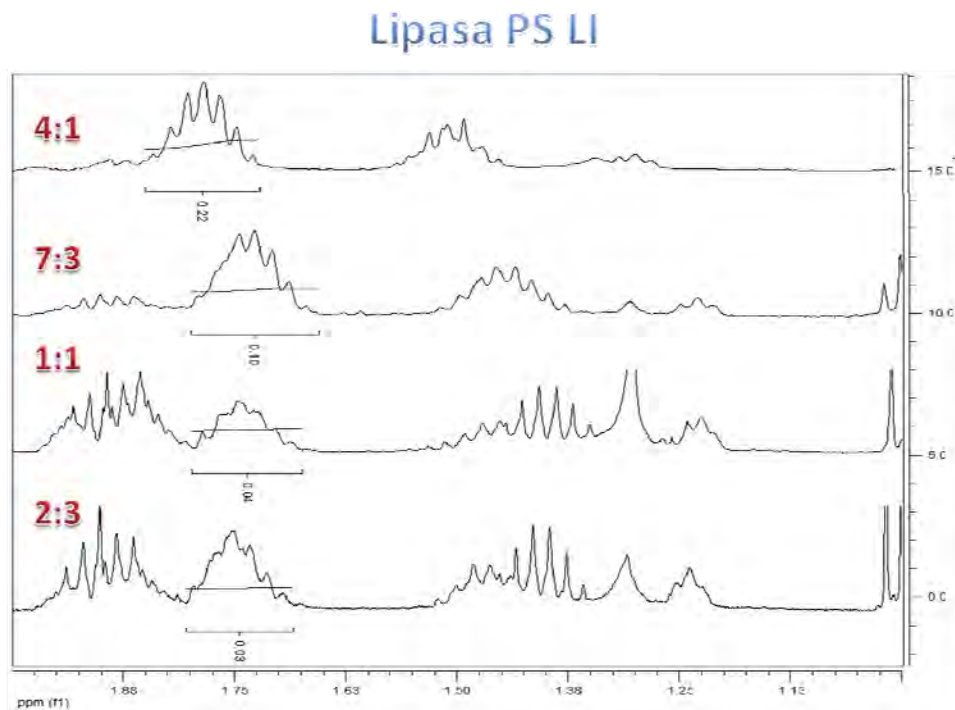
Por último, también se hizo el estudio de la polimerización de estos monómeros con Lipasa PS como catalizador, usando el LI [BMIM][PF₆] como disolvente del medio para completar el análisis de la polimerización usando ambas enzimas. Los resultados que se obtuvieron en el estudio de los rendimientos se muestran en la gráfica 14.



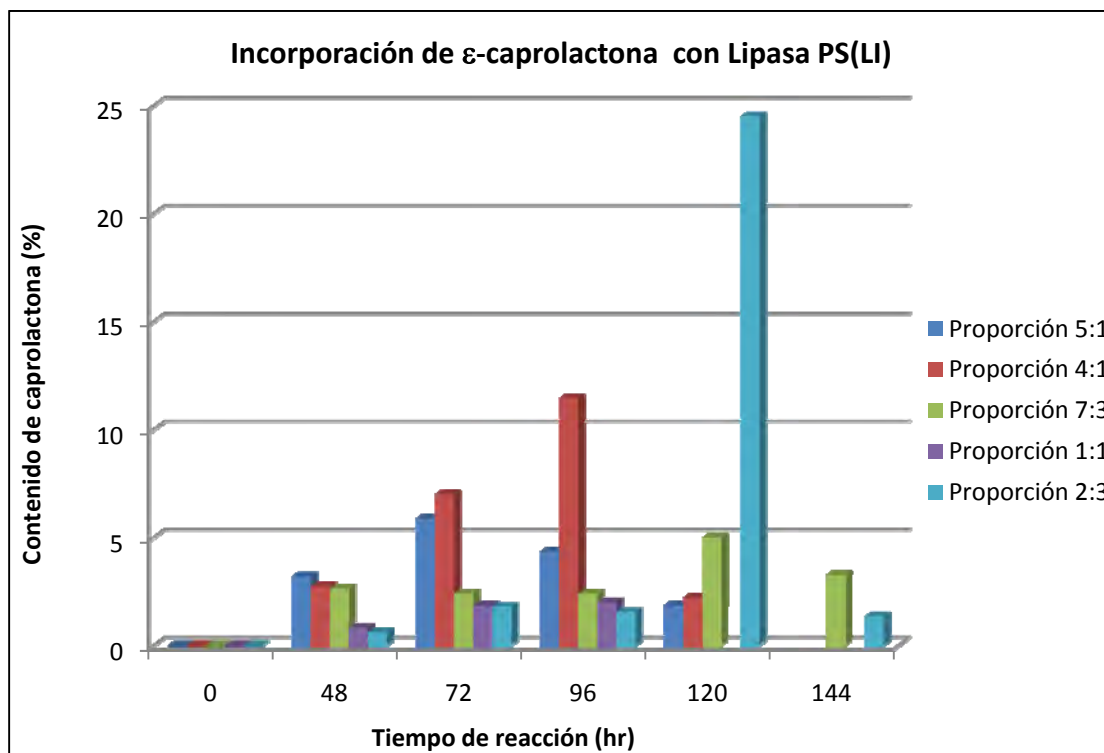
Gráfica 14: Determinación del rendimiento de la polimerización de CL:GA con Lipasa PS en LI.

