



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

FACULTAD DE QUÍMICA

"SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE BIOPOLÍMEROS EN
1,1,1,2-TETRAFLUOROETANO LÍQUIDO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA – BIOINGENIERÍA

P R E S E N T A :

M. en I. ALBERTO LÓPEZ LUNA

TUTOR:

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

2011





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

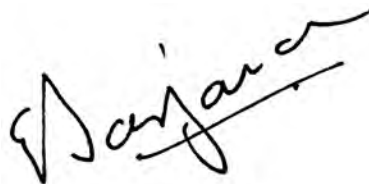
Presidente:	Dr. Alberto Tecante Coronel	Facultad de Química, UNAM
Secretario:	Dr. Herrera Najera Rafael	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. Keiko Shirai Matsumoto	UAM – Iztapalapa
1er. Suplente:	Dr. Joaquín Palacios Alquisira	Facultad de Química, UNAM
2do. Suplente:	Dr. Eduardo Vivaldo Lima	Facultad de Química, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 314, Edificio E.
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



FIRMA

DEDICATORIAS

A Dios:

Por haberme dado la vida y permitirme estar en este mundo, por levantarme cuando ya no he tenido ánimos para seguir adelante.

A mis Padres:

Por haberme criado y guiado durante todos estos años con su ejemplo, y sobre todo por estar siempre conmigo.

A mis Hermanos:

Por su cariño y por todos los momentos que hemos compartido juntos en la buenas y en la malas.

A mis Sobrinas:

Por formar parte de mi vida.

A Ana Laura:

Por haber entrado en mi vida y estar conmigo tanto en los buenos como en lo malos momentos y aceptarme tal y como soy

A mis Cuñadas y Cuñado:

Por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Laboratorio 314, Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el estudio de doctorado y proyecto CONACyT # 48641 para reactivos, congresos y equipo de laboratorio.

Posgrado de Ingeniería, UNAM, por el apoyo recibido para asistir a congreso

Presupuesto PAPIIT IN200109, recursos para reactivos

Dr. Eduardo Bárzana García.

Gracias por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo, por su paciencia, confianza y amistad. Sin su apoyo no habría sido posible todo esto.

Dr. Miquel Gimeno Seco

Por tu gran apoyo como asesor y sobre todo como amigo.

Dr. Eduardo Vivaldo Lima

Por sus asesorías y por los materiales proporcionados para la realización de este trabajo.

Dr. José Luis Gallegos

Por brindarme su apoyo, así como su amistad y por los materiales proporcionados para la realización de este trabajo.

M.C. Marco Antonio Uresti M.

Por sus asesorías y por su amistad.

USAI, LABORATORIO DE RESONANCIA MAGNETIA NUCLEAR, EDIFICIO B, PB, POSGRADO, UNAM

M. en C. Rosa Isela del Villar

Por las facilidades otorgadas en la realización de las pruebas de resonancia magnética nuclear.

**LABORATORIO DE ANALISIS TERMICOS, EDIFICIO B, PB, POSGRADO,
UNAM**

M. en C. Margarita Portilla Bazua

Por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas térmicas.

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES, UNAM

Q. Miguel Angel Canseco y M en C. Gerardo Cedillo

Por sus asesorías y amistad así como para la realización de pruebas térmicas y de resonancia magnética nuclear.

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENOMICA, SSA

Dr. Juan Pablo, Dra. Nora, B. Karla Grisel Calderón, Q.F.B Lisia

Por las facilidades otorgadas para realización de los análisis de MALDI-TOF, de igual modo por su amistad y asesorías.

A todos mis compañeros y compañeras del Laboratorio 314 de Alimentos y Biotecnología por su ayuda y sobre todo por su amistad

A todos mis amigos de generación tanto de licenciatura como a los que conocí durante el posgrado por sus asesorías y por su amistad

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
 CAPÍTULO I	
1.1 OBJETIVO	3
 CAPÍTULO II	
ANTECEDENTES	
2.1 BIOPOLIMEROS	5
2.1.1 Poli δ -Valerolactona.....	8
2.1.2 Poli ϵ - Caprolactona.....	8
2.1.3 Poliglicolido.....	9
2.1.4 Polilactido.....	9
2.1.5 Poli(láctido-co-glicólido).....	10
2.2 POLIMEROS HIPERRAMIFICADOS.....	11
2.2.1 Poliesteres Hiperramificados.....	12
2.3 ENZIMAS EN LA QUIMICA VERDE.....	12
2.3.1 Polimerizaciones Catalizadas Enzimáticamente vs Polimerizaciones Químicas.....	13
2.3.2 Síntesis Enzimática de Poliésteres por Polimerización por Apertura de Anillo (PAA).....	15

2.4	LIPASAS.....	17
2.4.1	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	17
2.5	DISOLVENTES EN LA QUÍMICA LIMPIA O “VERDE”	20
2.5.1	Dióxido de Carbono Supercrítico.....	22
2.5.2	1,1,1,2-Tetrafluoroetano (TFE o 134a) Líquido	22
2.5.3	Ventajas de la polimerización en FC con respecto a los DOV y Masa.....	24
2.5.4	Enzimas en Medios no Convencionales.....	25
2.5.5	Polimerización enzimática en medio no acuoso y recientes avances en scCO ₂	26
2.5.6	Avances recientes en polimerización enzimática en R-134a líquido.....	28

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1	DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO.....	29
3.2	MATERIALES.....	30
3.3	MEDICIONES ANALÍTICAS.....	31
3.4	TÉCNICA EXPERIMENTAL.....	32
3.5	CARACTERIZACIÓN.....	36
3.5.1	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear RMN de ¹ H y ¹³ C CP MAS.....	36
3.5.2	Espectroscopía de Masas (MALDI-TOF).....	36
3.5.3	Análisis térmicos: Calorimetría Diferencial de barrido (DCS) y Termogravimetría.....	37
3.5.4	Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).....	38

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	PAA de poliésteres alifáticos en FC.....	39
4.2	PAA en la producción de poliésteres hiperramificados.....	45
4.3	PAA de GA y su copolimerización con LLA en R-134a líquido....	65
	CONCLUSIONES.....	86
	RECOMENDACIONES.....	88
	BIBLIOGRAFÍA.....	92
	APENDICE.....	105

GLOSARIO

BL: γ -Butirolactone = γ -Butirolactona

PBL: Poly(γ -butirolactone) = Poly(γ -butirolactona)

VL: δ -Valerolactone = δ -Valerolactona

PVL: Poly(δ -valerolactone) = Poli(δ -valerolactona)

CL: ϵ -Caprolactone = ϵ -Capropactona

PCL: Poly(ϵ -caprolactone) = Poli(ϵ -caprolactona)

BHB: 2,2-bis(hydroxymethyl)butyric acid = ácido 2,2-bis(hidroximetil)butirico

GA: Glycolide (glycolic acid) = Glicólido

PGA: Polyglycolide [poly(glycolic acid)] = Poliglicólido

LLA: L-lactide (L-lactic acid) = L-láctido (ácido L-láctico)

PLLA: Poly(L-lactide) = Poli(L-láctido)

PLLGA: Poly(L-lactide-co-glycolide) acid = Poli ácido (L-láctido-co-glicólido)

PLLAVL: Poly(L-lactide-co- δ -valerolactone) = Poli(L-láctido-co- δ -valerolactona)

scCO₂: Supercritical carbón dioxide = Dióxido de carbono supercrítico

R-134a: 1,1,1,2-Tetrafluoroethane = 1,1,1,2-Tetrafluoroetano

CALB: B-lipase from *Candida atartica* = Lipasa B de *Candida atartica*

FC: Fluidos Comprimidos

DOV: Disolventes orgánicos volátiles

Novozym 435: immobilised *Candida atartica* lipase B = Lipasa B de *Candida atartica* Inmovilizada.

PAA: Polimerización por Apertura de Anillo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Propiedades fisicoquímicas de los monómeros.....	6
Tabla 2.2	Propiedades térmicas y mecánicas de algunos poliésteres alifáticos lineales y biodegradables.....	7
Tabla 2.3	Propiedades fisicoquímicas y toxicidad del CO ₂ y R-134a.....	21
Tabla 2.4	Propiedades físicas de algunos disolventes comunes.....	23
Tabla 2.5	Constantes dieléctricas y momento dipolar	24
Tabla 4.1	Resultados de la síntesis de PVL catalizada por la Novozym 435 en FC y en masa.....	40
Tabla 4.2	Resultados de la síntesis de los copoliésteres ramificados preparados con VL y BHB (6% mol).....	46
Tabla 4.3	Resultados de la síntesis de los copoliésteres ramificados preparados con CL y BHB (7% mol).....	47
Tabla 4.4	Resultados de la síntesis enzimática de PGA en R-134a líquido..	66
Tabla 4.5	Resultados de la síntesis enzimática de PLLGA en R-134a Líquido.....	66
Tabla 4.6	Resultados de la síntesis de P(VL-co-LLA) catalizada por la Novozyme 435 en R-134a y en masa.....	67
Tabla 4.7	Clasificación de los picos de resonancia en el espectro de RMN ¹ H del PLLGA en la región del grupo metileno del glicolido con respecto a su secuencia.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema de la polimerización enzimática de lactonas por apertura de anillo.....	15
Figura 2.2	Esquema del mecanismo de reacción de la lipasa CALB.....	18
Figura 3.1	a) Bomba Isco para fluidos comprimidos, b) Reactor de Alta Presión de 40 mL.....	29

Figura 3.2	Celda de alta Presión con Mirillas de Zafiro.....	30
Figura 3.3	Equipo utilizado para determinar pesos moleculares.....	31
Figura 4.1	Esquema de reacción para la PAA de la VL en FC.....	39
Figura 4.2	Mecanismo de la polimerización enzimática por apertura de anillo (PAA).....	41
Figura 4.3	a) Cinética de reacción para la síntesis poli(δ -Valerolactona) en TFE líquido, CO ₂ supercrítico y Bulk; b) Pesos moleculares de la poli(δ -Valerolactona) polimerizada en TFE líquido, CO ₂ supercrítico y masa.....	42
Figura 4.4	Esquema de reacción para la PAA de poliésteres hiperramificados en R-134a líquido.....	45
Figura 4.5	Comportamiento del rendimiento y del peso molecular con respecto al tiempo de reacción a) Poli(δ -Valerolactona-co-BHB) y b) Poli(ϵ - Caprolactona-co-BHB).....	48
Figura 4.6	A) Espectro RMN ¹ H de los copolímeros de VL y BHB a diferentes tiempos de reacción y el homopolímero de PVL como control; B) Espectro RMN ¹ H de los copolímeros de CL y BHB a diferentes tiempos de reacción y el homopolímero de PCL como control.....	50
Figura 4.7	Porcentaje mol de BHB incorporado en el polímero con respecto al tiempo para la copolimerización de a) VL con BHB experimentos de la tabla 4.22 y b) CL con BHB experimentos de la tabla 4.3, catalizado con CALB en R-134a líquido.	52
Figura 4.8	Espectro MALDI-TOF de la muestra del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB ₂), experimento 2, 2da fracción de la Tabla 2.....	54
Figura 4.9	Espectros MALDI-TOF de los copolímeros ramificados (muestras a 48 h de reacción) realizadas en modo reflectrón a) VL y b) CL primera fracción.....	55
Figura 4.10	Espectros MALDI-TOF de las reacciones de copolimerización de la VL con BHB a diferentes tiempo de reacción a) fracción 1 y fracción 2.....	57
Figura 4.11	Espectros MALDI-TOF de las reacciones de copolimerización de la CL con BHB a diferentes tiempo de reacción a) fracción 1 y b) fracción 2.....	58

Figura 4.12 Termogramas a) DSC y b) TG del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB ₂), experimento 3, 1a fracción de la Tabla 4.2.....	59
Figura 4.13 Comportamiento de las propiedades térmicas (T _m : temperatura de fusión y T _d : temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción a) Poli(δ-Valerolactona-co-BHB) 1a fracción, b) Poli(δ-Valerolactona-co-BHB) 2da fracción.....	62
Figura 4.14 Comportamiento de las propiedades térmicas (T _m : temperatura de fusión y T _d : temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción, a) Poli(ε-Caprolactona-co-BHB) 1a fracción y b) Poli(ε-Caprolactona-co-BHB) 2da fracción.....	63
Figura 4.15 Esquema de reacción para la PAA de a) GA y b) copolimerización con LLA en R-134a líquido.....	65
Figura 4.16 Comparación de los rendimientos obtenidos a diferentes tiempos mediante homopolimerización de δ-Valerolactona y copolimerización de δ-Valerolactona) con L-Lactido en masa y 134a líquido.....	68
Figura 4.17 a) Aspecto del R-134a al inicio de la reacción con LLA y Novozym 435 (vista frontal), b) Aspecto del R-134a a los 7 días de reacción (vista frontal).....	69
Figura 4.18 Comportamiento del rendimiento y del peso molecular (fracción soluble) con respecto al tiempo de reacción a) poliglicólido y b) poli(L-láctido-co-glicólido) ...	70
Figura 4.19. Integración de la señales características en el espectro RMN ¹ H del PLLGA obtenido a 24 h de reacción.....	73
Figura 4.20 Espectros RMN ¹ H de PGA y PLLGA obtenidos a diferentes tiempos de reacción.....	74
Figura 4.21 Espectro RMN ¹³ C en estado sólido realizado a 7500 Hz del PLLGA (región carbonilo).....	75
Figura 4.22 Espectros RMN ¹ H del PLLGA a diferentes tiempos de reacción en la región del grupo metileno del glicólido,.....	76

Figura 4.23	Espectros MALDI-TOF de los polímeros obtenidos vía enzimática en R-134a a) PGA y b) PLLGA.....	78
Figura 4.24	Ampliación de espectros MALDI-TOF a) PGA a 72 h de reacción, and b) PLLGA at 24 h de reacción, realizados en modo reflectrón, ion positivo.....	79
Figura 4.25	Espectros MALDI-TOF de los polímeros obtenidos a diferentes tiempos de reacción a) PGA y b) PLLGA.....	81
Figura 4.26	Termogramas a) DSC y b) TG del copolimero de GA con LLA, experimento 2, de la Tabla 4.5.....	83
Figura 4.27	Comportamiento de las propiedades térmicas (Tg: temperatura de transición vítrea, Tm: temperatura de fusión y Td: temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción a) poliglicolido y b) poli(glicolido-co-L-lactido).....	84

Resumen

En este trabajo se describe la síntesis enzimática de biopoliésteres usando un fluido comprimido como medio de reacción; el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) en estado líquido. Este fluido es considerado como un disolvente de baja toxicidad en el marco de la química verde que permite la síntesis de diferentes poliésteres vía enzimática. El carácter relativamente polar del R-134a líquido mejora la solubilidad de muchos sustratos de interés. En este trabajo, se reporta la síntesis exitosa de materiales lineales y ramificados, catalizada con una lipasa en condiciones suaves de reacción (25 bar y 65°C) en este medio. Los resultados han sido comparables e incluso mejores a las reacciones en masa, con disolventes convencionales o incluso dióxido de carbono supercrítico. Estos resultados, permiten concluir que la tecnología de los fluidos comprimidos es una alternativa viable hacia el desarrollo de procesos compatibles con el medio ambiente para la síntesis enzimática de polímeros de interés.

Abstract

This thesis describes the synthesis of enzyme mediated polyester structures using compressed fluids as solvent media, with emphasis in the use of compressed 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R-134a). Liquid R-134a is considered a green and non toxic solvent that allows the synthesis of several polyesters by enzymatic means, otherwise not possible when in bulk or in other non-polar solvents, such as toluene or supercritical carbon dioxide. The more polar character of liquid R-134a enhances the solubility of many substrates of interest. Herein, the lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched materials have been successfully prepared under mild reaction conditions (25 bar and 65°C) in R-134a, and the results have been compared to reactions in bulk or supercritical carbon dioxide media. Based on our results, compressed fluid technologies are prompted as promising green methods towards enzymatic synthesis of many polymers of interest.

CAPÍTULO I

1.1- OBJETIVO

Determinar las condiciones necesarias para la síntesis enzimática de estructuras poliméricas a partir de láctido, glicólido, delta-valerolactona y épsilon-caprolactona empleando fluidos comprimidos, reciclables y ecológicos, como medio de reacción.

Objetivos particulares:

- 1) Evaluar la solubilidad de los monómeros de interés en este estudio en 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido (R-134a).
- 2) Sintetizar poliláctido, poliglicólido y poli(láctido-co-glicólido) en R-134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido) empleando la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (CalB) como biocatalizador.
- 3) Sintetizar poli(delta-valerolactona) en (R-134a) y bióxido de carbono supercrítico empleando CalB como biocatalizador.
- 4) Sintetizar poli(delta-valerolactona) y poli(épsilon-caprolactona) hiperramificadas utilizando una molécula trifuncional en R-134a, empleando CalB como biocatalizador.
- 5) Caracterizar molecularmente los materiales obtenidos mediante técnicas analíticas avanzadas como:
 - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
 - Espectroscopía de masas: Desorción/Ionización Laser asistida por Matriz utilizando un Detector de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en ingles).
 - Técnicas de caracterización típicas para polímeros:
 - o Cromatografía de Permeación en Gel o Cromatografía de Exclusión de Tamaños (GPC/SEC) para determinar el peso molecular.

- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para la determinación de puntos de fusión y transición vítrea.
- Análisis Termogravimétrico (TGA) para determinar su estabilidad térmica.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Los materiales poliméricos más utilizados en la actualidad son sintetizados a partir de monómeros derivados del petróleo, como son los vinílicos, los cuales son además fuente de contaminantes durante su proceso de síntesis, poco o nada biodegradables. La existencia de ese tipo de materiales está supeditada a las reservas petroleras y según datos reportados al ritmo actual de consumo mundial las reservas se agotarán en el presente siglo.¹ Éstos también pueden contener sustancias de bajo peso molecular altamente tóxicas, como monómero residual, catalizadores químicos u otros aditivos de síntesis, los cuales requieren generalmente de procesos costosos para su eliminación y en la mayoría de los casos, perjudiciales para el medio ambiente. Debido a todo esto es un buen momento para iniciar el estudio de la síntesis y purificación de polímeros de origen natural o biopolímeros, como son los biopoliésteres, utilizando procesos que no afecten el medio ambiente y dando lugar a materiales que puedan servir como sustitutos de aquellos sintéticos, así como explotar nuevas aplicaciones de éstos en medicina² y/o embalaje y conservación de alimentos, entre otros.³

2.1-BIOPOLÍMEROS

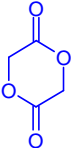


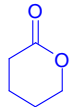
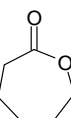
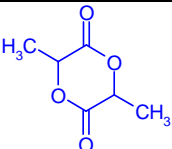

Hoy en día, materiales tales como biopolímeros, biocompuestos o fibras naturales han atraído un gran interés debido a su biodegradabilidad y carácter renovable. Los biomateriales son una excelente alternativa a los materiales que actualmente se utilizan en áreas como medicina, componentes electrónicos, aeroespacial, automóviles, entre otros.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de los monómeros ¹³⁸

	delta-Valerolactona (VL)	epsilon-Caprolactona (CL)	L-láctido (LLA)	Glicólido (GA)	ácido 2,2-bis(hidroximetil)butírico (BHB)
Fórmula	C ₅ H ₈ O ₂	C ₆ H ₁₀ O ₂	C ₆ H ₈ O ₄	C ₄ H ₄ O ₄	C ₆ H ₁₂ O ₄
Peso molecular	100.12 g/mol	114.14 g/mol	144.13 g/mol	116.07 g/mol	148.16 g/mol
Forma	Líquido transparente	Líquido transparente	Sólido, cristales	Sólido, polvo	Sólido, polvo
Color	Marrón claro	Incoloro	Incoloro	Blanco	Blanco
Punto de fusión	-13 a -12 °C	-1.5 °C	92-94 °C	82-86 °C	109-112 °C
Punto de ebullición	226-229 °C 58-60 °C a 0.5 mmHg	253 °C 97-98 °C a 15 mmHg	255 °C	No disponible	No disponible
Flash point	112 °C-frasco cerrado	109 °C-frasco cerrado	No disponible	No disponible	No disponible
Densidad	1.079 g/mL a 25°C	1.03 g/mL a 25°C	No disponible	No disponible	No disponible
Solubilidad en agua	Miscible	Miscible	No disponible	No disponible	48% a 20 °C
Índice de refracción	<i>n</i> ₂₀ /D 1.475	No disponible	<i>n</i> ₂₀ /D 1.447	No disponible	No disponible

En los últimos 30 años se han desarrollado aplicaciones novedosas para una variedad de productos a partir de diferentes monómeros (Tabla 2.1). Algunos de ellos incluyen el poli(ácido láctico) del maíz, productos de poliuretano obtenidos a partir de aceite de soya, adhesivos obtenidos de proteína de soya, lubricantes de aceites vegetales, polihidroxicanoatos o biocompuestos de fibra de lignocelulósicos combinados con polímeros derivados del petróleo, como polipropileno y polietileno.^{4,5}

Tabla 2.2 Propiedades térmicas y mecánicas de algunos poliésteres alifáticos lineales y biodegradables

Poliéster	Monómero	Punto de Fusión (°C)	Tg (°C)	Fuerza de Tensión (MPa)	Modulo de Young (MPa)	% de Elongación al Rompimiento	Origen	Propiedades
Poli(acido glicólico) (PGA)		223-233	46.5	100	6300	1.5	Sintético	Duro, quebradizo e insoluble en muchos disolventes
Poli(β -hidroxi propionato) (P β PA)		77	-19	103	1590	500-600	Sintético	Productos de degradación tóxicos
Poli(γ -hidroxi butirato) (P γ HB)		53	-51	50	70	1000	Bacterial	Suave, termoplástico
Poli(δ -valerolactona) (P δ VL)		57	-55	12.5	570	150-200	Sintético	Suave, plástico similar a la P ϵ PL
Poly (ϵ -caprolactona) (P ϵ CL)		60	-65	37	216	746	Sintético	Suave, plástico e hidrofóbico
Poli(L-Lactido) (PLLA)		180-192	56-66	64-77	619-2380	1.62-8	Sintético	Duro y quebradizo
Poli (β -hidroxi butirato) (P β HB)		174-177	4-5	28-36	1688-3670	1-7	Bacterial o Sintético	Duro y quebradizo

En la tabla 2.2 se muestran algunos de estos materiales y sus propiedades principales. Los polímeros biodegradables han recibido una creciente atención por su uso en una gran variedad de aplicaciones farmacéuticas y como material de empaque, ya que estos materiales pueden proporcionar considerables mejoras debido a sus propiedades térmicas y mecánicas, además de que su descomposición no produce compuestos tóxicos.⁶ Entre las diferentes familias de

polímeros biodegradables, los poliésteres alifáticos tienen una posición importante ya que la ruptura hidrolítica o enzimática de la cadena produce ácidos hidroxicarboxílicos que en la mayoría de los casos son metabolizados en el medio ambiente. Un ejemplo de estos polímeros biodegradables usados en aplicaciones médicas son el poliláctido, poliglicólido, poli(ϵ -caprolactona) y poli(δ -valerolactona).⁷ Sus principales propiedades son, rápida velocidad de biodegradación, propiedades de tensión, y biocompatibilidad, las cuales pueden ser optimizadas mediante copolimerización o mezclas de homopolímeros y/o copolímeros.⁸

2.1.1- Poli(δ -Valerolactona)

La poli(δ -valerolactona) (PVL) es un poliéster alifático hidrofóbico, semicristalino, estructuralmente similar al poliéster alifático poli(ϵ -caprolactona) (PCL). A diferencia de la PCL, la PVL ha sido poco explorada como material para uso en aplicaciones médicas.⁹ Diferentes métodos (polimerización en masa, polimerización en solución y diferentes catalizadores) han sido utilizados para la síntesis de PVL lineal y de sus copolímeros¹⁰⁻¹²; sin embargo no se ha explorado aún la síntesis de PVL ramificada¹³. La PVL es un biomaterial atractivo, no tóxico y biocompatible, que puede ser degradado por hidrólisis química o enzimática de los grupos éster en la cadena.¹⁴

2.1.2- Poli(ϵ -Caprolactona)

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es el poliéster alifático más estudiado de esta familia. La PCL es un polímero semicristalino con una temperatura de transición vítrea alrededor de -60 °C. El polímero tiene baja temperatura de fusión (59 a 64 °C) y es compatible con otros polímeros¹⁵. La PCL se degrada a una menor velocidad que el poliláctido (PLA) (alrededor de 2 años) y se usa para el desarrollo de

implantes de liberación de medicamentos de larga duración.¹⁶ La PCL es preparada mediante polimerización por apertura de anillo (PAA) del monómero cíclico de la ϵ -caprolactona (CL). Catalizadores como octoato de estaño y alcoholes de bajo peso molecular se utilizan para controlar el peso molecular del polímero.¹⁷

2.1.3 Poliglicólido

Es el poliéster alifático lineal más simple, fue utilizado para desarrollar la primera sutura sintética totalmente absorbible y se comercializó con el nombre comercial DEXON[®] en los años 60 del siglo XX. El monómero se sintetiza mediante un proceso de dimerización del ácido glicólico, el cual, por polimerización de apertura de anillo, produce un material de alto peso molecular y con un porcentaje de 1-3% de monómero residual. El polímero resultante se caracteriza por una elevada cristalinidad (45-55%), un alto punto de fusión (220-225°C) y una temperatura de transición vítrea de 35-40°C. No es soluble en muchos disolventes orgánicos, a excepción de los organofluorados como el hexafluoroisopropanol.¹⁸⁻²¹

Las fibras obtenidas a partir de poliglicólido (PGA) tienen elevados módulo de Young. Su rigidez dificulta su uso para suturas, excepto cuando se emplea como material trenzado. Las suturas de PGA pierden alrededor del 50% de su resistencia después de 2 semanas, el 100% en 1 mes, y son completamente absorbidas en 4-6 meses. El PGA ha sido copolimerizado con otros monómeros para reducir la rigidez de sus fibras.²²⁻²⁵

2.1.4 Poliláctido

El PLA también pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos. Se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo (PAA) del dímero cíclico del ácido láctico. El monómero tiene un carbono asimétrico por lo que es factible preparar polímeros con diferentes tacticidades (en polímeros se refiere al

arreglo estereoquímico en centros quirales de la macromolécula). El PLLA es el homopolímero derivado del monómero natural L-láctico (LLA), y presenta un elevado grado de cristalinidad (37%) debido a su estereoregularidad. El material tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado. El polímero es muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas. Sus características térmicas están definidas por un elevado punto de fusión (175-178 °C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C.²⁵⁻²⁷ El PLLA es más hidrofóbico y más resistente al ataque hidrolítico que el PGA, por lo que el isómero L es seleccionado cuando se requiere resistencia mecánica y largos tiempos de degradación, además de que es metabolizado con mayor eficiencia por el cuerpo. El PDLLA es un polímero amorfo, ya que está constituido por las dos formas isoméricas (D y L) del ácido láctico. En este caso, el polímero tiene baja resistencia a la tensión, alta elongación y una elevada velocidad de degradación que lo vuelve un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. Se preparan también copolímeros de PLLA y PDLLA para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y acelerar el proceso de degradación.^{22, 28-30}

2.1.5 Poli(láctido-co-glicólido)

Los copolímeros de glicólido con L-láctido y D,L-láctido han sido desarrollados para aplicaciones en sistemas liberadores de fármacos. Por ejemplo, un copolímero con 50% de glicólido (GA) y 50% de D,L-LA se degrada más rápidamente que sus homopolímeros puros.³¹⁻³⁴ El copolímero más importante presenta un 90% de GA y un 10% de LLA y es desarrollado por Ethicon como sutura absorbible con el nombre de VICRYL®.^{22, 35, 36}

El proceso general para la producción comercial de estos polímeros es el siguiente: ácido L-láctico o ácido glicólico son polimerizados por condensación para producir oligómeros de PLLA o PGA respectivamente, después se lleva a cabo una depolimerización de estos oligómeros mediante un cracking catalítico para obtener la lactona correspondiente [ácido L-láctido (LLA) o ácido glicólico (GA)] según sea el caso, estas lactonas (monómeros) son polimerizados bajo condiciones de vacío para producir PLLA o PGA o una mezcla de ambos monómeros para producir PLLGA de alto peso molecular mediante polimerización por apertura de anillo (PAA) con octoato de estaño o zinc metálico como catalizadores. Estos polímeros pueden ser degradados a ácido láctico o ácido glicólico en presencia de agua.^{28,29}

2.2- POLIMEROS HIPERRAMIFICADOS: síntesis, propiedades y aplicaciones

Las aplicaciones basadas en polímeros hiperramificados han crecido exponencialmente en los últimos años, ya que su alta funcionalidad permite el desarrollo de nuevos productos con una gran variedad de arquitecturas moleculares y aplicaciones.^{37,134} Estas características, junto al hecho de que su síntesis se realice en un solo paso, hacen que estos polímeros se contemplen como una alternativa económica y viable a los dendrímeros³⁹ ya que presentan propiedades similares. Además, la preparación de dendrímeros requiere de procedimientos de síntesis por pasos que implican mucho esfuerzo para obtener al final productos en cantidades muy limitadas. La modificación de los grupos terminales de los polímeros hiperramificados permite variar algunas de sus propiedades, tales como la temperatura de transición vítrea, la solubilidad y la viscosidad, del mismo modo que determina muchas de sus posibles aplicaciones. Estas aplicaciones van desde aditivos para recubrimientos hasta las más avanzadas tecnologías, como es el caso de los sensores.⁴⁰⁻⁴²

2.2.1- Poliésteres hiperramificados

La síntesis de poliésteres alifáticos hiperramificados ha sido reportada por Hendrick et al.³⁸ así como Fréchet et al.,¹³³ quienes usaron CL y estaño como catalizador mediante PAA; sin embargo, la reacción se realizó en múltiples pasos, lo que limita su aplicabilidad. En 2005 Frey et al.⁴³ reportaron la polimerización de CL con ácido 2,2-bis(hidroximetil)butírico (BHB) utilizando un complejo de cloruro de hafnio (IV) con THF [$\text{HfCl}_4(\text{THF})_2$] y trifluorometanosulfonato de difenilamonio (DPAT) como catalizadores en tolueno, obteniendo pesos moleculares en el rango de 22000-166000 g/mol e índices de polidispersidad (PDI) de 1.20 a 1.95. Tasaka et al.¹³⁵ en 1999 reportaron la síntesis de un PLA ramificado tipo peine mediante la polimerización por injerencia de LLA en un copolímero de α -hidroxipropiónico/láctido el cual tiene residuos de serina y copolímeros injertados, compuestos de PLA y polisacáridos, tales como pululana o amilosa, mediante el método de trimetilsilano. Sin embargo, estos métodos requieren de reacciones en múltiples pasos y/o procesos adicionales, tales como desprotección. Es por eso que estos autores propusieron un nuevo método para la síntesis de un producto ramificado de PLA a través de la copolimerización de L-LA usando un metabolito intermediario; la DL-mevalonolactona (ML) como un comonomero bifuncional, el cual es un anillo de lactona con un grupo hidroxilo, usando 2-etilhexanoato de estaño como catalizador en masa.⁴⁴ Zhao et al.⁴⁵ en 2002 reportaron la síntesis usando un dendrímetro de PAMAM (generación 3) funcionalizado con grupos OH como núcleo base (core) para la síntesis de un poliláctido novedoso en forma de estrella, en presencia de octoato de estaño (SnOct_2) como catalizador en masa.

2.3 ENZIMAS EN LA QUÍMICA VERDE

Sin duda, otra área científica de interés enmarcada dentro de la llamada "química verde" es la utilización de enzimas como catalizadores en síntesis, debido a que son altamente activas, selectivas y biodegradables, además de que pueden ser recuperadas y reutilizadas.⁴⁶⁻⁴⁸ En la naturaleza todos los polímeros son producidos

in vivo mediante la acción de las enzimas en los organismos vivos. La síntesis *in vitro* de polímeros a través de la catálisis enzimática (polimerización enzimática) ha tenido un gran desarrollo en los últimos años. La catálisis enzimática ha proporcionado una nueva estrategia de síntesis para polímeros de interés, incluso en casos muy difíciles de obtener por catálisis química convencional. La síntesis enzimática de polímeros vía ruta no metabólica (i.e. *in vitro*), ha sido reconocida como una nueva área para la síntesis de polímeros de manera selectiva. Además, la polimerización enzimática puede contribuir en forma importante a la sustentabilidad global sin el agotamiento de importantes recursos, ya que se utilizan materiales renovables no petroleros como materia prima para su síntesis. En las polimerizaciones enzimáticas, los materiales pueden ser obtenidos bajo condiciones suaves de reacción y se evita el uso de reactivos tóxicos. Por lo tanto, la polimerización enzimática puede ser considerada como un proceso amigable con el medio ambiente y como un ejemplo para producir polímeros de forma sustentable. Los ejemplos más importantes del uso de enzimas en la síntesis de polímeros son policondensación, polimerización oxidativa, y polimerización por apertura de anillo.^{49, 50}

2.3.1- Polimerizaciones Catalizadas Enzimáticamente vs Polimerizaciones Químicas

La catálisis enzimática ofrece varias ventajas sobre la catálisis química. Los poliésteres biodegradables sintetizados químicamente generalmente utilizan catalizadores organometálicos, los cuales tienen que ser completamente removidos para aplicaciones biomédicas. Los iniciadores organometálicos más ampliamente usados están basados en Zn, Al, Sn o Ge. El 2-etilhexanoato de estaño ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) es el catalizador más usado en la PPA de lactonas. Es prácticamente imposible remover completamente los compuestos organometálicos y residuos de estos poliésteres, requisito indispensable en aplicaciones médicas, debido a que los compuestos organometálicos son caracterizados por su alta toxicidad. De igual

manera, se requieren monómeros extremadamente puros y condiciones anhidras para llevar a cabo la polimerización por la ruta química.⁵¹⁻⁵³

Los procesos convencionales para la síntesis de poliésteres de alto peso molecular por reacciones de policondensación por pasos involucran calentar una mezcla de diol y ácido carboxílico o un ácido hidroxicarboxílico a altas temperaturas (>200 °C) por varias horas, en presencia de un catalizador fuertemente ácido. La reacción de poliesterificación es una reacción en equilibrio por lo que el agua producida tiene que ser removida por vacío o usando destilación azeotrópica en presencia de un agente desecante (tamiz molecular). A estas condiciones de temperatura pueden llevarse a cabo las reacciones secundarias de deshidratación de dioles, cambiando en forma indeseable la estequiometría de la reacción. Por otro lado, la polimerización catalizada enzimáticamente es un proceso benigno y puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas.⁵⁴⁻⁵⁷

Los beneficios de la polimerización catalizada enzimáticamente son:⁵⁵

- a) Las enzimas catalizan reacciones con alta enantio- y regio-selectividad
- b) Las reacciones catalizadas enzimáticamente se llevan a cabo en condiciones de reacción suaves (temperatura, presión, pH, etc.).
- c) Las enzimas pueden ser usados en masa, medios orgánicos y/o procesos multifases.
- d) Las enzimas provienen de recursos renovables. Las enzimas son materiales reciclables, eco-amigables y no tóxicos. De ahí que la necesidad de la completa remoción de la enzima no sea tan importante.
- e) Se pueden sintetizar polímeros con estructuras bien definidas por procesos de catálisis enzimática
- f) Las lipasas no requieren la remoción completa del agua y aire cuando son usados como catalizadores para la síntesis de poliésteres, en contraste con los iniciadores químicos tradicionales, con los que se tienen que tomar estrictas precauciones.

- g) Se han polimerizado fácilmente pequeñas lactonas cíclicas (4-7 miembros) usando iniciadores organometálicos. Sin embargo, la polimerización de lactonas de anillos grandes (macrociclos) es baja y sólo se obtienen productos de bajo peso molecular.

2.3.2- Síntesis Enzimática de Poliésteres por Polimerización por Apertura de Anillo (PAA)

En la figura 2.1 se muestra el esquema general de la reacción de PAA de lactonas.

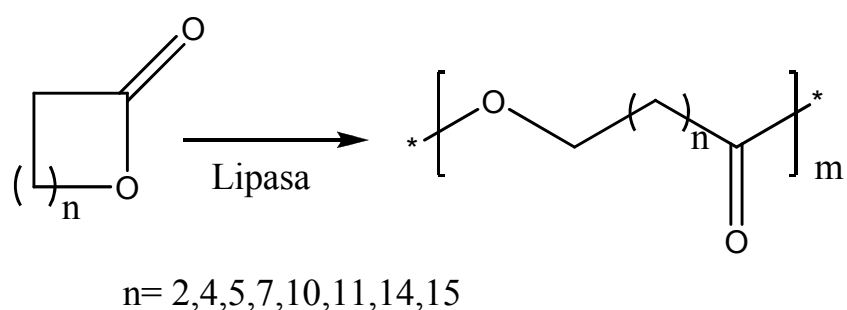


Figura 2.1 Esquema de la polimerización enzimática de lactonas por apertura de anillo

Se pueden usar enzimas para producción de poliésteres vía PAA, así como el reciclado químico de los mismos a través de la hidrólisis enzimática del polímero a monómeros. También las enzimas pueden proporcionar una herramienta muy versátil para polimerizaciones regio y enantioselectivas. Las polimerizaciones catalizadas con enzimas surgieron hace aproximadamente 20 años, usando principalmente lipasas. Las polimerizaciones enzimáticas han tenido un rápido desarrollo ya que representan una ruta para la síntesis de polímeros. Los precursores fueron dos grupos independientes, el de Uyama y Kobayashi (Universidad de Keio, Japón), y el de Knani (Instituto de Tecnología, Israel), quienes en 1993 demostraron por primera vez que las lactonas pueden ser polimerizadas por apertura de anillo con una lipasa para formar poliésteres. Al

polimerizar CL y VL obtuvieron un peso molecular promedio en número (Mn) máximo de 7700 para la PCL y pesos moleculares menores a 2000 (Mn) para la PVL. Se polimerizaron lactonas de diferentes tamaños (4 a 16 unidades) por PAA catalizadas por lipasas, y se encontró que la reactividad varía de acuerdo al tamaño del anillo, así como del origen de la enzima.⁵⁸⁻⁶⁰

Se han publicado numerosos estudios desde el primer reporte de PAA por vía enzimática de lactonas en 1993⁶¹⁻⁶⁷. Sin embargo, el número de publicaciones con respecto a la polimerización enzimática del ácido láctido ha permanecido sorprendentemente bajo y no siempre se presenta la evidencia de conversión catalítica del láctido por parte de la enzima. En 1997 se logró la polimerización de LLA, DLA y DLLA con la lipasa de *Candida cylindracea*, lipasa de páncreas de porcino (PPL) y con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PS), en masa a 80-130°C, reportando pesos moleculares (Mw) en el intervalo de 8,000-270,000 g/mol.^{61,62} El inconveniente mayor fue el bajo rendimiento (3-16%) en todos los experimentos. El mismo grupo publicó la co-polimerización de LLA, DLA y DLLA con trimetilen-carbonato usando lipasa (PPL) en masa, en un intervalo de temperatura de 80-100°C, alcanzando pesos moleculares (Mw) en el rango de 12,000-21,000 g/mol.⁶³ Recientemente, se usó la lipasa PS para la síntesis en masa de PLA ramificado a 140°C,⁶⁴ y para la co-polimerización en masa de LLA y DLLA con GA a 100-130°C.⁶⁵ En todos los casos los autores concluyen que bajo estas condiciones de reacción también se lleva a cabo de manera importante la polimerización térmica (sin enzima). Frey et al. (2002) reportaron la polimerización de la CL con ácido 2,2-bis(hidroximetil)butírico en benceno, con agitación, utilizando Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) (CalB) con un rendimiento del 96%, Mn de 61,500 g/mol y PDI de 1.20.^{66, 67}

2.4- LIPASAS

Las hidrolasas son las enzimas más usadas en biocatálisis y las lipasas forman una parte muy importante de esta clase de enzimas. Cuando se descubrió que las lipasas mantienen su actividad en disolventes orgánicos, estas enzimas se convirtieron en herramientas ideales para la química orgánica. ¿Qué es lo que hace a estas enzimas tan atractivas? 1) Han mostrado ser altamente quimioselectivas, regioselectivas, y estereoselectivas, 2) se encuentran fácilmente disponibles en grandes cantidades debido a que muchas de ellas son producidas con altos rendimientos por microorganismos como los hongos y las bacterias, 3) la estructura cristalina de muchas lipasas ha sido resuelta, facilitando considerablemente el diseño de estrategias de síntesis. Finalmente, estas enzimas normalmente no requieren cofactores y no catalizan reacciones secundarias. Estas propiedades hacen que las lipasas sean el grupo de biocatalizadores más usados en química orgánica. Una lipasa está definida como una carboxilesterasa, que actúa en enlaces éster de ésteres carboxílicos y que catalizan la hidrólisis y síntesis de cadenas largas de acilglicerol.⁶⁸⁻⁷⁰

2.4.1- Lipasa B de *Cándida antártica*

La levadura *Cándida antártica* fue originalmente aislada en la Antártica y se encontró que producía dos tipos de Lipasa (CALA y CALB). La mayoría de las lipasas muestran activación interfacial; su actividad es mucho más alta comparado con el sustrato disuelto, cuando actúan en sustratos en una interfase micelar de agua. La CALA muestra activación interfacial, mientras que la CALB no muestra tal comportamiento y es por eso que no es considerada como una verdadera lipasa. La activación interfacial puede ser explicada por la apertura de una lid (tapa) en la estructura de la enzima, en una interfase. La lipasa con una lid abierta es la forma activa de la enzima y da acceso al sitio activo. Esta lid que cubre el sitio activo de las lipasas verdaderas, está ausente o es muy pequeña en la CALB.⁷¹

La CALB está formada por 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33 kDa.

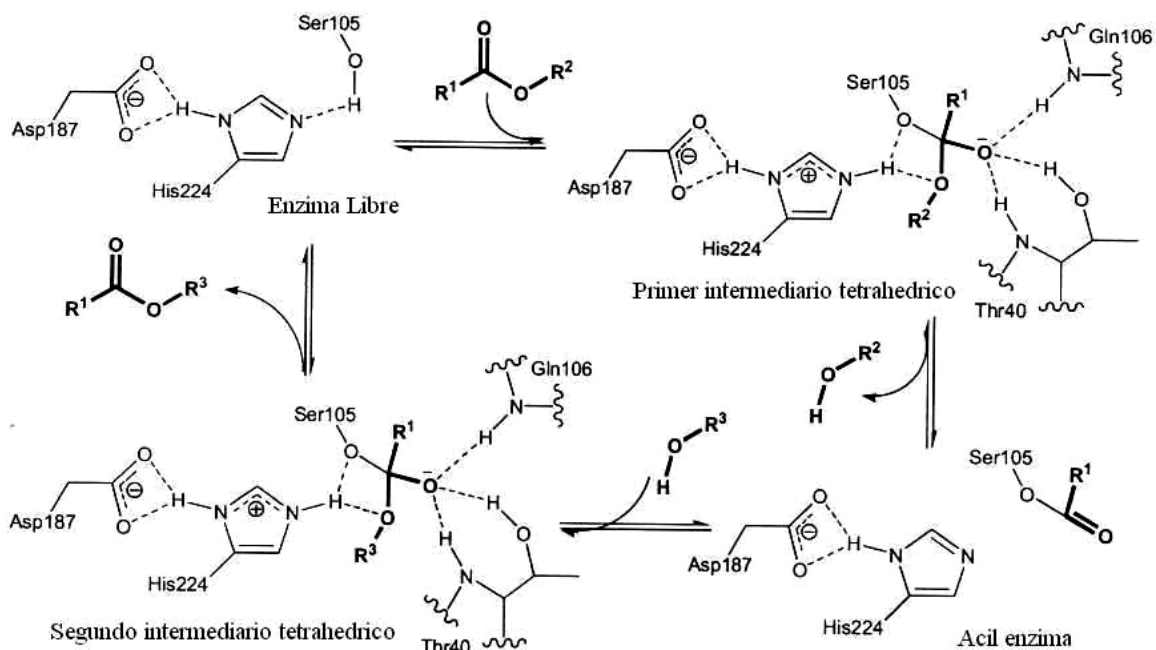


Figura 2.2 Esquema del mecanismo de reacción de la lipasa CALB.⁷⁴

En la figura 2.2 se muestra el mecanismo general de acción de la lipasa CALB en la reacción de transesterificación. El sitio activo de la CALB contiene la triada catalítica de Ser105-His224-Asp187, común en todas las serina hidrolasas.⁷² La CALB cataliza reacciones de transferencia de acilo y sigue el mecanismo de "ping-pong bi-bi". El modelo "Bi-Bi" describe de manera general un modelo de reacción de dos sustratos-dos productos (Bi-Bi), donde el producto de formación ocurre únicamente después de la formación de un complejo enzima-dos sustratos. El modelo "Ping-Pong Bi-Bi" describe un mecanismo particular del modelo Bi-Bi, en el que, el enlace de los sustratos y la liberación de los productos es ordenada, y es un mecanismo Ping-Pong porque la enzima hace un recorrido entre un estado libre y un intermediario sustrato-modificado.¹⁴¹ El primer sustrato entra en el sitio activo y forma el primer intermediario tetrahédrico. Cuando el primer producto deja el sitio activo se forma la acil-enzima. Cuando el segundo sustrato entra en el sitio activo se forma el segundo intermediario tetrahédrico. Entonces el segundo producto deja el sitio activo y la enzima está lista para otro ciclo catalítico.^{73, 74}

La CALB puede catalizar reacciones de transferencia de acilo entre varios compuestos. Dependiendo del grupo R, la reacción puede ser hidrólisis, esterificación, o transesterificación. El segundo sustrato también puede ser una amina, lo que podría resultar en la reacción de aminólisis. En una hidrólisis o transesterificación, el primer sustrato (el acilo donador) puede ser un tioéster.

Algunas aplicaciones de la CALB son la resolución de alcoholes secundarios quirales, en la producción de poliésteres. La CALB es una enzima termoestable que ha sido usada hasta 150 °C en disolventes orgánicos de alta polaridad como acetonitrilo y dimetil sulfóxido, líquidos iónicos, sistemas solido gas y en CO₂ supercrítico, así como otros fluidos comprimidos.^{75, 76}

La CALB se encuentra de forma comercial inmovilizada. La inmovilización de la enzima en un soporte sólido, ha mejorado la actividad, selectividad, estabilidad y reutilización en medio orgánico comparado a la enzima libre. Las resinas macroporosas, debido a su gran área superficial, han sido de gran interés para la inmovilización de la CALB. Por estas razones, la CALB fue físicamente inmovilizada en Lewatit VP OC 1600 (suministrado por Bayer) que consiste de una resina acrílica entrecruzada de poli(metil metacrilato-co-divinilbenceno) con valores promedio de tamaño de partícula, área superficial, y diámetro de poro de 315-1000 μm, 130 m² g⁻¹, y 150 Å, respectivamente. Esta presentación de CALB inmovilizada es conocida comercialmente como Novozym 435 y fue desarrollado por Novozymes (Dinamarca), y esta comercialmente disponible. De hecho numerosas publicaciones documentan la utilidad de la Novozym 435 como un extraordinario catalizador para pequeñas moléculas orgánicas, y recientemente, para reacciones de polimerización.⁷⁷⁻⁸⁰

El mecanismo de polimerización se lleva a cabo en dos pasos: iniciación y propagación, en el primero ocurre la apertura del anillo de la lactona mediante el ataque nucleofílico del grupo -OH (en el residuo de serina) de la enzima formando un complejo enzima-monómero y liberando una molécula de agua, después este complejo reacciona con una molécula de agua produciendo un hidroxiaácido, que en nuestro caso es la forma abierta de la lactona y la enzima en su forma libre lista para reaccionar con otra lactona para formar un nuevo complejo enzima-monómero, que al reaccionar con otro hidroxiaácido en vez de una molécula de agua, se lleva a cabo la propagación para formar el polímero el cual deja el sitio activo y la enzima está lista para otro ciclo catalítico.

2.5- DISOLVENTES EN LA QUIMICA LIMPIA O “VERDE”

Por otro lado, durante las dos últimas décadas se ha observado a nivel mundial un interés creciente en el desarrollo de nuevas tecnologías y procesos eco-eficientes, enmarcados en la denominada “química verde” o “química limpia”.⁸¹ Una de las técnicas más importantes basadas en este principio utilizan fluidos comprimidos (FC) como disolventes. El dióxido de carbono en estado supercrítico (scCO₂) es el FC mas estudiado como medio alternativo a los disolventes orgánicos volátiles (DOV), ya que estos son tóxicos y dañinos para el medio ambiente además de ser peligrosos debido a su carácter inflamable.

Tabla 2.3 Propiedades fisicoquímicas y toxicidad del CO₂ y R-134a ^{139, 140}

	Dióxido de Carbono	R-134a
Formula	CO ₂	CH ₂ FCF ₃
Peso Molecular	44.01 g/mol	102 g/mol
Forma	Gas, líquido, sólido	Gas licuado
Color	Incoloro	Claro, incoloro
Olor	Indoro	Ligeramente a éter
Punto de ebullición	-78.5 °C a 1 atm	-26.2 °C a 736 mmHg
Punto de congelamiento	-56.6 °C a 76 psia	-
Punto de ignición	N/A	Punto de flamabilidad: No se quema Autoignición: >743 °C
Presión de vapor	56. 5 atm (831 psia) a 20°C	96 psia a 25°C
Densidad del gas Densidad líquido	0.0018 g/mL a 20 °C	3.6 (Aire=1) a 25 °C 1.21 g/cm ³ a 25 °C
Solubilidad en agua	87.8% en volumen a 20 °C, 1 atm	0.15% en peso a 25 °C, 14.7 psia
Estabilidad	Estable	Estable
Concentración en aire	0.03 % por volumen-Nivel Normal 1%-Incrementa ritmo de la respiración 3-6%-Dolor de cabeza, sudor, disnea 6-10 %-Dolor de cabeza, sudor, disnea, temblor, disturbios visuales, inconsciencia Mayor a 10% Inconsciencia o muerte	50,000 ppm (6 horas diaria, 5 días a la semana por 2 años) baja toxicidad en ratas 75,000 ppm taquicardia en perros 8 dosis de 8,000 ppm en 1 hora cada 7 días no dio resultados adversos en pulso, electrocardiograma y función pulmonar en humanos
Limite de exposición: OOSHA: PEL-TWA ACGIH-TW-TWA NIOSH CPT CCT	5,000 ppm 5,000 ppm No establecido 5,000 ppm 15,000 ppm	No Establecido No Establecido AEL (DuPont) 1000 ppm, 8 & 12 Hr TWA WEEL (AIHA) 1000 ppm, 8 Hr. TWA
IARC NTP OSHA	No esta clasificado como cancerígeno	No esta clasificado como cancerígeno

2.5.1- Dióxido de Carbono Supercrítico ($scCO_2$)

El $scCO_2$ es un medio atractivo debido a su bajo costo, baja toxicidad, su carácter no inflamable y a que sus constantes críticas son fácilmente accesibles ($T_c=31^\circ C$, $P_c=73,8bar$). La densidad de este fluido en su estado supercrítico es similar a la de los líquidos, mientras que su viscosidad y su capacidad de difusión son comparables a las de los gases.⁸²⁻⁸⁴ Las consecuencias de esto son una buena solvatación de solutos aunado a una excelente transferencia de masa y un buen mezclado.⁸⁵ DeSimone *et al.* en 1992,⁸⁶ fue el pionero en reportar la efectividad de este medio en procesos de síntesis de polímeros. Además, el $scCO_2$ es usado en la actualidad en la industria en sistemas de limpieza en seco, en extracción o purificación de sustratos (e.g. extracción de cafeína) y se investiga su uso en otros campos (como en procesos de cristalización), mediante sistemas que permiten la recuperación y reciclaje del mismo, lo cual promueve una tecnología limpia y ecológica.^{87,88} Sin embargo, uno de los problemas que plantea la utilización de este fluido apolar es la baja solubilidad de solutos polares, como los aminoácidos. La utilización de surfactantes sintéticos para ampliar la aplicación del CO_2 comprimido como disolvente, especialmente en polimerizaciones, es un campo de investigación reciente. Sin embargo dichos surfactantes son potencialmente tóxicos y difíciles de remover, con lo que queda en entredicho el compromiso de la denominada química limpia.⁸⁹

2.5.2- 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (R-134a o TFE) Líquido

Otro FC que ha suscitado recientemente atención es el 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido (R-134a), debido a que no es tóxico, no es inflamable y al igual que el CO_2 , no destruye la capa de ozono y es fácilmente reciclable. Aunque, al igual que el CO_2 fomenta el efecto invernadero, la operación con estos fluidos puede diseñarse en un sistema cerrado de recirculación (Tabla 2.3). El R-134a es aceptado tanto en México como EEUU y la UE en el tratamiento de productos

alimenticios y en aplicaciones farmacéuticas.⁹⁰ Por ejemplo, el R134a se usa como aerosol en el tratamiento del asma constituyendo alternativa una a los fluoroclorocarbonos o clorocarbonos, los cuales son mas dañinos para el medioambiente, ya que destruyen la capa de ozono (razón por la cual fueron vetados por el protocolo de Montreal en 1987). La importancia del uso del R-134a en procesos químicos cuando se compara con el scCO₂ reside en que el R-134a puede operar de forma efectiva a mucha menor presión (15-20 bar), manteniendo propiedades físico-químicas similares sin necesidad de superar sus constantes críticas ($T_c=101^\circ\text{C}$, $P_c=40.6\text{bar}$).⁹¹ Además, la polaridad de este FC ($\epsilon=5.0$, $E=2.1\text{D}$) favorece la solubilidad de substratos de mayor polaridad. En la tabla 2.5 y 2.4 se muestran algunas de sus propiedades comparadas con las de otros fluidos.

