



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA**

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio de la biodegradación de oligómeros de uretano mediante la cepa *Alicyclophilus sp.* : identificación de los principales productos de biodegradación.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

INGENIERIA QUIMICA - POLIMEROS

P R E S E N T A :

Q. María Esperanza Walda Mayol Cuevas

TUTOR:

Dr. M. Javier Cruz Gómez



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Zolotukhin Mikhail

Secretario: M.C. Uresti Maldonado Marco Antonio

Vocal: Dr. Gimeno Seco Miquel

1er. Suplente: Dr. Luna Pabello Víctor Manuel

2 do. Suplente: Dr. Cruz Gómez Modesto Javier

LUGAR O LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio 212, Conjunto E, Departamento de Ingeniería Química,
Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 105, Conjunto E, Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química, UNAM.

Tutor de Tesis

Sustentante

Dr. Modesto Javier Cruz Gómez

Q. María Esperanza Walda Mayol Cuevas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería.

Al Dr. Javier Cruz Gómez, quien me propuso trabajar en el laboratorio 212 para llevar a cabo la realización de este proyecto y adquirir nuevos conocimientos.

A la Dra. Herminia Loza Tavera del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM, en cuyo laboratorio se llevó a cabo el desarrollo primordial de dicho proyecto al llevar a cabo todas las pruebas de degradación.

A la futura Maestra Claudia Julieta Solís por enseñarme y tenerme la paciencia en la comprensión de metodologías de cultivo, sembrado y duplicación de la cepa involucrada en el estudio. Muchas gracias por todo lo que hiciste por mí.

Al Dr. Néstor López por enseñarme técnicas de caracterización y tips para mejora continua de mis conocimientos como Química. Gracias por todo.

Por supuesto al Dr. Zolothukin quien fue un extraordinario profesor y me oriento para poder resolver ciertas problemáticas presentadas en el proyecto. Gracias Dr. por todo.

Al futuro Maestro Esteban Fragoso por apoyarme enormemente con los análisis térmicos realizados en el laboratorio de Caracterización Térmica, E-11, del Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM C.U. Gracias a dichos análisis pude obtener información muy valiosa. Muchas gracias.

Como los últimos serán los primeros: a Mike y Santiago, son el impulso y la razón de seguir superándome y preparándome día con día, los amo. A mi familia porque son pieza fundamental de la persona que soy. Gracias, muchas gracias por todo.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	3
2. Reciclaje de materiales poliméricos	3
2.1 Tipos de reciclaje	4
2.1.1 Reciclaje mecánico.....	4
2.1.2 Reciclaje químico.....	5
2.1.2.1 Pirólisis.....	5
2.1.2.2 Hidrogenación.....	5
2.1.2.3 Quimiólisis.....	5
2.1.3 Reciclaje físico.....	6
2.1.3.1 Recuperación de energía: Incineración.....	6
2.2 Reciclaje de poliuretanos	7
2.2.1 Reciclaje mecánico.....	7
2.2.1.1 Prensado adhesivo.....	7
2.2.1.2 Moldeo por compresión.....	8
2.2.1.3 Espuma flexible entrecruzada.....	9
2.2.1.4 Pulverización.....	9
2.2.2 Reciclaje químico.....	10
2.2.2.1 Hidrólisis.....	11
2.2.2.2 Glicólisis.....	11
2.2.2.3 Aminólisis.....	11
2.2.2.4 Pirólisis, hidrogenación y gasificación.....	11
2.2.3 Reciclaje físico.....	12
2.2.3.1 Incineración.....	12
2.2.4 Alternativa de reciclaje de poliuretanos. Biodegradación.....	12
2.2.4.1 Definiendo la biodegradación.....	12
2.2.4.2 Mecanismo general de biodegradación.....	12
2.2.4.3 Hidrólisis enzimática.....	14
2.2.4.4 Hidrólisis no enzimática.....	14

2.3 Microorganismos para la hidrólisis enzimática. Biodegradación	15
2.3.1 Hongos.....	16
2.3.2 Bacterias.....	16
2.3.2.1 Curvas de crecimiento bacteriano.....	18
2.4 Enzimas	19
2.4.1 Reacción enzimática heterogénea.....	19
2.4.2 Exo- y endo-ataque enzimático.....	20
2.4.3 Enzimas tipo hidrolasas.....	21
2.5 Factores que influyen en la hidrólisis enzimática, biodegradación	23
2.5.1 Influencia del peso molecular del polímero en la biodegradación.....	25
2.5.2 Influencia del grado de cristalinidad en la biodegradación.....	26
2.5.3 Influencia del valor de la temperatura de transición vítrea del polímero en la biodegradación.....	26
2.6 Técnicas de monitoreo de la biodegradación en el material polimérico	27
2.6.1 Cambios en la superficie.....	27
2.6.1.1 Observación visual.....	27
2.6.1.2 Superficie del material.....	27
2.6.2 Absorción de agua y pérdida de peso.....	27
2.6.3 Peso molecular.....	28
2.6.3.1 Cambios en las propiedades mecánicas y peso molecular.....	28
2.6.4 Cristalinidad del polímero.....	28
2.6.5 Aislamiento e identificación de productos de biodegradación.....	29
2.6.6 Otras técnicas de análisis.....	29
2.7 Técnicas de caracterización de materiales poliméricos	30
2.7.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).....	30
2.7.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC).....	30
2.7.3 Espectroscopia de infrarrojo (IR).....	31
2.7.4 Técnicas de análisis térmico.....	31
2.7.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	32
2.7.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA).....	33
2.8 Aislamiento de la cepa <i>Alicyclophilus sp</i>	33
2.8.1 Actividad enzimática asociada a la cepa <i>Alicyclophilus sp</i>	33
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	34
3.1 Síntesis y caracterización de oligómeros de poliéster	34
3.1.1 Síntesis de tereftalato de bis-(2-hidroxietileno), (BHET).....	34
3.1.1.1 Metodología.....	35

3.1.2 Síntesis de adipato de bis-(2-hidroxietileno), (BHEA).....	36
3.1.2.1 Metodología.....	36
3.1.3 Caracterización del tereftalato de bis-(2-hidroxietileno), (BHET) y adipato de bis-(2- hidroxietileno) (BHEA).....	36
3.1.3.1 Determinación del número de grupos hidroxilo (-OH) en los oligomeros de poliéster.....	36
3.1.3.2 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.....	37
3.1.3.3 Caracterización de la estructura de los oligomeros de poliéster mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).....	37
3.2 Caracterización del diisocianato (MDI).....	37
3.2.1 Determinación de grupos isocianato en el MDI mediante titulación.....	37
3.2.2 Caracterización del MDI por IR y GC-MS.....	38
3.3 Síntesis y caracterización de los compuestos de uretano.....	38
3.3.1 Compuestos de uretano a partir de oligomeros de poliéster sintetizados.....	38
3.3.1.1 Metodología.....	39
3.3.2 Determinación del peso molecular promedio de los compuestos de uretano mediante GPC.....	39
3.3.3 Determinación de la estructura de los compuestos de uretano por IR.....	39
3.3.4 Caracterización mediante técnicas de análisis térmico.....	41
3.3.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	41
3.3.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA).....	41
3.4 Pruebas de biodegradación.....	42
3.4.1 Preparación de los medios de cultivo.....	42
3.4.1.1 Preparación del medio de cultivo Luria Bertani (LB).....	42
3.4.1.2 Preparación del MM.....	42
3.4.1.3 Preparación del MM-PUR.....	43
3.4.2.1 Metodología.....	43
3.4.3 Preparación de muestras de los compuestos de uretano para su estudio de biodegradación.....	44
3.4.3.1 Pruebas de biodegradación de muestras de los compuestos de uretano.....	45
3.4.4 Obtención de los productos de degradación. Enzimática y no enzimática.....	45
3.4.4.1 Extracción de los productos de degradación.....	46
3.4.4.2 Identificación de los productos de degradación.....	46

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
4.1 Caracterización de oligómeros de poliéster	48
4.1.1 Determinación del número de grupos hidroxilo mediante titulación.....	48
4.1.2 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.....	49
4.1.3 Caracterización de la estructura mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).....	49
4.2 Caracterización del diisocianato (MDI)	51
4.3 Síntesis y caracterización de los compuestos de uretano	52
4.3.1 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.....	54
4.3.2 Caracterización de la estructura mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).....	54
4.3.3 Caracterización mediante técnicas de análisis térmico.....	59
4.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	59
4.3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA).....	64
4.4 Resultados de las pruebas de biodegradación	66
4.4.1 Curvas de crecimiento bacteriano de la cepa <i>Alicyclophilus sp.</i>	66
4.4.1.1 Crecimiento bacteriano de la cepa <i>Alicyclophilus sp.</i> en medio basal sin la presencia de compuestos de uretano.....	66
4.4.1.2 Crecimiento bacteriano de la cepa <i>Alicyclophilus sp.</i> en medio basal en presencia de compuestos de uretano.....	67
4.4.2 Análisis de los compuestos de uretano al término del tiempo de incubación.....	72
4.4.2.1 Análisis mediante IR	72
4.4.2.2 Análisis mediante DSC.....	76
4.4.2.3 Análisis mediante TGA.....	77
4.4.2.4 Análisis del peso molecular promedio mediante GPC.....	79
4.4.3 Identificación de los productos de biodegradación.....	81
4.4.3.1 Análisis mediante GC-MS a los distintos tiempos de incubación.....	81
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	97
APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	104
APÉNDICE B. TERMOGRAMAS MEDIANTE DSC	106
APÉNDICE C. CROMATOGRAMAS MEDIANTE GC	108
APÉNDICE D. CROMATOGRAMAS MEDIANTE GPC	117
APÉNDICE E. ANÁLISIS DEL DIISOCIANATO MDI	122

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAD	Ácido Adípico
AFM	Microscopía de fuerza atómica, (siglas en inglés)
Asp	Aspartato
BHEA	Adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (siglas en inglés)
BHET	Tereftalato de bis-(2-hidroxi-etileno), (siglas en inglés)
C	Carbono
CE	Colesterol esterasa
Da	Daltons
DBTL	Laurato de Dibutil estaño, (siglas en inglés)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (siglas en inglés)
DMEA	N, N- Dimetiletanolamina
DMSO	Dimetil sulfóxido
TDM	Tereftalato de dimetilo
D.O. ₆₆₀	Densidad óptica a 660 nm
DP	Grado de polimerización, (siglas en inglés)
Ec.	Ecuación
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo mediante transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografía de gases- espectrometría de masas (siglas en inglés)
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel, (siglas en inglés)
ΔH	Cambio de la entalpía
His	Histidina
HP	Hewlett Packard
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (siglas en inglés)
IR	Espectroscopia de Infrarrojo (siglas en inglés)
LB	Luria –Bertani, (medio de cultivo)
MB	Medio Basal
MDA	4,4'-metilendianilina
MDI	4,4'-difenildiisocianato de metileno
MEG	Monoetilenglicol
MM	Medio mínimo con poliuretano
Mn	Peso molecular número promedio
Mw	Peso molecular peso promedio
Mw/Mn	Polidispersidad
OH	Grupo hidroxilo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (siglas en inglés)
PBS	Poli (butilen succinato)
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PCNU	Policarbonato-poliuretano
PEU	Poliéter-poliuretano
PESU	Poliéster-poliuretano
PGA	Ácido poliglicólico

PHB	Poli (β -hidroxibutirato)	
PLA	Ácido poliláctico	
PUR	Poliuretano	
R.A.	Reactivo Analítico	
RIM	Moldeo por inyección-reacción, (siglas en inglés)	
rpm	Revoluciones por minuto	
RRIM	Moldeo por inyección- reacción reforzado, (siglas en inglés)	
ΔS	Cambio de la entropía	
SEM	Microscopía electrónica de barrido, (siglas en inglés)	
Ser	Serina	
TBT	Terbutil titanato	
Tc	Temperatura de cristalización	[°C]
TDM	Tereftalato de dimetilo	
Tg	Temperatura de transición vítrea	[°C]
TGA	Análisis termogravimétrico, (siglas en inglés)	
THF	Tetrahidrofurano	
Tm	Temperatura de fusión	[°C]
UFC	Unidades Formadoras de Colonias. Bacterias viables	
UV	Ultravioleta	

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estructura general de los compuestos de uretano a biodegradar.....	2
----------	--------------------------------------------------------------------	---

CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Mecanismo de glicólisis del grupo uretano mediante dietilenglicol y catalizador DBTL.....	6
Figura 2.2	Diagrama de proceso para el método prensado adhesivo.....	8
Figura 2.3	Diagrama de proceso para el método espuma flexible entrecruza.....	9
Figura 2.4	Proceso de reciclado de asientos mediante pulverización.....	10
Figura 2.5	Acción del microorganismo en la biodegradación de materiales poliméricos.....	13
Figura 2.6	Estructura molecular de poli (1-vinil-2-pirrolidona).....	14
Figura 2.7	Mecanismo hipotético de hidrólisis no enzimática de los polímeros sintetizados a partir de ácido láctico o ácido glicólico (PLA o PGA).....	15
Figura 2.8	Fases de crecimiento en medio líquido.....	18
Figura 2.9	Complejo enzima sustrato.....	20
Figura 2.10	Representación del ataque tipo exo- y endo-enzimático en la cadena polimérica.....	21
Figura 2.11	Mecanismo de hidrólisis de enlaces tipo éster mediante enzimas tipo hidrolasas.....	22
Figura 2.12	Efecto del peso molecular en el grado de biodegradación del polímero PLA.....	25
Figura 2.13	Factores de la estructura molecular del material polimérico que influyen en la biodegradación.....	26
Figura 2.14	Termograma de las principales transiciones que pueden observarse mediante DSC.....	32

CAPÍTULO 3

Figura 3.1	Esquema del equipo empleando para la síntesis de oligómeros de poliéster.....	35
Figura 3.2	Reacciones y subproductos probables durante la síntesis de los compuestos de uretano.....	41
Figura 3.3	Diagrama de pasos para la preparación de glicerol.....	44
Figura 3.4	Diagrama para las pruebas de degradación.....	47

CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Espectro de IR del BHEA.....	50
Figura 4.2	Espectro de IR del BHET.....	50
Figura 4.3	Espectro de IR del compuesto BHEA-MDI relación NCO/OH 2:1.....	55
Figura 4.4	Espectro de IR del compuesto BHEA-MDI relación NCO/OH 1:2.....	56
Figura 4.5	Espectro de IR del compuesto BHET-MDI relación NCO/OH 2:1.....	57
Figura 4.6	Espectro de IR del compuesto BHET-MDI relación NCO/OH 1:2.....	58
Figura 4.7	Termograma mediante DSC de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).....	60
Figura 4.8	Termograma mediante DSC de BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).....	61

Figura 4.9	Termograma mediante DSC de BHET-MDI (NCO/OH 2:1).....	61
Figura 4.10	Termograma mediante DSC de BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	62
Figura 4.11	Termograma mediante TGA de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).....	64
Figura 4.12	Termograma mediante TGA de BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).....	64
Figura 4.13	Termograma mediante TGA de BHET-MDI (NCO/OH 2:1).....	65
Figura 4.14	Termograma mediante TGA de BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	65
Figura 4.15	Crecimiento bacteriano de la cepa <i>Alicyclophilus sp.</i> sin presencia de compuesto de uretano.....	67
Figura 4.16	Crecimiento bacteriano de la cepa <i>Alicyclophilus sp.</i> en presencia de compuestos de uretano a distintos tiempos de incubación.....	69
Figura 4.17	Imágenes de cajas petri con LB sólido para la cuenta en placa del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) a diferentes tiempos de incubación.....	72
Figura 4.18	Espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.....	73
Figura 4.19	Espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.....	74
Figura 4.20	Espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.....	75
Figura 4.21	Espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.....	76
Figura 4.22	Análisis mediante TGA de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).....	77
Figura 4.23	Análisis mediante TGA de BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).....	77
Figura 4.24	Análisis mediante TGA de BHET-MDI (NCO/OH 2:1).....	78
Figura 4.25	Análisis mediante TGA de BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	78
Figura 4.26	Cromatograma mediante GC-MS de la alícuota extraída del MM a las 22 h de incubación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) en MM sin cepa bacteriana.....	81
Figura 4.27	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM + cepa bacteriana.....	82
Figura 4.28	Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).....	84
Figura 4.29	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM + cepa bacteriana.....	85
Figura 4.30	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM sin cepa bacteriana.....	85
Figura 4.31	Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).....	87
Figura 4.32	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h de BHET-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM + cepa bacteriana.....	88
Figura 4.33	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h de BHET-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM sin cepa bacteriana.....	88
Figura 4.34	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h de BHET-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM + cepa bacteriana.....	90
Figura 4.35	Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h de BHET-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM sin cepa bacteriana.....	90
Figura 4.36	Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	92

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1	Diferencias entre hidrólisis no enzimática e hidrólisis enzimática en la degradación de poliésteres.....	16
Tabla 2.2	Microorganismos capaces de biodegradar poliuretanos (PUR).....	16
Tabla 2.3	Diferencias entre lipasas y esterasas.....	21
Tabla 2.4	Tiempo de degradación requerido para algunos poliésteres.....	25

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1	Oligómeros de poliéster sintetizados.....	34
Tabla 3.2	Composición para la síntesis de compuestos de uretano a biodegradar.....	38
Tabla 3.3	Resumen de reacciones de síntesis de compuestos de uretano.....	40

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1	Contenido del número de grupos hidroxilo del BHET y BHEA.....	49
Tabla 4.2	Pesos moleculares y polidispersidades obtenidos mediante GPC del BHET y BHEA.....	49
Tabla 4.3	Bandas observadas mediante IR del compuesto BHEA.....	50
Tabla 4.4	Bandas observadas mediante IR del compuesto BHET.....	51
Tabla 4.5	Propiedades del diisocianato MDI empleado como materia prima.....	51
Tabla 4.6	Análisis mediante GPC de los pesos moleculares de los compuestos de uretano.....	54
Tabla 4.7	Bandas observadas en IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).....	55
Tabla 4.8	Bandas observadas en IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).....	56
Tabla 4.9	Bandas observadas en IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1).....	57
Tabla 4.10	Bandas observadas en IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	58
Tabla 4.11	Susceptibilidad a la biodegradación con respecto a la temperatura de transición vítrea.....	63
Tabla 4.12	Susceptibilidad a la biodegradación con respecto a la temperatura de fusión.....	63
Tabla 4.13	Cuantificación de los microorganismos . mL ⁻¹ sin fuente de carbono externa.....	67
Tabla 4.14	Cuantificación de microorganismos. mL ⁻¹ en presencia de compuestos de uretano a distintos tiempos de incubación.....	68
Tabla 4.15	Análisis mediante GPC de los pesos moleculares de los compuestos de uretano al inicio y término del tiempo de incubación.....	80
Tabla 4.16	Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados las pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)....	83
Tabla 4.17	Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados, pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)....	86
Tabla 4.18	Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados de las pruebas de biodegradación del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).....	85

RESUMEN

Mediante trabajos previos realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la UNAM, se aisló una cepa bacteriana que corresponde a la especie *Alicyclophilus sp.*, la cual es capaz de utilizar poliuretano hidrosoluble (Hydroform®) como única fuente de carbono y mediante el método de hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo (p-NPA) se logró determinar su actividad enzimática la cual es de tipo esterasa.

La cepa *Alicyclophilus sp.* se ha utilizado en estudios previos de biodegradación de poliuretanos sintetizados en el laboratorio, así como en poliuretanos comerciales, los cuales, han sido tratados previamente mediante procesos químicos (glicólisis, aminólisis e hidrólisis); esto con el objeto de producir cadenas pequeñas y así someterlas posteriormente al proceso de biodegradación para poder observar un proceso catalítico más efectivo en la hidrólisis de los grupos éster presentes en los sustratos, sin embargo, al emplear este tipo de muestras se dificulta entender el posible mecanismo enzimático que se lleva a cabo durante la biodegradación, debido a la complejidad de la estructura interna del polímero, (ramificaciones, entrecruzamiento de cadenas, presencia de aditivos, impedimento estérico (volumen libre), cristalinidad, etc.), ⁽²⁻⁵⁾ por esta razón, se emplearon moléculas más sencillas, cuatro oligómeros de uretano, de los cuales; dos oligómeros se obtuvieron a partir de tereftalato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHET), reaccionando con el compuesto 4,4'-difeníl diisocianato de metilo (MDI) en relación estequiométrica NCO/OH 1:2 y NCO/OH 2:1. Los dos oligómeros de uretano restantes se obtuvieron a partir de adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHEA) el cual se hizo reaccionar con el diisocianato mencionado anteriormente en relación NCO/OH 1:2 y NCO/OH 2:1. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante las técnicas de infrarrojo (IR), cromatografía de gases-masa (GC-MS), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA). Una vez caracterizados los compuestos de uretano se observó que presentaban pesos moleculares inferiores a 2000 Da y polidispersidades mayores a 1.5.

Los oligómeros de uretano fueron sometidos a pruebas de degradación tanto enzimática, (debida a la cepa bacteriana), como no enzimática, (debida únicamente al medio acuoso), durante 214 horas de incubación en medio mínimo. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos mediante GC-MS, DSC y TGA de los materiales sometidos a degradación no enzimática vs. los materiales sometidos a degradación enzimática se pudo observar que el mecanismo principal de degradación de los compuestos de uretano es por la primera vía, considerando por lo tanto a la degradación enzimática como un posible co-metabolismo, no siendo este el mecanismo principal de degradación. Adicionalmente, los oligómeros sintetizados en este trabajo más que representar a una posible fuente de carbono para la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*, fueron materiales tóxicos limitando el posible crecimiento bacteriano y haciendo que la fase exponencial en las curvas de crecimiento no fueran prolongadas.

SUMMARY

Through previous work at the Department of Biochemistry and Molecular Plant Biology, Faculty of Chemistry, UNAM, *Alicyclophilus sp.* was isolated from a bacterial strain which is capable of using water-soluble polyurethane (Hydroform®) as sole carbon source. The method of hydrolysis of p-nitrophenyl acetate (p-NPA) was carried out to determine its enzymatic activity which is of esterase type.

Alicyclophilus sp. strain has been used in previous studies of biodegradation of polyurethanes synthesized at laboratory and in commercial polyurethanes, which have been previously treated by chemical processes (glycolysis, aminolysis and hydrolysis); this in order to produce small chains and subsequently undergo biodegradation process to observe a catalytic process more effective in the hydrolysis of ester groups present in the substrates, however, by using these samples may be difficult to understand the enzymatic mechanism that place during biodegradation, due to the complexity of the internal structure of the polymer (branching, crosslinking of chains, presence of additives, steric hindrance (free volume), crystallinity, etc.), ⁽²⁻⁵⁾ for this reason, we used simpler molecules, four urethane oligomers, which, two were oligomers obtained from a terephthalate-2-hydroxy ethyl (BHET), reacting with the compound 4,4-diphenyl methyl diisocyanate (MDI) in stoichiometric ratio NCO / OH 1:2 and NCO / OH 2:1. The two remaining urethane oligomers were obtained from adipate bis-2-hydroxyethyl (BHEA) which was reacted with isocyanate mentioned above in relation NCO/OH 1:2 and NCO/OH 2:1. The materials were characterized using the techniques of infrared (IR), gas chromatography-mass (GC-MS), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA). The characterization displayed molecular weights lower than 2,000Da and high polydispersities being an indication those urethane oligomers were obtained.

The urethane oligomers were tested both by enzymatic (in presence of the strain) and non-enzymatic degradation (due solely to the aqueous environment) during 214 hours of incubation in basal medium. However, the results obtained by GC-MS, DSC and TGA of the materials subject to degradation due solely to the aqueous environment (non-enzymatic hydrolysis) vs. materials subjected to enzymatic hydrolysis showed that the main mechanism of degradation of urethane oligomers was the non-enzymatic hydrolysis, considered enzymatic hydrolysis as a possible co-metabolism, not being this the primary mechanism of degradation. Additionally, the oligomers synthesized in this work represent not only a source of carbon for *Alicyclophilus sp.* but these materials toxic could they might limit bacterial growth making the exponential phase and stationary growth curves not extended.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Cada vez más, las investigaciones realizadas a nivel mundial, se dirigen en la dirección de encontrar soluciones no contaminantes hacia el medio ambiente en los procesos de producción de materiales poliméricos y reciclaje, tanto a nivel industrial como en el laboratorio. En la actualidad debido a la gran cantidad de residuos existentes, el reciclado resulta necesario y de gran importancia. El 7 % de los residuos totales son plásticos pero debido a su volumen ocupan un 20 % del total de los mismos. Dentro de los residuos plásticos un 5% de los mismos pertenece al poliuretano. Por esta razón, las técnicas de reciclado de poliuretano han evolucionado de forma importante.^(1,6)

Los poliuretanos son quizás los polímeros más novedosos debido a la notable reducción de costo durante su fabricación, al no tener que emplearse altas presiones en su síntesis, lo cual, ha potenciado de forma inmediata el campo de sus aplicaciones. Las principales aplicaciones de estos polímeros son la fabricación de espumas, revestimientos flexibles y rígidos, adhesivos y elastómeros sintéticos.^(1, 2, 3) La aplicación en la industria médica se encuentra en etapa de desarrollo, siendo una gran promesa. Destacándose sus usos en la fabricación de parches, catéteres, y microcápsulas.^(3, 4, 6)

El gran interés prestado en los poliuretanos (PUR) se origina por la extensa variedad de sus reacciones químicas y la amplia diversidad de sus propiedades. En general, un aspecto sobresaliente en los poliuretanos resulta su adhesividad, resistencia, elasticidad^(7, 8) y no toxicidad.⁽¹⁰⁾

Desde hace algunos años se vienen estudiando modificaciones en el proceso de obtención de estos polímeros incorporando una fuente natural renovable como: olote de maíz,⁽¹¹⁾ cáscara de piña⁽¹²⁾ y pergamino de café,^(13, 14) por contener celulosa y lignina en su composición, ambas fuentes de grupos hidroxilos, con el objeto de obtener productos biodegradables, sin embargo, la gran mayoría de los poliuretanos que se formulan y fabrican en la actualidad, no provienen de fuentes renovables y al cumplir su tiempo de vida útil se acumulan como la mayoría de los otros materiales sintéticos, en los depósitos de basura.

Dentro de esta corriente de ambientalización, en las actividades relacionadas con la investigación en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de plantas e Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM, se ha estudiado una técnica complementaria en el ámbito de reciclaje de poliuretano, la cual, consiste en la biodegradación mediante la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*, capaz de utilizar un poliuretano hidrosoluble (Hydroform®) como fuente de carbono ⁽¹⁵⁾, permitiendo considerar dicha técnica, como una alternativa a las metodologías de reciclado ya existentes: reciclado mecánico, reciclado químico y recuperación de energía mediante incineración. La viabilidad de cada técnica depende del tipo de poliuretano, del uso posterior y de su costo.

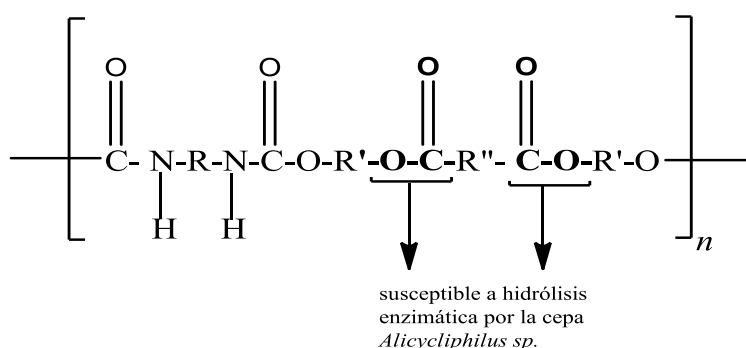


Figura 1. Estructura general de los compuestos de uretano a biodegradar. Enlace susceptible a hidrólisis enzimática mediante la cepa *Alicyclophilus sp.*

1.1 Objetivos.

Con el fin de explorar el posible reciclaje por biodegradación mediante la cepa *Alicyclophilus sp.*, se desarrollo el presente trabajo el cual tiene los siguientes objetivos:

- 1) Sintetizar oligomeros de uretano, (Fig.1) cuyas formulaciones se basen en la producción de poliuretanos para espumas flexibles, pero, obteniendo materiales menos complejos (sin aditivos) y de bajo peso molecular, donde $n=1-3$.
- 2) Lograr elucidar el mecanismo de degradación involucrado durante las pruebas de degradación tanto por hidrólisis no enzimática (debida al medio acuoso) como enzimática, (debido a la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*), al identificar mediante GC-MS a los productos o metabolitos, obtenidos durante las pruebas de degradación.
- 3) Determinar cuáles podrían ser los factores estructurales y morfológicos de los compuestos a biodegradar que pueden o no inducir a la biodegradación.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2. Reciclaje de materiales poliméricos.

A pesar de lo mucho que se ha planificado, legislado, experimentado e intentado en cuanto al reciclaje de desechos relacionados a los polímeros, aun éste es un problema no resuelto, y en el mejor de los casos, resuelto sólo parcialmente.

A la fecha se dispone de propuestas y tecnologías desarrolladas para reciclar materiales poliméricos, fundamentalmente bajo principios mecánicos, y que funcionarían sin problemas, si es que se cumplen simultáneamente una serie de requisitos operativos y técnicos^(2, 20, 21). Al momento de evaluar la factibilidad de aplicarlas en situación real y a gran escala, irremediamente se debe de aceptar una realidad difícil de doblegar, y es que la calidad y precios del material reciclado por los métodos propuestos no es competitiva al lado de los precios de las materias primas o resina virgen empleadas en la fabricación de los polímeros.

Actualmente se cuenta con programas de recolección, clasificación, separación y reciclaje de materiales poliméricos. Hasta ahora el método que ha dado resultado es el que se aplica en la fuente primaria de generación, es decir, en el lugar mismo de la fabricación del material antes de que este sea llevado a la etapa de utilización.^(8, 9, 19) Este reciclaje en la fuente, resulta factible, dado que el tipo de polímero que compone el desecho es conocido, está limpio y la pigmentación es la misma con que se está trabajando en la línea de fabricación. Si se hacen mejoras en los procesos de conversión, es posible reducir la cantidad de productos que están fuera de especificación, lo que apunta en la dirección de la minimización de la generación de residuos primarios, y si estos se llegan a generar, se reutilizan en un 100% como materias primas. De esta forma se sustenta la idea de que todo plan de minimización debe comenzar por la reducción en la fuente.

El aumento en el consumo de los materiales poliméricos en la sociedad moderna, se estima que crece un 4% anualmente;⁽²²⁾ se ha producido en paralelo con el desarrollo tecnológico de estos materiales, cuyo uso se ha extendido además de en el campo ya convencional de los envases, en la fabricación de componentes en las industrias automotriz, de vivienda, vestido y todo tipo de bienes de consumo. Sin embargo, el éxito en el desarrollo tecnológico no ha llevado emparejada la previsión de reciclado de los productos. Se estima que se recupera o recicla menos del 15% de los materiales poliméricos residuales. Los plásticos contenidos en los residuos sólidos urbanos (RSU) son principalmente polietileno (PE) y polipropileno (PP), alrededor del 60%, y en menor proporción están el poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), poli(tereftalato de etileno) (PET), poliestireno-butadieno (PS-BD); poli(metacrilato de metilo) (PMMA), etc.^(22, 23)

Siendo el porcentaje de recuperación del plástico utilizado en diferentes sectores industriales muy bajo.

La explicación de esta situación podría deberse a los siguientes motivos:

- El envase plástico no es retornable como las botellas de vidrio.
- Su baja densidad eleva el costo de transporte, haciendo imprescindible su rotura para el transporte a los centros de reciclaje.
- La diversidad de materiales plásticos, de diferente composición, exige una separación en familias antes de ser reciclado, complicando la recogida selectiva.

La importancia de reciclar el plástico cobra así, una dimensión inexistente en otros materiales y ayuda considerablemente a justificar su reciclado. En la década de los 90 la Unión Europea y Japón⁽²⁴⁾ han sido los líderes en el reciclado de plásticos.

Existen diversos métodos en el tratamiento del reciclado de los plásticos, denominados: Primario, secundario, terciario y cuaternario.

El tratamiento primario consiste en operaciones mecánicas para obtener un producto de características similares que el producto original. En el tratamiento secundario, consistente en la fusión; los desechos son convertidos en productos de diferentes formas y con mayor espectro de aplicaciones, las cuales son diferentes a las del plástico original. Esta es la tecnología más usada hasta ahora, particularmente en la industria automotriz, y se estima que sólo el 20% de los plásticos pueden ser reciclados de esta forma.

El reciclado terciario, o "reciclado químico", persiguen el aprovechamiento integral de los elementos constitutivos del plástico, por transformación del mismo en hidrocarburos, los cuales pueden ser materias primas para la obtención de nuevos plásticos o en otras rutas en la industria petroquímica. Los métodos pueden ser químicos o térmicos, dependiendo del tipo de polímero.^(25, 26)

El reciclado cuaternario consiste en la incineración para recuperar energía. Actualmente no es muy aceptado socialmente por los problemas medioambientales.

2.1 Tipos de reciclaje.

2.1.1 Reciclaje mecánico.

Este tipo de reciclaje es un proceso físico, que consiste principalmente en una secuencia de clasificación-separación de los residuos, seguida de una limpieza y posteriormente una granulación.

La clasificación y separación de los residuos no siempre es simple debida a las distintas formas, colores y propiedades físicas y químicas. La limpieza consecuente también es compleja. Las impurezas posibles de encontrar son variadas y a veces difíciles de separar: grasas, aceites, lácteos, pinturas; y un sin número de otros residuos dificultan el proceso de limpieza, siendo este factor crucial al momento de hacer factible el reciclaje mecánico.

2.1.2 Reciclaje químico.

En este proceso se lleva a cabo la depolimerización del material dando como resultado la obtención de los monómeros que se utilizaron como materia prima. Algunos métodos de reciclado químico ofrecen la ventaja de no tener que separar algunos tipos de materiales poliméricos, reduciendo de esta manera los costos de recolección y clasificación. Dentro de los principales procesos existentes están:

2.1.2.1 Pirólisis: Este proceso se lleva a cabo a temperaturas de operación de 400-800°C bajo presión reducida o en atmósfera inerte.

El método termolítico de descomposición es necesario para la ruptura de las cadenas de los polímeros de adición como lo son los polímeros vinílicos, acrílicos fluoroplásticos y poliolefinas. Este método tiene mayor diversidad y flexibilidad que la solvólisis (quimiólisis) en tanto que comprende tratamientos a altas temperaturas como la pirólisis y gasificación y otros procesos que son habituales en refinería, generalmente con intervención de catalizadores sólidos: Craqueo térmico, hidrogenación catalítica y craqueo catalítico. Los polímeros son convertidos a monómero, a combustibles gaseosos y líquidos, y a compuestos de base en la petroquímica. ^(28, 29, 30)

2.1.2.2 Hidrogenación: En este caso los plásticos son tratados con hidrógeno y calor. Las cadenas poliméricas son rotas y convertidas en un petróleo sintético que puede ser utilizado en refinerías y plantas químicas.

La hidrogenación catalítica es una vía avanzada comercialmente. La planta de Veba Oel en Alemania procesa 400 Ton/año de plásticos (acepta hasta un 10 % de PVC). Opera a 150-300 bar y 470 °C en atmósfera de hidrógeno, dando un producto con un 60% de parafinas, 30% de nafta, 9% de aromáticos y 1% de olefinas. La rentabilidad de la planta exige una tasa de 120 USD/Ton de plástico tratado. Sin embargo, los inconvenientes se centran en: 1) El costo de la necesaria separación y clasificación de plásticos. 2) La alimentación al equipo de tratamiento, preferiblemente en una corriente fluida. 3) La eliminación de contaminantes como el cloro y el nitrógeno. 4) El hidrógeno es inflamable. ⁽³¹⁾

2.1.2.3 Quimiólisis: La descomposición química, ruta más desarrollada industrialmente que la térmica, es aplicable solamente a polímeros de condensación (poliésteres, nylon y poliuretanos), los cuales tienen grupos funcionales unidos por enlaces débiles que son susceptibles al ataque con determinados agentes químicos. Según el agente utilizado las vías de tratamiento son: Metanólisis, glicólisis (Fig. 2.1) e hidrólisis.

Es de destacar que los procesos de metanólisis (con metanol) y glicólisis (con etilenglicol) eliminan impurezas de los plásticos y los compuestos obtenidos se pueden destinar a la fabricación de artículos con restricciones de calidad como los de envasado de alimentos. ^(32, 33)

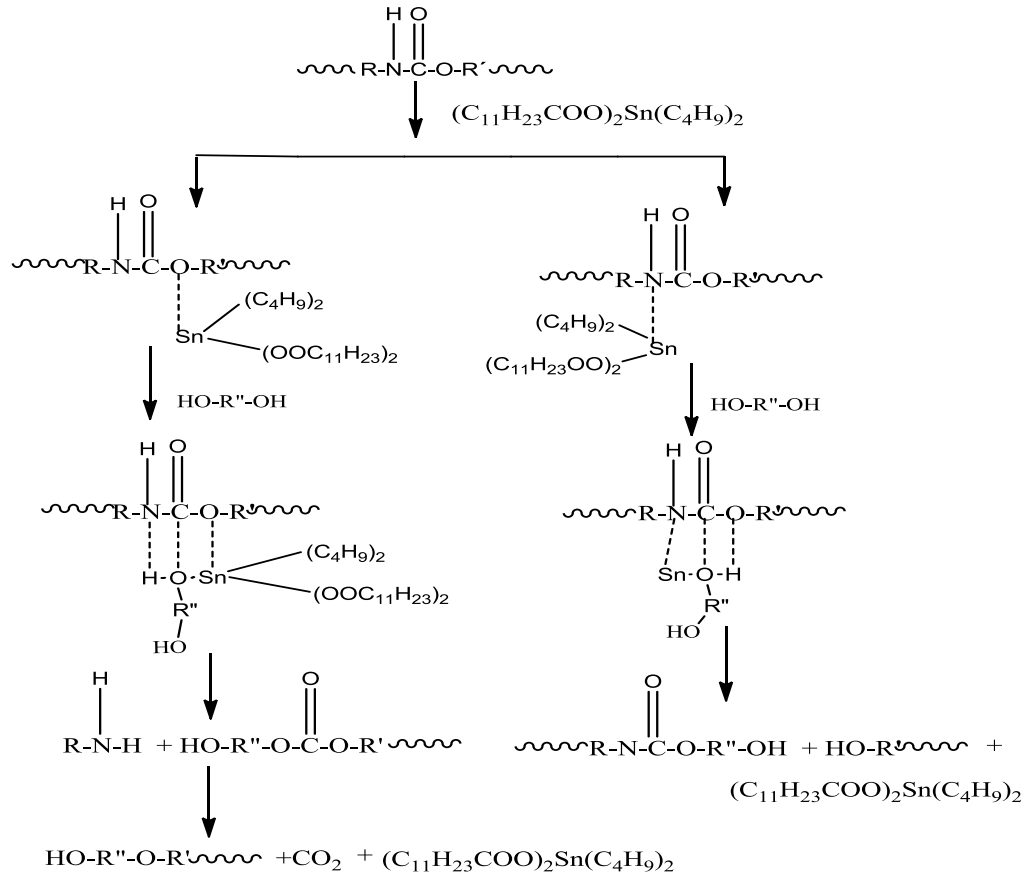


Figura 2.1 Mecanismo de glicólisis del grupo uretano mediante dietilenglicol y catalizador DBTL.⁽³⁶⁾

2.1.3 Reciclaje físico.

2.1.3.1 Recuperación de energía: Incineración.

La incineración es la forma más efectiva de reducir los materiales orgánicos, que de otra forma, irían a parar a un vertedero. Sin embargo, tiene el problema de que durante el proceso se genera CO_2 perjudicial para el medio ambiente ya que es el responsable del efecto invernadero. Sin embargo, si la energía generada se emplea, se evita el consumo de combustibles fósiles, ayudando así a la conservación de los recursos naturales sin aumento adicional de las emisiones de CO_2 al medio. Esto es de gran importancia para la consecución del "desarrollo sostenible".

Un proceso desarrollado en Suiza trata a los residuos sólidos urbanos en primera instancia compactándolos y posteriormente desgasificándolos y pirolizándolos en un etapa a $600\text{ }^\circ\text{C}$, donde los gases producidos son alimentados a un horno de incineración a $2000\text{ }^\circ\text{C}$. Siemens KWU también tiene otro proceso en el que los residuos son pirolizados en un horno rotatorio a $450\text{ }^\circ\text{C}$. Cada Ton de residuos genera 655 kg de gas y 345 kg de sólidos y el gas se alimenta en un incinerador a $1300\text{ }^\circ\text{C}$.^(36,37)

2.2 Reciclaje de poliuretanos.

En la actualidad debido a la gran cantidad de residuos existentes el reciclado resulta necesario y de gran importancia. El 7 % de los residuos totales son plásticos pero debido a su volumen ocupan un 20 % del total de los mismos. Dentro de los residuos plásticos un 5 % de los mismos pertenece al poliuretano. Por esta razón, las técnicas de reciclado de poliuretano han evolucionado de forma importante. ⁽³⁹⁾

Dependiendo del tipo de poliuretano (propiedades y aplicación) y de factores de tipo económico, logístico y ecológico; podemos hablar de cuatro tipos de técnicas de reciclado a emplear:

- Reciclaje mecánico.
- Reciclaje químico.
- Recuperación de energía mediante incineración.
- Biodegradación.

La viabilidad de cada técnica depende del tipo de poliuretano, del uso posterior y de su costo. ^(44, 45, 46)

2.2.1 Reciclaje mecánico

Los tipos de reciclaje mecánico para poliuretano son:

1. Prensado adhesivo.
2. Moldeo por compresión.
3. Espuma flexible entrecruzada.
4. Pulverización.

2.2.1.1 Prensado adhesivo.

Esta técnica no solo se puede aplicar a los poliuretanos, sino también a otros residuos como, por ejemplo, papel o goma. ^(4, 18)

Procedencia: el poliuretano utilizado en esta técnica puede proceder de:

- Moldeo mediante la técnica RIM (reaction injection molding) o RRIM (reinforced reaction injection molding).
- Espuma empleada en los parachoques.
- Espuma termoformable.
- PUR integrable (volantes).
- PUR empleado en las moquetas de los coches (insonorización).
- Espuma semirígida empleada en paneles de instrumentación, refrigeradores o paneles de puerta.

Proceso: El porcentaje de contenido de residuo en el producto final es muy elevado (en muchos casos llega hasta un 90 %) y el proceso consiste en cuatro pasos principales a partir de la obtención de la pieza de material a reciclar:

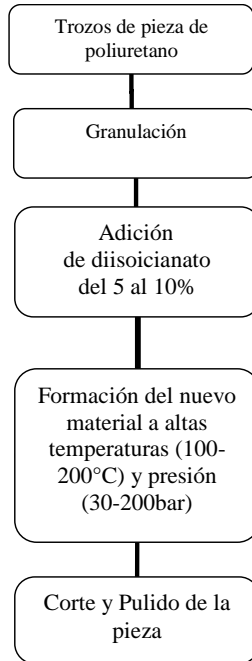


Figura 2.2 Diagrama de proceso para el método prensado adhesivo.

Aplicaciones: el material resultante de esta técnica se emplea en:

- Restauración de edificios antiguos (en el caso del PUR que proviene de autopartes).
- Muebles para embarcaciones.
- Alfombrado de gimnasios (debido a su elasticidad).
- Muebles de cocina.

2.2.1.2 Moldeo por compresión.

Proceso: mediante esta técnica el poliuretano se muele en partículas muy finas y se somete a presiones y temperaturas altas con objeto de generar un material de características ideales para aplicaciones automovilísticas. Tanto la molienda como la compresión deben ser altamente controladas para cada tipo de aplicación. ⁽¹⁰⁾

Aplicación: Debido a la escasa variación en la característica de elongación, estos materiales son adecuados para múltiples aplicaciones (moldeado mediante técnica RIM). Las ventajas que presenta esta técnica son:

- El material resultante está exento de tensiones internas, presenta una mejor resistencia al calor.
- El material contiene 100 % de material reciclado.

2.2.1.3. Espuma flexible entrecruzada.

Proceso: La espuma enlazada es un producto moldeado hecho de espuma de poliuretano flexible triturada que se mantiene adherida gracias a un entrecruzante.

En la trituración de la espuma se obtienen trozos de aproximadamente 1 cm. La activación y curado se realiza por vapor (Fig. 2.3). ⁽¹⁹⁾

Las propiedades de las piezas obtenidas vienen determinada por varios factores:

- Tipo y densidad de la espuma usada.
- Tamaño y uniformidad de la partícula.
- Tipo de entrecruzante.
- Relación entrecruzante/ espuma.

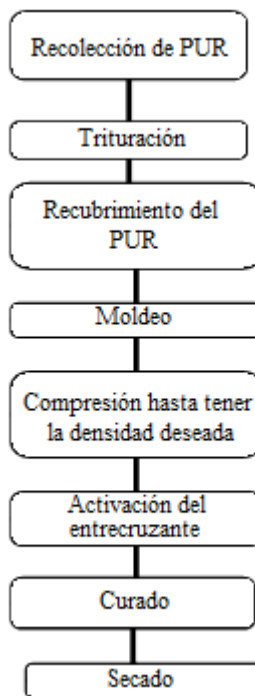


Figura 2.3 Diagrama de proceso para el método espuma flexible entrecruzada.

Aplicación: La relativa alta densidad y excelente resiliencia conseguida con esta técnica la hace adecuada para aplicaciones como apoya codos, apoyacabezas, insonorizantes, alfombrado así como muebles de oficina. Hasta 20.000 toneladas de este material es empleado en Europa y constantemente nuevas aplicaciones son descubiertas. ^(1, 2)

1.2.1.4. Pulverización.

Esta tecnología es extremadamente versátil ya que se emplea en un gran número de aplicaciones del poliuretano. Consiste en la transformación de la espuma en polvo fino que se mezcla con polioliol y se utiliza para la fabricación de nuevos productos de poliuretano.

Proceso: Esta técnica se emplea para el reciclado de asientos de PUR, (Fig.2.4) observándose que los nuevos asientos, (15-20% de material reciclado), presentan excelentes características y dependiendo del tipo de espuma las propiedades físicas están afectadas en mayor o menor medida. ^(3, 4)

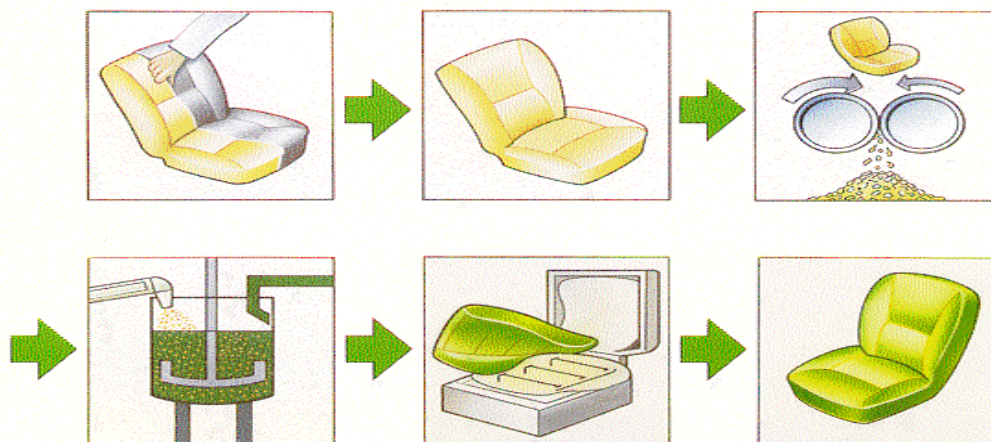


Figura 2.4 Proceso de reciclado de asientos mediante la pulverización.

Aplicación: El desarrollo comercial de esta tecnología en áreas como espuma en bloque y moldeadas se anticipa en un futuro cercano, mientras que se exploran otras aplicaciones potenciales, Bayer A.G. y Hennecke Polyurethan-Anlagentechnik han sido los primeros en desarrollar un sistema a escala industrial (Grind Flex Technology), el cual permite incorporar de forma homogénea partículas sólidas de espuma (polvo) en la estructura final del bloque. ⁽¹⁰⁾

2.2.2 Reciclaje químico.

Las diferentes técnicas que están incluidas dentro del reciclado químico se basan en la aplicación de diversos procesos químicos y térmicos que rompen los materiales poliméricos en fracciones de bajo peso molecular. ⁽⁴⁵⁾

Las técnicas más empleadas son:

1. Hidrólisis.
2. Aminólisis.
3. Glicólisis.
4. Pirólisis.
5. Hidrogenación.
6. Gasificación.

Siendo estas tres últimas de carácter termoquímico.

