



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

## PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI(EPILON-CAPROLACTONA-CO-  
GLICÓLIDO)S EN EL  
MEDIO 1,1,1,2-TETRAFLUOROETANO LÍQUIDO”

### T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERIA**

INGENIERÍA QUÍMICA – BIOINGENIERÍA

P R E S E N T A :

**I.Q.I. MARIA CAROLINA CASTILLO RUZ**

TUTOR:

**DR. MIQUEL GIMENO SECO**



2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Rafael Herrera Nájera	
SECRETARIO:	Dr. Modesto Javier Cruz Gómez	
VOCAL:	Dr. Jorge Aburto Anell	
1ER. SUPLENTE:	Dr. Marco Antonio Uresti Maldonado	
2DO. SUPLENTE:	Dr. Miquel Gimeno Seco	

### Lugar donde realizó la tesis:

El trabajo se realizó en el laboratorio 314 del departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química (Edificio E) de la Universidad Nacional Autónoma de México con financiamiento del proyecto CONACyT 48641.

---

Dr. Miquel Gimeno Seco

Tutor de tesis

---

I.Q.I. María Carolina Castillo Ruz

Sustentante

#### AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por el apoyo para la realización de este trabajo

Al laboratorio 314 por las instalaciones prestadas para realizar este trabajo así como a todos sus integrantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para realizar este trabajo a través del programa de formación de científicos y tecnólogos

## Índice

Índice	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Nomenclatura	vii
Resumen	1
Capítulo 1. Introducción	2
Capítulo 2. Antecedentes	4
2.1. Polímeros biodegradables	4
2.1.1. Clasificación	4
2.2. Catálisis enzimática	8
2.2.1. Lipasas	11
2.1.1.1. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) inmovilizada “Novozym 435”	15
2.1.1.2. Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (Lipasa PS)	18
2.3. Polimerización enzimática	20
2.3.1. Polimerización por apertura de anillo (PAA) Enzimática	22
2.4. Material objetivo de trabajo: copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA)	25
2.5. Fluidos comprimidos (FC) como medio de reacción no-convencional	27
2.6. Actividad enzimática en R134a líquido	29
Capítulo 3. Objetivos	32
3.1. Objetivo general	32
3.2. Objetivos específicos	32
Capítulo 4. Materiales y métodos	33
4.1. Materiales	33
4.2. Diseño experimental	33

4.3. Reacción de polimerización	34
4.3.1. Polimerización en masa	34
4.3.1.1. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) inmovilizada “Novozym 435”	34
4.3.1.2. Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (Lipasa PS)	34
4.3.2. Polimerización en R134a líquido	34
4.4. Purificación	35
4.5. Caracterización del polímero	35
4.5.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	35
4.5.2. Cromatografía de Exclusión de Tamaño/ Permeación en Gel	36
4.5.3. Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis termogravimétrico	36
4.5.4. Difracción de rayos X	37
4.6. Estudios de solubilidad	37
4.6.1. Solubilidad de glicólido (GA) y $\epsilon$ -caprolactona (CL) en las relaciones molares	37
Capítulo 5. Resultados y discusiones	39
5.1. Evaluación de la solubilidad de los monómeros	39
5.2. Obtención de policaprolactona (PCL) con Novozym 435	39
5.3. Obtención de policaprolactona (PCL) con lipasa PS	41
5.4. Análisis de la incorporación de $\epsilon$ -caprolactona (CL) y glicólido (GA) en el copolímero por $^1\text{H}$ RMN	42
5.5. Obtención de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA) con Novozym 435	47
5.6. Obtención de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA) con lipasa PS	53
5.7. Análisis térmico y termogravimétrico para los copolímeros con mayor y menor contenido de glicólido (GA)	62
5.8. Difracción de rayos X de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA)	64
6. Conclusiones	68
Referencias	70

## Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicas y mecánicas de algunos poliésteres comerciales	8
Tabla 2. Clasificación de enzimas y producción <i>in vitro</i> de polímeros catalizados por cada enzima.	11
Tabla 3. Comparación de la actividad específica de enzimas a 30° C.	15
Tabla 4. Efecto de la hidrofobicidad de disolventes en la actividad de la enzima CALB	18
Tabla 5. Momentos dipolos y reactividad de lactonas no sustituidas	24
Tabla 6. Diseño experimental	33
Tabla 7. Resultados de la polimerización catalizada por Novozym 435 en R134a líquido y en masa	47
Tabla 8. Resultados de la polimerización catalizada por Lipasa PS en R134a líquido y en masa	53
Tabla 9. Propiedades térmicas de la PCL y PGA	62
Tabla 10. Resultados del estudio térmico	63
Tabla 11. Resultados del análisis termogravimétrico	64
Tabla 12. Resultados de cristalización para las muestras de PCLGA con diferentes porcentajes de incorporación de GA	65

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables	5
Figura 2. Reacciones de polimerización, catalizadas por lipasas, para obtener poliésteres	12
Figura 3. Transesterificación, catalizada por lipasas, de acetato de vinilo y n-octanol	16
Figura 4. Ilustración del mecanismo de transesterificación, catalizada por CALB, del acetato de vinilo con n-octanol	17
Figura 5. Transesterificación, catalizada por CALB, del acetato de vinilo con ciclohexanol	17
Figura 6. Diagrama estéreo de cinta de la lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> . El dominio C es de color café y verde. U1 es azul, y U2 es morado. Las terminales N y C y están marcados los tres residuos catalíticos; también se muestran los residuos catalíticos. El ión $\text{Ca}^{2+}$ se muestra como una esfera azul oscuro.	19
Figura 7. El sitio activo de la lipasa <i>Burkholderia cepacia</i> . Se indican los espacios de vinculación para las partes sn1, sn2 y sn3 del sustrato lípido. También se indican los residuos que cubren los orificios vinculantes	20
Figura 8. Monómeros de: (a) glicólido; (b) L-láctido; (c) D-láctido; (d) D, L- o meso - láctido; (e) $\epsilon$ -CL; (f) 1,5-dioxepan-2-ona	21
Figura 9. Mecanismo postulado de la polimerización catalizada por lipasas de las lactonas	22
Figura 10. Poliésteres obtenidos de la polimerización enzimática de lactonas	23
Figura 11. Reactor con celda de visor de cuarzo donde se realizaron las pruebas de solubilidad	37
Figura 12. Comparación de la relación “rendimiento vs tiempo de reacción” en la síntesis de PCL en masa ( $\blacktriangle$ ) y en R134a líquido ( $\bullet$ ).	40



Figura 13. Comparación de la relación “peso molecular vs tiempo de reacción” para la síntesis de PCL con Novozym 435 en masa (▲) y en R134a líquido (●).	41
Figura 14. Rendimientos (▲) y pesos moleculares (●) en la síntesis de PCL catalizada con lipasa PS en masa	42
Figura 15. Estructura propuesta de la PCLGA	43
Figura 16. Desplazamiento de las señales de <sup>1</sup> H RMN teóricas para PCLGA	43
Figura 17. Espectro <sup>1</sup> H RMN de la muestra obtenida de la reacción en masa con Novozym 435 con una relación molar (GA: CL) 1:4 durante 72 h.	44
Figura 18. Acercamiento de figura 17 en el desplazamiento químico de 4-5 ppm	45
Figura 19. Espectro de <sup>1</sup> H RMN de la muestra obtenida de la reacción en R134a con lipasa PS con una relación molar (GA: CL) 1:2 durante 240 h.	46
Figura 20. Acercamiento de figura 19 en el desplazamiento químico de 4-5 ppm	46
Figura 21. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a (●) para la relación molar 1:2 (GA: CL) con Novozym 435	48
Figura 22. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:2 (GA: CL)	49
Figura 23. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar 1:3 (GA: CL) con Novozym 435	50
Figura 24. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:3 (GA: CL)	51
Figura 25. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar 1:4 (GA: CL) con Novozym 435	51
Figura 26. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:4 (GA: CL) con Novozym 435	52

Figura 27. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar (GA: CL) 1:2 con lipasa PS	54
Figura 28. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:2	55
Figura 29. Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:2	56
Figura 30. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar (GA: CL) 1:3 con lipasa PS	57
Figura 31. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:3	58
Figura 32. Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:3	58
Figura 33. Comparación de las reacciones en masa (▲) y en R134a (●) para la relación molar (GA: CL) 1:3 con lipasa PS	59
Figura 34. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:4	60
Figura 35. Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:4	60
Figura 36. Variación del % de cristalización con respecto a la incorporación de GA	65
Figura 37. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 2.79% con un 39.5% de cristalización (polímero obtenido con lipasa PS, relación molar (GA: CL) de 1:4, por 15 días)	66
Figura 38. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 80.35% con un 25.27% de cristalización (polímero obtenido con Novozym 435, relación molar (GA: CL): 1:4, por 3 días)	67
Figura 39. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 97.95% con un 20.96% de cristalización (polímero obtenido con Novozym 435, relación molar (GA: CL) de 1:3, por 2 días)	67

## LISTA DE NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASTM	American Society of Testing Materials
CALB	lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
Cap	Grupo caproil
CL	$\epsilon$ -caprolactona
COV	Compuesto orgánico volátil
MD	Momento dipolo
DSC	Differential scanning calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)
FC	Fluidos comprimidos
FDA	Food and drug administration
FSC	Fluidos supercríticos
G	Grupo glicolídil
GA	Glicólido
GPC	Gel permeation chromatography (cromatografía de Permeación en gel)
GRCS	Generalmente reconocido como seguro
IAE	Intermediario acil-enzima
ISO	International Organization of Standardization
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
Lipasa PS	lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> libre
$M_n$	Peso molecular
Novozym 435	lipasa B de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada
$P_c$	Presión crítica
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PCLGA	Copoli( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido)
IPD	Índice de polidispersidad
PEA	Polietilenadipato
PGA	Poliglicólido
PHB	polihidroxibutirato
PHBV	Copoli (polihidroxibutirato/hidroxivalerato)
PVC	polyvinyl chloride (cloruro de polivinilo)
R134a	1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano
RMN	Resonancia magnética nuclear
scCO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
SEC	Size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión de partícula)
$T_c$	Temperatura crítica
$T_c$	temperatura de cristalización
$T_g$	Temperatura de transición vítrea
$T_m$	temperatura de fusión
TMS	tetrametilsilano
USAI	Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación
$V_{max}$	Velocidad de reacción máxima

## Resumen

Los materiales biodegradables sintetizados a partir de los monómeros cíclicos glicólido (GA) y *épsilon*-caprolactona (CL) tienen aplicaciones en biomedicina, farmacología y las industrias de alimentos debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. El empleo de enzimas como catalizadores para la producción de estos copolímeros ofrece un método de síntesis alternativo a condiciones más suaves y ecológicas. Además las enzimas son una fuente renovable y reutilizable que evita el uso de reactivos tóxicos como puedan ser los catalizadores metálicos. Por otro lado, el uso de disolventes como medios de síntesis ecológicos o verdes ofrece también una alternativa ecoeficiente en la producción. Entre estos se encuentran los fluidos comprimidos (FC). En el presente trabajo se propone el uso del 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano (R-134a) en estado líquido como medio de reacción hidrófobo. Este requiere una baja presión para licuarse (1.0 MPa a 65 ° C) con propiedades adecuadas para las actividades de lipasas. Además, el R-134a se considera un "disolvente verde" porque no es tóxico, inflamable y no destruye la capa de ozono. Por otra parte, la polaridad de R134a podría aumentar la solubilidad de los compuestos polares. En este trabajo, se realizó la polimerización enzimática de poli (*épsilon*-caprolactona-co-glicólido) (PCLGA) con dos diferentes lipasas como catalizadores en R134a líquido como medio de reacción a una temperatura de 65 ° C. Las enzimas utilizadas fueron la lipasa libre de *Pseudomonas cepacia* (lipasa PS) y la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada "Novozym 435". El tiempo de reacción y el contenido del biocatalizador fueron menores para Novozym 435 que para lipasa PS, sin embargo se obtuvieron diferentes proporciones de incorporación de los monómeros con una y otra enzima según análisis de <sup>1</sup>H RMN. La Novozym 435 favoreció incorporación de glicólido (GA) y así la formación de poliglicólido (PGA), un incremento en la cantidad de *épsilon*-caprolactona (CL) no favoreció su incorporación en el polímero. La reacción, catalizada con Novozym 435, en masa produjo mejores rendimientos que la reacción en disolvente. El copolímero obtenido con la lipasa PS presentó un rendimiento máximo de 43 % (en disolución) que fue mayor que aquellos obtenidos con la Novozym 435 (17%) y una incorporación de glicólido de hasta 12%. Con la lipasa PS se obtuvieron pesos moleculares hasta de 7000g/mol. Se observó una mayor estabilidad térmica para los PCLGA con bajo contenido de glicólido (GA). Los PCLGA con mayor contenido de GA son amorfos.

## **CAPÍTULO 1. Introducción**

Recientemente se ha incrementado el uso de polímeros biodegradables debido a los daños ambientales (contaminación) causados por los polímeros sintéticos y al decremento de las reservas fósiles.

Debido a esto, se han realizado investigaciones para el desarrollo de materiales “ambientalmente amigables”, obtenidos de fuentes alternativas, con menor consumo de energía, biodegradables y no tóxicos para el medio ambiente. Los biopolímeros, como pueden ser la celulosa, quitina, almidón, son biodegradables y las producciones principales se obtienen de fuentes renovables como agro-fuentes, por lo que representan una ruta alternativa interesante a los polímeros no-degradables para aplicaciones de vida corta (empaques, material quirúrgico, higiene, agricultura). Sin embargo, otro tipo de polímeros biodegradables pueden ser obtenidos por síntesis ofreciendo una mayor procesabilidad de los materiales y ampliar su rango de aplicación. (Chandra *et al.*, 1998; Bordes *et al.*, 2008)

Los poliésteres alifáticos obtenidos mediante la polimerización por apertura de anillo (PAA) de lactonas son polímeros versátiles que poseen buenas propiedades mecánicas, hidrolizabilidad y biocompatibilidad. Estos atributos los hacen importantes candidatos en la industria farmacéutica y biomédica para su uso como material de implante o como vehículo para el suministro controlado de fármacos. La empresa American Cyanamid Co. desarrolló suturas degradables a partir del poliglicólido (PGA) en 1962 bajo el nombre comercial Dexon. Actualmente se ha incrementado el interés en copolímeros de glicólido (GA) y  $\epsilon$ -caprolactona (CL) para su utilización como dispositivos de suministro controlado de fármacos o implantes. El poliglicólido (PGA) es un polímero biocompatible y biodegradable en un periodo de 6 meses en el cuerpo humano, sin embargo no es soluble en disolventes convencionales lo que limita sus aplicaciones. Por su parte, la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) es soluble en la mayoría de los disolventes y moldeable sin embargo requiere mayor tiempo de degradación en el organismo. De esta forma, los copolímeros de estos dos compuestos permiten la obtención de un material manejable y tiempos de degradación adecuados. (Middleton *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Wu, 2003; Funabashi *et al.*, 2007; Bordes *et al.*, 2009)

Los métodos de obtención de estos materiales utilizan catalizadores organometálicos que necesitan ser completamente removidos, debido a que son tóxicos para el ser humano y requieren condiciones de operación más estrictas, como puede ser, alta pureza en los monómeros y condiciones anhidras o altas temperaturas. La catálisis enzimática es una alternativa viable y eco-eficiente que además tiene

la ventaja de permitir realizar las reacciones en condiciones suaves de operación (temperatura, pH y presión). Las enzimas son obtenidas de fuentes renovables, reciclables, no son tóxicas, son amigables con el ambiente y no se requiere necesariamente su completa remoción del polímero. A pesar de que el medio de reacción de las enzimas es el agua, éstas pueden ser utilizadas en medios no acuosos e hidrofóbicos. La capacidad de las enzimas para adecuarse al medio de reacción es indispensable, sin embargo, el uso de disolventes orgánicos es una fuente de contaminación alta que contrarresta los beneficios logrados con el uso de enzimas. (Varma *et al.*, 2005; Puskas *et al.*, 2009)

El uso de medios de reacción ecológicos ofrece una alternativa amigable con el medio ambiente y la obtención verde de productos. Uno de los disolventes verdes más estudiados es el dióxido de carbono en estado supercrítico, aunque la baja polaridad del mismo limita su rango de aplicación. Existen, sin embargo, otros fluidos comprimidos (FC) entre los que se encuentra el 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano (R134a) que es considerado no tóxico e inflamable. Además es un compuesto orgánico no volátil y es considerado como GRCS (Generalmente reconocido como seguro). El R134a requiere baja presión para convertirse en líquido (menos de 2 MPa) y es un fluido más polar que el CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>) lo que indica que puede solubilizar las cadenas de polímero en crecimiento, especialmente polares, lo cual retrasa la terminación de la polimerización por precipitación desde el medio de reacción. Al analizar la actividad enzimática de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) se encontró que su actividad no se ve afectada por variaciones de la presión en la reacción, de igual forma la solubilidad de agua en R134a (hidrofobicidad alta) es baja por lo que el coeficiente de distribución de agua para la enzima es mayor. (Corr, 2002; Yu *et al.*, 2007)

En este trabajo se estudió la síntesis enzimática de la poli( $\epsilon$ -caprolactona-co-glicólido) (PCLGA) catalizada por la CALB inmovilizada en su forma comercial Novozym 435 producida por Novozymes (Dinamarca) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre producida por Amano Chemicals (Japón) en el medio R134a líquido analizándose la compatibilidad de cada enzima, los tiempos de reacción y la relación molar de los monómeros para así determinar las mejores condiciones y la factibilidad de obtener el copolímero, así como las propiedades de los materiales obtenidos basándose en los pesos moleculares y porcentaje de inserción de GA.

## **CAPÍTULO 2. Antecedentes**

### **2.1 Polímeros Biodegradables**

Según la ISO 472 (1998) los polímeros biodegradables son plásticos diseñados para someterse a un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas resultando en una pérdida de algunas propiedades que pueden variar, dependiendo de métodos de pruebas estándares apropiadas al plástico y la aplicación, en un periodo de tiempo que determina su clasificación. El cambio en la estructura química resulta de la acción de microorganismos presentes en la naturaleza.

De acuerdo al estándar ASTM D-5488-94d, biodegradable significa capaz de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos, o biomasa en donde el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos que se pueden medir mediante pruebas estándares, durante un periodo de tiempo específico, reflejando condiciones adecuadas para ser desechados. La compostabilidad es la biodegradabilidad de un material, usando como medio la composta.