Tabla 2.4 Propiedades físicas de algunos disolventes comunes

Disolvente	Viscosidad (cP a 25°C)	Tensión superficial (dyn/cm)
scCO ₂ (200 bar, 33 °C)	0.1	NA
R134a (15 -20 bar, 25°C)	0.21	8.7
Dietil eter	0.223	17.0
Hexano	0.294	18.4
Acetona	0.316	23.7
Cloroformo	0.53	-
Metanol	0.56	22.6
Agua	0.89	73.0

El conjunto de estas características permiten que el R-134a líquido sea explotado industrialmente como en el caso de procesos de extracción de productos naturales.⁹² También han sido reportadas sus ventajas como disolvente no convencional en distintos procesos, incluida la síntesis de polímeros, reportado recientemente por Cooper *et al.*⁹³⁻⁹⁵

Tabla 2.5 Constantes dieléctricas (ϵ) y momento dipolar (DM)

Disolvente	ϵ(kHz)	DM
R.134a	9.5	2.05
Hexano	1.9	0.08
Dietil eter	4.34	1.52
Diclorometano	9.08	1.55
Tetrahidrofurano	7.61	1.63
Acetona	20.7	2.9
Metanol	32.6	1.66

2.5.3- Ventajas de la polimerización en FC con respecto a los DOV y Masa

En general, la polimerización en scCO₂ y R-134a líquido se ve favorecida no sólo por la insolubilidad de los productos finales en el medio, lo cual facilita su separación, sino también por la inherente plastificación o hinchamiento de algunos polímeros en el mismo, debido a la baja viscosidad y su elevada capacidad de interpenetración, siendo considerados como buenos agentes porogénicos. También se destaca que los FC aquí descritos tienen la capacidad de actuar como lubricantes entre las cadenas crecientes de polímero, permitiendo con ello la rápida difusión del monómero o catalizador y facilitando así el mecanismo de propagación. Por otro lado, con el uso de FC se eliminan las trazas de residuos de disolvente en el material, comúnmente presentes cuando se utilizan DOV, debido a su completa volatilización a presión atmosférica, facilitando así el proceso de purificación del material.⁹⁶ En las polimerizaciones en disolución con DOV, o en ausencia de estos (polimerización en masa), el polímero es comúnmente disuelto en un disolvente y posteriormente precipitado en un anti-disolvente con el fin de remover monómero residual, oligómeros y otros aditivos.⁹⁷ En la polimerización en masa, donde sólo coexisten el monómero líquido y el iniciador disuelto en el mismo, se obtienen productos de alta claridad óptica y pureza. Sin embargo, dado que las reacciones son exotérmicas, se produce una disipación del calor ineficiente dando lugar a puntos calientes indeseables o "hot spots" en el seno de la reacción.

Además, existe el incremento de la viscosidad del medio a medida que avanza la reacción, siendo éste un impedimento para la eficiente conversión de monómero.⁹⁸ La polimerización en disolución trata de superar parcialmente estos problemas ya que el uso de un DOV facilita la difusión de las sustancias y mejora la disipación del calor de reacción. No obstante, existen factores en contra tales como, el impacto ambiental severo y el alto costo energético asociado a la purificación del producto. Por el contrario, en las polimerizaciones en FC esta última etapa podría suprimirse a escala industrial debido a que las sustancias de bajo peso molecular y otros aditivos son generalmente solubles en el medio y pueden separarse *in-situ* gracias a la propiedad extractiva del mismo.⁹⁹

2.5.4- Enzimas en Medios no Convencionales

Históricamente, la formación enzimática de enlaces covalentes en disolventes no acuosos fue reportado inicialmente por Zaks y Klíbanov en 1984.¹⁰⁰ Esto amplió las posibilidades de las enzimas como catalizadores,^{101,102} ya que con anterioridad el estudio de su actividad estaba prácticamente restringido al medio acuoso, en donde se ve favorecido el proceso de hidrólisis. El uso de enzimas como catalizadores en síntesis molecular en $scCO_2$, fue reportado inicialmente por Randolph *et al.* en 1985.¹⁰³ El uso del CO_2 comprimido en la catálisis enzimática se ve favorecido por la naturaleza hidrofóbica del fluido. El agua contenida en la enzima, necesaria para su actividad catalítica, (denominado A_w), se ve retenida por la enzima en este fluido, como ocurre en disolventes apróticos y apolares como el hexano, debido a su hidrofobicidad. En la síntesis enzimática con el uso de DOV, especialmente aquellos próticos, polares o hidrofílicos, ocurre el fenómeno de "stripping" o secuestro del agua adsorbida en la enzima por parte del disolvente.¹⁰⁴ Debido a esto, en la mayoría de los procesos sintéticos catalizados con enzimas en DOV hidrofílicos, éstos contienen agua en mayor o menor grado para garantizar la suficiente cantidad de agua que asegure la actividad enzimática.

El uso conjunto de enzimas con R-134a líquido puro en síntesis molecular fue reportado por primera vez por Micklefield *et al.*, (2004), quienes mostraron la compatibilidad de ambas sustancias y las ventajas que existen, respecto a la utilización de DOV o del mismo $scCO_2$.¹⁰⁵ En dicho estudio se reporta, entre otras, la reacción de transesterificación catalizada por la proteasa subtilisina Carlberg de un aminoácido *N*-protegido, demostrando la compatibilidad de dicha sustancia polar con el R-134a, así como con la actividad enzimática. En dicho estudio se argumenta que aún siendo un disolvente polar, éste es de naturaleza hidrofóbica, por lo que la novedad del R-134a estriba en el hecho de ser un disolvente polar y a su vez ser compatible con la actividad enzimática sin la necesidad de agregar agua en el medio.

2.5.5- Polimerización enzimática en medio no acuoso y recientes avances en $scCO_2$

Existen numerosos estudios basados en la síntesis enzimática de polímeros en DOV o en masa. Es preferible la catálisis en medio no acuoso en este tipo de reacciones debido a que la reacción opuesta de hidrólisis se ve favorecida en medio acuoso. Debido a la mejor transferencia de masa es preferible usar DOV. Sin embargo, la existencia de efectos negativos, como pudieran ser la desorción del agua necesaria para la actividad enzimática por parte de disolventes polares, o la posible rigidez de la enzima, así como su desactivación debido a la utilización de sistemas pobres en agua, ha dirigido los estudios hacia la utilización de disolventes orgánicos mezclados con agua.¹³⁶ La adición de pequeñas cantidades de agua miscibles con el disolvente orgánico en adecuadas proporciones, las cuales varían para cada tipo de polimerización, han dado excelentes resultados. Los trabajos reportados están basados principalmente en síntesis de poliésteres alifáticos y policarbonatos mediante PAA o condensación, donde tanto las hidrolasas como las lipasas, preferiblemente inmovilizadas en soportes porosos, han dado los mejores resultados.^{106,49} Las oxidoreductasas como la peroxidasa, lacasa o la bilirrubina oxidasa han recibido recientemente mucha atención como catalizadores de

polimerizaciones oxidativas de fenoles en la síntesis de nuevos poliaromáticos.¹⁰⁷ Paralelamente, se ha reportado la eficacia de las transferasas, tales como fosforilasas o sintasas, como catalizadores en la síntesis *in vitro* de polisacáridos mediante transferencia de grupos glicosilo o acilo.¹⁰⁸ Otro campo de estudio en el uso de enzimas en el área de polímeros, es la síntesis de monómeros funcionalizados o macromonómeros, en su mayoría vinílicos, mediante la unión selectiva a carbohidratos, en muchos casos de origen natural como celulosas o azúcares.¹⁰⁹

Sin embargo, hay muy pocos estudios basados en el uso de catalizadores enzimáticos en polimerizaciones en FC, siendo éste un campo de investigación con gran proyección.^{110,111} Loeker et al.¹¹²⁻¹¹⁴ reportaron la primera polimerización en $scCO_2$ a temperaturas moderadas ($40^\circ C < T < 70^\circ C$) y con resultados relevantes. Específicamente, lograron la PAA enzimática de la CL y su dímero cíclico, la dicaprolactona, utilizando Novozyme 435 como catalizador. Se reporta el poliéster correspondiente con peso molecular similar al mismo polímero obtenido también por vía enzimática en tolueno como disolvente. A su vez, dicho material fue purificado de forma totalmente ecológica mediante la extracción *in situ*, por parte del mismo $scCO_2$, de oligómeros y monómero sin reaccionar. Recientemente, Garcia-Arrazola et al.¹³⁰ reportaron la PAA enzimática de LLA en un sistema tipo emulsión usando $scCO_2$. El uso de CO_2 comprimido es alentador ya que está fácilmente disponible a bajo costo; además, sus parámetros críticos son relativamente accesibles en un equipo adecuado, la baja densidad y viscosidad reducida asociadas a su estado supercrítico favorecen la propagación de la cadena polimérica. Sin embargo, la baja solubilidad de muchos sustratos, especialmente compuestos polares tales como GA o LLA en este FC inorgánico restringe su potencial.^{130, 137}

2.5.6- Avances recientes en polimerización enzimática en R-134a líquido.

Así como se ha reportado la polimerización en R-134a líquido, también se ha demostrado la compatibilidad de la actividad enzimática en R-134a líquido, especialmente la estabilidad y actividad de la CalB, donde los resultados indican que el uso de R-134a líquido condujo a un aumento significativo de la actividad de la enzima.^{115, 116} Recientemente en nuestro grupo de investigación se demostró la factibilidad de la PAA enzimática de la ϵ -CL en R-134a líquido, se observó que las condiciones de presión y temperatura a las que trabaja mejor la enzima fueron 25 bar y 65°C. También fue relevante el efecto del A_w , ya que si bien a condiciones de $A_w=0.22$ se obtuvo el mayor rendimiento, a condiciones de $A_w<0.16$ se alcanzó el mayor peso molecular.^{117, 118}

CAPÍTULO III DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

En este estudio se usaron los siguientes equipos: (a) reactor de alta presión de 40 mL de capacidad, (FILHER S.A. de C.V, México); (b) Celda de alta presión de acero inoxidable de 40 mL con mirillas de zafiro (THUROS S.A. de C.V, México); (c) Calefactores y medidores de temperatura termopar para el correcto monitoreo de las reacciones (ENSA S.A. de C.V.); (d) 3 Bombas de aguja para fluidos comprimidos (ISCO Syringe Pump) adaptados a los tanques de suministro; (e) Higrómetro para la determinación de la A_w en la enzima (RHOTRONIC).

En la figura 3.1 se muestran los equipos utilizados en las reacciones enzimáticas usando fluidos comprimidos y en la figura 3.2 se muestra la celda de alta presión con mirillas de zafiro para realizar las evaluaciones de solubilidad de los monómeros y el transcurso de las reacciones.

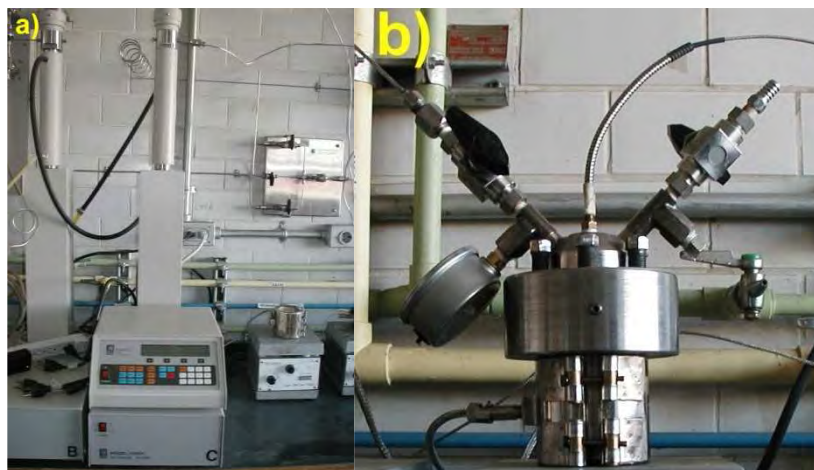


Figura 3.1 a) Bomba Isco para fluidos comprimidos, b) Reactor de Alta Presión de 40 mL

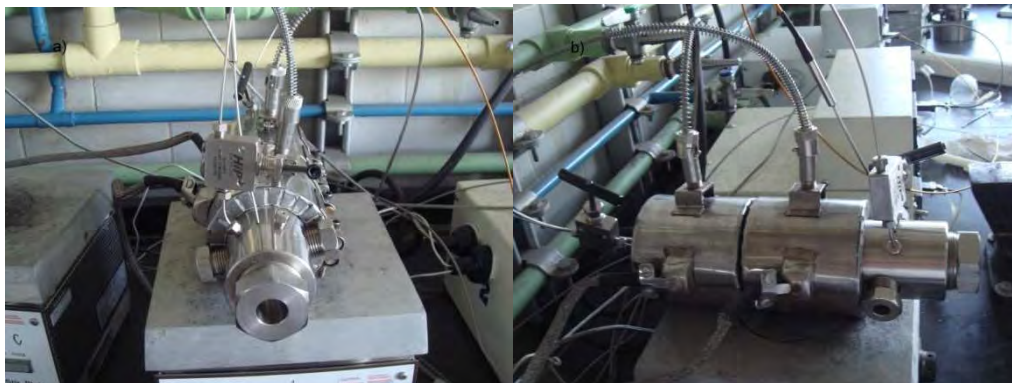


Figura 3.2 Celda de ata Presión con Mirillas de Zafiro

3.2 MATERIALES

Los materiales usados fueron los siguientes: Ácido glicólico (GA) (Sigma Aldrich > 99%); Ácido L-láctido (LLA) (99%, Sigma Aldrich); γ -Butirolactona (BL) (Sigma Aldrich \geq 99%); δ -Valerolactona (VL) (Sigma Aldrich); ϵ -Caprolactona (CL) (Sigma Aldrich); Ácido 2,2-Bis(hidroximetil)butírico (BHB) (98%, Sigma Aldrich); 1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (99+%, Sigma Aldrich); Tetrahidrofurano (THF HPLC) (J.T.Baker); Dimetil Sulfoxido (DMSO) grado espectrofotométrico (J.T.Baker); Acetona grado HPLC (J.T.Baker); Dimetil Sulfóxido grado reactivo; Cloroformo grado reactivo; Hexano grado reactivo; Metanol grado reactivo; Cilindro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) (Dupont, STAR SA de CV); Lipasa B de *Cándida Antártica* inmovilizada, Novozym 435 (Novozymes México SA de CV); Hidruro de Calcio (CaH_2) (95% Sigma Aldrich); Tamiz Molecular perlas (3\AA , Sigma Aldrich); solución sobresaturada de acetato de potasio ($A_w=0.22$).

3.3 MEDICIONES ANALÍTICAS



Figura 3.3 Equipo utilizado para determinar pesos moleculares

La determinación de los pesos moleculares fue realizado en un cromatógrafo de líquidos/GPC (HP Series 1100), el cual cuenta con dos bombas, una isocrática y otra cuaternaria, así como un termostato para mantener la temperatura de la columna constante el cromatógrafo cuenta con detector UV-VIS de arreglo de diodos, detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories), y un detector de índice de refracción IR 410 (Waters) el cual se muestra en la Figura 3.3. Se emplearon dos Columnas GPC/SEC PLgel 10 μm MIXED-B LS 300 x 7.5 mm (Polymer Laboratories, VARIAN). Se usaron tanto estándares de poliestireno PS-H de un intervalo de pesos moleculares de 126 a 6,035,000 g/mol (Polymer Laboratories, VARIAN), como estándares de Pululana de un intervalo de pesos moleculares de 180 a 708,000 g/mol (Polymer Laboratories, VARIAN).

3.4 TÉCNICA EXPERIMENTAL

El método empleado para la síntesis, está basado en reportes previos^{117, 118} mediante polimerización por apertura de anillo (PAA). A continuación se explica en que consistió.

Acondicionamiento previo de los monómeros

Los monómeros sólidos se purificaron mediante recristalización. El LLA se colocó en 600 mL de metanol a 37 °C con agitación hasta disolverse completamente. Posteriormente se colocó en refrigeración a -2 °C durante 24 h, se filtró y secó al vacío durante 24 h para eliminar el metanol remanente. El GA se utilizó directamente del frasco.

En el caso de los monómeros líquidos (VL, CLy BL) el monómero se colocó en un matraz de bola de 500 mL en presencia de hidruro de calcio para eliminar la presencia de agua. El matraz se colocó en un recipiente con glicerina sobre una parrilla de calentamiento con agitación y se conectó a un sistema de destilación al vacío (4×10^{-4} mbar) a una temperatura de 80 °C. El destilado fue colectado en un matraz de bola de 250 mL en presencia de tamiz molecular para eliminar cualquier traza de agua. El monómero destilado se colocó en un frasco de vidrio ámbar en presencia de tamiz y fue sellado para evitar la presencia de agua.

Síntesis de poli(γ -butirolactona) (PBL) lineal, PVL y PCL lineales e hiperramificadas.

Se colocaron esferas de biocatalizador (1.4 g) de Novozym-435 en un reactor de 40 mL equipado con un agitador magnético controlado con una parrilla de agitación externa. Se usó como control una enzima desactivada térmicamente. Se adicionó BHB (1.4g, 9.4 mmol) en el caso de la síntesis de poliésteres

hiperramificados. El reactor y su contenido fueron secados toda la noche usando una bomba de aceite de alto vacío (Vacubrand, GER). Posteriormente se transfirió al reactor el VL (14 mL, 154.8 mmol), o CL (14 mL, 126.3 mmol) según sea el caso, y fue sellado nuevamente.

Para la obtención de polímeros lineales se usaron CL, VL o BL en ausencia de BHB. Se llenó el reactor con R134a líquido a través de una bomba ISCO de alta presión. La columna de presurización de la bomba fue enfriada con un recirculador (American Heto Labs. Inc. US). La temperatura de reacción fue monitoreada cuidadosamente con dos termopares independientes, uno para la chaqueta de calentamiento, y otro para el interior del reactor. La temperatura y presión de operación fueron ajustadas a 65 ± 1 °C y 25 ± 2 bar, respectivamente, en todos los experimentos de polimerización.

La despresurización del reactor a presión atmosférica al final de cada experimento se realizó después de haber enfriado el reactor a -5°C o a temperatura ambiente durante 30 min.

Se sintetizó PVL en "masa" como control. El monómero (14 mL) y microesferas de biocatalizador Novozym-435 (1.4 g) se adicionaron en un reactor de vidrio, el cual se colocó en un baño con glicerina a 65°C. Una vez alcanzado el tiempo de reacción predefinido, el contenido fue disuelto en cloroformo y las microesferas insolubles de biocatalizador fueron removidas por filtración. La disolución fue adicionada lentamente a metanol para precipitar el polímero sintetizado (lineal o ramificado).

En el caso de los poliésteres ramificados, la fase metanólica fue enfriada a -5°C por 24 h para precipitar una segunda fracción. Los polímeros precipitados fueron recuperados por filtración, secados al vacío (4×10^{-4} mbar, 2-4 h) y pesados para determinar el rendimiento del producto.

Síntesis de PLLA, PGA, PLLGA, poli-LLA-co- δ -valerolactona (PLLAVL).

Se colocaron en el reactor de alta presión de 40 mL (descrito anteriormente) el biocatalizador Novozyme 435 (0.8 g), GA o LLA (8g, 68.9 mmol y 55.6 mmol respectivamente), o mezclas de GA (4g, 34.45 mmol) y LLA (4g, 27.8 mmol). El reactor y su contenido fueron secados toda la noche al vacío.

En el caso del PLLA se probaron adicionalmente dos condiciones diferentes de reacción: 25 y 40% peso /volumen de monómero con respecto al volumen del reactor (10 y 16 g L-LA/40 mL), así como dos humedades distinta: $A_w=0.4$ y $A_w=0.22$.

A $A_w=0.22$ el biocatalizador y el monómero fueron previamente acondicionados en un desecador en presencia de una solución sobresaturada de acetato de potasio. Para las condiciones de $A_w = 0.4$ el reactor se selló junto con el monómero y biocatalizador sin ningún acondicionamiento previo (secado o ajuste de A_w con alguna sal). Se usó como control una enzima inactivada térmicamente.

Para la síntesis de PLLAVL, se colocaron en el reactor de alta presión microesferas de biocatalizador Novozyme 435 (1.4 g) y LLA (3.5 g, 24.3 mmol), y fueron secados toda la noche al vacío. Posteriormente el VL (14 mL, 154.8 mmol) fue transferido al reactor, el cual se selló nuevamente. El llenado del reactor con R-134a, la reacción y la despresurización se realizaron como se describió anteriormente para la síntesis de polilactonas lineales e hiperramificadas.

El PLLAVL también fue sintetizado en masa como reacción de control. Se adicionaron LLA (3.5 g, 24.3 mmol) y Novozym-435 (1.4 g) en un reactor de vidrio y se dejaron secar toda la noche al vacío. Posteriormente se adicionó la VL (14 mL, 154.8 mmol), y el reactor fue colocado en un baño de glicerina, a 65°C.

Después de la reacción para el caso del PLLA el producto se disolvió en cloroformo y se filtró para separar la enzima. La solución fue adicionada lentamente a hexano; el precipitado obtenido se filtró y se secó al vacío por 24 h tomando una muestra pequeña para análisis de RMN ^1H . Este análisis se realizó únicamente para el ácido láctido, en el caso de la PLLAVL no fue posible obtener un precipitado en hexano y el PGA y PLLGA no fueron solubles en cloroformo. Posteriormente, el precipitado fue disuelto nuevamente en cloroformo, y la disolución fue adicionada lentamente a metanol para precipitar el polímero sintetizado y así separarlo del monómero sin reaccionar. En el caso de la PLLAVL el producto de reacción se disolvió en cloroformo y se filtró para separar la enzima.

La solución fue adicionada lentamente a metanol para precipitar el polímero sintetizado. En el caso del PGA y PLLGA el producto de la reacción fue disuelto en dimetil sulfoxido a 40°C y filtrado para separar el biocatalizador. Posteriormente el biocatalizador fue tratado con hexafluoro-2-propanol (HFIP) para remover completamente el material del biocatalizador. La solución fue filtrada para remover el biocatalizador, y la disolución fue adicionada lentamente en metanol para precipitar el polímero sintetizado y separarlo del monómero sin reaccionar. Los polímeros fueron filtrados, secados al vacío (4×10^{-4} mbar, 2-4 h) y pesados para determinar el rendimiento del producto.

Solubilidad de los monómeros en R-134a

La solubilidad de los monómeros en R-134a se determinó en forma visual usando un reactor de alta presión de 40 mL con tres mirillas de zafiro (uno frontal y dos laterales) equipado con un agitador magnético controlado con una parrilla de agitación externa. Los monómeros fueron colocados en el reactor, el llenado del R-134a y la despresurización se realizó como se describió anteriormente para la síntesis de polilésteres lineales e hiperramificados.

3.5 CARACTERIZACIÓN

La caracterización de los polímeros consistió en: resonancia magnética nuclear (RMN ^1H y RMN ^{13}C CP MAS), espectroscopía de masas (MALDI-TOF), cromatografía de permeación en gel (GPC), calorimetría de barrido diferencial (DSC) y termogravimetría (TG).

3.5.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN de ^1H y ^{13}C CP MAS

El análisis RMN se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM) en un equipo Varian Unity Inova Spectrometer operado a 400 MHz. Para el análisis de RMN de ^1H , las muestras de PGA y su copolímero con LLA fueron disueltas en una mezcla de cloroformo deuterado/ácido trifluoroacético (CDCl_3 :TFA, 3:1,v/v). En el caso de los poliésteres ramificados y PLLA, las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3). Se usó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El análisis RMN de ^{13}C CP MAS se realizó en un espectrómetro de 400 MHz Bruker Avance operado a 7500 Hz. La muestra se analizó en estado sólido y únicamente para el copolímero de GA con LLA.

3.5.2 Espectroscopía de Masas (MALDI-TOF)

El análisis MALDI-TOF por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica en un MALDI-TOF 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer de Applied Biosystems equipado con un láser YAG (acrónimo del inglés *yttrium aluminium*

garnet). Se trata de un láser en medio sólido que utiliza cristales de óxido de itrio y aluminio (Y3Al5O12), de 355 nm.

Para el caso de PGA y PLLGA se disolvió 1 mg de polímero en hexafluoroisopropanol (1 mL), Se mezclaron 5 μ L de esta solución con un volumen igual de matriz [40 mg/mL de *trans*-2-[3-(4-*tert*butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo (DCTB) en HFIP] y 1 μ L de trifluoroacetato de potasio (1 mg/mL) en HFIP, como agente cationizante. Se aplicó una alícuota de esta mezcla de (0.1 μ L) en una placa para MALDI. Se dejó evaporar el disolvente al ambiente, posteriormente se volvió a aplicar 0.1 μ L en el mismo lugar y se dejó evaporar el disolvente.

El espectro fue tomado en modo reflectrón ion positivo. Los productos con m/z menores a 500 fueron despreciados en la evaluación del espectro debido al traslapamiento con la matriz.

Para el caso de los polímeros hiperramificados se disolvieron 4 mg de polímero en dioxano (1 mL); se mezclaron de 5 μ L de esta solución con un volumen igual de matriz [10 mg/mL de ácido 2,5-dihydroxybenzoico (DHB) en metanol/agua 1/1]. Se aplicó una alícuota (0.5 μ L) en una placa para MALDI y se dejó evaporar el disolvente al ambiente.

El espectro fue tomado en modo lineal y reflectrón ion positivo. Los productos con m/z menores a 300 fueron despreciados en la evaluación del espectro debido al traslapamiento con la matriz.

3.5.3 Análisis Térmicos: Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) y Termogravimetría (TG)

Los análisis térmicos se llevaron a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM). Los análisis DSC se realizaron en un equipo Dupont DSC 2100 (US) en un intervalo de temperatura de -100 a 100 °C para los poliésteres ramificados, y de 10 a 300°C para el PGA y copolímeros con LLA, a una

velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, bajo una atmosfera de nitrógeno. Los análisis de TG se realizaron en un TA Instruments Hi-Res TGA 2950 (US), en un intervalo de 25 a 300°C para los poliésteres ramificados y de 25 a 500°C para el PGA y copolímeros con LLA, en una atmosfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

3.5.4 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

El análisis GPC para el caso del PGA y sus copolímeros con LLA se utilizó Dimetil Sulfóxido como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 80°C . El detector de dispersión de Luz se operó a 180°C en el nebulizador, 200°C en el evaporador y un flujo de gas (nitrógeno de alta pureza) de 1.0 SLM . El sistema fue calibrado con estándares de pululana (polisacáridos). Las muestras fueron previamente preparadas disolviendo 5 mg de muestra en 0.5 mL de HFIP y 5 mL de DMSO y calentados a 100°C para solubilizar la muestra lo mejor posible.

Para el caso de los poliésteres ramificados se utilizó THF como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 25°C . El detector de dispersión de luz se operó a 40°C en el nebulizador, 80°C en el evaporador y un flujo de gas (nitrógeno de alta pureza) de 1.0 SLM . El sistema fue calibrado con estándares de poliestireno. Las muestras fueron preparadas previamente disolviendo 5 mg de muestra en 5 mL de THF.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PAA de poliésteres alifáticos en FC

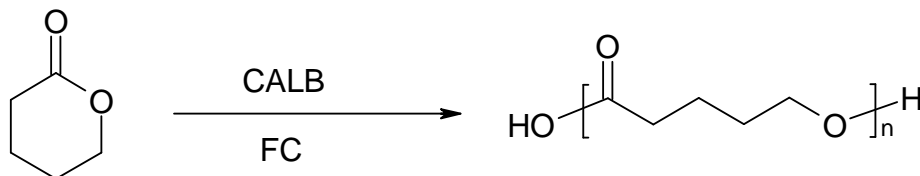


Figura 4.1 Esquema de reacción para la PAA de la VL en FC.

En 1995 se dio a conocer el primer reporte del uso de FC para la síntesis enzimática de un poliéster por el grupo de investigación de Russell en la Universidad de Pittsburg (EEUU).¹¹⁰ Ellos usaron fluoroforno supercrítico en la policondensación de bis(2,2,2-tricloroetil)adipato y 1,4-butanodiol catalizado por PPL para obtener poliésteres de peso molecular bajo. El grupo de Kobayashi (Universidad de Keio, Japón) logró en 2001 la primera polimerización enzimática de poliésteres en scCO₂ usando CALB.¹¹¹ Estos autores estudiaron la PAA de varias lactonas incluyendo CL, así como macrociclos de 11 y 12 miembros y sus copolímeros. Reportaron un aumento en el peso molecular de polímeros reportados con anterioridad¹¹⁰, sugiriendo que el scCO₂ como medio de reacción permite la síntesis enzimática de polímeros con pesos moleculares relativamente altos como una vía sustentable para polímeros enmarcados dentro de la química verde. Extensos trabajos sobre PAA fueron realizados por el grupo de Howdle de la Universidad de Nottingham (Reino Unido) mostrando rendimientos y peso moleculares para la PCL similares a los obtenidos en tolueno.¹¹³ Se sugiere que la tensión relativamente alta en el anillo de 7 miembros de la CL favorece la obtención de polímeros de alto peso molecular comparado al de otras lactonas cíclicas. Por ejemplo, la PAA enzimática de la VL con un anillo de seis miembros únicamente ha sido reportada con bajos pesos moleculares (Mn < 2,000 g/mol)^{120,59} en masa o solventes convencionales apolares donde las lipasas presentan buena actividad catalítica. En este trabajo nuestros resultados demuestran que la

PVL puede alcanzar pesos moleculares (M_n) relativamente mayores (11,300 g/mol y 28,000 g/mol) por PAA usando R-134a líquido o scCO₂ respectivamente (Figura 4.1) como medio de reacción y CALB inmovilizada como biocatalizador.

Tabla 4.1 Resultados de la síntesis de PVL catalizada por la Novozym 435 en FC y en masa.

Experimento	t (h)	Medio de Reacción	Rendimiento ^b (%)	M_n^c (g/mol x10 ⁻³)	PDI ^c
1	12	R-134a	21.4	5.7	1.6
2	12	scCO ₂	-	-	-
3	12	masa	-	-	-
4	24	R-134a	52.0	11.3	1.5
5	24	scCO ₂	51.7	13.1	1.8
6	24	masa	-	-	-
7	48	R-134a	65.1	8.3	1.7
8	48	scCO ₂	66.5	18.4	1.6
9	48	masa	14.3	1.7	1.4
10	72	R-134a	66.3	7.9	1.7
11	72	scCO ₂	68.6	28.0	1.6
12	72	masa	69.8	5.0	1.3
13	96	R-134a	63.9	6.6	1.7
14	96	scCO ₂	74.9	22.7	1.7
15	96	masa	70.5	5.3	1.3
16	120	R-134a	71.2	6.2	1.7
17	120	scCO ₂	89.4	16.4	1.8
18	120	masa	70.4	4.3	1.3
19	144	R-134a	69.9	9.1	1.6
20	144	scCO ₂	50.1	7.7	1.7
21	168	R-134a	60.1	5.2	1.4
22	168	scCO ₂	25.3	4.2	1.8
23	48	polímero control ^a	0	-	-

^aReacción control con enzima desactivada termicamente. ^bDeterminado por pesado. ^cDeterminado por SEC calibrado con estándares de poliestireno.

Los resultados de la PAA de la VL en FC como medio de reacción son mostrados en la Tabla 4.1. El experimento 23 de dicha tabla para la enzima térmicamente desactivada, demostró que no existe conversión en ausencia de actividad biocatalítica.

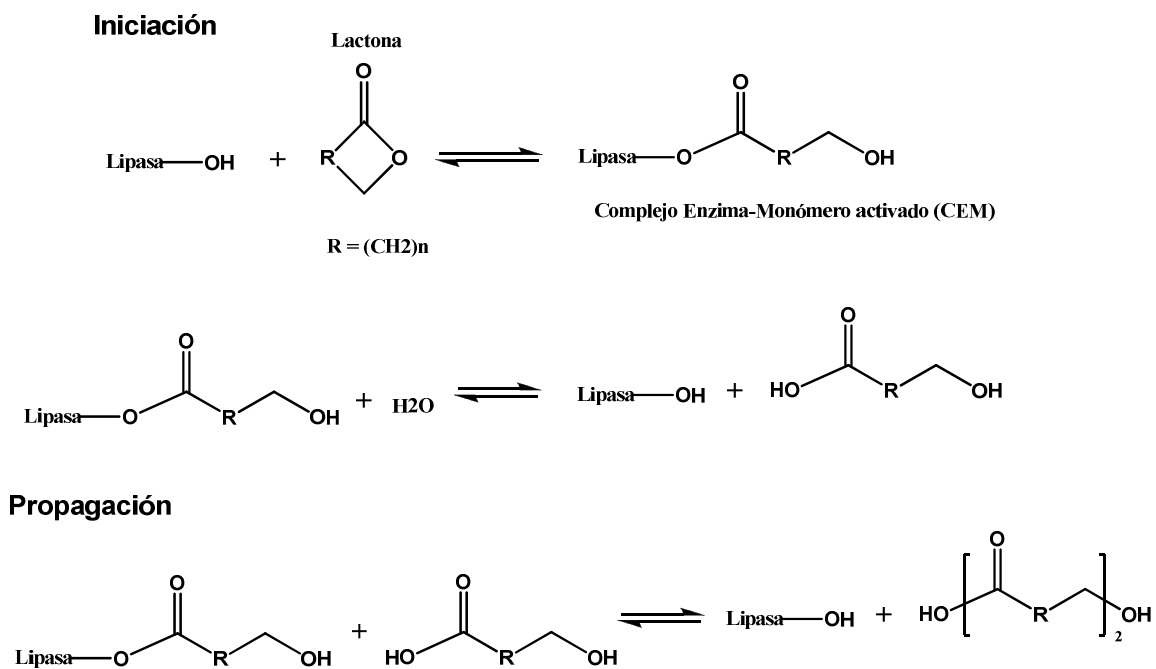


Figura 4.2 Mecanismo de la polimerización enzimática por apertura de anillo (PAA).

De acuerdo al mecanismo de reacción reportado para la PAA de lactonas (Figura 4.2),¹³² debe ocurrir una apertura inicial del anillo de la lactona para formar el complejo enzima-monómero activado (CEM). Después, el CEM reacciona con una molécula de agua produciendo un hidroxíácido, que en nuestro caso es VL en su forma abierta, y la enzima regenerada. El OH de la enzima en su forma libre es un nucleófilo listo para reaccionar con otra lactona y producir un nuevo CEM, que al reaccionar con otra lactona en su forma abierta produce la formación del polímero que corresponde al paso de propagación. Es necesaria el agua en la etapa de iniciación para permitir la apertura del anillo y que posteriormente se lleve a cabo la propagación. Sin embargo, un exceso de agua en la etapa de propagación puede conducir a reacciones de hidrólisis química o enzimática en la cadena,

evitando que se alcancen pesos moleculares altos y produciendo una disminución en el rendimiento de la polimerización .

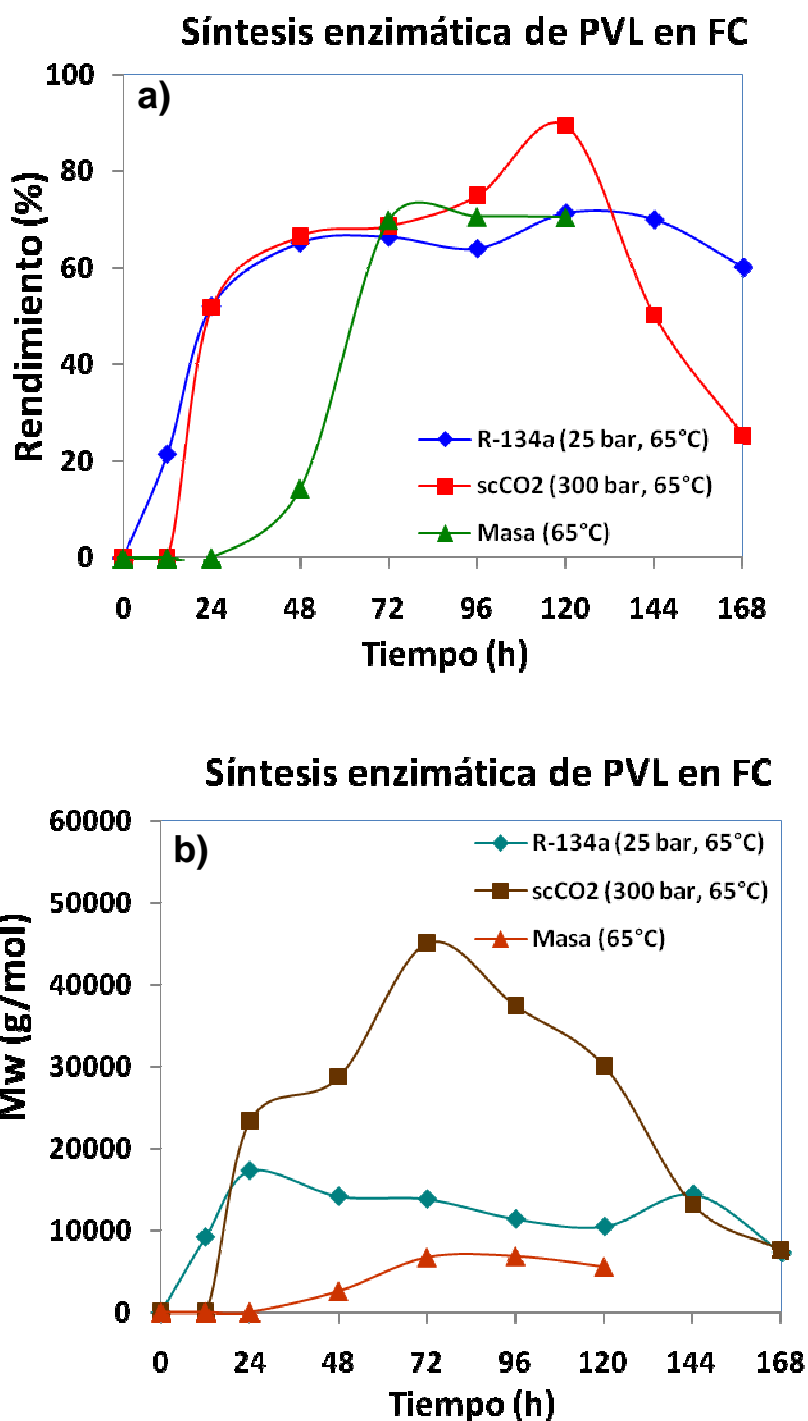


Figura 4.3 a) Rendimiento con respecto al tiempo de reacción para la síntesis poli(δ -Valerolactona) en TFE líquido, CO₂ supercrítico y masa; b) Pesos moleculares de la poli(δ -Valerolactona) polimerizada en TFE líquido, CO₂ supercrítico y masa con respecto al tiempo de reacción

Los experimentos en R-134a fueron llevados a 65°C y 25 bar de acuerdo con un trabajo previo en nuestro grupo.¹¹⁷ En relación a los experimentos de la polimerización en masa (Tabla 4.1) éstos fueron interrumpidos a las 120 h debido a la solidificación del medio como resultado de la producción del polímero. Se puede observar que el máximo M_n medido por SEC (con estándares de poliestireno), fue de 28,000 g/mol con un PDI de 1.6 usando $scCO_2$ ($T=65^\circ C$, $P=300$ bar), mientras que las reacciones en masa dieron los menores M_n de PVL. Es de notar que los pesos moleculares medidos fueron notablemente mayores a los reportados para la PAA de VL en DOV o en masa (Figura 4.3b). El rendimiento máximo (cerca del 90%) fue alcanzado en $scCO_2$ después de 120 h de reacción. Como se puede observar en la tabla, el uso de R-134a líquido (a 25 bar, 65°C) dio un rendimiento (definido como la cantidad de polímero obtenido con respecto a la cantidad de monómero inicial) del 21% en las primeras 12 h, mientras que a ese tiempo no se obtuvo material en $scCO_2$, por lo que la velocidad inicial de reacción fue ligeramente mas rápida en R-134a líquido que en $scCO_2$ (Figura 4.3a). En ambos medios se observa una disminución en el rendimiento del polímero obtenido a tiempos largos de reacción, atribuido a la hidrólisis (degradación) del polímero, siendo más dramático en el caso del $scCO_2$ (25.3% a 168 h). Como se mencionó el agua en la etapa de iniciación es necesaria para poder hacer la apertura del anillo previa a la propagación, sin embargo, conforme va avanzando la reacción el exceso de agua que se produce en nuestro sistema en la etapa de propagación, al no poder ser removida, conduce a reacciones de hidrólisis química o enzimática de las cadenas poliméricas produciendo cadenas más pequeñas, lo cual provoca que el peso molecular promedio disminuya, esta reacción de hidrolisis entra en competencia con la reacción de iniciación y propagación, por lo que, a pesar de disminuir el peso molecular promedio el rendimiento sigue aumentando, este fenómeno se observa muy marcadamente en el intervalo de 72 a 120 h de reacción en $scCO_2$ (Figura 4.3 a y b), después de ese intervalo tanto el rendimiento como el peso molecular disminuyen, ya que la reacción de hidrólisis es la que predomina. La alta solubilidad del polímero en el FC de baja viscosidad mejoró la

transferencia de masa durante la reacción promoviendo la propagación de la cadena polimérica y, por consiguiente, un mayor peso molecular, así como un mayor rendimiento.

Se ha reportado^{59,120} que entre mas pequeño es el anillo de la lactona la tensión en el anillo disminuye provocando la obtención de polímeros de bajo peso molecular. Lo anterior aunado a lo observado en los experimentos anteriores donde la polimerización de la VL fue mejor en R-134a a lo reportado en la literatura vía enzimática en masa,^{58,59} y a presiones mucho menores que en scCO₂, motivo el uso de γ -butirolactona (BL) por ser otra lactona de menor tamaño. Esta ha sido referida en la literatura^{9,16,60} como una lactona no homopolimerizable por razones termodinámicas ya que la tensión en el anillo, al ser muy pequeña, hace que el anillo sea muy estable. Únicamente ha sido homopolimerizada a condiciones extremas de reacción (20,000 atm y 165°C). Al llevar a cabo la reacción en R-134a líquido a 65°C y 25 bar con Novozym 435 si hubo polimerización, pero con rendimiento bajo (menores al 1%), por lo que se corroboran los reportes anteriores.

4.2 PAA en la producción de poliésteres hiperramificados

El grupo de Frey consiguió la primera síntesis enzimática de poliésteres ramificados en 2002 usando tolueno y mezclas con 1,4-dioxano.⁶⁶ En dicho trabajo se usaron la CL y un núcleo AB₂ (BHB) para obtener un material ramificado usando CALB inmovilizada como catalizador. Observaron que la densidad de los grupos funcionales al final del ramificado puede ser controlada con la relación de comonomero en la alimentación. El principal inconveniente fue la solubilidad del BHB en solventes apolares debido a los grupos hidroxilo y carboxilo. Otro inconveniente fue la adición de 1,4-dioxano como solvente polar para aumentar la solubilidad del sustrato, que es clasificado por la IARC dentro del Grupo 2B (carcinogénico).

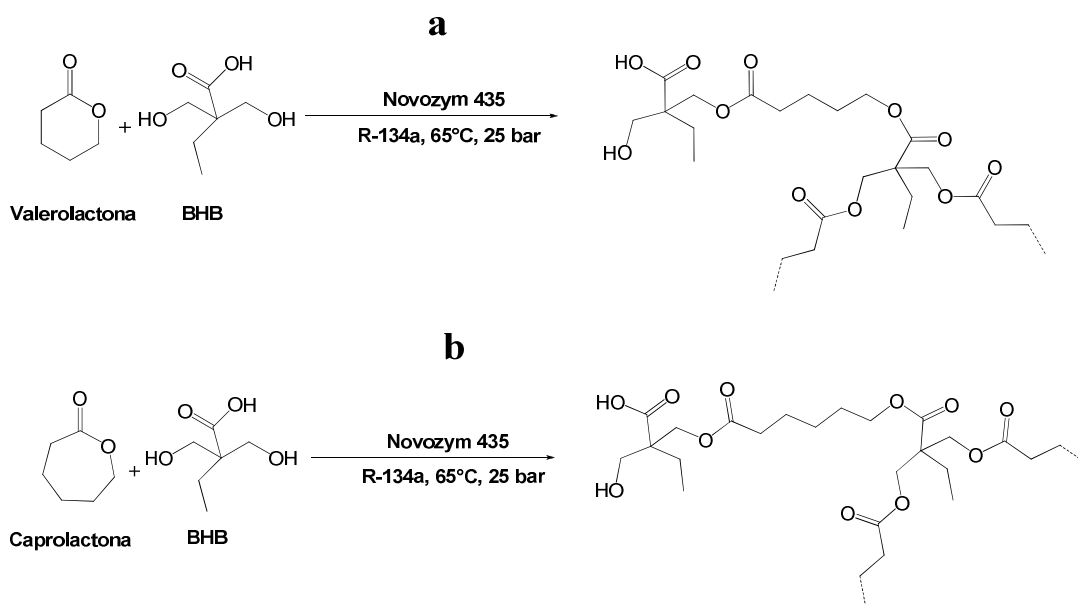


Figura 4.4. Esquema de reacción para la PAA of poliésteres hiperramificados en R-134a líquido.

La PVL ha permanecido poco explorada como material para aplicaciones médicas, se han desarrollado varios métodos para la síntesis de PVL lineal; sin embargo, la síntesis de PVL ramificada aun no ha sido reportada. En este trabajo se empleó lipasa CALB inmovilizada para catalizar la copolimerización de VL y CL con BHB en R-134a líquido como medio de reacción para obtener estructuras ramificadas (Figura 4.4).

La disolución completa del BHB (10% p/v) en presencia de VL o CL en el R-134a fue corroborado inicialmente con experimentos de solubilidad usando una celda de alta presión. Sin embargo, a 65°C y 300 bar la solubilidad en scCO₂ (BHB < 3% p/v) fue muy pobre, lo cual descarta el uso de este fluido para la síntesis de poliésteres ramificados.

Tabla 4.2. Resultados de la síntesis de los copolímeros ramificados preparados con VL y BHB (6% mol).

Exp.	Tiempo (h)	Fracción Copolímero	Rendimiento ^b %	DB ^c	$M_n^d \times 10^{-3}$ (g/mol)	PDI ^d	T_m^e °C	T_d^f °C
1	12	1 ^a Frac.	34.6	0.02	1.6	1.6	54.9	250.3
		2 ^a Frac.	9.6	0.07	0.9	1.5	48.9	247.4
2	24	1 ^a Frac.	34.7	0.03	1.9	1.5	55.5	251.8
		2 ^a Frac.	10.9	0.06	0.9	1.5	55.5	243.2
3	48	1 ^a Frac.	39.1	0.06	2.0	1.6	55.6	257.4
		2 ^a Frac.	15.0	0.07	1.1	1.5	50.9	255.4
4	96	1 ^a Frac.	35.7	0.07	2.1	1.5	55.9	259.7
		2 ^a Frac.	15.1	0.07	1.2	1.5	50.6	242.3
5	144	1 ^a Frac.	28.7	0.07	2.0	1.5	53.7	251.9
		2 ^a Frac.	4.9	0.09	0.9	1.5	48.8	241.8
6	48	polimero ^a control	65.1	-	8.3	1.7	56.1	270.0

^aEl polímero control fue sintetizado usando solo VL a 48 h de reacción. ^bFue determinado por pesado. ^cBHB% y DB fue determinado de la integración de las señales características de cada monómero en los espectros de RMN ¹H. ^dDeterminado por SEC calibrado con estándares de poliestireno. ^eDeterminado por DSC a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹. ^fLa temperatura de degradación corresponde a la pérdida del 5% en peso del material medido por TGA a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Tabla 4.3. Resultados de la síntesis de los copoliésteres ramificados preparados con CL y BHB (7% mol).

Exp.	Tiempo (h)	Fracción Copolímero	Rendimiento ^b %	DB ^c	$M_n^d \times 10^{-3}$ (g/mol)	PDI ^d	T_m^e °C	T_d^f °C
1	12 h	1 ^a Frac.	30.5	0.02	2.5	1.6	60.2	270.0
		2 ^a Frac.	12.3	0.10	0.8	1.7	57.1	160.0
2	24 h	1 ^a Frac.	42.3	0.02	2.7	1.6	59.3	200.0
		2 ^a Frac.	15.0	0.09	0.9	1.7	49.3	220.0
3	48 h	1 ^a Frac.	54.1	0.05	2.4	1.5	57.5	260.0
		2 ^a Frac.	13.5	0.09	1.1	1.6	55.2	250.0
4	96 h	1 ^a Frac.	61.7	0.04	2.7	1.5	56.5	250.0
		2 ^a Frac.	9.1	0.11	0.8	1.7	52.2	260.0
5	144 h	1 ^a Frac.	40.7	0.04	2.7	1.5	57.0	270.0
		2 ^a Frac.	7.0	0.09	0.9	1.7	52.8	255.7
6	48 h	polimero ^a control	67.0	-	18.6	4.5	58.9	280.0

^aEl polímero control fue sintetizado sin la adición de BHB a 48 h de reacción. ^bFue determinado por pesado. ^cBHB% y DB fue determinado de la integración de las señales características de cada monómero en los espectros de RMN ¹H. ^dDeterminado por SEC calibrado con estándares de poliestireno. ^eDeterminado por DSC a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹. ^fLa temperatura de degradación corresponde a la pérdida del 5% en peso del material medido por TGA a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

La síntesis de polímeros hiperramificados a diferencia de los dendrímeros produce materiales heterogéneos los cuales contienen polímeros con alto, mediado y bajo grado de ramificación, así como polímeros lineales, por lo que inicialmente los materiales fueron precipitados en metanol frío (5 °C) para obtener una primera fracción con un DB (grado de ramificación) relativamente bajo (Tabla 4.2 y 4.3), después de filtrar la primera fracción, la fase metanólica fue enfriada a -5°C, para permitir la precipitación de una segunda fracción con un mayor grado de ramificación. Esto se debe a que la segunda fracción al estar mas ramificada contiene un mayor números de grupos –OH terminales que provocan una mayor solubilidad de los ramificados en la fase metanólica.