La hidrólisis, glicólisis y aminólisis emplean agua, alcoholes y aminas, respectivamente para romper a la cadena polimérica y así obtener polioliol y diaminas aromáticas (producto de hidrólisis del diisocianato). De estas últimas se regenera el diisocianato que junto al polioliol son empleados en la fabricación de poliuretano de calidad.

2.2.2.1 Hidrólisis.

En la hidrólisis el polioliol-poliéter y diaminas son obtenidas por aplicación de vapor a altas presiones; después de las operaciones de separación, purificación y conversión de las diaminas en isocianato. Ambos materias (polioliol-poliéter e isocianato) son utilizados en la fabricación de PUR flexible. Compañías como Ford S.A. de C.V. y General Motors han concentrado todos sus esfuerzos en el desarrollo de este tipo de proceso. ^(45,46)

2.2.2.2 Glicólisis.

La glicólisis (alcohólisis) es un proceso en el cual se utilizan glicoles para convertir el polímero en un líquido a una temperatura de 200°C y a presión atmosférica.

El proceso consiste en romper la cadena polimérica reemplazando las moléculas de polioliol por glicol. Esto produce una mezcla de polioliol original, un polioliol nitrogenado, diisocianato y glicol sobrante de la reacción que debe ser tratada para separación y purificación.

Los polioles obtenidos en la glicólisis de espuma flexible pueden ser reutilizados en la fabricación de espuma semirrígida sustituyendo el 40 % de polioliol virgen sin una pérdida de propiedades significativa. Para reutilizar el polioliol en espuma de PUR flexible se necesitan polioles de bajo número de grupos hidroxilo. Esto se consigue con pequeñas cantidades de glicol. ⁽⁴⁶⁾

2.2.2.3 Aminólisis.

Cuando se utiliza la técnica de aminólisis se obtiene polioliol y urea di sustituida. Productos como dibutilamina, etanolamina, etc., son empleados como agentes depolimerizantes.

2.2.2.4 Pirólisis, hidrogenación y gasificación.

En la pirolisis, hidrogenación y gasificación se transforma la espuma de poliuretano en fracciones de hidrocarburos de bajo peso molecular.

La pirolisis consiste en aplicar calor bajo atmósfera inerte para dar lugar a hidrocarburos líquidos y gaseosos. La hidrogenación consiste en el tratamiento de residuos con hidrógeno a temperaturas y presiones elevadas. En la gasificación, los poliuretanos son calentados con aire o con oxígeno y así se produce la oxidación parcial de los hidrocarburos para producir una mezcla de gases como: monóxido de carbono e hidrógeno que pueden ser utilizados para la producción de metanol o amoníaco y/o incluso como agentes para la producción de acero en hornos de venteo. ^(27, 30)

La gasificación, desarrollada por diferentes empresas como la Shell Chemicals, Texaco y Ewivk se realiza en condiciones más severas que las de la pirólisis, 960 °C y 60 bar, para la obtención de gas de síntesis convertible en metanol. ^(30, 46)

2.2.3 Reciclaje físico.

2.2.3.1 Incineración.

Los residuos generados en la incineración son inertes e incluso se pueden utilizar como material de construcción. La energía recuperada es equivalente a la que se puede obtener si se emplea carbón, de hecho, la incineración de muchos poliuretanos conlleva unas emisiones inferiores a las del carbón propiamente dicho. ^(47, 48)

La incineración con recuperación de energía se está considerando como una solución responsable desde el punto de vista medioambiental en la gestión de los residuos de poliuretano. Ofrece una solución tanto en cuanto las otras opciones de reciclado son más costosas desde el punto de vista ecológico y económico. Por esa razón es necesario seguir explorando nuevas alternativas que permitan trabajar aisladamente o conjuntamente con alguna de las técnicas de reciclado utilizadas en la actualidad.

2.2.4 Alternativa de reciclaje de poliuretanos. Biodegradación.

2.2.4.1 Definiendo la biodegradación.

Desafortunadamente, el término biodegradación en relación a los plásticos no se ha aplicado consistentemente a lo largo del tiempo, provocando confusión. El deterioro o pérdida de las características físicas del material es a menudo confundido con la biodegradación. Sin embargo, la biodegradación es un proceso natural y complejo de descomposición facilitado por mecanismos bioquímicos. ^(50, 51)

- **Biodegradación primaria (o degradación parcial):** es la alteración en la estructura química resultando en pérdida de las propiedades específicas del polímero.
- **Biodegradación final (o degradación total):** el material es totalmente degradado por microorganismos generándose como productos finales CO_2 (bajo condiciones aerobias) o CH_4 (bajo condiciones anaerobias), agua, sales minerales y biomasa.

2.2.4.2 Mecanismo general de biodegradación de polímeros.

La biodegradación de polímeros se refiere al ataque por microorganismos dirigida hacia materiales polimérico naturales o sintéticos los cuales algunos de ellos presentan baja solubilidad o insolubilidad en medio acuoso, lo que implica para estos casos, un proceso heterogéneo, debido a la baja solubilidad en agua y al tamaño de las moléculas poliméricas, los microorganismos no son capaces de transportar el material polimérico directamente hacia el interior de las células donde se lleva a cabo la mayoría de las reacciones bioquímicas. ^(51, 87)

En un principio los microorganismos liberan enzimas extracelulares, las cuales depolimerizan a las cadenas del material polimérico (Fig. 2.5). Si la masa molecular de los polímeros está lo suficientemente reducida para generar intermediarios solubles en agua, estos podrán ser transportados hacia el interior de las células y transformarse mediante procesos metabólicos.

El producto final de estos procesos metabólicos incluye la generación de agua, dióxido de carbono y biomasa, sin embargo, las enzimas extracelulares son demasiado grandes para penetrar profundamente en el material polimérico, por lo que solo actúan principalmente en la superficie del polímero. Consecuentemente, la biodegradación de los plásticos es generalmente un proceso de erosión en la superficie. ^(64, 65)

Aunque la catálisis enzimática en la cadena polimérica es en muchos casos el proceso primario de la biodegradación, los procesos químicos y físicos pueden de la misma forma actuar en el polímero, de forma paralela o individualmente. Estos efectos no bióticos incluyen la hidrólisis, degradación térmica, oxidación o rompimiento de la cadena por irradiación (foto degradación). Para algunos materiales, estos efectos se emplean directamente para inducir el proceso de biodegradación, procesos que hay que considerar cuando se lleva a cabo primordialmente por enzimas extracelulares. Existiendo una coexistencia entre los procesos bióticos y los abióticos (no bióticos), (Tabla 2.1). ^(39, 51)

Por otro lado, los parámetros como humedad, temperatura, pH, salinidad; presencia o ausencia de oxígeno y la cantidad de nutrientes presentes en el medio, tienen efectos importantes en la biodegradación por microorganismos, dichos factores hay que considerar durante las pruebas de biodegradación. Otro factor que hay que considerar durante dichas pruebas es la complejidad de los materiales poliméricos, ya que estos pueden estar constituidos por distintos componentes, plastificantes, aditivos o pueden ser copolímeros; los cuales pueden estar distribuidos de forma aleatoria, pueden formar bloques, estar entrecruzados o formar redes poliméricas en donde se involucra un ordenamiento en la estructura polimérica (temperatura de fusión y cristalinidad). Estas diferencias estructurales pueden influir en la hidrólisis enzimática. ⁽⁵³⁾

Es importante considerar la estructura química del sustrato, (material polimérico), que se emplea durante las pruebas de biodegradación ya que podría existir algún tipo de inhibición enzimática como puede ser: reversible (competitiva, mixta o no competitiva), alostérica o irreversibles, debido a la presencia de algún tipo de metabolito originado a partir de la hidrólisis del material, el cual, podría actuar como inhibidor al inhabilitar al sitio activo de la enzima provocando esto una posible muerte celular. ⁽⁵⁶⁾

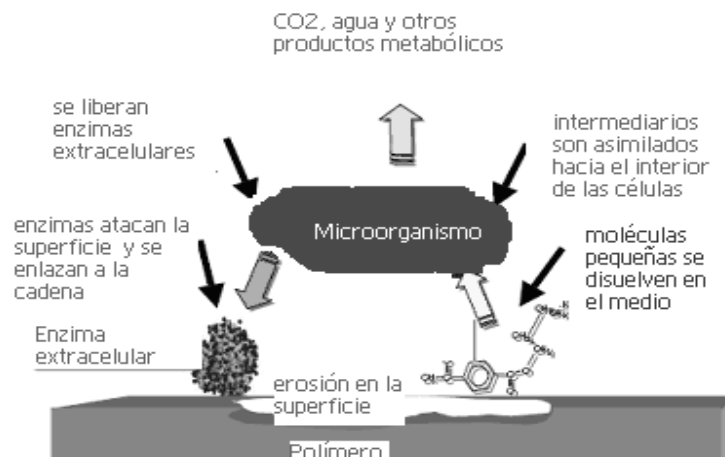


Figura 2.5 Acción del microorganismo en la biodegradación de materiales poliméricos.

2.2.4.3 Hidrólisis enzimática.

Las enzimas son catalizadores biológicos, los cuales aceleran la velocidad de reacción sin que sufran ningún cambio permanente. De hecho, en ausencia de las enzimas, la mayoría de las reacciones del metabolismo celular no podrían ocurrir. Las reacciones de hidrólisis pueden ser catalizadas mediante enzimas conocidas como hidrolasas, en las cuales se incluyen las lipasas, proteasas, esterases y las fosfatasas, entre otras. Esta clase de enzimas se encuentran en el plasma, en el tracto gastrointestinal y en el epitelio de los riñones, facilitando la absorción de los nutrientes y solutos. Por lo tanto, las enzimas juegan un papel muy importante en la degradación de materiales mediante la catálisis que implica una hidrólisis o rompimiento de enlaces. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el grado de biodegradación de los poliuretanos en presencia de la enzima colesterol esterasa, es alrededor de 10 veces más que en los estudios realizados en presencia únicamente de una solución amortiguadora, mediante hidrólisis no enzimática.⁽⁵⁸⁾

La degradación enzimática inicia en la superficie del sustrato sólido, acompañada por la erosión en la superficie y pérdida de peso, debido a que las enzimas no pueden penetrar en la matriz polimérica. Las enzimas degradan selectivamente las regiones amorfas o menos ordenadas, las cuales, permiten a las enzimas penetrar hacia el interior del material y así a su vez poder degradar eventualmente las regiones cristalinas.^(39, 55)

2.2.4.4 Hidrólisis no enzimática.

La degradación hidrolítica no enzimática de un polímero puede definirse como el rompimiento de los enlaces químicos tipo éster o amida a lo largo de la cadena polimérica, para así formar sustancias de menor peso molecular. En primera instancia, el agua interacciona con la cadena polimérica formándose posibles enlaces débiles en la superficie del material, progresando del exterior hacia el interior del material, seguido de la hidrólisis de enlaces. Las reacciones de hidrólisis pueden ser catalizadas por ácidos, bases o sales.⁽⁵³⁾

La naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los materiales poliméricos influye en su grado de degradación, observándose una tendencia a la hidrólisis de acuerdo al siguiente orden: (1) hidrofiliidad del material con enlaces hidrolizables, (2) hidrofobicidad del material con enlaces hidrolizables, (3) hidrofiliidad del material con enlaces no hidrolizables, (4) hidrofobicidad del material con enlaces no hidrolizables. En el caso del polímero poli (1-vinil-2-pirrolidona), (Fig. 2.6), por ejemplo, es un material polar capaz de absorber grandes cantidades de agua, pero no es propenso a la hidrólisis.^(53, 54)

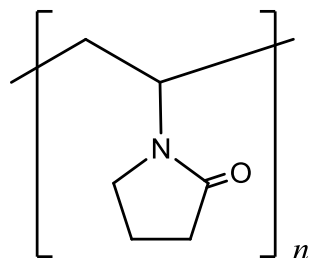


Figura 2.6 Estructura molecular de poli (1-vinil-2-pirrolidona).

Todos los polímeros biodegradables contienen grupos con enlaces hidrolizables, como son los grupos: éster, anhídridos, carbonatos, amidas, uretanos y ureas. Los polímeros con fuertes enlaces covalentes en la cadena (como C-C) y con grupos no hidrolizables requieren tiempos prolongados para ser degradados mediante hidrólisis no catalítica.^(53, 55)

Los pasos involucrados en la hidrólisis no enzimática son cuatro principalmente: (1) el agua penetra en la región amorfa del polímero y se generan moléculas más pequeñas las cuales pueden ser estabilizadas mediante fuerzas de Vander Waals y enlaces de hidrógeno, (2) posteriormente algunos enlaces covalentes (C-O, C-N), en la cadena polimérica pueden romperse. Conforme continúa la hidrólisis química, se continúan generando grupos terminales como por ejemplo ácidos carboxílicos para polímeros como el PLA y PGA, (Fig. 2.7). Estos grupos carboxílicos liberados pueden autocatalizar la reacción de hidrólisis, lo cual podría acelerar la degradación. Una pérdida de fuerza mecánica se observa en esta etapa. (3) el tercer paso está caracterizado por un rompimiento total a lo largo de la cadena polimérica de los enlaces covalentes observándose una reducción en el peso molecular, este paso, depende de factores como son: temperatura de fusión, cristalinidad y estructura de la cadena. (4) finalmente se obtienen moléculas como dímeros o monómeros así como moléculas solubles en el medio acuoso.⁽⁵⁴⁾

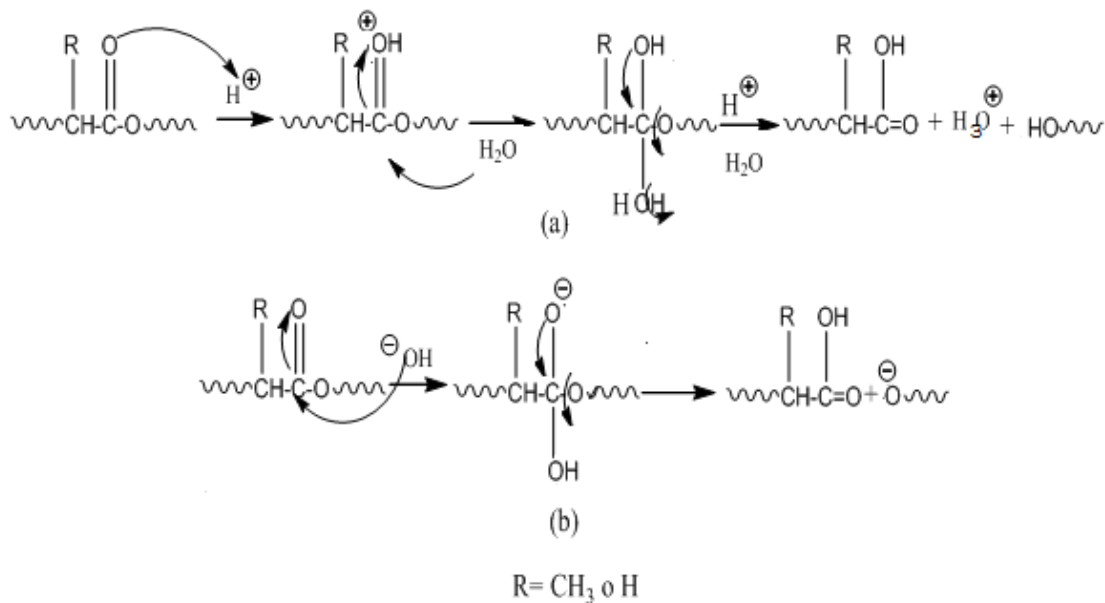


Figura 2.7 Mecanismo hipotético de hidrólisis no enzimática de los polímeros sintetizados a partir de ácido láctico o ácido glicólico (PLA o PGA): (a) a pH < 2; (b) a pH > 7⁽⁵⁴⁾

Tabla 2.1 Diferencias entre hidrólisis no enzimática e hidrólisis enzimática en la degradación de poliésteres. ⁽⁵⁴⁾

Concepto	Hidrólisis química	Hidrólisis enzimática
Material polimérico susceptible a hidrólisis	PGA, PLA ^a	PCL, PBS, PHB ^b
Punto de acceso	Del exterior hacia el interior	Exterior únicamente
Apariencia en la superficie	Suave	áspero , erosionado
Pérdida de peso	No hay	Si hay
Reducción de la masa molecular	Si hay	No hay

(a) Nombre comercial PGA= poli (ácido glicólico), PLA= poli (ácido láctico)

(b) Nombre comercial. PCL= poli (caprolactona), PBS=poli (succinato de butileno), PHB= poli (hidroxibutirato)

2.3 Microorganismos para la hidrólisis enzimática. Biodegradación.

Dos tipos de microorganismos resultan de gran interés para llevar a cabo la biodegradación mediante catálisis enzimática en polímeros naturales o sintéticos; estos son las bacterias y los hongos.

Tabla 2.2 Microorganismos capaces de biodegradar poliuretanos (PUR).

Microorganismo	PUR ^(a)	Tipo de enzima	Referencia
Hongo			
<i>Aspergillus niger</i>	PS y PE	Esterasa	Darby and Kaplan 1968 ⁽⁹¹⁾
<i>Aspergillus flavus</i>	PS y PE	Desconocido	Darby and Kaplan 1968 ⁽⁹¹⁾
<i>Aspergillus Fumigatus</i>	PS	Esterasa	Pathirana and Seal 1984 ⁽⁶¹⁾
<i>Chaetomium globosum</i>	PS	Esterasa, proteasa, ureasa	Pathirana and Seal 1984 ⁽⁶²⁾
<i>Penicillium citrinum</i>	PS	Esterasa, proteasa, ureasa	Pathirana and Seal 1984 ⁽⁶³⁾
<i>Fusarium solani</i>	PS	Esterasa	Cosgrove et al. 2009 ⁽⁵⁸⁾
<i>Penicillium viridicatum</i>	PS y PE	Esterasa, proteasa, ureasa	Cosgrove et al. 2009 ⁽⁵⁸⁾
<i>Alternaria Solani</i>	PS	Esterasa	Hamed et al. 2009 ⁽⁵⁹⁾
Bacteria			
<i>Comamonas acidovorans</i>	PS	Esterasa	Nakajima–Kambe et al. 1991 ⁽⁶⁶⁾
<i>Corynebacterium sp.</i>	PS	Esterasa	Kay et al. 1991,1993 ^(64, 65)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PS	Desconocido	Kay et al. 1991 ⁽⁶⁴⁾
<i>Rhodococcus sp.</i>	PS	Esterasa	Dang and Mitchell 2004 ⁽⁸⁰⁾
<i>Arthrobacter sp. AF11</i>	PS	Esterasa	Shah and Hasan 2008 ⁽⁹²⁾

(a) PS (poliéster poliuretano), PE (poliéter poliuretano)

2.3.1 Hongos.

Los hongos son microorganismos eucariontes, de particular importancia para los procesos de biodegradación. Los hongos son microorganismos nucleados, se reproducen sexual y asexualmente; la mayoría de ellos poseen filamentos y existen más de 80,000 especies conocidas. Su importancia como agentes degradadores es resultado de la producción de enzimas capaces de utilizar las cadenas poliméricas como sustratos para ser asimilados como sus nutrientes.⁽⁵⁶⁾

Estudios realizados por Derby *et al.*⁽⁹¹⁾ para evaluar la degradabilidad de los PUR mediante microorganismos, llevaron a cabo estudios en donde sintetizaron 100 tipos de poliuretanos y realizaron pruebas de biodegradación frente a siete tipos de hongos (*Aspergillus niger*, *A. avus*, *A. versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma sp.*, and *Chaetomium globosum*).^(56, 91) Este fue el primer estudio sistemático de biodegradación de PUR por microorganismos. Ellos reportaron que los PUR son resistentes a la biodegradación cuando están presentes segmentos de cadenas laterales en los polioles poliésteres, así como también observaron que se veía afectada dicha hidrólisis por el tipo de diisocianato empleado durante la síntesis del PUR. Crabbe *et al.*⁽⁶⁹⁾ hicieron estudios con los hongos *Fusarium solani*, *Curvularia senegalensis*, *Aureobasidium pullulans*, and *Cladosporium sp.* para llevar a cabo la biodegradación de poliuretanos coloidales tipo poliéster-poliuretano encontrando que al emplear estos hongos se requería adicionar ciertos nutrientes ya que no eran capaces de utilizar al PUR como única fuente de carbono.

2.3.2 Bacterias.

Las bacterias son microorganismos procariontes los cuales pueden presentarse en las formas de: bastones, cocos o espirales; otras pueden ser de tipo cadena o filamentosas. Pueden ser aerobias o anaerobias, en contraste con los hongos los cuales son únicamente microorganismos aerobios. La capacidad para transformar materiales poliméricos a compuestos simples, metabolitos, se debe a una serie de reacciones químicas llevadas a cabo por determinadas proteínas que actúan como catalizadores llamados enzimas.⁽⁶³⁾

Se han reportado estudios de biodegradación de PUR por bacterias gram positivas y gram negativas. Kay *et al.*⁽⁶⁴⁾ aislaron 15 tipos de bacterias capaces de atacar piezas de poliéster-poliuretano siendo las cepas bacterianas *Corynebacterium sp.* B6, B12, y *Enterobacter agglomerans* B7, las que presentaron una mayor actividad en la degradación del PUR. En sus estudios encontraron que después de dos semanas de cultivo, se registraba una pérdida de peso y de ciertas propiedades mecánicas en el PUR, sin embargo, para llevar a cabo la degradación de dicho material por estas bacterias se requería de la adición de nutrientes orgánicos como suplemento (ejem. extracto de levadura), ya que las bacterias no fueron capaces de utilizar al PUR como única fuente de carbono. Kay *et al.*⁽⁶⁵⁾ también analizaron los productos obtenidos en las pruebas de biodegradación mediante FT-IR cuando emplearon a la bacteria *Corynebacterium sp.*; encontrando que la degradación del PUR es llevada a cabo principalmente por la hidrólisis de los enlaces éster. Ellos concluyeron que el PUR no fue utilizado como nutriente pero fue degradado como resultado de un co-metabolismo.

La bacteria *Comamonas acidovorans* TB-35 fue aislada por Nakajima-Kambe *et al.*,⁽⁶⁶⁾ es una bacteria gram-negativa la cual ha sido reportada como capaz de utilizar poliésteres-poliuretanos como única fuente de carbono. En sus estudios analizaron a los metabolitos obtenidos mediante GC-MS y concluyeron que los productos fueron derivados a partir de los segmentos de poliéster del PUR como resultado de un rompimiento hidrolítico de enlaces éster.^(66, 67)

2.3.2.1 Curvas de crecimiento bacteriano.

Cuando una bacteria comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo de cierto tiempo es una colonia. Por este motivo se denomina unidad formadora de colonia, (UFC).^(16, 70)

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento bacteriano, en la figura 2.8 se representan las diferentes fases de crecimiento bacteriano. Las fases, parámetros y cinética de crecimiento para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento en este caso se puede seguir por conteo del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.^(9, 16)

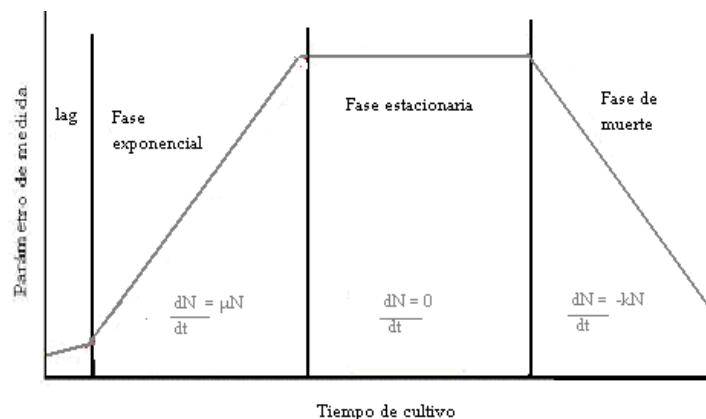


Figura 2.8 Fases de crecimiento bacteriano en medio líquido.⁽¹⁶⁾

Donde la fase lag es la fase de adaptación en la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales, de abundancia de nutrientes, para poder iniciar el crecimiento exponencial. La fase exponencial o logarítmica es aquella en la cual su rapidez de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.

Posteriormente está la fase estacionaria en la cual no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante esta se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria ya sea porque se agota algún nutriente esencial del medio, o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para su crecimiento, o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. Finalmente, se presenta la fase de muerte en la cual hay reducción del número de bacterias viables del cultivo.

2.4 Enzimas.

Las enzimas estructuralmente son proteínas globulares y consisten en moléculas largas con pesos moleculares que van desde los 10,000 Da hasta los 400,000 Da o más, las cuales son altamente especializadas para catalizar reacciones específicas. Se clasifican en seis grupos dependiendo del tipo de reacción que catalizan: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

En la biodegradación de poliésteres y poliuretanos se ha encontrado que las enzimas capaces de catalizar reacciones de ruptura de las cadenas poliméricas son las enzimas tipo hidrolasas, las cuales rompen enlaces C-O y C-N. Las hidrolasas a su vez pueden ser: lipasas, esterasas, depolimerasas y serin endopeptidasas.⁽⁶⁸⁾

Pathirana *et al.*⁽⁶¹⁻⁶³⁾ reportaron la degradación de algunos poliéster-poliuretanos por hongos los cuales producían enzimas extracelulares tipo esterasas, proteasas o ureasas en presencia de dichos materiales, sin embargo, no ha sido determinada la relación que existe entre dichas enzimas y el material a biodegradar. Crabbe *et al.*⁽⁶⁹⁾ purificaron parcialmente una enzima extracelular tipo esterasa producida por una especie de hongo, *Curvularia senegalensis* durante la degradación de un PUR coloidal, dicha enzima tenía una masa molecular de 28, 000 Da y era estable hasta 100°C durante 10min.

Kay *et al.*⁽⁶⁴⁾ determinaron la actividad de una esterasa en el sobrenadante de un cultivo de extracto de levadura y PUR en presencia de la bacteria *Corynebacterium sp.*, dicha enzima se cree que es la responsable de la hidrólisis de los grupos éster presentes en el PUR.

Nakajima-Kambe *et al.*^(66, 67) también determinaron la relación entre la degradación de PUR y la producción de enzima extracelular tipo esterasa en presencia de la bacteria *Comamonas acidovorans* TB-35, encontrando, que existen dos tipos de esterasas, una liberada hacia el medio de cultivo y la otra asociada a la membrana de la pared celular, siendo esta última la responsable de la degradación del poliéster-poliuretano. La esterasa extracelular se consideró como una enzima asociada a la superficie de la célula por enlaces hidrofóbicos y no fue liberada hacia el medio de cultivo debido a su alta hidrofobicidad.

2.4.1 Reacción enzimática heterogénea.

Se ha encontrado que para llevarse a cabo una biodegradación, la enzima involucrada debe acoplarse en el sustrato mediante una determinada conformación estereoquímica. En un sistema biológico, cada enzima realiza una función específica.

Es importante señalar que la cinética descrita por el modelo de Michaelis-Menten es aplicable a los sistemas que implican una catálisis homogénea y no puede ser aplicado a sistemas catalíticos enzimáticos heterogéneos como los son las hidrólisis enzimáticas de sustratos insolubles en agua.⁽⁷²⁾

En los sistemas heterogéneos, han reportado que las enzimas presentan un dominio hidrofóbico como sitio de unión donde se adhieren los sustratos hidrofóbicos en adición a un dominio catalítico el cual es el sitio activo (Fig. 2.9). ⁽⁷¹⁾ Mukai *et al.* ⁽⁶⁰⁾ propuso un modelo cinético aplicable a reacciones enzimáticas heterogéneas. La degradación enzimática heterogénea se lleva a cabo a través de dos pasos: la absorción y la hidrólisis, en donde los dominios hidrofóbicos de la enzima se adhieren a los sustratos sólidos por interacciones hidrofóbicas, antes de que se lleve a cabo la hidrólisis debida a los dominios catalíticos.

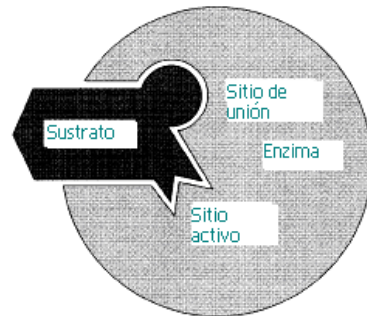


Figura 2.9 Complejo enzima sustrato.

2.4.2 Ataque exo- y endo-enzimático.

La degradación enzimática de un polímero es un proceso en dos etapas, en donde en la primera etapa, la enzima se une al sustrato, polímero, y a continuación, cataliza para dar una escisión hidrolítica. Este primer ataque en el polímero puede producirse mediante dos mecanismos diferentes, conocidos como ataques exo- y/o endo-enzimático, los cuales difieren tanto por el lugar en el que se rompe la cadena polimérica, así como por los productos que se generan.

El exo-ataque ocurre principalmente en la terminación de la cadena del polímero, a menudo con una preferencia por un grupo terminal sobre otro (por ejemplo, el grupo terminal hidroxilo, en lugar de un grupo terminal como ácido carboxílico), exclusivamente generando pequeñas moléculas, oligómeros o incluso monómeros como los productos resultantes. Por el contrario, el ataque endo se produce en cualquier lugar a lo largo de la longitud de la cadena polimérica y en ese caso, una mezcla de productos de bajo peso molecular se obtiene como resultado.

Si el ataque endo se lleva a cabo en repetidas ocasiones se reduce el peso molecular del polímero rápidamente, mientras que el ataque exo se traduce en una rápida generación de pequeñas moléculas como monómeros o dímeros que pueden ser fácilmente metabolizados por las células (Fig. 2.10). En algunos sistemas el ataque exo y endo se llevan a cabo simultáneamente como es en el caso de la biodegradación de la celulosa.

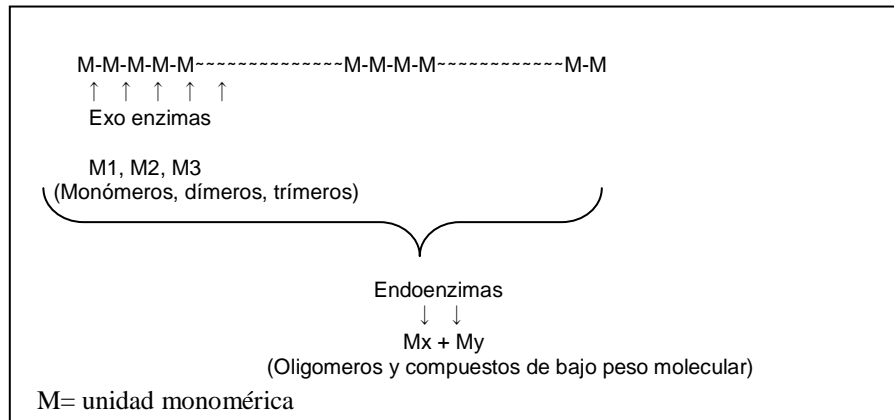


Figura 2.10 Representación del ataque tipo exo- y endoenzimático en la cadena polimérica.

Los procesos de biodegradación mediante las enzimas lipasas o PHA depolimerasas se llevan a cabo principalmente por mecanismos tipo endo.⁽⁷²⁾

2.4.3 Enzimas tipo hidrolasas .

Las principales clases de hidrolasas son: lipasa (triacilglicerol hidrolasa) y esterasa (carboxil éster hidrolasa) producidas por microorganismos procariontes y eucariontes.

Según Bornscheuer⁽²⁴⁾, las lipasas se pueden distinguir de las esterases por el fenómeno de la activación interfacial, que sólo se observa para las lipasas. Considerando que las esterases obedecen la cinética clásica de Michaelis-Menten. La elucidación de la estructura de la lipasa reveló que esta activación interfacial se debe a un dominio hidrofóbico (*lid*, tapa), que cubre el sitio activo de la lipasa. Sólo en la presencia de una fase hidrofóbica la interface, *lid*, se mueve haciendo accesible el sitio activo. Por lo tanto, las lipasas prefieren sustratos insolubles en agua por lo general triglicéridos, compuestos de ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterases prefieren hidrolizar ésteres solubles en agua (por ejemplo, el acetato de etilo) y normalmente sólo rompen triglicéridos de ácidos grasos inferiores a C₆. Ambas enzimas han demostrado ser estables y activas en disolventes orgánicos, pero ésta característica es más pronunciada en la enzima lipasa. La Tabla 2.3 muestra las diferencias entre las enzimas carboxil esterases y las lipasas.⁽⁷³⁾

Tabla 2.3 Diferencias entre lipasas y esterases.⁽⁷³⁾

Propiedad	Lipasa	Esterasa
Preferencia de sustratos	Triglicéridos de cadena larga, alcoholes secundarios	Ésteres simples, triglicéridos de cadena corta
Activación interfacial / <i>lid</i>	Si	No
Hidrofobicidad del sustrato	Alta	Media
Estabilidad en disolventes orgánicos	Alta	Media

El mecanismo de hidrólisis de los enlaces tipo éster es esencialmente el mismo para ambas enzimas, lipasas y esterases, y se compone de los siguientes pasos: (1) en primer lugar, el sustrato se une a la serina activa, produciendo un intermediario tetraédrico estabilizado por sus residuos catalíticos His y Asp. (2) Posteriormente el alcohol es liberado y el complejo acil-enzima se forma. (3) Finalmente el ataque de un nucleófilo (agua, alcohol o de un éster, transesterificación) forma nuevamente el intermediario tetraédrico, generándose el producto final (un ácido o un éster) y la enzima libre (Fig. 2.11).

Labow y colaboradores ⁽²⁰⁾ han estudiado y caracterizado la hidrólisis enzimática de los poliéter-poliuretanos (PEU), poliéster-poliuretanos (PESU) y policarbonato-poliuretanos (PCNU) por las enzimas colesterol esterasa (CE), carboxil-esterasa, elastasa, proteinasa K y fosfolipasa. Donde la enzima CE ha mostrado ser la principal responsable de la degradación de dichos materiales, ya que han observado una mayor actividad catalítica frente a los PUR's.

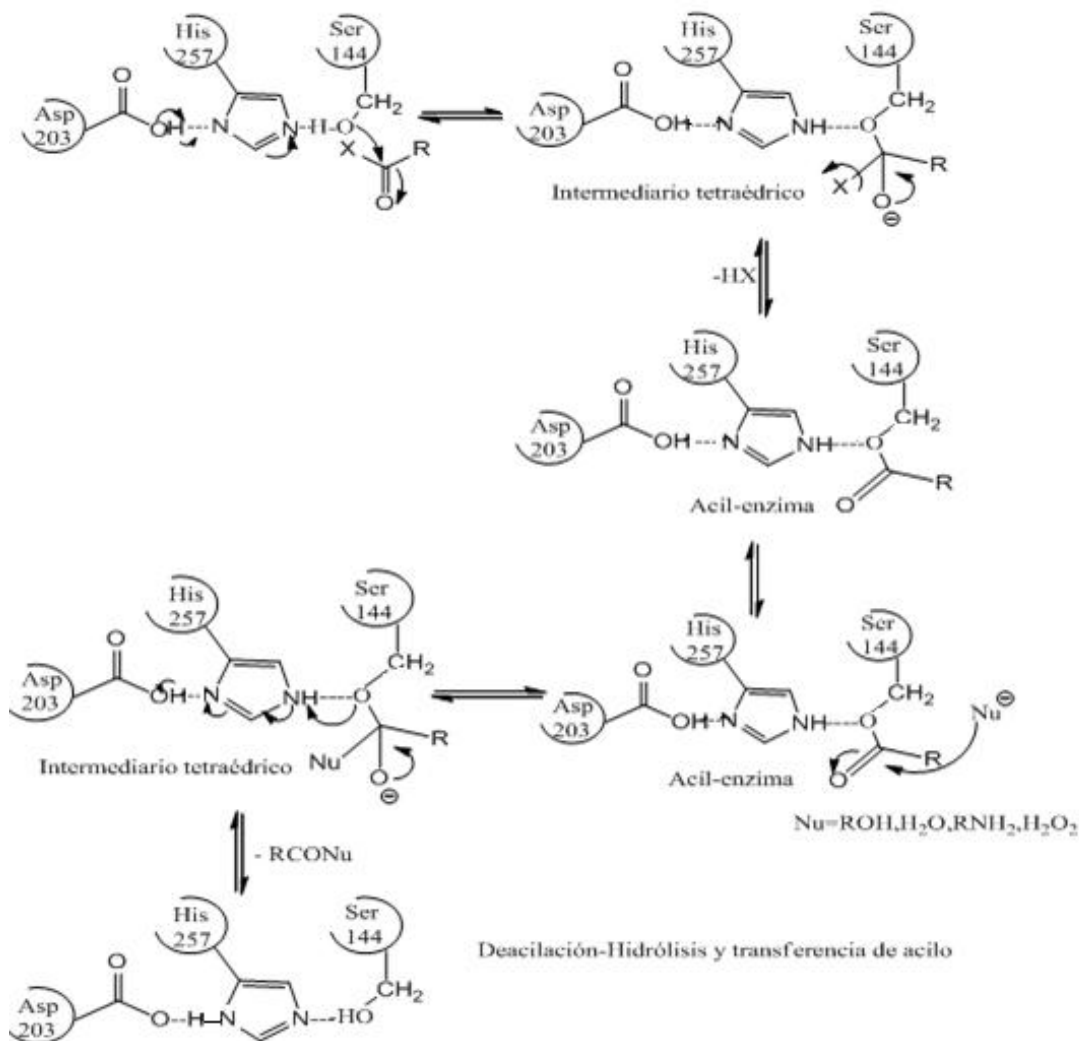


Figura 2.11 Mecanismo de hidrólisis de enlaces tipo éster mediante enzimas tipo hidrolasas.

Existen dos grupos de investigación que han realizado pruebas de biodegradación de poliuretano con bacterias, Howard y Blake, ⁽⁹⁴⁾ aislaron una cepa bacteriana que degradaba poliéster-poliuretano hidrosoluble (Impranil® DNL). Ellos fueron los primeros en identificar una actividad extracelular del tipo proteasa en *Pseudomonas fluorescens*. Su patrón de degradación involucrado es el rompimiento de las celdas de poliuretano con la subsecuente formación de flóculos y la degradación del sustrato.

Varios miembros del género *Pseudomonas* han sido aislados por su habilidad para utilizar poliéster-poliuretano como su única fuente de carbono y energía. Los datos obtenidos de estas bacterias aisladas sugieren que las actividades involucradas en la degradación de Impranil son del tipo esterases y/o proteasas. Cultivos de *Pseudomonas chlororaphis* en poliuretano llevaron a la purificación y caracterización de dos enzimas, una esterasa y otra proteasa, capaces de degradar poliuretano. ⁽⁷⁶⁾

2.5. Factores que influyen en la hidrólisis enzimática.

La hidrólisis de materiales poliméricos no solubles en medio acuoso mediante la catálisis enzimática es un proceso heterogéneo el cual puede verse afectado por el modo de interacción entre las enzimas y las cadenas poliméricas donde están involucrados principalmente cuatro pasos: (1) difusión de la enzima del seno del medio de solución hacia la superficie sólida, (2) absorción de la enzima en el sustrato, dando como resultado el complejo enzima-sustrato, (3) catálisis de la reacción de hidrólisis, y (4) difusión de la degradación de los productos solubles del sustrato hacia la solución.

La absorción y grado de hidrólisis están afectados por las propiedades fisicoquímicas del sustrato (peso molecular, composición química, cristalinidad, área de superficie), así como también, por las características intrínsecas de la enzima específica (actividad, estabilidad, concentración, composición de aminoácidos, y conformación 3-D). ^(71, 77)

También es muy importante considerar las condiciones del medio como: pH y temperatura, ya que estas influyen tanto en las propiedades de la enzima. Así como también la presencia de estabilizadores, activadores, o inhibidores en el medio, pueden afectar a la actividad enzimática.

La hidrólisis enzimática de los sustratos esta normalmente caracterizada por un punto de saturación enzimática, esto quiere decir, que aunque se incremente la concentración de la enzima a un determinado valor ya no se observará ningún incremento significativo en el grado de biodegradación del material polimérico. Esto se atribuye a una disminución de la exposición de la superficie del sustrato debido a que el sitio catalítico de la enzima se ha saturado, esto limita el progreso de la biodegradación de algunos materiales. Sin embargo, esa conducta no fue observada por Tang *et al.* ^(77, 78), quienes estudiaron el efecto de la concentración de la enzima colesterol esterasa (CE), en el grado de degradación de policarbonatos-poliuretanos (PCNUs). Estos autores encontraron que el grado de degradación de los PCNUs depende en gran medida de la dosis de enzima que se utilice, y que está influenciada dicha degradación por la superficie y estructura química del polímero.

La estructura química de los polímeros (entrecruzamiento, remoción o introducción de grupos en la cadena polimérica) afecta el grado de degradación, ya que según el grado de modificación en la estructura, se puede ver influenciada la capacidad de la enzima a reconocer el sustrato modificado. Este parece ser el caso de la lisozima (enzima responsable de la degradación de peptidoglican quitina y otros derivados) la cual presentó una baja actividad frente a derivados de quitina que presentaban un alto grado de deacetilación o entrecruzamiento. ⁽⁷⁹⁾

Tokiwa *et al.* ⁽⁴⁵⁾ han realizado estudios concernientes a la capacidad hidrolítica de la enzima lipasa frente a poliésteres alifáticos y aromáticos, observando que para el caso de los poliésteres alifáticos que presentan puntos de fusión (T_m) bajos son generalmente más susceptibles a la catálisis enzimática, comparados con aquellos que presentan altos puntos de fusión ($T_m = \Delta H / \Delta S$). Por otro lado, para que un polímero sintético pueda ser degradado por la enzima, este debe de ser lo suficientemente “flexible”, el valor de la temperatura de transición vítrea (T_g) debe ser bajo, y así poder encajar en el sitio activo de ésta. Por consiguiente para poliésteres alifáticos flexibles y cuyo valor de T_m es bajo serán más fáciles de ser degradados por las enzimas tipo lipasas en comparación con los poliésteres con grupos aromáticos, los cuales son más rígidos. ^(52, 71)

$$T_g/T_m = (C-1) / C+1 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$C = (1 + \Delta E / K)^{1/2} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

ΔE = energía de activación (en la interfase núcleo-fusión)

K = parámetro de nucleación el cual está asociado con la energía media (σ) y el calor de fusión (ΔH_m): $K = n\sigma^2 / \Delta H$, $\sigma = (b_o \sigma_e \sigma_u)^{1/2}$, donde n es el modo de nucleación, b_o es el espesor de la capa de crecimiento en la nucleación, σ_e y σ_u son las energías de superficie en la nucleación, final y lateral respectivamente.

Por consiguiente T_m y T_g pueden expresarse en función de C . Ambas temperaturas se pueden ver afectadas por las fuerzas intermoleculares presentes en el material polimérico así como también por la rigidez en la cadena. ^(71, 99)

En cuanto a la relación que existe con la biodegradabilidad y la estructura primaria de poliésteres alifáticos, se acepta que la biodegradación de varios polímeros análogos procede mejor cuando existe un equilibrio de hidrofobicidad-hidrofilicidad en la estructura polimérica. Hang *et al.* ⁽⁷¹⁾ reportaron que los polímeros que contenían en su cadena alcanos dioles un número de carbonos de C_6 a C_8 , son más degradables que aquellos polímeros hidrofóbicos provenientes de alcanos dioles de C_2 a C_4 o aquellos polímeros hidrofílicos con C_{10} a C_{12} . ^(53, 71)

Para el caso de los polímeros PLA y PGA los cuales difieren entre sí en su composición, en donde los grupos metilo del PLA son más hidrofóbicos y proveen impedimento estérico, trae como consecuencia que el PLA sea hidrolíticamente menos lábil y por tanto el PGA se degrade con mayor rapidez que el PLA, (Tabla 2.4). ^(53, 54, 71)

Tabla 2.4 Tiempo de degradación requerido para algunos poliésteres. ⁽⁷¹⁾

Polímero o copolímero ^a	Tiempo aproximado para una biodegradación completa (meses)
PLA	18-24
PLA:PGA (85:15)	5
PLA:PGA (50:50)	2
PLA-Caprolactona (90:10)	2
PGA	2-4

^a PLA= ácido poliláctico, PGA= ácido poliglicólico

2.5.1 Influencia del peso molecular del polímero en la hidrólisis enzimática.

El peso molecular y la distribución del peso molecular tienen un efecto en el grado de biodegradación de los polímeros. Para el caso de los polímeros tipo poliéster, la biodegradabilidad incrementa conforme el peso molecular decrece (Fig. 2.12). Una razón es que los polímeros lineales de bajo peso molecular son más hidrofílicos que sus correspondientes polímeros con altos pesos moleculares, ya que estos tienen una mayor relación de grupos terminales, (incluyendo grupos carboxílicos o grupos hidroxilo), en función de la masa del material. Este incremento de hidrofiliicidad permite una penetración mayor de agua hacia el interior de la matriz polimérica acelerando la degradación. Por otro lado, los polímeros que tienen polidispersidades cercanas a uno y peso molecular pequeño se degradarán en un menor tiempo, comparados con aquellos materiales que tienen pesos moleculares mayores y polidispersidades grandes. ^(53, 54)

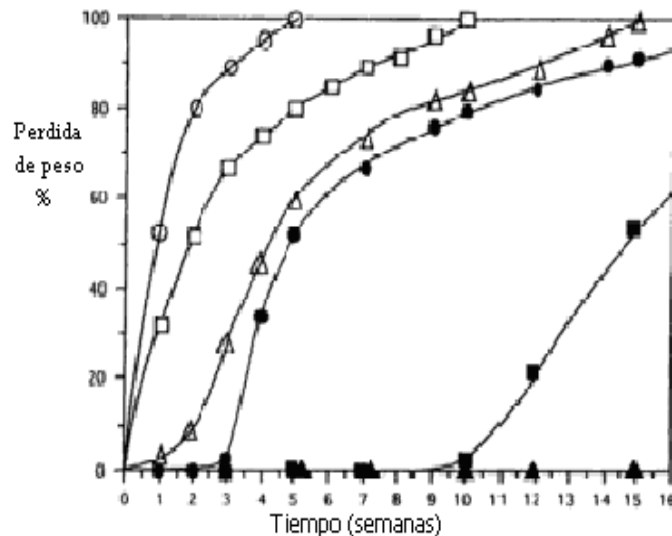


Figura 2.12 Efecto del peso molecular en el grado de biodegradación del polímero PLA (Mn (Da): -○-1400; -□-1600; -△-2000; -●- 4300; -■- 11500; -▲-16900). Experimentos realizados *in vivo*. ⁽⁵⁴⁾

2.5.2 Influencia del grado de cristalinidad en la biodegradación.

La naturaleza semicristalina de algunos polímeros tenderá a limitar la accesibilidad del agua hacia las cadenas poliméricas, por lo tanto, los polímeros amorfos se degradarán más rápido que los semicristalinos. Chu *et al.* ⁽⁷⁹⁾ han propuesto que la degradación de polímeros semicristalinos se lleva a cabo en dos etapas: (1) primero, la degradación ocurre en las regiones amorfas del polímero, iniciándose la hidrólisis de las cadenas poliméricas en dichas regiones. Posteriormente cuando todas las regiones amorfas han sido degradadas, (2) la segunda etapa comienza; en donde la red cristalina será destruida lentamente debido a la existencia de imperfecciones en las regiones cristalinas. Debido a que las regiones cristalinas están altamente compactas, la hidrólisis enzimática será más lenta que en la región amorfa, por lo tanto, un alto porcentaje de cristalinidad en un polímero provoca una degradación lenta del material.

2.5.3 Influencia del valor de la temperatura de transición vítrea del polímero en la biodegradación.

La temperatura de transición vítrea refleja la movilidad de la cadena polimérica, lo cual determina la facilidad con la que pueden penetrar las moléculas del agua mediante difusión y llevarse a cabo la hidrólisis. Si la temperatura de transición vítrea de un polímero es menor que la temperatura de biodegradación (por ejemplo, *in vivo* temperatura del cuerpo), las moléculas individuales poseen mayor movilidad para poder conformarse de tal forma que permitan el ataque químico y/o enzimático, resultando una rápida biodegradación. Por otro lado, si la temperatura de transición vítrea de un polímero es mayor que la temperatura de biodegradación, las moléculas tendrán una menor movilidad resultando una biodegradación más lenta.