Un incremento en los parámetros como carácter hidrofóbico, peso molecular, cristalinidad o tamaño de las esferulitas disminuye la biodegradabilidad. Por el contrario, la presencia de polisacáridos (mezclas) favorece la biodegradabilidad. (Chandra *et al.*, 1998)

#### **2.1.1. Clasificación**

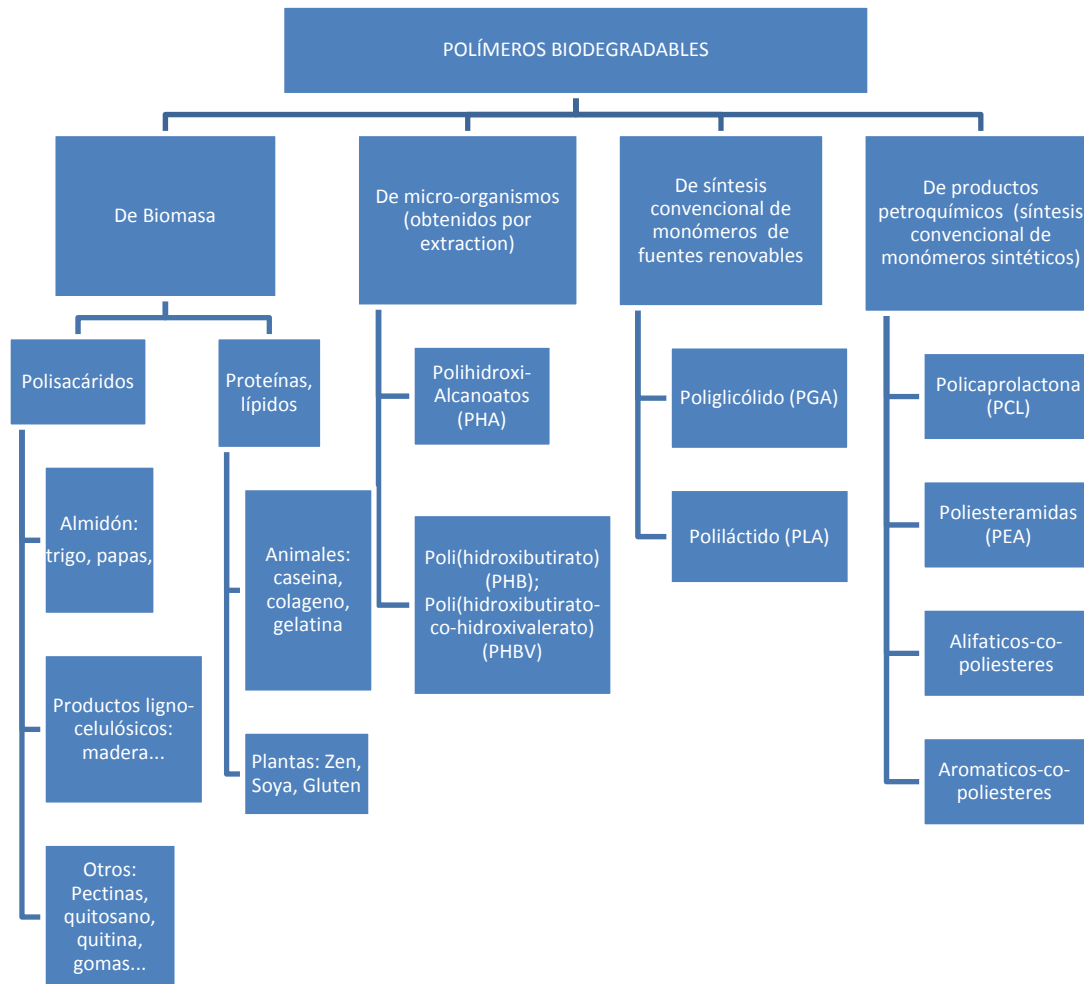
Existe una gran cantidad de polímeros biodegradables sintetizados durante los ciclos de crecimiento de los organismos. También se han identificado enzimas y microorganismos capaces de degradarlos.

Dependiendo de la síntesis del polímero, se ha propuesto una clasificación de cuatro categorías, siendo solo las primeras tres categorías obtenidas de fuentes renovables (figura 1):

1. Polímeros directamente extraídos o removidos de la biomasa. Ejemplos son polisacáridos como almidón y celulosa, quitina y proteínas como caseína y gluten.
2. Polímeros obtenidos por producción microbiana, por ejemplo, los Polihidroxicanoatos.
3. Polímeros sintetizados químicamente usando monómeros obtenidos de fuentes renovables (agro-recursos). Un buen ejemplo es el poliglicólido, un biopoliéster polimerizado de monómeros del dímero cíclico del ácido glicólico.

4. Polímeros obtenidos por síntesis química de monómeros obtenidos de recursos fósiles. Como ejemplo está la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL).

También se pueden clasificar los polímeros biodegradables en dos familias: agro-polímeros (1) y poliésteres biodegradables (2-4).



**Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables**

### Agro-polímeros

Los agro-polímeros son obtenidos principalmente de plantas. Son polímeros compostables y renovables. Existen diferentes familias como los polisacáridos o las proteínas. Estos polímeros presentan características comunes como carácter hidrofílico. La mayoría de estos polímeros pueden ser procesados directamente, ya sea agregando agentes plastificantes, para empastar o modificados por reacciones químicas.



Polisacáridos: Esta familia es representada por diferentes productos como almidón o celulosa basados en moléculas de glucosa unidas en cadenas macromoleculares.

La celulosa es el primer agro-polímero en la biosfera. Es un polímero lineal que consiste en cadenas con unidades repetitivas de D-glucosa sintetizadas por las plantas y bacterias.

El almidón es el principal suministro de almacenamiento en las fuentes botánicas (cereales, leguminosas y tubérculos). Es una materia prima ampliamente disponible en la tierra. Presenta diferentes aplicaciones en el área de alimentos, papel, textiles y adhesivos.

### **Polihidroxicanoatos: Polímeros biodegradables obtenidos de microorganismos**

Los Polihidroxicanoatos pueden producirse química o biológicamente por fermentación. Esta familia comprende principalmente al homopolímero, polihidroxibutirato (PHB) y diferentes copoliésteres como el copoli (hidroxibutirato/hidroxivalerato) (PHBV).

El PHB es un polímero natural. Es un producto de bacterias y algas que se encuentra almacenado intracelularmente. Después de la fermentación, el PHB se puede obtener mediante extracción con disolventes. El PHBV puede obtenerse por la fermentación con bacterias (por ejemplo con *alcaligenes eutrophus*) de bio-productos como glucosa que contenga ácido propiónico o valérico, seguida de un paso de extracción y purificación del polímero.

La cinética de degradación enzimática es variable dependiendo de la cristalinidad, la estructura y el procesado.

### **Poliglicólido (PGA): Ejemplo de polímero biodegradable de origen natural obtenido vía síntesis**

El es el más sencillo polímero de poliéster alifático. El monómero, ácido glicólico, se produce de forma natural en el jarabe de caña de azúcar y en las hojas de ciertas plantas, pero también puede ser sintetizado químicamente. La polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico, glicólido (GA), produce polímeros de alto peso molecular.

### **Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), Poliesteramida y copolímeros aromáticos y alifáticos: Ejemplos de materiales biodegradables con origen en los recursos fósiles**

Un gran número de poliésteres biodegradables son obtenidos químicamente partiendo de monómeros obtenidos del petróleo. Pueden ser, de acuerdo a su estructura química, PCL,

poliesteramidas, copoliésteres alifáticos o aromáticos. Todos estos poliésteres son flexibles a temperatura ambiente.

La PCL se obtiene por polimerización por apertura de anillo (PAA) de  $\epsilon$ -caprolactona (CL) en presencia de Isopropóxido de aluminio. La PCL es ampliamente utilizada como plastificante del PVC sólido o para aplicaciones de poliuretano. También ha encontrado aplicaciones basadas en su carácter biodegradable en áreas como en la dosificación controlada de drogas, empaques compostables o en aplicaciones biomédicas. Generalmente, la PCL es mezclada o modificada (por ejemplo, copolimerización o entrecruzamiento).

Se ha demostrado que la PCL puede ser fácilmente degradada enzimáticamente sin embargo la velocidad de hidrólisis del homopolímero es muy lenta. La presencia de almidón puede incrementar significativamente la velocidad de biodegradación del PCL.

La Poliesteramida fue obtenida industrialmente mediante la copolicondensación estadística de los monómeros de la poliamida (PA 6 ó PA 6-6) y ácido adípico. Este es el poliéster más polar lo que permite que sea compatible con otros compuestos polares, por ejemplo compuestos con almidón. Además, posee la permeabilidad en agua más alta.

Se encuentra en discusión el hecho de que la biodegradabilidad de este poliéster presenta un impacto eco-toxicológico negativo.

Los copoliésteres alifáticos poliésteres son obtenidos por la combinación de dioles)1, 2-etanodiol, 1, 2-propanodiol o 1, 4-butanodiol) y un ácido carboxílico (ácido adípico, sebácico o succínico).

La biodegradabilidad de estos productos depende de la estructura. La adición de ácido adípico, el cual disminuye la cristalinidad, tiende a incrementar la biodegradación por composteo. De igual forma la adición de almidón incrementa la velocidad de degradación.

Por otro lado, los copoliésteres aromáticos están generalmente basados en ácido tereftálico. Mientras mayor sea el contenido de ácido tereftálico se tiende a disminuir la velocidad de degradación.

En la tabla 1 se presentan las propiedades de algunos de los poliésteres mencionados en la clasificación que son utilizados industrialmente. (Bordes *et al.*, 2008)

**Tabla 1. Propiedades físicas y mecánicas de algunos poliésteres comerciales**

	PHBV Monsanto (Biopol D400G) HV=7% mol	PCL Solway (CAPA 680)	PEA Bayer (BAK 1095)
Densidad	1.25	1.11	1.07
Punto de fusión, in °C (DSC)	153	65	112
Temperatura de transición vítre, °C (DSC)	5	-61	-29
Elongación a la ruptura, en % (NFT- 51-035)	15	>500	420
Tensión de esfuerzo a la ruptura ó max., en MPa (NFT 55-035)	-	14	17
Biodegradación* Mineralización en %	100	100	100
Permeabilidad del agua a 25° C (g/m <sup>2</sup> /dia)	21	177	680

(\*) A 60 días en composta controlada de acuerdo al ASTM 5336.

## 2.2 Catálisis Enzimática

Un gran número de enzimas catalizan reacciones metabólicas por rutas biosintéticas en las células vivas (catálisis enzimática *in vivo*). Los polímeros naturales como polisacáridos, proteínas, poliésteres, etc., son sintetizados en la naturaleza por las enzimas. Un estimado conservador es que alrededor de 10<sup>12</sup> toneladas de celulosa, almidón y polímeros relacionados son generados en nuestro planeta cada año debido a procesos naturales. La producción anual de polímeros sintéticos derivados de petróleo es de cinco a seis magnitudes menor que la producción de estos polímeros naturales. (Varma et al., 2005)

Recientemente se ha desarrollado la síntesis de polímeros tipo poliéster por catálisis enzimática *in vitro* conocida como “polimerización enzimática”.

La catálisis enzimática es un área de precisión para la obtención de poliésteres sintéticos alternativamente a la catálisis química convencional. Además, la polimerización enzimática puede contribuir gratamente a la sustentabilidad global sin la disminución de recursos importantes al

utilizar recursos renovables no petroquímicos como monómeros hacia materiales poliméricos funcionales.

La catálisis enzimática *in vivo* tiene características específicas al compararla con la catálisis enzimática *in vitro*. Al ser designada por la naturaleza, todas las reacciones *in vivo* se llevan a cabo bajo condiciones suaves, generalmente en agua con pH neutro, a baja temperatura y con altas conversiones. El incremento de la velocidad, en presencia de la enzima depende de la energía de enlace del sustrato y el centro activo de la enzima (Varma *et al*, 2005).

Sin embargo, existen muchas diferencias entre los procesos catalizados por enzimas *in vivo* y los catalizados por enzimas aisladas, aunque en ambos casos pueden ser reacciones reversibles. Las reacciones catalizadas por enzimas *in vitro* se llevan a cabo en masa o con disolventes. Las enzimas presentan propiedades diferentes en disolventes orgánicos (Varma *et al*, 2005).

El problema, asociado con disolventes orgánicos, es la posible desactivación de las enzimas o el decrecimiento de la velocidad de reacción. Las enzimas son menos reactivas en disolventes orgánicos que en agua pero pueden catalizar algunas reacciones que son imposibles de obtener en medio acuoso. La hidratación de las enzimas proporciona la movilidad conformacional necesaria para una catálisis óptima. Una reducción en la actividad enzimática se puede atribuir a la inaccesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima. Las enzimas y el agua forman soluciones homogéneas mientras que en los disolventes orgánicos se obtiene una solución heterogénea (suspensión) debido a que las enzimas son insolubles en el disolvente. Un factor responsable de la baja actividad de las enzimas son los cambios en su estructura conformacional (desnaturalización) en los disolventes orgánicos. Otro factor fisicoquímico que puede disminuir la actividad de la enzima en los disolventes orgánicos es el pH de la solución. Los procesos catalizados por enzimas en soluciones acuosas son dependientes del pH; sin embargo, en los disolventes orgánicos la dependencia es menor ya que solo se debe a la memoria conformacional de la enzima, en la solución acuosa (con un pH determinado), al momento de realizar la inmovilización. El tipo de disolvente orgánico, el contenido de agua y su localización son los puntos clave para las reacciones catalizadas por enzimas en medios no acuosos (Varma *et al*, 2005).

La catálisis enzimática posee algunas ventajas sobre la catálisis química. Los poliésteres biodegradables, sintetizados químicamente, utilizan catalizadores organometálicos que requieren ser removidos completamente para aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, los iniciadores organometálicos más utilizados están basados en Zn, Al, Sn o Ge. El 2-etilhexanoato de estaño es el catalizador más utilizado en la PAA de lactonas. Es imposible remover completamente los

compuestos organometálicos y los residuos que permanecen en los poliésteres. Este hecho es un punto de discusión para su uso en aplicaciones médicas debido a que son compuestos de alta toxicidad. Además se requieren monómeros de alta pureza condiciones anhidras para llevar a cabo la polimerización química. (Varma et al, 2005)

La síntesis convencional de poliésteres de alto peso molecular mediante la reacción de policondensación por pasos requiere calentar una mezcla de dioles y ácidos dicarboxílicos, o un ácido carboxílico hidróxido a altas temperaturas (mayores de 200° C), por varias horas y en presencia de ácidos fuertes como catalizadores. Debido a que la poliesterificación es una reacción de equilibrio es necesario remover moléculas de agua reduciendo la presión o usando destilación azeotrópica o en presencia de agentes secantes. A altas temperaturas se puede propiciar la deshidratación de los dioles, además el catalizador puede provocar la descoloración del polímero. La polimerización por catálisis enzimática por el contrario, es un proceso benigno y puede ser llevado a cabo a bajas temperaturas (Varma *et al*, 2005).

Los beneficios de la polimerización catalizada por enzimas se pueden enumerar en los siguientes apartados:

- I. La catálisis enzimática se realiza en condiciones de reacción moderadas de temperatura, presión y pH que conlleva un ahorro de energía;
- II. Las enzimas catalizan reacción con altas enantio-, regio-, y quimioselectividades. También regulan la estereoquímica para la obtención de componentes funcionales para productos farmacéuticos y agroquímicos;
- III. Las enzimas son derivadas de fuentes renovables. Son materiales reciclables, no tóxicos y amigables con el ambiente. Por lo tanto, no es estricta la completa remoción de la enzima del polímero;
- IV. En los procesos catalizados con enzimas se puede obtener polímeros con estructuras bien definidas;
- V. Las enzimas son biocompatibles;
- VI. Las enzimas pueden ser utilizadas en masa, disolventes orgánicos y varias interfaces;
- VII. Las lipasas no requieren la eliminación de agua y aire cuando catalizan la síntesis de poliésteres. En contraste, los catalizadores inorgánicos tradicionales requieren precauciones estrictas para excluir el aire y agua del sistema;
- VIII. Las lactonas cíclicas pequeñas (4-7 miembros) poseen tensión en el anillo y polimerizan fácilmente con catalizadores inorgánicos. Sin embargo, la polimerización de lactonas con anillos grandes (macrólidos) es lenta y se obtienen productos de bajo peso molecular. Por

ejemplo, la catálisis química tradicional posee baja actividad para la polimerización de  $\omega$ -pentadecalactona, mientras que la reacción para obtener poli ( $\omega$ -pentadecalactona) catalizada por lipasa es más prometedora. La  $\gamma$ -butirolactona no puede ser polimerizada utilizando catalizador de aluminóxano pero puede ser polimerizada utilizando enzimas. (Kobayashi *et al*, 2001; Puskas *et al*, 2009; Varma *et al*, 2005)

Las enzimas se clasifican en seis grupos, y los polímeros típicos obtenidos de cada una de ellas se describen en la tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación de enzimas y producción *in vitro* de polímeros catalizados por cada enzima.**

Enzimas	Polímeros obtenidos
Oxidoreductasas	Polifenoles, polianilinas, polivinilos
Transferasas	Polisacáridos, oligosacáridos cíclicos, poliésteres
Hidrolasas	Polisacáridos, poliésteres, policarbonatos, poli(aminoácidos)
Liasas	-
Isomerasas	-
Ligasas	-

### 2.2.1 Lipasas

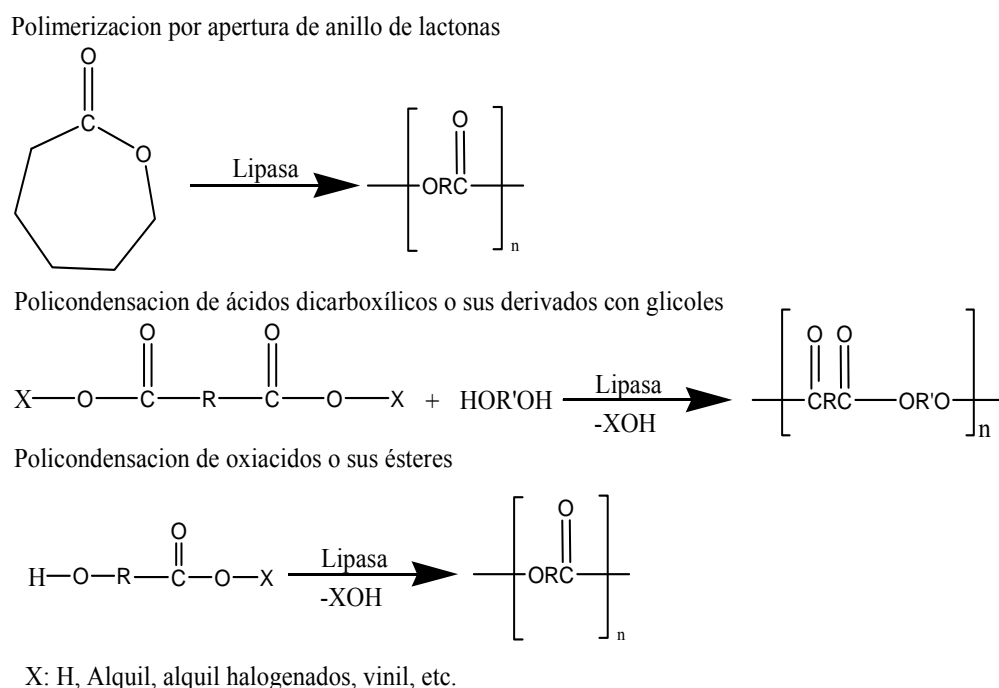
Las lipasas, del grupo de las hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos en los seres vivos (medio acuoso).