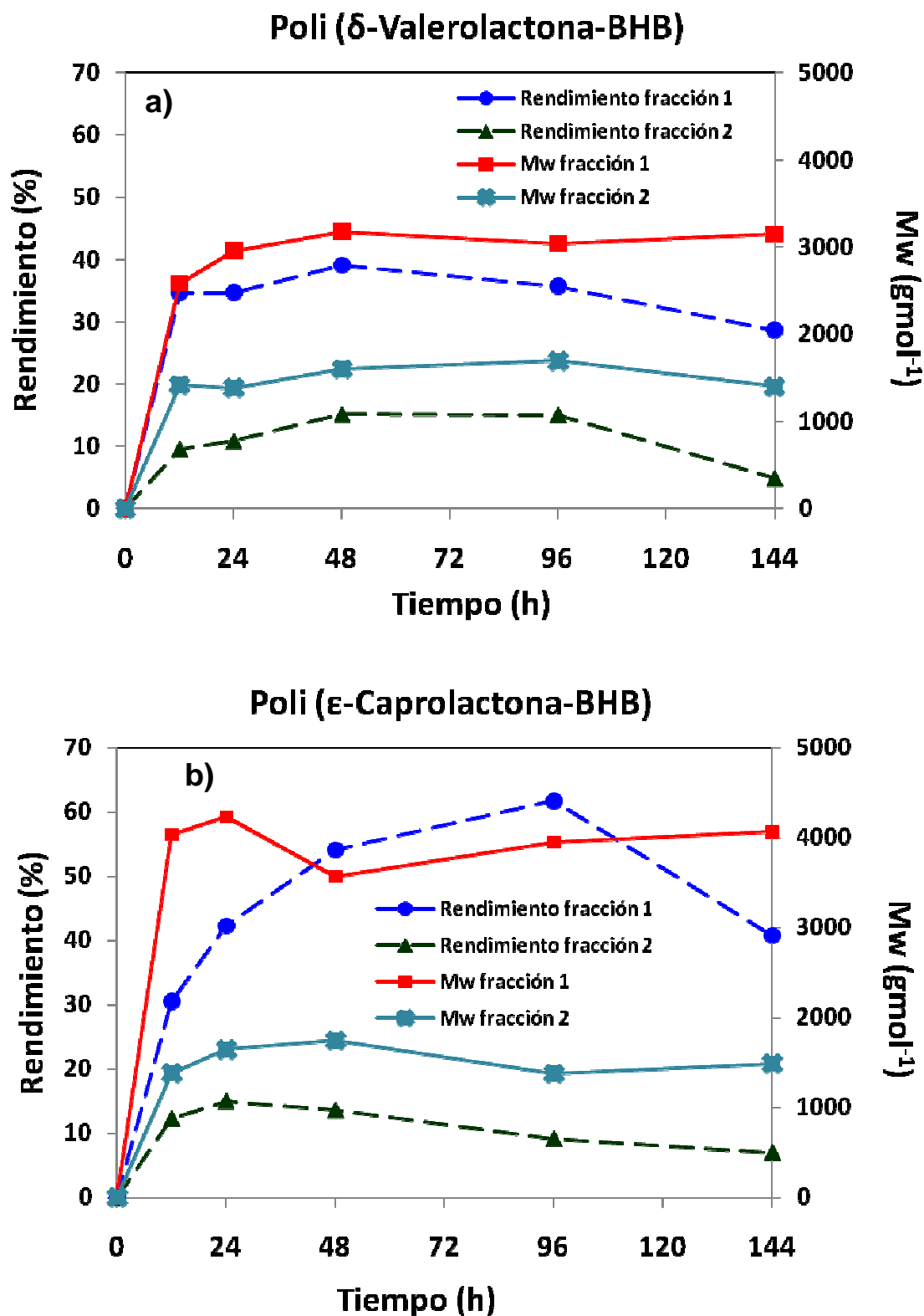


Figura 4.5 Comportamiento del rendimiento y del peso molecular con respecto al tiempo de reacción a) Poli(δ -Valerolactona-co-BHB) y b) Poli(ϵ -Caprolactona-co-BHB).

Los datos compilados en las Tabla 4.2 y 4.3 para la P(VL-co-BHB) y P(CL-co-BHB), respectivamente, muestran que los rendimientos en ambos poliésteres ramificados tienden a aumentar, aunque se observa un decremento a largos tiempos de reacción, que se asumió correspondía a la degradación (hidrólisis) del polímero (figura 4.5 a y b), lo cual también fue observado en la homopolimerización. Una explicación plausible para el bajo rendimiento de poliVL-co-BHB obtenido con respecto a la poliCL-co-BHB es debido a la menor tensión en el anillo de la VL.^{60,122}

Se aprecia que el peso molecular promedio en número (M_n), determinado por SEC (con estándares de poliestireno) estuvieron dentro del rango de 1,300 a 3,200 g/mol para los ramificados de VL-co-BHB y de 1,400 a 4,300 g/mol para los ramificados de CL-co-BHB. Sin embargo, resulta pertinente establecer que el peso molecular absoluto de los poliésteres ramificados podría diferir en un factor de 10 con respecto al peso molecular equivalente de los estándares lineales de poliestireno.¹²³ Una de las posibles causas de que los pesos moleculares (M_n) de la primera fracción sean mayores que la segunda para todos los casos, se deba a que la estructura de la segunda fracción por estar más ramificada se encuentre más compacta con respecto a la primera fracción, provocando que se registren pesos moleculares (M_n) menores de lo que realmente se tienen. Todos los co-poliésteres obtenidos mostraron una distribución de pesos moleculares relativamente estrecha, en el rango de 1.5 a 1.6 para el copolímero de VL, y 1.5 a 1.7 para el copolímero de CL.

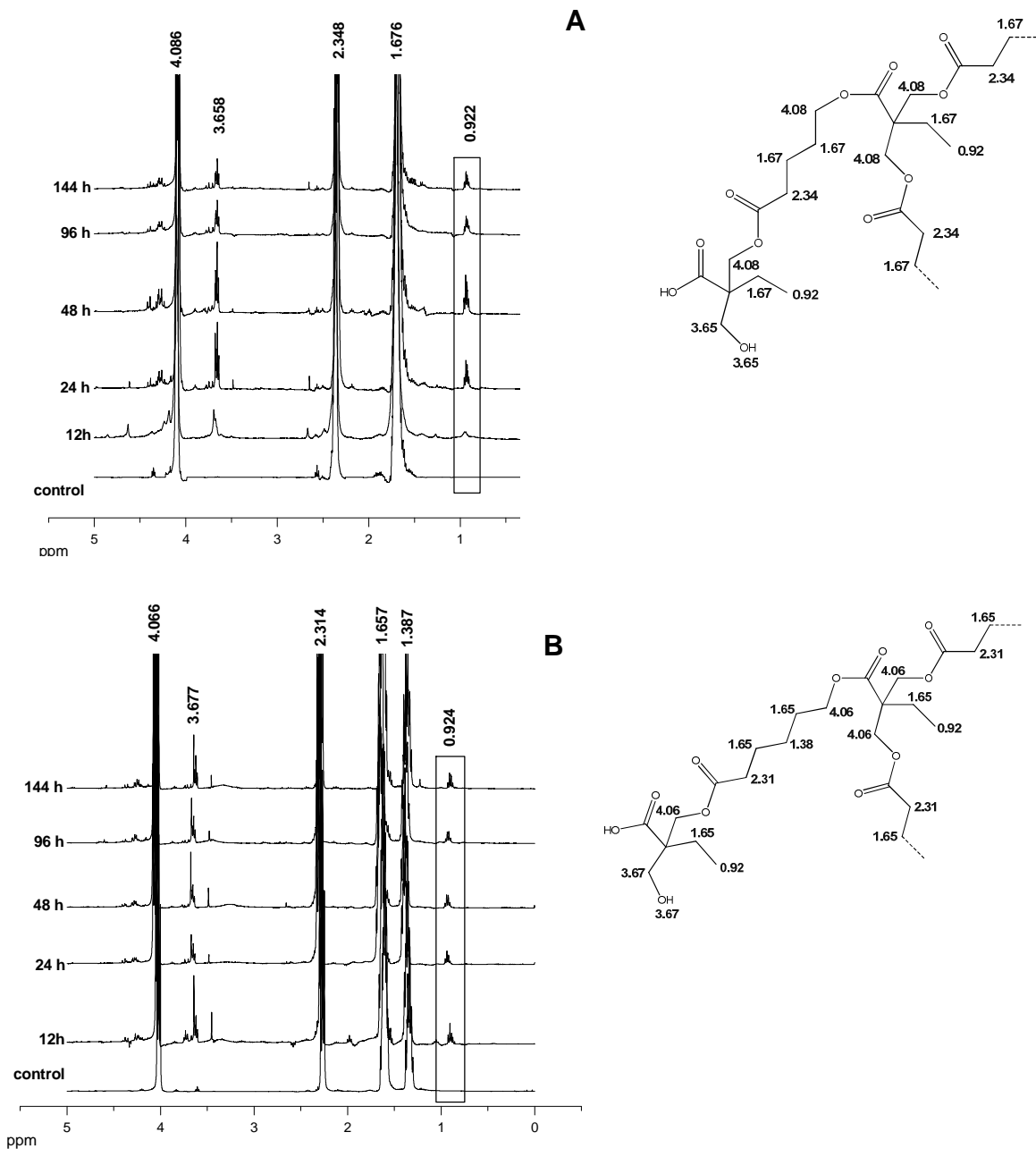


Figura 4.6. **A)** Espectro RMN ^1H de los copolimeros de VL y BHB a diferentes tiempos de reacción y el homopolímero de PVL como control; **B)** Espectro RMN ^1H de los copolimeros de CL y BHB a diferentes tiempos de reacción y el homopolímero de PCL como control.

Los espectros de RMN ^1H para los copoliésteres hiperramificados se muestran en la Figura 4.6 donde se confirma la incorporación de BHB al polímero. La cantidad de monómero AB_2 en el copolímero fue determinado, por la integración de las señales características en el espectro de RMN ^1H siguiendo la ecuación descrita en reportes previos⁴³.

Las unidades de BHB muestran una resonancia característica a 0.9 ppm que puede ser usado, para cuantificar su fracción por comparación con la resonancia del grupo (-OOC-CH₂-) característico de las unidades de VL y CL (localizada a 2.3 ppm)⁶⁶. La fracción de BHB incorporada en los poliésteres ramificados fue menor a la del monómero inicial alimentado. El DB de los copolímeros estuvo en el rango de (0.02 a 0.11) de acuerdo a la definición para copolímeros AB/AB_2 .⁴³ El valor de $\text{DB}_{\text{AB}/\text{AB}_2}$ se calculó a partir de la siguiente ecuación⁶⁷.

$$\text{DB}_{\text{AB}/\text{AB}_2}^{\text{stat}} = 2[1-x_{\text{AB}}/(2-x_{\text{AB}})^2]$$

donde x_{AB} : moles de AB

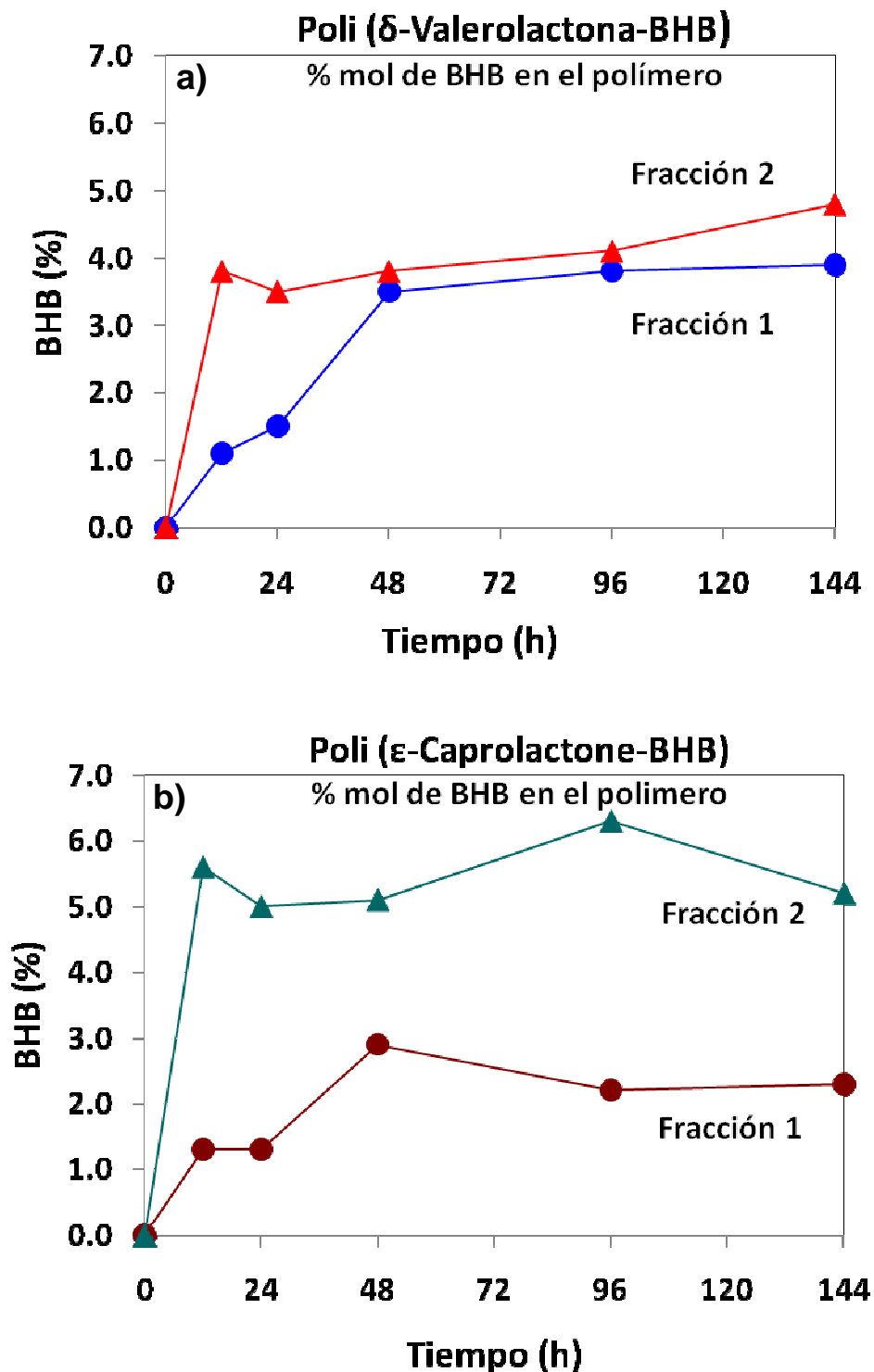


Figura 4.7 Porcentaje mol de BHB incorporado en el polímero con respecto al tiempo para la copolimerización de a) VL con BHB experimentos de la tabla 4.2 y b) CL con BHB experimentos de la tabla 4.3, catalizado con CALB en R-134a líquido.

La primera fracción precipitada muestra un incremento en el DB a tiempos cortos de reacción y posteriormente no se detectaron variaciones significativas a tiempos largos de reacción, mientras que la segunda fracción precipitada no mostró variaciones significativas en el tiempo. Sin embargo, la fracción de BHB incorporado y el grado de ramificación fueron mayores en la segunda fracción para ambas lactonas, lo que explica la mayor solvatación en metanol. El % de BHB incorporado en el polímero con respecto al tiempo para ambas lactonas es mostrado en la Figura 4.7a y b.

Los resultados indican que el rendimiento de la copolimerización de VL y CL con BHB, aumentan considerablemente a tiempos de reacción relativamente cortos (12 h) y posteriormente los rendimientos disminuyen a tiempos largos de reacción. Sin embargo, los pesos moleculares no muestran variaciones sustanciales en el tiempo para ambas fracciones (Figura 4.5 a y b).

A diferencia de la síntesis de dendrímeros donde el producto es un material monodisperso, la síntesis de hiperramificados produce un material polidisperso en el cual se encuentra una mezcla de polímeros con alta, media y baja ramificación, así como estructuras lineales. Estos últimos podrían ser los que se degradan manteniéndose relativamente menos afectados los ramificados, ya que son más difíciles de degradar por parte de la enzima debido a impedimentos estéricos. Esto deriva en una disminución del rendimiento y baja variación del promedio de los pesos moleculares a largos tiempos de reacción. Esta hipótesis se corrobora al observar el % de BHB incorporado en la cadena con respecto al tiempo para ambas lactonas mostrado en la Figura 4.7a y b. Donde se observa (principalmente en la fracción 1) un incremento en el % de BHB incorporado en el polímeros conforme pasa el tiempo, el cual permanece prácticamente sin variaciones a partir de las 48 h. En la fracción 2 el % de BHB en el polímero permanece con poca variación casi desde un principio, lo cual indica que los polímeros ramificados se mantienen prácticamente intactos a lo largo del tiempo.

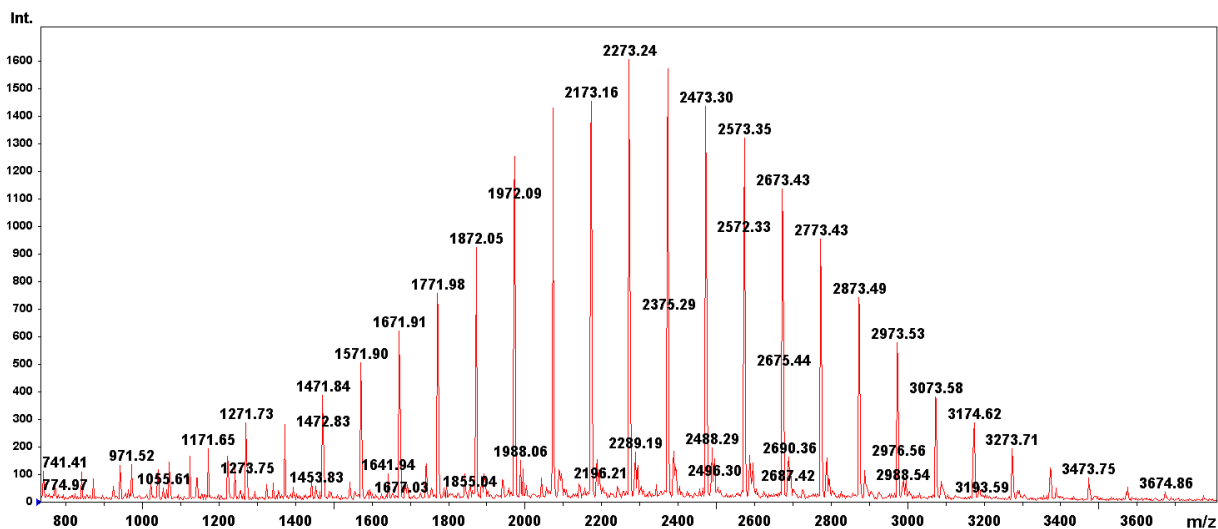


Figura 4.8 Espectro MALDI-TOF de la muestra del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 2, 2da fracción de la Tabla 2.

La espectroscopía MALDI-TOF corroboró la estructura molecular de los poliésteres ramificados al determinarse en modo reflector usando DHB como matriz. A manera de ejemplo, la figura 4.8 muestra un espectro MALDI-TOF obtenido para la poli (VL-co-BHB). Las señales por debajo de 500 m/z fueron descartados debido al traslape de los picos con la matriz.

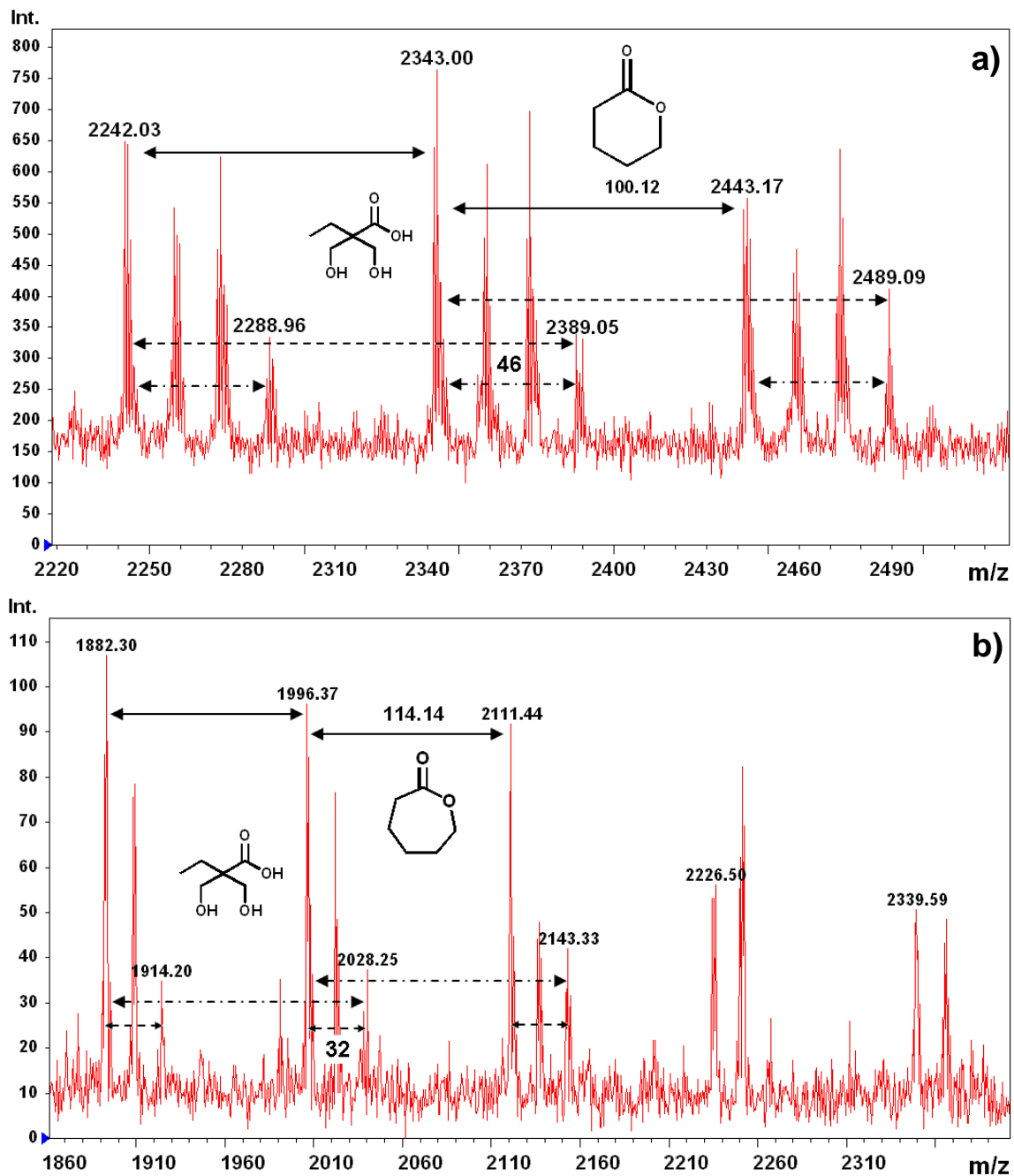


Figure 4.9. Espectros MALDI-TOF de los copolíesteres ramificados (muestras a 48 h de reacción) realizadas en modo reflectrón a) VL y b) CL primera fracción.

La serie de señales observadas son totalmente atribuibles a la estructura de un copolímero ramificado (Figura 4.9). En el caso del Poli(VL-co-BHB), las señales fueron observadas a intervalos regulares de 100 m/z, que corresponde al peso molecular de la unidad estructural de la VL. La diferencia entre los picos adyacentes igual a 46 m/z fue asignado al cambio de una unidad de VL (100 g/mol) por una unidad de BHB (148 g/mol), lo que confirma una incorporación al azar de cada unidad monomérica en el copolímero. Se observó una serie de señales menores, la cual está caracterizada por 18 unidades m/z (H_2O) menos que en los picos principales, indicando que también ocurre la ciclización macromolecular en ciento grado, según ha sido reportado con anterioridad^{59,124-126}.

En el caso de la poli(CL-co-BHB), la diferencia entre los picos adyacentes fue igual a 32 m/z, lo cual es asignado al intercambio de unidades de CL (114 g/mol) por unidades de BHB (148 g/mol). Los espectros MALDI-TOF muestran pesos moleculares de hasta 5,500 g/mol para la poli(VL-co-BHB) y de 6,000 g/mol para la poli(CL-co-BHB). También notamos que la diferencia entre las series de picos principales y las series que corresponden a unidades cíclicas disminuyeron gradualmente de 18 unidades m/z a 14 m/z, por lo que se asumió que estas son señales de otras especies muy cercanas a las de los oligómeros cíclicos, como aductos de iones de Na^+ , K^+ , y NH_4^+ , aparentemente contaminantes provenientes del medio ambiente.^{123, 124}

Las Figuras 4.10 y 4.11 incisos a y b, respectivamente, muestran los espectros adquiridos a diferentes tiempos de reacción para la poli(VL-co-BHB) y poli(CL-co-BHB) de ambas fracciones. En ambos casos el rango de m/z detectado tiende a aumentar conforme la reacción procede.

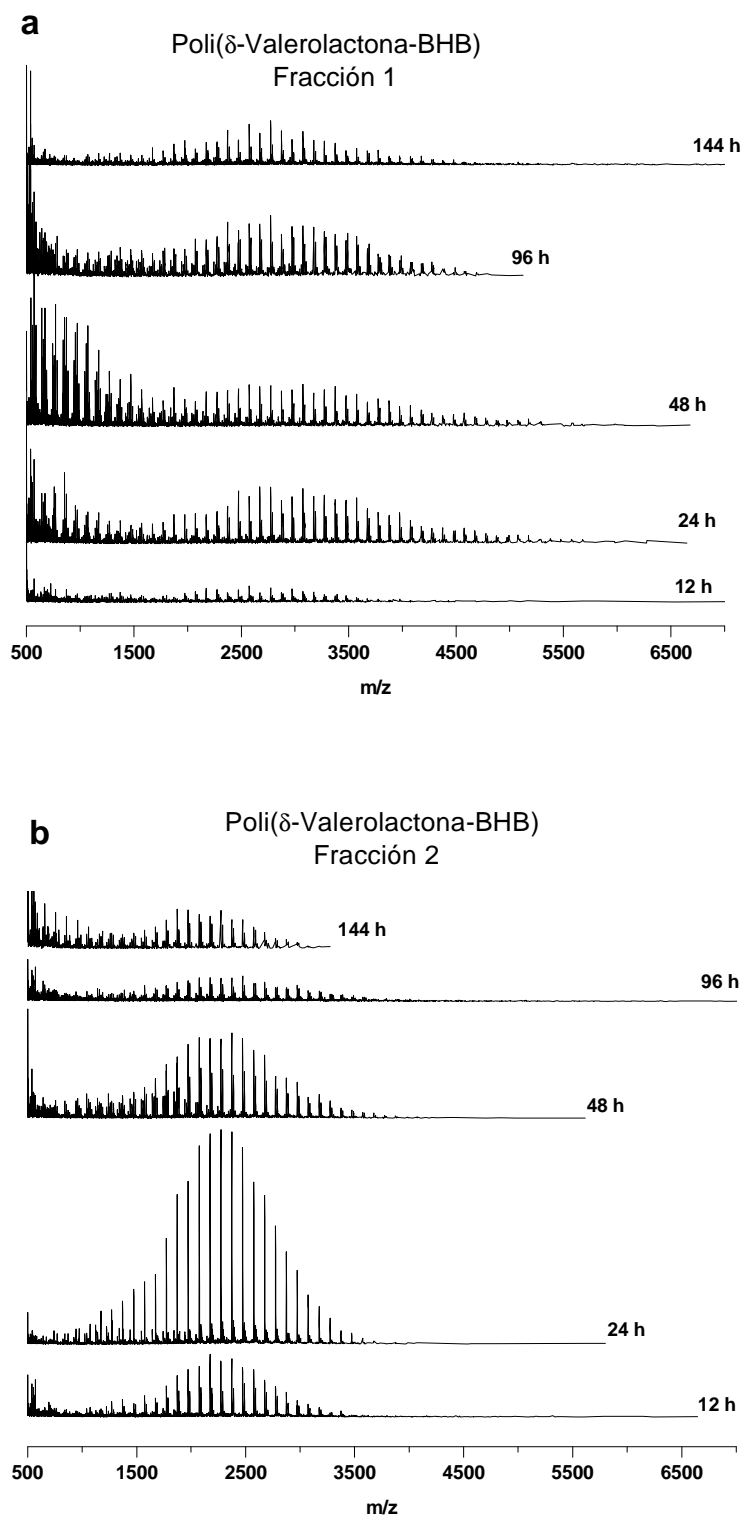


Figura 4.10 Espectros MALDI-TOF de las reacciones de copolimerización de la VL con BHB a diferentes tiempo de reacción a) fracción 1 y b) fracción 2.

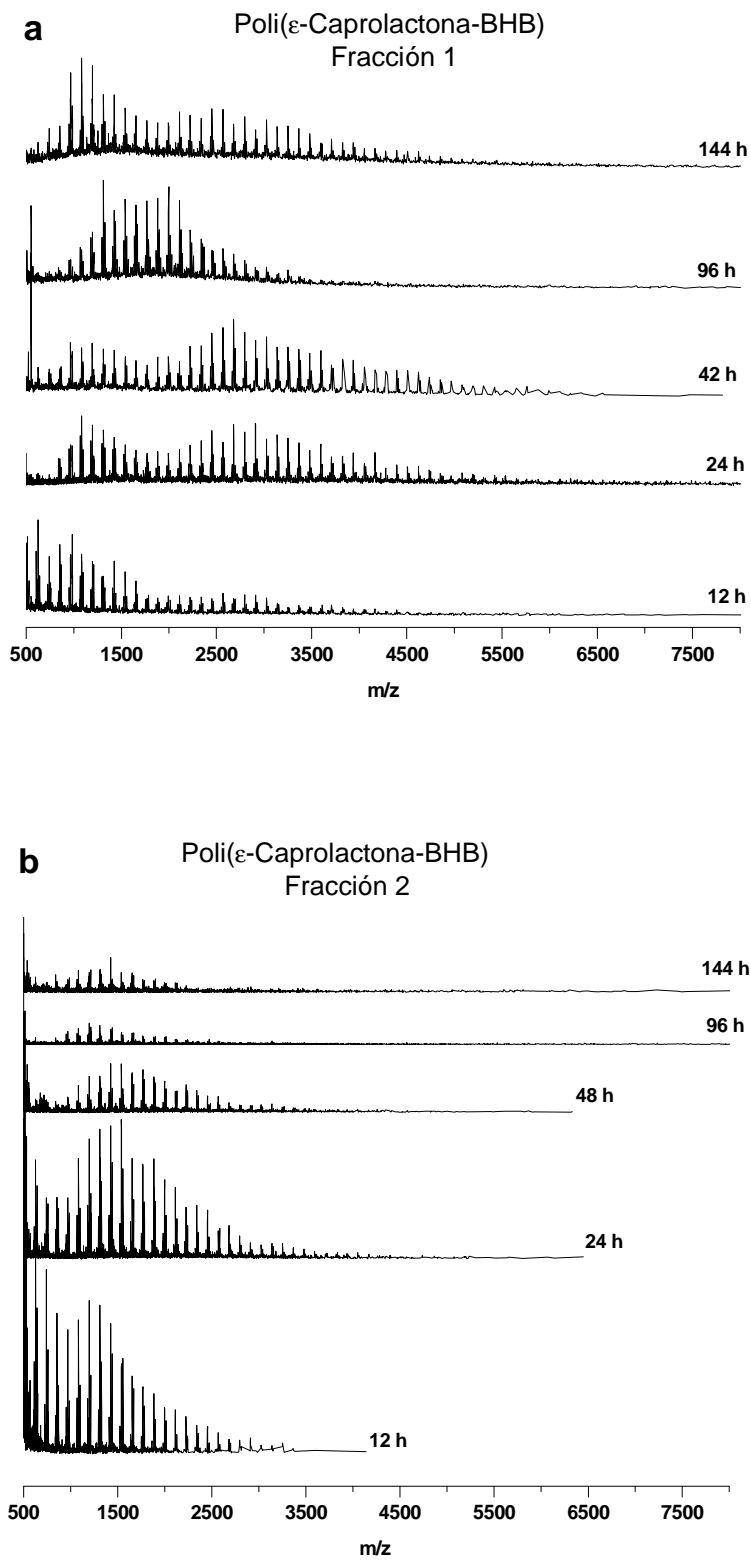


Figura 4.11. Espectros MALDI-TOF de las reacciones de copolimerización de la CL con BHB a diferentes tiempo de reacción a) fracción 1 y b) fracción 2.

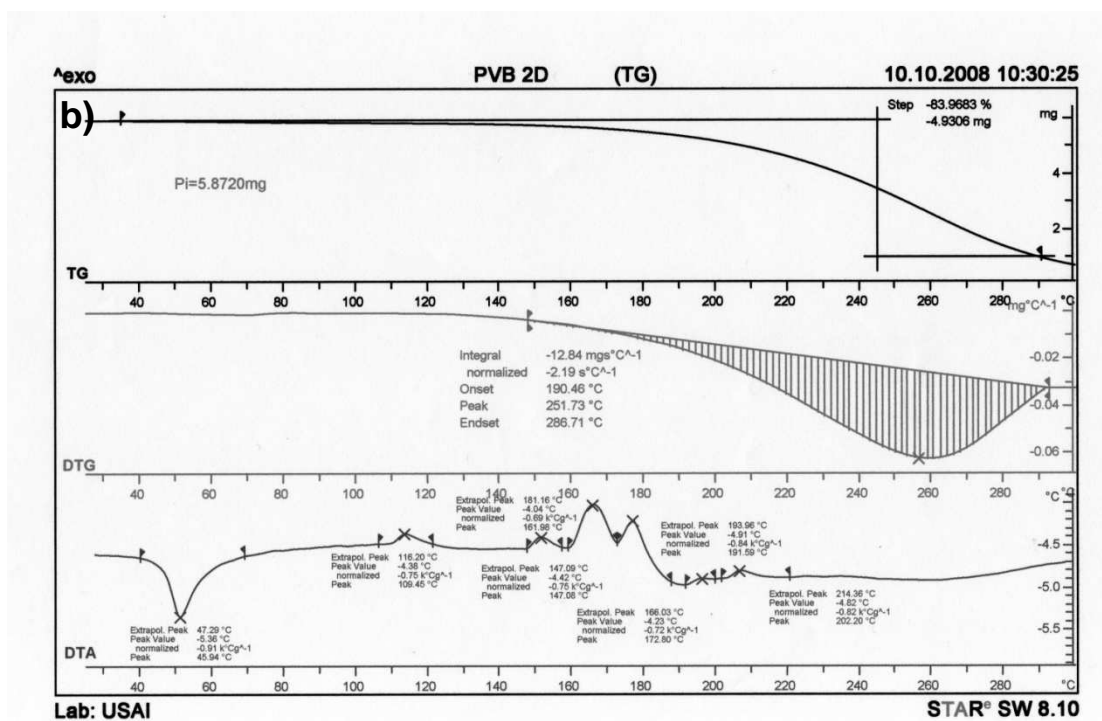
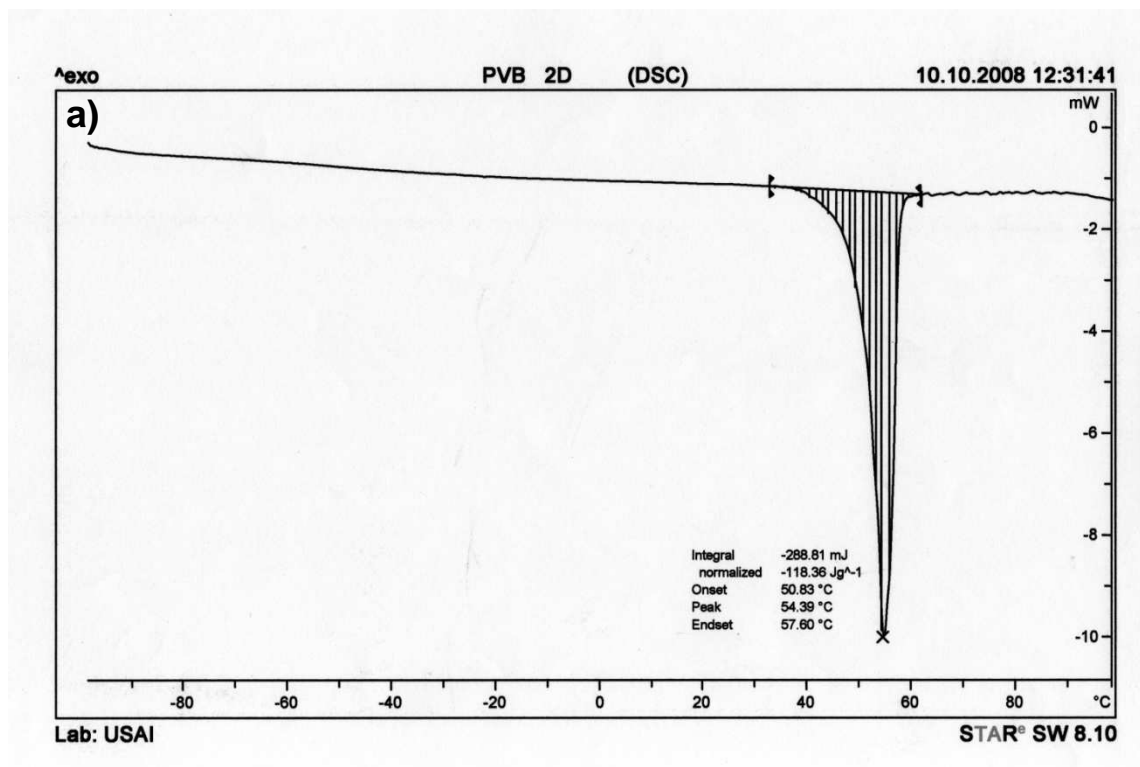


Figura 4.12 Termogramas a) DSC y b) TG del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 3, 1a fracción de la Tabla 4.2.

Las propiedades térmicas de los materiales fueron analizados por DSC y TGA (Tablas 4.2 y 4.3). Los termogramas de DSC fueron corridos en un intervalo de temperatura de -100 a 100°C mientras que los análisis TG se realizaron en un intervalo de 25 a 300°C. Ambas determinaciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La figura 4.12 muestra los termogramas DSC y TGA adquiridos para la poli (VL-co-BHB), a modo de ejemplo.

Como ya es bien sabido el fundido es una transición que se manifiesta en los polímeros. Ocurre cuando las cadenas poliméricas abandonan su estructura cristalina y se transforma en un líquido desordenado. La transición vítrea es una transición que se manifiesta en los polímeros amorfos o semi-cristalinos; es decir cuyas cadenas no están enteramente dispuestas según un ordenamiento cristalino. Las propiedades térmicas de los dendrímeros y polímeros ramificados o hiperramificados es significativamente diferente al de sus análogos lineales. Se ha visto que la temperatura de transición vítrea (T_g) es una función del esqueleto dependiente de la estructura, el número de grupos terminales, y el número de puntos de entrecruzamiento o ramificación. Para los dendrímeros, el incremento en el número de grupos terminales baja la T_g , mientras que este aumenta al incrementar en el número de puntos de ramificación y la polaridad de los grupos funcionales.^{142, 143} Stutz¹⁴⁴ demostró que la T_g basado en estos parámetros converge a valores finales aproximadamente después de la cuarta o quinta generación a partir de la cual no ocurren cambios significativos. La influencia de los grupos terminales de los polímeros ramificados fue estudiada a detalle por Hawker y Chu¹⁴⁵, quienes prepararon poli(éter cetonas) con diferentes grados de ramificación y diferentes unidades terminales como grupos flouro, hidroxí y benzofenona. Ellos demostraron que las propiedades térmicas de los polímeros hiperramificados, con diferentes grados de ramificación son independientes de la arquitectura macromolecular, pero fuertemente dependientes de las propiedades de los grupos terminales. Kim y Webster¹⁴⁶ propusieron que la T_g de los polímeros hiperramificados es debido a movimientos de traslación de la molécula en lugar de

movimientos segmentarios de la cadena. La gran cantidad de grupos terminales hidroxilo en nuestros polímeros ramificados forman puentes de hidrógeno intermoleculares provocando poco movimiento de traslación, haciendo que la T_g en nuestros termogramas sea imperceptible (Figura 4.12). Ellos también señalan que la propiedades dependen mas de la longitud de la cadena entre los puntos de ramificación que del peso molecular, en otras palabras, los polímeros hiperramificados con longitudes de cadena corta se comportan como oligómeros, incluso aun, cuando el peso molecular promedio es alto.

Los termogramas de DSC muestran valores de T_m similares a los reportados en la literatura⁶⁶ y son similares tanto en los materiales lineales como en los ramificados, con temperaturas de degradación (T_d) relativamente altas.

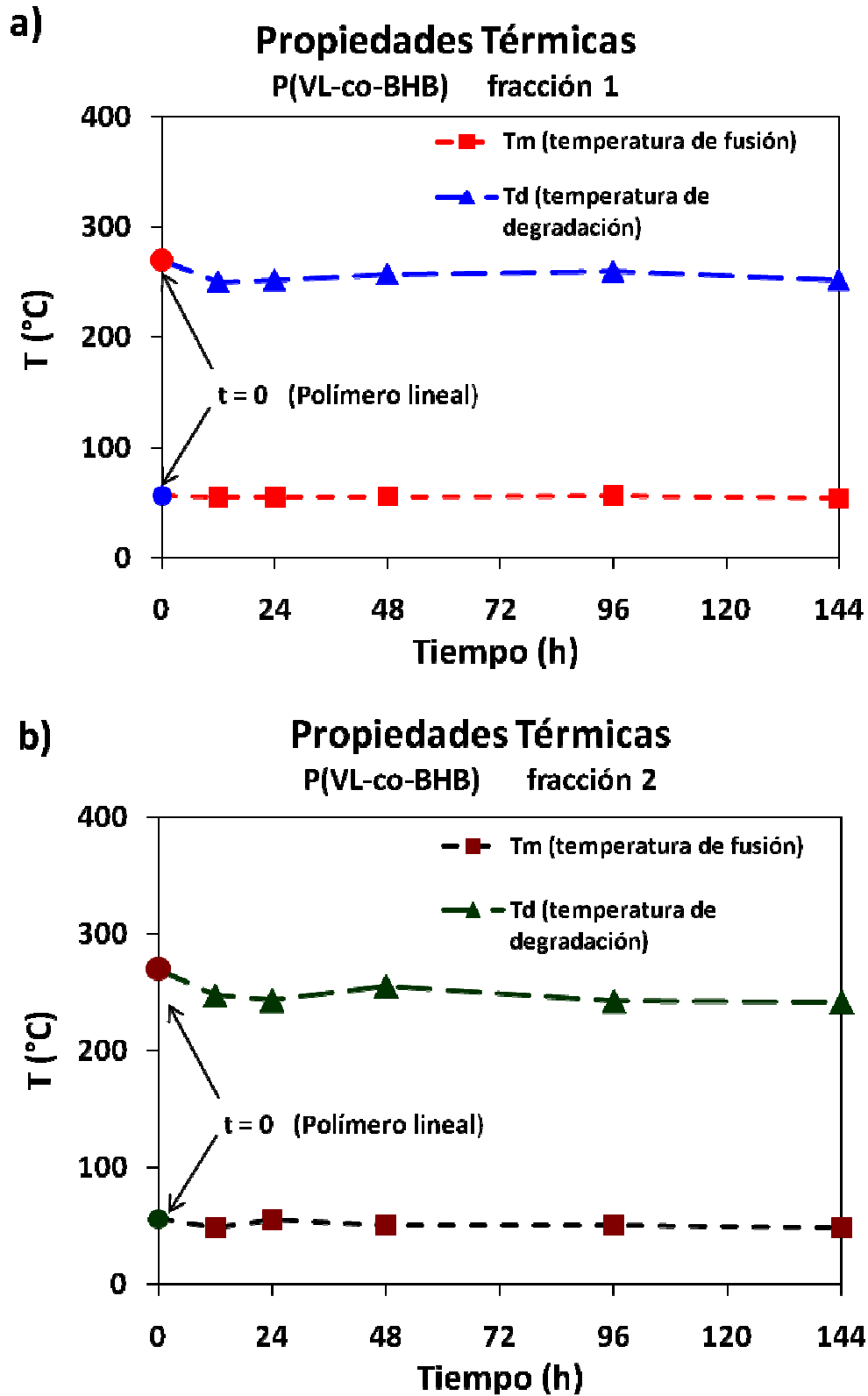


Figura 4.13 Comportamiento de las propiedades térmicas, (T_m : temperatura de fusión y T_d : temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción a) Poli(δ -Valerolactona-co-BHB) 1a fracción, b) Poli(δ -Valerolactona-co-BHB) 2da fracción.

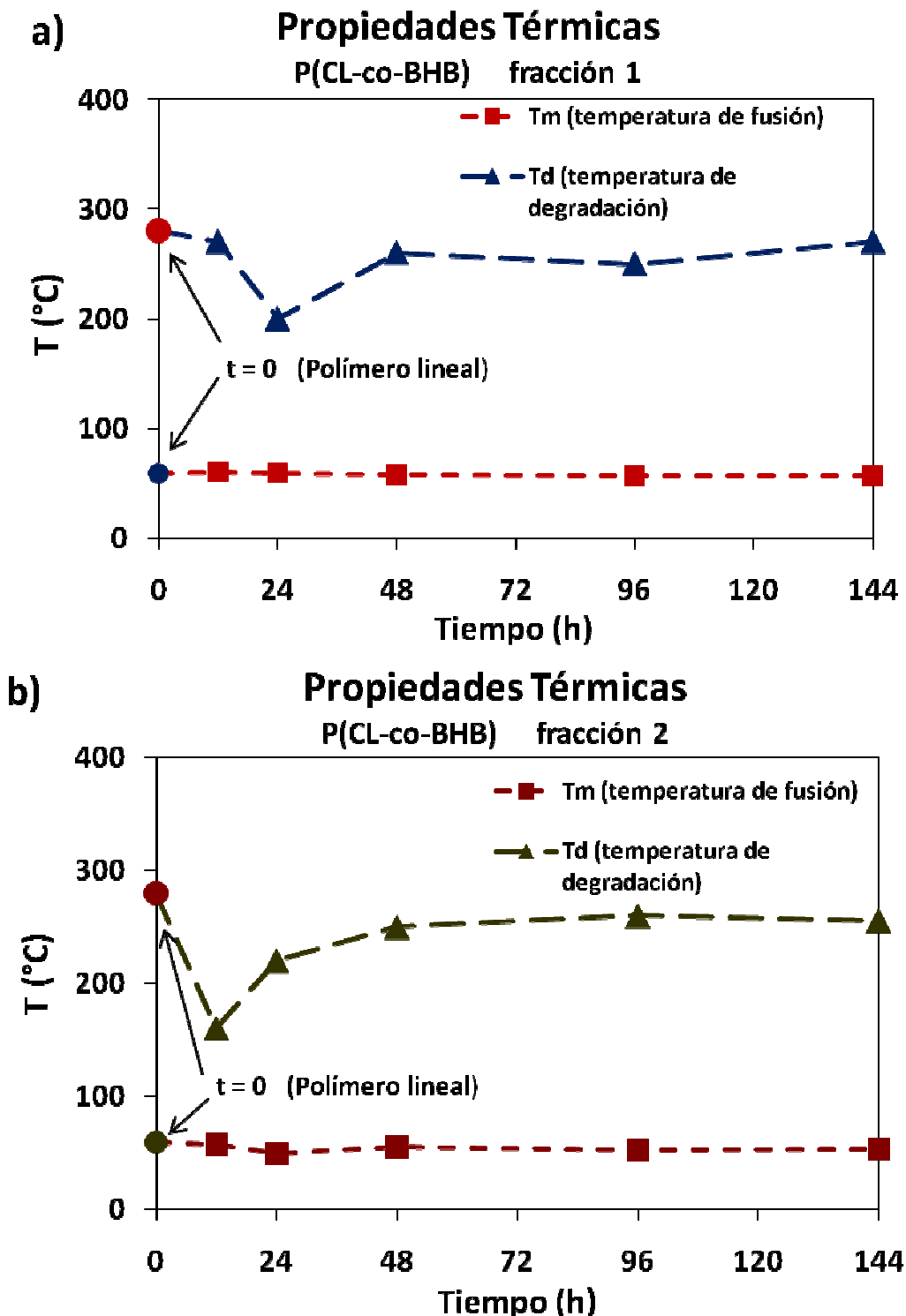


Figura 4.14 Comportamiento de las propiedades térmicas (Tm: temperatura de fusión y Td: temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción, a) Poli(ε-Caprolactona-co-BHB) 1a fracción y b) Poli(ε-Caprolactona-co-BHB) 2da fracción.

La degradación térmica se refiere a los casos en los que el polímero es sometido a temperaturas elevadas y se producen cambios químicos dando lugar a otro compuesto. Es difícil establecer una diferencia entre degradación térmica y termoquímica, ya que los materiales poliméricos raramente son químicamente puros. Las macromoléculas orgánicas así como las moléculas de bajo peso molecular son estables solamente bajo un cierto límite de temperatura, esto se debe a que los polímeros orgánicos a diferencia de otros muchos materiales inorgánicos como ciertos metales y una variedad de silicatos que resisten altas temperaturas (2000-3000 °C), están compuestos de átomos unidos por enlaces covalentes, la fuerza de estos enlaces está limitada, no así la energía de disociación de los enlaces simples inorgánicos. En una degradación térmica la estructura del polímero evoluciona irreversiblemente a partir de temperaturas entre 100-500°C y la causa fundamental es la estabilidad de los enlaces químicos, por lo que el ligero decremento en la temperatura de degradación de los polímeros ramificados con respecto al polímero lineal es debido a que la cantidad de enlaces éster que pueden ser degradados es mayor en el polímero ramificado, haciendo que el polímero sea más susceptible a degradarse a menores temperaturas (Figuras 4.13 y 4.14).

4.3 PAA de GA y su copolimerización con LLA en R-134a líquido

Los compuestos de fuentes renovables y biocompatibles como lo son el GA y LLA, así como sus polímeros altamente oxigenados, presentan baja solubilidad en solventes apolares como tolueno y $scCO_2$. Ésto fue corroborado en nuestro laboratorio con experimentos de solubilidad, por lo que el estudio de su polimerización lineal y ramificada vía enzimática está restringido a la polimerización en masa.^{61,64,65,125} Sin embargo, se ha reportado recientemente la PAA de LLA en liquido iónico (LI).^{121,126} En ambos sistemas, tanto en masa como en LI, también se observa la polimerización sin la presencia de biocatalizador y esto se atribuye a la formación de trazas de hidroxiácidos a partir del monómero a temperaturas de reacción relativamente altas (100-150°C), lo que induce la polimerización catiónica. Sin embargo, son necesarios más estudios para aclarar este tema.^{65,126} Aquí nosotros reportamos una nueva forma de sintetizar PGA y PLLGA vía enzimática usando R-134a (65°C, 25 bar) como medio de reacción. Las solubilidades del GA y LLA fueron corroborados en una celda de alta presión. La disolución de estos monómeros en un medio apropiado ofrece la atractiva posibilidad de producir nuevas y complejas estructuras poliméricas a partir de estos monómeros altamente biodegradables.

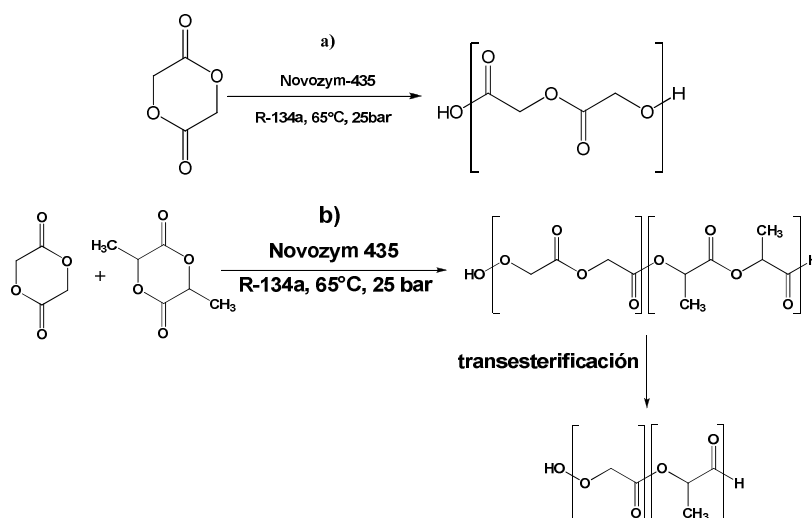


Figura 4.15 Esquema de reacción para la PAA de a) GA y b) copolimerización con LLA en R-134a líquido.

Tabla 4.4 Resultados de la síntesis enzimática de PGA en R-134a líquido

Experimento	t (h)	Fracción soluble e insoluble		Fracción Soluble		Fracción soluble e insoluble	
		Rendimiento (%)	$M_n^b \times 10^{-3}$ (g/mol)	PDI ^b	T_g^c (°C)	T_d^d (°C)	
1	24	1.51	1.2	1.3	37.2	283.4	
2	48	5.39	2.0	1.5	31.6	291.1	
3	72	10.69	1.5	1.4	n.d	321.0	
4	96	8.65	1.1	1.6	n.d	316.5	
5	120	3.82	1.4	1.3	n.d	288.2	
6(control) ^a	72	2.05	-	-	-	-	

^aLa reacción control se llevo acabo usando enzima desactivada térmicamente. ^bDeterminado por SEC calibrado con estándares de pululana y únicamente de midió la fracción soluble. ^cDeterminado por DSC. ^dLa temperatura de degradación corresponde a la pérdida del 5% en peso del material.

Tabla 4.5 Resultados de la síntesis enzimática de PLLGA en R-134a líquido y “masa” preparados con GA y LLA (44.7% mol).

Experimento	t (h)	Fracción soluble e insoluble		Fracción soluble		Fracción soluble e insoluble	
		Rendimiento (%)	% de LLA ^b en el polímero	$M_n^c \times 10^{-3}$ (g/mol)	PDI ^c	T_g^d (°C)	T_d^e (°C)
1	12	7.21	9.43	1.6	1.5	n.d	279.2
2	24	13.65	15.72	5.4	1.3	n.d	290.0
3	72	10.04	14.06	4.3	1.2	43.4	273.0
4	120	8.45	13.07	4.0	1.2	n.d	307.0
5 (masa) ^f	24	26.18	7.29	1.8	1.1	-	-
6(control) ^a	24	1.51	-	-	-	-	-

^aLa reacción control se llevo acabo usando enzima desactivada térmicamente. ^bEl porcentaje of unidades de L-lactido en el co-polímero fue determinado por la integración de las señales características en el espectro de RMN ¹H. ^cDeterminado por SEC calibrado con estándares de pululana y únicamente de midió la fracción soluble. ^dDeterminado por DSC. ^eLa temperatura de degradación corresponde a la perdida del 5% en peso del material. ^fLa polimerización en masa se llevo a cabo a 80 °C.

