



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIÉSTERES POR APERTURA DE ANILLO DE  
LA  $\epsilon$ -CAPROLACTONA USANDO BIOCATALIZADORES DE *LIPASA B DE*  
*CANDIDA ANTARCTICA* EN TOLUENO Y EN 1,1,1,2-TETRAFLUOROETANO  
LÍQUIDO COMO DISOLVENTES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

DIANA OLVERA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

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:** Profesor: Carlos Guzmán de las Casas.  
**VOCAL:** Profesor: Marco Antonio Uresti Maldonado.  
**SECRETARIO:** Profesor: Miquel Gimeno Seco.  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Rogelio Cuevas García.  
**2° SUPLENTE:** Profesor: León Pablo Torres Mancera.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 314, FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO E, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. Miquel Gimeno Seco

**SUSTENTANTE**

---

Diana Olvera Martínez

---

## **Agradecimientos.**

*A la UNAM por darme una segunda oportunidad, donde pude alcanzar una meta.*

*A la Facultad de Química donde aprendí muchas cosas, de grandes profesores pero sobre todo de grandes personas.*

*Al Doctor Miquel por su infinita paciencia conmigo, por su ayuda su apoyo y sus consejos.*

*A Alberto, gracias por todo lo que me ayudaste, eres amable, bueno, inteligente, bondadoso con lo que sabes y disfrutas compartir tus conocimientos sin ningún recelo.*

*A Don Pedro que hizo tan amena la estancia en el laboratorio, era un placer platicar con usted.*

*A todos los profesores que me ayudaron pero especialmente a Manuel Vázquez Islas y a Mariano Pérez Camacho.*

*A mi papi que desde que tengo uso de razón siempre ha estado conmigo, te quiero, admiro y sobre todo te respeto, nunca me dejaste sola ni en mis peores momentos, por ti estoy aquí.*

*A mi madre que desde siempre ha luchado por todos nosotros, te quiero mami.*

*A mis hermanos Elena, Vicky, Antonio, Diego, Enrique y Andrés<sup>†</sup>, a todos mis bebes, Dany, Lalo, Jessy, Liz, Sergio y Fer, a mis cuñados Armando<sup>†</sup> y Eduardo, gracias por todo, hemos tenido una vida complicada pero eso nos ha permitido ser una gran familia.*

---

A Erika ..... 18-October-1999.

*A Maru "la chivis" te quiero no hay mas que decir, siempre he contado contigo hemos pasado tantas cosas juntas, caray, sí que alguien nos quiere mucho. Te agradezco por ser mi amiga, por las parrandas, por los consejos, por ser mi "prima", por darme 5 minutos, tú entiendes, podría pasar horas enteras recordando todooo lo que hemos vivido pero nunca terminaría, simplemente debo decirte GRACIAS MARUCA!!. Esto va a sonar raro pero espero envejecer contigo, como tu amiga claro☺*

*A Gris, eres una gran amiga y próximamente una gran mamá, en tu pequeña persona esta guardada una gran guerrera. Gracias por tu gran amistad.*

*A Francisco mi eterno y muy queridísimo amigo, eres una gran persona especialmente conmigo, me brindas tu amistad sin condiciones y Dios sabe que me has tenido mucha paciencia. Te quiero mucho a pesar de todos tus "debrayes", espero seguir siendo la respuesta a todas tus preguntas por mucho tiempo.*

*A Fabián mejor dicho MI FABIAN... eres tan inteligente, pero eso no es lo mejor de ti, lo mejor es tu sencillez y humildad. Agradezco el haberte conocido y que me hayas brindado tu gran amistad.*

*A mi PUCHUNGO!!!!.....espero que algún día vuelvas a sonreír como cuando estábamos juntos. Deseo que estés contento y feliz donde quiera y con quien quiera que estés.*

*A Hugo porque me ayudaste a salir de un momento difícil en mi vida, supiste ser exactamente lo que requería en cada instante y lo mejor de todo es que lo sigues haciendo. Me inspiraste a regresar a ese mundo que había dejado de lado, quien más que tú para guiarme.....gracias HUG-ME!!!*

---

*A mis amigos Karina, Mario, Israel, Rubén, Carlos H., Aráis, María, Jesuitas, Faby, Hammurabi, Mirna, Alicia, Maha, Alex, Karlita, Mario, Humberto, Daleth, Gabriel, Gibran, Celinda, Carlos, Max, Yochi, Juan Ramón, a los pastelosos!! (Lupita y Ricardo), Liz, Raúl, a todos GRACIAS por su amistad porque soy lo que soy gracias a todas las personas que he conocido en mi vida, especialmente mis amigos, porque si hubiera tomado otro rumbo tal vez hubiera sido diferente, no lo se, solo se que soy feliz con el rumbo de mi vida y eso los incluye. Gracias por permitirme ser la “florecita rockera”, la “demonia”, la “diabla”, el “aigre”.....*

*Y finalmente a ti.....*

*“siempre se encuentra alguien a quien amar”*

---

## Índice.

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
II.i. Polímeros.....	5
II.i.a. Características de los polímeros.....	5
II.ii. Tipos de polimerización.....	11
II.ii.a. Polimerización por condensación.....	11
II.ii.b. Polimerización por adición.....	12
II.ii.c. Polimerización vía radicales libres.....	12
II.ii.d. Polimerización aniónica.....	13
II.ii.e. Polimerización catiónica.....	14
II.ii.f. Polimerización por apertura de anillo.....	14
II.iii. Polímeros biodegradables.....	16
II.iii.a. La PCL como material biodegradable.....	17
II.iv. Enzimas.....	18
II.iv.a. Lipasas.....	19
II.iv.b. La CalB.....	28

---

<i>III. OBJETIVOS.....</i>	<i>32</i>
<i>III. i. Objetivo general. ....</i>	<i>32</i>
<i>III. ii. Objetivos particulares. ....</i>	<i>32</i>
<i>IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</i>	<i>33</i>
<i>IV. i. Material. ....</i>	<i>33</i>
<i>IV. ii. Reactivos.....</i>	<i>33</i>
<i>IV.iii. Síntesis de la PCL usando Novozym-435 como biocatalizador. ....</i>	<i>34</i>
<i>IV.iii.a. Purificación del polímero.....</i>	<i>34</i>
<i>IV.iv. Síntesis de polímeros usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA), usando como disolvente tolueno. ....</i>	<i>35</i>
<i>IV.v. Síntesis de polímeros usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA), en un reactor presurizado con R-134a.....</i>	<i>35</i>
<i>IV.vi. Polimerización en masa.....</i>	<i>36</i>
<i>IV.vii. Determinación de pesos moleculares por GPC/SEC (Cromatografía de permeación en gel). ....</i>	<i>36</i>
<i>IV.vii.a. Caracterización de las muestras. ....</i>	<i>36</i>
<i>V. RESULTADOS .....</i>	<i>38</i>
<i>V.i. Síntesis de la PCL usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA).....</i>	<i>38</i>
<i>V. ii. Efecto del tiempo de reacción y biocatalizador sobre la PCL. ....</i>	<i>38</i>
<i>V.iii. Síntesis PCL, usando la CalB(C-LECTA) en R-134a como medio de reacción. ....</i>	<i>46</i>
<i>V.iv. Síntesis de la PCL con Novozym 435 en R-134a. ....</i>	<i>48</i>



---

<i>V.v. Polimerización en masa de la CL</i> .....	49
<i>V.vi. Caracterización física y estructural de la PCL</i> .....	50
VI. CONCLUSIONES. ....	54
VII. BIBLIOGRAFÍA. ....	55
VIII. ANEXO. ....	58

---

## *Índice de figuras.*

Figura 1. Ejemplos de polímeros lineales. _____	<b>6</b>
Figura 2. Ejemplo de una estructura ramificada. _____	<b>6</b>
Figura 3. Representación de un polímero entrecruzado. _____	<b>7</b>
Figura 4. Distribución de pesos moleculares en un polímero. _____	<b>8</b>
Figura 5. Tipos de estereoquímica de un polímero. _____	<b>9</b>
Figura 6. Sistemas amorfo, semicristalino y cristalino. _____	<b>10</b>
Figura 7. Etapa de iniciación entre un diol y un diácido. _____	<b>11</b>
Figura 8. Reacción entre un diol y un dímero. _____	<b>11</b>
Figura 9. Reacción entre un dímero y un diácido. _____	<b>12</b>
Figura 10. Reacción entre dímeros para formar un tetrámero. _____	<b>12</b>
Figura 11. Polimerización por apertura de anillo de algunos monómeros. _____	<b>15</b>
Figura 12. ROP de la CL catalizada por lipasas. _____	<b>16</b>
Figura 13. Sitio activo de una lipasa. _____	<b>20</b>
Figura 14. Mecanismo para la polimerización catalizada por lipasas de lactona. _____	<b>27</b>
Figura 15. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> . _____	<b>28</b>
Figura 16. Imagen que muestra el reactor utilizado. _____	<b>34</b>
Figura 17. Imagen que muestra el sólido que se obtiene al de despresurizar el reactor. _____	<b>35</b>
Figura 18. Espectro de FT-IR de la PCL. _____	<b>58</b>

---

Figura 19. Espectro de RMN- $H^1$ de la PCL. _____	<b>59</b>
Figura 20. Espectro de RAYOS X de la PCL. _____	<b>60</b>
Figura 21. Termograma obtenido por DSC de la PCL. _____	<b>61</b>
Figura 22. Análisis termogravimétrico (TGA) de la PCL. _____	<b>62</b>

---

## *Índice de tablas y gráficas.*

Tabla 1. Relación entre el coeficiente de partición (log P) y la solubilidad en agua de disolventes. _____	<b>22</b>
Tabla 2. Valores del log P de algunos disolventes. _____	<b>23</b>
Tabla 3. Resultados que muestran la efectividad de varias enzimas en la síntesis de la PCL. _____	<b>29</b>
Tabla 4. Resultados de los polímeros obtenidos utilizando un 5% p/v de biocatalizador. _____	<b>38</b>
Tabla 5. Resultados de los polímeros utilizando un 10% p/v de biocatalizador. _____	<b>39</b>
Tabla 6. Resultados obtenidos en la polimerización de la CL usando el 20% p/v de biocatalizador. _____	<b>41</b>
Tabla 7. Valores alcanzados por la PCL con la CalB(C-LECTA) al 30% p/v. _____	<b>42</b>
Tabla 8. Resultados de la PCL usando CalB(C-LECTA) al 10% p/v en R-134a. _____	<b>46</b>
Tabla 9. Comparativo de resultados usando diferentes biocatalizadores. _____	<b>48</b>
Tabla 10. Datos obtenidos de la síntesis de la PCL llevadas a cabo por polimerización en masa. _____	<b>49</b>
Tabla 11. Características de absorción en el infrarrojo de algunos grupos funcionales. _____	<b>51</b>
Gráfica 1. Relación que guarda el rendimiento vs tiempo de reacción en la síntesis de la PCL usando CalB(C-LECTA) como biocatalizador. _____	<b>43</b>

---

Gráfica 2. En esta figura se muestra la dependencia que guarda el peso molecular ( $M_n$ ) respecto al tiempo. \_\_\_\_\_ **44**

Gráfica 3. Comportamiento del rendimiento del polímero vs cantidad de enzima utilizada, a los tiempos de reacción estudiados. \_\_\_\_\_ **45**

Gráfica 4. En esta figura se comparan los pesos moleculares ( $M_n$ ) de la PCL usando diferentes disolventes. \_\_\_\_\_ **47**

---

## Abreviaturas.

%wt	Porcentaje en peso
AIE	Intermediario acil-enzima
ASTM	American Society of Testing Materials
$a_{wi}$	Actividad de agua inicial
CalB(C-LECTA)	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada (C-LECTA)
CL	$\epsilon$ -caprolactona
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTA	Análisis termogravimétrico diferencial
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Log P	Coefficiente de partición
$M_n$	Peso molecular promedio en número
$M_w$	Peso molecular promedio en masa
Novozym 435	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada (Novozymes)
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersidad
PGA	Poliglicólico
R-134a	1,1,1,2-Tetrafluoroetano
RMN- $H^1$	Resonancia magnética nuclear de protón
ROP	Ring-opening polymerization
scCO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
TGA	Termogravimetría
THF	Tetrahidrofurano
$T_g$	Temperatura de transición vítrea
$T_m$	Temperatura de fusión

### **RESUMEN.**

La síntesis de poliésteres catalizados por enzimas es una nueva técnica amigable para el medio ambiente. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar las características de los polímeros obtenidos usando diferentes lipasas comerciales, en diferentes medios de reacción.

Los parámetros que fueron estudiados y que a su vez dieron la pauta para discutir sus efectos sobre la reacción de polimerización fueron: el disolvente, la concentración de enzima y el tiempo de reacción.

Las lipasas que se utilizaron para llevar a cabo la síntesis de la policaprolactona (PCL) fueron la lipasa B de la levadura *Candida antarctica* inmovilizada en una resina macroporosa de poliacrilatos Lewattit VP OC 1600 de Lanxes suministradas por dos compañías C-LECTA de Alemania y Novozymes de Dinamarca, esta última bajo el nombre comercial Novozym-435.

Los medios de reacción que se emplearon en la polimerización en disolución fueron tolueno y 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido en estado líquido.

Las distintas características fisicoquímicas de cada disolvente dieron como resultado polímeros de diferentes pesos moleculares.

La cantidad de CalB(C-LECTA) que obtuvo los mejores rendimientos de la policaprolactona fue de un 10% de biocatalizador respecto al monómero en 24 horas de reacción usando como disolvente tolueno. El uso del 1,1,1,2-tetrafluoroetano como medio de reacción para sintetizar la policaprolactona usando CalB(C-LECTA) como biocatalizador, produjo polímeros de mayor peso molecular, respecto a los obtenidos con tolueno.

Se encontró que el uso de la Novozym 435 como biocatalizador en la síntesis de la policaprolactona, dio como resultado un peso molecular y un rendimiento de 20,000 g/mol y 80% respectivamente, a diferencia de los obtenidos con la CalB(C-

LECTA) que aunque obtuvo un mayor peso molecular de 32,000 g/mol su rendimiento fue menor (64%). Estos resultados fueron obtenidos con el 10% p/v de biocatalizador en 24 horas con 1,1,1,2-tetrafluoroetano.

La polimerización en masa de la  $\epsilon$ -caprolactona, usando como catalizadores las diferentes lipasas, dio rendimientos bajos, demostrando con esto que el uso de un disolvente facilita la transferencia de masa y por ende la polimerización.

El polímero caracterizado mostro un porcentaje de cristalinidad de 44% y una temperatura de fusión de 61°C.



### ***I. INTRODUCCIÓN.***

Desde hace mucho tiempo el hombre uso polímeros naturales, como la madera, las resinas, el caucho, entre otros, además aprendió a procesar la lana, la seda, el algodón por mencionar algunos. Los polímeros sintéticos han ido sustituyendo a los polímeros naturales, debido a la facilidad de transformación, a sus mejores propiedades mecánicas y a la resistencia frente a sustancias químicas agresivas. En la actualidad la investigación está encaminada a encontrar polímeros que no afecten al medio ambiente.

La gran cantidad de plásticos que se genera en el mundo es un problema que puede ser solucionado si se utilizan polímeros que puedan ser fácilmente reutilizables o biodegradables.

Durante el 2010 entro en vigor la reforma aprobada por la Asamblea Legislativa del Distrito Federal que incluyó la prohibición de regalar bolsas de plástico. El objetivo de la ley de residuos sólidos es impulsar una conciencia ambiental que ayude a disminuir el uso indiscriminado de bolsas de plástico y promover simultáneamente su reuso, además de buscar y desarrollar nuevas técnicas de biodegradación.

A lo largo del siglo XX se ha producido un gran incremento en el número y variedad de polímeros, en sus propiedades y aplicaciones, consiguiéndose desarrollar materiales de gran importancia en la ingeniería.