Las reacciones lipolíticas ocurren en la interfase lípido-agua, donde los sustratos lipolíticos suelen formar un equilibrio entre los estados monomérico, micelar y emulsificado. Actualmente, existen dos criterios para clasificar una enzima lipolítica como "verdadera" lipasa: (a) debe ser activada por la presencia de una interfase, es decir, su actividad debe aumentar considerablemente tan pronto como el sustrato de triglicérido forme una emulsión. Este fenómeno se denomina "activación interfacial". (b) Debe contener una "tapa", que es una superficie circular de la proteína que cubre el sitio activo de la enzima y se abre al estar en contacto con la interface (Jaeger *et al.*, 1999, 2002).

Las aplicaciones biotecnológicas de las lipasas demandan técnicas para determinar su actividad y si es relevante, su estereoselectividad. Una reacción estándar para determinar la actividad relativa de las lipasas es la esterificación de un alcohol con un ácido carboxílico, por ejemplo, la formación de

laurato de octilo a partir de ácido láurico y n-octanol reaccionando en un disolvente orgánico (Jaeger *et al.*, 1999).

Algunas lipasas son estables en disolventes orgánicos hidrofóbicos y pueden ser utilizadas como catalizadores para esterificaciones y transesterificaciones. El gran potencial sintético de las lipasas se debe al hecho que aceptan un amplio rango de sustratos; son moderadamente estables en disolventes orgánicos no acuosos. Dependiendo del disolvente utilizado, pueden ser aplicadas para las reacciones de hidrólisis o la síntesis de ésteres, poliésteres o policarbonatos. Muchas reacciones de condensación que son difíciles o imposibles en medio acuoso son catalizadas por lipasas en medio no-acuoso. Las reacciones más comunes de la polimerización catalizada por lipasas para obtener poliésteres se resumen en la figura 2. (Kobayashi *et al.*, 2001; Puskas *et al.*, 2009; Varma *et al.*, 2005)



**Figura 2. Reacciones de polimerización, catalizada por lipasas, para obtener poliésteres**

Las lipasas tienen diversas funciones en la degradación de alimentos y grasas; son utilizadas como medicamentos contra desordenes digestivos y enfermedades del páncreas. Las lipasas también han sido utilizadas para aplicaciones en biotecnología (como aditivos en detergentes) y como

catalizadores para la producción de químicos especiales y para la síntesis orgánica. (Schmid *et al.*, 1998)

Las lipasas son enzimas que se pueden encontrar en muchos organismos provenientes de microbios, reino animal y vegetal. Muchas lipasas disponibles comercialmente son impuras y requieren procesos de purificación laboriosos (Schmid *et al.*, 1998). En la síntesis de poliésteres se han reportado lipasas de mamíferos (lipasa pancreática porcina, PPL), de hongos (CALB; *Candida rugosa*, CR; *Candida cylindracea*, CC; *Aspergillus niger*, AN; *Penicillium roqueforti*, PR; *Rhizopus delemar*, RD; *Rhizomucor miehei*, RM) o de origen bacteriano (Lipasa PS; lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, PF). La lipasa PS fue reclasificada como lipasa de *Burkholderia cepacia* en 1995. Los pesos moleculares de algunas lipasas en kDa son 60 (CA), 50 (PPL), 41 (RD), 33 (PC), y 30 (RM) (Varma *et al.*, 2005).

A pesar de que las lipasas son aisladas de varios organismos y tienen variación en pesos moleculares diferentes poseen similitudes estructurales y funcionales. Un aspecto estructural único que es común en muchas lipasas es una tapa o solapa compuesta de una secuencia péptida  $\alpha$ -hélice anfifílica la cual, en su conformación cerrada, previene el acceso del sustrato al sitio catalítico. Cuando la tapa se abre, se crea una superficie hidrofóbica a la cual se une el sustrato hidrofóbico. El sitio activo se compone de un residuo de serina (Ser) nucleofílico activado por un enlace de hidrógeno en comunicación con histidina (His) y aspartato (Asp) o glutamato (Ser 105-His 224-Asp 187). Todas las lipasas son miembros de la familia “ $\alpha/\beta$ -hidrolasas” con una arquitectura común compuesta por una secuencia específica de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -filamentos. En el centro se encuentran los  $\beta$ -filamentos paralelos entre sí y rodeados por  $\alpha$ -hélices. El residuo activo de serina nucleofílico descansa en una horquilla entre un  $\beta$ -filamento y una  $\alpha$ -hélice. Las lipasas son esterasas que pueden hidrolizar triglicéridos (o ésteres) en la interface agua/aceite. (Schmid *et al.*, 1998)

El agua es crítica para las enzimas ya que influencia la estructura de la enzima mediante un enlace no covalente y la interrupción de puentes de hidrógeno. Un contenido de agua muy bajo generalmente reduce la actividad de la enzima. Un alto contenido de agua también puede reducir la velocidad de reacción al aglomerar las partículas de enzima causando limitaciones difusionales. La cantidad óptima de agua es frecuentemente en un rango muy estrecho. A fin de permanecer activa en medio no acuoso la enzima seca, requiere pequeñas cantidades de agua suficientes para proporcionar una hidratación parcial de la capa que se encuentra alrededor de la molécula de la enzima (Krishna, 2002). En general, las lipasas muestran baja actividad en disolventes hidrofílicos debido a la partición del agua al medio y la subsecuente desactivación por pérdida de la estructura proteica activa. Sin embargo, los disolventes hidrofóbicos permiten la retención de las moléculas de



agua en el sitio activo garantizando así la actividad. El coeficiente de partición (P) es el parámetro utilizado para medir la polaridad del disolvente. P se define como la relación entre las concentraciones de equilibrio de un disolvente particionado en un sistema de dos fases que contiene *n*-octanol y agua. Un disolvente con un valor de *log* P mayor de 2, asegura una alta retención de la actividad de la enzima. (Puskas et al., 2009)

Por otro lado, las enzimas se inactivan a altas temperaturas en medios acuosos debido al desdoblamiento parcial y alteraciones covalentes en la estructura primaria. Sin embargo, la estabilidad térmica en medio no acuoso es más alta debido a la mayor rigidez de la proteína y ésta puede ser hasta 100 °C.

Las lipasas son los biocatalizadores más versátiles en la síntesis de compuestos orgánicos. Esto es debido principalmente a que las lipasas se pueden acomodar a una amplia variedad de sustratos sintéticos mostrando regioselectividad y reconocimiento quiral. Las lipasas han evolucionado a estructuras estables que pueden sobrevivir al efecto de disolventes orgánicos. La hidrólisis catalizada con lipasas en agua puede ser invertida en medio no acuoso a la síntesis de éster o a la transesterificación. (Varma *et al.*, 2005)

La inmovilización de catalizadores sobre soportes porosos mediante adsorción o deposición es una técnica útil para incrementar la actividad de la enzima. Uno de los biocatalizadores de mayor aplicabilidad es la forma inmovilizada físicamente de la CALB. Esta se encuentra en su forma comercial Novozym 435®, aunque en la actualidad ya se venció la patente y se puede adquirir de diferentes productores. Generalmente, las enzimas inmovilizadas muestran mejor eficiencia catalítica que las enzimas libres. Además, las enzimas inmovilizadas pueden ser más fácilmente recuperadas y reutilizadas. Otro método de inmovilización útil es el atrapamiento de lipasas en sol-gel. La dispersión de la enzima en la matriz de gel ayuda a incrementar la actividad de la enzima. Los aero-geles de sílica son adecuados como medio para la encapsulación de algunas lipasas, posiblemente incrementan su actividad comparado con las enzimas libres. La función principal de los aero-geles es mantener la enzima dispersa como si se encontrara en una solución acuosa aun si se encuentra en un disolvente orgánico, donde la enzima liofilizada es insoluble. (Persson *et al.*, 2002; Uyama *et al.*, 2002; Varma *et al.*, 2005)

Se han investigado los soportes para las enzimas a fin de desarrollar catalizadores de lipasa inmovilizados para la producción eficiente de poliésteres como cerámica porosa (sílica) al igual que soportes poliméricos. (Uyama *et al.*, 2002) Sin embargo, la inmovilización de la CALB sobre

esferas acrílicas se ha demostrado como el biocatalizador más eficaz en la síntesis de poliésteres a partir de la PAA de lactonas.

### 2.2.1.1 Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada “Novozym 435”

La *Candida antarctica* es una levadura (hongo microscópico unicelular) que produce dos formas isoenzimáticas de lipasa: la lipasa A con un peso molecular de 45 kDa y un punto isoelectrónico pI=7.5; y la CALB con un peso de 33 kDa y un pI=6.0. Estas enzimas fueron aisladas debido a su aplicación potencial en muchos procesos industriales. La CALB es la isoforma más interesante en el campo de la síntesis orgánica.

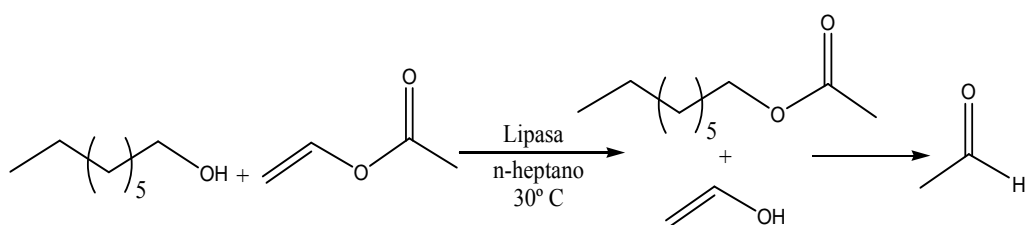
La CALB es mayormente inmovilizada físicamente en la resina Lewatit VP OC 1600 (Lanxess) que consiste en copoli (metacrilato de metilo/divinilbenceno) y tiene valores de tamaño de partícula promedio, área superficial, y diámetro de poro de 315-1000  $\mu\text{m}$ , 130  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ , y 150  $\text{\AA}$ , respectivamente y se considera una resina macroporosa. La inmovilización incrementa la estabilidad térmica al estabilizar la estructura terciaria de la proteína y facilita la remoción de la enzima de la mezcla de reacción permitiendo un uso posterior. Además, al absorber la enzima en un soporte sólido incrementa el área superficial de la enzima, previniendo su incorporación al disolvente orgánico, lo cual incrementa la actividad catalítica.

La CALB es un buen biocatalizador en una gran variedad de reacciones enzimáticas debido a su alta estabilidad y reactividad. Al comparar las actividades catalíticas de diferentes lipasas disponibles comercialmente en la transesterificación del acetato de vinilo con n-octanol se demostró que la CALB fue la más eficiente (Tabla 3). (Anderson *et al.*, 1998)

**Tabla 3. Comparación de la actividad específica de enzimas a 30° C.**

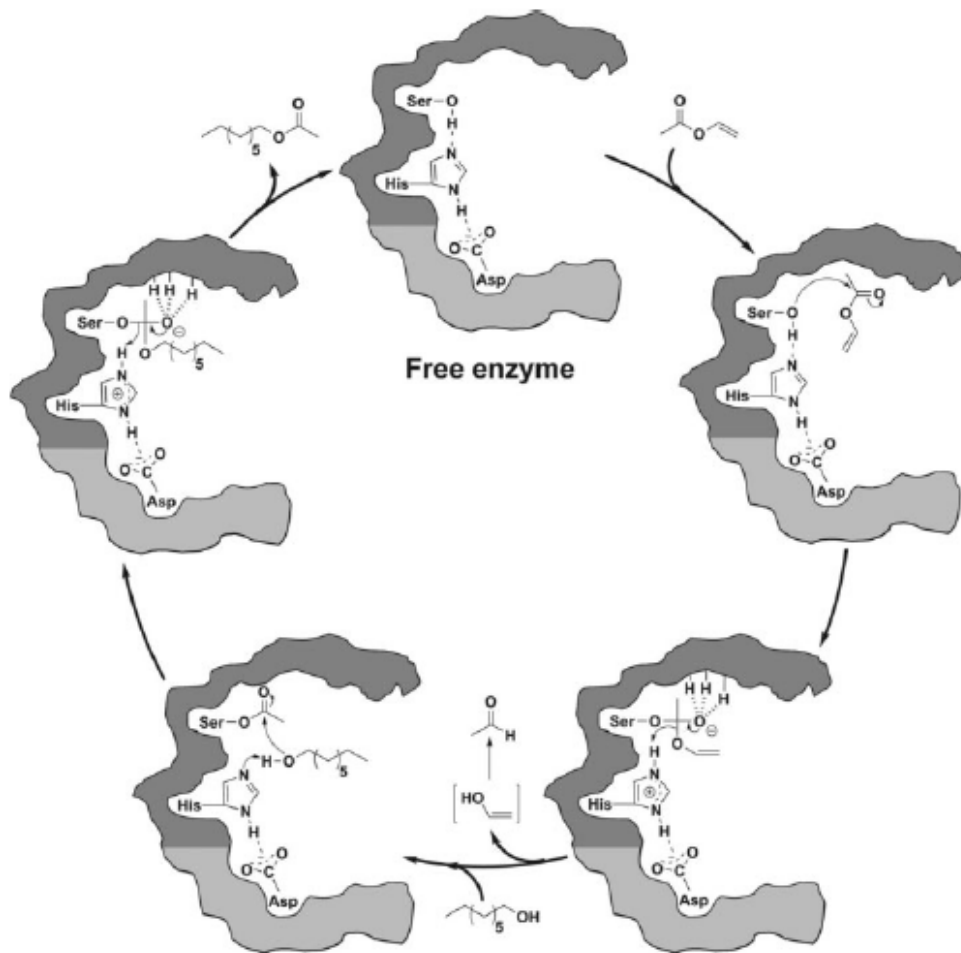
Enzima	Actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	11.3
Lipozyme IM20	1.3
Lipasa <i>Pseudomonas</i>	0.93
Lipasa <i>Candida cylindrase</i>	0.00
Lipasa de pancreática porcina	0.00

La secuencia de aminoácidos y sitios activos en la estructura de la CALB han sido resueltos por Uppenberg *et al* en 1994. La CALB posee un centro activo profundo y cerrado que se compone de serina (Ser105), histidina (His224) y aspartato (Asp187) como la triada catalítica. Este sitio activo se compone de dos canales; uno aloja la parte acilo y el otro, aloja la parte alcohol del sustrato, siendo el primer canal el más espacioso. Por lo tanto, se espera que la enzima tenga mayor grado de selectividad hacia los sustratos que sean alcoholes. Por ejemplo, aunque los alcoholes primarios son conocidos como excelentes sustratos para la CALB, los alcoholes ternarios (por ejemplo *tert*-butanol) son tan inertes con la CALB que pueden utilizarse efectivamente como disolventes en las reacciones catalizadas con CALB. (Uppenberg *et al.*, 1994; Puskas *et al.*, 2009)



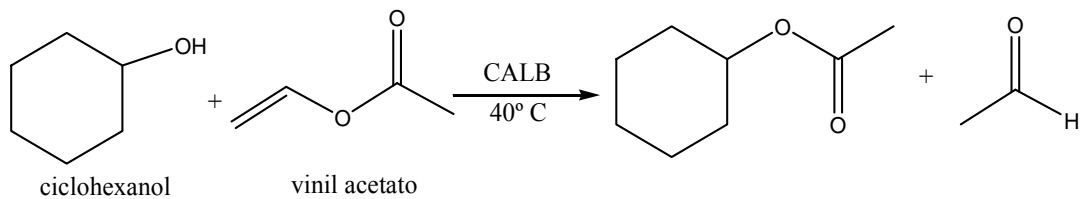
**Figura 3. Transesterificación, catalizada por lipasas, de acetato de vinilo y n-octanol**

De acuerdo con el mecanismo catalítico, la transesterificación del acetato de vinilo con n-octanol (figura 3) consiste en 4 pasos subsecuentes: primero, se forma un intermediario tetraédrico por el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina hacia el grupo carbonilo del acetato de vinilo, lo que resulta en la estabilización oxianión por el llamado “poro del oxianión” por tres enlaces de hidrógeno, uno con una unidad de glutamina (Gln106) y dos con unidades de treonina (Thr40). En el segundo paso, el enlace éster se rompe para así liberar el alcohol, que es, el alcohol vinílico, y el complejo de acilo-enzima. En el tercer paso, el n-octanol ataca al grupo carbonilo del complejo acil-enzima para formar el segundo intermediario tetraédrico, el cual es nuevamente estabilizado por el “poro del oxianión”. Finalmente, en el cuarto paso, la enzima es desacetilada para formar el éster deseado, acetato de octilo. En la figura 4 se muestra el mecanismo. La parte oscura de la enzima representa el canal acil de la enzima, mientras que la parte clara representa el “compartimiento” del alcohol. (Puskas *et al.*, 2009)



**Figura 4. Ilustración del mecanismo de transesterificación, catalizada por CALB, del acetato de vinilo con n-octanol**

Aparte de la estructura de los reactivos, la naturaleza de los disolventes orgánicos es importante en la catálisis enzimática. Como se mencionó anteriormente, los disolventes hidrofóbicos son mejores ya que los disolventes hidrofílicos pueden despojar la estrechamente vinculada capa de agua en la superficie de la enzima, la cual es necesaria para mantener la conformación catalíticamente activa de la enzima.



