



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – PROCESOS

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI-L-LÁCTIDO UTILIZANDO LIPASA DE
Burkholderia cepacia COMO BIOCATALIZADOR Y 1,1,1,2-
TETRAFLUOROETANO COMPRIMIDO COMO MEDIO DE REACCIÓN**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

I.B.Q. FERNANDO GUZMÁN LAGUNES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MIQUEL GIMENO SECO
ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL
Secretario: DR. EDUARDO VIVALDO LIMA
Vocal: DR. JOSE FERNANDO BARRAGAN AROCHE
1er. Suplente: M. EN C. CARLOS GUZMÁN DE LAS CASAS
2do. Suplente: DR. MIQUEL GIMENO SECO

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
LABORATORIO 314 CONJUNTO E

TUTOR DE TESIS:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

Se agradece a CONACyT la beca de estudios de Maestría de Fernando Guzmán Lagunes (No. 240095) y financiamiento para la investigación a través del proyecto SEP-Básica 2011 J3 165757 y Apoyo consolidación SIN-1 2009 117503.

Se agradece a DGAPA-UNAM convocatoria PAPIIT 2012 por financiamiento a través del proyecto IA201813.

"I know how important it is in life not necessarily to be strong but to feel strong, to measure yourself at least once"

Primo Levi

Agradecimientos

Tendría que escribir un documento más amplio que el trabajo para agradecer como se merece a todos.

A Zaidita, Viejito y mi Rudo porque sin ustedes yo no sería, y porque por ustedes yo seré.

Ardillita porque a pesar de todo estuviste ahí hasta el final, como la guerrera que eres.

Dr.Miquel porque me recibió sin conocerme, me aconsejó sin merecerlo, y por la infinita paciencia que tuvo conmigo, usted tendrá siempre mi agradecimiento.

Comité tutorial por sus consejos, sin los que este trabajo no podría haber sido concluido.

Damarita, porque el final de este trayecto me reencontré con mi amiga, y hacías mucha falta.

Pau porque tus regaños llegan desde el otro lado del mundo.

Doña Silvia que es mi madre adoptiva siempre que es necesario.

Chompi, Gatito y Chabelle, ¡hermanos!, ¡somos Pumas!

Vladi, Mily y Osama por todo su apoyo en las clases, las tareas, las series, las expos, las pedas, etcétera, etcétera, etcétera.

Estef, Majito y Sebas (ale y Caro) por abrirme las puertas de su casa, tratarme como uno más de ustedes y permitirme conocer lo increíbles personas que son.

Betito gracias por todo tu apoyo y las larguísimas asesorías, y por tu amistad.

Mina por creer en mi a pesar de las evidencias.

Lid, Mari y Charly, si si, ¡ya voy!, hermanos, gracias a ustedes que me ayudaron, me animaron y hasta me buscaron a mí, el más ingrato de todos, pero sepan que los quiero, aunque eso no baste para pagarles.

A todos en el laboratorio que hicieron posible que más que un grupo de trabajo fuéramos una familia y porque de todos aprendí algo.

Y a todos los que con un saludo o una sonrisa hicieron que los días fueran más llevaderos, a veces solo eso hace falta.

A la UNAM por abrirme los ojos de mil maneras y hacerme soñar con que un país mejor es posible.

Índice de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
a. Química verde	5
b. Poli-L-láctido	6
i. Propiedades.....	8
ii. Aplicaciones	10
c. Métodos de producción.....	11
i. Vía química.....	11
ii. Vía biotecnológica.....	13
1. Enzimas.....	13
2. Ventajas y desventajas del uso de enzimas	15
3. Lipasas	15
4. Polimerización enzimática por apertura de anillo	19
5. Mecanismo de reacción.....	20
6. Lipasa PS.....	21
iii. Solventes en la química verde.....	24
1. Fluidos supercríticos (FSC).....	24
2. 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (R134a o TFE) Líquido	26
3. Ventajas y desventajas del uso de los FC	29
iv. Avances recientes en polimerización enzimática en R134a líquido.....	30
3. Objetivos	31
a. Objetivo general.....	31
b. Objetivos específicos	31
4. Metodología	32
a. Materiales	32
b. Equipo	32
c. Desarrollo experimental	33
i. Purificación del monómero	33

ii.	Síntesis de PLLA	33
iii.	Purificación de productos	35
iv.	Medición de la actividad enzimática mediante la hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenil acetato por espectroscopía UV-visible	35
v.	Caracterización de productos.....	36
1.	Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).....	36
2.	Determinación del avance de la reacción mediante ¹ H-RMN.....	37
3.	Análisis térmicos	38
a)	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
b)	Análisis termogravimétrico (TGA)	39
4.	Determinación de cristalinidad mediante Rayos X en polvo.....	40
5.	Resultados y discusión.....	41
a.	PAA enzimática de LLA usando R134a comprimido como medio de reacción ...	41
b.	Seguimiento visual de la reacción.....	46
c.	Avance de reacción.....	47
d.	Actividad enzimática.....	50
e.	Análisis térmicos	51
f.	Cristalografía de rayos x en polvos	52
6.	Conclusiones.....	54
7.	Trabajo futuro.....	55
	Publicación derivada de la elaboración de éste trabajo.....	55
8.	Referencias	56
9.	Anexos	62
	Anexo A Hoja de datos de seguridad para el 134a.....	62

Índice de figuras

Figura 2. 1. PAA del láctido.	7
Figura 2. 2. Estereoisómeros del láctido.	7
Figura 2. 3. Síntesis de poliláctido mediante PAA por coordinación-inserción.	12
Figura 2. 4. Esquema de producción industrial del PLA. ^[15]	13
Figura 2. 5. Sitio activo de una lipasa.	17
Figura 2. 6. Rutas típicas de la producción de poliésteres utilizando una enzima aislada como catalizador.	19
Figura 2. 7. Mecanismo de polimerización enzimática de LLA.	21
Figura 2. 8. Estructura cristalina de la lipasa PS.	22
Figura 2. 9. Diagrama topológico de la estructura de la lipasa PS.	23
Figura 2. 10. Región supercrítica.	25
Figura 4. 1. Bomba para fluidos comprimidos y reactores de alta presión.	32
Figura 4. 2. Celda de alta presión con mirillas.	33
Figura 4. 3. Espectro de ¹ H-RMN del PLLA, señales correspondientes a la forma abierta y al monómero cíclico.	38
Figura 5. 1. Comparación inicial de polímeros obtenidos a condiciones supercríticas y líquidas:	41
Figura 5. 2. Rendimientos obtenidos para la PAA enzimática de LLA de los polímeros obtenidos a diferentes condiciones de reacción:	42
Figura 5. 3. Pesos moleculares (Mn) de los polímeros obtenidos a diferentes condiciones de reacción:	43
Figura 5. 4. Seguimiento visual de la reacción, formación de precipitado.	47
Figura 5. 5. Comparación entre espectros ampliados de ¹ H RMN a las 72 horas para diferentes condiciones de reacción:	48
Figura 5. 6. Efecto del aumento de la temperatura en condiciones líquidas a los 3 días de reacción:	49
Figura 5. 7. Rapidez de conversión del monómero a diferentes condiciones de reacción:	50
Figura 5. 8. Actividad enzimática residual relativa en condiciones supercríticas.	51
Figura 5. 9. Análisis de TGA para la muestra de mayor peso molecular.	52
Figura 5. 10. Espectros de difracción de rayos X en polvo para muestras de PLLA a diferentes tiempos.	53

Índice de tablas

Tabla 2. 1. Propiedades físicas de diferentes poliésteres.	9
Tabla 2. 2. Principales campos de aplicación de las enzimas.	14
Tabla 2. 3. Origen y uso de las lipasas.	17
Tabla 2. 4. Polímeros obtenidos utilizando lipasa PS.	23
Tabla 2. 5. Valores típicos de algunas propiedades físicas de los FSC.	25
Tabla 2. 6. Propiedades físicas de algunos disolventes comunes.	27
Tabla 2. 7. Constantes dieléctricas (ϵ) y momento dipolar (DM).	27
Tabla 2. 8. Propiedades fisicoquímicas y toxicidad del CO ₂ y R134a. ^[i, ii]	28
Tabla 4. 1. Condiciones de reacción y alimentaciones evaluadas.	34
Tabla 5. 1. Rendimientos y M _n obtenidos.	46
Tabla 5. 2. Actividad enzimática residual a diferentes condiciones.	51

Símbolos y abreviaturas

β -BL	β -Butilolactona
β -PL	β -Polilactona
δ -DL	δ -Caprolactona
δ -DDL	δ -Dodecalactona
ϵ -CL	ϵ -Capropactona
γ -BL	γ -Butirolactona
γ -CL	γ -Caprolactona
γ -VL	γ -Valerolactona
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
v/v	Relación volumen/volumen
A_w	Actividad de agua
Asp	Aspartame
CALB*	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DDL	12-Dodecanólida
DLA	D-láctido
DLLA	D,L-láctido
DOV	Disolventes orgánicos volátiles
DSC*	Calorimetría diferencial de barrido
ELC*	Complejo enzima-lactona inicial
FC	Fluidos comprimidos
FSC	Fluidos supercromprimidos
Glu	Glutamato
SEC*	Cromatografía por exclusión molecular o de tamaño
HDL	16-hexadecanólida
His	Histidina
LLA	L-láctido
Lipasa PS	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>
LI	Líquidos iónicos
M_n	Peso molecular promedio numérico
M_w	Peso molecular promedio en peso
OL	8-octanólido
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PDI*	Índice de polidispersidad
PDL	15-pentadecanólida
PDLA	Poli-D-láctido
PDLLA	Poli-D,L-láctido
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PGA	Poli(glicólido)
PLA	Poliláctido
PLLA	Poli-L-láctido
PS	Poliestireno
R134a	1,1,1,2-tetrafluoroetano
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
scR134a	1,1,1,2-tetrafluoroetano supercrítico
Ser	Serina
Sn(Oct) ₂	2-etilhexanoato de estaño

T_f	Temperatura de fusión
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA*	Análisis termogravimétrico
UDL	11-undecanólida

*Por sus siglas en ingles

Resumen

La producción de un poli-L-láctido (PLLA) biodegradable y biocompatible fue exitosamente alcanzada por medio de una polimerización por apertura de anillo (PAA) del L-láctido (LLA) utilizando como medio de reacción al 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a) tanto en condiciones subcríticas como en condiciones supercríticas (scR134a). Los mejores resultados fueron posibles en condiciones por encima de las críticas a 105°C y 50 bar usando a la lipasa de *Brukholderia cepacia* (lipasa PS) como catalizador, obteniendo un rendimiento máximo de PLLA de más del 50%. Estas mismas condiciones supercríticas, utilizando relaciones de 40% (p/v) y 10% (p/p) como alimentación del monómero y la lipasa, respectivamente, mostraron un incremento significativo en el peso molecular del polímero obtenido comparado con otras condiciones de reacción estudiadas.

Las muestras sintetizadas de PLLA fueron semicristalinas, como se determinó por análisis difracción de rayos X, presentando un porcentaje de cristalinidad máximo de 35%. Las características fisicoquímicas del R134a, en especial su polaridad relativa, así como su hidrofobicidad, favorecen la solubilidad del monómero y de los polímeros obtenidos en el medio y logran mantener la actividad enzimática aún en la región supercrítica. Esta ruta evita los problemas toxicológicos y ambientales relacionados con la producción de PLLA por el uso de catalizadores organometálicos o solventes orgánicos comunes como medio.

Abstract

The production of biodegradable and biocompatible poly-L-lactide has been successfully achieved by enzymatic ring-opening polymerization of L-lactide in subcritical and supercritical 1,1,1,2- tetrafluoroethane (R134a). Best results were obtained in scR134a at 105°C and 50 bar using the thermostable lipase from *Burkholderia cepacia* with a maximum PLLA yield above 50%. The media at supercritical conditions using 40% (wt/v) and 10% (wt/wt) loads of monomer and lipase, respectively, showed remarkable increase in polymer molecular weights as compared to other reaction conditions.

The synthesized PLLA samples were semi-crystalline, as determined by powder diffraction X-ray analyses, with a maximum percentage of crystallinity of ca. 35%. The physico-chemical characteristics of this green organic compressed fluid, especially its relative polarity and hydrophobicity, enhanced the solubility of the monomer and subsequent polymeric products with sustained lipase activity even in the supercritical region. This route circumvents the toxicological or environmental issues associated to the syntheses of poly-L-lactide using metal catalysts or common organic solvent media

1. Introducción

La inquietud actual por elaborar productos ambientalmente amigables mediante procesos benignos con el ambiente ha impulsado el desarrollo de nuevos materiales que presenten un mayor grado de degradación, así como de las tecnologías para lograr su producción. Entre estos materiales, se encuentra el poliláctido, un poliéster derivado del dímero cíclico del ácido láctico y cuya unidad repetitiva es el grupo lactíl. Este polímero posee características que lo hacen de gran interés a nivel industrial ya que, dependiendo de ellas, puede ser utilizado en diversos rubros.

La producción comercial de PLLA se lleva a cabo mediante una polimerización por apertura de anillo (PAA) utilizando catalizadores organometálicos, siendo el más utilizado el 2-etilhexanoato de estaño $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Sin embargo, es precisamente el uso de estos catalizadores lo que restringe las aplicaciones de los productos obtenidos, ya que para poder ser usados, en algunos casos, se requieren eliminar las trazas de estaño que se alojan en el polímero, lo cual encarece el proceso de purificación.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que las lipasas, enzimas que *in vivo* catalizan las reacciones de hidrólisis de los enlaces éster en los acilgliceroles, en condiciones *in vitro* pueden llevar a cabo reacciones de esterificación, como la PAA, utilizando solventes orgánicos como medio de reacción. Además, el uso de enzimas confiere ciertas ventajas al proceso, entre ellas el hecho de tratarse de sustancias reciclables, no tóxicas y que se obtienen de fuentes renovables. Sin embargo, el uso de solventes orgánicos volátiles (DOV) tóxicos para llevar a cabo la reacción va en contra del concepto de la química verde, lo que ha derivado en la búsqueda de nuevos medios de reacción en los que las enzimas puedan llevar a cabo dichas reacciones y que sean amigables con el ambiente.

Es por lo anterior que el presente trabajo se centra en establecer un método para la producción de PLLA a través de un proceso completamente verde, utilizando a la lipasa PS como catalizador y al 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a) comprimido como medio de reacción.

El presente trabajo presenta en primera instancia un resumen sobre los antecedentes concernientes al proyecto, con el fin de dar a conocer las bases sobre las que se establecieron la hipótesis y objetivos. Posteriormente se presentan de manera detallada los materiales y métodos utilizados durante el desarrollo experimental; para a continuación dar lugar a un análisis y discusión de los resultados obtenidos. Por último, son expuestas las conclusiones así como las perspectivas del trabajo, para futuros estudios.

2. Antecedentes

a. Química verde

Hasta hace algunos años se consideraba que el desarrollo tecnológico implicaba necesariamente un costo ambiental que pagar y un peligro potencial para el ciudadano común. Del mismo modo, no se tenía conciencia de la posibilidad del agotamiento de los recursos naturales empleados como materias primas de los procesos de producción. Todo esto añadido a la inadecuada disposición de desechos directa e indiscriminadamente, al aire, agua y suelo.

La expresión “química verde” se refiere a una filosofía que consiste en el esfuerzo colectivo para reducir al mínimo, o de ser posible eliminar por completo la contaminación desde su inicio: mediante el uso de procesos “limpios”, evitando al máximo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la elaboración de productos químicos “limpios”, que no atenten contra la salud o el medio ambiente.^[1]

Los medios que utiliza la química verde se centran en la disminución o la eliminación del uso de productos químicos tóxicos y el reciclaje de los desechos producidos por el avance tecnológico, de una manera creativa de tal forma que se consiga un mínimo impacto en los seres humanos y al medio ambiente, sin sacrificar el avance científico y tecnológico. Existen además de la química verde otros medios para prevenir la generación de contaminantes, como el control de procesos, el control de inventarios y la optimización de procesos, herramientas con enfoque ingenieril.^[2]

La diferencia entre la química verde y la química ambiental es que mientras esta última tiene como objetivo el saneamiento y remediación de los efectos en el

ambiente de los procesos contaminantes, la química verde intenta evitar la contaminación desde su origen.

Por otro lado, la gran mayoría de los polímeros usados tanto en la industria como en la vida diaria son sintetizados a partir de derivados del petróleo. Estos materiales, además de ser difíciles de degradar, son comúnmente producidos a través de procesos que tienen un efecto negativo en el ambiente.

En los últimos años se ha presentado el uso de polímeros biodegradables como una alternativa viable para disminuir el impacto ambiental provocado por la actividad humana. Biodegradable, en este contexto, significa hidrolizable por acción microbiana a temperaturas de alrededor de 40°C en un periodo de poco más de un año. Otro requerimiento indispensable para cualquier aplicación potencial es que la degradación no forme productos tóxicos. Los poliésteres alifáticos poseen estas propiedades, y entre ellos uno de los más estudiados es el poli-láctido (PLA) un biomaterial que durante las últimas décadas ha sido investigado extensamente debido a que además de ser biodegradable posee propiedades de barrera, biocompatibilidad, termoplaticidad y propiedades mecánicas similares a las del poliestireno (PS) y del poli (tereftalato de etileno) (PET).^[2]

b. Poli-L-láctido

El poli(ácido láctico) (PLA) es un polímero formado por moléculas de ácido láctico unidas por enlaces ésteres, cuya unidad repetitiva es el grupo láctil, y que ha despertado gran interés debido a que posee una amplia gama de aplicaciones industriales, pero que además de esto posee ciertas características que lo convierten en un producto amigable con el ambiente, lo que le da ventajas sobre los polímeros convencionales desde el punto de vista de la química verde.^[3]

Actualmente la producción industrial del PLA se lleva a cabo por polimerización de PAA a partir del dímero cíclico del ácido láctico, el lactido, por lo que también es conocido por el nombre de poliláctido, como es referido en el presente trabajo. La figura 2.1 muestra el esquema de reacción de PAA para el lactido.