Como por ejemplo; la policaprolactona (PCL), material biocompatible, estable térmicamente y viable para formar "*blends*" o aleaciones con otros polímeros. La baja viscosidad de la PCL su alta permeabilidad al agua, al oxígeno y al CO<sub>2</sub> además de que sus propiedades mecánicas son comparables a las del polietileno de baja densidad, hacen de la PCL un buen candidato para mejorar las propiedades mecánicas de otros polímeros biodegradables, actuando como aditivo.<sup>1</sup>

El intervalo de degradación de la PCL es de 2 años, este tiempo puede ser disminuido si se forman copolímeros con otros monómeros, entre los monómeros destacan los láctidos pero también se hacen copolímeros de bloque de PCL-co-

PGA (MONOCRYL®), que ofrecen una menor rigidez comparada con el homopolímero PGA puro.

Existen en el mercado mezclas de PCL con almidón tales como Mater-Bi® que se usan para producir películas, artículos inyectados, productos termoformados. Este polímero es de uso frecuente como un añadido para que las resinas mejoren sus características de proceso y sus características de uso final (resistencia de impacto).

Las aplicaciones de la PCL son muy amplias, algunas de ellas son en la producción de bolsas biodegradables, revestimientos superficiales, adhesivos, industria automotriz (componentes de la suspensión), industria del calzado, suturas, sistema de liberación controlada de medicamentos, piezas ortopédicas, impresiones dentales, entre otros.

La síntesis de la PCL se lleva a cabo por PAA, se trata de una polimerización térmica basada en una reacción de apertura de anillo que es catalizada por un compuesto organometálico. Debido a que algunos catalizadores organometálicos son altamente tóxicos para el ser humano, hacen de la catálisis enzimática una alternativa limpia.

El uso de enzimas como catalizadores permite que las reacciones se lleven a cabo en condiciones suaves de operación, además de que no necesariamente se necesita la total separación del polímero.

Los estudios de catálisis enzimática en su mayoría utilizan disolventes orgánicos, una gran desventaja de estos disolventes es que son líquidos inflamables y volátiles, que afectan el medio ambiente, por ejemplo en el *smog* fotoquímico. Por otro lado el uso de fluidos comprimidos, como por ejemplo el R-134a que es considerado como no tóxico ni inflamable, considerado como seguro y aprobado para uso farmacéutico ofrece una alternativa limpia para llevar a cabo la polimerización de la PCL.

El presente trabajo tuvo como objetivo llevar a cabo la polimerización enzimática de la PCL, usando como biocatalizadores la Novozym 435 y la CalB(C-LECTA) en diferentes medios de reacción como el tolueno y R-134a líquido y comparar los resultados obtenidos con una polimerización en masa.

### ***II. ANTECEDENTES.***

#### ***II.i. Polímeros.***

Los polímeros son macromoléculas construidas mediante la unión de moléculas más pequeñas unidas por enlaces covalentes. Las moléculas que se combinan entre sí para formar un polímero se denominan monómeros y las reacciones por las que se combinan se denominan polimerizaciones.<sup>2</sup>

Los polímeros pueden clasificarse de acuerdo a su origen en:

- Polímeros naturales: celulosa, seda, proteínas, hule.
- Polímeros semisintéticos: nitrato de celulosa, caucho vulcanizado.
- Polímeros sintéticos: poliestireno, polietileno, nylon.

Las reacciones a través de las cuales se obtienen los polímeros se denominan reacciones de polimerización y se dividen principalmente en dos grupos.

Polimerizaciones de condensación donde la unión de los monómeros requiere de la formación de una molécula pequeña, normalmente de agua.

Polimerizaciones de adición son reacciones donde el monómero presenta un doble enlace y la unidad estructural es la misma que la del monómero.

#### ***II.i.a. Características de los polímeros.***

Cada polímero tiene una estructura determinada que está relacionada con sus propiedades. La composición, la arquitectura, el tamaño, la orientación, la cristalinidad, entre otros, afectan la flexibilidad, la temperatura de transición vítrea, la dureza, la retención de humedad del polímero, por citar algunas.

Por ejemplo, el nylon-66 tiene un punto de ebullición muy alto (265°C), esto es resultado de una combinación de fuerzas de enlaces de hidrógeno, fuerzas de London y de dipolo-dipolo entre las cadenas de poliamidas.<sup>3</sup>

La estructura de los polímeros puede ser dividida en lineal, ramificada y entrecruzada.

Un polímero lineal no tiene ramificaciones esta formado por cadenas sencillas que son flexibles. Un polímero lineal generalmente es clasificado como termoplástico y es soluble en algunos disolventes. Algunos ejemplos de polímeros lineales son: polietileno (HDPE), poliestireno, polipropileno, nylon 66 (Fig.1).

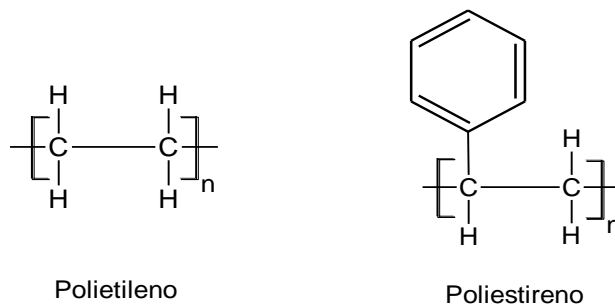


Figura 1. Ejemplos de polímeros lineales.

Un polímero ramificado tiene cadenas laterales extendidas a partir de una cadena principal, estas ramas son el resultado de las reacciones locales que ocurren durante las síntesis del polímero (Fig.2).<sup>4</sup>

Una propiedad importante que se modifica en estos polímeros, con la presencia de ramificaciones, es la disminución de la cristalinidad.

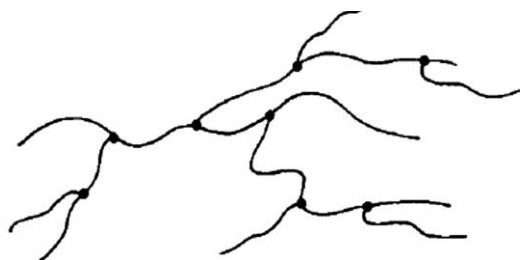


Figura 2. Ejemplo de una estructura ramificada.

Un polímero entrecruzado tiene cadenas lineales adyacentes que se unen transversalmente en varias posiciones mediante enlaces covalentes. Este entrecruzamiento se realiza durante la síntesis o por la adecuada selección de monómeros (Fig.3).<sup>4</sup>

Estos polímeros son generalmente insolubles ya que el solvente no penetra en el polímero, además son particularmente rígidos debido a que sus cadenas estructurales no permiten movilidad entre ellas.

Esta capacidad mecánica puede ser modulada en función del grado de entrecruzamiento del polímero.

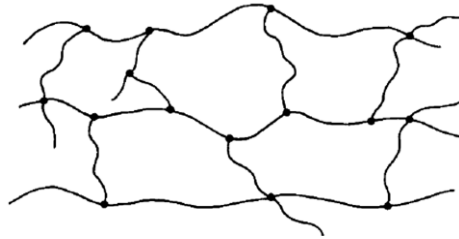


Figura 3. Representación de un polímero entrecruzado.

Algunas de las propiedades de los polímeros, como por ejemplo la resistencia mecánica, la elasticidad de los cauchos, la temperatura de transición vítrea de plásticos amorfos o la temperatura de fusión de fibras y materiales semicristalinos, se deben al alto peso molecular de los mismos.

Se suele utilizar el término peso molecular para determinar el tamaño de la molécula. Los polímeros están formados por una mezcla de moléculas que han alcanzado diferente grado de polimerización, y por tanto, diferente peso molecular. El polímero contiene moléculas que poseen longitudes de cadena muy diferentes; de modo que siempre se encontrará con una distribución de pesos moleculares (Fig.4).

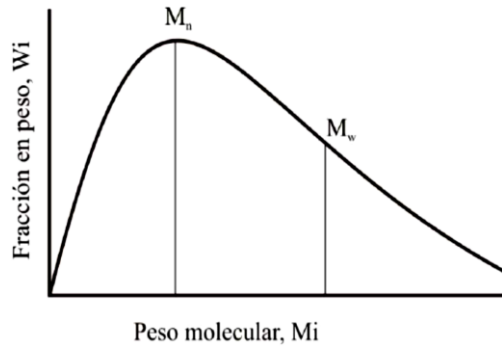


Figura 4. Distribución de pesos moleculares en un polímero.

Los valores medios más importantes utilizados para representar el peso molecular de un polímero son el promedio en número,  $M_n$  (media aritmética):

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

Y el promedio en peso  $M_w$  (media cuadrática):

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

donde  $N_i$  representa el número de moles de las especies  $i$  de peso molecular  $M_i$ .

La relación  $M_w/M_n$  se utiliza como medida de la heterogeneidad de la distribución del peso molecular de un polímero y se conoce como índice de polidispersidad (PDI). Si las cadenas poliméricas de una muestra fueran todas de una misma longitud se podría decir que:

$$\bar{M}_n = \bar{M}_w = \bar{M}_z$$

indicando que el polímero es monodisperso.

$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

Cuando el valor de PDI es mayor se dice que el polímero es polidisperso.

La estereoquímica de un polímero nos indica el orden de los sustituyentes en la cadena principal, esto es conocido con el nombre de tacticidad, que permite una mejor interpretación de la relación entre cristalinidad y estructura del polímero. Hay diferentes tipos de orden; si todos los grupos R están situados en el mismo lado de la cadena, es una configuración isotáctica, si los grupos R alternan las posiciones en la cadena, es sindiotáctica, finalmente si los grupos R en la cadena son aleatorias se denomina atáctica (Fig.5).

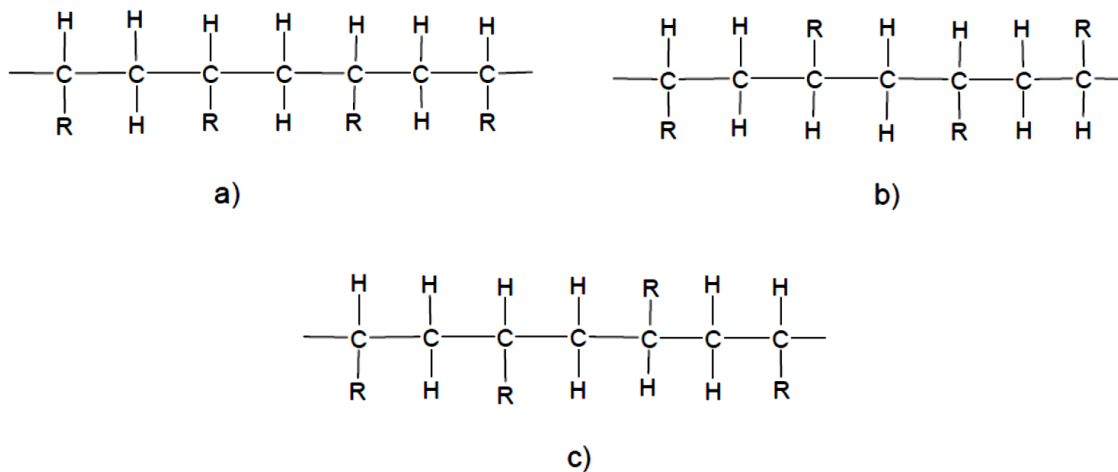


Figura 5. a) isotáctica, b) sindiotáctica, c) atáctica.

El tipo de configuración también condiciona el comportamiento del material. Por ejemplo, el polipropileno isotáctico es un polímero semicristalino comercial que se utiliza como plástico y como fibra. El polipropileno atáctico es amorfo, tipo cera, sin consistencia para su uso como material plástico. Estos ejemplos dejan ver una vez más la influencia de la estructura del polímero sobre sus propiedades.

Esto da una consecuencia para hablar de los términos cristalino y amorfo, ya que el orden que presente el polímero definirá su estructura.

Los términos cristalino y amorfo se utilizan normalmente para indicar las regiones ordenadas y desordenadas de los polímeros, respectivamente. En estado sólido algunos polímeros son completamente amorfos, otros son semicristalinos y, dependiendo de las condiciones de cristalización, un polímero con capacidad de cristalizar puede ser amorfo o semicristalino (Fig.6).

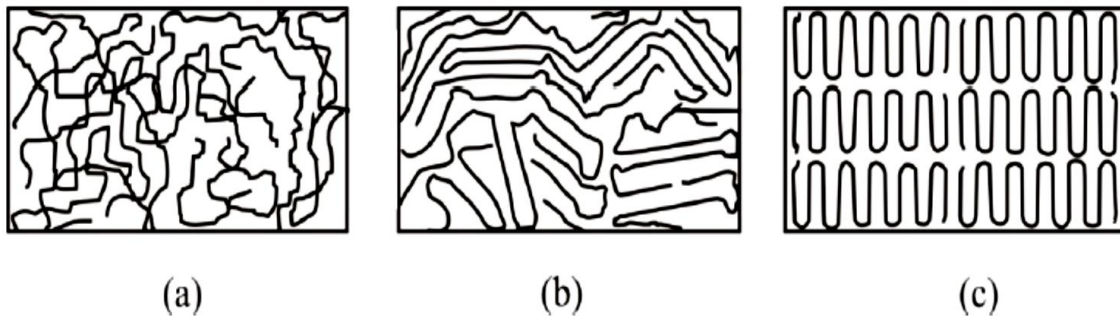


Figura 6. Sistemas: amorfo (a), semicristalino (b), cristalino (c).

Los polímeros con capacidad de cristalizar son aquellos cuyas moléculas son química y geoméricamente regulares en su estructura. Las irregularidades ocasionales, tales como las ramificaciones de la cadena, o la copolimerización de una pequeña cantidad de otro monómero limitan el alcance de la cristalización, pero no evitan que ocurra.

Los materiales termoplásticos son básicamente polímeros lineales o polímeros que tienen estructuras ramificadas con cadenas flexibles, pudiendo hacerse fluidos por calentamiento y tomar una forma determinada, forma que mantienen una vez fríos. Los termoplásticos son relativamente blandos y dúctiles. Al ser calentados, la forma que toman puede repetirse, en principio, indefinidamente por lo que se les considera reciclables, pero una degradación irreversible se produce cuando la temperatura del fundido se eleva hasta el punto que las vibraciones moleculares son tan violentas que se rompen los enlaces covalentes.

Por otro lado, los materiales termoestables, debido a su estructura entrecruzada, no funden y son insolubles. Los polímeros termoestables generalmente son más



duros, más resistentes y más frágiles que los termoplásticos y tienen mejor estabilidad dimensional. La gran mayoría de los polímeros de adición son termoplásticos.

Entre los polímeros de condensación, algunos son termoplásticos (poliamidas, policarbonatos, poliésteres lineales, poliuretanos lineales) y otros típicamente termoestables (poliésteres insaturados, resinas epoxi, resinas fenólicas).

### ***II.ii. Tipos de polimerización.***

Las primeras clasificaciones fueron hechas por Carothers en 1929<sup>2</sup> y las dividió en dos grupos principalmente; polimerización de condensación y polimerización de adición.

#### ***II.ii.a. Polimerización por condensación.***

La polimerización por condensación o de reacción por etapas es la formación de un polímero que emplea monómeros polifuncionales que generalmente originan un subproducto de bajo peso molecular, como el agua. La reacción continúa hasta que casi toda la totalidad de uno de los reactivos ha sido utilizada.

Un ejemplo de una polimerización por condensación es la síntesis de un poliéster entre un diol y un diácido. El primer paso es el ataque nucleofílico al grupo funcional de uno de los monómeros para formar un dímero (Fig. 7).

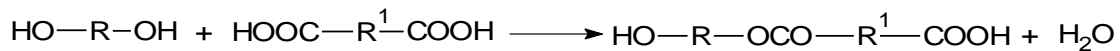


Figura 7. Etapa de iniciación entre un diol y un diácido.

El segundo paso se da entre el monómero del diol y el dímero resultante, que reaccionan para formar un trímero (Fig. 8).



Figura 8. Reacción entre un diol y un dímero.

Pero también el dímero y el monómero del diácido pueden reaccionar para formar un trímero (Fig. 9)

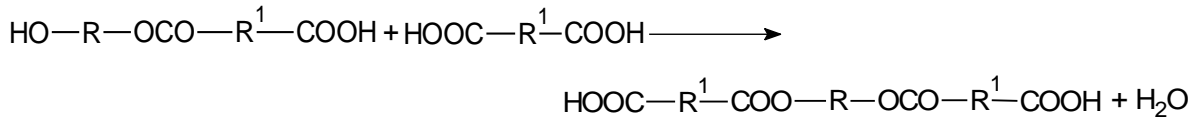


Figura 9. Reacción entre un dímero y un diácido.