Nuestros resultados de la síntesis por PAA de GA y su copolimerización con LLA (Figura 4.15a y 4.15b) en R-134a líquido, son mostrados en la Tabla 4.4 y 4.5, para PGA y PLLGA, respectivamente.

Fue posible la síntesis de PLLGA en masa (80°C) usando Novozyme 435 como biocatalizador como se muestra en la tabla 4.5 experimento 5. Sin embargo, también observamos que la polimerización en masa de GA a 80°C se lleva a cabo, con o sin enzima, obteniendo rendimiento similares (> 20%) a los de un material insoluble y la reacción se detuvo rápidamente (24 h) debido a la solidificación del polímero. En el experimento 6 de las tablas 4.4 y 4.5 la reacción control con enzima desactivada térmicamente en R-134a líquido mostró baja polimerización, justificando el requerimiento de actividad enzimática.

Por su parte, la homopolimerización de LLA y DLLA en nuestro sistema fue evaluado, a diferentes condiciones de reacción, alcanzando rendimientos menores al 2%. De modo similar Matsumura y colaboradores no observaron la ocurrencia de la polimerización de DLLA a 80°C usando este mismo biocatalizador.⁶¹ Estos resultados sugieren que la lipasa CALB inmovilizada no es la más adecuada para la PAA de DLLA y LLA en R-134a, a pesar de que el monómero solubilizó perfectamente en este medio.

Tabla 4.6. Resultados de la síntesis enzimática de P(VL-co-LLA) en R-134a líquido y “masa” preparados con VL y LLA (13.5 % mol).

Experimento	t (h)	Medio de Reacción	Rendimiento ^b (%)	M_n^c (g/mol x10 ⁻³)	PDI ^c
1	48	R-134a	-	-	-
3	48	masa	-	-	-
4	96	R-134a	0.9	-	-
6	96	masa	36.3	3.0	1.1
7	144	R-134a	0.4	-	-
8	144	masa	32.1	2.9	1.1

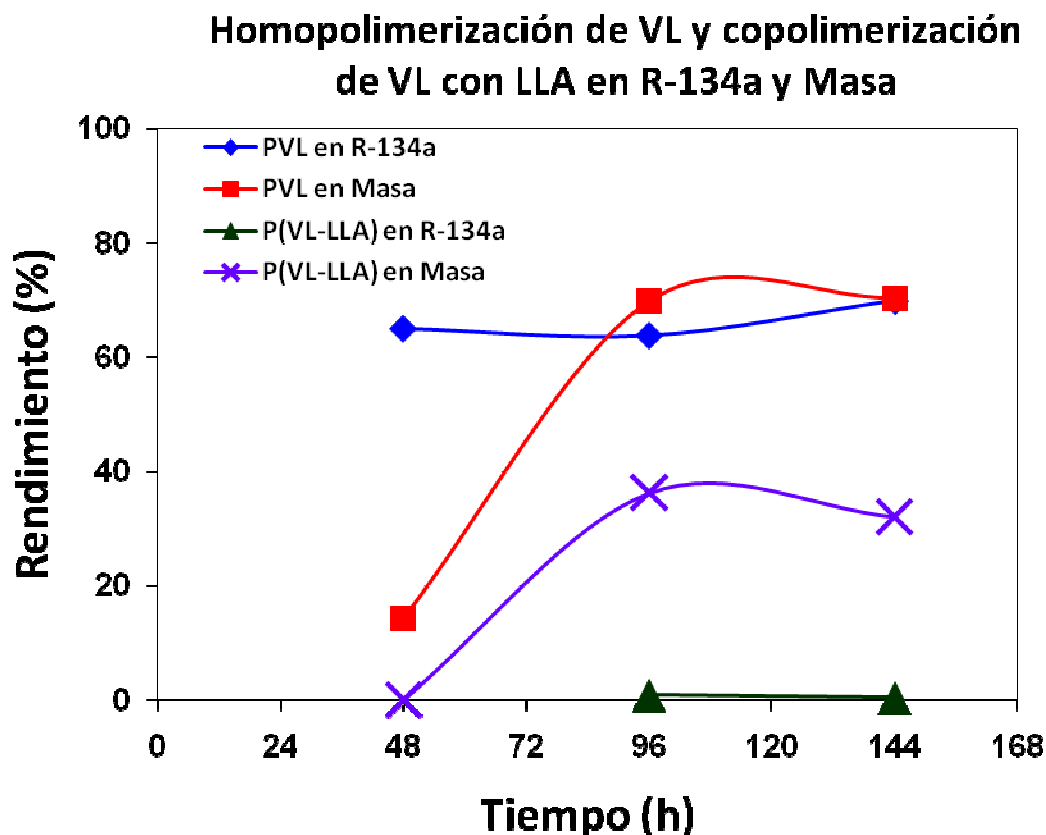


Figura 4.16 Comparación de los rendimientos obtenidos a diferentes tiempos mediante homopolimerización de δ -Valerolactona y copolimerización de δ -Valerolactona) con L-Láctido en masa y R134a líquido.

Sin embargo, Whalberg et al. observaron que la PAA de la CL es inicialmente inhibida por la adición de DLLA,¹²⁷ produciendo que el DLLA sea consumido más rápidamente que la CL. De manera similar, nosotros observamos la inhibición de la PAA de VL en masa y en R-134a a 65°C y 25 bar al adicionar LLA (Figura 4.16 y Tabla 4.6). Por el contrario, se ha reportado la polimerización exitosa de D,D-Láctido usando Novozyme 435, en tolueno, a 70 °C.¹³¹

En nuestro grupo de trabajo la homopolimerización de LLA fue posible en LI,¹²⁶ por lo que la ausencia de reacción de polimerización en nuestro sistema no es debida a una incompatibilidad catalítica de la CALB y el LLA.

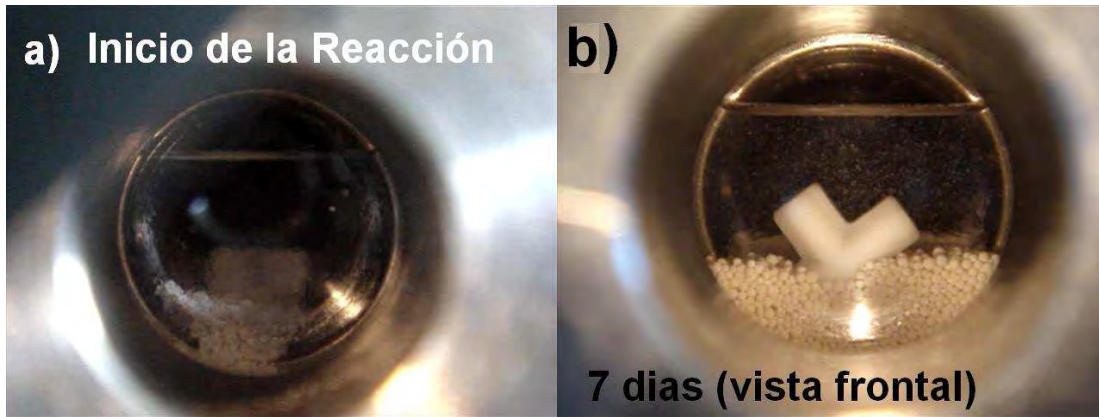


Figura 4.17. a)Aspecto del R-134a al inicio de la reacción con LLA y Novozym 435 (vista frontal), b) Aspecto del R-134a a los 7 días de reacción (vista frontal).

Al monitorear una reacción de 7 días en la celda de alta presión (Figura 4.17 a y b) observamos la formación de pequeñas partículas de polímero que nos dicen que el PLLA es insoluble en el R-134^a. Esto nos llevó a pensar que el polímero inicialmente formado en los sitios de reacción precipita al poco tiempo de formarse, obstruyendo el acceso de más reactivo a los sitio donde se encuentra la enzima inmovilizada en el soporte.

Después de analizar estos resultados y los mostrados en las tablas 4.4, 4.5 y 4.6 se puede deducir el por qué sí ocurre la copolimerización del LLA con GA (incluso mejor que el homopolímero de GA) más no su homopolimerización. Es probable que, en este caso, y a diferencia de la CL y VL, el GA sea consumido más rápidamente que el LLA, por lo que la incorporación de LLA es más lenta en el polímero, produciendo un material más soluble en el medio sin que el PLLA bloquee los sitios de reacción.

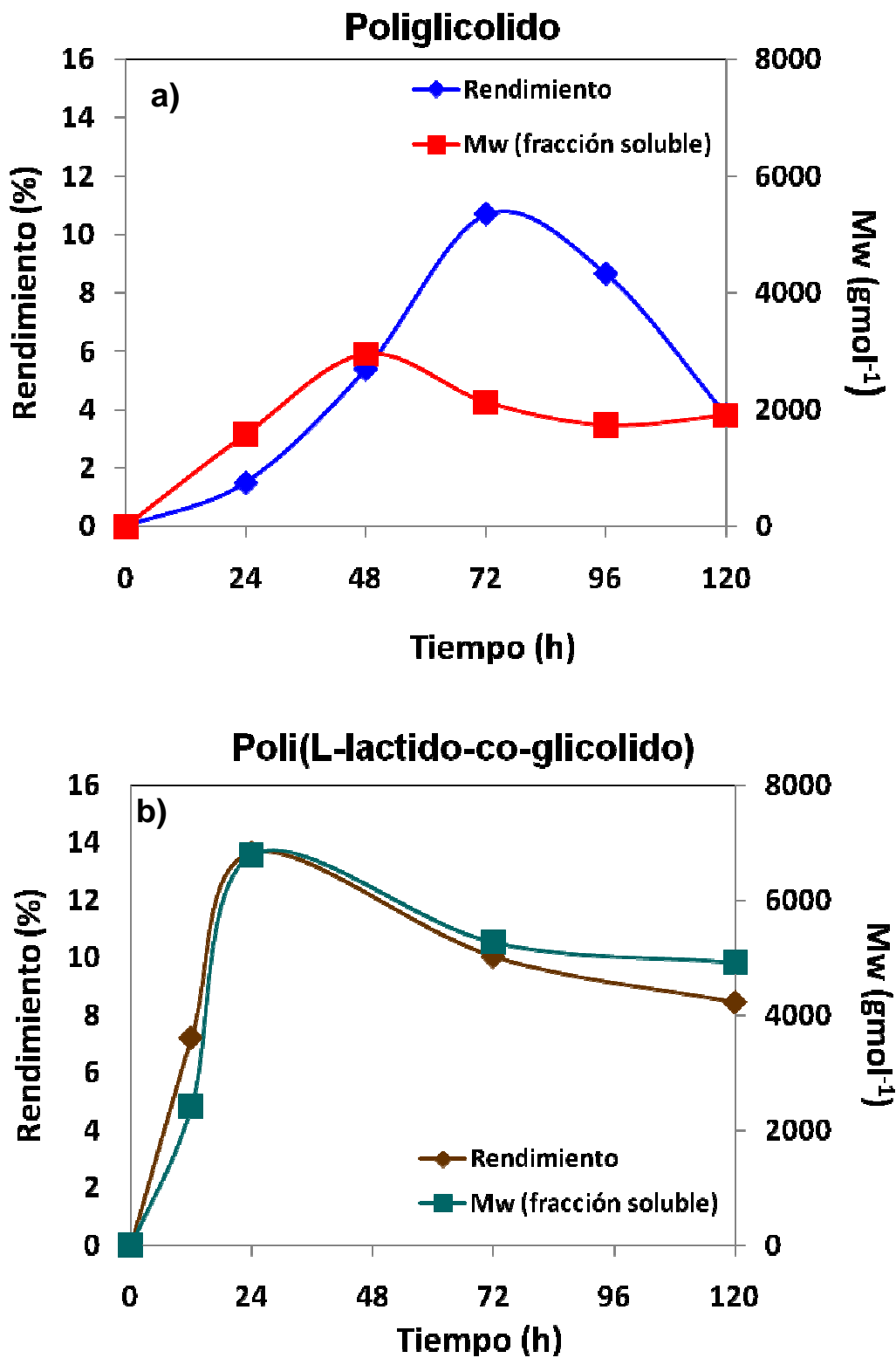


Figura 4.18 Comportamiento del rendimiento y del peso molecular (fracción soluble) con respecto al tiempo de reacción a) poliglicolido y b) poli(L-láctido-co-glicólido)

Se observa en la figura 4.18a que el mayor rendimiento de PGA fue obtenido después de 72 h, mientras que la figura 4.18b muestra que para el PLLGA la máxima producción fue alcanzada a las 24 h. Posteriormente, se presenta un decremento en el rendimiento del polímero en todos los casos a largos tiempos de reacción. Esto puede ser atribuido a la reacción inversa de hidrólisis que se ha reportado en otras investigaciones en PAA de lactonas.^{113,126}

Como se puede observar, los tiempos de la polimerización enzimática con respecto a los químicos son mayores principalmente si los comparamos con la polimerización por adición, donde una molécula con un electrón desapareado en un estado de alta energía (radical libre) se aparea a otra molécula (monómero) que tiene un par electrónico susceptible, como es el caso del doble enlace carbono-carbono (monómero vinílico) a través del movimiento de un electrón, este nuevo par electrónico forma un nuevo enlace químico sencillo y el subsiguiente radical libre sigue reaccionando con otro monómero y así sucesivamente para formar el polímero. El crecimiento de la cadena es relativamente rápido e irreversible. El tiempo necesario para el crecimiento de, por ejemplo 100 unidades monoméricas es del orden de 10^{-2} s a 10^{-3} s.

Por otro lado en las polimerizaciones de policondensación, los tiempos de reacción son generalmente mayores a los de la polimerización por adición, por lo que, para generar materiales con elevados pesos moleculares se necesitan tiempos de reacción suficientemente largos para completar la conversión de monómeros a reactivos. Esto se debe a que en la reacción de condensación se forma un intermediario, produciendo un grupo saliente (usualmente pequeña) como agua, cloruro de hidrógeno o metanol. En estas reacciones el producto saliente se extrae inmediatamente del medio porque puede inhibir la polimerización, hacerla reversible, hacerla mas lenta o permanecer como impureza indeseable, por lo que, el hecho de eliminarlo del medio de reacción también conduce a altas conversiones por el principio de Le Chatelier.

La polimerización enzimática que se lleva a cabo en nuestro sistema, además de ser una policondensación tiene la característica, de seguir un mecanismo que se realiza en múltiples pasos formándose dos intermediarios tetrahédricos, lo cual hace que los tiempos de reacción sean todavía más largos.

Como se discutió en un punto anterior el agua en la etapa de iniciación es necesaria para poder hacer la apertura del anillo previa a la propagación, sin embargo, el exceso de agua que se produce en nuestro sistema en la etapa de propagación, al no poder ser removida conduce a reacciones de hidrólisis química o enzimática en la cadena. Una de las principales características del PGA junto con PLLA son su buena biodegradabilidad (6 meses en composta) a diferencia de la PCL que tiene un tiempo de degradación de 2 años, esto es debido a que el PGA y PLLA tienen mayor cantidad de grupos éster en sus cadenas susceptibles de sufrir hidrólisis. En el caso del PLLGA, la rigidez del PGA dificulta su uso, es por eso que es copolimerizado con LLA para reducir la rigidez (cristalinidad), esto provoca que el PLLGA se degrade más rápidamente que sus homopolímeros, dando como consecuencia que la síntesis de PGA y PLLGA se de en bajos rendimientos (Figura 4.18), así como la disminución de este y evitando que se alcancen altos pesos moleculares (lo cual no fue confirmado debido a que nuestro material no fue totalmente soluble al analizarlo por GPC).

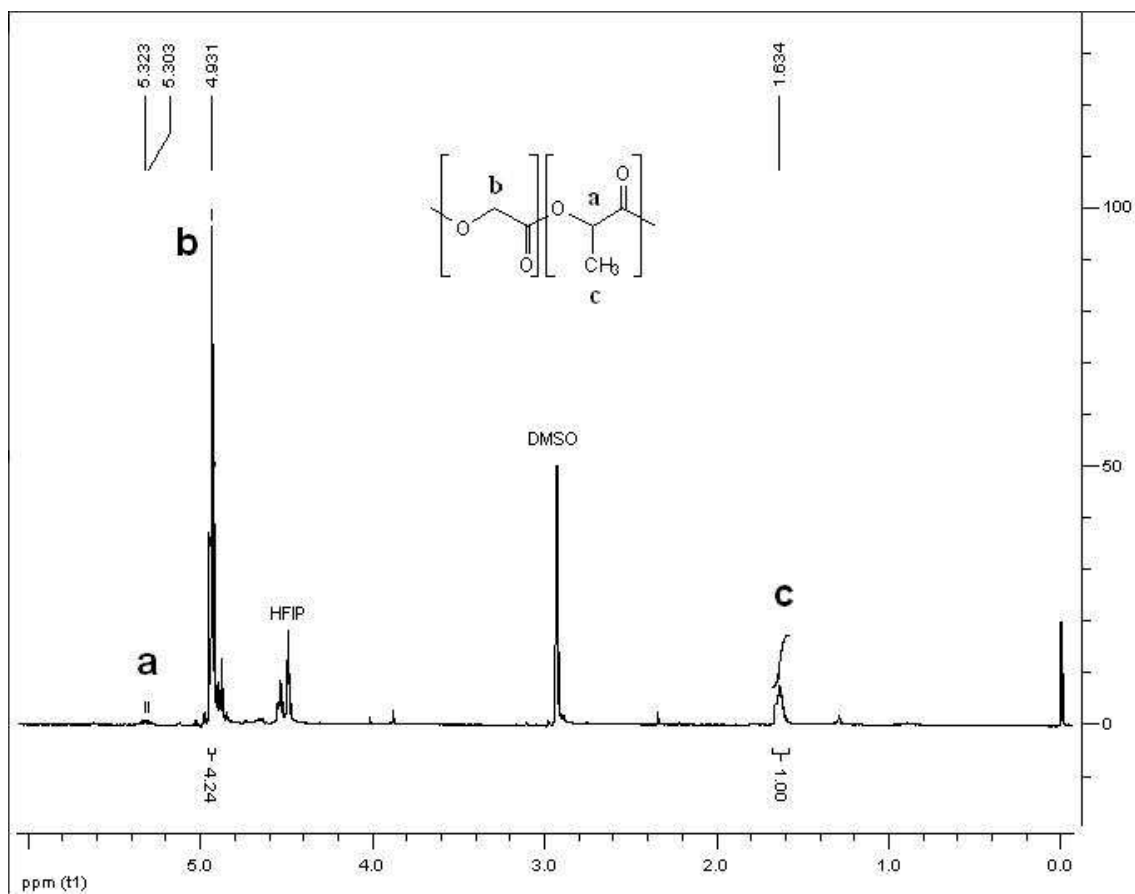


Figura 4.19. Integración de las señales características en el espectro RMN ^1H del PLLGA obtenido a 24 h de reacción.

La estructura molecular de estos materiales fue confirmada por análisis de RMN H^1 . El porcentaje de incorporación de cada unidad repetitiva en el copolímero fue determinado por la integración de sus señales características en el espectro (Figura 4.19): grupo metilo ($-\text{CH}_3$, $\delta = 1.6$ ppm) del lactido y unidad glicolil ($-\text{O-CH}_2\text{-COO-}$, $\delta = 4.9$ ppm) del glicolido.

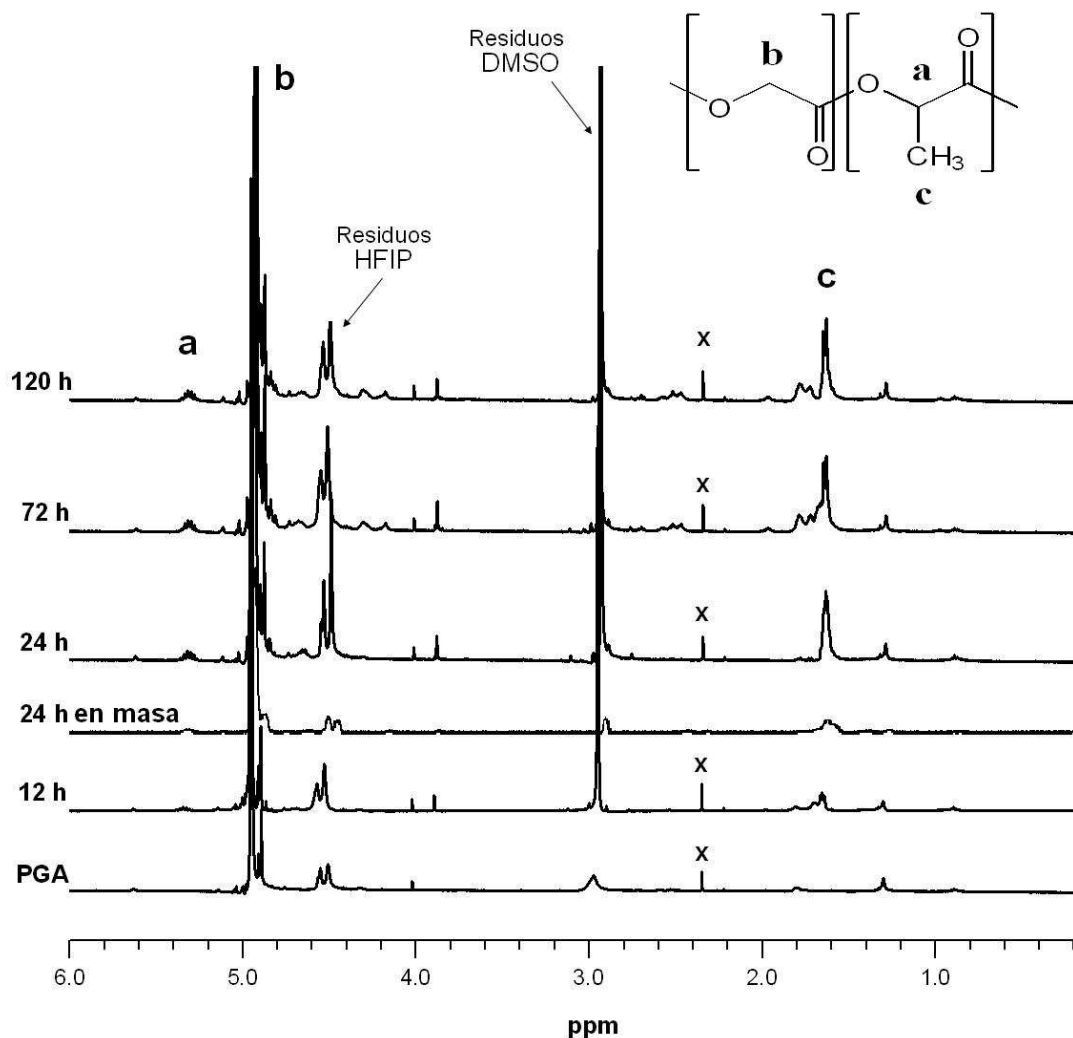


Figura 4.20. Espectros RMN ^1H de PGA y PLLGA obtenidos a diferentes tiempos de reacción.

Consistentemente, los análisis RMN ^1H de los copolímeros obtenidos (Figura 4.20) muestran que la incorporación del LLA aumenta de 12 a 24 horas y después no muestran sustanciales variaciones a lo largo del tiempo.

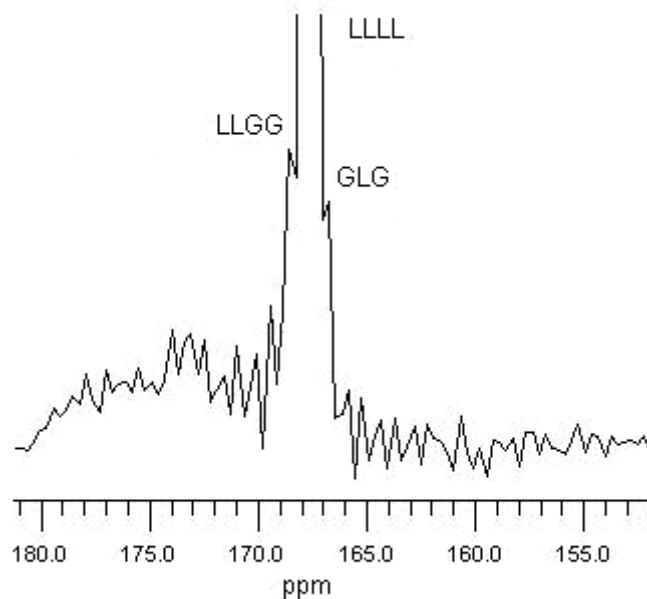


Figura 4.21. Espectro RMN ^{13}C en estado sólido realizado a 7500 Hz del PLLGA (región carbonilo).

En este punto enfocamos nuestra atención en reportes previos sobre el estudio y análisis de la microestructura del PLLGA por RMN ^1H en solución y RMN ^{13}C en estado sólido.¹²⁸ El espectro de RMN ^{13}C en estado sólido de nuestro copolímero muestra únicamente señales bien definidas de las siguientes secuencias: LLGG ($\delta/\text{ppm} = 168.6$ ppm), LLLL ($\delta/\text{ppm} = 167.66$ ppm), y GLG ($\delta/\text{ppm} = 166.87$ ppm), donde L representa la unidad lactil $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CO-O-}$, y G la unidad glicolil $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$ (Figura 4.21).

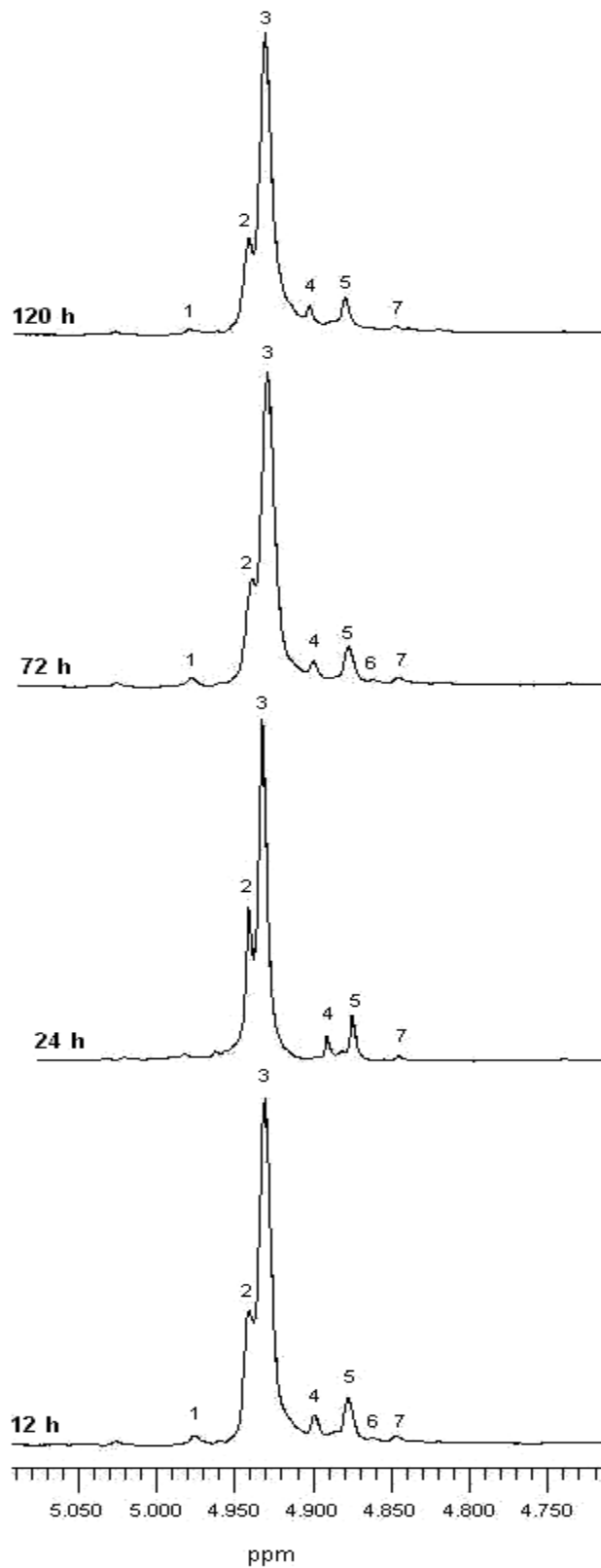


Figura 4.22. Espectros RMN ^1H del PLLGA a diferentes tiempos de reacción en la región del grupo metileno del glicólido. La clasificación de los picos se muestra en la Tabla 4.7

El análisis del espectro RMN ^1H fue realizado usando la señal del grupo metileno de las unidades glicolil. Debido al acoplamiento spin-spin de la señal de las unidades lactil en la región del grupo metileno, éste no es adecuado para el análisis. Sin embargo, se pueden observar señales bien definidas en la región del grupo metileno ($\delta = 4.8\text{-}5$ ppm) de la unidad glicolil como se muestra en la Figura 4.22.

Tabla 4.7. Clasificación de los picos de resonancia en el espectro de RMN ^1H del PLLGA en la región del grupo metileno del glicolido con respecto a su secuencia.

Pico número	Secuencia	δ (ppm)
1	GLGGG o GGGLG	4.98
2	LGGLG o GLGGL	4.94
3	GGGGG	4.93
4	LLGGL + LGGLL	4.90
5	GGGGL + LGGGG	4.88
6	LLGGG + GGGLL	4.86
7	LLGGL + GLGGL + LLGLG + GLGLG	4.84

Las señales de nuestros espectros son clasificadas basándonos en la resonancia individual de una secuencia específica y los resultados son mostrados en la tabla 4.7.¹²⁸ Tanto en el pico característico del grupo metilo del láctido ($\delta = 167.6$ ppm) del espectro de RMN ^{13}C en estado sólido (Figura 4.21) como el pico característico del grupo metileno del glicolido ($\delta = 4.9$ ppm) en el espectro RMN ^1H (Figura 4.22) se observa la aparición de una serie picos adyacentes, que corresponden a diferentes secuencias de grupos L (lactil) con G (glicolil) dentro de la estructura polimérica, los cuales son de menor tamaño ya que la unidad glicolil es la que se encuentra en mayor cantidad en el polímero, esto nos dice que hay una incorporación al azar de cada unidad en el polímero. Si bien el pico mayoritario es

la secuencia de unidades G, esta es, por la mayor velocidad de polimerización del GA que por la afinidad entre unidades L y G.

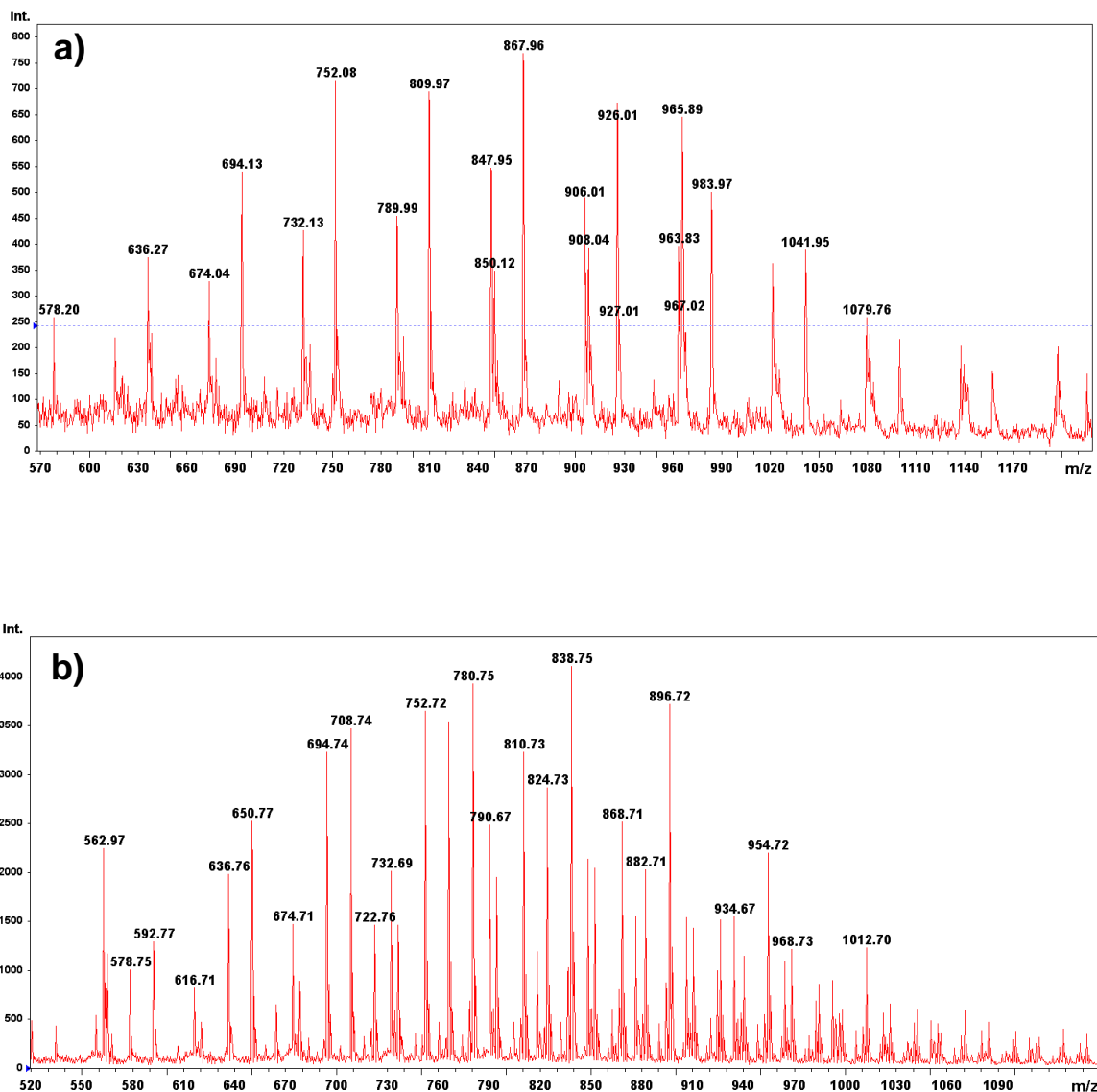


Figura 4.23 Espectros MALDI-TOF de los polímeros obtenidos vía enzimática en R-134a a) PGA y b) PLLGA.

El PGA y PLLGA presentan muy baja solubilidad en los disolventes comúnmente usados para los análisis SEC, lo que invalida el uso de la técnica de SEC. Únicamente el hexafluoro-2-propanol (HFIP) es capaz de disolver este material, pero su toxicidad desalienta su uso como solvente en análisis SEC. Los análisis MALDI-TOF fueron realizados en modo reflector usando trifluoroacetato de

potasio como agente cationizante y DCTB como matriz. Las señales por debajo de 500 m/z fueron descartados en la evaluación de espectro debido al traslape de los picos con la matriz. A manera de ejemplo, las Figuras 4.23a y 4.23b muestran los espectros MALDI-TOF del PGA y PLLGA, respectivamente.

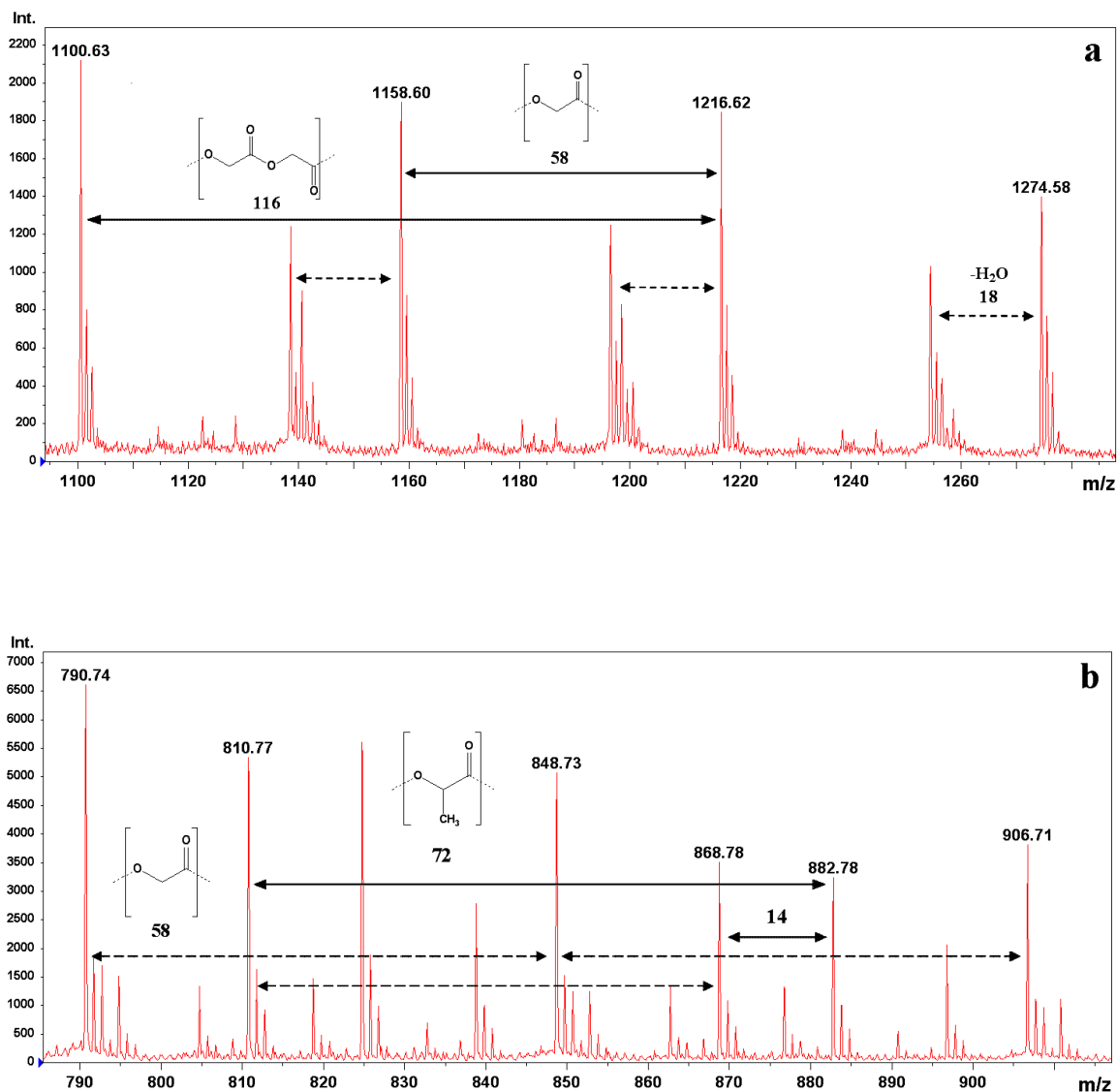


Figura 4.24. Ampliación de espectros MALDI-TOF a) PGA a 72 h de reacción, y b) PLLGA a 24 h de reacción, realizados en modo reflectrón, ion positivo.

Las señales observadas pueden ser fácilmente asignadas a las estructuras del homopolímero PGA y del copolímero PLLGA, como se muestran en las Figuras 4.24a y 4.24b, respectivamente. En el caso del PGA las señales fueron observadas a intervalos regulares de 58 m/z, que corresponde al peso molecular de la unidad glicolil, lo que confirma que se obtuvo el polímero deseado y que tenemos reacciones de transesterificación. De igual manera, la diferencia entre los picos adyacentes de 116 m/z distribuidos en el espectro corresponden a la unidad glicolidil, confirmando que hay una incorporación al azar de cada unidad en el copolímero. Se obtuvo una serie menor de picos que está caracterizada por corresponder a 18 unidades m/z menores a los picos principales. Esto sugiere que también ocurren ciclizaciones macromoleculares, aunque en menor grado (Figura 4.24a), observación que ha sido reportada para el caso de los poliláctidos.¹²⁹ En el caso del PLLGA, la diferencia de 14 unidades m/z entre los picos adyacentes es debido al intercambio de una unidad glicolil (58 g/mol) por una unidad lactil (72 g/mol). Lo cual indica que ocurren en cierto grado reacciones de politransesterificación (Figura 4.24b).

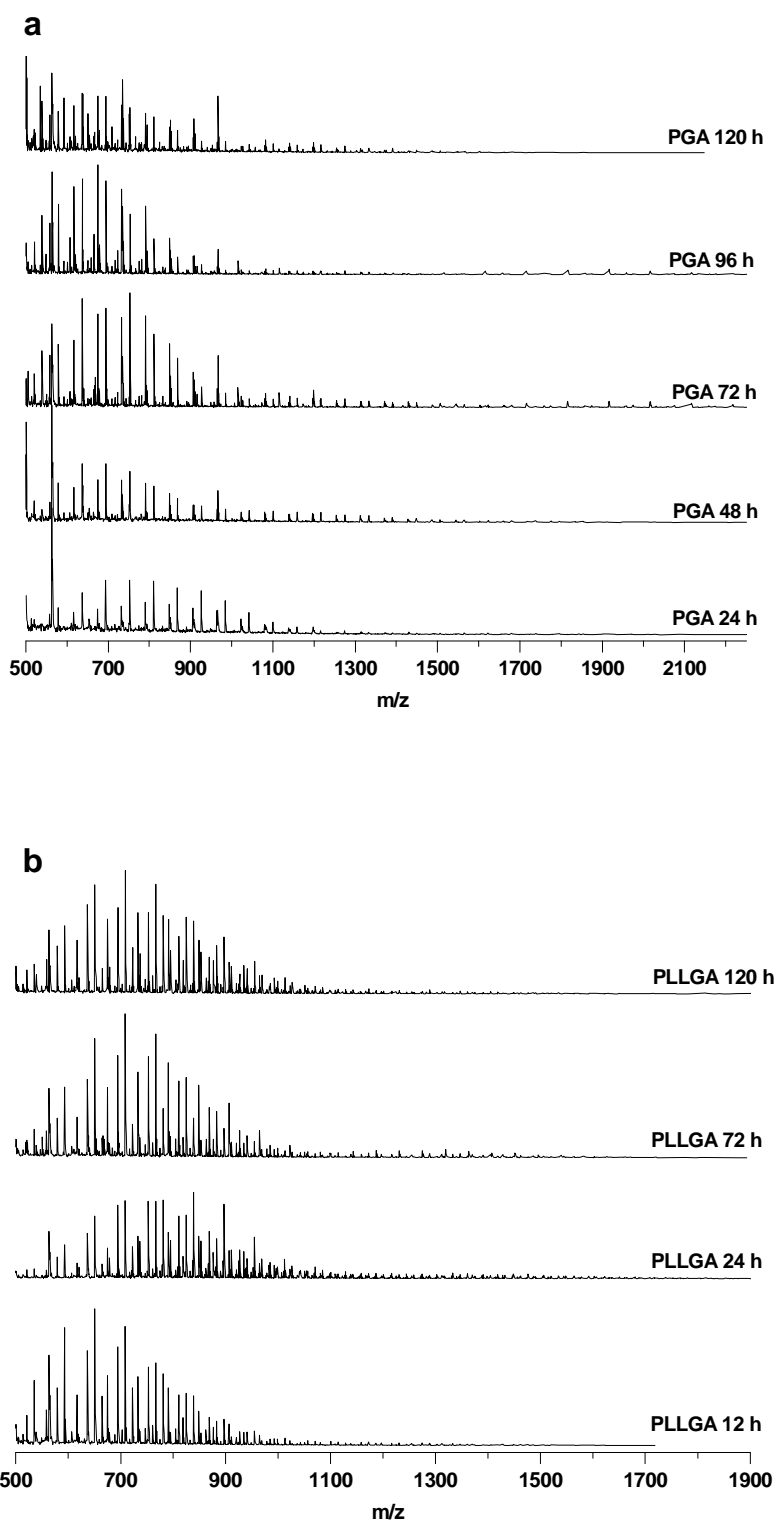


Figure 4.25. Espectros MALDI-TOF de los polímeros obtenidos a diferentes tiempos de reacción a) PGA y b) PLLGA.

Los espectros MALDI-TOF muestran pesos moleculares arriba de 2,100 g/mol para el PGA y arriba de 1,900 g/mol para el PLLGA (Figura 4.25). Sin embargo, los pesos moleculares detectados por MALDI-TOF, podrían ser menores a los reales del material en estudio ya que el pulso laser únicamente desorbe una fracción de la cadena macromolecular del polímero, limitando el análisis. Este efecto es más significativo en PLLA con altos pesos moleculares.¹²⁹ También otros autores han atribuido el límite de detección al corte de las cadenas poliméricas durante la preparación de la muestras, o por el pulso láser al momento del análisis.¹²³ Las Figuras 4.25a y 4.25b muestran los espectros MALDI-TOF de los polímeros obtenidos a diferentes tiempos de reacción para PGA y PLLGA. En ambos casos, el rango m/z detectado tiende a aumentar conforme la reacción procede a 72 y 24 h, respectivamente, seguido de un decremento en el rango detectado a largos tiempos de reacción.

Por su parte, las propiedades térmicas de los materiales fueron analizados por DSC y TGA (Tablas 4.4 y 4.5). Los termogramas DSC fueron corridos en un intervalo de temperatura de 25 a 300°C mientras que los análisis TGA se realizaron en un intervalo de 25 a 500°C. Ambas determinaciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La Figura 4.26 muestra los termogramas DSC y TGA adquiridos para la PLLGA, a modo de ejemplo.

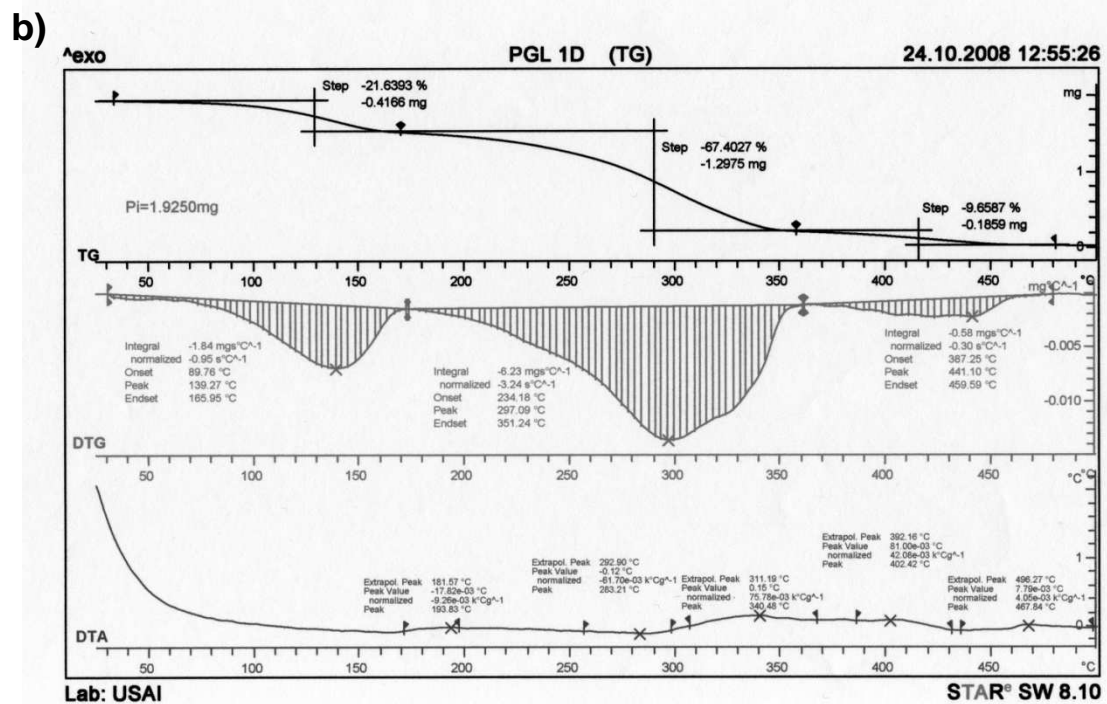
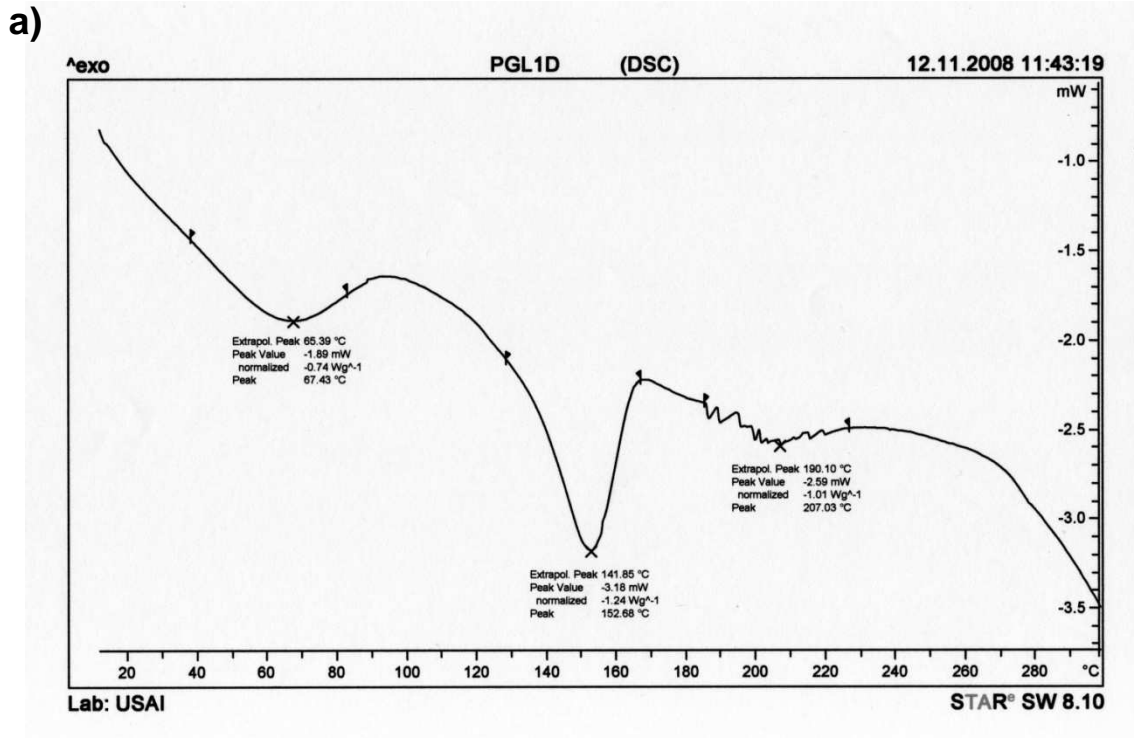


Figura 4.26 Termogramas a) DSC y b) TG del copolímero de GA con LLA, experimento 2, de la tabla 4.5.

