



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**“INJERTO DE
D,L-LACTIDA SOBRE QUITOSANO MEDIANTE
POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

Q. Rodolfo Jesús Romero Aragón

TUTOR PRINCIPAL

DR. RICARDO VERA GRAZIANO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DR. ANTONIO MARTÍNEZ RICHA

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

MÉXICO, D. F., SEPTIEMBRE 2015



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	Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua
PRIMER VOCAL	Dr. Ricardo Vera Graziano
SEGUNDO VOCAL	Dra. Lioudmila Fomina
TERCER VOCAL	Dr. Humberto Vázquez Torres
SECRETARIO	Dr. Miquel Gimeno Seco

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, Laboratorio C-202.

División de Ciencias Naturales y Exactas, Facultad de Química, UG, laboratorio de polímeros.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Ricardo Vera Graziano

SUSTENTANTE

Q. Rodolfo Jesús Romero Aragón

Dedicatoria

Dedicada a cada uno de los seres divinos que me he encontrado en esta hermosa vida y que me han compartido un poco de su sabiduría infinita.

Gracias a todos

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y la mente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la maestría realizada.

Al personal académico, administrativo y personas restantes que laboran en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). A la coordinación y posgrado en Ciencia e Ingeniería en Materiales (UNAM), María Isabel Gómez Romero, María Luisa Reséndiz B., Lic. Esther Carrillo Espinosa, Diana Elizabeth Arias Calzadilla y al Dr. Heriberto Pfeiffer Perea.

Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado durante mi estancia académica en este posgrado.

PAPIIT

CONACYT SENER HIDROCARBUROS 117373

Al Dr. Ricardo Vera Graziano, por sus aportes y enseñanzas como director de esta investigación

Al Dr. Antonio Martínez Richa, por sus consejos, ser parte de mi comité tutor y permitirme hacer una estancia en su laboratorio en la Universidad de Guanajuato (UG).

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, por sus consejos, ser parte de mi comité tutor y su buena disposición.

Al distinguido jurado Dra. Sofía Guillermina Burillo, Dr. Ricardo Vera, Dra. Lioudmila Fomina, Dr. Humberto Vázquez y Dr. Miquel Gimeno que se tomaron el tiempo y la dedicación de revisar este trabajo.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda por su apoyo, consejos y amistad, que fue una parte fundamental para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres por escucharme y orientarme en este trayecto.

A la Q. Odemaris y el departamento de química analítica de la UG, a la QFB. Damaris Cabrero, al IQ. Gerardo Cedillo Valverde.

Al grupo de investigación: Dr. Ricardo Vera Graziano, Dr. Filiberto Rivera, Dr. Alfredo Maciel Cerda, Dr. Raúl Montiel, Alida, Ulises, Lauro, Aurora, Selene, Lizeth, Andrómeda, Marissa, Daniela, Josué, Amnon, Angélica, Andrés y Paty.

A mis compañeros y amigos del posgrado: Abril, Gloria, Mayra, Karen, Raziel, Eduardo, Leonel y Rafa.

A mi madre Rosa María, a mis hermanos Rogelio y Rosario, a mi abuelita Esperanza, a mi futuro sobrino, a mi familia y brothers: César, David, Jesús, José, Laura, Lucero, Mónica, Marisol y Raziel.

A mi madre adoptiva Rocío Martínez por adoptarme como su hijo y abrirme las puertas de su hogar y su corazón.

A mi maestra Carmen Marcela Guilbert Contreras por su amistad, todas sus enseñanzas, apoyo y consejos.

A todas las personas que hicieron posible este gran proyecto.

Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
General.....	4
Particulares.....	4
Hipótesis.....	4
Capítulo 1. Generalidades y Antecedentes.....	5
1.1 Biomateriales.....	5
1.2 Biopolímeros.....	6
1.3 Piel: estructura y composición.....	7
1.3.1 Epidermis.....	8
1.3.2 Dermis.....	8
1.3.3 Hipodermis.....	9
1.4 Quitina y Quitosano.....	9
1.4.1 Obtención de quitosano.....	10
1.4.2 Síntesis de quitosano.....	11
1.4.2.1 Método químico.....	11
1.4.2.2 Método biológico.....	11
1.4.3 Propiedades fisicoquímicas.....	11
1.4.4 Propiedades biológicas.....	12
1.5 Poli(ácido láctico).....	13
1.5.1 El ácido láctico.....	13
1.5.2. Lactida.....	14
1.5.3 Síntesis del poli(ácido láctico).....	14
1.5.4 Polimerización por apertura de anillo.....	15
1.5.5 Mecanismo de coordinación-inserción.....	16
1.5.6 Catalizadores utilizados en la polimerización por apertura de anillo de lactida.....	17
1.5.7 Polimerización enzimática.....	18
1.5.7.1 Lipasa <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
1.5.8 Propiedades del poli(ácido láctico).....	20
1.6 Consideraciones de diseño de materiales para regenerar la piel.....	21
1.7 Modificación del quitosano.....	21
1.8 Estado del arte.....	23
Capítulo 2. Materiales y Metodología.....	28
2.1 Materiales.....	28
2.2 Síntesis del copolímero de injerto de lactida en quitosano.....	29
2.3 Caracterización de los copolímeros.....	30

2.3.1 Espectroscopía en el infrarrojo (FTIR-ATR)	30
2.3.2 Resonancia magnética nuclear de ¹³ C RMN CP-MAS y ¹ H RMN	31
2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	31
2.3.4 Calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC)	31
Capítulo 3. Resultados y Análisis	32
3.1 Síntesis de copolímero quitosano-g-polilactida (QL)	32
3.2 Estructura por espectroscopía en el infrarrojo (FTIR-ATR)	34
3.3 Estructura por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	37
3.3.1 ¹³ C RMN CP-MAS.....	37
3.3.2 Estructura del copolímero de injerto por ¹ H RMN Gel.....	41
3.4 Transiciones térmicas por calorimetría diferencia de barrido modulado (MDSC).	42
3.5 Degradación térmica por termogravimetría (TGA).....	45
Capítulo 4. Conclusiones	51
Perspectivas.....	53
Referencias.....	54
Apéndice.....	60

Índices de tablas y figuras

Tabla 1. Polímeros sintéticos biodegradables	6
Tabla 2. Catalizadores que se usan en la síntesis de poli(ácido láctico). [33, 34].....	17
Tabla 3. Quitosanos modificados reportados en la literatura. [43-46]	22
Tabla 4. Proporciones del copolímero de injerto de lactida y quitosano.....	29
Tabla 5. Análisis gravimétrico de la reacción de injerto.	33
Tabla 6. Bandas de absorción en el infrarrojo del quitosano.	34
Tabla 7. Bandas de absorción en el infrarrojo de PLA.	35
Tabla 8. Desplazamientos químicos de ¹³ C RMN CP-MAS del quitosano.....	38
Tabla 9. Desplazamientos químicos en ¹³ C RMN CP-MAS del copolímero de injerto QLE.	39
Tabla 10. Transiciones relevantes y entalpías de los copolímeros de injerto determinadas por MDSC	44
Tabla 11. Porcentaje de PLA injertado en quitosano por termogravimetría.	50
Tabla 12. Bandas de absorción en el infrarrojo de lactida.	60
Figura 1. Representación esquemática de la piel. [9].....	8
Figura 2. Estructura de la quitina y del quitosano.....	10
Figura 3 Enantiómeros del ácido láctico	13
Figura 4. Estereoisómeros de la lactida.....	14
Figura 5. Métodos de síntesis para la obtención de poli(ácido láctico) de alto peso molecular..	15
Figura 6 Polimerización por apertura de anillo, mecanismo de coordinación-inserción. [7].....	16
Figura 7. Mecanismo de polimerización enzimática. [36]	19
Figura 8. Reacción de la copolimerización de injerto de lactida sobre quitosano.....	32
Figura 9. Espectro en el infrarrojo del quitosano.	34
Figura 10. Espectro en el infrarrojo del poli(ácido láctico).....	35
Figura 11. Espectros en el infrarrojo del Quitosano, PLA e injerto de quitosano-PLA (QL 1:15).	36
Figura 12. Espectro en el infrarrojo de los copolímeros de injerto catalizados con enzima YLL.	37
Figura 13. Espectro de ¹³ C RMN CP-MAS del quitosano.	38
Figura 14. Espectro de ¹³ C RMN CP-MAS del copolímero de injerto QLE 1:15. (*bandas laterales de rotación)	39
Figura 15. Espectros de RMN ¹³ C CP-MAS de a) quitosano, de los copolímeros injerto sintetizados, b) sin catalizador, c) con enzima YLL y d) con SnOct ₂	40
Figura 16. Espectro de ¹ H RMN de quitosano. [51].....	41
Figura 17. Espectros de ¹ H RMN en gel, DMSO-d ₆ , de los copolímeros sintetizados a) sin catalizador, b) con octoato de estaño y c) con enzima YLL.	42
Figura 18. Termogramas MDSC de los copolímeros QL, QLE y QLS todos con la proporción 1:15 quitosano:lactida.	43
Figura 19. Termograma DSC del PLLA.....	43
Figura 19. Termograma de TGA y DTG del PLA.	45
Figura 20. Termograma de TGA y DTG del quitosano.	46
Figura 21. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:15 sin el uso de catalizador.	47
Figura 22. Termograma TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:15 sintetizado con enzima YLL.	48

Figura 23. Termograma TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:15 sintetizado con Sn(Oct) ₂	49
Figura 24. Termogramas TGA y DTG de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador (QL).....	49
Figura 25. Espectro en el infrarrojo de lactida.	60
Figura 26. Espectros en el infrarrojo de las materias primas a) lactida, b) PLA y c) quitosano .	61
Figura 27. Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15.....	61
Figura 28 Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados con catalizador enzimático YLL con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15	62
Figura 29. Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados con catalizador octoato de estaño con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15.....	62
Figura 30. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d ₆) del copolímero QL.....	63
Figura 31. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d ₆) del copolímero QLS.....	63
Figura 32. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d ₆) del copolímero QLE	64
Figura 34. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QL con proporción 1:5 y 1:15.....	64
Figura 35. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QLE con proporción 1:5 y 1:15.....	65
Figura 36. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QLS con proporción 1:5 y 1:15.....	65
Figura 37. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:5	66
Figura 38. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:10.....	66
Figura 39. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:15	67
Figura 40. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:5.....	67
Figura 41. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:10.....	68
Figura 42. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:15.....	68
Figura 43. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:5.....	69
Figura 44. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:10.....	69
Figura 45. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:15.....	70
Figura 46. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador.....	70
Figura 47. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador.....	71
Figura 48. Termograma de las DTG de los copolímeros de injerto sintetizados con enzima YLL	71
Figura 49. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados con octoato de estaño.....	72
Figura 50. Termograma de las DTG de los copolímero de los injertos sintetizados con octoato de estaño.....	72

Resumen

La ingeniería de tejidos requiere de nuevas rutas de síntesis para obtener polímeros biocompatibles que promuevan la regeneración de tejidos que han sido dañados. En este trabajo se buscó una nueva ruta de reacción a través de una enzima para catalizar la reacción de injerto de la lactida sobre quitosano.

El objetivo de este trabajo fue preparar el copolímero quitosano-injerto-polilactida (QL) mediante el método de polimerización por apertura de anillo de lactida. Se realizó la síntesis usando como catalizador organometálico octoato de estaño y con el biocatalizador enzimático de lipasa *Yarrowia Lipoyitica*.

La estructura del copolímero fue determinada por las técnicas de espectroscopía al infrarrojo, resonancia magnética de carbono en sólido y de protón en gel. Las propiedades térmicas fueron determinadas por termogravimetría y calorimetría de barrido diferencial modulado. El porcentaje de injerto, eficiencia, incorporación y rendimiento se determinó de manera gravimétrica.

El injerto de lactida se llevó a cabo tanto en los grupos hidroxilos como en los grupos amino de la estructura del quitosano. El mayor injerto se logró en la reacción donde se utilizó el biocatalizador, las cadenas más largas se lograron con el octoato de estaño y el injerto fue menor sin el uso de catalizador. A medida que se aumentó la proporción entre el quitosano y la lactida el porcentaje de injerto aumenta. Este material puede tener potencial aplicación en la obtención de andamios para la regeneración de la piel, debido a sus características que mimetizan las funciones de la matriz extracelular y a que no contiene catalizador metálico.

Introducción

Entre las causas frecuentes y graves de daños a la piel se encuentran las quemaduras. Las quemaduras de segundo y tercer grado dañan la capa externa e interna de la piel, éstas últimas son más profundas y por lo tanto más difíciles de tratar debido a que no solo causan daños severos a la piel, sino también a los tejidos que se encuentran debajo de ella, como los músculos. Los tratamientos son a través de injertos de tejidos humanos o un material que mimetice la matriz extracelular de este tejido.

El quitosano y el poli(ácido láctico) son polímeros biodegradables y biocompatibles que se utilizan en diversos materiales para la regeneración de cartílago, piel y hasta hueso. El quitosano presenta propiedades de bioactividad que ayuda al crecimiento de las células, además de ser un bactericida, lo cual es muy apropiado para el tratamiento de las quemaduras, debido a que la piel está expuesta al medio ambiente y se debe proteger de agentes patógenos.

En los métodos convencionales de síntesis para la polimerización del poli(ácido láctico), PLA, se utilizan catalizadores de estaño, los cuales no se pueden eliminar por completo, y puede causar daños. Por ello, se propuso en este trabajo la síntesis del copolímero quitosano-g-polilactida, Q-g-PLA, por medio de un catalizador enzimático libre de metales pesados (lipasa *Yarrowia Lipolytica*) que se pueden utilizar en la regeneración de tejidos, en este caso piel.

Se pretende sintetizar un material cuya estructura y composición mimetice las funciones de la matriz extracelular, para que tenga la capacidad de promover la regeneración de la piel. Además el Q-g-PLA obtenido mediante copolimerización por injerto, conserva las propiedades biológicas del quitosano y mejora sus propiedades mecánicas con injerto del PLA. Una posible aplicación es utilizarlo como un apósito, que cubra las heridas por quemaduras.

Este trabajo de tesis se organiza de la siguiente manera. El capítulo I, Generalidades y Antecedentes, menciona conceptos básicos como biopolímeros biodegradables como quitina, quitosano y su obtención, además del ácido láctico, su dímero y polímero y el estado del arte. El capítulo II, presenta la descripción de los materiales y el procedimiento experimental, así como las técnicas utilizadas para la caracterización del copolímero de

injerto de quitosano y PLA. El capítulo III, discute y muestra los resultados de las técnicas de caracterización del copolímero. En la sección final se discuten las conclusiones y perspectivas.

Objetivos

General

Sintetizar y caracterizar el copolímero quitosano-g-polilactida, Q-g-PLA, mediante la reacción por apertura de anillo de lactida usando como catalizador (a) octoato de estaño (SnOct_2), y (b) un biocatalizador enzimático obtenido de lipasa de *Yarrowia lipolytica*.

Particulares

- ✓ Determinar los efectos de los siguientes catalizadores en la síntesis del copolímero Q-g-PLA por apertura de anillo mediante tres rutas: sin catalizador, con catalizador de estaño (SnOct_2) y con biocatalizador enzimático de lipasa de *Yarrowia lipolytica*.
- ✓ Caracterizar la estructura química del quitosano y de los copolímeros Q-g-PLA con apoyo de las técnicas de FTIR-ATR, ^1H RMN y ^{13}C RMN CP-MAS.
- ✓ Caracterizar las propiedades térmicas del quitosano y de los copolímeros Q-g-PLA mediante MDSC y TGA

Hipótesis

La síntesis del copolímero entre el quitosano y la lactida se llevará a cabo por la apertura de anillo de la lactida, a través de un biocatalizador enzimático de lipasa de *Yarrowia lipolytica*, injertándose en los grupos funcionales amino e hidroxilo del quitosano, en dimetil formamida.

Capítulo 1.

Generalidades y Antecedentes

1.1 Biomateriales

Según Williams (1987) un biomaterial se define como un “material interactivo” que no es un alimento ni un fármaco, está contenido en un sistema terapéutico capaz de establecer una interacción apropiada con el tejido y sus alrededores sin inducir a su huésped a una respuesta adversa. Los biomateriales pueden ser polímeros, cerámicos, metales o materiales compuestos.[1]

Un biomaterial es un material sintético, que no produce efectos adversos en el organismo cuando se pone en contacto con tejidos vivos y líquidos fisiológicos; puede emplearse para evaluar, tratar, aumentar, completar o reemplazar un órgano o un tejido vivo; se diferencia de un material biológico en que este es producido por un sistema biológico, aunque este puede tratarse para ser empleado como biomaterial. [2]

La biocompatibilidad es la propiedad más importante de los biomateriales, se define como la capacidad de un material de actuar sobre un huésped, con el objetivo de generar una respuesta apropiada para una aplicación específica.[3]

Generalidades y Antecedentes

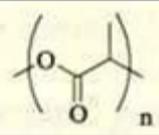
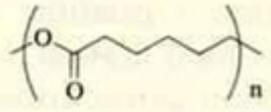
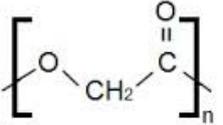
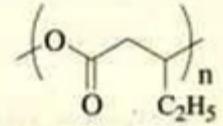
1.2 Biopolímeros

Los polímeros biocompatibles pueden ser biodegradables o no biodegradables. Ambos pueden ser naturales y sintéticos. Son ejemplos de polímeros naturales el colágeno/gelatina, poliaminoácidos, elastina, albúmina, fibrina, celulosa, almidón, quitina, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, ácido algínico, heparina, queratina y poli(hidroxi-butirato). Al ser naturales poseen una mayor afinidad por las células, además algunos de éstos polímeros tienen las características de tener una estructura y composición similar a la matriz extracelular, mimetizando a ésta para la sustitución de tejidos.[4, 5]

Los polímeros sintéticos (Tabla 1) que más se utilizan en estas aplicaciones son: poliglicolida, polilactida, polidioxanona, poli(ϵ -caprolactona), poli(lactida-co-glicolida), poli(trimetilen carbonato), poli(ésteres uretano), poli(ésteres amida), poli(orto ésteres), polianhídridos, poli(anhídrido-co-imida), poli(fumarato propileno), poli(acril cianoacrilatos), polifosfacenos y polifosfoésteres.[5-7]

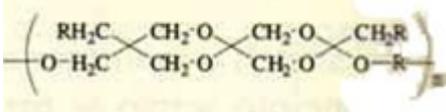
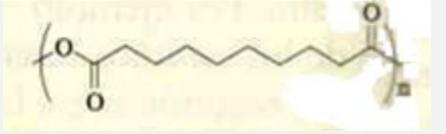
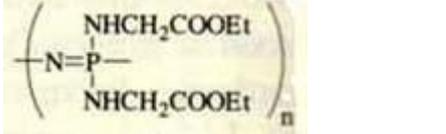
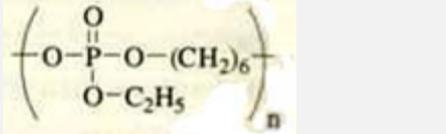
Los biopolímeros pueden presentar características importantes como procesabilidad, esterilizabilidad, propiedades mecánicas y ópticas, bioestabilidad o biodegradabilidad, permeabilidad, apariencia y un costo adecuado. [3, 5]

Tabla 1. Polímeros sintéticos biodegradables

Poli(ácido láctico)	
Poli(ϵ-caprolactona)	
Poli(ácido glicólico)	
Poli(β-hidroxibutirato)	

Capítulo 1

Tabla 1. Polímeros sintéticos biodegradables (continuación)

Poli(orto éster)	
Poli(anhídrido sebácico)	
Polifosfaceno	
Poli(fosfaceno éster)	

1.3 Piel: estructura y composición

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con un área superficial aproximada de 1.8 m², el cual representa el 16 % de total de la masa corporal. Tiene muchas funciones, la más importante es actuar como una barrera que proteja al cuerpo de agentes externos nocivos, manteniendo el sistema interno intacto e hidratado. La piel está compuesta de tres capas: dermis, epidermis e hipodermis, como se muestra en la Figura 1. [8]

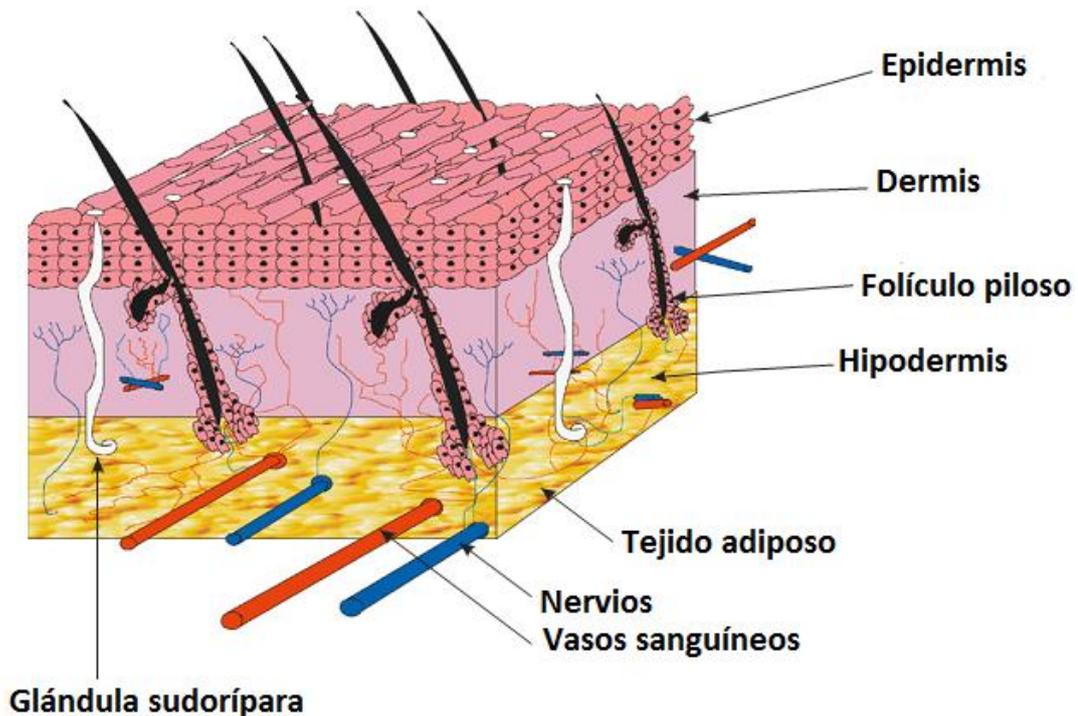


Figura 1. Representación esquemática de la piel. [9]

1.3.1 Epidermis

La epidermis, la capa exterior de la piel, se define como epitelio escamoso estratificado con espesor que varía de 0.1 mm hasta 1.4 mm, con una capa externa de células muertas. Estas células son destruidas y reemplazadas constantemente por la afluencia de nuevas células desde el interior. Está compuesta principalmente de células llamadas queratinocitos que producen queratina. En la parte más interna de la epidermis se produce el pigmento melanina. [8]

1.3.2 Dermis

La dermis se define como una matriz de tejido conectivo de soporte duro, con un espesor que varía de 0.6 a 6 mm, compuesta por una red de colágeno, fibras elásticas, glicosaminoglicanos (GAG), nervios, grasas, vasos sanguíneos, dentro de esta, se encuentran contenidas las bases de las glándulas sudoríparas y de los folículos pilosos. Su función es proveer a la epidermis de nutrientes y resistencia mecánica. La dermis

Capítulo 1

contiene fibroblastos que sintetizan colágeno, elastina, tejido conectivo y GAG. Los dendrocitos se encargan de defender al organismo de posibles infecciones.[8]

1.3.3 Hipodermis

La hipodermis también se conoce como subcutis o tejido subcutáneo, es la capa más interna y gruesa de la piel de hasta 3 cm en el abdomen. Es la red de tejido conectivo cuyos espacios se rellenan con los adipocitos, éstas son células específicas de almacenamiento de grasa que rellenan los espacios de esta red. Las mujeres tienen más adipocitos en la hipodermis que los hombres. Los adipocitos suplen de energía, aíslan y también protegen contra posibles daños. [8]

1.4 Quitina y Quitosano

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en el planeta, después de la celulosa, y el primero en identificarla fue el químico francés Braconnot en 1811. La quitina es un homopolímero lineal denominado poli(β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina), presente principalmente en el reino animal. Es sintetizado por un gran número de organismos como los crustáceos, que está presente en sus caparazones en forma de microfibrillas cristalinas y forman una estructura compleja entre proteínas, minerales y lípidos. [10-12]

El quitosano es el principal derivado de la quitina, descubierto por Rouget en 1859, es un copolímero lineal de β -(1,4)-2-acetamida-D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopiranososa, este último es su mayor componente. [11, 13] Hasta el momento no hay una nomenclatura oficial para diferenciar la quitina del quitosano. Sin embargo, se usa el grado de acetilación presente en las cadenas del polímero para diferenciarlos, si el porcentaje de acetilación es mayor a 50% se llama quitina y si es menor al 50% se llama quitosano (Figura 2). [14]

Generalidades y Antecedentes

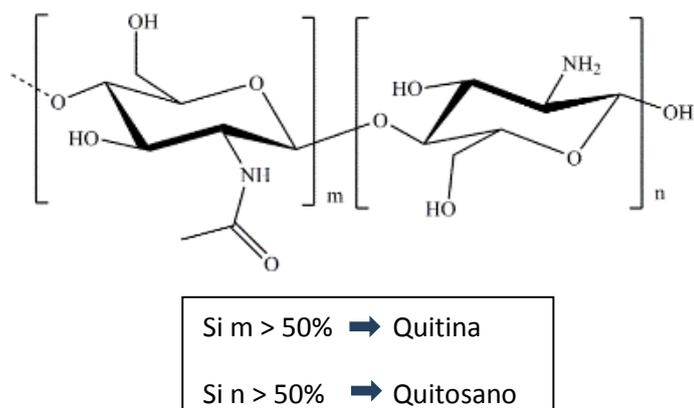


Figura 2. Estructura de la quitina y del quitosano

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en exoesqueletos de crustáceos, como cangrejos, camarones, insectos, en las paredes celulares de bacterias, hongos, etc. [15]. Por lo tanto los desechos marinos son la materia prima para la obtención de este biopolímero, anualmente se desechan toneladas de este material, lo que lo convierte en un problema ambiental. Si este desecho se transformara en quitosano, sería posible darle una función benéfica, y de esta forma se transformaría de basura a un biopolímero con potencial uso biomédico, y así sintetizar los diferentes derivados de la quitina, en especial el quitosano.