Los dímeros pueden reaccionar con ellos mismos para formar un tetrámero (Fig. 10).

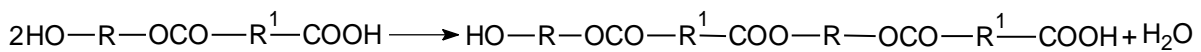


Figura 10. Reacción entre dímeros para formar un tetrámero.

El tetrámero y el trímero reaccionan entre ellos mismos, uno con el otro y con monómeros y dímeros. Así sucede de manera repetitiva hasta formar un polímero de cierto peso molecular.

### ***II.ii.b. Polimerización por adición.***

La polimerización por adición o reacción en cadena es generalmente el resultado de la apertura del doble enlace existente en muchos monómeros insaturados. La ruptura de este doble enlace está condicionada por la estructura del monómero, las condiciones de la reacción y sobre todo, por la acción de un iniciador.

Estas reacciones a su vez pueden dividirse en polimerizaciones vía radical libre y polimerizaciones iónicas (catiónica o aniónica).

### ***II.ii.c. Polimerización vía radicales libres.***

Este tipo de polimerización comienza con una molécula llamada iniciador que mediante la acción de la luz o el calor rompe un enlace. Cuando la molécula se

rompe aparecen dos fragmentos de iniciador, cada uno con un electrón desapareado. Estos fragmentos reciben el nombre de radicales libres. Estos electrones desapareados buscarán aparearse, por ejemplo el etileno tiene un par electrónico que es muy susceptible a ser atacado por un radical libre, formándose un nuevo enlace químico entre un fragmento del iniciador y un carbono del monómero, quedando de nuevo un radical libre. Los iniciadores más usados son los peróxidos, los hidroperóxidos y los sistemas redox entre otros. Además de esta primera etapa de iniciación, ocurren la de propagación y terminación.

### ***II.ii.d. Polimerización aniónica.***

Este tipo de polimerizaciones se basa en la ruptura del doble enlace de los monómeros, dependiendo del iniciador empleado la polimerización pueden ser aniónica o catiónica.

En la polimerización aniónica el proceso comienza por medio de un iniciador, los más usados son los compuestos organometálicos (butil litio), las fosfinas, los hidróxidos metálicos. Este iniciador se rompe para formar un anión y donar un par de electrones a uno de los átomos de carbono del monómero, formándose un carbanión.

El carbanión reacciona ahora con otra molécula de monómero exactamente de la misma manera en que el iniciador reaccionó con la primera molécula monomérica; por lo tanto se genera otro carbanión. Este proceso sigue sucediendo con el tiempo y cada vez que se agrega otro monómero a la cadena en crecimiento, se genera un nuevo anión, permitiendo la incorporación de otro monómero. Así es como crece la cadena polimérica. La adición sucesiva de monómeros se denomina propagación.

Los mecanismos de terminación de este tipo de polimerizaciones son distintos ya que la reacción podría seguir indefinidamente hasta que el monómero desaparezca, pero puede seguir reaccionando si se le adiciona más monómero.

El proceso de terminación se puede conseguir adicionando sustancias que acaben con las especies activas. Por ejemplo la adición de alcoholes o agua, o bien la

espontanea que se basa en la eliminación de un hidruro, dejando al polímero con carga neutra.

### ***II.ii.e. Polimerización catiónica.***

En este tipo de polimerización el iniciador es un catión que se unirá a un monómero, la sucesiva adición de más moléculas de monómero formaran la cadena polimérica.

El iniciador es el complejo que se forma al reaccionar un ácido de Lewis con una molécula de  $H_2O$ . Los ácidos más usados son  $AlCl_3$ ,  $SbCl_5$ ,  $SnCl_4$ ,  $TiCl_4$ ,  $FeCl_3$  y  $ZnCl_2$ . Este iniciador atraerá un par de electrones, con carga negativa, del doble enlace carbono-carbono, esto deja a uno de los carbonos del doble enlace deficiente de electrones, portando una carga positiva (iniciación).

El carbocatión formado reacciona con una segunda molécula de monómero, del mismo modo que hizo el iniciador cuando reaccionó con el primer monómero, formándose un nuevo carbocatión que sigue uniéndose con más monómeros hasta obtener una larga cadena polimérica (propagación).

El mecanismo de terminación puede ocurrir de varias maneras. Una de ellas es conocida como transferencia de cadena, donde los hidrógenos de un grupo metilo del carbocatión son atacados por una molécula de monómero, quedando la cadena neutra con un doble enlace terminal y un nuevo carbocatión. Así la cadena polimérica dejara de reaccionar, pero el nuevo carbocatión podrá comenzar una nueva cadena.

### ***II.ii.f. Polimerización por apertura de anillo.***

La polimerización por apertura de anillo es una de las rutas por la cual muchos polímeros de utilidad pueden ser sintetizados. En este tipo de polimerización se utilizan monómeros cíclicos que cuenten con grupos funcionales que sean susceptibles al ataque nucleofílico o electrofílico por parte de aniones o cationes, los cuales actuarán como iniciadores y propiciarán la apertura del anillo. Por esta

vía se pueden polimerizar una amplia variedad de monómeros cíclicos tales como éteres, acetales, amidas, ésteres (lactonas), entre otros (Fig. 11).<sup>2</sup>

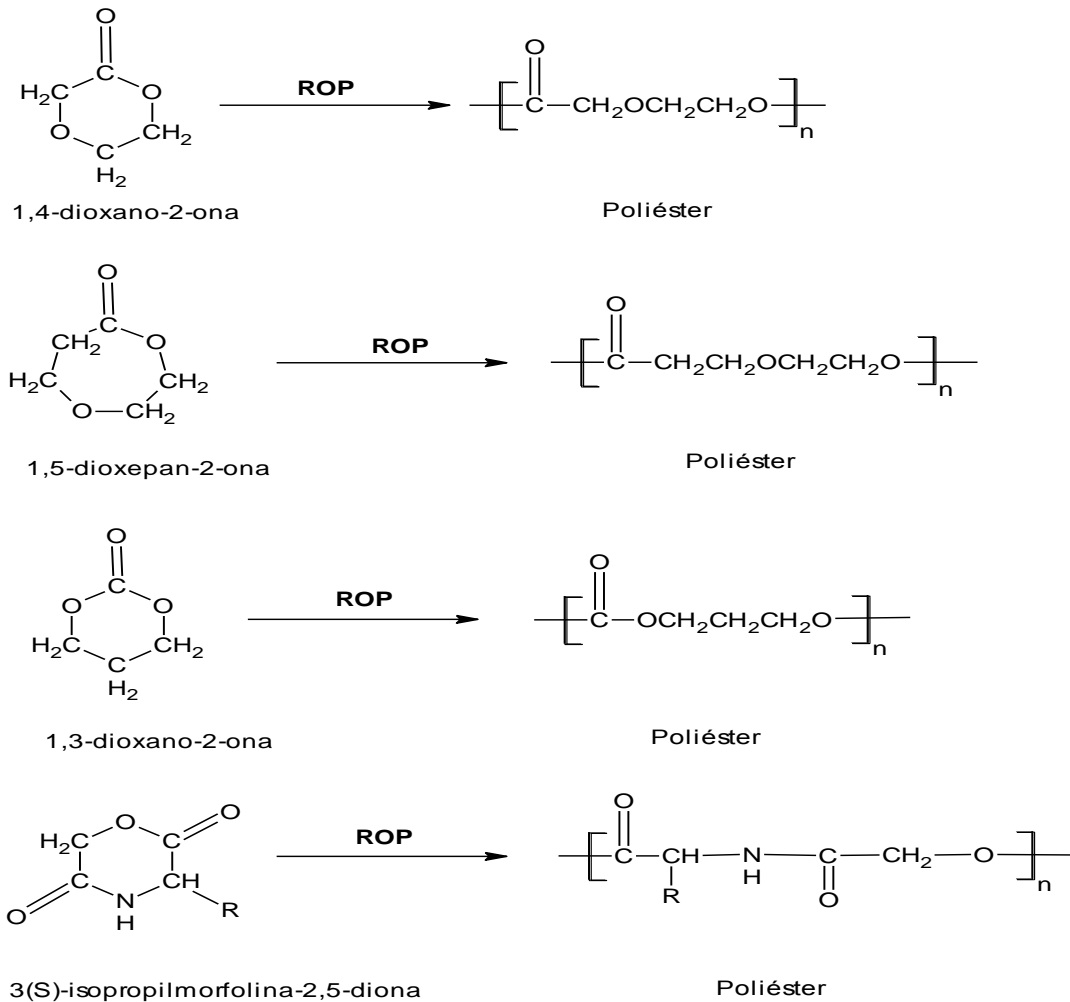


Figura 11. Polimerización por apertura de anillo de algunos monómeros.

El uso de compuestos derivados de aluminio, litio, magnesios conocidos como compuestos organometálicos, son usados como catalizadores para este tipo de polimerización.

Una desventaja de usar estos catalizadores, es su alta toxicidad hacia el medio ambiente, además de que es difícil su total eliminación del polímero, un aspecto relevante si se desean utilizar en la biomedicina.

La polimerización enzimática ofrece una vía alternativa para llevar a cabo este tipo de polimerización, debido a que las enzimas no son tóxicas y pueden ser

removidas fácilmente del polímero, además de que pueden ser reutilizadas (Fig:12.)

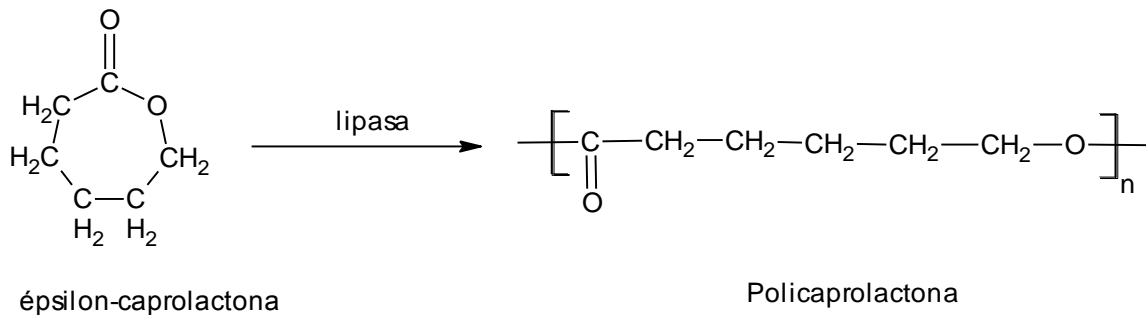


Figura 12. Polimerización por apertura de anillo de la CL catalizada por lipasas.

Uno de los requisitos más importantes para que se lleve a cabo la PAA usando enzimas es la presencia de una pequeña cantidad de agua, que es inicialmente proporcionada por el sitio catalítico de la lipasa, progresivamente el agua es producida por la misma reacción aumentando la cantidad en el sistema y favoreciendo la reacción inversa, conocida como la hidrólisis del polímero.

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

### ***II.iii. Polímeros biodegradables.***

En cuatro décadas la generación de residuos sólidos municipales se incrementó nueve veces y su composición cambio de mayoritariamente orgánica, fácilmente integrable a los ciclos de la naturaleza, a múltiples elementos, cuya descomposición es lenta y requiere de procesos complementarios para efectuarse. Cifras oficiales reportan que en el país se producen 9 mil millones de toneladas de plástico y que solo cerca del 1% se recolecta para su reutilización, dejando la

mayor cantidad contaminando bosques y ríos, y ya que los microorganismos no tienen mecanismos para degradar el plástico, existirán por lo menos 100 años, que es el tiempo que tardan en degradarse químicamente.

Estos y muchos otros factores nos han llevado a la necesidad de investigar y producir materiales de fácil y rápida biodegradación.

Los polímeros biodegradables son aquellos donde ocurre una degradación, es decir, un cambio en su estructura química que modifica sus propiedades, esta degradación ocurre por la acción metabólica de microorganismos como hongos, algas o bacterias.<sup>5</sup>

Hace ya más de 20 años que el primer plástico biodegradable se introdujo en el mercado, pero sin una aceptación inmediata, debido principalmente a las escasas evidencias de biodegradabilidad. A partir de entonces, la biodegradabilidad debe ser cuidadosamente demostrada, creándose diversos comités para la estandarización de ensayos de degradación. Entre estos pueden citarse las normas norteamericanas (ASTM D5209-92, D5210-92, D5247-92, D5338-92 y D5271-93), japonesas (JIS K6950-94) y europeas (CEN TC261/SC4/WG2).

El uso de los biomateriales se ha extendido a varios campos como la industria y la medicina.

### ***II.iii.a. La PCL como material biodegradable.***

La PCL se prepara comercialmente mediante una polimerización por apertura de anillo de la correspondiente lactona, la *épsilon*-caprolactona (CL). El polímero es semicristalino, presenta un bajo punto de fusión (57°C) y una baja temperatura de transición vítrea (-60°C). Es estable térmicamente y compatible con otros polímeros para la formación de mezclas o aleaciones.

La PCL se degrada fácilmente por hidrólisis de sus enlaces éster. El proceso de degradación inicia con una rotura de las cadenas moleculares, de forma que disminuye el peso molecular. La PCL puede degradarse en un período comprendido entre dos y cuatro años, pero la rapidez de degradación se puede aumentar por copolimerización con poli (ácido láctico) o poli (ácido glicólico), o por adición de ácido oleico o aminas terciarias, que catalizan la reacción de hidrólisis.

Existen varios factores que pueden influir en la rapidez de degradación, el tipo de enlace químico, el acceso que tengan las enzimas u otras moléculas capaces de romper estos enlaces químicos, el pH, su morfología, la cristalinidad y el más importante: la higroscopicidad. El peso molecular es el parámetro más ampliamente aceptado para evaluar la degradación.

La menor rapidez de degradación de la PCL le confiere una capacidad como sistema liberador de fármacos en aplicaciones que no pueden ser cubiertas por otros polímeros más degradables como la polilactida. A pesar de su versatilidad, el uso de la policaprolactona es predominante en aplicaciones de liberación controlada de fármacos. No obstante, en los últimos 5 años también ha sido propuesto para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

### ***II.iv. Enzimas.***

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, debido a su origen natural han sustituido a los catalizadores basados en metales para polimerizar diferentes monómeros.<sup>6</sup>

Las enzimas tienen algunas características importantes como por ejemplo

- Son los catalizadores más eficientes, aceleran las reacciones y se distinguen por su especificidad.
- Las reacciones catalizadas por enzimas proceden en condiciones leves de reacción, es decir, temperatura, presión y pH.
- Las enzimas se pueden utilizar en polimerizaciones en masa, en medios orgánicos y en distintas interfaces.
- Las enzimas se derivan de los recursos renovables, además son materiales reciclables no tóxicos y amistosos al medio ambiente. Por lo tanto, la necesidad de su completa eliminación de los polímeros no es necesaria.
- Polímeros con estructuras bien definidas pueden ser formados por procesos catalizados por enzimas.



Otras características que diferencian a las enzimas de los catalizadores químicos, son que las enzimas pueden saturarse por sustrato y tienen capacidad para regular su actividad. Por lo general, la molécula de enzima es mucho mayor que la del sustrato por lo que sólo una pequeña parte de la enzima está implicada en la formación del complejo; esta región que interacciona con el sustrato y en la que tiene lugar la reacción, se denomina sitio activo de la enzima. El sitio activo es un dominio tridimensional de la enzima con una distribución única de sus grupos que posibilita la unión hacia un sustrato específico. Dichos grupos de la enzima no tienen por qué ser necesariamente consecutivos en la secuencia de la proteína y reciben el nombre de centros catalíticos.<sup>7</sup>

Las enzimas se clasifican con base en el tipo de reacción química que catalizan. Se dividen en 6 grupos principalmente: Oxireductasas, Transferasas, Liasas, Isomerasas, Ligasas y finalmente Hidrolasas, a este grupo pertenecen las lipasas usadas en este trabajo.