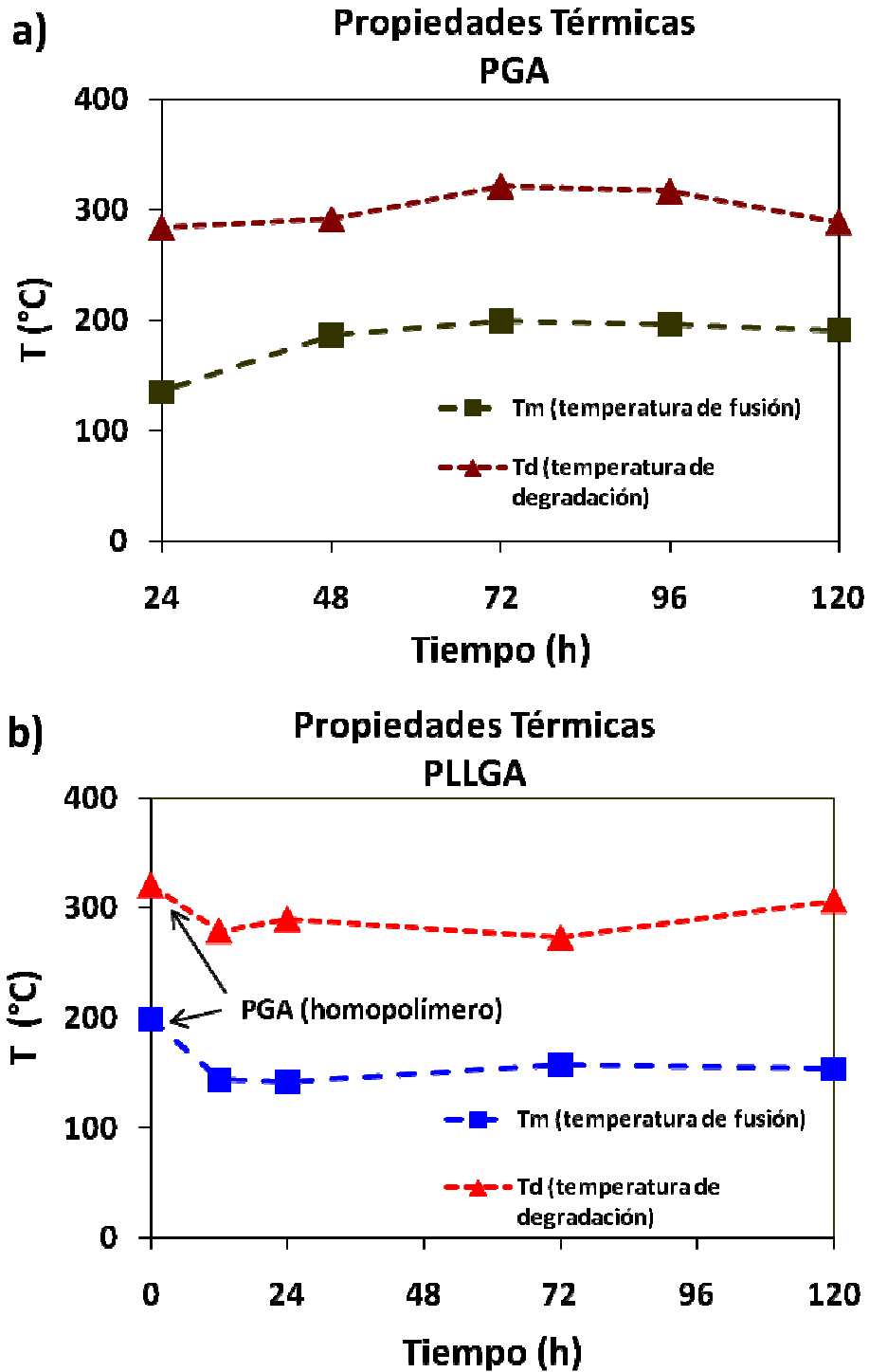


Figura 4.27 Comportamiento de las propiedades térmicas (T_g : temperatura de transición vítrea, T_m : temperatura de fusión y T_d : temperatura de degradación) con respecto al tiempo de reacción a) poliglicólido y b) poli(L-láctido-co-glicólido)

Los polímeros semi-cristalinos tienen una porción amorfa que generalmente constituye el 40-70% de la muestra polimérica (PGA de 45-55 % y PLLA de 63 %). Esto explica porque en la literatura está reportado que estos polímeros presentan tanto T_g como temperatura de fusión (Tabla 2.1). Sin embargo, se ha observado que en el proceso de cristalización (precipitación del polímero en un antisolvente para purificar el producto) las cadenas relativamente cortas se organizan en estructuras cristalinas más rápidamente que las cadenas más grandes. Esto quiere decir que polímeros con un alto grado de polimerización (DP) tiene dificultad de organizarse en capas porque la tendencia es enredarse. Por consiguiente, el DP es un factor importante para determinar la cristalinidad del polímero. Debido a que los polímeros que hemos sintetizado se presuponen con pesos moleculares relativamente menores a los reportados en la literatura vía química, podemos decir que la ausencia de la T_g en la mayoría de nuestros termogramas se debe al alto grado de cristalinidad que tienen nuestros materiales como consecuencia del bajo peso molecular de éstos.

Finalmente, la temperatura de transición vítrea que presentaron algunas muestras de PGA y PLLGA están en el rango de los valores reportados en la literatura.^{28, 35, 119} Los análisis TGA muestran resistencia térmica del material arriba de 270°C para todos los materiales sintetizados. También se observó que la temperatura de fusión y la de degradación de los copolímeros fueron ligeramente menores a las de los homopolímeros de PGA (Figura 4.27). Como se mencionó en un punto anterior, en el caso del PLLGA, la rigidez del PGA dificulta su uso, es por eso que es copolimerizado con LLA para reducir la rigidez (cristalinidad), esto provoca que el PLLGA se degrade más rápidamente que sus homopolímeros

CONCLUSIONES

- ❖ La solubilidad de los polímeros en R-134a líquido y scCO₂ mejoró el rendimiento de la reacción al promover una mejor transferencia de los monómeros a la enzima, facilitando así la polimerización y por consiguiente un mayor peso molecular así como un mayor rendimiento con respecto a la reacción en masa.
- ❖ La reacción de PAA en ambos FC se observó un decremento en el rendimiento de polímero obtenido a tiempos largos de reacción. Esto es atribuido a la hidrólisis del polímero, siendo más dramático en el caso del scCO₂ (25.3% a 168 h). Así mismo, la rapidez de reacción inicial fue más rápida en R-134a líquido que en scCO₂.
- ❖ Al llevar a cabo la reacción en R-134a líquido a 65°C y 25 bar con lactonas de diferentes tamaños (anillos de 5, 6 y 7 átomos de carbono) y con el biocatalizador estudiado se observó que entre más pequeño es el anillo de la lactona, disminuye la reactividad de ésta, debido a la menor tensión en el anillo provocando un menor rendimiento. Ésto corrobora resultados de reportes previos.
- ❖ La disolución completa del compuesto polar BHB (10% p/v) en presencia de VL o CL en el R-134a líquido con respecto al scCO₂ donde el BHB fue poco soluble (< 3% p/v), descarta el uso de este último para la síntesis de poliésteres ramificados polares, confirmando la compatibilidad del R134a líquido con compuestos polares.

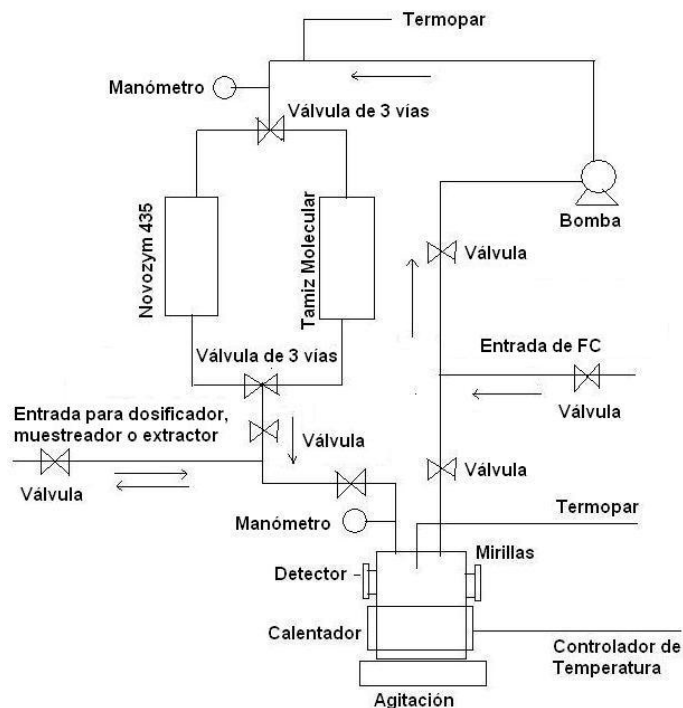
- ❖ Los rendimientos en todas las reacciones tienden a aumentar pero luego se da una disminución a largos tiempos de reacción, lo que corresponde a la hidrólisis del polímero.
- ❖ Nuestros resultados usando R134a líquido indican que este disolvente podría ser adecuado para la síntesis de otros materiales de interés. El R134a operado en sistemas cerrados es una buena opción para la síntesis verde de polímeros, basados en sus buenas propiedades físicas.
- ❖ Con base en nuestros resultados y el de otros investigadores, la investigación en R-134a líquido y otros freones polares no tóxicos cuentan con gran potencial para la síntesis enzimática de poliésteres con nuevas estructuras y de manera compatible con el medio ambiente.

RECOMENDACIONES

Con base en la experimentación realizada se reconoce que todavía hay una gran ventana de oportunidades en la investigación de este tipo de sistemas, por lo que a continuación se hacen algunas recomendaciones sobre el trabajo a futuro para mejoras y ampliar el espectro de posibles aplicaciones.

- ❖ La evaluación de otros fluidos comprimidos (otros freones) no tóxicos, y compatibles con la síntesis enzimática, para el desarrollo de nuevos procesos ecológicos.
- ❖ La evaluación de otros biocatalizadores comerciales para la obtención de estos y otros materiales.
- ❖ Debido a que la caracterización de la estructura y el peso molecular de nuestros materiales fue de gran importancia, y que para ello se probaron diferentes técnicas, resulta necesario mejorar y desarrollar técnicas preparativas para RMN y MALDI-TOF, entre otros, para caracterizar y determinar pesos moleculares de polímeros altamente insolubles, polímeros ramificados y copolímeros.

- ❖ Se está desarrollando un sistema con recirculación acoplado a columnas empacadas con las siguientes características:



- Columna empacada con tamiz molecular para remover el agua producida, con el fin de minimizar la hidrólisis, aumentar el rendimiento y el peso molecular.
- Columna empacada con enzima inmovilizada para eliminar el paso de la separación del polímero de la enzima con solvente.
- Línea de usos múltiples (dosificación, muestreador, extracción).
 - Dosificador: suministro programado de los monómeros para aumentar el grado de ramificación.
 - Muestreador: toma de muestra para el monitoreo de la reacción.
 - Extracción: debido a que las sustancias de bajo peso molecular y otros aditivos son generalmente solubles en el medio estos pueden separarse *in-situ* aprovechando la propiedad extractiva de los FC para la purificación del material

- ❖ Lo relevante de este sistema es que se puede ampliar hacia otro tipo de reacciones (e.g. estampado molecular, hidrólisis, etc) y/o configuraciones, por ejemplo procesos de extracción-reacción-purificación, en donde:
 - Se empaqueta un material, al cual se le extrae algún compuesto de interés.
 - Se realiza la reacción enzimática o incluso con otro tipo de catalizadores (e.g. polímeros estampados molecularmente con actividad catalítica) para obtener el producto deseado.
 - Se purifica el material aprovechando la propiedad extractiva del FC y/o atrapando la molécula en un soporte empacado (e.g. polímero estampado molecularmente) que sea selectiva a ésta.

CONGRESOS, PUBLICACIONES DERIVADOS DEL PROYECTO

Congresos

1. "SÍNTESIS DE BIOPLÍMEROS EN 1, 1, 1, 2-TETRAFLUOROETANO LÍQUIDO" (presentación oral), Alberto López Luna, Miquel Gimeno Seco, Eduardo Bárzana García, XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio 21-26, 2009. Acapulco, Gro. México.
2. "LIPASE-CATALYZED SYNTHESSES OF POLYGLICOLIDE AND POLY-L-LACTIDE-CO-GLICOLIDE USING LIQUID 1,1,1,2-TETRAFLUROETHANE AS SOLVENT MEDIA" (presentación oral), Alberto López Luna, José Luis Gallegos, Miquel Gimeno Seco, Eduardo Vivaldo Lima, Eduardo Bárzana García, International Conference on Polymers and Advanced Materials, POLYMAT 2009, November 22-26, 2009. Huatulco, México.
3. "ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLYESTERES IN COMPRESSED FLUIDS" (presentación oral), Eduardo Bárzana García, Miquel Gimeno Seco, Alberto López Luna, José Luis Gallegos, Eduardo Vivaldo Lima, 9th Conference on Supercritical Fluids and their Applications, September 5-8, 2010, Sorrento, Italia.

Publicaciones

1. Alberto López-Luna, Jose L. Gallegos, Miquel Gimeno*, Eduardo Vivaldo-Lima, Eduardo Bárzana*, "Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 67, 143-149.
2. Alberto López-Luna, Jose L. Gallegos, Miquel Gimeno*, Eduardo Vivaldo-Lima, Eduardo Bárzana*, "Biocatalysis in Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane for the preparation of Poly-L-Lactide-co-Glycolides" **Enviado**.
3. Actualmente se esta escribiendo un articulo sobre una técnica preparativa llamada "imaging" la cual servirá para mejorar la calidad de los espectros obtenidos por MALDI-TOF, especialmente para compuestos altamente insolubles.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Suriyamongklo P., Weselake R., Narine S., Moloney M., Shah S., Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganism and plants – A review, *Biotechnology Advances*, **2007**, 25, 148-175.
- 2 Jarerat A., Yutaka T., Tanaka H., Microbial Poly(L-lactide)-Degrading Enzyme Induced by Amino Acids, Peptides, and Poly(L-amino Acids), *Journal of Polymers and the Environment*, **2004**, 3, 139-146.
- 3 Jayasekaya R., Harding I., Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation, *Journal of Polymers and the Environment*, **2005**, 13, 231-251.
- 4 Kennedy J. F., Bunko K., Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites, *Carbohydrate Polymers*, **2007**, 68, 808-809.
- 5 Chandra R., Rustgi R., Biodegradable Polymers, *Progress in Polymer Science*, **1998**, 23, 1273-1335.
- 6 Swift G., Directions for Environmentally Biodegradable Polymer Research, *Accounts of Chemical Research*, **1993**, 26, 105-110.
- 7 Ikada Y., Tsuji H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, 21, 117-132
- 8 Toncheva N., Mateva R., Carbamoyl derivatives of poly(ϵ -caprolactone) and poly(δ -valerolactone) as precursors for syntheses of poly (ϵ -caprolactam) copolymers, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, **2007**, 2, 151-158
- 9 Kodakawa J., Iwasaki Y., Tagaya H., Ring-opening polymerization of lactones catalyzed by ion-exchanged clay montmorillonite, *Green Chemistry*, **2001**, 4, 14-16.
- 10 Furuhashi Y., Sikorski P., Atkins E., Iwata T., Doi Y., Structure and Morphology of the Aliphatic Polyester Poly(δ -valerolactone) in Solution-Grown, Chain-Folded Lamellar Crystals, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, **2001**, 39, 2622-2634
- 11 Lin W., Wang C., Juang L., Characterization and Comparison of Diblock and Triblock Amphiphilic Copolymers of Poly(δ -valerolactone), *Journal of Applied Polymer Science*, **2006**, 100, 1836-1841.

- 12** Juzwa M., Jedlinski Z., Unprecedented polymerization of δ -valerolactone initiated by the stable enolate of γ -butyrolactone, *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, 21, 166-168.
- 13** Zeng F., Lee H., Chidiac M., Allen C., Synthesis and Characterization of Six-Arm Star Poly(δ -valerolactone)-block-Methoxy Poly(ethylene glycol) Copolymers, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2140-2149
- 14** Yotova L., Toncheva N., Mateva R., Kinetics of Enzyme Biodegradation of New Synthesized Copolymers, *Bioautomation*, **2005**, 2, 65-69.
- 15** Yang L., Jia L., Hao Q., Li Y., Li Q., Fang Q., Cao A., New Biodegradable Amphiphilic Block Copolymers of ϵ -Caprolactone and δ -Valerolactone Catalyzed by Novel Aluminum Metal Complexes, *Macromolecular Bioscience*, **2005**, 5, 896-903
- 16** Bhaw-Luximon A., Jhurry D., Motala-Timol S., Lochee Y., Polymerization of ϵ -Caprolactone and its Copolymerization with γ -Butyrolactone using Metal Complexes, *Macromolecular Symposia*, **2006**, 231, 60-68
- 17** Faÿ F., Renard E., Langlois V., Linossier I., Vallée-Rehel K., Development of poly(ϵ -caprolactone-co-L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone-co- δ -valerolactone) as new degradable binder used for antifouling paint, *European Polymer Journal*, **2007**, 43, 4800-4813.
- 18** Du F., Ye W., Gu Z., Yang J., Synthesis and In Vitro Degradation of Copolymers of Glycolide and 6(R,S)-Methylmorpholine-2,5-dione, *Journal of Applied Polymer Science*, **1997**, 63, 643-650.
- 19** Takahashi K., Taniguchi I., Miyamoto M., Kimura Y., Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid), *Polymer*, **2000**, 41, 8725-8728.
- 20** Epple M., Herzberg O., Porous Polyglycolide, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **1998**, 43, 83-88.
- 21** Nakafuku C., Yoshimura H., Melting parameters of poly(glycolic acid), *Polymer*, **2004**, 45, 3583-3585.
- 22** Domb A., J., Kost J., Wiseman, Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers Imprint, **1997**.
- 23** Schwarz K., Epple M., A detailed characterization of polyglycolide prepared by solid-state polycondensation reaction, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1999**, 200, 2221-2229.

- 24** Gilding D. K., Reed A. M., Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1, *Polymer*, **1979**, 20, 1459-1464.
- 25** Drumright R. E., Gruber P. R., Henton D. E., Polylactic Acid Technology, *Advanced Materials*, **2000**, 12, 23, 1841-1846
- 26** Hutchinson, M. H., Dorgan J. R., Knauss D. M., Hait S. B., Optical Properties of Polylactides, *Journal of Polymers and the Environment*, **2006**, 14, 119-124.
- 27** Perepelkin K. E., Polylactide fibres: fabrication, properties, use, prospects: a review, *Fiber Chemistry*, **2002**, 34, 2, 85-100
- 28** Garlotta D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid), *Journal of Polymers and the Environment*, **2001**, 9, 2, 63-84
- 29** Mehta R., Kumar V., Bhunia H., Upadhyay S. N., Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, **2005**, 45, 325-349.
- 30** Gunatillake P. A., Adhikari R., Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering, *European Cells and Materials*, **2003**, 5, 1-16.
- 31** Astete C. E. , Sabliov C. M., Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, **2006**, 17, 3, 247-289.
- 32** Jiang W., Gupta R. K., Deshpande M. C., Schwendeman S. P., Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 391-410.
- 33** Kiremitci M., Deniz G., Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly(DL-Lactide)/Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Films, *Turkish Journal of Chemistry*, **1999**, 23, 153-161.
- 34** Stevanovic M., Savic J., Jordovic B., Uskokovic D., Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2007**, 59, 215-223.
- 35** Dechy-Cabaret O., Martin-Vaca B., Bourissou D., Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide, *Chemical Reviews*, **2004**, 104, 6147-6176.

- 36** Reed A. M., Gilding D. K., Biodegradable polymers for use in surgery poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2 *In vitro* degradation, *Polymer*, **1981**, 22, 494-498.
- 37** Ishizu K., Tsubaki K., Mori A., Uchida S., Architecture of nanostructured polymers, *Progress in Polymer Science*, **2003**, 28, 27-54
- 38** Trollsas M., Löwenhielm P., Lee V. Y., Möller M., Miller R. D., Hedrick* J. L., New Approach to Hyperbranched Polyesters: Self-Condensing Cyclic Ester Polymerization of Bis(hydroxymethyl)-Substituted ϵ -Caprolactone, *Macromolecules*, **1999**, 32, 9062-9066.
- 39** Seiler M., Hyperbranched polymers: Phase behavior and new applications in the field of chemical engineering, *Fluid Phase Equilibria*, **2006**, 241, 155-174
- 40** Yan D., Gao C., Hyperbranched polymers: from synthesis to applications, *Progress in Polymer Science*, **2004**, 29, 183-275.
- 41** Voit B. I., Hyperbranched polymers: a chance and a challenge, *Comptes Rendus Chimie*, **2003**, 6, 821-832.
- 42** Klanjert B., Bryszewska M., Dendrimers: properties and applications, *Acta Biochimia Polonica*, **2001**, 48, 1, 199-208.
- 43** Frey H., Smet M., Gottschalk C., Skaria S., Aliphatic Hyperbranched Copolyesters by Combination of ROP and AB₂-Polycondensation, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2005**, 206, 2421-2428.
- 44** Tasaka F., Ohya Y., Ouchi T., One-Pot Synthesis of Novel Branched Polylactide Through the Copolymerization of Lactide with Mevalonolactone, *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, 22, 820-824.
- 45** Zhao L., Cai Q., Jiang J., Shuai X., Bei J., Chen C., Xi F., Synthesis and thermal properties of novel star-shaped poly(L-lactide)s with starburst PAMAM-OH dendrimer macroinitiator, *Polymer*, **2002**, 43, 5819-5825.
- 46** Biotechnology for Clean Industrial Products and Processes; Towards Industrial Sustainability, Organisation for Economic Co-Operation and Development, **1998**
- 47** The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability; Sustainable Development, Organisation for Economic Co-Operation and Development, **2001**
- 48** Monte M. C., Magaña I., Enzimas con aplicación industrial, *Avance y Perspectiva*, **2002**, 21, 279-282

- 49 Kobayashi S., Uyama H., Kimura S., Enzymatic Polymerization, *Chemical Reviews*, **2001**, 101, 3793-3818.
- 50 Puskas J. E., Sen M. Y., Seo K. S., Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, Enzymes, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **2009**, 47, 2959-2976.
- 51 Hsuan-Ying C., Hui-Yi T., Chu-Chieh L., Ring-opening polymerization of L-lactide catalyzed by a biocompatible calcium complex, *Polymer*, **2007**, 48, 2257-2262.
- 52 Zhong Z., Schneiderbauer S., Dijkstra P. J., Westerhausen M., Fast and Living Ring-Opening Polymerization of L-Lactide Initiated with *In-situ*-Generated Calcium Alkoxides, *Journal of Polymer and the Environment*, **2001**, 9, 1, 31-38.
- 53 Casas J., Persson P. V., Inversen T., Córdova A., Direct Organocatalytic Ring-Opening Polymerizations of Lactones, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2004**, 346, 1087-1089.
- 54 Stridsberg K. M., Ryner M., Albertsson A., Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture, *Advances in Polymer Science*, **2002**, 157, 41-65.
- 55 Varma I. K., Albertsson A., Rajkhowa R., Srivastava R. K., Enzyme catalyzed synthesis of polyesters, *Progress in Polymer Science*, **2005**, 30, 949-981.
- 56 Báez J. E., Martínez M., Martínez A., Ring-opening polymerization of lactones catalyzed by decamolybdate anion, *Polymer*, **2003**, 44, 6767-6772.
- 57 Hachemaoui A., Belbachir M., Ring-opening polymerization of lactones catalyzed by ion-exchanged clay montmorillonite and the application to well-defined block copolymer synthesis with seven-membered cyclic carbonate, *Materials Letters*, **2005**, 59, 3904-3908.
- 58 Matsumura S., Enzymatic Synthesis of Polyesters via Ring-Opening Polymerization, *Advances in Polymer Science*, **2006**, 194, 95-132.
- 59 Huyama H., Kobayashi S., Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones Catalyzed by Lipase, *Chemistry Letters*, **1993**, 1149-1150.
- 60 Moore T., Adhikari R., Gunatilake P., Chemosynthesis of bioresorbable poly(γ -butyrolactone) by ring-opening polymerisation: a review, *Biomaterials*, **2005**, 26, 3771-3782.
- 61 Matsumura S., Mabuchi K., Toshima K., Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide, *Macromolecular Rapid Communication*, **1997**, 18, 477-482.

- 62** Matsumura S., Mabuchi K., Toshima K., NOVEL RING-OPENING POLYMERIZATION OF LACTIDE BY LIPASE, *Macromolecular Symposia*, **1998**, 130, 285-304.
- 63** Matsumura S., Tsukada K., Toshima K., Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s, *International Journal of Biological Macromolecules*, **1999**, 25, 1,161-167.
- 64** Numata K., Srivastava R. K., Finne-Wistrand A., Albertsson A. C., Doi Y., Abe H., Branched Poly(lactide) Synthesized by Enzymatic Polymerization: Effects of Molecular Branches and Stereochemistry on Enzymatic Degradation and Alkaline Hydrolysis, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 3115-3125.
- 65** Huijser S., Staal B. B. P., Huang J., Duchateau R., Koning C. E., Topology Characterization by MALDI-ToF-MS of Enzymatically Synthesized Poly(lactide-co-glycolide), *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 9, 2465-2469.
- 66** Frey H., Skaria S., Smet M., Enzyme-Catalyzed Synthesis of Hyperbranched Aliphatic Polyesters, *Macromolecular Rapid Communications*, **2002**, 23, 292-296.
- 67** Ai P., Chen L., Hu D., Chen Y., Li D., Zhang B., Sha K., Wang J., Synthesis of hyperbranched copolymers by combining enzymatic ring-opening polymerization and ATRP from a novel bifunctional initiator, *Chinese Science Bulletin*, **2006**, 51, 22, 2706-2709
- 68** Jaeger K., Eggert T., Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 390-397.
- 69** Norin M., Haeffner F., Achour A., Norin T., Hult K., Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizornucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*, *Protein Science*, **1994**, 3, 1493-1503
- 70** Overbeeke P. L. A., Govardhan N., Khalaf N., Jongejan J. A., Heijen J. J., Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 10, 385-393.
- 71** Ole K., Morten W., Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Organic Process Research & Development*, **2002**, 6, 446-451.

- 72** Trodler P., Pleiss J., Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents, *MBC Structural Biology*, **2008**, 8, 9, 1-10
- 73** Hæffner F., Norin T., Hult K., Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions, *Biophysical Journal*, **1998**, 74, 1251-1262
- 74** Raza S., Fransson L., Hult K., Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study, *Protein Science*, **2001**, 10, 329-338.
- 75** Magnusson A. O., Rotticci-Mulder J. C., Santagostino A., Hult K., Creating Space for Large Secondary Alcohols by Rational Redesign of *Candida Antarctica* Lipase B, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1051-1056.
- 76** Magnusson A., Rational redesign of *Candida antarctica* lipase B, Printed at Universitetsservice US AB, **2005**.
- 77** Chen B., Hu J., Miller E. M., Xie W., Cai M., Gross R. A., *Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 463-471.
- 78** Heinsman N. W. J. T., Schorën C. G. P. H., van der Padt A., Franssen M. C. R., Boom R. M., van't Riet K., Substrate sorption into the polymer matrix of Novozym 435® and its effect on the enantiomeric ratio determination, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2699-2704.
- 79** Nakaoki T., Mei Y., Miller L. M., Kumar A., Kalra B., Miller M. E., Kirk O., Christensen M., Gross R. A., *Candida antarctica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: Effects of immobilization matrices on polymerization kinetics & molecular weight, *Industrial Biotechnology*, **2005**, 1, 2, 126-134.
- 80** Veld M. A. J., Palmans A. R. A., Meijer E. W., Selective Polymerization of Functional Monomers with Novozym 435, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **2007**, 45, 5968-5978.
- 81** Tundo P., Anastasa P., Black D., Breen J., Collins T., Momoli S., Miyamoto J., Polyakoff M., Tumas W., Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview*, *Pure and Applied Chemistry*, **2000**, 72, 1207-1228
- 82** Cooper A.I., Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide, *Journal of Materials Chemistry*, **2000**, 10, 207-234.
- 83** Giles M.R., Griffiths R.M.T., Aguiar-Ricardo A., Silva M., Howdle S.M., Fluorinated Graft Stabilizers for Polymerization in Supercritical Carbon Dioxide: The Effect of Stabilizer Architecture, *Macromolecules*, **2001**, 34, 20-25.

- 84** Hauthal W. H., Advances with supercritical fluids [review], *Chemosphere*, **2001**, 43, 123-135.
- 85** Mesiano A.J., Beckman E.J., Russell A.J., Supercritical Biocatalysis, *Chemical Reviews*, **1999**, 99, 623-633.
- 86** DeSimone J.M., Cooper I.A., Polymer synthesis and characterization in liquid / supercritical carbon dioxide, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, **1996**, 1, 761-768.
- 87** Knez Z., Skerget M., Modelling high pressure extraction processes, *Computers and Chemical Engineering*, **2001**, 25, 879-886.
- 88** Hartono R., Mansoori G. A., Suwono A., Prediction of solubility of biomolecules in supercritical solvents, *Chemical Engineering Science*, **2001**, 56, 6949-6958.
- 89** McClain J. B., Betts D. E., Canelas D. A., Samulski E. T., DeSimone J. M., Londono J.D., Cochran H.D., Wignall G.D., ChilluraMartino D., Triolo R., Design of Nonionic Surfactants for Supercritical Carbon Dioxide, *Science*, **1996**, 274 (5295), 2049-2052.
- 90** Brown A. R., George D. W., Tetrafluoroethane (HFC 134A) Propellant-Driven Aerosol of Proteins, *Pharmaceutical Research*, **1997**, 14 (11), 1542-1547.
- 91** Gimeno M., Ventosa N., Sala S., Veciana J., Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R-134a)-Expanded Liquids as Solvent Media for Ecoefficient Particle Design with the DELOS Crystallization Process, *Crystal Growth & Design*, **2006**, 6 (1): 23-25.
- 92** Corr S., *Journal of Fluorine Chemistry*, 1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent, **2002**, 118 (1-2), 55-67.
- 93** Abbott A. P., Eltringham W., Hope E.G., Nicola M., Solubility of unsaturated carboxylic acids in supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFC 134a) and a methodology for the separation of ternary mixtures, *Green Chemistry*, **2005**, 7(4), 210-216.
- 94** Wood C. D., Senoo K., Martin C., Cuellar J., Cooper A. I., Polymer Synthesis Using Hydrofluorocarbon Solvents. 1. Synthesis of Cross-Linked Polymers by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane, *Macromolecules*, **2002**, 35, 6743-6746.
- 95** Wood C. D., Cooper A. I., Synthesis of Polystyrene by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R134a) Using Inexpensive Hydrocarbon Macromonomer Stabilizers, *Macromolecules*, **2003**, 36 (20), 7534-7542.

- 96** Hyon S., Jamshidi K., Ikada Y., Synthesis of polylactides with different molecular weights, *Biomaterials*, **1997**, 18, 1503-1508.
- 97** Feast W. J., Gimeno M., Khosravi E., Approaches to highly polar polymers with low glass transition temperatures. 1. Fluorinated polymers via a combination of ring-opening metathesis polymerisation and hydrogenation, *Polymer*, **2003**, 44, 6111-6121.
- 98** Cowie J. M. G., *Polymers: Chemistry & Physics of modern materials*, 2nd Edition, Publisher: Blackie Academic & Professional, Ed. Chapman & Hall, Glasgow, **1991**.
- 99** Desimone J. M., Maury E.E., Menciloglu Y. Z., McClain J. B., Romack T. J., Combes J. R., Dispersion Polymerizations in Supercritical Carbon Dioxide, *Science*, **1994**, 265, 356-359.
- 100** Zaks A., Klibanov A. M., Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Science*, **1985**, 82, 3192-3196.
- 101** García-Garibay M., López-Munguía A., Bárzana E., Alcoholysis and Reverse Hydrolysis Reactions in Organic One-Phase System with a Hyperthermophilic β -Glycosidase, *Biotechnology & Bioengineering*, 69 (6), **2000**, 69(6), 627-632.
- 102** García-Garibay M., López-Munguía A., Bárzana E., Effect of β -Galactosidase Hydration on Alcoholysis Reaction in Organic One-Phase Liquid Systems, *Biotechnology and -Bioengineering*, **2000**, 70, 647-653.
- 103** Randolph T. W., Blanch H. W., Prausnitz J. M., Wilke C. R., Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid, *Biotechnology Letters*, **1985**, 7, 325-328.
- 104** Fersht A., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd edición, W.H.Freeman & Co. **1977**, (NY)
- 105** Saul S., Corr S., Micklefield J., Biotransformations in Low-Boiling Hydrofluorocarbon Solvents, *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, 43, 5519-5523.
- 106** Gross R. A., Kumar A., Kalra B., Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis, *Chemistry Review*, **2001**, 101, 2097-2124.
- 107** Akkara J.A., Ayyagari M. S. R, Bruno F. F., Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents, *Trends in Biotechnology*, **1999**, 17, 67-80.

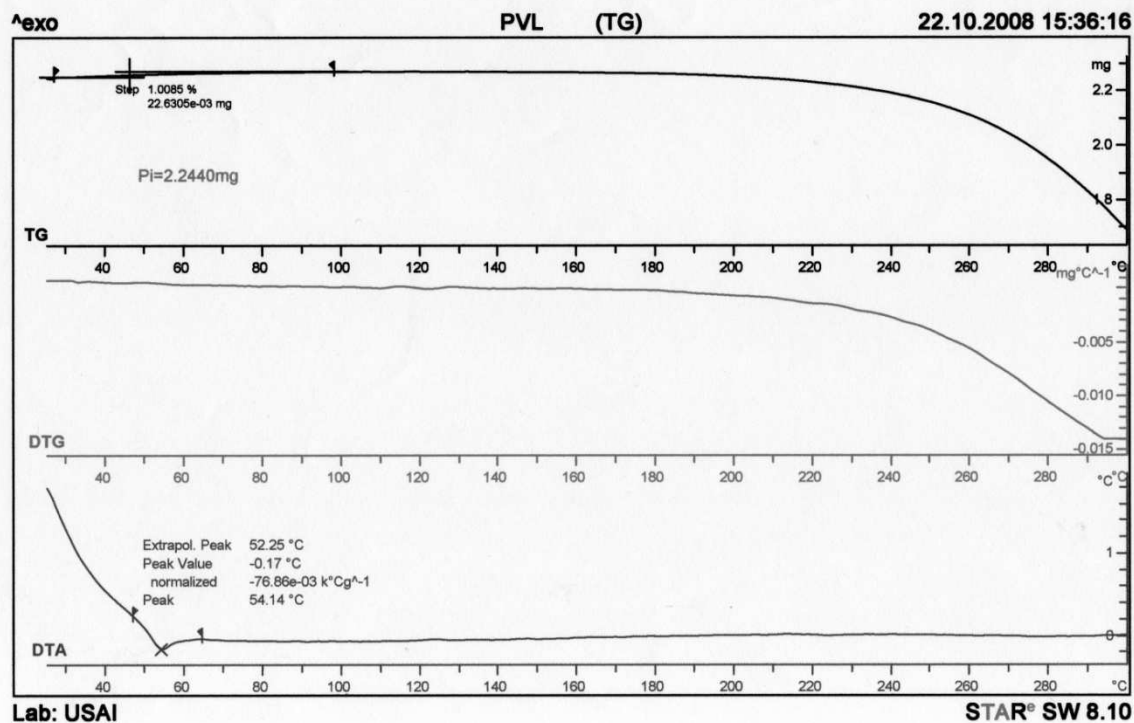
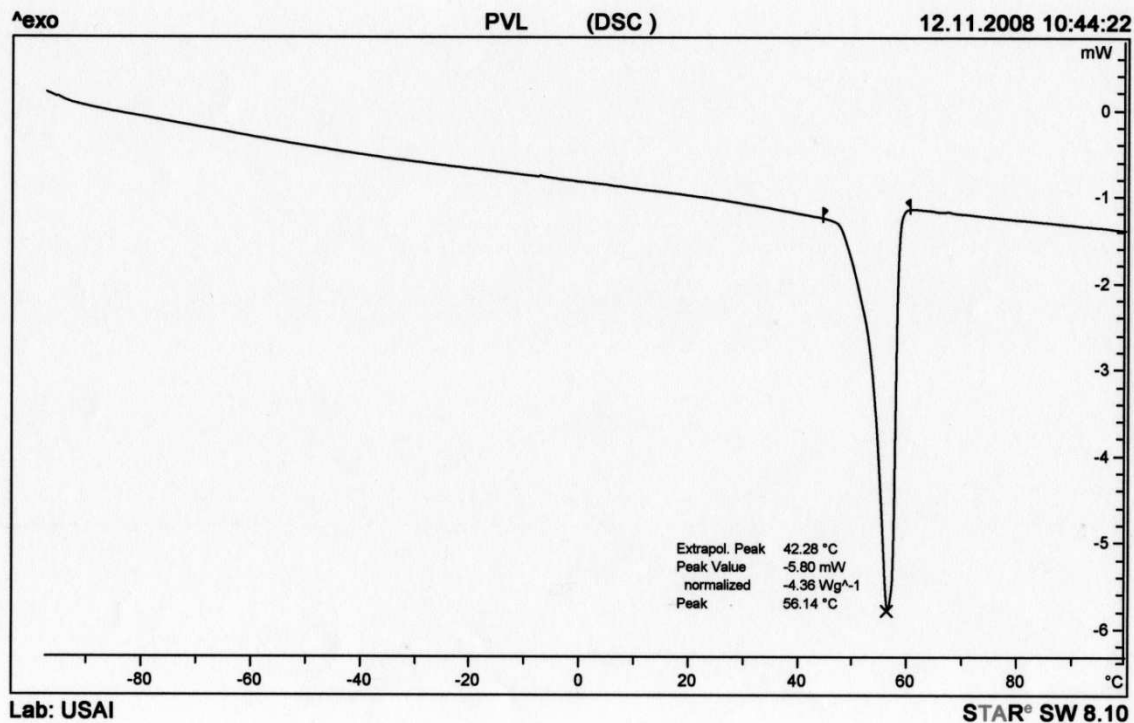
- 108**Leloir L. F., Two Decades of Research on the Biosynthesis of Saccharides, *Science*, **1971**, 172, 1299-1303.
- 109**Kitagawa M., Tokiwa Y., Synthesis of polymerizable sugar ester possessing long spacer catalyzed by lipase from *Alcaligenes* sp. and its chemical polymerization, *Biotechnology Letters*, **1998**, 20, 627-630.
- 110**Chaudhary A. K., Beckman E. J., Russell A. J., Rational Control of Polymer Molecular Weight and Dispersity during Enzyme-Catalyzed Polyester Synthesis in Supercritical Fluids, *Journal of American Chemical Society*, **1995**, 117, 3728-3733.
- 111**Takamoto T., Uyama H., Kobayashi S., Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in supercritical carbon dioxide, *e-Polymer*, **2001**, 004, 1-6.
- 112**Kondo R., Toshima K., Matsumura S., Lipase-Catalyzed Selective Transformation of Polycaprolactone into Cyclic Dicaprolactone and Its Repolymerization in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecular Bioscience*, **2002**, 2(6), 267-271.
- 113**Loecker F. C., Duxbury C. J., Kumar R., Gao W., Gross R. A., Howdle S. M., Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecules*, **2004**, 37, 2450-2453.
- 114**Duxbury C. J., Wang W. X., de Geus M., Heise A., Howdle S. M., Can Block Copolymers Be Synthesized by a Single-Step Chemoenzymatic Route in Supercritical Carbon Dioxide?, *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127, 2384-2385.
- 115**Hebb A. K., Senoo K., Cooper A. I., Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the porogen, *Composites Science and Technology*, **2003**, 63, 2379-2387.
- 116**Yu G., Xue Y., Xu W., Zhang J., Xue C. H., Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 34, 793-798.
- 117**García R., Gimeno M., Bázquez E., Use of Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Solvent Media for Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones, *Macromolecules*, **2007**, 40, 4119-4120.
- 118**García R., Gimeno M., Bázquez E., Effect of the initial water activity on the yields and molecular weights of the lipase-catalysed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid R-134a, *e-Polymers*, **2008**, 019, 1-6

- 119 An, Y. H.; Woolf, S. K.; Friedman, R.J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2635-2652.
- 120 Kobayashi, S.; Takeya, K.; Suda, S.; Uyama, H. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of medium-size lactones to polyesters, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 1729-1736.
- 121 Fujioka, F.; Hosoda, N.; Nishiyama, S.; Noguchi, H.; Shoji, A.; Kumar, D.S.; Katsuraya, K.; Ishii, S.; Yoshida, Y., One-pot Enzymatic Synthesis of Poly(L,L-lactide) by Immobilized Lipase Catalyst, *Sen-i Gakkaishi* **2006**, *62*, 63–65.
- 122 Saiyasombat W., Molloy R., Nicholson T. M., Johnson A. F., Ward I. M., Poshyachinda S., Ring strain and polymerizability of cyclic esters, *Polymer*, **1998**, *39*, 23, 5581-5585.
- 123 Sosnowski S., Slomkowski S., Lorenc A., Kricheldorf H. R., Mechanism of dispersion polymerization of L-lactide initiated with 2,2-dibutyl-2-stanna-1,3-dioxepane, *Colloid Polym. Sci.*, 2002, *280*, 107-115.
- 124 Osaka I., Watanabe M., Takama M., Murakami M., Arakawa R., Characterization of linear and cyclic polylactic acids and their solvolysis products by electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2006, *41*, 1369-1377.
- 125 Yoshizawa-Fujita, M.; Saito, Ch.; Takeoka, Y.; Rikukawa, M. Lipase-catalyzed polymerization of L-lactide in ionic liquids, *Polymers for Advanced Technologies*. **2008**, *19*, 1396-1400.
- 126 Chanfreau, S.; Mena, M.; Porras-Domínguez, J.R.; Ramírez-Gilly, M.; Gimeno, M.; Roquero, P.; Tecante, A.; Bázquez, E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, *33*, 629-638.
- 127 Wahlberg J., Persson P. V., Olsson T., Hedenstrom E., Iversen T., Structural Characterization of a Lipase-Catalyzed Copolymerization of ϵ -Caprolactone and D,L-Lactide, *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1068.
- 128 Kasperczyk J., Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-(glycolide)] by ^1H and ^{13}C n.m.r. spectroscopy, *Polymer*, **1996**, *37*, 2, 201-203.
- 129 Jalabert, M.; Fraschini, C.; Prud'homme, R.E., Synthesis and Characterization of Poly(L-lactide)s and Poly(D-lactide)s of Controlled Molecular Weight, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **2007**, *45*, 1944-1955.
- 130 García-Arrazola, R.; López-Guerrero, D.; Gimeno, M.; Bázquez, E., Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, **2009**, *51*, 197-201.

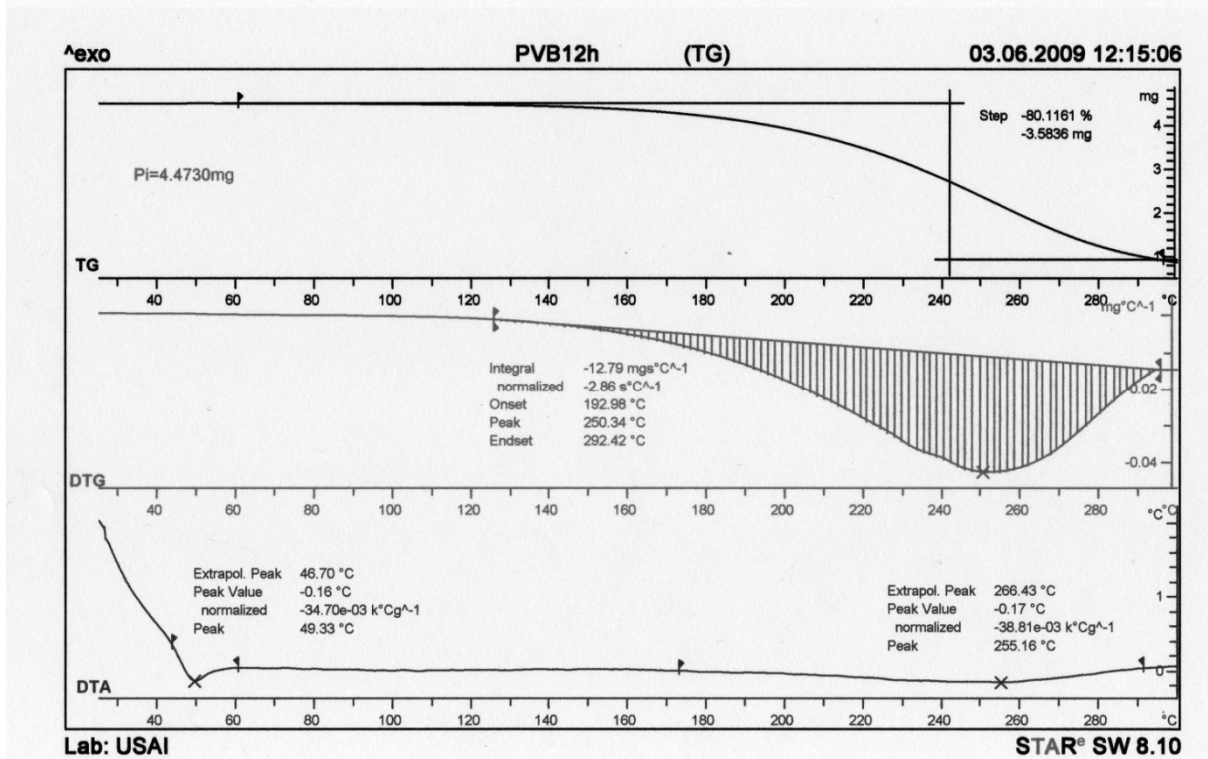
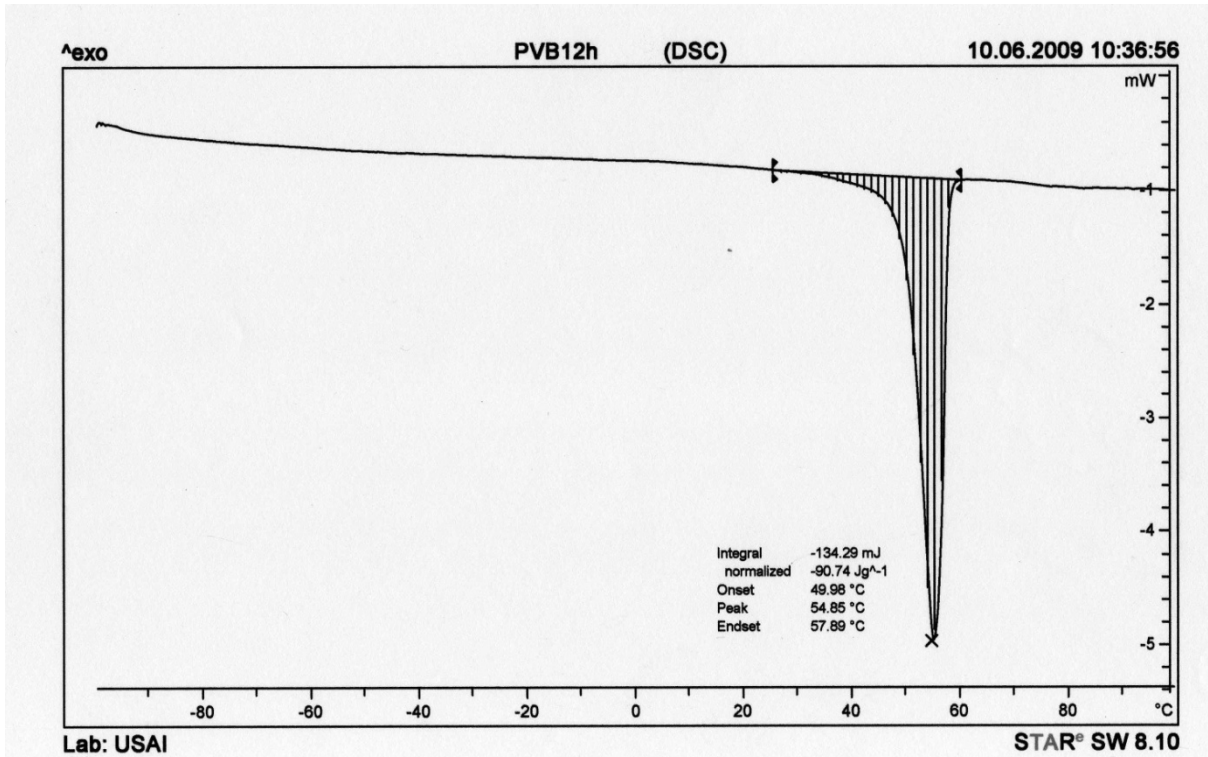
- 131** Hans M., Keul H., Moeller M., Ring-Opening Polymerization of DD-Lactide Catalyzed by Novozyme 435, *Macromolecular Bioscience*, **2009**, 9, 239-247.
- 132** Albertsson A., Srivastava R., Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, 60, 1077-1093.
- 133** Liu M., Vladimirov N., Fréchet J. M. J., A New Approach to Hyperbranched Polymers by Ring-Opening Polymerization of an AB Monomer: 4-(2-Hydroxyethyl)- ϵ -caprolactone, *Macromolecules*, **1999**, 32, 6881-6884.
- 134** Inoue K., Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers, *Progress in Polymer Science*, **2000**, 25, 453-571.
- 135** Tasaka F., Miyazaki H., Ohya Y., Ouchi T., Synthesis of Comb-Type Biodegradable Polylactide through Depsipeptide-Lactide Copolymer Containing Serine Residues, *Macromolecules*, **1999**, 32, 6386-6389.
- 136** Krishna S. H., Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnology Advances*, **2002**, 20, 239-267.
- 137** Bratton D., Brown M., Howdle S. M., Synthesis of poly(glycolide) in supercritical carbon dioxide in the presence of a hydrocarbon stabilizer, *Chemical Communications*, **2004**, 808-809.
- 138** <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>
- 139** http://www.infra.com.mx/servicio_atencion/libreria/gases/documentos/msds/bioxido_carbono.pdf
- 140** http://www2.dupont.com/Refrigerants/es_MX/assets/downloads/suva134a_msds.pdf
- 141** Yang C., Shapiro B. E., Mjolsness E. D., Hafield G. W., An enzyme mechanism language for the mathematical modeling of metabolic pathways, *Bioinformatics*, **2005**, 21, 6, 774-780.
- 142** Farrington P. J., Hawker C. J., Fréchet J. M. J., Mackay M. E., The Melt Viscosity of Dendritic poly(benzyl ether) macromolecules, *Macromolecules*, **1998**, 31, 5043-5050.
- 143** Wooley K. L., Hawker C. J., Pochan J.M., Fréchet J. M. J., Physical properties of dendritic macromolecules: a study of glass transition temperature, *Macromolecules*, **1993**, 26, 1514-1519.

- 144** Stutz H., Illers K. H., Mertes J., A Generalized Theory for the Glass Transition Temperature of Crosslinked and Uncrosslinked Polymers, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **1990**, 28, 1483-1498..
- 145** Hawker C.J., Chu F., Hyperbranched Poly(ether ketones): Manipulation of Structure and Physical Properties, *Macromolecules*, **1996**, 29, 4370-4380.
- 146** Kim Y. H., Webster O. W., Hyperbranched polyphenylenes, *Macromolecules*, **1992**, 25, 5561-5572.

