



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

**“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIÉSTERES HIPERRAMIFICADOS
OBTENIDOS A PARTIR DE δ -VALEROLACTONA Y ÁCIDO 2,2-
BIS(HIDROXIMETIL)PROPIÓNICO ”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:
SERGIO ADRIAN MORENO GÓMEZ



MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
VOCAL: **Profesor:** PERLA YOLANDA CASTILLO VILLALÓN
SECRETARIO: **Profesor:** MIQUEL GIMENO SECO
1er SUPLENTE: **Profesor:** OSCAR HERNÁNDEZ MELENDEZ
2do SUPLENTE: **Profesor:** CAROLINA PEÑA MONTES

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
LABORATORIO 314, CONJUNTO E

ASESOR DEL TEMA:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

SUSTENTANTE:

SERGIO ADRIAN MORENO GÓMEZ

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1 BIOMATERIALES	6
2.1.1 POLIÉSTERES COMO BIOMATERIALES	6
2.1.2 POLI- δ -VALEROLACTONA (PVL)	7
2.2 POLIMERIZACIÓN DE LACTONAS POR APERTURA DE ANILLO (PAA)	8
2.3 CATALIZADORES ENZIMÁTICOS	9
2.3.1 USO DE ENZIMAS EN DISOLVENTES NO CONVENCIONALES	10
2.3.2 LIPASAS	11
2.3.3 LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTARTICA</i> (CALB)	12
2.4 LIPASAS EN LA POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA POR APERTURA DE ANILLO (PEAA).	14
2.5 DISOLVENTES UTILIZADOS EN PEAA	15
2.5.1 1,1,1,2-TETRAFLUOROETANO (TFE)	16
2.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y PEAA EN TFE	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3.1 HIPÓTESIS	18
3.2 OBJETIVO GENERAL	18
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	18
4. METODOLOGÍA	18
4.1 MATERIALES	18
4.2 EQUIPOS	19
4.3 PREPARACIÓN DE MATERIALES	19
4.4 CONDICIONES EVALUADAS	20
4.5 DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE REACCIÓN	21
4.6 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	22
4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INICIAL	23
4.8 REACCIONES	24
4.8.1 PURIFICACIÓN DE MATERIALES OBTENIDOS	24
4.9 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	25
4.9.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN ($^1\text{HRMN}$)	25
4.9.2 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (GPC/SEC)	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	28
5.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA INICIAL	28
5.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES MEDIANTE $^1\text{HRMN}$ Y GPC/SEC	29
5.4 SÍNTESIS DE CO-POLÍMEROS A PARTIR DE δ -VL Y BHP	32
5.4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CO-POLIMERIZACIÓN	34
5.5 EL EFECTO DE LA AGITACIÓN EN LA CO-POLIMERIZACIÓN	38
5.6 CO-POLIMERIZACIÓN UTILIZANDO FLUIDOS COMPRIMIDOS COMO MEDIO DE REACCIÓN.	40
5.7 INCORPORACIÓN DE BHP Y GRADO DE RAMIFICACIÓN	42
6. CONCLUSIONES	46
7. TRABAJO FUTURO	47
8. REFERENCIAS	48

Índice de figuras:

Figura 2.2.1 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo catiónica.	8
Figura 2.2.2 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo aniónica.	9
Figura 2.2.3 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo por activación del monómero por ácido.	9
Figura 2.3.1 Esquema de PEAA	11
Figura 2.3.2 Estructura de la CALB.	13
Figura 2.4.1 Mecanismo de polimerización por apertura de anillo catalizada por lipasa.	15
Figura 5.3.1 ¹ HRMN de PVL lineal.	29
Figura 5.3.2 ¹ HRMN de PVL hiperramificada.	30
Figura 5.3.3 ¹ HRMN del BHP en CDCl ₃ .	31

Índice de tablas:

Tabla 2.3.1 Algunas lipasas utilizadas en la síntesis de poliésteres in vitro y sus abreviaciones.	12
Tabla 4.4.1 Condiciones evaluadas	21
Tabla 5.2.1 resultados de la medición de actividad enzimática	28
Tabla 5.4.1 Resultados obtenidos de la síntesis de polímeros, reacciones a 65 °C.	32
Tabla 5.4.2 Resultados obtenidos de la síntesis de co-polímeros a 75 °C y 65 °C.	34
Tabla 5.5.1 Resultados obtenidos de la síntesis de co-polímeros a 65 °C con diferentes tipos de agitación.	38
Tabla 5.6.1 Resultados de la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.	41

Índice de gráficas:

Gráfica 5.2.1 Curva patrón de absorbancia de p-nitrofenol.	28
Gráfica 5.4.1 Mn de los poliésteres obtenidos a 65 °C.	33
Gráfica 5.4.2 Rendimiento de los poliésteres obtenidos a 65 °C.	33
Gráfica 5.4.3 Comparación de Mn de los poliésteres obtenidos a 75 °C y 65 °C.	35
Gráfica 5.4.4 Comparación de rendimientos de los materiales obtenidos a 75 °C y 65 °C.	36
Gráfica 5.5.1 Comparación de Mn de los materiales obtenidos a 65 °C con diferentes tipos de agitación.	39
Gráfica 5.5.2 Comparación de los rendimientos de los materiales obtenidos a 65 °C con diferentes tipos de agitación.	40
Gráfica 5.6.1 Comparación de Mn de los materiales obtenidos a 65 °C con la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.	41
Gráfica 5.6.2 Comparación de rendimiento de los materiales obtenidos a 65°C con la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.	42
Gráfica 5.7.1 Comparación de la inserción de BHP de los poliésteres hiperramificados obtenidos.	43
Gráfica 5.7.2 Comparación del DB de los co-polímeros obtenidos.	43
Gráfica 5.7.3 Relación entre DB y MN de los co-polímeros obtenidos.	44
Gráfica 5.7.4 Tipo de inserción del BHP en las macromoléculas; Azul: BHP insertado como centro de ramificación; Rojo: BHP insertado como co-monómero lineal.	45

Abrebiaciones:

δ-VL	δ -Valerolactona
1HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
BHB	Ácido 2,2-bis(hidroximetil)butírico
BHP	Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico
CALB	Lipasa B de candida antartica
CALB	Lipasa de <i>Candida antartica lipasa B</i>
CFS's	clorofluorocarbonos
GPC	Cromatografía de permeación en gel
Lipasa A	Lipasa de <i>Aspergillus niger</i>
Lipasa CA	Lipasa de <i>Candida antartica</i>
Lipasa CC	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>
Lipasa CR	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
Lipasa PC	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
Lipasa PF	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipasa PR	Lipasa de <i>Penicillium roqueforti</i>
Lipasa RJ	Lipasa de <i>Rhizopus japonicus</i>
Lipasa RM	Lipasa de <i>Rhizomucor meihei</i>
Lipasa YL	Lipasa de <i>Yarrowia lipolytica</i>
M_n	Peso molecular numeral
M_w	Peso molecular promedio
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PBS	Poli(succinato de butileno)
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PDI	Índice de polidispersidad
PDI	Índice de polidispersidad
PEAA	Polimerización enzimática por apertura de anillo
PET	Poli(etilentereftalato)
PGA	Ácido poli(glicólico)
PPL	Lipasa de páncreas porcino
PVL	Poli- δ -valerolactona
scCO₂	dióxido de carbono súper crítico
TFE	1,1,1,2-Tetrafluoroetano
ϵ-CL	ϵ -Caprolactona

1. Introducción

Los poliésteres son un grupo de materiales poliméricos que tiene un gran impacto en nuestra vida diaria. Su extensa variedad y su amplia gama de propiedades los hacen óptimos para una gran diversidad de aplicaciones. Plásticos como el tereftalato de polietileno (PET) y el poli(succinato de butileno) (PBS) han sido usados extensivamente, generando un gran aumento en la producción y comercialización de estas macromoléculas durante el último medio siglo. Una de las características generales de estos polímeros es que presentan baja degradación y compatibilidad biológica, además su síntesis involucra el uso de catalizadores e iniciadores tóxicos, altas temperaturas (>150 °C) y disolventes orgánicos, lo cual limita su uso en aplicaciones biomédicas.

La necesidad de materiales dirigidos y diseñados para aplicaciones biomédicas exige el desarrollo de materiales biodegradables y biocompatibles, idealmente provenientes de recursos renovables y sintetizados mediante procesos no tóxicos. Descubierta en 1993, la polimerización enzimática por apertura de anillo (PEAA) podría ser una de las aplicaciones más atractivas en el campo industrial en la obtención de poliésteres biodegradables debido a que es una alternativa no tóxica a la síntesis convencional de dichos polímeros¹.

La ventaja de este método reside en la alta eficiencia y especificidad de algunas enzimas frente a lactonas cíclicas de entre 4 y 7 carbonos². Además las reacciones se llevan a cabo en condiciones suaves de temperatura y pH. Este novedoso enfoque de las transformaciones vía enzimática permite la producción de polímeros sin residuos dañinos, adicionalmente, los catalizadores enzimáticos son fácilmente reciclables, no producen residuos tóxicos y al tratarse de proteínas de origen natural, pueden ser desechados con relativa facilidad.

La PEAA utiliza enzimas como catalizadores en medios de reacción en un ambiente de escasez de agua, de esta manera, la enzima es capaz de realizar reacciones de poliesterificación y politransesterificación. Los fluidos comprimidos como el 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (TFE) líquido y dióxido de

carbono súper crítico (scCO₂), son excelentes disolventes para procesos ambientalmente benignos ya que no son tóxicos, no destruyen la capa de ozono y son fácilmente reutilizables. Estos medios de reacción presentan grandes ventajas sobre los solventes convencionales: tienen gran difusividad y baja tensión superficial, sus propiedades son ajustables, tienen gran capacidad de solvatación y permiten la recuperación de los productos por precipitación en el mismo medio ajustando sus propiedades físicas.

Si bien los poliésteres lineales tienen un gran potencial como biomateriales debido a los enlaces éster presentes a lo largo de su cadena, hoy en día se buscan materiales hiperramificados debido a su versatilidad y aplicaciones específicas como liberación controlada de fármacos y andamios moleculares entre otras. De manera general, los poliésteres hiperramificados tienen una menor viscosidad, mejor solubilidad, mayor degradabilidad y mayor compatibilidad biológica en comparación con los polímeros lineales. El cambio en sus propiedades se debe al aumento en la cantidad de grupos funcionales terminales presentes en su estructura.

La δ -Valerolactona (δ -VL), lactona cíclica de 6 carbonos, se ha polimerizado exitosamente mediante PEAA utilizando lipasas de diferentes orígenes: lipasa de *Candida cylindracea* (lipasa CC), lipasa de páncreas de porcino (PPL), lipasa de *Rhizopus Japonicus* (lipasa RJ) y lipasa B de *Candida antártica* (CALB). En todos los casos se obtuvo poli- δ -valerolactona (PVL) de bajo peso molecular^{1,3}. Existen pocos reportes de la obtención de PVL hiperramificada, entre los que destaca el trabajo de López Luna y colaboradores. Dichos autores obtuvieron el poliéster hiperramificado al realizar la co-polimerización de la δ -VL con ácido 2,2-bis(hidroximetil)butírico (BHB) utilizando TFE y scCO₂ como medio de reacción.

En este proyecto se desea llevar a cabo la síntesis de un poliéster hiperramificado a partir de la co-polimerización de δ -VL con ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (BHP), enfocado a una posible aplicación biomédica.

2. Antecedentes

2.1 Biomateriales

El término biomaterial ha cobrado gran importancia en las últimas dos décadas debido a la necesidad de materiales biocompatibles en el desarrollo de tecnología ligada a ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y la bionanotecnología. De acuerdo con David F. Williams, un biomaterial es “una sustancia que ha sido diseñada de tal manera que, por si sola o como parte de un sistema complejo, dirija el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico, en el campo médico”^{4,5}. Estos materiales por lo general provienen de materias primas naturales, son producidos por procesos naturales (o inspirados en ellos) y tienen la capacidad de coexistir en sistemas biológicos sin dañarlos. Durante las últimas dos décadas se ha avanzado significativamente en el desarrollo e implementación de biomateriales para aplicaciones biomédicas tales como, estructuras nano-porosas, andamios para el crecimiento de tejidos y células, así como la liberación controlada de fármacos⁶.

Los materiales de esta naturaleza tienen una serie de propiedades físicas, biológicas, químicas y biomecánicas muy específicas, además su degradación no es tóxica y se lleva a cabo a través de hidrólisis. Obtener materiales con estas características ha sido un gran reto para la ciencia, sin embargo, estos compuestos están remplazando a aleaciones metálicas y materiales cerámicos. En 2003 la venta de biomateriales ascendió a 7 billones de dólares en los Estados Unidos y se espera que en los próximos años aumente su mercado⁷.

2.1.1 Poliésteres como biomateriales

Los poliésteres alifáticos han sido ampliamente investigados por ser materiales con buenas propiedades de degradabilidad biológica y capacidad para ser asimilados por el organismo. Estas propiedades se deben a la presencia de grupos éster a lo largo de su cadena polimérica^{8,9}, los cuales hacen que estos materiales sean susceptibles a la hidrólisis (química y enzimática) y al reconocimiento biológico.

Una gran ventaja de estos polímeros es que son fácilmente hidrolizables en medios acuosos (como fluidos corporales), además, los compuestos producidos durante su degradación son metabolizados o excretados por los riñones. Un ejemplo es el ácido poli(glicólico) (PGA), que es el poliéster alifático lineal más simple, el cual junto con sus co-polímeros, es utilizado actualmente en suturas biodegradables.

Si bien los poliésteres lineales tienen un gran potencial como biomateriales, el desarrollo de materiales se ha orillado por obtener poliésteres hiperramificados debido a su alta funcionalidad. En comparación con un poliéster lineal, el cual tiene un grupo funcional en cada extremo de su cadena, los hiperramificados presentan un grupo funcional en cada una de sus ramificaciones. La modificación de los grupos funcionales presentes en la macromolécula permite ajustar algunas de sus propiedades físicas tales como, temperatura de transición vítrea, solubilidad, viscosidad y degradabilidad para diferentes aplicaciones específicas.