1.4.1 Obtención de quitosano

La quitina se obtiene a partir de desechos marinos como las cáscaras de camarón y crustáceos, en México se produjeron 146, 605 toneladas de camarón en 2012 (CONAPESCA, 2012), de los cuales alrededor del 35 a 45% es desperdicio. Esto se convierte en un problema ambiental, este recurso se podría aprovechar, pero solo se le da uso a una pequeña parte de esta materia prima. [16]

Capítulo 1

1.4.2 Síntesis de quitosano

1.4.2.1 Método químico

La quitina se desacetila en medio alcalino por dos métodos químicos, homogéneo y heterogéneo, los cuales se diferencian por el tipo de condiciones de reacción. En el primer método se usan temperaturas bajas y tiempo prolongados de reacción, lo que produce una desacetilación homogénea, por otra parte, en el método heterogéneo las condiciones son a mayor temperatura y menor tiempo, de esta forma se logra una desacetilación no uniforme, ya que en las zonas cristalinas es más difícil que se lleve a cabo la desacetilación. [17]

1.4.2.2 Método biológico

Una alternativa o complemento al método químico es el uso de enzimas quitina desacetilasas. Estas favorecen el proceso de desacetilación, para que sea controlado y no se degrade la cadena polimérica, con lo que se aumenta la cristalinidad del quitosano. [18, 19]

1.4.3 Propiedades fisicoquímicas

Se conocen tres polimorfos de la quitina, denominados α , β y γ . La α -quitina es la estructura más común y corresponde a una celda ortorrómbica compacta compuesta de láminas alternadas de cadenas del polímero en paralelo y antiparalelo [12]. Los polimorfos β y γ tienen una celda monoclinica, la β -quitina se extrae de las paredes celulares de las diatomeas y la γ -quitina se extrae del estómago del calamar de la especie *Loligo*. [20]

Las propiedades fisicoquímicas dependen principalmente de su peso molecular y el grado de acetilación presente en la cadena. La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, pero se puede disolver en hexafluoroacetona, hexafluoroisopropanol, N,N-dimetilacetamida con sales inorgánicas como cloruro de litio del 5 a 8 % o tiocianato de litio, en ácido trifluoroacético, etc. En cambio, el quitosano es

Generalidades y Antecedentes

insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos puros, pero, es soluble en ácidos orgánico e inorgánicos diluidos. [21]

1.4.4 Propiedades biológicas

Los estudios sobre quitina y quitosano han sido más intensos desde 1990 porque estos polisacáridos muestran excelentes propiedades biológicas, de degradación en el cuerpo humano, inmunológicas, antibacteriales y para curar heridas. En recientes estudios se ha encontrado que el quitosano es un buen candidato como material de soporte para la liberación controlada de fármacos, cultivo celular y en ingeniería de tejidos. [22]

La quitina es un biopolímero que tiene baja toxicidad, es inerte en el tracto gastrointestinal y es biodegradable en presencia de quitinasas presentes en bacterias, hongos, plantas y en el sistema digestivo de muchos animales. Las películas y las fibras de quitina presentan aplicaciones médicas y farmacéuticas como material de apósitos y en la liberación controlada de fármacos. La quitina también se utiliza como excipiente y vehículo del fármaco en forma de película, además de presentar propiedades de mucoadhesividad. [23]

El quitosano no es tóxico, es biodegradable, biocompatible, muestra interesantes propiedades farmacéuticas, biológicas y fisiológicas. Presenta bioactividad, promueve la cicatrización de heridas, tiene actividad hemostática, mejora la respuesta inmunológica, también tiene mucoadhesión, provoca respuestas biológicas y tiene actividad antimicrobiana y antitumoral. [23, 24].

El quitosano no presenta efectos adversos después de implantarse en el tejido y por esta razón puede ser usado en diversas aplicaciones biomédicas como sustituto de piel artificial. [25] Debido a que el quitosano tiene una estructura similar a la de los glicosaminoglicanos es por esto que se considera como candidato para sustituir la piel.

Capítulo 1

1.5 Poli(ácido láctico)

1.5.1 El ácido láctico

El ácido láctico es una sustancia que juega un papel muy importante en varios procesos bioquímicos, este es constantemente producido mediante el metabolismo a través del ejercicio físico. El ácido láctico se produce a escala industrial desde finales de los años 90s. Se emplea principalmente en la industria de alimentos, cosméticos y fármacos. [26] Adicionalmente es uno de los precursores monoméricos para la síntesis de poli(ácido láctico).

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico posee un carbón asimétrico que le permite presentar dos configuraciones ópticamente activas (Figura 3). El ácido láctico se obtiene principalmente por fermentación de carbohidratos que son recursos renovables de la biomasa como el maíz y el azúcar de caña, una vez que las macromoléculas son hidrolizadas a dextrosas, se realiza la fermentación con lactobacilos para producir el ácido láctico. [27]

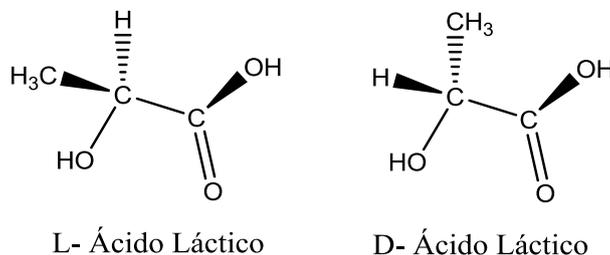


Figura 3 Enantiómeros del ácido láctico

El D-ácido láctico y el L-ácido láctico son productos de bacterias, de ésta forma es como se obtiene a nivel industrial. El L-ácido láctico es producto del metabolismo humano y otros mamíferos. En la policondensación, los porcentajes que se obtienen de los isómeros dependen del ácido láctico empleado como materia prima, temperatura y del catalizador. [7, 28]

Generalidades y Antecedentes

1.5.2. Lactida

La lactida (3,6 dimetil 1,4-dioxano 2,5 diona) es un dímero cíclico deshidratado que se forma mediante la unión de dos moléculas de ácido láctico dando lugar a la L-lactida, D-lactida y meso-lactida (Figura 4). La mezcla de L-lactida y D-lactida se conoce como una mezcla racémica (rac-lactida). [27] Usualmente se sintetiza por la depolimerización a presión reducida del poli(ácido láctico) de bajo peso molecular. Mediante este método se obtiene una mezcla de L-lactida, D-lactida o meso-lactida. [29, 30] Es importante la separación de los estereoisómeros para controlar la estructura final del polímero de alto peso molecular, la cual se basa en las diferencias del punto de ebullición entre ellos. [31]

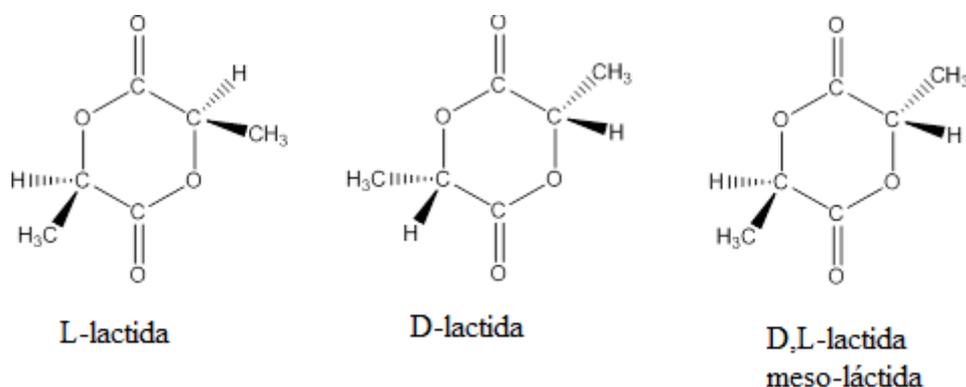


Figura 4. Estereoisómeros de la lactida.

1.5.3 Síntesis del poli(ácido láctico)

La síntesis de poli(ácido láctico) (PLA) se efectúa mediante tres rutas principales (Figura 5). En la policondensación de ácido láctico se obtiene un polímero frágil de bajo peso molecular, oligómeros, poco útiles en aplicaciones biomédicas. La segunda ruta es la destilación azeotrópica del ácido láctico, con esta técnica se pueden obtener polímeros de alto peso molecular sin emplear agentes de acoplamiento. Por último, la polimerización por apertura del anillo del lactida se utiliza para obtener polímeros con altos pesos moleculares, este proceso fue patentado por Cargill (US) en 1992. [7]

Capítulo 1

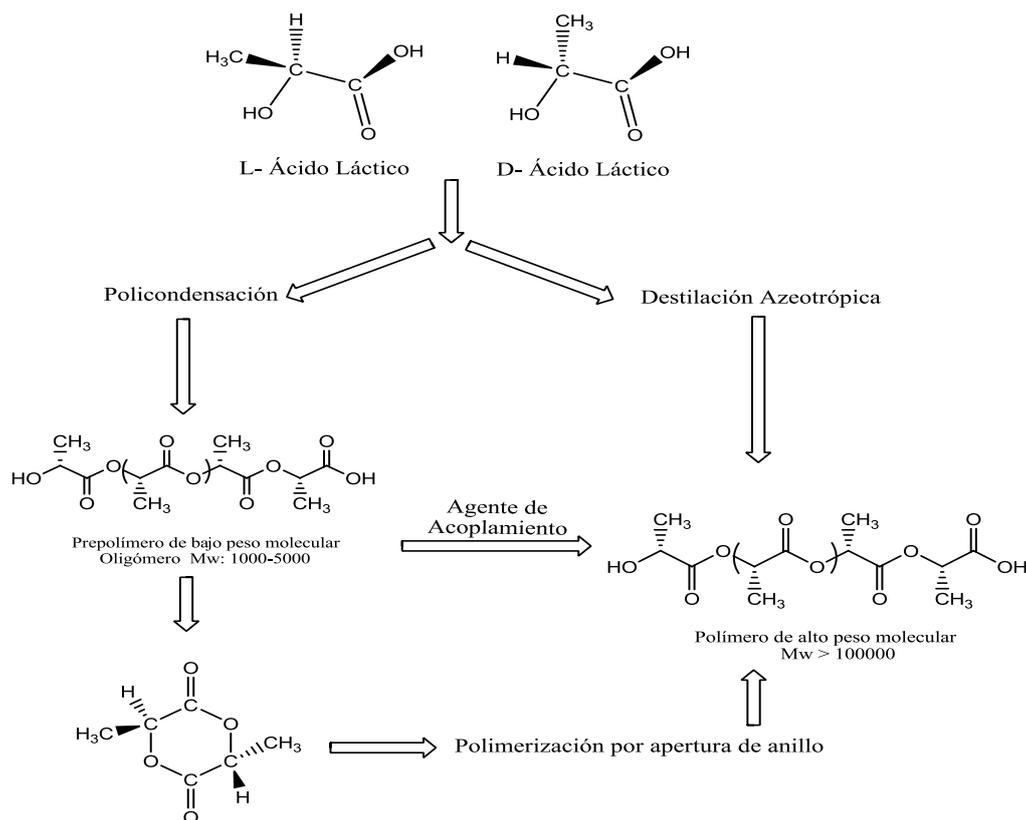


Figura 5. Métodos de síntesis para la obtención de poli(ácido láctico) de alto peso molecular

1.5.4 Polimerización por apertura de anillo

La polimerización por apertura de anillo ocurre por reacciones de transesterificación intramolecular e intermolecular en ausencia de disolvente y en presencia de un catalizador. Esta reacción es estudiada ampliamente debido a la posibilidad de controlar la química y por tanto las propiedades de los polímeros resultantes. Este método se emplea usualmente para la síntesis de polímeros de alto peso molecular con un alto grado de estereoregularidad. Las polilactonas y polilactidas se obtienen exclusivamente mediante esta ruta. La polimerización por apertura de anillo de lactidas se puede clasificar por sus diferentes mecanismos de reacción: Polimerización aniónica, polimerización catiónica, de inserción-coordinación y enzimática. [7]

Generalidades y Antecedentes

1.5.5 Mecanismo de coordinación-inserción

Este mecanismo es el más ampliamente estudiado para la síntesis de poli(ácido láctico) de alto peso molecular. En este método se emplean catalizadores como alcóxidos metálicos, alcóxidos de magnesio, zinc, aluminio, estaño, titanio, zirconio, samario, itrio, metales que poseen orbitales libres p, d o f. Adicionalmente poseen un enlace covalente entre el átomo metálico y el átomo de oxígeno por lo que se comporta como un ácido de Lewis. La primera etapa ocurre cuando uno de los oxígenos exocíclicos del lactida comienza temporalmente a coordinarse con el átomo metálico del iniciador. Esta coordinación incrementa la nucleofilicidad de la parte alcóxida del iniciador y la electrofilicidad del grupo carbonilo del lactida. En la segunda etapa, el enlace acil-oxígeno (enlace entre el grupo carbonilo y el oxígeno endocíclico) del lactida se rompe y se inserta entre el enlace metal-oxígeno del iniciador. La polimerización continúa con la coordinación e inserción de moléculas de lactida (Figura 6). [7]

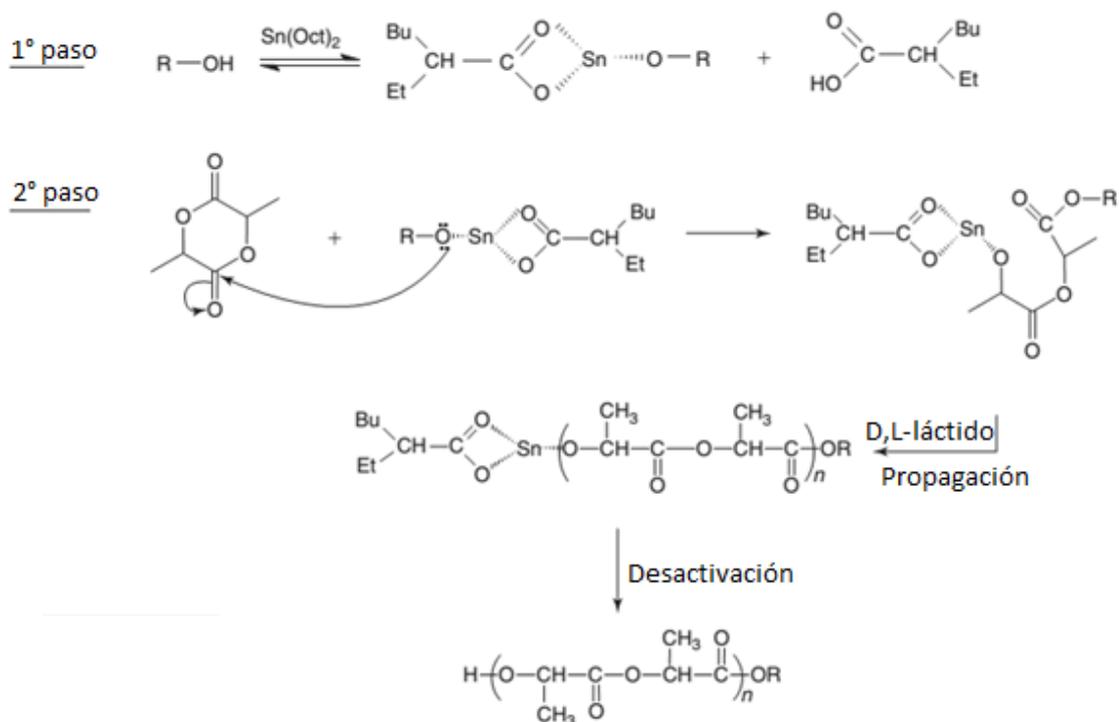


Figura 6 Polimerización por apertura de anillo, mecanismo de coordinación-inserción. [7]

Capítulo 1

1.5.6 Catalizadores utilizados en la polimerización por apertura de anillo de lactida

Un gran número de catalizadores se han estudiado para la polimerización por apertura de anillo de la lactida. Los efectos en las propiedades, como el peso molecular, distribución del peso molecular y racemización del PLA de un gran número de catalizadores para la polimerización por apertura de anillo del lactida se han estudiado ampliamente

Los catalizadores que se usan principalmente para la síntesis del PLA consisten en diferentes polvos metálicos, ácidos de Lewis, bases de Lewis, compuestos organometálicos y diferentes sales de metales. De los anteriores, los compuestos organometálicos son muy efectivos en la síntesis de PLA de alto peso molecular, particularmente alquilmetales. Sin embargo, son tóxicos para su uso como biomateriales.

El SnOct₂ no se elimina completamente por el método de purificación de disolución y precipitación. Sus aplicaciones en biomedicina están muy limitadas porque los compuestos organometálicos del estaño inducen daños en el cuerpo humano. Algunos catalizadores más usados en la síntesis de lactida se muestran en la Tabla 2.

Existe un amplio interés en los biomateriales biodegradables, tanto que se ha puesto en la mira la búsqueda de nuevos catalizadores para la polimerización por apertura de anillo de caprolactona y lactidas. Se buscan métodos alternos para la síntesis de éstos polímeros que no contengan metales pesados, como el uso de nuevos catalizadores como fosfinas y la 4-dimetilaminopiridina (DMAP). [32]

Tabla 2. Catalizadores que se usan en la síntesis de poli(ácido láctico). [33, 34]

Catalizador
Alcóxidos de aluminio
Hierro
Octoato de estaño
Arilóxidos de zinc
Fosfinas

Generalidades y Antecedentes

Tabla 2. Catalizadores que se usan en la síntesis de poli(ácido láctico) (continuación).

Catalizador
Alcóxidos de zinc y magnesio
Cloruro de litio
Oro (I)
Ítrio (III)
Lactato y sales de zinc
Tierras raras
Catalizadores de lipasas
Compuestos de fósforo
Creatinina
Microondas

1.5.7 Polimerización enzimática

Knani *et al.* (1993) y Uyama y Kobayashi (1993) fueron los primeros en reportar la polimerización por apertura de anillo catalizada por enzimas. [35] Namekawa, *et al.* (1999) encontraron que la catálisis mediante lipasas puede inducir la polimerización por apertura de anillo de lactonas no substituidas. Se ha estudiado a las lipasas de las familias de las *Pseudomonas*, *Candida Cylindracea*, *Aspergillus Niger*, *Candida Rugosa*, *Mujor javancius Pseudomonas fluorescens* y *Psudomonas cepacia*, *Rhizopus japonicus* y lipasa pancreática porcina, además de la lipasa B de *Candida antartica* preferentemente en su forma inmovilizada, [36] con las cuales se han obtenido diversos rendimientos, también se encontró que hay influencia tanto del disolvente como de la concentración para algunas lipasas. [37, 38]

La polimerización enzimática por apertura de anillo se puede aplicar como herramienta para la síntesis en la química de polímeros. Las enzimas son biocatalizadores que pueden acelerar una polimerización sin el uso de catalizadores metálicos tóxicos.

La polimerización enzimática presenta ventajas en comparación a la polimerización química como; actuar en condiciones suaves de presión, temperatura y pH. Además de

Capítulo 1

ser específicas, regio y estereoselectivas, con disolventes orgánicos y con diferentes interfaces, se obtienen de recursos renovables, reciclables, no tóxicas, y no dañan al medio ambiente. [38]

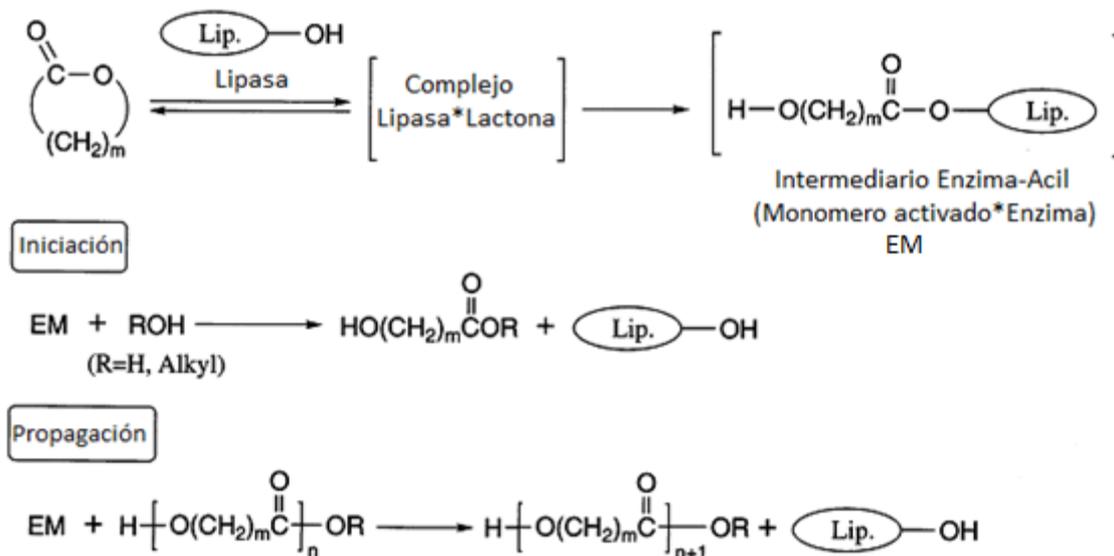


Figura 7. Mecanismo de polimerización enzimática. [36]

En la polimerización enzimática de lactonas catalizadas por lipasas pasan por el intermediario acil-enzima. (Figura 7). El sitio catalítico de las lipasas es un residuo de serina, el primer paso importante de la formación del complejo enzima-lactona por la reacción de apertura de anillo de la lactona con la lipasa, luego se abre el anillo de lactona y se forma un intermediario enzima-monómero activado (EM). La iniciación comienza con el ataque nucleofílico del agua, que probablemente se encuentre en la enzima, en el acil del intermediario que luego produce un ácido ω -hidroxicarboxílico. En la propagación, el intermediario acil-enzima sufre un ataque nucleofílico por el hidroxilo terminal de un hidroxicarboxílico incrementando la cadena una unidad más.

La polimerización enzimática no requiere de la exclusión de agua y aire cuando se usan como catalizadores para la síntesis de poliésteres, en contraste con la tradicional síntesis química. El agua tiene dos roles en la polimerización enzimática por apertura de anillo. Por una parte, las enzimas necesitan agua para mantener su conformación activa, pero al mismo tiempo actúa como competidor en las subsiguientes condensaciones antes mencionadas. [36] El agua en exceso se podría remover por técnicas físicas de secado sin perder la actividad de la enzima cuando está inmovilizada.

Generalidades y Antecedentes

1.5.7.1 Lipasa *Yarrowia lipolytica*

La lipasa de *Yarrowia lipolytica* es una levadura *Ascomycota* que describe como un buen productor de lipasas ampliamente usada en aplicaciones industriales. La mayoría de las cepas de esta especie han sido aisladas de alimentos ricos en lípidos, tales como el queso o el aceite de oliva, así como de aguas residuales. [39, 40]

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas E.C. 3.1.1.3) comparten un plegamiento en común del tipo α/β hidrolasa, contiene una pequeña hélice α , que se conoce como tapa, la cual cubre al sitio activo, su actividad catalítica depende principalmente de la triada de aminoácidos que se conforma usualmente por serina, histidina y ácido aspártico.

La estructura de las lipasas es un sistema dinámico de interconversión entre la conformación cerrada y abierta. Cuando la lipasa es adsorbida a una interfase, la tapa es desplazada para que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Esta conformación se conoce como abierta.

La lipasa de *Yarrowia lipolytica* es una enzima que normalmente cataliza la hidrólisis de ácidos grasos en condiciones acuosas en sistemas vivos, la lipasa aisladas y en disolventes orgánicos se puede usar como catalizadores de esterificaciones, transesterificaciones, polimerizaciones por policondensación y por apertura de anillo. [35-37]

1.5.8 Propiedades del poli(ácido láctico)

En el proceso de obtención de poli(ácido láctico), tanto el método de síntesis como la relación de los enantiómeros D y L modifican las propiedades del producto. El método de policondensación se utiliza para la síntesis de polímeros de bajo peso molecular u oligómeros ($M_w < 5\ 000$). Por el contrario, la polimerización por apertura de anillo permite sintetizar polímeros de alto peso molecular ($M_w > 100\ 000$). En relación a la cristalinidad, el poli(L-ácido láctico) o PLLA y poli(D-ácido láctico) (PDLA) son materiales semicristalinos y su periodo de degradación supera los dos años. Por otro lado, el PDLLA es amorfo y se degrada en aproximadamente 16 meses. La cristalización, el grado de cristalinidad y las propiedades térmicas del PLLA dependen del peso molecular, de las condiciones de polimerización, de su historial térmico, y de la pureza, entre otras [27]. El

Capítulo 1

poli(ácido láctico) presenta menor resistencia al impacto y estabilidad térmica, en comparación con los polímeros termoplásticos convencionales.

El PLA es el polímero sintético de origen biológico, biodegradable y biocompatible más usado en aplicaciones biomédicas, como en implantes reabsorbibles, ingeniería de tejidos y liberación de fármacos. La degradación del PLA puede ser por hidrólisis y por vía enzimática. [27]

1.6 Consideraciones de diseño de materiales para regenerar la piel

Anualmente existe un gran número de personas que necesitan un injerto de piel, debido a diversos traumas causados por intervenciones quirúrgicas, úlceras diabéticas, úlceras postquirúrgicas, sustancias químicas, quemaduras, etc. Una alternativa al tratamiento es un injerto que, idealmente, se adhiere a la herida, y por tanto debe ser poroso para permitir la difusión de nutrientes, secreciones, y humedad. [41]

Para el diseño de materiales que ayuden a regenerar la piel es importante considerar la selección adecuada de los componentes, los polímeros biodegradables se utilizan para regenerar este tejido, debido a sus propiedades fisicoquímicas y estructurales similares a la matriz extracelular. Los polímeros naturales son los que presentan mejores propiedades de adhesión celular, pero sus propiedades mecánicas son deficientes, en comparación con los polímeros sintéticos. [42]

Existen diversos materiales que se usan actualmente para la regeneración de la piel; entre ellos el colágeno, fibrinógeno, quitosano, quitina PLA, PGA, PCL, PLGA.