Las hidrolasas intervienen en reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos (C-O, C-N, C-C), es decir, hidrólisis de enlaces estéricos, glucosídicos y peptídicos.<sup>8</sup>

### ***II.iv.a. Lipasas.***

Las lipasas, en seres vivos catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos. Además las lipasas son adecuadas para la resolución cinética de alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres en agua como en disolventes orgánicos.<sup>9</sup>

Las lipasas no requieren la exclusión del agua y el aire cuando se utilizan como catalizadores para la síntesis de poliéster. Esto es en contraste con el uso de catalizadores organometálicos tradicionales donde se deben tomar precauciones estrictas para excluir del sistema el aire y el agua.

Las lipasas han demostrado tener la capacidad de polimerizar lactonas de anillos grandes en condiciones normales de polimerización.<sup>10</sup>

Independientemente del origen de la lipasa por lo general todas muestran una estructura globular similar. Todas las lipasas son miembros de la familia  $\alpha/\beta$

hidrolasa, con una arquitectura común compuesta por una secuencia específica de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -hebras. El sitio activo se compone de un residuo de serina nucleófilo (Ser), activado por un enlace de hidrógeno en comunicación con histidina (His) y aspartato (Asp) o glutamato (Glu); que constituye la triada catalítica de una lipasa.<sup>6</sup> y que es la base de la especificidad.<sup>8</sup> (Fig.13).

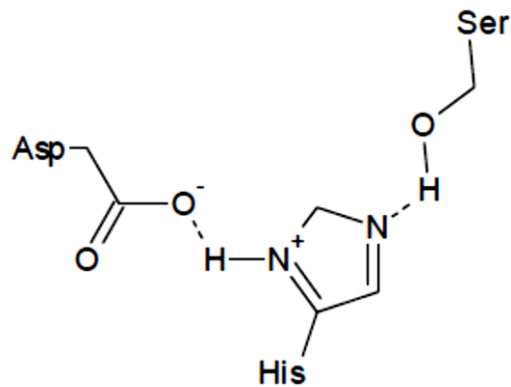


Figura 13. Sitio activo de una lipasa

Una característica estructural única que es común en la mayoría de las lipasas es una “tapa”, un fragmento en hélice con cerca de 20 aminoácidos, el cual cierra el sitio activo de la enzima. Esta “tapa” controla la actividad dependiendo del medio, bajo ciertas condiciones, la “tapa” se abre exponiendo el sitio activo, dando lugar a una estructura catalíticamente activa favoreciendo la interacción de la enzima con el sustrato.<sup>11</sup>

En 1966 Dastoli y Price, observaron por primera vez que algunas enzimas son activas en disolventes orgánicos y en 1984 Klivanov, demostró que algunas hidrolasas pueden ser más activas y estables en disolventes no acuosos.<sup>9</sup>

Gross et. al., modificó el residuo serina<sub>105</sub> de la Novozym-435 por reacción con paraoxón (dietil p-nitrofenil fosfato). La enzima modificada, habiendo inhibido irreversiblemente el residuo de serina, no pudo iniciar la polimerización de la CL. Por lo tanto concluyeron que la polimerización catalizada por esta lipasa, procede por catálisis en el residuo activo de la serina y no por otros factores que participan en el proceso.<sup>6</sup>

Las lipasas necesitan de moléculas de agua para retener su estado conformacional tridimensional activo y poder interactuar con el sustrato, pero un exceso de agua en el presente caso de síntesis de poliéster favorecería la reacción inversa, es decir, la hidrólisis del poliéster.

En general las lipasas muestran baja actividad en disolventes orgánicos hidrofílicos debido a la partición de agua en el medio y la subsecuente desactivación por pérdida de la estructura proteica activa. Sin embargo, los disolventes hidrófobos permiten la retención de las moléculas de agua en el sitio activo garantizando así la actividad enzimática.

Algunas investigaciones han llegado a la conclusión de que el contenido de agua en la lipasa y no la temperatura es la que determina el  $M_n$  y rendimiento del producto.<sup>12</sup>

Además de la cantidad de agua existen otros factores que pueden modificar la actividad de la enzima entre ellos la temperatura, el pH y el disolvente.

Las enzimas se desnaturalizan a temperaturas elevadas ( $> 100\text{ }^\circ\text{C}$ ), perdiendo su actividad catalítica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un aumento de la temperatura favorece la rapidez de reacción por el efecto termocinético, pero si esta temperatura es muy grande desnaturaliza la enzima perdiendo su actividad.

La temperatura óptima de las enzimas esta entre un intervalo de  $30$  a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ .

Las enzimas tienen un pH óptimo que es un valor característico para cada enzima y expresa que en ese valor la enzima se encuentra en su conformación más activa. El pH modifica el estado de disociación de los grupos presentes en la enzima o en el complejo enzima-sustrato. Un cambio en el pH confiere un cambio estructural de la enzima y por lo tanto una baja actividad. Este parámetro es afectado cuando se utilizan soluciones acuosas dependientes del pH, pero en disolventes orgánicos no aplica.

Los disolventes influyen sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas, afectando también las interacciones entre la enzima y el sustrato. La polaridad del disolvente orgánico empleado para reacciones de esterificación puede afectar la actividad catalítica al distorsionar la capa esencial de agua que estabiliza al biocatalizador.

El concepto que define la polaridad de un disolvente es el coeficiente de partición ( $\log P$ ), que expresa la solubilidad de una sustancia en un medio no acuoso respecto a uno acuoso (n-octanol/agua), dicho en otras palabras indica el carácter hidrófobo de una sustancia. Disolventes con altos valores de  $\log P$  ( $>4$ ) indican que es muy hidrófobo, y por lo tanto no podrá relacionarse con el agua presente en la enzima, evitando la desnaturalización y asegurando una alta actividad catalítica.

La actividad de las enzimas en disolventes orgánicos parece ser controlada por varios factores, por ejemplo: la estabilidad del sustrato y/o del producto y la enzima, la flexibilidad y polaridad del sitio activo (controlado por la cantidad de agua en el sitio activo), la extracción del agua contenida en la enzima que altera el delicado equilibrio de fuerzas no covalentes que mantienen la estructura nativa de la enzima, así como perturbaciones inducidas directamente sobre la enzima.

La rigidez estructural de las enzimas en disolventes orgánicos puede mejorar la regio-estereoselectividad.<sup>13</sup>

En la tabla 1 se muestra la relación que hay entre el  $\log P$  y la solubilidad en agua, comprobando que a altos valores de  $\log P$  los disolventes son inmiscibles en agua.

Tabla 1. Relación entre el coeficiente de partición ( $\log P$ ) y la solubilidad en agua de disolventes.

<b>Log P</b>	<b>Solubilidad en agua (20°C) (%wt)</b>
$\text{Log P} \leq 2$	$> 0.4$
$2 < \text{log P} < 4$	$0.04 - 0.4$
$\text{Log P} \geq 4$	$< 0.04$

En la tabla 2 se muestran algunos valores del coeficiente de partición de varios disolventes.

Tabla 2. Valores del log P de algunos disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b>Log P</b>
Hexadecano	8.8
Tetradecano	7.6
Dodecanol	5.0
Tetrahidrofurano	4.0
Hexano	3.5
Tolueno	2.7
Cloroformo	1.97
R-134a	1.06
Metanol	-0.821

Gross et. al., encontraron que disolventes con valores de log P de -1,1 a 0,49 mostraban una rapidez de propagación baja (30% de conversión de CL en 4 horas) dando productos con cadena corta ( $M_n \leq 5200$  g/mol). En contraste, disolventes con valores de log P de 1,9 a 4,5 mostraron una mayor rapidez de propagación y polímeros de mayor peso molecular ( $M_n = 11500-17000$  g/mol).<sup>15</sup>

En disolventes un valor de estudio es la constante dieléctrica, ya que un aumento en la constante del medio implica un aumento de las interacciones electrostáticas con los residuos cargados de la enzima, lo que puede conducir a la pérdida de flexibilidad interna de esta última.<sup>14</sup>

Por todo lo anteriormente mencionado se puede concluir que las propiedades del disolvente orgánico así como la cantidad de agua presente en el sistema determinan la actividad de la enzima y juegan un papel importante en el sistema de reacción y en la eficiencia del biocatalizador.

### ***Actividad enzimática en Tolueno.***

El tolueno es un líquido incoloro utilizado como disolvente en síntesis orgánicas. Disolvente no polar, que a 25°C es muy poco soluble en agua (0.515 kg/m<sup>3</sup>) y tiene una viscosidad de 0.6 cP, además presenta una constante dieléctrica de 2.4 KHz, y un momento dipolar de aproximadamente 0.4D.

El uso del tolueno como disolvente para polimerizaciones enzimáticas ha sido ampliamente estudiado, siendo el disolvente preferido, ya que los resultados obtenidos son superiores respecto a otros disolventes que debieran reportar mejores resultados.

Gross et. al., investigaron el efecto de varios disolventes en la polimerización de la CL catalizada por Novozym-435, entre ellos el tolueno. Los resultados demostraron que la mayor rapidez de reacción y productos con altas masas moleculares ( $M_n=44,800$  g/mol) se obtuvieron utilizando tolueno e isooctano. Al parecer el tolueno puede estabilizar la Novozym-435.<sup>15</sup>

Las condiciones a las que se obtuvieron estos resultados son en una proporción de disolvente/monómero de 2:1, a 70 °C por 4 horas.

Algunas veces los resultados no son lo que se espera, por ejemplo: el tolueno con un valor de log P igual a 2.5 obtuvo un alto peso molecular ( $M_n=15,000$  g/mol y un rendimiento del 80%), respecto al dibutil éter con un log P igual a 2.9 que obtuvo un  $M_n= 12,900$  g/mol con un rendimiento del 60%.<sup>22</sup> En estos casos el coeficiente de partición (log P) no es suficiente para explicar estos resultados, se debe de profundizar en otros factores como la geometría del disolvente, el momento dipolar, la solubilidad de los sustratos y otros factores que influyen en las propiedades catalíticas y fisicoquímicas de la enzima.

Otros resultados obtenidos con tolueno como disolvente son pesos moleculares ( $M_n$ ) que van desde los 3,200 g/mol hasta los 44,800 g/mol y porcentajes de conversión de 44-99% con diferentes condiciones de reacción.<sup>15</sup>

### ***Actividad enzimática en R-134a.***

El R-134a es un disolvente que ha ganado espacio en las investigaciones para polimerizaciones de lactonas, debido a que no es inflamable, ni tóxico, no destruye la capa de ozono y es reconocido como seguro (GRAS), con un momento dipolar de 2.05D y una constante dieléctrica de 9.5 KHz, tiene baja viscosidad (0.21cP a 25°C), con una solubilidad en agua de 0.15 Kg/Kmol a 25°C, miscible en la mayoría de disolventes orgánicos pero inmisible en agua, tiene un coeficiente de partición de 1.06, reportado como hidrófobo y con un pH neutro.

El R-134a es gas a temperatura y presión ambiente con un punto de ebullición de -26°C, una temperatura crítica de 101.1°C y una presión crítica de 40.67 bar. Manejado normalmente como gas comprimido bajo presión en forma líquida con una densidad líquida de 1.3 kg/l a 25°C. Requiere de bajas presiones para convertirse en líquido (<2 MPa), Su baja tensión superficial (8.7 din/cm a 25°C) y baja viscosidad son propiedades que permiten una humectación y penetración rápida en la matriz del soluto.<sup>16</sup>

Estudios sobre la estabilidad y la actividad de la Novozym 435 en R-134a líquido, indicaron que el desarrollo de las lipasas en este medio dio incrementos en la actividad de la enzima de 300% a una presión de 4 MPa y a 30°C después de 7 horas.<sup>12</sup> El R-134a a presiones bajas cambia sus propiedades como disolvente aumentando su polaridad y esto hace que la actividad de la enzima se reduzca. La investigación sobre los efectos de la temperatura fueron en un rango de 30-60°C, resultando que la enzima conservó su actividad en R-134a hasta una temperatura de 60°C, una discrepancia se observó cuando a 40°C el rendimiento fue de 70.24% y para 60°C fue de 58.24%. Debido a que la disminución de la conversión no pudo deberse a la desactivación de la enzima, porque se comprobó que a esa temperatura todavía presentaba actividad, se puede explicar sobre la base que el

aumento de temperatura podría cambiar el equilibrio de la reacción a favor de la hidrólisis, reduciendo el rendimiento de esterificación. Cuando se modificaron los tiempos de incubación, después de 12 horas no hubo un cambio en la actividad de la enzima, se conservó estable con una actividad residual de 199%.<sup>17</sup>

García-Arrazola et. al., demostraron el uso del R-134a como disolvente para la síntesis de poliésteres catalizada por lipasas.<sup>18</sup> Usaron Novozym 435 y obtuvieron un peso molecular máximo ( $M_w$ ), un índice de polidispersidad y un porcentaje de rendimiento de 37,600 g/mol, 1.7 y 75% respectivamente. Las condiciones de reacción fueron de 2.5 MPa, 65°C y 24 horas.

El mayor rendimiento obtenido fue del 95% con un  $M_w= 35,600$  g/mol y un PDI=1.6 a las mismas condiciones de operación.<sup>18</sup>

En estudios posteriores se estudiaron los efectos de la actividad de agua inicial ( $a_{wi}$ ) sobre el rendimiento y el peso molecular de las lipasas en la síntesis de poliésteres usando R-134a, En estos estudios se varió la  $a_{wi}$  en un rango de 0.16 a 0.75. Algunos resultados sobresalientes se presentaron con una  $a_{wi}=0.22$  obteniendo un rendimiento del 99% y un  $M_n$  de 7,246 g/mol después de 48 horas de reacción. En contraste el biocatalizador con una  $a_{wi}<0.16$  dio un rendimiento del 67% con un  $M_n=83,600$  g/mol en 48 horas.<sup>19</sup>

### ***Mecanismo enzimático.***

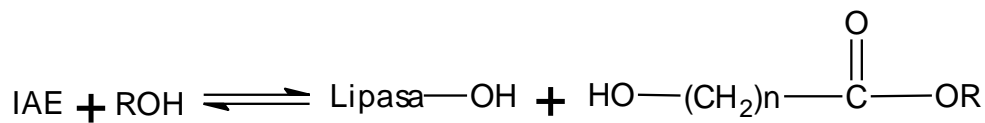
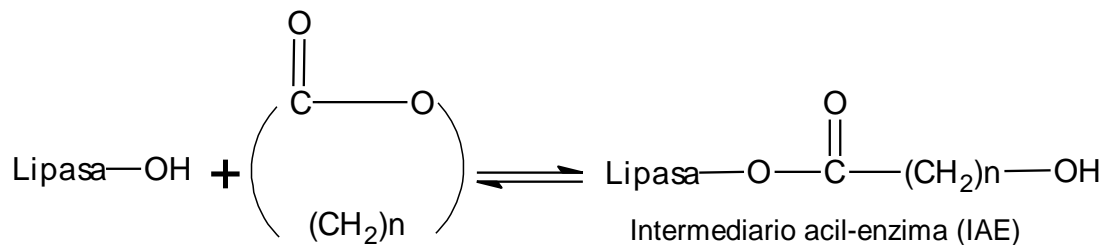
Anteriormente se ha mencionado que la “triada catalítica” de la lipasa, compuesta por un residuo de serina nucleofílico, es la responsable de la polimerización por apertura de anillo de lactonas, en la figura 14 se muestran los pasos que determinan el mecanismo de reacción en la polimerización por apertura de anillo de las lactonas.

El residuo de serina nucleofílico forma un complejo con la lactona, esto hace que el anillo de la lactona se abra para dar paso a la formación de un intermediario acil-enzima (IAE).



La iniciación es un ataque nucleofílico del agua, que se cree está dentro de la enzima, sobre el carbono acilo del IAE para producir un ácido ω-hidroxicarboxílico. En la etapa de propagación, ocurre un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo terminal de una cadena polimérica que se está propagando al carbonilo del IAE. Finalmente el complejo acil-enzima es hidrolizado dejando libre ya sea el polímero formado o el monómero en su forma libre.

Iniciación:



Donde, R = H, lactona abierta, oligómero o un polímero formado, n = número de unidades de metileno en la lactona.