2.1.2 Poli- δ -valerolactona (PVL)

La PVL es un poliéster alifático que llama la atención debido a su buena biodegradabilidad, biocompatibilidad y permeabilidad. Actualmente, la síntesis de PVL lineal y la de sus co-polímeros puede ser realizada mediante dos diferentes métodos, polimerización en masa o polimerización en solución. Los catalizadores comúnmente usados en esta reacción son compuestos organometálicos a base de aluminio, estaño, carbono y fósforo. El contenido de residuos metálicos provenientes de estos procesos, ponen en entredicho la posibilidad de usar estos materiales en aplicaciones biomédicas.

Aunque la PEAA ha sido desarrollada ampliamente en las últimas dos décadas como una ruta alternativa para la síntesis de poliésteres libres de compuestos metálicos, existen pocos reportes sobre la síntesis de PVL a través de esta metodología^{10,11}. La δ -VL se ha logrado polimerizar mediante PEAA utilizando lipasas de diferentes orígenes: lipasa CC, PPL, lipasa RJ y CALB, sin embargo,

la PVL obtenida fue de bajo peso molecular^{1,3}. La síntesis enzimática de PVL hiperramificada solo está reportada por López Luna y colaboradores³, quienes obtuvieron el poliéster hiperramificado al realizar la co-polimerización de la δ -VL con BHB utilizando TFE y $scCO_2$ como medio de reacción. En dicho estudio el BHB actúa como centro de ramificación debido a que es una molécula trifuncional.

2.2 Polimerización de lactonas por apertura de anillo (PAA)

La polimerización por apertura de anillo de lactonas es un atractivo método para sintetizar poliésteres alifáticos porque proporciona una ruta para controlar las propiedades físicas y el índice de polidispersidad (PDI) de los materiales. La polimerización química puede ser catiónica, aniónica y por activación del monómero. De forma generalizada, en este tipo de reacción el monómero cíclico es abierto para producir un polímero lineal.

La polimerización de lactonas por apertura de anillo catiónica, cuyo mecanismo de iniciación se ilustra en la Figura 2.2.1, implica la formación de iones con carga positiva, los cuales son posteriormente atacados por el monómero, desencadenando la reacción de polimerización¹².

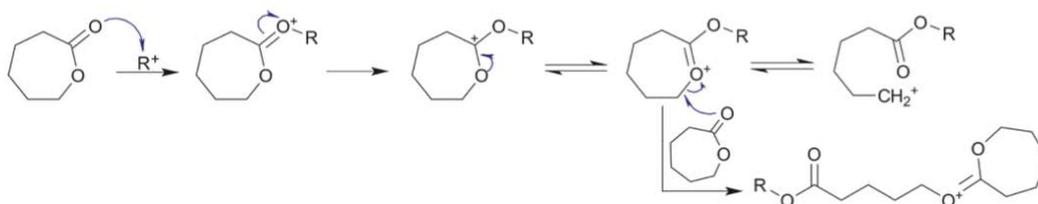


Figura 2.2.1 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo catiónica¹².

Por otra parte, la polimerización por apertura de anillo aniónica de ésteres cíclicos se lleva a cabo por el ataque nucleofílico de un compuesto con carga negativa sobre el átomo de carbono del grupo carbonilo o bien sobre el carbono adyacente al oxígeno¹². El mecanismo de iniciación de esta reacción se ilustra a continuación en la Figura 2.2.2.

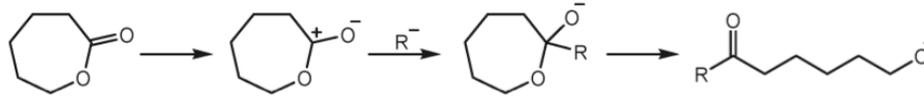


Figura 2.2.2 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo aniónica¹².

En la polimerización por apertura de anillo por activación del monómero, como se muestra en la Figura 2.2.3, el monómero cíclico debe ser activado para que sea susceptible a un ataque nucleofílico al carbono del enlace éster¹³.

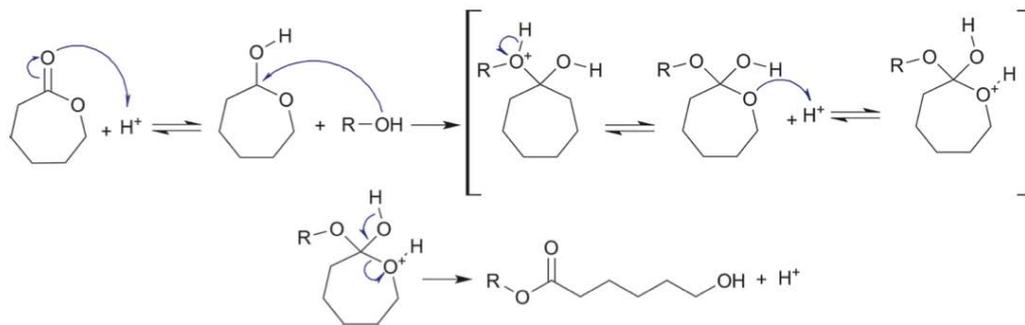


Figura 2.2.3 Mecanismo de iniciación de polimerización por apertura de anillo por activación del monómero por ácido¹³.

2.3 Catalizadores enzimáticos

Las enzimas, catalizadores biológicos o biocatalizadores, participan en el metabolismo de los organismos vivos facilitando una gran diversidad de reacciones. Entre otras funciones, son capaces de sintetizar polímeros naturales, tales como polisacáridos, proteínas y poliésteres entre otros. Las enzimas, son una atractiva alternativa al uso de catalizadores metálicos ya que son altamente específicas respecto a su sustrato, presentan alta actividad catalítica, su origen se encuentra en fuentes renovables, no son tóxicas y utilizan condiciones suaves de reacción (temperatura, presión y pH). Debido a esto, su uso en la industria ha adquirido gran relevancia recientemente.

La necesidad de desarrollar procesos y productos ecológicamente benignos ha hecho de la catálisis enzimática una de las herramientas más prometedoras en la creación de nuevos compuestos, entre ellos se estudia la producción de polímeros. Las enzimas pueden actuar de manera eficiente como catalizadores

en la producción y reciclaje de polímeros biodegradables a través de la reacción de PEAA. Además, debido a su regio y enantio-selectividad, son una gran herramienta en la síntesis de materiales.

2.3.1 Uso de enzimas en disolventes no convencionales

De manera natural, las enzimas son catalizadores que se encuentran y actúan en disolución acuosa dentro de los seres vivos, sin embargo, su actividad no está limitada a los medios acuosos de reacción.

Se conoce como “medios no convencionales” a fluidos utilizados para llevar a cabo reacciones enzimáticas en condiciones de mínimo contenido de agua. La enzimología en medios no acuosos empezó a estudiarse por Dastoli y Price en 1966 mostrando inmediatamente las ventajas de utilizar solventes orgánicos junto con estos catalizadores. Klibanov, en 1984, demostró que algunas hidrolasas pueden ser más activas y estables en disolventes orgánicos anhidros¹⁴. Actualmente, existen diversos estudios de actividad y reacción enzimática realizados en disolventes orgánicos, gases y fluidos comprimidos.

Existe un sin número de ventajas al utilizar catalizadores enzimáticos en medios con escasez de agua, por ejemplo: llevar a cabo reacciones que no son posibles en medios acuosos, mejor solubilidad de sustratos orgánicos o mayor estabilidad enzimática, entre otras.

En estas condiciones, algunas lipasas exhiben una alta actividad catalítica en un intervalo de temperatura de entre 90 y 120 °C por tiempos relativamente extensos. Además, permiten que las lipasas catalicen reacciones de PEAA en lugar de su habitual catálisis hidrolítica.

2.3.2 Lipasas

En particular, las lipasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Pertenecen a la familia de las hidrolasas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos en medios acuosos (en organismos vivos).

De manera general, las lipasas tienen una estructura similar, presentan un plegamiento α/β , su sitio activo es una "tríada catalítica" compuesta de un residuo de serina nucleofílica estabilizado por un puente de hidrógeno en el enlace con histidina y aspartato o glutamato, y algunas tienen una "tapa" móvil que cubre el sitio activo, la cual se abre en presencia de una interfase lípido/agua.

En 1993 dos grupos independientes descubrieron que las lipasas inducen la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona (ϵ -CL) y de la δ -VL. Estos hallazgos abrieron las puertas a la síntesis enzimática de poliésteres, cuyo esquema de reacción se muestra en la Figura 2.3.1.

Ahora es bien sabido que las lipasas se pueden utilizar como biocatalizadores en reacciones de esterificación, transesterificación, hidrólisis, aminólisis, politransesterificación, poliesterificación. Es preferible que las reacciones de este tipo se realicen en medios no acuosos ya que, la reacción de hidrólisis se ve favorecida en dichos medios, además de la baja solubilidad de las lactonas en medio acuoso.

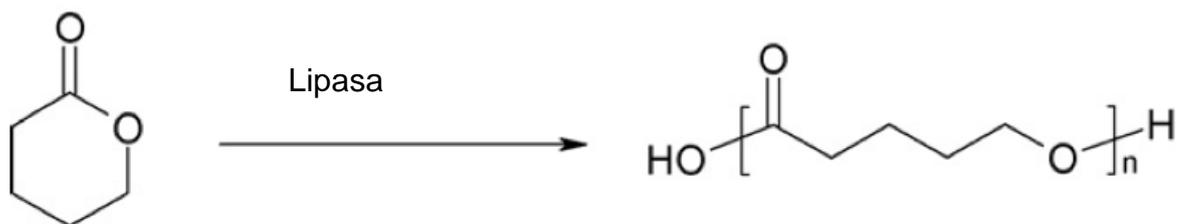


Figura 2.3.1 Esquema de PEAA

La producción enzimática de poliésteres se ha realizado de manera exitosa utilizando lipasas de diferentes orígenes, la Tabla 2.3.1 muestra las hidrolasas utilizadas comúnmente en este tipo de polimerización.¹⁵

Tabla 2.3.1 Algunas lipasas utilizadas en la síntesis de poliésteres *in vitro* y sus abreviaciones.

Origen de la lipasa	Abreviatura
<i>Candida cylindracea</i>	Lipasa CC
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipasa PF
Lipasa de páncreas porcino	PPL
<i>Aspergillus niger</i>	Lipasa A
<i>Candida rugosa</i>	Lipasa CR
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipasa PR
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipasa PC
<i>Rhizopus japonicus</i>	Lipasa RJ
<i>Rhizomucor meihei</i>	Lipasa RM
<i>Candida antarctica</i>	Lipasa CA
<i>Candida antarctica lipasa B</i>	CALB
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipasa YL

2.3.3 Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

La cepa de *Candida antarctica* es capaz de producir dos distintas lipasas, las isoenzimas A y B. La diferencia entre estas lipasas radica en que la isoenzima A no es específica, es dependiente del calcio y presenta alta termoestabilidad; por el contrario, la lipasa B es independiente del calcio y es menos termoestable.

La CALB es una enzima con una amplia gama de aplicaciones industriales debido a que presenta una alta enantioselectividad, gran versatilidad de

sustratos, estabilidad térmica y estabilidad en solventes orgánicos. Consta de 317 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 33273 g/mol. Su sitio activo está constituido por la triada catalítica de serina(Ser105)-histidina(His224)-ácido aspártico(ASP187) característico de las serina proteasas¹⁶. En la Figura 2.3.2 se muestra una imagen de la estructura tridimensional de la CALB.

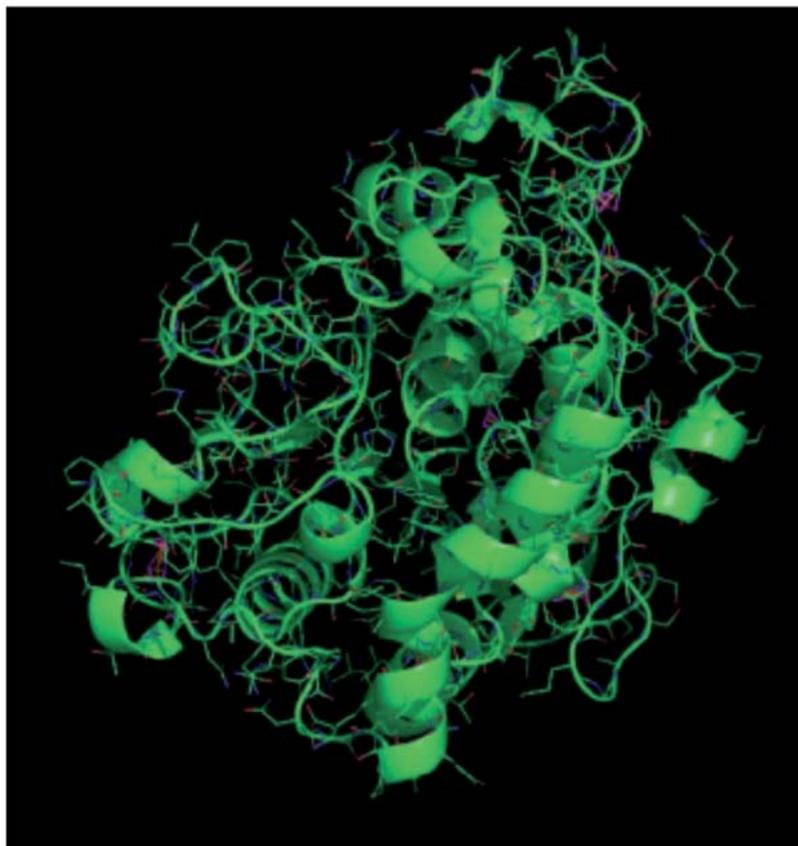


Figura 2.3.2 Estructura de la CALB.

En comparación con otras lipasas, la CALB carece de la tapa que cubre el sitio catalítico de la mayoría de las lipasas, lo cual permite que esta enzima tenga actividad sin presencia de una interfase.

De manera inmovilizada, se ha probado que la CALB soporta una gran variedad de condiciones de reacción y es utilizada en un gran número de reacciones de manera eficiente. La forma comercial más ampliamente usada es la CALB soportada sobre una resina de Lewattit VOC 1600 esférica, con nombre comercial Novozym435 de Novozymes (Dinamarca), sin embargo, hoy

en día existen varios proveedores de este mismo producto al estar vencidos los derechos de patente, entre otros la empresa alemana C-Lecta. Esta lipasa presenta actividad catalítica en disolventes orgánicos, además se ha observado que en estos medios de reacción aumenta su estabilidad térmica.¹⁷

2.4 Lipasas en la polimerización enzimática por apertura de anillo (PEAA).

La PEAA catalizada por lipasas, podría ser una de las aplicaciones más atractivas en el campo industrial para la siguiente generación de procesos en la obtención poliésteres potencialmente biodegradables. A diferencia de otras enzimas, las lipasas, aceptan un amplio rango de sustratos.