1.7 Modificación del quitosano

Existen diversos reportes en la literatura que mencionan la modificación química del quitosano (Tabla 3). [43-46] Las reacciones pueden ser específicas en la posición del carbono 2 (C2) del grupo amino ($-NH_2$) o no específicas en cualquiera de los grupos hidroxilo ($-OH$) situados en los carbonos 3 (C3) y 6 (C6), en el C3 se encuentra un hidroxilo secundario y en el C6 se encuentra un hidroxilo primario, el cuál es más

Generalidades y Antecedentes

reactivo. Sobre los grupos –OH se pueden llevar a cabo reacciones de esterificación y eterificación. El grupo –NH₂ es más reactivo que el grupo –OH, y eso establece la principal diferencia entre la celulosa y el quitosano. Debido a la presencia de este grupo, el quitosano se puede disolver en medios acuosos ligeramente ácidos y formar sales cuaternarias. [45]

Tabla 3. Quitosanos modificados reportados en la literatura. [43-46]

Quitosano modificado	Ejemplos
Sales cuaternarias y alquil quitosanos	Cloruro de trimetilquitosano N-propil-N,N-dimetilquitosano N-furfuril-N,N-dimetil quitosano N-dietilmetilaminoquitosano.
N-Acilquitosanos	Formil, acetil, propionil, butiril, hexanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol, lauroil, miristoil, palmitoil, stearoil, benzoil, monocloroacetil, dicloroacetil, trifluoroacetil, carbamoil, succinil, acetoxibenzoil quitosano.
N-carboxialquil/aril quitosanos	N-carboximetil, N-carboxipropil, N-carboxibenzil, alanina, fenilalanina, tirosina, serina, ácido glutámico, metionina, leucina, glucano quitosano.
O-carboxialquil quitosanos	O-carboximetil quitosano.
N-carboxilacil quitosanos	De anhídridos maleico, succínico, itanoico, glutarico, trimélico, pirométrico, tiosuccínico, ftálico quitosano.
Quitosanos sulfurados	Cisteína, ácido tioglicólico, 4-tio-butilamidina, iminotiolano quitosano.
Iones metálicos quelatantes	Paladio, cobre, yodo y plata.
Resinas semisintéticas de quitosano	Copolímeros de quitosano con: metacrilato de metilo, ácido metacrílico, N-isopropilacrilamida, 2-hidroxietilmetacrilato, acrilonitrilo, 4-vinil-piridina, vinil pirrolidona, acetato de vinilo, resinas de poli(urea-uretano), poli(amida-éster), acrilamida, anhídrido maleico, N-vinilcaprolactama, poliestireno.

Tabla. 3 Quitosanos modificados reportados en la literatura (continuación).

Copolimerización de polímeros preformados o injertados sobre quitosano	Copolímeros de quitosano con: Poli(isobutilvinil éter), PEG y derivados, POE-PPO-PEO, poli(etilen imina), poliuretano, poli(dimetilsiloxano), polilactida, policaprolactona, poli(dioxanona), colágeno.
--	---

1.8 Estado del arte

Las modificaciones químicas del quitosano y su amplio diseño molecular permiten extender su uso, ya que no siempre los homopolímeros presentan las características requeridas. Una de las opciones consiste en la copolimerización por injerto, que es una alternativa para sintetizar copolímeros con segmentos bien definidos de cada unidad monomérica. En el caso del quitosano, la copolimerización por injerto permite preservar algunas de sus propiedades de este como son la mucoadhesión, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad, y agrega nuevas funciones que mejoran ciertas características del material y permite generar nuevos materiales híbridos compuestos. [44, 46]

Existen diversos métodos para la copolimerización de injerto, y estos incluyen reacciones mediante radicales libres, redox, enzimática, química, catiónica, por microondas o radiación γ . [46] La modificación enzimática ofrece una alternativa en donde las ventajas obtenidas son superiores a las obtenidas mediante modificación química. Esto desde el punto de vista de salud, toxicidad y seguridad, ya que en la modificación química se utilizan organometálicos que difícilmente se eliminan completamente del biomaterial. Por ejemplo, en el caso de la síntesis del PLA se utiliza octanoato de estaño (SnOct_2) para tener mayores rendimientos y altos pesos moleculares. [22]

En 1999, Qu *et al.* [47] sintetizaron el copolímero de injerto por el método directo o policondensación del D,L-ácido láctico sobre quitosano, sin el uso de catalizador. En 2002 Kim *et al.* [48] realizaron la síntesis del copolímero por el método de polimerización

Generalidades y Antecedentes

por apertura de anillo de L-lactida sobre quitina, con cloruro de litio como catalizador y como parte del medio, para solubilizar la quitina en DMF. Ya en 2004 Liu *et al.* [49] reportan el copolímero de injerto tipo peine del poli(ácido láctico) sobre quitosano por polimerización por apertura de anillo de lactida, usando trietilaluminio como catalizador.

En 2004 Fujioka *et al.* [50] reportan el primer trabajo sobre un nuevo método de síntesis catalizada enzimáticamente, para la polimerización del injerto en masa de los copolímeros de ϵ -caprolactona, β -butirolactona y γ -butirolactona sobre quitina y quitosano como cadena principal. Usaron una lipasa pancreática porcina como biocatalizador regioselectivo y encontraron que la γ -butirolactona no reaccionó.

Wu *et al.* [51], en 2005, sintetizaron el copolímero de injerto de quitosano y lactida, usando quitosano soluble en agua y trietilamina como catalizador de la reacción. En 2008 Yuan *et al.* [52] repitieron la síntesis. Luckachan y Pilliai [53], en 2006, usaron $\text{Ti}(\text{O}i\text{Bu})_4$ como catalizador, en búsqueda de un copolímero que presente mejores propiedades fisicoquímicas y de biodegradabilidad en comparación con los homopolímeros para aplicaciones en el campo biomédico y farmacéutico.

Liu *et al.* [54], en 2005, realizaron la copolimerización con microondas, injertaron ϵ -caprolactona sobre quitosano, protegieron los grupos amino con anhídrido ftálico, siendo el catalizador SnOct_2 . La reacción de desprotección se hizo con hidrazina y obtuvieron un copolímero con grupos amino libres y con cadenas hidrofóbicas de policaprolactona. Feng y Dong [32], en 2006, no protegieron los grupos amino, polimerizaron la ϵ -caprolactona sobre quitosano con 4-dimetilamino piridina (DMAP) como catalizador y lograron incorporar hasta el 400% de injerto de PCL en el quitosano. Wu *et al.* [55], en 2011, realizaron la síntesis del copolímero de quitosano-poli(ϵ -caprolactona) en condiciones similares a las de Liu *et al.* [54]

Liu *et al.*[56], en 2008, sintetizaron un nuevo copolímero de injerto de p-dioxanona y quitosano, por polimerización por apertura de anillo de p-dioxanona en masa; utilizaron $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador, el copolímero que obtuvieron lo probaron para liberación de ibuprofeno.

Li *et al.* [57], en 2008, sintetizaron el copolímero de injerto de poli(L-ácido láctico) sobre quitosano. Por un lado, utilizaron una ruta de protección y desprotección con anhídrido ftálico (como Liu *et al.* [54] en 2005), y, por el otro lado, reaccionaron el PLA con 2,4-

Capítulo 1

toluendiisocianato. Enseguida, pusieron a reaccionar estos dos productos formando el copolímero.

Bing-hong *et al.* [58], en 2009, sintetizaron el copolímero de injerto quitosano-injerto-poli(D,L-lactida) por polimerización por apertura de anillo de D,L lactida. Utilizaron el quitosano como macroiniciador, el octoato de estaño como catalizador y aplicaron microondas. De igual manera, Luo *et al.* [59], en 2012, realizaron la síntesis del copolímero irradiado con microondas, pero usando como cadena principal quitosano y su derivado hidroxietil quitosano.

Duan *et al.* [60], en 2010, llevaron a cabo la síntesis del copolímero de injerto de poli(ϵ -caprolactona) sobre quitosano, injertaron los oligómeros de ϵ -caprolactona en los grupos hidroxilo del quitosano vía polimerización por apertura de anillo y usaron ácido metilsulfónico como disolvente, como catalizador y protector de los grupos amino del quitosano. Chen *et al.* [61], en 2011, y Shi *et al.* [62], en 2014, reprodujeron la síntesis del copolímero quitosano-g-poli(ϵ -caprolactona) para electrohilarlo.

Liu *et al.* [63], en 2010, sintetizaron el copolímero de injerto de quitosano y polilactida vía polimerización por apertura de anillo de lactida sobre quitosano. Protegieron los grupos amino con anhídrido ftálico (como Liu *et al.* [54] en 2005 y Li *et al.* [57] en 2008). Sin embargo, observaron que durante la desprotección alcalina ocurrió la degradación del quitosano-g-polilactida.

En 2010 Xie *et al.* [64] modificaron el quitosano con cloruro de trimetil silano (TMS-Cl), catalizaron la reacción con dimetilamino piridina (como Feng y Dong en 2006). Enseguida realizaron la esterificación con los ácidos carboxílicos terminales del PLGA y los hidroxilos secundarios del quitosano. Posteriormente, eliminaron el TMS-Cl de la estructura del copolímero de quitosano-g-PLGA. Finalmente, procesaron el copolímero por electrohilado.

Li *et al.* [65], en 2011, realizaron la síntesis del copolímero de injerto de quitosano con PLA, a través de la modificación química del PLA con 1-etil-3-(3-dimetilamonio)propil carbodiimida (EDC) como catalizador. Formaron un intermediario inestable al que se le adiciona N-hidroxisuccinimida (NHS) y quitosano, para que la reacción específica de injerto se lleve a cabo entre el grupo amino del quitosano y el ácido carboxílico del PLA.

Generalidades y Antecedentes

Suyatma *et al.* [66], en 2011, prepararon el copolímero de injerto de PLA sobre quitosano por dos diferentes métodos: por injerto directo y por apertura de anillo de L-lactida. El método directo consiste en la reacción de policondensación en masa del ácido láctico y ácido p-toluensulfónico como catalizador (como Qu *et al.* [47] en 1999). En el método de polimerización por apertura de anillo de L-lactida se pone a reaccionar quitosano, L-lactida y trietilamina (como Wu *et al.* [51] en 2005).

En 2011 Hu *et al.* [67] sintetizaron el copolímero biodegradable de polilactida injertado sobre quitosano. Primero sintetizaron el PLA por apertura de anillo de L-lactida y D-lactida en presencia de 1-octanol como iniciador y lactato de zinc al 0.1% como catalizador. Después hicieron reaccionar PLA con N,N'-carbonilimidazol como agente de acoplamiento. Para la copolimerización del injerto de quitosano, pusieron a reaccionar PLA modificado con el quitosano y usaron dimetilamino piridina (DMAP) como catalizador (como Feng y Dong [32] en 2006 y Xie *et al.* [64] en 2010).

Wang *et al.* [68], en 2013, sintetizaron el copolímero de injerto de caprolactona sobre quitosano mediante polimerización por apertura de anillo de caprolactona y usaron octoato de estaño (SnOct₂) como catalizador. Lo novedoso de este trabajo fue que se utilizó como medio de reacción un líquido iónico (acetato de 1-etil-3-metilimidazolio). Además reportan que el contenido de PCL puede ser hasta del 630%.

Lu *et al.* [69], en 2013, sintetizaron el copolímero biodegradable de poli(D,L-lactida) injertado sobre quitosano por polimerización por apertura de anillo *in situ* de D,L-lactida. Usaron ácido láctico como disolvente y Sn(Oct)₂ como catalizador.

Niu *et al.* [70], en 2014, como primer paso prepararon el PLA por polimerización por apertura de anillo de lactida, usaron octoato de estaño (SnOct₂) como catalizador. Por otro lado, protegieron al grupo amino del quitosano con 1-hidroxibenzotriazol. El copolímero de quitosano injertado con PLA lo sintetizaron a través de una emulsión de autoensablaje, en microemulsión de agua en aceite (W/O). La fase acuosa contenía al quitosano y la fase oleosa contenía al PLA y al cloroformo. La microemulsión se realizó con span-80 y la reacción entre PLA y quitosano se llevó a cabo con cloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC·HCl) como catalizador, igual como lo reportaron Li *et al.* [65] en 2011.

Capítulo 1

Yu *et al.* [71], en 2014, realizaron un copolímero de injerto anfifílico. Utilizaron quitosano e hidroxipropil quitosano (HPCS) como cadena principal hidrofílica y polilactida como segmento hidrofóbico (derivado de quitosano como lo utilizaron Luo *et al.* [59] en 2012). Primero sintetizaron HPCS, después realizaron la polimerización por apertura de anillo de lactida sobre la cadena de HPCS, usando $Ti(OBu)_4$ usaron como catalizador (Luckachan y Pilliai [53] en 2006).

Se encontró reportado un copolímero entre quitosano y ϵ -caprolactona, y β -butirolactona sintetizado por Fujioka *et al.* [50] con una enzima lipasa pancreática porcina, pero no con lactidas; tampoco se encontró el uso de la enzima de *Yarrowia Lipolytica* para la síntesis del copolímero antes mencionado.

Capítulo 2.

Materiales y Metodología

2.1 Materiales

Para la síntesis del copolímero de injerto de lactida en quitosano se utilizó quitosano de bajo peso molecular (bpm) con 80.3 % grado de desacetilación y una viscosidad de 96 cps al 1% en 1% de ácido acético (Sigma-Aldrich), 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona (lactida) (Sigma-Aldrich), 2-etilhexanoato de estaño, Sn(Oct)₂ (Reaxis C129), enzima lipasa de *Yarrowia lipolytica* (YLL-1026, sintetizada y soportada de acuerdo al procedimiento descrito por Barrera-Rivera et al. [72], proporcionada por la UG) y dimetilformamida (DMF Sigma-Aldrich). Para la precipitación y purificación del copolímero se utilizó acetona RA (Tecsiquim) y diclorometano (Sigma-Aldrich). Para la caracterización por ¹H RMN en gel se usó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆, 99.9 %D, Sigma-Aldrich). Todos los reactivos y disolventes se usaron tal como se recibieron.

Capítulo 2

2.2 Síntesis del copolímero de injerto de lactida en quitosano

El copolímero se sintetizó a través de la polimerización por apertura de anillo de lactida en quitosano. La polimerización se llevó a cabo por dos vías catalíticas: para la primera se utilizó el catalizador químico 2-etilhexanoato de estaño (octoato de estaño) y la segunda un biocatalizador de enzima lipasa de *yarrowia lipolytica*.

Se agregó en el reactor 300 mg de quitosano de bajo peso molecular, 10 mL de dimetilformamida como disolvente, 3 proporciones de lactida (Tabla 4), el sistema catalítico al 1% con respecto al peso del monómero y una barra magnética de agitación. El reactor se cerró y se calentó con agitación en un baño de silicón a temperatura constante de 80 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar, se precipitó con exceso de acetona, se filtró y se lavó el sólido que se obtuvo con diclorometano para eliminar el polímero no injertado en el quitosano. El copolímero se secó en un horno con presión reducida a 40 °C por lo menos 48 horas, para cuantificar el porcentaje de injerto por gravimetría. Bajo estas mismas condiciones se sintetizaron los injertos con distintas proporciones de lactida con respecto al quitosano (Tabla 4).

Tabla 4. Proporciones del copolímero de injerto de lactida y quitosano.

Injerto	Cantidad de quitosano (mg)	Cantidad de lactida (mg)	Catalizador
QL 1:5	300	1500	s/c
QL 1:10	300	3000	s/c
QL 1:15	300	4500	s/c
QLE 1:5	300	1500	Enzima YLL
QLE 1:10	300	3000	Enzima YLL
QLE 1:15	300	4500	Enzima YLL
QLS 1:5	300	1500	Sn(Oct) ₂
QLS 1:10	300	3000	Sn(Oct) ₂
QLS 1:15	300	4500	Sn(Oct) ₂

Materiales y Metodología

A continuación se presentan las ecuaciones que se utilizaron para el cálculo del % de injerto, eficiencia de injerto, incorporación y rendimiento

$$\% \text{ Injerto} = \frac{m_{\text{copolímero}} - m_{\text{quitosano}}}{m_{\text{quitosano}}} \times 100 \text{ --- (1)}$$

$$\% \text{ Eficiencia de injerto} = \frac{m_{\text{copolímero}} - m_{\text{quitosano}}}{m_{\text{lactida}}} \times 100 \text{ --- (2)}$$

$$\% \text{ Incorporación} = \frac{m_{\text{copolímero}} - m_{\text{quitosano}}}{m_{\text{copolímero}}} \times 100 \text{ --- (3)}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{m_{\text{copolímero}}}{m_{\text{quitosano}} + m_{\text{lactida}}} \times 100 \text{ --- (4)}$$

En donde m es la masa.

2.3 Caracterización de los copolímeros

Los copolímeros de injerto se caracterizaron con apoyo de técnicas de espectroscopía en el infrarrojo (FTIR), calorimetría de barrido diferencial modulada (MDSC), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13 (^1H RMN y ^{13}C RMN).

2.3.1 Espectroscopía en el infrarrojo (FTIR-ATR)

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR equipado con accesorio de reflexión total atenuada (ATR), con cristal de diamante, para la caracterización de los grupos funcionales en los copolímeros. Los espectros se registraron en un intervalo del número de onda de 4,000 a 500 cm^{-1} . A los espectros se les realizó una corrección de línea base con ayuda del software OMNIC 4.1.

Capítulo 2

2.3.2 Resonancia magnética nuclear de ^{13}C RMN CP-MAS y ^1H RMN

Para la caracterización de la estructura química del copolímero se utilizó un espectrómetro de RMN Bruker Avance 400 con una sonda de sólidos usando las secuencias combinadas de polarización cruzada (CP) y rotación con ángulo mágico (MAS). Se calculó el grado de acetilación (DA) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$DA = \frac{(I_{CH_3})}{(I_{C_1} + I_{C_2} + I_{C_3} + I_{C_4} + I_{C_5} + I_{C_6})/6} \text{---(5)}$$

en donde $I_{CH_3}, I_{C_1} \dots I_{C_6}$ son las intensidades correspondientes a cada señal en el espectro de ^{13}C RMN del carbono asignado a la estructura del quitosano.

El porcentaje de injerto de los copolímeros se determinó con un espectrómetro de RMN Bruker Avance 400 con una sonda de geles. Para gelificar todas las muestras se utilizó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de los injertos se analizó en un equipo TGA Q5000 TA Instruments, a una razón de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ en un intervalo de temperatura ambiente a $400\text{ }^\circ\text{C}$, con flujo de nitrógeno a una velocidad de $10\text{ mL}/\text{min}$. Se utilizó el software TA Universal Analysis 2000 como herramienta para el análisis de los termogramas.

2.3.4 Calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC)

Los termogramas de los materiales, se obtuvieron con un equipo DSC Q2000 TA Instruments. Cada una de las muestras entre 4 y 14 mg, se colocaron en una charola de aluminio cerrada herméticamente a una razón de calentamiento de $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ en el modulado $1\text{ }^\circ\text{C}/120\text{ s}$, en un intervalo de temperatura ambiente a $220\text{ }^\circ\text{C}$ con flujo de nitrógeno a una velocidad de $10\text{ mL}/\text{min}$, calibrado con indio.

Capítulo 3. Resultados y Análisis

3.1 Síntesis de copolímero quitosano-g-polilactida (QL)

La reacción que se llevó a cabo a partir de la polimerización por apertura de anillo del lactida sobre el quitosano (Figura 8). La síntesis se realizó con dos tipos de catalizadores, el octoato de estaño, el más usado y recomendado para obtener altos pesos moleculares y la enzima lipasa de *Yarrowia Lipolytica* (YLL), se realizaron las siguientes reacciones (Figura 8).

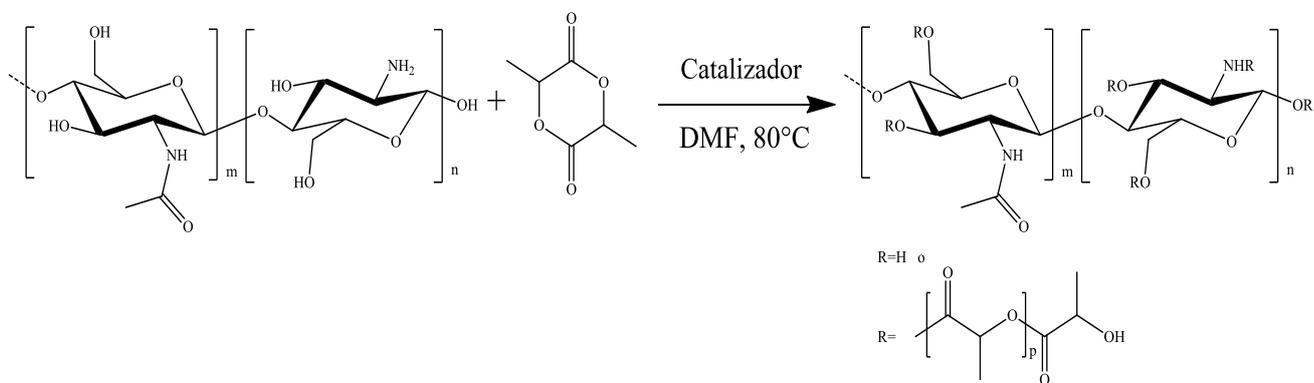


Figura 8. Reacción de la copolimerización de injerto de lactida sobre quitosano.

Capítulo 3

En la reacción se pueden formar oligómeros de lactida como producto secundario, es por ello que se purifica primero con acetona para disolver estos oligómeros, se filtra el producto, enseguida se lava con diclorometano para eliminar los restos de los oligómeros que no reaccionaron y finalmente el producto se secó. Después, se calculó por gravimetría los porcentajes del monómero injertado sobre el quitosano, la eficiencia de injerto, la incorporación del injerto y el rendimiento (Ecuaciones 1-4).

Conforme aumenta la proporción entre el quitosano y el de lactida, aumenta el porcentaje de injerto, a excepción de la última proporción en la reacción con octoato de estaño (Tabla 5). Esto se puede deber a que las condiciones de reacción para el catalizador no son óptimas, porque la temperatura de reacción debe ser mayor a 120 °C, en atmósfera de nitrógeno [33, 73]. Los porcentajes de incorporación son relativamente, bajos, lo cual se debe a la presencia de moléculas de agua en la reacción. El agua juega un papel muy importante en la polimerización del lactida, para aumentar los porcentajes de incorporación es necesario eliminar el agua del sistema antes y durante la reacción.

El porcentaje de incorporación del lactida, que fue máximo para las reacciones con proporciones 1:15 en peso (quitosano:lactida). Sin embargo, los rendimientos son bajos debido a que no toda la lactida se incorporó al quitosano y las cadenas del polímero no siguieron creciendo.

Tabla 5. Análisis gravimétrico de la reacción de injerto.

Injerto	% Injerto	% Eficiencia	% Incorporación	% Rendimiento
RQL 1:5	73.0	14.6	42.2	28.9
RQL 1:10	133.2	13.2	57.1	21.1
RQL 1:15	146.3	8.7	56.5	14.4
RQLE 1:5	106.8	21.3	51.6	34.4
RQLE 1:10	126.7	13.0	55.9	21.1
RQLE 1:15	147.2	10.0	59.5	15.7
RQLS 1:5	114.1	23.1	53.3	36.1
RQLS 1:10	154.1	15.4	60.6	23.1
RQLS 1:15	152.2	10.1	60.3	15.7

Resultados y Análisis

3.2 Estructura por espectroscopía en el infrarrojo (FTIR-ATR)

El espectro en el infrarrojo del quitosano (Figura 9) presenta las frecuencias características de sus grupos funcionales (Tabla 6). Las señales que aparecen alrededor de $3,300\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los grupos hidroxilos y aminas presentes en la estructura del quitosano. La banda en $2,869\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los grupos C-H. En $1,650\text{ cm}^{-1}$ aparece la vibración de los grupos N-H de amida I, en $1,555\text{ cm}^{-1}$ la vibración de amida II y en $1,315\text{ cm}^{-1}$ aparece la banda de amida III. En $1,415\text{ cm}^{-1}$ aparece la vibración de los metilenos. La banda en $1,373\text{ cm}^{-1}$ es del metilo de la quitina. Finalmente, en $1,058\text{ cm}^{-1}$ y en $1,023\text{ cm}^{-1}$ aparecen las vibraciones del C-O anomérico del anillo de quitosano. Las bandas encontradas corresponde con lo reportado en la literatura. [47, 65, 74]

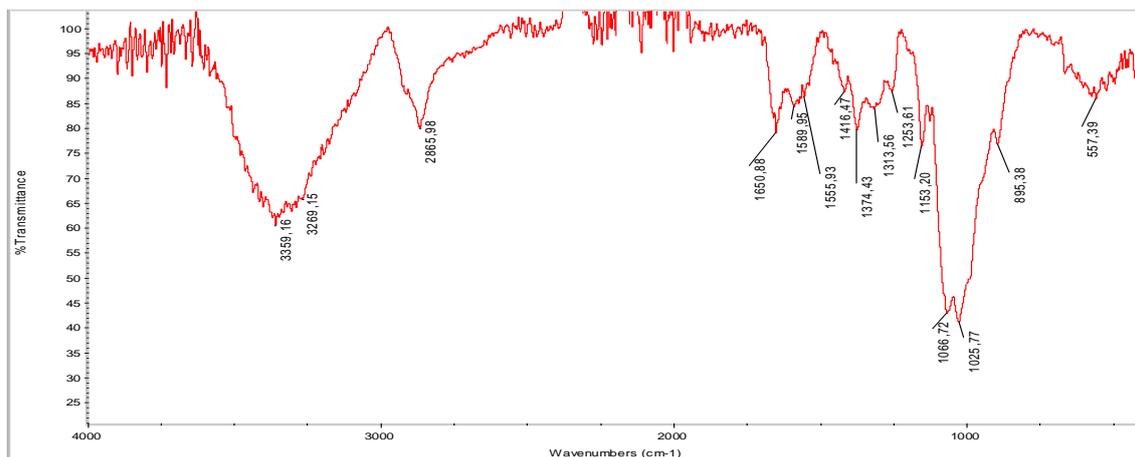


Figura 9. Espectro en el infrarrojo del quitosano.

Tabla 6. Bandas de absorción en el infrarrojo del quitosano.