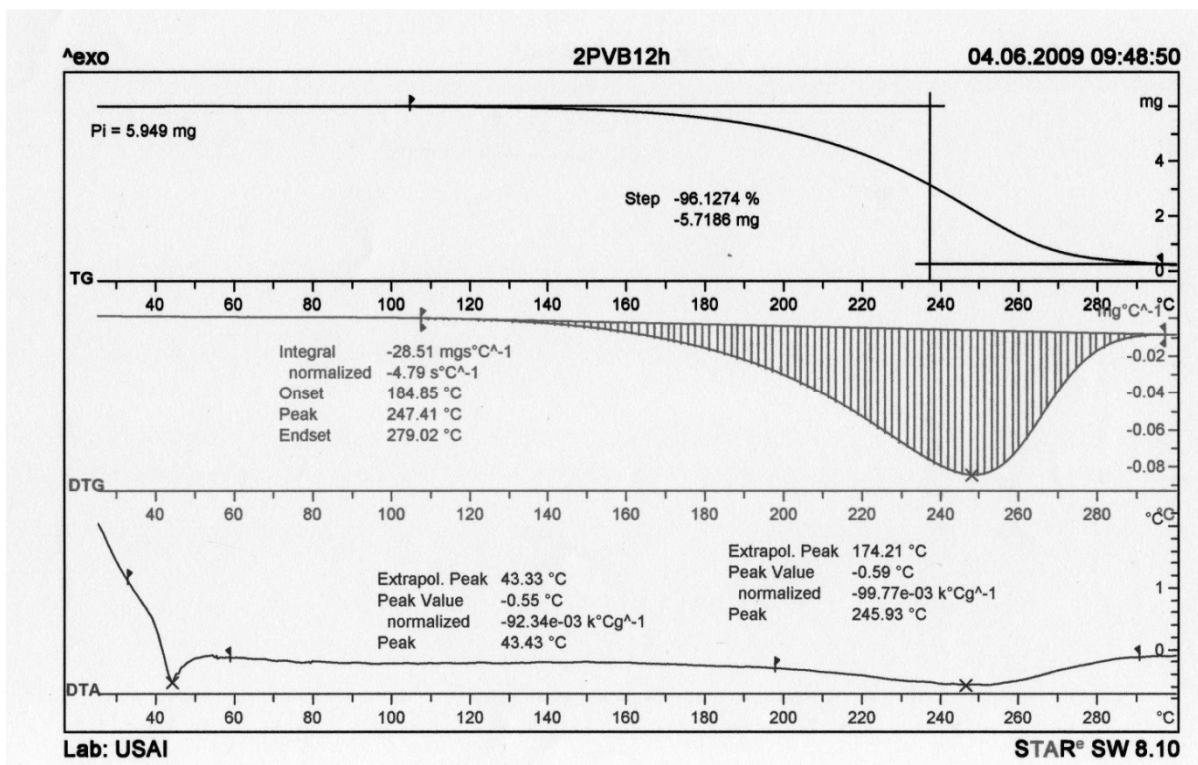
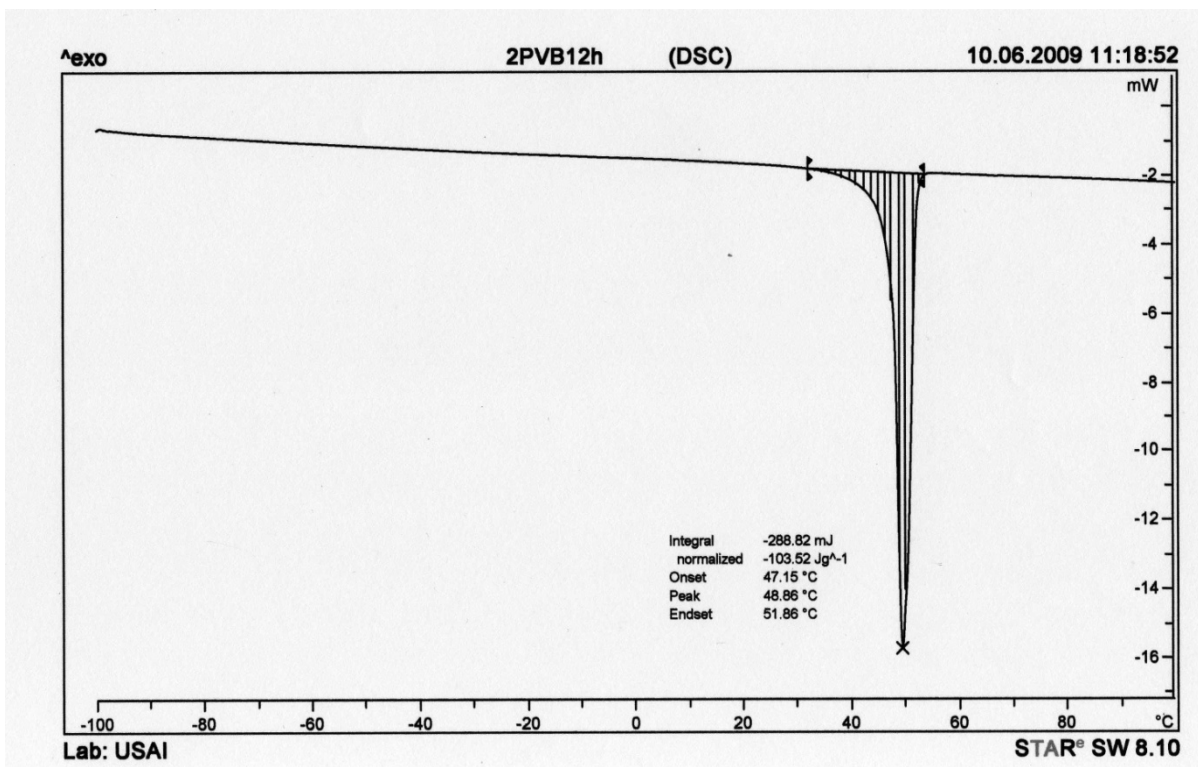
APENDICE: TERMOGRAMAS



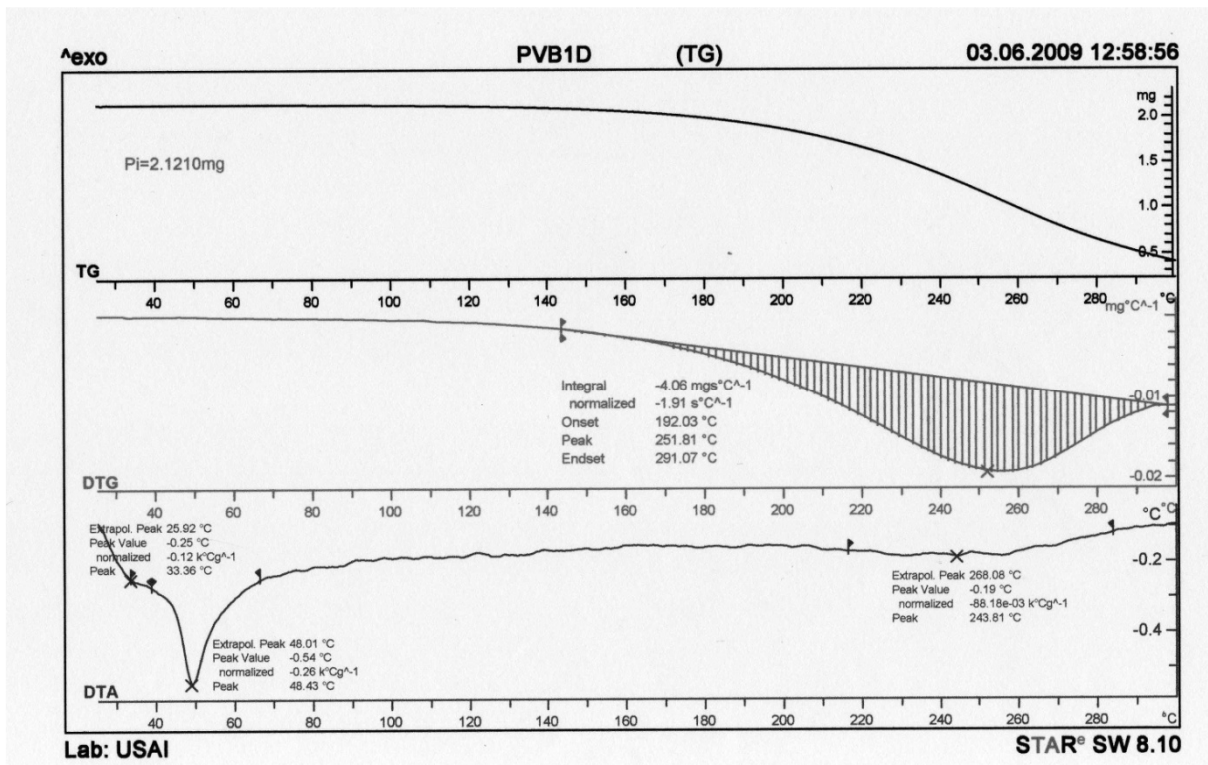
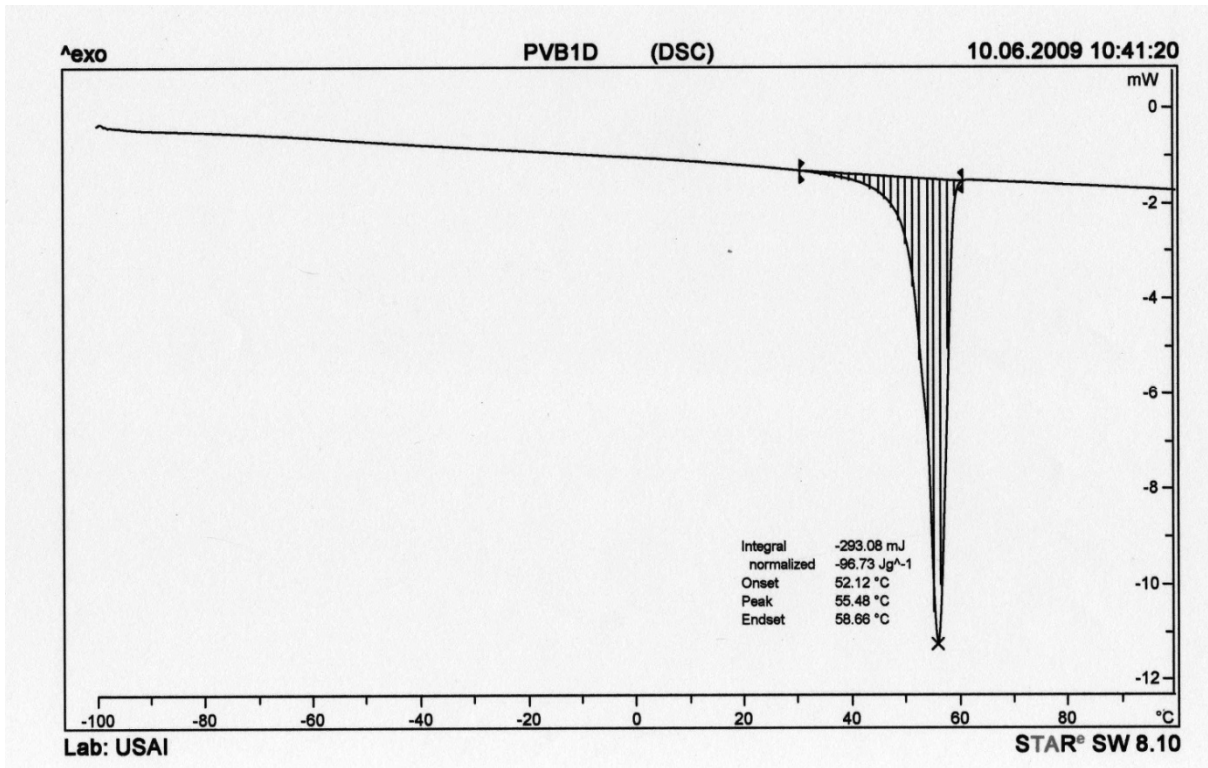
Termográmás DSC y TGA del polímero lineal δ-Valerolactona experimento 6, Tabla 4.2.



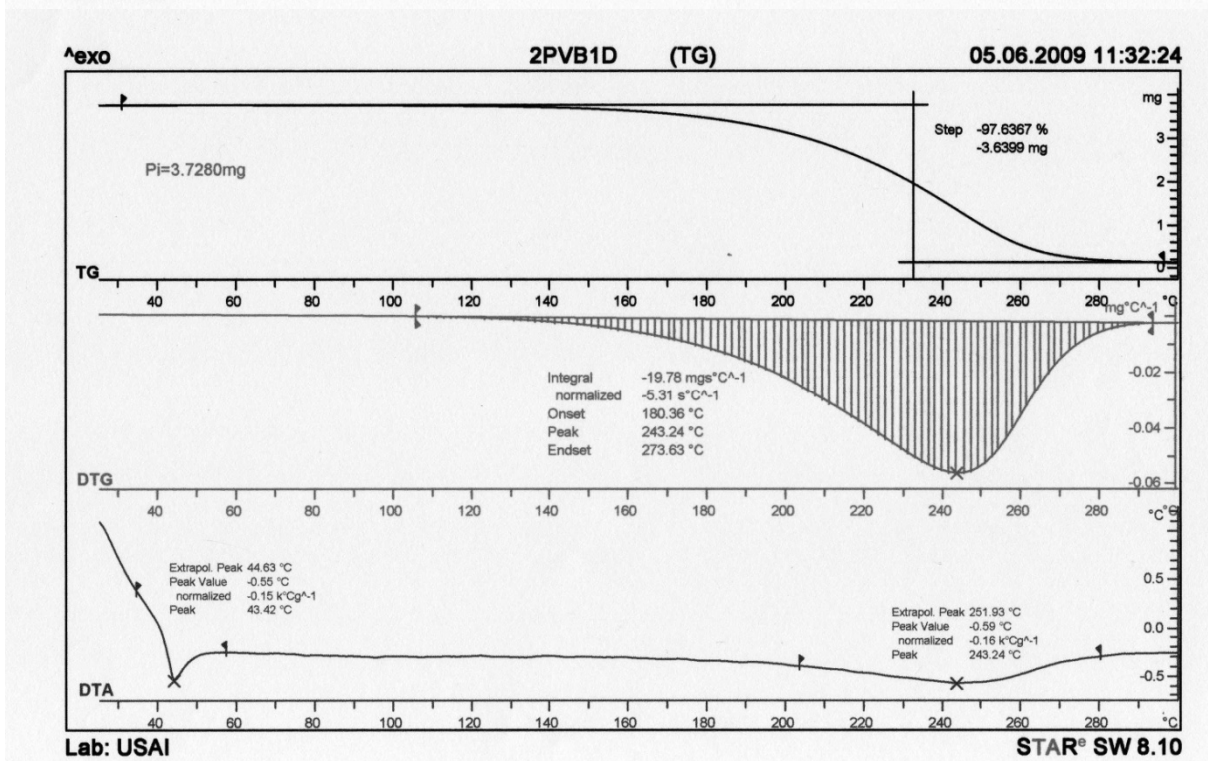
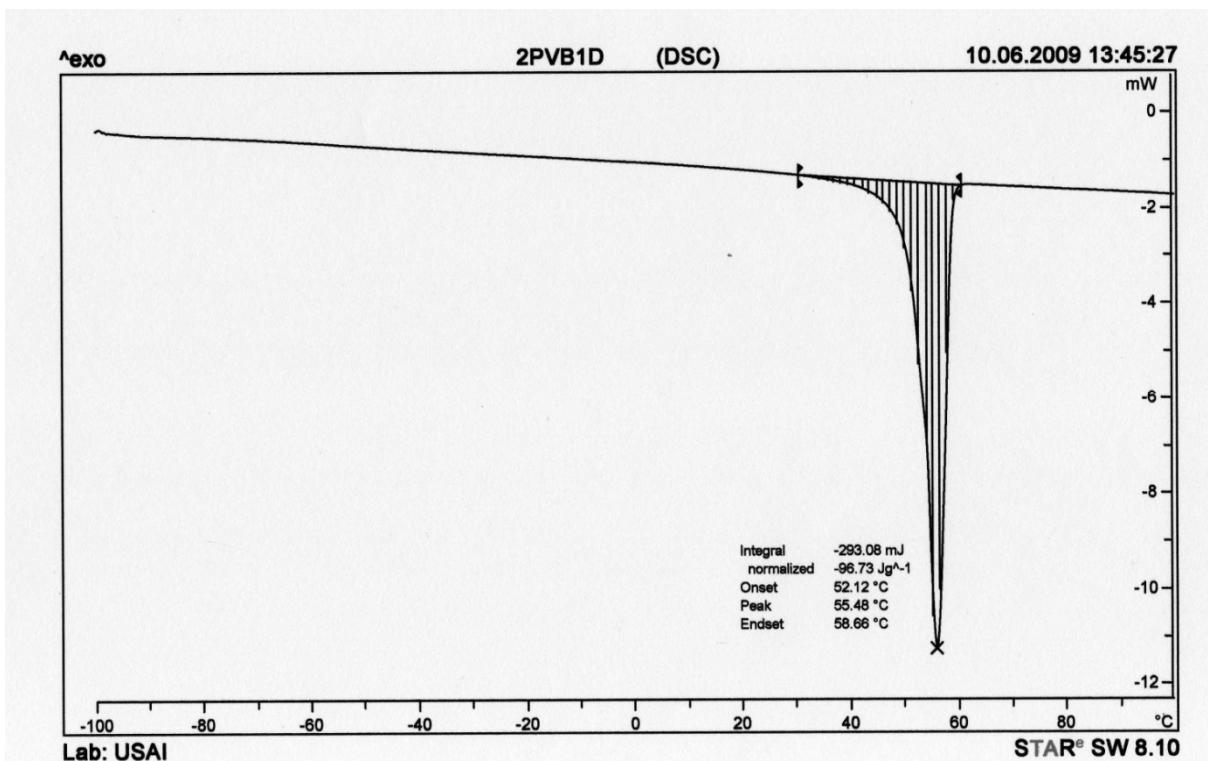
Termogramas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 1, 1a fracción de la Tabla 4.2.



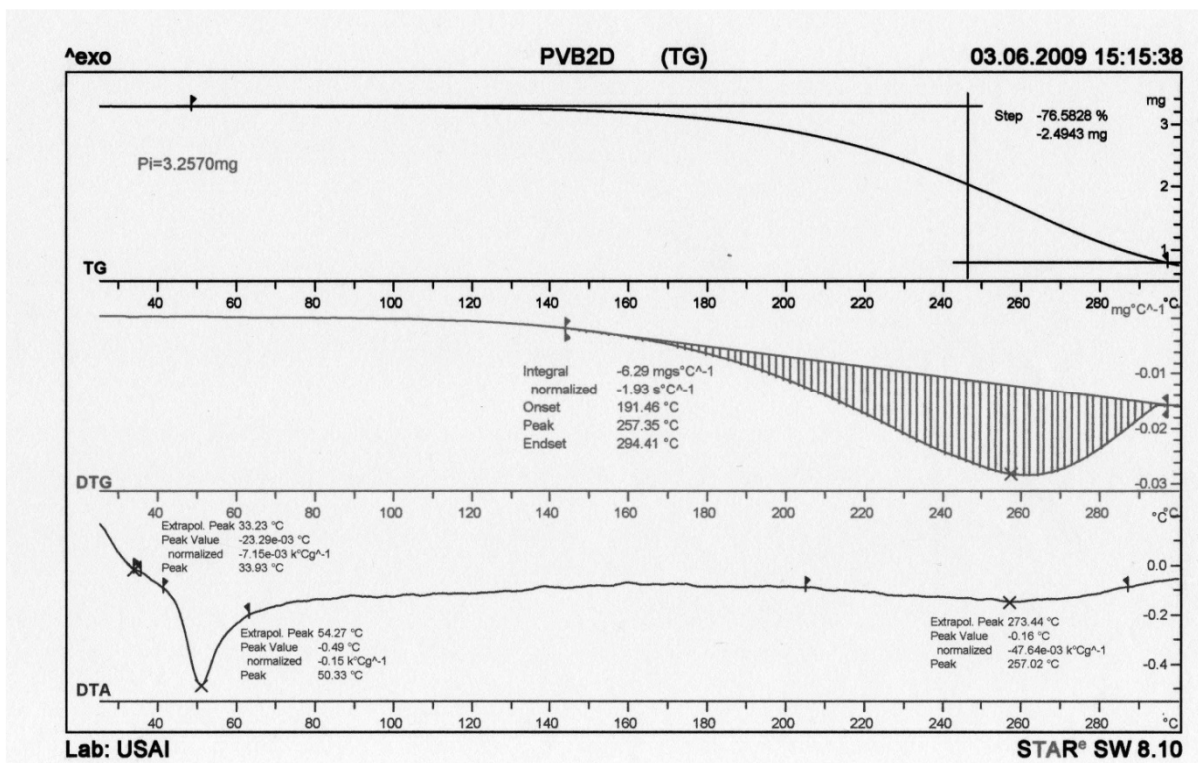
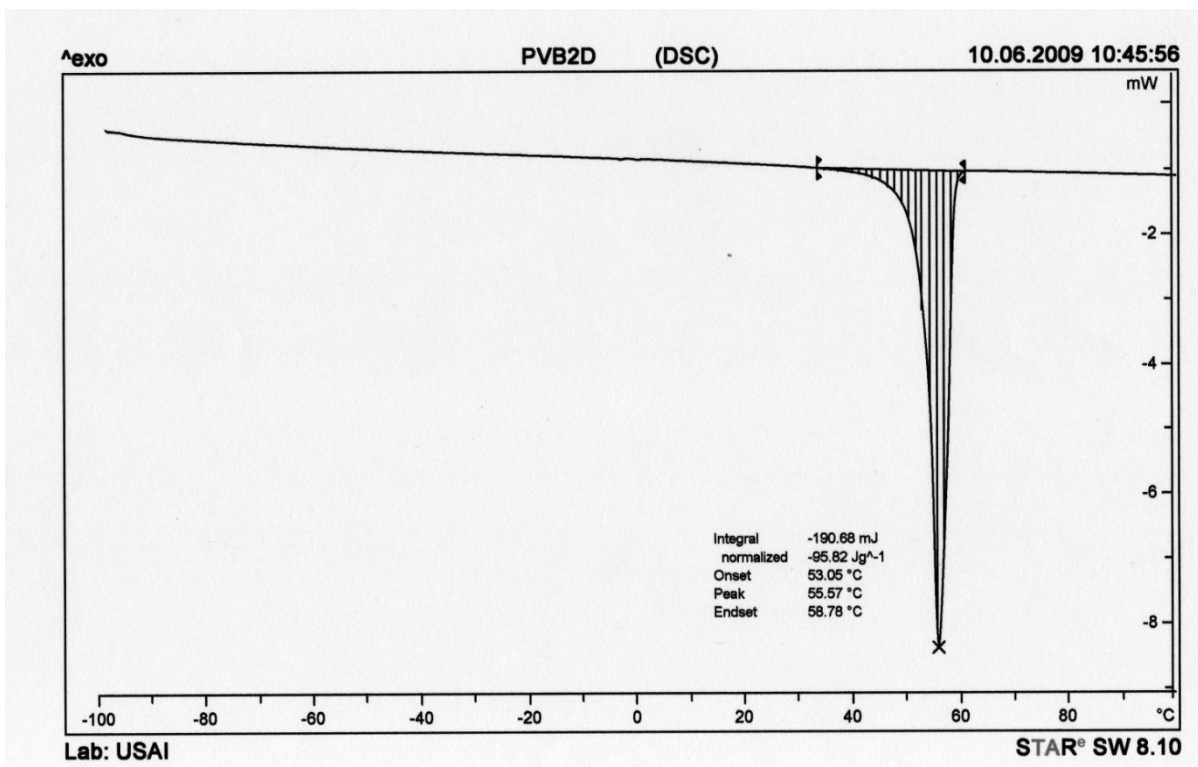
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 1, 2a fracción de la Tabla 4.2.



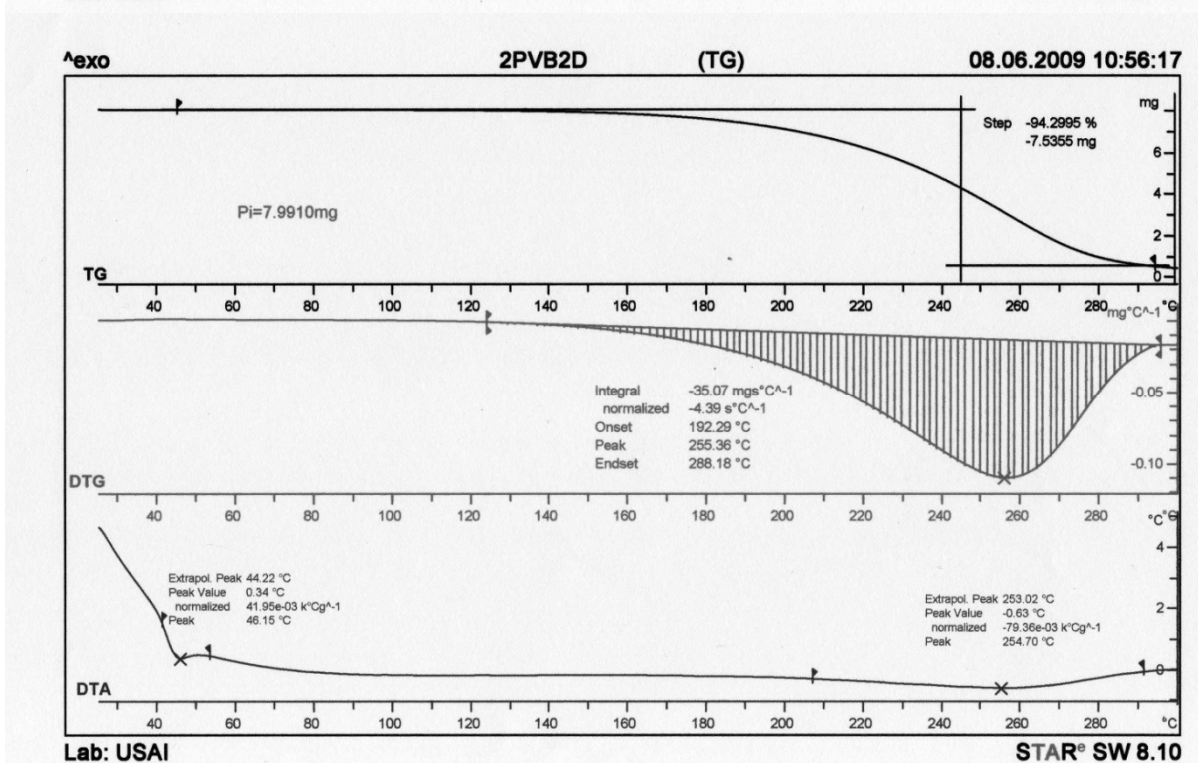
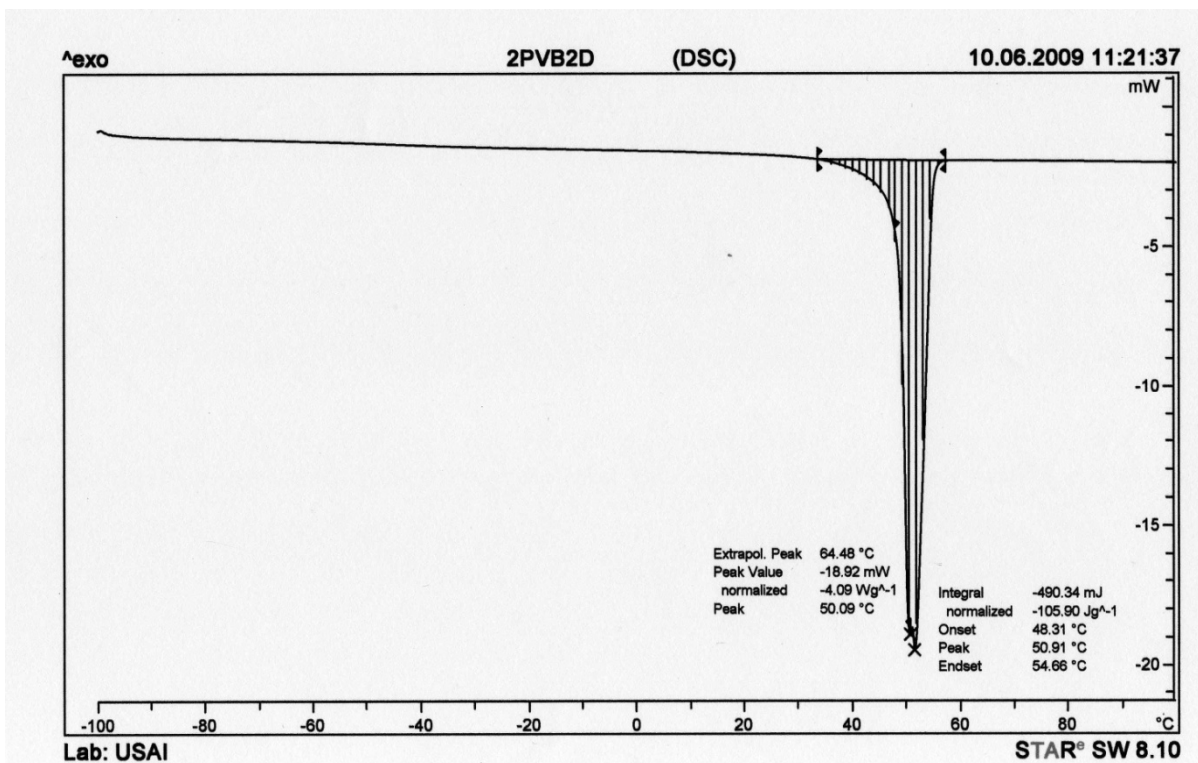
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 2, 1a fracción de la Tabla 4.2.



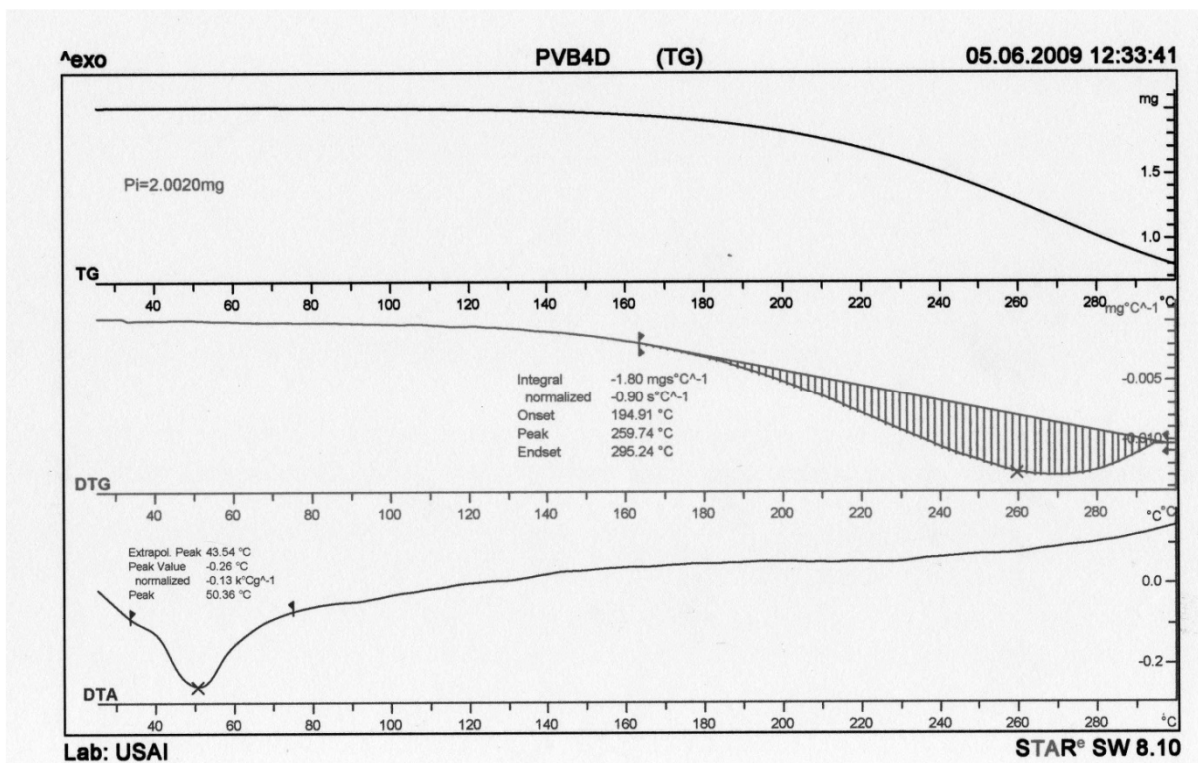
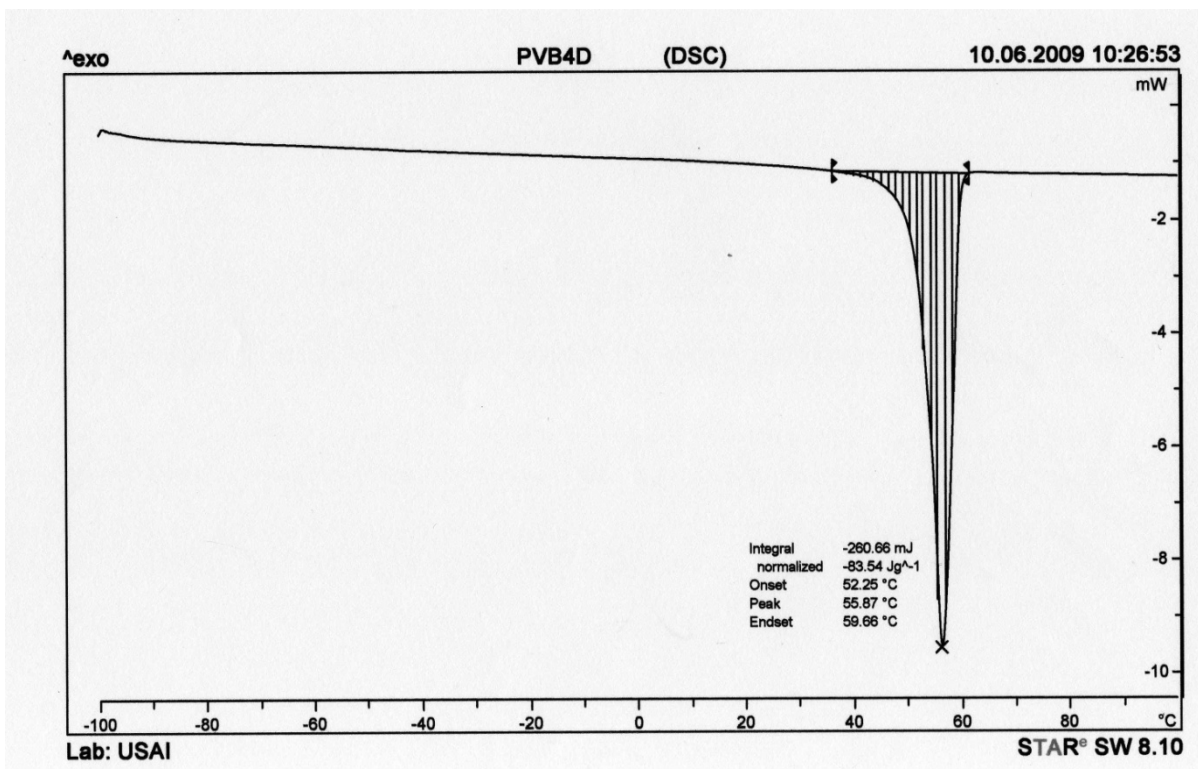
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 2, 2a fracción de la Tabla 4.2.



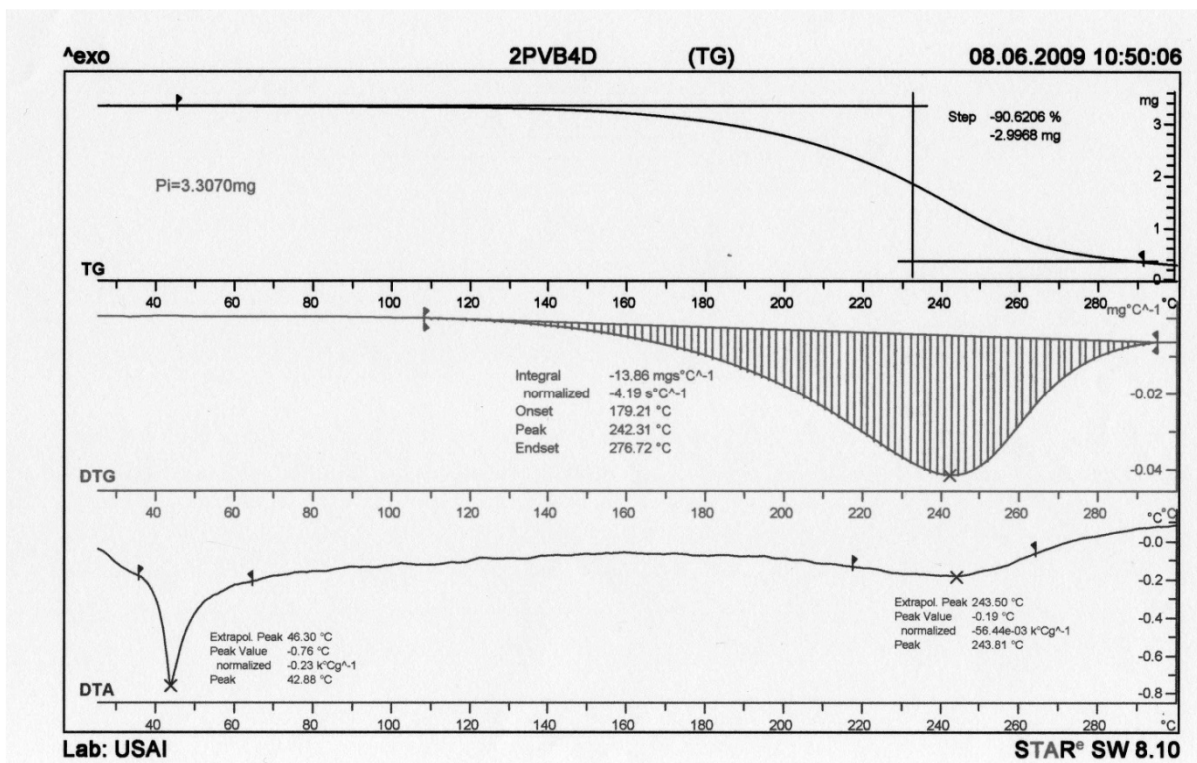
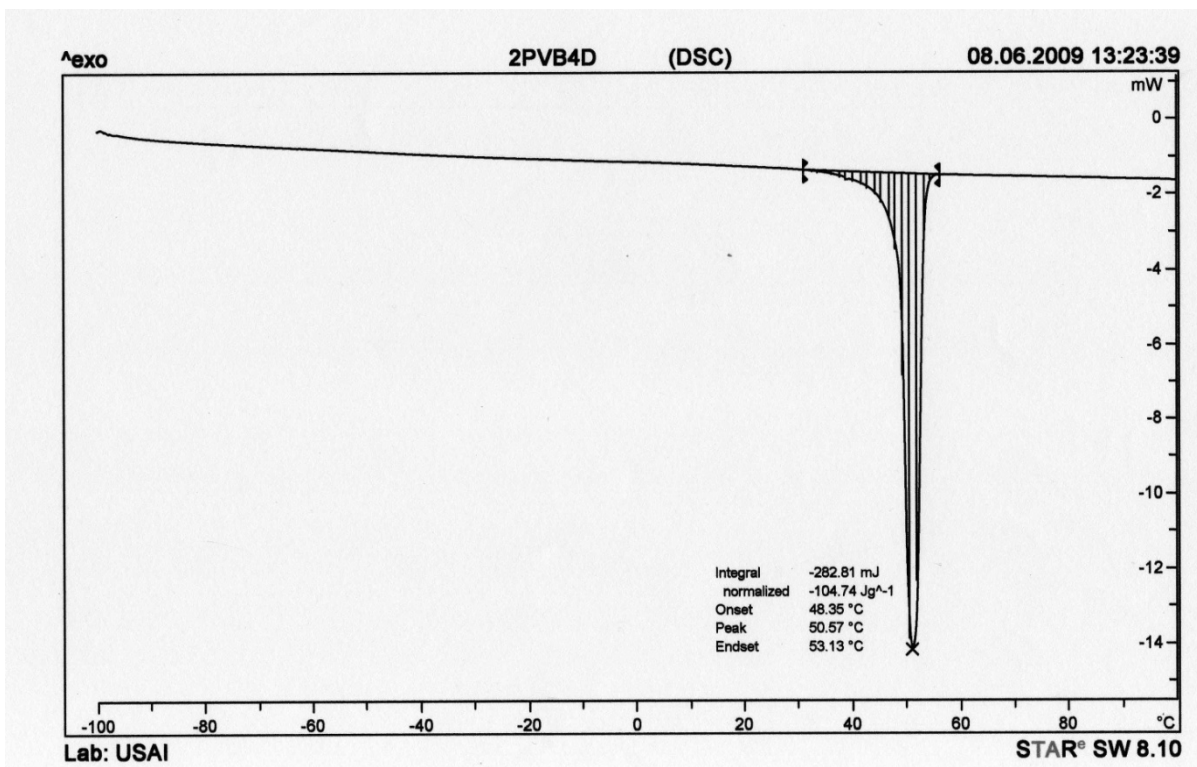
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 3, 1a fracción de la Tabla 4.2.



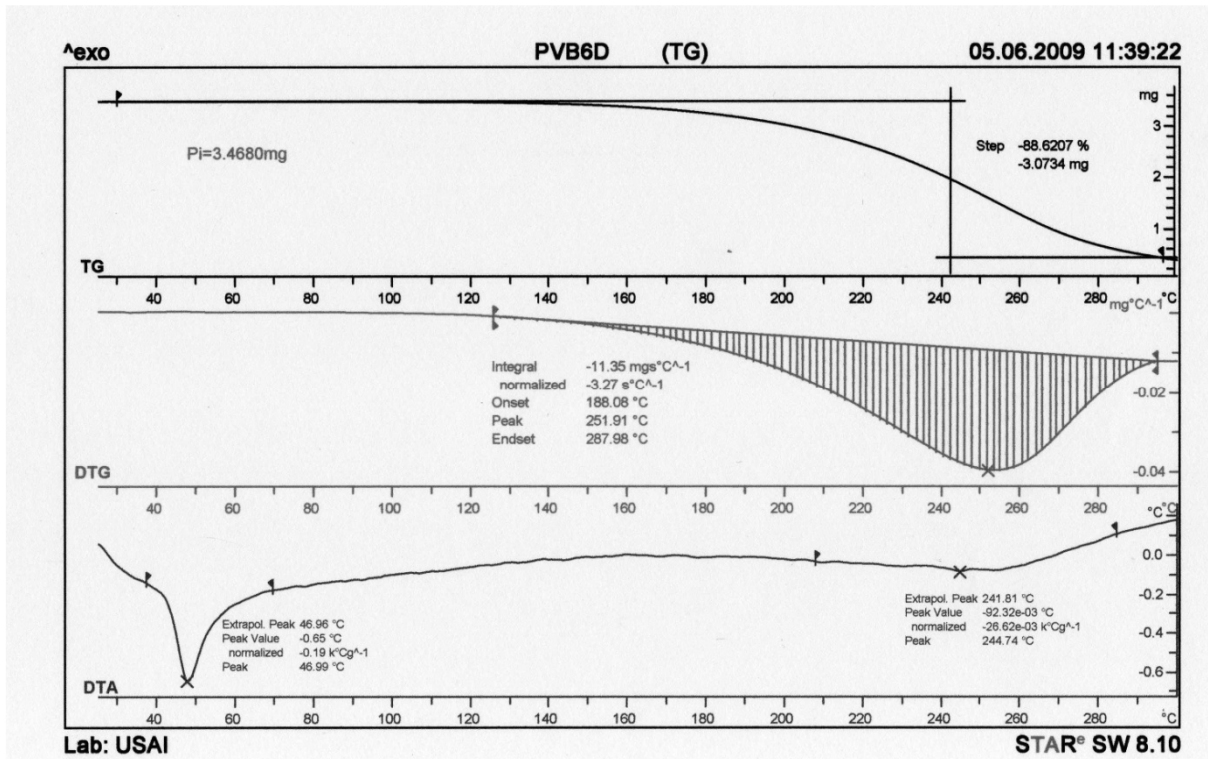
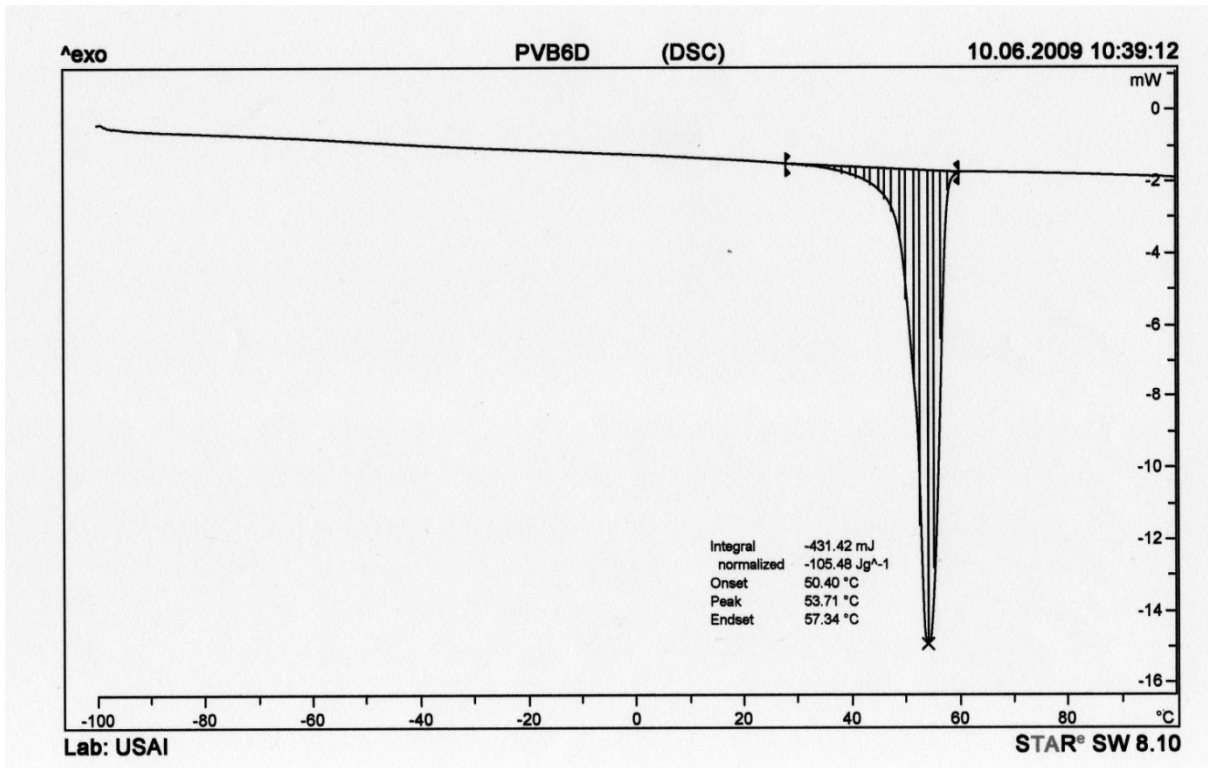
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 3, 2a fracción de la Tabla 4.2.



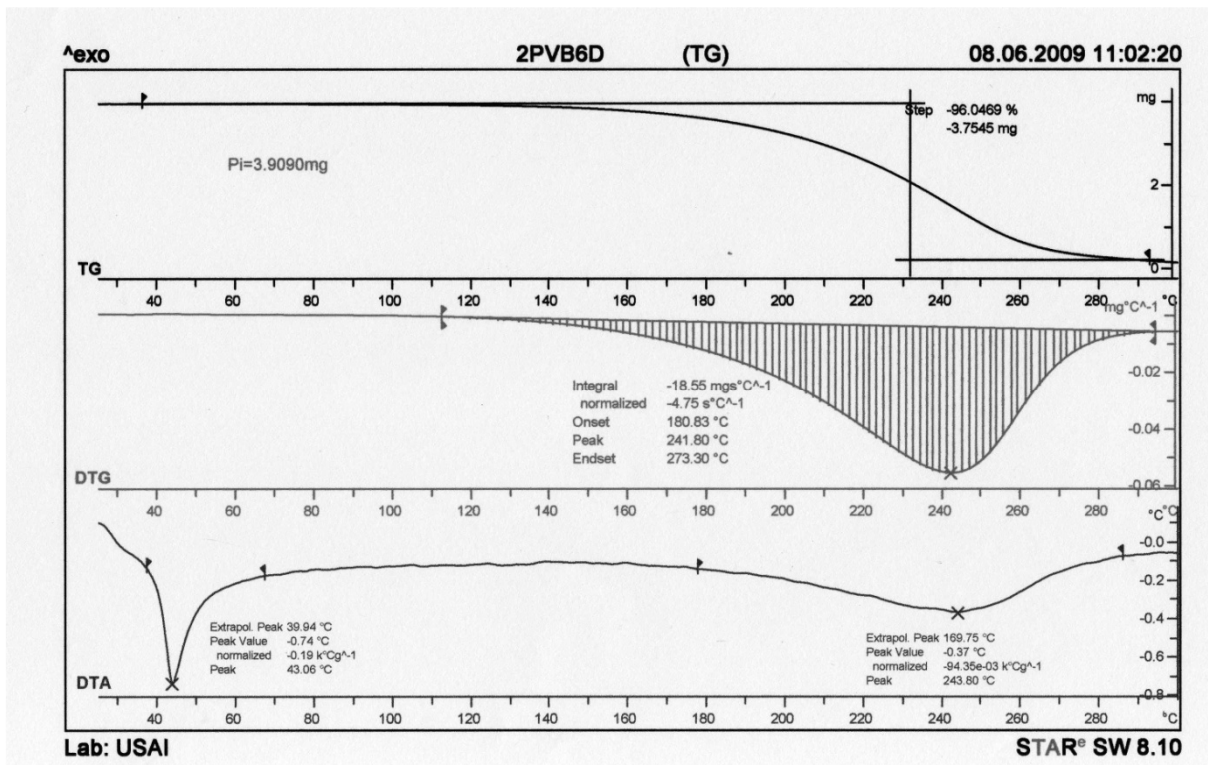
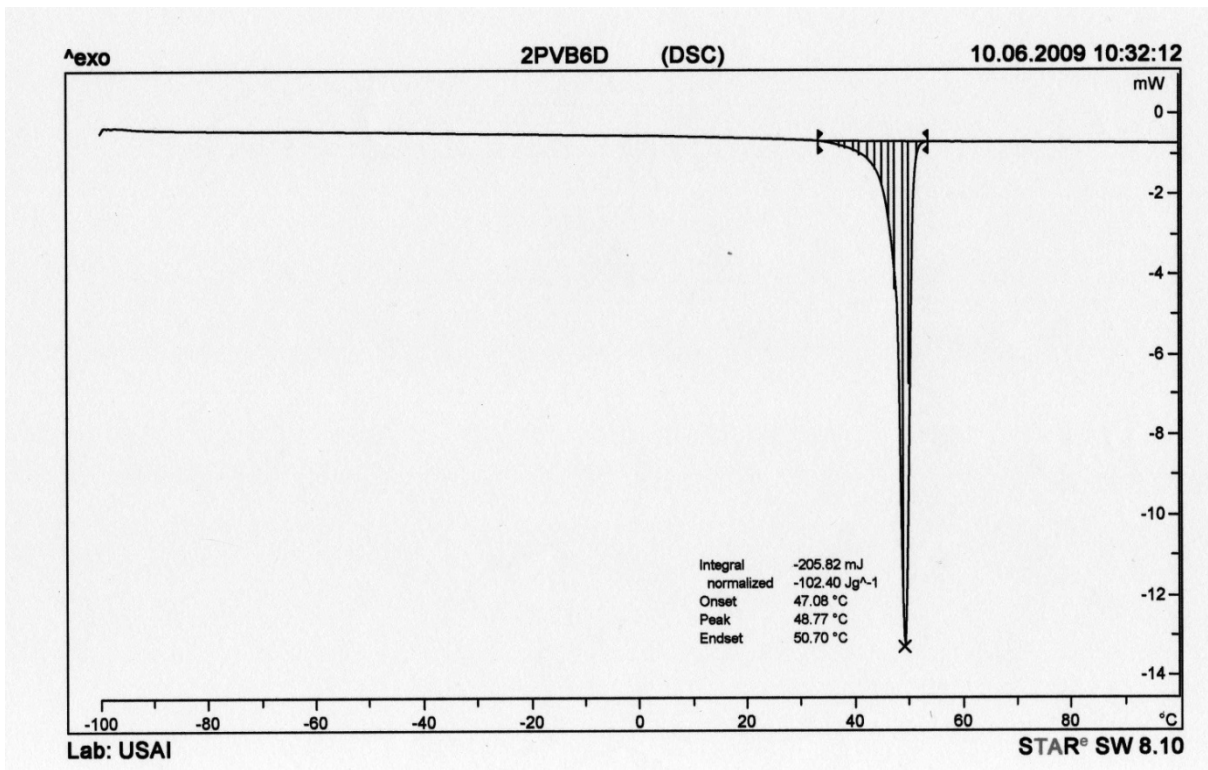
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 4, 1a fracción de la Tabla 4.2.



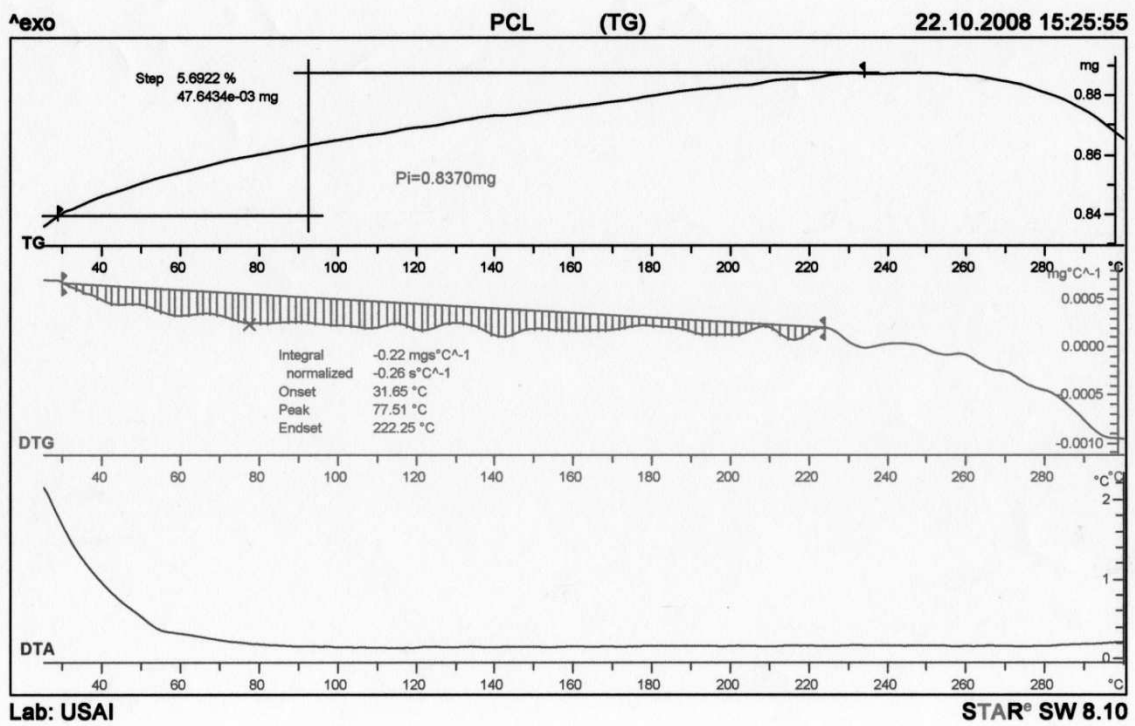
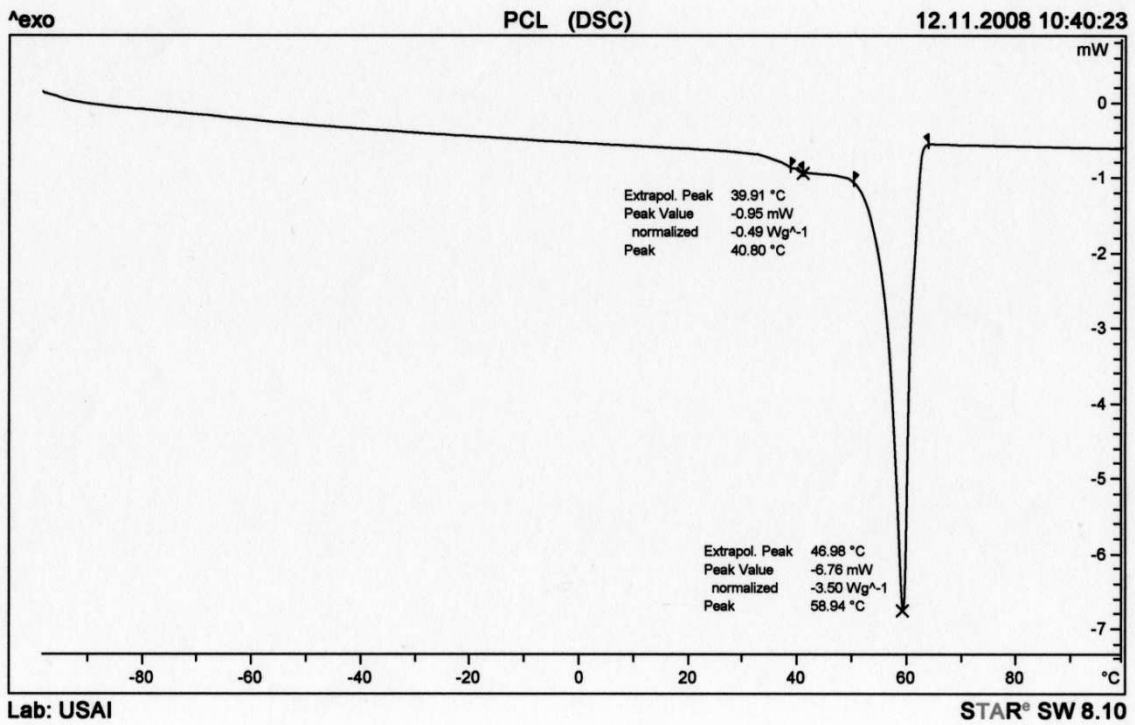
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 4, 2a fracción de la Tabla 4.2.