Se ha reportado que la polimerización por apertura de anillo de lactonas de entre 4 y 6 carbonos se realiza eficientemente usando lipasas como catalizadores. Las propiedades y rendimientos de los polímeros obtenidos varía al modificar el tamaño del anillo y el origen de la lipasa, en algunos casos se obtienen pesos moleculares y rendimientos mayores que aquellos obtenidos mediante catálisis química.^{18,19}

Como se mencionó antes, el sitio activo de las lipasas es una "tríada catalítica" compuesta de un residuo de serina nucleofílica estabilizado por un puente de hidrógeno en el enlace con histidina y aspartato o glutamato. El residuo de serina nucleofílica participa en el ataque al carbonilo de la lactona para formar un complejo enzima-lactona inicial o acil-enzima. Posteriormente, ocurre un ataque nucleofílico del agua al carbonilo del complejo para dar como producto un hidroxácido, la estructura abierta de la lactona. La propagación polimérica ocurre cuando el ataque nucleofílico proviene de un hidroxilo terminal de la estructura abierta al carbonilo de otro complejo acil-enzima, dando lugar a un dímero. Las sucesivas reacciones de condensación en el sitio activo de la enzima conducen a la formación de un polímero de cadena larga, este mecanismo de reacción se muestra en la Figura 2.4.1.

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 decrece a medida que se utiliza en la hidrólisis del complejo acil-enzima, por otro lado, el contenido de agua se incrementa debido a las policondensaciones entre los complejos y las formas abiertas, por lo que se dice que el agua tiene un comportamiento dinámico en este tipo de mecanismos.^{2,16}

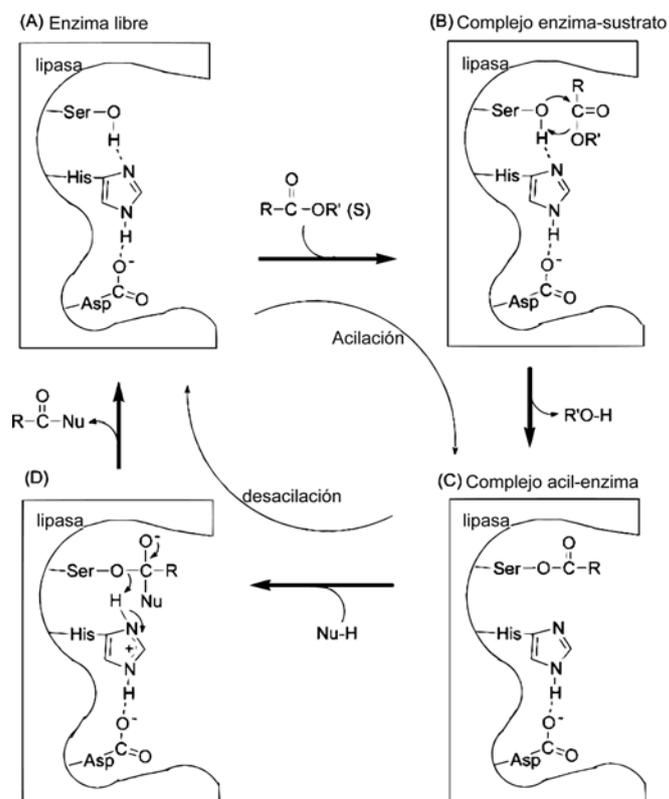


Figura 2.4.1 Mecanismo de polimerización por apertura de anillo catalizada por lipasa.

2.5 Disolventes utilizados en PEAA

Convencionalmente estas reacciones se llevan a cabo en disolventes orgánicos apróticos e hidrofóbicos como el tolueno, heptano y diisopropiléter, para evitar la difusión de las moléculas de agua sobre la proteína al medio, lo cual implicaría la desnaturalización de la enzima. Sin embargo, el uso de “disolventes verdes” como sistemas microacuosos fluidos comprimidos y líquidos iónicos es un área creciente de investigación.

El primer ejemplo de síntesis enzimática de poliésteres a partir de lactonas y macrólidos en agua fue llevada a cabo por Kobayashi y colaboradores en 1998. En dicha ocasión, los autores obtuvieron rendimientos de hasta el 89% en masa, siendo la lipasa PC la enzima que mejores resultados mostró. La reacción se llevó a cabo en un sistema de emulsión. Existen otros reportes de PEAA llevados a cabo en miniemulsiones y micro emulsiones utilizando surfactantes no iónicos y hexadecano.¹

Los fluidos comprimidos se utilizaron por primera vez al llevar la PEAA de ϵ -CL en CO₂ supercrítico utilizando lipasa CA como catalizador. En dicha ocasión S. Kobayashi y colaboradores obtuvieron pesos moleculares promedio alrededor de 1.1×10^4 g/mol con altos rendimientos y en estudios posteriores se sintetizaron materiales con un M_w cercano a 7.3×10^4 g/mol.

2.5.1 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (TFE)

El TFE es un freón que ha sido utilizado desde los años 80 como refrigerante. Aunque este compuesto es conocido desde 1934, no fue hasta que el protocolo de Montreal prohibiera los clorofluorocarbonos (CF's) cuando éste freón fue producido en masa. El TFE se encuentra en la mayoría de los sistemas de refrigeración actuales y es considerado un refrigerante de tercera generación no tóxico, no inflamable, que no destruye la capa de ozono y es fácilmente reciclable. Es gas a temperatura y presión ambiental, su punto normal de ebullición es de -26 °C, tiene una densidad líquida de 1.3 kg/l (25 °C). Su temperatura crítica es 101.21 °C y su presión crítica es 4.059 MPa.²⁰

Utilizar fluidos comprimidos como el TFE en lugar de disolventes orgánicos convencionales tiene muchas ventajas, estos fluidos presentan una enorme difusividad, gran capacidad de solvatación y propiedades ajustables (manipulando las condiciones de presión y temperatura a las que se someten). Además son excelentes medios de reacción enzimática ya que disminuyen la resistencia de la transferencia de masa entre la mezcla de reacción y los sitios activos en las enzimas.

Como medio de reacción favorece la polimerización por PEAA ya que permite solubilizar sustancias polares y apolares, facilita la separación por insolubilidad de los productos finales y, debido a su baja viscosidad y su elevada capacidad de interpenetración, permite la rápida difusión del monómero al catalizador²¹.

2.6 Actividad enzimática y PEAA en TFE

Yu y colaboradores²² analizaron la actividad catalítica de la CALB inmovilizada después de su incubación en TFE líquido en un rango de presiones de 2 a 8 MPa y en un intervalo de temperaturas de 30 °C a 60 °C por 7 horas. La incubación de la CALB inmovilizada en medio TFE líquido resultó en un incremento significativo en la actividad hasta un valor máximo de 229%, con respecto a la actividad inicial y a una presión de 4MPa. Además, observaron una excelente estabilidad térmica al realizar la incubación de la enzima en este medio de reacción con un incremento en la actividad hasta un máximo de 300% con respecto a la actividad inicial a 30 °C.

García Arrazola y colaboradores demostraron por primera vez la efectividad de TFE líquido como medio de reacción en la síntesis de poliésteres catalizada por lipasas. Ellos realizaron la polimerización de ϵ -CL, catalizada por Novozym435 usando TFE líquido a una presión de 2.5 MPa. El peso molecular numeral (M_n) máximo alcanzado en este estudio inicial fue de 37,600 g/mol con un PDI de 1.7. El rendimiento del polímero fue mayor de 95% y no se observó conversión en ausencia de enzima. En este caso, la temperatura óptima para la actividad de la enzima en el TFE fue de 65 °C, similar a los reportes previos en tolueno y $scCO_2$.

Posteriormente López Luna³ y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis de poliésteres hiperramificados a partir de BHB, δ -VL y ϵ -CL utilizando condiciones supercríticas de CO_2 y TFE líquido como medio de reacción. Las condiciones de las reacciones llevadas a cabo con TFE fueron 25 Bar y 65 °C, consiguiendo un peso molecular máximo de 2700 g/mol, con un rendimiento del 49.07% y un grado de ramificación de 0.04. Cabe decir que el CO_2 comprimido no pudo usarse en estas reacciones de hiperramificación debido a la baja solubilidad de BHB en este fluido inorgánico.

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Si es posible llevar a cabo la co-polimerización de la δ -Valerolactona (δ -VL) y el ácido 2,2-bis(hidroximetil) propiónico (BHP) empleando la CALB como catalizador, entonces se obtendrá un poliéster hiperramificado.

3.2 Objetivo general

Sintetizar enzimáticamente estructuras poliméricas hiperramificadas basadas en δ -VL utilizando como co-monómero BHP.

3.3 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de reacción para la producción de polímeros hiperramificados de δ -VL modificando la temperatura, tipo de agitación, tiempo de reacción y utilizando diferentes medios de reacción.
- Caracterizar los materiales obtenidos utilizando técnicas analíticas de Resonancia Magnética Nuclear de protón ($^1\text{HRMN}$) y Cromatografía de exclusión por tamaño (GPC/SEC).

4. Metodología

4.1 Materiales

El catalizador empleado fue CALB inmovilizada sobre soporte acrílico esférico de Lewattit VOC 1600, con una actividad específica de 6,000 PLU/g (μmoles de laurato de n-propilo producidos por minuto por gramo de catalizador empleado) y fue adquirido a la empresa C-LEcta (Alemania). Los monómeros utilizados en la co-polimerización fueron δ -VL (tetrahidro-2H-piran-2-ona) grado técnico (Aldrich) y BHP 98% (Sigma). Los disolventes empleados fueron el TFE mediante el uso de un cilindro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) (Dupont

SUVA R-134a) que fue adquirido a Refacciones STAR SA de CV; metanol grado industrial y cloroformo grado industrial (Química Barsa). Cloroformo grado HPLC fue adquirido a JT Baker (Mexico).

4.2 Equipos

Los equipos utilizados para la reacción y purificación fueron Balanza analítica (marca Ohaus, modelo AP2105), congelador REVCO a -78°C , Liofilizador (marca Heto, modelo FD1.0.), parrilla con temperatura y agitación controlada (IKA RTC basic ETS-D4), bomba de vacío (diafragma) intermedio Millipore, equipo Millipore con filtro de membrana de $0.45\ \mu\text{m}$, bomba de vacío para disolventes (marca Vacuubrand modelo PC3-RZS2.5) con condensador de volátiles incorporado para hielo seco/acetona, capacidad total de vacío de 4×10^{-4} mbar. Propela de agitación (marca Groschopp, modelo PM6015).

Para la caracterización de los co-polímeros se utilizaron los siguientes equipos: Cromatógrafo de líquido de alta resolución (HPLC Hewlett Packard HP1050S, USA) usando columnas de permeación en gel GPC y equipado con un automuestreador (HP1100S, USA), un detector Refractive Index Detector 1260 infinity (agil agent, EUA). Las muestras fueron eluidas en cloroformo (HPLC). La resonancia magnética nuclear (RMN) fue adquirida en un Unity Inova 400 MHz (Varian, EUA), este último análisis fue realizado por la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química de la UNAM)

4.3 Preparación de materiales

δ -VL

La δ -VL se puso en agitación durante 12 h con hidruro de calcio para retirar el agua presente en el reactivo y posteriormente fue destilada al vacío para retirar los inhibidores de polimerización. Después fue almacenada a $5\ ^{\circ}\text{C}$ en un matraz de bola con tamiz molecular hasta su uso.

BHP

El BHP fue almacenado a 5°C hasta su uso. Antes de llevar a cabo la reacción se congeló durante 2 h a -80 °C y luego se liofilizó para minimizar el contenido de agua en el sistema.

Enzima

La enzima fue almacenada a 5°C hasta su uso. Antes de llevar a cabo la reacción se congeló durante 2 h a -80 °C y luego se liofilizó para minimizar el contenido de agua en el sistema.

Reactor

El reactor se limpió con acetona y CO₂ antes de cada uso y se secó en el extractor de solventes durante 1 h.

4.4 Condiciones evaluadas

Para determinar las condiciones óptimas de reacción para la co-polimerización de la δ -VL y el BHP, se llevaron a cabo polimerizaciones modificando la temperatura, tipo de agitación, tiempo de reacción y utilizando diferentes medios de reacción. Además, se llevaron a cabo reacciones de control en ausencia tanto de enzima como de BHP.

Como se mencionó en el párrafo anterior, las reacciones se llevaron a cabo usando dos diferentes medios de reacción. Por un lado, un sistema reaccionante en masa, es decir utilizando la δ -VL como medio de reacción y por otro lado, un sistema presurizado utilizando TFE en estado líquido.

El efecto de la temperatura en la co-polimerización se observó al realizar las reacciones en masa a dos temperaturas diferentes, 65 °C y 75 °C. Para estudiar el efecto de la agitación en la co-polimerización, se utilizaron dos diferentes tipos de agitación, una accionada por un agitador magnético de cruz y otra mediante una propela de agitación.

Las reacciones en las que se utilizó TFE líquido como medio de reacción se llevaron a cabo a una temperatura de 90 °C, esta temperatura se determinó a

partir de los resultados de las pruebas de solubilidad descritas en el **apartado 4.6.**

Tabla 4.4.1 Condiciones evaluadas

Monómeros	Tipo de reacción	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (C °)	Tipo de agitación
* δ -VL	Masa	24	65	Magnética
* δ -VL	Masa	48	65	Magnética
* δ -VL	Masa	72	65	Magnética
* δ -VL + 5% BHP	Masa	24	65	Magnética
			75	Con propela
* δ -VL + 5% BHP	Masa	36	65	Magnética
			75	Con propela
* δ -VL + 5% BHP	Masa	72	65	Magnética
			75	Con propela

δ -VL + 5% BHP	con TFE	24	90	Magnética
δ -VL + 5% BHP	con TFE	36	90	Magnética
δ -VL + 5% BHP	con TFE	72	90	Magnética

* Estas reacciones fueron llevadas a cabo con y sin enzima, el resto de las reacciones solamente se realizaron en presencia de la enzima.