Frecuencia (cm^{-1})	Grupo funcional	Estructura del quitosano
3,361 y 3,272	ν -OH y ν -NH	
2,869	ν C-H	
1,650	ν N-H Amida I	
1,555	ν Amida II	
1,415	ν CH_2	
1,373	δ CH_3 de quitina	
1,315	δ Amida III	
1,149	τ C-O-C	
1,058	ν C-O y ν C-O-C	
1,023		
893	ν C-H	

Capítulo 3

En el espectro del poli(ácido láctico) (Figura 10) se observan las bandas características de sus grupos funcionales que se muestran a continuación (Tabla 7). Los grupos C-H aparecen en $2,998\text{ cm}^{-1}$ y $2,943\text{ cm}^{-1}$. La banda del carbonilo se presenta en $1,746\text{ cm}^{-1}$. La banda en $1,454\text{ cm}^{-1}$ es por la vibración del CH_3 . Las bandas en $1,208\text{ cm}^{-1}$, $1,180\text{ cm}^{-1}$ y $1,083\text{ cm}^{-1}$ corresponden a las vibraciones C-O-C del éster. [28, 31]

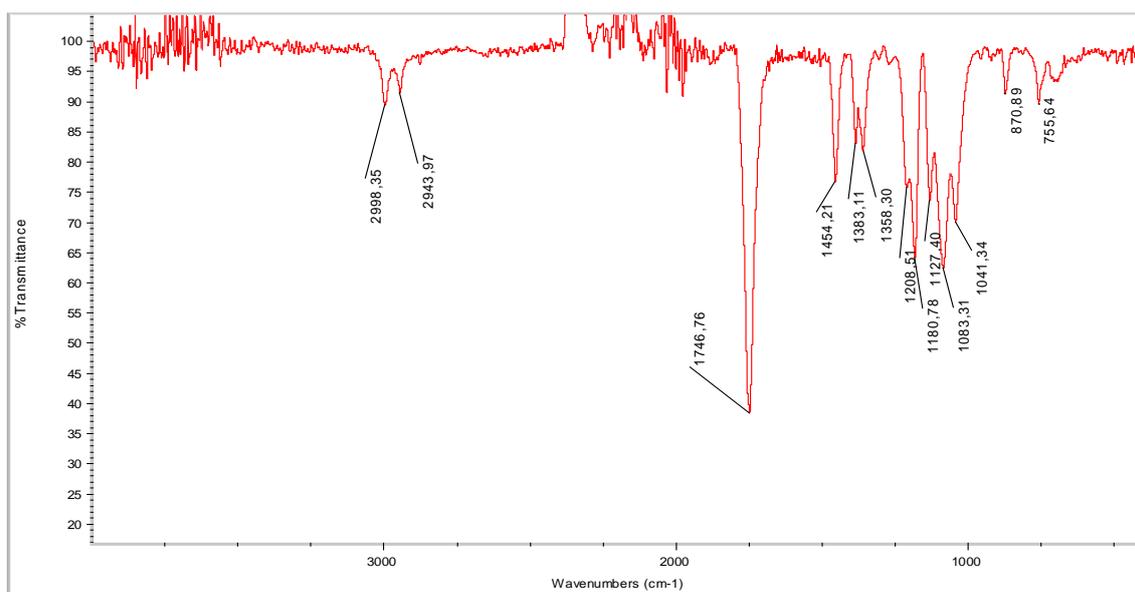


Figura 10. Espectro en el infrarrojo del poli(ácido láctico).

Tabla 7. Bandas de absorción en el infrarrojo de PLA.

Frecuencia (cm^{-1})	Grupo funcional	Estructura del PLA
2,998 y 2,943	ν CH y ν CH_3	
1,746	ν C=O	
1,454	δ CH_3	
1,382	δ CH	
1,358	δ C-H	
1,208 y ν 1,180	ν C-O-C	
1,127	ρ CH_3	
1,083	ν C-O-C	
1,041	ν C- CH_3	
953 y 918	ρ CH_3 + ν CC	
870	ν C-COO	
755 y 689	δ C=O	

Resultados y Análisis

En los espectros de infrarrojo del quitosano, el PLA y el copolímero de injerto QL (Figura 11). Se observan nuevas bandas que corresponden a las del copolímero. La más notable se encuentra alrededor de $1,746\text{ cm}^{-1}$, corresponde al grupo carbonilo presente en el PLA. Una nueva banda en $1,450\text{ cm}^{-1}$ característica de la deformación del metilo del espectro del PLA. Las bandas en $1,257\text{ cm}^{-1}$ y $1,191\text{ cm}^{-1}$ se asignan, en el copolímero, a las vibraciones C-O-C de los grupos éster. Las señales en $1,125\text{ cm}^{-1}$ y $1,047\text{ cm}^{-1}$ se son atribuidas a los grupos metilo.

Se aprecia un aumento de la intensidad de las bandas que corresponden a las amidas I y II, en $1,657$ y $1,538\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, debido a la formación del grupo amida, por la reacción de injerto entre el grupo $-\text{NH}_2$ del quitosano y el carbonilo del lactida. La banda en $1,191\text{ cm}^{-1}$ también aumenta conforme aumenta la proporción de lactida injertada en el quitosano. También, la banda más ancha en $3,436\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ presentes en el quitosano disminuye su intensidad en el copolímero debido a la reacción de estos grupos con el carbonilo de la lactida donde se abrió el anillo.[49, 53, 68]

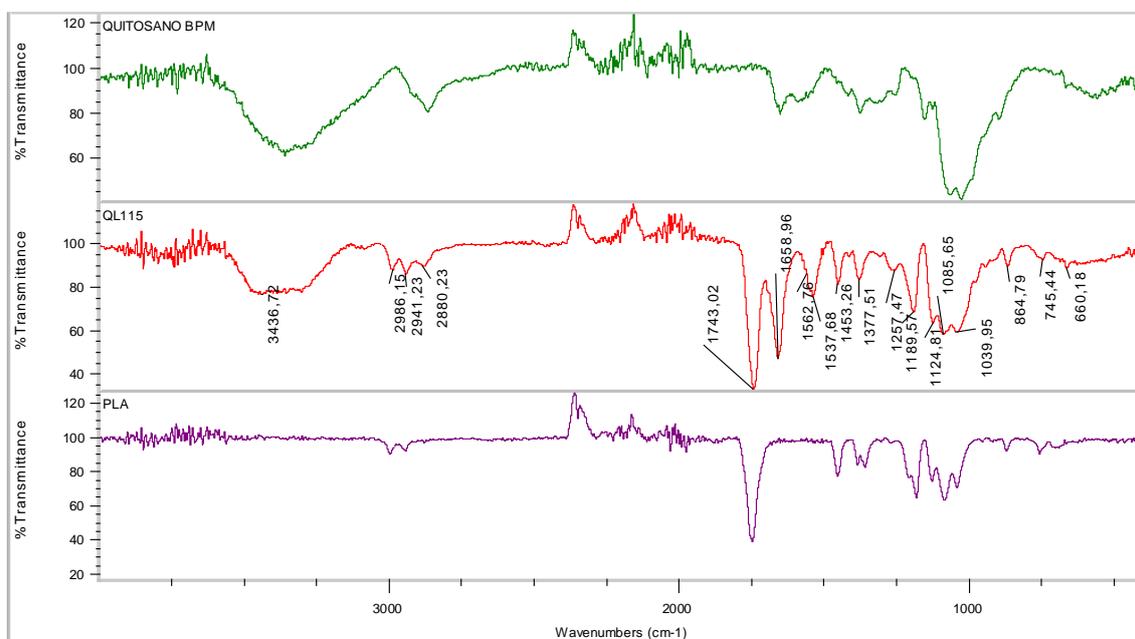


Figura 11. Espectros en el infrarrojo del Quitosano, PLA e injerto de quitosano-PLA (QL 1:15).

Capítulo 3

Los espectros en el infrarrojo de los copolímeros QLE catalizados con enzima YLL con tres proporciones: 5, 10 y 15 en peso de lactida (Figura 12). La intensidad de las bandas en $1,746\text{ cm}^{-1}$ van en aumento conforme aumenta el porcentaje de lactida en el copolímero, de igual manera aumentan las bandas en $1,657$ y $1,538\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a la formación del enlace amida en el copolímero. En todos los copolímeros sintetizados por cualquier método, se observan las mismas bandas antes mencionadas correspondientes al carbonilo y al enlace amida (los espectros se pueden ver en el apéndice).

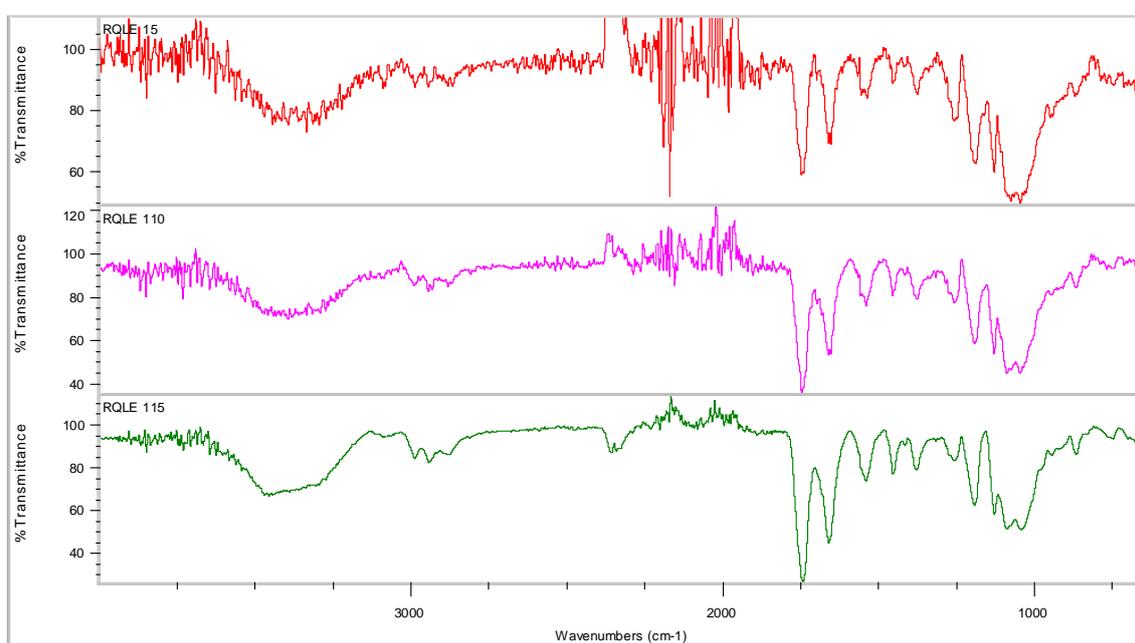


Figura 12. Espectro en el infrarrojo de los copolímeros de injerto catalizados con enzima YLL.

3.3 Estructura por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

3.3.1 ¹³C RMN CP-MAS

El espectro de ¹³C RMN CP-MAS del quitosano de bajo peso molecular (Figura 13). El pico que aparece en 104.31 ppm corresponde al C1 y la señal que aparece entre 85 y 82 ppm pertenece al C4, que forman parte del enlace glucosídico 1-4 del esqueleto del quitosano. La señal en 74.65 ppm corresponde a los carbonos C5 y C3, mientras que las señales en 60.28 y 56.77 ppm son de los carbonos C6 y C2 que están unidos a un -OH y a un -NH₂ respectivamente.

Resultados y Análisis

Las señales de la quitina en 173.26 ppm del carbonilo y en 23.08 ppm aparece la banda del metilo de grupo acetilo. El grado de desacetilación es de 80.4 % del quitosano, que se calculó de acuerdo a la ecuación 5 [74, 75] y con los valores de intensidades reportados en la Tabla 8, el valor del grado de desacetilación corresponde con las especificaciones del proveedor del quitosano.

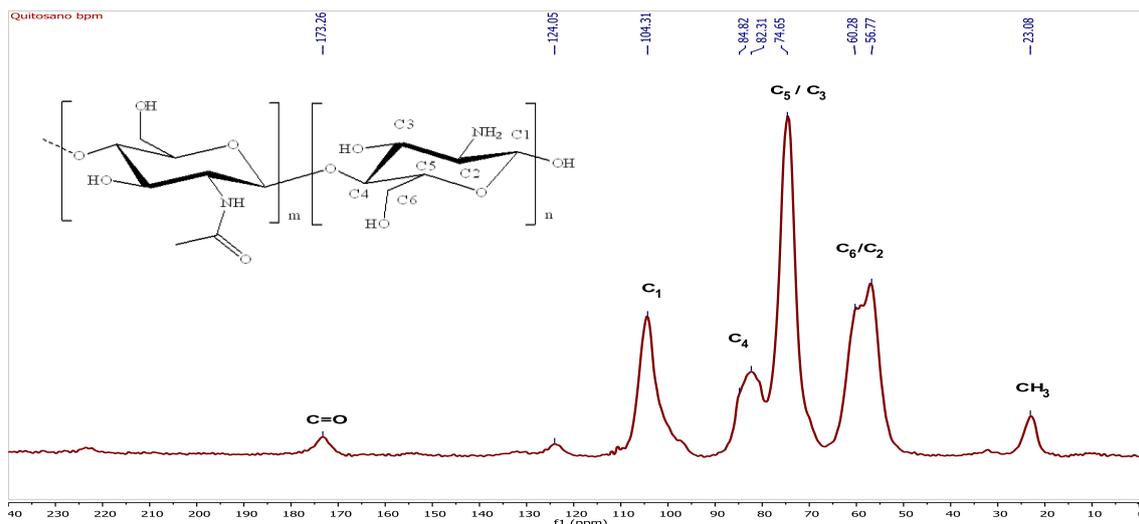


Figura 13. Espectro de ^{13}C RMN CP-MAS del quitosano.

Tabla 8. Desplazamientos químicos de ^{13}C RMN CP-MAS del quitosano.

Quitosano			Estructura del quitosano
	ppm	Intensidad	
CH ₃	23.09	200,670.1	
C2	56.80	780,676.7	
C6	60.34	570,443.1	
C5/C3	74.66	178,4253.2	
C4	81.97	336,870.1	
	84.73	217,311.7	
C1	104.36	683,181.7	
C=O	173.28	88,889.9	

Cervera *et al.* [75] mencionan que el ^{13}C RMN CP-MAS es muy sensible a los cambios estructurales. El desplazamiento químico de los C1 y el C4 en carbohidratos unidos por enlaces 1-4 se cree que son altamente sensibles a cualquier cambio conformacional en el enlace glucosídico. Lo anterior se puede corroborar al observar los desplazamientos químicos del injerto del C1 y del C4, que se desplazaron 2 ppm aproximadamente hacia

Capítulo 3

campo alto y hacia campo bajo respectivamente, con respecto a las posiciones originales del quitosano.

El espectro de ^{13}C RMN CP-MAS del copolímero de injerto QLE (Figura 14) con la proporción más grande (1:15). Se observan nuevas señales en 19.76 y 16.23 ppm que corresponden, principalmente, al metilo (CH_3) del PLA. El carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) del PLA aparece en 170.49 ppm y la señal en 70.09 ppm se asigna a los metinos (CH) del PLA (Tabla 9). [76]

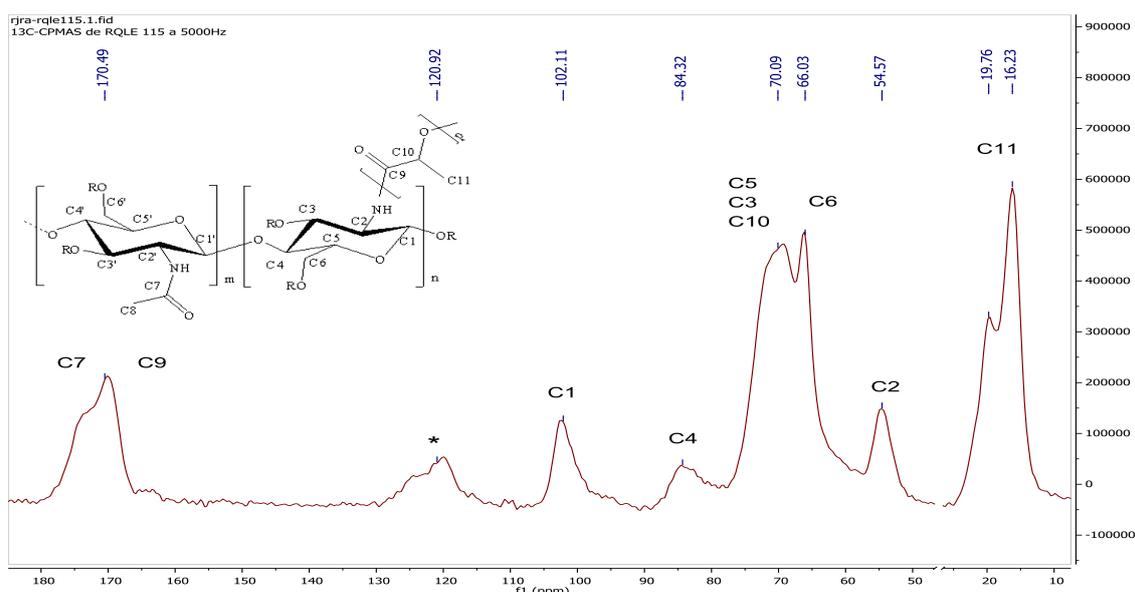


Figura 14. Espectro de ^{13}C RMN CP-MAS del copolímero de injerto QLE 1:15. (*bandas laterales de rotación)

Tabla 9. Desplazamientos químicos en ^{13}C RMN CP-MAS del copolímero de injerto QLE.

QLE 1:15		Estructura
Carbono	δ (ppm)	
C9 (C=O)	170.49	
C1	102.11	
C4	84.32	
C5, C3, C10 (CH)	70.09	
C6	66.03	
C2	54.57	
C8, C11 (CH_3)	19.76	
	16.23	

Resultados y Análisis

La comparación de los espectros de ^{13}C RMN del quitosano y los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador, con enzima y con octoato de estaño (Figura 15). Aparentemente, no hay diferencia entre los copolímeros obtenidos debido a que en los tres espectros aparecen las mismas nuevas señales que indican la formación de nuevos enlaces, cambios en la estructura y entorno químico diferente.

La señal más importante aparece en 170 ppm que corresponde al carbonilo del PLA y en 173 ppm aumenta la intensidad de la señal que corresponde al carbonilo de amida. En 19.8 y 16.2 ppm aparecen las señales del metilo del PLA y en 70 ppm aparecen las señales del metino del PLA, los carbonos C5 y C3 del quitosano y las señales de la estructura del quitosano aparecen desplazadas alrededor de las mismas regiones. Las señales del C2 y C6 son las más afectadas, ya que en estos carbonos se injerta el anillo de lactida. [77, 78]

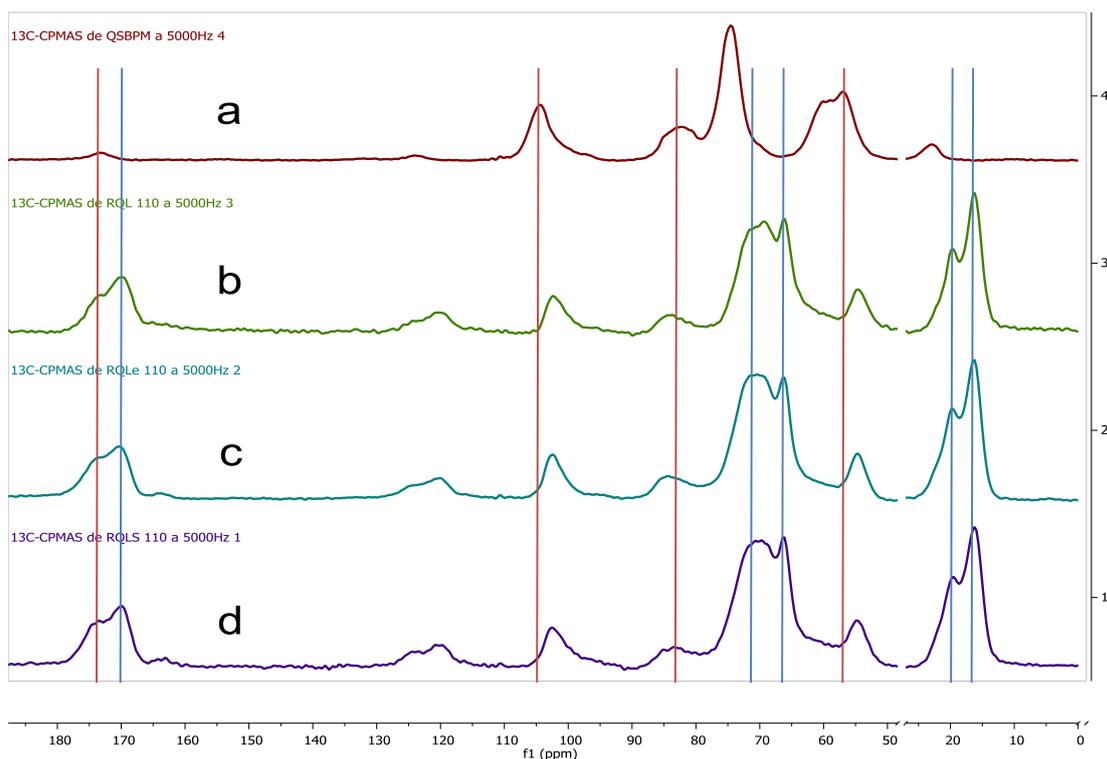


Figura 15. Espectros de RMN ^{13}C CP-MAS de a) quitosano, de los copolímeros injerto sintetizados, b) sin catalizador, c) con enzima YLL y d) con SnOct_2 .

Capítulo 3

3.3.2 Estructura del copolímero de injerto por ^1H RMN Gel

Espectro del quitosano de ^1H RMN (Figura 16) tomada de Wu *et al.* [51] De acuerdo con esta referencia se muestran las siguientes señales: un singulete en 3.13 ppm correspondiente al hidrógeno del carbono 2 (H-2), multipletes en 3.3 – 3.6 ppm que corresponden a los hidrógenos (H-3, H-4, H-5 y H-6) y un pequeño singulete en 4.4 ppm correspondiente al H-1.

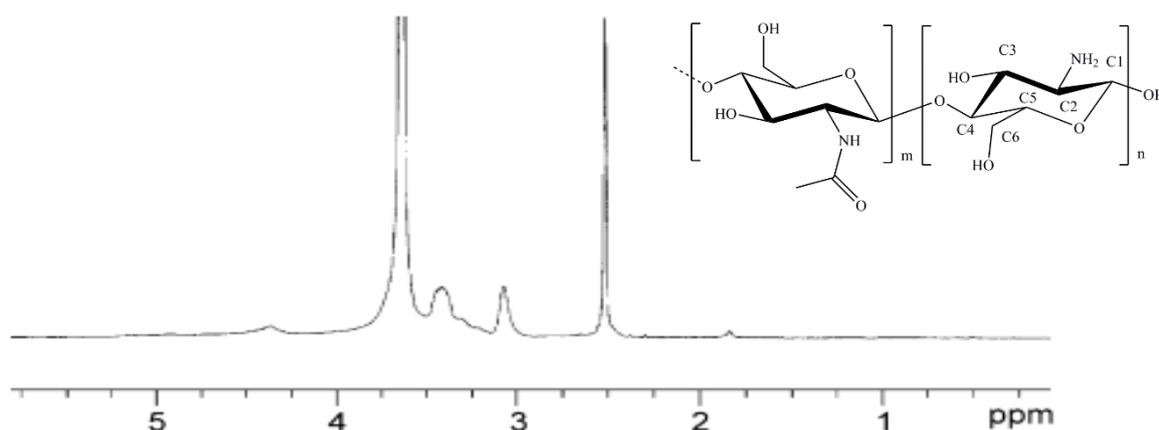


Figura 16. Espectro de ^1H RMN de quitosano. [51]

En los espectros de los copolímeros de injerto (Figura 17) se observan las señales que aparecían en el quitosano en 3.13 a 3.6 ppm, pero ahora solo se forma una sola señal en 3.6 ppm para los injertos sin catalizador y con octoato de estaño y en 3.8 ppm para el copolímero catalizado con lipasa YLL, que concuerda con lo reportado por Wu *et al.* [51] y Bing-hong *et al.* [58] El desplazamiento se puede deber a la cantidad de injerto en el quitosano, por lo que hay mayor número de injertos en el copolímero QLE que en los copolímeros QL y QLS. Así mismo, la intensidad de las bandas entre estos dos últimos es mayor en QLS ya que tiene cadenas más largas que el QL.

Comparando con el espectro del quitosano, en todos los espectros de los copolímeros se observa la aparición de nuevas bandas entre 1.45 y 1.28 ppm que se atribuyen a los grupos metilo (CH_3) localizados dentro de la cadena del PLA y terminales. Los grupos metino (CH) del PLA en 5.49 y 4.90 ppm, aproximadamente, son asignados a los protones de la unidad repetitiva del PLA y los terminales respectivamente. De acuerdo con Liu *et al.* [56] las señales en 2.90 y 2.74 ppm corresponde a los hidrógenos del carbono 2 de la

Resultados y Análisis

estructura del quitosano y aparecen por los grupos amino que no reaccionaron y los grupos amida que se formaron con la unión de las cadenas de lactida. Por último, también aparece una banda en 4.21 ppm que se debe a metino terminal del PLA y en 2.52 ppm aparece la banda del disolvente DMSO.

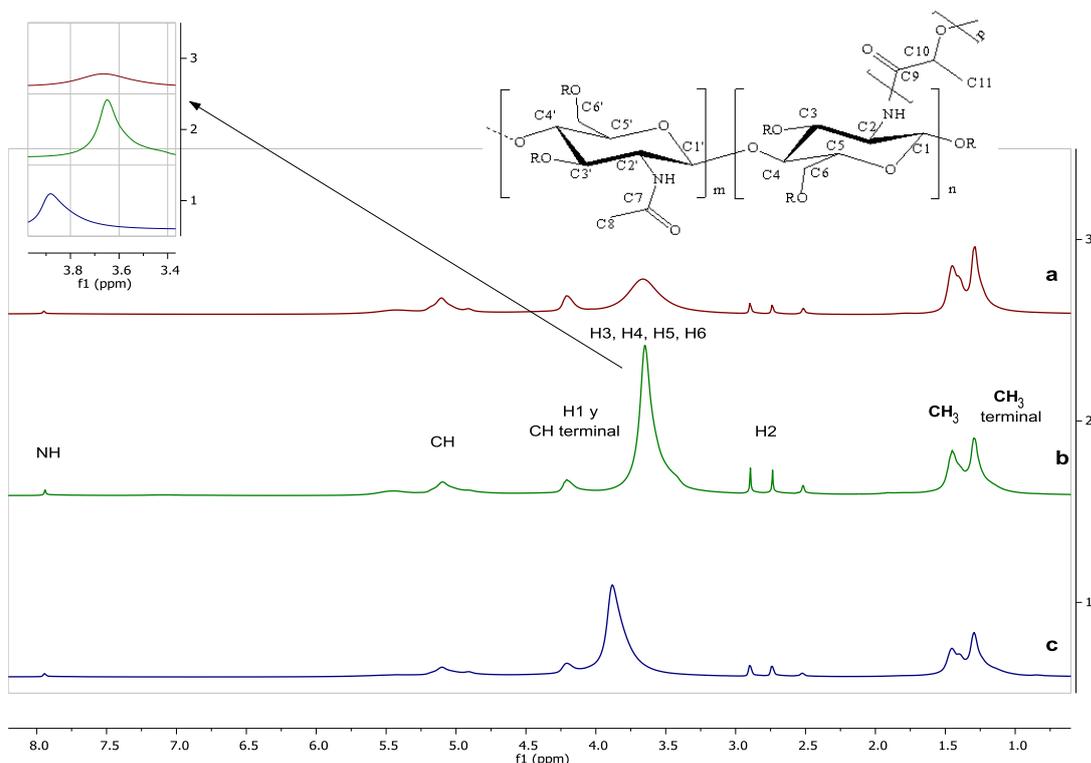


Figura 17. Espectros de ^1H RMN en gel, DMSO-d_6 , de los copolímeros sintetizados a) sin catalizador, b) con octoato de estaño y c) con enzima YLL.