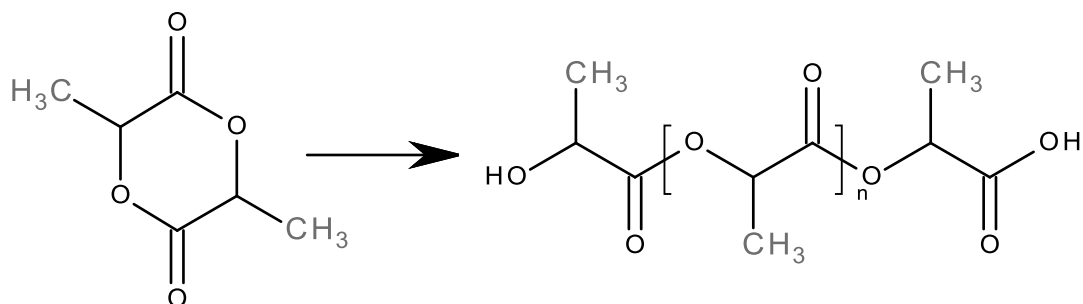


Figura 2. 1. PAA del lactido.

El tratarse de un derivado del ácido láctico añade algunas ventajas tanto al producto como al proceso, ya que éste, el ácido láctico, es obtenido fácilmente a través de una fermentación, utilizando levaduras o bacterias, partiendo de materias primas renovables poco costosas. Además, al formar parte del metabolismo de los animales y microorganismos, se considera un producto de degradación no tóxico. El lactido puede presentarse en tres formas estereoisoméricas RR, SS o RS, como puede apreciarse en la figura 2.2. La configuración RR es denominada como D-lactido, mientras que la SS recibe el nombre de L-lactido. Una mezcla equimolar de D y L lactido recibe el nombre de racémico o D,L-lactido, mientras que la configuración RS, o aquiral, es llamada meso-lactido.^[4]

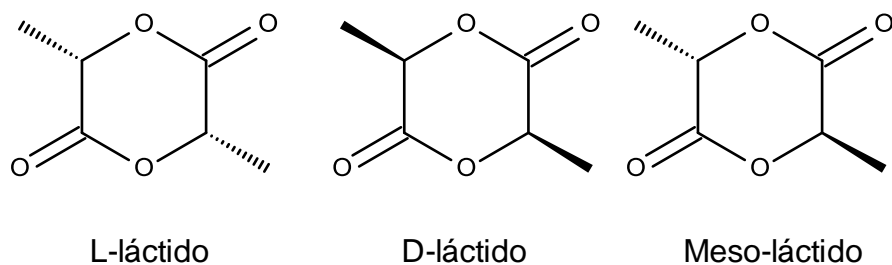


Figura 2. 2. Estereoisómeros del lactido.

i. Propiedades

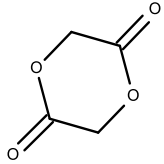
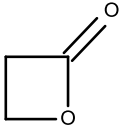
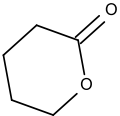
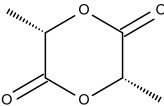
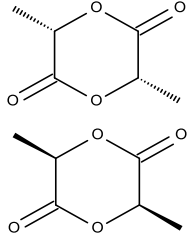
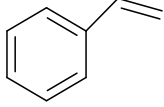
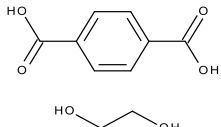
Algunas de las propiedades físicas que presenta el PLA están ligadas a su distribución y secuencia estereoquímica. Por ejemplo, un PLLA isotáctico cristaliza con mayor rapidez que uno preparado con pequeñas cantidades de D-láctido ó meso-láctido, por lo que las propiedades de cristalización del PLA pueden asociarse con la cantidad de unidades L presentes.

Al poseer el monómero dos carbonos asimétricos se hace factible preparar polímeros con diferentes tacticidades, lo que se refiere al arreglo estereoquímico de los centros quirales en la macromolécula. El PLLA es el homopolímero derivado del monómero natural LLA, y presenta un elevado grado de cristalinidad (hasta un 37%) debido a su estereoregularidad. El material tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente, tiene un módulo de Young elevado. El polímero es muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas. Sus características térmicas están definidas por un elevado punto de fusión (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C.^[5-7] El PLLA es más hidrofóbico y más resistente al ataque hidrolítico que el poliglicólido (PGA), por lo que el isómero L es seleccionado cuando se requiere resistencia mecánica y largos tiempos de degradación, además de que es metabolizado con mayor eficiencia por el cuerpo, por la acción de la L-lactato deshidrogenasa.

El poli-D,L-láctido (PDLLA) es un polímero amorfo, ya que está constituido por las dos formas isoméricas (D y L) del láctido. En este caso, el polímero tiene baja resistencia a la tensión, alta elongación y una elevada rapidez de degradación, lo que lo convierte en un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. Se preparan también copolímeros de PLLA y PDLLA para disminuir la cristalinidad del polímero y acelerar el proceso de degradación.^[8-10]

Los PLAs pueden ser sometidos a esterilización con rayos gama y son estables cuando se exponen a los rayos ultravioleta. Se le atribuyen también propiedades de interés como suavidad, resistencia al rayado o al desgaste. La tabla 2.1 muestra una comparación entre las propiedades de los PLAs y las de diferentes polímeros sintéticos.

Tabla 2. 1. Propiedades físicas de diferentes poliésteres.

Polímero	Monómero	T _m (°C)	T _g (°C)	Fuerza de tensión (MPa)	Módulo de Young (MPa)	% de elongación al rompimiento	Origen	Propiedades
Poliglicólido (PGA)		223-233	46.5	100	6300	1.5	Sintético	Duro, quebradizo e insoluble en muchos disolventes
Poli (γ-hidroxibutirato) (PγHB)		53	-51	50	70	1000	Bacterial	Suave, termoplástico
Poli (δ-valerolactona) (PδVL)		57	-55	12.5	570	150-200	Sintético	Suave plástico similar al
Poli (L-láctido) (PLLA)		180-192	56-66	64-77	619-2380	1.62-8	Sintético	Duro, quebradizo
Poli (D,L-láctido) (PDLLA)		262	32.9	50-60	1500-1900	5-10	Sintético	
Poliestireno (PS)		235	100		2000-2500	1-4	Sintético	
Poli (tereftalato de etileno) (PET)		260	75		2800-3100	50-150	Sintético	

ii. Aplicaciones

Debido a su mecanismo de degradación, el PLA tiene muchas aplicaciones en las áreas de medicina, alimentos, textiles y empaques. Muchas de estas aplicaciones dependen también del estereoisómero usado en su preparación; por ejemplo, el PLLA es utilizado en suturas y en la producción de materiales ortopédicos donde es necesaria una alta resistencia mecánica.^[11]

Las resinas de PLA cuya composición está por arriba del 93% de unidades L resultan ser semicristalinas, por lo que son las más demandadas, mientras que las formadas entre un 53 y 93% de LLA tienen una estructura amorfa; estas últimas son usadas en el área de la medicina para la elaboración de sistemas de liberación controlada de fármacos debido a su mayor biodegradabilidad.

La gran gama de aplicaciones de los PLAs van desde uso textil, pasando por bandejas para microondas, e incluso plásticos industriales para lo que debe mezclarse con un polímero de tipo hule. Tales mezclas también tienen buena forma-estabilidad y transparencia, haciéndolos útiles para aplicaciones de envasado de baja calidad.^[11]

Como se mencionó anteriormente, entre las aplicaciones biomédicas del PLLA se incluyen las suturas, medios de diálisis y dispositivos de liberación controlada de fármacos. Actualmente también se están evaluando como material para ingeniería de tejidos.

Dado que el PLLA es biodegradable, también se puede emplear en la preparación de bioplásticos, es útil para producir material de relleno de embalaje, bolsas de composta, envasado de alimentos, y vajillas. También tiene muchos usos potenciales, por ejemplo, como tapicería, prendas desechables, toldos, productos de higiene femenina y pañales desechables.

El PLLA puede ser una alternativa al PS de alto impacto mediante el uso de tan solo un 1% de algún co-monómero para crear el copolímero con las características deseadas.^[12]

Aunque es más costoso que muchos plásticos comunes fabricados a partir de derivados del petróleo, el precio del PLLA ha ido disminuyendo a medida que aumenta la producción lo que ha hecho que sus usos se diversifiquen. Por ejemplo, en el Reino Unido ha sido utilizado como envolturas de sándwiches; en Francia se usa como aglutinante en aislamiento de edificios; también se utiliza para la elaboración de vasos desechables biodegradables para bebidas frías y estuches contenedores para envasar alimentos. Gracias a avances en el proceso de elaboración se ha logrado aumentar su temperatura de transición vítrea, lo que hace factible su uso con líquidos calientes hasta 110 ° C. Además puede ser usado como un sustituto de nylon para la elaboración de bolsas.^[13]

La industria farmacéutica utiliza un oligómero de LLA, en los inhaladores presurizados de dosis medida como un agente surfactante que proporciona una dosis bastante constante.^[13] En la actualidad se utiliza como material de insumo para las impresoras de modelos 3D.^[14]

c. Métodos de producción

i. Vía química

La síntesis de poliláctido se lleva a cabo actualmente de dos distintas formas, por la condensación del ácido láctico o por la polimerización vía PAA del láctido a través de una catálisis catiónica, aniónica o de coordinación, dependiendo del tipo de catalizador usado. En esta última se usan catalizadores con cationes metálicos como estaño, zinc, aluminio e incluso algunos lantánidos.^[1] El compuesto más usado de forma industrial es el 2-etilhexanoato de estaño, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. La reacción se lleva a cabo en ausencia de solvente, y tiene lugar a temperaturas entre 180-210°C con una concentración de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ entre 100-1000 ppm, y regularmente se

usa como iniciador el 1-octanol.^[15] La figura 2.3 muestra el esquema de reacción utilizado más comúnmente en la industria actualmente.

Utilizando estas condiciones se obtiene una alta actividad catalítica, una baja racemización del polímero, con un importante porcentaje de conversión del monómero, por arriba del 90%, con polímeros de altos pesos moleculares mayores a 100,000 g/mol; sin embargo, el producto de la reacción suele contener residuos del catalizador. Estos residuos son muy difíciles de remover, lo cual encarece el proceso de purificación, ya que la eliminación de éstos es indispensable para sus usos farmacéuticos.^[16]

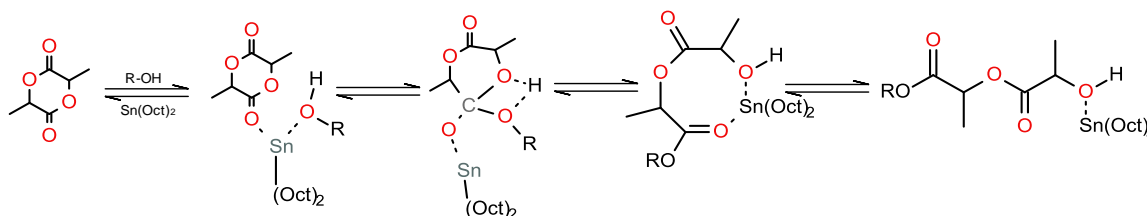


Figura 2. 3. Síntesis de poliláctido mediante PAA por coordinación-inserción.

Por otro lado por tratarse de una reacción en equilibrio el agua producida debe ser eliminada, lo cual se logra utilizando vacío o por medio destilación azeotrópica en presencia de un agente desecante o tamiz molecular. En ese rango de temperatura pueden llevarse a cabo las reacciones secundarias de deshidratación de dioles, cambiando en forma indeseable la estequiometría de la reacción

Otro tipo de catálisis, como ya se mencionó, es la vía catiónica en donde un catión (Zn^{2+}) abre el anillo y desencadena la reacción de polimerización.^[10] Sin embargo, de la misma manera que para el proceso, la eliminación de las trazas de catalizador en el producto es muy difícil de lograr, siendo necesarios extensos procesos de purificación.

La figura 2.4 muestra de manera esquemática el proceso de obtención del PLA desde el proceso de fermentación, necesario para la obtención del ácido láctico,

hasta la polimerización que lleva a cabo la empresa Nature Works, filial de la multinacional Cargyll-Dow.

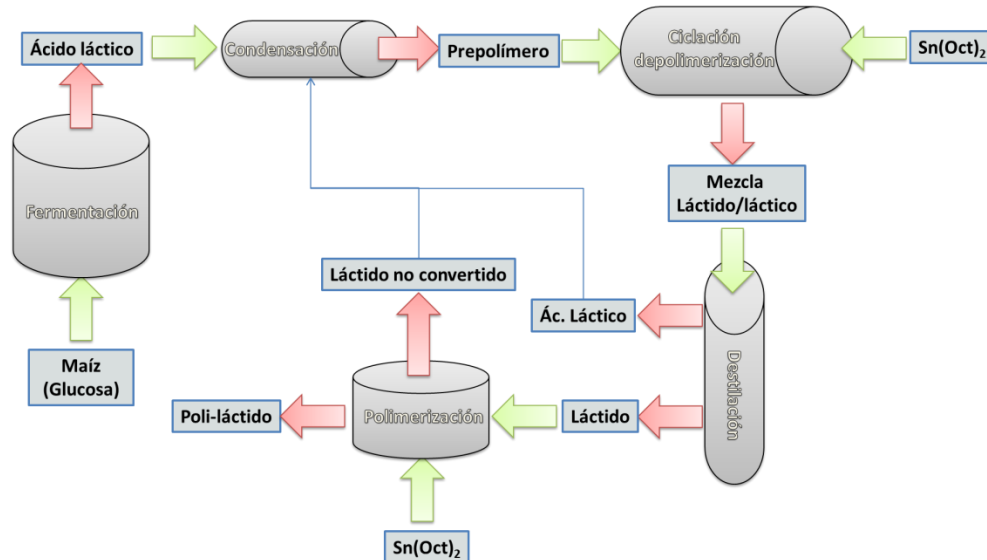


Figura 2. 4. Esquema de producción industrial del PLA.^[15]

ii. Vía biotecnológica

En los últimos años los avances en biotecnología enzimática han permitido la implementación de nuevos sistemas y métodos de producción de polímeros, y se ha impulsado la realización de diversos estudios en este campo. La tecnología enzimática es una de las áreas con más desarrollo en las últimas décadas, siendo el uso de enzimas como catalizadores de reacciones uno de los temas más recurrentes.

1. Enzimas

Las enzimas funcionan como catalizadores naturales en las reacciones bioquímicas. Participan en el metabolismo vía reacciones de biosíntesis en células vivas. Los polímeros naturales, tales como polisacáridos, proteínas y poliésteres, entre otros, son sintetizados de manera natural mediante enzimas. Aproximadamente 1×10^{12} toneladas de celulosa, almidón y biomateriales relacionados son generados en nuestro planeta cada año mediante procesos

naturales.^[17] El uso anual de polímeros sintéticos derivados del petróleo es de cuatro a cinco órdenes de magnitud menor que aquellos que tienen su origen en fuentes renovables. La necesidad de desarrollar procesos y productos ecológicamente benignos se ha traducido en la creación de rutas alternativas para la generación de polímeros sintéticos nuevos; la catálisis enzimática *in-vitro* es una de las herramientas más prometedoras para este fin. Hace más de 100 años, Emil Fisher propuso el mecanismo “llave-cerradura” para explicar la selectividad de cada enzima por su sustrato, sin embargo, actualmente se sabe que la relación enzima-sustrato no es tan estricta ya que al ser las enzimas moléculas dinámicas, muchas veces son generosas al reconocer múltiples sustratos. Esta situación permite a las enzimas catalizar la síntesis de no únicamente algunos polímeros naturales sino también de una amplia variedad de polímeros sintéticos *in-vitro*.^[17] Los principales campos de aplicación tanto en la industria como a nivel investigación de las enzimas se resumen en la tabla 2.2.^[18]

Tabla 2. 2. Principales campos de aplicación de las enzimas.

Investigación científica	Herramientas en la investigación de reacción de hidrolisis y síntesis; biotransformaciones; análisis; procesos de separación por afinidad.
Diagnósticos médicos y análisis químicos	Determinación de glucosa en sangre, urea, colesterol; pruebas ELISA; en electrodos de enzimas y en kits de ensayo.
Catálisis industrial	Elaboración de cerveza y vino; procesamiento de lácteos, fruta, carnes y vegetales; procesamiento de almidón; procesamiento de cueros; manufactura de papel y pulpa; procesamiento de azúcar; producción de fructosa; producción de detergentes y agentes de limpieza; síntesis de aminoácidos y productos químicos en masa; tratamiento de agua residual; desencolado de algodón.
Aplicaciones terapéuticas	Agentes antitrombosis; tratamientos contra tumores; agentes antiinflamatorios; productos para facilitar la digestión, entre otros.

La mayoría de las enzimas de uso industrial son de origen microbiano. La presencia de enzimas en la actividad industrial se debe a los avances en la biotecnología, y

a la mejora en los procesos de fermentación y de recuperación, lo que ha hecho procesos económicamente factibles.

2. Ventajas y desventajas del uso de enzimas

Es dentro del concepto de la química verde que el uso de enzimas como catalizadores químicos se presenta como una alternativa ya que estas presentan ciertas ventajas sobre los catalizadores químicos comunes. Algunos de los beneficios de la polimerización catalizada enzimáticamente son:^[19]

- a) Las enzimas catalizan reacciones con alta enantio y regioselectividad
- b) Las reacciones catalizadas enzimáticamente se llevan a cabo en condiciones suaves de reacción (temperatura, presión, pH, etc.).
- c) Las enzimas pueden ser usadas en masa, medios orgánicos y/o procesos multifases.
- d) Las enzimas provienen de recursos renovables. Son materiales reciclables, eco-amigables y no tóxicos. De ahí que la necesidad de la completa remoción de la enzima no sea tan importante.
- e) Se pueden sintetizar polímeros con estructuras bien definidas por procesos de catálisis enzimática.

Entre las principales desventajas se encuentra que es una tecnología reciente que aún está en desarrollo, los costos de un biocatalizador es aún mayor que el de uno químico, los tiempos de reacción son generalmente más largos y en la mayoría de los casos los rendimientos son menores. Sin embargo al ser las reacciones más selectivas el proceso de purificación puede verse disminuido en tiempos y costos.

3. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas E.C.3.1.1.3) son enzimas que poseen un importante potencial fisiológico e industrial. Uno de sus principales usos es la hidrólisis de triacilgliceroles. Son ubicuas, es decir, se encuentran en todos los

organismos desde microbios hasta plantas y animales; sin importar su origen, ni la variación de sus pesos moleculares, todas las lipasas muestran una sobresaliente similitud estructural y funcional. Su gran potencial en reacciones de síntesis se debe en gran medida a que, a diferencia de otras enzimas, aceptan un amplio rango de sustratos.

Son activas únicamente cuando se encuentran adsorbidas a una interfase agua-aceite; no son capaces de disolver los sustratos en el seno del fluido y presentan poca actividad en soluciones acuosas que contienen sustratos solubles. *In vivo* desarrollan varias funciones, principalmente en el metabolismo de lípidos incluyendo la digestión de grasas, absorción, reconstitución y metabolismos grasoprotéicos.^[19]

Debido a su importancia, las lipasas son objeto de varios estudios que se enfocan particularmente en la caracterización de su estructura, elucidación de su mecanismo de acción, cinética, secuencia y en su actividad.^[19]

Las lipasas comerciales han sido frecuentemente obtenidas a partir de microorganismos que producen una amplia variedad de lipasas extracelulares.^[19] La tabla 2.3 muestra un resumen de las diferentes fuentes y aplicaciones de las lipasas. Un rasgo estructural único y común en la mayoría de las lipasas es la presencia de una “tapa” compuesta de una secuencia anfifílica α -hexil peptídica, la cual es una estructura que regula el acceso del sustrato al sitio catalítico; una vez que la “tapa” se abre, queda expuesta una amplia superficie hidrofóbica, en la cual el sustrato quedará unido.^[17]

El sitio activo posee un residuo de serina nucleofílica (Ser) activado por un puente de hidrógeno “coordinado” con un residuo de histidina (His) y uno de aspartato (Asp) o glutamato, conociéndose éstos residuos como la “triada catalítica” (Ser105-His224- Asp187).

Tabla 2. 3. Origen y uso de las lipasas.

Tipo	Fuente	Aplicación
Fúngico	<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica
	<i>Candida antarctica</i>	Síntesis orgánica
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo paradetergentes
Bacteriano	<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Síntesis orgánica
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo para detergentes
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo para detergentes
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis orgánica

Todas las lipasas son miembros de la familia de las “ α/β - hidrolasas”, familia con una arquitectura común compuesta de una secuencia específica de α -hélices y láminas- β ; el núcleo está compuesto de láminas- β paralelas rodeadas de α -hélices. En el sitio activo, figura 2.5, el residuo de serina nucleofílica reposa en una curva muy cerrada entre una α -hélice y una lámina- β .^[17]

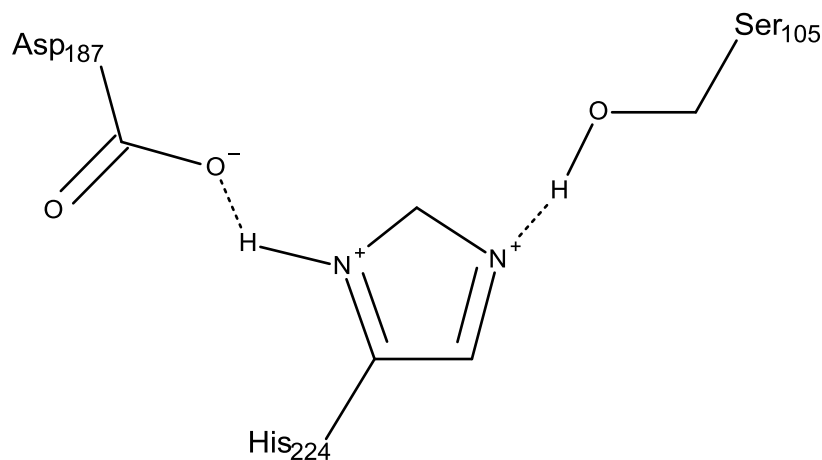


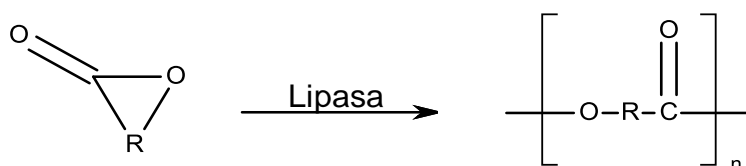
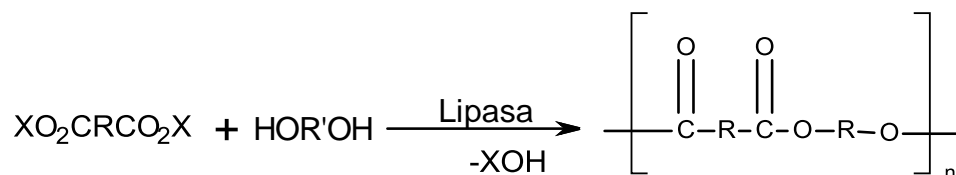
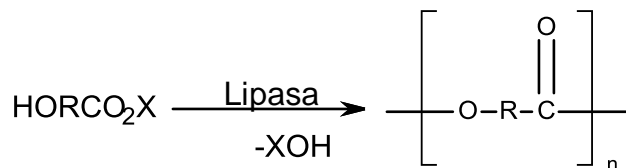
Figura 2. 5. Sitio activo de una lipasa.

Actualmente, se sabe que algunas lipasas son activas en disolventes orgánicos, en los cuales pueden catalizar un amplio número de reacciones incluyendo esterificaciones, transesterificaciones, acilación regioselectiva de glicoles y

mentoles, así como síntesis de péptidos. Esto ha incrementado el interés en su estudio, así como en sus posibles aplicaciones.^[19] Entre dichas aplicaciones se encuentran ya en uso en procesos químicos orgánicos, formulación de detergentes, síntesis de biosurfactantes, en la industria oleoquímica, en la de lácteos, en la agroquímica, en la manufactura de papel, nutrición, cosméticos y procesos farmacéuticos.

El desarrollo de tecnologías basadas en el uso de lipasas, y enfocadas a la síntesis de nuevos compuestos, se ha expandido rápidamente. En la actualidad son utilizadas como catalizadores de una gran variedad de reacciones regio y estereoselectivas. Ahora se sabe que, para determinadas condiciones de reacción, la cantidad de agua en el sistema determinará la reacción que catalizarán las lipasas; en ausencia de ésta en el medio, ó a concentraciones pequeñas, únicamente las reacciones de esterificación o de transesterificación estarán favorecidas, mientras que, existiendo un exceso de agua, el equilibrio se desplazara hacia la reacción de hidrólisis.^[19]

En contraste con los catalizadores químicos tradicionales, con los que se tienen que tomar estrictas precauciones, las lipasas no requieren la remoción completa del agua y aire cuando son usados para la síntesis de poliésteres. La figura 2.6 muestra las rutas de poliesterificación típicas utilizando a las lipasas como catalizador. Por otro lado, a pesar de que, usando catalizadores órganometálicos, se han logrado polimerizar fácilmente pequeñas lactonas cíclicas, de 4 hasta 7 miembros, la polimerización de lactonas de anillos grandes presenta bajos rendimientos y solo se obtienen productos de bajo peso molecular, lo cual representa un área de oportunidad para el uso de las lipasas.

PAA**Policondensación de ácidos dicarboxílicos o sus derivados con glicoles****Policondensación de hidroxiacidos y sus ésteres**

X: H, alquilo, alquilo halogenado, vinil, etc.

Figura 2. 6. Rutas típicas de la producción de poliésteres utilizando una enzima aislada como catalizador.

4. Polimerización enzimática por apertura de anillo

La polimerización enzimática es definida como “la polimerización *in vitro* de un monómero, pudiendo ser éste un sustrato artificial, catalizada por una enzima aislada, y llevada a cabo mediante rutas no metabólicas”. En las últimas décadas se han descubierto muchas reacciones de polimerización enzimáticas, y se han desarrollado un gran número de polímeros.

El desarrollo de macromoléculas con estructura y propiedades definidas ha resultado en la síntesis de diversos polímeros biodegradables con arquitecturas avanzadas. Para lograr propiedades y arquitecturas controladas, la técnica se ha refinado continuamente. Se han evaluado muchas posibles combinaciones de iniciadores y catalizadores para lograr las propiedades y arquitecturas deseadas. La PAA catalizada por enzimas es actualmente una de las herramientas más promisorias para lograr este fin. ^[17]

El punto clave para la polimerización enzimática es la combinación del sustrato y de la enzima. La catálisis enzimática provee una nueva estrategia en síntesis de polímeros, los cuales presentan dificultades en los procesos convencionales mediante catálisis química. Esta nueva estrategia se ha expandido a la síntesis de polímeros biodegradables como poliésteres alifáticos, policarbonatos, polifosfatos, y también para poliaromáticos y polivinilos. Estos polímeros biodegradables han sido usados para aplicaciones biomédicas tales como dispositivos ortopédicos, tejidos de ingeniería y dispositivos para la liberación controlada de fármacos. Todas estas aplicaciones biomédicas tienen que cumplir con requerimientos específicos como altos pesos moleculares, entre otros.^[17]

La investigación en el área de polimerizaciones catalizadas enzimáticamente ha recibido progresiva en los últimos años. Muchas familias de enzimas se pueden usar para la transformación de sustratos no únicamente naturales, sino también de un amplio rango de compuestos sintéticos. Las lipasas, como se mencionó anteriormente, son enzimas que pueden catalizar la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos presentes normalmente en sistemas acuosos en seres vivos. Al ser estables en disolventes orgánicos algunas de ellas, se pueden usar como catalizadores para reacciones de esterificación y transesterificación. Estos catalizadores tan específicos promueven la producción de poliésteres y policarbonatos mediante diferentes tipos reacciones de polimerización. Las lipasas catalizan la PAA de lactonas de láctidos y de carbonatos cíclicos para producir poliésteres alifáticos o policarbonatos. El potencial como catalizadores de algunas lipasas comerciales se debe en gran parte al hecho de que dependiendo del disolvente usado en el sistema, pueden ser usadas para reacciones de hidrólisis o para la síntesis de ésteres y poliésteres.^[17]

5. Mecanismo de reacción

El mecanismo generalmente aceptado para la PAA del L-láctido se muestra en la Figura 2.7. El sitio catalítico es un residuo de serina y las reacciones se llevan a

cabo mediante un intermediario acil-enzima (monómero activado por la enzima). La polimerización enzimática por PAA tiene pasos de iniciación y de propagación.^[20]

El residuo de serina nucleofílico participa en el ataque al carbonilo de la lactona para formar un complejo enzima-lactona inicial (ELC). Luego ocurre un ataque nucleofílico del agua, que está presente en la superficie de la enzima, en el carbonilo del ELC para producir una estructura abierta de la lactona. Después ocurre un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo terminal de la lactona abierta al carbonilo de ELC; ésto conduce a la formación de un primer tetrámero de PLLA. Cabe mencionar que en este tipo de reacción, el agua contenida en la enzima participa en dos diferentes rutas. El agua contenida en la enzima disminuye a medida que se utiliza en la hidrólisis del ELC, por otro lado, el contenido de agua aumenta debido a las policondensaciones entre los ELCs y la forma abierta de la lactona.^[17]

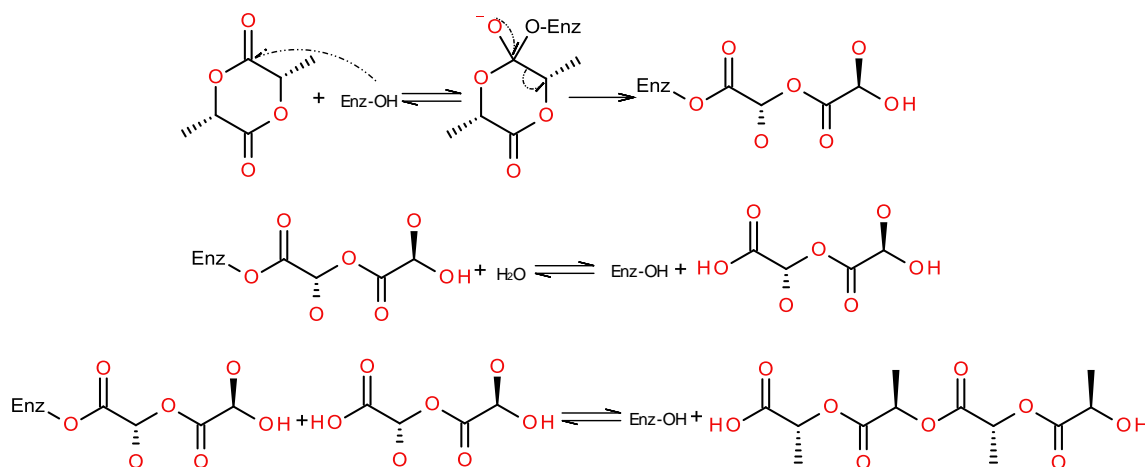


Figura 2. 7. Mecanismo de polimerización enzimática de LLA.

6. Lipasa PS

La Lipasa PS (*Pseudomonas Species*) de *Pseudomonas cepacia*, que fue reclasificada como *Burkholderia cepacia* en 1995, en honor al Dr. Burkholder de la

Universidad de Cornell en Estados Unidos de Norteamérica, quien la descubrió en 1949 en las catáfilas de cebolla y en sus epidermis radiculares. Es una lipasa que tiene su origen en un grupo de bacterias gram negativas, no fermentadoras y aerobias.^[21] La cadena polipeptídica tiene un peso molecular de 33 kDa y consta de 320 residuos de aminoácidos.^[17] La estructura cristalina de la Lipasa PS muestra que la enzima se compone de tres dominios, el mayor de los cuales es miembros de la familia del doblamiento “ α/β -hidrolasa” y un sitio de unión con un ión de calcio; es una enzima globular con dimensiones aproximadas de 30x50x50 Å. Las figuras 2.8 y 2.9 muestran la estructura cristalina y topografía estructural de la lipasa PS

La triada catalítica está formada por tres residuos (Ser87, His286 y Asp264); el nucleófilo Ser87, está situado en una curva cerrada, lo que permite a la His286 y al sustrato tener acceso. El sitio de unión está compuesto por iones de calcio unidos a los grupos carboxilato de Asp242 y Asp288, dos grupos carbonilo de Gln292 y Val296 y dos moléculas de agua. El sitio activo de la Lipasa PS muestra características similares a otras lipasas. Esta enzima es ampliamente utilizada para la síntesis orgánica e hidrólisis de triglicéridos de cadena larga debido a su enantioselectividad.^[21]



Figura 2. 8. Estructura cristalina de la lipasa PS.

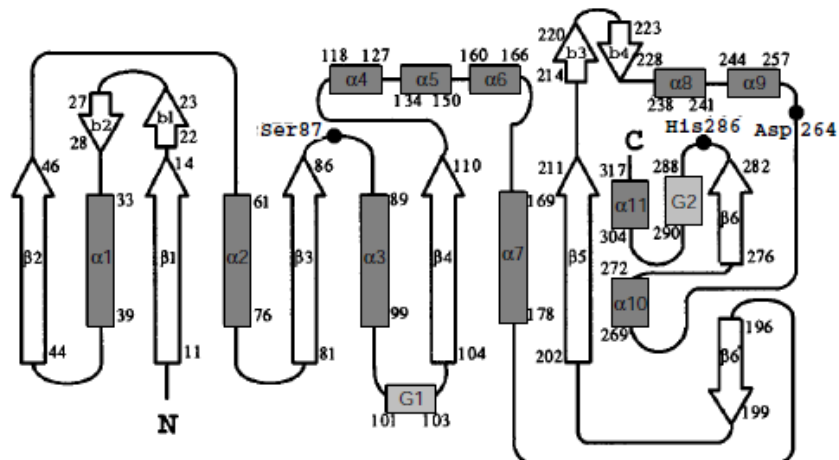


Figura 2. 9. Diagrama topológico de la estructura de la lipasa PS.

Se han reportado diferentes síntesis de polímeros empleando Lipasa PS (en estado libre); la tabla 2.4 presenta un resumen de los polímeros obtenidos utilizándola. ^[17]

Tabla 2. 4. Polímeros obtenidos utilizando lipasa PS.

Monomero	T (°C)	Tiempo (h)	Medio de reacción	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Conversión o rendimiento
β-PL	60	120	Masa	290	---	60
β-BL	45	480	Masa	7700	---	85
γ-BL	45	480	Masa	800	---	8
γ-VL	60	480	Masa	800	---	<5
ε-CL	45	480	Masa	8800	---	100
γ-CL	60	480	Masa	1000	---	<10
OL	75	240	isooctano	16000	22000	85
δ-DL	45	480	Masa	6900	---	87
	60	480	Masa	9000	---	87
UDL	60	120	Masa	5700	---	100
	60	72	c-hexano	1100	---	77
DDL	60	120	Masa	5600	---	100
	75	120	Masa	16400	---	100
Δ-DDL	45	480	Masa	5900	---	78
	60	480	Masa	7900	---	78
	60	240	Masa	2400	---	90
PDL	45	480		3600	---	64
	80	72		34400	---	92
	60	72		---	21300	100
HDL	75	120		5800	---	100
LLA	100	168		---	48000	82
DLA	100	168		---	59000	96
DLLA	130	168		---	12600	100

iii. Solventes en la química verde

Como se expuso anteriormente las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación y transesterificación siempre que utilicen solventes orgánicos como medios de reacción. Sin embargo, dentro del marco de la química verde dichos solventes son rechazados ya que presentan cierta toxicidad y son dañinos para el medio ambiente; además, son consideradas de uso peligroso debido a su carácter inflamable. Algunas de las alternativas aceptadas por la química verde se encuentran los líquidos iónicos (LI) y los fluidos comprimidos (FC). Los LI poseen propiedades disolventes excelentes, presentan elevada estabilidad química y térmica, además de una insignificante presión de vapor, lo cual facilita su reutilización,^[22]. Algunos de los FC son considerados solventes GRAS (Generally Recognized as Safe) y se han convertido en una de las herramientas más importantes en la química verde, debido a que sus propiedades como disolventes pueden ser manipuladas fácilmente; entre ellos, el dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) es el más estudiado como alternativa a los disolventes orgánicos volátiles (DOV).