Como se puede observar en los resultados de la gráfica 14 y comparándolos con el mismo sistema usando la enzima Novozym435, los máximos rendimientos son ligeramente mayores en un intervalo de 2 - 5% y esto a pesar de sus mayores tiempos de reacción. En el caso de la Lipasa PS, los máximos rendimientos se observan a partir de las 72 hr para la proporción equimolar de los monómeros, hasta un tiempo de 144 hr (6 días) para las proporciones 2:3 y 7:3. Una característica que se mantuvo en todos los ensayos, tanto con las 2 enzimas utilizadas como en los sistemas con y sin disolvente, es que el máximo rendimiento de la polimerización era mayor conforme aumentaba la concentración de GA en el medio. Al comparar los resultados con el sistema en masa de la enzima Lipasa PS, igualmente se observa un ligero aumento de los rendimientos máximos, con un cambio significativo en las proporciones 2:3 y 7:3 que tienden a alcanzar el equilibrio de la polimerización sin presentar reacciones de hidrólisis. Además, la proporción 5:1 alcanza el máximo rendimiento en un tiempo mayor que en ausencia de disolvente.

Por último, en la gráfica 15 se muestran las señales correspondientes a CL en RMN-¹H en función de la concentración de los monómeros, y en la gráfica 16 se representan los resultados del cálculo del porcentaje de incorporación de CL al copolímero



Gráfica 15: Intensidad de las señales de CL como función de la proporción molar de los monómeros.



Gráfica 16: Cálculo del contenido de CL en el copolímero catalizado por Lipasa PS en LI.

A diferencia de lo que se vio en el sistema en *bulk*, el patrón que hay en la incorporación de CL en función del tiempo no tiene relación con el rendimiento de la síntesis. En este caso, el uso del LI no favoreció la incorporación de este monómero en la estructura, siendo los valores en general menores que el sistema sin disolvente. El efecto de haber agregado un exceso de CL sobre el grado de incorporación de éste al polímero se observa solo en los tiempos de reacción 3 y 4 días donde se obtuvo una diferencia notable con respecto a las proporciones donde no hay un exceso de monómero. Sin embargo, después de este tiempo nuevamente el porcentaje de incorporación baja, y conjuntando este dato con el hecho de que el rendimiento de la reacción igualmente descende, se puede concluir que son las unidades de PCL aquí las más afines a la hidrólisis.

Por otro lado, se observa un dato interesante para la proporción 2:3. A un tiempo de reacción de 5 días, la incorporación de CL se eleva hasta un valor de 24% después de presentar un valor promedio de 1.5%. Sin embargo, no se posee suficiente información para poder proponer una hipótesis con este dato.

Para el uso de esta enzima al contrario a como se observó con Novozym435, es más efectiva la síntesis de poli(CL-co-GA) en un sistema de reacción en masa o *bulk*, ya que se obtienen copolímeros con una mayor cantidad de CL en su estructura con tiempos de reacción menores que en el sistema con LI como disolvente.

Para finalizar esta sección, en la tabla 1 se muestran los datos referentes a los valores de integral correspondientes al multiplete con $\delta=1.7$ que integra para 4 protones, así como el resultado del cálculo del porcentaje de incorporación para cada uno de los espectros mostrados en este capítulo.