4.5 Descripción del sistema de reacción

Para las reacciones llevadas a cabo en masa, el sistema de polimerización constó de un matraz de bola de 50 ml y agitación continua mediante un agitador magnético de cruz. Además, se utilizó una propela de agitación para observar el impacto de la agitación en la co-polimerización. En ambos tipos de agitación, el matraz se colocó dentro de un baño de glicerina, el cual se instaló a su vez sobre una parrilla de calentamiento con temperatura y agitación controlada.

En las reacciones llevadas a cabo utilizando TFE líquido como medio de reacción, el sistema de polimerización constó de un reactor de acero inoxidable de 40 ml con agitación continua (mediante un agitador magnético de cruz accionado por una parrilla agitadora externa). El reactor se colocó dentro de una chaqueta cerámica eléctrica de calentamiento conectada a un controlador de temperatura. Otro termopar independiente se usó para monitorear la temperatura dentro del reactor.

El reactor fue presurizado mediante una bomba de jeringa (ISCO, EEUU) de 100 ml que introduce el fluido comprimido directamente al reactor por acción de un panel de válvulas de control.

4.6 Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad del BHP en la lactona con la finalidad de obtener las condiciones a las cuales es posible llevar a cabo la reacción. Las pruebas se realizaron tanto en masa como utilizando TFE como solvente.

Pruebas en masa

Se utilizó un matraz de bola de 50 ml con agitación continua (mediante un agitador magnético de cruz), se introdujo 13.5 g de δ -VL y 0.9 g de BHP (5% molar con respecto a δ -VL). Se calentó gradualmente hasta que el BHP se solubilizó completamente, se registró la temperatura alcanzada.

Pruebas con TFE

Se utilizó un reactor de 40 ml con mirillas de zafiro sintético para realizar la prueba de solubilidad. Para ello se introdujo en el reactor 13.5 g de δ -VL y 0.9 g de BHP (5% molar con respecto a δ -VL). La agitación fue controlada mediante un agitador magnético en cruz y una parrilla externa donde se descansó el reactor de mirillas. Se inyectó TFE hasta alcanzar una presión de 12 bar y se calentó gradualmente hasta que el BHP se solubilizó completamente, se registró la temperatura y presión alcanzada.

4.7 Determinación de la actividad enzimática inicial

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante el método de hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo. Durante el ensayo, la enzima realiza una hidrólisis sobre el sustrato previamente mencionado dando como producto p-nitrofenol, este último es un compuesto que en disolución acuosa presenta coloración permitiendo determinar la concentración de producto mediante espectrofotometría UV-visible.

Para la determinación de la actividad se realizó una curva de calibración (concentración contra absorbancia) con soluciones patrón de p-nitrofenol. Se prepararon soluciones con concentraciones de 25, 50, 100 y 250 μ M en matraces aforados de 10 ml con buffer de fosfatos (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0) y 0.2% de emulsificante (Tritón X-100).

Posteriormente, se añadió 2 mg de enzima, 100 μ l de una solución con una concentración 100 μ molar de acetato de p-nitrofenilo y 1.9 ml de buffer a una celda de UV-visible. El espectrofotómetro registra el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo durante un periodo de 2 min en el cual la actividad enzimática presenta un comportamiento lineal en relación al producto de la hidrólisis.

Finalmente, es posible determinar la actividad enzimática al relacionar el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo empleando la curva de calibración con la siguiente ecuación:

$$Act = \left(\frac{n}{m}\right) * \left(\frac{V}{E}\right)$$

Donde: **m** es la pendiente de la curva de calibración; **n** es el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo medido durante el ensayo; **V** es el volumen en el que se realizó el ensayo; **E** es la masa neta de enzima utilizada.

El ensayo se midió en una longitud de onda de 410 nm a 25 °C y pH 7.

4.8 Reacciones

Reacción en masa

Después de llevar a cabo la metodología preparativa, se carga un matraz de bola de 50 ml con 13.5 gramos de monómero cíclico, 0.9 gramos del co-monómero trifuncional (una relación 5% molar con respecto a la lactona) y 1.66 gramos del biocatalizador (11% p/p con respecto al peso de los monómeros). Se utilizaron dos formas de agitación, una fue accionada por una parrilla externa y un agitador magnético de cruz, la otra mediante una propela de agitación mecánica. El matraz se colocó dentro de un baño de glicerina, el cual se instaló a su vez sobre una parrilla de calentamiento con temperatura y agitación controlada. Como se mencionó anteriormente se llevaron a cabo reacciones a 65 °C y 75 °C.

Reacción en TFE

Después de llevar a cabo la metodología preparativa de los monómeros y biocatalizador, se cargó un reactor de 40 ml con 13.5 gramos de monómero cíclico, 0.9 gramos del co-monómero trifuncional (una relación 5% molar con respecto a la lactona) y 1.66 gramos de biocatalizador (11% p/p con respecto al peso de los monómeros) en la presencia de un agitador magnético en cruz accionado por parrilla de agitación externa. El reactor se llevó a una presión de 35 bar con TFE con ayuda de la bomba de jeringa ISCO y a una temperatura de reacción de 90 °C utilizando el sistema de reacción descrito anteriormente.

4.8.1 Purificación de materiales obtenidos

Una vez finalizado el tiempo de reacción los materiales obtenidos fueron purificados. Para ello, se agregó cloroformo al matraz o al reactor según el caso y se agitó hasta disolver totalmente el polímero. Se filtró la enzima a través de una rejilla y se hicieron dos lavados con cloroformo para recuperar la mayor cantidad de material posible. Posteriormente, esta mezcla fue goteada en metanol a 5 °C en una relación 1:10 con respecto al volumen de cloroformo usado con el fin de precipitar el producto al mismo tiempo que remover impurezas y monómero residual.

El precipitado es separado de los solventes con un filtro Millipore de tamaño de poro de 45 µm para, finalmente, ser secado durante 3 h con una bomba de alto vacío a una temperatura de 30 °C para retirar trazas de disolventes.

Después de la purificación, los materiales fueron pesados y se calcularon los rendimientos de cada reacción utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{masa del polimero recuperado (g)}}{\text{masa total de monómeros (g)}} * 100$$

4.9 Caracterización de los materiales

4.9.1 Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹HRMN)

Los materiales obtenidos se analizaron mediante Resonancia magnética nuclear de protón en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química (USAI-UNAM). El análisis se realizó con 50 mg de muestra disuelta en 2 ml de cloroformo deuterado (CDCl₃) a 400 MHz.

Una vez ubicadas las señales características de los segmentos lineales y de los puntos de ramificación en la cadena polimérica (los espectros utilizados se muestran en el **apartado 5.3**), se calculó el porcentaje de incorporación total de BHP a través de la integración de dichas señales utilizando las siguientes ecuaciones:

$$X_{BHPtotal} = \frac{\frac{\int s_{1.2}}{nH_{BHP}}}{\frac{\int s_{1.2}}{nH_{BHP}} + \frac{\int s_{2.3}}{nH_{VL}}}$$

$$\%inc_{BHP} = X_{BHP} * 100$$

Donde: $X_{BHPtotal}$ es la fracción molar de BHP incorporada al polímero; $\int s_{1.2}$ es la integración

de las dos señales en 1.2 ppm; $\int s_{2.3}$ es la integración de la señal en 2.3 ppm; nH_{BHP} es el número de hidrógenos metílicos del BHP; nH_{VL} es en número de hidrógenos de la lactona correspondientes a la señal en 2.3 ppm.

Asimismo, se calculó el grado de ramificación o “Degree of branching” (DB) que es una relación estadística entre las ramificaciones y los segmentos lineales de una macromolécula. El DB puede calcularse fácilmente utilizando la integración de las señales de $^1H_{RMN}$. Los valores de esta relación varían entre 0 y 1, siendo 0 un polímero lineal y 1 para un polímero con estructura perfectamente dendrítica. De acuerdo con H.Frey y D.Hölter²³, el grado de ramificación es calculado de la siguiente manera:

$$X_{BHPram} = \frac{\frac{\int s_{b'1.2}}{nH_{BHP}}}{\frac{\int s_{b1.2}}{nH_{BHP}} + \frac{\int s_{b'1.2}}{nH_{BHP}} + \frac{\int s_{2.3}}{nH_{VL}}}$$

$$X_{PL} = 1 - X_{BHPram}$$

$$DB = 2 \frac{1 - X_{PVL}}{(2 - X_{PVL})^2}$$

Donde: X_{BHPram} es la fracción molar de BHP incorporado como centro de ramificación; $\int s_{b'1.2}$ es la integración de la señal a menor campo en 1.2 ppm; $\int s_{b1.2}$ es la integración de la señal a mayor campo en 1.2 ppm; $\int s_{2.3}$ es la integración de la señal en 2.3 ppm; nH_{BHP} es el número de hidrógenos metílicos del BHP; nH_{VL} es en número de hidrógenos de la lactona correspondientes a la señal en 2.3 ppm; X_{PL} representa la fracción molar de segmentos lineales presentes en el polímero; **DB** es el grado de ramificación.

4.9.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (GPC/SEC)

La Cromatografía de permeación en gel se realizó en un equipo HPLC con un detector Refractive Index Detector y dos columnas en serie PLGEL 10 cm MIXED-B 300 x 7.5 mm (1106-6100 LS, Varian, USA) montadas en un termostato a 30 °C (1200-G1316, Agilent, USA). La fase móvil fue cloroformo grado HPLC a la temperatura del termostato y a un flujo de 1mL/min. Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de polímero en 2 ml de cloroformo

grado HPLC. Posteriormente se filtró dicha disolución a través de un filtro de membrana.

La GPC permite determinar la distribución de pesos moleculares de los materiales debido a la diferencia en el volumen hidrodinámico de las moléculas. Al comparar los tiempos de retención de los co-polímeros sintetizados enzimáticamente contra los de estándares de peso molecular conocido, es posible determinar el peso molecular numeral (M_n), el peso molecular promedio (M_w) y la polidispersidad (PDI), parámetros muy importantes en la caracterización de los polímeros.

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i^2 N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i} \quad PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

Definiciones de M_n , M_w y PDI donde: M_i es el peso molecular de la molécula "i"; N_i es el número de moléculas "i" en la muestra.

Los cálculos necesarios para obtener los valores de estos parámetros fueron realizados por un software acoplado al Cirrus, GPC (versión para ChemStation) previamente calibrado con estándares de poliestireno de PDI estrecho.

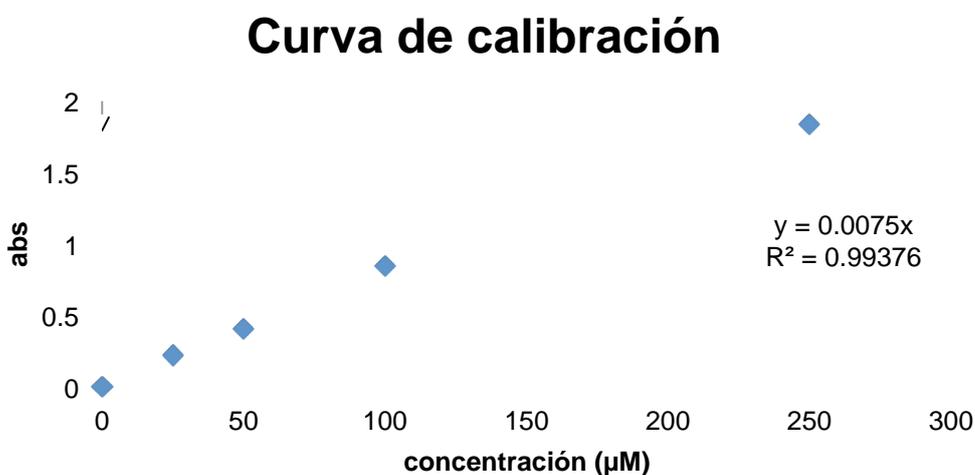
5. Resultados y discusión

5.1 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad en masa demostraron que el BHP es soluble en la δ -VL a una temperatura de 63 °C. Por otro lado, el BHP fue soluble a 90 °C en el sistema con δ -VL y TFE en estado líquido como medio de reacción. La diferencia entre las temperaturas de solubilidad del BHP indica que la solubilidad cambia por la presencia del TFE.

5.2 Actividad catalítica inicial

A continuación se presenta la curva de calibración realizada para la medición de la actividad enzimática inicial junto con la tabla de resultados.



Gráfica 5.2.1 Curva patrón de absorbancia de p-nitrofenol.

Tabla 5.2.1 resultados de la medición de actividad enzimática

n (dA/t)	V Rxn(L)	Enzima (g)	Actv µmol/(min*g)
1.3943	0.002	0.0000816	4677.72
0.9928	0.002	0.0000612	4440.98
1.2139	0.002	0.0001054	3152.90
1.5681	0.001	0.000068	3156.48
			Promedio µmol/(min*g) 3857.02

Los resultados muestran que la enzima presenta actividad catalítica al inicio de la reacción, después de llevar a cabo la metodología preparativa. Esta información nos permite asegurar que la CALB no se desactiva al congelarse y al retirar el exceso de agua durante la liofilización.

5.3 Caracterización de materiales mediante $^1\text{HRMN}$ y GPC/SEC

Los materiales obtenidos se analizaron mediante $^1\text{HRMN}$, el estudio se utilizó para determinar la composición de los co-polimeros obtenidos. Al comparar los espectros de PVL lineal (Figura 5.3.1) con los espectros del polímero ramificado (Figura 5.3.2), encontramos algunas diferencias que evidencian la polimerización de la lactona y el BHP.