En la figura 2.13 se muestran los posibles factores estructurales que influyen en la degradación de polímeros tipo poliéster-poliuretano.

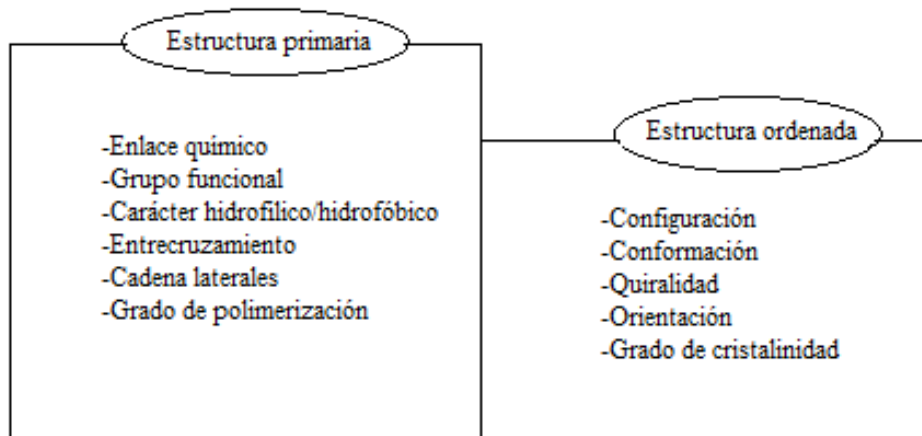


Figura 2.13 Factores de la estructura molecular del material polimérico que influyen en la biodegradación. ⁽⁷¹⁾

2.6 Técnicas de monitoreo de la biodegradación en el material polimérico.

La evaluación de los cambios en los materiales poliméricos se debe de realizar en todas las pruebas que implican degradación. Las principales técnicas empleadas para evaluar el grado de degradación se pueden dividir en dos: A) técnicas para el análisis de la superficie (espectroscopia y microscopía); las cuales se emplean para monitorear los cambios que ocurren en las primeras etapas de degradación, B) técnicas para determinar los cambios en la estructura interna del material como; cambio del peso molecular, pérdida de peso, temperaturas de transición y propiedades mecánicas, dichos cambios se observan en etapas avanzadas de biodegradación. Por lo tanto, la selección del tipo de técnica a emplear debe de estar basada en la etapa en la que se encuentra el proceso de degradación y del tipo de material que se está estudiando. Algunas de las propiedades y técnicas empleadas se describen a continuación.

2.6.1 Cambios en la superficie.

2.6.1.1 Observación visual.

La evaluación de los cambios visibles en los polímeros se realiza en casi todas las pruebas *in vitro*. Los efectos que pueden observarse en la superficie del material son: formación de agujeros o grietas, fragmentación, cambio de color o la formación de biofilms en la superficie. Estos cambios no demuestran la presencia de un proceso de biodegradación en condiciones de metabolismo, pero se pueden utilizar como una primera indicación de cualquier ataque microbiano. Para obtener información sobre el mecanismo de degradación, se emplean técnicas más sofisticadas como son la microscopía electrónica de barrido (SEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM).⁽⁸⁰⁾

2.6.1.2 Superficie del material.

La superficie del material antes y después de ser biodegradado puede ser analizada por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). La técnica mediante XPS puede dar información acerca de la composición elemental y química de los grupos que constituyen al material en la superficie (los primeros 10 nm de superficie).^(79, 80)

2.6.2 Absorción de agua y pérdida de peso.

Los principales factores que influyen en la permeabilidad de los polímeros están relacionados con el grado de cristalinidad, composición y medio acuoso. Marois *et al.*⁽⁹⁶⁾ encontraron diferencias entre películas de poli (octanoato de hidroxilo), (PHO), referente a la absorción de agua y en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Observaron que la incubación en dicha solución permitía una menor absorción de agua que cuando se incubaron únicamente en presencia de agua, dichas diferencias se atribuyeron al fenómeno osmótico y a la fuerza iónica del PBS. La medición de la cantidad de agua absorbida es un indicador de la naturaleza de hidrofiliidad/hidrofobicidad del material, así como la tendencia a ser degradados.^(71, 96)

Los valores de absorción de agua son obtenidos después de haber alcanzado el equilibrio de los materiales en la solución. En algunos casos, el equilibrio no puede alcanzarse ya que los materiales se degradan al mismo tiempo. En este caso, el nivel de agua absorbido se incrementa con el tiempo de la degradación debido a un incremento en la permeabilidad de los materiales (una estructura porosa normalmente es obtenida como resultado de la liberación de los productos de biodegradación).^(71, 79)

Durante la degradación, la masa del material puede variar, y estos cambios pueden ser monitoreados al comparar la masa inicial y final durante el período de prueba. El material debe de estar seco a peso constante para evitar humedad en la muestra. La temperatura de secado no debe de exceder la temperatura a la cual presente cambios irreversibles (ejemplo temperatura de fusión). Después de las pruebas de biodegradación las muestras deben lavarse con agua desionizada o destilada para remover trazas productos, enzimas, sales u otras impurezas y finalmente colocarlas para su secado a vacío y pesarlas.⁽⁷⁹⁾

2.6.3 Peso molecular.

La determinación del peso molecular peso promedio (M_w) durante el proceso de biodegradación es uno de los análisis más importantes que se realizan. La evolución del M_w durante dicho proceso puede ser determinado mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) o por técnicas de viscosimetría. El principal parámetro antes de ser biodegradado el material es la determinación del peso molecular promedio así como la polidispersidad ($PDI = M_w/M_n$) y así comparar dichos valores con los obtenidos una vez concluidos los experimentos.

2.6.3.1 Cambios en las propiedades mecánicas y peso molecular.

Al igual que con las observaciones visuales, los cambios en las propiedades mecánicas de los materiales no se pueden utilizar para probar directamente la biodegradación en los materiales. Sin embargo, los cambios en las propiedades mecánicas se observan a menudo cuando pequeños cambios en el peso molecular se llevan a cabo. Propiedades como resistencia a la tracción son muy sensibles a los cambios en el peso molecular de los polímeros, que también es a menudo un indicador de la degradación.⁽⁸¹⁾

2.6.4 Cristalinidad del polímero.

En polímeros semicristalinos, un incremento en la cristalinidad del polímero se ha observado frecuentemente durante las primeras etapas de biodegradación, y esto se ha relacionado con los efectos del plastificante que absorbe agua permitiendo ciertos movimientos en la cadena polimérica, lo que provoca un reordenamiento hacia una red cristalina. Por otro lado, la hidrólisis inicial se lleva a cabo en las regiones amorfas debido a que son más accesibles para que penetre el agua y enzimas, permitiendo esto que sea mayor el porcentaje de la región cristalina. Posteriormente en etapas avanzadas de la biodegradación ocurre el rompimiento de la cadena en las zonas cristalinas y finalmente se observa un decremento de la región cristalina del polímero.⁽⁸²⁾

Los cambios en la cristalinidad de los polímeros puede ser medida mediante técnicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) o mediante difracción de rayos X en ángulo alto o bajo (WAXD). El análisis de cristalinidad mediante DSC está basado en los valores registrados de temperatura de fusión (T_m) y temperatura de cristalización (T_c) debida a transiciones en donde se registra el valor de ΔH de fusión o cristalización.

2.6.5 Aislamiento e identificación de productos de biodegradación.

El análisis y cuantificación de los productos liberados hacia el medio de incubación (medio basal), provee información acerca del modo de acción de la enzima en el polímero permitiendo deducir cuales son los enlaces más susceptibles a la biodegradación. Las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas (MS) han sido las más empleadas en el aislamiento e identificación de los productos de biodegradación de poliuretanos mediante la acción de la enzima colesterol esterasa.⁽⁸³⁾

Por otro lado, es importante conocer el tipo de productos de degradación, ya que estos podrían interferir con el curso de la degradación así como en el equilibrio de reacciones de biodegradación. La liberación y acumulación de algunos productos pueden acelerar el grado de degradación de materiales poliméricos, por ejemplo, la liberación de grupos terminales carboxílicos formados por el rompimiento de las cadenas de poliésteres alifáticos durante la hidrólisis de enlaces éster, pueden producir un decremento en el pH y posteriormente catalizar la hidrólisis de otros enlaces éster, autocatálisis. Además, podría ocurrir la inhibición de la catálisis enzimática, por ejemplo, se sabe que la hidrólisis de productos como maltosas inhibe la actividad de la enzima amilasa.

Los productos de biodegradación (metabolitos) en el medio de cultivo, por tanto, dependen; del material a biodegradar, de la etapa en la que se encuentra el proceso, así como de las soluciones empleadas en los estudios de biodegradación. El medio en el que se hacen las pruebas de biodegradación puede ser analizado mediante técnicas apropiadas como es la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia UV visible, resonancia magnética nuclear (NMR), así como espectrometría de masas (MS), dichas técnicas permitirán identificar los principales productos de biodegradación.⁽⁵⁴⁾ Es necesario, antes de llevar a cabo el análisis, tener técnicas adecuadas de extracción y remoción de las proteínas, enzimas o sales que pudieran estar presentes en las alícuotas a analizar, ya que podrían interferir con la identificación y cuantificación de los productos.^(39, 79)

2.6.6 Otras técnicas de análisis.

Existen otros métodos o técnicas de análisis para monitorear los procesos de biodegradación, especialmente para la degradación donde se involucran enzimas para llevar a cabo la depolimerización, estos son:

- Medición de la cantidad de carbono disuelto en el medio, utilizando la técnica de carbono orgánico disuelto (DOC).⁽⁸⁴⁾

- Disminución de la densidad óptica de las pequeñas partículas de polímero dispersas en el agua. ⁽⁸⁵⁾
- Análisis de la disminución en el tamaño de las partículas de polímero utilizando la técnica de dispersión de luz. ⁽⁸⁶⁾
- Determinación mediante titulación de ácidos libres formados por escisión enzimática en el poliéster. ^(87, 90)

2.7 Técnicas de caracterización de materiales poliméricos.

Existen diversas técnicas de caracterización de materiales poliméricos. Dependiendo de la técnica utilizada se puede conocer: la composición química, estructura, morfología, así como también, sus propiedades mecánicas o magnéticas del material. ⁽⁴⁾ En el presente trabajo la caracterización de los materiales sintetizados se realizó para determinar la composición química y estructura molecular, así como sus propiedades físicas en función de la temperatura. Las técnicas utilizadas fueron: espectroscopia de infrarrojo (IR), cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), cromatografía de permeación en gel (GPC), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

2.7.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración. ⁽⁵⁾

La cromatografía de gases acoplado a masas provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes de una mezcla o material. Cada componente de una muestra suministra tres unidades de información en el cromatograma: posición, altura y anchura de los picos. La posición suministra información cualitativa (está en función del tiempo de retención), la anchura y altura del pico nos proporcionan información cuantitativa. En este proceso, el espectrómetro de masas registra la corriente iónica total generada por todos los iones dando lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado, observándose en el espectro al ion molecular (M^+). ^(4, 5)

2.7.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC).

Cuando se trata con materiales poliméricos no es posible hablar de un peso molecular único, sino de una distribución de pesos moleculares. Normalmente se habla de un peso molecular promedio y se describe la distribución de pesos moleculares alrededor del promedio.

El principio de la técnica de GPC consiste en hacer pasar una solución que contiene el polímero de interés a través de una columna empacada con material poroso. Debido a la difusión, el polímero intenta entrar en los poros del material del empaque, pero sólo las moléculas de menor tamaño pueden entrar en los poros. De esta manera, las moléculas grandes viajan rápidamente a través del volumen libre, mientras que las moléculas pequeñas viajan a través del material de empaque poroso, deteniéndose a lo largo de la columna por lo que la abandonan más tarde que las moléculas grandes.⁽⁵⁾

La cromatografía de permeación en gel no es un método absoluto, ya que no se mide la masa, sino el volumen hidrodinámico de las moléculas del polímero, es decir cuánto espacio ocupa una molécula cuando se encuentra en solución en un determinado solvente. Para relacionar el volumen hidrodinámico de una muestra de polímero con su peso molecular, es necesaria la construcción de una curva de calibración con estándares de peso molecular conocido y distribución.

2.7.3 Espectroscopia de infrarrojo (IR).

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinados por la energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibracional asociado.

Los requisitos previos para que ocurra una absorción infrarroja son que la frecuencia de la radiación debe ser igual a la frecuencia de vibración de enlace entre 2 átomos de la molécula y que el momento dipolar de la molécula debe sufrir un cambio cuando tiene lugar esta vibración molecular. Si se reúnen estas condiciones, entonces la molécula absorberá la energía del haz infrarrojo que la atraviesa. Así, la frecuencia de las vibraciones está asociada con un tipo en particular de enlace.^(4, 10)

En lo que respecta a la interpretación de un espectro obtenido mediante IR, en la región correspondiente al intervalo de 1450 a 600 cm^{-1} se observan modelos únicos para cada compuesto por lo que se le conoce como región de huella digital. La región de bandas de absorción que se observan entre 4000 y 1450 cm^{-1} se debe normalmente a las vibraciones por estiramiento de unidades biatómicas y por ello se conoce como región de frecuencias de grupo.⁽¹⁰⁾

2.7.4 Técnicas de análisis térmico.

El análisis térmico se refiere a una variedad de técnicas mediante las cuales las propiedades físicas de un material pueden medirse en función de la temperatura.⁽¹⁹⁾ Las técnicas de análisis térmico más empleadas son:

- Análisis termogravimétrico (TGA de sus siglas en inglés Thermal Gravimetric Analysis).
- Análisis térmico diferencial (DTA de sus siglas en inglés Differential Thermal Analysis)
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC de sus siglas en inglés Differential Scanning Calorimetry).
- Análisis mecánico dinámico (DMA de sus siglas en inglés Dynamic Mechanical Analysis).
- Análisis térmico –mecánico (TMA de sus siglas en inglés Thermo Mechanical Analysis).

En el presente trabajo se emplearon únicamente las técnicas DSC y TGA.

2.7.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Mediante esta técnica se mide la entalpía del material en función de la temperatura, es decir, se observa una diferencia en el flujo de calor de la muestra con respecto a una referencia; y es monitoreado dicho flujo en función de la temperatura o tiempo, siendo la muestra sometida a una temperatura controlada. Gracias a esta técnica se pueden determinar las llamadas *transiciones térmicas* en un polímero (que son cambios que tienen lugar en cuando se calienta dicho material), las cuales pueden ser de: transición vítrea, de fusión y de cristalización, así como también se puede determinar, pureza de la muestra, estabilidad térmica y grado de cristalinidad (χ_c), (Fig. 2.13) , para este caso se hace una estimación a partir de la información obtenida en la calorimetría. Este parámetro se evalúa usando como referencia el calor de fusión de un material de cristalinidad conocida. Si se acepta que la fusión del material se debe únicamente a las zonas cristalinas, el grado de cristalinidad puede expresarse como el cociente del calor de la fusión de la muestra, ΔH_f , respecto al calor de fusión del material si fuera totalmente cristalino, ΔH_{fc} .
(29, 82)

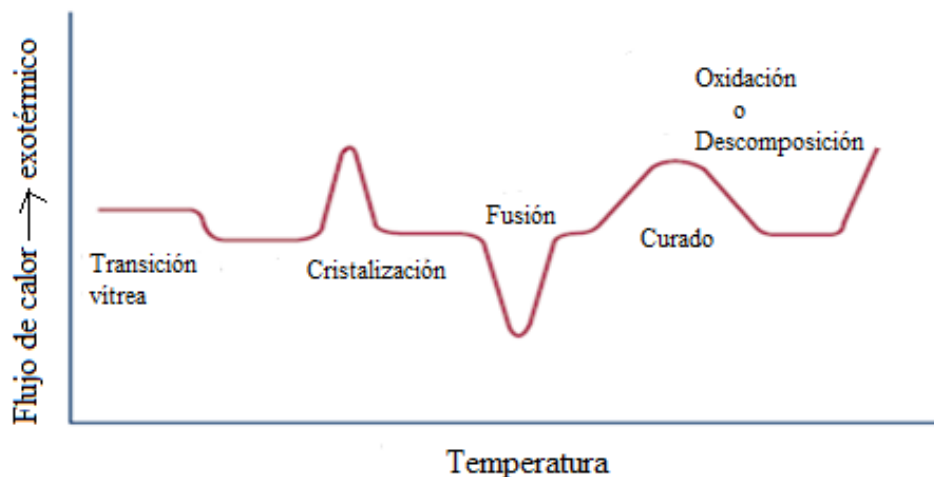


Figura 2.14 Termograma de las principales transiciones que pueden observarse mediante DSC. (82)

2.7.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA).

El TGA, mide el porcentaje y la velocidad de cambio en el peso de un material en función de la temperatura o el tiempo, en una atmósfera controlada. Dicha técnica permite caracterizar materiales que presenten pérdida o ganancia de peso debido a alguna descomposición, oxidación o deshidratación.⁽⁵⁾

Los experimentos pueden realizarse midiendo el cambio de peso de la muestra al aumentar la temperatura a una velocidad constante (análisis dinámico), o bien manteniendo constante la temperatura y midiendo los cambios que ocurren a lo largo del tiempo (análisis isotérmico). También es posible medir el gradiente de la variación de peso con la temperatura o el tiempo, lo que constituye un análisis termogravimétrico diferencial (DTG).

Dentro de los estudios más importantes que pueden llevarse a cabo mediante el análisis termogravimétrico se puede citar: control de calidad, efectos de aditivos, estabilidad térmica en atmósfera inerte, oxidación en aire o en atmósfera rica en oxígeno, degradación térmica, estudio de la cinética de degradación, análisis de los productos producidos, etc.^(5, 18)

2.8 Aislamiento de la cepa *Alicyclophilus sp.*⁽¹⁵⁾

El aislamiento de la cepa *Alicyclophilus sp.* fue realizado por el equipo de trabajo encabezado por la Dra. Herminia Loza Tavera del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM, Conjunto E, Laboratorio 105.^(15, 93)

La cepa bacteriana se obtuvo de muestras de poliuretano en proceso de deterioro, encontrados en el suelo así como en mobiliario, en varias zonas del basurero municipal de Nezahualcóyotl, Estado de México. Las muestras fueron obtenidas en invierno y la temperatura promedio de la zona no superaba los 20 °C. Las muestras se inocularon el mismo día de la colecta. Para el aislamiento, las muestras se incubaron en medio basal con poliuretano hidrosoluble Hydroform®, el cual ha sido empleado exitosamente en el aislamiento de bacterias afines al poliuretano por el grupo de Howard y colaboradores.⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾ Las cepas presentaron crecimiento en MM con PUR. Sin embargo, la determinación de las curvas de crecimiento, midiendo densidad óptica a 660 nm, mostró que las cepas de mayor crecimiento fueron las denominadas BQ1 y BQ8. Siendo la cepa BQ1 (*Alicyclophilus sp.*) la que es de interés para el desarrollo de este trabajo experimental.⁽⁹³⁾

2.8.1 Actividad enzimática asociada a la cepa *Alicyclophilus sp.* (BQ1).

Las pruebas realizadas en el Laboratorio 105 del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM, Conjunto E, a la cepa BQ1 muestran que no hay presencia de actividades enzimáticas tipo proteasas y ureasas. Por otro lado, se observó que la actividad presente en el sobrenadante de los cultivos con MM más Hydroform® con las bacterias, presentó una actividad esterasa, la cual pudiera ser la responsable de la degradación, ya que no se detectó ninguna otra actividad.⁽⁹³⁾

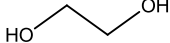
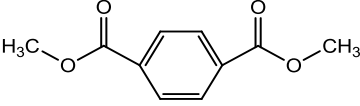
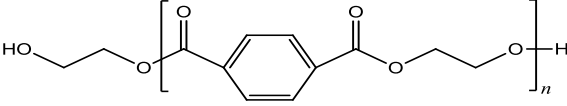
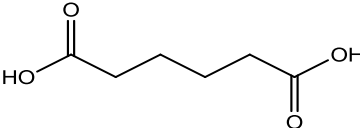
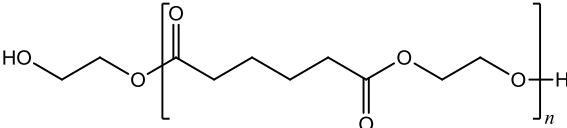
Capítulo 3

Metodología experimental

3.1 Síntesis y caracterización de oligomeros de poliéster.

Se sintetizaron dos oligomeros de poliéster, de los cuales, el primero se obtuvo a partir de tereftalato de dimetilo (DMT de sus siglas en inglés Dimethyl terephthalate), y monoetilenglicol (MEG) y el segundo, se obtuvo a partir de ácido adípico (AAD) y monoetilenglicol (MEG). En la tabla 3.1 se presentan los compuestos sintetizados a partir de dichas materias primas.

Tabla 3.1 Oligomeros de poliéster sintetizados.

Diol	Fuente de ácido carboxílico	Producto
 MEG	 DMT	 BHET ^a
	 AAD	 BHEA ^a

^a si $n=1$

3.1.1 Síntesis de tereftalato de bis-(2-hidroxietileno), (BHET).

Se preparó un oligomero de poliéster a partir de tereftalato de dimetilo (DMT), y monoetilenglicol (MEG), mediante la transesterificación debida a la adición del catalizador titanato de terbutilo, (TBT de sus siglas en inglés terbutyl titanate), formando como producto al tereftalato de bis-(2- hidroxietileno), (BHET, de sus siglas en inglés bis-2-hydroxyethylene terephthalate). Posteriormente se llevó a cabo la eliminación del metanol al aumentar la temperatura de reacción (240-250°C).

En la síntesis de dicho oligomero se pretende obtener un peso molecular bajo y para esto se llevó a cabo la reacción en proporción estequiométrica 1:2 de DMT-MEG respectivamente.

3.1.1.1 Metodología.

1. Se pesó 0.5 mol (97 g) de DMT previamente purificado y se colocó en un matraz de tres bocas, equipado con agitación magnética, termómetro, condensador y pipeta para nitrógeno, ver figura 3.1.
2. Se adicionó 1 mol (61.44 mL) de MEG al reactor manteniendo la relación COO-/OH 1:2.
3. Se colocó el matraz en una mantilla de calentamiento y se inició el flujo de nitrógeno para mantener una atmósfera inerte. Se comenzó la agitación de los reactivos durante 15 minutos aproximadamente.
4. Se inició el calentamiento de la mezcla con agitación constante hasta llegar a la temperatura de 110°C. La temperatura se elevó paulatinamente para evitar la sublimación del DMT. Al alcanzar dicha temperatura se adicionó 0.5% en peso en relación al DMT del catalizador TBT.
- 5.-Se incrementó la temperatura hasta alcanzar 160°C, para iniciar la separación de metanol. Después de 1hr, el metanol dejó de destilar, la temperatura alcanzó un valor de 240° C.
- 6.-Se mantuvo la temperatura a 240-250°C durante 10 min. Pasado este tiempo se dejó enfriar el producto hasta 70°C y se trasvasó.
- 7.- Se dejó enfriar a temperatura ambiente para su posterior caracterización.

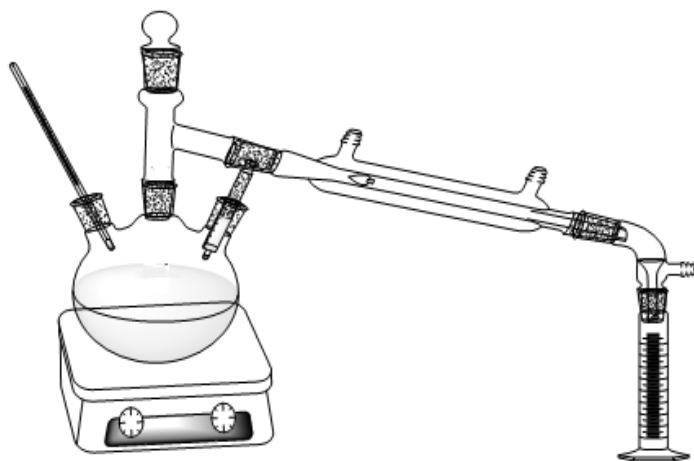


Figura 3.1 Esquema del equipo empleado para la síntesis de oligómero de poliéster.

3.1.2 Síntesis de adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHEA).

Se preparó un oligomero de poliéster a partir de ácido adípico (AAD), y monoetilenglicol (MEG), formando como producto al adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHEA, de sus siglas en inglés bis-2-hydroxyethylene adipate), mediante la esterificación debido a la presencia del catalizador Tegokat 256 (mono-n-butyl estaño).

Se buscó obtener un oligomero lineal de bajo peso molecular, con dos moléculas de glicol unidas a una de ácido adípico, por lo tanto la reacción se propuso con una estequiometría de 1:2 de ácido adípico- monoetilenglicol respectivamente.

3.1.2.1 Metodología.

1. Se pesó 0.5 mol (73 g) de AAD y se colocaron en un matraz tres bocas, equipado con agitación magnética, termómetro, condensador y pipeta para nitrógeno, ver figura 3.1.
2. Se adicionó 1mol (56.3 mL) de MEG al reactor. Posteriormente se cargó al reactor 0.1% en peso con respecto al ácido adípico del catalizador Tegokat 256.
3. Se colocó el matraz en una mantilla de calentamiento y se inició el flujo de nitrógeno, para mantener una atmósfera inerte. Se inicia la agitación permitiendo que se mezclen los reactivos durante 15 minutos aproximadamente.
4. Se inició lentamente el calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 140°C y se va incrementando hasta observar que el agua se desprende durante la reacción.
5. Después de 1hr se observó la ausencia de goteo de agua (el rango de la temperatura fue de 190-220°C).
7. Se dejó enfriar el producto hasta 70°C y se trasvasó.
8. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para su posterior caracterización.

3.1.3 Caracterización de tereftalato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHET) y adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHEA).

3.1.3.1 Determinación del número de grupos hidroxilo (-OH) en los oligomeros de poliéster.

Las técnicas para determinar grupos hidroxilo están basadas en hacer reaccionar a los grupos hidroxilo presentes en la muestra a analizar, con anhídrido acético, para formar ésteres; las técnicas determinan los grupos anhídrido hidrolizados, ácidos carboxílicos remanentes, los cuales se hacen reaccionar con una base fuerte como el hidróxido de sodio, además se emplea como disolvente piridina, para favorecer la reacción del grupo anhídrido, hidrolizándolo y acelerando la reacción del ácido carboxílico con los grupos hidroxilo de la muestra; adicionalmente la piridina se comporta como una base débil por lo que es posible titular los ácidos carboxílicos con una base fuerte sin interferencia de ésta.

En el análisis de los grupos hidroxilo, se utilizó una técnica no catalizada, empleando anhídrido acético y piridina en solución en proporción 1:3. Para titular los ácidos carboxílicos resultante, se utilizó una solución 0.1 N de NaOH.

3.1.3.2 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.

La estimación de peso molecular promedio para los compuestos sintetizados se realiza a partir de una curva de calibración con estándares de poliestireno de pesos moleculares entre 160 y 580 Da, los cuales se disolvieron en tetrahidrofurano (THF) a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se inyectó un volumen de $10 \mu\text{L}$ al equipo Waters 2695 con una columna HP PLgel 5μ y 500 \AA de porosidad para la separación de pesos moleculares menores a 20000 Da. La temperatura de la columna fue de 40°C y el eluyente empleado fue THF a un flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para la determinación de la viscosidad se empleó el equipo Viscotek 270. El detector de índice de refracción fue el equipo Waters 2424, ambos acoplados al equipo de permeación en gel.

3.1.3.3 Caracterización de la estructura de los oligómeros de poliéster mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).

El análisis de los oligómeros de poliéster se llevó a cabo con la finalidad de identificar los grupos funcionales presentes en dichos compuestos. Los grupos OH terminales que se esperan, deberán aparecer en la región de $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ y los grupos éster $\text{R-COO-R}'$, deberán aparecer en la región de 1750 a 1710 cm^{-1} . Par el grupo carbonilo C=O alifático, en el caso de los polioles a partir de ácido adípico, será de 1730 a 1715 cm^{-1} , par el grupo C=O del éster aromático, deberán aparecer entre 1330 a 1050 cm^{-1} .

Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo FTIR 1605 Perkin Elmer en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} de infrarrojo medio, con 4 cm^{-1} de resolución.

3.2 Caracterización del diisocianato (MDI).

3.2.1 Determinación de grupos isocianato en el MDI mediante titulación.

El parámetro más importante para la síntesis de compuestos de uretano, es conocer la concentración de isocianato presente por gramo de muestra del material

El método utilizado en el presente trabajo para determinar grupos isocianato es el de “equivalentes de amina”, que como su nombre lo indica se basa en la reacción del grupo $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ con una amina. El método consiste en disolver una cantidad conocida del isocianato o polímero conteniendo grupos isocianato en un disolvente adecuado, lo que permite una reacción en solución del isocianato con una amina en exceso a concentración estandarizada, tal como dibutilamina 1 N. La amina que no reacciona se titula con una solución estándar 0.1 N de ácido clorhídrico. La amina consumida por la reacción con el isocianato se puede calcular como porcentaje de $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ en la muestra y como equivalentes de isocianato en peso. ⁽⁵⁶⁾

La determinación se realizó mediante la disolución de una muestra en THF, para ser titulada con una solución 1 N de n-butilamina en THF y se tituló con una solución de ácido sulfúrico 0.1 N. ^(98, 99)

3.2.2 Caracterización del MDI por IR y GC-MS.

Se empleó el infrarrojo (IR), para observar las bandas de absorbancia de los grupos funcionales presentes. En el caso del diisocianato las bandas esperadas más importantes son las del grupo funcional isocianato $-N=C=O$ alrededor de 2280 a 2230 cm^{-1} debida al estiramiento asimétrico y 1450 a 1380 cm^{-1} para el estiramiento simétrico.

Para determinar cualitativamente las características de composición del diisocianato utilizado para la elaboración de los uretanos, se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973. Las pruebas se realizaron disolviendo 1 mg de muestra en 5 mL de tolueno; la muestra se inyectó al cromatógrafo en una rampa de temperatura desde 50 hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 45 minutos con helio como fase móvil.

3.3 Síntesis y caracterización de los compuestos de uretano.

Una vez caracterizado el diisocianato se hizo reaccionar con los oligómeros de poliéster previamente sintetizados. Las reacciones se llevaron a cabo en masa, utilizando como catalizador N, N-dimetiletanolamina (DMEA) al 0.5% en peso con respecto al reactivo limitante.

La tabla 2.3 presenta un resumen de las reacciones que se llevaron a cabo, mostrando las estructuras idealizadas de los compuestos de uretano propuestos para ser biodegradados.

3.3.1 Compuestos de uretano a partir de oligómeros de poliéster sintetizados.

Se sintetizaron cuatro compuestos de uretano, de los cuales, dos compuestos se obtuvieron a partir del tereftalato bis-(2-hidroxi-etileno), (BHET) el cual se hizo reaccionar con 4,4'-difeníl diisocianato de metileno (MDI), en relación estequiométrica NCO/OH 1:2 y NCO/OH 2:1. Los dos compuestos de uretano restantes se obtuvieron a partir del adipato de bis-(2-hidroxi-etileno), (BHEA) el cual se hizo reaccionar con MDI en relación estequiométrica NCO/OH 1:2 y NCO/OH 2:1, (Tabla 3.3). Las formulaciones utilizadas para los uretanos se resumen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Composición para la síntesis de compuestos de uretano a biodegradar.

Materia prima	Relación estequiométrica NCO/OH 2:1	Relación estequiométrica NCO/OH 1:2
BHET	10.000	10.000
MDI	19.708	4.927
Catalizador*	0.050	0.0246

Tabla 3.2 continuación.

Materia prima	Masa (g)	Masa(g)
	Relación estequiométrica NCO/OH 2:1	Relación estequiométrica NCO/OH 1:2
BHEA	10.000	10.000
MDI	21.393	5.348
Catalizador*	0.050	0.0267

*Peso del catalizador N,N-dimetilanolamina (DMEA) calculado con respecto al reactivo limitante.

3.3.1.1 Metodología.

1. Se llevó a cabo cada una de las reacciones en masa en recipientes de plástico donde se pesó el oligomero de poliéster correspondiente, el cual fue previamente secado a vacío por 24 horas.
2. Se adicionó el diisocianato y se mezcló por 10 minutos a 30 rpm.
3. Se adicionó 0.5% en peso del catalizador DMEA con respecto al reactivo limitante y se agito la mezcla durante 20 min a 30rpm. Pasado este tiempo se dejó en reposo el material durante 12 horas.
4. Se retiro el material del recipiente y se caracterizó.

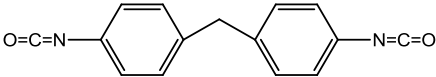
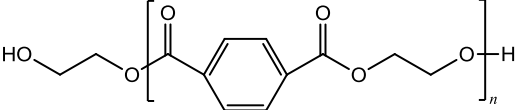
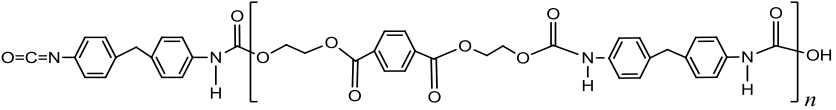
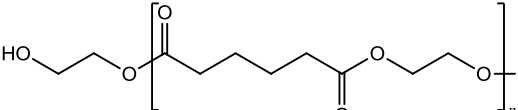
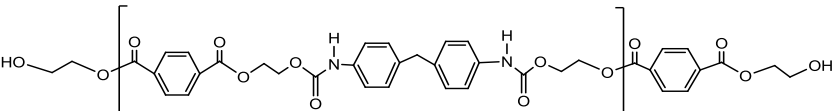
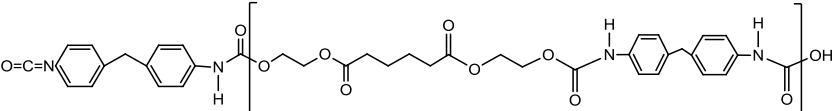
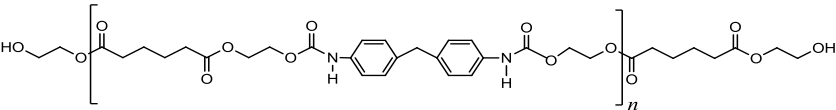
3.3.2 Determinación del peso molecular promedio de los compuestos de uretano mediante GPC.

Para la obtención de los pesos moleculares promedio, se empleó la técnica de cromatografía de permeación en gel GPC y se hizo uso de una curva de calibración de estándares de poliestireno de pesos moleculares del rango de 106 a 21,000 Da utilizando la columna HP PL gel 5 μ y 500 Å a 40 °C, con THF como eluyente a un flujo de 1 mL.min⁻¹. Se inyectó un volumen de 10 μ L al equipo Waters 2695. Para la determinación de la viscosidad se empleó el equipo Viscotek 270 y el detector de índice de refracción fue el equipo Waters 2424 ambos acoplados al equipo de permeación en gel.

3.3.3 Determinación de la estructura de los compuestos de uretano por IR.

Se utilizó espectroscopia de infrarrojo (IR) para determinar la presencia de los grupos funcionales en los compuestos de uretano sintetizados, siendo uno de los grupos más importante para nuestro estudio la señal correspondiente al grupo uretano cuyas bandas, aparecen en el rango de los 1750 a 1680 cm⁻¹ debido al enlace C=O; una señal débil en el rango de 1050 a 850 cm⁻¹ para el enlace N-H; una señal mediana para la deformación en el rango de 1650 a 1500 cm⁻¹ y otra señal también mediana para el estiramiento, en el rango de 3500 y 3250 cm⁻¹; adicionalmente, se esperan las señales debidas al grupo éster de los oligomeros de poliéster ya descritas en la sección 3.1.3.3, así como la señal del grupo isocianato presente en la región de 2270 cm⁻¹, para el caso de los oligomeros sintetizados con una relación 2:1 de NCO /OH respectivamente.

Tabla 3.3 Resumen de reacciones de síntesis de compuestos de uretano. ^a

Diisocianato	Oligomeros de poliéster	Compuesto de uretano propuesto ^b
 <p style="text-align: center;">MDI</p>	 <p style="text-align: center;">BHET</p>	 <p style="text-align: center;">BHET-MDI (NCO/OH 2:1)</p>
	 <p style="text-align: center;">BHEA</p>	 <p style="text-align: center;">BHET-MDI (NCO/OH 1:2)</p>
 <p style="text-align: center;">BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)</p>		
		 <p style="text-align: center;">BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)</p>

^a En la figura 3.2 se muestran los posibles subproductos obtenidos durante la síntesis de los compuestos de uretano.

^b compuesto de uretano idealizado, suponiendo $n=1$ para BHET y BHEA.

3.4 Pruebas de biodegradación.

Se prepararon dos medios de cultivo de Medio Mínimo (MM), ver apéndice A, por cada compuesto de uretano sintetizado, conteniendo uno de los dos cultivos a la cepa *Alicyclophilus sp.* y el segundo cultivo no se inoculó, esto con el fin de estudiar la influencia de la actividad enzimática de la cepa bacteriana vs. la influencia de la hidrólisis química debida únicamente al MM que contiene al uretano sintetizado, con el propósito de determinar si la cepa bacteriana es capaz de crecer en un medio cuya fuente de carbono fuera alguno de los materiales sintetizados. Se realizaron tres replicas de cada prueba de biodegradación.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano mediante la técnica de cuenta en placa en LB sólido, determinando los microorganismos/mL en tiempos específicos.

La presencia de los metabolitos se monitoreó a distintos tiempos de incubación mediante la toma de alícuotas en el sobrenadante, realizando filtración, centrifugación y extracción con disolventes orgánicos. La caracterización de los posibles metabolitos presentes en el medio acuoso se realizó mediante GC-MS.^(16, 67)

3.4.1 Preparación de medios de cultivo.

3.4.1.1 Preparación del medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido y sólido.

El medio LB es un medio de cultivo el cual contiene extracto de levadura y peptona como fuentes de carbono y nitrógeno, haciéndolo un medio rico en carbono y nitrógeno de fácil disponibilidad para las bacterias. Al ser un medio no selectivo, permite el crecimiento de cualquier tipo de hongos y bacterias, por lo que este medio se utiliza para cuantificar las bacterias capaces de formar una colonia en una placa de LB sólido en 24 h. La cepa bacteriana empleada crece después de 48 h en LB sólido, lo que permite identificar si es la cepa que se requiere, ya que en caso de tener contaminación debida a la presencia de otros microorganismos estos crecerían antes de las 48 horas. Ver apéndice A para su formulación.

3.4.1.2 Preparación del MM.

El MM, consiste en una disolución acuosa formada a partir de tres disoluciones; A, B y C. La disolución A esta formada por: KH_2PO_4 y K_2HPO_4 disueltos en agua estéril. La disolución B por NH_4NO_3 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua estéril y la disolución C denominada elementos traza por: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua estéril, obteniendo finalmente un medio con un pH cercano a 7 y condiciones isotónicas. El MM no incluye una fuente de carbono, por lo que funciona como fuente de sales minerales, siendo el nitrato de amonio la fuente de nitrógeno en el cultivo. Ver apéndice A para su formulación.

3.4.1.3 Preparación del medio mínimo con poliuretano (MM-PUR).

El MM-PUR se prepara a partir de Hydroform® y medio mínimo MM.

El Hydroform® es un barniz poliuretano marca comercial base agua el cual presenta las siguientes características:

- Poliuretano alifático de un componente, cuyo solvente es agua desmineralizada.
- Acabado transparente.
- Secada al tacto en 20 minutos y gelado en 2 horas.
- Contenido de sólidos, 30% +/- 1.
- Viscosidad, 60-100 cps.
- Densidad, 1.04-1.06 g. cm⁻³.

A partir del Hydroform® al 30% se preparó una solución al 3%, empleando como disolvente agua destilada, haciendo pasar la disolución a través de un filtro en condiciones asépticas. Una vez filtrada dicha solución se preparó el MM-PUR, adicionando a un matraz el MM y la solución de Hydroform® al 3% para así obtener finalmente un contenido de sólidos al 0.3%. Ver apéndice A para su formulación.

3.4.2 Preparación de glicerol.

Los glicerol permiten mantener un stock de la cepa bacteriana y así ser utilizados durante las pruebas de biodegradación, ya que dichas pruebas, se hacen por triplicado y por períodos de observación mayor a 1 semana, por lo que se requieren mantener congeladas las células bacterianas para que no alcancen su fase exponencial máxima de crecimiento, si es que se mantuvieran en un medio rico en carbono como es el LB, para esto se congelan en glicerol en presencia del medio mínimo, ver figura 3.3.

3.4.2.1 Metodología.

Mediante un glicerol el cual contenía a la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*, perteneciente al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de plantas de la Facultad de Química C.U., se duplicó dicha cepa para poder mantener las mismas condiciones experimentales durante el desarrollo experimental de biodegradación de los compuestos de uretano.

Se requirió descongelar un glicerol el cual estaba a una temperatura de -70°C. Una vez descongelado se tomó una alícuota de 50 µL y se plaqueó en LB sólido contenido en caja petri. Posteriormente se introdujo la caja petri en la incubadora a 37°C durante 48 h. Una vez pasado este tiempo se observaron las colonias formadas y aisladas.

A partir de una colonia aislada se inoculó un tubo de ensayo el cual contenía LB líquido y se introdujo en la incubadora durante 12 h, esto con el objeto de reproducir y alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento de la cepa bacteriana. Pasado este tiempo se determinó la densidad óptica a 660 nm mediante el espectrofotómetro UV/visible Ultrospec 2000 y se calculó el volumen de alícuota para re inocular nuevamente en LB líquido y llevarlo a incubación durante 6 h.

Pasado este tiempo se determinó la densidad óptica a 660 nm para conocer el volumen de alícuota que se requería para inocular 500 μL de MM-PUR, el cual es el medio de cultivo que contiene a los nutrientes necesarios para la supervivencia de la cepa, incluyendo carbono el cual es obtenido del Hydroform®.

Una vez inoculado el matraz que contenía al MM-PUR (MM + Hydroform®) se sometió a incubación durante 17 h, pasado este tiempo se tomaron alícuotas de 700 μL y se colocaron en tubos Eppendorf los cuales contenían 300 μL de glicerol, finalmente se congelaron con nitrógeno líquido para mantenerlos en el congelador a -70°C . Ver figura 3.3.

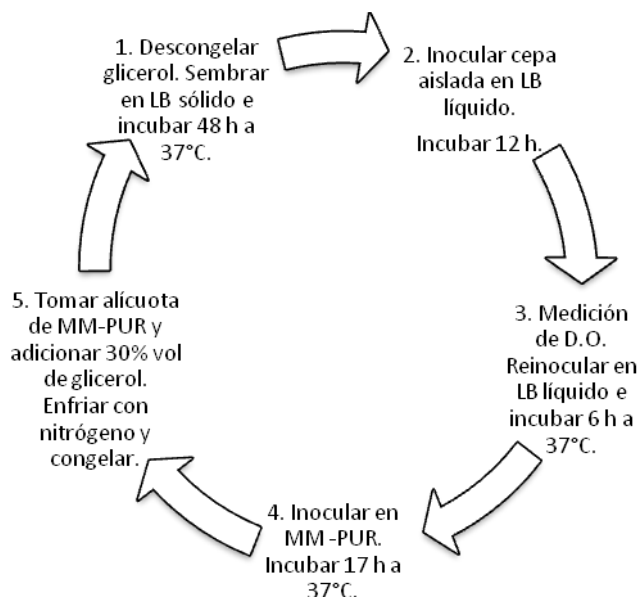


Figura 3.3 Diagrama de pasos para la preparación de gliceroles.

3.4.3 Preparación de muestras de los compuestos de uretano para su estudio de biodegradación.

En matraces de 125 mL, se pesaron 0.75 g (1.5% peso) de cada compuesto de uretano y se les adicionó a cada uno 44.45 mL de agua desionizada para ser esterilizados mediante autoclave. Posteriormente se adicionaron 5.55 mL de MM en condiciones de esterilidad a cada uno de los matraces; teniendo 2 matraces por compuesto a estudiar, solo uno de los dos matraces se inoculó con la cepa *Alicyclophilus sp.*, con un volumen de cultivo proveniente del inóculo incubado durante 12 h, y fueron colocados para su incubación a 220 rpm a una temperatura de 37°C en una incubadora de flujo durante 10 días.

Se monitoreó el crecimiento de las bacterias con respecto al tiempo (microorganismos. mL^{-1} vs. Tiempo), mediante una curva de crecimiento, utilizando cada uno de los cuatro compuestos de uretano sintetizados como fuente de carbono

3.4.3.1 Pruebas de biodegradación de muestras de los compuestos de uretano.

A partir de un glicerol obtenido como stock de la cepa bacteriana, se descongeló y se tomó una alícuota de 50 μL para sembrar en una caja petri, la cual se incubó durante 48 h a 37°C. Pasado este tiempo se rasparon cepas aisladas y se inocularon en 50 mL de cultivo LB líquido, el cual posteriormente se incubó 12 horas a 37°C, con la finalidad de reactivar la cepa bacteriana. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia (D.O. 660 nm) y se calcularon los mililitros de inóculo necesarios para obtener 0.02 de D.O a.660 nm en cada uno de los matraces que contenían 1.5% peso del compuesto de uretano y 5.55 mL del medio mínimo.⁽¹⁵⁾

Uno de los parámetros más importantes en la medición de los cultivos en microbiología es la concentración de bacterias por mL de cultivo líquido (microorganismos. mL^{-1}); para la determinación de este parámetro es necesario determinar la absorbancia a 660 nm (Densidad Óptica D.O.660 nm) de una muestra de medio LB sin bacterias y uno con las bacterias, al paso de algunas horas (al menos 24 horas); la correlación de esta lectura se hace mediante una curva de crecimiento patrón, elaborada por el seguimiento del cambio de la absorbancia de la muestra con el tiempo.⁽¹⁵⁾

Para la obtención de la gráfica que representa al número de microorganismos/mL con respecto al tiempo presentes en los matraces inoculados, se realizó la técnica de cuenta en placa, en la cual, se contaron el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) a distintos tiempos, definiendo como al tiempo inicial como **Tiempo cero**, para esto, se tomaron 100 μL del cultivo agitado y se colocó en un tubo Eppendorf el cual contenía 900 μL de solución A (1X), ver apéndice A, esta dilución corresponde a una concentración de 10^{-1} , de esta dilución se tomó 100 μL para adicionarlos a otro tubo Eppendorf que contenía 900 μL de solución A(1X), así esta dilución corresponde a 10^{-2} , de la misma forma se continuó hasta obtener 10^{-3} , una vez obtenida esta dilución se sembraron 100 μL de esta dilución en una caja petri y se mantuvo en incubación durante 48 h a 37°C.

A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de cada matraz inoculado y se sembraron en cajas petri como se describió en el párrafo anterior para el Tiempo cero, los tiempos determinados fueron: **Tiempo 1**, implicó 6 h de incubación y dilución de 10^{-4} , **Tiempo 2**, 22 h de incubación y dilución de 10^{-5} , **Tiempo 3**, 44 h de incubación y dilución de 10^{-6} , **Tiempo 4**, 68 h de incubación y dilución de 10^{-6} , **Tiempo 5**, 166 h de incubación y dilución 10^{-5} , **Tiempo 6**, 190 h de incubación y dilución de 10^{-5} , **Tiempo 7**, 214 h de incubación y dilución 10^{-4} . Se hicieron tres réplicas para cada material a biodegradar (Fig. 3.4)

3.4.4 Obtención de los productos de degradación. Enzimática y no enzimática

Para determinar si hubo algún efecto de la cepa bacteriana sobre los compuestos sintetizados debido a hidrólisis enzimática, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas para poder identificar los posibles compuestos presentes, metabolitos, en el medio de cultivo. Estos metabolitos tendrán que ser secciones de moléculas de los compuestos sintetizados que no pertenezcan a productos de una posible hidrólisis química que pudiera haber sido llevada a cabo por el hecho de estar presentes los materiales en un medio de cultivo acuoso.