**Figura 5 Transesterificación, catalizada por CALB, de acetato de vinilo con ciclohexanol**

El trabajo de Riva y colaboradores (1997) ilustra el efecto de la hidrofobicidad del disolvente en la velocidad inicial y la conversión en las transesterificaciones catalizadas con CALB de acetato de vinilo en ciclohexanol (figura 5). La reacción fue cuantitativa en todos los casos excepto en DMF, el cual tuvo un (*log P*) de -1.0, y la lipasa mostró la más alta actividad en hexano, el disolvente con el (*log P*) más elevado como se muestra en la tabla 4. (Danieli *et al.*, 1997; Puskas *et al.*, 2009)

**Tabla 4. Efecto de la hidrofobicidad de disolventes en la actividad de la enzima CALB**

Disolvente	log P	Velocidad inicial ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Conversión (%)	
			5 horas	24 horas
Hexano	3.5	2.14	100	
THF	0.49	1.17	95	100
Acetonitrilo	-0.33	0.76	85	100
DMF	-1.0	0.0	-	-

El rango de temperatura óptima de estabilidad de la CALB es de 40 a 60° C. Por ejemplo, Zong y colaboradores (2008) demostraron que la temperatura óptima para la acilación de 5-azacitidina con laureato de vinilo en piridina es 50° C. (Chen *et al.*, 2008; Puskas *et al.*, 2009)

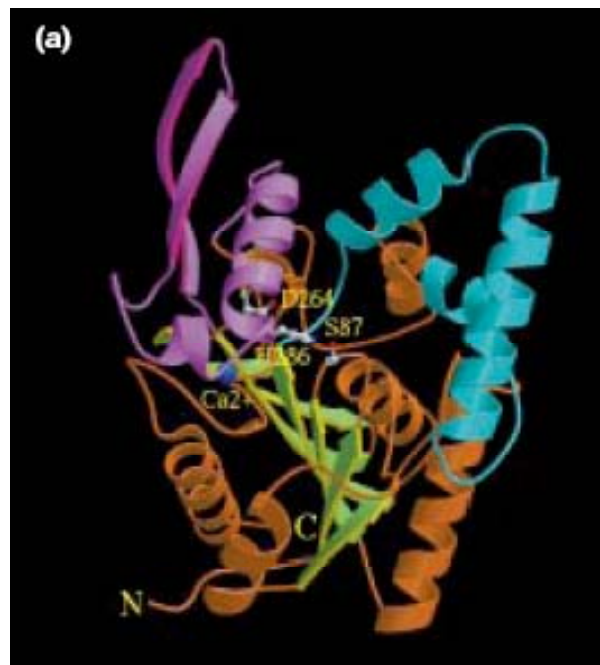
### 2.2.1.2 Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Lipasa PS)

El complejo *Burkholderia cepacia*, o simplemente *Burkholderia cepacia* o *Pseudomonas cepacia*, es un grupo de bacterias Gram negativas (no fermentadoras) y aerobias. Estas bacterias producen y secretan exitosamente lipasas de forma extracelular, las cuales catalizan ambas la hidrólisis y síntesis de acilgliceroles de cadena larga. (Kim *et al.*, 1997; Jaeger *et al.*, 1999)

La Lipasa PS muestra una alta preferencia por la hidrólisis de triglicéridos con un largo de cadena mayor de 8. Esta enzima es ampliamente utilizada para la síntesis orgánica e hidrólisis debido a su enantioselectividad. Su secuencia de aminoácidos se ha deducido a partir de la secuencia de ADN. La cadena polipeptídica madura consta de 320 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 33128 Da. La estructura cristalina de 3.0 Å de la lipasa PS muestra que la enzima se compone de tres dominios, el mayor de los cuales contiene un subconjunto de  $\alpha/\beta$  hidrolasa y un sitio de unión de calcio. (Kim *et al.*, 1997)

La lipasa PS es una enzima globular con las dimensiones aproximadas de 30 Å x 50 Å x 50 Å y su estructura se puede dividir en un dominio grande y dos pequeños (figura 7). Las terminales N y C y los tres residuos catalíticos están etiquetados; los residuos catalíticos se muestran en la representación de bola y el palillo. El ion  $\text{Ca}^{2+}$  es mostrado como una esfera de color azul oscuro.

En la lipasa PS, la triada catalítica está formada por tres residuos (Ser87, His286 y Asp264) situados en el extremo terminal C. En esta lipasa, el nucleófilo Ser87, está situado en una curva cerrada, lo que permite a la His286 poder tener acceso a un lado y el sustrato poder tener acceso por el otro. Se cree que esta configuración especial del nucleófilo en el sitio activo es esencial para la hidrólisis del sustrato. También se encontró un sitio de unión de calcio, los iones ligando del calcio son dos grupos carboxilato de Asp242 y Asp288, dos grupos carbonilo de Gln292 y Val296 y dos moléculas de agua. (Kim *et al.*, 1997)

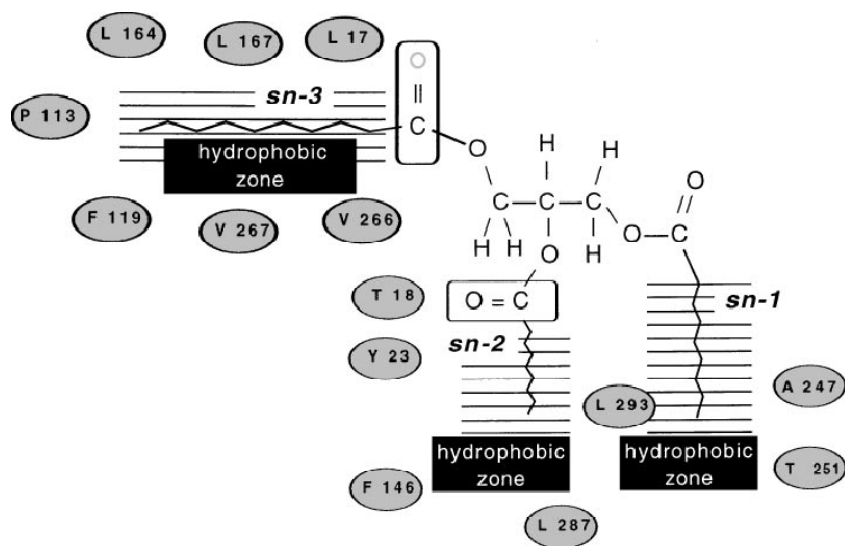


**Figura 6. Diagrama estéreo de cinta de la lipasa PS. El dominio C es de color café y verde. U1 es azul, y U2 es morado. Las terminales N y C y están marcados los tres residuos catalíticos; también se muestran los residuos catalíticos. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  se muestra como una esfera azul oscuro.**

Estudios bioquímicos han mostrado que el mecanismo de hidrólisis por lipasas es similar al de la proteasas de serina. En ambos casos, se crea un oxianión, durante la hidrólisis, que se localiza en la

llamada “cavidad del oxianión” y se estabiliza mediante las interacciones con algunos electrófilos. En la lipasa PS la “cavidad del oxianión” se genera al abrirse la tapa de la enzima.

El sitio activo de la lipasa PS muestra todas las características que se sabe se conservan entre las lipasas. La triada catalítica y las características estructurales provocada por la apertura de la tapa, tales como la formación de una cavidad del oxianión y la exposición de un compartimiento de fijación del sustrato, están bien conservados en las estructuras abiertas de otras lipasas entre la que se encuentra la CALB. Las consecuencias similares de la conformación sugieren que la conformación abierta de la lipasa PS representa un estado activo. Todos los datos de carácter estructural apoyan la idea de que esta lipasa comparte el mismo mecanismo de activación interfacial y acción catalítica con otras lipasas (lipasa de *Candida rugosa*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, CALB). (Kim *et al.*, 1997)



**Figura 7** El sitio activo de la lipasa PS. Se indican los espacios de vinculación para las partes sn1, sn2 y sn3 del sustrato lípido. También se indican los residuos que cubren los orificios vinculantes

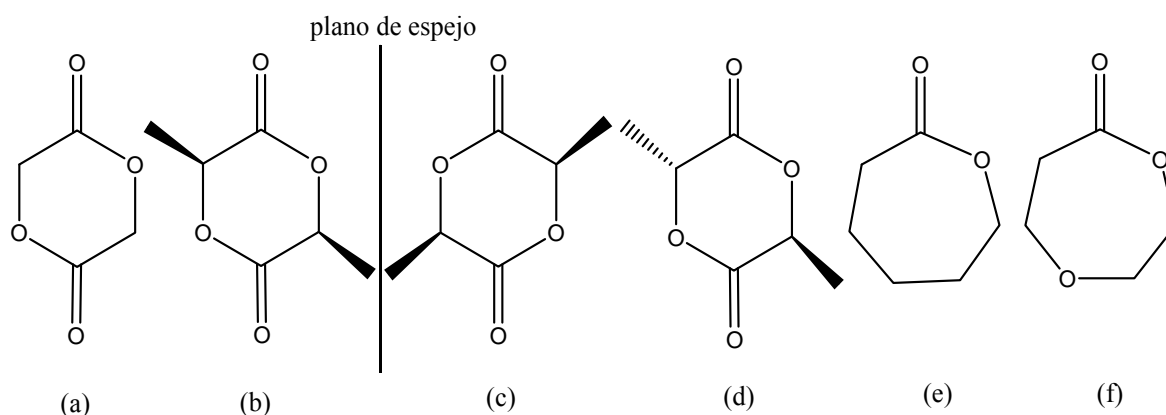
### 2.3 Polimerización Enzimática

La polimerización enzimática es la síntesis química de un polímero *in vitro* a través de una ruta no metabólica catalizada por una enzima aislada. Cuando intervienen lipasas en medios no acuosos se pueden generar estructuras tipo poliéster por poliesterificación o politransesterificación.

En general, la polimerización catalizada por lipasas requiere tiempos de reacción más largos que en el caso de catalizadores inorgánicos para la conversión total del monómero y se obtienen poliésteres con índice de polidispersidad relativamente alto. Usualmente se requieren altas relaciones de enzima/monómero en la polimerización en medio orgánico debido a que la enzima queda suspendida en este medio (reacción heterogénea).

Un método para sintetizar poliésteres alifáticos es la policondensación de ácido hidroxicarboxílico. Este es un método menos caro, pero usualmente resulta en rendimientos y pesos moleculares bajos. Además, es muy difícil obtener polímeros con arquitecturas bien definidas, composición y grupos terminales. El método más común para sintetizar poliésteres alifáticos es la PAA de lactonas o di-lactonas, como el GA o el láctido. Carothers y colaboradores desarrollaron este método en 1932. Existen diversos iniciadores y catalizadores para la PAA desde entonces. Gracias a la PAA es posible controlar las propiedades como peso molecular, distribución de peso molecular y arquitectura del polímero. Este método también hace posible los grupos terminales deseados y la copolimerización de varios monómeros, dependiendo del catalizador elegido. La polimerización de lactonas se lleva a cabo en masa o en solución, emulsión o dispersión.

Las lactonas y di-lactonas más ampliamente utilizados en PAA incluyen CL, GA y D- o L-láctido (figura 8) debido a su hidrolizabilidad y biocompatibilidad como polímeros. En el cuerpo humano, estos polímeros se degradan mediante hidrólisis en sus correspondientes hidroxiaácidos los cuales pueden ser metabolizados y esto los hace útiles como materiales de implante reabsorbibles. Estos monómeros poseen una amplia gama de aplicaciones en ingeniería de tejidos como cartílagos artificiales, ligamentos, suturas, entre otros.



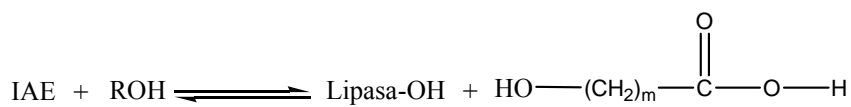
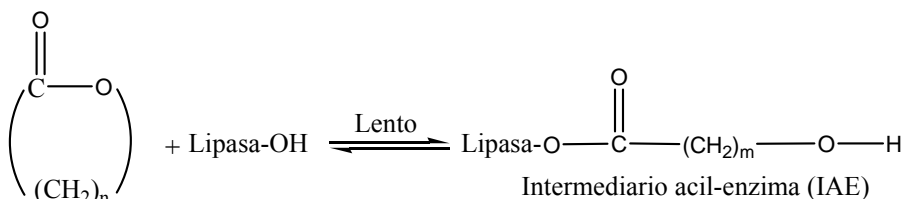
**Figura 8. Monómeros de: (a) GA; (b) L-láctido; (c) D-láctido; (d) D, L- o meso -láctido; (e) CL; (f) 1,5-dioxepan-2-ona**



### 2.3.1. Polimerización por apertura de anillo (PAA) Enzimática

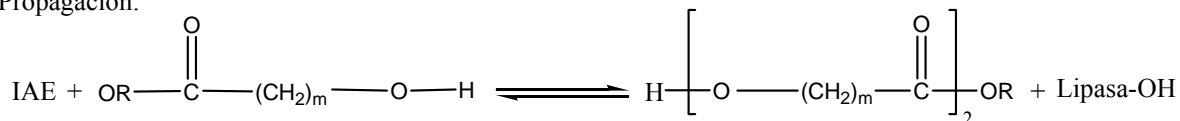
Por analogía con otras reacciones catalizadas con lipasas, Uyama y colaboradores (1993) sugirieron el mecanismo de reacción de la PAA de las lactonas. El sitio catalítico de la lipasa es el residuo de la serina y las reacciones se llevan a cabo mediante un intermediario acil-enzima. La polimerización enzimática de lactonas se explica mediante la siguiente secuencia de reacciones que se muestra en la figura 9. El paso determinante es la reacción de la lactona con la lipasa que implica la apertura de anillo de la lactona para dar el intermediario acil-enzima (monómero activado por la enzima, EM). La iniciación es el ataque nucleofílico del agua, la cual está contenida parcialmente en la enzima, sobre el “carbono acilo” del intermediario para producir un ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico, que son especies de propagación cortas. Otros nucleófilos como alcohol o amina pueden participar en esta reacción. En la etapa de propagación, el intermediario sufre un ataque nucleofílico del grupo terminal hidroxilo de una cadena polimérica que se está propagando, o bien una forma ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico, para producir “una unidad más larga”. Esto es “el mecanismo de activación del monómero”. (Kobayashi *et al.*, 2001)

Iniciación:



donde, R=H o grupo alquil, m=numero de unidades metileno en la lactona

Propagación:

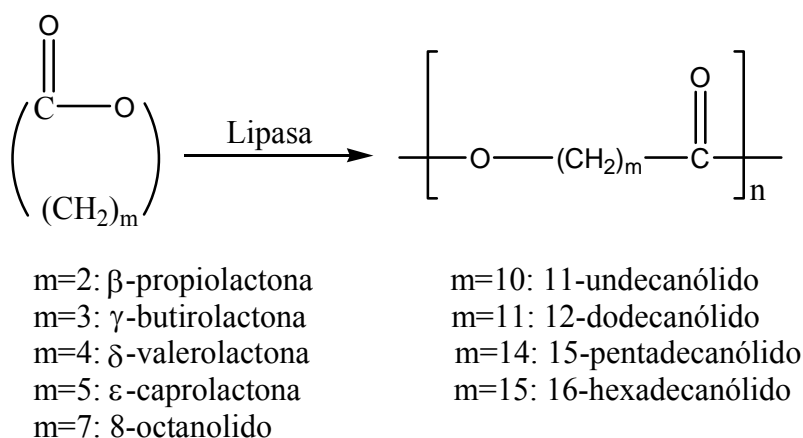


**Figura 9. Mecanismo postulado de la polimerización catalizada por lipasas de las lactonas**

El primer reporte de polimerización enzimática por apertura de anillo fue en 1993; Uyama y Kobayashi realizaron la polimerización en masa de CL a 60 °C durante 10 días utilizando la lipasa

de *Pseudomonas fluorescens*. Con esta lipasa se obtuvo una conversión del monómero de 92% con un  $M_n=7,700$  con grupos terminales de carboxilo e hidroxilo.

Más tarde, varios compuestos cíclicos fueron polimerizados por apertura de anillo catalizada por lipasas. Entre los monómeros cíclicos, la polimerización catalizada por lipasas de las lactonas ha recibido mayor atención. En la figura 10 se muestran los poliésteres resultantes de la polimerización enzimática de lactonas no sustituidas con tamaño de anillo de 4 a 17 (Uyama *et al.*, 1993).



**Figura 10. Poliésteres obtenidos de la polimerización enzimática de lactonas**

En los compuestos cíclicos, la reactividad depende en gran medida del tamaño de anillo; la tensión en los anillos de tamaño pequeño y moderado es mayor que en los macrociclos, y por lo tanto, los primeros muestran mayor reactividad para la apertura del anillo.

En la tabla 5 se muestran los valores de momento dipolo y reactividades de lactonas con diferente tamaño de anillo. Los valores de momento dipolo de los monómeros pueden indicar la tensión del anillo. Los valores de los macrólidos son menores que los de la CL y muy cercanos al del éster de ácido graso acíclico (caproato de butilo). Las constantes de velocidad de los macrólidos en la hidrólisis alcalina y la polimerización aniónica son mucho menores que las de la CL. Estos datos implican que los macrólidos tienen menor tensión en el anillo y, por lo tanto, muestran menos reactividad aniónica y polimerizabilidad que la CL (Kobayashi *et al.*, 2001).

**Tabla 5. Momentos dipolos y reactividad de lactonas no sustituidas**

Lactona	Tamaño de anillo	Momento dipolo (D)	Constante de velocidad		Cinética de Michaelis-Menten <sup>c</sup>		
			Hidrólisis alcalina <sup>a</sup> (10 <sup>4</sup> , L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Propagación <sup>b</sup> (10 <sup>3</sup> , s <sup>-1</sup> )	K <sub>m(lactona)</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	V <sub>max (lactona)</sub> (10 <sup>2</sup> , mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	V <sub>max (lactona)</sub> /K <sub>m(lactona)</sub> (10 <sup>2</sup> , h <sup>-1</sup> )
<b>δ-valerolactona</b>	6	4.22	55000				
<b>CL</b>	7	4.45	2550	120	0.61	0.66	1.1
<b>11-undecanólido</b>	12	1.86	3.3	2.2	0.58	0.78	1.4
<b>Caproato de butilo</b>		1.75	8.4				

<sup>a</sup>Alcalina: NaOH. Medida en 1,4-dioxan/agua (60/40 % vol) a 0° C. <sup>b</sup>Medida usando NaOMe como iniciador (0.06 mol) en THF a 0° C. <sup>c</sup>La cinética de polimerización se realizó utilizando lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (200 mg) como catalizador en presencia de 1-octanol (0.03 mol/L) en diisopropil éter (10 mL) a 60° C.