1. Fluidos supercríticos (FSC)

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperatura críticas, alcanza el estado supercrítico. En este estado se interrumpe la línea de separación de fases líquido-gas. Ésto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas: así pues, mientras se mantiene una gran difusividad similar a la de los gases, se consigue una alta densidad y solvatación cercana a la de los líquidos.^[23] La tabla 2.5 muestra una comparación de los valores de ciertas propiedades de los FSC contra los valores clásicos en gases y líquidos.

Tabla 2. 5. Valores típicos de algunas propiedades físicas de los FSC.

Propiedad	Gas	FSC	Líquido(unidades)
Densidad (kg/m^3)	1	100-800	1000
Viscosidad (cP)	0.01	0.05-0.1	0.5-1.0
Difusividad (mm^2/s)	1-10	0.01-0.1	0.001

Al igual que los gases, la densidad de los FSC varía enormemente con la presión y la temperatura, aunque se alcanzan densidades muy cercanas a las de los líquidos. De esta forma, la propiedad más característica de los FSC es el amplio intervalo de densidades que pueden adoptar dependiendo de las condiciones de presión y/o temperatura.^[24]

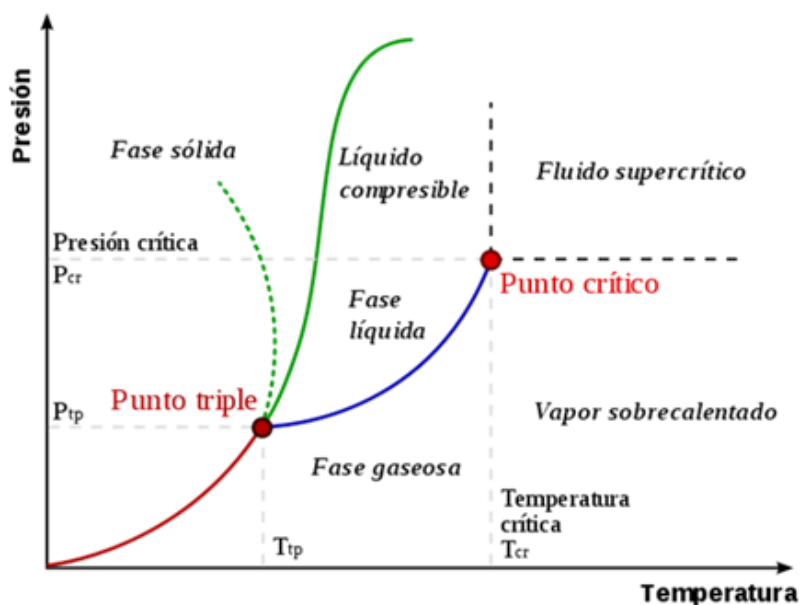


Figura 2. 10. Región supercrítica.

Teniendo en cuenta estas características, los FSC se convierten en disolventes ideales puesto que su enorme difusividad les permite penetrar perfectamente a través de matrices porosas y su capacidad de solvatación ajustable les permite una gran versatilidad y selectividad según las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan. Los tres principales usos de los FSC son:

- **Extracción:** no dejan residuos, se obtienen extractos de alta pureza y no requiere altas temperaturas, lo que favorece su aplicación a productos naturales.

- **Precipitación:** dando como resultado la obtención de cristales con morfología muy uniforme, alta pureza y libres de residuos de disolvente.
- **Medio de reacción:** en donde la existencia de una fase continua desde la densidad del gas hasta la densidad del líquido, lo permite una óptima transferencia de masa con bajos consumos de energía.

Se pueden obtener muchos beneficios al utilizar los FSC como medio de reacción en catálisis enzimática. Por ejemplo, la resistencia de la transferencia de masa entre la mezcla de reacción y los sitios activos en las enzimas se ven reducidos si el reactante está disuelto en un FSC. Adicionalmente, la densidad de un FSC es muy sensible a cambios de temperatura y presión; con ésto se alteran otras propiedades del solvente, como la constante dieléctrica, la solubilidad y el coeficiente de partición. Por lo tanto, es posible controlar el ambiente de la reacción y también la actividad y especificidad de las enzimas con solo pequeñas variaciones en la presión y/o temperatura del sistema.^[25,26]

2. 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (R134a o TFE) Líquido

Un gas que ha sido estudiado en los últimos años por sus posibles aplicaciones como solvente en su estado supercrítico, además del scCO₂, es el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a), debido a que no es tóxico, no es inflamable y al igual que el CO₂, no destruye la capa de ozono además de que es fácilmente reciclable. Aunque se fomenta el efecto invernadero con el uso de FC y FSC, el proceso de utilización fácilmente puede incluir un sistema de recirculación, lo que convertiría al proceso en uno completamente verde. El R134a es ampliamente usado en sistemas de refrigeración como sustituto de los CFCs y es clasificado como HFC ecológico por no generar ODP. La tabla 2.6 muestra una comparación entre las viscosidades y constantes de tensión superficial del R134a y otros solventes de uso común.

Tabla 2. 6. Propiedades físicas de algunos disolventes comunes.

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

El R134a es aceptado tanto en México como EEUU y la UE en el tratamiento de productos alimenticios y en aplicaciones farmacéuticas.^[27] Por ejemplo, el R134a se usa como aerosol en el tratamiento del asma constituyendo alternativa una a los fluoroclorocarbonos o clorocarbonos, los cuales son más dañinos para el medioambiente, ya que destruyen la capa de ozono. La ventaja del uso del R134a en procesos químicos cuando se compara con el scCO₂ reside en que puede operar de forma efectiva a mucha menor presión (15-20 bar), manteniendo propiedades fisicoquímicas similares, sin necesidad de superar sus constantes críticas ($T_C=101^\circ\text{C}$, $P_C=40.6$ bar).^[28] Además, la polaridad de este FC ($\epsilon=5.0$, $E=2.1\text{D}$) favorece la solubilidad de substratos de mayor polaridad. El conjunto de estas características permiten que el R134a líquido sea explotado industrialmente como en el caso de procesos de extracción de productos naturales.^[29] También han sido reportadas sus ventajas como disolvente no convencional en distintos procesos, incluida la síntesis de polímeros.^[30,31] La tabla 2.7 enlista las constantes dieléctricas y momentos dipolares del R134a, así como de otros solventes comunes.

Tabla 2. 7. Constantes dieléctricas (ϵ) y momento dipolar (DM).

Disolvente	$\epsilon(\text{kHz})$	DM
R134a	9.5	2.05
Hexano	1.9	0.08
Dietil éter	4.34	1.52
Diclorometano	9.08	1.55
Tetrahidrofurano	7.61	1.63
Acetona	20.7	2.9
Metanol	32.6	1.66

Por último la tabla 2.8 presenta una comparación entre las propiedades físicas, químicas y de toxicidad que presenta el R134a frente a las del CO₂.

Tabla 2. 8. Propiedades fisicoquímicas y toxicidad del CO₂ y R134a.^[i, ii]

	Dióxido de carbono	R134a
Peso molecular	44.01 g/mol	102 g/mol
Forma	Gas, líquido, sólido	Gas licuado
Color	Incoloro	Claro, incoloro
Olor	Inodoro	Ligero olor a éter
Punto de ebullición	-78.5°C a 1.0132 bar	-26.2 °C a 0.985 bar
Punto de congelación	-56.6°C a 5.269 bar	---
Punto de ignición	N/A	Punto de flamabilidad: No se quema Autoignición: >743°C
Presión de vapor	57.347 bar a 20°C	6.586 bar a 25°C
Densidad del gas	0.0018 g/mL a 20°C	3.6 (Aire=1) a 25°C
Densidad del líquido	---	1.21 g/cm ³ a 25°C
Solubilidad en agua	87.8% en volumen a 20 °C, 1.0132 bar	0.15% en peso a 25°C, 1.0132 bar
Estabilidad	Estable	Estable
Concentración en aire	0.03% por volumen- Nivel Normal 1% Incrementa ritmo de la respiración 3-6% Dolor de cabeza, sudor, disnea 6-10% Dolor de cabeza, sudor, disnea, temblor, disturbios visuales, inconsciencia Mayor a 10% inconsciencia o muerte	50,000 ppm (6 horas diaria, 5 días a la semana por 2 años) baja toxicidad en ratas. 75000 ppm taquicardia en perros 8 dosis de 8000 ppm en 1 hora cada 7 días no dio resultados adversos en pulso, electrocardiograma y función pulmonar en humanos
Límite de exposición: OOSHA: PEL-TWA ACGIH-TW-TWA NIOSH CPT CCT	5000 ppm 5000 ppm No establecido 5000 ppm 15000 ppm	No establecido No establecido AEL (DuPont) 1000 ppm, 8&12 Hr TWA WEEL (AIHA) 1000ppm, 8Hr TWA
IARC NTP OSHA	No está clasificado como cancerígeno	No está clasificado como cancerígeno

3. Ventajas y desventajas del uso de los FC

El uso de scCO_2 y R134a comprimido favorece la polimerización, no sólo por la insolubilidad de los productos finales en el medio, lo cual facilita su separación, sino también por el hinchamiento que pueden provocar en algunos polímeros, debido a la baja viscosidad y su elevada capacidad de interpenetración, considerándolos agentes porogénicos. Tienen la capacidad de actuar como lubricantes entre las cadenas crecientes de polímero, permitiendo con ello la rápida difusión del monómero y del catalizador, facilitando así la propagación de la reacción. Por otro lado, su uso garantiza la eliminación de trazas de disolvente en el material, comúnmente presentes con cuando se utiliza un DOV, debido a su completa volatilización a presión atmosférica, facilitando con esto proceso de purificación.^[32] En las polimerizaciones en disolución con DOV, o en reacciones en ausencia de disolvente (en masa), el polímero es comúnmente disuelto en un disolvente y posteriormente precipitado en un anti-disolvente con el fin de remover monómero residual, oligómeros y otros aditivos.^[33] En la polimerización en masa, donde sólo coexisten el monómero líquido y el iniciador disuelto en el mismo, se obtienen productos de alta claridad óptica y pureza. En las reacciones de polimerización en masa, dado que las reacciones son exotérmicas, se produce una disipación del calor ineficiente dando lugar a puntos calientes indeseables o “hot spots” en el seno de la reacción; además se presenta un incremento de la viscosidad del medio a medida que avanza la reacción, siendo este un impedimento para la eficiente conversión de monómero.^[34]

Al llevarse a cabo en disolución la reacción se intenta superar parcialmente estos problemas ya que el uso de un DOV facilita la difusión de las sustancias y mejora la disipación del calor de reacción. Sin embargo, existen factores desfavorables, tales como el impacto ambiental severo y el alto costo energético asociado a la purificación del producto. En cambio con el uso de los FC esta última etapa podría suprimirse a escala industrial debido a que las sustancias de bajo peso molecular

y otros aditivos son generalmente solubles en el medio y pueden separarse in-situ gracias a la propiedad extractiva del mismo.^[35]

iv. Avances recientes en polimerización enzimática en R134a líquido

El uso de enzimas con R134a líquido puro como medio de reacción para síntesis molecular fue reportado por primera vez por Micklefield *et al.*, (2004), quienes mostraron la compatibilidad de ambas sustancias y las ventajas que existen, respecto a la utilización de DOV o del mismo scCO₂.^[36] El estudio argumentó que aun siendo un disolvente polar, éste tiene naturaleza hidrofóbica, por lo que la novedad del R134a estriba en el hecho de ser un disolvente polar y a su vez ser compatible con la actividad enzimática sin la necesidad de agregar agua en el medio. Ya que, en la síntesis enzimática con el uso de solventes hidrofílicos, ocurre un fenómeno denominado “stripping”, o secuestro, del agua adsorbida en la enzima por parte del disolvente, por lo que es necesario agregar cierta cantidad de agua a la reacción, para garantizar la actividad catalítica de la enzima.^[37]

Así como se ha reportado la polimerización en R134a líquido, también se ha demostrado la compatibilidad de la actividad enzimática en R134a líquido, especialmente la estabilidad y actividad de la lipasa CALB, donde los resultados indican que el uso de R134a líquido condujo a un aumento significativo de la actividad de la enzima.^[37, 38] Recientemente el grupo de investigación del laboratorio 314 del departamento de biotecnología y alimentos de la facultad de química de la UNAM, demostró que era posible llevar a cabo la PAA enzimática de la ϵ -CL en R134a líquido, y se determinó que las condiciones de presión y temperatura a las que trabaja mejor la enzima fueron 25 bar y 65°C. También fue relevante el efecto de la actividad de agua (A_w), la relación entre la presión de vapor de agua sobre el sistema y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, ya que si bien a condiciones de $A_w=0.22$ se obtuvo el mayor rendimiento, a condiciones de $A_w<0.16$ se alcanzó el mayor peso molecular.^[39, 40]

3. Objetivos

a. Objetivo general

Determinar las condiciones necesarias para llevar a cabo la polimerización vía enzimática de LLA utilizando R134a comprimido como medio de reacción, para conocer si es posible la producción de PLLA por un sistema verde.

b. Objetivos específicos

- Llevar a cabo la síntesis enzimática del ácido poli-L-láctico vía PAA de LLA mediante el uso de la Lipasa PS y utilizando R134a comprimido como solvente, en estado líquido y como FSC.
- Determinar las mejores condiciones de reacción variando la temperatura-presión, tiempo de reacción y relaciones de alimentación; comparar con los resultados obtenidos en las reacciones en masa y los blancos, para conocer los efectos del solvente y el catalizador sobre este sistema.
- Determinar la actividad enzimática de la lipasa PS antes y después de la reacción, con el fin de evaluar la posible reutilización de la enzima.
- Estimar la conversión del monómero mediante análisis de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$).
- Caracterizar de los materiales obtenidos mediante técnicas analíticas:
 - Determinar el peso molecular de los polímeros mediante la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), para determinar si hubo polimerización.
 - Determinar las temperaturas de fusión (T_m) y de transición vítrea (T_g) por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el porcentaje de degradación del polímero por termogravimetría (TGA), para determinar la estabilidad térmica del polímero.
 - Realizar un análisis de difracción de rayos X en polvo para determinar el porcentaje de cristalinidad en los polímeros sintetizados.

4. Metodología

a. Materiales

El LLA, (3S)-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona, (99%, Sigma Aldrich) fue purificado por recristalización en metanol y secado en una bomba de vacío (30 mmHg) previo a su uso. Lipasa PS (Burkholderia cepacia de Amano Enzymes, Japón), comprada a Sigma Aldrich y usada directamente.

Metanol, hexano y cloroformo grado técnico, comprado a Química Barsa S. A. de C.V.

Cilindro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a SUVA Dupont) fue adquirido a refaccionarias STAR SA de CV.

b. Equipo

En este estudio se usaron los siguientes equipos: reactor de alta presión de 40 mL de capacidad, (FILHER S.A. de C.V, México); celda de alta presión de acero inoxidable de 40 mL con mirillas de zafiro (THUROS S.A. de C.V, México); calefactores y medidores de temperatura termopar para el correcto monitoreo de las reacciones (ENSA S.A. de C.V.); bombas de aguja para FC (ISCO Syringe Pump) adaptados a los tanques de suministro.

La figura 4.1 ilustra los equipos utilizados en las reacciones enzimáticas usando FC, mientras que la figura 4.2 se muestra la celda de alta presión con mirillas de zafiro para realizar las evaluaciones de solubilidad de los monómeros y productos durante el transcurso de las reacciones.



Figura 4. 1. Bomba para fluidos comprimidos y reactores de alta presión.



Figura 4. 2. Celda de alta presión con mirillas.

c. Desarrollo experimental

i. Purificación del monómero

El LLA fue purificado mediante recristalización en metanol. Para ésto fue disuelto en una relación de 1:6 p/v a 36°C, para después enfriar a 5°C durante 24 h. Posteriormente fue separado mediante una etapa de filtrado; las trazas de solvente fueron eliminadas mediante secado al vacío.

ii. Síntesis de PLLA

El reactor se cargó con el monómero y la enzima a las relaciones de alimentación requeridas por el ensayo. Los porcentajes de monómero fueron medidos respecto a la capacidad total del reactor, mientras que el biocatalizador fue añadido en relación al monómero alimentado. Una vez cargado y sellado el reactor se procedió a la alimentación del R134a, ajustando la presión inicial a 15 bar; a continuación se elevó la temperatura hasta ajustarla a las condiciones requeridas por el ensayo. Una vez alcanzada la temperatura, y de ser necesario, se añadió una cantidad

complementaria de R134a con el fin de obtener la presión deseada. La agitación fue provista mediante un agitador tipo barra magnética y el reactor fue colocado sobre parrillas de agitación. Al concluir el ensayo el reactor fue enfriado, colocándose dentro de un cuarto frío (5°C) durante 12 horas, con el fin de detener la reacción, y disminuir la presión al interior del mismo, para posteriormente realizar una despresurización abriendo las válvulas de éste.

Las reacciones en masa o bulto se llevaron a cabo en matraces de bola de 10 mL, donde se agregaron 2g de LLA y el porcentaje correspondiente de Lipasa PS. La temperatura fue mantenida por un baño de glicerina, y la agitación provista por barras magnéticas. Estos experimentos fueron detenidos al tiempo en el que la viscosidad del polímero detenía por completo el movimiento del agitador, ya que se consideró que en ese momento el peso molecular obtenido sería el mayor posible. La tabla 4.1 presenta un resumen de las condiciones probadas, así como de las cantidades añadidas.

Tabla 4. 1. Condiciones de reacción y alimentaciones evaluadas.