3.4.4.1 Extracción de los productos de degradación.

A partir de cada uno de los tiempos descritos en la sección 3.4.3.1 se tomaron alícuotas de 3 mL de los medios de cultivo para ser analizadas mediante las técnicas de GC-MS. Cada alícuota fue centrifugada a 7000 rpm para eliminar las bacterias. Posteriormente se hicieron tres extracciones sucesivas con 5 mL cloroformo cada una y finalmente se hizo una cuarta extracción de la fase acuosa con 5 mL de éter etílico. La toma de alícuotas se realizó tanto en los matraces inoculados como en los no inoculados.

Al término de las 214 h de incubación (Tiempo 7) los cultivos de cada matraz fueron filtrados a través de papel poro medio para obtener los sólidos los cuales fueron lavados y secados a temperatura ambiente, mientras que el líquido de cada cultivo fue centrifugado para eliminar las bacterias a 7000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se hicieron tres extracciones sucesivas con 5 mL de cloroformo cada una y finalmente se hizo una cuarta extracción de la fase acuosa con 5 mL de éter etílico.

3.4.5.2 Identificación de los productos de degradación.

Del procedimiento anterior se obtuvieron en total 32 extractos por monómero de uretano, obtenidos a los 8 tiempos definidos con anterioridad, 16 extractos de los posibles productos de hidrólisis por el medio acuoso y 16 extractos de los posibles productos por hidrólisis enzimática. La identificación de tales productos se realizó por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas GC-MS. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases marca HP modelo CG 6890, acoplado a un detector selectivo de masas marca HP modelo 5973. Los extractos fueron inyectados al GC-MS a una temperatura de inyección de 230 °C y programado con temperaturas de la siguiente forma: temperatura inicial de 20 °C hasta 80 °C con una rampa de 5 °C por minuto, una meseta de 1 minuto a 80 °C y luego una rampa de 10 °C por minuto hasta llegar a 230 °C; se utilizó como gas de arrastre He y una columna capilar HP-5 de 26 m x 0.32 mm.

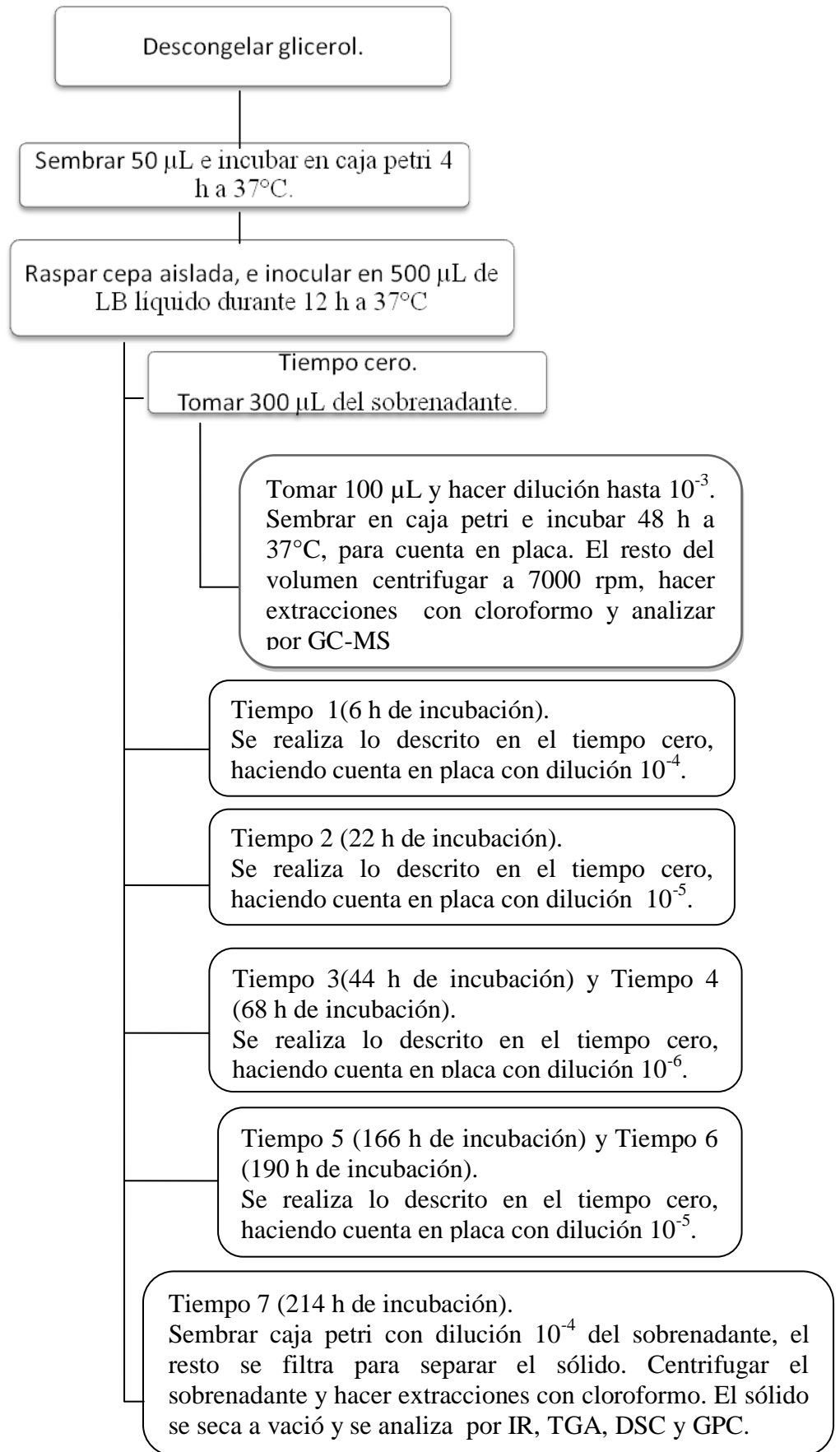


Figura 3.4 Diagrama para las pruebas de degradación de los compuestos de uretano.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Caracterización de oligómeros de poliéster.

La obtención de los compuestos de uretano se llevó a cabo mediante la síntesis de oligómeros de poliéster originados a partir de ácidos carboxílicos; aromático o alifático y monoetilenglicol, el cual constituye la fuente de grupos hidroxilo, en donde se involucran reacciones de esterificación, hidrólisis de enlaces éster y reacciones de transesterificación; dando como resultado oligómeros, BHET y BHEA (dependiendo de la fuente de ácido carboxílico), los cuales a su vez se hicieron reaccionar con MDI para obtener finalmente a los compuestos deseados.

Los cálculos realizados para llevar a cabo la síntesis de los oligómeros de poliéster se basaron en la ecuación 3, (Ec.3), la cual se emplea en polimerización etapa por etapa ^(18, 19) en donde se describe al grado de polimerización DP (de sus siglas en inglés Degree of Polymerization), como:

$$DP = \frac{1+r}{r + 1-2rp} \quad (\text{Ec.3})$$

Siendo r la relación inicial de monómeros $r = N^{\circ}A/N^{\circ}B$ y p la conversión de la reacción; si se considera que $p = 1$ (se convierte todo el monómero A), se tiene la ecuación Ec.4 que da los valores de DP respecto a la relación de monómeros r .

$$DP = \frac{1+r}{1-r} \quad (\text{Ec.4})$$

4.1.1 Determinación del número de grupos hidroxilo mediante titulación.

Las relaciones propuestas de los reactivos para la síntesis de los oligómeros de poliéster fue tal que se obtuviera un valor de DP cercano a 1. Se empleó el término grado de oligomerización el cual fue representado por la letra n , en vez de DP y se estimó a partir de los resultados obtenidos mediante las técnicas de valoración de grupos terminales (No. de OH's), (Tabla 4.1). La obtención del grado de oligomerización (n) mediante la determinación del número de grupos hidroxilo presentes en cada uno de los oligómeros se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$n = \frac{(112220 \text{ mg KOH/g} - P_{GT} * \text{No OH's})}{(P_{URC} * \text{No OH's})} \quad (\text{Ec.5})$$

Siendo P_{GT} el peso molecular del grupo terminal y P_{URC} el peso molecular de la unidad repetitiva constitucional. El término numérico corresponde al peso de dos moles de KOH expresado en miligramos por mol.

Tabla 4.1 Contenido del número de grupos hidroxilo del BHET y BHEA.

oligomero	mg OH/g oligomero ^(a)	<i>n</i> teórico	<i>n</i> ^(b)
BHET	330.62 ± 0.42	1	1.4
BHEA	321.78 ± 0.58	1	1.7

^(a) $\bar{x} \pm \sigma$ (Media ± Desviación estándar, $n=3$).

^(b) Grado de oligomerización del oligomero de poliéster calculado a partir de \bar{x} .

En la tabla 4.1 se resumen los valores obtenidos del número de grupos hidroxilo determinados mediante la técnica de titulación de grupos terminales, **ASTM-D-4274-99**, de las muestras de oligomeros de poliuretano. Los valores altos obtenidos del número de grupos OH es un indicativo del bajo peso molecular de los compuestos sintetizados.

4.1.2 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.

La determinación de sus pesos moleculares se llevó a cabo mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando como referencia la curva de calibración universal de estándares de polietilenglicol de pesos moleculares del rango de 106 a 21,000 Da, ver apéndice D. En la tabla 4.2 se presentan los pesos moleculares peso promedio, M_w , de cada uno de los oligomeros de poliéster sintetizados, junto con su polidispersidad, M_w/M_n , siendo M_n el peso molecular número promedio.

Tabla 4.2 Pesos moleculares y polidispersidades obtenidos mediante GPC del BHET y BHEA.

oligomero	M_w (Da)	M_w/M_n	<i>n</i> teórico	<i>n</i> estimado ^(a)
BHET	285	3.4	1	1.16
BHEA	273	2.9	1	1.22

^(a) Grado de oligomerización calculado mediante la Ec. 6 a partir de los valores de M_w obtenidos por GPC.

4.1.3 Caracterización de la estructura mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).

La determinación de la estructura molecular se llevó a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo (IR). En los espectros de IR se pueden observar claramente las bandas de absorción debidas a la presencia de los grupos OH terminales y las bandas de absorción de los grupos carbonilos C=O del grupo éster. En la tabla 4.3 y 4.4 se resumen las principales señales observadas.

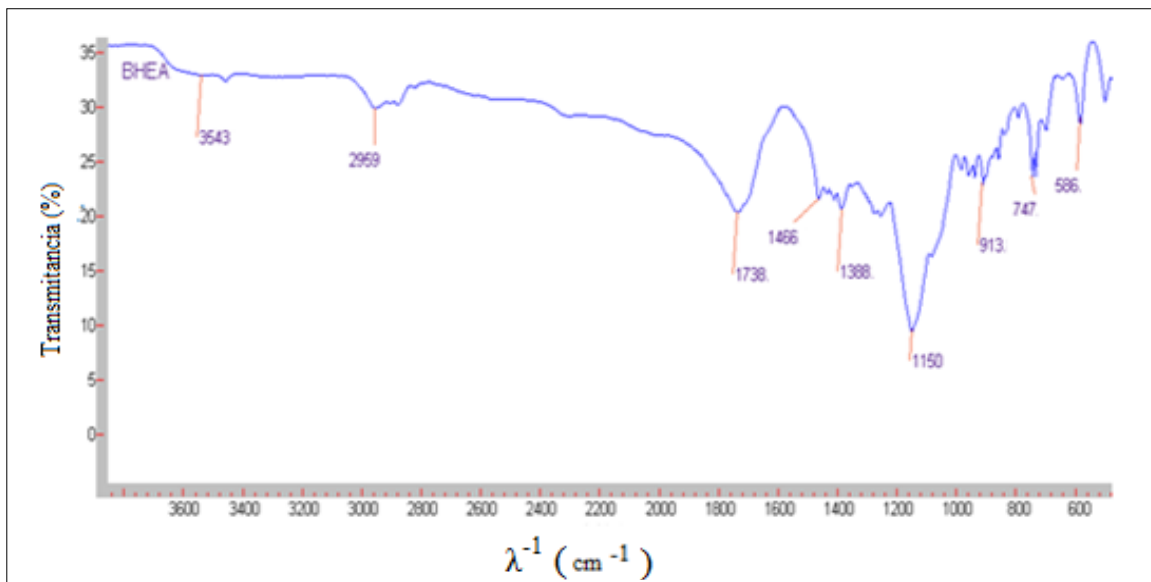


Figura 4.1 Espectro de IR del BHEA.

Tabla 4.3 Bandas observadas mediante IR del compuesto BHEA.

λ^{-1} (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Características
3543	-OH	Grupo terminal del oligomero
2959, 1388	R-CH ₂ -	Señales de CH ₂ presentes en la cadena del compuesto
1738	-C=O	Señales del carbonilo del grupo éster
2959, 1466, 747	R'-CH ₂ -R''	Confirmación de alcanos unidos -CH ₂ -CH ₂ -
1150	-C-O-C-	Confirmación del grupo éster
1388, 747	-(CH ₂)-	Confirmación sección alifática

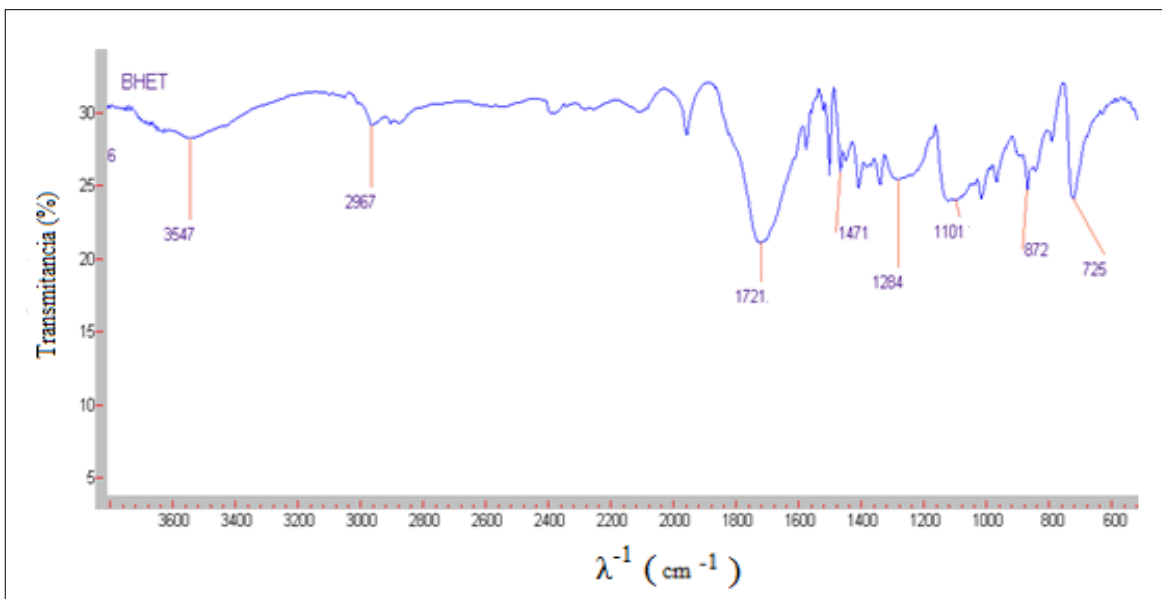



Figura 4.2 Espectro de IR del BHET.

Tabla 4.4 Bandas observadas en IR del compuesto BHET.

λ^{-1} (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Características
3547	-OH	Grupo terminal del oligomero
2967		C-H debida al grupo aromático
1721.86	-C=O-	Señales del carbonilo del grupo éster
2967, 1101	R'-CH ₂ -R''	Confirmación de alcanos unidos -CH ₂ -CH ₂ -
1101	-C-O-C-	Confirmación del grupo éster
1471	-C=C-	Confirmación del grupo aromático
725	C-H d	Confirmación de grupo aromático sustituido
1284	-C-O-	Confirmación del grupo alcohol

4.2 Caracterización del diisocianato (MDI).

El MDI utilizado durante la síntesis de los compuestos de uretano fue distribuido por Down Chemical. Tiene un contenido del 33% en peso de isocianatos. Las especificaciones reportan que: es una mezcla de isómeros 4,4'- y 4,2'- difenildiisocianato de metileno, que son los isómeros para- con contenido de 55 % y orto- con contenido de 25 % respectivamente, además de un 20 % de triisocianatos y especies de mayor peso molecular. El análisis por cromatografía de gases – masas del MDI muestra dos especies en abundancia y un grupo de especies de pesos moleculares mayores a 250 en pequeñas cantidades. Ver apéndice E.

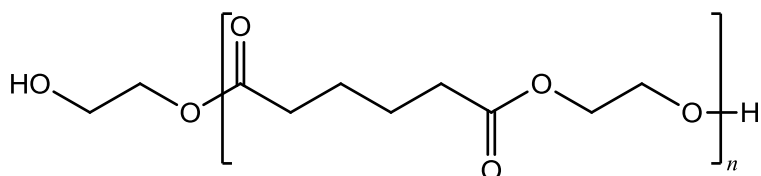
Tabla 4.5 Propiedades del diisocianato MDI empleado como materia prima.

Característica	Valor
Eq de NCO.gramo ⁻¹	0.00757
Peso equivalente	32 g .eq ⁻¹ NCO
Peso molecular	304 g. mol ⁻¹
Funcionalidad	2.3
Densidad (a 20°C)	1.22g. mL ⁻¹

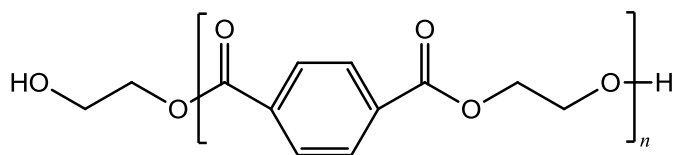
El espectro de IR del diisocianato MDI se presenta en el apéndice E, en donde se observan las bandas de absorción características debidas a los grupos isocianato ($-N=C=O$) en 2273 cm^{-1} , además de las señales correspondientes al anillo aromático en $3026, 1608, 1577, 1523, 1434\text{ cm}^{-1}$ y la debida al enlace C-H en 2914 cm^{-1} .

4.3 Síntesis y caracterización de los compuestos de uretano.

Para la elaboración de los compuestos de uretano se realizaron los cálculos correspondientes a un modelo de polimerización etapa por etapa (**Ec.3**), así, con éste modelo de polimerización se obtuvieron los valores teóricos de relaciones molares para obtener un grado de oligomerización $n=1$ deseado a partir de los oligómeros de poliéster siguientes:



BHEA



BHET

Para la formulación de los compuestos de uretano a partir de los oligómeros de poliéster se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$PM_{\text{oligomero poliéster}} = n * P_{\text{URC}} + P_{\text{GT}} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde:

$PM_{\text{oligomero poliéster}}$ = peso molecular del oligomero de poliéster

n = número de unidades repetitivas

P_{URC} = Peso molecular de la unidad repetitiva constitucional (g. mol^{-1})

P_{GT} = Peso molecular del grupo terminal.

Los cálculos estequiométricos para obtener las relaciones de NCO/OH: 2:1 y 1:2 se hicieron como se presenta a continuación:

$$M_{MDI} = \left[\frac{(\text{g oligomero poliéster})}{PM_{\text{oligomero poliéster}}} \right] * 1 * PM_{MDI} * (NCO/OH) \quad (\text{Ec.7})$$

Donde:

M_{MDI} = masa de MDI requerida para que reaccione con el oligomero de poliéster.

$PM_{\text{oligomero poliéster}}$ = peso molecular del oligomero de poliéster calculado a partir de la **Ec.6**

PM_{MDI} = peso molecular (g/mol) del diisocianato MDI

(NCO/OH) = relación estequiométrica propuesta para la síntesis de compuestos de uretano.

Otra forma de obtener la masa de diisocianato requerido es a partir del número de OH's obtenido a partir de los datos experimentales (mostrados en la Tabla 3.1):

$$P_{e\ MDI} = \frac{PM_{MDI}}{f_{MDI}} \quad (\text{Ec.8})$$

$$K_{MDI} = \frac{(P_{e\ MDI}) (\text{g oligomero poliéster})}{(PM_{KOH})(1000\text{mg/ 1g})} \quad (\text{Ec.9})$$

$$M_{MDI} = (\text{No OH's}) (K_{MDI}) (NCO/OH) \quad (\text{Ec.10})$$

Donde:

$P_{e\ MDI}$ = peso equivalente del diisocianato.

f_{MDI} = funcionalidad del diisocianato

K_{MDI} = Constante calculada a partir del peso equivalente del diisocianato y peso de la muestra de oligomero de poliéster a reaccionar.

M_{MDI} = Masa de la muestra requerida para que reaccione con los gramos de oligomero de poliéster.

(NCO/OH) = relación estequiométrica deseada.

La preparación de los compuestos de uretano se llevó a cabo en masa, aunque el control de la reacción se lleva a cabo mejor en solución ^(18, 19) se optó por esta técnica ya que al realizar la reacción en masa se obtiene un compuesto sin aditivos, los cuales podrían interferir en las pruebas de biodegradación, mientras que por otro lado, se elimina la presencia de residuos de disolvente en los materiales, lo cual también sería una interferencia difícil de cuantificar en las pruebas de degradación evitando poder elucidar un mecanismo de hidrólisis enzimática debida a la presencia de algún agente "externo" al material a biodegradar. ⁽⁵⁴⁾

4.3.1 Determinación del peso molecular promedio mediante GPC.

Una vez sintetizados los compuestos se realizó la caracterización para la obtención de sus pesos moleculares, éstos fueron disueltos en DMSO y se aforó cada una de las disoluciones con THF hasta 10 mL para obtener la concentración deseada de 1000 mg. L⁻¹. La tabla 4.6 muestra los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración realizada con estándares de poliestireno de distintos pesos moleculares que van del rango de 162 a 21,000 Da. Ver apéndice D.

Tabla 4.6 Análisis mediante GPC de los pesos moleculares de los compuestos de uretano.

Oligomero de poliéster	Relación (NCO/OH)	Mw (Da) ^(a) $\bar{x} \pm \sigma$	Mw/Mn $\bar{x} \pm \sigma$	<i>n</i> ^(b) estimado
BHEA-MDI	2:1	$1.11 \times 10^3 \pm 3.09 \times 10^1$	3.51 ± 0.78	1.7
	1:2	$0.87 \times 10^3 \pm 1.27 \times 10^1$	2.81 ± 0.89	1.3
BHET-MDI	2:1	$1.44 \times 10^3 \pm 3.02 \times 10^1$	1.83 ± 0.43	2.3
	1:2	$1.28 \times 10^3 \pm 2.28 \times 10^1$	1.24 ± 0.43	2.1

(a) $\bar{x} \pm \sigma$, Media \pm Desviación estándar, *n* = 3.

(b) *n* grado de oligomerización calculado a partir del Mw obtenido experimentalmente mediante GPC

Se observa en la tabla 4.6, que el grado de oligomerización final de los compuestos de uretano es mayor a 1, (*n* = 1), estimado con base a los cálculos estequiométricos propuestos inicialmente; lo que indica, un posible agotamiento durante la reacción de grupos isocianato debido quizá a posibles reacciones secundarias, (ver sección 3.3, figura 3.2), además, de la posible formación del isocianurato; de tal forma que el grado de conversión *p* del monómero isocianato no es total y por consiguiente se obtiene un grado de oligomerización mayor, con base a lo descrito en la **Ec.1**.

4.3.2 Caracterización de la estructura mediante espectroscopia de infrarrojo (IR).

Para determinar la estructura general de los materiales obtenidos se obtuvieron los espectros de infrarrojo para cada uno de ellos, en los cuales se observan diferencias claras entre los compuestos sintetizados a partir del oligomero de poliéster aromático (BHET) y los compuestos sintetizados a partir del oligomero de poliéster alifático (BHEA).

En los espectros de los compuestos sintetizados con una relación de NCO/OH 1:2 se observa la banda correspondiente al grupo hidroxilo en la región de 3300 cm⁻¹. Para el caso de los compuestos con relación NCO/OH 2:1 se observa la presencia del grupo terminal isocianato, cuya señal aparece en la región de ~ 2270 cm⁻¹. Una de las señales importantes a identificar es la correspondiente al isocianurato, la cual se presenta ~ 1414 cm⁻¹ lo que podría indicar de que en la estructura de los materiales sintetizados puedan presentar ramificaciones.

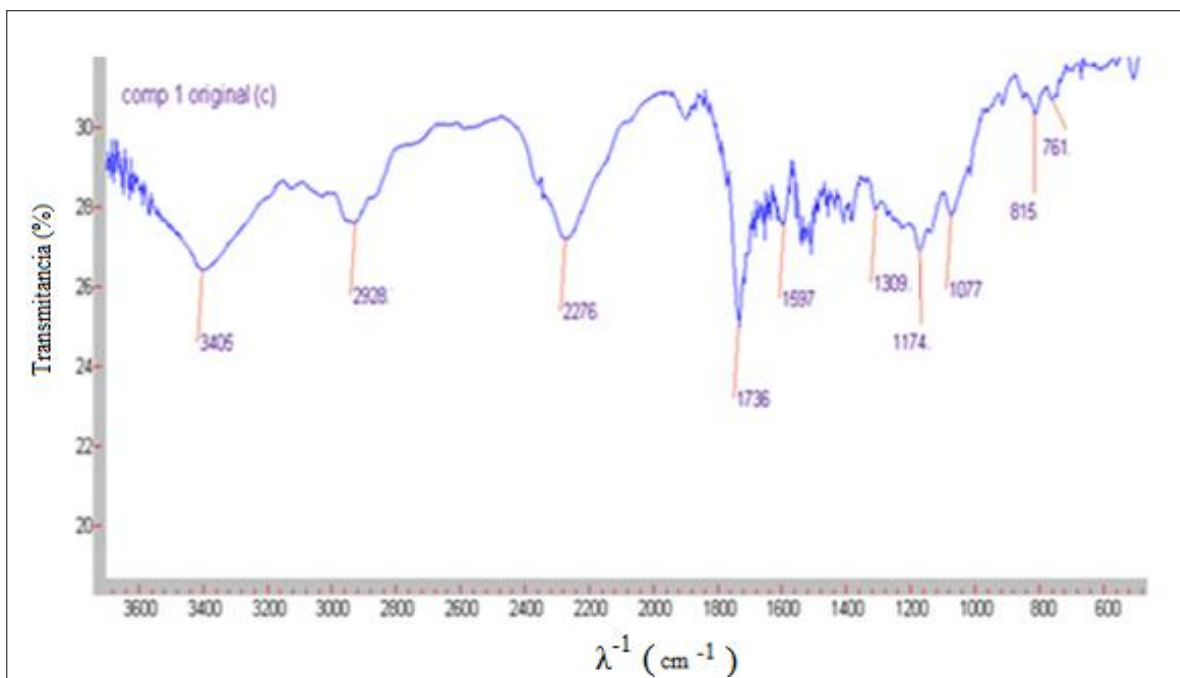



Figura 4.3 Espectro de IR del compuesto de uretano BHEA-MDI relación NCO/OH 2:1.

Tabla 4. 7 Bandas observadas en IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

λ^{-1} (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Características
3405	-NH	Grupo amina unido al fenilo (grupo uretano)
1597, 815	N-H	Confirmación de grupo uretano
2928, 1174	R'-CH ₂ - R'' -CH ₂ , (4 o más) CH,	Señales debidas a los alcanos R, puede ser -CH ₂ o provenientes del MDI
1600- 1475		C=C debida a la presencia del grupo aromático
2276	-N=C=O	Señal debida a los isocianatos terminales
1736	-C-O-C-	Señal del grupo éster
1471	-C=C-	Confirmación del grupo aromático
725	C-H	Confirmación del grupo aromático sustituido

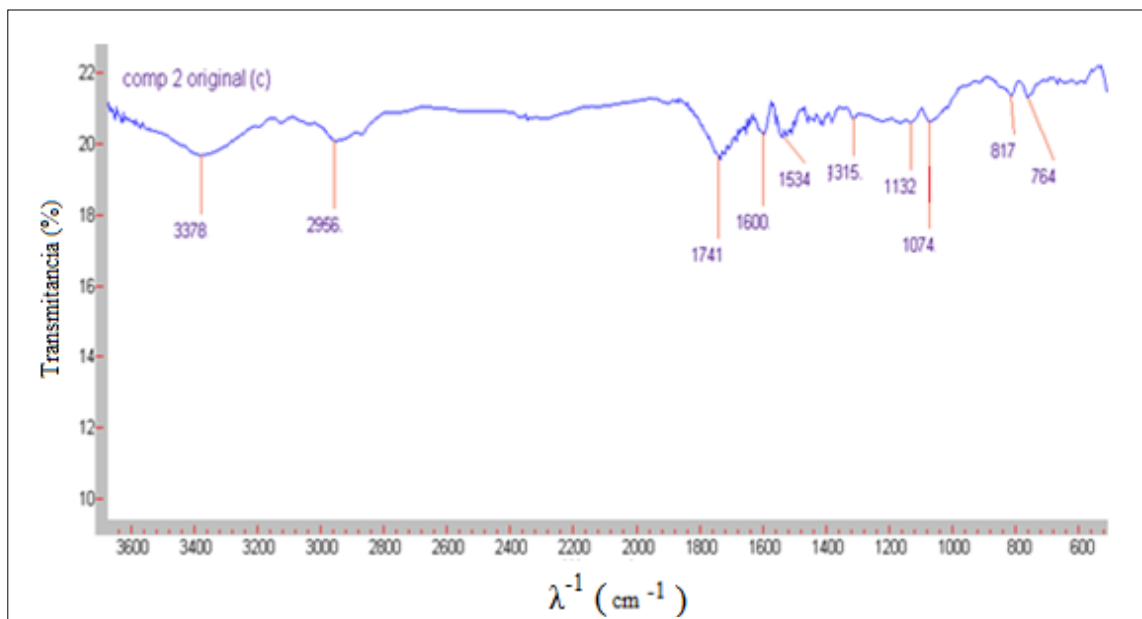



Figura 4.4 Espectro de IR del compuesto BHEA-MDI relación NCO/OH 1:2.

Tabla 4.8 Bandas observadas en IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).

$\lambda^{-1}(\text{cm}^{-1})$	Grupo funcional	Características
3378	-NH	Grupo amina unido al fenilo (grupo uretano)
1534, 817	N-H	Confirmación de grupo uretano
2956, 1074	R'-CH ₂ -R'' -CH ₂ , (4 o más) CH ₂	Señales debidas a los alcanos R puede ser -CH ₂ provenientes del MDI
1600		-C=C- debida a la presencia del grupo aromático
1741	-C-O-C-	Señal del grupo éster
~1440-1400	-OH	Confirmación del grupo hidroxilo
817, 764	C-H	Confirmación del grupo aromático sustituido

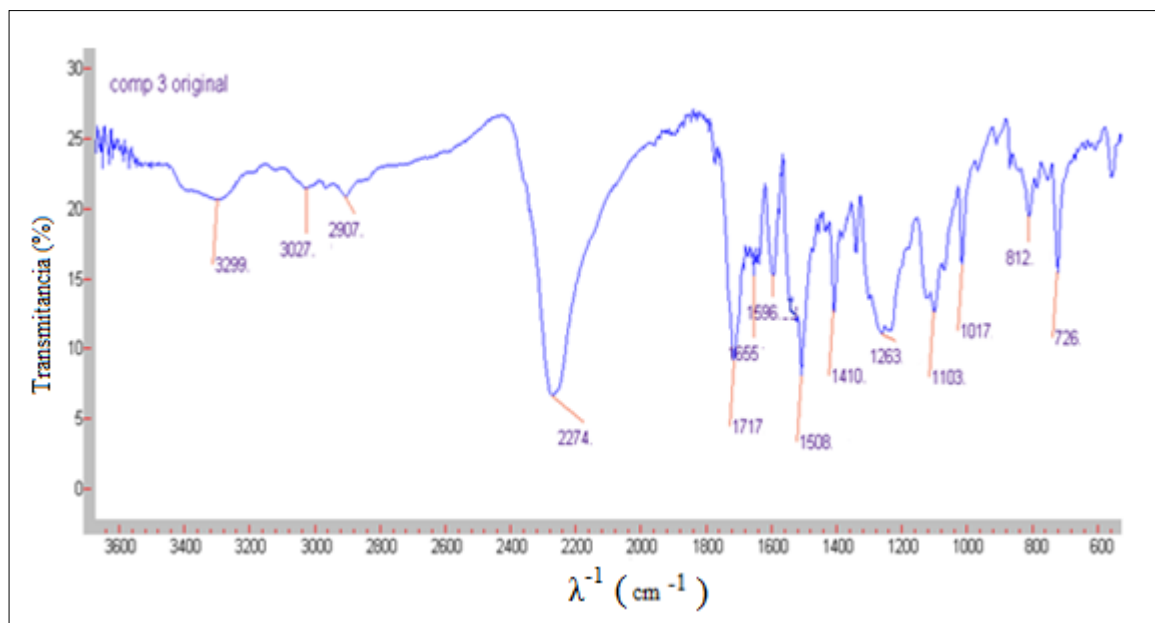



Figura 4.5 Espectro de IR del compuesto BHET-MDI relación NCO/OH 2:1.

Tabla 4.9 Bandas observadas en IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1).

λ^{-1} (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Características
3299	f-NH	Grupo amina unido al fenilo (grupo uretano)
1596, 812	N-H	Confirmación de grupo uretano
2907, 1117	R'-CH ₂ -R''	Señales debidas a los alcanos R puede ser -CH ₂ o provenientes del MDI
3027, 1600- 1475		C=C debida a la presencia de grupos aromáticos
2274	-N=C=O	Señal debida a los isocianatos terminales
1717, 1263	-C-O-C-	Señal del grupo éster y confirmación
1410	-C=C-	Confirmación del grupo aromático
726	C-H	Confirmación del grupo aromático sustituido

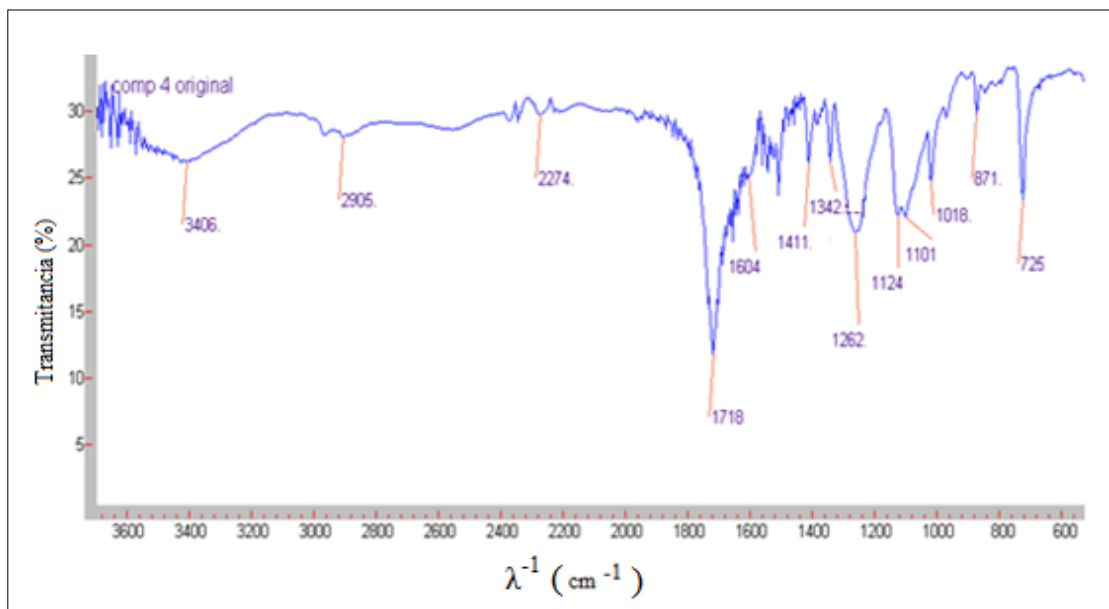



Figura 4.6 Espectro de IR del compuesto BHET-MDI relación NCO/OH 1:2.

Tabla 4.10 Bandas observadas en IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

λ^{-1} (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Características
3406	f-NH	Grupo amina unido al fenilo (grupo uretano)
2905	CH ₂	Enlaces C-H de grupos lineales
2274	-N=C=O	Señales debidas al isocianato (residual)
1718	-C=O	Grupo carbonilo debido al éster presente
1124	-C-O-C-	Confirmación del grupo éster
~1600- ~1400		Enlaces C=C del grupo aromático
1411	-OH	Confirmación de grupo OH terminal
1262	C-O	Debida al grupo OH terminal
725	C-H	Confirmación del grupo aromático sustituido

En los espectros correspondientes a los compuestos sintetizados con una relación NCO/OH 2:1 se observa claramente la señal perteneciente al grupo funcional isocianato terminal, y en el caso de los compuestos sintetizados con una relación NCO/OH 1:2; únicamente para el compuesto BHET con MDI se observa una señal tenue debida al isocianato residual de la reacción de policondensación, el cual no pudo reaccionar por completo con el BHET.

Para el caso de los compuestos sintetizados con una relación NCO/OH 1:2 se observa que el grupo OH aparece como grupo terminal, dicho grupo se confirmó con las bandas que aparecen en la región de $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, sin embargo, es difícil observar en la región de $3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ la presencia de los hidroxilos ya que también están presentes los grupos uretano los cuales aparecen en la misma región de λ^{-1} .

Por otro lado, las posibles reacciones secundarias de las aminas, subproducto cuando hay un exceso de isocianato, deberían formar el grupo urea (-NH-CO-NH-), el cual, tiene señales parcialmente encimadas con las pertenecientes al grupo uretano, pero existe un desplazamiento del grupo carbonilo de la urea, que tendría que observarse en el intervalo de los 1650 a los 1670 cm^{-1} . Esta señal se puede observar en los espectros correspondientes a los uretanos con relación NCO/OH 2:1, sin embargo, no se observa en el compuesto de BHET con MDI relación NCO/OH 1:2 el cual presentó isocianato residual, lo cual puede deberse a que quizá sea más débil la señal respecto a la señal del carbonilo del grupo uretano.

En la región de los $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ aparece la señal correspondiente al isocianurato, la cual está presente en los compuestos sintetizados con BHET- MDI, sin embargo, es una señal tenue que quizá corresponda a la confirmación de los C=C provenientes del anillo aromático del DMT o del MDI.

La caracterización mediante espectroscopia de infrarrojo de los materiales antes de someterlos a degradar brindó información muy valiosa respecto a los grupos presentes en los materiales, ya que se espera que se modifiquen los espectros debido al efecto de la hidrólisis tanto enzimática como no enzimática sobre algunos grupos funcionales en particular.

4.3.3 Caracterización mediante técnicas de análisis térmico.

4.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los materiales sintetizados fueron caracterizados mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC de sus siglas en inglés **M**odules **D**iferencial **S**canning **C**alorimetry), dichos análisis fueron realizados en el laboratorio de Caracterización Térmica, E-11, del Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM C.U, con el equipo Q100 TA Instruments. Se llevó a cabo mediante el calentamiento en un intervalo de temperaturas de -50 a 200°C con una velocidad de calentamiento de $10 \text{ grados.min}^{-1}$ utilizando un flujo de nitrógeno de 50 mL.min^{-1} . El tratamiento de datos se realizó mediante el software "Universal Analysis 2000" con el que se determinó el valor de la temperatura de transición vítrea (T_g), de fusión (T_m) y el ΔH_f .

Los termogramas obtenidos de las muestras se presentan a continuación:

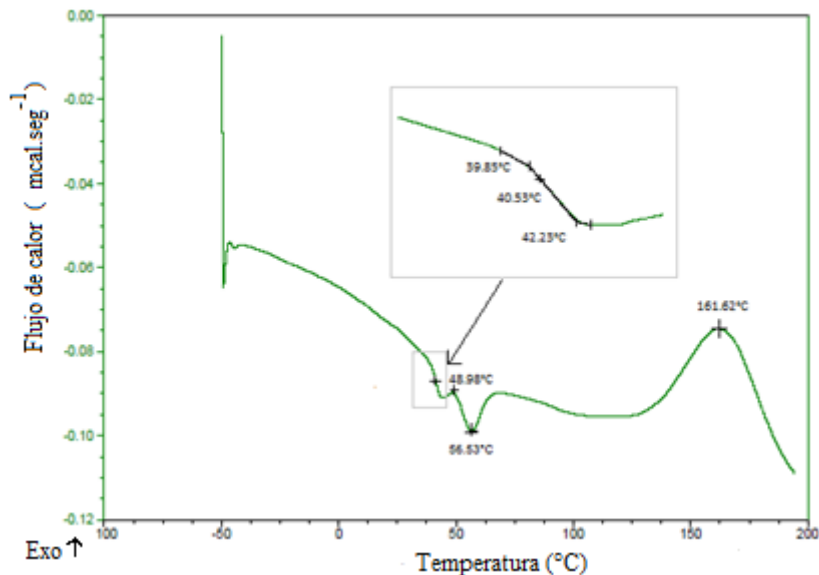


Figura 4.7 Termograma mediante DSC del compuesto BHEA-MDI NCO/OH 2:1.

En el termograma correspondiente al compuesto BHEA-MDI NCO/OH 2:1, figura 4.7, se observan transiciones las cuales corresponden a la temperatura de transición vítrea (T_g) así como de temperatura de fusión (T_m); la T_g es una transición que se manifiesta únicamente en la región amorfa, y la T_m es una transición que se manifiesta en la región cristalina. Los materiales poliméricos semicristalinos presentan siempre una porción amorfa que va desde el 40 al 70%. Es importante ver que en este termograma se ven ambas transiciones por lo tanto tenemos en dicho material las dos regiones: cristalina y amorfa, donde la porción amorfa sólo experimenta la transición vítrea, en este caso el valor de T_g es de 40.5°C y la porción cristalina sólo experimenta la fusión ($T_m = 56.5^\circ\text{C}$), es decir, las cadenas que se funden no son las mismas cadenas que experimentan transición vítrea.

Finalmente observamos una transición cuyo valor máximo es de 161.6°C y esto se debe al posible entrecruzamiento (cross-linking) debido al exceso de isocianato empleado para la síntesis de dicho material.

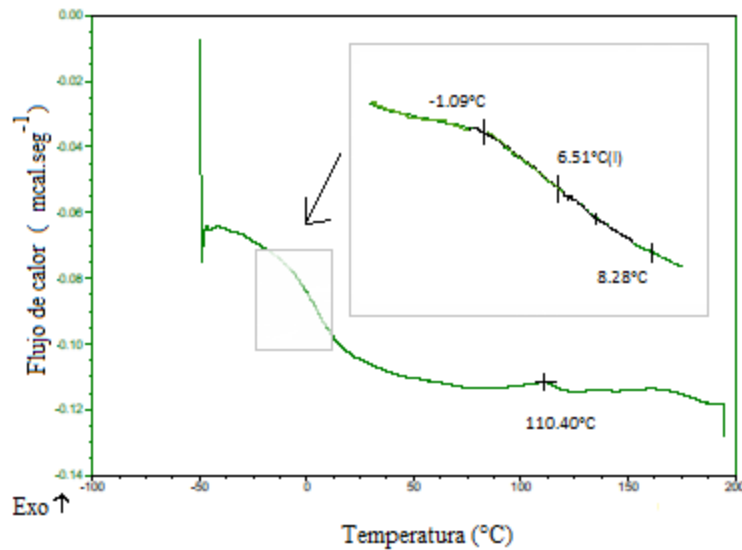


Figura 4.8 Termograma mediante DSC del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)

En el termograma correspondiente al compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2), figura 4.8, se observa únicamente la transición vítrea cuyo valor de T_g es de 6.5°C , lo que indica que el material está constituido solo por regiones amorfas, además, comparando el valor de T_g del caso anterior con este material, observamos que es mucho menor, lo cual indica que es más “flexible” ya que el valor de T_g depende de la facilidad con que se muevan las cadenas en un material. Una cadena polimérica que pueda movilizarse fácilmente tendrá un valor de T_g muy bajo, por lo tanto, cuanto más fácilmente pueda moverse menor calor tendrá que suministrar el equipo de DSC durante su análisis.

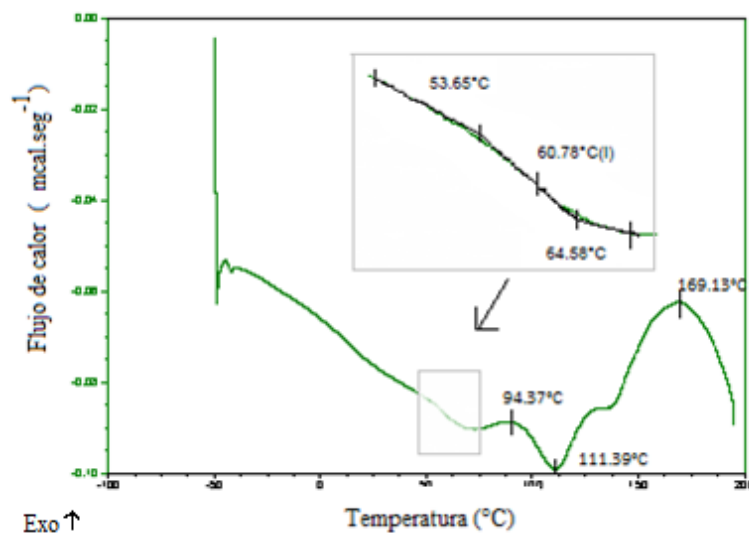


Figura 4.9 Termograma mediante DSC del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1).

En la figura 4.9, termograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1), se observan, al igual que en el primer termograma (figura 4.8), dos transiciones; correspondientes a la transición vítrea, cuyo valor de T_g es 60.7°C , y a la fusión, cuyo valor de T_m es 111.3°C , con un porcentaje alto de cristalinidad.

Este porcentaje de cristalinidad se debe a la presencia de los grupos éster los cuales son polares, así como también por la presencia de los grupos fenilo, los cuales se “apilan” y empaquetan para formar redes cristalinas. Por lo tanto, tenemos en este material ambas regiones: amorfa y cristalina, observándose que ambos valores de temperaturas son mayores que en el caso del material sintetizado a partir de BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) lo que indica, que este material es menos “flexible”, comparado con los anteriores y este factor es importante a considerar durante las pruebas de biodegradación, ya que materiales con altos valores de T_g serán menos susceptibles a la hidrólisis enzimática. Por otro lado, vemos otra transición cuya temperatura máxima es de 169.1°C y se debe al posible entrecruzamiento al estar en exceso el diisocianato ya que se aumenta la probabilidad de que los grupos NCO del diisocianato reaccionen entre sí.

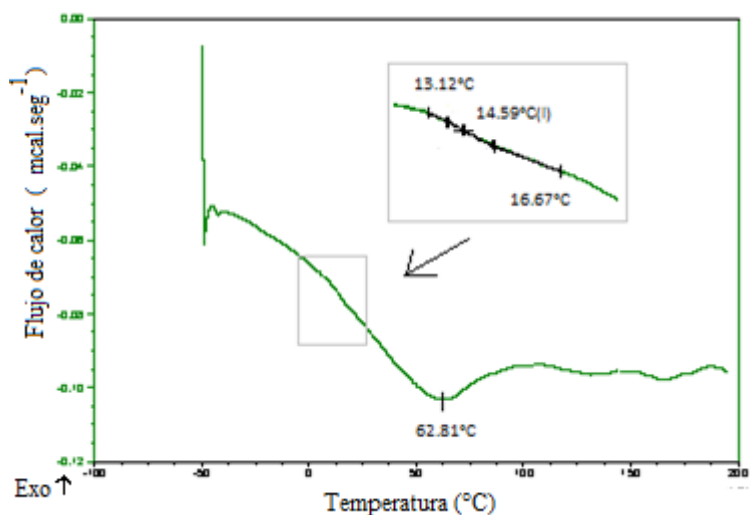


Figura 4.10 Termograma mediante DSC del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

En la figura 4.10 se observa únicamente la transición vítrea cuyo valor de T_g es de 14.5°C, siendo mayor comparada con el segundo material (figura 4.8), por lo que podría suponerse que será menos “flexible” y por lo tanto será menos susceptible a ser biodegradado ya que el ataque enzimático estará impedido debido al menor movimiento de las cadenas del material.