3.4 Transiciones térmicas por calorimetría diferencia de barrido modulado (MDSC).

En el termograma MDSC de los injertos sintetizados se observa (Figura 18) la transición vítrea (T_g) entre 48 - 53 °C que corresponde a las cadenas del PLA injertadas en el quitosano; el copolímero con la T_g mayor es el sintetizado con octoato de estaño. Mientras tanto, la T_g del quitosano se presenta en 208 °C y cuando se injerta el PLA baja la transición vítrea hasta un intervalo de 124 a 130 °C, de acuerdo con Suyatma *et al.* [66], que reportan la T_g en un intervalo de 149-144 °C. Tan solo cuando se hace una mezcla entre el quitosano y el PLA, la adición del quitosano influye demasiado en la cristalización del PLA cristalizable, disminuye esta fase, por lo tanto, estos polímeros son

Capítulo 3

parcialmente miscibles e interactúan a través de puentes de hidrógeno intermoleculares como lo muestran Chen *et al.* [77]

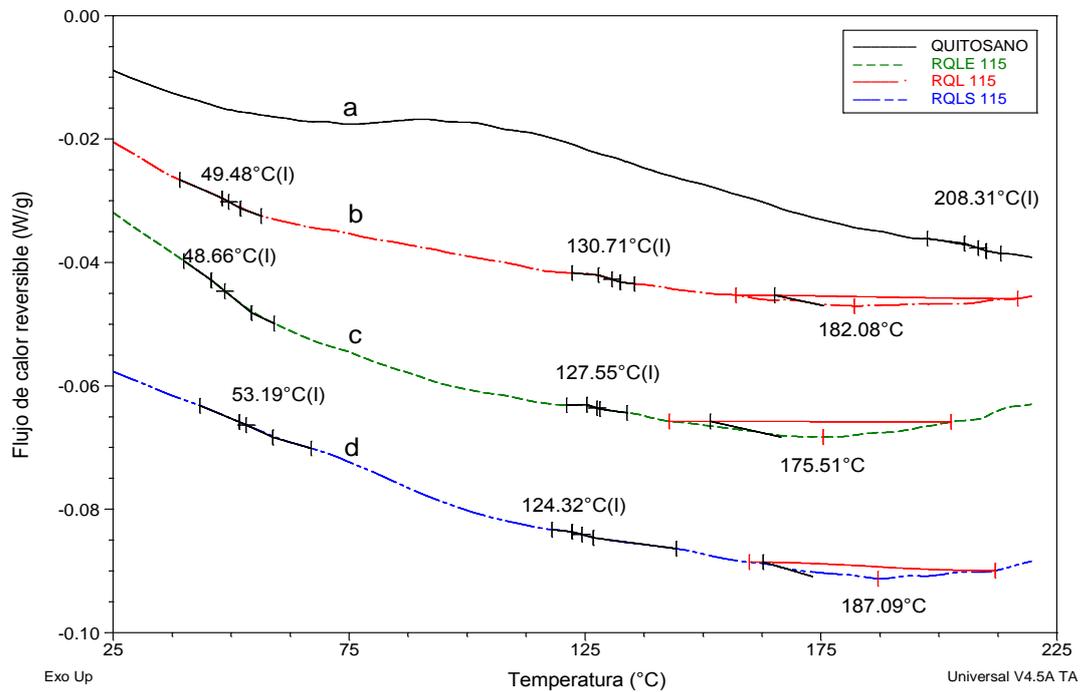


Figura 18. Termogramas MDSC de los copolímeros QL, QLE y QLS todos con la proporción 1:15 quitosano:lactida.

En el termograma del PLA (Figura 19) se observa la transición vítrea de éste polímero a una temperatura de 58 °C, el siguiente evento térmico es la cristalización en 114 °C la cual es exotérmica y finalmente una señal endotérmica en 172 °C que corresponde a la fusión del material.

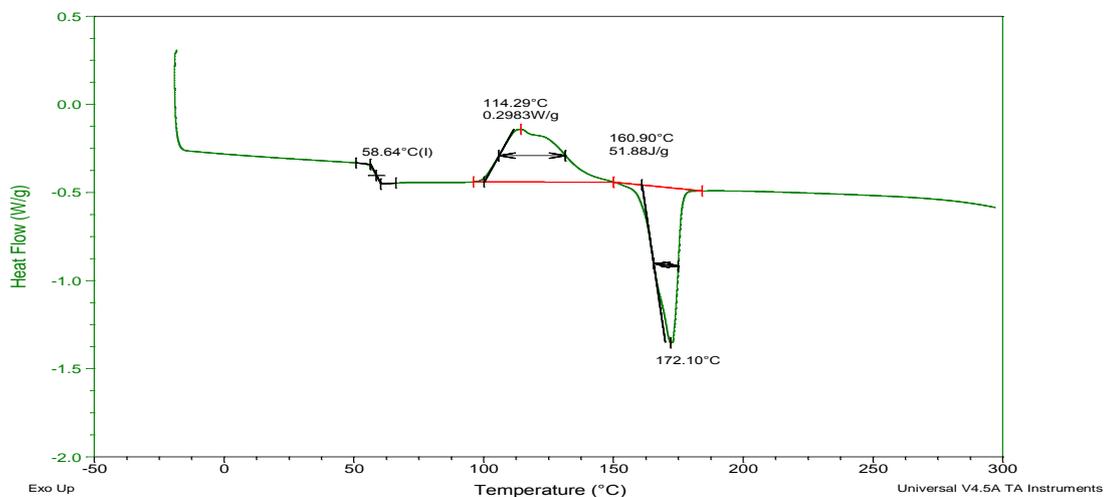


Figura 19. Termograma DSC del PLLA

Resultados y Análisis

El quitosano tiene puentes de hidrógeno intra e intermoleculares muy fuertes, por lo tanto, el punto de fusión es más alto que la temperatura de descomposición. Cuando la lactida se injerta sobre el quitosano los puentes de hidrógeno que estaban presentes en este disminuyen, debido a que la lactida se injerta en los grupos $-NH_2$ y $-OH$ del polisacárido y, por lo tanto, disminuyen los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, como consecuencia, el injerto presenta una temperatura de fusión menor que la temperatura de descomposición. Todos los copolímeros sintetizados presentaron un evento endotérmico entre 174 y 187 °C (que se pueden observar en el apéndice) debido a una posible temperatura de fusión, de acuerdo con Liu *et al.* [49] y Luckachan *et al.* [53]

Es importante notar la tendencia que presentan la temperatura de fusión (T_f) y la entalpía (ΔH) de los copolímeros de injerto, conforme aumenta el porcentaje de injerto sobre el quitosano también lo hacen la T_f y su ΔH (Tabla 10). De acuerdo con los resultados de 1H RMN y los de MDSC se obtiene una mayor cantidad de injerto en el QLE y las cadenas más largas se forman en el injerto QLS.

Tabla 10. Transiciones relevantes y entalpías de los copolímeros de injerto determinadas por MDSC

Muestra	T_{g1} °C	T_{g2} °C	T_f °C	ΔH J/g
Quitosano	-	208.31	-	-
QL 1:5	-	143.44	176.84	0.839
QL 1:15	49.45?	130.68	182.07	1.095
QLE 1:5	47.06?	137.1	174.73	1.359
QLE 1:15	48.3?	127.56	175.51	1.719
QLS 1:5	49.68?	131.18	187.54	0.827
QLS 1:15	53.21?	124.30	187.00	0.968

La señal endotérmica que muestra el copolímero de injerto varía de 174 °C, cuando se utiliza el biocatalizador, a 187 °C cuando se usa el octoato de estaño. Esta transición coincide con la temperatura de fusión del homopolímero de PLA (170 a 180 °C). La señal que se observa es amplia y pequeña, por lo que se tiene baja cristalinidad, muy conveniente para la aplicación, ya que, el tiempo de degradación será menor. La literatura reporta [53] que la transición observada en el copolímero de injerto corresponde a la temperatura de fusión de las cadenas del PLA en el copolímero.

3.5 Degradación térmica por termogravimetría (TGA).

Se observa el termograma de TGA y DTG del PLA (Figura 20) donde se muestra su estabilidad térmica. La primera pérdida de casi 4 % en peso del PLA que ocurre a los 220 °C se asocia a la pérdida de las moléculas de agua que se absorben en el material debido a la humedad ambiental y a la presencia de moléculas de disolvente remanente en el material, ya que comienza a perder peso muy lentamente a partir de los 60 °C. La temperatura de descomposición es, aproximadamente, de 345 °C, en 367 °C donde se ha perdido el 63.58 % de su peso, presenta la máxima velocidad de descomposición, y a 400 °C ya se ha perdido el 96.79 % de la muestra.

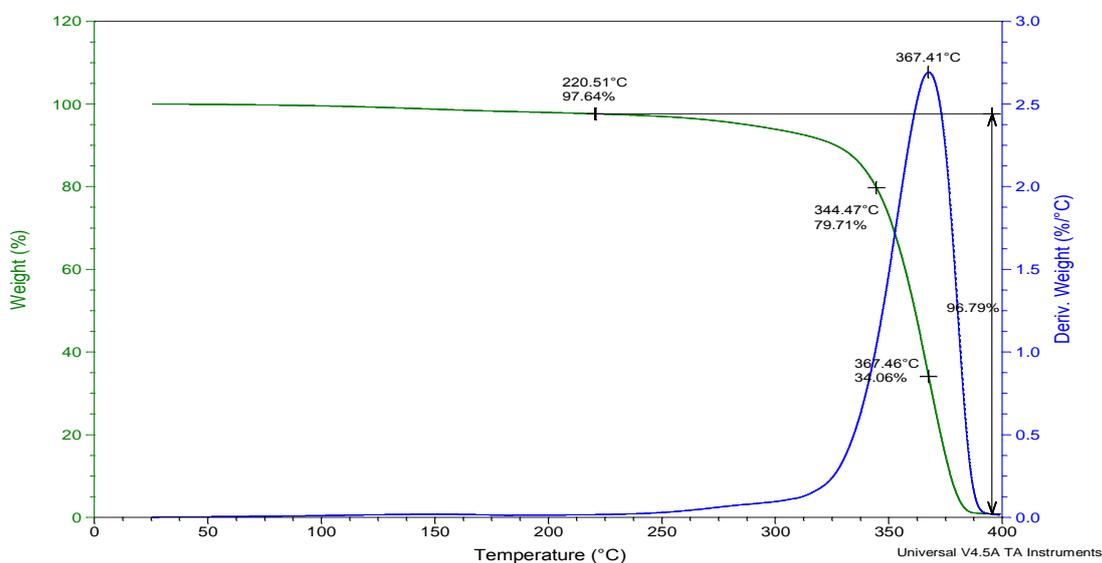


Figura 20. Termograma de TGA y DTG del PLA.

Se observa el termograma de TGA y DTG del quitosano (Figura 21), la primera pérdida de casi el 5 % ocurre alrededor de los 135 °C, la cual se atribuye a la presencia de humedad en la muestra que inicia a los 50 °C. Debido a la facilidad con la cual forma enlaces de tipo puente de hidrógeno con los grupos hidroxilos y aminas de la estructura del quitosano. Posteriormente se observa la temperatura de descomposición del quitosano a los 270 °C, aproximadamente. Enseguida presenta una rápida descomposición a los 295 °C perdiendo 25 % de su peso. A partir de este punto, la descomposición es un poco más lenta y pierde un 20 % de peso más, por lo que, finalmente, se tiene un 45 % en peso del residuo de descomposición.

Resultados y Análisis

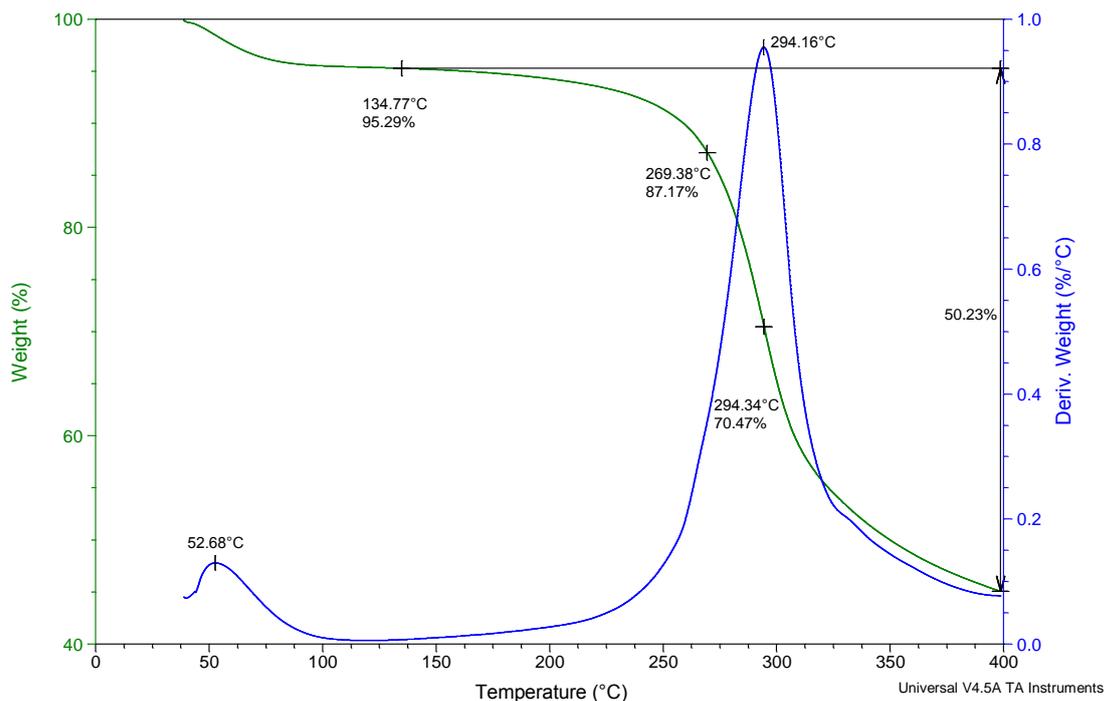


Figura 21. Termograma de TGA y DTG del quitosano.

Se puede observar el TGA con su respectiva derivada del injerto sintetizado sin catalizador en la mayor proporción QL 1:15 (Figura 22). El evento térmico se asocia a la desorción de agua del material, con una pérdida en peso del 1.3 %, atribuido al agua remanente que no se pudo eliminar completamente en el secado. El segundo evento térmico se debe a la eliminación de disolvente, en este caso DMF, con una pérdida del 4.6 % en peso. El tercer evento térmico comenzó en 131 °C con un máximo en 172 °C y una pérdida de 9.3 % en peso, este cambio se asoció a la degradación de oligómeros del PLA de acuerdo con Luckachan *et al.* y Avérous. [7, 53]

En 211 °C se observa el inicio de la degradación, en 229 °C presenta un aumento en la velocidad de degradación perdiendo del 11 % y al 28 % en peso hasta los 267 °C. Esta pérdida se debe a la descomposición de los oligómeros del PLA, además de los efectos de la estabilidad térmica de los copolímeros de injerto. Se observa que todos los copolímeros tienen una temperatura de descomposición menor que la del quitosano 270 °C.

Se observa en los resultados que la estabilidad térmica del quitosano-g-PLA decrece en comparación a la estabilidad térmica original del quitosano. El injerto de las cadenas de PLA en la estructura del polisacarido podría interrumpir la estructura cristalina del

Capítulo 3

quitosano, especialmente por la pérdida de los puentes de hidrógeno que existían entre las cadenas del quitosano antes del injerto. Los tres injertos sintetizados presentaron un termograma similar (se puede observar en el apéndice). Para finalizar a los 400 °C se tiene un 81.6 % de pérdida en peso del copolímero.

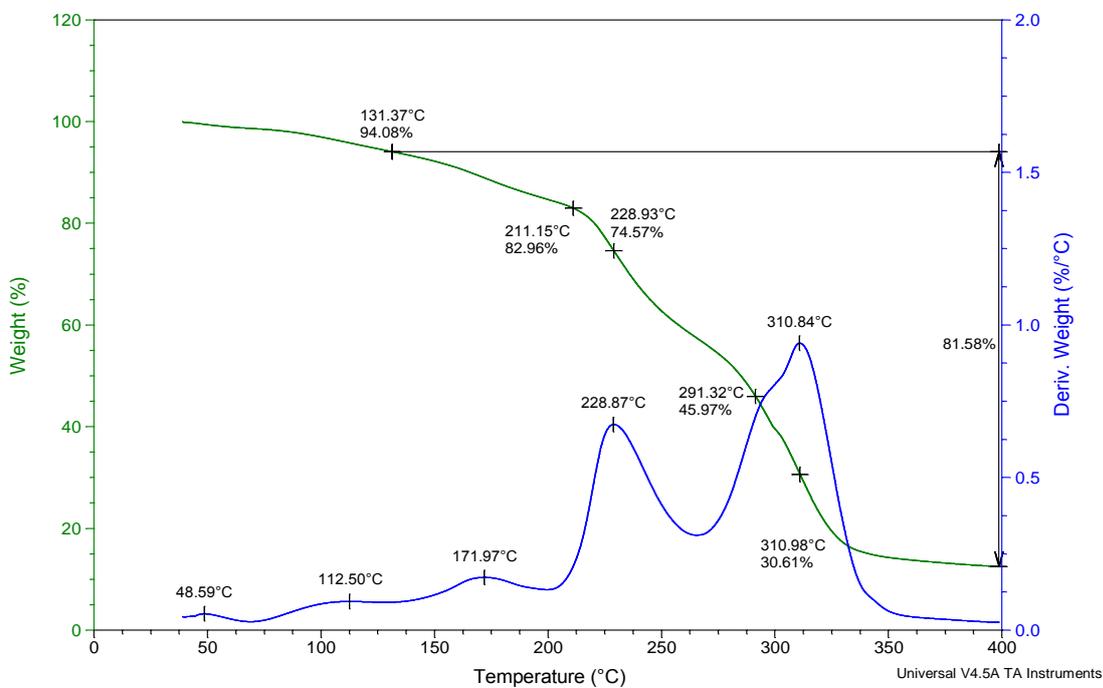


Figura 22. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:15 sin el uso de catalizador.

Se observa el termograma de TGA con su respectiva derivada DTG del injerto sintetizado con biocatalizador de enzima lipasa de *Yarriwia Lipolytica* QLE 1:15 (Figura 23). El primer evento térmico se asocia a la desorción de agua del material, con una pérdida en peso del 1.5 %, aproximadamente. El segundo evento térmico se atribuye a la eliminación de disolvente DMF, con una pérdida del 4.4 % en peso. El tercer evento térmico comenzó en 140 °C con un máximo en 179 °C y una pérdida de 6.7 % en peso, este evento puede pertenecer a la degradación de oligómeros del PLA. Es importante hacer notar que este máximo alrededor de los 179 °C, solo se presentó en este copolímero de los sintetizados con enzima, en los otros dos casos se observan hombros en vez de señales resueltas (se pueden ver los termogramas en el apéndice).

En 238 °C se observa el inicio de la degradación, en 260 °C presenta un aumento en la velocidad de degradación perdiendo el 25 % en peso, ésta pérdida se debe a los oligómeros del PLA además de los efectos de la estabilidad térmica de los copolímeros

Resultados y Análisis

de injerto. Y, para finalizar, en 400 °C se observa la pérdida del 78.8 % en masa del copolímero.

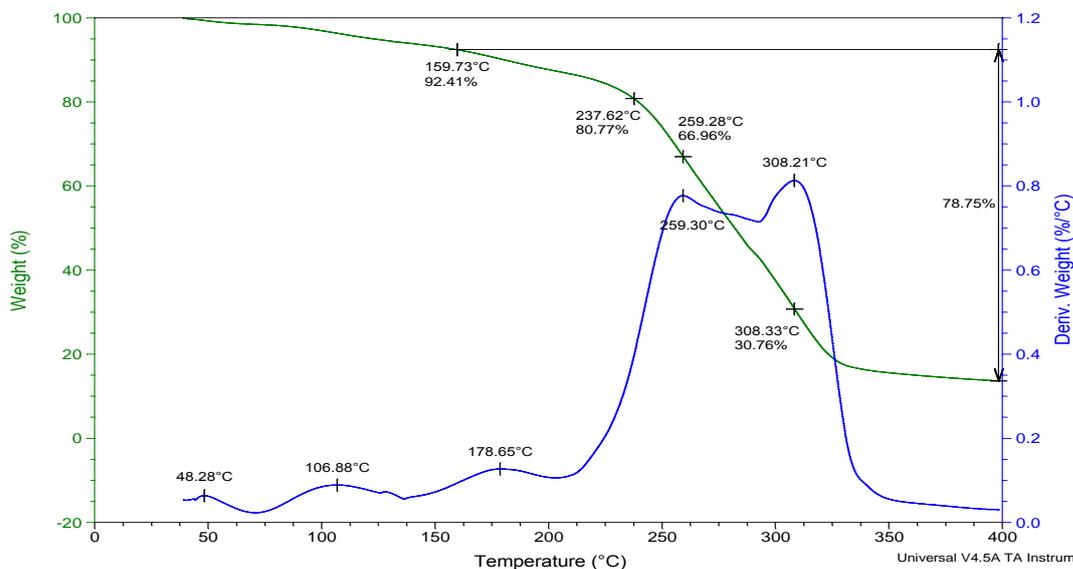


Figura 23. Termograma TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:15 sintetizado con enzima YLL.

Se observa el TGA y DG del copolímero de injerto de QLS 1:15 sintetizado con octoato de estaño (Figura 24). Como se ha mencionado en los termogramas anteriores, el primer evento térmico corresponde a la humedad con una pérdida en peso del 1.5 % aproximadamente. El segundo evento térmico se debe a la DMF, con una pérdida del 3.5 % en peso. El tercer evento térmico comenzó en 142 °C, no se observa un cambio de pendiente evidente alrededor de 179 °C, como en los termogramas de los copolímeros sintetizados sin catalizador, pero se observa un hombro en el copolímero QLS 1:5. En 210 °C se observa la temperatura de descomposición con un máximo en 232 °C y 23 % de pérdida en peso, esta pérdida se debe a los oligómeros del PLA además de los efectos de la estabilidad térmica de los copolímeros de injerto. Después de este punto la degradación se va haciendo lenta hasta los 300 °C en donde se observa otro máximo, a diferencia del compuesto QLS 1:5 que presenta dos máximos alrededor de 278 °C y 308 °C (pueden verse en el apéndice los otros termogramas). Finalmente, a los 400 °C se observa el 77.8 % de pérdida en peso del copolímero QLS 1:15.

Capítulo 3

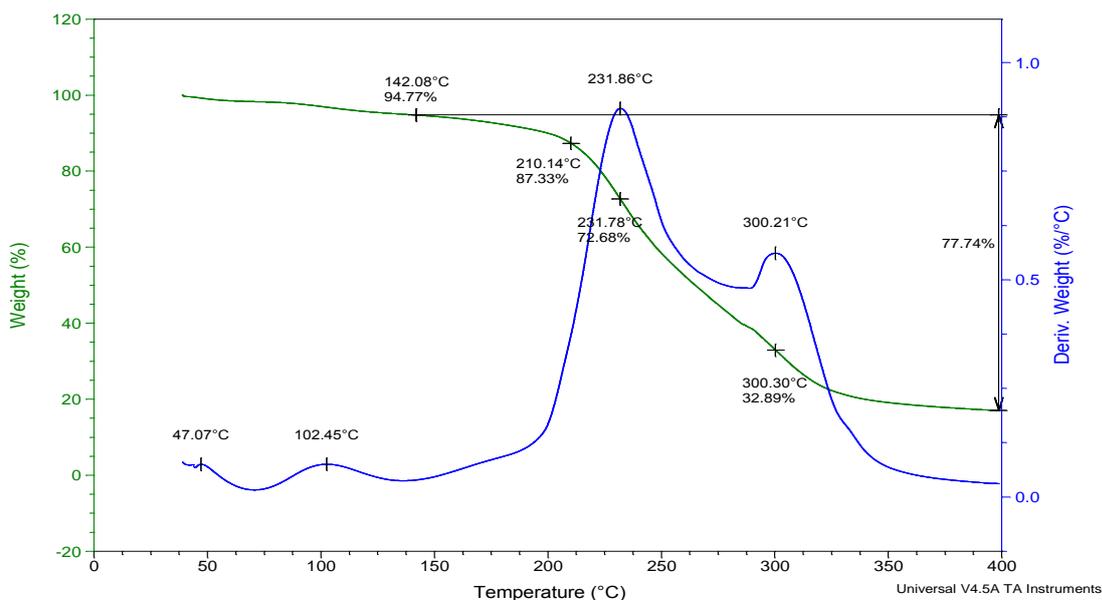


Figura 24. Termograma TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:15 sintetizado con Sn(Oct)₂.

Se presenta el termograma TGA y DTG de los copolímeros de injerto QL sin catalizador (Figura 25). Como ya se comentó, antes de los 175 °C corresponde a la pérdida de humedad, disolvente y algunos oligómeros. En el intervalo de 190 a 260 °C se observan un máximo que el quitosano no presenta, este corresponde a las cadenas del PLA en el copolímero. Este máximo va aumentando en intensidad conforme aumenta el injerto de PLA en el quitosano. El máximo que está en el intervalo de 260 a 340 °C corresponde a las cadenas de quitosano, este se va desplazando a temperaturas mayores.