Proporción de monómeros (CL:GA)	Sistema	Valor de la Integral	Porcentaje Incorporación (%)
5:1	Novozym 435 Bulk	0.29	12.66
4:1		0.12	5.66
7:3		0.09	4.31
1:1		0.02	0.99
2:3		0.02	0.99
5:1	Novozym 435 LI	0.14	6.54
4:1		0.05	2.44
7:3		0.05	2.44
1:1		0.02	0.99
2:3		0.03	1.48
5:1	Lipasa PS Bulk	0.30	13.04
4:1		0.27	11.89
7:3		0.19	8.68
1:1		0.05	2.44
2:3		0.12	5.66
4:1	Lipasa PS LI	0.22	9.91
7:3		0.10	4.76
1:1		0.01	0.50
2:3		0.03	1.48

Tabla 1: Tabulación de los valores de integral y cálculo de porcentaje de de incorporación de CL correspondientes a los espectros de RMN-¹H mostrados.

IX.1 Reacción control de polimerización

Hasta ahora, se ha observado que la síntesis de Poli(CL-co-GA) se ha obtenido de manera satisfactoria usando Lipasas como biocatalizadores de la reacción. Sin embargo, se sabe que el GA es una especie reactiva, por lo cual podría suponerse que la reacción pueda efectuarse por rutas no biocatalíticas. En base a esto, se colocaron las diferentes proporciones de los monómeros CL:GA que son 5:1, 4:1, 7:3, 1:1 y 2:3 en distintos viales en ausencia de enzima bajo las condiciones experimentales con las que se trabajó. El tiempo de reacción fue de 48 hr tiempo en el cual se obtuvieron los mejores resultados.

Se observó que al momento de agregar el metanol, no se obtuvo ningún precipitado producto de la síntesis del copolímero. Aun así, el filtrado se puso a secar y se pesó. No se obtuvo un producto de la copolimerización, con lo cual se confirma que la reacción no se lleva a cabo por factores termodinámicos de calentamiento.

De igual manera, se realizaron las reacciones en ausencia de biocatalizador usando LI como disolvente para descartar que la reacción se vea favorecida por efecto de la especie aniónica del LI vía un ataque nucleofílico a cualquiera de los monómeros y así iniciando la polimerización. Para esto, nuevamente en los viales se colocaron los monómeros CL y GA en todas las proporciones trabajadas usando el LI como disolvente y en ausencia del biocatalizador bajo las condiciones de trabajo de 60 °C y un tiempo de reacción de 4 días, tiempo en que se obtuvieron los mejores resultados. Después de este tiempo, al agregar el metanol no se observó la formación del precipitado correspondiente al copolímero, y tampoco se obtuvo un valor del peso después de secar el filtrado. Por lo cual, también se descarta que la reacción de polimerización se vea afectada por el uso de LI como disolvente.

En conjunto con lo observado en ausencia de LI, se confirma que esta reacción se lleva a cabo únicamente con la presencia de las Lipasas como biocatalizadores.

X. CONCLUSIONES

- ✦ Durante el presente proyecto, se logró realizar la síntesis enzimática de Poli(CL-co-GA) usando dos diferentes lipasas obtenidas de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina porosa, y de *Burkholderia cepacia* en su forma libre.
- ✦ No existen reportes previos en la literatura de la síntesis enzimática de éste copolímero por lo que este trabajo constituye una aportación novedosa en enzimología de polímeros.
- ✦ Los rendimientos obtenidos de la polimerización fueron de 2% hasta 25%, con una incorporación de CL en un intervalo de 0.37% a 15.3%, con un caso aislado de 24.5%.
- ✦ Las condiciones experimentales óptimas para el rendimiento de la polimerización son una temperatura de 60 °C, el uso de la Lipasa PS a una concentración de 10% p/p enzima/monómeros, empleando el LI [BMIM][PF₆] como disolvente de la reacción, con una proporción molar de CL:GA 2:3 en un tiempo de reacción de 6 días para obtener un 30% de rendimiento.
- ✦ Por otro lado, desde el punto de vista de obtener el mejor copolímero que implica en un caso ideal una proporción de monómeros en su estructura de 50/50, pueden mencionarse 2 condiciones óptimas para cada enzima. Para Novozym435, estas son una temperatura de reacción de 60 °C, la enzima en una concentración del 10% p/p y LI como disolvente al 100% p/p, una relación molar de CL:GA de 2:3 a un tiempo de reacción de 48 hr para obtener una incorporación de CL de 14%; y para Lipasa PS, las condiciones óptimas son 60 °C, usando la enzima en concentración 10% p/p en un sistema *bulk*, con una relación molar de los monómeros de 5:1 después de un tiempo de reacción de 72 hr para obtener una incorporación de 14.3%.
- ✦ La reacción de polimerización de CL y GA es completamente biocatalítica, ya que en reacciones sin enzima que servirían como un blanco no se observó la obtención de ningún precipitado en metanol correspondiente al copolímero.
- ✦ **Se observó que el rendimiento de la reacción aumenta conforme la cantidad de glicólido presente en el medio aumenta también con respecto a la cantidad de ϵ -caprolactona, con lo cual se puede afirmar que ambas enzimas tienen una mayor afinidad hacia el glicólido.**
- ✦ El uso de LI en el caso de la enzima Novozym435 favoreció la síntesis del copolímero manteniendo fluido permanentemente el medio de reacción y de esta forma mantener el transporte de materia, que de otra forma en el sistema en *bulk* solidificaba el medio de reacción. Por otro lado, para la enzima Lipasa PS el uso