De los análisis realizados por DSC podemos citar lo siguiente:

La diferencia entre los valores de T_g obtenidos para cada compuesto de uretano (ver tabla 4.11), se puede deber principalmente a los siguientes factores: A) Cristalinidad, para el caso de un material polimérico semicristalino, tendrá un valor mayor de T_g (correspondiente a la región amorfa), comparado con el mismo material pero exclusivamente amorfo.⁽⁵⁵⁾ Para el caso de los compuestos BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) y BHET-MDI (NCO/OH 2:1) presentaron los valores más altos de T_g, lo cual pudo deberse a la presencia de la región cristalina cuyas temperaturas de cristalinidad (T_c) registradas fueron 48.9°C y 94.3°C respectivamente. B) Entrecruzamiento, el valor de T_g en los compuestos que presentan una estructura molecular entrecruzada es mayor en comparación con materiales de estructura similar pero sin estar entrecruzados.⁽⁵⁵⁾

Para el caso de los compuestos BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) y BHET-MDI (NCO/OH 2:1) se empleó una mayor cantidad del diisocianato MDI, siendo este hecho un posible factor para promover estructuras entrecruzadas, observándose valores de T_g mayores comparados con los materiales sintetizados a partir de la relación NCO/OH 1:2. Las temperaturas de transición debido al posible entrecruzamiento fueron 161.6°C para el compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) y 169.1°C para el compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1).

Tabla 4.11 Susceptibilidad a la biodegradación con respecto a la temperatura de transición vítrea.

Compuesto	T_g ($^\circ\text{C}$)	Susceptibilidad a la biodegradación ^(a)
BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)	6.5	>>>>
BHET-MDI (NCO/OH 1:2)	14.5	>>>
BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)	40.5	>>
BHET-MDI (NCO/OH 2:1)	60.7	>

(a) Cada símbolo > representa el grado de susceptibilidad a ser biodegradado.

2. Uno de los factores que afectan a la hidrólisis enzimática es el valor de la temperatura de transición vítrea, entre menor sea su valor, será más flexible la cadena; y por consiguiente será más susceptible a la biodegradación. En la Tabla 4.11 se puede suponer el posible orden de susceptibilidad a la degradación de los compuestos con base a los valores de la temperatura de transición vítrea obtenidos.

3. Otro factor que afecta a la hidrólisis tanto enzimática como química, debida al agua, es la cristalinidad del material, ya que la penetración de agua o de la enzima hacia el interior del material es mayor en la región amorfa, mientras que en materiales semicristalinos está más limitada la accesibilidad de moléculas de agua o enzima, por lo tanto, los materiales semicristalinos, los cuales tienen temperatura de fusión (T_m), se biodegradan en mayor tiempo que los amorfos, en la tabla 4.12 se presenta el posible orden de susceptibilidad a la degradación con base al valor de la temperatura de fusión.

Tabla 4.12 Susceptibilidad a la biodegradación con respecto a la temperatura de fusión.

Compuesto	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔH_f ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$) ^(b)	Susceptibilidad a la biodegradación ^(a)
BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)	*	*	>>>>
BHET-MDI (NCO/OH 1:2)	*	*	>>>>
BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)	56.5	-1.7	>>
BHET-MDI (NCO/OH 2:1)	111.3	-4.8	>

* Compuestos amorfos no tienen temperatura de fusión.

(a) Cada símbolo > representa el grado de susceptibilidad a ser biodegradado.

(b) ΔH_f , Entalpía de fusión, es un proceso endotérmico por lo que es representado con valores negativos. El porcentaje de cristalinidad puede ser estimado mediante el cociente entre $(\Delta H_{\text{fusión}} - \Delta H_{\text{cristalización}})$ y el valor teórico de la entalpía del material 100% cristalino, ΔH_m^0 .

4.3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA).

El análisis termogravimétrico de las muestras sintetizadas se realizó en el laboratorio de Caracterización Térmica E-11, del Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM C.U, con el equipo Q 600 TA Instruments. Se empleó una atmósfera de nitrógeno a un flujo de $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, una velocidad de calentamiento de $20 \text{ grados} \cdot \text{min}^{-1}$ y un intervalo de temperatura de 20 a 800°C . El tratamiento de datos se realizó mediante el software "Universal Analysis 2000" con el que se determinó el porcentaje de pérdida de peso para cada una de las muestras. Los termogramas obtenidos se presentan a continuación:

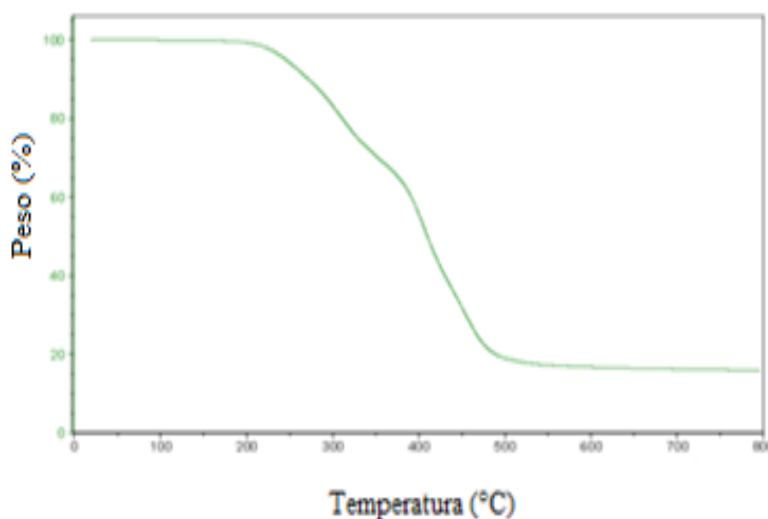


Figura 4.11 Termograma mediante TGA del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

En el termograma de la figura 4.11 se observa la degradación térmica del material BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), donde la pérdida de peso es de aproximadamente del 30% a partir de $\sim 240^\circ\text{C}$, dicha pérdida se relaciona con la ruptura de enlaces débiles principalmente en la estructura del material. Se observa otra pérdida de peso a partir de $\sim 400^\circ\text{C}$, debido probablemente a una serie de reacciones propias del sistema del grupo uretano presente, (formación de urea), dicha pérdida de peso es del 40% aproximadamente.

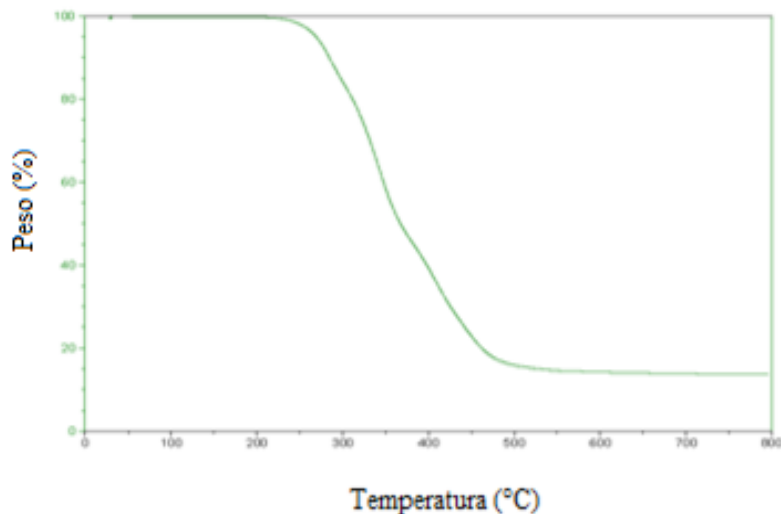


Figura 4.12 Termograma mediante TGA del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).

En la figura 4.12 correspondiente al termograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2), se observa que no hay pérdida de peso por debajo de $\sim 250^{\circ}\text{C}$, a temperatura mayor comienza la pérdida de peso del 90% y esto puede deberse a que es un material con enlaces lábiles debido a su composición química, comparándolo con el compuesto anterior, (Figura 4.11).

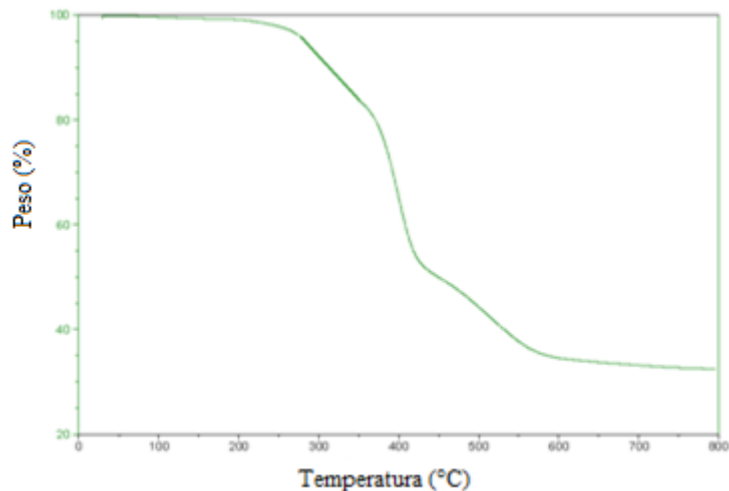


Figura 4.13 Termograma mediante TGA del compuesto sintetizado con BHET-MDI (NCO/OH 2:1).

La figura 4.13 muestra al termograma del material sintetizado por unidades aromáticas MDI y unidades cicloalifáticas (oligomero de poliéster a partir del tereftalato de dimetilo), lo cual tiende a producir materiales con una alta rigidez, en función del mejor empaquetamiento entre los segmentos de la estructura del material. Se observa que la pérdida de peso comienza a partir de 290°C con una pérdida del $\sim 20\%$ de peso, posteriormente se observa una segunda etapa de pérdida de peso a partir de 380°C debida a un posible ordenamiento en la estructura del material y por consiguiente se puede considerar quizá la ruptura del enlace éster.

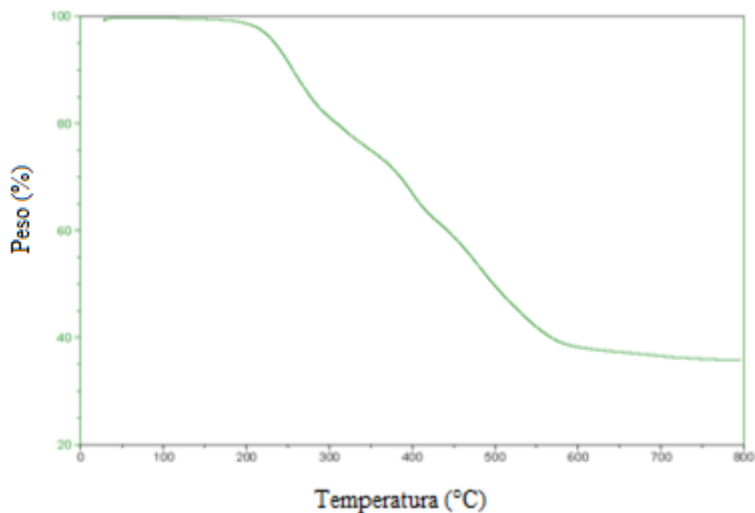


Figura 4.14 Termograma mediante TGA del compuesto sintetizado con BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

La figura 4.14 nos muestra al termograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2). La pérdida de peso es a partir de 240°C y podría considerarse que se lleva dicha pérdida es de un 60%, ocurriendo la degradación en una sola etapa, por lo que podría considerarse que esta pérdida es debido a las reacciones en el grupo uretano para formarse el grupo urea.

De los análisis realizados por Termogravimetría (TGA) se tiene lo siguiente:

1. Las muestras a partir de BHEA-MDI y BHET-MDI relación (NCO/OH 1:2) presentan una tendencia similar en donde pierden un alto porcentaje de peso > 60% en una sola etapa, mientras que para el caso de los materiales sintetizados a partir de una relación NCO/OH 2:1 presentan pérdida de peso en más de una etapa y esto se debe posiblemente a la presencia de enlaces poco lábiles y/o a la región cristalina que puede ser del tipo carbodiimida ($\sim\text{N}=\text{C}=\text{O}\sim$) debida al exceso de isocianato.

2. Ésta técnica permite observar las posibles diferencias relacionadas con la pérdida de peso antes y después de someter los materiales a las pruebas de degradación.

4.4 Resultados de las pruebas de biodegradación.

4.4.1 Curvas de crecimiento de la cepa *Alicyclophilus sp.*

4.4.1.1 Crecimiento bacteriano de la cepa *Alicyclophilus sp.* en medio mínimo sin la presencia de compuestos de uretano.

Para verificar el crecimiento de la cepa *Alicyclophilus sp.* sin la presencia de los compuestos sintetizados, los cuales representan una posible fuente de carbono, se diseñó un experimento en el cual se monitoreó el crecimiento bacteriano únicamente en presencia del carbono proveniente del inóculo, y así obtener una curva de crecimiento de dicha bacteria sin una fuente externa de carbono.

Se prepararon dos matraces de cultivo utilizando uno como control de esterilidad sin inóculo y el otro con inóculo de la cepa implicada en el estudio, en ambos no se adicionó fuente externa de carbono. Para determinar si existía crecimiento en el número de bacterias capaces de formar una colonia, durante el tiempo de observación se hizo un conteo en placa en LB al tiempo cero, donde se determinó el número de bacterias presentes (microorganismos. mL⁻¹), y posteriormente a distintos tiempos hasta no observar colonias en LB sólido, debido a la muerte bacteriana por ausencia de nutrientes en el MM. El resultado encontrado durante 24 horas de incubación fue que posterior a dicho tiempo ya no se observó la formación de colonias, lo que demostró que sí existe un crecimiento bacteriano debido únicamente al carbono presente del inóculo en el MM. Estos resultados se muestran en la tabla 4.13 los cuales muestran el valor medio de microorganismos.mL⁻¹ así como la desviación estándar de las pruebas realizadas por triplicado.

Tabla 4.13 Cuantificación de los microorganismos. mL⁻¹ sin fuente de carbono externa a distintos tiempos de incubación.

Tiempo (horas)	microorganismos.mL ⁻¹ ($\bar{x} \pm \sigma$)
0	$1.58 \times 10^6 \pm 2.15 \times 10^5$
6	$6.95 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^5$
12	$1.66 \times 10^7 \pm 5.77 \times 10^5$
22	$6.50 \times 10^6 \pm 1.43 \times 10^6$
30	0*

($\bar{x} \pm \sigma$, Media \pm Desviación estándar, n=3)

* No se observan colonias en las tres repeticiones.

Esta prueba permite conocer cuál es el tiempo de supervivencia de la bacteria únicamente debida a los nutrientes en el medio, en éste caso por el carbón del inóculo inicial, aunque dicho elemento esté en bajas concentraciones. La importancia de estos resultados está en la información acerca del patrón de crecimiento de la cepa bacteriana, ya que el crecimiento que se observe en las pruebas, podría ser similar o distinto en presencia de una fuente externa de carbono, proveniente de los materiales sintetizados.

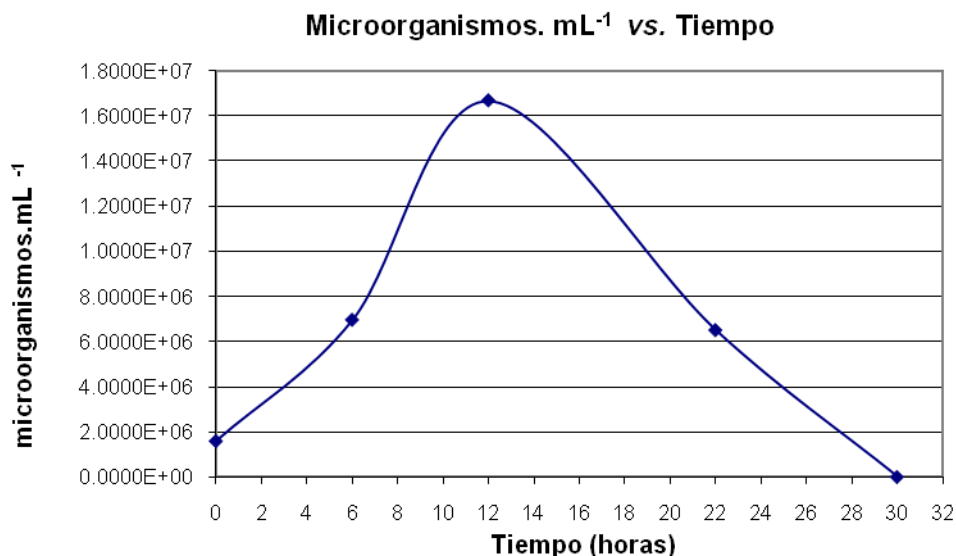


Figura 4.15 Crecimiento bacteriano de la cepa *Alicyclophilus sp.* sin presencia de compuesto de uretano.

Mediante la curva presentada en la figura 4.15 se observa que la cepa bacteriana presenta un máximo de crecimiento alrededor de las 12 horas de incubación y pasado este tiempo comienza a decaer el número de microorganismos.mL⁻¹ presentes en el medio de cultivo.

4.4.1.2 Crecimiento bacteriano de la cepa *Alicyclophilus sp.* en medio mínimo en presencia de compuestos de uretano.

Con los materiales estériles se realizaron las pruebas de incubación descritas en la sección 3.4.3. En la tabla 4.14 se presentan el valor medio de microorganismos.mL⁻¹ y desviación estándar correspondiente para cada tiempo de incubación.

Tabla 4.14 Cuantificación de microorganismos. mL⁻¹ en LB sólido en presencia de compuestos de uretano a distintos tiempos de incubación.

Tiempo (horas)	Microorganismos. mL ⁻¹ ($\bar{x} \pm \sigma$)			
	BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)	BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)	BHET-MDI (NCO/OH 2:1)	BHET-MDI (NCO/OH 1:2)
0	$1.64 \times 10^6 \pm 1.63 \times 10^5$	$1.24 \times 10^6 \pm 1.02 \times 10^5$	$1.54 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^5$	$1.51 \times 10^6 \pm 1.29 \times 10^5$
6	$5.90 \times 10^7 \pm 4.71 \times 10^7$	$4.82 \times 10^7 \pm 4.00 \times 10^7$	$5.12 \times 10^7 \pm 3.40 \times 10^7$	$4.21 \times 10^7 \pm 2.61 \times 10^7$
22	$1.64 \times 10^8 \pm 1.51 \times 10^8$	$1.07 \times 10^8 \pm 8.87 \times 10^7$	$8.58 \times 10^7 \pm 6.91 \times 10^7$	$8.34 \times 10^7 \pm 6.53 \times 10^7$
44	$1.94 \times 10^9 \pm 1.66 \times 10^7$	$1.38 \times 10^9 \pm 6.11 \times 10^6$	$6.59 \times 10^8 \pm 4.13 \times 10^7$	$7.12 \times 10^8 \pm 2.08 \times 10^7$
68	$1.70 \times 10^8 \pm 1.24 \times 10^6$	$3.96 \times 10^8 \pm 1.71 \times 10^6$	$1.31 \times 10^8 \pm 3.13 \times 10^7$	$2.29 \times 10^8 \pm 1.22 \times 10^8$
166	$4.26 \times 10^7 \pm 4.00 \times 10^7$	$6.10 \times 10^7 \pm 4.90 \times 10^7$	$6.23 \times 10^7 \pm 2.72 \times 10^7$	$2.16 \times 10^7 \pm 7.00 \times 10^6$
190	$3.00 \times 10^6 \pm 1.40 \times 10^5$	$8.40 \times 10^7 \pm 1.18 \times 10^5$	$1.36 \times 10^8 \pm 6.92 \times 10^7$	$1.79 \times 10^8 \pm 8.53 \times 10^7$
214	$2.00 \times 10^6 \pm 9.82 \times 10^5$	$6.00 \times 10^6 \pm 8.48 \times 10^5$	$5.60 \times 10^7 \pm 7.91 \times 10^6$	$6.60 \times 10^7 \pm 9.33 \times 10^6$

($\bar{x} \pm \sigma$, Media \pm Desviación estándar, n=3)

El comportamiento de las curvas de crecimiento de cada material sometido a biodegradación se presenta en la figura 4.16, las cuales se obtuvieron de los resultados de los recuentos microbianos a distintos tiempos de incubación para cada compuesto sometido a biodegradación, (pruebas realizadas por triplicado, Media \pm Desviación estándar, n=3).

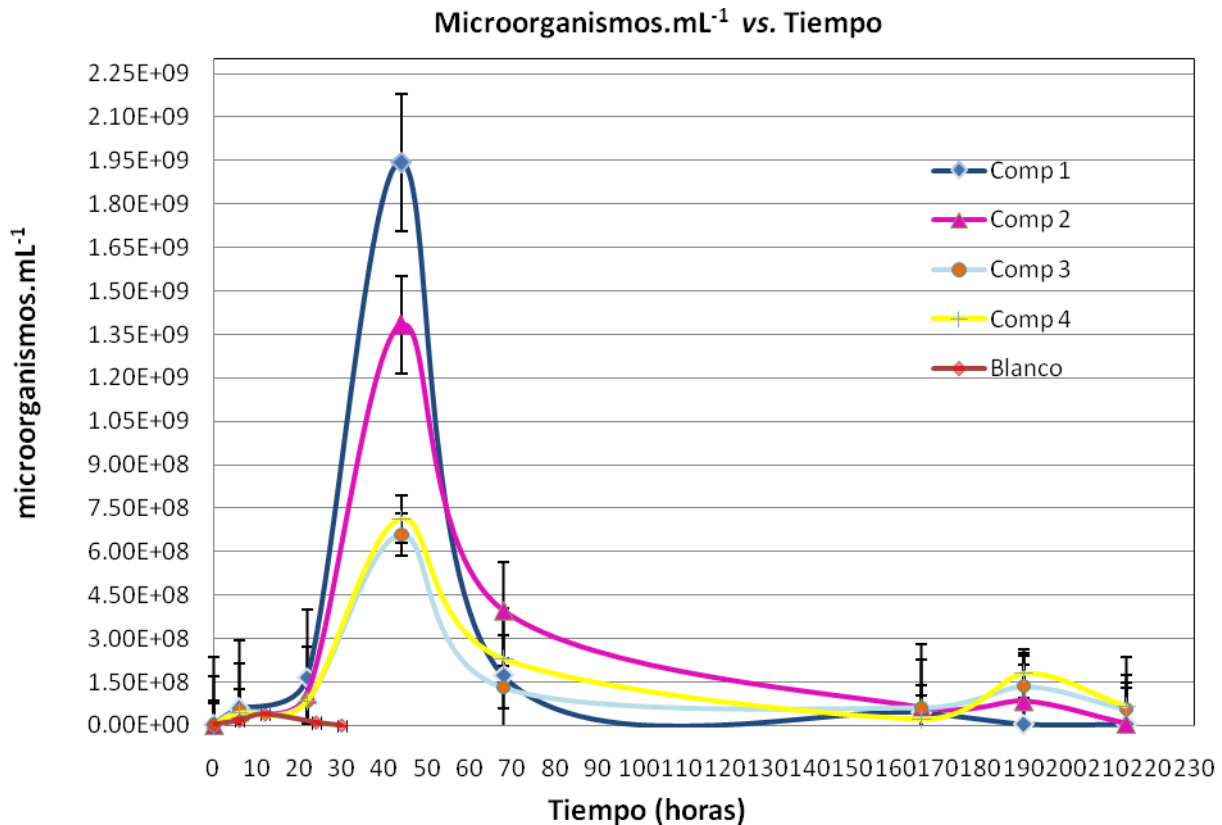


Figura 4.16 Crecimiento bacteriano de la cepa *Alicyclophilus sp.* en presencia de compuestos de uretano a distintos tiempos de incubación.

En la figura 4.16 se observa un período de adaptación de la cepa al MM y luego un período de máxima actividad que posteriormente decae. El tiempo de adaptación, de 0 a 22 h, en los cuatro casos podría ser debido al agotamiento de la fuente de carbono inicial, proveniente del inóculo, el cual estaba presente en el medio mínimo del cultivo que se preparó a partir del cultivo inicial, (12 h de incubación), y por lo tanto, al agotarse dicho nutriente el metabolismo de las células comienza a adaptarse a los nuevos nutrientes, compuestos de uretano, adicionados al medio. Dicha observación puede confirmarse con la curva de crecimiento bacteriano sin presencia de compuesto de uretano, es decir el blanco, en donde el agotamiento de los nutrientes provenientes del medio de cultivo inicial es a partir de 12 h de incubación y posterior a esto, las bacterias comienzan a morir. La tendencia que se observa por igual para los cuatro compuestos de uretano antes de las 12 h de incubación es similar que el blanco, no hay diferencias significativas en el crecimiento ($p < 0.05$), siendo esto un indicativo de que los experimentos realizados presentan el mismo comportamiento para cada uno de los casos al reproducirse la tendencia de crecimiento sin compuesto vs. crecimiento con compuesto.

La fase de crecimiento comienza a partir de las 20 h de incubación para los cuatro compuestos de uretanos (Fig. 4.16), presentando un máximo a las 44 h de incubación. En este período se están consumiendo los nutrientes presentes en el medio, dichos nutrientes podrían ser las moléculas de menor peso molecular obtenidas debido a la hidrólisis no enzimática y/o enzimática. Haciendo un comparativo de la curva de crecimiento sin compuesto de uretano *vs.* las curvas de crecimiento en presencia de compuestos de uretano, las células bacterianas sobreviven pasadas las 12 h de incubación en presencia de dichos compuestos; por lo tanto hay un crecimiento distinto, siendo esto un indicativo de que las bacterias están consumiendo probablemente a los productos obtenidos por degradación (debido al medio acuoso) y/o biodegradación (debido a la actividad enzimática) de los compuestos de uretano.

Pasado el tiempo de las 44 h se espera observar una fase estacionaria en la cual haya liberación y acumulación de metabolitos producidos por una posible catálisis enzimática, por esta razón se tomaron alícuotas a los diferentes tiempos de incubación. Las curvas de crecimiento de los cuatro compuestos de uretano no presentan una fase estacionaria prolongada y la posible razón es que los tiempos propuestos para llevar a cabo el seguimiento durante dicha fase quizá no fueron los más adecuados; aunque por otro lado también se puede considerar la ausencia de una fase estacionaria prolongada debido a un posible agotamiento rápido de los nutrientes que provienen de la hidrólisis no enzimática y/o enzimática de los compuestos de uretano, los cuales son de bajo peso molecular y de polidispersidades grandes, considerándolos como posibles fuentes de carbono que están en baja concentración. Finalmente, se puede observar la fase de muerte en la cual hay una notable reducción del número de bacterias viables en el medio de cultivo, sin embargo, para el caso de los compuestos de BHET-MDI a partir de 190 h de incubación hay un pequeño incremento de bacterias, no es el mismo caso para los compuestos con BHEA-MDI, dicho incremento puede deberse a células que quizá se están adaptando a los posibles residuos de material, dichos “residuos” podrían ser las regiones cristalinas o redes, debidas al tipo de estructura química de dichos materiales, estas regiones en un principio son difíciles de ser degradadas por las enzimas debido a su poca flexibilidad en la cadena, sin embargo, con la ayuda de la hidrólisis, debida al medio acuoso, permite que penetren las moléculas de agua y poco a poco estas regiones pueden incrementar su volumen libre y así ser atacadas por las enzimas para poder ser degradadas.

Los compuestos sometidos a biodegradación presentan algunas diferencias significativas ($p < 0.05$) para ciertos tiempos de incubación a partir de las 44 h, dichas diferencias podrían deberse a lo siguiente:

1. Los compuestos de BHEA-MDI presentan valores de pesos moleculares menores y de polidispersidad mayor comparados con los compuestos de BHET-MDI, lo cual, tiene un efecto en el grado de biodegradación, la cual, incrementa conforme el peso molecular decrece; ya que los materiales de bajo peso molecular son más hidrofílicos debido a su alto porcentaje de grupos terminales hidrofílicos y dicha hidrofiliidad permite una penetración mayor de agua hacia el interior del material acelerando la biodegradación, por esa razón, se puede observar que los materiales sintetizados a partir de BHEA-MDI presentan ligeramente un máximo mayor de crecimiento al tiempo de las 44 horas que los compuestos de BHET-MDI.

2. Es muy importante considerar las características químicas de los materiales sometidos a la biodegradación. El compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) presenta un punto de fusión bajo (56.5 °C) comparado con el compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) el cual tiene un mayor punto de fusión (111.3 °C), siendo más susceptible a la catálisis enzimática el material que tiene menor punto de fusión, ya que la temperatura de fusión está relacionada con la temperatura de cristalización (T_c): $T_c/T_m = C/(C+1)$, y la temperatura de transición vítrea (T_g)⁽⁹⁹⁾, (ver sección **1.5**, **Ec.1** y **Ec.2**), mostrándose por lo tanto un mayor crecimiento bacteriano para BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) en comparación con el compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1). La naturaleza semicristalina de los materiales BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) y BHET-MDI (NCO/OH 2:1), es otro factor a considerar en las tendencias de las curvas de crecimiento, sin embargo, es muy sutil la influencia de ésta, ya que se hubiera esperado que los materiales amorfos (BHEA-MDI y BHET NCO/OH 1:2), se degradaran en menor tiempo, pero para los cuatro casos el valor máximo de crecimiento es a las 44 horas de incubación y pasado este tiempo decrece con una tendencia similar, siendo ligeramente menor el número de muerte celular para los semicristalinos, ya que la degradación en materiales semicristalinos ocurre primero en la región amorfa y posteriormente en la red cristalina, por lo tanto, la hidrólisis enzimática será más lenta que en la región amorfa.

3. El valor de la temperatura de transición vítrea (T_g), debida a la presencia de la región amorfa del material, refleja la movilidad de la cadena y esto determina la facilidad con la que puede penetrar la enzima o las moléculas del agua mediante difusión, así que para el caso de los materiales que presentaron valores bajos de T_g los cuales son los compuestos BHEA-MDI y BHET-MDI con relación NCO/OH 1:2 poseen mayor movilidad para poder conformarse de tal forma que la hidrólisis química o enzimática sea más rápida, sin embargo, no se observó un crecimiento bacteriano mucho mayor para dichos compuestos comparado con los compuestos con altos valores de T_g . A pesar de no haber observado claras diferencias de crecimiento bacteriano con base a lo mencionado anteriormente, es importante considerar la posible influencia de los factores como: peso molecular, orientación de las cadenas, volumen libre, y entrecruzamiento de los cuales puede depender la posible degradación y/o biodegradación del material.⁽⁹⁷⁾

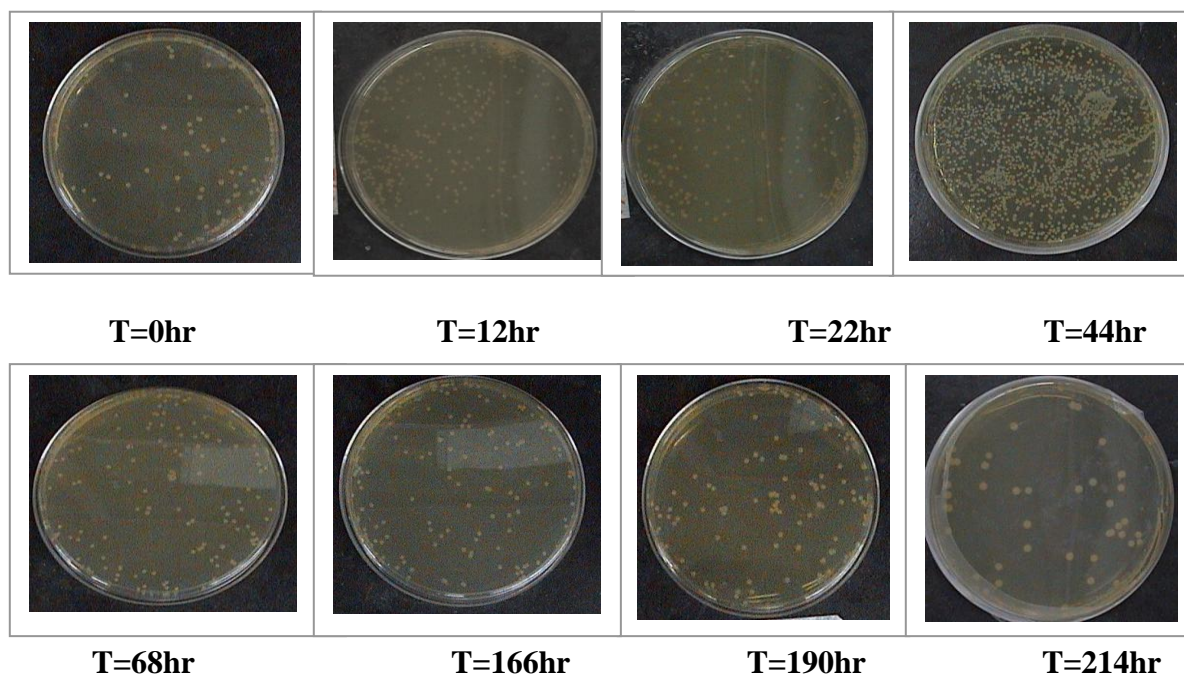


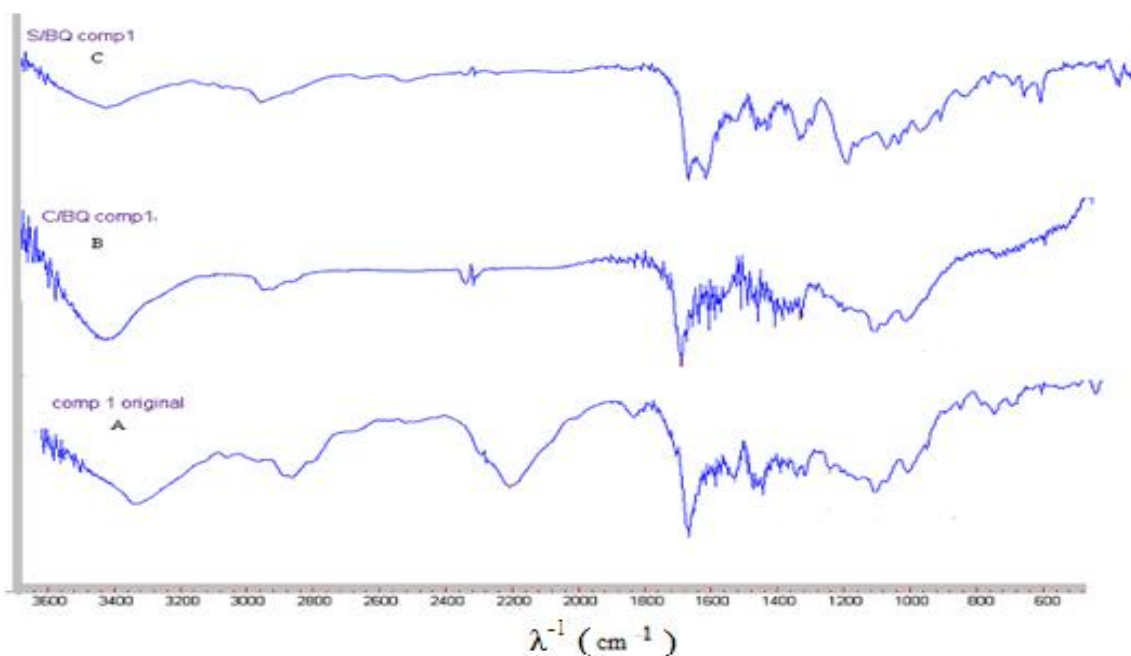
Figura 4.17 Imágenes de cajas petri con LB sólido para la cuenta en placa del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) a diferentes tiempos de incubación.

4.4.2 Análisis de los compuestos de uretano al término del tiempo de incubación.

Una vez finalizado el tiempo de incubación (214 h), se filtró cada uno de los compuestos sintetizados presentes en el medio mínimo, para ser caracterizados mediante las técnicas de IR, TGA, DSC y GPC, y así comparar los resultados obtenidos antes y después de someterlos a hidrólisis enzimática y no enzimática.

4.4.2.1 Análisis mediante IR.

Una vez que se concluyó el tiempo propuesto de incubación de los materiales (214 h), se filtró el medio de cultivo y el sólido obtenido se lavó y secó a vacío durante 48hr. Pasado este tiempo, se procedió a caracterizar el material sólido que fue incubado en presencia de la cepa bacteriana, así como el material que fue incubado en medio mínimo sin cepa bacteriana, obteniendo los siguientes espectros:

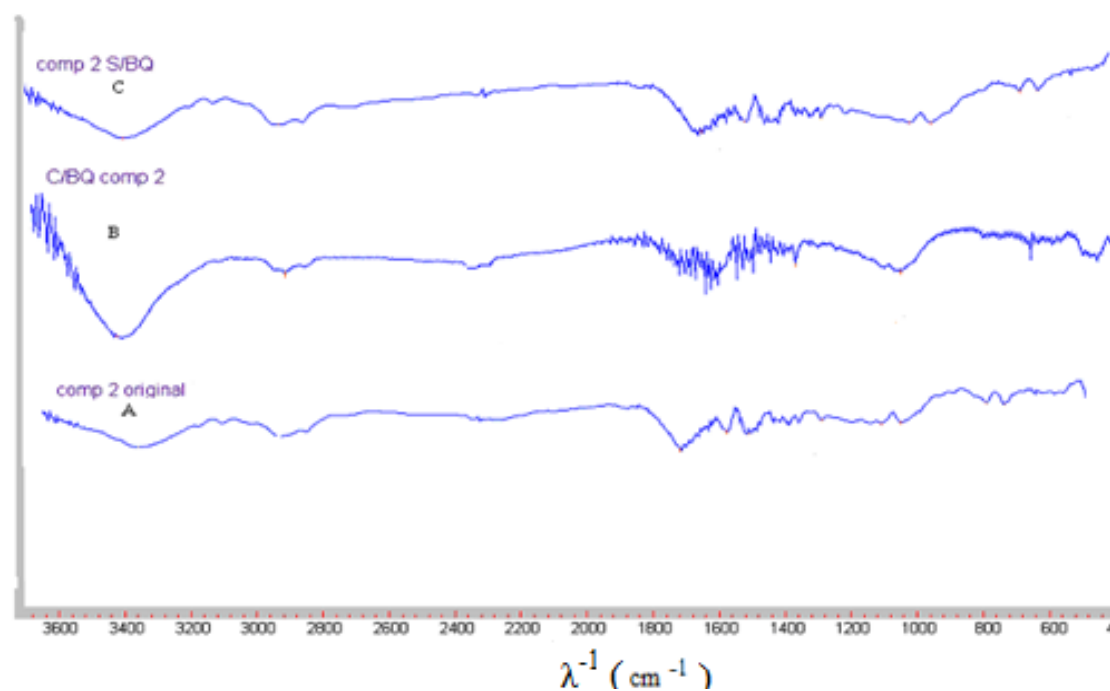


A= Compuesto antes de degradar, B= Compuesto en MM + cepa bacteriana, C= Compuesto únicamente en MM sin cepa bacteriana.

Figura 4.18 Espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.

En la figura 4.18 se presentan los espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) correspondientes a los tres casos siguientes: **A**, compuesto antes de ser degradado, **B**, compuesto en MM + cepa bacteriana, **C**, compuesto en MM sin cepa bacteriana. Se observa en el espectro correspondiente al compuesto sin degradar la banda correspondiente al grupo isocianato en la región de $\sim 2200 \text{ cm}^{-1}$, la cual, no aparece en los espectros **B** y **C** debido a la hidrólisis de dicho grupo por la presencia del agua en el medio. En la región de $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$, se observa que para el caso del material sometido a la bacteria, espectro **B**, presenta una señal pronunciada, lo cual podría deberse a la presencia de grupos OH de posibles compuestos que se pudieron formar durante la biodegradación, así como también se podría considerar la presencia del enlace N-H proveniente de la amida que pudo formarse como producto de hidrólisis del grupo uretano y/o isocianato.

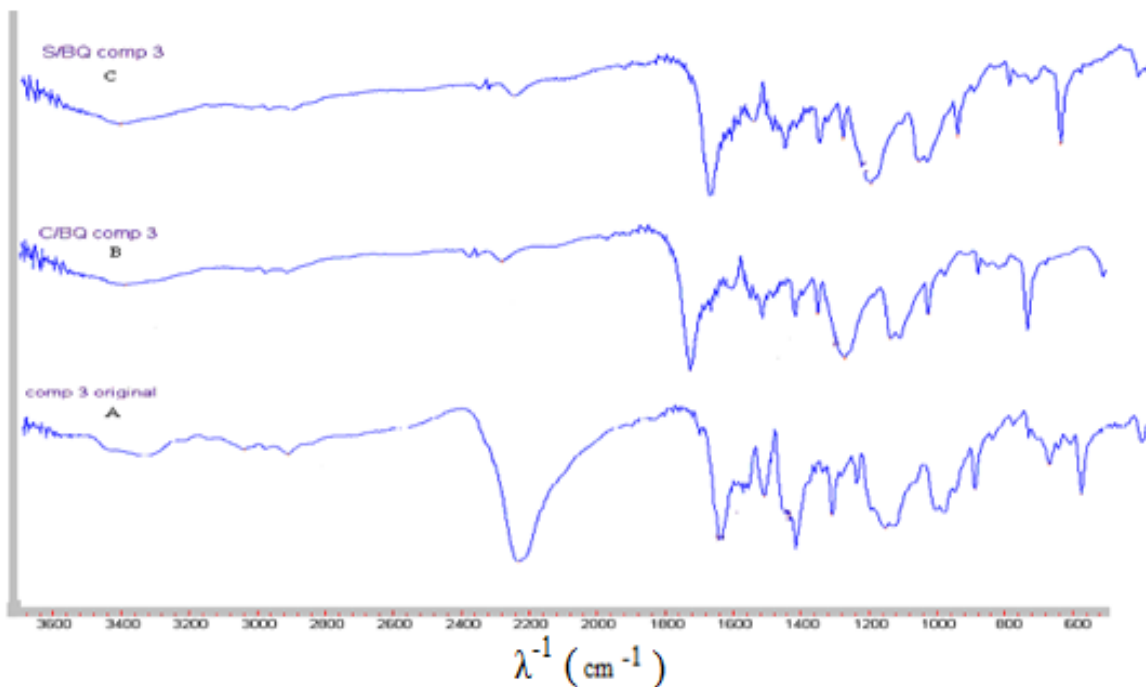
Para el caso de la banda correspondiente al enlace C=O en la región de $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ proveniente del grupo éster, se puede observar, un disminución en la intensidad de dicha señal para el caso correspondiente al material sometido a biodegradación, espectro **B**, sin embargo, para el caso del material sometido únicamente a hidrólisis química, espectro **C**, la señal en esta región presenta dos señales; posiblemente debido a la presencia de distintos compuestos con enlaces C=O.



A= Compuesto antes de degradar, B= Compuesto en MM + cepa bacteriana, C= Compuesto únicamente en MM sin cepa bacteriana.

Figura 4.19 Espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.

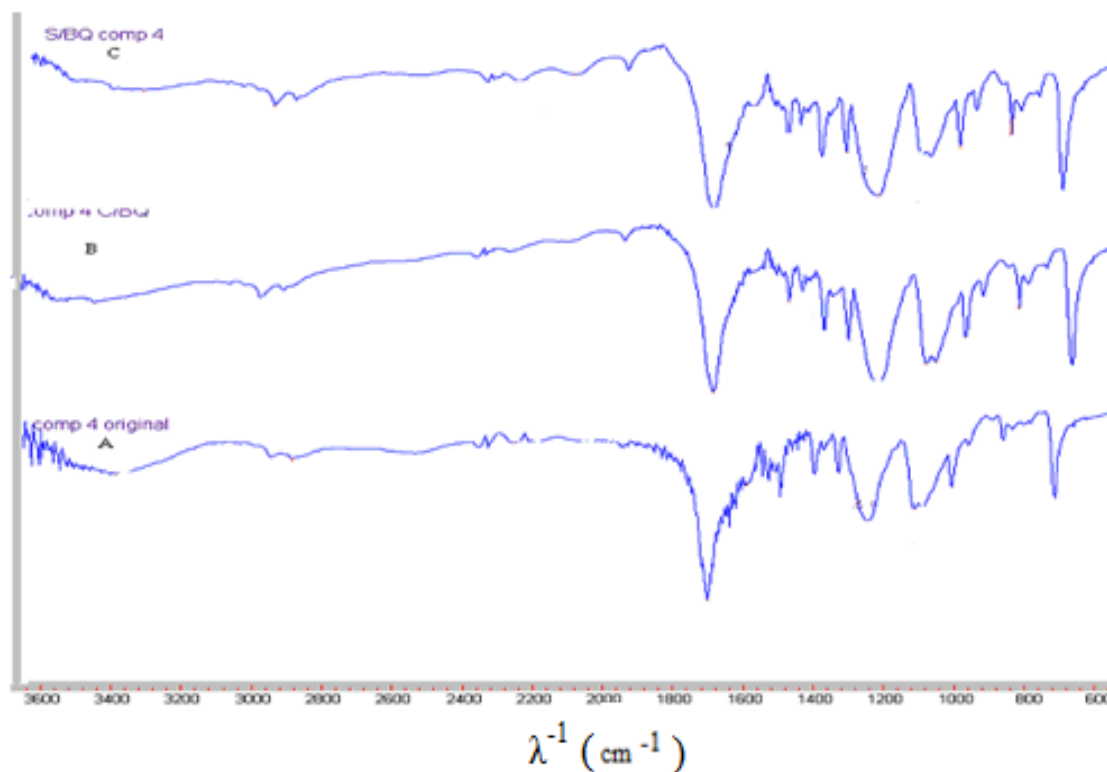
En la figura 4.19 se presentan los espectros de IR del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) correspondientes a los tres casos siguientes: **A**, compuesto antes de ser degradado, **B**, compuesto en MM + cepa bacteriana, **C**, compuesto en MM sin cepa bacteriana. Se pueden observar las diferencias correspondientes en las regiones de $\sim 3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ siendo para la primera región una variación en la señal debida a la posible formación del enlace N-H presente en un posible compuesto formado con el grupo amida siendo más intensa la señal en el espectro **B**. Para el caso de la segunda región mencionada se observa una disminución de intensidad de la banda correspondiente al grupo C=O en el espectro **B**, también se puede observar una diferencia entre el espectro **A** y **B** en la región de $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a enlaces C-H, debido a la posible formación de compuestos con cadenas cortas como alcoholes.



A= Compuesto antes de degradar, B= Compuesto en MM + cepa bacteriana, C= Compuesto únicamente en MM sin cepa bacteriana.

Figura 4.20 Espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.

En la figura 4.20 se presentan los espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) correspondientes a los tres casos siguientes: **A**, compuesto antes de ser degradado, **B**, compuesto en MM + cepa bacteriana, **C**, compuesto en MM sin cepa bacteriana. En el espectro **A** en la región de $\sim 2200 \text{ cm}^{-1}$ aparece la señal correspondiente al grupo isocianato, para los espectros **B** y **C** dicha señal desaparece debido a la hidrólisis química del grupo. Por otro lado en los espectros **B** y **C**, la región de $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al enlace C=O tuvo un desplazamiento a una mayor longitud de onda en comparación con el espectro del compuesto sin biodegradar, sin embargo, la banda del grupo éster aun está presente después de llevar a cabo las pruebas de degradación con y sin bacteria.



A= Compuesto antes de degradar B= Compuesto en MM + cepa bacteriana C= Compuesto únicamente en MM sin cepa bacteriana

Figura 4.21 Espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.

En la figura 4.21 se presentan los espectros de IR del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) correspondientes a los tres casos siguientes: **A**, compuesto antes de ser degradado, **B**, compuesto en MM + cepa bacteriana a hidrólisis enzimática; **C**, compuesto en MM sin cepa bacteriana. En los espectros **B** y **C** se observa una diferencia en la región de $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ siendo menos intensa la señal en ambos casos en comparación con el espectro **A**. Por otro lado la región de $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al enlace C=O aun está presente después de llevar a cabo las pruebas de degradación con y sin bacteria.

4.4.2.2 Análisis mediante DSC.

Los termogramas obtenidos mediante la técnica de DSC de los compuestos de uretano al término del tiempo de incubación se muestran en el apéndice B. No fue posible determinar los valores de temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y/o cristalización tanto para los materiales que fueron sometidos a hidrólisis enzimática (MM + cepa bacteriana), como los materiales sometidos únicamente a hidrólisis química (MM sin cepa bacteriana), ya que no se observan transiciones claramente definidas en los termogramas.