Solvente	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Relación alimentación de LLA (% p/v)	LLA (g)	Relación alimentación de lipasa PS (% p/p)	Lipasa PS (g)
R134a Subcrítico	25	65	20	8	10	0.8
	25	65	40	16	10	1.6
	25	105	40	16	10	1.6
scR134a	50	105	20	8	10	0.8
	50	105	20	8	20	1.6
	50	105	30	12	10	1.6
	50	105	40	16	10	1.6
	50	105	40	16	---	0.0
Sin solvente*	---	65	---	2	10	0.2
	---	105	---	2	10	0.2
	---	105	---	2	20	0.4
	---	105	---	2	---	0.0

*Llevados a cabo en matraces de bola de 10 ml.

iii. Purificación de productos

Se disolvió en cloroformo la mezcla obtenida del reactor y los matraces y fue filtrada, usando papel filtro común, con el fin de separar la enzima. Posteriormente la solución libre de enzima se adicionó lentamente a hexano, en una relación de 1:10 v/v. El precipitado obtenido fue filtrado nuevamente y secado al vacío para eliminar trazas de solvente; se tomó una muestra de 50 mg con el fin de realizar los análisis de $^1\text{H-RMN}$. El resto del precipitado fue disuelto nuevamente en cloroformo, y la disolución agregada lentamente en metanol, relación 1:10 v/v, para precipitar el polímero sintetizado y separarlo del monómero residual. Se llevó a cabo una etapa de microfiltrado utilizando membranas Millipore de 0.45 μm de diámetro de poro, para luego ser sometido a una etapa de secado en una extractora de solventes con el fin de eliminar trazas de alguno de ellos. Por último se pesó el polímero seco con el fin de determinar el rendimiento de la reacción.

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Peso de polímero recuperado (g)}}{\text{Peso de monomero alimentado (g)}} * 100$$

iv. Medición de la actividad enzimática mediante la hidrólisis del *p*-nitrofenil acetato por espectroscopía UV-visible

Con la finalidad de conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la actividad enzimática de la lipasa PS se determinó la actividad residual utilizando al *p*-nitrofenil como sustrato. La medición se realizó a las muestras de enzima recuperada a diferentes tiempos y condiciones de reacción, y fue comparada con la actividad obtenida para la enzima en el tiempo cero, utilizando un espectrómetro de UV-Visible (Perkin Elmer Lambda 2S) a 410 nm.

Se elaboró una curva patrón, para lo que se prepararon diferentes soluciones de *p*-nitrofenol en acetonitrilo a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM en

matraces aforados de 10 mL en una solución amortiguadora de fosfatos (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0) y 0.2% de emulsificante (Tritón X-100).

Para la lectura de las muestras, se colocaron 1.8 mL de una solución amortiguadora a una celda de vidrio y se adicionaron 100 μ L de una solución de *p*-nitrofenil acetato en acetonitrilo (100 μ M). Las muestras de enzima fueron disueltas en la solución amortiguadora de fosfatos a una concentración de 2 mg/mL y se agregaron 100 μ L de esta solución a la celda.

La medición de la absorbancia se llevó a cabo a 410 nm en el espectrofotómetro durante 2 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente la señal de absorbancia fue convertida a unidades de concentración de producto formado (μ M) contra tiempo de reacción (min) en base a la curva de calibración de *p*-nitrofenol en buffer de fosfatos con emulsificante.^[41]

v. Caracterización de productos

1. Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)

Las distribuciones de pesos moleculares se determinaron por SEC mediante un sistema formado por una bomba isocrática (HPLC Hewlett Packard HP1050S, USA), un automuestreador (HP1100S, USA) y un detector de índice de refracción a una temperatura de 35°C (Waters 510, USA), empleando 2 columnas en serie PLGEL 10 cm MIXED-B 300 x 7.5 mm (1106-6100 LS, Varian, USA) montadas en un termostato a 25 °C (1200-G1316, Agilent, USA). La fase móvil fue cloroformo grado HPLC, a la temperatura del termostato y a una rapidez de flujo de 0.8 mL/min.

La concentración de las muestras fue de máximo 5 mg de polímero en 2 mL de $ClCH_3$ y el volumen de inyección de 10 μ l. Todas las soluciones fueron filtradas usando acrodiscos de 0.45 μ m de tamaño de poro previo al análisis. Se compararon las distribuciones de pesos moleculares contra estándares calibrados de PS, en un

rango de 2,900 a 591,000 g/mol con un índice de polidispersidad (PDI) de 1 a 1.23 (Polymer Laboratories Inc., USA).

2. Determinación del avance de la reacción mediante ^1H -RMN

El avance de la reacción se determinó a partir de la ^1H -RMN. Dicho análisis se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM), utilizando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian Unity Inova Spectrometer operado a 400 MHz. Para obtener los espectros de ^1H -RMN, 50 mg de cada muestra se disolvieron en 2mL de cloroformo deuterado (CDCl_3). Se usó al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; los desplazamientos químicos fueron presentados en partes por millón (ppm).

Se identificó al PLLA como producto de la reacción y se determinó el avance de la reacción por medio de la integración de las señales a 5.0ppm correspondiente al hidrógeno del metileno del monómero, es decir la forma cíclica y a 5.2ppm correspondiente al hidrógeno del metileno de las formas abiertas. ^[42], dicha integración fue realizada a través del software MestreC. La fórmula utilizada fue:

$$\%con = \frac{I_{5.2}}{I_{5.0} + I_{5.2}}$$

Dónde:

$\%con$ es el porcentaje de conversión del monómero a la forma abierta, e $I_{5.0}$ y $I_{5.2}$ son las integraciones de las señales correspondientes.

La figura 4.3 muestra un ejemplo de un espectro de ^1H -RMN obtenido para una de las muestras. En él se observan las señales características de los hidrógenos correspondientes a los grupos metilos del láctido en su forma cíclica y de la forma abierta, así como los resultados de integración de estos.

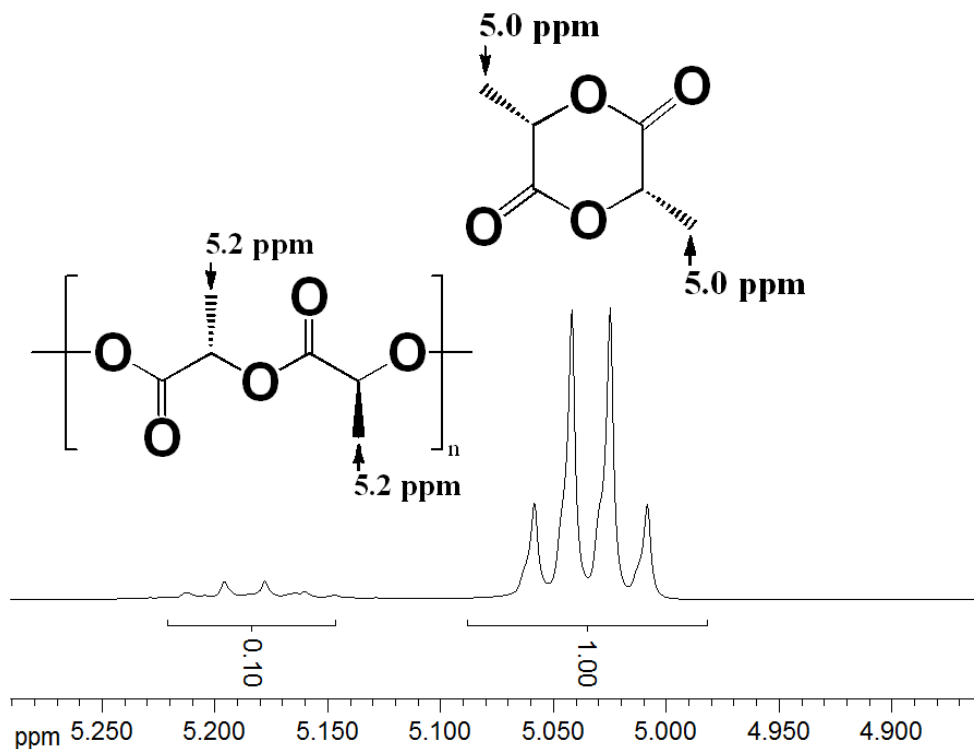


Figura 4. 3. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ del PLLA, señales correspondientes a la forma abierta y al monómero cíclico.

3. Análisis térmicos

a) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La DSC se realizó utilizando un equipo DuPont 2100 con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{minuto}$. Las muestras se analizaron en un intervalo de temperatura de 10 a $300\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno.

Para este análisis una pequeña cantidad, aproximadamente 5 mg , de muestra problema se deposita dentro de una cápsula de aluminio, y se coloca en un pequeño crisol metálico. En otro crisol metálico se coloca otra cápsula que se toma como referencia del mismo material empleado para encerrar la muestra problema; esta otra cápsula usualmente se encuentra vacía o rellena de algún material que no sufre ninguna transición térmica en el intervalo de temperatura de interés para realizar el análisis. Ambas cápsulas son calentadas individualmente

en diferentes cámaras y se registra la temperatura de ambos. Los equipos de DSC disponibles actualmente miden el flujo de calor necesario para mantener un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra. En lo que se refiere a la caracterización de polímeros esta técnica se emplea para obtener la temperatura de transición vítrea T_g y de fusión.

La T_g de un polímero se entiende como la temperatura debajo de la cual un determinado polímero se comporta como un material vítreo y por arriba de la cual se comporta como un material elástico. Este concepto sólo es aplicable a materiales amorfos, ya que si el polímero tiene un alto grado de cristalinidad, este cambio puede ser no apreciable. Una interpretación molecular de la T_g es considerar que a temperaturas muy bajas los átomos que constituyen la cadena polimérica solamente pueden vibrar alrededor de posiciones determinadas. A medida que se eleva la temperatura el movimiento es mayor hasta llegar a la T_g , a la que es posible que se muevan secciones de la cadena.^[43, 44]

b) **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Para el análisis termogravimétrico se usó un equipo TA Instruments Hi-Res TGA 2950 en una atmósfera de nitrógeno usando una rampa de calentamiento de 10 °C/minuto. El intervalo de temperatura donde se analizaron las muestras fue de 25 a 500 °C. Se tomaron aproximadamente 5 mg de muestra por análisis.

La termogravimetría es una técnica para evaluar el cambio en la masa de una muestra en función de la temperatura. En este análisis se usa una balanza muy sensible para seguir la variación de peso de un polímero en función del tiempo y la temperatura.^[45]

4. Determinación de cristalinidad mediante Rayos X en polvo

La difracción de Rayos X de las muestras en polvo fueron llevadas a cabo mediante un difractómetro Siemens (Modelo D5000) compuesto por una fuente $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) localizado en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI-FQ-UNAM). El polímero fue pulverizado en un mortero y se tomaron muestras de 50 mg. La cristalinidad de las muestras expresada en porcentaje fue determinada mediante la relación de las áreas cristalinas y total.

En un diagrama de rayos X para un polímero semicristalino, puede verse la intensidad de los rayos X dispersados frente al ángulo de difracción θ . Los picos relativamente más estrechos son debidos a la dispersión producida por las regiones cristalinas, mientras que el pico más ancho (llamado halo amorfo), sobre el que los demás picos descansan, es debido principalmente a la dispersión producida por las zonas amorfas. Se puede calcular el grado de cristalinidad wc con la fórmula: ^[44]

$$\%wc = \frac{Ac}{Ac + Aa} * 100$$

Dónde:

Ac = Área de picos cristalinos, y Aa = Área de picos amorfa.

5. Resultados y discusión

a. PAA enzimática de LLA usando R134a comprimido como medio de reacción

Para los experimentos iniciales se emplearon las condiciones descritas García-Arrazola *et al.* (2007) para ϵ -CL en R134a líquido usando como biocatalizador la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada sobre soporte esférico de Lewatit VPOC 1600 en su forma comercial Novozym435, ellos encontraron que las mejores condiciones de presión y temperatura fueron 25 bar y 65°C, manteniendo una relación de 20% p/v de monómero con respecto a la capacidad del reactor y una de 10% de enzima respecto al monómero alimentado [39]. Los resultados obtenidos para estas condiciones fueron comparados con los obtenidos para las mismas condiciones para R134a en condiciones supercríticas a 50 bar y 105°C y con Lipasa PS en la síntesis de PLLA.

Como se puede apreciar en la figura 5.1, los resultados obtenidos en condiciones supercríticas condujeron tanto a mayores rendimientos como a pesos moleculares más elevados, llegando a obtenerse rendimientos de hasta 14% y pesos moleculares de alrededor de 3500 g/mol.

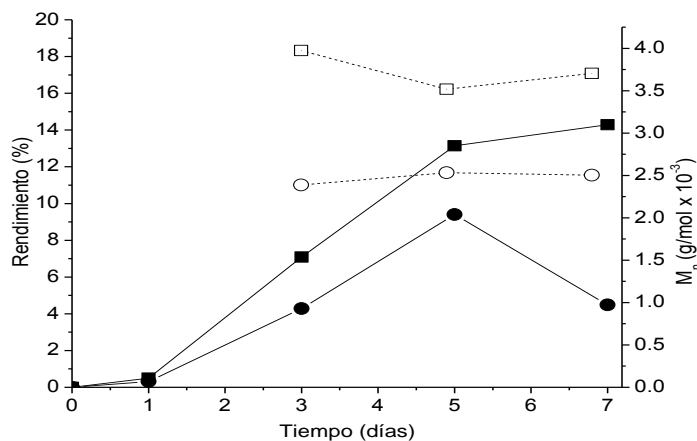


Figura 5. 1. Comparación inicial de polímeros obtenidos a condiciones supercríticas y líquidas: rendimiento supercrítico (■), rendimiento líquido (●), M_n supercrítico (□), M_n líquido (○).

Posteriormente se evaluó el efecto de la variación de la proporción enzima/sustrato utilizada para las mismas condiciones de temperatura y presión, así como la comparación de los resultados anteriores con la misma reacción en masa. Con el fin de determinar si el efecto observado no era causado exclusivamente por la temperatura se realizó un experimento a condiciones subcríticas con temperatura similar a la utilizada en condiciones supercríticas. Las condiciones bajo las que se llevaron a cabo las reacciones en estado supercrítico utilizando al R134a como solvente fueron 105°C y 50 bar. Los productos purificados fueron identificados como PLLA por estudios de $^1\text{H-RMN}$, y sus pesos moleculares determinados por SEC. Los resultados de los rendimientos para las diferentes reacciones de polimerización se muestran en la figura 5.2. Los pesos moleculares M_n obtenidos son presentados en la figura 5.3.

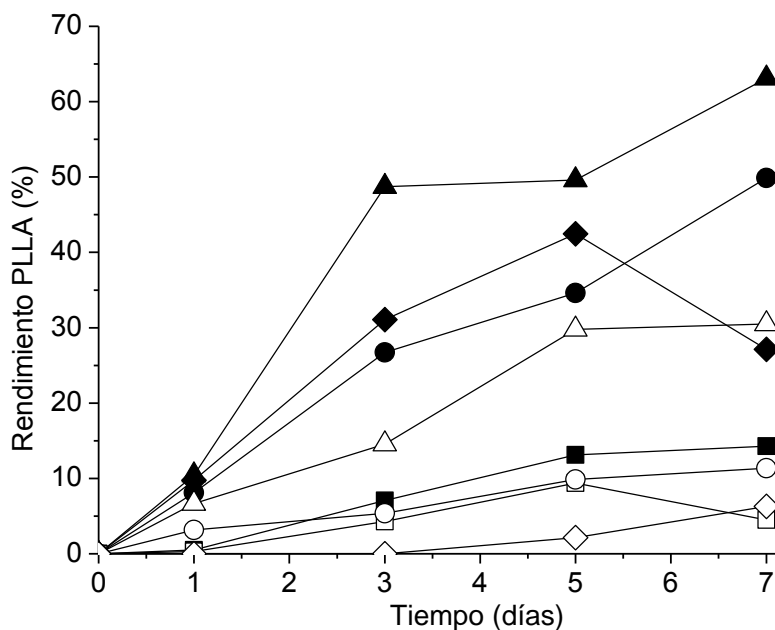


Figura 5. 2. Rendimientos obtenidos para la PAA enzimática de LLA de los polímeros obtenidos a diferentes condiciones de reacción: supercrítico 20:10 a 105 °C y 50 bar (■), supercrítico 30:10 (●), supercrítico 20:20 (▲), supercrítico 40:10 (◆), líquido 20:10 a 65 °C y 25 bar (□), líquido 40:10 (○), líquido 40:10 a 100 °C (△) y blanco supercrítico (◇).

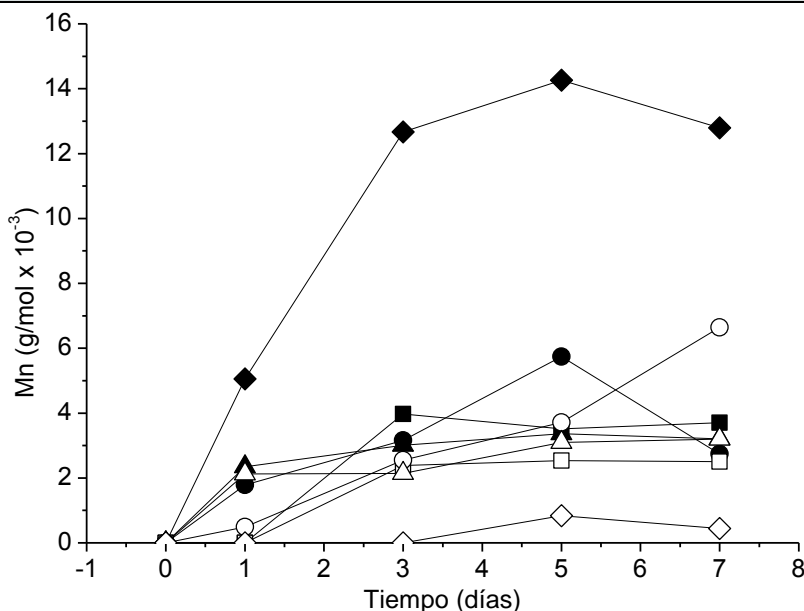


Figura 5. 3. Pesos moleculares (M_n) de los polímeros obtenidos a diferentes condiciones de reacción: supercrítico 20:10 a 105 °C y 50 bar (■), supercrítico 30:10 (●), supercrítico 20:20 (▲), supercrítico 40:10 (◆), líquido 20:10 a 65 °C y 25 bar (□), líquido 40:10 (○), líquido 40:10 a 100 °C (Δ) y blanco supercrítico (◇).