del LI disminuyó los rendimientos de las reacciones así como el porcentaje de incorporación de la CL en la estructura. Convenientemente, el LI no provocó la desactivación de la enzima por desnaturalización.

- ✦ En base a los resultados en los rendimientos, de la incorporación de CL, y en las proporciones molares de cada uno de los monómeros, se puede suponer que la cinética de polimerización del GA es más rápida a la que presenta la CL, así como también es el primer polímero que se hidroliza.
- ✦ No fue posible determinar el peso molecular de los copolímeros sintetizados en el presente proyecto, debido a factores de baja solubilidad en las técnicas disponibles para la medición de esta propiedad. Sin embargo, este trabajo abre el campo de estudio para la síntesis enzimática de Poli(CL-co-GA) con lo cual se puede analizar el uso de distintas enzimas y su efecto en la solubilidad del producto, de manera que pueda ser determinado su peso molecular, así como modificar la cantidad de cada monómero utilizado y el rendimiento de la reacción.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Albertsson, A., Srivastava, R., *Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, *80*, 1077 – 1093
2. Allcock, Harry; Lampe, Frederick; Mark, James; “Contemporary polymer chemistry”, 3^o edición, Ed. Pearson Education, EU, 2003.
3. Bero, M., Czapla, B., Dobrzynski, P., Janeczek, H., Kasperczyk, J., *Copolymerization of glycolide and ϵ -caprolactone. Random copolymerization in the presence of tin octoate*. *Macromol. Chem. Phys.*, **1999**, *200*, 911 – 916.
4. Bisht, K., Svirkin, Y., Henderson, L., Gross, R., *Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of trimethylene carbonate*, *Macromolecules*, **2007**, *30*, 7735 – 7742.
5. Cai, Q., Bei, J., Wang, S., *Synthesis and properties of ABA-type triblock copolymers of poly(glycolide-co-caprolactone) (A) and poly(ethylene glycol) (B)*, *Polymer*, **2002**, *43*, 3585 – 3591.
6. Dai, W., Shu, J., Aoyu, S., Lang, M., *Synthesis, characterization and degradability of the comb-type poly(4-hydroxyl- ϵ -caprolactone-co- ϵ -caprolactone)-g-poly(L-lactide)*, *European Polymer Journal*, **2009**, *45*, 1659 – 1667.
7. Dobrzynski, P., Kasperczyk, J., Bero, M., *Application of calcium acetylacetonate to the polymerization of glycolide and copolymerization of glycolide with ϵ -caprolactone and L-lactide*, *Macromolecules*, **1999**, *32*, 4735 – 4737.
8. Environment and Plastics Industry Council, *Technical report: Biodegradable polymers: a review*, **2000**.
9. Escobar Solórzano, Daniuska Elizabeth, *Estudio de la copolimerización de L-láctido y ϵ -caprolactona para la síntesis de poliésteres amorfos*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, 2008.
10. Gorke, J., Okrasa, K., Louwagie, A., Kazlauskas, R., Srienc, F., *Enzymatic synthesis of poly(hydroxyalcanoates) in ionic liquids*, *Journal of Biotechnology*, **2007**, *132*, 306 – 313
11. Hua Zhao, *Effect of ions and others compatible solutes on enzyme activity, and its implications for biocatalysis using ionic liquids*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, *37*, 16 – 25.