4.4.2.3 Análisis mediante TGA.

Los termogramas obtenidos al término del tiempo de incubación se presentan a continuación:

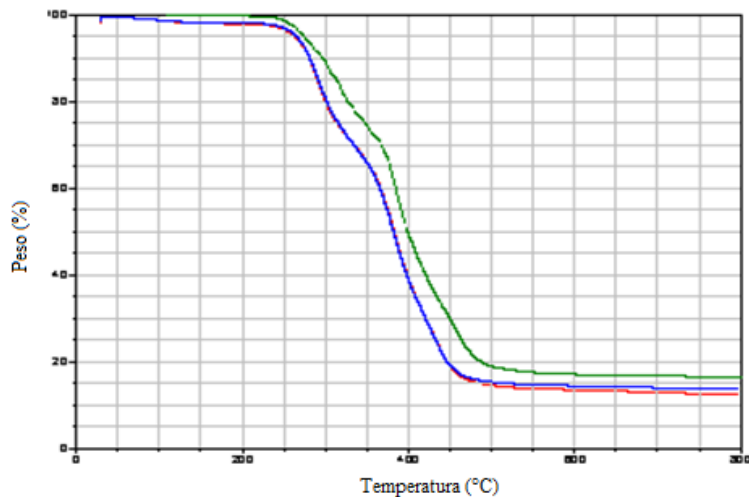


Figura 4.22 Análisis mediante TGA del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1). ■ Compuesto sin incubar, ■ Compuesto incubado en MM sin cepa bacteriana, ■ Compuesto incubado en MM + cepa bacteriana.

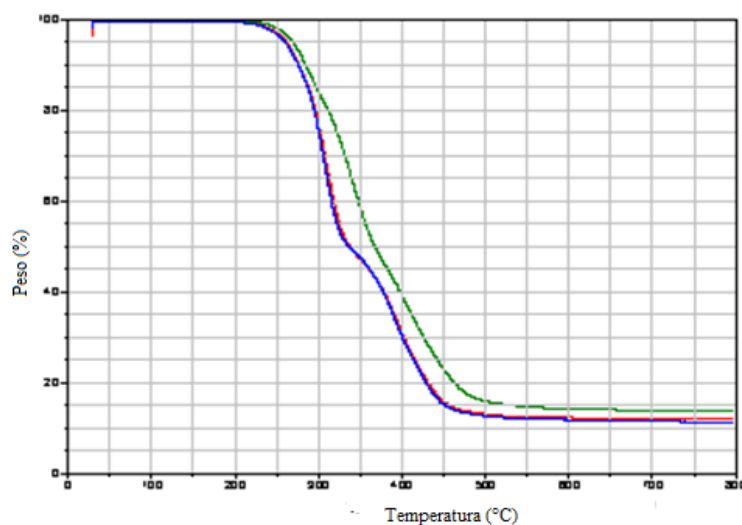


Figura 4.23 Análisis mediante TGA del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2). ■ Compuesto sin incubar, ■ Compuesto incubado en MM sin cepa bacteriana, ■ Compuesto incubado en MM + cepa bacteriana.

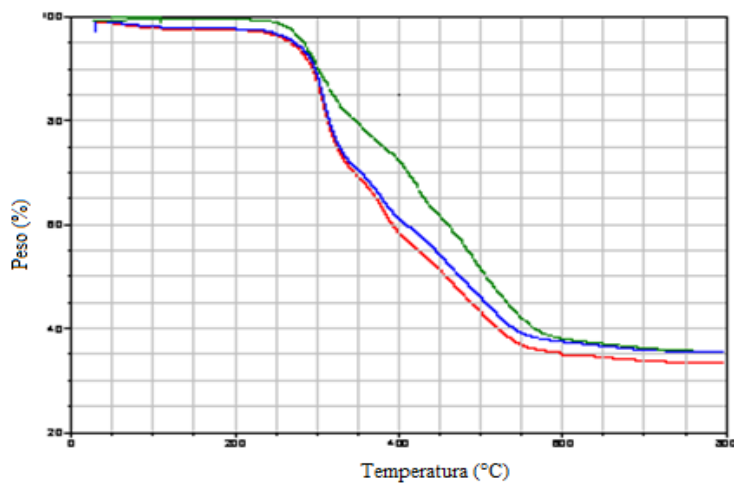


Figura 4.24 Análisis mediante TGA del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1). ■ Compuesto sin incubar, ■ Compuesto incubado en MM sin cepa bacteriana, ■ Compuesto incubado en MM + cepa bacteriana.

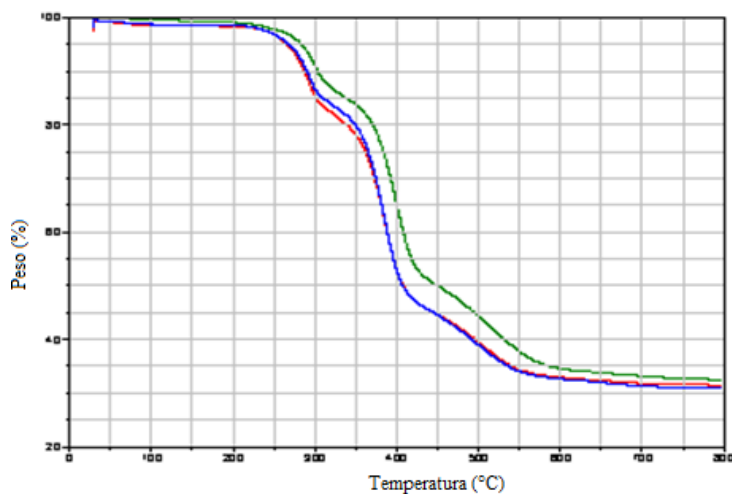


Figura 4.25 Análisis mediante TGA del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2). ■ Compuesto sin incubar, ■ Compuesto incubado en MM sin cepa bacteriana, ■ Compuesto incubado en MM + cepa bacteriana.

Con base a los resultados obtenidos mediante TGA de los cuatro compuestos de uretano se observa lo siguiente:

1. Los compuestos incubados en MM + cepa bacteriana (■) vs. los compuestos incubados únicamente en MM sin cepa bacteriana (■), presentan un comportamiento similar en cuanto a la pérdida de peso con respecto a la temperatura. Sin embargo, se estimaba una diferencia marcada entre ellos, esperando que los termogramas correspondientes a los compuestos incubados con la bacteria mostraran pérdida de peso a menor temperatura (< 250°C).
2. Los termogramas correspondientes a los cuatro compuestos de uretano incubados en MM + cepa bacteriana (■) vs. los termogramas correspondientes a los compuestos sin incubar (■), presentan una diferencia de temperatura en promedio de 50°C menos durante la descomposición de los materiales.
3. Mediante la comparación de los termogramas obtenidos antes y después de las pruebas de degradación se puede estimar que hubo cambios en todos los compuestos incubados, tanto los inoculados con cepa como los no inoculados, ya que se requirió suministrar menor temperatura, a partir de los ~ 250°C, para alcanzar su descomposición.

4.4.2.4 Análisis del peso molecular promedio mediante GPC.

Una vez concluido el tiempo de incubación de cada uno de los materiales en medio mínimo, en presencia y ausencia de la cepa bacteriana, se filtraron y se llevaron a sequedad para realizar el análisis de sus pesos moleculares mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). Éstos fueron disueltos en DMSO y se aforó cada una de las disoluciones con THF hasta 10 mL para obtener la concentración deseada de 1000 mg. L⁻¹. La tabla 4.15 muestra los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración, realizada con estándares de poliestireno de distintos pesos moleculares que van del rango de 162 a 21,000 Da. Ver apéndice D.

En la tabla 4.15 se observan los valores de M_w ($\bar{x} \pm \sigma$) y M_w/M_n ($\bar{x} \pm \sigma$) obtenidos de las tres réplicas experimentales de degradación; antes y después del tiempo de incubación de cada uno de los materiales. Dichos resultados, muestran que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados obtenidos de las pruebas de degradación en MM + cepa bacteriana vs. los valores obtenidos antes de dichas pruebas (material sin incubar) para los compuestos BHET- MDI NCO/OH 1:2 y 2:1 así como para el material BHEA-MDI NCO/OH 2:1. Para el caso de los valores obtenidos de M_w ($\bar{x} \pm \sigma$) a partir de las pruebas en MM sin bacteria vs. material con bacteria se observa que los compuestos BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), BHET-MDI (NCO/OH 1:2) y BHET-MDI (NCO/OH 2:1) no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), sin embargo, para el compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) sí hay diferencia significativa entre los valores obtenidos antes de ser incubado y después de ser incubado sin cepa bacteriana. Por consiguiente para este compuesto en particular se podría decir que hay degradación debida principalmente al medio de incubación (MM), ya que presenta grupos hidrolizables en medio acuoso; siendo el isocianato el grupo más susceptible a la hidrólisis.

Tabla 4.15 Análisis mediante GPC de los pesos moleculares de los compuestos de uretano al inicio y término del tiempo de incubación.

Compuesto de uretano	M_w (Da) $\bar{x} \pm \sigma$			Mw/Mn		
	sin incubar	Con cepa	sin cepa	sin incubar	Con cepa	sin cepa
BHEA-MDI (NCO/OH 2:1)	$1.11 \times 10^3 \pm 3.09 \times 10^1$	$1.10 \times 10^3 \pm 5.41 \times 10^1$	$1.02 \times 10^3 \pm 5.67 \times 10^1$	3.5 ± 0.78	2.8 ± 0.93	3.1 ± 0.61
BHEA-MDI (NCO/OH 1:2)	$0.87 \times 10^3 \pm 1.27 \times 10^1$	$0.83 \times 10^3 \pm 3.80 \times 10^1$	$0.72 \times 10^3 \pm 4.71 \times 10^1$	2.8 ± 0.89	1.2 ± 0.38	1.5 ± 0.24
BHET-MDI (NCO/OH 2:1)	$1.44 \times 10^3 \pm 3.02 \times 10^1$	$1.59 \times 10^3 \pm 5.60 \times 10^1$	$1.38 \times 10^3 \pm 5.94 \times 10^1$	1.8 ± 0.43	3.1 ± 0.29	2.0 ± 0.26
BHET-MDI (NCO/OH 1:2)	$1.28 \times 10^3 \pm 2.28 \times 10^1$	$1.31 \times 10^3 \pm 3.36 \times 10^1$	$1.24 \times 10^3 \pm 2.38 \times 10^1$	1.2 ± 0.43	1.8 ± 0.24	3.5 ± 0.49

($\bar{x} \pm \sigma$, Media \pm Desviación estándar, n=3)

4.4.3 Identificación de los productos de biodegradación.

4.4.3.1 Análisis del medio de incubación mediante GC-MS a distintos tiempos de incubación.

El análisis y cuantificación de los productos liberados hacia el medio de incubación, provee información acerca del posible modo de acción de la enzima en el material permitiendo deducir cuales son los enlaces más susceptibles del compuesto durante la biodegradación. La técnica de GC-MS ha sido empleada en el aislamiento e identificación de los posibles productos de biodegradación. Se tomaron alícuotas de los cultivos a diferentes tiempos de incubación, las cuales se extrajeron y analizaron mediante la técnica descrita en la sección 3.4.5.1 y 3.4.5.2. A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a las alícuotas tomadas a determinado tiempo de incubación (> 20 h, ya que en los cromatogramas correspondientes tanto para los estudios realizados con y sin cepa bacteriana a un menor tiempo de incubación no se observaron picos), los espectros de masas de dichos análisis se presentan en el apéndice C:

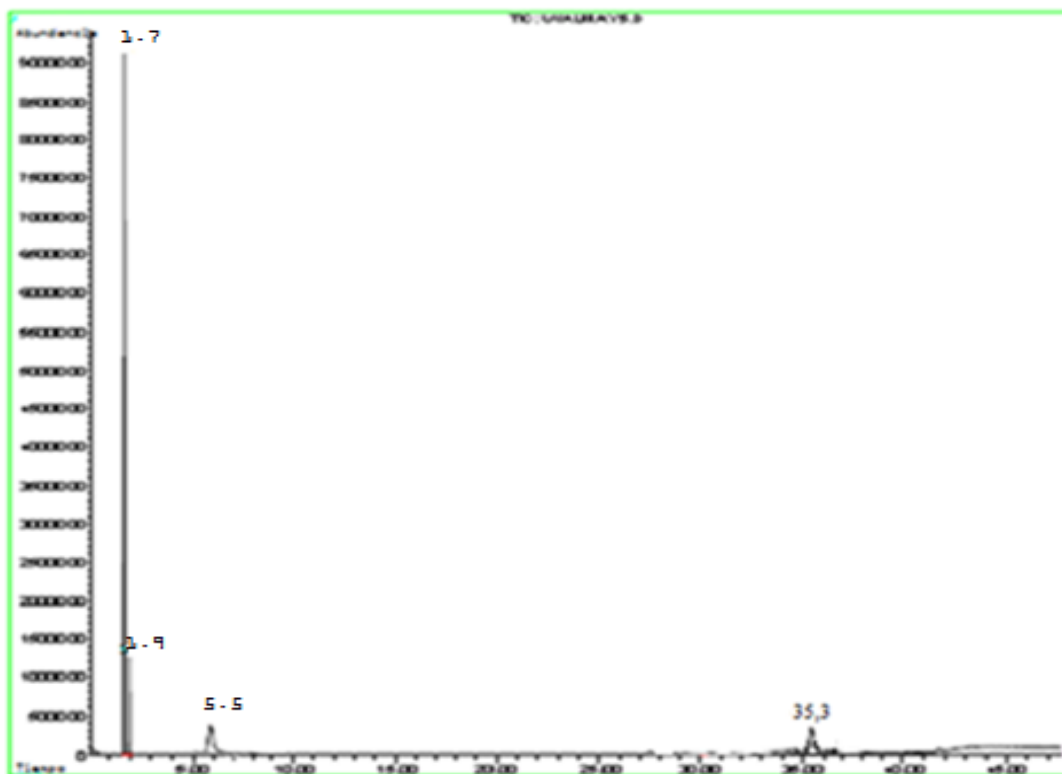


Figura 4.26 Cromatograma mediante GC-MS de la alícuota extraída del MM a las 22 h de incubación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) en MM sin cepa bacteriana.

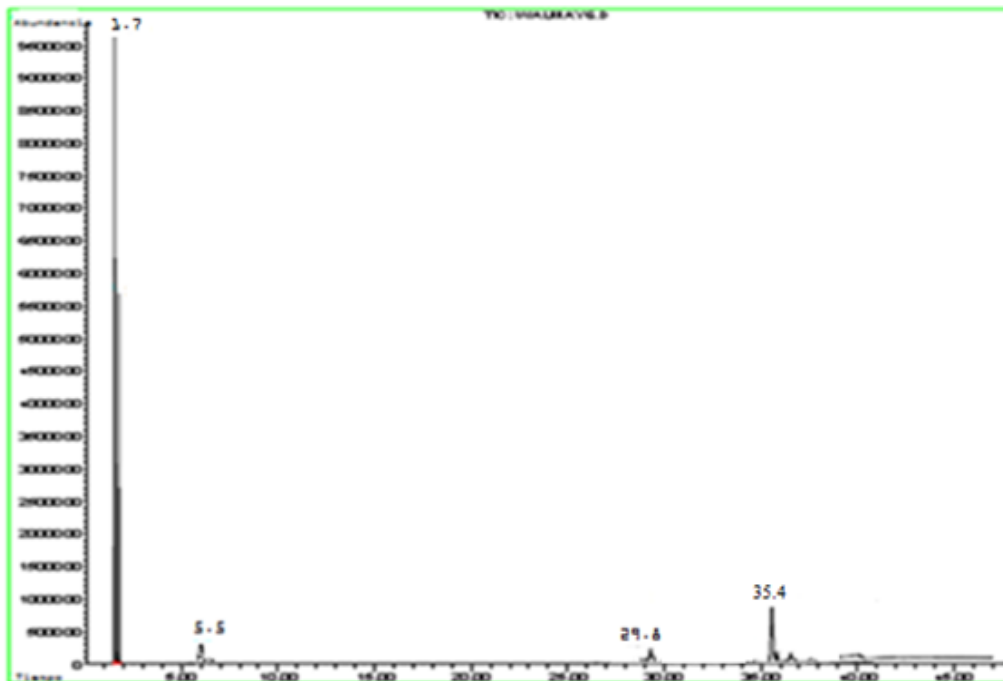


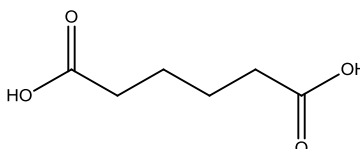
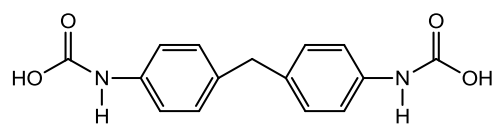
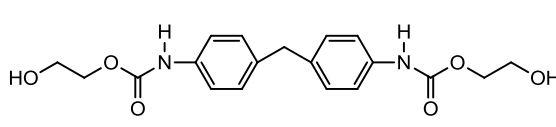
Figura 4.27 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM + cepa bacteriana.

Haciendo una comparación del cromatograma obtenido del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) en MM sin cepa *vs.* compuesto en MM + cepa bacteriana a las 22 horas de incubación, se puede observar que en la figura 4.26, el pico correspondiente al tiempo de retención de 5.5 minutos quizá corresponda al producto obtenido de la hidrólisis del grupo éster terminal, generando un ácido de bajo peso molecular (146 g. mol^{-1} , ver apéndice C). El pico correspondiente al tiempo de retención de ~ 35 minutos para ambos cromatogramas se debe a la presencia de un compuesto cuyo peso molecular es de 374 g. mol^{-1} . El pico correspondiente al tiempo de retención de 29.8 minutos presente en la figura 4.27 corresponde a un compuesto de 286 g. mol^{-1} el cual pudo haberse obtenido debido a la posible hidrólisis del grupo uretano en presencia de la cepa a pesar de que se detectó únicamente actividad tipo esterasa.⁽¹⁵⁾

Dichos cromatogramas permiten determinar cuál es la influencia del medio acuoso en la hidrólisis del compuesto de uretano. Al presentar el compuesto segmentos “blandos”, los cuales son hidrofílicos, pudieron haber sido hidrolizados a partir de cierto tiempo de incubación por acción del medio acuoso, el cual pudo haberse acidificado, a pesar de que se iniciaron las pruebas de degradación a $\text{pH} = 7$, habiéndose modificado dicho pH después de cierto tiempo con la posible presencia o liberación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular hacia el medio.⁽¹⁰¹⁾

Mediante los análisis GC-MS de la alícuota obtenida a las 22 horas de incubación en presencia de la cepa bacteriana y sin cepa bacteriana, se propusieron las posibles estructuras descritas en la tabla 4.16, lo cual permitió a su vez, proponer un posible mecanismo de hidrólisis ya sea por acción enzimática y/o química durante las pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2), figura 4.28.

Tabla 4.16 Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados de las pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).

Peso molecular (g. mol ⁻¹)	Estructura química
146	
286	
374	

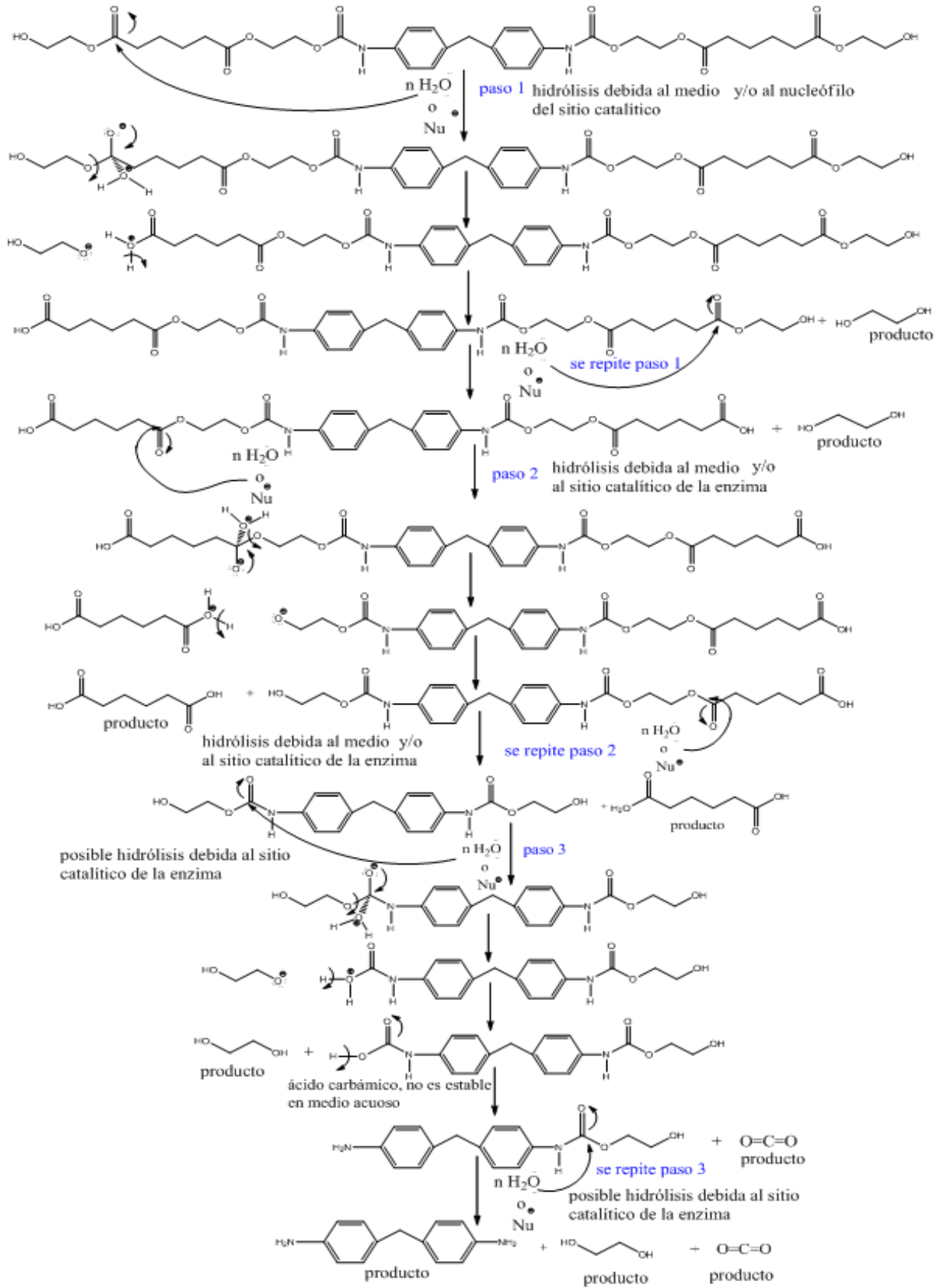


Figura 4.28 Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).

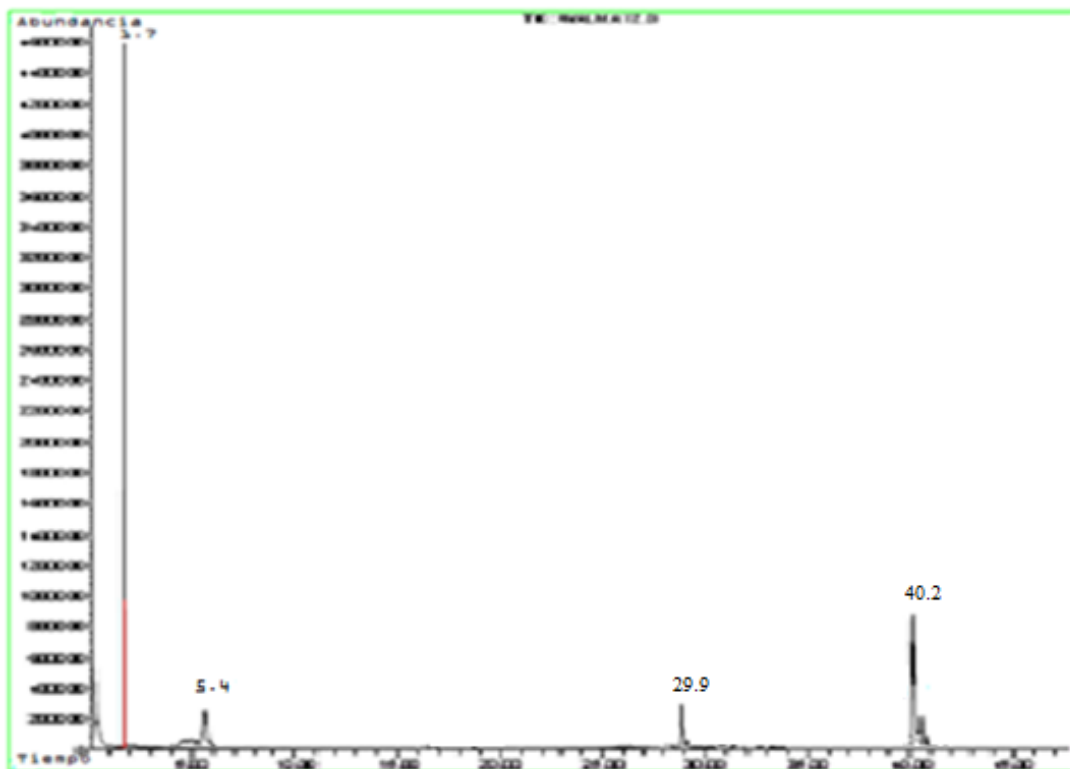


Figura 4.29 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM + cepa bacteriana.

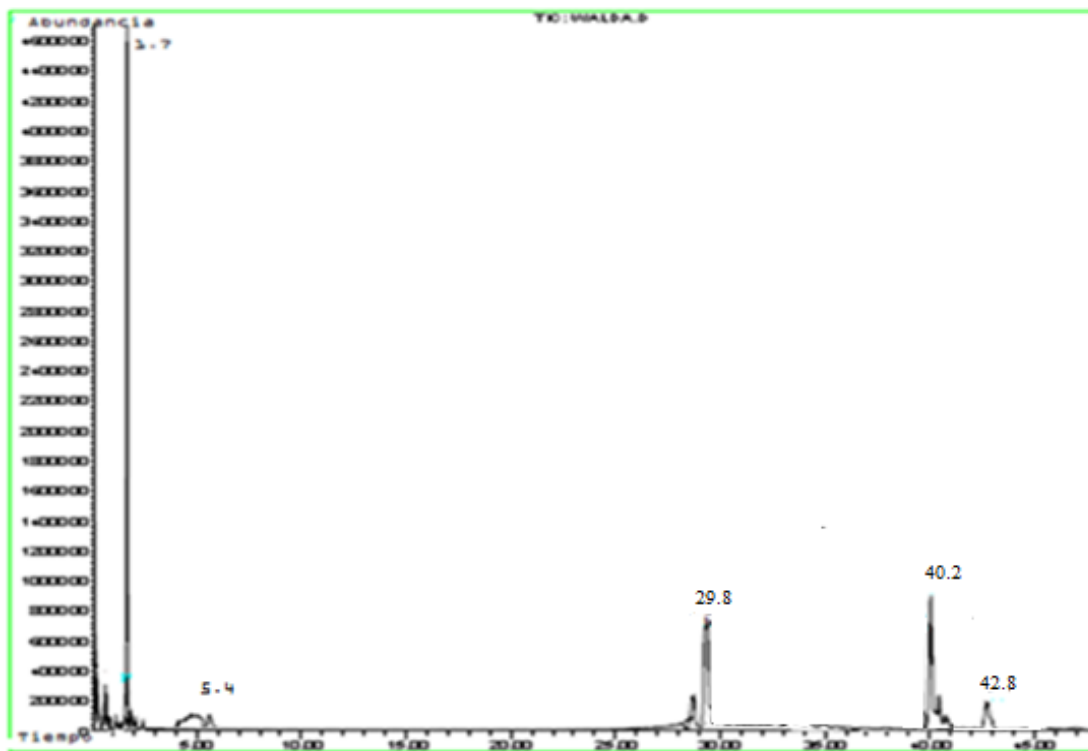
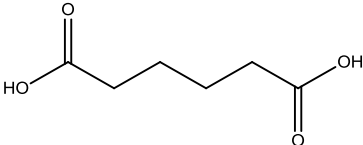
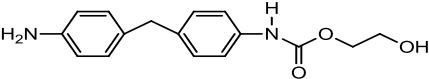
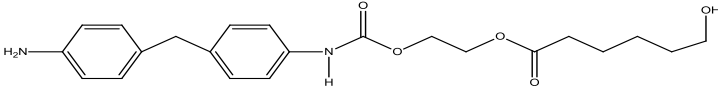
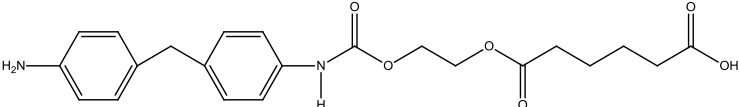


Figura 4.30 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 22 h del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM sin cepa bacteriana.

Mediante una comparación del cromatograma obtenido de la alícuota del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) en MM sin cepa *vs.* la alícuota del compuesto en MM + cepa bacteriana, se puede observar que en las figuras 4.29 y 4.30, el pico correspondiente al tiempo de retención de 5.4 minutos corresponde al metabolito de peso molecular de 146 g. mol⁻¹ obtenido quizá de la hidrólisis química y enzimática ya que aparece en mayor abundancia para el caso del estudio en presencia de la cepa. El pico correspondiente al tiempo de retención de ~ 29.9 minutos para ambos cromatogramas se debe a la presencia de un compuesto cuyo peso molecular es de 286 g. mol⁻¹. El pico correspondiente al tiempo de retención de 40.2 minutos corresponde a un compuesto de peso molecular de 400 g. mol⁻¹. En la figura 4.30 aparece un tercer pico a los 42.8 minutos de retención el cual corresponde a un compuesto de peso molecular de 413 g. mol⁻¹.

Con base a los cromatogramas obtenidos a las 22 horas de incubación: figura 4.29 y 4.30, se propusieron las estructuras descritas en la tabla 4.17, lo cual permitió a su vez, proponer un posible mecanismo de hidrólisis ya sea por acción enzimática y/o química (Fig. 4.31) durante las pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

Tabla 4.17 Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados de las pruebas de biodegradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

Peso molecular (g. mol ⁻¹)	Estructura química
146	
286	
400	
414	

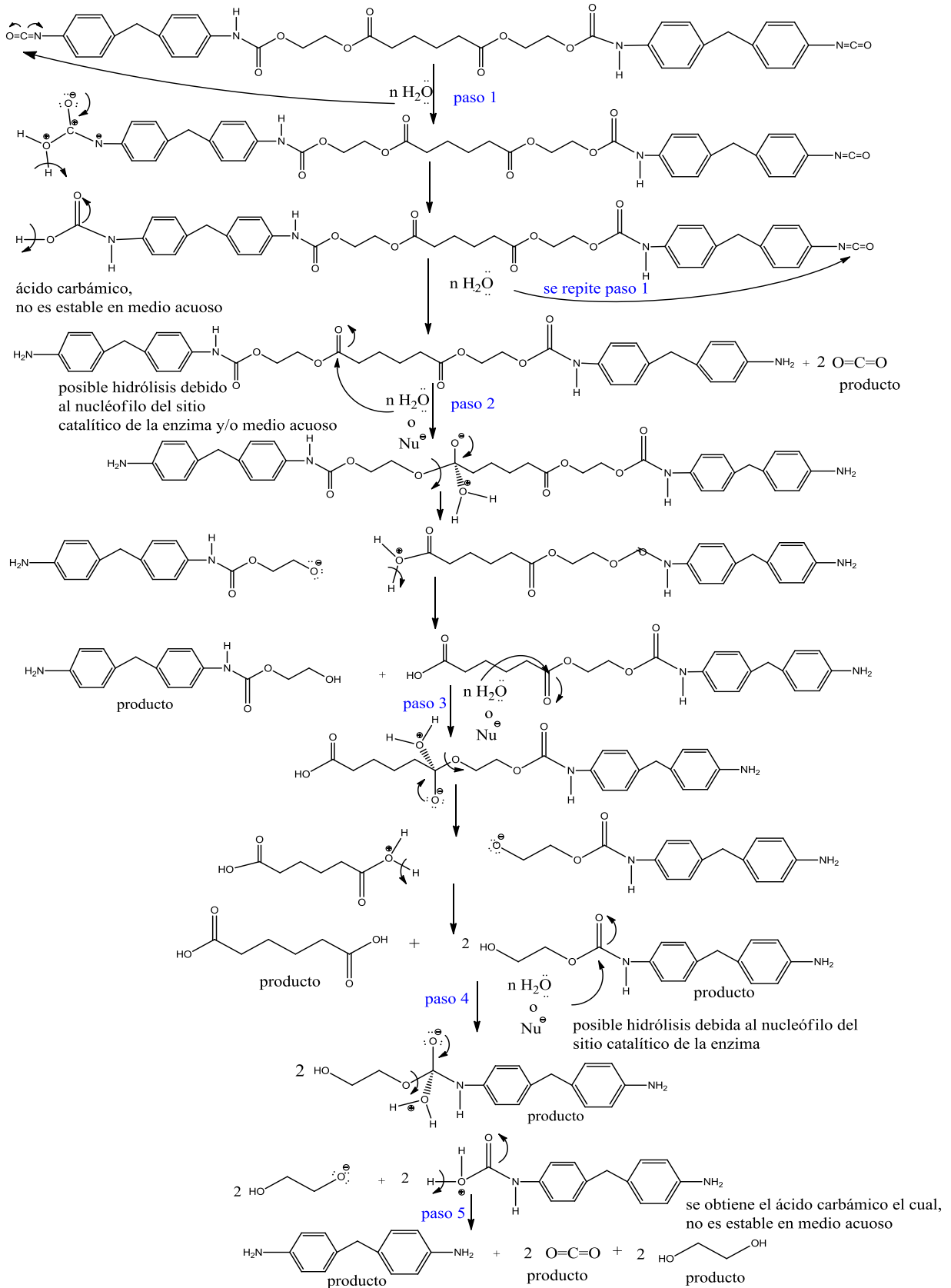


Figura 4.31 Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

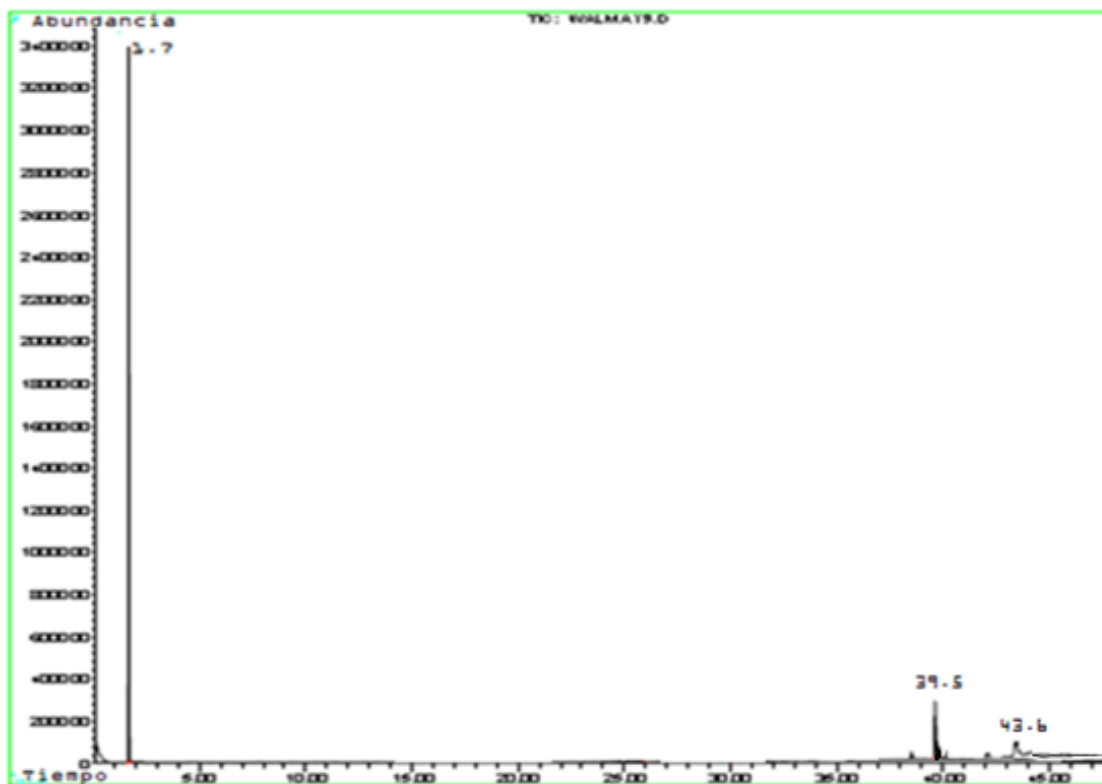


Figura 40.32 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM + cepa bacteriana.



Figura 40.33 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) incubado en MM sin cepa bacteriana.

Los cromatogramas correspondientes a las figuras 4.32 y 4.33 muestran las diferencias con respecto al tipo de tratamiento para el compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1), siendo que para el caso del tratamiento con cepa bacteriana (Fig. 4.32) se observa un pico a los 39.5 minutos el cual corresponde a un compuesto de peso molecular de 464 g. mol^{-1} , el cual, no está presente en el cromatograma obtenido de la alícuota del MM sin cepa bacteriana (Fig. 4.33) por lo que permite considerar la posible acción enzimática. El pico obtenido a los 43.6 minutos, para el caso del tratamiento con bacteria, corresponde a un producto cuyo peso molecular es 471 g. mol^{-1} . Par el caso de la figura 40.33 solo se observa un solo pico, el peso obtenido mediante MS es de 497 g. mol^{-1} .

Con base a los resultados en dichos cromatogramas podemos considerar que no tuvo la misma influencia el medio acuoso, como fue en los casos correspondientes a los compuestos BHEA-MDI, en la hidrólisis del material. Para el caso de la influencia de la bacteria en la degradación del material se observa que los pesos correspondientes a los picos en el cromatograma podemos suponer lo siguiente: A) los productos identificados mediante GC-MS pueden corresponder a segmentos de poliisocianato, ya que durante la síntesis del compuesto de uretano a biodegradar se empleó una relación de NCO/OH 2:1 habiendo reaccionado los grupos isocianato entre sí para formar poliisocianatos, por lo que es importante considerar que dichos metabolitos obtenidos quizá no son productos derivados de una hidrólisis enzimática dirigida hacia la matriz del material. B) los productos obtenidos quizá fueron obtenidos a partir de la hidrólisis del grupo uretano por acción enzimática. Al estar presente el anillo aromático del DMT en los compuestos de BHET-MDI, éste “protege” de la hidrólisis a los segmentos que contienen al grupo éster y a su vez, hace que sea electropositivo el carbón del grupo uretano y por lo tanto pueda ser más susceptible a la hidrólisis. No se determinaron las posibles estructuras de los productos de hidrólisis del material detectados mediante GC-MS.

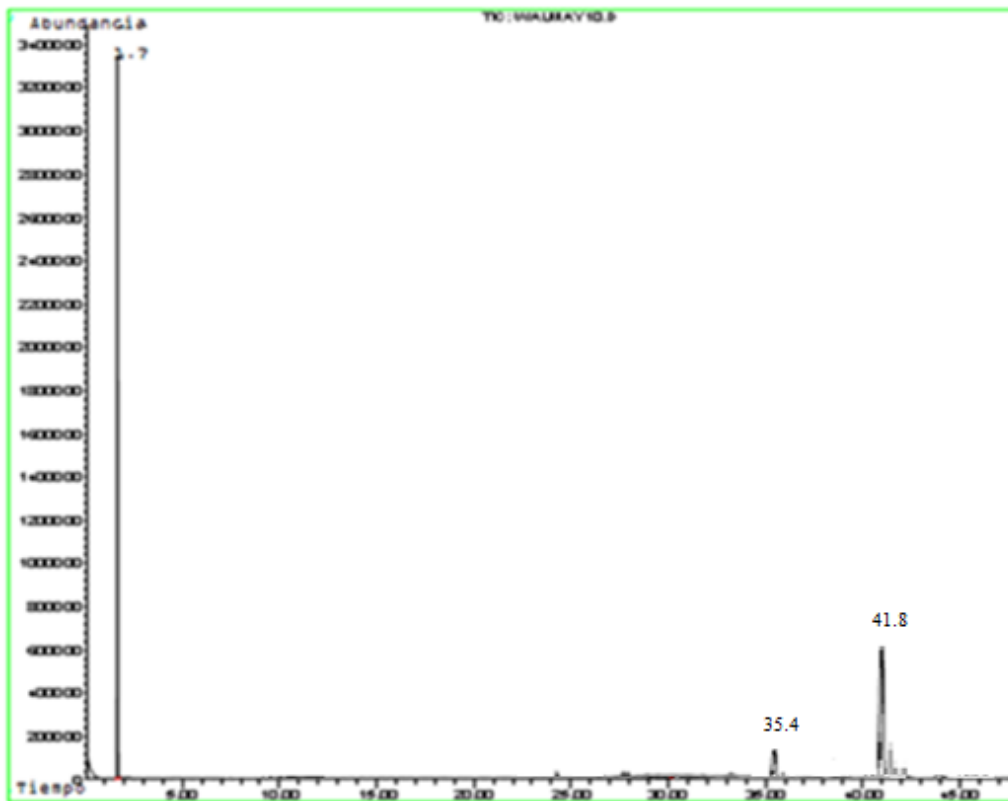


Figura 4.34 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM + cepa bacteriana.

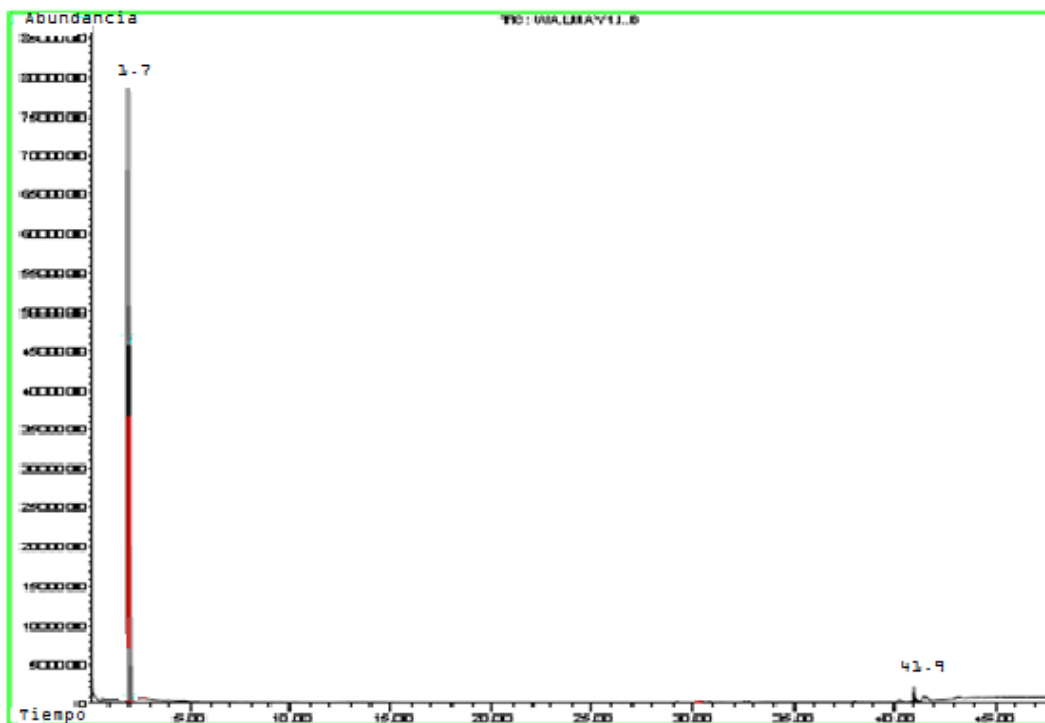
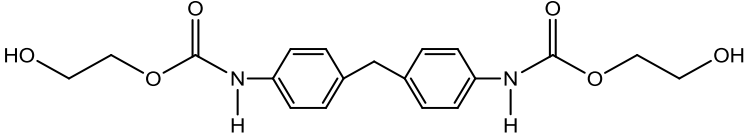
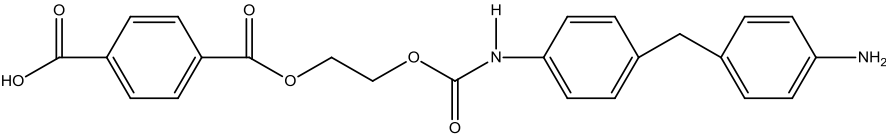


Figura 4.35 Cromatograma de la alícuota extraída del MM a las 44 h del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) incubado en MM sin cepa bacteriana.

Las figuras 4.34 y 4.35 muestran las diferencias con respecto al tipo de tratamiento para el compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2), siendo que para el caso del tratamiento con cepa bacteriana (Fig. 4.34) se observa un pico a los 35.4 minutos, peso molecular de 374 g. mol⁻¹. Los picos obtenidos a los ~ 41 minutos, para ambos casos, corresponde a un metabolito de 434 g. mol⁻¹.

Con base a los cromatogramas obtenidos a las 44 horas de incubación: figura 4.34 y 4.35, se propusieron las estructuras descritas en la tabla 4.18, lo cual permitió a su vez, proponer un posible mecanismo de hidrólisis durante las pruebas de biodegradación del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

Tabla 4.18 Estructuras químicas propuestas para los posibles productos aislados de las pruebas de biodegradación del compuesto BHET (NCO/OH 1:2).

Peso molecular (g. mol ⁻¹)	Estructura química
374	 <p>The structure shows a central diphenylmethane core. Each phenyl ring is connected via its para position to a secondary amide group (-NH-). Each amide group is further connected to a hydroxyethyl group (-O-CH₂-CH₂-OH).</p>
434	 <p>The structure shows a central diphenylmethane core. One phenyl ring is connected via its para position to a secondary amide group (-NH-), which is further connected to a hydroxyethyl group (-O-CH₂-CH₂-OH). The other phenyl ring is connected via its para position to a carbonyl group (-C(=O)-), which is further connected to another carbonyl group (-C(=O)-) that is attached to a 4-aminophenyl ring (-NH₂).</p>

En la figura 4.36 se presenta el posible mecanismo de hidrólisis del material que pudo haberse llevado a cabo para la obtención de los metabolitos detectados mediante GC-MS. Se esperaba identificar como posibles metabolitos al monoetilenglicol, MEG, (PM = 62 g. mol⁻¹) y 4,4'-metilendianilina, MDA, (PM= 198 g. mol⁻¹), lo cual no fue posible quizá por estar en bajas concentraciones o simplemente no fueron obtenidos por hidrólisis química y/o enzimática.