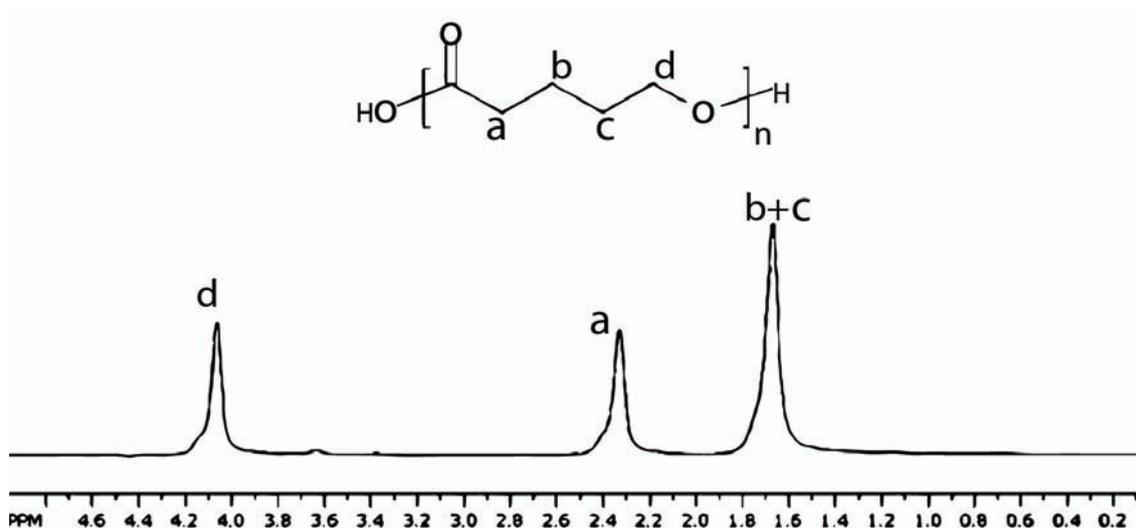


Figura 5.3.1 $^1\text{HRMN}$ de PVL lineal.

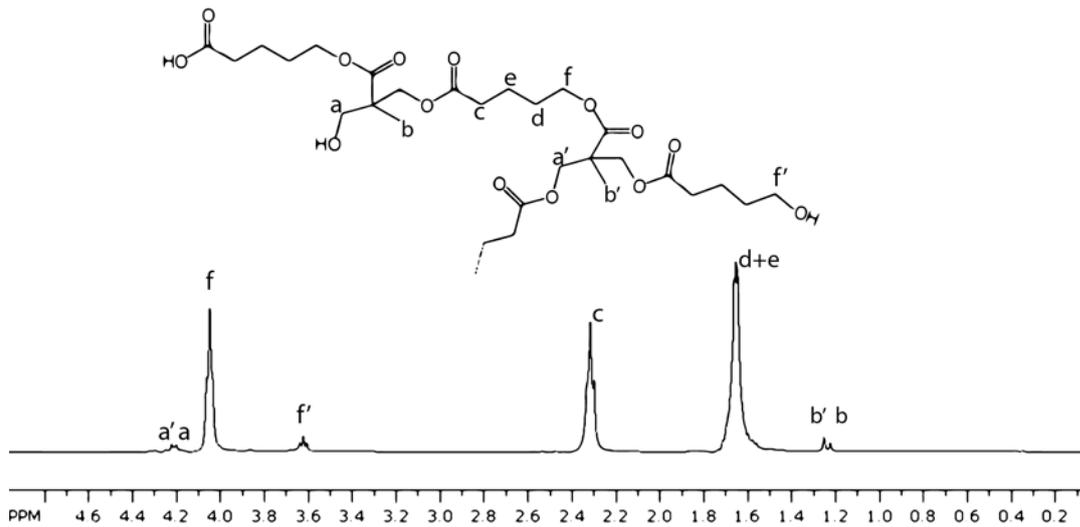


Figura 5.3.2 $^1\text{HRMN}$ de PVL hiperramificada.

El espectro del polímero ramificado presenta dos señales alrededor de 1.2 ppm además de una serie de señales cerca de 4.2 ppm que no aparecen en el espectro del polímero lineal. De acuerdo con Velthoen y colaboradores²⁴, quienes analizan el espectro de Poli- ϵ -caprolactona (PCL) sustituida con BHP sintetizada mediante un catalizador de octanoato de estaño, dichas señales corresponden a los hidrógenos del carbono del grupo hidroximetilo del BHP.

La Figura 5.3.3 muestra el espectro de $^1\text{HRMN}$ del BHP, donde observamos que dichas señales efectivamente son características de BHP, sin embargo, hay un corrimiento hacia la izquierda de las señales en 3.9, 4.0 y 4.1 ppm, tanto en los espectros de los co-polímeros obtenidos en este trabajo como en el de los autores previamente citados. La causa de este desplazamiento en las señales, corresponde a la sustitución en los grupos alcóxidos del BHP por cadenas de PVL, lo cual es un indicador de que la co-polimerización se lleva a cabo.

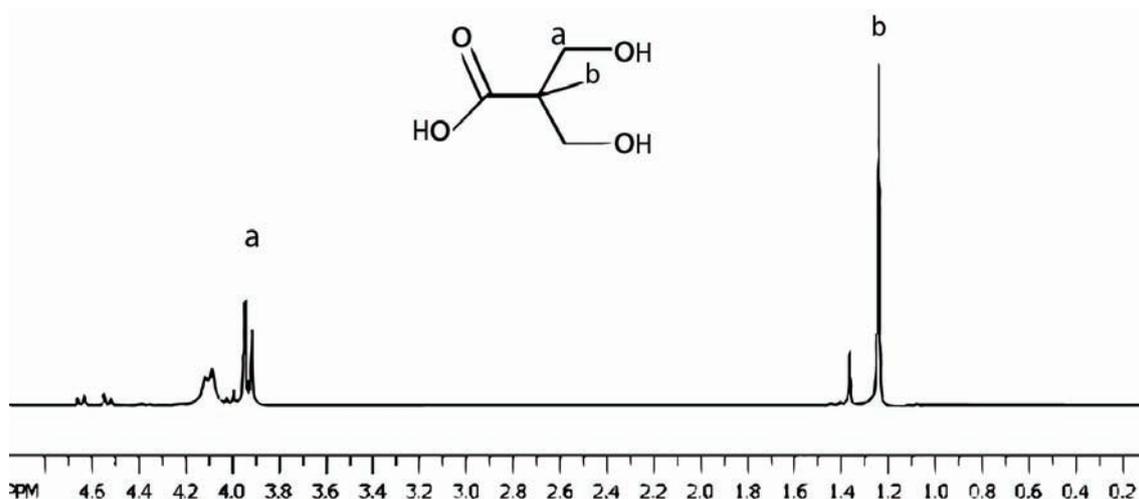


Figura 5.3.3 $^1\text{HRMN}$ del BHP en CDCl_3 .

En la Figura 5.3.2 se observan dos señales diferentes para los hidrógenos metílicos del BHP. La señal a mayor campo identificada con la letra b representa los hidrógenos del grupo metilo del BHP que está sustituido en el carbonilo y en solo un grupo hidroxilo. La señal a menor campo identificada como b' corresponde al BHP sustituido tanto en el carbonilo como en ambos grupos hidroxilos, siendo este tipo de inserción la que proporciona las ramificaciones en la estructura.

Por otro lado, la GPC permite determinar la distribución de pesos moleculares de los materiales debido a la diferencia en el volumen hidrodinámico de las moléculas. Al permear por la columna de exclusión las moléculas presentan diferentes tiempos de retención, las cadenas pequeñas presentarán menor volumen hidrodinámico y por ende son retenidas por más tiempo que las cadenas largas.

Al comparar los tiempos de retención de los co-polímeros sintetizados enzimáticamente contra los de estándares de peso molecular conocido, es posible determinar el M_n , el M_w y PDI, parámetros muy importantes en la caracterización de los polímeros. Sin embargo, es de recalcar que los estándares de calibración son lineales y muestran un error en general con respecto a otros analitos de otras estructuras moleculares. En este caso, al comparar una muestra hiperramificada contra un estándar lineal, es de esperar que el peso molecular determinado mediante este técnica sea menor al real.

5.4 Síntesis de co-polímeros a partir de δ -VL y BHP

En primer lugar se llevó a cabo la polimerización de los monómeros a 65 °C en masa y se hizo una comparación entre los materiales que se sintetizaron usando enzima con aquellos donde la enzima no estuvo presente. También se realizaron reacciones en ausencia del BHP.

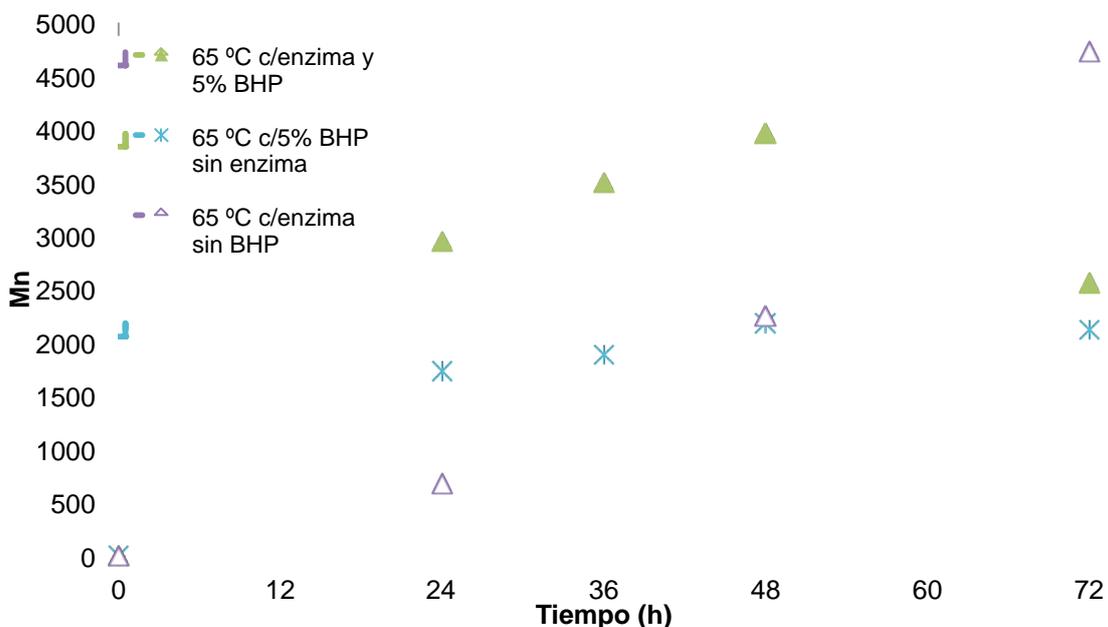
Tabla 5.4.1 Resultados obtenidos de la síntesis de polímeros, reacciones a 65 °C.

Enzima	BHP (%mol)	Tiempo de reacción (h)	PDI	DB
Si	5	24	1.517	0.037
	5	36	1.629	0.034
	5	48	1.431	0.031
	5	72	1.926	0.029
	0	24	1.365	---
	0	48	2.619	---
	0	72	1.430	---
No	5	24	1.667	0.056
	5	36	1.982	0.047
	5	48	1.889	0.052
	5	72	2.040	0.041

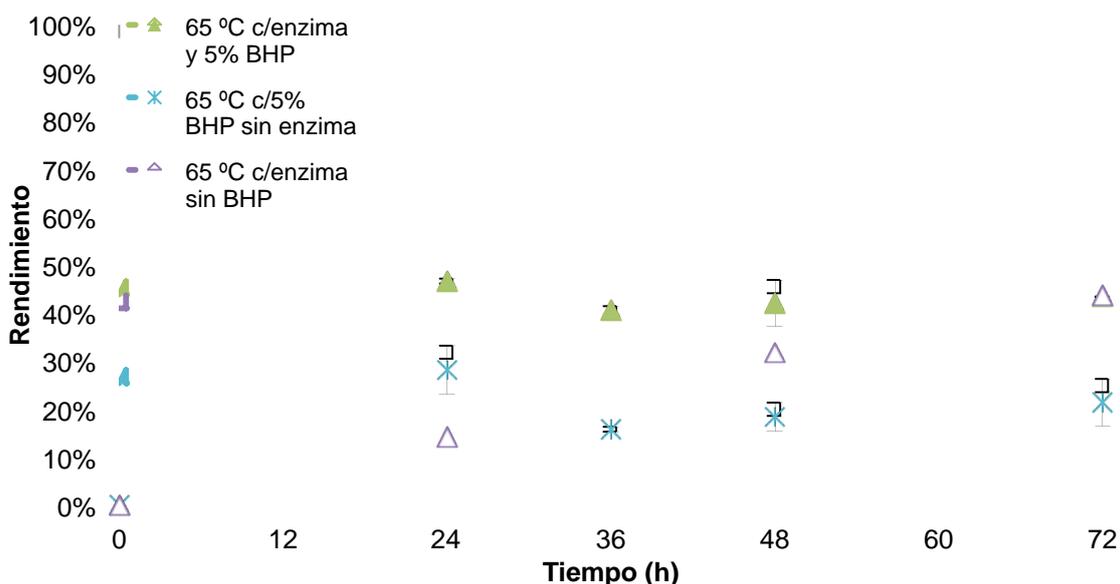
No se obtuvo ningún producto de la reacción de control de la δ -VL en ausencia tanto de enzima como de BHP, lo cual coincide con lo reportado por López Luna y colaboradores³. De acuerdo con dichos autores, se esperaba que la reacción procediera solamente vía enzimática. Sin embargo, resultados posteriores hicieron evidente que la polimerización sucede cuando se añade 5% de BHP en ausencia de biocatalizador. Esta información indica que el BHP, un ácido carboxílico que tiene dos grupos hidroxilos en su estructura, puede catalizar la polimerización de la δ -VL por apertura de anillo por monómero activado¹³.

En las Gráfica 5.4.1 y Gráfica 5.4.2 se muestran las curvas Mn contra tiempo y rendimiento contra tiempo de los poliésteres obtenidos a 65 °C. Se observa que los polímeros lineales obtenidos con enzima en ausencia de BHP, aumentan su peso molecular y rendimiento paulatinamente conforme avanza el tiempo de reacción. No se observa que la reacción alcance un máximo dentro de las primeras 72 h de reacción.

En contraste, los co-polímeros hiperramificados tienen un mayor crecimiento en las primeras 24 h de reacción, alcanzando su mayor rendimiento en este tiempo.



Gráfica 5.4.1 Mn de los poliésteres obtenidos a 65 °C.



Gráfica 5.4.2 Rendimiento de los poliésteres obtenidos a 65 °C.