Se puede apreciar en ellas que tanto los rendimientos como pesos moleculares obtenidos utilizando R134a supercrítico fueron superiores comparado con los arrojados para las mismas relaciones de alimentación en condiciones subcríticas, así como a su correspondiente reacción en ausencia de solvente.

Es también claro que la relación de alimentación del monómero influye en las características del PLLA obtenido, siendo que para una misma relación de alimentación de lipasa, 10% en peso, manteniendo las mismas condiciones de presión y temperatura, pero cambiando la alimentación de LLA, fue posible obtener un incremento en el peso molecular (M_n) llegando a un máximo de 14000 g/mol con un rendimiento de 42%, siendo éste al límite máximo de la capacidad del reactor, 40% p/v de LLA. Ésto pone en evidencia de la alta disponibilidad de sustrato dentro del sistema, en general los rendimientos de PLLA obtenidos fueron superiores a los reportados para PAA enzimática de LLA utilizando scCO₂, así como los sistemas en masa, y muy similares a los reportados con el uso de LI como medio [26, 46-49]. Garcia-Arranzola *et al.* encontraron que el alimentar el

reactor a la máxima capacidad de LLA, previo a la adición de $scCO_2$ resultaba en la inactivación de la enzima (CALB)^[26], lo cual concuerda con lo reportado en trabajos previos de PAA enzimática para ϵ -CL utilizando tolueno o hexano como solventes y una enzima proveniente de una levadura como catalizador. García reportó que existía una dramática caída en los rendimientos y pesos moleculares a cantidades iniciales de lactona altas, lo cual fue atribuido a una insuficiente distribución de intermediarios lineares entre el solvente de reacción y el sitio activo de la enzima, y de este modo las formas hidroxilados se vuelven los nucleófilos en mayor proporción y están en competencia con los intermediarios enzima sustrato. Fue interesante seguir el progreso de la PAA enzimática a través de una celda de alta presión de mirillas. En ella se observó que el polímero precipita del medio reacción cuando se alcanza el peso molecular (M_n) máximo obtenido.

El duplicar la cantidad inicial de enzima (20% p/p) manteniendo las condiciones supercríticas condujo a un incremento considerable en el rendimiento, teniendo un máximo del 53%. Este rendimiento se alcanzó a los 3 días de reacción y presentó poca variación para los días siguientes. Además no se observó precipitación de las cadenas a estas condiciones. Los análisis de SEC además demostraron que el peso molecular M_n nunca sobrepasa los 4000 g/mol. Lo anterior nos lleva a concluir que el incremento en el rendimiento de PLLA observado al aumentar la cantidad de enzima, es ocasionado por el incremento en el número de las cadenas iniciales, como ha sido encontrado en otros sistemas de polimerización catalizados por lipasas^[50]. Por lo tanto, el aumentar la cantidad de enzima en el sistema, no necesariamente es lo óptimo para obtener un mayor peso molecular.

Por otro lado, para descartar el efecto térmico de disminución de la energía de activación (E_a) al aumentar la temperatura de reacción, se decidió trabajar con R134a líquido elevando la temperatura hasta alcanzar los 105°C pero manteniendo la presión en 25 bar, conservando las mismas condiciones de alimentación de sustrato y enzima. Se encontró que, aunque el aumentar la temperatura tiene un impacto positivo, tanto en rendimiento como en peso

molecular, no fue posible igualar los resultados obtenidos para condiciones supercríticas, siendo el M_n máximo obtenido de aproximadamente 3000 g/mol, con un rendimiento máximo de 28% para estas condiciones subcríticas. Es interesante, sin embargo, resaltar que el efecto de la temperatura fue más notorio al comparar los resultados obtenidos entre el R134a subcrítico a 105 °C (25 bar) y a 65 °C (25 bar), ya que fue posible observar un incremento en el rendimiento de aproximadamente 3 veces con el aumento en la temperatura. Se debe mencionar también que además del efecto termodinámico, podría presentarse un incremento en la solubilidad de las cadenas de PLLA formadas como consecuencia del aumento en la temperatura.

Los experimentos control, en ausencia de enzima, realizados en scR134a condujeron a rendimientos y pesos moleculares mucho menores que aquellos obtenidos en los catalizados por la enzima, lo que prueba el efecto sostenido de la actividad de la Lipasa PS en el sistema bajo condiciones supercríticas, en complemento a los reportes previos de la actividad de la CALB en R134a. Esta baja propagación no enzimática observada en los experimentos control concuerda con reportes previos de PAA de LLA en reacciones en masa, así como en LI, y es atribuida a las trazas de hidroxiacidos provenientes de los LLA.^[46,47] Aunque cabe resaltar que la propagación no enzimática presente en nuestro sistema es mucho menor a la reportada para otros sistemas, lo que nos lleva a la conclusión de que las reacciones de polimerización secundaria no son favorecidas bajo este sistema.

Por último, las reacciones en ausencia de solvente llevadas a cabo para este estudio, realizadas a 100 °C, también condujeron a PLLAs de bajo peso molecular para todos los casos, con máximo de 3500 g/mol después de 7 días de reacción y alcanzando un rendimiento de 22%. Además, las reacciones control en masa resultaron en pesos moleculares y rendimientos similares, 3000 g/mol y 21%, que aquellos llevados a cabo en presencia de enzima para los mismos tiempos de reacción. Esto provee una evidencia experimental de la desactivación de la lipasa PS como consecuencia de encontrarse tanto como a una temperatura

relativamente alta como al encontrarse en un ambiente hidrofílico como lo es el monómero fundido, donde el efecto stripping es más favorecido. En otras palabras, las evidencias experimentales muestran que no es posible asegurar que en reacciones llevadas a cabo en ausencia de solvente el mecanismo sea enzimático. La tabla 5.1 presenta un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 5. 1. Rendimientos y M_n obtenidos.

Solvente	Condiciones	Rendimiento (%)	M_n^{**} (g/mol)	PDI	Tiempo (días)
R134a Subcrítico	25 bar, 65 °C, 20% LLA, 10% Lipasa PS	9.4	2532	1.60	5
	25 bar, 65 °C, 40% LLA, 10% Lipasa PS	11.3	6640	1.11	7
	25 bar, 105 °C, 40% LLA, 10% Lipasa PS	30.5	3195	1.21	7
scR134a	50 bar, 105 °C, 20% LLA, 10% Lipasa PS	7.1	3975	1.13	3
	50 bar, 105 °C, 20% LLA, 20% Lipasa PS	49.6	3362	1.44	5
	50 bar, 105 °C, 30% LLA, 10% Lipasa PS	34.6	5739	1.36	5
	50 bar, 105 °C, 40% LLA, 10% Lipasa PS	42.5	14265	1.15	5
	50 bar, 105 °C, 40% LLA, 0% Lipasa PS	2.1	836	1.56	5
Sin solvente*	65 °C, 10% Lipasa PS	32.1	3222	1.44	7
	105 °C, 10% Lipasa PS	31.1	3595	1.13	7
	105 °C, 20% Lipasa PS	22.6	3833	1.39	5
	105 °C, 0% Lipasa PS	21.1	2956	1.35	11

*Llevados a cabo en matraces de bola de 10 ml.

**Para estándares de PS.

b. Seguimiento visual de la reacción

Se llevó a cabo el seguimiento visual de la reacción con el fin de determinar el comportamiento del sistema a lo largo de la reacción de polimerización. El ensayo se realizó bajo las condiciones que condujeron al mayor peso molecular. Los resultados arrojados por los primeros experimentos, como puede observarse en la Figura 5.1, mostraron que al alcanzar un peso molecular de alrededor de 3300 g/mol comenzaba la precipitación de las cadenas, aunque el rendimiento continuaba su variación, es decir, continuaba habiendo incorporación de monómero pero solo en cadenas de pequeño tamaño, esto sugería que la etapa de propagación para cadenas en crecimiento era detenida por problemas de solubilidad. El estudio reveló que aunque al inicio de la reacción sólo es posible observar una fase, al avanzar el tiempo y comenzar a alargarse las cadenas de

PLLA, la turbidez del sistema aumenta, resultando en la precipitación del polímero del medio de reacción, la cual coincide en tiempo con el máximo M_n alcanzado, lo que lleva a concluir que la terminación de la polimerización en el sistema podría estar relacionada con limitaciones en la solubilidad de las cadenas en crecimiento más que con la inhibición de la enzima a concentraciones altas de sustrato inicial.

La figura 5.4 se presenta algunas fotografías tomadas a diferentes tiempos de la reacción. En ellas se puede observar que al inicio de la reacción el R134a disuelve completamente al LLA dando como resultado un sistema traslúcido, mientras que al comenzarse a formar las cadenas y crecer estas comienza a observarse cierta turbidez en el sistema así como la formación de pequeñas partículas, siendo que para el quinto día de reacción el sistema es completamente opaco y fue posible apreciar agregados en las paredes internas de la celda.



Figura 5. 4. Seguimiento visual de la reacción, formación de precipitado.

c. Avance de reacción

El consumo total de LLA fue alcanzado en las primeras 72 h en todos los experimentos en que se usó al scR134a como solvente (figura 5.5 a), lo que difiere de lo obtenido por Garcia-Arranzola *et al.* en scCO₂. Ellos reportaron que el máximo de conversión del monómero nunca sobrepasó el 60% después de 9 días de reacción^[26]. Otro trabajo realizado por el grupo de Fujioka reportó que, utilizando CALB en un sistema sin solvente, es posible lograr el 91% de conversión de monómero después de 10 días de reacción^[49], mientras que en 1997, Matsumura *et al.* reportaron un 86% de conversión de LLA después de 7

días utilizando lipasa de *Pseudomonas cepacia* en sistema en masa, lo que demuestra que una mayor actividad enzimática en el sistema de scR134a estudiado en el presente trabajo.

La figura 5.5 muestra los espectros ampliados de ^1H -RMN para las 72 h de polimerización de LLA, se puede apreciar que tanto el mantener condiciones supercríticas como la adición de la enzima favorecen a la apertura del anillo de LLA.

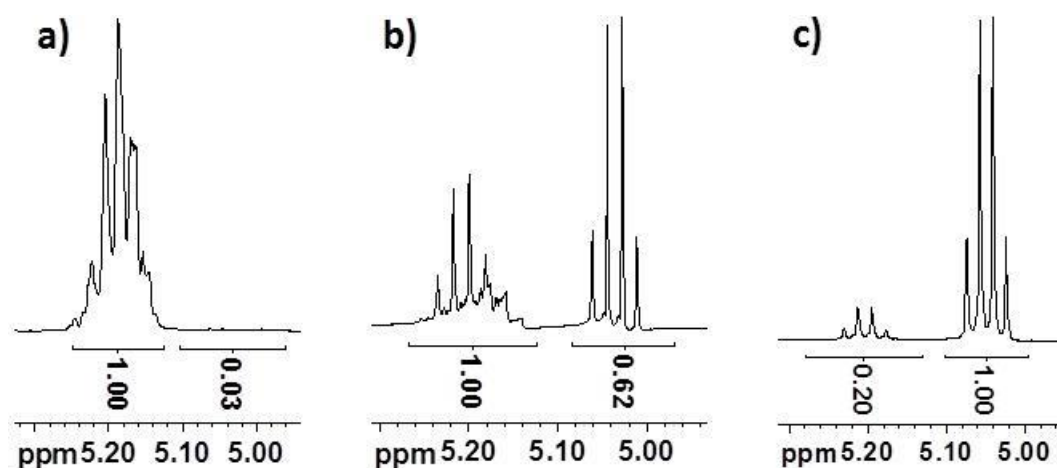


Figura 5. 5. Comparación entre espectros ampliados de ^1H RMN a las 72 horas para diferentes condiciones de reacción: scR134a (a), sin solvente (b) y sin presencia de enzima (c).

Las reacciones llevadas a cabo bajo un sistema en masa utilizando un 10% de enzima mostraron una conversión de monómero más lenta, alcanzando sólo un 17% y 48% de consumo de monómero después de 24 y 36 h, respectivamente, mientras que aquellas reacciones bajo el mismo sistema, con un porcentaje de enzima del 20%, lograron una conversión del 31 y 59% a las 24 y 36 h, respectivamente.

Las polimerizaciones llevadas a cabo en condiciones de R134a líquidas, a 65 °C, también mostraron una rapidez de consumo menor, alcanzando un 9% después de 24 h y solo un 62% a los 7 días. Es interesante mencionar que al comparar los resultados de las condiciones líquidas, aumentando la temperatura a 105°C, con

respecto a los obtenidos a condiciones supercríticas, se encontró que sólo se obtuvo un 34.8% de conversión de LLA a las 24 h. El consumo de monómero bajo esas condiciones fue de 69.4, 97.6 y 100% después de 3, 5 y 7 días, respectivamente, lo que demuestra el efecto que, tanto la condición supercrítica como el aumento en temperatura de reacción, tienen sobre la rapidez de apertura de anillo para el sistema propuesto.

Con el fin de corroborar el efecto enzimático, se llevaron a cabo experimentos control en ausencia de catalizador a condiciones supercríticas. Las conversiones alcanzadas fueron de sólo 6.5, 14.5, 16.6 y 32.24% después de 1, 3, 5 y 7 días de reacción, respectivamente, lo que corroboró la existencia cierta extensión de propagación no enzimática dentro del sistema, aunque siempre por debajo de los alcanzados con ayuda enzimática.

Las figura 5.6 muestran los espectros de ^1H -RMN del PLLA obtenidos para condiciones subcríticas, tanto a 65 °C como a 105 °C, ambas con proporciones de 40% (p/v) de alimentación de monómero y 10% (p/p) de enzima. En ella es posible apreciar que el aumento de temperatura tiene efecto positivo sobre la rapidez de apertura de anillo.

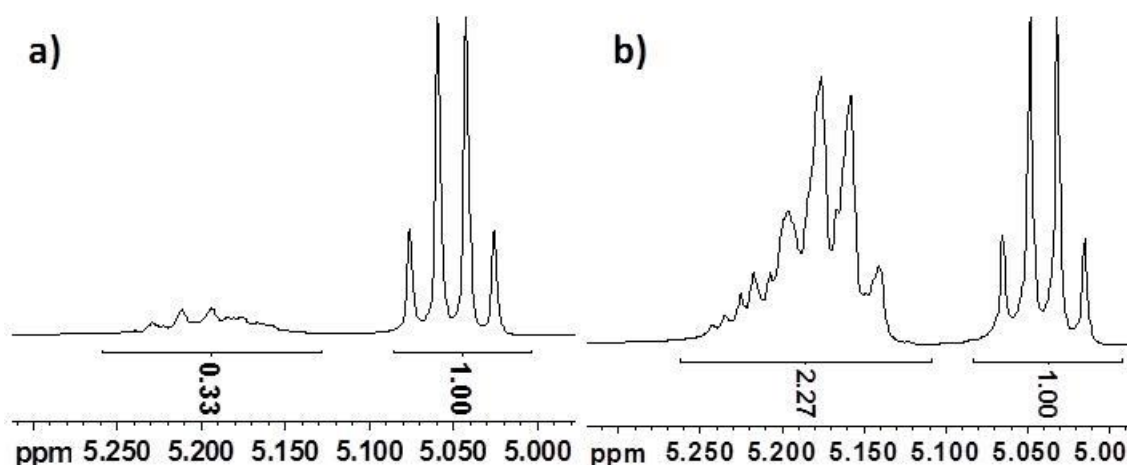


Figura 5. 6. Efecto del aumento de la temperatura en condiciones líquidas a los 3 días de reacción: a 65 °C (a) y a 105 °C (b).

En la figura 5.7 se muestra la rapidez de incorporación de monómero. Es evidente el efecto sinérgico que se presenta al añadir la lipasa PS y llevar a cabo la reacción en condiciones supercríticas, obteniéndose más del 90% de apertura de monómero durante las primeras 24 h, mientras que a condiciones líquidas a temperatura de 100 °C sólo es posible después de 5 días. Para el caso en ausencia de enzima, bajo las mismas condiciones supercríticas, sólo se obtiene un 33% después de 7 días.