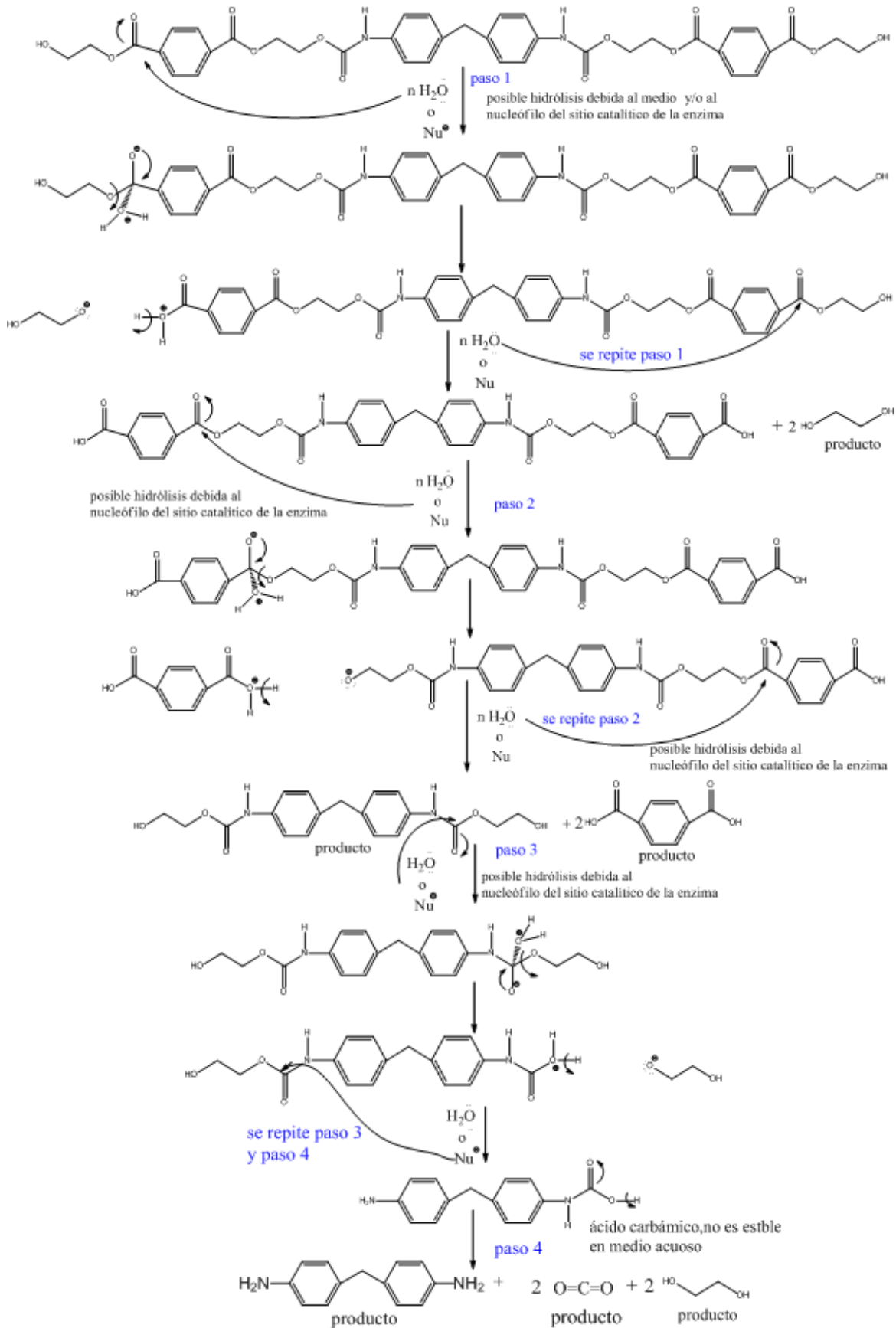


Figura 4.36 Mecanismo propuesto de degradación del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

La importancia de analizar las alícuotas a distintos tiempos, fue tal que permitió determinar a los posibles productos obtenidos durante la degradación de los compuestos de uretano, tales resultados permiten observar las diferencias entre los compuestos sintetizados a partir de BHEA-MDI y los compuestos sintetizados a partir de BHET-MDI por consiguiente: **1.** Si existen en el material grupos hidrolizables presentes en segmentos “blandos”; es baja la probabilidad de que los enlaces del grupo uretano puedan hidrolizarse preferentemente que los más hidrolizables, como lo es el grupo éster. **2.** Si los segmentos “blandos” del material no contienen grupos con alto grado de hidrólisis, productos de diamina pueden obtenerse. **3.** Los materiales que presentan segmentos “duros”, debido a la materia prima tereftalato de dimetilo (DMT), utilizada en la síntesis de los compuestos BHET-MDI, tienen una estabilidad distinta a los compuestos con segmentos “blandos”, formados a partir del ácido adípico (AAD), dicha diferencia se debe principalmente a la presencia de la nube electrónica del anillo aromático del DMT que “protege” de la hidrólisis a los segmentos que contienen al grupo éster y a su vez, hace que sea electropositivo el carbón del grupo uretano y por lo tanto pueda ser más susceptible a la hidrólisis.

Con respecto a las diferencias observadas entre los cromatogramas obtenidos a partir de las alícuotas sin cepa bacteriana vs. cromatogramas obtenidos de alícuotas en presencia bacteriana se observa que para los compuestos sintetizados a partir de BHEA sí tuvo influencia el medio acuoso en la hidrólisis de los compuestos ya que se obtuvieron picos correspondientes a productos de bajo peso molecular por lo que hace suponer que hubo degradación del material por hidrólisis no enzimática, a pesar de que se partió de un medio acuoso con buffer de fosfatos para mantener el pH neutro cabe la posibilidad que pudo haberse acidificado el medio con la presencia grupos carboxilos que pudieron haberse liberado hacia el medio o por la presencia de materia prima (AAD) que quedó sin reaccionar durante la síntesis de los compuestos de BHEA-MDI, sin embargo, es importante considerar que hubo picos que se obtuvieron únicamente en presencia de la cepa bacteriana la cual permitió considerar que hubo actividad enzimática frente al material.

Por otro lado en los cromatogramas obtenidos de los compuestos de BHEA-MDI antes de las 22 horas de incubación, se esperaba detectar al posible metabolito correspondiente al alcohol, cuyo peso molecular es de 62 g. mol^{-1} , pero no fue posible haciendo suponer que por ser soluble en el medio acuoso su concentración no fue posible detectarlo y para el caso de los estudios en presencia de la cepa quizá fue un nutriente para las bacterias una vez que se haya agotado su fuente de carbono proveniente del MM.

Para el caso de los compuestos de BHET-MDI también existieron ciertas diferencias entre los cromatogramas de las alícuotas de los estudios realizados en presencia de cepa vs. los cromatogramas de las alícuotas sin cepa, observando que la posible influencia del medio acuoso en el material, fue menor comparada con los casos de los compuestos de BHEA-MDI. Los grupos éster no fueron hidrolizados en medio acuoso ya que se partió del DMT el cual al estar constituido por un anillo aromático protege de la hidrólisis a los grupos éster presentes en la sección; este hecho pudo haber permitido que la enzima actuara frente a grupos uretano al ser más electropositivo el carbón del grupo uretano por la presencia de la nube electrónica del anillo aromático permitiendo su posible hidrólisis.

Los resultados obtenidos a partir de las alícuotas, tiempos de incubación de 22 y 44 horas, tanto para el caso de los experimentos a partir de los materiales incubados en presencia de la cepa bacteriana como en el caso de los materiales incubados sin cepa bacteriana se obtuvieron señales correspondientes a compuestos de menor peso comparados con los pesos iniciales, compuestos antes de ser incubados, por lo que se considera que en ambos casos hubo hidrólisis de los materiales, siendo un factor importante a considerar el tipo de compuesto a degradar ya que su estructura y composición química están relacionados con el grado de degradación de éste en medio acuoso en presencia o ausencia de la cepa bacteriana. Por esa razón se sintetizaron cuatro compuestos de uretano con distintas formulaciones con el objeto de elucidar un posible mecanismo de biodegradación debido a la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*, y consecuentemente, poder determinar si las posibles enzimas que pudieron estar presentes en las pruebas de biodegradación fueron reguladas por una producción enzimática del tipo constitutivo o inductivo, y en caso de haberse tratado de un sistema inductivo, ¿Cuáles fueron los materiales capaces de inducir la actividad enzimática?, sin embargo, es difícil determinar cuáles fueron los materiales capaces de inducir dicha actividad, debido a la influencia que tuvo el medio frente a los materiales así como la posible toxicidad de los compuestos de uretano frente a la cepa bacteriana, ya que quizá se liberaron productos hacia el medio de incubación que pudieron ser tóxicos para la cepa, considerándolos como inhibidores enzimáticos; posible consecuencia de la muerte celular bacteriana.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron cuatro compuestos de uretano con distintas características y propiedades. Pesos moleculares bajos, menores de 2,000 Da en promedio, y polidispersidades grandes, 2.3 en promedio.
- Los cuatro compuestos de uretano presentaron características distintas entre ellos en cuanto a sus valores de Temperatura de fusión (T_m) y de Transición vítrea (T_g).
- No se observó alguna diferencia significativa en el crecimiento bacteriano, siendo muy similar la tendencia en las curvas de crecimiento (Microorganismo. mL^{-1} vs. Tiempo), entre los compuestos BHET-MDI NCO/OH 1:2, 2:1 y BHEA-MDI 2:1. Siendo significativa únicamente para el caso del compuesto BHEA-MDI 1:2, el cual presentó el menor peso molecular 872 Da, y polidispersidad alta, 2.8, así como un valor bajo de temperatura de transición vítrea (T_g) de 6.5°C , teniendo las características apropiadas para considerarlo como el material más susceptible a la biodegradación.
- No se observaron diferencias en los termogramas obtenidos mediante TGA antes de ser incubados vs. termogramas obtenidos después de incubarlos en presencia y/o ausencia de la cepa bacteriana para los cuatro compuestos. Se esperaba observar mayor pérdida de peso en los termogramas obtenidos a partir de los materiales incubados con cepa bacteriana.
- Para el caso de los resultados obtenidos mediante GPC, no hay diferencias significativas en cuanto a la pérdida de masa entre los experimentos realizados en presencia de la cepa bacteriana vs. experimentos sin cepa bacteriana para los compuestos BHET- MDI relación NCO/OH 1:2 y 2:1 así como para el material BHEA-MDI relación NCO/OH 2:1 excepto para el material BHEA-MDI NCO/OH 1:2 el cual sí presentó diferencia significativa en la pérdida de masa en presencia del medio acuoso sin cepa bacteriana en comparación con el material sin incubar e incubado en MM + cepa bacteriana.
- Los resultados obtenidos mediante la técnica de GC-MS tanto en los experimentos realizados sin cepa bacteriana como en los experimentos realizados con cepa bacteriana se pudieron detectar a determinado tiempo de incubación ciertos productos de degradación y/o biodegradación identificando posibles secciones del material obtenidos a partir de la hidrólisis del grupo uretano en presencia de la cepa bacteriana, sin embargo, no se esperaba observar dichos productos por efecto de la actividad enzimática ya que dicha bacteria solo se ha reportado que tiene actividad tipo esterasa.⁽⁹³⁾

- La presencia de secciones de diisocianato detectados mediante GC-MS en el medio de incubación permiten suponer la razón del poco crecimiento bacteriano de las pruebas de biodegradación, siendo el promedio de 2 días de crecimiento celular, posterior a éste tiempo la muerte celular comenzó, dicha muerte pudo haber sido debida a la alta toxicidad de los productos liberados.
- Los compuestos de uretano sintetizados en el presente trabajo no pueden considerarse como nutriente (fuente de carbono) para la cepa *Alicyclophilus sp.*, debido a su toxicidad, por consiguiente, el tipo de PUR, sólido o coloidal (propiedades fisicoquímicas), empleado en las pruebas de biodegradación es un factor primordial a considerar en futuras pruebas de biodegradación.
- El factor primordial en la degradación del material es vía hidrólisis debida al medio acuoso, ya que son materiales que presentan enlaces susceptibles a la hidrólisis del agua siendo los más susceptibles los enlaces del grupo isocianato. El grupo éster es susceptible a hidrólisis ácida o básica lo que hizo suponer cierta acidez en el MM durante la incubación.
- A pesar de haber observado una muerte celular bacteriana a partir de los dos días de incubación para los cuatro casos, (cuatro oligómeros de uretano), se presentó un determinado crecimiento bacteriano en las pruebas de degradación distinto a la curva de crecimiento sin compuesto de uretano. Esto pudo deberse a la posible presencia de enzimas hidrolasas tipo proteasas, las cuales, también son conocidas por su capacidad para hidrolizar ésteres simples, tales como acetato de p-nitrofenilo, por lo tanto, pudo ser posible el crecimiento bacteriano debido a una posible actividad proteolítica y no un resultado debido a la inducción de enzimas tipo esterasa para degradar a los oligómeros de uretano y utilizarlos como nutriente. Siendo la degradación de dichos compuestos en presencia de la cepa bacteriana el resultado de un co-metabolismo.
- Estudios futuros se requieren con respecto a la cepa bacteriana *Alicyclophilus sp.*, en donde se lleve a cabo el aislamiento y caracterización de las enzimas y los genes responsables en la posible biodegradación de compuestos de uretano.
- Es importante considerar los posibles cambios en cuanto a las propiedades físicas y mecánicas que pudieron haberse presentado en los oligómeros de uretano durante las pruebas de degradación; así como las posibles variaciones de pH en el medio de incubación durante las pruebas en presencia y ausencia de la cepa bacteriana, dichos estudios no se realizaron, por consiguiente, se requiere en un futuro realizar dichos estudios para hacer un comparativo, antes y después de las pruebas de degradación, con y sin inóculo de los materiales a degradar.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Markusch, P., Schmeizer, G., "Synthesis of Polyurethane Elastomers". Bayer Corporation Polyurethane Division, 3-15 (2007).
2. Center for the polyurethanes industry. *Flexible polyurethane foams used in furniture and bedding*. Enero 2008. [En línea] Internet: <http://www.polyurethane.org/s_api/index.asp>. (Consulta Enero 2010).
3. Polyurethane foam association. *The Flexible polyurethane foam Industry's record of Innovation & success*. Junio 2008. [En línea]. Internet: <http://www.pfa.org/Library/AEP_no_logo.pdf>. (Consulta Enero 2010).
4. Woods, G., *The ICI Polyurethanes book*, Ed. ICI Polyurethanes and Jhon Wiley & Sons1: 3-7, 42 (1990).
5. Pethrick R., *Polymer Structure characterization*. Ed. RSC Publishing, 140-207 (2008).
6. Park, J.H., Ye M, Park K., "Synthesis of Polyurethane Elastomers", *J. Molecules*, 10, 151 (2005).
7. Sheikh, H.N., "Isocyanate-terminated urethane prepolymer as bioadhesive base material: synthesis and characterization" *J. Adhesion and Adhesives*; 20, 299 (2000).
8. Pathiraja, A., "Poly (dimethylsiloxane)/poly (hexamethylene oxide) mixed macrodiol based polyurethane elastomers. "Synthesis and properties", *J. Appl. Polym. Sci.*, 76, 2026 (2000).
9. Shan-Hui, H., "Degradation of polyurethanes by glycolysis" *J. BioMat. Appl.*, 19, 135, (2000).
10. Correia, C., "Síntesis y Caracterización de Nuevos Poliuretanos". 5º Seminario y Mini Foro Iberoamericano de Tecnología de Materiales", 9-11 Junio, (2005).
11. Vega, J., Alvarado P., Sibaja, R., Moya, M., Nikolaev, S., "Evaluation of degradation of polymers". *Rev. Iberoamer. Polím.*, 6(3), 199 (2005).
12. Vega, J., "Obtención de espumas rígidas de poliuretano a partir de cáscara de piña", Tesis de Licenciatura, San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, (1994).
13. Yano, S., Hirose, S., Hatakeyama, P., "Wood Processing and Utilization", Ed. Ellis-Horwood, Nueva York, 263, (1989).
14. Kennedy, R., "Natural sources for plastics" *Sugar Industry Abstract*, 48(2), 607, (1989).
15. Ocegüera Cervantes, A., "Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación", tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (2005).
16. Pérez Lara, L., "Síntesis y Estudio de Biodegradación de dos Familias de Poliuretano de estructura conocida", Tesis de Maestría en Ingeniería Química UNAM (2005).
17. Zavala Arce, R., "Síntesis de espumas de poliuretano a partir de polioles de fuentes naturales", Tesis de Doctorado en Ingeniería Química, ITCM, (2003).

18. Sperling, L., "Physical polymer science", Ed. John Wiley & Sons, New York, EEUU, (1986).
19. Brayer R.L., "Advances in polyurethane foams formulation", Ed. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pennsylvania, (1994).
20. Labow r., Santerre, J., "Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes . Journal Biom. Res. 28, 1187-119 (1998).
21. Instituto nacional de ecología. *Listado adicional al convenio de Estocolmo*. Noviembre 2007 [en línea] <www.inegi.gob.mx/ueajei/publicaciones/libro/128/Cap3.html >. (Consulta Diciembre 2009).
22. Asociación Nacional de la Industria Química, ANIQ. Estadísticas de Importación y Exportación. Investigación directa en el Sector Económico. Anuario (2006).
23. Jornal de Plásticos. Clasificación y Procesos de obtención de polímeros. Junio 2009. [En línea].Internet: <<http://www.jorplast.com.br/cbipep/cbip5ep.html>> (Consulta Diciembre 2009).
24. Bornscheuer, U., Hentschel, J., Hornung, A., "Study of Hydrolase in organic synthesis- region- and stereoselective degradation". *Chem. Eng. Sci.*, 54, 3043, (1999).
25. Conesa, J.A., Font, R., Marcilla, A., García, A.N., "Thermogravimetric Studies on the Thermal Decomposition of Polyethylene", *Energy & Fuels.*, 8, 1238 (1994).
26. Randome, F., *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 47, 837 (1992).
27. Albright, L.F., Crynes B.L., Corcoran W.H., "Pyrolysis Theory and Industrial Practice", Academic Press, New York, (1983).
28. Arandes, J.M., Abajo I., López-Valerio D., "Reciclado de residuos plásticos", *Bilbao. J. Ind. Eng. Chem. Res.*, 36, 4523 (1997).
29. Audisio, G., Bertini, F., Beltrame, P.L., "Thermogravimetric study of the kinetics of degradation of polypropylene with solid catalysts", *Polym. Degrad. Stabil.* 29, (1990).
30. Bockhorn, H., Hornung, A., "Pyrolysis of fire retardant model polymers", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 46, 1 (1998).
31. Harding, R., "Degradation of polymers" *Appl. Catal.*, 221, 389 (2001).
32. Ishihara, Y., Nanbu, H., "Thermal and chemical recycle of waste polymers", *Chem.Eng.Sci.* 69,978 (1996).
33. Jo, S., Guin, J., "Stability of polymers in thermogravimetric studies". *Energy& Fuels*, 11, 586 (1997).
34. Kaminsky, W., "Pyrolysis of filled PMMA for monomer recovery". *Chem. Macromol. Symp.* 48, 38 (1991).
35. Kaminsky, W., "Recycling of Polymeric Materials by Pyrolysis." *Chem., Macromol. Symp.* 57, 145 (1992).
36. Kaminsky, W., "Techniques of analysis of degradation". *Adv. Polym. Technol.*, 14, 337 (1997).
37. Karayildirim, T., Yanik, J., Ucar, S., *Fuel Proc. Technol.*, 73, 23 (2007).
38. Das, D., "Polymers from renewable resources: XXII: Studies on synthesis and Thermal properties of interpenetrating polymer networks derived from castor Oilisophorone, Ed. Elsevier, *Thermochim. Acta*, 297, 101 (1997).

39. Domed, A.J., Handbook of biodegradable polymers, Harwood Academic Publishers, 475-479 (2007).
40. Le Page, J., "Residue and Heavy Oil Processing", *Editions Technic*. 2,32 (1992).
41. Lin, R. & White, R., "Acid Catalyzed Cracking of Poly (Styrene)", *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 1287 (1997).
42. Lin, Y.H., Sharratt, P.N., "Polyolefins to chemicals and Fuels over Various Cracking Catalysts.", *Energy & Fuels*, 12, 767 (1998).
43. Marcilla, A., Beltrán, M. & Conesa, J., " Pyrolysis of polymers in the presence of a commercial clay." , *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 58-59,117 (2004).
44. Mastral, F.J., "Pyrolysis of high-density polyethylene in a fluidised bed reactor. Influence of the temperature and residence time", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 63 (2002).
45. Tokiwa, T., Kushino, T., "Chemical recycling of mixture of waste plastics using a new reactor system with stirred heat medium particles in steam atmosphere", *Chem. Eng.J.* , 82, 173 (2001).
46. Molgaard, C., "Environmental impacts by disposal of plastic from municipal solid Waste". *Resourc. Conserv. Recycle*. 15, 51 (1995).
47. Aguado, J., Sotelo, J.L., Escola, J.M., "Reciclado químico de plásticos y aceites lubricantes usados mediante catalizadores zeolíticos". *Energy & Fuels*, 11, 1225 (1997).
48. Mordi, R., Fields, R., Dwyer, J., "Feedstock recycling and Pyrolysis of waste plastics". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 374 (1992).
49. Brandrup, J., Polymer Handbook, 4th Ed, John Wiley, N.Y., 2,350-452 (1999).
50. Buchanan, C. M., Gardner, R. M. and Komarek, R., "Aerobic Biodegradation of cellulose acetate". *J. Appl. Polym. Sci.* 47, 1709-1719 (1993).
51. Schlegel, H., Allgemeine Mikrobiologie. 7th edition George Thieme Verlag Stuttgart. (1992).
52. Augusta, J., Müller, R.-J., Widdecke, H. "A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:673- 678, (1993).
53. Lamba, N., Woodhouse, K., Cooper S., "Polyurethanes in Biomedical Applications" Ed. Springer, Netherlands, 180-250 (2000).
54. Scott, G., & Gilead, D., "Degradable polymers: principles and applications", Ed. Chapman. & Hall, London, 51-133(1995).
55. Lee, D., Trantolo D., Altobelli, D., "Encyclopedic handbook of Biomaterials and Bioengineering" Ed. Marcel Dekker N.Y (2005).
56. Anderson, A. J., and Dawes, E., "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates". *Microbiol. Rev.* 54:450-472. (1990)
57. Andersson, R.E., "Concentration and partial purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*". *Biotechnol. Lett.* 2(5): 247-252 (1980).
58. Cosgrove, T., Nomura, N., Nakahara, T., "Purification and properties of polyester polyurethane degradation enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35". *Appl. Environ Microbiol.* 64, 62-67 (2009).
59. Hamed, A., Klingbeil, B., Jendrossek, D., "Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site". *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 191-194 (2009).

60. Mukai, K., Yamada K., Doi Y., “Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] @lm by PHA depolymerases”. *Int. J. Biol. Macromol.* 15: 361-366, (1993).
61. Pathirana, R., Seal, K., “Studies on polyurethane deteriorating fungi”. Part1. “Isolation and characterization of the test fungi employed”. *Int. Biodet.* 20: 163-168, (1984a).
62. Pathirana, R., Seal, K., “Studies on polyurethane deteriorating fungi”. Part 2. “An examination of their enzyme activities”. *Int. Biodet.* 20, 229-235, (1984b).
63. Pathirana, R.A., Seal, K., “Studies on polyurethane deteriorating fungi”. Part 3. “Physico-mechanical and weight changes during fungal deterioration”. *Int. Biodeterior.* 21: 41-49, (1985 a)
64. Kay MJ, Morton L., “Bacterial degradation of polyester polyurethane”. *Int. Biodet.* 27: 206-222, (1991).
65. Kay M., Mc Cabe R., Morton L., “Chemical and physical change occurring in polyester polyurethane during biodegradation”. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 31: 209-225, (1993).
66. Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N., Nakahara, T., “Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source”. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 39-42, (1995).
67. Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Akutsu, Y., Ankara, T., “Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of Comamonas acidovorans strain TB-35”. *Ferment. Bioeng.* 83: 456-460, (1997).
68. Webb E.C., Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the nomenclature committee of the International union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. Prepared for IUBMB by E.C. Webb. Academic Press, Inc., San Diego
69. Crabbe, JR, Campbell, J., Thompson, L., “Biodegradation of a colloidal ester based polyurethane by soil fungi”. *Int. Biodet. Biodeg.* 33: 6467 103-113 (1994).
70. Doi, Y., Kanewawa, Y. & Kunioka, M., “Biodegradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3 hydroxybutyrate-co-4-hydroxy-valerate)”. *Macromolecules.* 23, 26 -31. Albertsson, (1978).
71. Hang, M., Hiram, M., “Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters” *Polym. Adv. Technol.* 8,203-209, (2007).
72. Abou, D., “Anaerobic Biodegradation of Natural and Synthetic Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina. Braunschweig (2001).
73. Bornscheuer, U., “Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis”. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:73-81, (2002).
74. Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., “Microbial degradation of polyurethane, polyesters polyurethanes and polyether polyurethanes” *Inst. App. Biochem.* 51:134-140, (1998).

75. Blake R.C. & Howard G.T., "Adhesion and growth of a *Bacillus* sp. On a polyesterurethane", *Int. Biodet. & Biodeg.*, 42, 63-73 (1998).
76. Ruiz, C., Hilliard, N. and Howard, G.T., "Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester – polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase– esterase enzyme", *Int. Biodet. & Biodeg.*, 43, 7 – 12 (1999).
77. Tang, Y., Labow, R.S., Santerre, J., "Isolation of methylene dianiline and aqueous- soluble biodegradation products from polycarbonate polyurethanes" *Biomat.* 24, 2805-2819 (2003).
78. Tang, Y., Santerre, J., Labow, R., "Enzyme induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: dependence on hard-segment concentration". *J. Biomed. Mater Res.* 56:516-528 (2001).
79. Chu H., Reis R., "Understanding the enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate" CRC Press LLC (2005).
80. Dang G., Lee, M., "Method determining the anaerobic degradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge". *Soc. Test. Mater.*, 179 (2006).
81. Kay M., McCabe R. and Morton L. H., "Chemical and physical changes occurring on polyester polyurethane during biodegradation", *International Biodeterioration and Biodegradation*, 31, 209 – 225 (1993).
82. Hourston, D., Song M, Schafer FU, Pollock HM, Hammiche A., *Modulate Differential Scanning Calorimetry: 13. Analysis of Morphology of Poly (Ethyl Methacrylate) / Polyurethane Interpenetrating Polymer Networks*, Elsevier Science, 109-121 (1998).
83. Wang, G., Labow, R., Santerre, J., "Biodegradation of a poly(ester) urea- urethane by cholesterol esterase: Isolation an identification of principal biodegradation products." John Wiley& Sons, 407-417, (1996).
84. Tokiwa, Y., Suzuki, T. and Takeda, K., "Two types of lipases in hydrolysis of polyester". *Agric. Biol. Chem.* 52(8): 1937-1943 (1988).
85. Jaeger K., Steinbüchel, A. & Jendrossek, D., "Substrate specificities bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly (w-hydroxyalkanoates)". *Appl. Environ. Microbiol.* 61(8): 3113-3118 (1995).
86. Gan, Z., Yu D., Zhong, Z., Liang, Q. & Jing, X., "Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases". *Polymer Degrad. Stability.* 56: 209-213, (1997).
87. Walter, T., Augusta, Müller, R.J., Widdecke, H. & Klein, J., *Enzyme Microb. Technol.* 17, 218-224 (1995).
88. Mas-Castellà, J., Urmeneta, J., Lafuente, R., Guerrero R., "Biodegradation of poly- β -hydroxyalkanoates in anaerobic sediments". *Intern. Biodet. Biodeg.* 6,155-174.
89. Marchessault, R.H., Monasterios, C.J., Jesudason, J., "Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly- β hydroxyalkanoates". *Polym. Degrad. Stab.* 45: 187-196 (1994).
90. Welzel, K., Müller, R. & Deckwer, W., "Enzymatischer Abbau von Polyester-Nanopartikeln". *Chem. Ing. Tech.* 32: 128-139, (2002).

- 900-905 (1968).
92. Shah, M., Iwata, T., Kasuya, K., “Cloning of the gene for poly(3-hydroxybutyric acid) depolymerase of *Comamonas hydrolysable* and functional analysis of its substrate-binding domain.” *FEMS Microbiol. Lett.* 154: 89-94, (2008).
 93. Ocegüera Cervantes, A., Carrillo García, A., López N., Wachter, C.; Loza Tavera, “Characterization of the Polyurethanolytic Activity of Two *Alicyclophilus* sp. Strains Able To Degrade Polyurethane and N-Methylpyrrolidone.” *App. And Env. Microb.* 73(19): 6214-6223, (2007).
 94. Howard, G.T. & Blake, R.C., “Growth of *Pseudomonas fluorescens*. On a polyesterpolyurethane and the purification and characterization of a polyurethane-protease enzyme”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42: 213 –220, (1999).
 95. Ruiz, C., Main T., Hilliard, N. & Howard, G.T., “Purification and characterization of two 6hydrolysable6 enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*”. *Int. Biodet. & Biodeg.*, 43, 43 – 47, (1999).
 96. Morrois C., Hilliard N. & Howard G.T., “Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester – polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase– esterase enzyme”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43, 7 – 12, (1999).
 97. Rowe, L. & Howard G.T., “Growth of *Bacillus subtilis*. On polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme” *International of Biodet. & Biodeg.* 50, 33 – 40 (2002).
 98. ASTM D-2572-97, “Methods of testing urethane foam isocyanate raw materials”, ASTM International, (2003).
 99. Norimasa, O., “Relationships between melting temperature, maximum crystallization temperature and glass transition temperature”, *Polymer*, 31: 92 (1990)
 100. Tambushi, I., Yamada, H., Matsuzaki, H. & Furukawa, J., “Polyester readily hydrolysable by chymotrypsin”. *Journal of Polymer Science. Polymer Letters Edition*, 13, 447-50 (1975).
 101. Si-Chang L. & Xiu-Li W., “In vitro degradation of biodegradable blending material with high molecular weights”. *Journal of Polymer Science.* 15, 2239 (2008).

APÉNDICES

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE MEDIOS

A) Medio Mínimo. (Composición por litro. Basado en el medio propuesto por Nakajima-Kambe *et. al.*, 1995).

Solución A. (10x)

- KH_2PO_4 20.0 g
- K_2HPO_4 70.0 g

Solución B. (100x)

- NH_4NO_3 100.0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100.0 g

Solución elementos traza (1000x)

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g

Preparación: Preparar las soluciones A y B. Esterilizar en autoclave a 120 °C por 20 minutos. Preparar la solución de elementos traza y esterilizar por filtración. A 800 mL de agua estéril adicionar en condiciones asépticas 100 mL de solución A, 10 mL de solución B y 1 mL de solución de elementos traza. Llevar a un litro, el cual es el medio mínimo que permanecerá como stock para realizar las pruebas de degradación, por triplicado.

B) Medio Luria. (Composición por litro. Ausubel ed. Current Protocols in Molecular Biology, 1997).

Medio líquido

- Peptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- NaCl 5.0 g

Preparación: Disolver en agua desionizada, necesaria para completar un litro, ajustar pH a 7.0 mediante la adición de solución de NaCl 1.0 N y esterilizar en autoclave a 120 °C por 20 minutos y mantener en refrigeración.

C) Medio sólido.

- Agar 15.0 g
- Peptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- NaCl 5.0 g

Preparación: Disolver el agar en la mínima cantidad de agua desionizada posible por separado, y los otros componentes en 100 mL de agua desionizada. Mezclar las dos soluciones y completar a 1 L con agua. Esterilizar bajo las mismas condiciones que para la preparación del medio líquido.

Enfriar hasta 65 °C. Para preparar placas vacías de 25 a 30 mL de la solución caliente en cajas Petri estériles. Mantenga las cajas en refrigeración.

D) Solución de Hydroform® al 3%.⁽⁹³⁾

- Hydroform al 30% de sólidos 1.5mL
- Agua destilada 13.5 mL

Preparación: Las cantidades descritas anteriormente son las necesarias para tener como volumen final 15mL. Se toman 1.5mL del barniz de poliuretano al 30% y se le adiciona 13.5 mL de agua destilada, se mezclan y se hace pasar dicha solución a través de un filtro con membrana de 45µ. Una vez obtenida la solución al 3%, se filtra nuevamente en condiciones asépticas a través de un filtro Micropore y finalmente se colecta la solución en un tubo Falcon el cual se esteriliza previamente.

E) Medio mínimo con poliuretano (MM-PUR).⁽⁹³⁾

- Agua esterilizada 20mL
- Solución A (10x) 5.5mL
- Solución B (100x) 0.55 mL
- Solución C (1000x) 0.055mL
- Solución de Hydroform® al 3% 5.5mL
- Agua esterilizada 23.4 mL

Preparación: Las cantidades descritas anteriormente son las necesarias para tener como volumen final 55 mL de MM-PUR. Se prepara dicho medio en un matraz previamente esterilizado y en condiciones asépticas. Se adiciona cada uno de los componentes siguiendo el orden de aparición, teniendo una concentración final de Hydroform® al 0.3%. Dicho medio es inoculado e incubado durante 17 h a 37°C.

APÉNDICE B

TERMOGRAMAS MEDIANTE DSC

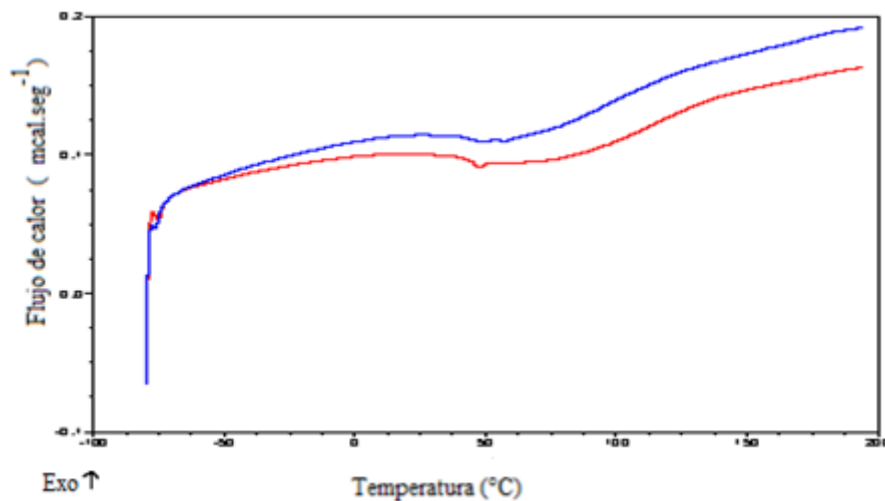


Figura B.1 Termograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación (■ compuesto sometido a biodegradación, MM + cepa bacteriana, ■ compuesto sometido a degradación, MM sin cepa bacteriana).

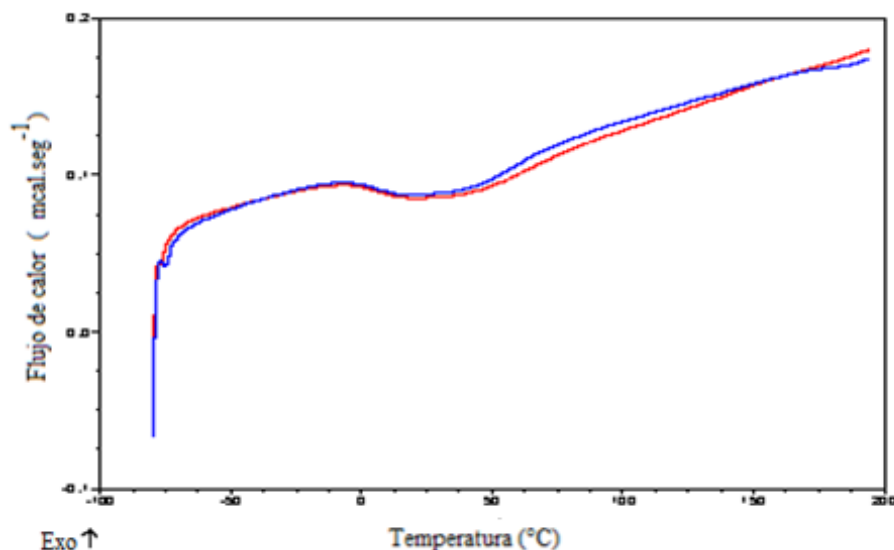


Figura B.2 Termograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación (■ compuesto sometido a biodegradación, MM + cepa bacteriana, ■ compuesto sometido a degradación, MM sin cepa bacteriana).

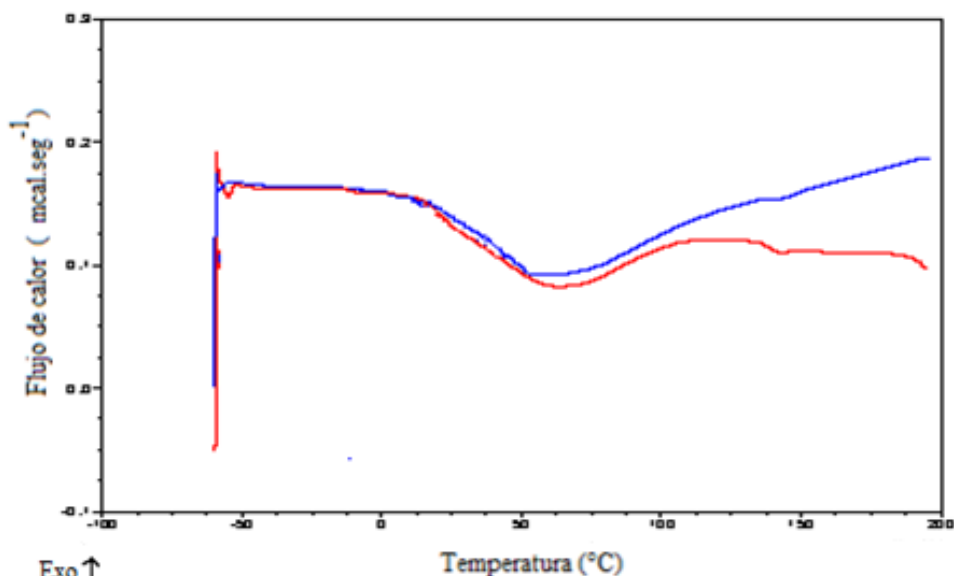


Figura B.3 Termograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación (■ compuesto sometido a biodegradación, MM + cepa bacteriana, ■ compuesto sometido a degradación, MM sin cepa bacteriana).

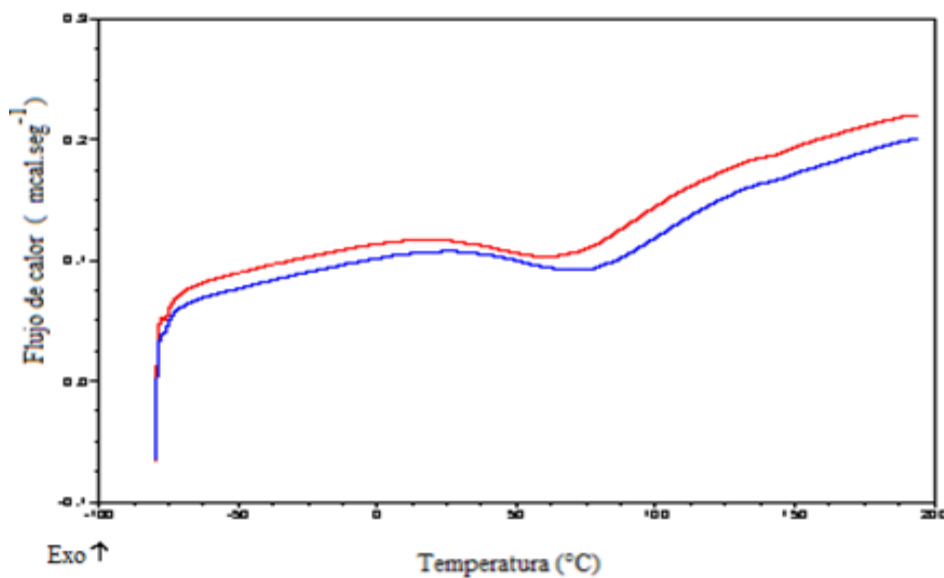


Figura B.4 Termograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación (■ compuesto sometido a biodegradación, MM + cepa bacteriana, ■ compuesto sometido a degradación, MM sin cepa bacteriana).

APÉNDICE C ESPECTROS DE MASAS

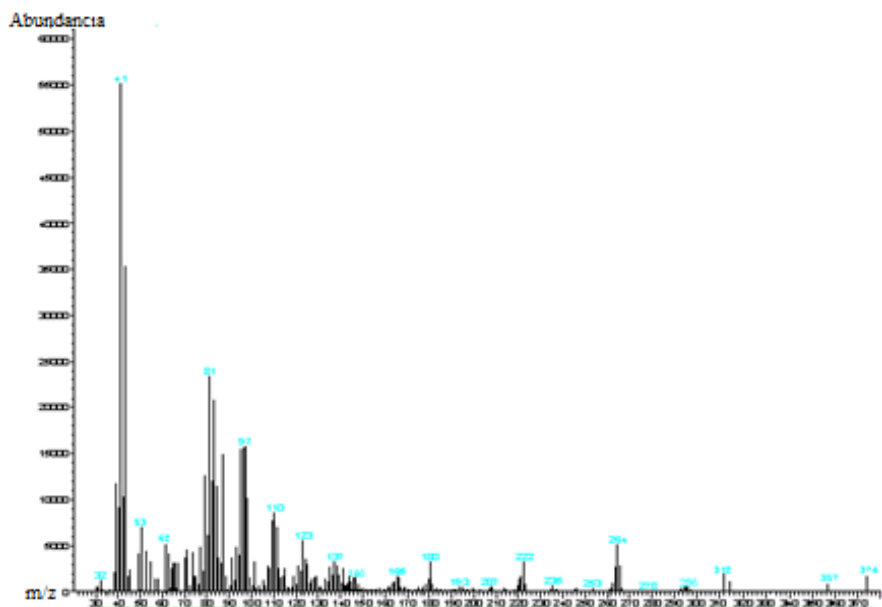


Figura C.1 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) correspondiente al tiempo de retención de 35.4 min.

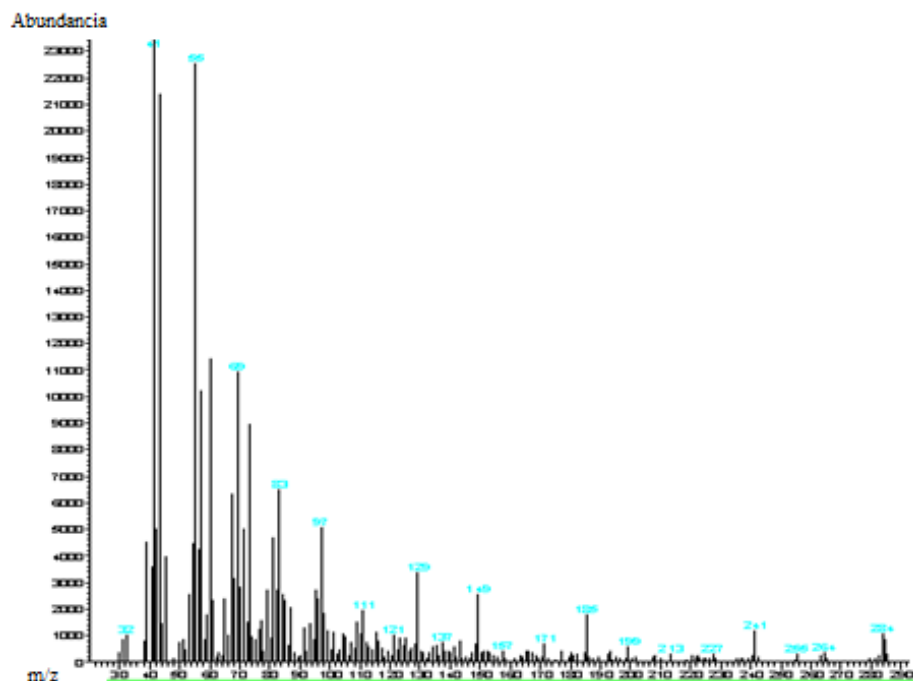


Figura C.2 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) correspondiente al tiempo de retención de 29.8 min.

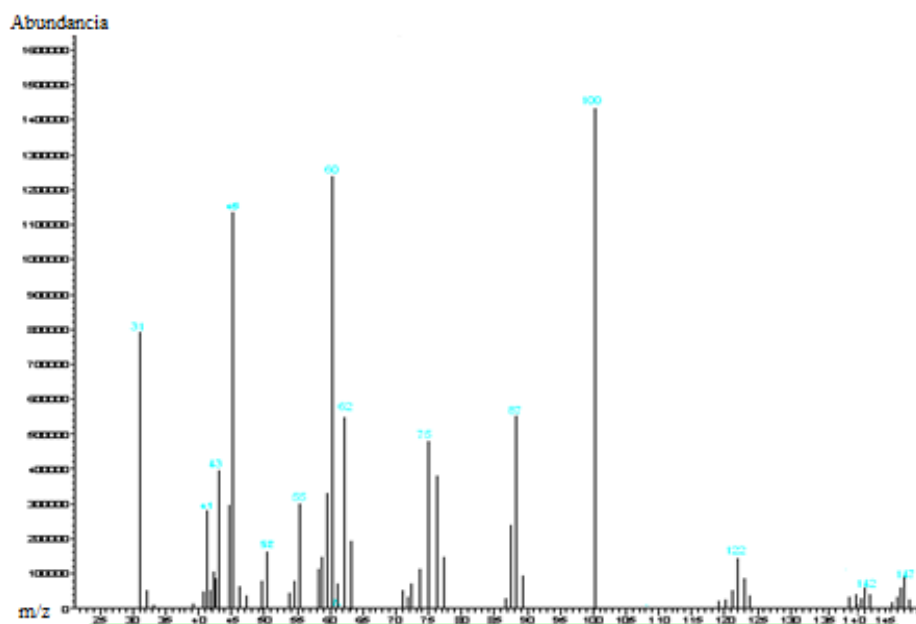


Figura C.3 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2), correspondiente al tiempo de retención de 5.5 min.

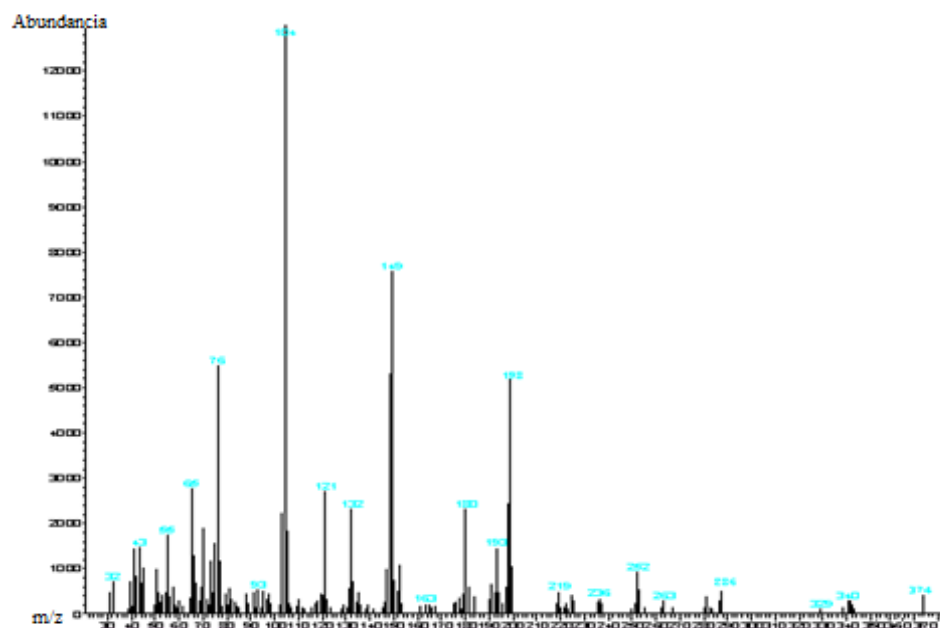


Figura C.4 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) correspondiente al tiempo de retención de 35.3 min.

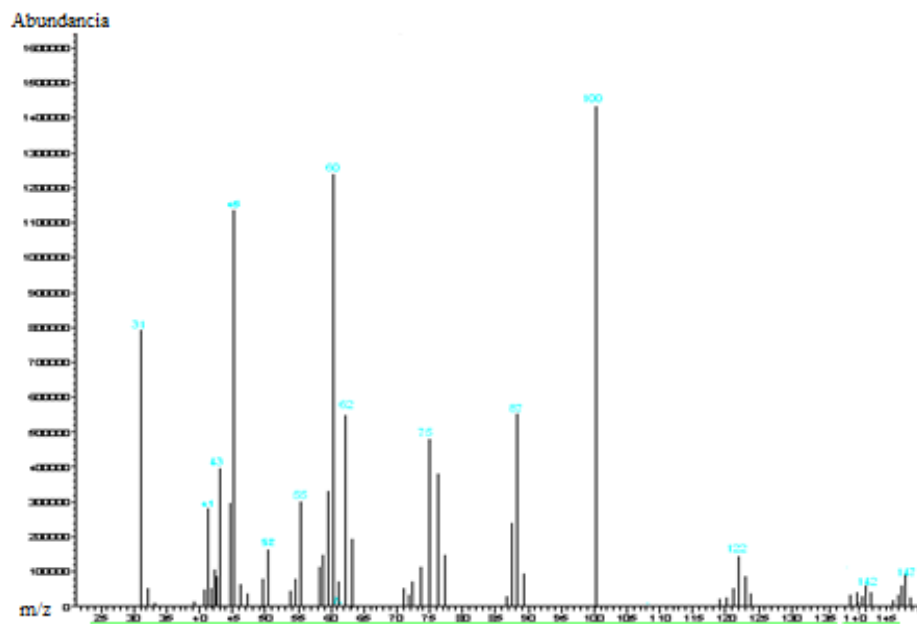


Figura C.5 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2), correspondiente al tiempo de retención de 5.5 min.