Propagación:

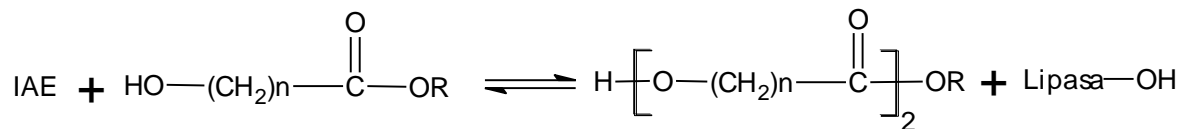


Figura 14. Mecanismo postulado para la polimerización catalizada por lipasas de lactonas.

### ***II.iv.b. La CalB.***

La *Candida antarctica* (Fig.15) es una levadura que puede producir dos diferentes tipos de lipasas la A y la B.

La CalB es una de las lipasas comerciales más utilizadas como biocatalizador para la polimerización enzimática por apertura de anillo, debido a su alta actividad y especificidad hacia el los sustratos lactónicos.

La cadena polipeptídica de la CalB está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es de aproximadamente 30x40x50 Å, su sitio activo está formado por Ser105-His224-Asp187, común a todas las serinas hidrolasas. Esta lipasa tiene una  $\alpha/\beta$  hidrolasa que es la “tapa” que cubre el sitio activo.<sup>20, 21</sup>



Figura 15. Lipasa B de *Candida antarctica*

La polimerización de la CL ha sido ampliamente estudiada usando diferentes enzimas y condiciones de reacción variables, los resultados más sobresalientes se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados que muestran la efectividad de varias enzimas en la síntesis de la PCL.<sup>6, 18</sup>

Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Medio	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	Rendimiento (%)
CA	60	4	masa	1,100	-	100
PPL	60	240	masa	1,300	-	95
CA	60	1	masa	1,300	-	96
CC	60	240	masa	1,900	-	92
PPL	75	480	masa	2,300	-	99
PPL	65	96	heptano	2,700	-	100
CC	75	1.5	masa	3,100	-	100
CC	45	240	heptano	3,200	-	97
N435	116	1.5	tolueno	3,200	-	41
N435	45	24	masa	4,100	-	95
PF	75	480	masa	12,000	-	99
CA	60	24	tolueno	15,600	-	55
N435	65	24	scCO <sub>2</sub>	35,000	54,000	98
N435	65	24	R-134a	-	35,600	95
N435	65	48	R-134a	-	37,600	75

CA o N435: *Candida antarctica* (Novozym 435), CC: *Candida cylindracea*, PF: *Pseudomonas fluorescens*, PPL: *Lipase pancreática porcina*.

### **Características de la Novozym 435.**

La lipasa B de *Candida antarctica* producida por Novozymes, empresa de origen danés, conocida comercialmente con el nombre de Novozym 435 y que su producción se realiza en la planta de producción de Novozymes en Brasil, con un peso de 33 kDa, un  $pI=6.0$  y una actividad específica reportada por Novozymes de 7,000 PLU/g. La Novozym 435 está inmovilizada físicamente en una resina Lewatit VP OC 1600 (Lanxess) que consiste en un copoli (metacrilato de metilo/divinilbenceno) con valores de tamaño de partícula promedio, área superficial y diámetro de poro de 315-1000 $\mu m$ , 130  $m^2g^{-1}$  y 150 Å respectivamente.

La inmovilización incrementa la estabilidad térmica al estabilizar la estructura terciaria de la proteína, facilita la remoción de la enzima de la mezcla de reacción permitiendo su reutilización. Al estar absorbida en un soporte sólido incrementa el área superficial de la enzima, previniendo su incorporación al disolvente orgánico, lo cual incrementa la actividad catalítica. Por otro lado, y no menos importante, el hecho de estar inmovilizada permite con mayor facilidad su recuperación y reuso, cosa que en el caso de este tipo de productos de gran valor económico es muy interesante.

La Novozym 435 es un buen catalizador en una gran variedad de reacciones enzimáticas debido a su alta estabilidad y reactividad.

### **Características de la CalB(C-LECTA).**

C-LECTA empresa de origen alemán proporciona enzimas personalizadas y produce cepas que son usadas en la biotecnología industrial.

Específicamente hablando de la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) se reportan las siguientes características del producto. Un peso molecular de 33kDa, con una actividad específica de >6000 LU/g, un punto isoeléctrico de 6.0  $pI$ , un pH óptimo de 7, un pH de estabilidad entre 3-10, una temperatura de estabilidad de la enzima de 60-80°C (en disolventes orgánicos no polares), y de 45-50°C (en sistemas

acuoso), estable en disolventes orgánicos polares y no polares. Puede ser usada en sistemas acuoso y no acuoso, para reacciones de esterificación, hidrólisis de ésteres y transesterificación, es regio y estereoselectiva. La enzima puede ser recuperada por filtración y reutilizarse varias veces. Es una enzima inmovilizada usada en síntesis orgánica, adsorbida en un soporte de metacrilato. Estable al menos durante 12 meses a una temperatura de 4°C.

### ***III. OBJETIVOS.***

#### ***III. i. Objetivo general.***

- Realizar la polimerización de la CL vía apertura de anillo usando diferentes lipasas en tolueno y en R-134a como disolventes.

#### ***III. ii. Objetivos particulares.***

- Realizar el estudio comparativo de los biocatalizadores comerciales CalB(C-LECTA) y Novozyme 435 para encontrar las mejores condiciones de reacción.
- Cuantificar y comparar el rendimiento de los polímeros obtenidos con los biocatalizadores utilizados, en diferentes medios de reacción.
- Determinar por GPC los pesos moleculares de los polímeros conseguidos.
- Caracterizar el polímero por DSC, TGA, Rayos X, RMN-H<sup>1</sup> y FTIR.

### **IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

#### **IV. i. Material.**

- Reactor de acero inoxidable de 40mL, con orificios para termopares y equipado con barómetro para verificar la presión.
- Chaqueta de calentamiento que se conecta a una caja reguladora y verificadora de temperatura.
- Parrilla con temperatura y agitación controlada (IKA RTC basic ETS-D4).
- Bomba de inyección de alta presión (ISCO corp. Modelo 100X)
- Tamiz Alfa Aesar con poro de 75 $\mu$ m.
- Baño de glicerina.
- Balanza analítica (OHAUS Analytic Plus, modelo AP2105).
- Bomba de vacío para solventes (Vacuubrand modelo PC3-RZS2.5).

#### **IV. ii. Reactivos.**

- Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre soporte acrílico poroso Lewatit®, Novozym 435 (Novozymes México S.A. de C.V.).
- Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (C-LECTA, Alemania).
- $\epsilon$ -caprolactona g.p. 99% Aldrich.
- Cilindro de R-134a (Dupont), proporcionado por Refacciones Star, México, con un 98% de pureza.
- Tolueno (Química Barsa).
- Estándares de Poliestireno (Polymer Laboratories, Varian, Inc.).
- Acetona grado industrial (Química Barsa).
- Cloroformo grado industrial (Química Barsa).
- Metanol grado industrial (Química Barsa).
- Tetrahidrofurano grado HPLC.
- Cloroformo grado HPLC de J. T. Bayer fue adquirido de Equipar S.A de C.V

### ***IV.iii. Síntesis de la PCL usando Novozym-435 como biocatalizador.***

Se ha reportado que las condiciones óptimas de polimerización de la CL con Novozym 435 se dan con un 35% v/v de CL con respecto al volumen del medio de reacción y un 10% p/v de peso de Novozym 435 con respecto al volumen de CL en  $scCO_2$ .<sup>12, 24</sup> En estudios anteriores se ha demostrado que la CalB inmovilizada tiene su temperatura óptima de catálisis a los 65°C. Bajo estas premisas, en un reactor de acero de 40mL, se colocó 14mL de CL, 1.4 g de enzima y un agitador magnético, el reactor se cerró para ser presurizado con R-134a. Se colocó una chaqueta de calentamiento al reactor, para elevar la temperatura hasta 65°C (Fig.16). La presión final del reactor fue de 25 bares.

Después de 24 horas se llevó el reactor a un cuarto frío (-5°C), al bajar la temperatura y la presión, se procedió a despresurizarlo abriendo las válvulas del reactor y así poder obtener el sólido de la reacción (Fig. 17).



Fig. 16. Imagen que muestra el reactor utilizado.

### ***IV.iii.a. Purificación del polímero.***

Los materiales del reactor se disolvieron en cloroformo, y esta mezcla se filtró en un tamiz para poder separar el polímero del biocatalizador.



La solución obtenida se vertió en metanol frío, en una relación 1:10, para precipitar el polímero, posteriormente se filtró en un embudo de porcelana y se secó al vacío.



Fig. 17. Imagen que muestra el sólido que se obtiene al despresurizar el reactor.

#### ***IV.iv. Síntesis de polímeros usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA), usando como disolvente tolueno.***

En un matraz equipado con un agitador magnético se colocó el monómero (1.75mL) con diferentes relaciones de biocatalizador con respecto al volumen de CL en 5mL de tolueno. Se burbujeó con  $N_2$  por unos minutos y se colocó el matraz en un baño de glicerina para llevarlo a una temperatura de  $65^\circ C$  por 24 horas en agitación.

Para precipitar el polímero se utilizó el mismo procedimiento antes descrito (IV.iii.a).

#### ***IV.v. Síntesis de polímeros usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA), en un reactor presurizado con R-134a.***

Se utilizó el mismo procedimiento experimental descrito en la sección IV. iii., para la producción de la PCL, con la única diferencia de que en esta parte se utilizó

como biocatalizador la CalB(C-LECTA). Igualmente para la precipitación del polímero se utiliza la metodología descrita en la parte IV. iii. a.

### ***IV.vi. Polimerización en masa.***

En un vial equipado con un agitador magnético se colocó 5mL de CL y 0.5g de enzima. Se colocó el vial en un baño de glicerina sobre una parrilla agitadora para llevarlo a una temperatura de 65°C por 71 horas en agitación.

Para precipitar el polímero se utilizó el mismo procedimiento antes descrito (IV.iii.a).

### ***IV.vii. Determinación de pesos moleculares por GPC/SEC (Cromatografía de permeación en gel).***

Las muestras fueron disueltas en cloroformo o tetrahidrofurano y filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 micras a los viales HPLC. Para este análisis se ocupó un cromatógrafo de líquidos HP 1050 con autosampler equipado con columnas de permeación en gel (GPC/SEC) y detector de difracción de luz evaporativa PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, EEUU). La fase móvil fue cloroformo o tetrahidrofurano, según el caso, con un flujo de 1mL/min. La curva de calibración se construyó con estándares de poliestireno que fueron disueltos de la misma manera y con el mismo disolvente que las muestras a analizar.

### ***IV.vii.a. Caracterización de las muestras.***

Las muestras fueron pulverizadas y etiquetadas para su caracterización, estos análisis se llevaron a cabo en la USAI (Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación).

### ***FT-IR.***

El análisis cualitativo se llevó a cabo en un espectrofotómetro FT-IR, modelo Spectrum 400 marca Perkin Elmer en la USAI.

### ***RMN-H<sup>1</sup>.***

El estudio de RMN-H<sup>1</sup> fue llevado a cabo en un espectrómetro de RMN marca Varian modelo VNMRS y MR (400MHz) en la USAI. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado. Y Analizadas con el programa SpinWords 3.1.

### ***Difracción de rayos X.***

El análisis de Rayos X (en polvo) fue llevado a cabo en un equipo Siemens D-5000, con una fuente de K $\alpha$  de Cu a  $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$  en la USAI. Para evaluar el porcentaje de cristalinidad se tomo el área total (cristalina + amorfa) y se restó la parte cristalina.

### ***Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico.***

El análisis térmico se realizó por dos técnicas de análisis, caloría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TG).

El DSC se utilizó para conocer las transiciones térmicas del polímero, fue llevado a cabo en un equipo Mettler Toledo (modelo 821°), con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, bajo una atmosfera de nitrógeno en un rango de temperatura de -100°C a 100°C.

Para determinar la estabilidad térmica por análisis termogravimétrico se utilizó un equipo Mettler Toledo (modelo TGA/SDTA851°), bajo una atmosfera de nitrógeno, la muestra se evaluó en un rango de temperatura de 25 hasta 250°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

## V. RESULTADOS

### V.i. Síntesis de la PCL usando como biocatalizador la CalB(C-LECTA).

Para obtener las mejores condiciones en la polimerización de la CL con esta nueva lipasa, se modificaron varios parámetros, entre ellos la cantidad en peso de biocatalizador (5, 10, 20 y 30%) y los tiempos de reacción (24, 48 y 72 horas). En la evaluación de la cinética realizada, se usó el tolueno como medio de reacción y se trabajó a una temperatura de 65°C. Los resultados encontrados son los siguientes:

### V. ii. Efecto del tiempo de reacción y biocatalizador sobre la PCL.

En esta primera parte experimental se utilizó el 5%p/v de biocatalizador. El tiempo fue el único parámetro que se modificó, llevándose a cabo reacciones con períodos de 24, 48 y 72 horas y los resultados obtenidos de la síntesis de la PCL se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los polímeros obtenidos utilizando un 5% p/v de biocatalizador.

Muestra	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	PDI
1	24	74	18,365	25,337	1.37
2	48	87	24,552	28,970	1.17
3	72	65	18,489	27,034	1.46

En los resultados obtenidos de la PCL utilizando el 5% p/v de biocatalizador se observó que hasta las 48 horas el rendimiento así como los pesos moleculares aumentaron, ocurriendo lo contrario a las 72 horas de reacción. La disminución de los valores a las 72 horas de reacción es posiblemente debido a un exceso de agua en el sistema que favoreció la reacción de hidrólisis del polímero haciendo que los valores de  $M_n$  y del rendimiento disminuyeran. Los mejores resultados se presentaron a las 48 horas de reacción con un rendimiento del 87%, un  $M_n=24,552$  g/mol y un  $PDI=1.17$

Cuando se incrementó la cantidad de enzima al 10% p/v los resultados fueron los siguientes:

Tabla 5. Resultados de los polímeros utilizando 10% p/v de biocatalizador.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b><math>M_n</math> (g/mol)</b>	<b><math>M_w</math> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
1	24	93	19,148	29,233	1.52
2	48	90	20,108	24,491	1.21
3*	72	75	15,789	22,497	1.42
3**	72	75	24,290	53,837	2.21

3\* Fracción de muestra disuelta en THF (1mg/3mL).

3\*\* Fracción de muestra disuelta en  $CHCl_3$  (1mg/2mL).

Un aumento en la concentración del biocatalizador aumentó la rapidez de polimerización, en este caso la cantidad de enzima utilizada (10%p/v) incremento el valor del rendimiento en un tiempo de reacción menor (24 horas) así como también sus pesos moleculares que fueron de  $M_n=19,148$  g/mol y  $M_w= 29,233$  g/mol. Un exceso de agua en el sistema hace que la hidrólisis se presente limitando el crecimiento del poliéster además de que provoca el rompimiento de las cadenas del polímero.<sup>12</sup> Una posible explicación del aumento de  $M_n$  a las 48 horas es el rompimiento de las cadenas del poliéster, que incrementa el número de estas, este aumento de  $M_n$  no pudo ser por la generación de más cadenas de polímero ya que se observa un menor rendimiento y un  $M_w$  menor, indicando que los pesos de los polímeros disminuyeron. Un PDI (1.21) menor como el mostrado a las 48 horas indica una homologación en el peso de las cadenas del polímero.

Cuando se realizó el análisis por GPC la muestra 3 requirió modificar la cantidad y el disolvente utilizado ya que el polímero no se disolvía completamente. Este comportamiento es porque la solubilidad del polímero en un determinado disolvente está determinada por factores como su peso molecular, su estructura química y su distribución siendo más fácilmente solubles las fracciones de bajo peso molecular. Empleando  $\text{CHCl}_3$  se consiguió solubilizar el material dando lugar a mediciones de pesos moleculares promedio más altos que en THF.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la PAA de la CL usando un 20% p/v de biocatalizador en tolueno.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la polimerización de la CL usando el 20% p/v de biocatalizador.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g/mol)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
1	24	87	16,668	22,323	1.33
2	48	78	16,537	21,484	1.29
3	72	69	14,989	21,219	1.41

Algunas investigaciones sugieren que el aumento en la concentración de biocatalizador aumenta la rapidez de reacción pero también disminuyen los pesos moleculares<sup>12</sup>. En esta parte experimental donde se utilizó una mayor cantidad de biocatalizador (20%) se obtuvieron rendimientos y pesos moleculares bajos respecto a lo reportado en la tabla 5 donde se utilizó una menor cantidad de biocatalizador. Esto indica que no necesariamente una mayor cantidad de biocatalizador ayudaría a producir más polímero en los tiempos de reacción estudiados.