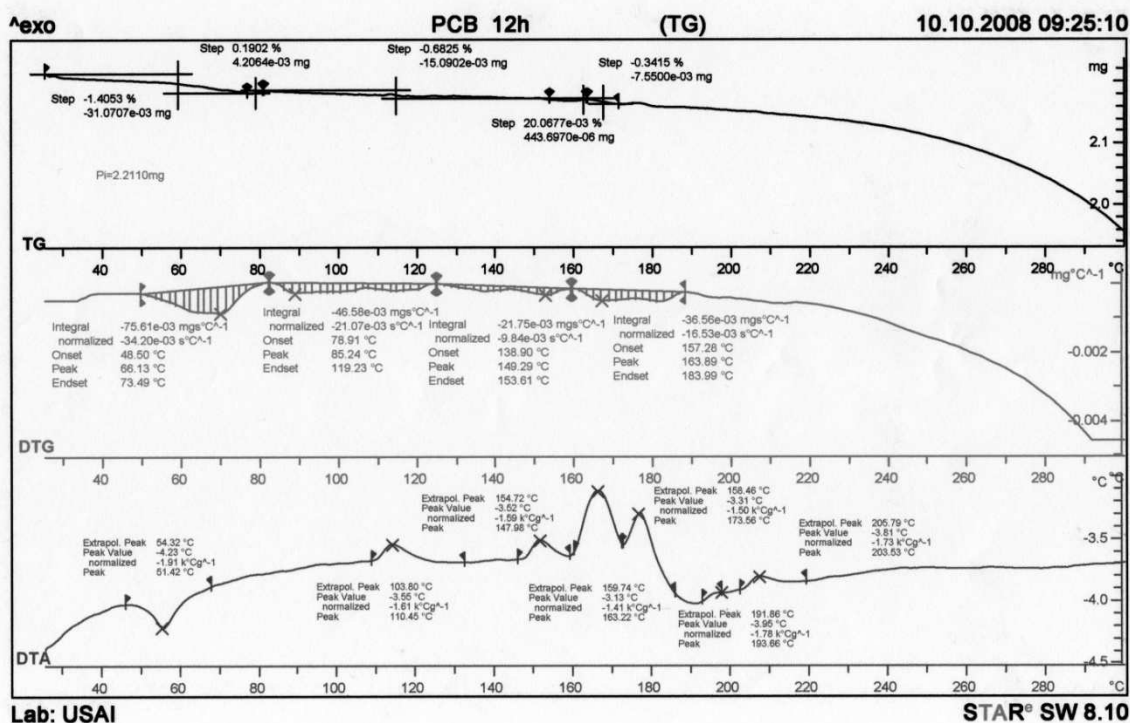
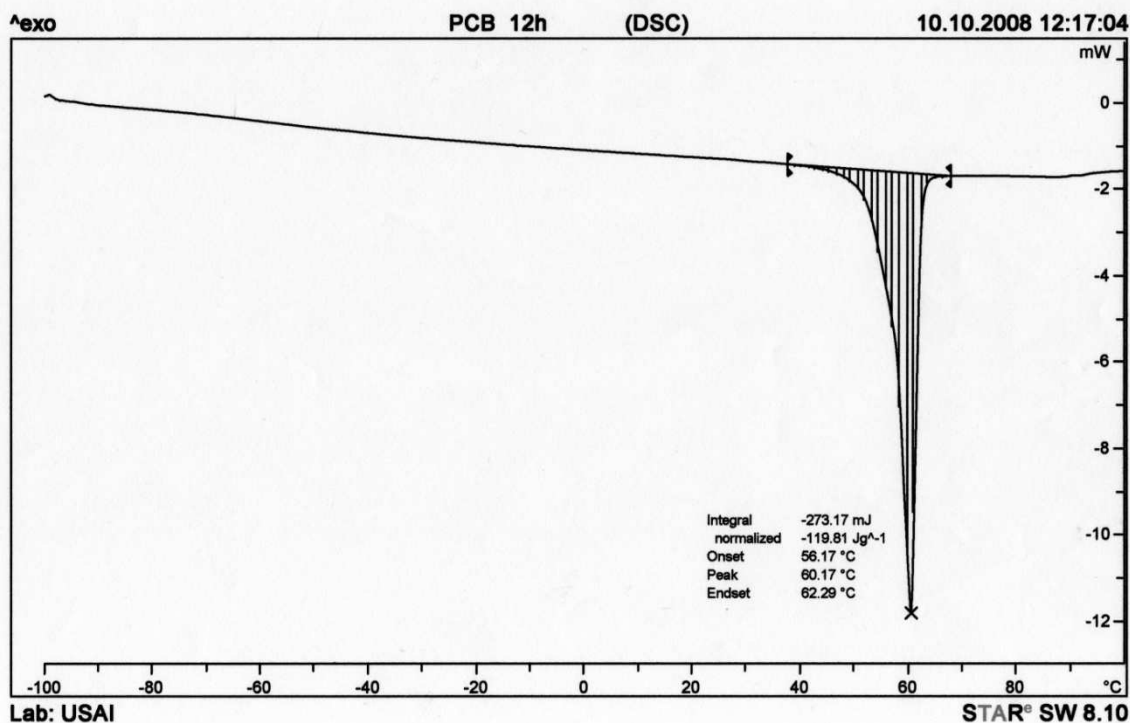
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 5, 1a fracción de la Tabla 4.2.



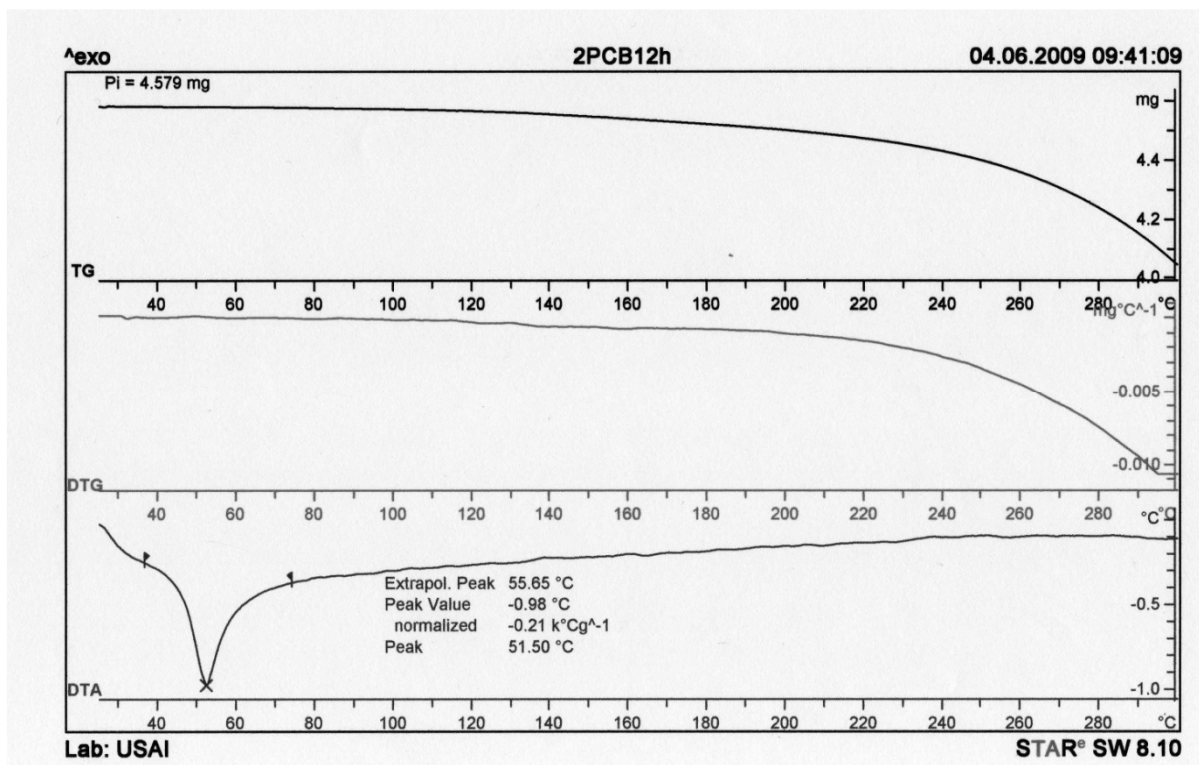
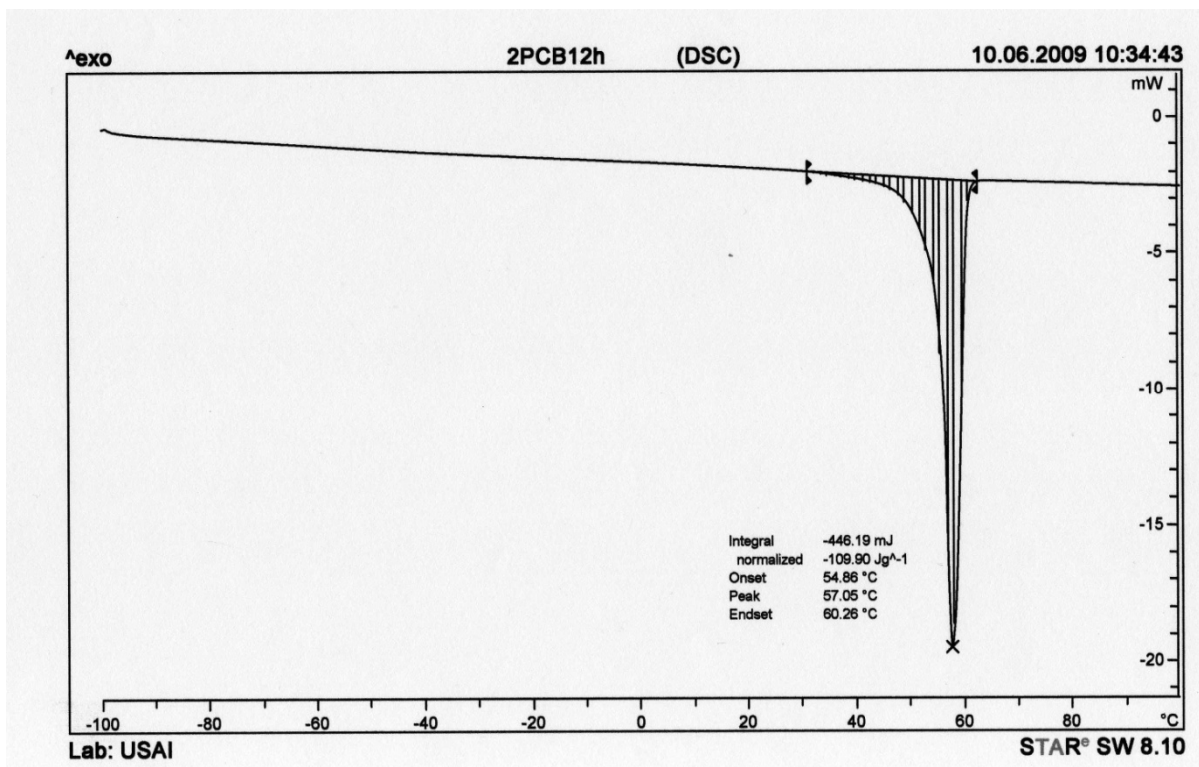
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de VL con BHB (core AB₂), experimento 5, 2a fracción de la Tabla 4.2.



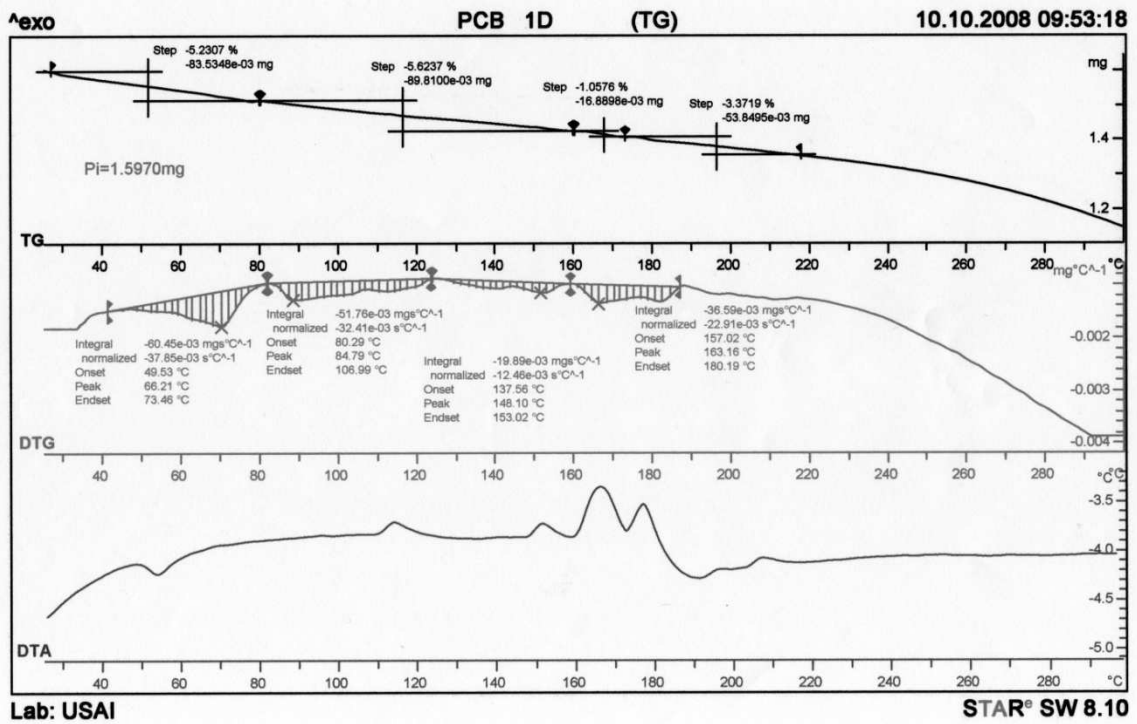
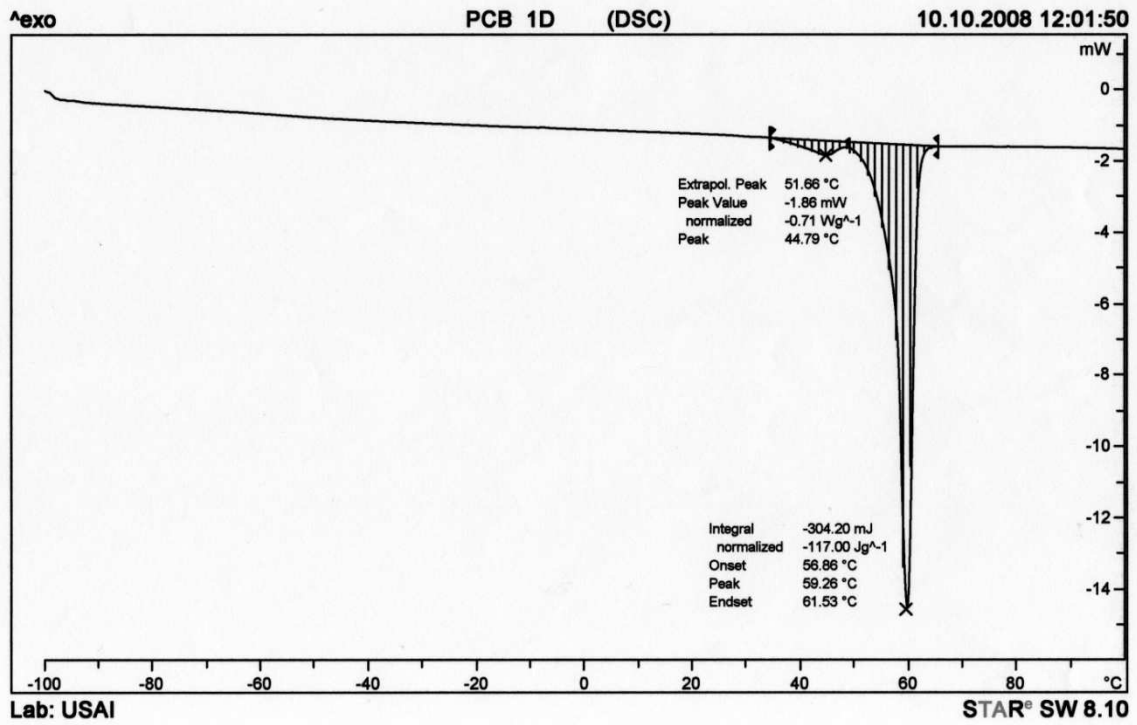
Termográmicas DSC y TGA del polímero lineal ε-Caprolactona experimento 6, Tabla 4.3.



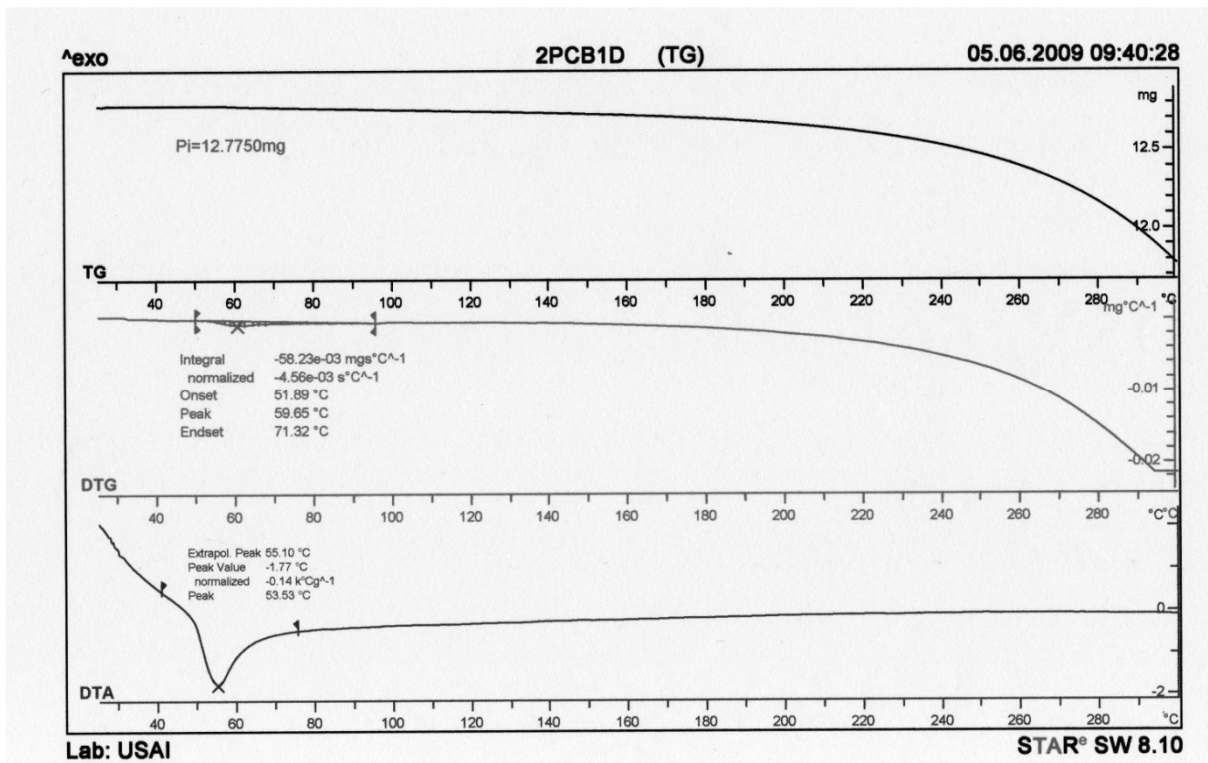
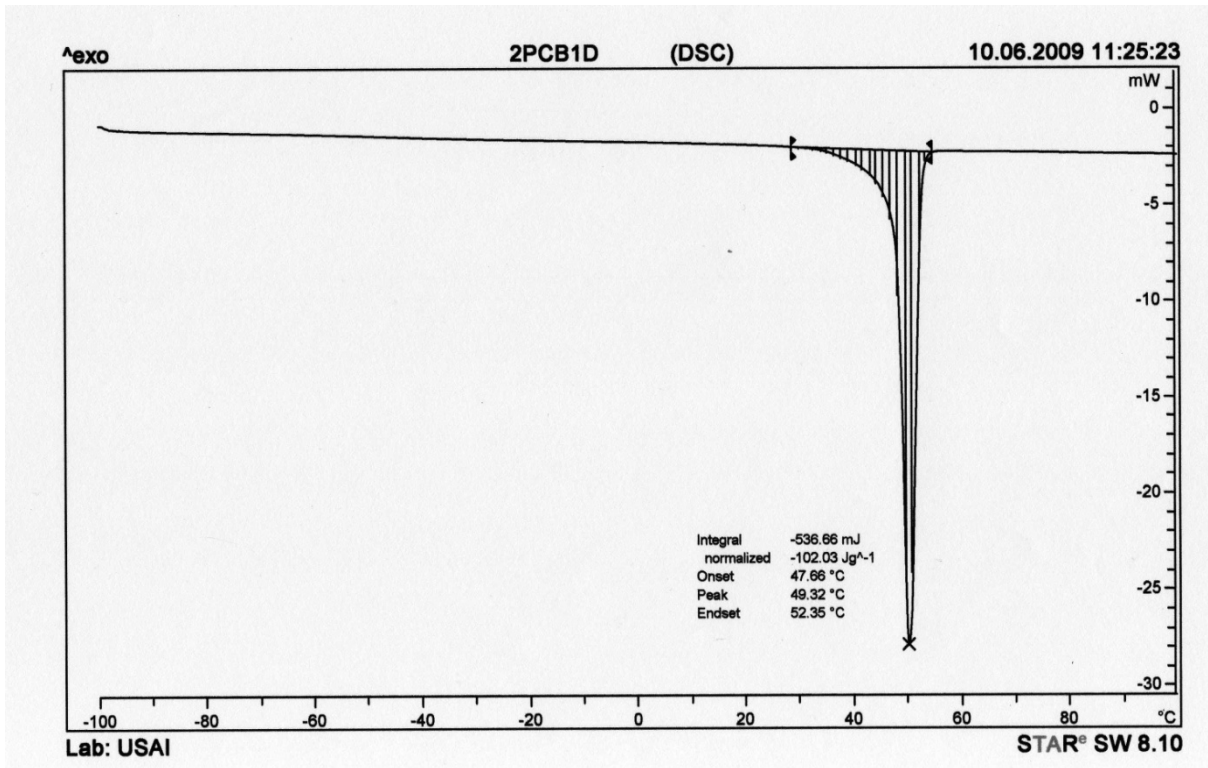
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 1, 1a fracción de la Tabla 4.3.



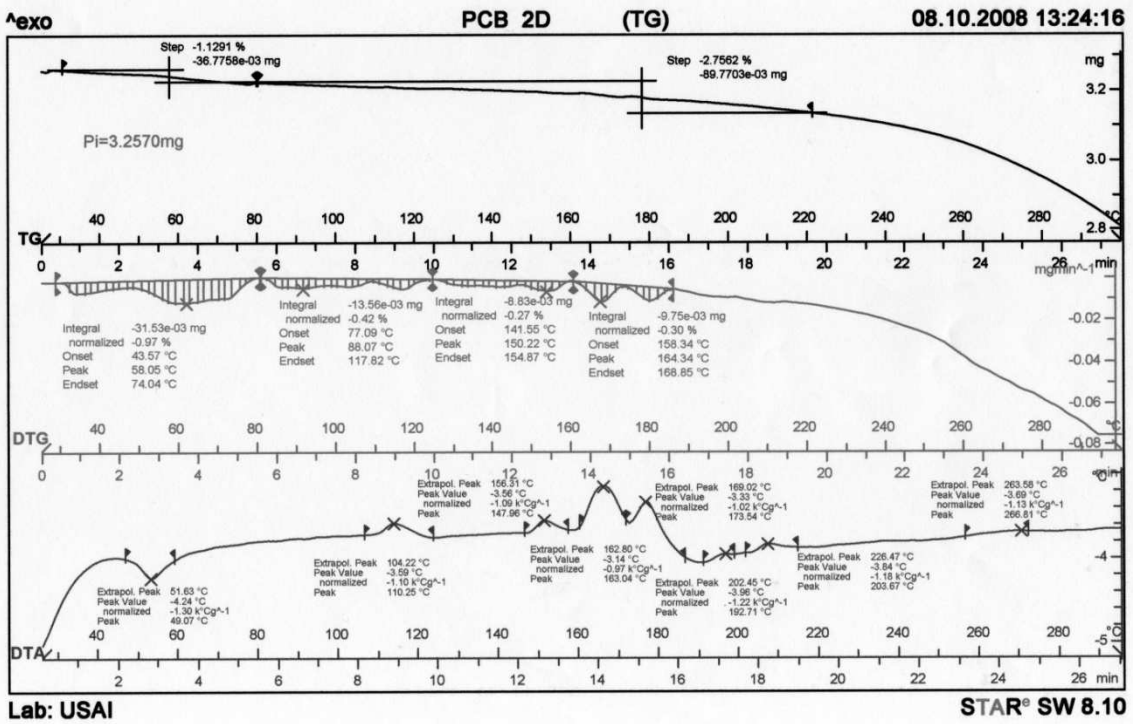
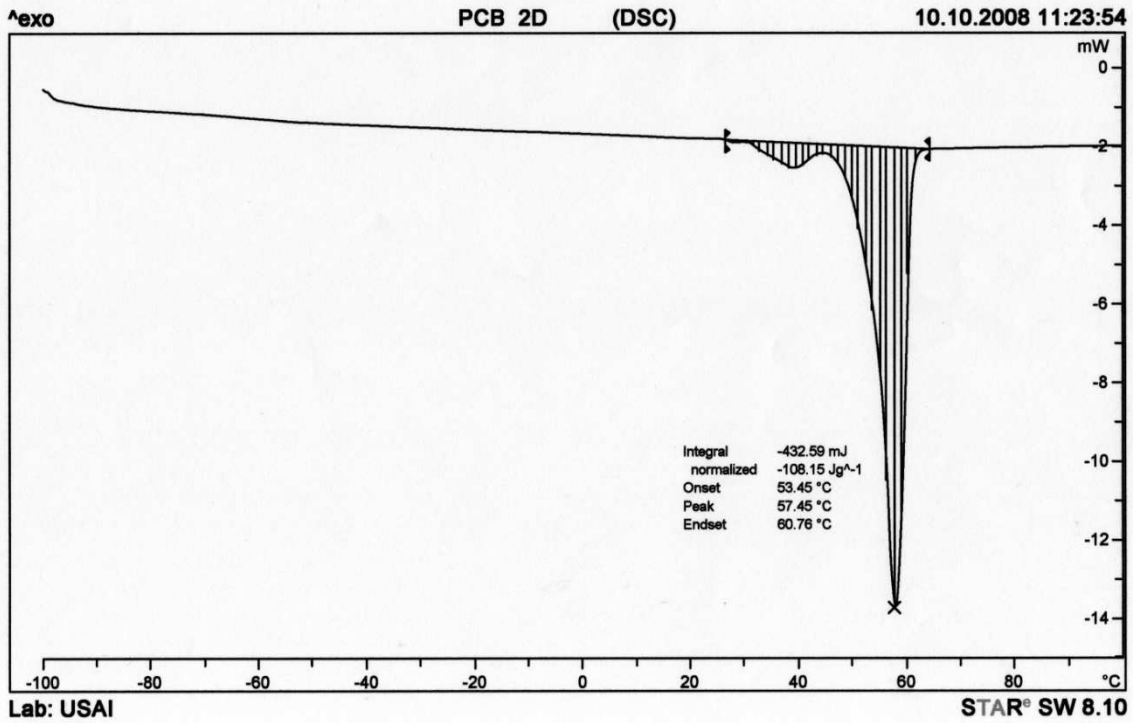
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 1, 2a fracción de la Tabla 4.3.



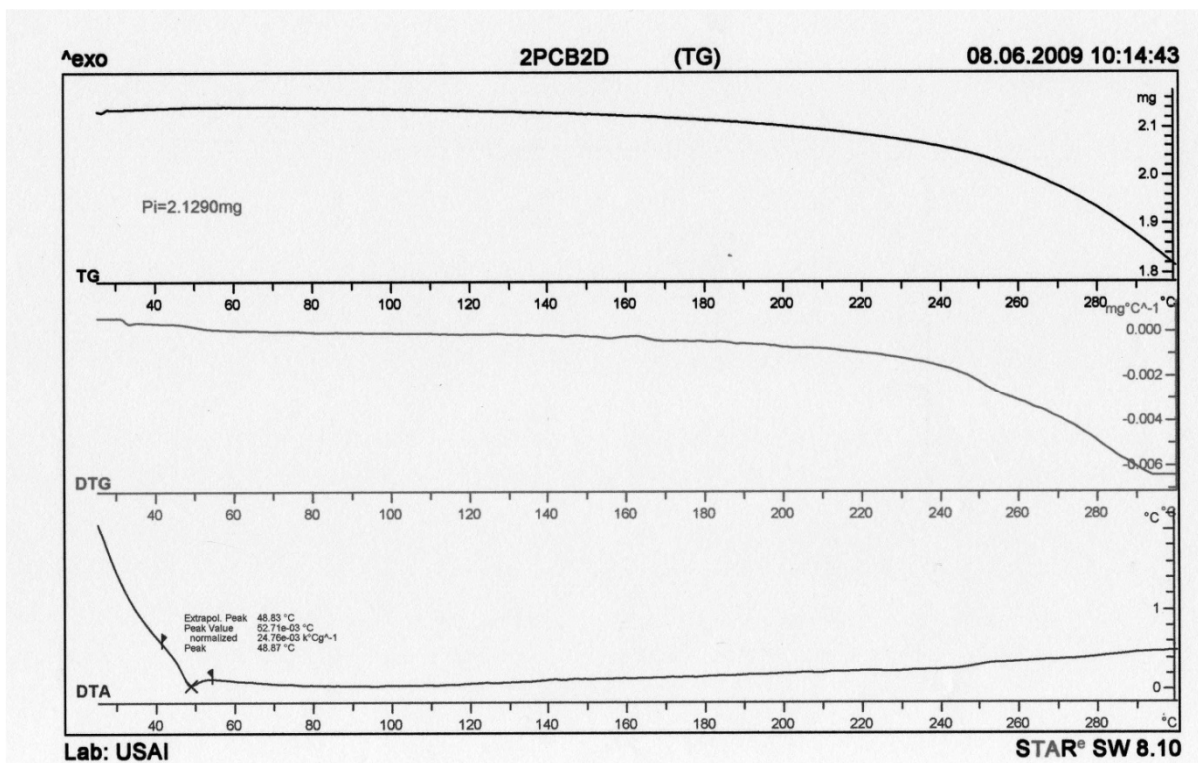
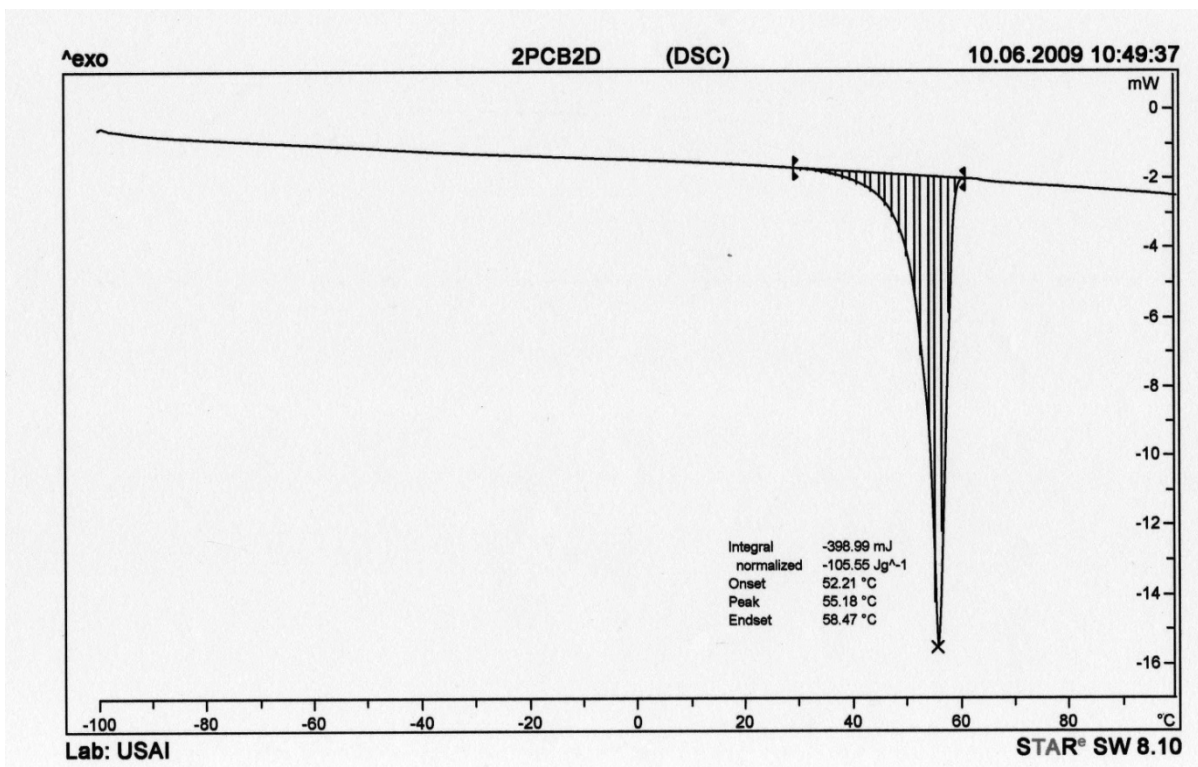
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 2, 1a fracción de la Tabla 4.3.



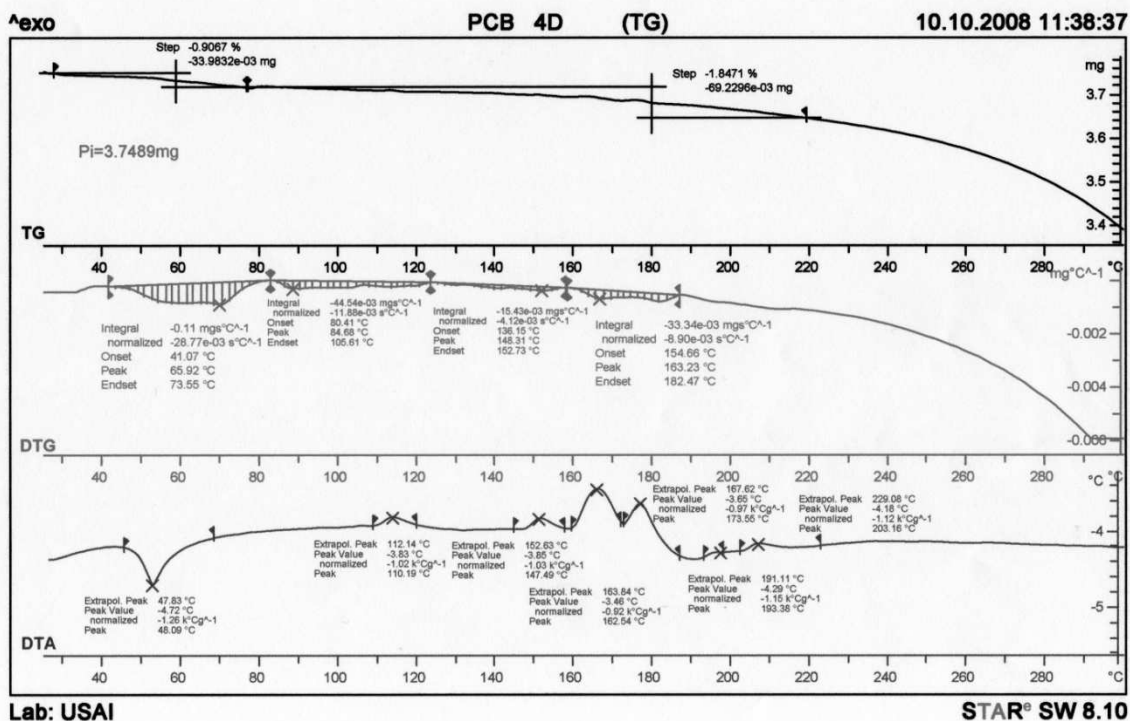
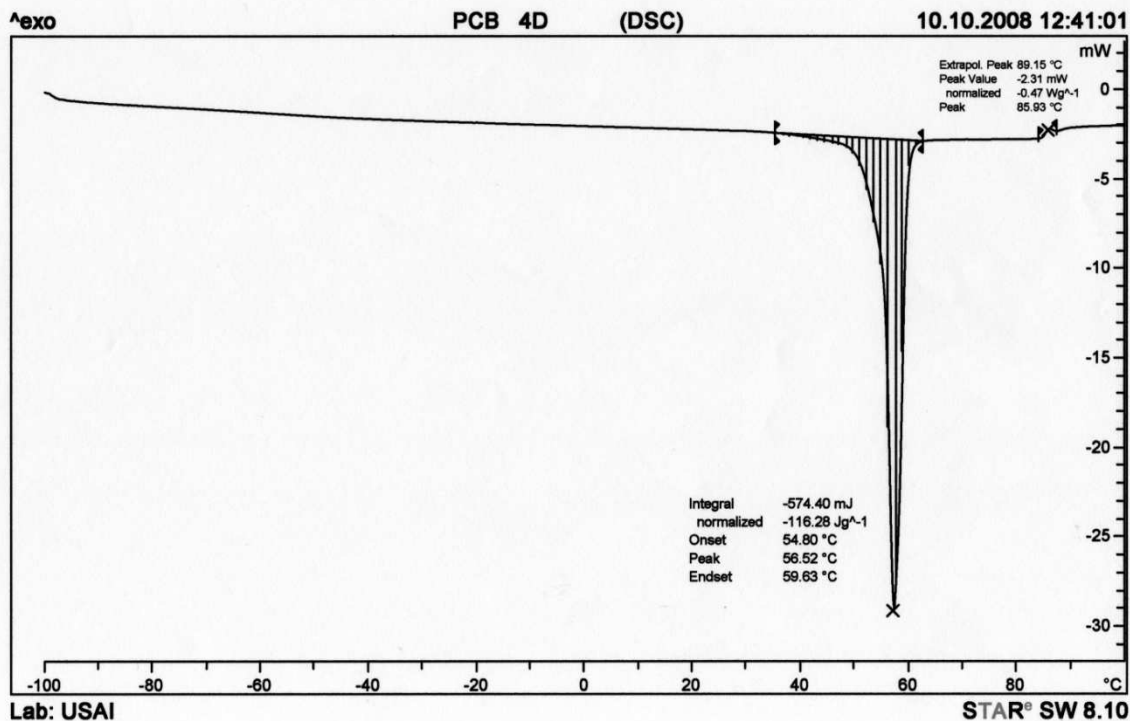
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 2, 2a fracción de la Tabla 4.3.



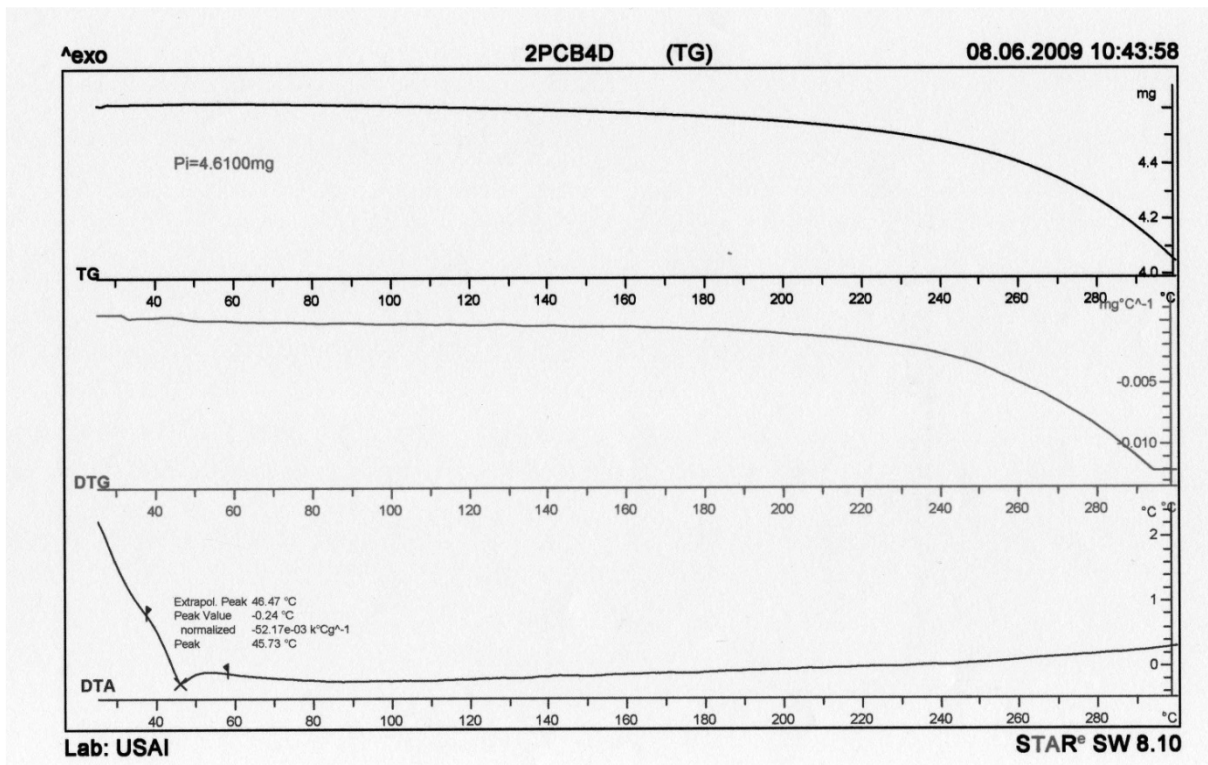
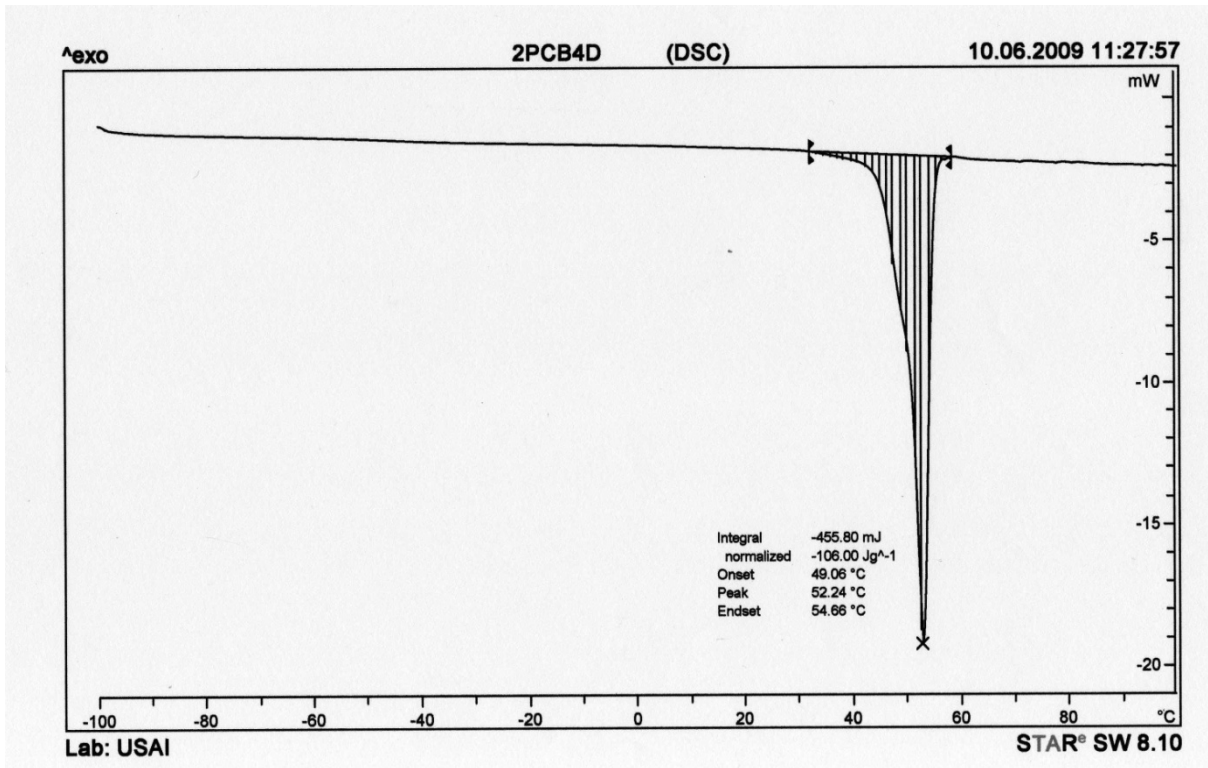
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 3, 1a fracción de la Tabla 4.3.



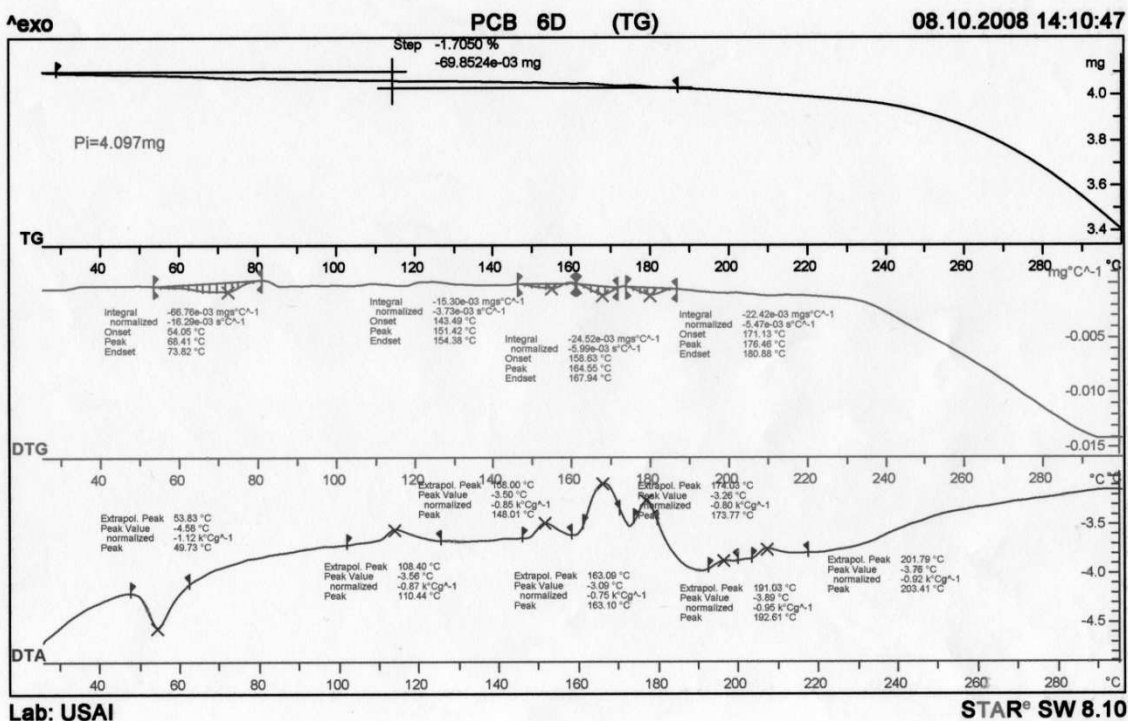
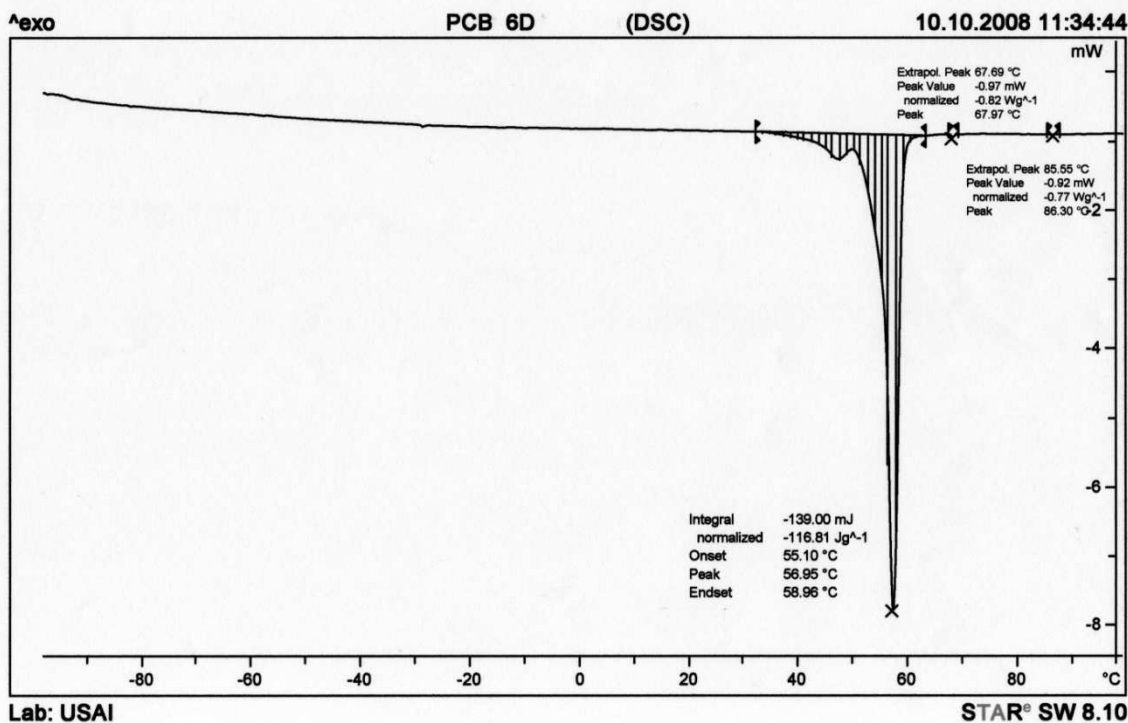
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 3, 2a fracción de la Tabla 4.3.