Se observó que la polimerización de las lactonas obedece la cinética de Michaelis-Menten ya que todos los monómeros se comportaron linealmente en la gráfica de Hanes-Woolf. Los valores de  $V_{\max (lactona)}$  y  $V_{\max (lactona)}/K_m (lactona)$  incrementan con el tamaño del anillo de la lactona, mientras que los valores de  $K_m (lactona)$  raramente cambian. Estos datos implican que la polimerización enzimática incrementa como función del tamaño de anillo, y la duración de la polimerización enzimática está regida principalmente por la velocidad de reacción ( $V_{\max}$ ) y no por la capacidades de unión, por ejemplo, el proceso de reacción del complejo lipasa-lactona al convertirse en el intermediario enzima-acilo es el paso determinante de la polimerización. (Kobayashi *et al.*, 2001)

Se han probado varias lipasas, disponibles en el mercado, en la catálisis enzimática para la PAA de la CL. Algunas lipasas en estado libre (lipasa pancreática porcina, lipasa de *Candida rugosa*, lipasa PS y *Pseudomonas fluorescens*) inducen la polimerización; sin embargo, se requiere una gran cantidad de catalizador (frecuentemente más de 40% en peso con respecto a la CL) para la producción eficiente del polímero. Al usar la lipasa pancreática porcina se obtuvieron los mejores resultados en heptano a 65° C por 4 días con una conversión de 100% y una  $M_n=1,600$  usando butanol como iniciador. El peso molecular del polímero incrementa lentamente con la conversión, lo que sugiere que es una polimerización en cadena con una iniciación rápida pero con una propagación lenta. (McDonald *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1998)

## 2.4 Material objetivo de trabajo: copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA)

Se han realizado diferentes formulaciones basadas en copolímeros con GA a fin de obtener materiales sin las limitaciones asociadas al homopolímero (PGA). Por ejemplo, la incorporación de GA, unidad de rápida degradación, en un bloque de PCL puede acelerar su velocidad de degradación (Middleton *et al.*, 1998; Zurita *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2007)

La copolimerización de lactonas, catalizada por lipasas, frecuentemente da como resultado copoliésteres al azar. La formación de copolímeros al azar sugiere que la transesterificación intermolecular de poliésteres frecuentemente ocurre durante la copolimerización. Se puede obtener una variedad de materiales, con un amplio rango de propiedades, mediante la copolimerización de GA, láctido o CL y la variación de su incorporación en el copolímero. (Kobayashi *et al.*, 2001)

Es posible obtener copolímeros de dibloque utilizando lipasas como catalizadores. Se estudiaron los polibutadienos (con mono terminación de grupos hidroxilo), de diferente longitud de cadena, como sitios para la iniciación de la polimerización por apertura de anillo catalizada enzimáticamente por Novozym 435. Se obtuvo exitosamente el copoli (butadieno/ $\epsilon$ -caprolactona) en tolueno a 55 °C. Se realizó exitosamente la copolimerización de CL y poli (etilenglicol) con terminación mono-hidroxil o di-hidroxil, obteniendo copolímeros di-bloque o tri-bloque al utilizar Novozym 435 como catalizador. Se obtuvieron más altas velocidades y pesos moleculares al utilizar tolueno como disolvente. (Varma *et al.*, 2005)

De la copolimerización de CL y D, L-láctido catalizada CALB a 70° C resultan al inicio polímeros con incorporación no-aleatoria de láctido en el polímero y la exclusión de la CL de la matriz. Después de esta etapa inicial, el láctido y la CL son polimerizados a aproximadamente velocidades iguales. Eventualmente, se obtiene una mezcla al azar debido a las reacciones de transesterificación.

Los métodos químicos para obtener copolímeros al azar utilizan octoato de estaño como iniciador a 160-220° C. Otra forma es obtener copolímeros de estructura segmentada. El método empleado consiste en preparar un copolímero al azar de GA y CL seguido de una elongación de la cadena con GA introducido al medio de reacción. Este polímero biodegradable se comercializa bajo la marca comercial llamada Monocryl (producida por Ethicon) empleada como sutura quirúrgica que contiene un 75% de GA. El material de PCLGA posee baja rigidez y unas características de manejo excelentes. Este copolímero se ha aplicado como implante y sutura quirúrgica con resultados satisfactorios pero no existe mucha información acerca de su aplicación en la liberación controlada de fármacos. La razón principal es que el copolímero es poco soluble en disolventes orgánicos

convencionales. Para preparar las microesferas, los copolímeros deben, primero que nada, ser solubles en disolventes convencionales. Sin embargo, PGA es un material rígido y altamente cristalino e insoluble.

Debido a que GA es mucho más reactivo que la CL, las velocidades de copolimerización de ambos son muy diferentes. Como resultado, se obtienen polímeros de PCLGA con secuencias de bloques a lo largo de la cadena del polímero. La insolubilidad de los segmentos de PGA en los disolventes convencionales hace que los polímeros sean parcialmente solubles si el contenido de las unidades de GA es menor a 10% molar. Por lo tanto, los materiales utilizados para la fabricación de microesferas deben poseer un alto contenido de unidades provenientes de la CL para incrementar la solubilidad. Sin embargo, en ese caso, el copolímero exhibiría desafortunadamente una baja hidrofobicidad y una velocidad de degradación baja debido a un dominio en la formación de PCL. (Cai *et al.*, 2002)

Se ha conducido la copolimerización de estos monómeros usando una relación molar inicial de 1:2 a 100° C, utilizando FeCl<sub>3</sub> y BF<sub>3</sub> como iniciadores catiónicos que favorecen la incorporación de la lactona mientras que ZnCl<sub>2</sub> y Al(OPr)<sub>3</sub> favorecen la incorporación de GA. También se encontró que, debido a la transesterificación, se produce una división de las unidades de GA para formar estructuras de Cap-G-Cap. (Kricheldorf *et al.*, 1984) Bero *et al* (1999) estudiaron la copolimerización de CL y GA en presencia de octoato de estaño a 100° C con una relación molar GA: CL de 1:4. Los resultados indicaron que se favorece la adición de GA en la cadena de polímero y a una conversión total de 60% (60 h de reacción) ya se ha consumido casi el 100% del GA alimentado al inicio y se ha incorporado un 33% de las unidades glicolidil al polímero. Al avanzar la reacción, el largo de las cadenas de microbloques de glicolidil disminuye mientras que las cadenas de microbloques provenientes de la PAA de CL se incrementan lentamente. A las 150 h de reacción se obtuvo una conversión total de 94 % (g de polímero/g inicial de GA y CL), con la conversión individual de cada monómero (GA y CL) cercana al 100% y un incorporación de GA del 21%. Los autores concluyeron que estas observaciones se deben a las reacciones de transesterificación que implican el ataque de una terminal activa del grupo caproil sobre los microbloques del glicolidil de la cadena en crecimiento. (Bero *et al.*, 1999; Dobrzynski *et al.*, 2005)

Cai y colaboradores (2002) sintetizaron copolímeros tribloque tipo ABA de PCLGA (A) y poli(etilenglicol) (B) mediante polimerización en masa usando octoato de estaño como catalizador. Los copolímeros obtenidos mostraron un incremento de la hidrofobicidad. Posteriormente Jiang *et al* (2007) prepararon termo geles de copolímeros tribloque tipo ABA de PCLGA (A) y poli(etilenglicol) (B) controlando el balance hidrofílico/hidrofóbico y la composición química de los

materiales. El GA fue incorporado dentro de la cadena del copolímero para incrementar su velocidad de degradación (Cai *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007).

Sin embargo al momento no hay ningún reporte de síntesis enzimática de PCLGA.

## **2.5 Fluidos comprimidos (FC) como medio de reacción no-convencional**

Ha habido un creciente interés, en el campo de la biocatálisis, en la búsqueda de disolventes seguros y no tóxicos que sigan los principios de la química verde (utilizar métodos de síntesis: que generen sustancias con poca o ninguna toxicidad y que se lleven a cabo a temperatura y presión ambiental; reducir el uso de disolventes; utilizar materias primas renovables; emplear catalizadores reutilizables; generar productos biodegradables). Desde los primeros reportes de reacción catalizadas enzimáticamente en FC, especialmente en fluidos supercríticos (FSC) definidos como fluidos que se encuentran por encima de su temperatura y presión crítica, se ha incrementado la atención en el uso de gases densos, principalmente dióxido de carbono supercrítico ( $scCO_2$ ), como alternativas potenciales a los disolventes orgánicos convencionales. (Yu *et al.*, 2007) Las ventajas en el uso de FSC incluyen el reemplazo total de los disolventes orgánicos, al igual que una alta difusión y una baja viscosidad que reducen las limitaciones de transporte en la interface, favorecen la cinética de la reacción, y afinan la selectividad de la reacción debido a un incremento apreciable en la concentración local del sustrato y del catalizador. Además, el poder de solvatación variable de los FSC facilita la separación de los reactivos, productos, y catalizador después de la reacción, por lo tanto, la integración de los pasos de procesamiento de las corrientes de salida y biocatalítica en un biorreactor. (Yu *et al.*, 2007)

El  $scCO_2$  es el FC más utilizado sin embargo, los solutos que se pueden utilizar se limitan a compuestos poco polares y altamente volátiles, lo cual significa que no es apropiado para ambos compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Además, las características hidrofílicas del  $scCO_2$  en un amplio rango de presiones afecta negativamente la actividad de la enzima, debido a que la partición del agua entre la enzima y la mezcla de reacción puede ser un factor determinante para conducir las reacciones. Sin embargo, el  $scCO_2$  no es el único FC cuyas propiedades se encuentran en el rango donde la biocatálisis es factible, y no todos los materiales alternativos modifican químicamente la proteína. Alternativamente, el R134a es un gas relativamente nuevo que fue introducido para sustituir a los refrigerantes clorados que destruían la capa de ozono. El uso del R134a como disolvente ha sido reportado en “Phytosol A”, un proceso de extracción para recuperar productos naturales de un amplio rango de plantas. (Yu *et al.*, 2007)

El R134a puede ser considerado como un fluido aprótico, no tóxico, halogenado, inflamable, estable en ácidos y bases, en medio acuoso. El R134a es inmisible en agua y escasamente soluble en agua (1500 ppm a 20° C) pero miscible con la mayoría de disolventes orgánicos. El R134a es gas a temperatura y presión ambiente con un punto normal de ebullición de -26° C. Es normalmente manejado como gas comprimido bajo presión en forma líquida y tienen una densidad líquida de 1.3 kg/l (25° C). El R134a no es un compuesto orgánico volátil (COV) y no destruye la capa de ozono, tiene una capacidad de calentamiento global leve y es considerado GRCS (Generalmente reconocido como seguro). (Corr, 2002)

El R134a tiene una temperatura y presión crítica relativamente elevadas ( $T_c = 101.21^\circ \text{C}$ ,  $P_c = 4.059 \text{ MPa}$ ), sin embargo se puede usar en estado líquido a condiciones de operación mucho más suaves. De acuerdo con el momento dipolo y la constante dieléctrica (propiedades físicas que son indicadores de la polaridad del solvente), el R134a ( $\epsilon = 9.5 \text{ KHz}$ ,  $MD = 2.05 \text{ D}$ ) es más polar que algunos solventes convencionales, como el dietileter ( $\epsilon = 4.34 \text{ KHz}$ ,  $MD = 1.52 \text{ D}$ ) y el tetrahidrofurano ( $\epsilon = 7.61 \text{ KHz}$ ,  $MD = 1.63 \text{ D}$ ) ya que posee una constante dieléctrica y un momento dipolo mayor que estos. Esto sugiere que el R134a solubiliza las cadenas de polímero en crecimiento, especialmente las polares, lo cual retarda su precipitación. El  $\text{scCO}_2$ , en ausencia de modificadores polares, es considerado como no polar en un amplio rango de presiones de operación. (Corr, 2002).

El R134a presurizado es más hidrofóbico que el  $\text{CO}_2$  presurizado aunque parecer ser juzgado hidrofílico a partir de otros parámetros como permeabilidad y polaridad. Como indican muchos investigadores, la actividad y estabilidad de la enzima en disolventes orgánicos se incrementa con la hidrofobicidad ( $\log P$ ) de los disolventes, el R134a presurizado, con respecto a su parámetro hidrofóbico, puede ser un medio prometedor para las reacciones catalizadas por enzimas. (Yu *et al.*, 2007)

El R134a requiere baja presión para convertirse en líquido ( $P < 2 \text{ MPa}$ ) con propiedades físicas y químicas adecuadas para la síntesis y procesamiento de materiales. La viscosidad del R134a líquido es 0.21 cP a 25° C, muy cercana a la del  $\text{scCO}_2$  (0.1 a 20 MPa y 33° C). Su tensión superficial es 8.7 din/cm a 25° C, la cual es mucho menor que los valores registrados para los disolventes orgánicos comunes (17-73 din/cm). Su baja tensión superficial y baja viscosidad son propiedades que permiten una humectación y penetración rápida en la matriz del soluto, la baja viscosidad también incrementa la rápida difusión del soluto a través del disolvente lo cual promueve buenas velocidades de disolución del soluto. (Corr, 2002)

## 2.6 Actividad enzimática en R134a líquido

Yu y colaboradores (2007) analizaron la actividad residual de la CALB inmovilizada después de su exposición a R134a subcrítico en un rango de presiones de 2-8 MPa a 40° C por 7 horas. La incubación de la Novozym 435 en R134a líquido resulta en un incremento significativo en la actividad de la enzima hasta un valor máximo de 229%, con respecto a la actividad inicial, a una presión de 4MPa. En el rango de presión estudiado, no se observó una pérdida de actividad y la actividad residual decrece con el incremento de la presión para valores por encima de 4MPa. El R134a muestra variaciones en sus propiedades como disolvente en un rango de presiones bajo, y su polarizabilidad se incrementa linealmente con el incremento de la presión en la región subcrítica. Se ha argumentado que el decrecimiento de la actividad de la lipasa en FSC se puede atribuir a interacciones enzima-disolvente. Por lo tanto, las interacciones enzima-disolvente cambian con la presión, lo cual resulta en la variación de la actividad residual con la presión. Se debe enfatizar que el R134a subcrítico es un disolvente relativamente polar y tiene más alto poder de solvatación para solutos polares, aun en estado subcrítico (relativamente bajas presiones), que el scCO<sub>2</sub>, lo cual es de gran interés para uso en reacciones catalizadas por enzimas.

También se observó una excelente estabilidad térmica al realizar la incubación de Novozym 435 en R134a líquido en un rango de temperatura de 30-60° C con un incremento en la actividad de la enzima hasta un máximo de 300% con respecto a la actividad inicial a 30° C. En contraste, las pruebas realizadas con scCO<sub>2</sub>, presentaron una pérdida de actividad de la enzima del 5% para la novozym 435 a 55° C (4 MPa, 7 h), mientras que no se observó una pérdida de la actividad de la enzima cuando la novozym 435 se expuso a R134a subcrítico hasta 60° C (4 MPa, 7 h). (Yu *et al.*, 2007)

Por otro lado, se sometió a la Novozym 435 a una incubación en R134a subcrítico a diferentes tiempos. Se observó un cambio dependiente del tiempo en la actividad de la enzima. Aun después de 12 horas de incubación, la enzima permaneció estable y activa (actividad residual, 199%). Las velocidades de reacción en los FSC se pueden aumentar y se puede lograr una conversión satisfactoria en pocas horas (menos de 6 horas). La estabilidad de las enzimas así como su actividad depende de la concentración de agua en el medio. (Yu *et al.*, 2007)

Con respecto al contenido de agua, la influencia de éste en la estabilidad de la enzima depende de la hidrofobicidad del medio, el soporte en que esta inmovilizada la enzima y el tipo de enzima. El agua es necesaria para que la lipasa inmovilizada exhiba su actividad en los FC, y la cantidad de absorción de agua en el soporte que inmoviliza depende en gran medida de la solubilidad del agua



en los FC. La solubilidad del agua en R134a subcrítico es menor que en scCO<sub>2</sub> y como resultado el coeficiente de distribución del agua para la lipasa es mayor en R134a que en el scCO<sub>2</sub>. Se estudió como se afectaba la actividad residual de la enzima después de una exposición con R134a subcrítico a 4 MPa y 40° C (7 h), incrementado la contenido de agua [relación enzima (peso/peso): agua de 1:1, 1: 2 y 1: 5] para la Novozym 435. Los resultados indicaron un incremento en la actividad de la enzima (el máximo fue de 277% con respecto a la actividad inicial para una relación 1:1 enzima/agua, peso/peso) en un amplio rango de contenido de agua (enzima: agua, p/p). (Yu *et al.*, 2007)

Se ha encontrado que, la polimerización enzimática, en la que se obtienen polímeros polares, ha sido un reto debido a la desactivación del catalizador en disolventes orgánicos convencionales polares e/o hidrofílicos. La adición de pequeños volúmenes de agua en el medio hidrofílico puede superar este inconveniente; sin embargo, existen dificultades para el control de la reacción y se observan resultados bajos en las poli-transesterificaciones o poliamidaciones. (García-Arazola *et al.*, 2007)

Takamoto y colaboradores (2001) reportaron por primera vez la polimerización por apertura de anillo, con CALB, de la CL usando scCO<sub>2</sub> como disolvente con peso molecular número ( $M_n$ ) promedio de 9,600 g/mol. Posteriormente, Loecker y colaboradores (2004) estudiaron la polimerización, catalizada por Novozym 435, de la CL en scCO<sub>2</sub> obteniendo un peso molecular de PCL similar al obtenido en tolueno (37,000 g/mol), pero con scCO<sub>2</sub> se lograron mejores rendimientos (95-98%) y menores índices de polidispersidad. Las presiones de operación utilizadas se encuentran en un rango de 8 a 22 MPa y la temperatura de reacción fue de 65° C. (Takamoto *et al.*, 2001; Loecker *et al.*, 2004)

García-Arazola y colaboradores (2007) demostraron por primera vez la efectividad de R134 líquido como medio de reacción en la síntesis de poliésteres catalizada por lipasas. Ellos realizaron la PAA de la CL, catalizada por Novozym 435 usando R-134a líquido a una presión de 2.5 MPa. El peso molecular masa ( $M_w$ ) máximo alcanzado en este estudio inicial fue de 37,600 g/mol con un PDI de 1.7. El rendimiento del polímero fue mayor de 95% y no se observó conversión en ausencia de enzima. En este caso, la temperatura óptima para la actividad de la enzima en el R134a fue de 65° C, similar a los reportes previos en tolueno y scCO<sub>2</sub>. También se determinó que el uso de R134a en su estado líquido se obtienen resultados similares que con presiones mayores (5 MPa). Por lo tanto, se obtuvieron mejores resultados en R134a líquido con presiones más bajas que con scCO<sub>2</sub>. El máximo rendimiento alcanzado fue después de 24 horas. Se observó que el rendimiento del polímero decrece a mayores tiempos de reacción (García-Arazola *et al.*, 2007).