-
12. Huijser, S., Staal, B., Huang, J., Duchateau, R., Koning, C., *Topology characterization by MALDI-ToF-MS of enzymatically synthesized Poly(lactide-co-glycolide)*, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 2465 – 2469.
 13. Jaeger, K., Eggert, T., *Lipases for biotechnology*, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 390 – 397.
 14. Jérôme, C., Lecomte, P., *Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, 60, 1056 – 1076.
 15. Jiang, Z., Hao, J., You, Y., Gu, Q., Cao, W., Deng, X., *Biodegradable thermogelling hydrogel of P(CL-GL)-PEG-P(CL-GL) triblock copolymer: degradation and drug release behavior*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, 98, 2603 – 2610.
 16. Jiang, Z., You, Y., Deng, X., Hao, J., *Injectable hydrogels of poly(ϵ -caprolactone-co-glycolide)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone-co-glycolide) triblock copolymer aqueous solutions*, *Polymer*, **2007**, 48, 4786 – 4792.
 17. Kobayashi, S., Takeya, K., Suda, S., Uyama, H., *Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of medium-size lactones to polyesters*, *Macromol. Chem. Phys.*, **1998**, 199, 1729 – 1736.
 18. Kobayashi, S., Uyama, H., Namekawa, S., *In vitro biosynthesis of polyesters with isolated enzymes in aqueous systems and organic solvents*, *Polymer Degradation and Stability*, **1998**, 59, 195 – 201.
 19. Kolybaba, M., Tabil, L. G., Panigrahi, S., Crerar, W., Powell, T., Wang, B., *Biodegradable polymers: past, present and future*. The society for Engineering in Agricultural, Food and Biological Systems, An ASAE meeting presentation, 2003
 20. Kubisa, P., *Application of ionic liquids as solvents for polymerization processes*, *Prog. Polym. Sci.*, **2004**, 29, 3 – 12.
 21. Do Kwang Cho, Jun Wuk Park, Soo Hyun Kim, Young Ha Kim, Seung Soon Im, *Effect of molecular orientation on biodegradability of poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone)*, *Polymer Degradation and Stability*, **2003**, 80, 223 – 232.
 22. Marcilla, R., de Geus, M., Mecerreyes, D., Duxbury, C., Koning, C., Heise, A., *Enzymatic polyesters synthesis in ionic liquids*, *European Polymer Journal*, **2006**, 42, 1215 – 1221.

-
23. Moon, Y., Lee, S., Ha, S., Koo, Y., *Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids*, Korean J. Chem. Eng., **2006**, *23*, 247 – 263.
 24. Nara, S., Harjani, J., Salunkhe, M., Mane, A., Wadgaonkar, P., *Lipase-catalyzed polyester synthesis in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid*, Tetrahedron Letters, **2003**, *44*, 1371 – 1373.
 25. Odian, George. “Principles of polymerization”, 3° Edición, Ed. Wiley-Interscience, EU, 1991.
 26. Porras Domínguez, Jaime Ricardo, *Síntesis enzimática de Poli-L-láctido en líquidos iónicos*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, 2009
 27. Puskas, J., Sen, M., Su Seo, K., *Green polymer chemistry using nature’s catalysis, enzymes*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, **2009**, *47*, 2959, 2976.
 28. Rantwijk, F, Sheldon, R., *Biocatalysis in ionic liquids*, Chem. Rev. **2007**, *107*, 2757 – 2785.
 29. Ravve, A. “Principles of polymer chemistry”. Ed. Plenum Press, EU, 1995.
 30. Seoud, O., Koschella, A., Fidale, L., Dorn, S., Heinze, T., *Applications of ionic liquids in carbohydrate chemistry: A window of opportunities*, Biomacromolecules, **2007**, *8*, 2629 – 2647.
 31. Varma, I., Albertsson, A., Rajkhowa, R., Srivastava, R., *Enzyme catalyzed synthesis of polyesters*, Prog. Polym. Sci., **2005**, *30*, 949 – 981.
 32. Yang, Z., Pan, W., *Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis*, Enzyme and Microbial Technology, **2005**, *37*, 19 – 28.
 33. Zhao, Z., Yang, L., Hu, Y., He, Y., Wei, J., Li, S., *Enzymatic degradation of block copolymers obtained by sequential ring opening polymerization of L-lactide and ε-caprolactone*, Polymer Degradation and Stability, **2007**, *92*, 1769 – 1777.
 34. Zhou, Y., Wu, G., Zhuo, R., Liu, Z., *Synthesis and properties of novel aliphatic poly(carbonate-ester)s*, European Polymer Journal, **2009**, *45*, 1868 – 1872.
 35. Arrazola, F., Martínez, E., *Química y propiedades de los polímeros*, 5° Edición, IPN, 2002