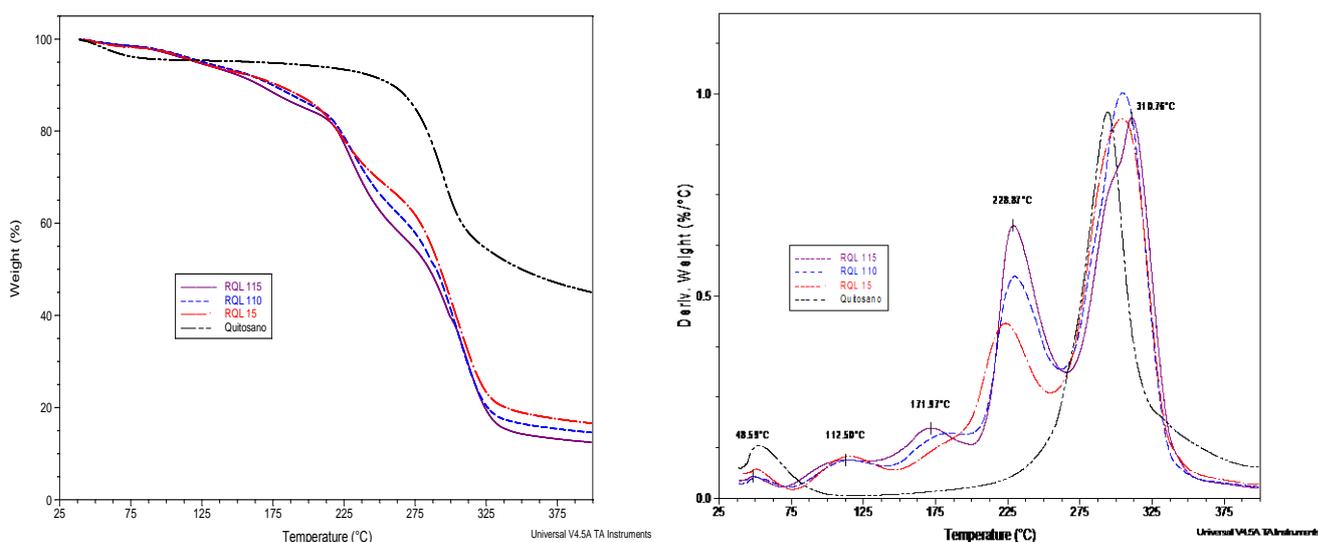


Figura 25. Termogramas TGA y DTG de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador (QL).

Resultados y Análisis

En base en el análisis termogravimétrico se cuantificó la cantidad de PLA que se injerta en el quitosano. En la Tabla 11 se presenta el porcentaje aproximado de PLA que se logró injertar en el quitosano, en donde se observa una tendencia clara, a mayor proporción de lactida aumenta la cantidad de PLA que se injerta.

Se observa que el proceso sin catalizador fue donde se obtuvo la menor cantidad de injerto 38%, seguido del proceso enzimático, en donde se logró injertar más del 45%, y finalmente, el proceso catalítico por vía organometálica en donde se logró un injerto del 53%.

Tabla 11. Porcentaje de PLA injertado en quitosano por termogravimetría.

Muestra	Injerto de PLA %
QL 15	25.83
QL110	31.58
QL115	37.50
QLE 15	25.93
QLE 110	43.71
QLE 115	45.49
QLS 15	34.49
QLS 110	40.46
QLS 115	52.58

Capítulo 4. Conclusiones

Se logró sintetizar el copolímero de quitosano-g-polilactida, Q-g-PLA, por un nuevo procedimiento con baja toxicidad, mediante polimerización por apertura de anillo de lactida, con la enzima lipasa de *Yarrowia Lipolytica* como biocatalizador.

Se comprobó, mediante espectroscopías en el infrarrojo y resonancia magnética nuclear de ^{13}C y de protón, que se logró el injerto químico del PLA en la estructura del quitosano y que tanto el grupo $-\text{OH}$ y el $-\text{NH}_2$ del quitosano participaron en la reacción química como el carbonilo que resulta al abrirse el anillo de la lactida.

Con base en el análisis termogravimétrico, el copolímero quitosano-g-poli(lactida) sintetizado sin catalizador comenzó a degradarse térmicamente antes que el sintetizado con el biocatalizador. En tanto el copolímero sintetizado con el octoato de estaño comenzó a degradarse a mayor temperatura que los otros copolímeros.

De acuerdo con los análisis de TGA, MDSC y ^1H RMN, a medida que se aumenta la proporción de lactida en la reacción, aumenta la cantidad de lactida injertada sobre el quitosano. Además, se comprobó por TGA que el tipo de catalizador influye significativamente en la cantidad de lactida injertada: con la enzima lipasa de *Yarrowia*

Capítulo 4

Lipolytica se logró un injerto de 45 % y con el octoato de estaño se logró un injerto de 52 %, de hecho con este último se obtuvieron cadenas de PLA más largas.

La disminución de la T_g del quitosano (208 °C) respecto a la T_g de los injertos (130 °C) puede deberse a la eliminación de algunos puentes de hidrógeno que existían entre las cadenas del quitosano, además de que el PLA injertado proporciona mayor flexibilidad a las cadenas del quitosano, por lo que la T_g del copolímero se reduce sensiblemente.

Perspectivas

Secar y purificar el quitosano y la lactida para aumentar el porcentaje de injerto. Además, realizar la reacción en atmósfera inerte.

Modificar la concentración de enzima y los tiempos de reacción de la síntesis, ya que las enzimas necesitan tiempos más prolongados para obtener mayores rendimientos.

Para caracterizar los injertos sobre el quitosano se utilizaría la biotecnología. De manera que, la enzima quitinasa degrade el quitosano. Para luego cuantificar por GPC y RMN las cadenas de PLA que fueron injertadas en el polisacárido.

Realizar una síntesis alterna. Primero sintetizar oligómeros de PLA y luego injertarlos sobre el quitosano para conocer de una manera más precisa la longitud de los oligómeros injertados en el quitosano.

Realizar pruebas biológicas de citotoxicidad y proliferación celular de fibroblastos para comprobar que el material es apto para el crecimiento celular de tejido conectivo.

Procesar el copolímero por electrohilado ya que han reportado que tiene buena histocompatibilidad y es un material potencial en la ingeniería de tejidos.

Referencias

- [1] Bose S, Bandyopadhyay A. Chapter 1 - Introduction to Biomaterials. In: Bose AB, editor. *Characterization of Biomaterials*. Oxford: Academic Press; 2013. p. 1-9.
- [2] Piña Barba MC, Medina Molotla N. Los materiales de implante. *Materiales Avanzados*. México: UNAM; 2004. p. 6-12.
- [3] Ratner BD. 9.21 - Polymeric Implants. In: Möller KM, editor. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 397-411.
- [4] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004;428:487-92.
- [5] Tang X, Thankappan SK, Lee P, Fard SE, Harmon MD, Tran K, et al. Chapter 21 - Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Deng SGKTL, editor. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Oxford: Elsevier; 2014. p. 351-71.
- [6] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007;32:762-98.
- [7] Avérous L. Chapter 21 - Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. In: Gandini MNB, editor. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 433-50.
- [8] Gawkrödger DJ. *Dermatology an illustrated colour text*. Third ed: Elsevier Limited; 2002.
- [9] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*. 2007;28:5100-13.
- [10] Park BK, Kim M-M. Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11:5152-64.
- [11] Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 1996;13:383-420.
- [12] Pacheco N, Garnica-Gonzalez M, Gimeno M, Barzana E, Trombotto S, David L, et al. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*. 2011;12:3285-90.
- [13] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011;36:981-1014.
- [14] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003;24:2339-49.
- [15] Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000;46:1-27.

Referencias

- [16] Cira LA, Huerta S, Hall GM, Shirai K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 2002;37:1359-66.
- [17] Lamarque G. New Route of Deacetylation of α - and β -Chitins by Means of Freeze–Pump Out–Thaw Cycles. *Biomacromolecules*. 2005;6:1380-8.
- [18] Kafetzopoulos D, Thireos G, Vournakis JN, Bouriotis V. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:8005-8.
- [19] Pacheco López NA. EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE QUITINA PARA LA PRODUCCIÓN DE QUITOSANOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN. México, D. F.: Universidad Autónoma Metropolitana; 2010.
- [20] Hudson SM, Smith C. Polysaccharides: Chitin and Chitosan: Chemistry and Technology of Their Use As Structural Materials. In: Kaplan D, editor. *Biopolymers from Renewable Resources*: Springer Berlin Heidelberg; 1998. p. 96-118.
- [21] Pillai CKS, Paul W, Sharma PC. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009;34:641-8.
- [22] Sashiwa H, Aiba S-i. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2004;29:887-908.
- [23] Kurita K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers. *Mar Biotechnol*. 2006;8:203-26.
- [24] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31:603-32.
- [25] Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*. 2009;76:167-82.
- [26] Avérous L. Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. In: Belgacem MN, Gandini A, editors. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*: Elsevier; 2008. p. 433-50.
- [27] Auras R, Harte B, Selke S. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4:835-64.
- [28] Garlotta D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *J Polym Environ*. 2001;9:63-84.
- [29] Yoo DR, Kim D, Lee DS. Synthesis of lactide from oligomeric PLA: Effects of temperature, pressure, and catalyst. *Macromolecular Research*. 2006;145:510-6.
- [30] Fuentes DA, Díazgranados MA, Perilla JE. MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE LACTURO DE ALTA PUREZA. *REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA*. 2006;35:115-23.
- [31] *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.

Referencias

- [32] Feng H, Dong CM. Preparation and characterization of chitosan-graft-poly (ϵ -caprolactone) with an organic catalyst. *J Polym Sci Part A*. 2006;44:5353-61.
- [33] Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010;101:8493-501.
- [34] Gupta AP, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 2007;43:4053-74.
- [35] Miletić N, Nastasović A, Loos K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. 2012;115:126-35.
- [36] Namekawa S, Suda S, Uyama H, Kobayashi S. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999;25:145-51.
- [37] Linko Y-Y, Wang Z-L, Seppälä J. Lipase-catalyzed linear aliphatic polyester synthesis in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995;17:506-11.
- [38] Varma IK, Albertsson A-C, Rajkhowa R, Srivastava RK. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2005;30:949-81.
- [39] Fickers P, Marty A, Nicaud JM. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2011;29:632-44.
- [40] Carrillo Sancén G. Producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación en medio sólido. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2011.
- [41] Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2001;34:147-230.
- [42] Boughton E, McLennan SV. 6 - Biomimetic scaffolds for skin tissue and wound repair. In: Ruys AJ, editor. *Biomimetic Biomaterials*: Woodhead Publishing; 2013. p. 153-80.
- [43] Mourya VK, Inamdar NN. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*. 2008;68:1013-51.
- [44] Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology* (New York, NY). 2006;8:203-26.
- [45] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31:603-32.
- [46] Jayakumar R, Prabakaran M, Reis RL, Mano JF. Graft copolymerized chitosan—present status and applications. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62:142-58.

Referencias

- [47] Qu X, Wirsén A, Albertsson A-C. Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 1999;74:3186-92.
- [48] Kim JY, Ha CS, Jo NJ. Synthesis and properties of biodegradable chitin-graft-poly(L-lactide) copolymers. *Polym Int*. 2002;51:1123-8.
- [49] Liu Y, Tian F, Hu KA. Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan. *CARBOHYDR RES*. 2004;339:845-51.
- [50] Fujioka M, Okada H, Kusaka Y, Nishiyama S, Noguchi H, Ishii S, et al. Enzymatic synthesis of chitin- and chitosan-graft-aliphatic polyesters. *Macromol Rapid Commun*. 2004;25:1776-80.
- [51] Wu Y, Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan-poly(lactide) graft copolymer. *Carbohydrate Polymers*. 2005;59:165-71.
- [52] Yuan H, Qiao X, Ren J. Synthesis and Application of Chitosan-g-PLLA Copolymers. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2008;45:754-60.
- [53] Luckachan GE, Pillai CKS. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability. *Carbohydrate Polymers*. 2006;64:254-66.
- [54] Liu L, Li Y, Fang Y-e, Chen L. Microwave-assisted graft copolymerization of ϵ -caprolactone onto chitosan via the phthaloyl protection method. *Carbohydrate Polymers*. 2005;60:351-6.
- [55] Wu H, Zhang J, Xiao B, Zan X, Gao J, Wan Y. N-(2-hydroxypropyl)-3-trimethylammonium chitosan-poly(ϵ -caprolactone) copolymers and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83:824-30.
- [56] Liu G-Y, Zhai Y-L, Wang X-L, Wang W-T, Pan Y-B, Dong X-T, et al. Preparation, characterization, and in vitro drug release behavior of biodegradable chitosan-graft-poly(1,4-dioxan-2-one) copolymer. *Carbohydrate Polymers*. 2008;74:862-7.
- [57] Li G, Zhuang Y, Mu Q, Wang M, Fang Ye. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (l-lactic acid) side chains. *Carbohydrate Polymers*. 2008;72:60-6.
- [58] Bing-hong L, Cui-hong Z, Zhu-guo H, Chang-ren Z. Microwave-Assisted Synthesis of a Brush-Like Copolymer of Poly(D,L-Lactide) Grafted onto Chitosan. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 2009 ICBBE 2009 3rd International Conference on 2009. p. 1-3.
- [59] Luo B, Yang J, Zhao J, Hsu C, Li J, Zhou C. Rapid synthesis and characterization of chitosan-g-poly(D,L-lactide) copolymers with hydroxyethyl chitosan as a macroinitiator under microwave irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;125:E125-E31.

Referencias

- [60] Duan K, Chen H, Huang J, Yu J, Liu S, Wang D, et al. One-step synthesis of amino-reserved chitosan-graft-polycaprolactone as a promising substance of biomaterial. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80:498-503.
- [61] Chen H, Fan X, Xia J, Chen P, Zhou X, Huang J, et al. Electrospun chitosan-graft-poly (ϵ -caprolactone)/poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:453-61.
- [62] Shi W, Gu C, Jiang H, Zhang M, Lang M. Effects of amphiphilic chitosan-g-poly(epsilon-caprolactone) polymer additives on paclitaxel release from drug eluting implants. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2014;45:502-9.
- [63] Liu L, Shi A, Guo S, Fang Ye, Chen S, Li J. Preparation of chitosan-g-poly(lactide) graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA. *Reactive and Functional Polymers*. 2010;70:301-5.
- [64] Xie D, Huang H, Blackwood K, MacNeil S. A novel route for the production of chitosan/poly(lactide-co-glycolide) graft copolymers for electrospinning. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 2010;5:065016.
- [65] Li J, Kong M, Cheng XJ, Li JJ, Liu WF, Chen XG. A facile method for preparing biodegradable chitosan derivatives with low grafting degree of poly(lactic acid). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;49:1016-21.
- [66] Suyatma NE, Copinet A, Legin-Copinet E, Fricoteaux F, Coma V. Different Pla Grafting Techniques on Chitosan. *J Polym Environ*. 2011;19:166-71.
- [67] Hu Y, Liu Y, Qi X, Liu P, Fan Z, Li S. Novel bioresorbable hydrogels prepared from chitosan-graft-poly(lactide) copolymers. *Polym Int*. 2012;61:74-81.
- [68] Wang Z, Zheng L, Li C, Zhang D, Xiao Y, Guan G, et al. A novel and simple procedure to synthesize chitosan-graft-polycaprolactone in an ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*. 2013;94:505-10.
- [69] Lu HW, Nie QL, Liu GQ, He H. Synthesis of Biodegradable Chitosan-Poly(D,L-Lactide) Hybrid Amphiphiles via Ring Opening Graft Polymerization for Efficient Gene Carrier. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2013;50:738-46.
- [70] Niu XF, Tian F, Wang LZ, Li XM, Zhou G, Fana YB. Synthesis and characterization of chitosan-graft-poly(lactic acid) copolymer. *Chin J Polym Sci (Engl Ed)*. 2014;32:43-50.
- [71] Yu JX, Yao TY, Zhang YN. Preparation and characterisation of amphiphilic chitosan. *Mater Res Innov*. 2014;18:S4719-S22.
- [72] Barrera-Rivera KA, Peponi L, Marcos-Fernández Á, Kenny JM, Martínez-Richa A. Synthesis, characterization and hydrolytic degradation of polyester-urethanes obtained by lipase biocatalysis. *Polymer Degradation and Stability*. 2014;108:188-94.

Referencias

- [73] Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic Acid Technology. *Advanced Materials*. 2000;12:1841-6.
- [74] Harish Prashanth KV, Kittur FS, Tharanathan RN. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2002;50:27-33.
- [75] Cervera MF, Heinämäki J, Räsänen M, Maunu SL, Karjalainen M, Acosta OMN, et al. Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*. 2004;58:401-8.
- [76] Thakur KAM, Kean RT, Zupfer JM, Buehler NU, Doscotch MA, Munson EJ. Solid State ¹³C CP-MAS NMR Studies of the Crystallinity and Morphology of Poly(l-lactide). *Macromolecules*. 1996;29:8844-51.
- [77] Chen C, Dong L, Cheung MK. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/chitosan blends. *European Polymer Journal*. 2005;41:958-66.
- [78] Cedillo G, Bucio E. Solid State NMR Analysis of Two Grafted Biopolymers. *MRS Online Proceedings Library*. 2015;1767:113-8.

Apéndice

Apéndice

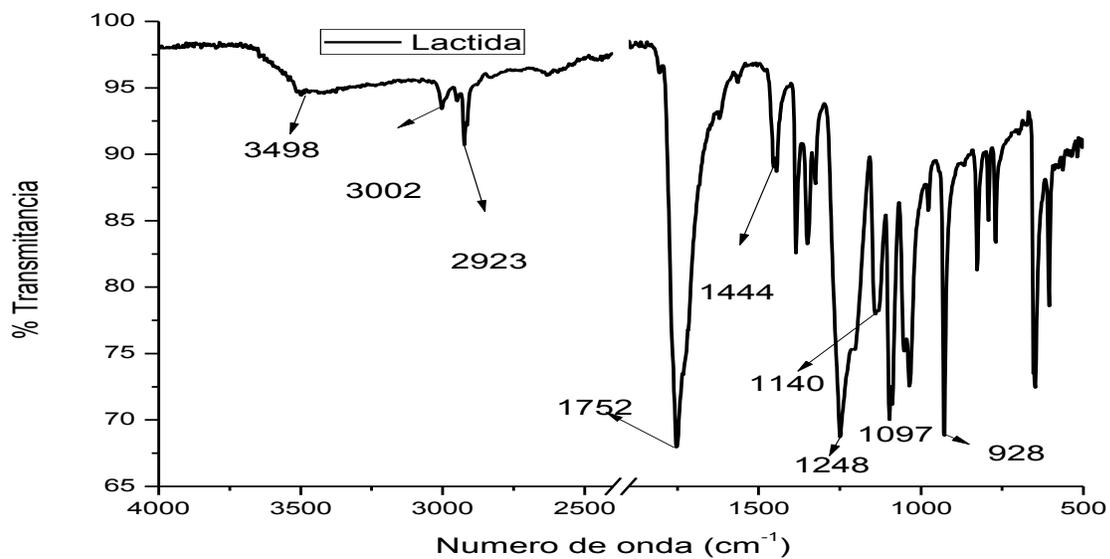


Figura 26. Espectro en el infrarrojo de lactida.

Tabla 12. Bandas de absorción en el infrarrojo de lactida.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Estructura del lactida
3498	-OH	
3002	CH y CH ₃	
2923	CH y CH ₃	
1752	C=O	
1444	CH ₃ asimétrico	
1248	C-O-C	
1097		
928	C-C	

Apéndice

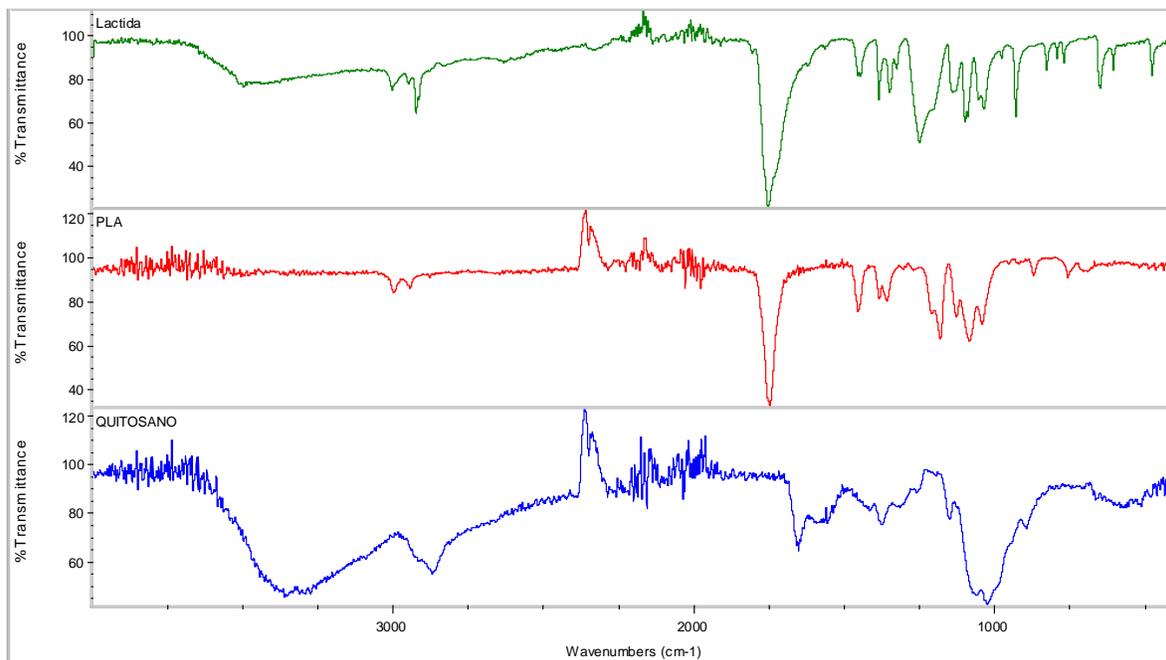


Figura 27. Espectros en el infrarrojo de las materias primas a) lactida, b) PLA y c) quitosano

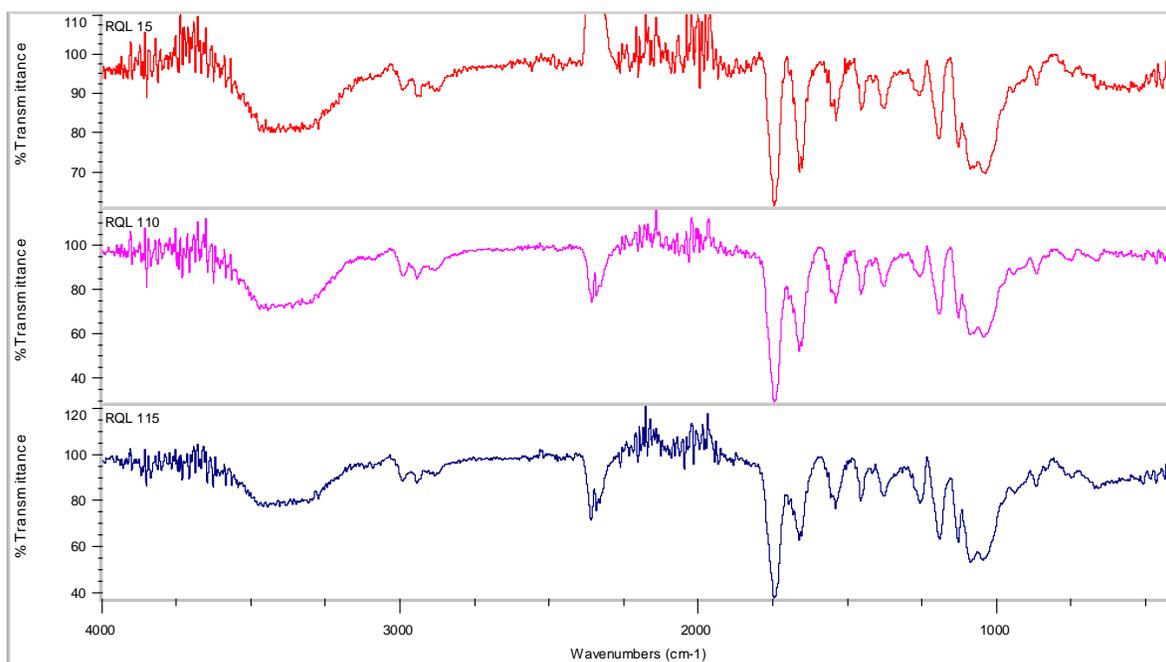


Figura 28. Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15

Apéndice

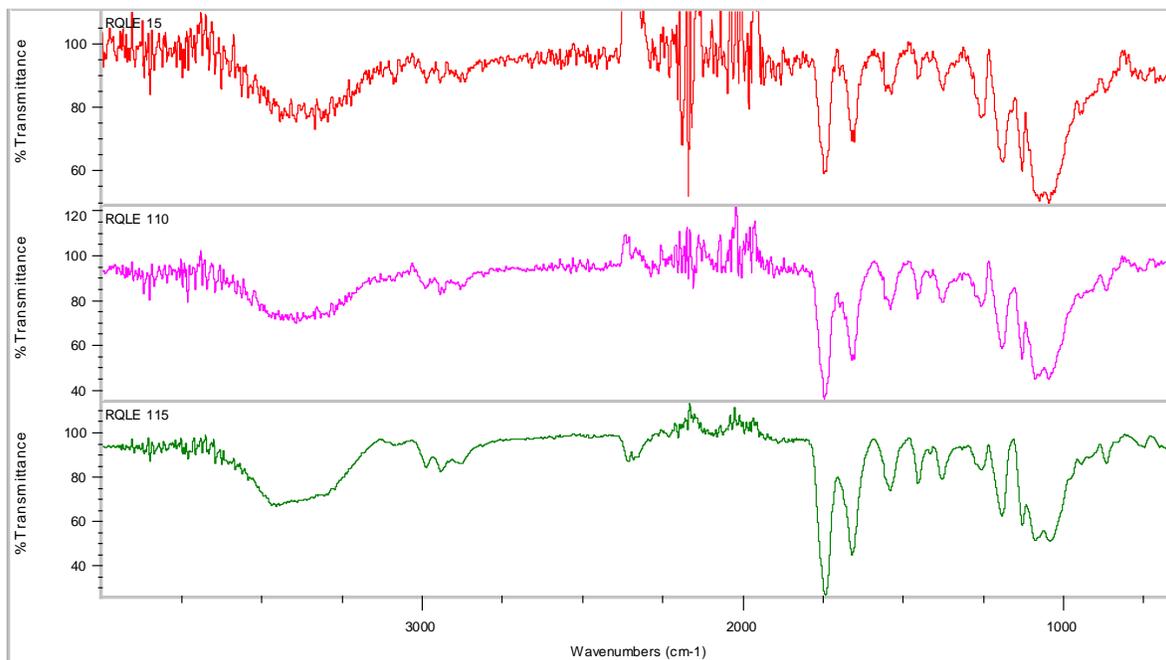


Figura 29 Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados con catalizador enzimático YLL con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15