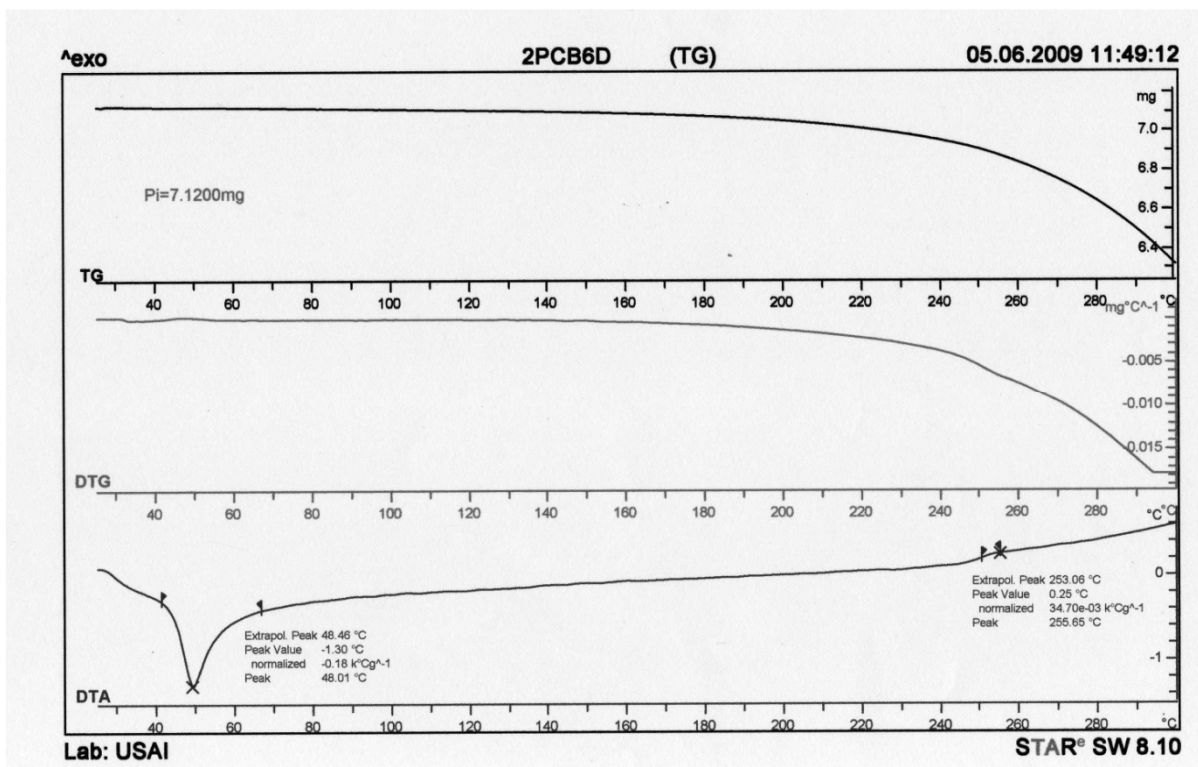
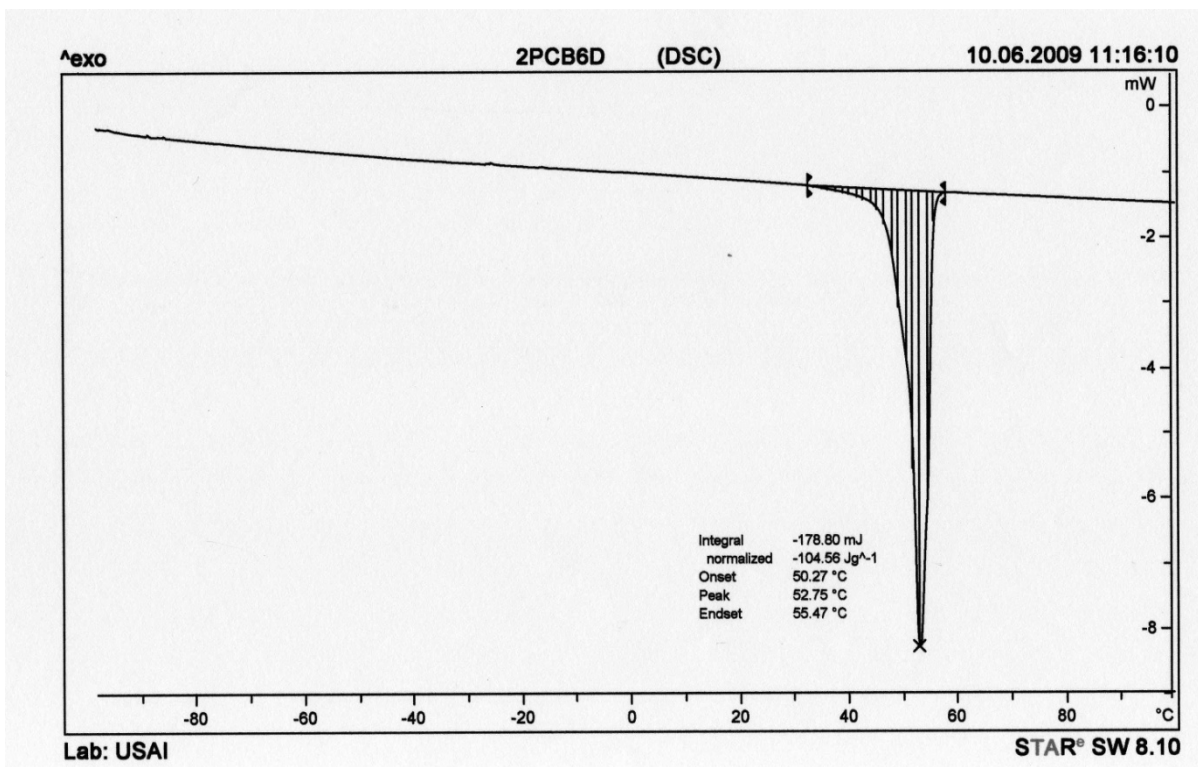
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 4, 1a fracción de la Tabla 4.3.



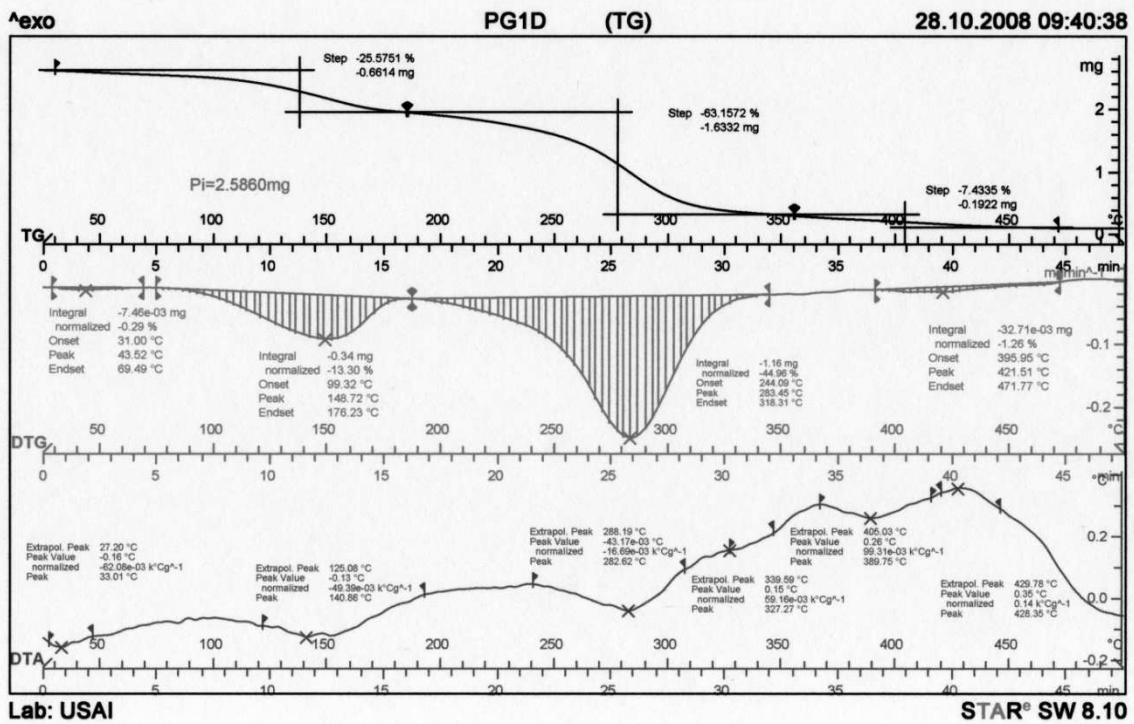
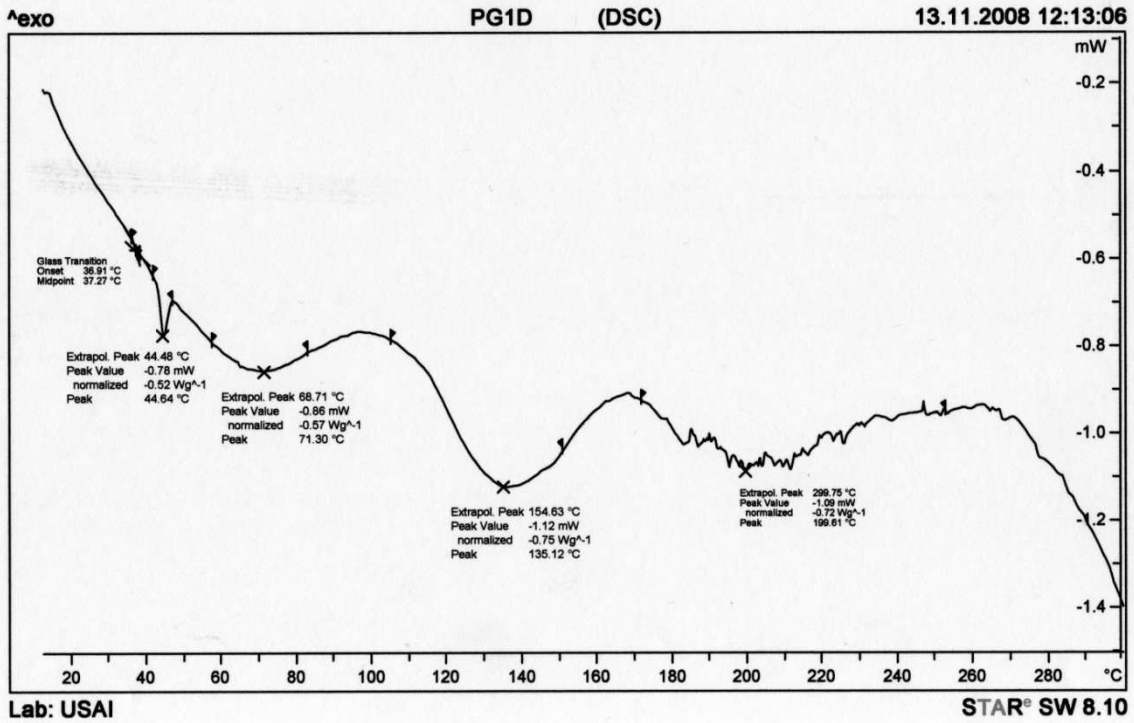
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 4, 2a fracción de la Tabla 4.3.



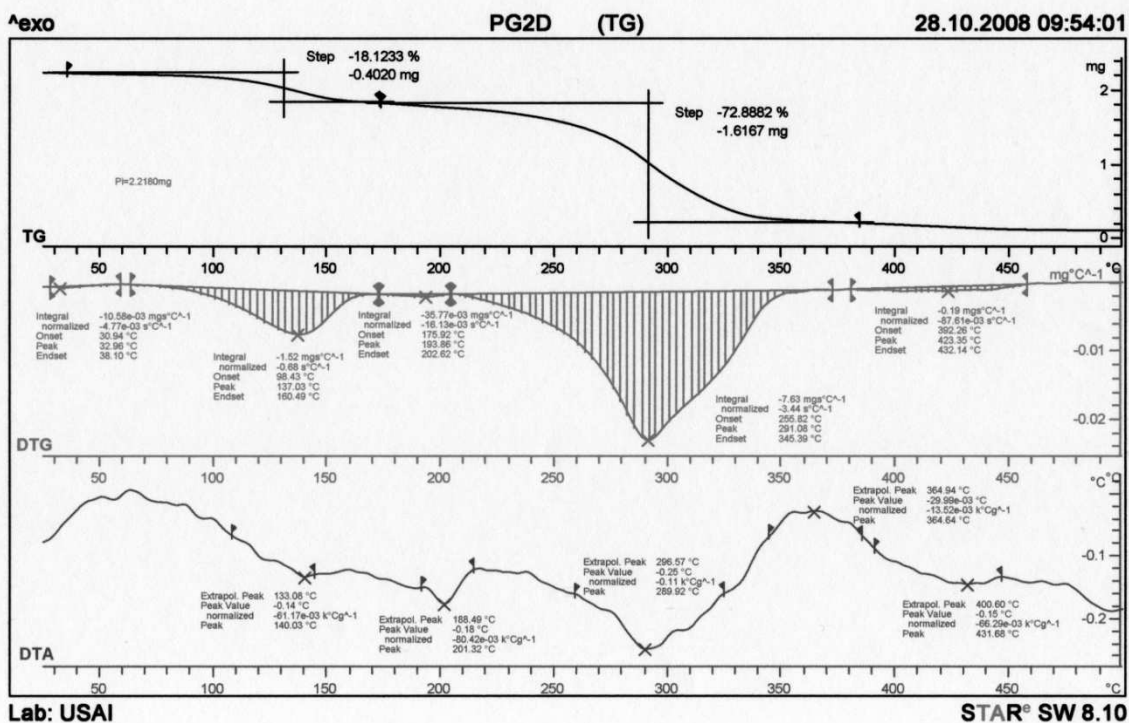
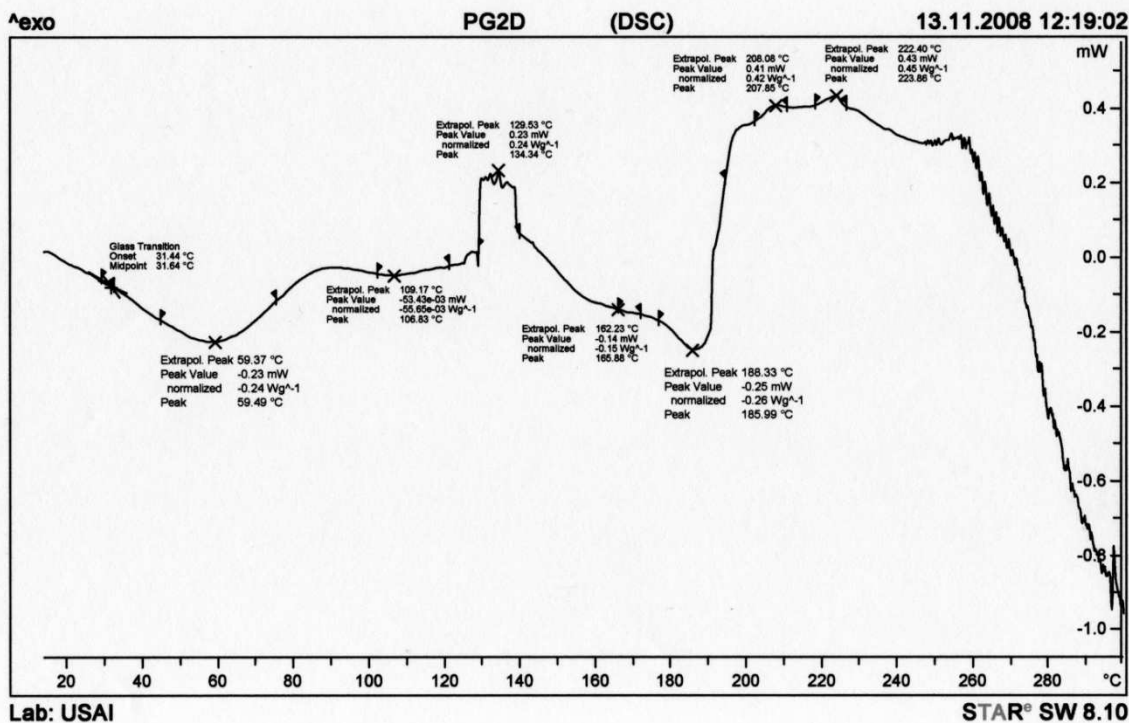
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 5, 1a fracción de la Tabla 4.3.



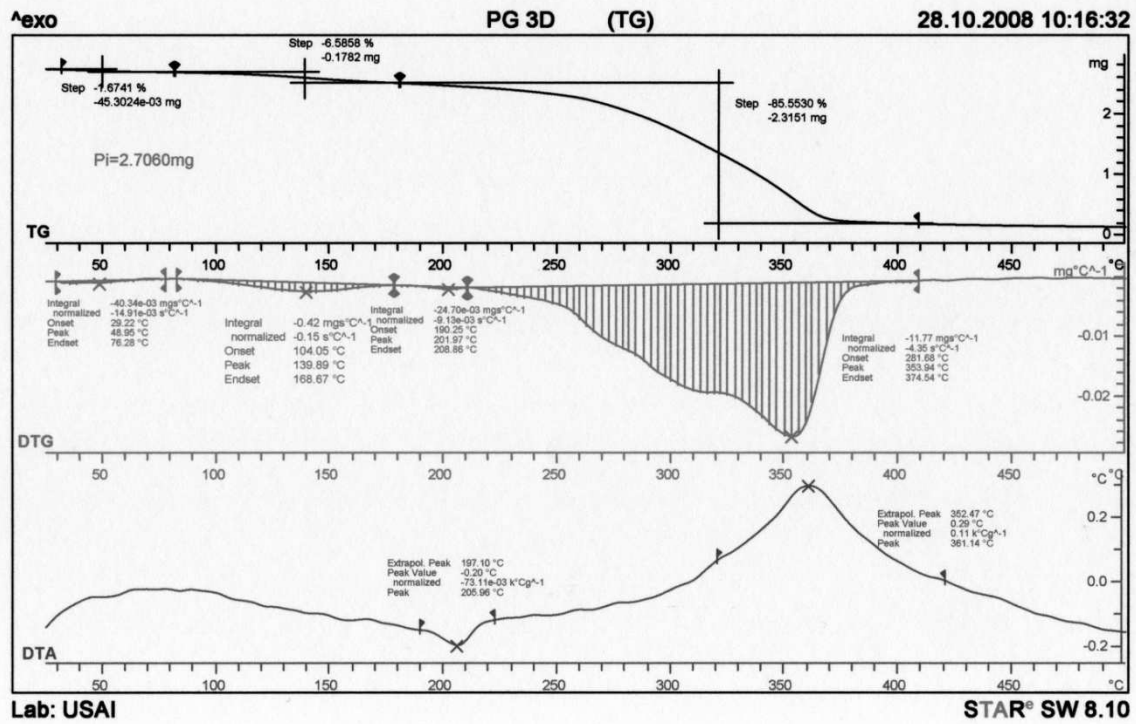
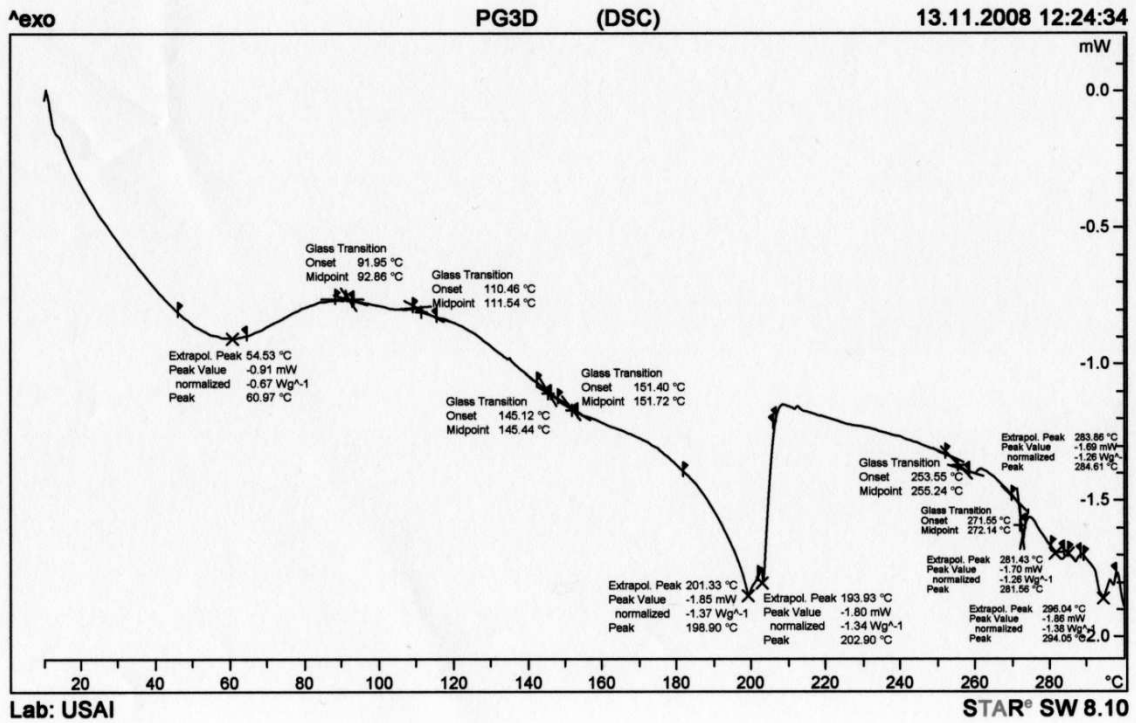
Termográmicas DSC y TGA del copolímero ramificado de CL con BHB (core AB₂), experimento 5, 2a fracción de la Tabla 4.3.



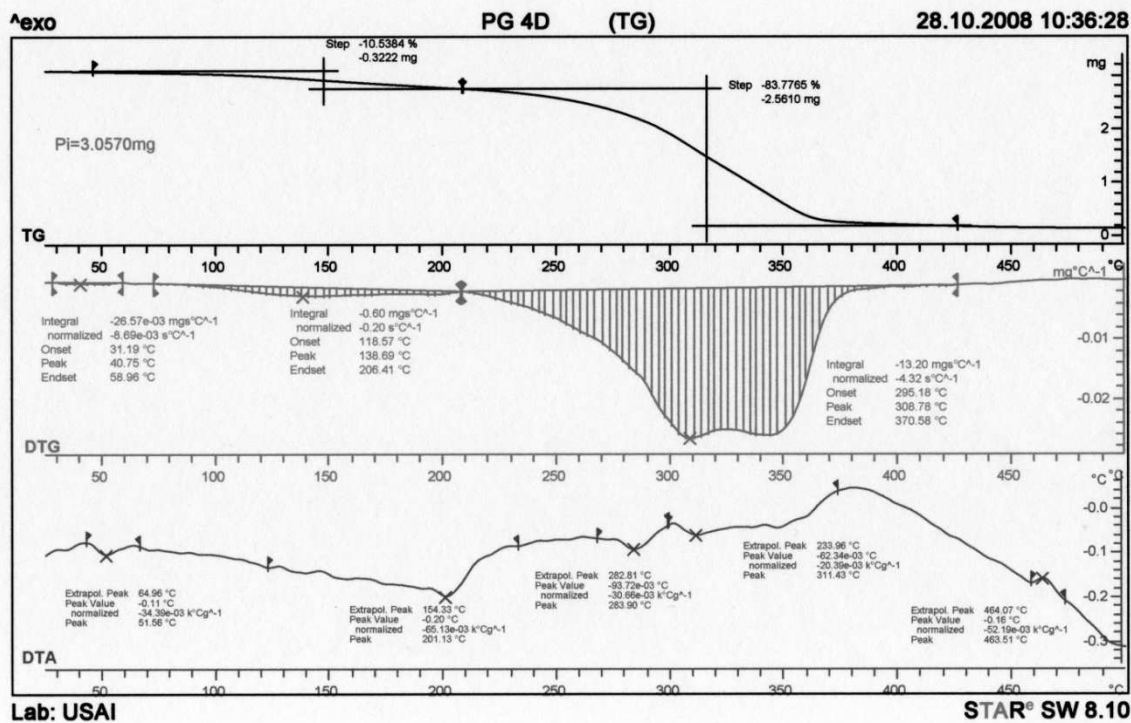
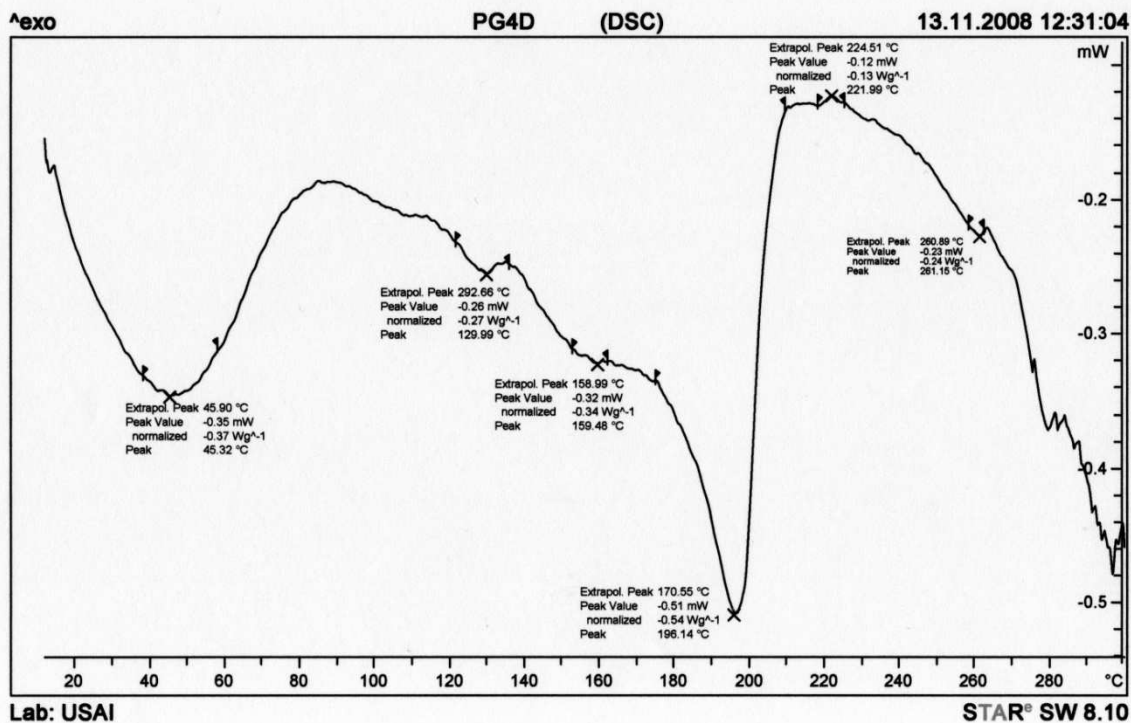
Termográmicas DSC y TGA de Poliglicólido experimento 1, Tabla 4.4.



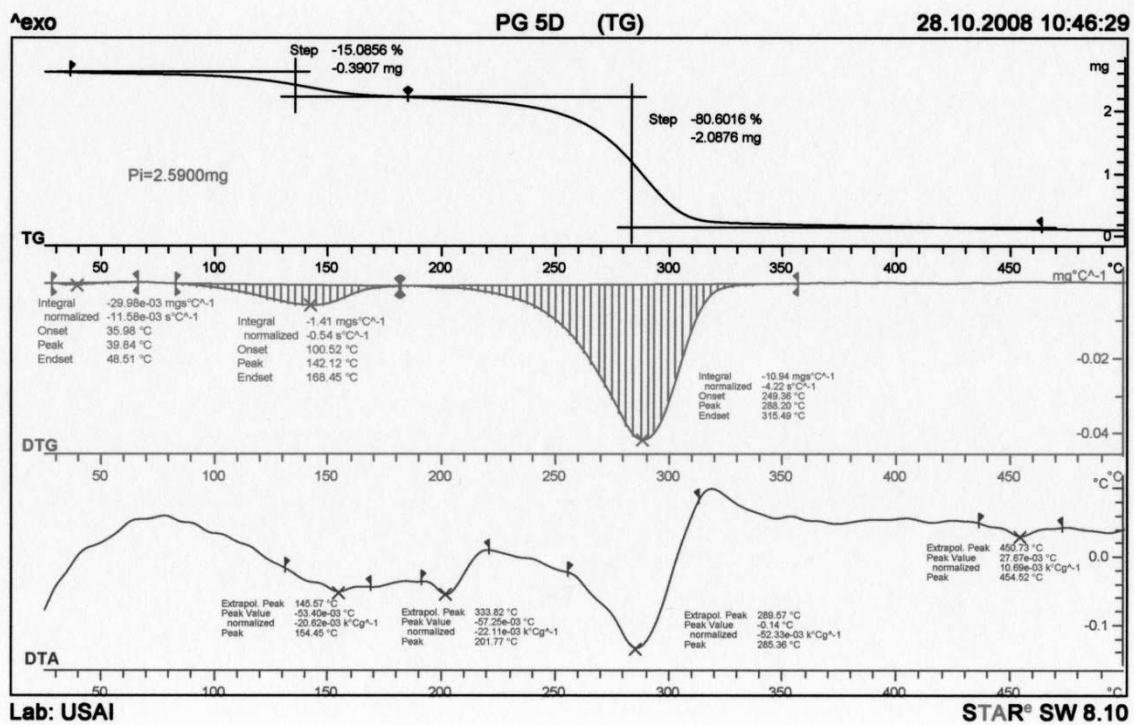
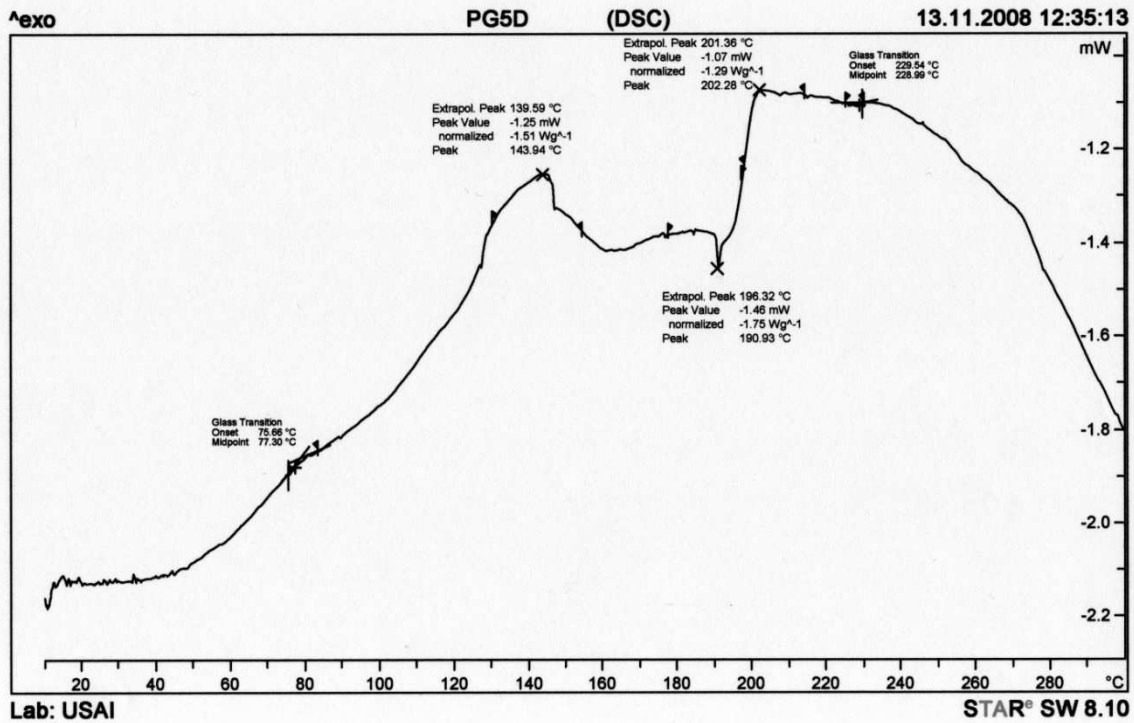
Termográmicas DSC y TGA de Poliglicólido experimento 2, Tabla 4.4.



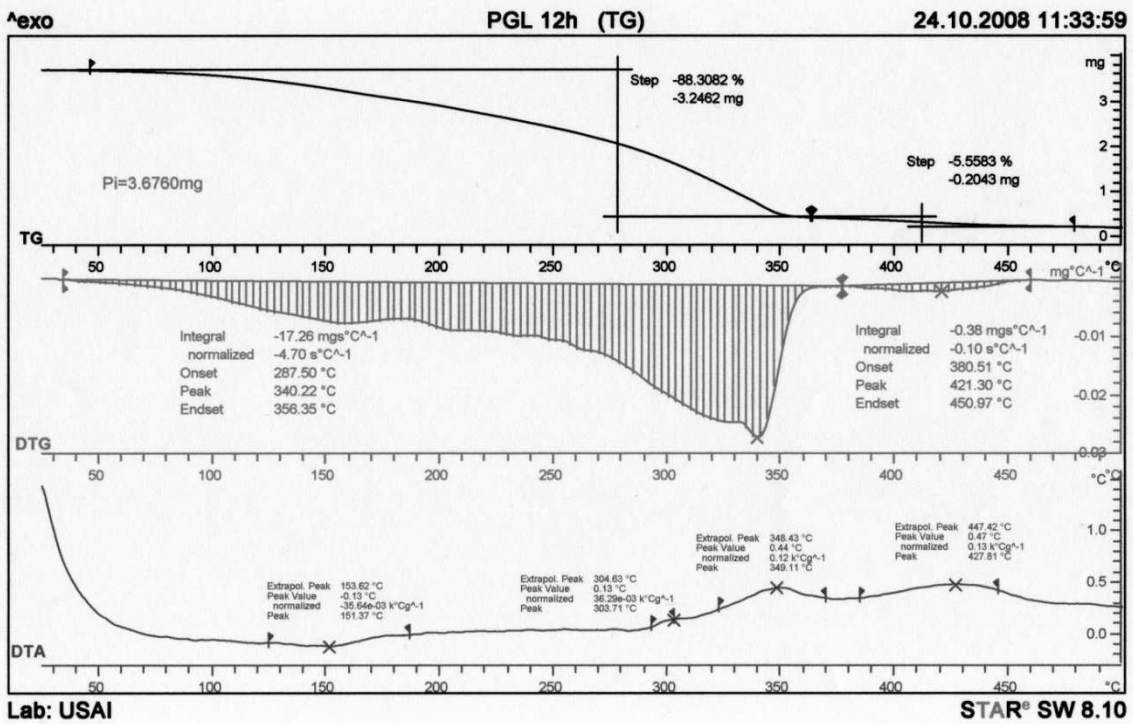
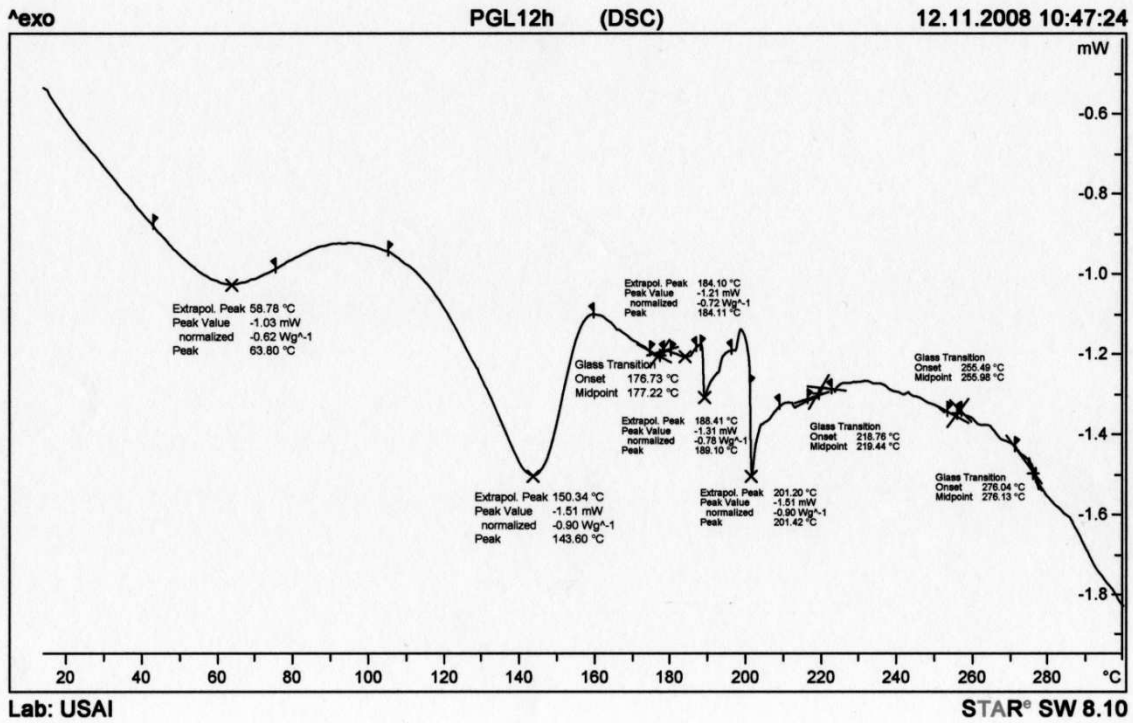
Termográmicas DSC y TGA de Poliglicólido experimento 3, Tabla 4.4.



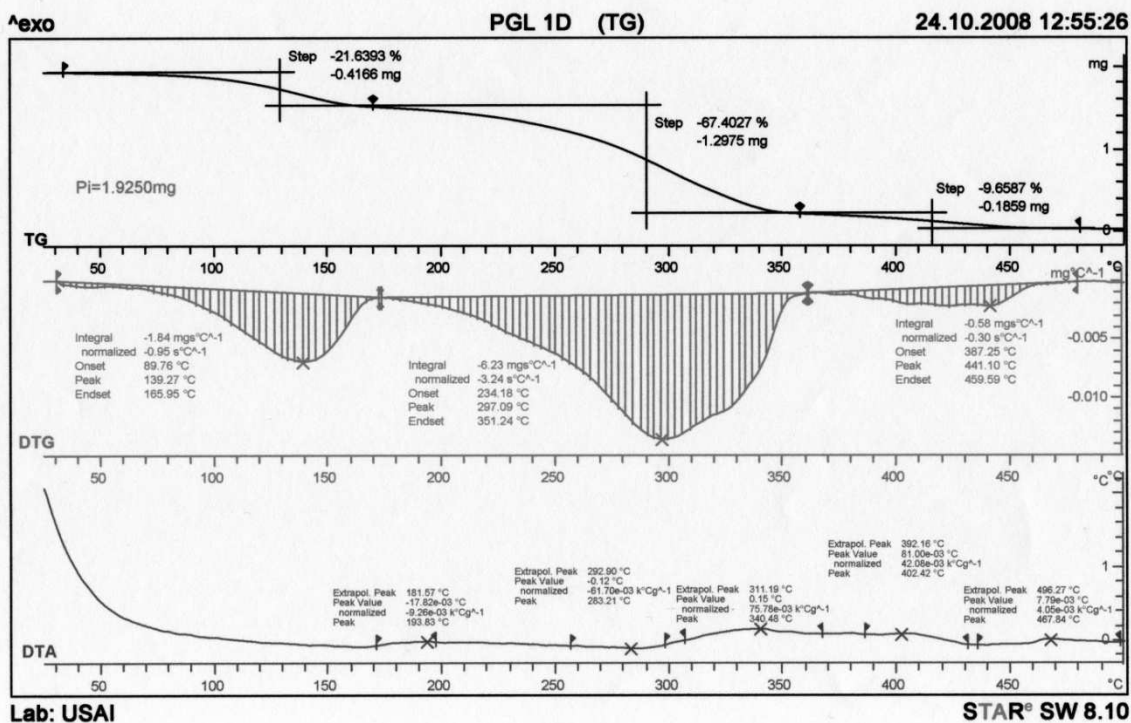
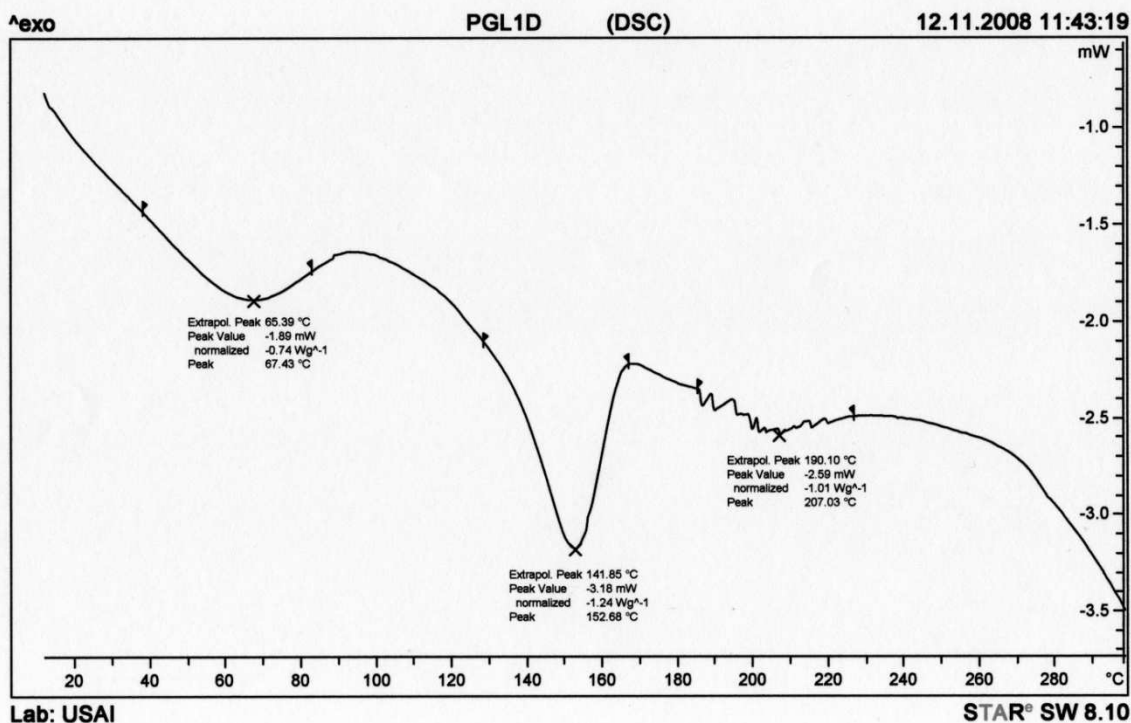
Termográmicas DSC y TGA de Poliglicólido experimento 4, Tabla 4.4.



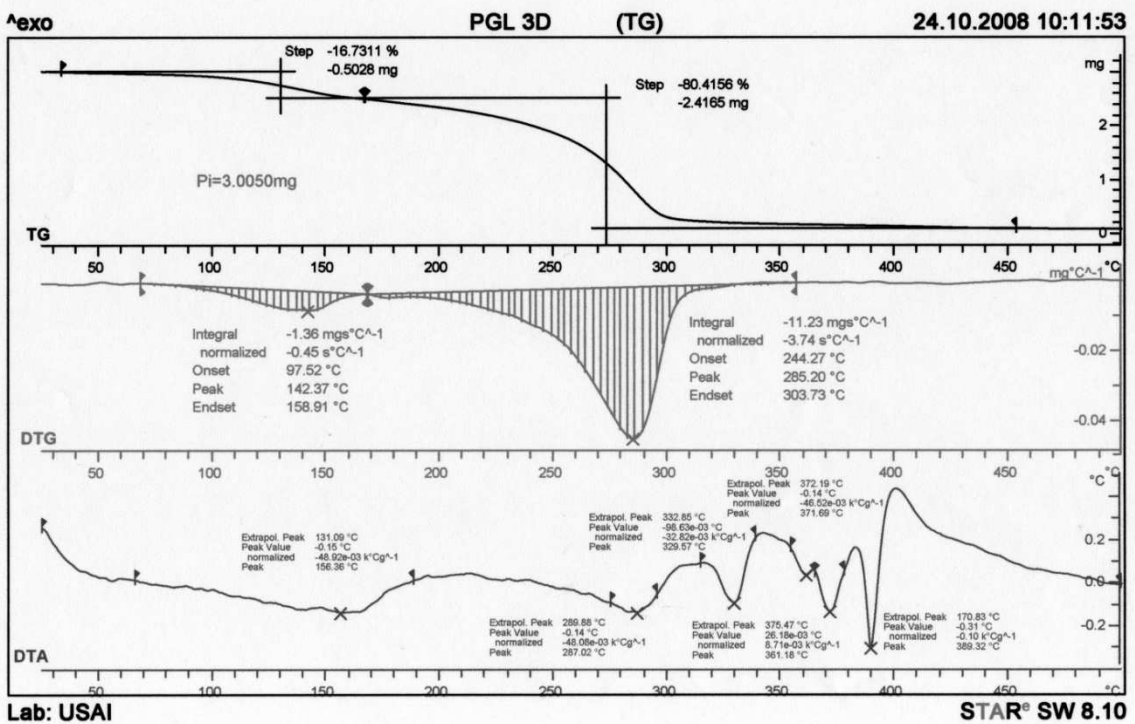
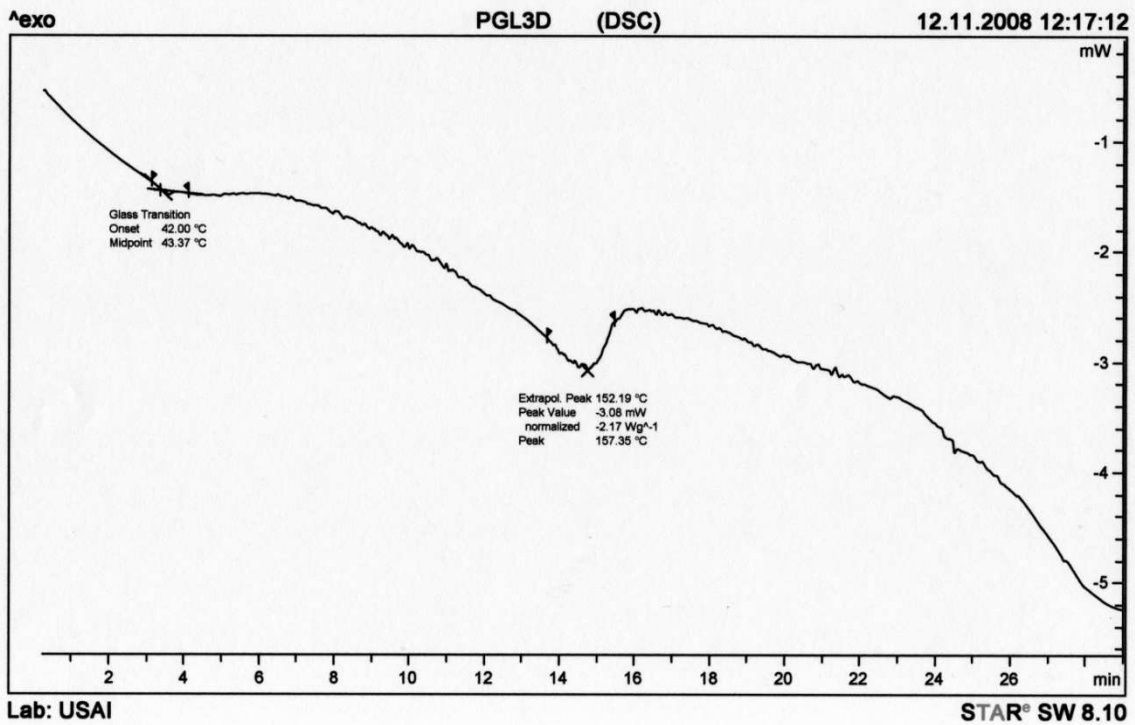
Termográmicas DSC y TGA de Poliglicólido experimento 5, Tabla 4.4



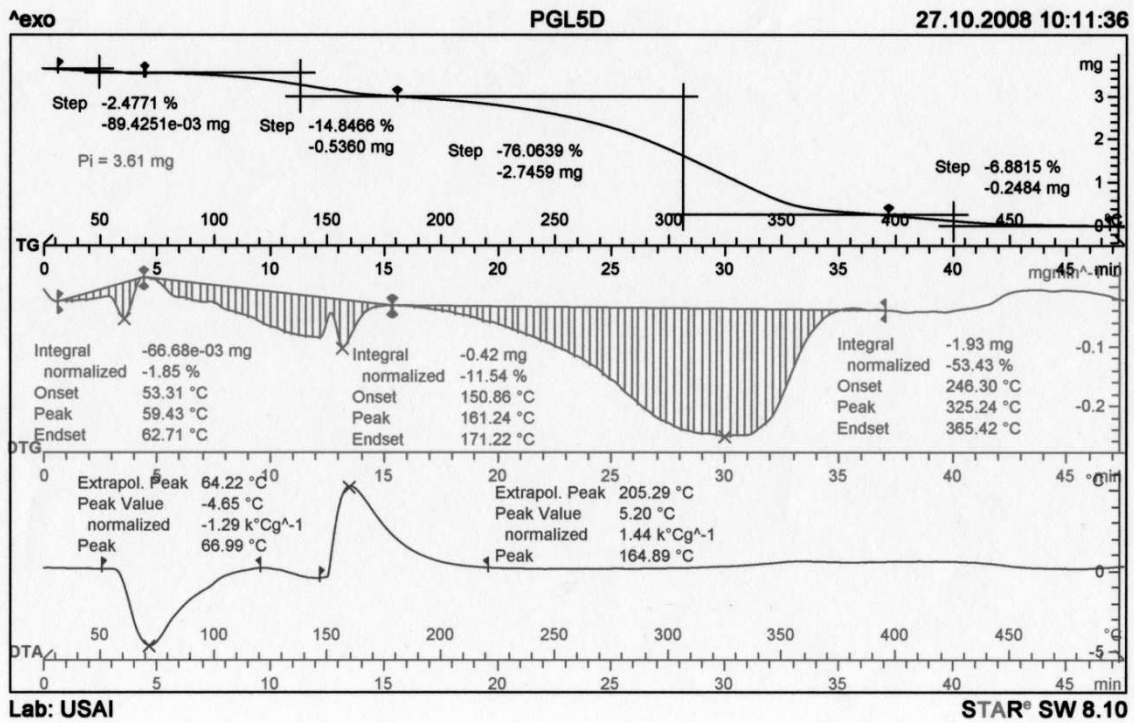
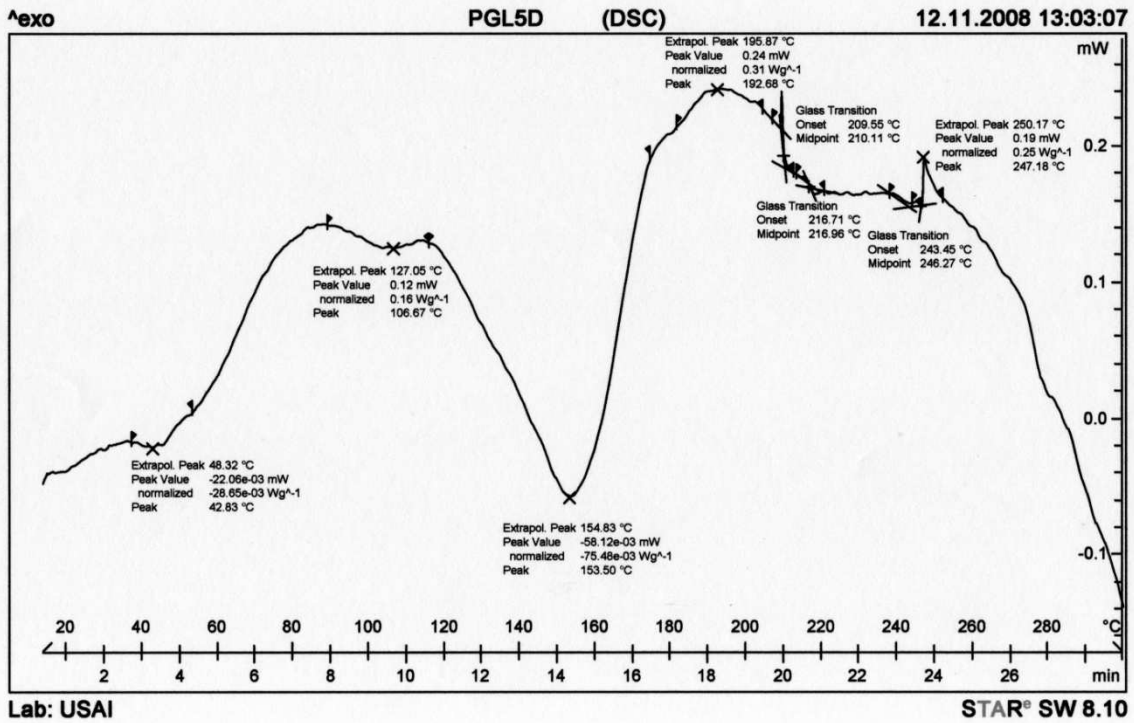
Termográmicas DSC y TG del copolímero de GA con LLA, experimento 1, de la Tabla 4.5



Termográmicas DSC y TG del copolímero de GA con LLA, experimento 2, de la Tabla 4.5.



Termogramas DSC y TG del copolímero de GA con LLA, experimento 3, de la Tabla 4.5



Termogramas DSC y TG del copolímero de GA con LLA, experimento 4, de la Tabla 4.5