En un estudio posterior, se analizó el efecto de la actividad de agua inicial ( $a_{wi}$ ) ya que se considera un parámetro crucial para la actividad del biocatalizador. La actividad del agua se define como la relación entre la presión parcial del agua ( $\bar{P}_{H_2O}$ ) dividida por la presión de vapor del agua ( $P_{v,H_2O}$ ). Este parámetro termodinámico se utiliza frecuentemente para representar la cantidad de agua disponible que las moléculas de enzima requieren para mantener la conformación y flexibilidad esencial para la catálisis. En los experimentos se varió la  $a_{wi}$  en un rango de 0.16 a 0.75. El máximo rendimiento alcanzado fue de 99% con un  $M_n$  de 7,000 después de 48 horas de reacción con un  $a_{wi}$  de 0.22. En contraste el biocatalizador con un  $a_{wi}$  mínima dio un rendimiento máximo de 67% pero con una máxima  $M_n$  de 83,000 g/mol (48 horas). Los experimentos que realizaron con  $a_{wi}$  mayores de 0.22 produjeron  $M_n$  y rendimientos más bajos (García-Arazola *et al.*, 2008).

## **CAPÍTULO 3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Síntesis y caracterización de PCL y PCLGA mediante PAA usando lipasas como biocatalizadores en el medio R-134a líquido.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Comprobar la solubilidad de los monómeros, sean estos CL, GA y mezclas de ambos en el medio R-134a líquido.

Llevar a cabo la síntesis de PCL y PCLGA en el medio R-134a líquido y en ausencia de disolvente, en masa, en función de la concentración inicial de monómeros, tiempo de reacción y tipo de lipasa.

Caracterización de los materiales obtenidos mediante las técnicas analíticas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón hidrógeno, cromatografía por exclusión de tamaño, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría y difracción de rayos x.

## CAPÍTULO 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales

GA (pureza mayor de 99%) de sigma-aldrich se mantuvo a -20° C hasta su uso. CL (99% de pureza) de Aldrich fue destilada a 95° C sobre CaH<sub>2</sub> a condiciones de vacío (30 mmHg) y mantenida en un recipiente con tamiz molecular activado (3 Å) a 5° C hasta su uso.

La CALB soportada en una matriz resina acrílica  $\geq 10,000$  U/g expresada en *Aspergillus niger* de Novozymes conocida comercialmente por Novozym 435. Temperatura de almacenamiento de 2-8° C. La lipasa PS producida por Amano Chemicals fue adquirida a través de Sigma-Aldrich (México) con actividad  $\geq 30,000$ U/g.

El cilindro de R134a (Dupont) fue proporcionado por Refacciones Star, México con un 98% de pureza. Los disolventes grado técnico fueron adquiridos de Química Barsa SA De CV (México). El cloroformo grado HPLC de J. T. Baker fue adquirido de Equipar SA De CV.

### 4.2 Diseño Experimental

Basándose en los reportes bibliográficos previos se ubicaron las condiciones de operación de la reacción de polimerización para ambas enzimas, los datos detallados se presentan en la tabla 6.

**Tabla 6. Diseño experimental**

Temperatura	65° C			
Enzima	CALB inmovilizada		Lipasa PS	
% peso de enzima (g de enzima/ g de monómeros)	10%		43%	
Medio de reacción	Masa	R-134a	Masa	R-134a
Presión	2.5 MPa		2.5 MPa	
% peso de monómeros	35%		20%	
Relación molar (GA:CL)	1:2, 1:3, 1:4	1:2, 1:3, 1:4	1:2, 1:3, 1:4	1:2, 1:3, 1:4
Tiempo de reacción (h)	12, 24, 48, 72, 96	12, 24, 48, 72, 96	120, 240, 370, 480	120, 240, 370, 480

### **4.3 Reacción de Polimerización**

Se realizaron reacciones en masa y en R134a líquido como medio de reacción. A continuación se describe el procedimiento que se llevo a cabo para cada uno de los medios de reacción:

#### **4.3.1. Polimerización en masa**

##### **4.3.1.1 Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada “Novozym 435”**

Los monómeros (2 g), en la relación molar 1:2, 1:3 y 1:4, GA: CL, y la enzima (0.2 g) se colocaron en un vial seco. El cual se mantuvo en el REVCO a  $-80^{\circ}$  C por un tiempo aproximado de 2 horas y luego se colocó en una liofilizadora a fin de eliminar el agua por un tiempo de 2 horas. La CL seca se adicionó después de esto. Posteriormente, el vial se colocó en un baño de glicerina de un equipo IKA 9001 con control de temperatura y agitación a las condiciones de  $65^{\circ}$  C durante el tiempo señalado en el diseño experimental.

El mismo procedimiento se realizó con las reacciones para obtener PCL.

##### **4.3.1.2 Lipasa *Pseudomonas cepacia* (Lipasa PS)**

Los monómeros (1.16 g), en relación molares 1:2, 1:3 y 1:4 (GA: CL) y la enzima (0.5 g) se colocaron en un vial seco. Posteriormente, el vial se calentó a temperatura constante y agitación a las condiciones de  $65^{\circ}$  C durante el tiempo señalado en el diseño experimental.

El mismo procedimiento se realizó con las reacciones para obtener PCL.

#### **4.3.2. Polimerizaciones en el medio R134a líquido**

Para la reacción de copolimerización se utilizó un reactor de acero inoxidable de 40 mL con un agitador magnético accionado por una placa de agitación externa. En el reactor se adicionó Novozym435 (1.4 g; 10 p%) o bien lipasa PS (3.5 g; 43 p%) y una cantidad determinada de GA. La válvula de entrada del reactor se mantuvo cerrada y la válvula de salida del reactor se conectó a una bomba de aceite con capacidad de vacío de 0.04 MPa (30 mmHg) por 12-16 h a fin de retirar agua de la enzima y el monómero. Después de las 12 h, se cerró la válvula de salida, se apagó la bomba y se abrió el reactor (eliminando así el vacío), se agregó la CL y se cerró nuevamente el reactor. La cantidad total de monómeros (GA y CL) fue de 14 g y de 8 g cuando se usó Novozym 435 y Lipasa PS, respectivamente, como catalizadores. Las relaciones molares estudiadas fueron 1:2, 1:3 y 1:4 (GA: CL). La válvula de entrada, que estaba acoplada con un manómetro, se conectó a una bomba

de pistón de alta presión ISCO (ISCO Corp, Modelo 100X, USA), la cual estaba conectada al cilindro de R134a. La columna presurizada de la bomba de pistón ISCO fue enfriada por un baño refrigerante (American Heto Labs. Inc., USA), que contenía una mezcla de agua y etilenglicol, a una temperatura de  $2\pm 1^\circ\text{C}$ . El R134a fue bombeado hacia el reactor mediante la bomba de pistón ISCO hasta la presión de 1.0 MPa. El reactor fue calentado con una chaqueta de cerámica y la temperatura fue controlada mediante dos termopares independientes que median la temperatura en la superficie externa de reactor y la temperatura en el interior del reactor, respectivamente. La temperatura y la presión de operación se mantuvieron en  $65\pm 1^\circ\text{C}$  y  $2.5\pm 0.2\text{ MPa}$ .

Al finalizar el experimento, según el tiempo de reacción correspondiente, el reactor se colocó en un cuarto frío a una temperatura de  $-5^\circ\text{C}$  para despresurizarlo hasta alcanzar la presión atmosférica.

Un procedimiento similar se llevó a cabo con las reacciones de homopolimerización de CL añadiendo 14 g de la lactona (35 p/v%) a una relación de 1.4 g de Novozym 435, o bien, 8 g del monómero cuando se usó la Lipasa PS (3.5 g).

#### **4.4 Purificación**

La mezcla de reacción se disolvió en cloroformo y la enzima insoluble se removió por filtración (mesh 80 micras). Para el caso de la lipasa PS se requirió filtración al vacío a través de filtro de  $0.45\ \mu\text{m}$  debido a que era un polvo muy fino. La mezcla resultante se precipitó en metanol ( $5^\circ\text{C}$ ) en agitación. Se dejó precipitar el polímero obtenido y posteriormente se filtró la solución ( $0.45\ \mu\text{m}$ ).

El polímero fue obtenido como polvo blanco que se secó en una bomba de vacío (30 mmHg) para eliminar los residuos de los disolventes durante un tiempo de 2 horas y posteriormente se pesó el polímero para determinar rendimiento por diferencia de pesos dividiendo el peso del polímero obtenido entre el peso de los monómeros.

#### **4.5 Caracterización del polímero**

##### **4.5.1 Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ (RMN)**

El porcentaje de incorporación del GA en el copolímero se determinó por  $^1\text{H}$  RMN. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se obtuvieron de un espectrómetro de RMN marca Varian (modelo VNMRS y MR) a 400 MHz. Los desplazamientos químicos en partes por millón (ppm) para los espectros  $^1\text{H}$  RMN fueron mencionadas con respecto al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La preparación de las muestras para la RMN consistió en lo siguiente: 50 mg de polímero en 1.5 mL de cloroformo

deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y gotas (hasta disolución) de ácido trifluoroacético deuterado cuando fuera necesario.

#### 4.5.2 Cromatografía de Exclusión de Tamaño / Permeación en Gel

Los pesos moleculares fueron determinados por cromatografía de exclusión de tamaño o de permeación en gel (GPC/SEC) usando un sistema HPLC Hewlett Packard (HP) 1100 series equipado con una bomba isocrática HP series 1050, un automuestreador HP series 1100, un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 de Polymer Laboratories (Varian, Inc.) con una columna PLgel 10 $\mu\text{m}$  mixed-B LS 300 x 7.5 mm de Polymer Laboratories (Varian, Inc.) montada en un termostato Agilent 1200 series. Las condiciones de operación del detector fueron temperatura de evaporación ( $T_{\text{ev}}$ ) de 80° C, temperatura nebulizador ( $T_{\text{neb}}$ ) es de 40° C y un flujo de gas (nitrógeno) de 1.0 mL/min.

El cloroformo fue utilizado como eluyente a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min a 25° C. La concentración de las muestras fue de 1 mg en 2 mL y los volúmenes de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . Los pesos moleculares fueron determinados basándose en la curva de calibración convencional generada por los estándares de poliestireno con pesos moleculares estrechos obtenidos de Polymer Laboratories (Varian, Inc.). Los estándares de poliestireno utilizados para generar la curva fueron de los siguientes pesos moleculares: 2,900, 8,450, 24,600, 70,950, 132,900, 197,300 y 591,000 g/mol.

#### 4.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Termogravimétrico

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y temperatura de fusión ( $T_m$ ) fueron determinadas mediante calorimetría diferencial de barrido en la Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, sótano del Conjunto B. El equipo utilizado fue un DSC Mettler Toledo (modelo 821°). La muestra, con una masa de  $1 \pm 0.1$  mg, se depositó en un plato de aluminio de 40 $\mu\text{L}$  herméticamente sellado bajo una atmósfera de nitrógeno (velocidad de flujo de nitrógeno de 10 mL/min). El barrido se realizó desde la temperatura de -100° C hasta 300° con una velocidad de calentamiento de 10° C/min.

La estabilidad térmica fue evaluada por análisis termogravimétrico en la USAI usando un TG Mettler Toledo (modelo TGA/SDTA851°) bajo una atmósfera de nitrógeno (velocidad de flujo de nitrógeno de 10ml/min). La muestra se sometió a una temperatura de 25 hasta 500° C a una velocidad de calentamiento de 10° C/min.

Los datos fueron analizados con el programa STAR° versión 8.1.

#### 4.5.4 Difracción de Rayos X

El espectro de difracción de rayos X fue registrado (muestra en polvo) con un difractor Siemens modelo D5000 compuesto por una fuente  $K\alpha$  de cobre ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ) en la USAI. El porcentaje de cristalización se calculó basándose en la relación entre el área cristalina con respecto al área total (cristalina + amorfa).

### 1.6 Estudios de solubilidad

#### 1.6.1 Solubilidad de glicolido (GA) y $\epsilon$ -caprolactona (CL) en las relaciones molares

Para determinar la solubilidad de las relaciones molares (GA: CL) 1:2, 1:3 y 1:4, indicadas anteriormente, se utilizó un reactor de acero inoxidable con 3 mirillas de zafiro (una en el centro y 2 en los costados) de 40 mL de capacidad interior con un agitador magnético accionado por una placa de agitación externa (figura 11).

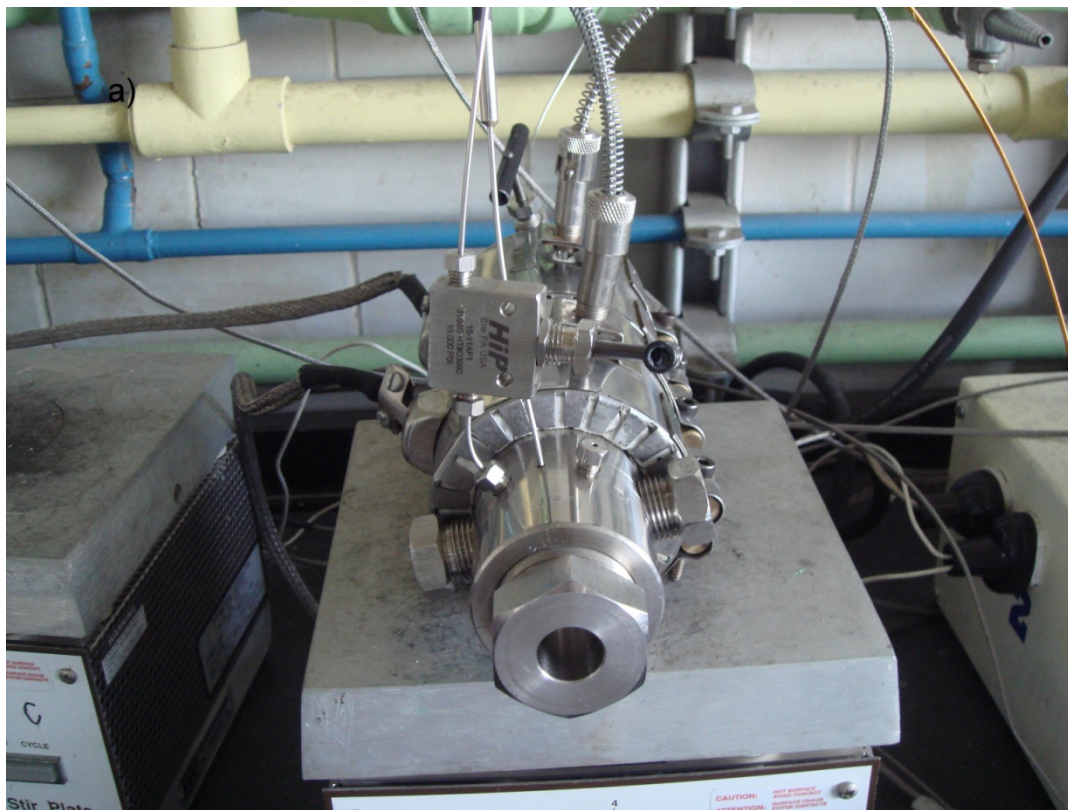


Figura 11. Reactor con celda de visor de cuarzo donde se realizaron las pruebas de solubilidad



En el reactor se colocó GA y CL. La válvula de entrada del reactor, que estaba acoplada con un manómetro, se conectó a una bomba de pistón de alta presión ISCO, la cual estaba conectada al cilindro de R134a, la válvula de salida del reactor se mantuvo cerrada. La columna presurizada de la bomba de pistón ISCO fue enfriada por un baño refrigerante, a una temperatura de  $2\pm 1^\circ\text{C}$ . El R134a fue bombeado hacia el reactor mediante la bomba de pistón ISCO hasta la presión de 1.0 MPa. El reactor fue calentado con una chaqueta de cerámica y la temperatura fue controlada mediante dos termopares independientes que median la temperatura en la superficie externa de reactor y la temperatura en el interior del reactor, respectivamente. La temperatura y la presión de operación se mantuvieron en  $65\pm 1^\circ\text{C}$  y  $2.5\pm 0.2\text{ MPa}$ . Se comprobó que la disolución de los monómeros desde que se inyectó el R134a, mientras se alcanzó la temperatura de operación y durante la agitación, comprobando al final una sola fase y un fluido transparente sin partículas en el fondo del reactor.