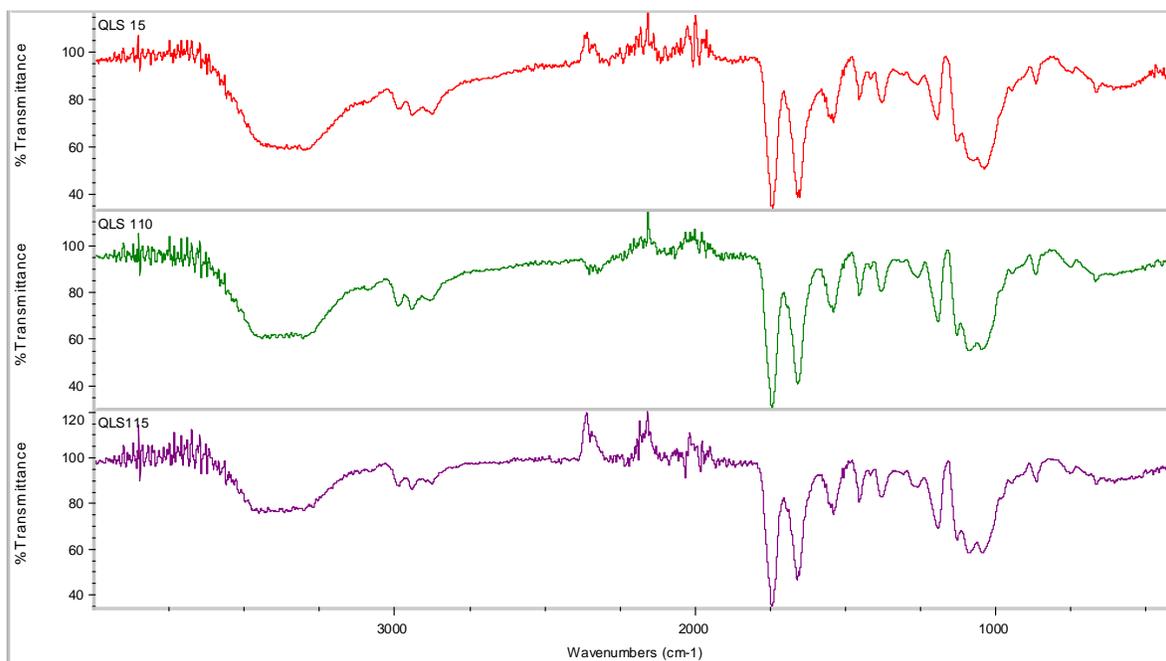


Figura 30. Espectros en el infrarrojo de dos copolímeros de injerto sintetizados con catalizador octoato de estaño con proporciones de a) 1:5, b) 1:10 y c) 1:15

Apéndice

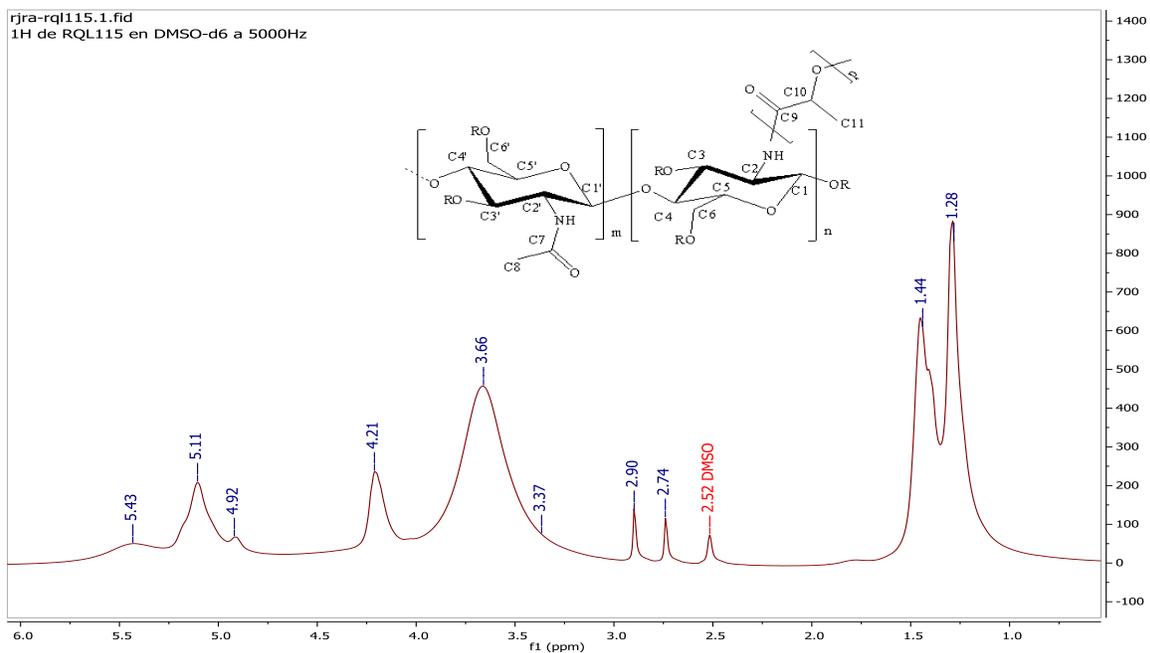


Figura 31. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d₆) del copolímero QL

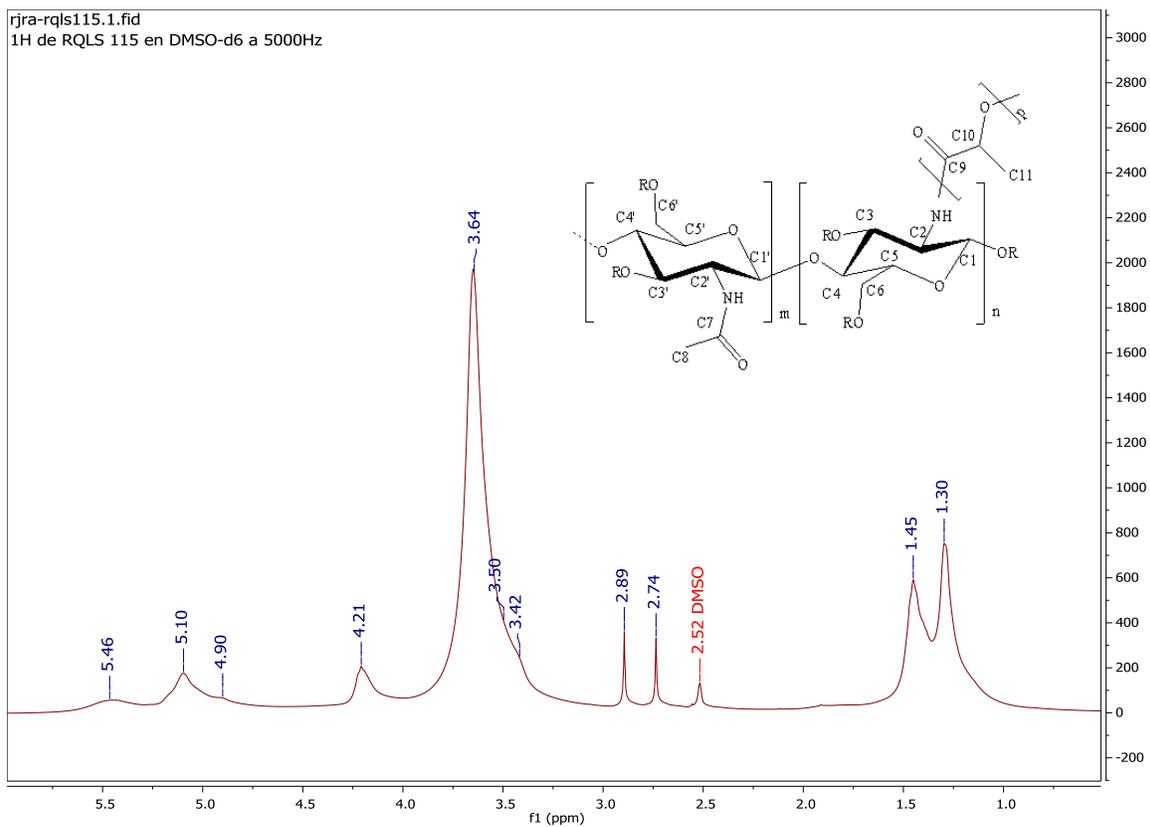


Figura 32. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d₆) del copolímero QLS

Apéndice

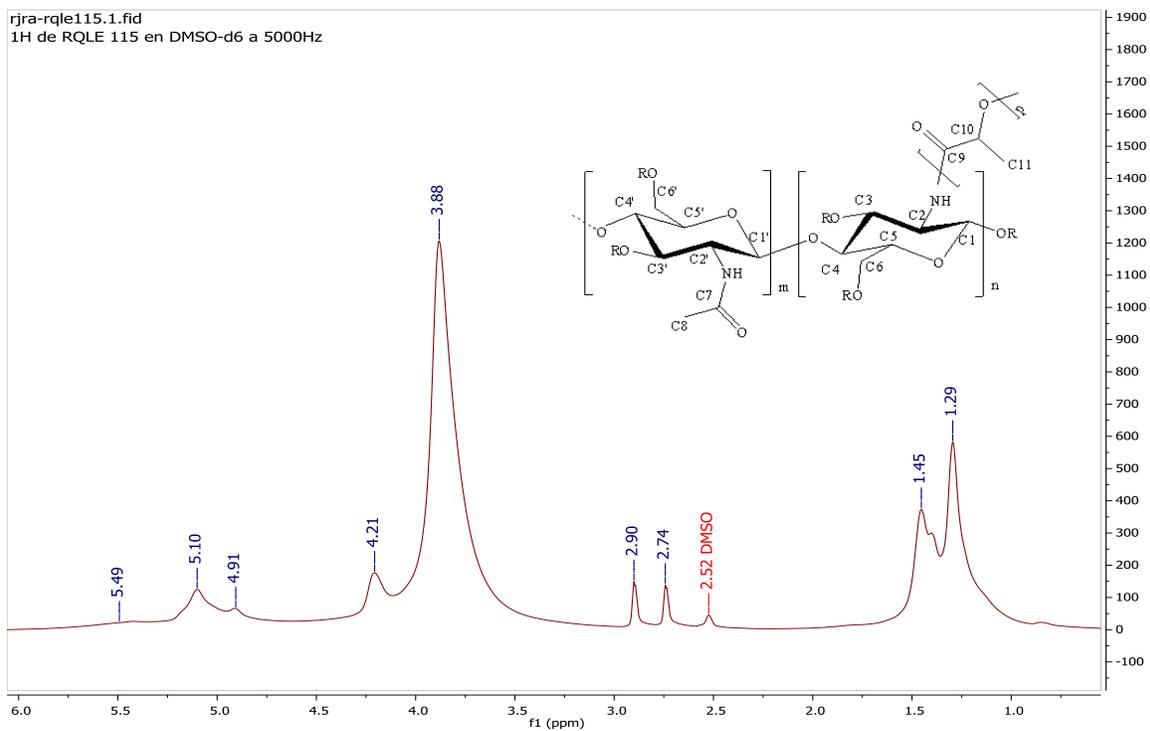


Figura 33. Espectro RMN 1H en gel (DMSO-d₆) del copolímero QLE

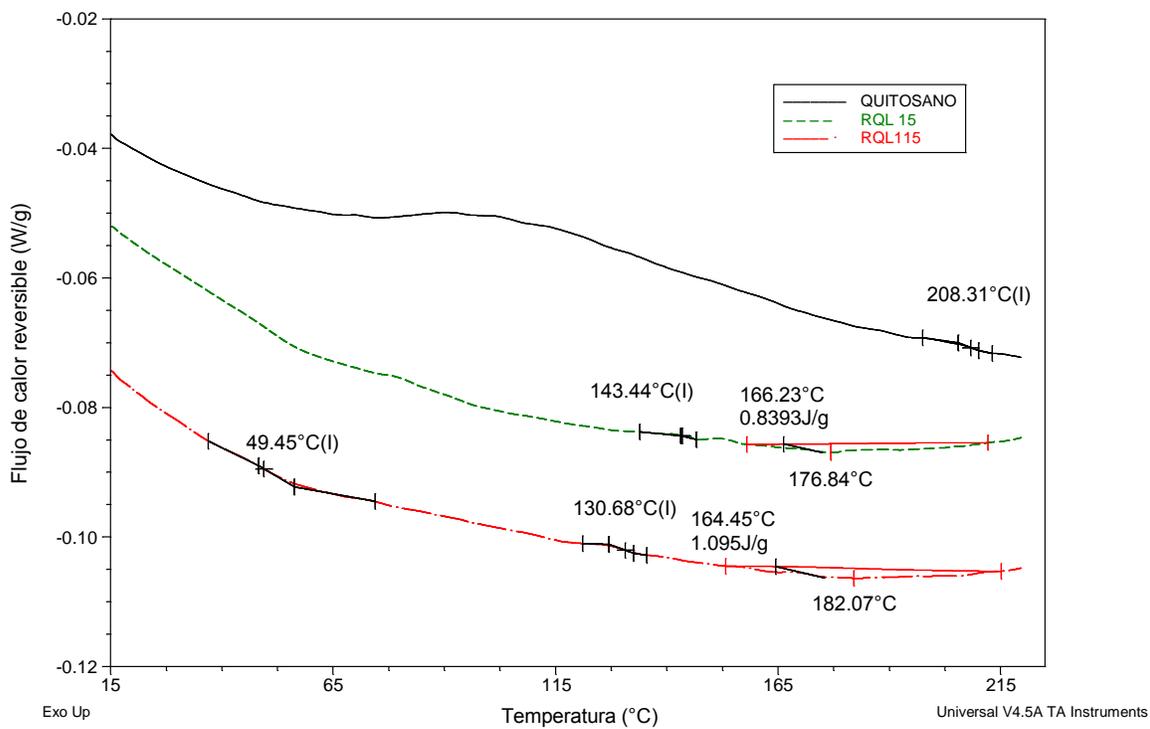


Figura 34. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QL con proporción 1:5 y 1:15

Apéndice

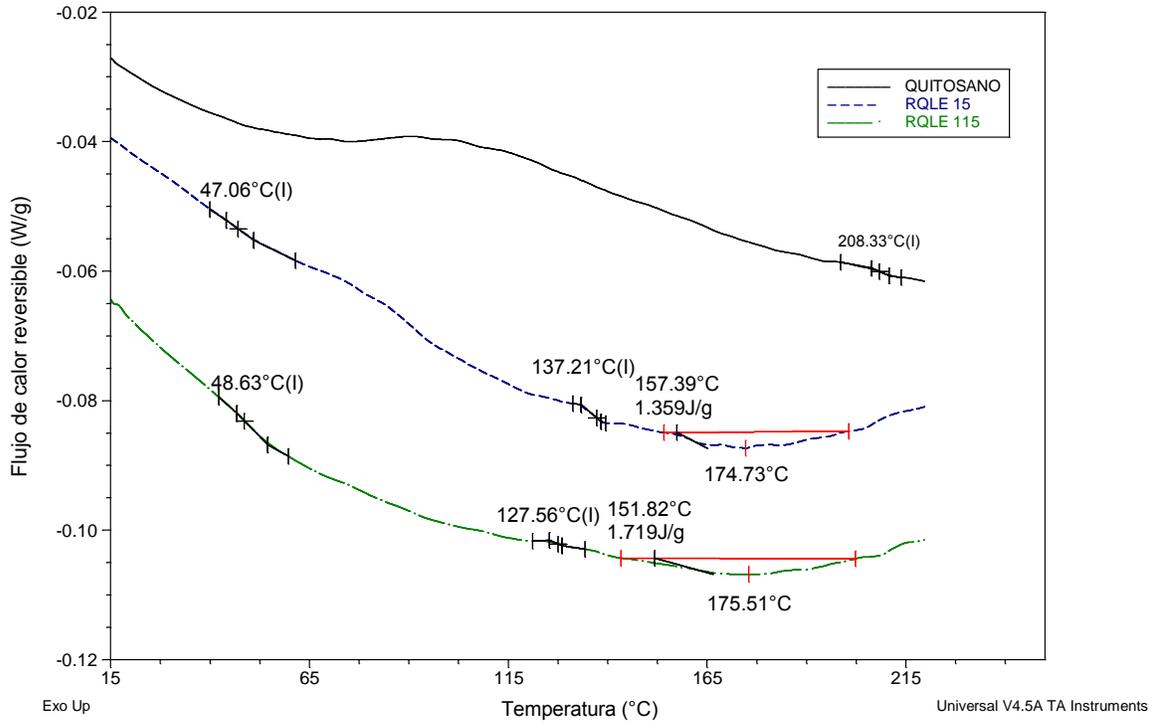


Figura 35. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QLE con proporción 1:5 y 1:15

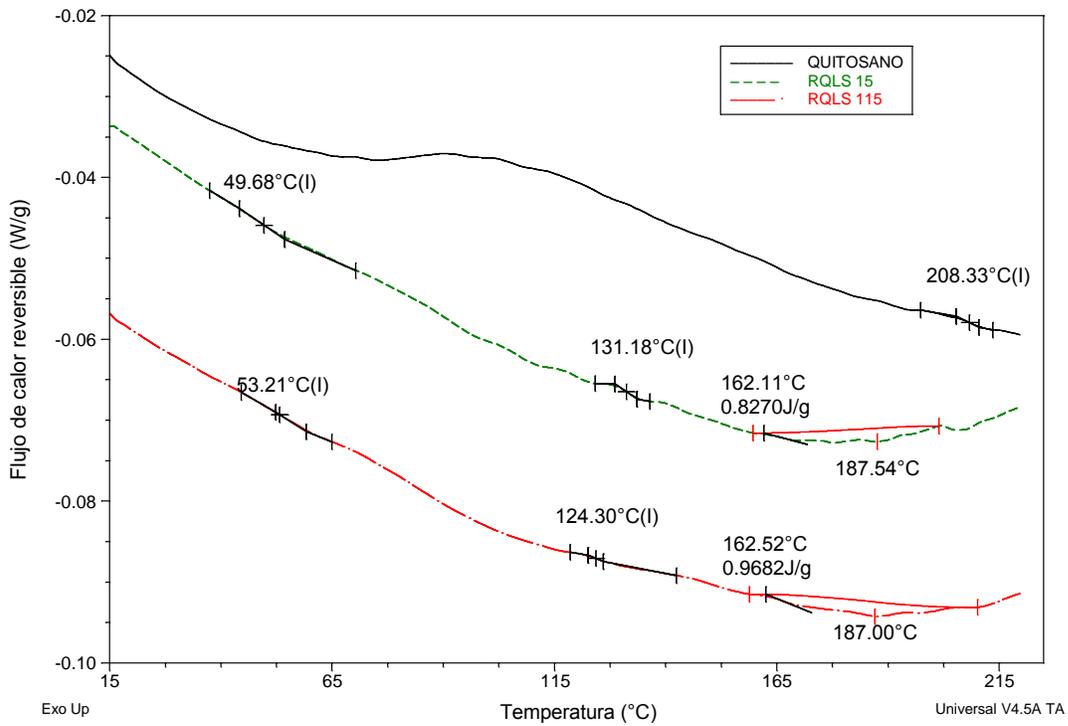


Figura 36. Termograma MDSC del quitosano y los copolímeros de injerto QLS con proporción 1:5 y 1:15

Apéndice

Sample: RQL 15 TGA 10 N2 26ENE15
Size: 8.1420 mg

TGA

File: C:\...TGA\RQL 15 TGA 10 N2 26ENE15.00
Operator: D.Cabrero
Run Date: 26-Jan-2015 21:41
Instrument: TGA Q5000 V3.15 Build 263