Los mejores resultados se dieron a las 24 horas obteniendo un polímero con un 87% de rendimiento y un M<sub>n</sub> de 16,668 g/mol.

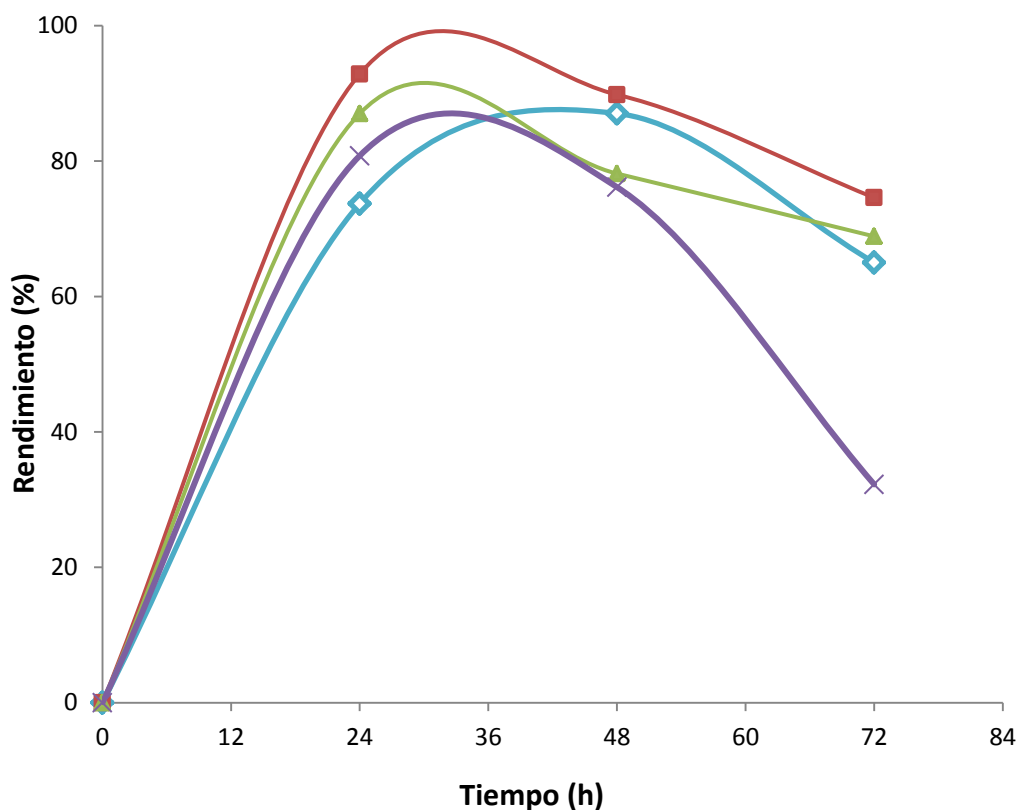
Finalmente en la tabla 7 se muestra la tendencia que presentan los polímeros logrados usando un 30% p/v de biocatalizador.

Tabla 7. Valores alcanzados de PCL con la Calb(C-LECTA) al 30% p/v.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g/mol)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
1	24	81	12,296	15,788	1.28
2	48	76	15,004	21,118	1.40
3	72	32	13,164	17,273	1.31

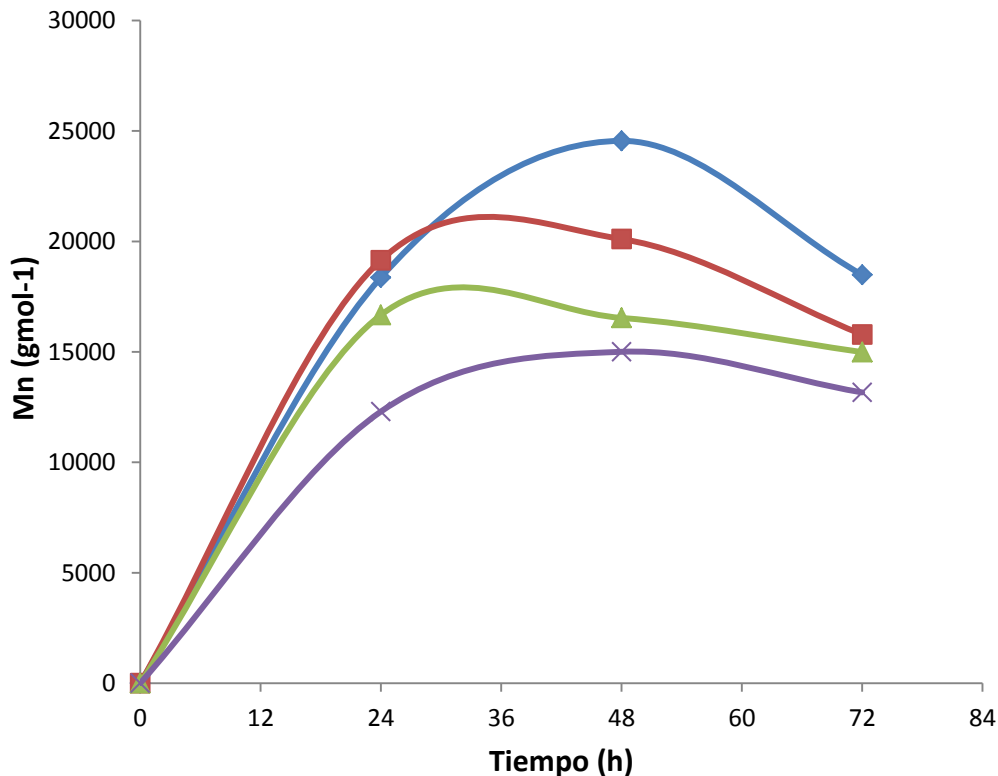
Los rendimientos que se obtuvieron con un 30% p/v de biocatalizador, son los más bajos de todos los experimentos realizados hasta ahora. El rendimiento máximo se dio a las 24 horas y fue de 81% con un M<sub>n</sub> de 12,296g/mol.





Gráfica 1. En esta gráfica se muestra la relación que guarda el rendimiento vs tiempo de reacción en la síntesis de la PCL usando CalB(C-LECTA) como biocatalizador. 5%  $\diamond$ , 10%  $\blacksquare$ , 20%  $\blacktriangle$ , 30%  $\times$ .

En la gráfica 1 se observa la relación que guarda el rendimiento del polímero con el tiempo de reacción a diferentes concentraciones de enzima. Como se ve en la gráfica el uso del 10% p/v de biocatalizador, en todos los tiempos estudiados, presentó los mejores resultados en cuanto a rendimientos. En la mayoría de los casos conforme transcurría el tiempo el rendimiento fue disminuyendo, con excepción en el caso cuando se utilizó 5% p/v que a las 48 horas el rendimiento aumento de 73% a 83%.

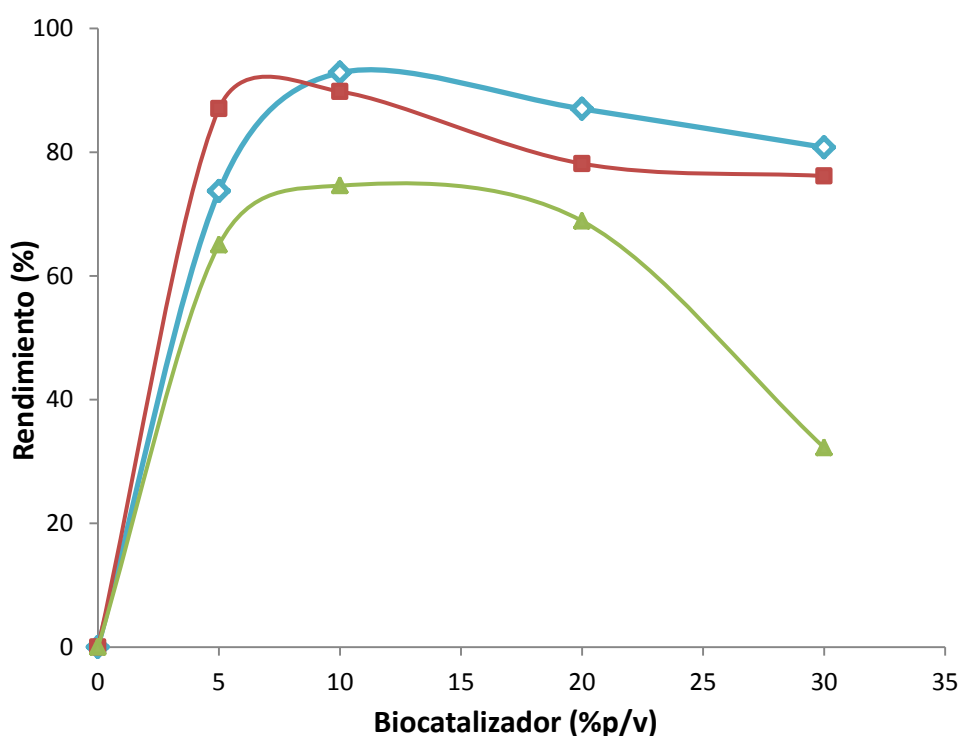


Gráfica 2. En esta figura se muestra la dependencia que guarda el peso molecular ( $M_n$ ) respecto al tiempo. 5%  $\diamond$ , 10%  $\blacksquare$ , 20%  $\blacktriangle$ , 30%  $\times$ .

En la gráfica 2 se ve la dependencia del peso molecular con el tiempo. Conforme el tiempo transcurre la reacción sigue polimerizando pero llega a un estado de equilibrio, donde el peso molecular de la PCL ya no aumenta, a las 72 horas se presenta la reacción inversa de la esterificación, la hidrólisis del poliéster.

Un caso particular que no siguió el comportamiento general fue el uso del 5% p/v de biocatalizador donde a 48 horas se obtuvo el mejor peso molecular de todos los resultados alcanzados. Esta menor relación de biocatalizador versus monómero promovió la formación de cadenas de polímero más largas debido a unas condiciones de favorecimiento de propagación, sin embargo, estas condiciones no fueron las que dieron mejor rendimiento de polímero.

En la gráfica 3 se presenta la tendencia que sigue el rendimiento a diferentes concentraciones de enzima, cuando se utilizó el 10% p/v de biocatalizador los rendimientos del polímero obtenido fueron los más altos en todos los casos, a 24 horas el 93%, a las 48 horas el 90% y a las 72 horas el 75%. Para las concentraciones de 20 y 30% de biocatalizador los rendimientos disminuyeron en general. De todas formas, hay que resaltar que los rendimientos de la PCL obtenidos con un 5% p/v de biocatalizador son cercanos a los de 10 % p/v y deben considerarse en función de los mayores pesos moleculares obtenidos.



Gráfica 3. Comportamiento del rendimiento del polímero vs porcentaje de biocatalizador utilizado.

24h ◆, 48h ■, 72h ▲.

En un análisis general de la PAA de la CL usando la enzima CalB(C-LECTA) como biocatalizador en medio tolueno, que salió a la venta recientemente después de que se venciera la patente de la Novozym 435, se pueden observar varias

condiciones que afectan el rendimiento y los pesos moleculares del producto final como la cantidad de biocatalizador y el tiempo de reacción.

La viscosidad de la reacción puede ser un factor para obtener máximos resultados en la producción de la PCL, ya que la disminución de esta facilita la transferencia de masa, en otras palabras la propagación polimérica.

***V.iii. Síntesis PCL, usando la CalB(C-LECTA) en R-134a como medio de reacción.***

Como la mayor eficiencia en cuanto a rendimiento para la síntesis de la PCL fue usando 10% p/v de CalB(C-LECTA), esta cantidad se utilizó para realizar la siguiente parte experimental, pero ahora utilizando R-134a en estado líquido como medio de reacción para comparar los productos con los obtenidos anteriormente en tolueno.

Las condiciones de reacción fueron de 25 bares, 65°C y 10% p/v de biocatalizador y los resultados de esta síntesis son los siguientes:

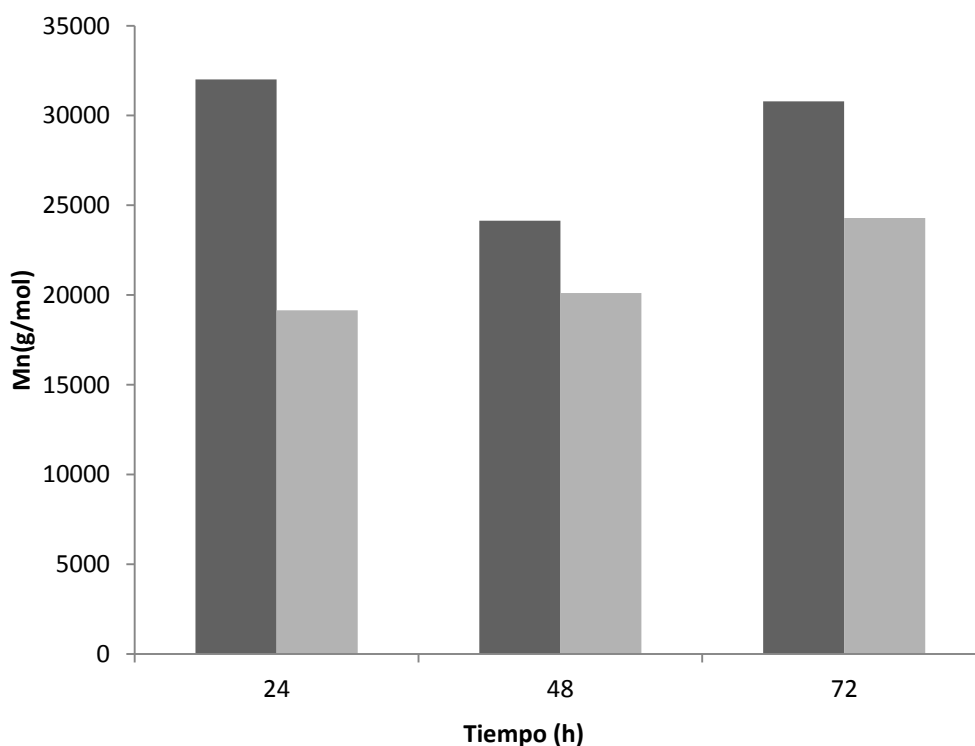
Tabla 8. Resultados de la PCL usando CalB(C-LECTA) al 10% p/v en R-134a.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g/mol)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
1	24	64	32,011	41,033	1.28
2	48	82	24,135	34,827	1.44
3	72	83	30,789	45,990	1.49

El uso del R-134a como disolvente para la síntesis de la PCL, obtuvo en 24 horas un polímero con un peso molecular ( $M_n$ ) de 32,011g/mol, un PDI de 1.28 y un rendimiento del 64%. Se observa que todos los pesos moleculares obtenidos con R-134a superan a los resultados con tolueno de la tabla 5.

Los altos pesos moleculares obtenidos usando el R-134a pueden ser por la menor viscosidad o capacidad solvatante de los productos en este fluido, esto retarda la precipitación del polímero permitiendo que la propagación siga hasta obtener polímeros con mayor peso molecular, como se observa en los resultados de la tabla 8.

En la gráfica 4 se comparan los pesos moleculares obtenidos con los dos disolventes (tolueno y R-134a), se puede ver que para todos los tiempos de reacción estudiados, se obtienen mayores pesos moleculares usando R-134a que los reportados con tolueno.



Gráfica 4. En esta figura se comparan los pesos moleculares ( $M_n$ ) de la PCL usando diferentes disolventes. R-134a ■, Tolueno □.

Usando R-134a como disolvente en solo 24 horas de reacción se obtienen polímeros con pesos moleculares por encima de los 30,000 g/mol en comparación con el uso del tolueno que el mayor peso molecular del polímero obtenido fue de casi 20,000 g/mol.

Este comportamiento de los pesos moleculares y rendimientos, tiene una explicación en base a las características de cada disolvente y de su interacción con el sustrato y la enzima.

#### ***V.iv. Síntesis de la PCL con Novozym 435 en R-134a.***

En esta parte se comparan los dos biocatalizadores comerciales basados en la CalB para la síntesis de la PCL, con iguales condiciones de reacción (R-134a, 10% p/v de biocatalizador, 65°C, 24 horas y 25 bares).