## **CAPÍTULO 5. Resultados y Discusiones**

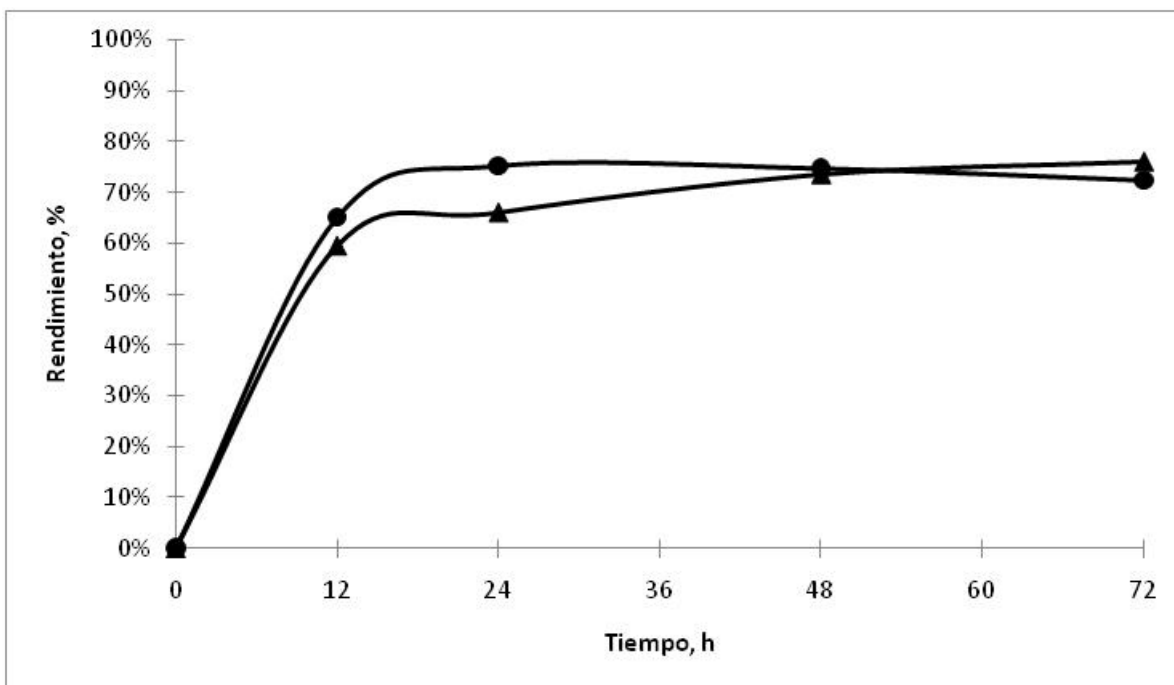
### **5.1 Evaluación de la solubilidad de los monómeros**

Para que la reacción de polimerización se pueda llevar a cabo se necesita que los monómeros sean solubles en el medio R134a líquido a las condiciones de trabajo. En general, se busca un copolímero con un contenido bajo de GA (menor al 30%) que sea soluble en disolventes orgánicos convencionales y de esta forma sea posible su tratamiento.

Las pruebas de solubilidad realizadas determinaron que la CL es 100% soluble en R134a y el GA es soluble en las relaciones molares GA: CL de 1:2 (2.7: 5.3 g), 1:3 (3.03: 5.97 g) y 1:4 (2.84: 11.16 g). Es importante hacer notar que la CL contribuye a la disolución del GA. El GA puro fue insoluble al ocupar un 20% [peso de monómero (g)/volumen del reactor (mL)] de volumen del reactor que equivale a 8 g y un 35% (% p/v) del volumen del reactor que equivale a 14 g, y ponerse en contacto con R134a líquido a 65° C y 2.5 MPa. Adicionalmente se realizaron pruebas en las que se probó la relación molar GA: CL de 1:1 (4.04: 3.96 g), observando de igual forma que el GA era insoluble.

### **5.2 Obtención de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) con Novozym 435**

Se evaluó la CALB inmovilizada en la síntesis de PCL utilizando un 10% de la enzima con respecto a la cantidad de monómero alimentado, ya que según datos reportados por Deng y colaboradores (1999) esta es la mejor proporción. En la figura 12 se muestra la relación rendimiento vs tiempo de la reacción comparando la síntesis en masa y en el medio de reacción R134a líquido. La tendencia, de ambas cinéticas, indicó que los rendimientos en R134a son ligeramente superiores hasta antes de las 48 horas, posteriormente se igualaron a los obtenidos en la reacción en masa. Después de 72 horas, la reacción en masa se detuvo debido a la solidificación del medio de reacción, que impide la agitación y por lo tanto la transferencia de masa. A este punto se consideró que la reacción había finalizado. En menos tiempo (24 h), el rendimiento con R134a alcanza el máximo (76%) mientras que en masa a las 48h. Los resultados obtenidos no indican una clara mejoría del rendimiento al usar un medio de reacción, es decir, no aumenta la velocidad de reacción en un medio de reacción como el R134a. Los hechos sugieren que al estar disueltos la enzima y los monómeros en medio R134a es más difícil para la enzima tener acceso al sustrato (CL).



**Figura 12. Comparación de la relación “rendimiento vs tiempo de reacción” en la síntesis de PCL en masa (▲) y en R134a líquido (●).**

Por otra parte, en la figura 13 se muestra los pesos moleculares promedio (GPC/SEC) con respecto al poliestireno estándar de las muestras. A las 12 horas se obtienen pesos moleculares ligeramente mayores con la reacción en masa sin embargo, a las 24 horas de reacción, en el medio R134a líquido, se superaron los demás resultados obteniéndose un peso molecular mayor de 50,000 g/mol. Después de las 24 horas de reacción en el disolvente fluorado, el peso molecular disminuye, lo que puede atribuirse a la hidrólisis de las cadenas de polímero, la cual puede ser tanto enzimática como química. En el caso de la reacción en masa, los pesos moleculares se mantienen alrededor de 20,000 g/mol desde las 12 h de reacción sin cambio aparente hasta las 72 h. Los resultados obtenidos, para la reacción en masa, avalan la hipótesis de que la solidificación del sistema, por el incremento de la viscosidad, a medida que avanza la reacción, es una limitante para el crecimiento de las cadenas del polímero. El hecho de que los pesos moleculares, para la reacción en masa, se mantengan en 20,000 g/mol sugiere que existe un equilibrio entre la reacción de polimerización y la de hidrólisis, lo cual puede indicarse por el hecho de que después de alcanzar el máximo a las 24 h, en el medio de reacción fluorado, el polímero experimenta la reacción de hidrólisis reduciendo así su  $M_n$  hasta 20,000 g/mol y manteniéndolo en ese mismo valor hasta las 72 h.

De estas gráficas podemos resumir que la cinética en la síntesis de PCL catalizada con Novozym 435 permite obtener un Mn mayor en un medio de reacción de FC en comparación con la reacción en masa, en un tiempo de 24 horas sin embargo no se obtuvieron rendimientos similares. Es importante hacer notar que el medio de reacción (R134a líquido) favorece la hidrólisis de las cadenas del polímero posteriormente al máximo obtenido, esto debido a la disponibilidad de sustrato para esta reacción inversa como indicó García-Arrozola y colaboradores (2007; 2008). De igual forma la presencia de un medio de reacción favorece la polimerización y la obtención de pesos moleculares mayores debido a la mejor transferencia de masa.

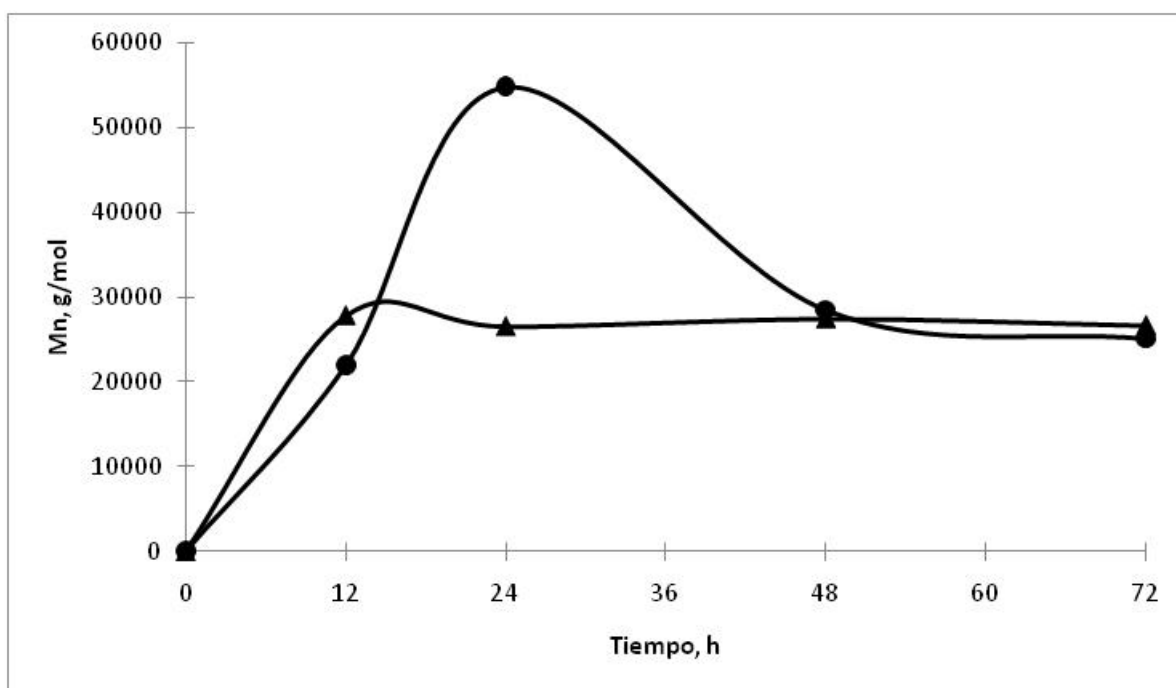


Figura 13. Comparación de la relación “peso molecular vs tiempo de reacción” para la síntesis de PCL con Novozym 435 en masa (▲) y en R134a líquido (●).

### 5.3 Obtención de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) con lipasa de *PSerudomonas cepacia* (lipasa PS)

Se evaluó la Lipasa PS libre en la polimerización de CL. Para obtener la PCL se requiere usar un 43% de la enzima y tiempos de reacción prolongados (240 h o más) según lo reportado por Kobayashi y colaboradores (1998). En dicho estudio se reporta una relación enzima/monómero mucho mayor que la reportada con CALB (Córdova *et al.*, 1998; García-Arrozola *et al.*, 2007,

2008). La reacción en masa (figura 14) alcanza un rendimiento del 30% mientras que Kobayashi reporta un 84% de conversión a las 240 h (Kobayashi *et al.*, 1998), sin embargo, para la reacción en R134a líquido evaluada aquí por primera vez, no se obtuvo material a ese tiempo.

Con respecto a los pesos moleculares que se reportan en la figura 14, el máximo alcanzado fue de 12,000 g/mol, superior al reportado por Kobayashi y colaboradores que fue de 6,100 g/mol.

Se debe hacer notar que los pesos moleculares obtenidos con Novozym 435 en masa son el doble y se obtienen en 12 horas, es decir, en mucho menor tiempo. Las condiciones de reacción (tiempo y cantidad de enzima) reportadas para ambas enzimas se tomaron como base para llevar a cabo la reacción de copolimerización.

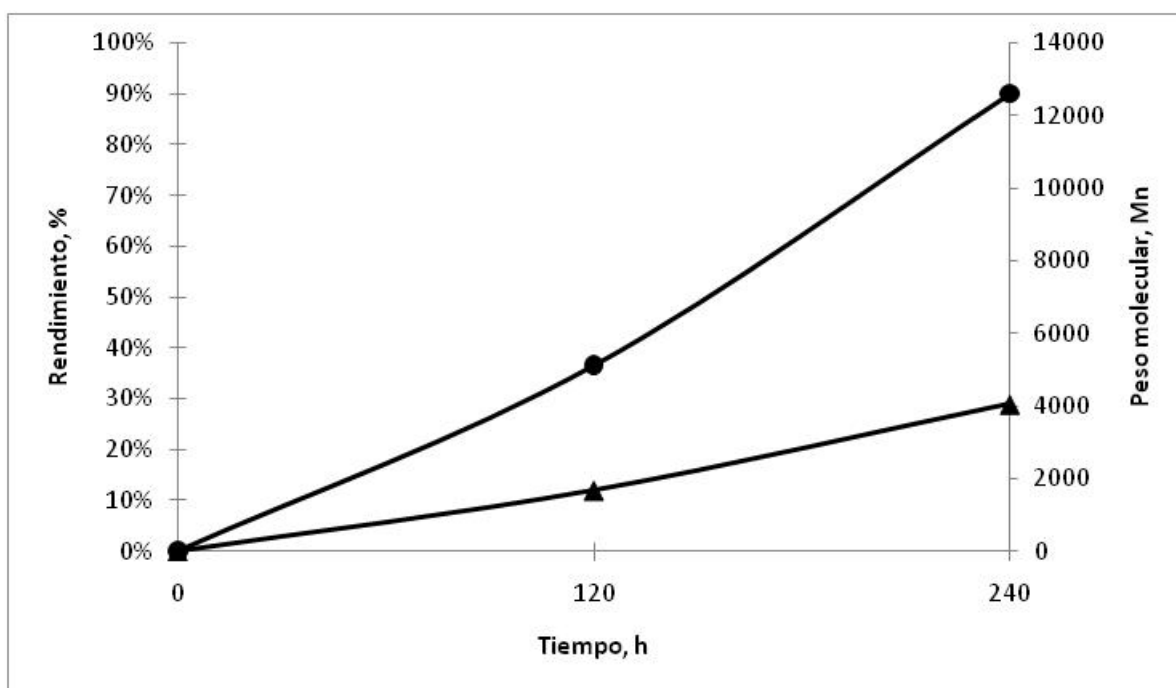


Figura 14. Rendimientos (▲) y pesos moleculares (●) en la síntesis de PCL catalizada con lipasa PS en masa

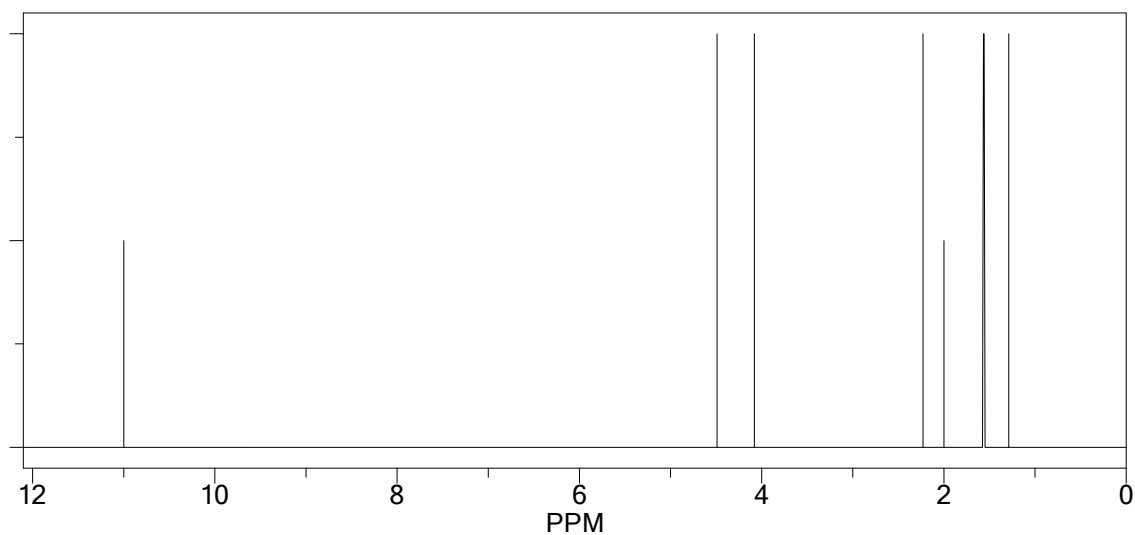
#### 5.4 Análisis de la incorporación de $\epsilon$ -caprolactona (CL) y glicólido (GA) en el copolímero por $^1\text{H}$ RMN

En la figura 15, se muestra la estructura propuesta de la PCLGA en donde se indican los desplazamiento químicos esperados en  $^1\text{H}$  RMN de los protones de metileno para la CL ( $\delta$  /

ppm=1.29, 1.56 y 1.57, 2.23 y 4.08) y para el GA ( $\delta$ /ppm=4.49) y en la figura 16 se muestra el espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) teórico de la PCLGA obtenido a partir de la herramienta ChemNMR Pro del programa ChemDraw Ultra.



**Figura 15. Estructura propuesta de la PCLGA**

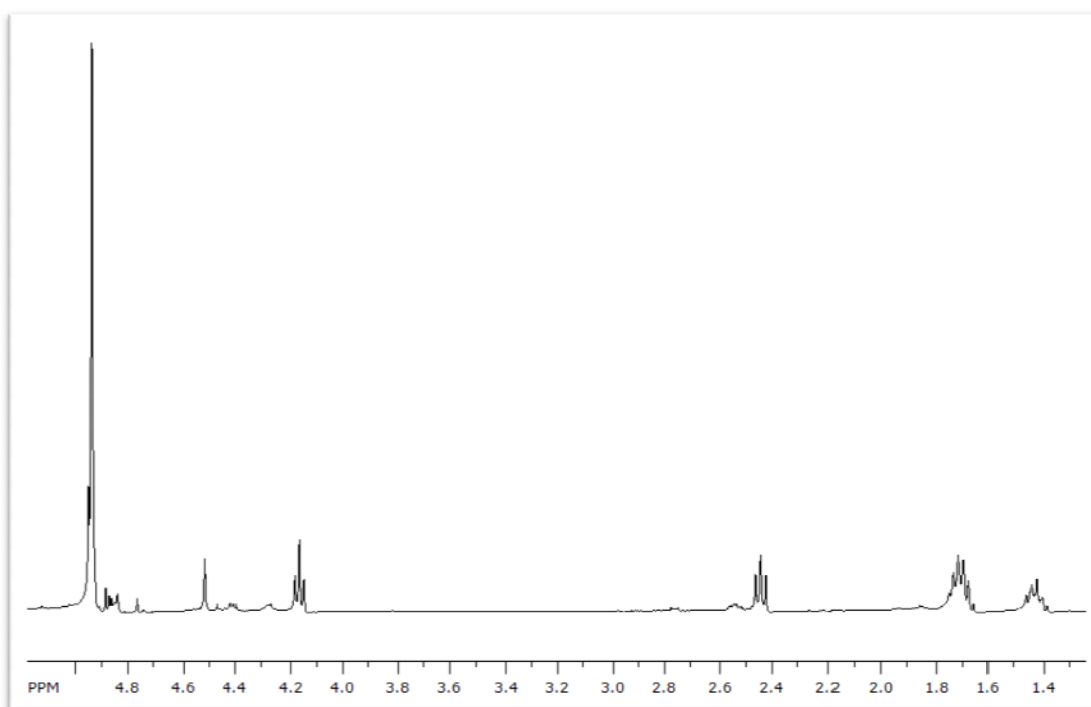


**Figura 16. Desplazamiento de las señales de  $^1\text{H}$  RMN teóricas para PCLGA**

De esta forma, el porcentaje de inserción de GA en los materiales sintetizados se pudo obtener mediante el análisis de los espectros de RMN de protón de cada muestra. Los desplazamientos químicos de los protones de metileno de la CL fueron  $\delta$  (ppm) 1.4, 1.65, 1.7, 2.4 y 4.1 ppm mientras que el para el GA fue 4.8 ppm. En la figura 17, se muestra a modo de ejemplo el espectro del copolímero obtenido por reacción en masa catalizada con Novozym 435 para la relación molar 1:4 durante 72 horas. Un espectro con estos desplazamientos indica la presencia de ambas unidades de repetición en la estructura molecular del copolímero, sean estas glicolidil y caproil.