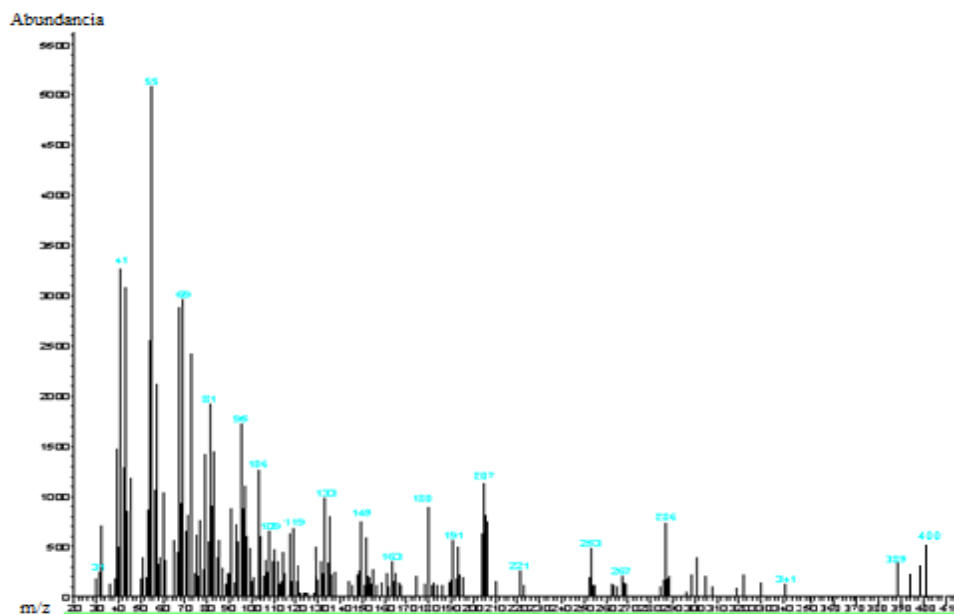


Figura C.6 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 40.2 min.

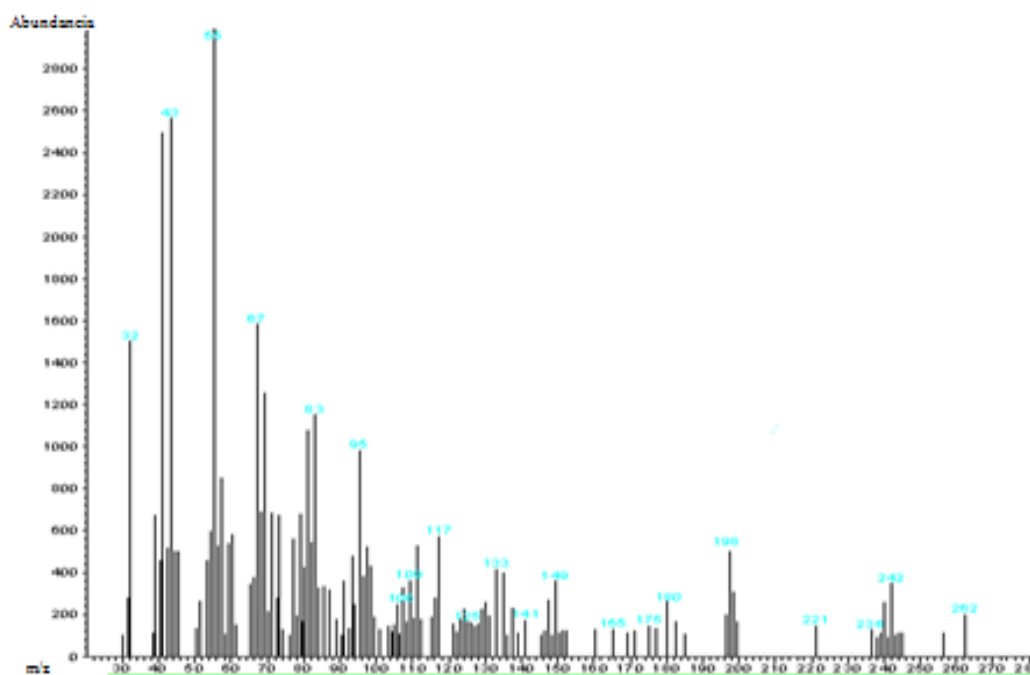


Figura C.7 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 29.9 min.

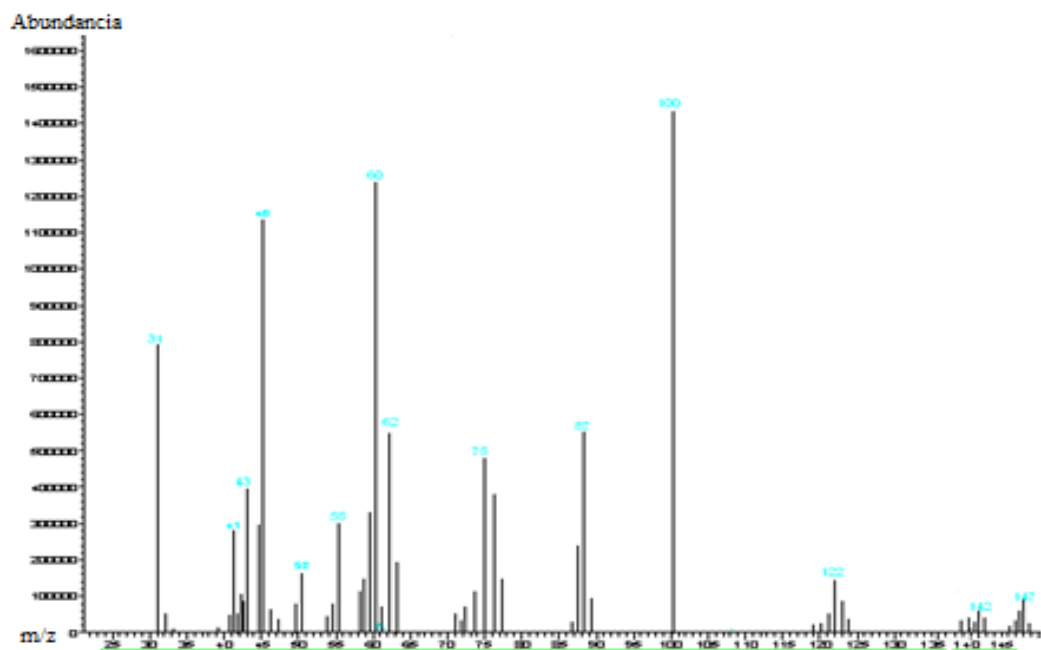


Figura C.8 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 5.4 min.

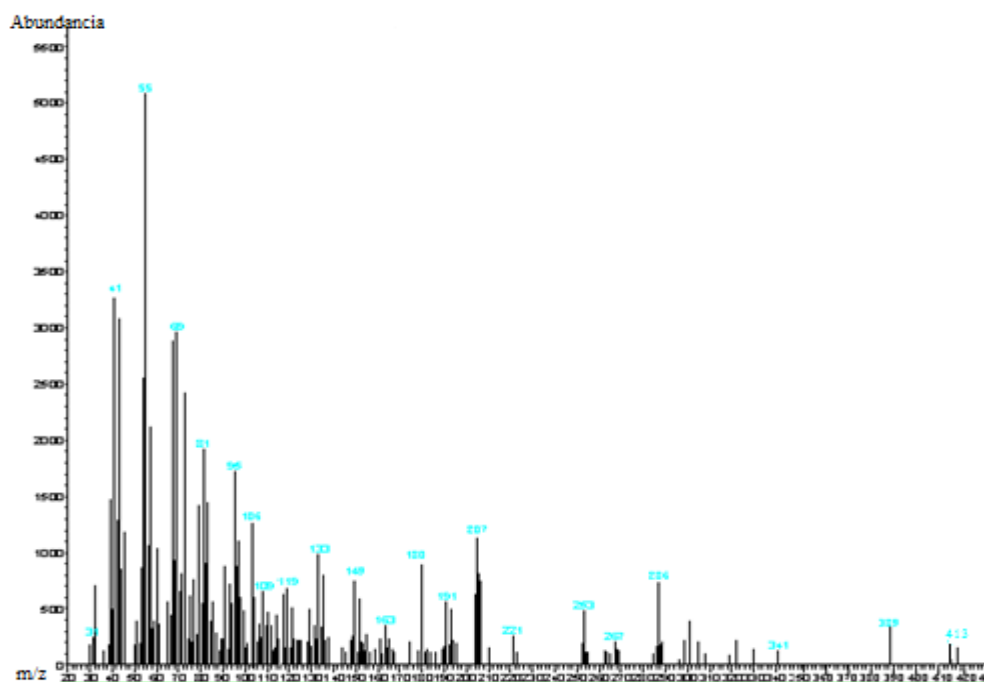


Figura C.9 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) correspondiente al tiempo de retención de 42.8 min.

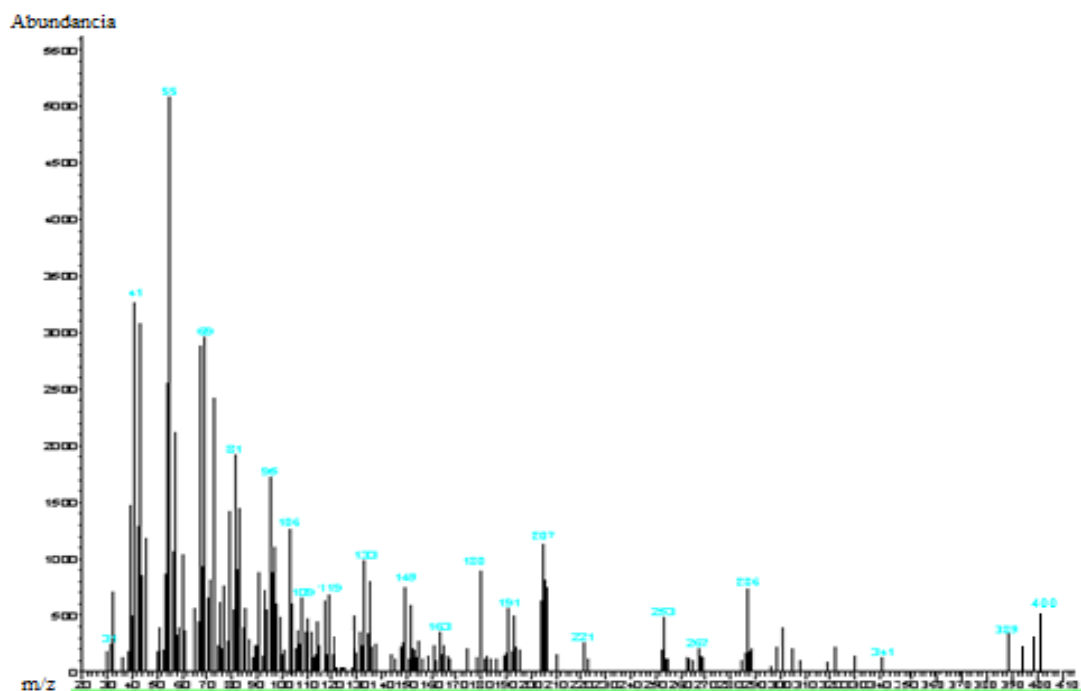


Figura C.10 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) correspondiente al tiempo de retención de 40.2 min.

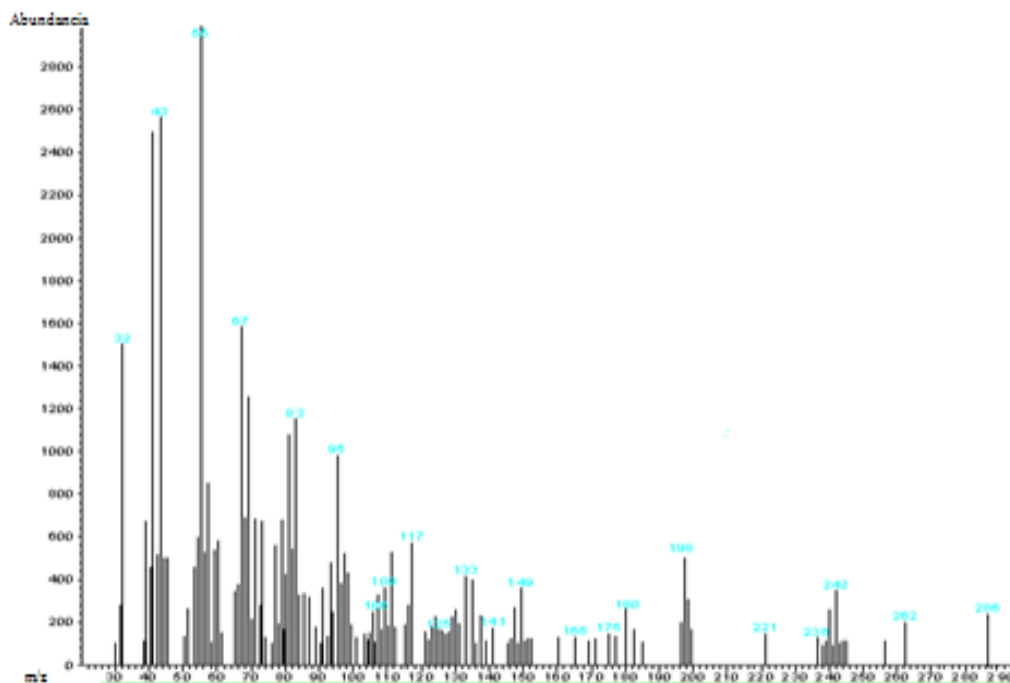


Figura C.11 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 29.8 min.

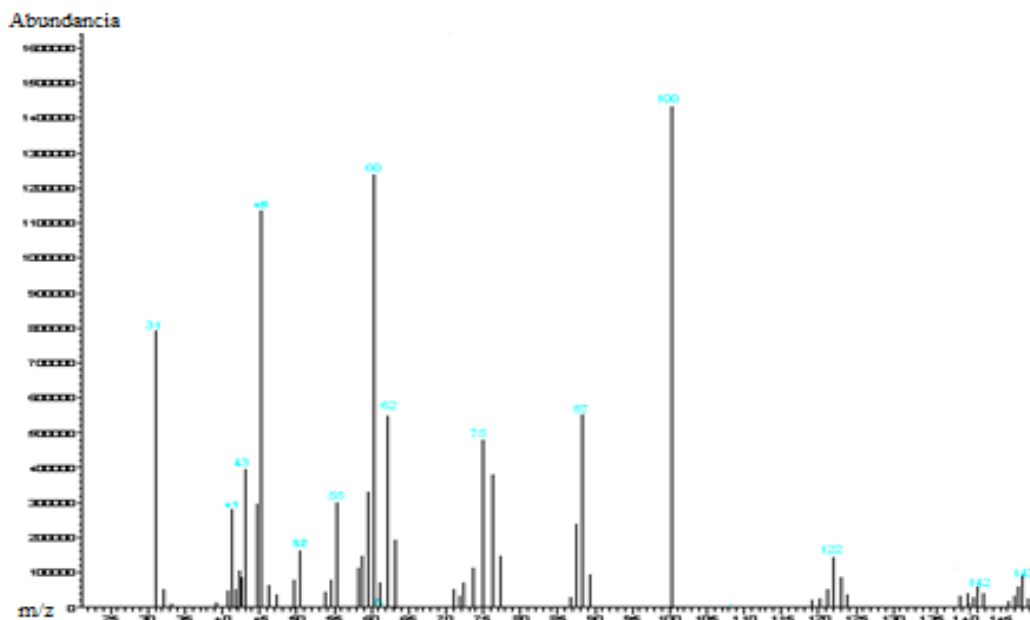


Figura C.12 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 5.4 min.

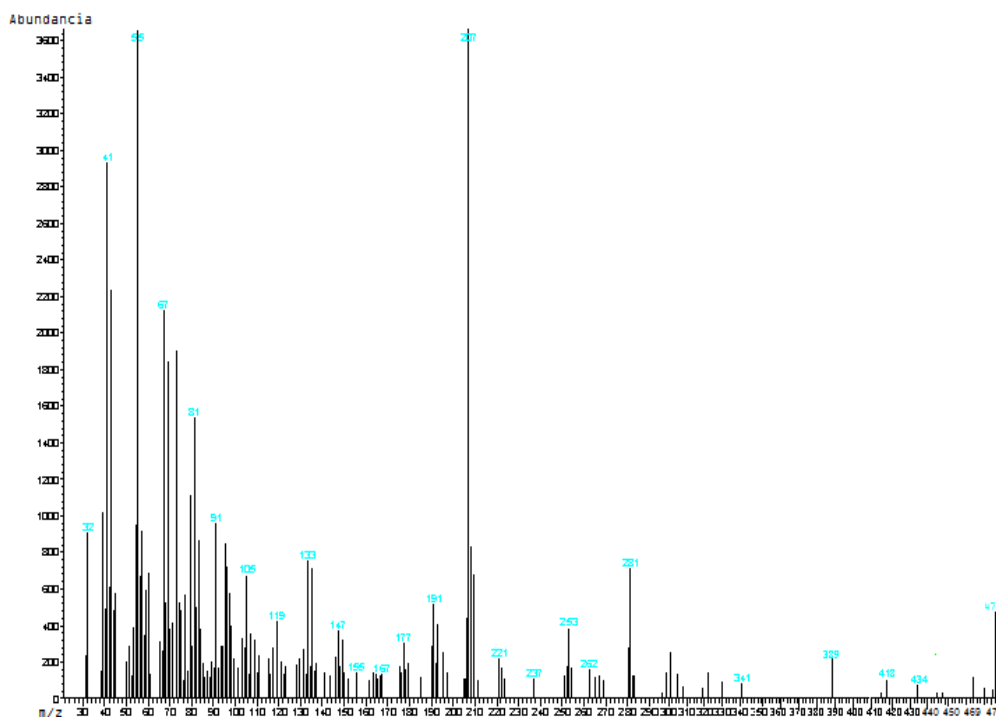


Figura C.13 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 43.6 min.

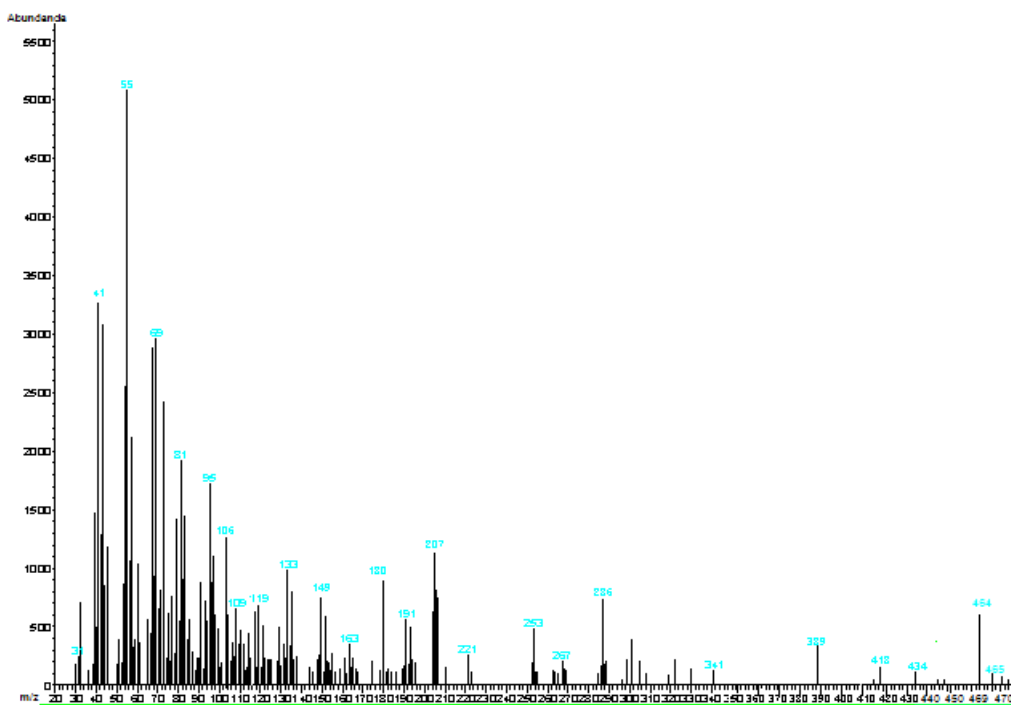


Figura C.14 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 39.5 min.

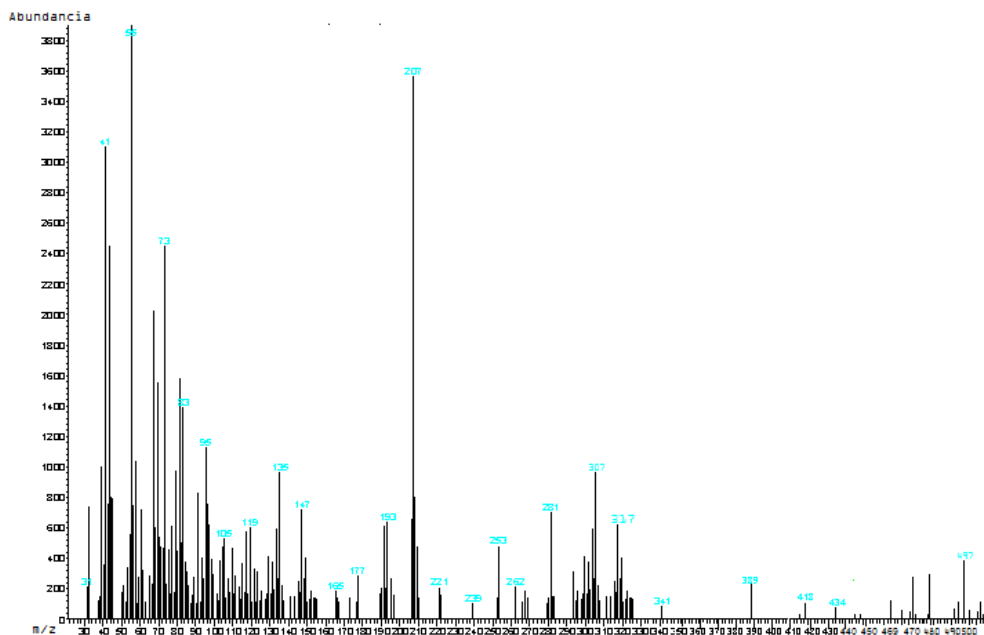


Figura C.15 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1), correspondiente al tiempo de retención de 42.8 min.

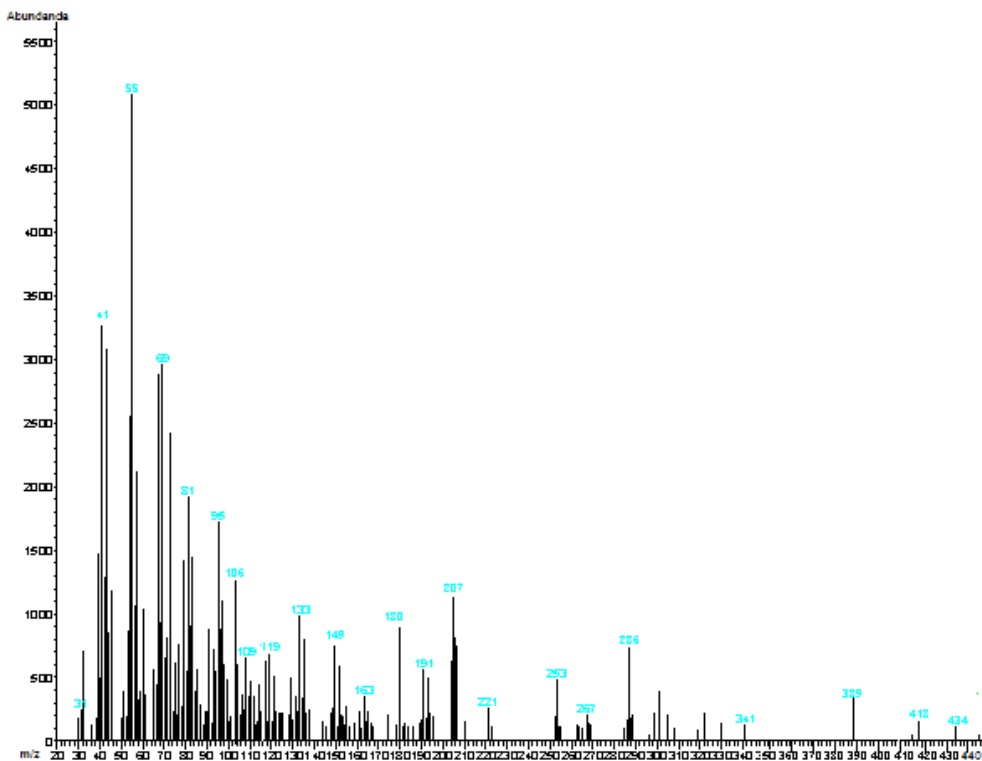


Figura C.16 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2), correspondiente al tiempo de retención de 41.8 min.

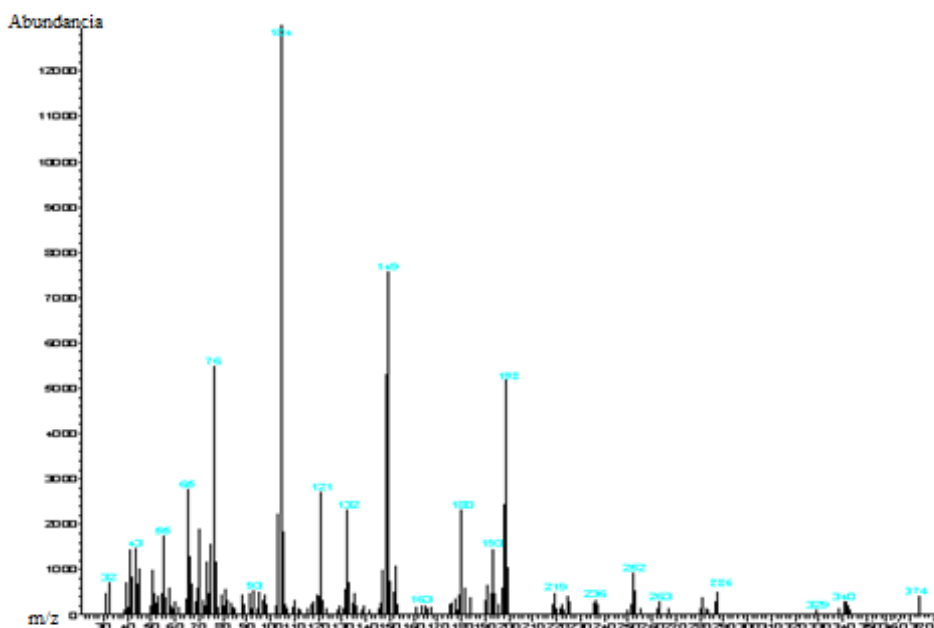


Figura C.17 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM + cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2), correspondiente al tiempo de retención de 35.4 min.

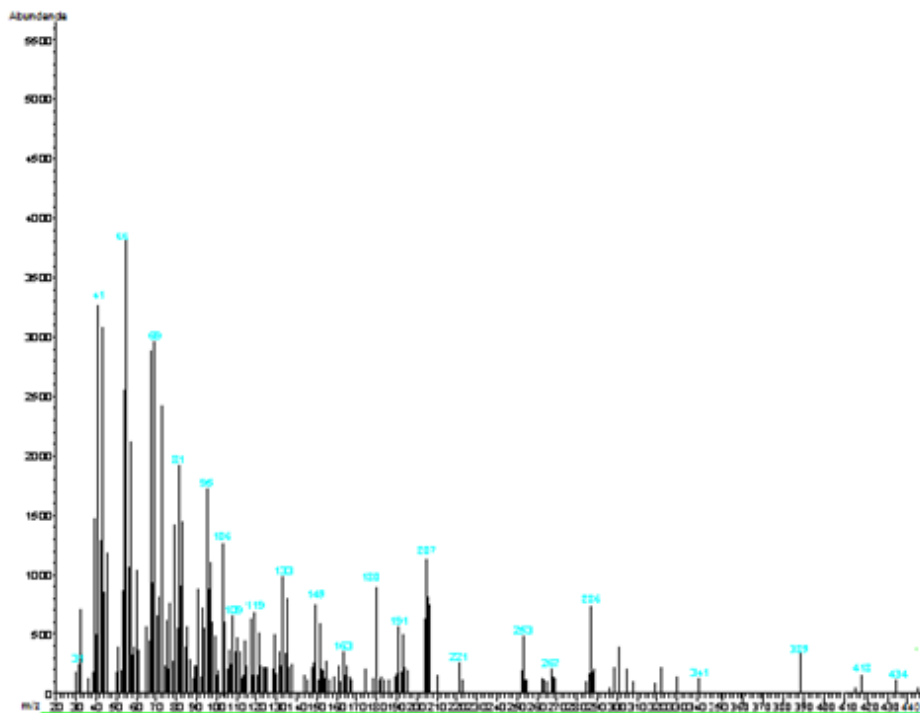


Figura C.18 Espectro de masas obtenido a las 22 horas de incubación en MM sin cepa bacteriana del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2), correspondiente al tiempo de retención de 41.9 min.

APÉNDICE D CROMATOGRAMAS MEDIANTE GPC

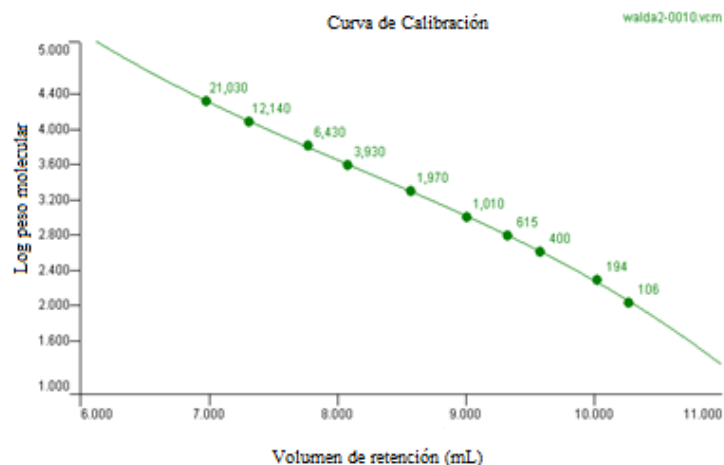


Figura D.1 Curva de calibración con estándares de poliestireno.

D.1 Cromatogramas de los oligomeros de poliéster sintetizados.

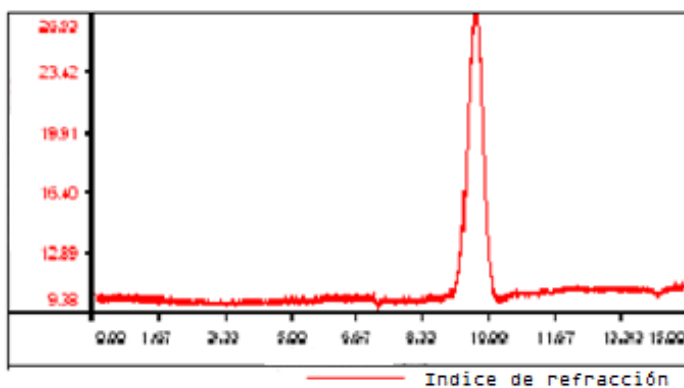


Figura D.2 Cromatograma del oligomero de poliéster BHET.

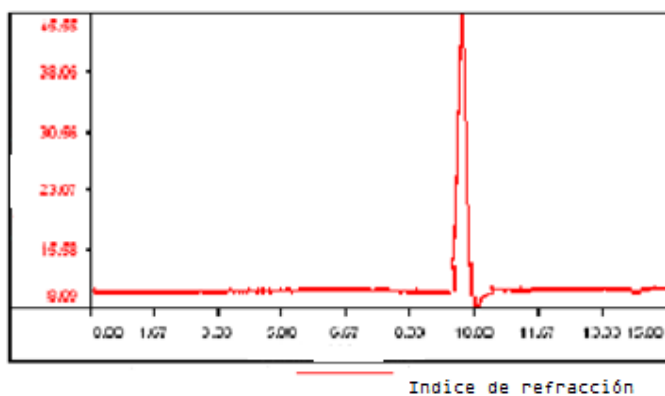


Figura D.3 Cromatograma del oligomero de poliéster BHEA.

D.2 Cromatogramas de los compuestos de uretano obtenidos antes de las pruebas de degradación

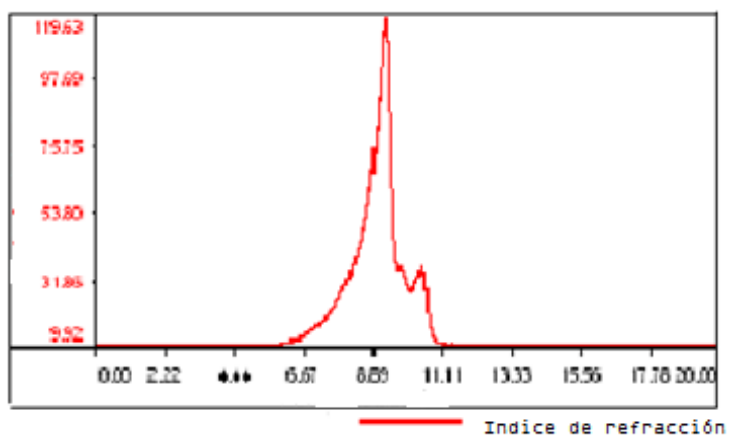


Figura D.4 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2).

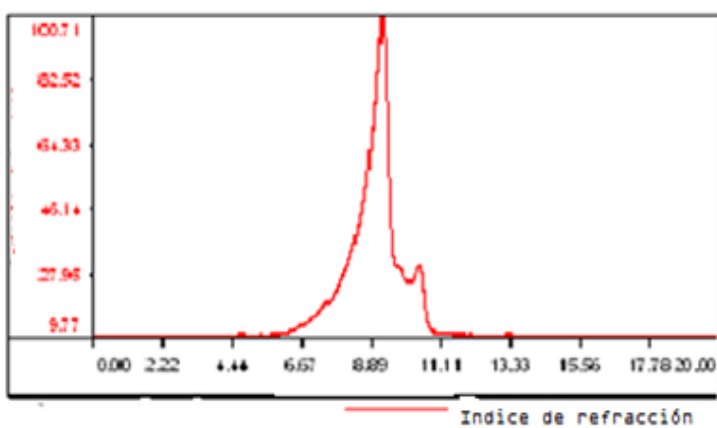


Figura D.5 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1).

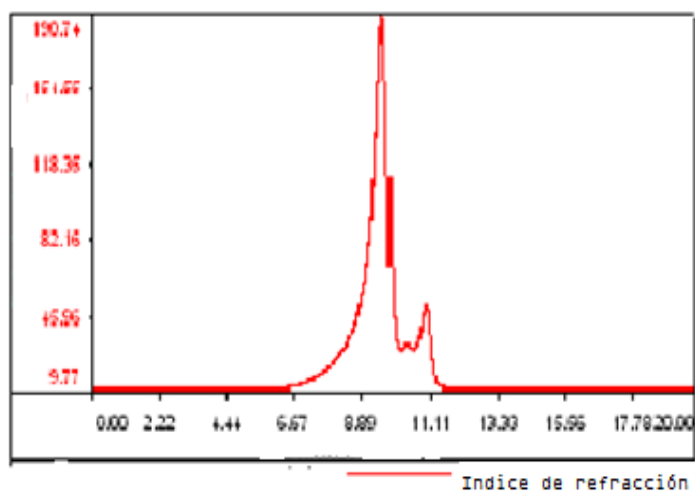


Figura D.6 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2).

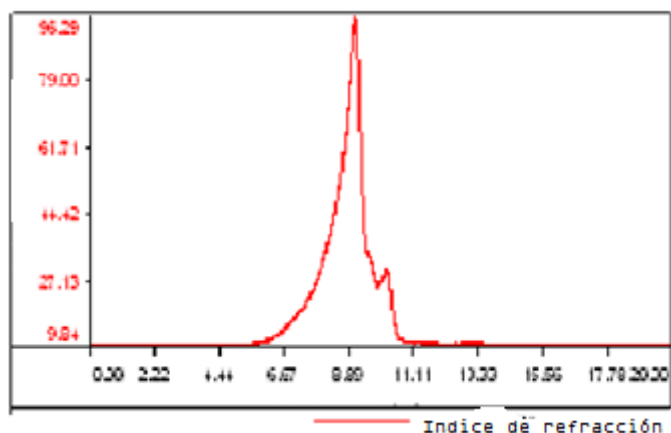


Figura D.7 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1).

D.3 Cromatogramas de los compuestos de uretano al término del tiempo de incubación (MM + cepa bacteriana).

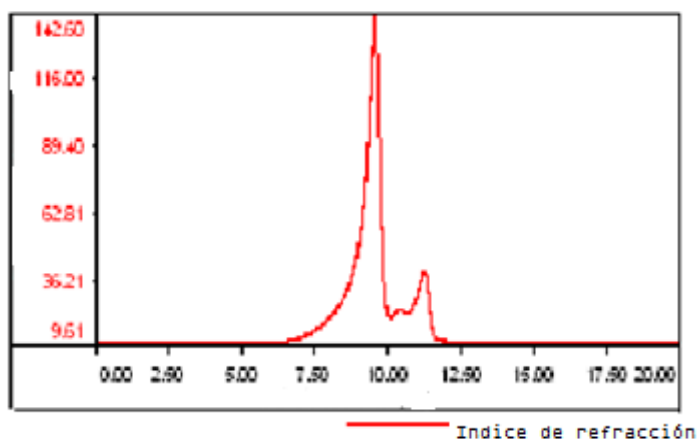


Figura D.8 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.

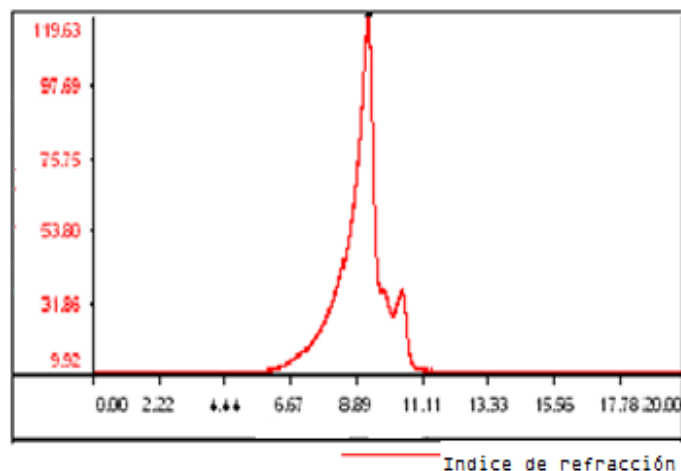


Figura D.9 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.

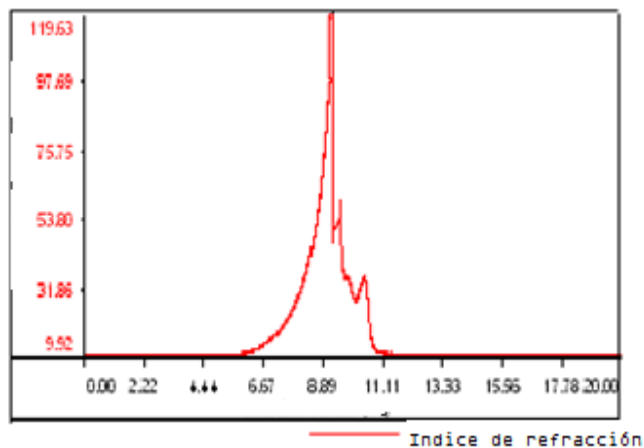


Figura D.10 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación.

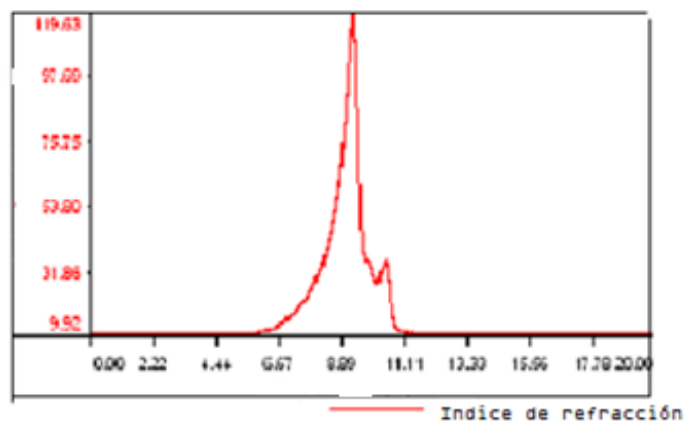


Figura D.11 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación.

D.4 Cromatogramas de los compuestos de uretano al término del tiempo de incubación (MM sin cepa bacteriana).

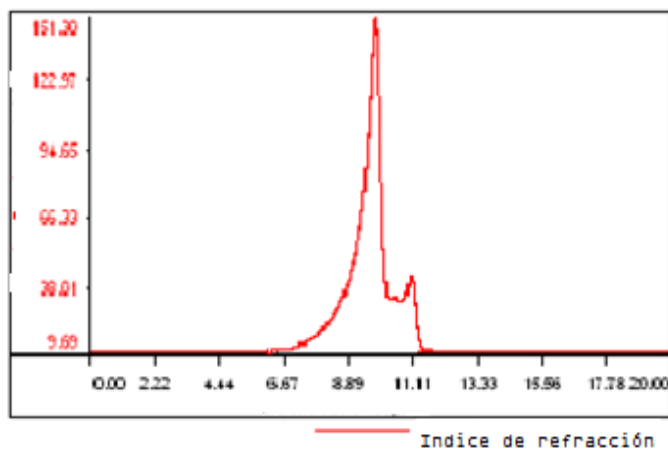


Figura D.12 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación sin cepa bacteriana.

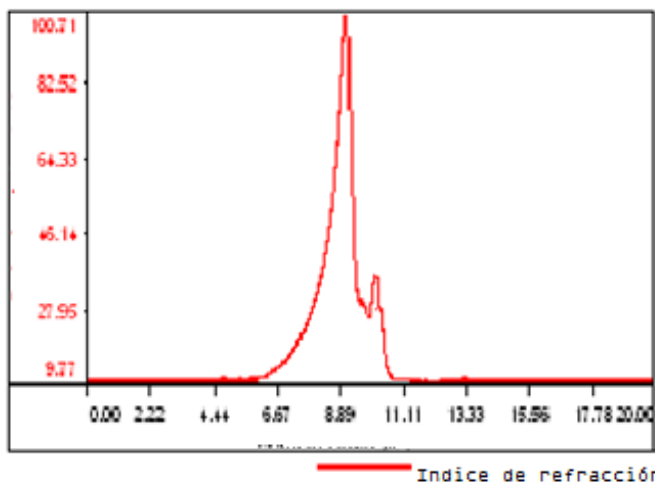


Figura D.13 Cromatograma del compuesto BHEA-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación sin cepa bacteriana.

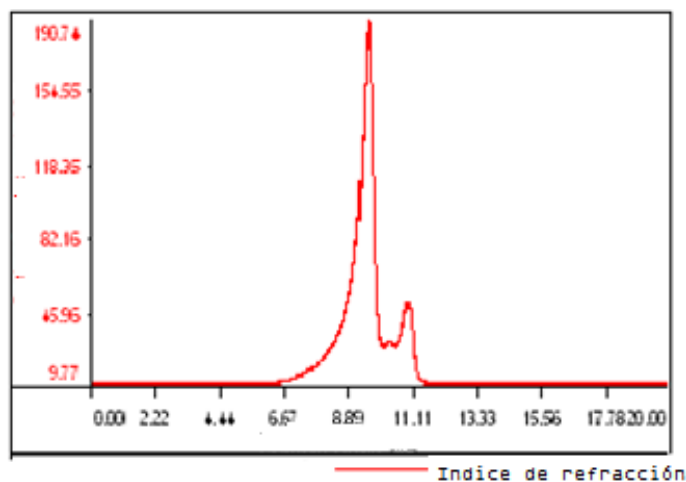


Figura D.14 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 1:2) al término del tiempo de incubación sin cepa bacteriana.

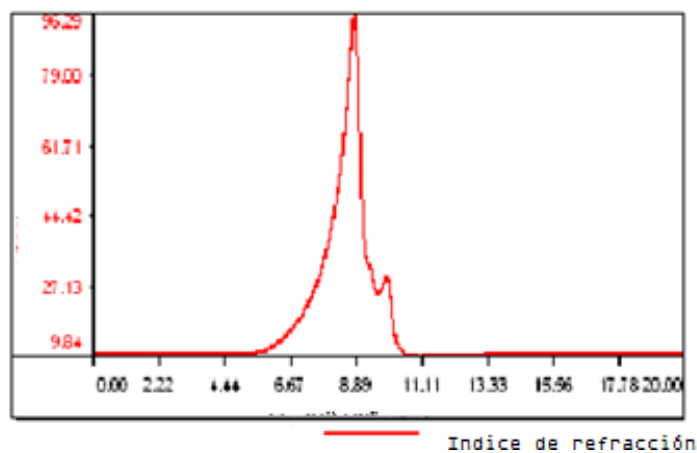


Figura D.15 Cromatograma del compuesto BHET-MDI (NCO/OH 2:1) al término del tiempo de incubación sin cepa bacteriana.

APENDICE E ANÁLISIS DEL DIISOCIANATO MDI

E.1 Espectro de IR del MDI.

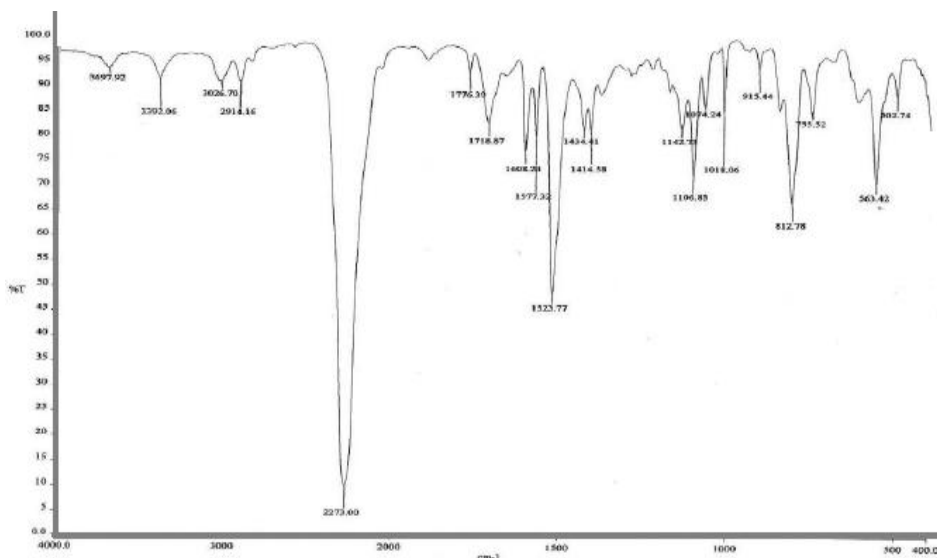


Figura E.1 Espectro obtenido mediante IR del diisocianato MDI empleado en la síntesis de compuestos de uretano.

E.2 Espectro de masas del MDI.

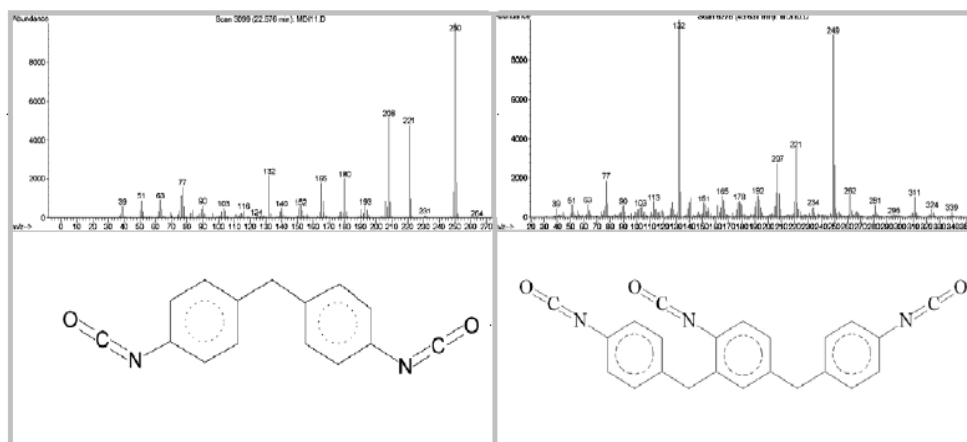


Figura E.2 Espectro de masas obtenido mediante GC-MS del diisocianato MDI empleado en la síntesis de compuestos de uretano.