En el caso de los poliésteres hiperramificados obtenidos con 5% de BHP sin enzima, se observa que el peso molecular alcanza su máximo y se mantiene constante a partir de las 48 h de reacción. Por otro lado, los co-polímeros obtenidos con enzima y 5% de BHP presentaron mayor Mn y rendimiento en comparación con los poliésteres obtenidos sin enzima, lo cual prueba que la reacción procede exitosamente vía enzimática bajo estas condiciones. Sin

embargo, el Mn cae dramáticamente después de las 48 h de reacción, dicho decaimiento es producto de la hidrólisis enzimática de los poliésteres obtenidos. La enzima necesita poca agua para mantener la estabilidad de su sitio activo, el agua producida durante la polimerización invierte la reacción hacia la hidrólisis de los materiales²². Este fenómeno se abordará con mayor detalle en el **apartado 5.4.1**.

Analizando esta información, es claro que el proceso de síntesis de los materiales bajo estas condiciones se lleva a cabo mediante dos rutas independientes. Una ruta química posiblemente catalizada por el BHP y la reacción de PEAA que sucede en presencia de la CALB. Al parecer, la síntesis mediante ambas vías es sinérgica, es decir, los sucesivos productos de estos dos diferentes mecanismos pueden seguir reaccionando por ambas rutas. Se ahondará más al respecto en el **apartado 5.7** donde se discute la inserción del BHP en la macromolécula.

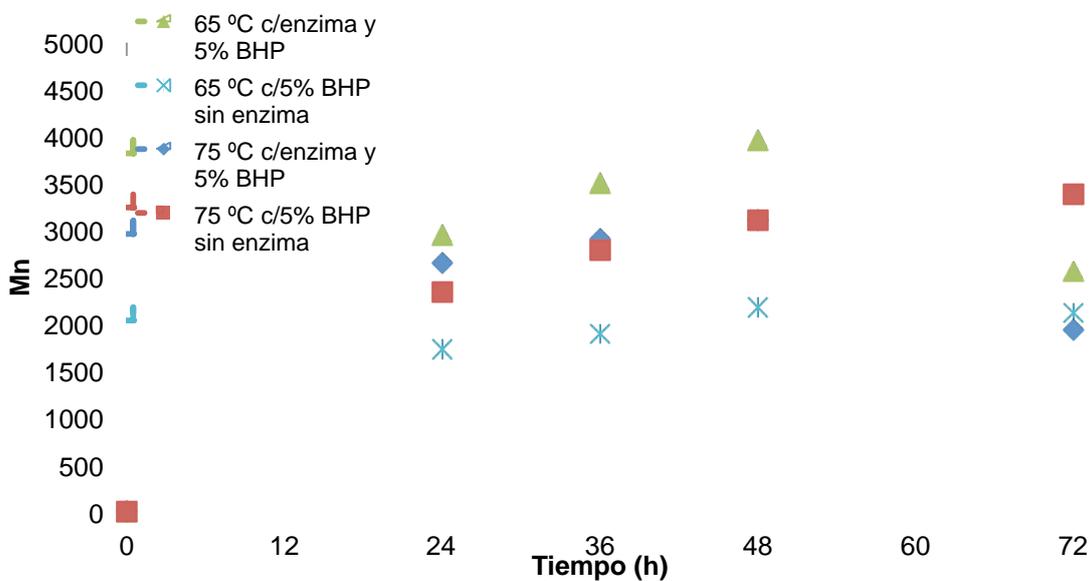
5.4.1 Efecto de la temperatura en la co-polimerización

Para observar el impacto de la temperatura sobre la polimerización, se llevaron a cabo reacciones a mayor temperatura (75 °C), los resultados se reportan en la Tabla 5.4.2.

Tabla 5.4.2 Resultados obtenidos de la síntesis de co-polimeros a 75 °C y 65 °C.

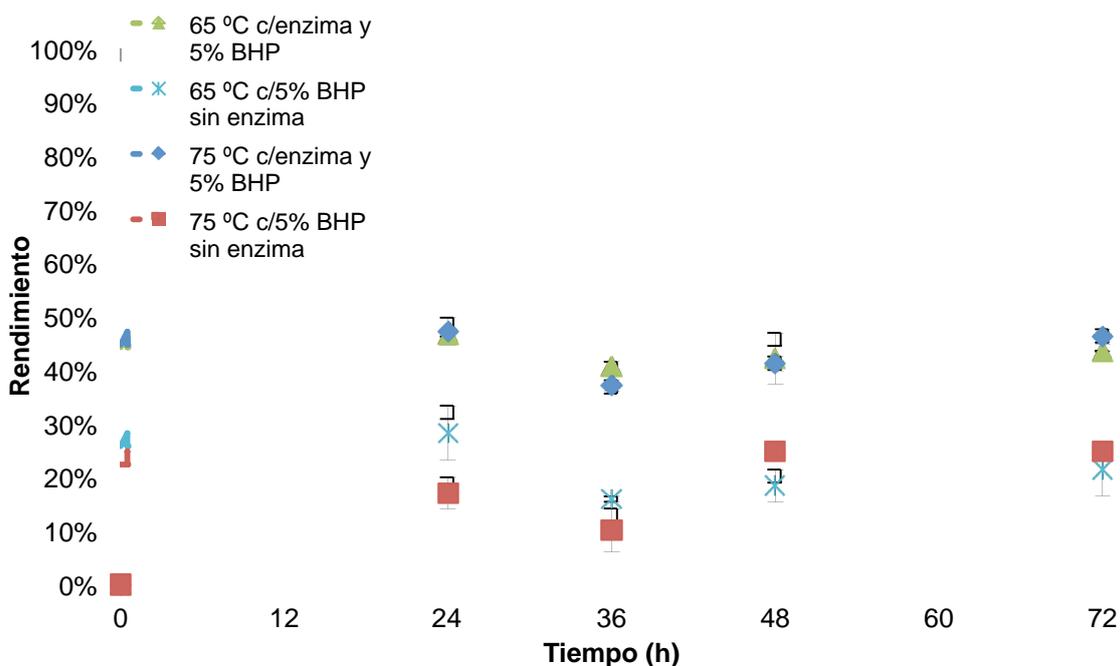
Enzima	Temperatura (°C)	BHP (%mol)	Tiempo de reacción (h)	PDI	DB
Si	65	5	24	1.517	0.037
		5	36	1.629	0.034
		5	48	1.431	0.031
		5	72	1.926	0.029
	75	5	24	1.825	0.044
		5	36	1.894	0.040
		5	48	1.650	0.042
		5	72	2.646	0.033
No	65	5	24	1.667	0.056
		5	36	1.982	0.047
		5	48	1.889	0.052
		5	72	2.040	0.041
	75	5	24	1.600	0.044
		5	36	2.010	0.041
		5	48	2.222	0.051
		5	72	2.118	0.035

Los materiales obtenidos a esta temperatura se compararon con los copolímeros previamente sintetizados a 65 °C. En la Gráfica 5.4.3 se observa que al aumentar la temperatura a 75 °C, los polímeros obtenidos sin enzima tienen mayor peso molecular que los poliésteres sintetizados de la misma manera a 65 °C, lo cual es esperado debido al abatimiento de la energía de activación de la reacción con el aumento de la temperatura. Sin embargo, mientras que a 65 °C existe una gran diferencia en Mn entre los materiales sintetizados con y sin enzima, a 75 °C esa diferencia no existe. Inclusive, los pesos moleculares de los poliésteres obtenidos enzimáticamente a 75 °C disminuyen con respecto a los materiales sintetizados por la misma vía a 65 °C.



Gráfica 5.4.3 Comparación de Mn de los poliésteres obtenidos a 75 °C y 65 °C.

Aunque esta información indica que la actividad enzimática podría disminuir con la temperatura en esta reacción en masa, es necesario comparar los rendimientos contra tiempo de las reacciones para hacer un análisis más profundo.



Gráfica 5.4.4 Comparación de rendimientos de los materiales obtenidos a 75 °C y 65 °C.

En la Gráfica 5.4.4 se observa que los materiales obtenidos con el biocatalizador a diferentes temperaturas tienen rendimientos similares, además de ser mayores a los rendimientos de los co-polímeros obtenidos en ausencia de la CALB. Esto indica que la enzima conserva su actividad durante la reacción. La disminución del peso molecular de los polímeros al aumentar la temperatura puede ser atribuida a dos diferentes fenómenos.

Por un lado, el aumento de la temperatura pudo repercutir en un desplazamiento del equilibrio químico de la reacción hacia la hidrólisis de los productos debido a la naturaleza de la lipasa. Como se mencionó en el **apartado 5.4**, el agua producida durante la polimerización invierte la reacción hacia la hidrólisis de los materiales. Al aumentar la velocidad de reacción de polimerización, por consecuencia también aumenta la hidrólisis. Este fenómeno también fue observado en el estudio de estabilidad y actividad enzimática realizado por Yu y colaboradores²².

El efecto de la hidrólisis enzimática de los poliésteres también se observa en la caída del peso molecular de los co-polímeros después de las 48 h de reacción.

En contraste, los materiales cuya síntesis no involucra a la lipasa no presentan este comportamiento.

Por otro lado, de acuerdo con Andrzej Duda y Adam Kowalski²⁵, en la polimerización por apertura de anillo el equilibrio químico de la reacción está determinado por la existencia de monómero cíclico sin reaccionar. Estos autores desarrollan la siguiente ecuación en el primer capítulo de la fuente citada:

$$[M]_{eq} = \exp\left(\frac{\Delta H_p^0}{RT} - \frac{\Delta S_p^0}{R}\right)$$

Donde: $[M]_{eq}$ es la concentración de monómero cíclico sin reaccionar al equilibrio; ΔH_p^0 es la entalpía estándar de polimerización; ΔS_p^0 es la entropía estándar de polimerización; R es la constante ideal de los gases; T es la temperatura.

Tomando en cuenta que para la δ -VL en este mecanismo de polimerización, tanto la entalpía como la entropía de reacción son negativas, un aumento en la temperatura llevaría a un aumento en la concentración de monómero cíclico sin reaccionar al equilibrio, es decir, a mayor temperatura menor conversión de monómero cíclico.

En el caso de que el equilibrio de la reacción estuviera determinado por la concentración de monómero cíclico sin reaccionar, se observaría que los materiales sintetizados a 75 °C tendrían menores rendimientos y pesos moleculares que aquellos obtenidos a 65 °C. Sin embargo, las reacciones enzimáticas tienen rendimientos similares y los M_n de los materiales obtenidos sin enzima presentan una relación inversa a la esperada si la reacción hubiese alcanzado el equilibrio. Por lo tanto, los resultados indican que la hidrólisis enzimática es el fenómeno que determina el equilibrio de la reacción. Además

esto explica por qué en el mecanismo no enzimático no decae el peso molecular de los poliésteres.

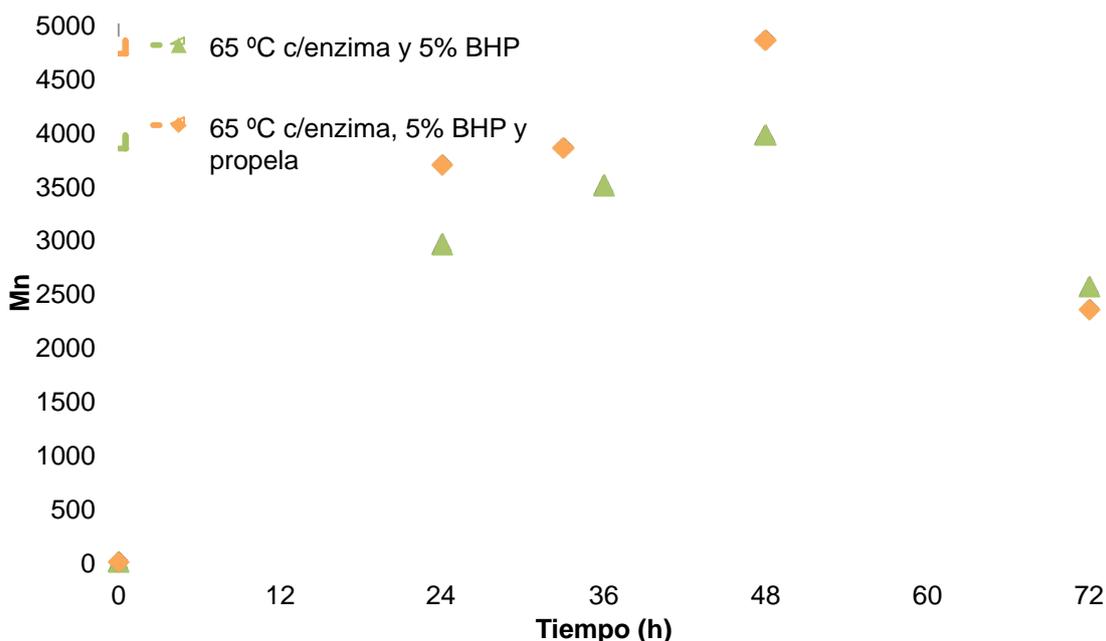
5.5 El efecto de la agitación en la co-polimerización

Debido a que la viscosidad del medio de reacción aumenta al llevarse a cabo la polimerización, la agitación a través de un magneto sobre una parrilla de agitación se ve reducida a lo largo de esta. Esto trae como consecuencia que el catalizador se asiente en el matraz y no haya un contacto apropiado entre la enzima y los monómeros. Por ello, se decidió llevar a cabo reacciones donde se agitó con una propela en lugar de un agitador magnético.

Los resultados de la síntesis de co-polimeros a 65 °C con diferentes tipos de agitación se muestran en la Tabla 5.5.1.

Tabla 5.5.1 Resultados obtenidos de la síntesis de co-polimeros a 65 °C con diferentes tipos de agitación.