Tabla 9. Comparativo de resultados usando diferentes biocatalizadores.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g/mol)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
(CalB(C-LECTA))	24	64	32,011	41,033	1.28
(Novozym 435)	24	80	20,378	35,155	1.72

En esta parte se compara la efectividad de las lipasas utilizadas, no se abunda en las características de la enzima que pueden afectar los pesos moleculares y el rendimiento (tabla 9).

Solo se desea demostrar la eficiencia de la nueva lipasa CalB(C-LECTA), recientemente disponible en el mercado, respecto a la Novozym 435.

Un estudio de las características de la enzima podría explicar estos resultados ya que es el único parámetro diferente en estudio.

### ***V.v. Polimerización en masa de la CL.***

Generalmente, la polimerización en disolución ofrece la ventaja respecto a una misma polimerización en ausencia de disolvente, o en masa, de reducir las viscosidades crecientes de los medios a medida que el polímero se forma y es una herramienta importante para diseño de estructuras moleculares. La reacción en masa llevada a cabo con los dos biocatalizadores produjo los siguientes resultados:

Tabla 10. Datos obtenidos de la síntesis de la PCL llevadas a cabo por polimerización en masa.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g/mol)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>	<b>PDI</b>
Novozym 435	71	14,283	30,541	2.13
CalB(C-LECTA)	71	11,025	18,225	1.65

La reacción en masa se llevó a cabo para ver cómo se ven afectado los resultados (M<sub>n</sub>, M<sub>w</sub>, rendimiento y PDI) del producto final, en ausencia de un disolvente. La reacción se llevó a cabo hasta que el magneto dejó de moverse debido a la solidificación del medio de reacción, suponiendo que a este punto fue cuando se obtuvieron los mayores valores de rendimiento y peso molecular de PCL.

En la experimentación la agitación del sistema se vio afectada ya que la solución se volvía cada vez más viscosa conforme el tiempo transcurría. Esta viscosidad

que presentó la solución, puede ser un factor de sus bajos pesos moleculares, debido a factores de transferencia de masas ya que limita la interacción de los sustratos con la enzima.

Con estos resultados (tabla 9), se puede ver claramente que la polimerización de la CL, en ausencia de un disolvente, produce polímeros de menor peso molecular comparado con la PAA en disolución. No habiendo una gran diferencia entre el biocatalizador utilizado. .

### ***V.vi. Caracterización física y estructural de la PCL.***

Una muestra del polímero obtenido de la síntesis de la PCL catalizada con Novozym 435 en R-134a se mandó a la USAI para su caracterización. Los análisis permitieron conocer algunas características que definen al polímero por ejemplo: RAYOS X (cristalinidad), DSC ( $T_g$  y  $T_m$ ), RMN- $H^1$  (los diferentes tipos de hidrógenos que están presentes en el compuesto), TG (degradación térmica del polímero) y finalmente FT-IR (análisis cualitativo de los grupos funcionales presentes en la PCL).

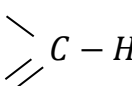

### ***Análisis por FT-IR.***

La espectroscopia de infrarrojo se emplea para determinar la estructura molecular, grupos funcionales o para identificar compuestos desconocidos.

En el espectro producido, grupos específicos de átomos en la molécula dan como resultado bandas características de absorción, por lo que de esta manera pueden identificarse.



Tabla 11. Características de absorción en el infrarrojo de algunos grupos funcionales.<sup>25</sup>

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias (cm <sup>-1</sup> )
$C - H$	Alcanos, grupos alquilo	2850-2960
$= C - H$	Alquenos	3020-3100
$C = C$		1640-1680
$\equiv C - H$	Alquinos	3300
$-C \equiv C -$		2100-2260
$O - H$	Alcoholes	3400-3650
$C - O$		1050-1150
 $C - H$	Anillos aromáticos	3030
		1660-2000
$N - H$	Aminas	3300-3500
$C - N$		1030-1230
$C = O$	Compuestos de carbonilo <sup>a</sup>	1670-1780

a. ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos y cetonas

La región útil de un espectro de infrarrojo comprende de los 4000 a los 400 cm<sup>-1</sup>. En el espectro existe una región compleja que va de los 1500-400 cm<sup>-1</sup> que se conoce como huella digital. Algunos grupos funcionales con bandas características nos permiten definir que compuesto se tiene.

De acuerdo a los valores de la tabla 1 se puede identificar en el espectro de la muestra analizada (Anexo, Fig.20) los siguientes grupos funcionales; un grupo C=O a una absorción de  $1720.95\text{cm}^{-1}$  y un pico característico de un C-H de  $2944.39\text{-}2865.32\text{cm}^{-1}$ , que definen al polímero de la PCL.

### **Análisis por RMN-H.**

En la Fig.21 (Anexo) se observa el espectro de RMN-H<sup>1</sup> de la PCL, donde se ven los desplazamientos químicos que identifican a los diferentes tipos de hidrógenos presentes en el polímero.

- a  $\delta=1.4$  ppm los protones del grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
- a  $\delta=1.6$  ppm los protones del grupo  $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2$

- a  $\delta=2.3$  ppm los protones del grupo  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underline{\text{CH}_2}$

- a  $\delta=4.05$  ppm los protones del grupo  $\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}$

### **Análisis de difracción de Rayos X en polvo.**

La técnica de rayos X, permite estimar el grado de cristalinidad de un polímero, en un difractograma se puede analizar cuantitativamente las fases cristalinas. En la figura 22 (Anexo) se muestra el espectro de la PCL.

Integrando los picos que aparecen en el difractograma se obtiene el área de la fase cristalina. Con el valor del área de la fase cristalina se procedió a calcular el porcentaje de cristalinidad de la PCL de la siguiente manera:

$$\%c = \frac{A_T - A_C}{A_T} * 100$$

% c = porcentaje de cristalinidad

$A_T$  = Área total

$A_C$  = Área de la fase cristalina

Dando como resultado un 44.5% de cristalinidad, por lo tanto se le puede considerar como un polímero semicristalino.

### ***Análisis termogravimétrico y DSC.***

El análisis térmico incluye un grupo de técnicas en las cuales una propiedad física de la sustancia es medida como una función de la temperatura mientras la sustancia esta sujeta a un programa de temperatura controlada.

La  $T_g$  es una temperatura característica de los polímeros amorfos y la  $T_m$  es una temperatura que se manifiesta en los polímeros cristalinos y semicristalinos. La  $T_m$  para la PCL se reporta entre un intervalo de 58-62°C.<sup>26</sup> El análisis por DSC que se realizó a la PCL, usando Novozym 435 como biocatalizador y R-134a como disolvente, mostro una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 61.62°C (Anexo Fig. 23).

El TGA determina el comportamiento del polímero en función de un aumento de temperatura. En un termograma característico de la PCL se esperaría una disminución de peso conforme aumenta la temperatura sin embargo esta tendencia no se presentó en el análisis ocurriendo todo lo contrario, es decir; en el termograma (anexo Fig. 24) se observa una ganancia en peso de la muestra. El análisis se repitió y los resultados fueron similares a lo que se vio en el primer termograma. Este comportamiento no se pudo explicar, ya que existen algunas circunstancias fuera del alcance de este estudio que pudieron alterar este análisis.

### VI. CONCLUSIONES.

Se logró determinar que la cantidad recomendable de biocatalizador CalB(C-LECTA) para llevar a cabo la polimerización por apertura de anillo de la PCL fue de 10% en peso respecto al volumen de CL.

Los mejores resultados con la CalB(C-LECTA) como biocatalizador, fueron un  $M_n=19,148\text{g/mol}$ , un rendimiento del 93% y un PDI de 1.52, a 24 horas de reacción usando tolueno como disolvente.

El uso del R-134a como disolvente, para la polimerización de la CL catalizada por la CalB(C-LECTA), permitió obtener mejores resultados (Gráfica 4) que con tolueno, debido a las propiedades que distinguen al disolvente.

Se demostró que la CalB(C-LECTA) puede ser una opción para sintetizar la PCL, ya que al comparar los resultados alcanzados con la Novozym 435, la CalB(C-LECTA) obtuvo mejores pesos moleculares.

La polimerización en masa demostró que los disolventes mejoran la polimerización enzimática de la CL.

El polímero caracterizado presentó un 44.5% de cristalinidad, con este porcentaje se le puede considerar como un polímero semicristalino. El polímero mostró una  $T_m$  de  $61.62^\circ\text{C}$ .

## VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Proyecto de análisis de bioplásticos, *“Informe sobre biodegradabilidad teórica de envases plásticos”*, España, 2008.
2. Odian, George, *“Principles of polymerization”*, 4° Edición, Ed. Wiley-Interscience, EU, 2004.
3. Raimond, S., Charles E, Carraher, Jr., *“Introducción a la química de los polímeros”*, 1ª Ed., Ed. Reverté, España, 1995.
4. Callister, Jr., William D., *“Ciencia e ingeniería de los materiales”*, Ed. Reverté, 473-475.
5. Andrady, A. L., J. Macromol. Sci. Rev. Macromol, Chem. Phys. 1994, C34, 25.
6. Albertsson, A., Srivastava, R, *“Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization”*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 80, 1077-1093.
7. Arroyo, Miguel, *“Inmovilización de enzimas”*, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 1998.
8. Bohinski, Robert C., *“Bioquímica”*, Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A., 1978.
9. Gallardo, R., Rojas, A., Valerio-Alfaro, G., (2004). *“Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de Candida antártica en la aminólisis de amino ésteres en disolvente orgánico”*. Revista de la Sociedad Química de México, vol. 48, No. 004, pp. 300-304.
10. Jérôme, C., Lecomte, P., *“Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization”*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60, 1056 – 1076.
11. Arroyo, M. (2000). *“Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas”*, Anales de la Real Sociedad Española de Química, 2000, 19-24.

12. Varma, I., Albertsson, A., Rajkhowa, R., Srivastava, R., “*Enzyme catalyzed synthesis of polyesters*”, Progress in Polymer Science, 2005, 30, 949 – 981.
13. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C., “*Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents*”, Biotechnology and Bioengineering, vol. XXX, 1987, 81-87.
14. A. Zaks, A. M. Klibanov. “*Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*”, Proc.Natl. Acad. Sci. vol. 82, 1985, 3192-3196.
15. Kumar, A., Gross, R., “*Candida antarctica lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature*”. Biomacromolecules, 2000, 1, 133-138.
16. Corr, S.; *1,1,1,2-tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent*, J. Flour. Chem. (2002), 118, 55-67.
17. Yu, G., Xue, Y., Xu, W., Zhang, J., Hu, C., “*Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a)*”, J. Ind. Microbial. Biotechnol, 2007, 34, 793-798.
18. García-Arrazola, R., Gimeno, M., Bárzana, 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.
19. García-Arrazola, R., Gimeno, M., Bárzana, E., “*Effect of the initial water activity on the yields and molecular Weights of the lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid R-134a*”, e-Polymers, 2008, 19.
20. Mora, M., “*Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua*”, Tesis de Doctorado en Ingeniería, 2007, Facultad de Química, UNAM, D.F.
21. Gotor-Fernández, V., Busto, E. y Gotor, V., “*Candida antarctica lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic Compounds*”, Advanced Synthesis and Catalysis, 2007, 348(7-8):797-812.

22. Cortés, A., Mora, R. y Vargas, J. (15/04/2009). “Inmovilización de lipasas: estudio de la actividad catalítica en la esterificación de ácidos grasos”. URL: [http://www.ciiq.org/varios/peru\\_2005/Trabajos/I/2/1.2.11.pdf](http://www.ciiq.org/varios/peru_2005/Trabajos/I/2/1.2.11.pdf).
23. Cifuentes, A. y Rojas, D., “Inmovilización de lipasa *Candida rugosa* en soporte de quitosano”, Trabajo para optar el título de Ingeniero Químico, modalidad: Participación en proyecto de investigación, 2005, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
24. Loeker C., Duxbury C., Kumar R., Gao W., Gross R., Howdle S, “Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide”, *Macromolecules*, July 2003, 2450-2453.
25. McMurry, J., “*Química Orgánica*”, 6° edición, Ed., Thomson, 2004.
26. Mark, J., “*Polymer Data Handbook*”, Oxford University Press, 1999.
27. Van Tol, J. B. A., Roob, M. M., Willem J., “Do Organic Solvents Affect the Catalytic Properties of Lipase? Intrinsic Kinetic Parameters of Lipases in Ester Hydrolysis and Formation in Various Organic Solvents”, *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, Vol. 47, 71-81.
28. Dordick, J. S., “Designing Enzymes for Use in Organic Solvents”, *Biotechnol. Prog.* 1992, 8, 259-267.
29. Schmid, R. D., Robert V., “Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37 1608-1633.
30. Serata N., Chieko Y., Shigeru K., “Revisiting the Ring-opening Bulk Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactones using Commercial Lipases”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2002, Vol. 20 (2), 111-116.
31. Castillo C., “Síntesis enzimática de poli (épsilon-caprolactona-co-glicolidos) en el medio 1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido”, Tesis de Maestría en Ingeniería, 2010, Facultad de Química, UNAM, D.,F.

VIII. ANEXO.

Figura 18. Espectro de FT-IR de la PCL.

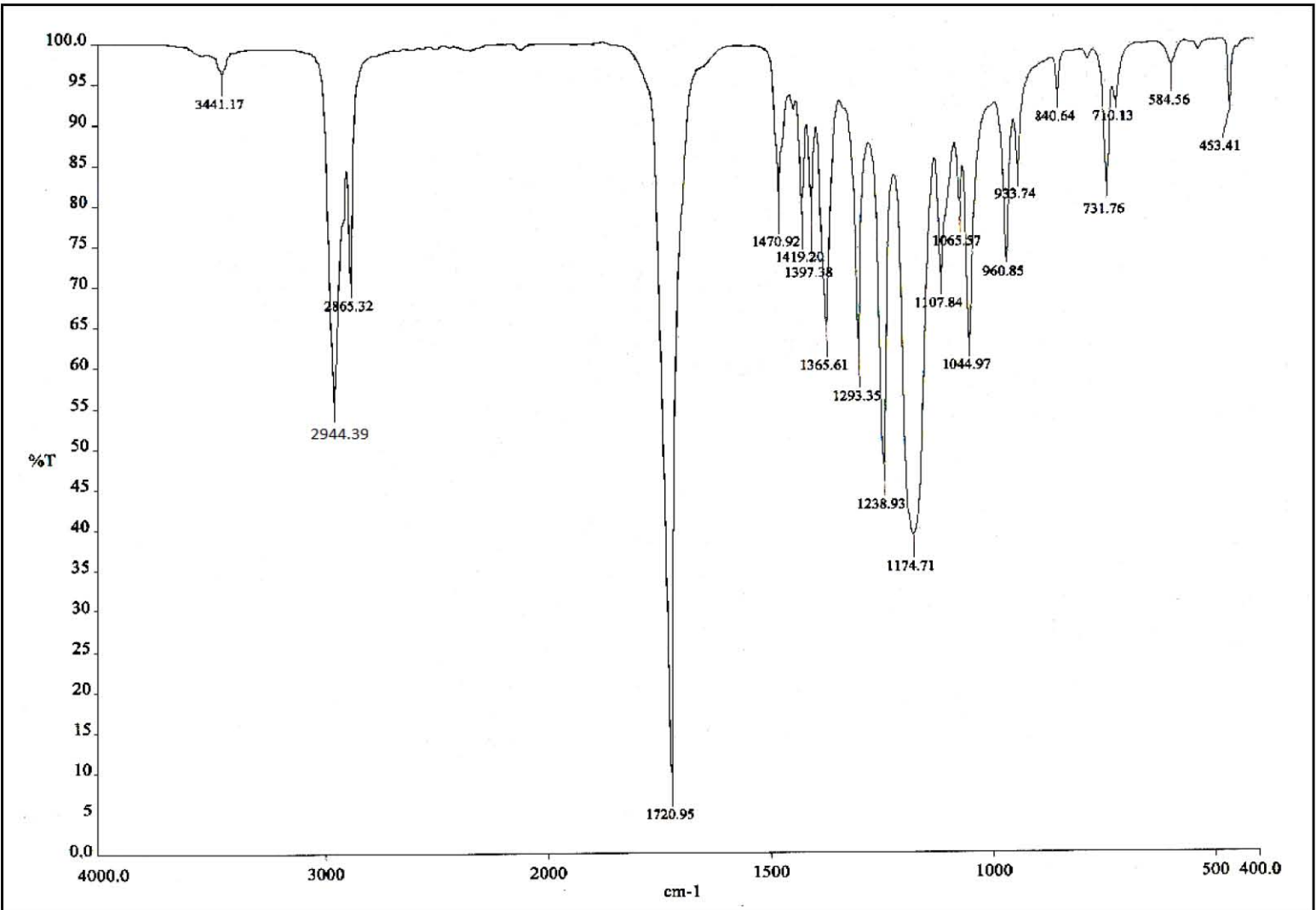




Figura 19. Espectro de RMN- $H^1$  de la PCL.