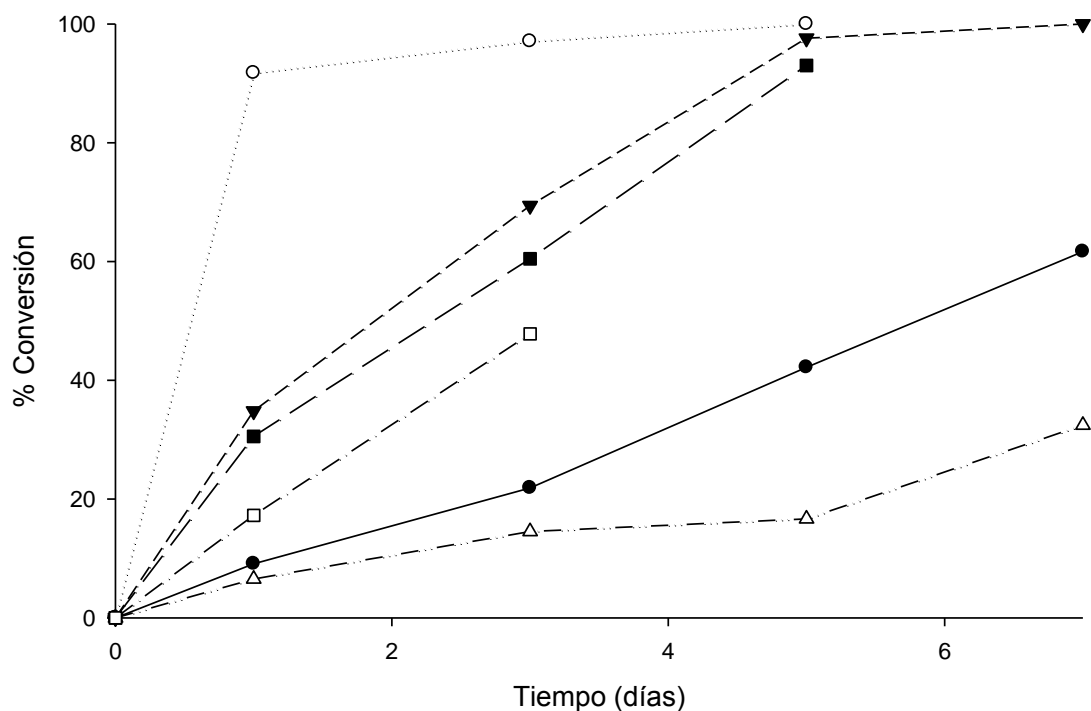


Figura 5. 7. Rapidez de conversión del monómero a diferentes condiciones de reacción:
 masa 20% lipasa PS (■), R134a líquido (●), R134a líquido 100 °C (▼), masa 10% lipasa PS (□), scR134a 40:10 (○), scR134a sin lipasa PS (△).

d. Actividad enzimática

El siguiente paso del estudio consistió en determinar la actividad enzimática residual para constatar que la enzima seguía siendo activa después de haber sido usada en la polimerización. Se encontró que durante las primeras 24h de reacción existe la mayor pérdida en la actividad para el sistema en condiciones supercríticas, perdiéndose más del 40% de la actividad inicial. Sin embargo, también se

encontró que a pesar de que para todos los sistemas estudiados la actividad se muestra considerablemente reducida por efecto de la temperatura, en todos los casos mayor a un 60% de pérdida después de 5 días, existe también un efecto positivo al utilizar R134a como medio de reacción, dado que todas las pruebas que lo incluyeron mostraron mayor actividad que la prueba en ausencia de solvente. Esto confirma a su vez el efecto sinérgico de la adición de la enzima, observado en los rendimientos y peso moleculares a lo largo de la reacción, a pesar de que existe una inactivación parcial de ésta. Cabe señalar que la enzima fue separada por filtración con CHCl_3 lo que quizás también afecte a la actividad enzimática. La figura 5.8 muestra la pérdida en la actividad enzimática relativa que presentó la lipasa PS en scR134a para las relaciones de alimentación que condujeron al mayor M_n . Por otro lado, la tabla 5.1 presenta la actividad enzimática obtenida en estudios previos, así como las presentadas por la lipasa PS para diferentes condiciones de reacción.

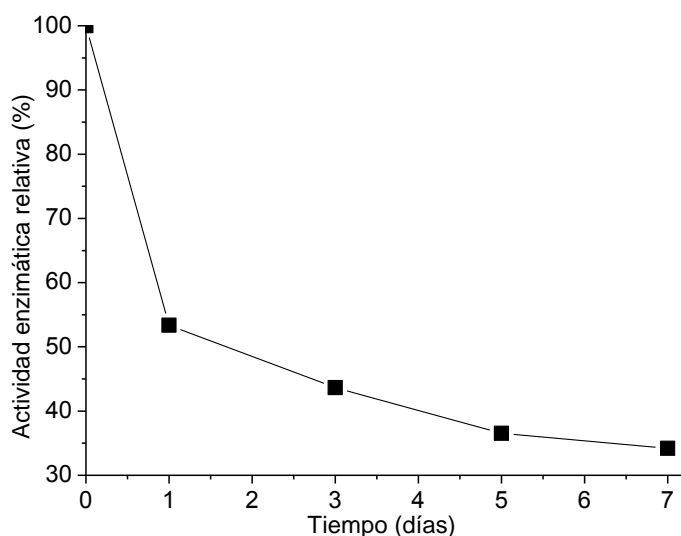


Figura 5. 8. Actividad enzimática residual relativa en condiciones supercríticas.

Tabla 5. 2. Actividad enzimática residual a diferentes condiciones.

Muestra	Actividad enzimática $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$
Furutani <i>et al.</i> ^[41]	2182
Barrios López (2011)	1556.13
Inicio reacción	1763.32
5 días de reacción	
sc R134a (40:10)	644.48
sc R134a (30:10)	612.73
sc R134a (20:20)	683.25
R134a líquido 65°C	705.19
R134a líquido 105°C	593.22
Masa 105°C	519.96

e. Análisis térmicos

Los análisis de DSC mostraron que la temperatura de transición vítrea T_g de los productos se encuentra entre 41-45 °C mientras que la temperatura de fusión se

encontró en el rango entre 170-180 °C, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura [26]. El análisis termogravimétrico mostró que los poliésteres sintetizados presentan una relativamente buena estabilidad térmica, sufriendo una pérdida de aproximadamente del 5% en peso entre los 200 y los 260 °C. La figura 5.9 muestra, a manera de ejemplo, el termograma TGA adquirido para el PLLA obtenido a 5 días de reacción y relaciones 40% (v/v) de LLA y 10% (p/v) de lipasa PS.

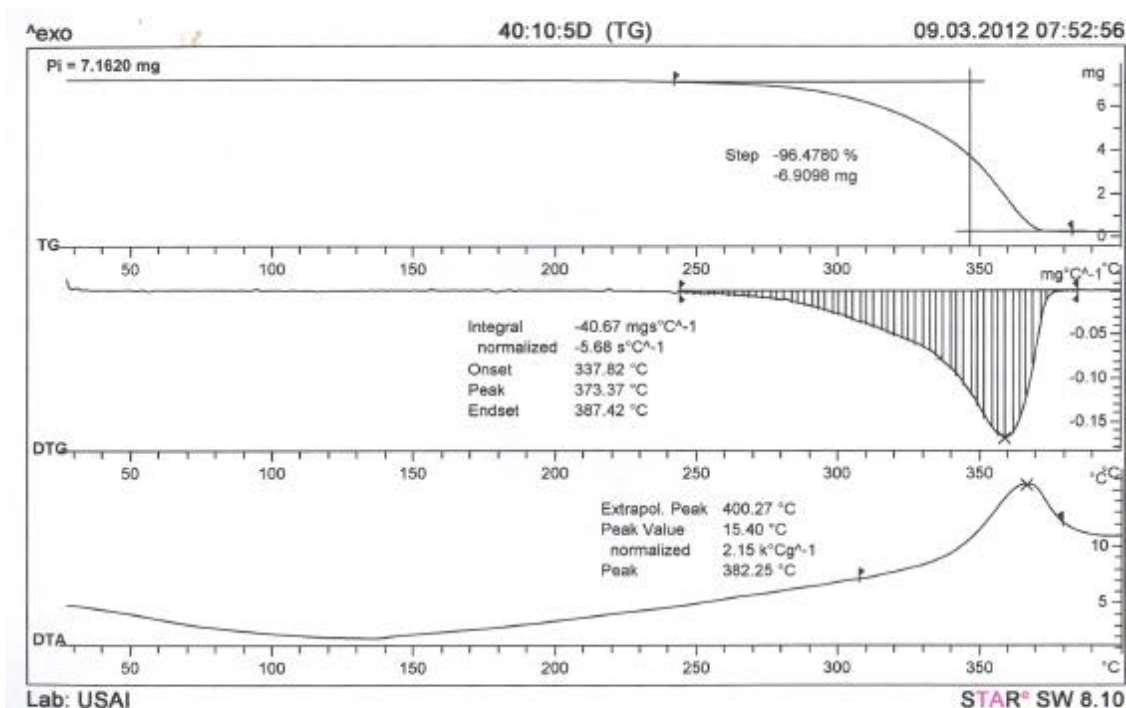


Figura 5. 9. Análisis de TGA para la muestra de mayor peso molecular.

f. Cristalografía de rayos x en polvos

Se llevaron a cabo análisis de rayos x para determinar el porcentaje de cristalinidad de los productos obtenidos.

Los espectros obtenidos mostraron productos semicristalinos. Los resultados muestran que la cristalinidad aumenta con el peso molecular (M_n). La figura 5.10 muestra los espectros de difracción de rayos x de las muestras obtenidas en scR134a con 40% de alimentación de LLA y 10% de lipasa a diferentes tiempos. El porcentaje de cristalinidad máximo alcanzado fue de aproximadamente el 35%, corresponde al polímero de mayor peso molecular mayor. Este porcentaje fue mayor que los

reportados para PLLAs sintetizados utilizando CALB en un sistema en emulsión utilizando scCO_2 . Sin embargo, fue notablemente menor al obtenido utilizando LI como medio de reacción y la misma CALB, que fueron cerca del 85.2%.^[46]

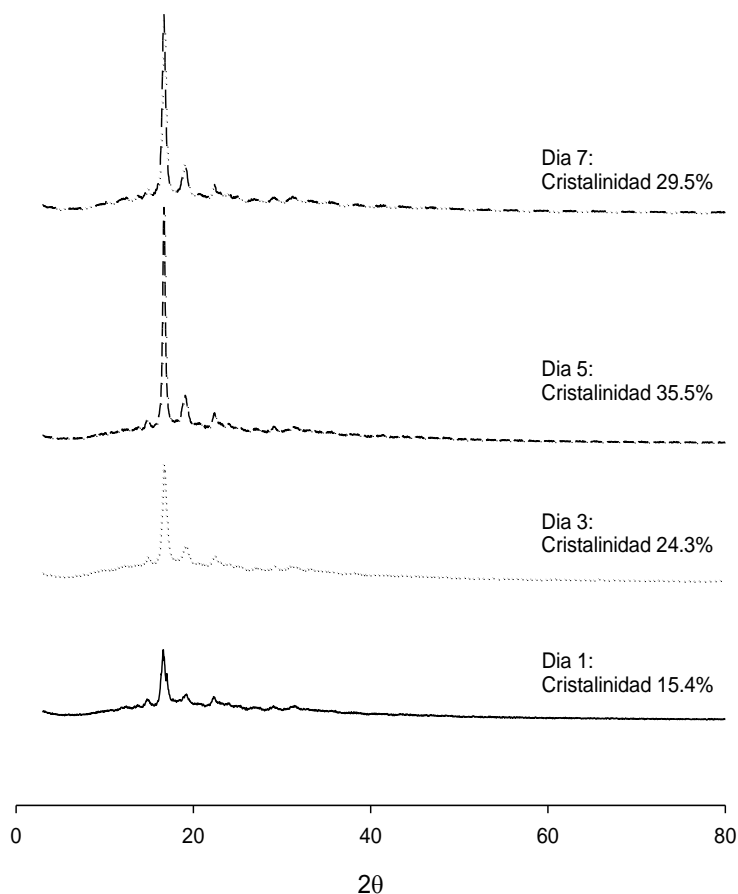


Figura 5. 10. Espectros de difracción de rayos X en polvo para muestras de PLLA a diferentes tiempos.

Se puede apreciar como el área cristalina aumenta a medida que avanza la reacción y logra su máximo a los 5 días de reacción y disminuye en tiempos posteriores, esto puede deberse a una hidrólisis de las cadenas por el aumento de la cantidad de agua.

6. Conclusiones

La PAA enzimática de LLA fue alcanzada exitosamente utilizando scR134a como medio de reacción y Lipasa PS libre como catalizador, obteniendo mejores rendimientos y características en los polímeros alcanzados, que aquellos trabajos realizados buscando el mismo polímero bajo otros sistemas de reacción, como fluidos comprimidos o en ausencia de solvente.

Se obtuvieron evidencias de que a pesar de que existe una inactivación parcial en la enzima posterior a su utilización, la adición del R134a comprimido tiene un efecto positivo sobre ésta, siendo mayor este efecto en condiciones supercríticas.

La mejora en la solubilidad de las cadenas poliméricas en crecimiento, afectada tanto como por las relaciones de alimentación de monómero como por la temperatura y estado de agregación del medio, para el sistema de reacción estudiado parece ser un factor crucial para explicar los resultados obtenidos.

Se concluye entonces que este fluido comprimido es capaz de llevar a cabo la polimerización enzimática del LLA en un proceso verde, siendo bajo estado supercrítico en que, para este estudio se obtuvieron los mejores resultados; éste es 105°C, 50 bar, y con relaciones de alimentación de 40% p/v de monómero, y 10% de enzima.

7. Trabajo futuro

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten vislumbrar nuevas áreas de oportunidad para estudios futuros, las cuales se esbozan a continuación.

Aunque fue posible obtener PLLA bajo un sistema de reacción considerado verde, se debe aún estudiar una alternativa al proceso de purificación de los polímeros obtenidos, evitando el uso de los solventes orgánicos utilizados en este caso. Para este fin se pueden usar los fluidos comprimidos ya que, como se mencionó en la etapa de antecedentes, sus características pueden ser modificadas fácilmente.

Otra área de oportunidad se refiere a las posibles aplicaciones de los productos obtenidos, que al haber sido obtenidos en ausencia de catalizadores organometálicos, se presentan como alternativa a las aplicaciones biomédicas.

Por otro lado, se puede buscar cambiar las características de los polímeros obtenidos; por ejemplo, añadiendo una molécula núcleo para obtener polímeros ramificados, los cuales presentan características diferentes a los lineales obtenidos por el presente estudio.

Publicación derivada de la elaboración de éste trabajo

Guzmán F., López A., Gimeno M., Bárzana E., Enzymatic synthesis of poly-L-lactide in supercritical R134a, *The Journal of Supercritical Fluids* , 2012, 72, 186–190.

8. Referencias

1. Anastas P.T., Warner J. C. Green chemistry: Theory and practice. Oxford University Press, 1998. Oxford.
2. Hans R. Kricheldorf, Syntheses and application of polylactides Chemosphere, 2001, 43, 49-54.
3. Jerome C., Lecomte P., Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60, 1056-1076.
4. Auras R., Harte B., Selke S., An Overview of Polylactides as Packaging Materials, Macromolecular Bioscience, 2004, 4,9, 835-864.
5. Drumright R. E., Gruber P. R., Henton D. E., Polylactic Acid Technology, Advanced Materials, 2000, 12, 23, 1841-1846.
6. Becker J. M., Pounder R. J., Dove A. P., Synthesis of Poly(lactide)s with Modified Thermal and Mechanical Properties, Macromolecular Rapid Communications, 2010, 31, 1923-1937.
7. Perepelkin K. E., Polylactide fibres: fabrication, properties, use, prospects: a review, Fibre Chemistry, 2002, 34, 2, 85-100.
8. Gilding D. K., Reed A. M., Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1, Polymer, 1979, 20, 1459-1464.
9. Garlotta D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid), Journal of Polymers and the Environment, 2001, 9, 2, 63-84.
10. Mehta R., Kumar V., Bhunia H., Upadhyay S. N., Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review, Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 2005, 45, 325-349.
11. Lam C. X. F., Olkowski R., Swieszkowski W., Tan, K. C., Gibson I., Hutmacher D. W. Composite PLDLLA/TCP Scaffolds for Bone Engineering: Mechanical and In Vitro Evaluations, IFMBE Proceedings, 2008, 23, 1480-1483.

-
12. Fiore G; L., Jing F., Young V. G., Cramer C. J., Hillmyer M. A. High Tg Aliphatic Polyesters by the Polymerization of Spirolactide Derivatives, *Polymer Chemistry*, 2010, 1, 870–877.
 13. Auras R., Lim L., Selke S., Tsuji H., *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, 2010, Ed. Jhon Wiley & Sons, New Jersey.
 14. Tsuji H., *Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation and Applications*, *Macromoleculas. Bioscience*. 2005, 5, 569–597.
 15. Gruber, P., O'Brien, M., *Poly lactides “NatureWorks® PLA”*, *Biopolymers Online.*, 2005, 235-239.
 16. Garlota D., *A Literature Review of Poly(Lactic Acid)*, *Journal of the Polymers and Environment*, 2001, 9, 63-83.
 17. Albertsson A. C., Srivastava R. K., *Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1077-1093.
 18. Kobayashi S., Makino A., *Enzymatic Polymer Synthesis: An opportunity for green polymer chemistry*, *Chemical Reviews*, 2009, 109, 5288-5353.
 19. Sharma R., Chisti Y. and Chand Banerjee U. *Production, purification, characterization and applications of lipases*, *Biotechnology Advances*, 2001 19, 627-662.
 20. Kobayashi S., *Lipase-catalyzed polyester synthesis: A green polymer chemistry*, *Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences*, 2010, 86, 338-365.
 21. Kim K., Shin D., Hwang K., Suh S., *The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor*. *Structure*, 1997, 5, 173-185.
 22. Yoshizawa-Fujita, M., Saito, Ch., Takeoka, Y., Rikukawa, M., *Lipase-catalyzed polymerization of L-lactide in ionic liquids*, *Polymers for Advanced Technologies*, 2008, 19, 1396-1400.
-

-
23. Takamoto T., Uyama H., Kobayashi S., Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in supercritical carbon dioxide, *e-Polymers*, 2001, 4, 1-6.
 24. Howdle., *Supercritical Fluids: A clean Route to Polymer Synthesis and Polymer Processing*, 2001, Jerwood Salters Environmental Award, RSC publishing.
 25. Loecker F. C., Duxbury C. J., Kumar R., Gao W., Gross R. A., Howdle S. M. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecules*, 2004, 37, 2450-2453.
 26. García R., López D., Gimeno M., Bázquez E. Lipase catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 51, 197-201.
 27. Meyer C.W., Morrison G. Dipole Moments of Seven Partially Halogenated Ethane Refrigerants, *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 3860-3866.
 28. Gimeno M., Ventosa N., Sala S., Veciana J. Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R134a)-Expanded Liquids as Solvent Media for Ecoefficient Particle Design with the DELOS Crystallization Process, *Crystal Growth & Design*, 2006, 6, 23-25.
 29. Corr S. 1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2002, 118, 55-67.
 30. Wood C. D., Senoo K., Martin C., Cuellar J., Cooper A. I., Polymer Synthesis Using Hydrofluorocarbon Solvents. Synthesis of Cross-Linked Polymers by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane, *Macromolecules*, 2002, 35, 6743-6746.
 31. Emmen H.H., Hoogendijk E.M.G., Klöpping-Ketelaars, Muijser H., Duistermaat E., Ravensverg J.C., Alexander D.J., Borkhataria D., Rusch G. M., Schimt B., Human safety and pharmacokinetics of the CFC alternative propellants HFC R134a (1,1,1,2- tetrafluoroethane) and HFC 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane) following whole-body exposure, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000, 32, 22-35.
 32. Hyon S., Jamshidi K., Ikada Y., Synthesis of polylactides with different molecular weights, *Biomaterials*, 1997, 18, 1503-1508.
-