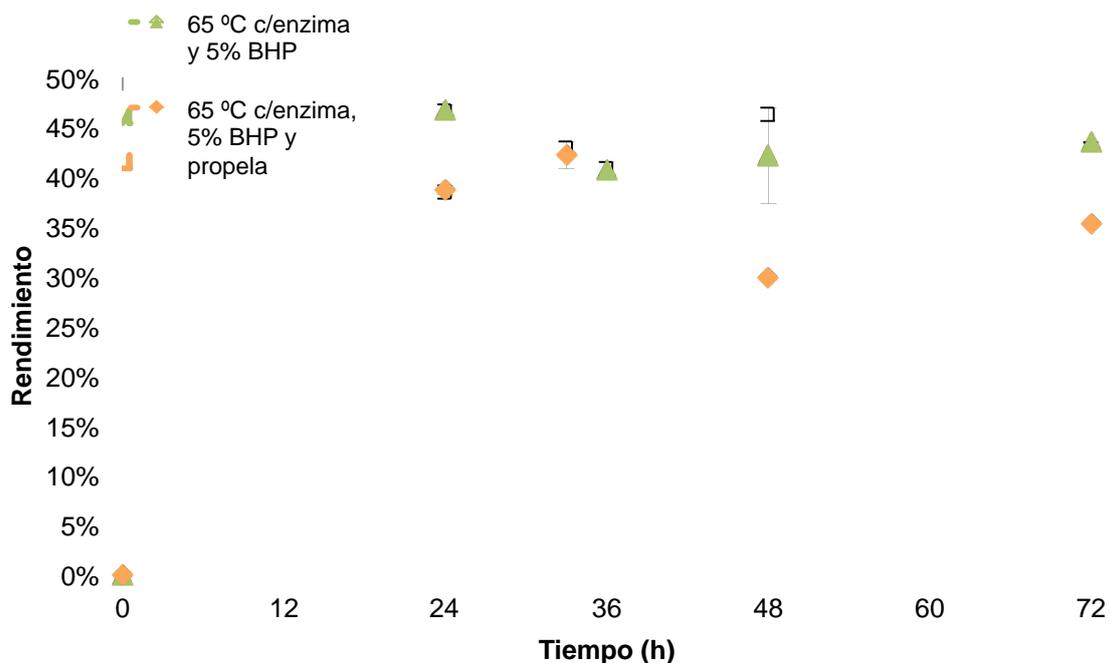
Enzima	Tipo de agitación	BHP (%mol)	Tiempo de reacción (hr)	PDI	DB
Si	Magnética	5	24	1.517	0.037
		5	36	1.629	0.034
		5	48	1.431	0.031
		5	72	1.926	0.029
	Con Propela	5	24	1.576	0.028
		5	30	1.520	0.029
		5	48	1.319	0.027
		5	72	2.413	0.025



Gráfica 5.5.1 Comparación de Mn de los materiales obtenidos a 65 °C con diferentes tipos de agitación.

Como se muestra en la Gráfica 5.2.1, Al agitar de manera uniforme durante toda la reacción los pesos moleculares de los materiales obtenidos aumentan. El sistema reaccionante consta de una fase líquida y otra sólida. En la fase líquida se encuentra el monómero cíclico, cadenas poliméricas en crecimiento y el BHP disuelto, mientras que en la fase sólida está el catalizador enzimático soportado en acrílico, siendo esto una catálisis heterogénea ya que ni la CALB ni el soporte son solubles en el medio.

Al aumentar la agitación, el catalizador se distribuye en la fase líquida en vez de asentarse como se observó en las reacciones agitadas magnéticamente. Asimismo una agitación mejorada aumenta la transferencia de masa durante la reacción, el transporte de los monómeros al sitio activo de la enzima es más rápido y las colisiones entre las moléculas aumenta, provocando un aumento en el Mn de los materiales. Por otro lado, también aumenta la velocidad con la que se hidroliza el material obtenido después de 48 h de reacción, la pendiente negativa entre los puntos a 48 y 72 h es más pronunciada con la agitación de propela que en la agitación con núcleo magnético.



Gráfica 5.5.2 Comparación de los rendimientos de los materiales obtenidos a 65 °C con diferentes tipos de agitación.

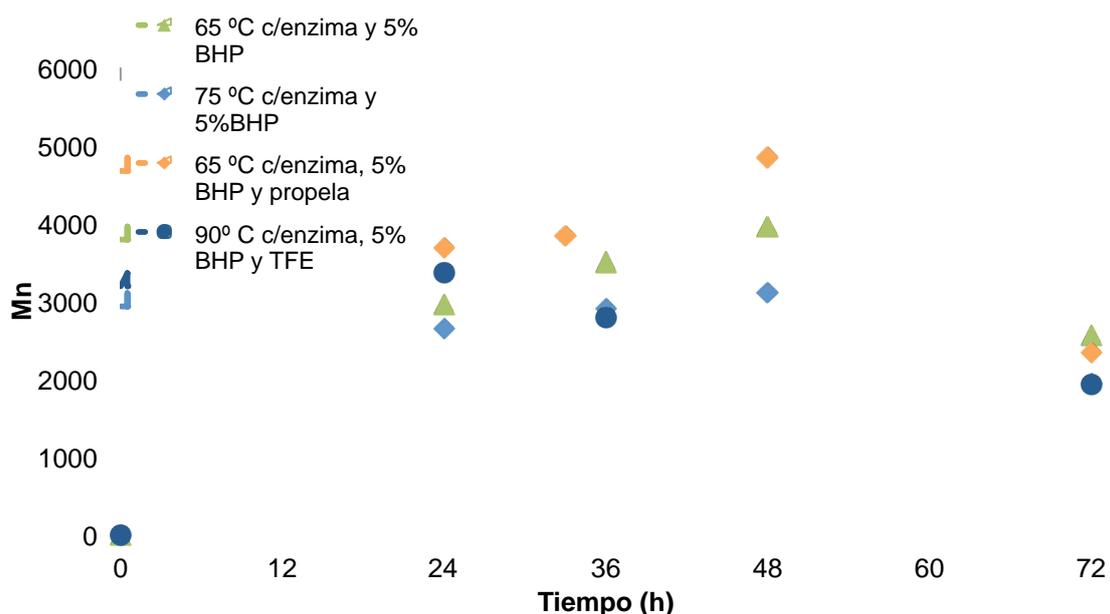
Los rendimientos se observan en la Gráfica 5.5.2, estos parecen disminuir ligeramente al emplear la propela, lo cual podría deberse al aumento en la velocidad de hidrólisis del producto antes mencionada.

5.6 Co-polimerización utilizando fluidos comprimidos como medio de reacción.

Dados los resultados de las pruebas de solubilidad, la co-polimerización enzimática de la δ -VL y el BHP en TFE líquido se llevó a cabo a una temperatura de 90 °C y a una presión de 35 bar. BHP resultó ser muy insoluble en el TFE líquido a temperaturas inferiores. Cabe decir que el BHP presenta muy baja solubilidad en sistemas con disolventes orgánicos convencionales empleados comúnmente en este tipo de reacciones enzimáticas. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 5.6.1 Resultados de la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.

Enzima	BHP (%mol)	Tiempo de reacción (hr)	PDI	DB
Si	5	24	1.771	0.07
	5	48	2.266	0.05
	5	72	1.454	0.06

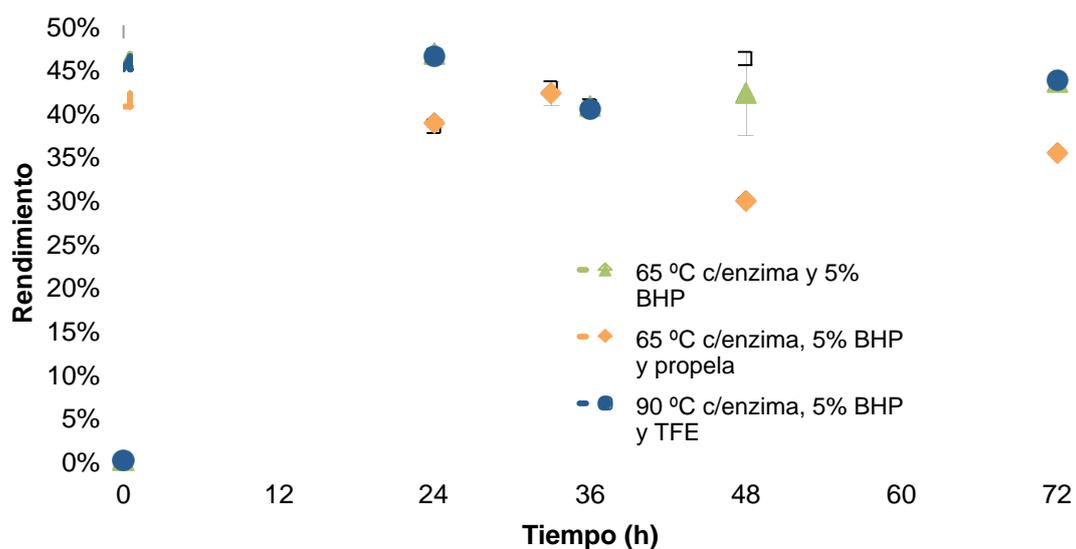


Gráfica 5.6.1 Comparación de Mn de los materiales obtenidos a 65 °C con la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.

Los resultados de la Gráfica 5.6.1 muestran que la polimerización con TFE líquido como medio de reacción es comparable a la realizada en masa, los poliésteres alcanzan su máximo Mn a las 24 h para, posteriormente, hidrolizarse. Se esperaba que tanto el aumento en la temperatura como el uso de un fluido comprimido tuvieran repercusiones en la velocidad de reacción. Como se observó en el **apartado 5.4.1**, el aumento de la temperatura incrementa la velocidad de reacción tanto de la polimerización como de la hidrólisis. Por ello vemos un aumento del peso molecular a las 24 h de reacción comparable con los resultados en masa. También observamos el decaimiento del Mn atribuido a la hidrólisis enzimática. Los rendimientos de la reacción

llevada a cabo en el fluido comprimido a 90 °C son similares a los de los materiales sintetizados en masa a 65 °C y se presentan en la Gráfica 5.6.2.

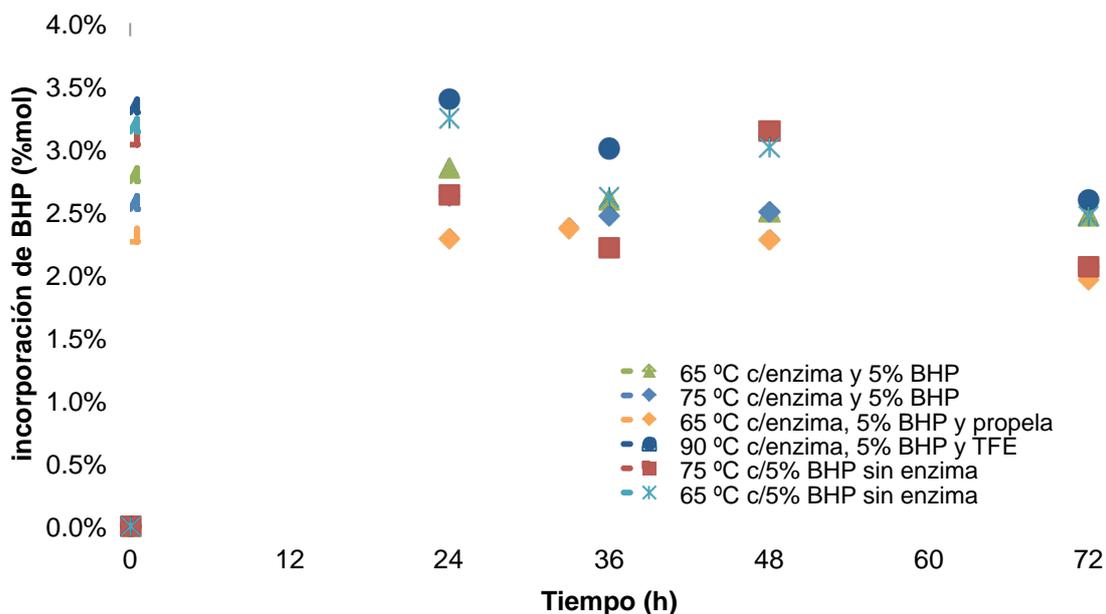
Cabe mencionar que las reacciones en masa se realizan en sistemas abiertos en donde el agua puede evaporarse, mientras que en los sistemas de reactores sellados, el agua permanece dentro del reactor y favorece por ende el proceso de hidrólisis, además el TFE tiene cierta miscibilidad en agua, siendo ésta de 0.15 g en 100 mL a 25 °C y 12 bar, la cual obviamente aumenta con la temperatura.



Gráfica 5.6.2 Comparación de rendimiento de los materiales obtenidos a 65°C con la co-polimerización realizada en TFE líquido a 90 °C.

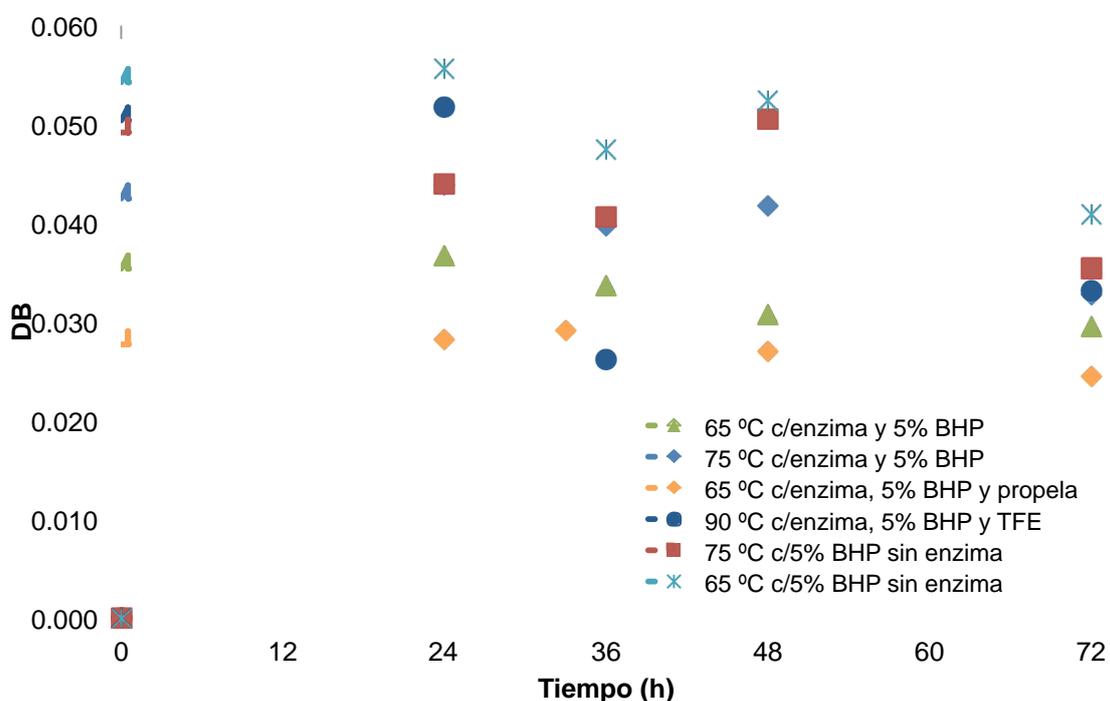
5.7 Incorporación de BHP y Grado de ramificación

Se observa que los materiales con mayor inserción de BHP son los sintetizados a 90 °C con TFE como medio de reacción. Los materiales sintetizados a 65 °C y 75 °C tienen una incorporación similar que se mantiene constante a lo largo de la reacción, sin embargo, se observa que los materiales obtenidos sin enzima tienen una incorporación de BHP ligeramente mayor. Estos resultados podrían indicar que la co-polimerización entre el BHP y la PVL se realiza mediante la ruta química y se favorece al aumentar la temperatura.