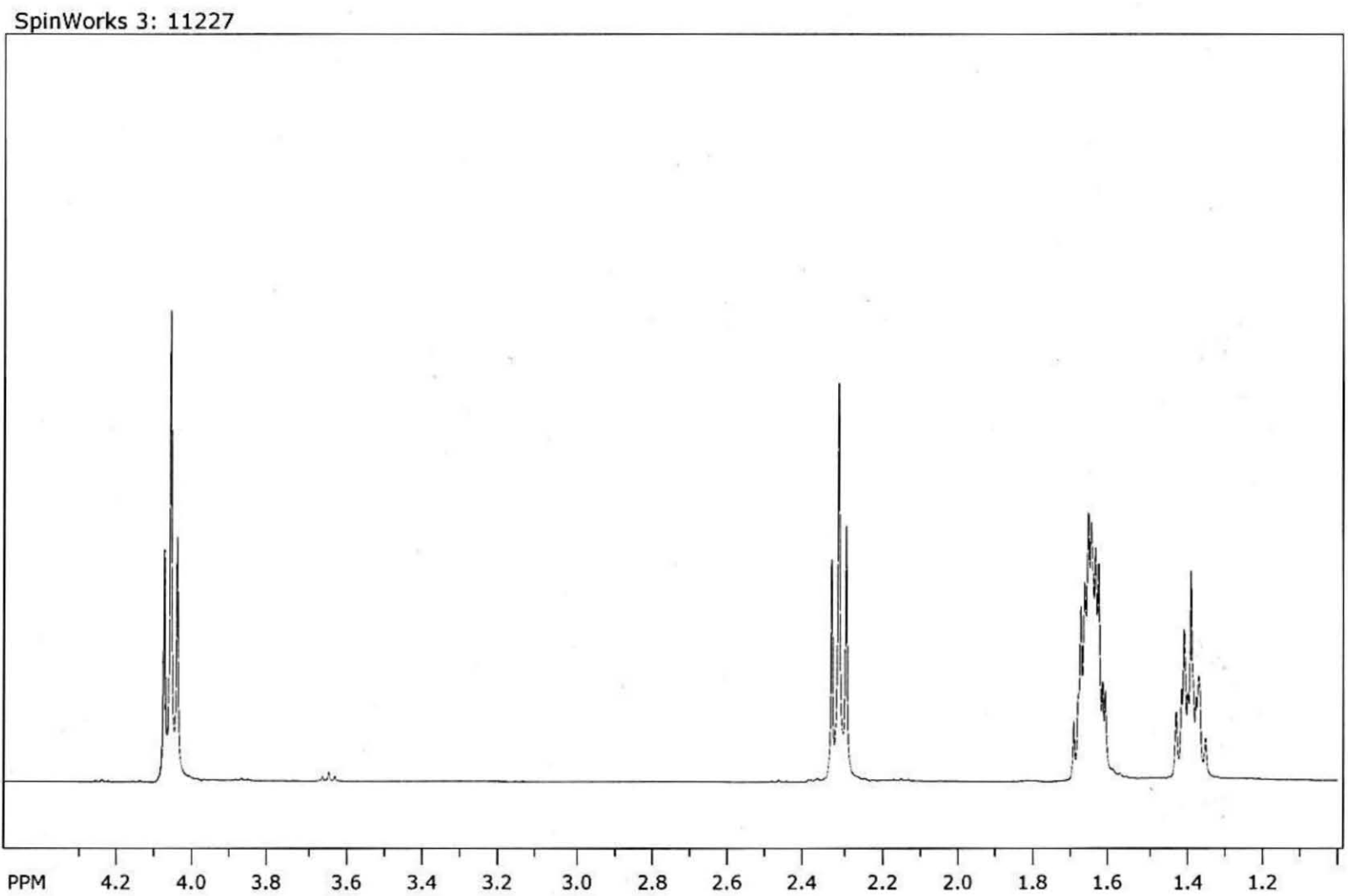


Figura 20. Espectro de RAYOS X de la PCL.

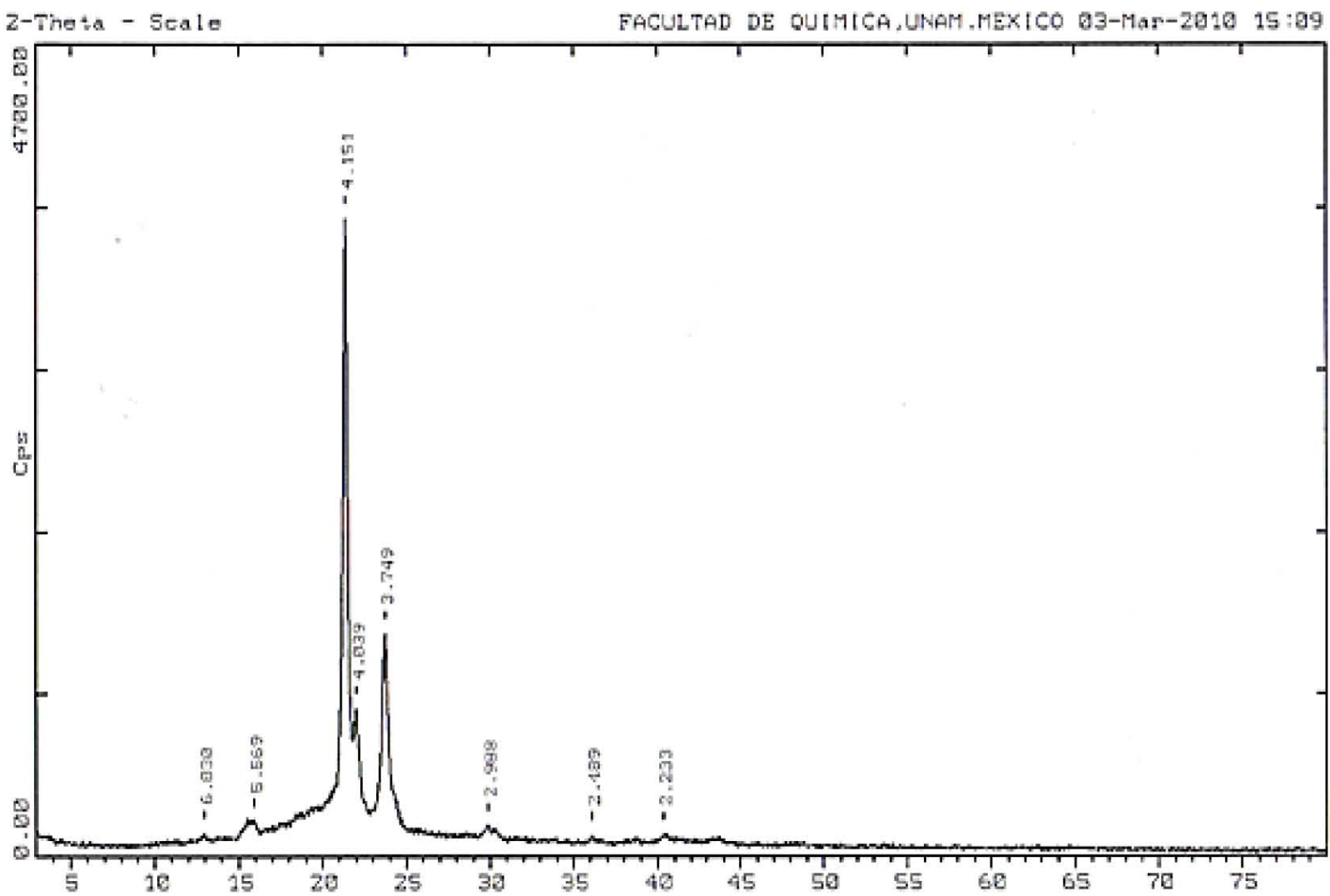
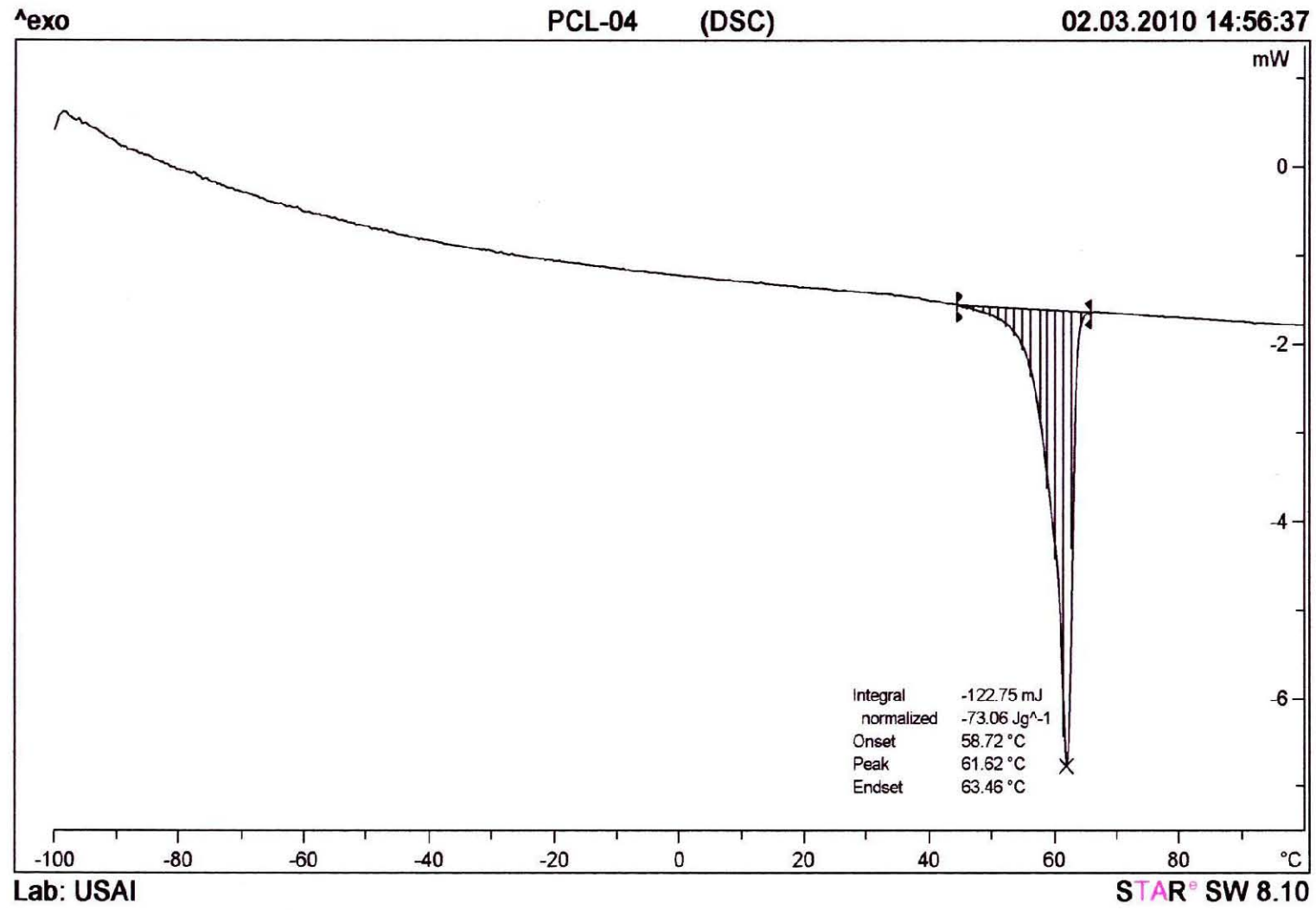


Figura 21. Termograma obtenido por DSC de la PCL.



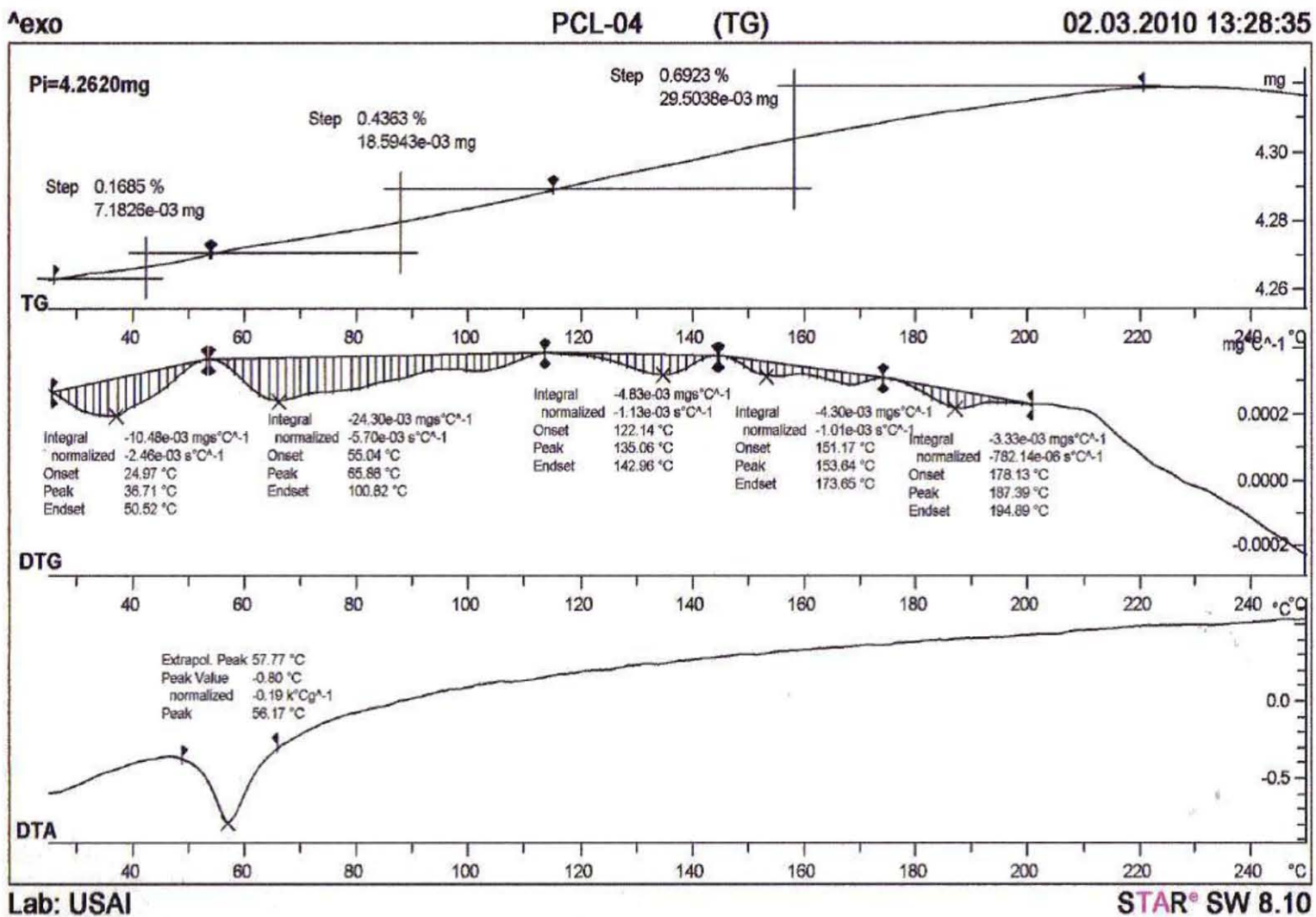


Figura 22. Análisis termogravimétrico (TGA) de la PCL.