-
33. Feast W. J., Gimeno M., Khosravi E., Approaches to highly polar polymers with low glass transition temperatures. 1. Fluorinated polymers via a combination of ring-opening metathesis polymerisation and hydrogenation, *Polymer*, 2003, 44, 6111-6121.
 34. Cowie J. M. *Polymers: Chemistry & Physics of modern materials*, 2^{da} Edition, Publisher: Blackie Academic & Professional, Ed. Chapman & Hall, Glasgow, 1991.
 35. Desimone J. M., Maury E.E., Menciloglu Y. Z., McClain J. B., Romack T. J., Combes J. R., *Dispersion Polymerizations in Supercritical Carbon Dioxide*, *Science*, 1994, 265, 356-359.
 36. Saul S., Corr S., Micklefield J., *Biotransformations in Low-Boiling Hydrofluorocarbon Solvents*, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 5519-5523.
 37. Hebb A. K., Senoo K., Cooper A. I., Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the porogen Composites, *Science and Technology*, 2003, 63, 2379-2387.
 38. Yu G., Xue Y., Xu W., Zhang J., Xue C. H., Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34, 793-798.
 39. García R., Gimeno M., Bázquez E., Use of Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Solvent Media for Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones, *Macromolecules*, 2007, 40, 4119-4120.
 40. García R., Gimeno M., Bázquez E., Effect of the initial water activity on the yields and molecular weights of the lipase-catalysed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid R134a, *e-Polymers*, 2008, 19, 1-6.
 41. Furutani T. Ronghui S., Ooshima H. and J. Kato., Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent, *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17, 1067-1072.
 42. Matsumura S., Mabuchi K., Toshima K., Lipase-catalyzed ring-opening of lactide, *Macromolecules*, 1997, 18, 477-482.
-

-
43. Angulo J. Caracterización físicoquímica de polímeros. 1ª Ed. México, Editorial LIMUSA, 1995.
 44. Areizaga J., Cortázar M., Elorza J. e Iruin J. Polímeros. 1ª Ed. España, Editorial Síntesis, S.A, 2002.
 45. Raymond S., Charles C. Introducción a la química de los polímeros. 1ª Ed. España, Editorial Reverté, 1995.
 46. Chanfreau S., Mena M., Porrás-Domínguez J.R., Ramírez-Gilly M., Gimeno M., Roquero P., Tecante A., Bárzana E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33, 629-638.
 47. Mena M., Chanfreau S., Gimeno M., Bárzana E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide-co-glycolide in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33, 1095-1101.
 48. López-Luna A., Gallegos J., Gimeno M., Vivaldo E., Bárzana E. Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67, 143-149.
 49. Fujioka F., Hosoda N., Nishiyama S., Noguchi H., Shoji A., Kumar D.S., Katsuraya K., Ishii S., Yoshida Y. One-pot Enzymatic Synthesis of Poly(L-lactide) by Immobilized Lipase Catalyst, *Sen-i Gakkaishi*, 2006, 62, 63–65.
 50. Panova A.A., Kaplan D.L., Mechanistic limitations in the synthesis of polyesters by lipase-catalyzed ring-opening polymerization, *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84, 103-113.

Páginas electrónicas


- i. Hoja de datos de seguridad: Bióxido de carbono. (s.f.). Recuperado el 8 junio de 2013, de http://www.infra.com.mx/servicio_atencion/libreria/gases/documentos/msds/bioxido_carbono.pdf

- ii. Hoja de datos de seguridad: R-134a SUVA. (s.f.). Recuperado el 8 junio de 2013, de

http://msds.dupont.com/msds/pdfs/EN/PEN_09004a358054797d.pdf

9. Anexos

Anexo A Hoja de datos de seguridad para el 134a.

Material Safety Data Sheet		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant		
Version 2.3		
Revision Date 09/12/2011	Ref. 130000000349	
This SDS adheres to the standards and regulatory requirements of the United States and may not meet the regulatory requirements in other countries.		
SECTION 1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION		
Product name	:	DuPont™ SUVA® 134a refrigerant
Product Grade/Type	:	ASHRAE Refrigerant number designation: R-134a
Tradename/Synonym	:	HFC-134a SUVA® 134a
MSDS Number	:	130000000349
Product Use	:	Refrigerant
Manufacturer	:	DuPont 1007 Market Street Wilmington, DE 19898
Product Information	:	1-800-441-7515 (outside the U.S. 1-302-774-1000)
Medical Emergency	:	1-800-441-3637 (outside the U.S. 1-302-774-1139)
Transport Emergency	:	CHEMTREC: 1-800-424-9300 (outside the U.S. 1-703-527-3887)
SECTION 2. HAZARDS IDENTIFICATION		
Emergency Overview Rapid evaporation of the liquid may cause frostbite.		
Potential Health Effects		
Skin		
1,1,1,2-Tetrafluoroethane	:	Contact with liquid or refrigerated gas can cause cold burns and frostbite. May cause skin irritation. May cause: Discomfort, itching, redness, or swelling.
Eyes		
1,1,1,2-Tetrafluoroethane	:	Contact with liquid or refrigerated gas can cause cold burns and frostbite. May cause eye irritation. May cause: tearing, Redness, Discomfort.
1 / 10		

Material Safety Data Sheet



DuPont™ SUVA® 134a refrigerant

Version 2.3

Revision Date 09/12/2011

Ref. 130000000349

Inhalation
1,1,1,2-
Tetrafluoroethane

: Misuse or intentional inhalation abuse may cause death without warning symptoms, due to cardiac effects.
Other symptoms potentially related to misuse or inhalation abuse are: Anaesthetic effects, Light-headedness, dizziness, confusion, incoordination, drowsiness, or unconsciousness, irregular heartbeat with a strange sensation in the chest, heart thumping, apprehension, feeling of fainting, dizziness or weakness.
Vapours are heavier than air and can cause suffocation by reducing oxygen available for breathing.

Carcinogenicity

None of the components present in this material at concentrations equal to or greater than 0.1% are listed by IARC, NTP, or OSHA, as a carcinogen.

SECTION 3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS


Component	CAS-No.	Concentration
1,1,1,2-Tetrafluoroethane	811-97-2	100 %

SECTION 4. FIRST AID MEASURES

Skin contact : In case of contact, immediately flush skin with plenty of water for at least 15 minutes. Take off all contaminated clothing immediately. Consult a physician. Wash contaminated clothing before re-use. Treat for frostbite if necessary by gently warming affected area.

Eye contact : In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes. Consult a physician if necessary.

Inhalation : Remove from exposure, lie down. Move to fresh air. Keep patient warm and at rest. Artificial respiration and/or oxygen may be necessary. Consult a physician.

Material Safety Data Sheet		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant		
Version 2.3		
Revision Date 09/12/2011	Ref. 13000000349	
Ingestion	: Is not considered a potential route of exposure.	
General advice	: Never give anything by mouth to an unconscious person. When symptoms persist or in all cases of doubt seek medical advice.	
Notes to physician	: Because of possible disturbances of cardiac rhythm, catecholamine drugs, such as epinephrine, that may be used in situations of emergency life support should be used with special caution.	
SECTION 5. FIREFIGHTING MEASURES		
Flammable Properties		
Flash point	: does not flash	
Ignition temperature	: > 743 °C (> 1,369 °F) at 1,013 hPa	
Lower explosion limit	: Method : None per ASTM E681	
Upper explosion limit	: Method : None per ASTM E681	
Fire and Explosion Hazard	: Hazardous thermal decomposition products: Carbon oxides Hydrogen fluoride Carbonyl fluoride Cylinders are equipped with pressure and temperature relief devices, but may still rupture under fire conditions. Decomposition may occur. Contact of welding or soldering torch flame with high concentrations of refrigerant can result in visible changes in the size and colour of the torch flame. This flame effect will only occur in concentrations of product well above the recommended exposure limit. Therefore stop all work and ventilate to disperse refrigerant vapors from the work area before using any open flames.	
3 / 10		

Material Safety Data Sheet



DuPont™ SUVA® 134a refrigerant

Version 2.3

Revision Date 09/12/2011

Ref. 13000000349

HFC-134a is not flammable in air at temperatures up to 100 deg. C (212 deg. F) at atmospheric pressure. However, mixtures of HFC-134a with high concentrations of air at elevated pressure and/or temperature can become combustible in the presence of an ignition source. HFC-134a can also become combustible in an oxygen enriched environment (oxygen concentrations greater than that in air). Whether a mixture containing HFC-134a and air, or HFC-134a in an oxygen enriched atmosphere become combustible depends on the inter-relationship of 1) the temperature 2) the pressure, and 3) the proportion of oxygen in the mixture. In general, HFC-134a should not be allowed to exist with air above atmospheric pressure or at high temperatures; or in an oxygen enriched environment. For example HFC-134a should NOT be mixed with air under pressure for leak testing or other purposes.


Experimental data have also been reported which indicate combustibility of this substance in the presence of certain concentrations of chlorine.


- Suitable extinguishing media : Use extinguishing measures that are appropriate to local circumstances and the surrounding environment.
- Firefighting Instructions : In the event of fire, wear self-contained breathing apparatus. Cool containers / tanks with water spray. Water runoff should be contained and neutralized prior to release.


SECTION 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

NOTE: Review FIRE FIGHTING MEASURES and HANDLING (PERSONNEL) sections before proceeding with clean-up. Use appropriate PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT during clean-up.

- Safeguards (Personnel) : Evacuate personnel to safe areas. Ventilate area, especially low or enclosed places where heavy vapours might collect.
- Spill Cleanup : Evaporates.
- Accidental Release Measures : Should not be released into the environment. Self-contained breathing apparatus (SCBA) is required if a large release occurs. Avoid open flames and high temperatures.

Material Safety Data Sheet		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant		
Version 2.3		
Revision Date 09/12/2011	Ref. 130000000349	
SECTION 7. HANDLING AND STORAGE		
Handling (Personnel)	: Use sufficient ventilation to keep employee exposure below recommended limits. For personal protection see section 8. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.	
Handling (Physical Aspects)	: The product should not be mixed with air for leak testing or used with air for any other purpose above atmospheric pressure. Contact with chlorine or other strong oxidizing agents should also be avoided.	
Storage	: Valve protection caps and valve outlet threaded plugs must remain in place unless container is secured with valve outlet piped to use point. Do not drag, slide or roll cylinders. Use a suitable hand truck for cylinder movement. Use a pressure reducing regulator when connecting cylinder to lower pressure (>3000 psig) piping or systems. Never attempt to lift cylinder by its cap. Use a check valve or trap in the discharge line to prevent hazardous back flow into the cylinder. Cylinders should be stored upright and firmly secured to prevent falling or being knocked over. Separate full containers from empty containers. Keep at temperature not exceeding 52°C. Do not store near combustible materials. Avoid area where salt or other corrosive materials are present.	
Storage temperature	: < 52 °C (< 126 °F)	
SECTION 8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION		
Engineering controls	: Normal ventilation for standard manufacturing procedures is generally adequate. Local exhaust should be used when large amounts are released. Mechanical ventilation should be used in low or enclosed places. Refrigerant concentration monitors may be necessary to determine vapour concentrations in work areas prior to use of torches or other open flames, or if employees are entering enclosed areas.	
Personal protective equipment	: For rescue and maintenance work in storage tanks use self-contained breathing apparatus. Vapours are heavier than air and can cause suffocation by reducing oxygen available for breathing.	
Respiratory protection	: For rescue and maintenance work in storage tanks use self-contained breathing apparatus. Vapours are heavier than air and can cause suffocation by reducing oxygen available for breathing.	
Hand protection	: Additional protection: Impervious gloves	
5 / 10		

Material Safety Data Sheet			
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant			
Version 2.3			
Revision Date 09/12/2011		Ref. 13000000349	
Eye protection	:	Wear safety glasses with side shields. Additionally wear a face shield where the possibility exists for face contact due to splashing, spraying or airborne contact with this material.	
Protective measures	:	Self-contained breathing apparatus (SCBA) is required if a large release occurs.	
Exposure Guidelines			
Exposure Limit Values			
1,1,1,2-Tetrafluoroethane			
AEL *	(DUPONT)	1,000 ppm	8 & 12 hr. TWA
* AEL is DuPont's Acceptable Exposure Limit. Where governmentally imposed occupational exposure limits which are lower than the AEL are in effect, such limits shall take precedence.			
SECTION 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES			
Form	:	Liquefied gas	
Color	:	colourless	
Odor	:	slight, ether-like	
Boiling point	:	-26.1 °C (-15.0 °F) at 1,013 hPa	
% Volatile	:	100 %	
Vapour Pressure	:	6,661 hPa at 25 °C (77 °F)	
	:	13,190 hPa at 50 °C (122 °F)	
Density	:	1.206 g/cm ³ at 25 °C (77 °F)	
	:	(as liquid)	
Specific gravity	:	1.208 at 25 °C (77 °F)	
Water solubility	:	1.5 g/l at 25 °C (77 °F) at 1,013 hPa	
Vapour density	:	3.6 at 25 °C (77 °F)	
	:	(Air = 1.0)	
Evaporation rate	:	> 1	
	:	(CCL4=1.0)	
SECTION 10. STABILITY AND REACTIVITY			
Stability	:	Stable under recommended storage conditions.	
6 / 10			

Material Safety Data Sheet		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant		
Version 2.3		
Revision Date 09/12/2011	Ref. 13000000349	
Conditions to avoid	: The product is not flammable in air under ambient conditions of temperature and pressure. When pressurised with air or oxygen, the mixture may become flammable. Certain mixtures of HCFCs or HFCs with chlorine may become flammable or reactive under certain conditions.	
Incompatibility	: Alkali metals Alkaline earth metals, Powdered metals, Powdered metal salts	
Hazardous decomposition products	: Decomposition products are hazardous., This material can be decomposed by high temperatures (open flames, glowing metal surfaces, etc.) forming hydrofluoric acid and possibly carbonyl fluoride., These materials are toxic and irritating., Avoid contact with decomposition products	
Hazardous reactions	: Polymerization will not occur.	
SECTION 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant	Further information	
	: Cardiac sensitisation threshold limit : 312975 mg/m3 Anaesthetic effects threshold limit : 834600 mg/m3 Did not show carcinogenic or teratogenic effects in animal experiments. Inhalation of decomposition products in high concentration may cause shortness of breath (lung oedema). Rapid evaporation of the liquid may cause frostbite.	
1,1,1,2-Tetrafluoroethane	Dermal	
	: not applicable	
	Oral	
	: not applicable	
	Inhalation 4 h LC50	
	: 567000 ppm , rat	
	Inhalation	
	: dog Cardiac sensitization	
	Skin irritation	
	: slight irritation, rabbit Not expected to cause skin irritation based on expert review of the properties of the substance. No skin irritation, human	
7 / 10		

Material Safety Data Sheet



DuPont™ SUVA® 134a refrigerant

Version 2.3

Revision Date 09/12/2011


Ref. 13000000349

Eye irritation	:	slight irritation, rabbit Not expected to cause eye irritation based on expert review of the properties of the substance. No eye irritation, human
Skin sensitization	:	Did not cause sensitization on laboratory animals., guinea pig Not expected to cause sensitization based on expert review of the properties of the substance. Did not cause sensitization on laboratory animals. There are no reports of human respiratory sensitization.
Repeated dose toxicity	:	Inhalation rat No toxicologically significant effects were found.
Carcinogenicity	:	Overall weight of evidence indicates that the substance is not carcinogenic. An increased incidence of benign tumours was observed in laboratory animals.
Mutagenicity	:	Did not cause genetic damage in animals. Did not cause genetic damage in cultured mammalian cells. Did not cause genetic damage in cultured bacterial cells.
Reproductive toxicity	:	Animal testing showed no reproductive toxicity.
Teratogenicity	:	Animal testing showed effects on embryo-fetal development at levels equal to or above those causing maternal toxicity.

SECTION 12. ECOLOGICAL INFORMATION

Aquatic Toxicity 1,1,1,2-Tetrafluoroethane 96 h LC50	:	Oncorhynchus mykiss (rainbow trout) 450 mg/l
72 h EC50	:	Algae > 118 mg/l Information given is based on data obtained from similar substances.

8 / 10

Material Safety Data Sheet		
DuPont™ SUVA® 134a refrigerant		
Version 2.3		
Revision Date 09/12/2011	Ref. 130000000349	
48 h EC50	: Daphnia magna (Water flea) 980 mg/l	
SECTION 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS		
Waste Disposal	: Can be used after re-conditioning. Recover by distillation or remove to a permitted waste disposal facility. Comply with applicable Federal, State/Provincial and Local Regulations.	
Environmental Hazards	: Empty pressure vessels should be returned to the supplier.	
SECTION 14. TRANSPORT INFORMATION		
DOT	UN number	: 3159
	Proper shipping name	: 1,1,1,2-Tetrafluoroethane
	Class	: 2.2
	Labelling No.	: 2.2
IATA_C	UN number	: 3159
	Proper shipping name	: 1,1,1,2-Tetrafluoroethane
	Class	: 2.2
	Labelling No.	: 2.2
IMDG	UN number	: 3159
	Proper shipping name	: 1,1,1,2-Tetrafluoroethane
	Class	: 2.2
	Labelling No.	: 2.2
SECTION 15. REGULATORY INFORMATION		
SARA 313 Regulated Chemical(s)	: SARA 313: This material does not contain any chemical components with known CAS numbers that exceed the threshold (De Minimis) reporting levels established by SARA Title III, Section 313.	
9 / 10		

Material Safety Data Sheet



DuPont™ SUVA® 134a refrigerant

Version 2.3

Revision Date 09/12/2011

Ref. 130000000349

California Prop. 65 : Chemicals known to the State of California to cause cancer, birth defects or any other harm: none known

SECTION 16. OTHER INFORMATION

HMIS

Health	:	1
Flammability	:	0
Reactivity/Physical hazard	:	1

SUVA® is a registered trademark of E. I. du Pont de Nemours and Company

Before use read DuPont's safety information.

For further information contact the local DuPont office or DuPont's nominated distributors. ®

DuPont's registered trademark

The information provided in this Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text.

Significant change from previous version is denoted with a double bar.