Gráfica 5.7.1 Comparación de la inserción de BHP de los poliésteres hiperramificados obtenidos.

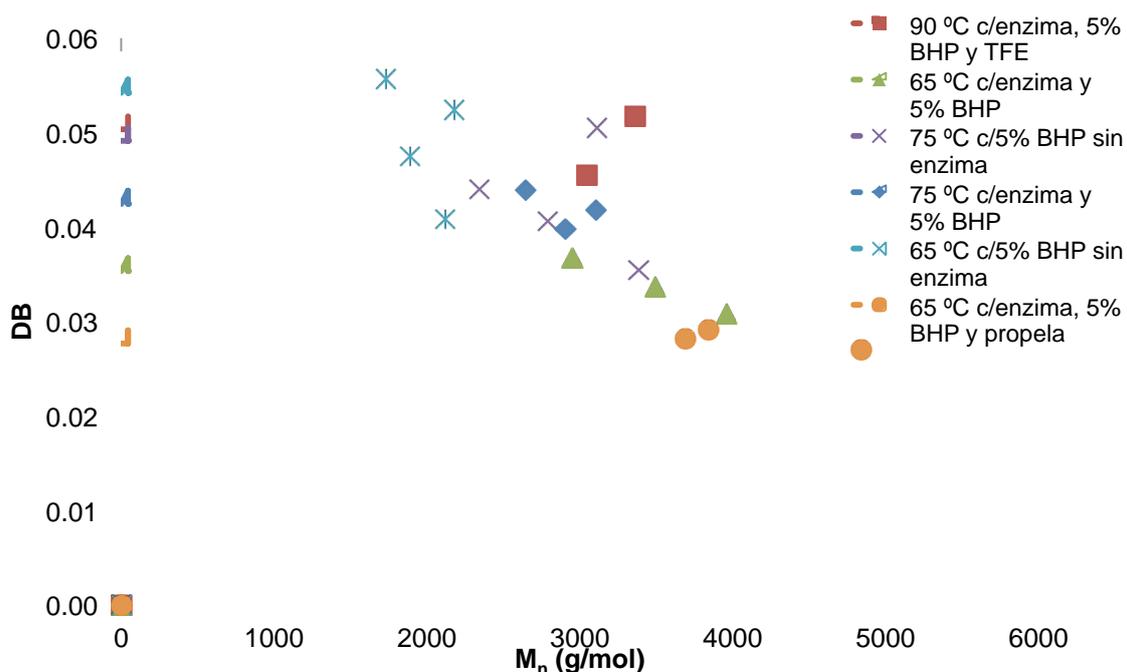
En la Gráfica 5.7.1 se observa el porcentaje total de BHP incorporado a las macromoléculas. Si se desea ver la proporción molar de este co-monómero que se encuentra en la molécula como sitio de ramificación es necesario calcular el grado de ramificación con la ecuación descrita en la metodología en el apartado 4.9.1.



Gráfica 5.7.2 Comparación del DB de los co-polímeros obtenidos.

Al analizar los resultados obtenidos del DB, se observa que todas las reacciones realizadas en masa presentan un comportamiento similar, en el cual el grado de ramificación se mantiene prácticamente constante a lo largo de toda la reacción con una variación entre 0.03 y 0.05 aproximadamente. Esto indica que el BHP se incorpora a una velocidad constante durante toda la reacción y no actúa como reactivo limitante. Al parecer, existe un error experimental en la síntesis de 36 horas del poliéster obtenido enzimáticamente a 90 °C utilizando TFE como medio de reacción. Si se deja de tomar en cuenta dicho punto, la tendencia del DB para todos los materiales sería el mismo.

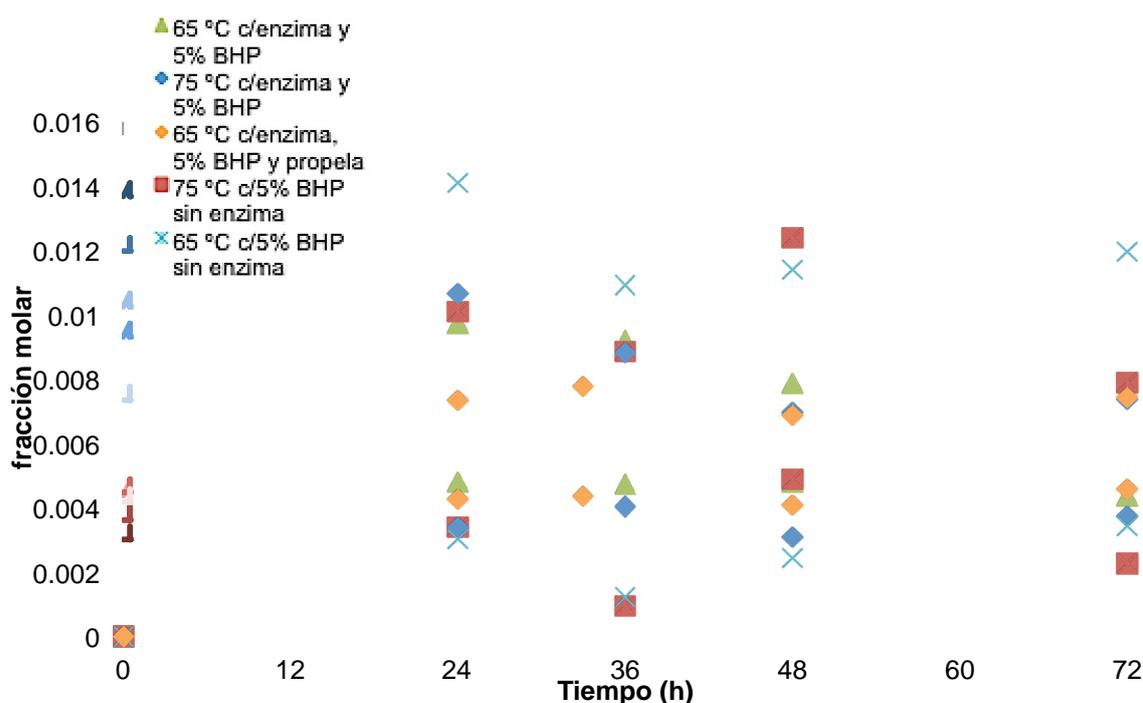
Nuevamente se aprecia que los co-polímeros obtenidos sin enzima son ligeramente más ramificados, así mismo, se observa que los materiales de mayor peso molecular son los que menor DB presentan. Esta información se observa en la Gráfica 5.7.3, la cual muestra la relación entre el Mn y el DB de los materiales obtenidos hasta el máximo Mn respecto al tiempo para cada condición.



Gráfica 5.7.3 Relación entre DB y MN de los co-polímeros obtenidos.

Dado que los materiales más ramificados fueron sintetizados en ausencia de enzima y los co-polímeros de mayor peso molecular fueron obtenidos al utilizar la lipasa, estos resultados indican que la ruta química es la encargada de incorporar las ramificaciones en el co-polímero, mientras que la ruta enzimática aumenta la longitud las cadenas.

Por otro lado, se calcularon las fracciones molares de BHP que se incorporan a la macromolécula como co-monómero y como centro de ramificación. Esto nos ayuda a entender de mejor manera la estructura de los materiales obtenidos.



Gráfica 5.7.4 Tipo de inserción del BHP en las macromoléculas; Azul: BHP insertado como centro de ramificación; Rojo: BHP insertado como co-monómero lineal.

La Gráfica 5.7.4 muestra la tendencia del tipo de inserción del BHP en todos materiales. Se observa que desde las 24 h el BHP se presenta en mayor proporción como centro de ramificación que como co-monómero lineal. Es probable que la lipasa tienda a reconocer más fácilmente moléculas poco polares durante la síntesis de los materiales (monómero cíclico). Recordemos que este tipo de enzimas se encargan de llevar a cabo la hidrólisis de ácidos grasos. El BHP es una molécula mucho más polar y difícilmente podría ser reconocida como sustrato por la lipasa. Esto podría explicar la tendencia observada en el porcentaje y tipo de inserción de dicho co-monómero.

6. Conclusiones

Se llevó a cabo exitosamente la síntesis enzimática de co-polímeros hiperramificados a partir de δ -VL y BHP. Se obtuvieron mayores pesos moleculares que aquellos alcanzados en reportes anteriores que utilizan fluidos comprimidos y monómeros similares.

Se encontraron las condiciones óptimas de reacción a un tiempo de 48 h, una temperatura de 65 °C y agitación constante mediante una propela, obteniendo un peso molecular máximo de 4800 g/mol y un DB de 0.035.

Se observaron 4 factores que impactan de manera importante la polimerización: el tiempo de reacción, la producción de agua durante la reacción, la temperatura de reacción y la transferencia de masa.

Se encontró evidencia de que el sistema reaccionante polimeriza mediante dos rutas no exclusivas y simultáneas, una enzimática y otra química presumiblemente mediada por ácido (BHP), aunque también podría ser catiónica.

7. Trabajo futuro

Dado que el agua producida durante la reacción es un factor que limita la polimerización enzimática, llevar a cabo reacciones en condiciones de vacío o en condiciones de control del agua producida en las sucesivas condensaciones podría aumentar los rendimientos y los pesos moleculares.

Llevar a cabo polimerizaciones en TFE líquido como medio de reacción utilizando una propela para agitar, podría mejorar los resultados de la reacción en el fluido comprimido.

Llevar a cabo pruebas de solubilidad en TFE con agitación mejorada, ya que una mejor agitación podría disminuir la temperatura de solubilidad del BHP.

Llevar a cabo reacciones variando la concentración de BHP, es posible que al aumentar el BHP en la reacción aumente el grado de ramificación.

8. Referencias

1. Shiro, B. "Review Lipase-catalyzed polyester synthesis A green polymer chemistry". *Proc. jpn. Acad* **86**, 338–365 (2010).
2. Namekawa, S. y Suda, S. "Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic aspects". *Int. J.* **25**, 145–151 (1999).
3. López Luna, A., Gallegos, J. L., Gimeno, M., Vivaldo-lima y E. Bárzana, E. "Enzymatic Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media". *J. Mol. Catal. B Enzym.* **67**, 143–149 (2010).
4. Williams, D. F. "On the nature of biomaterials". *Biomaterials* **30**, 5897–909 (2009).
5. Williams, D. F. "On the mechanisms of biocompatibility". *Biomaterials* **29**, 2941–53 (2008).
6. Jérôme, C. y Lecomte, P. "Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization" *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1056–76 (2008).
7. Nair, L. S. y Laurencin, C. T. "Biodegradable polymers as biomaterials". *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
8. Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X. y Jing, X. "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application". *Prog. Polym. Sci.* **37**, 237–280 (2012).
9. Chandra, R. y Rustgi, R. "Biodegradable polymers". *Prog. Polym. Sci* **23**, 1273–1335 (1998).
10. Cao, H. *et al.* "Biocatalytic Synthesis of Poly(δ -Valerolactone) Using a Thermophilic Esterase from *Archaeoglobus fulgidus* as Catalyst". *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12232–41 (2012).
11. Furuhashi, Y., Sikorski, P., Atkins, E., Iwata, T. y Doi, Y. "Structure and morphology of the aliphatic polyester poly(-valerolactone) in solution-grown, chain-folded lamellar crystals. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **39**, 2622–2634 (2001).
12. Nuyken, O. y Pask, S. "Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers (Basel)*". **5**, 361–403 (2013).
13. Labet, M. y Thielemans, W. "Synthesis of polycaprolactone: a review". *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484–504 (2009).

14. Zaks, a y Klivanov, a M. "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3192–6 (1985).
15. Kobayashi, S. y Makino, A. "Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry". *Chem. Rev.* **109**, 5288–353 (2009).
16. Kobayashi, S. "Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones by Lipase Catalyst: Mechanistic Aspects". *Macromol. Symp.* **240**, 178–185 (2006).
17. Chen, B. *et al.* "Candida antarctica lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis". *Biomacromolecules* **9**, 463–71 (2008).
18. Matsumura, S. "Enzymatic synthesis of polyesters via ring-opening polymerization". *Enzym. Synth. Polym.* **194**, 95–132 (2006).
19. Kobayashi, S., Uyama, H. y Kimura, S. "Enzymatic polymerization". *Chem. Rev.* **101**, 3793–818 (2001).
20. Corr, S. "1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent". *J. Fluorine Chem.* **118**, 55–67 (2002).
21. Brodman, E. y Cohen, G. "Polymer Synthesis Using Hydrofluorocarbon Solvents. 1. Synthesis of Cross-Linked Polymers by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane". *Bull. Med. Libr. Assoc.* **35**, 18–21 (1966).
22. Yu, G., Xue, Y., Xu, W., Zhang, J. y Xue, C. H. "Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a)". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 793–798 (2007).
23. Hölter, D., Burgath, A. y Frey, H. "Degree of branching in hyperbranched polymers". *Acta Polym.* **48**, 67–76 (1997).
24. Velthoen, I. W., Dijkstra, P. J. y Feijen, J. "AB 2 Functional Polyesters via Ring Opening Polymerization: Synthesis and Characterization". *Macromol. Chem. Phys.* **210**, 689–697 (2009).
25. Dubois, P., Coulembier, O. y Raquez, J. M. "Handbook of Ring-Opening Polymerization". *John Wiley & Sons.* 2009. 1–45.