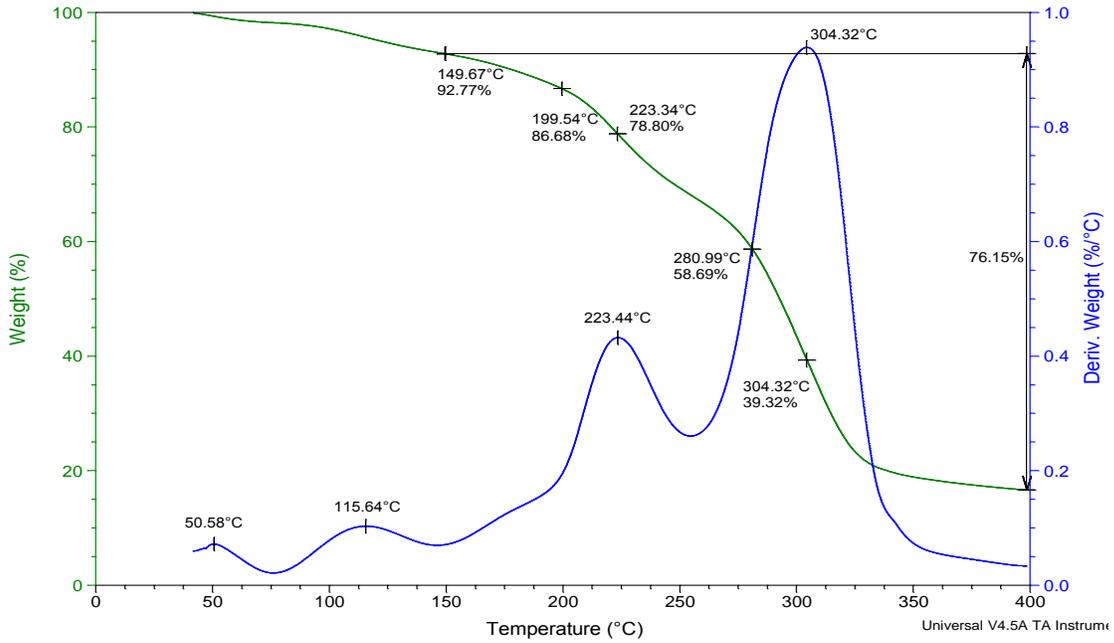


Figura 37. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:5

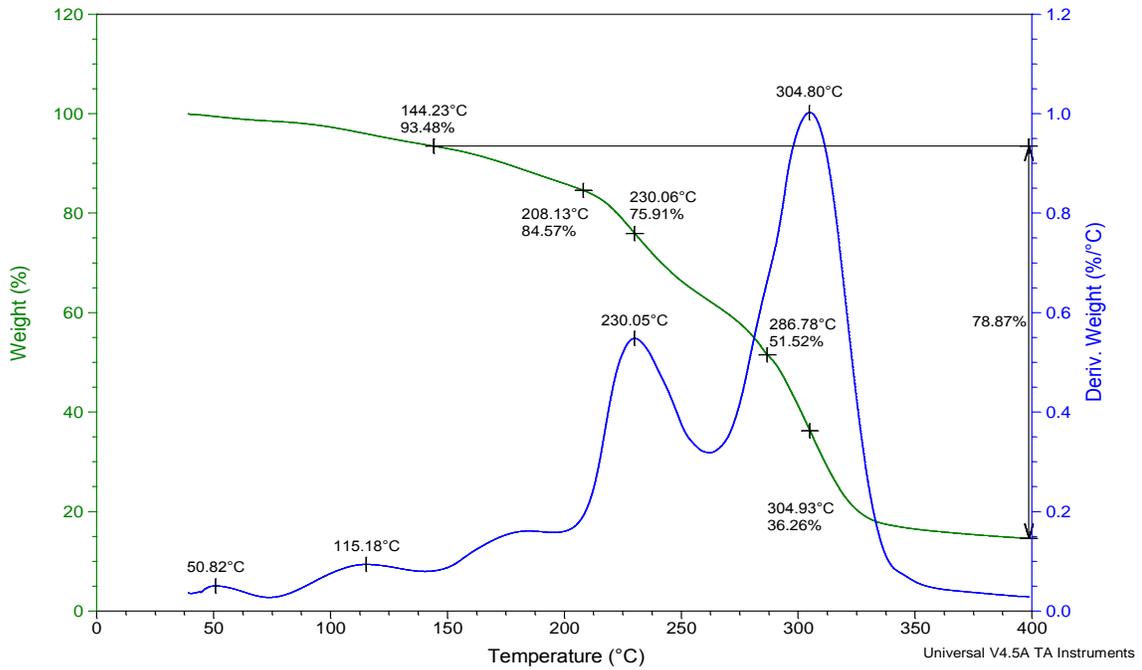


Figura 38. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:10

Apéndice

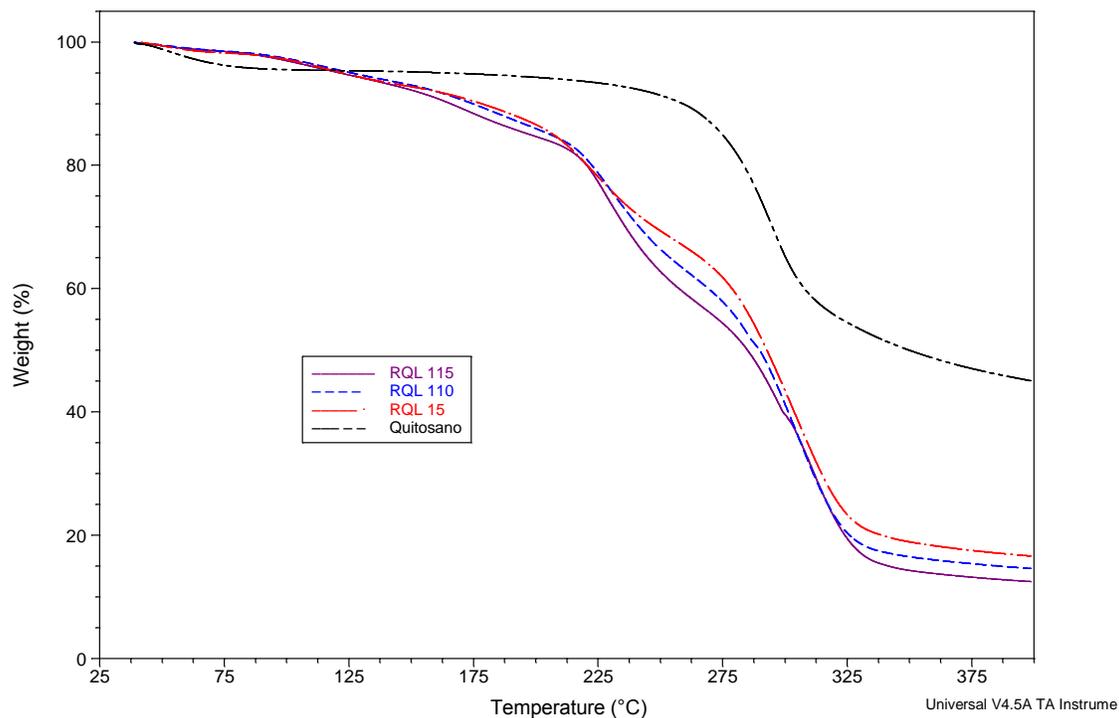


Figura 39. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QL 1:15

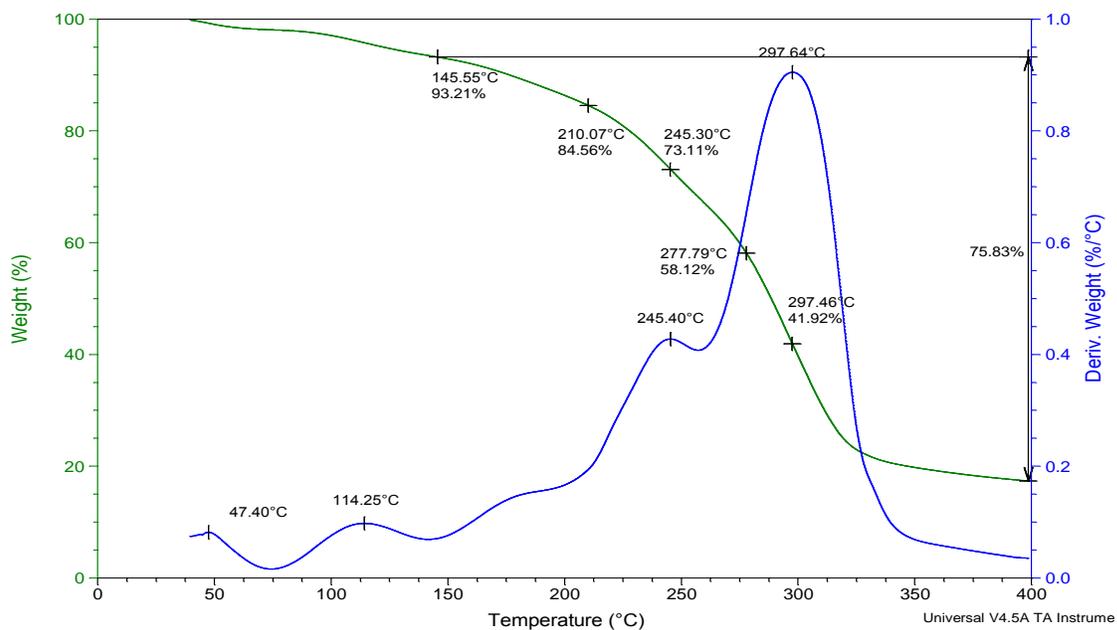


Figura 40. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:5

Apéndice

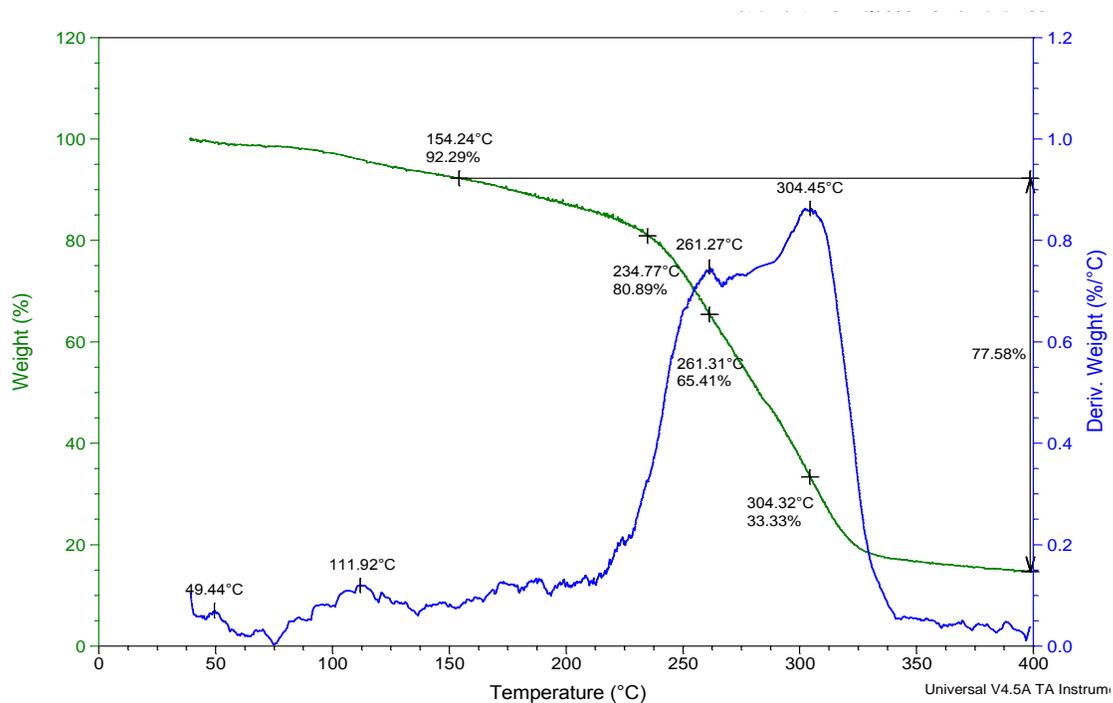


Figura 41. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:10

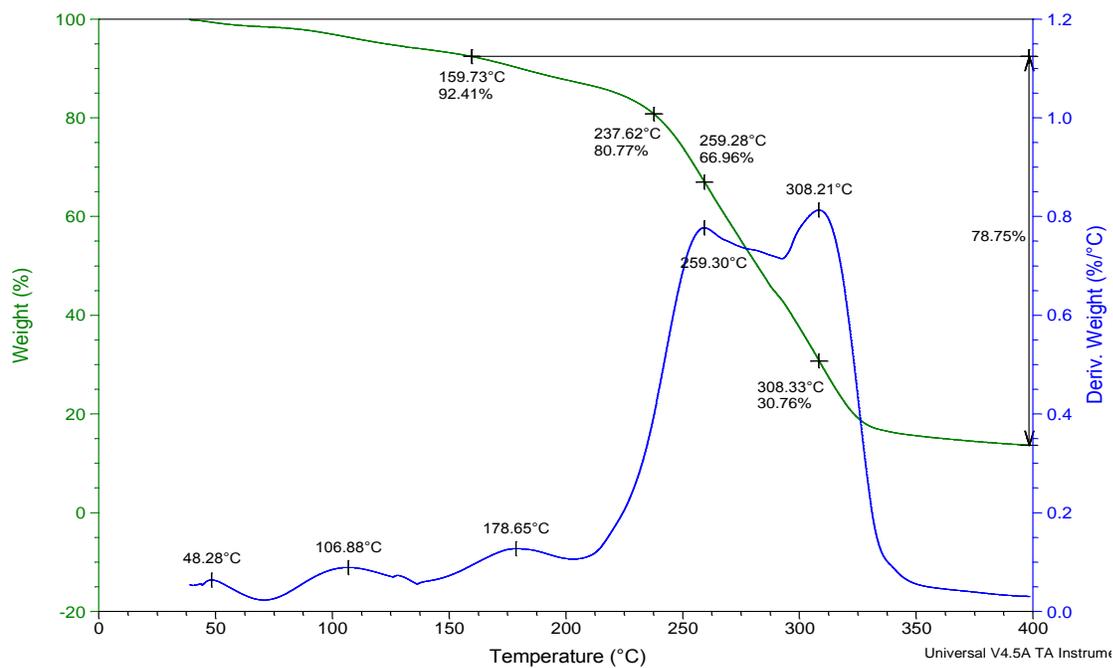


Figura 42. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLE 1:15

Apéndice

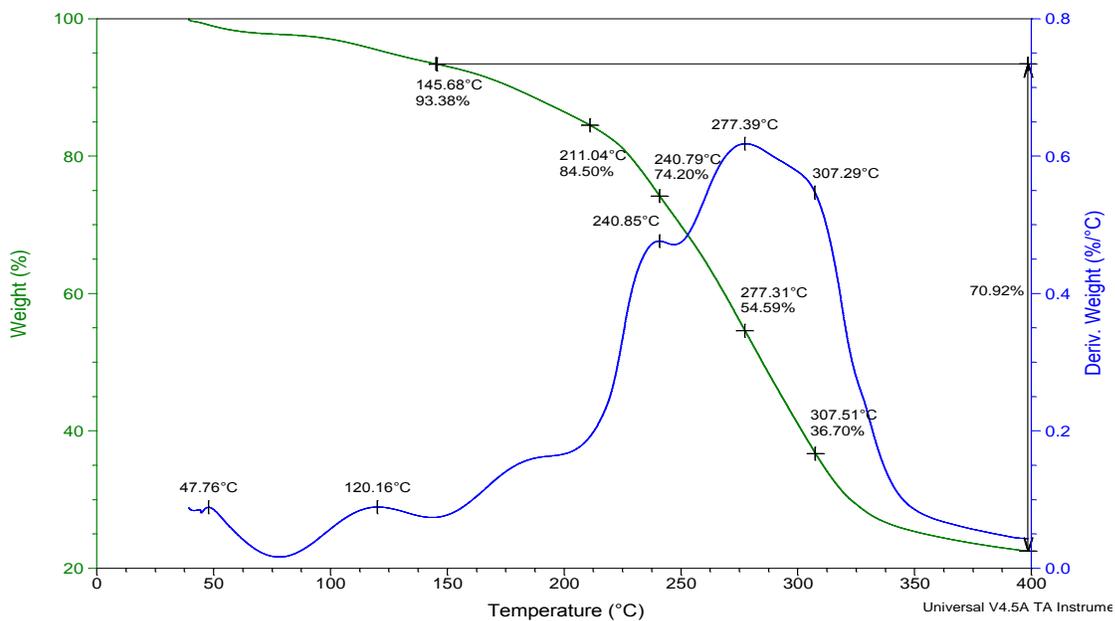


Figura 43. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:5

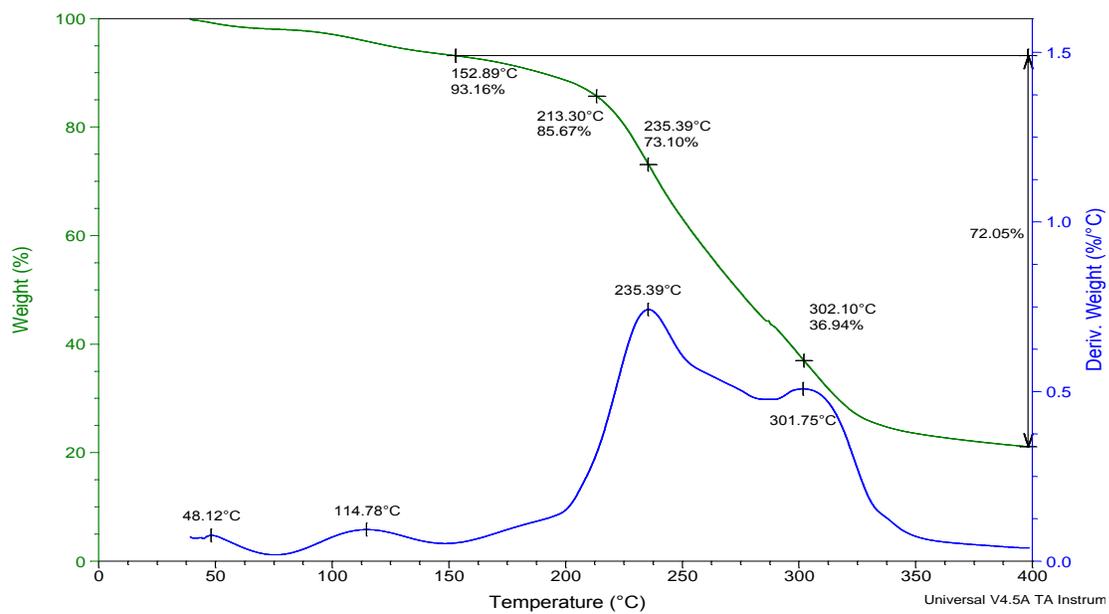


Figura 44. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:10

Apéndice

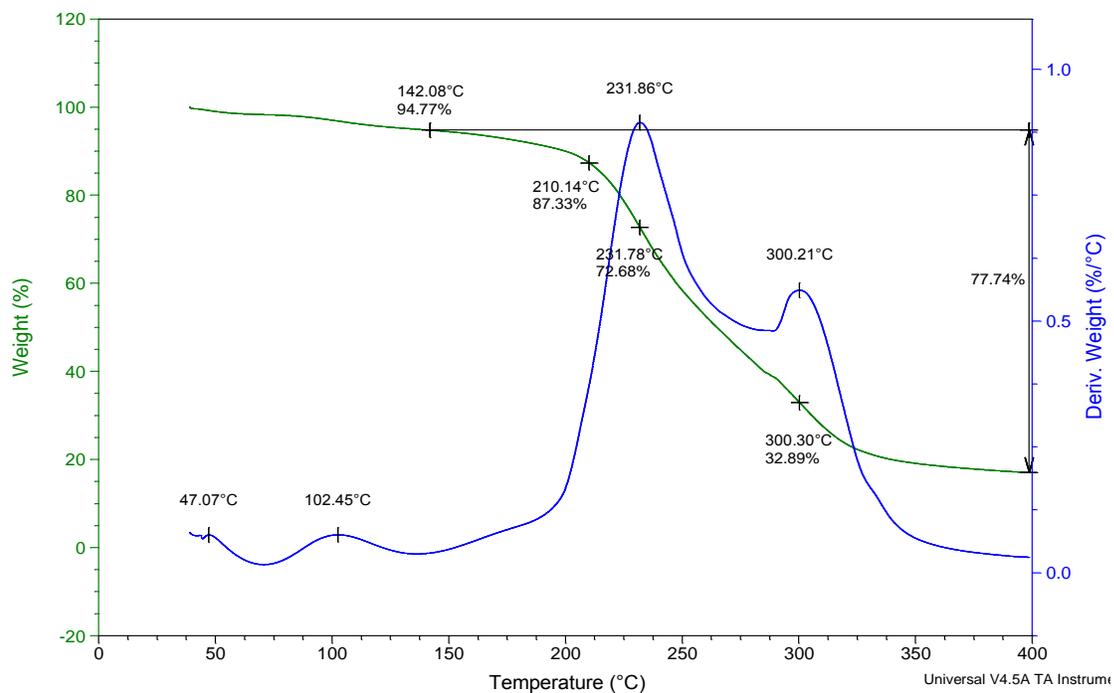


Figura 45. Termograma de TGA y DTG del copolímero de injerto QLS 1:15

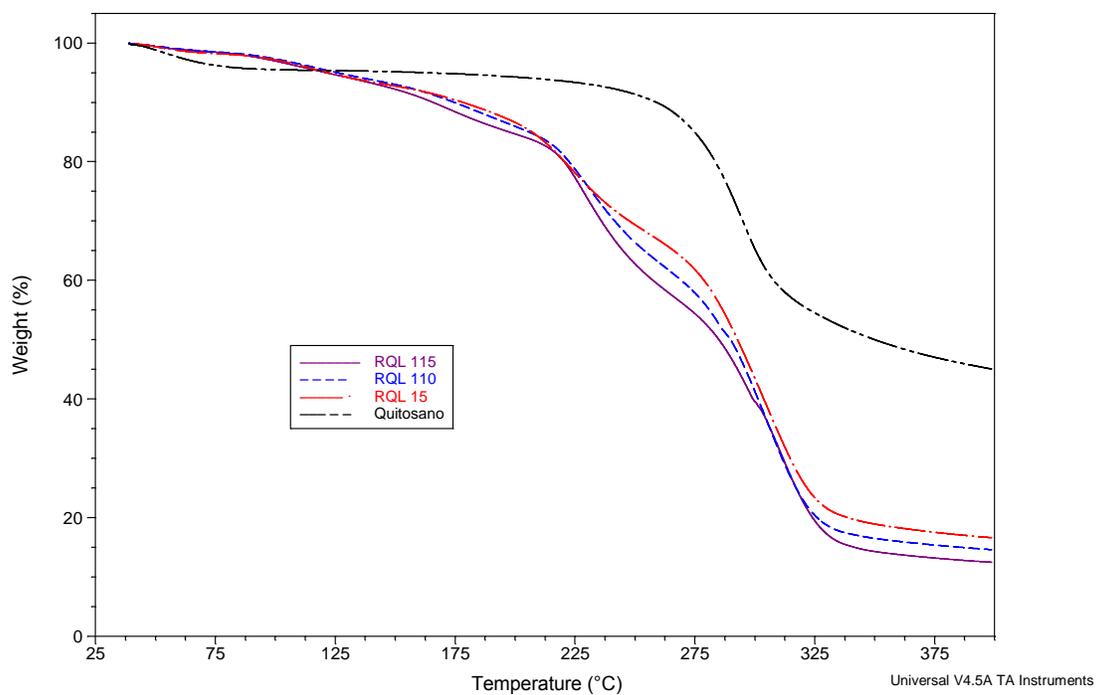


Figura 46. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador

Apéndice

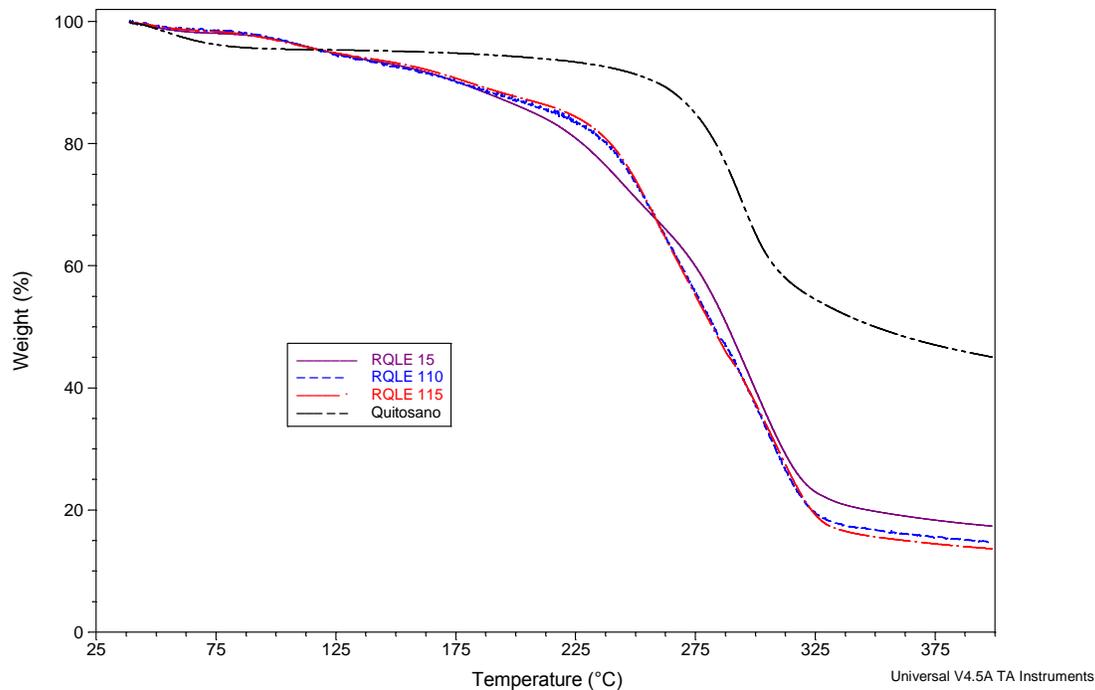


Figura 47. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados sin catalizador

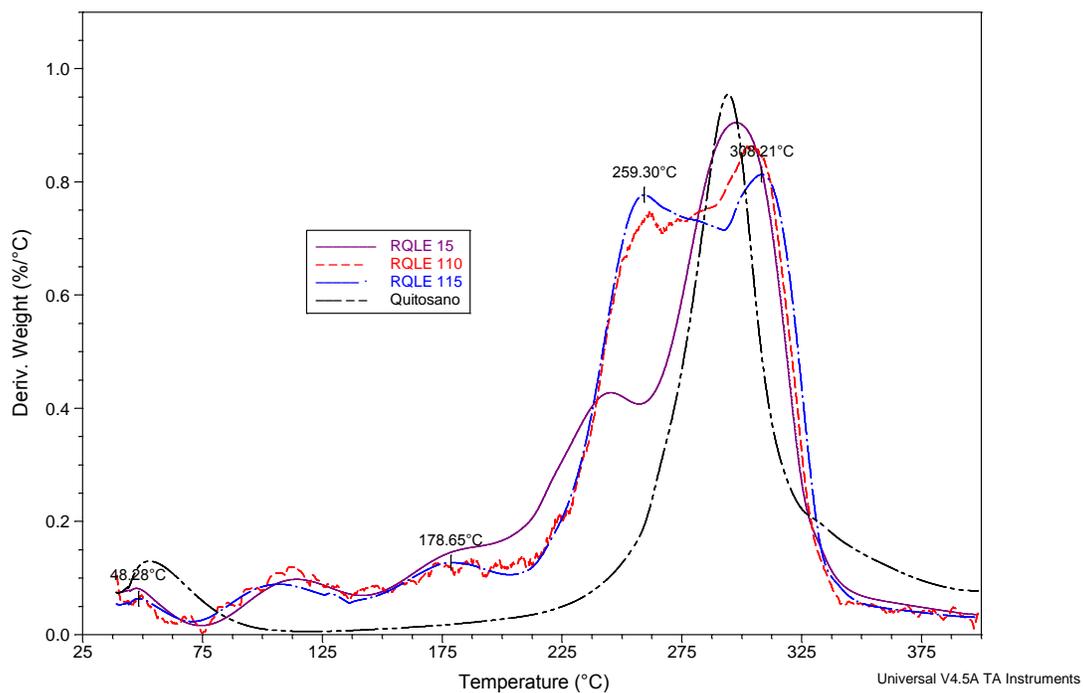


Figura 48. Termograma de las DTG de los copolímeros de injerto sintetizados con enzima YLL

Apéndice

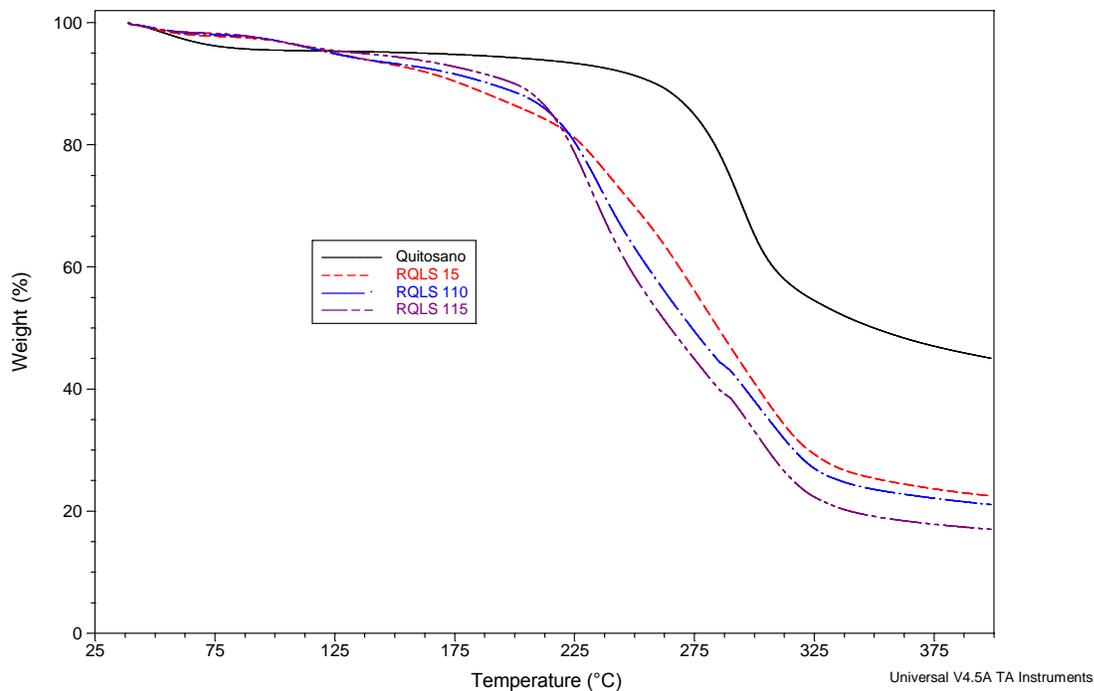


Figura 49. Termograma de TGA de los copolímeros de injerto sintetizados con octoato de estaño

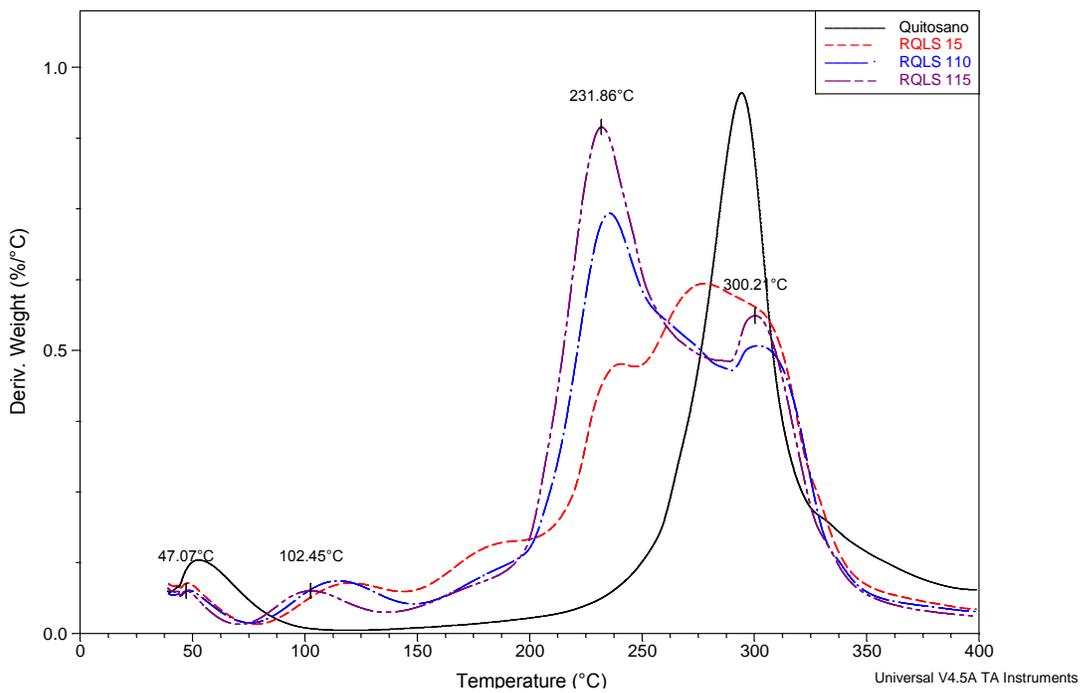


Figura 50. Termograma de las DTG de los copolímero de los injertos sintetizados con octoato de estaño