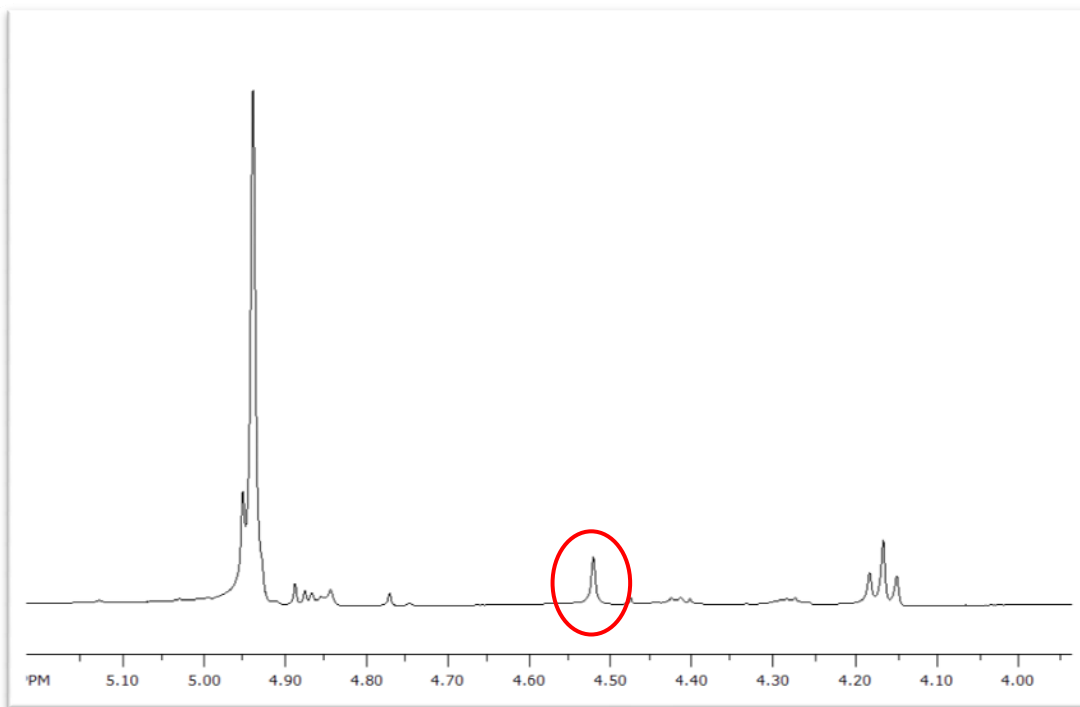
La integración de picos para obtener el porcentaje de inserción del GA se basó en el  $\delta/\text{ppm}=1.65$  que corresponde a cuatro hidrógenos (2 metilos) de la CL y  $\delta/\text{ppm}=4.8$  que corresponde a dos hidrógenos (1 metilo) de la unidad glicolidil. Para este polímero se registró un porcentaje de GA de 80.35%.

Para este caso en específico, se puede sugerir la presencia de un copolímero en bloques, sin embargo, para PCLGA con una inserción de GA más altas, se puede decir que es PGA con inserción de PCL al azar.



**Figura 17. Espectro 1H RMN de la muestra obtenida de la reacción en masa con Novozym 435 con una relación molar (GA: CL) 1:4 durante 72 h**

En la figura 18, se muestra un acercamiento de la figura 17, en donde se observa el desplazamiento químico entre 4 y 5 ppm. El pico que encuentra en 4.5 ppm coincide con los espectros de RMN obtenidos por Dobrzynski y colaboradores (1999 y 2005) en la polimerización de GA y CL con octoato de estaño y acetilacetato de zirconio (relación molar Iniciador/monómero: 1/800) a 100 y 150° C y corresponde a la formación de una secuencia de CGC (CL-GA-CL).

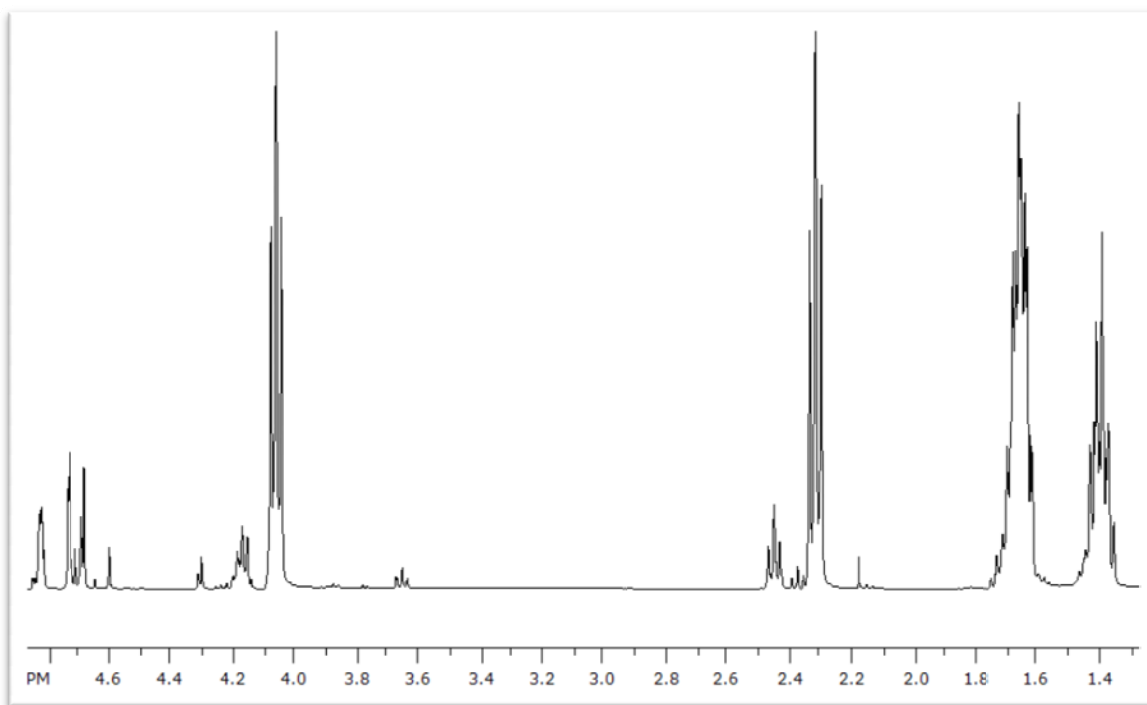


**Figura 18. Acercamiento de figura 17 en el desplazamiento químico de 4-5 ppm**

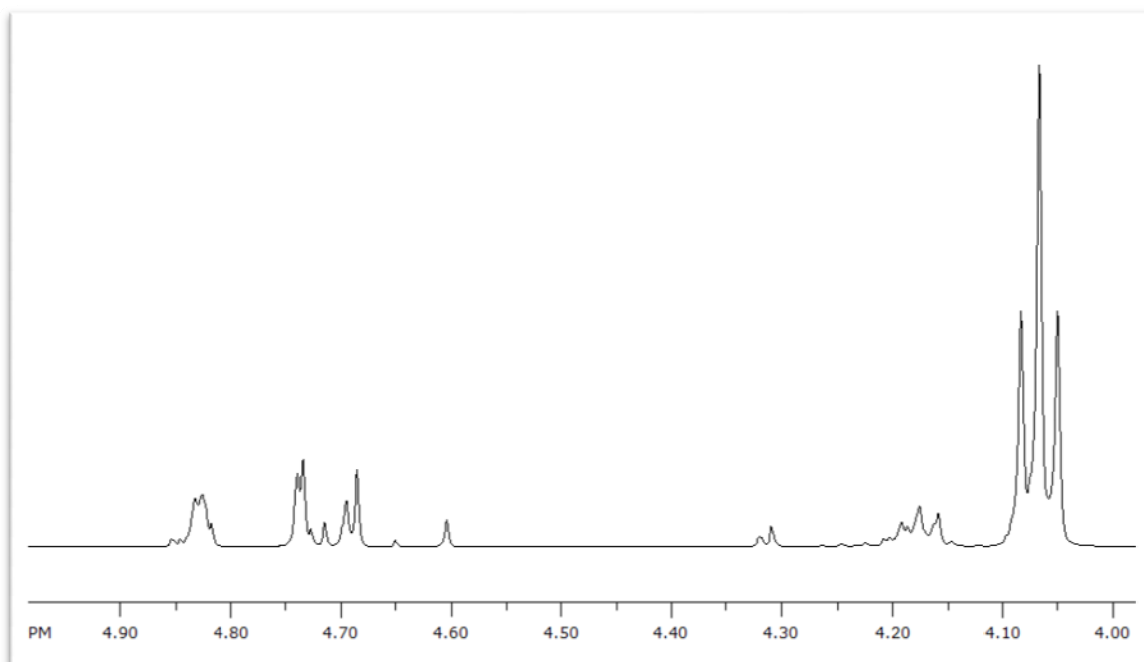
En la figura 19 se muestra el espectro del copolímero obtenido por reacción en el FC fluorado catalizada con la lipasa PS para la relación molar 1:2 durante 240 horas. El porcentaje de inserción del glicólido fue de 11.07%.

Un acercamiento de la figura 19, muestra los desplazamientos químicos entre 4 y 5 ppm. En la figura 20 se puede observar el pico de 4.0 ppm que corresponde al protón metilo de la CL, la señal a 4.1 ppm corresponde a la secuencia GC, la señal a 4.6 ppm corresponde a la secuencia CGC, la señal a 4.7 ppm corresponde a la secuencia CGGC y finalmente la señal a 4.81 ppm corresponde a la unidad glicolidil.





**Figura 19. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la muestra obtenida de la reacción en R134a con lipasa PS con una relación molar (GA: CL) 1:2 durante 240 h**



**Figura 20. Acercamiento de figura 19 en el desplazamiento químico de 4-5 ppm**

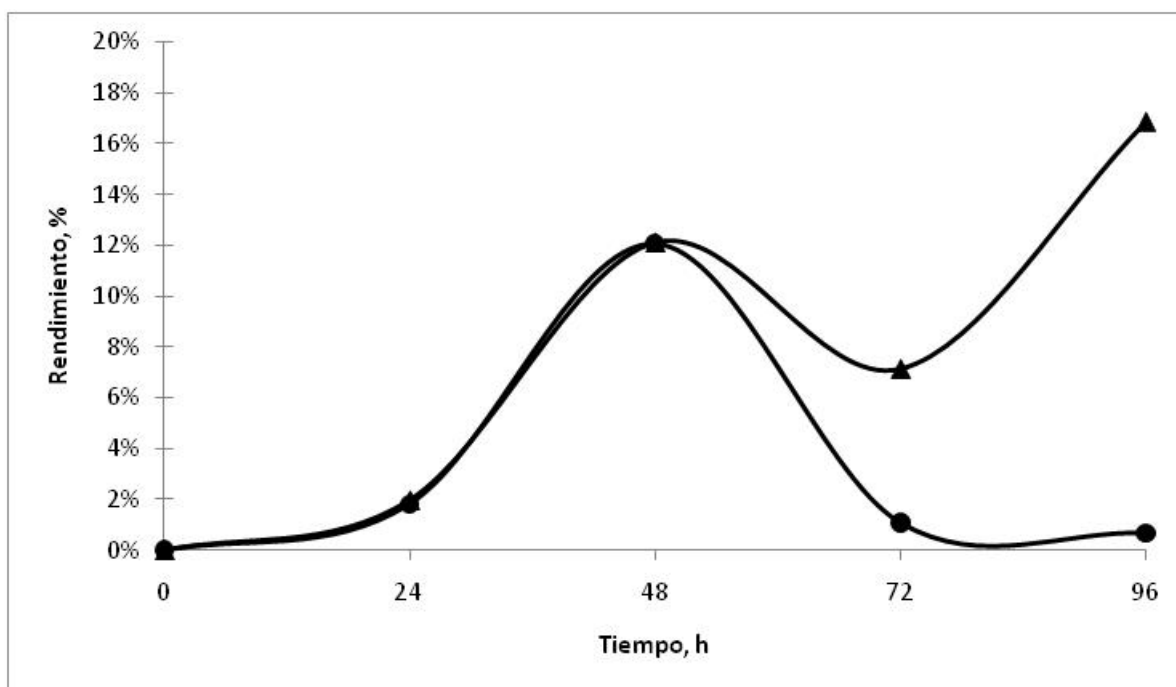
### 5.5 Obtención de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA) con Novozym 435

Se realizó la síntesis Lenzimática de la PCLGA catalizada con Novozym 435 (10% peso de enzima) en R134a y en masa a una temperatura de 65° C. Se varió la relación molar de los monómeros iniciando con una relación 1:2 hasta una relación de 1:4, esperando que el aumento de la cantidad de CL, favoreciera la inserción de esta en el copolímero. En la tabla 7 se muestran los experimentos realizados con la enzima así como los resultados obtenidos.

**Tabla 7. Resultados de la polimerización catalizada por Novozym 435 en R134a líquido y en masa**

Entrada	Relación molar (GA:CL)	Tiempo	Rendimiento (%)	Inserción de GA (%)
<b>R134a líquido</b>				
1	1:2	0	0.00%	0.00%
2	1:2	24	1.82%	95.89%
3	1:2	48	12.08%	97.18%
4	1:2	72	1.09%	97.23%
5	1:2	96	0.68%	97.28%
6	1:2	0	0.00%	0.00%
7	1:3	24	0.86%	97.32%
8	1:3	48	1.41%	97.95%
9	1:3	72	1.83%	98.04%
10	1:4	0	0.00%	0.00%
11	1:4	24	0.53%	95.93%
12	1:4	48	6.99%	96.77%
13	1:4	72	3.57%	93.15%
<b>Masa</b>				
	1:2	0	0.00%	0.00%
14	1:2	24	1.97%	97.90%
15	1:2	48	12.12%	95.91%
16	1:2	72	7.14%	98.07%
17	1:2	96	16.87%	98.01%
18	1:3	0	0.00%	0.00%
19	1:3	24	1.58%	94.25%
20	1:3	48	3.09%	94.85%
21	1:3	72	9.30%	97.35%
22	1:3	96	12.87%	97.48%
23	1:4	0	0.00%	0.00%
24	1:4	24	0.64%	96.95%
25	1:4	48	2.22%	94.38%
26	1:4	72	5.70%	80.35%
27	1:4	96	5.13%	94.60%

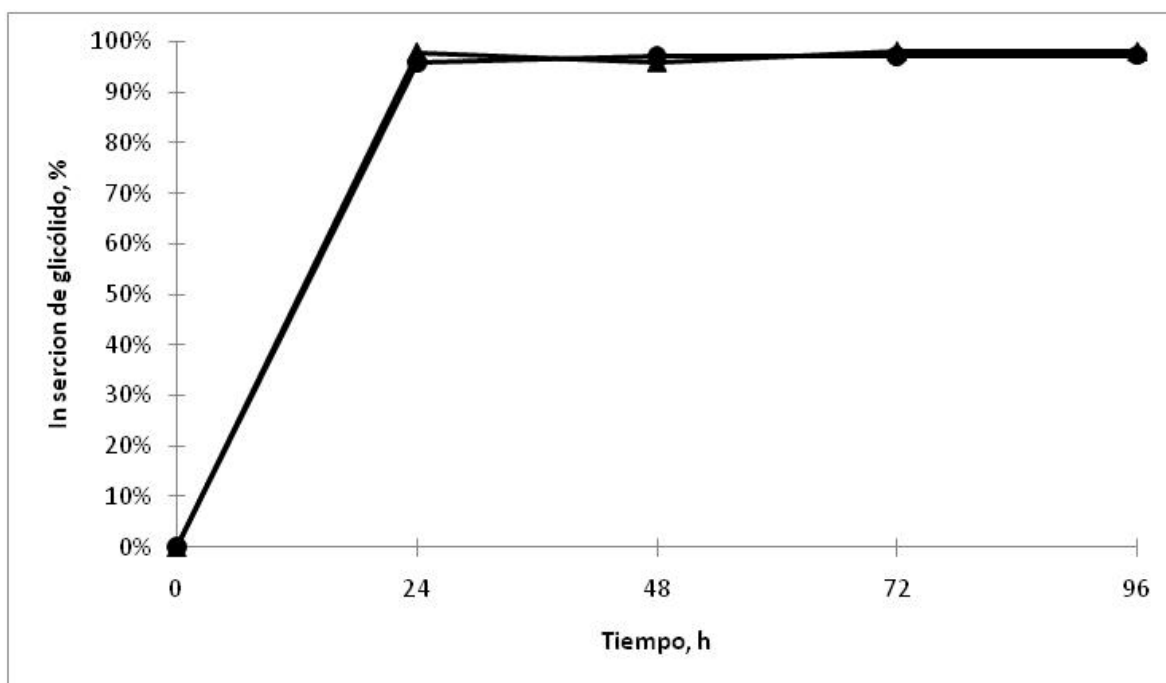
En la figura 21, se muestra la comparación de los rendimientos obtenidos para la relación molar 1:2 en masa y en el medio R134a líquido. Se puede observar un comportamiento similar, en ambas, hasta las 48 horas; posteriormente el rendimiento obtenido a partir de la reacción en masa se incrementa hasta casi 17% mientras que el rendimiento en el FC disminuye hasta menos del 1%. Cabe aclarar que para la reacción en masa, después de 96 h, ya no existe agitación de la mezcla de reacción por lo que esta concluye en ese tiempo debido a que no hay transferencia de masa. La disminución del rendimiento, para el caso de la reacción en disolución, se puede deber a la hidrólisis de las cadenas de polímero que se encuentran disueltas en el medio ya sea por acción química (agua producida por la reacción) o enzimática.



**Figura 21. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a (●) para la relación molar 1:2 (GA: CL) con Novozym 435**

En la figura 22 se muestra la incorporación de GA en el copolímero. Se puede observar que la tendencia es similar a lo largo del tiempo, ya que en todos los casos se obtiene un porcentaje de GA mayor a 90%, indicando que la enzima Novozym 435 favorece altamente la reacción para obtener mayormente unidades de repetición de PGA. Esta situación hace imposible el manejo del polímero

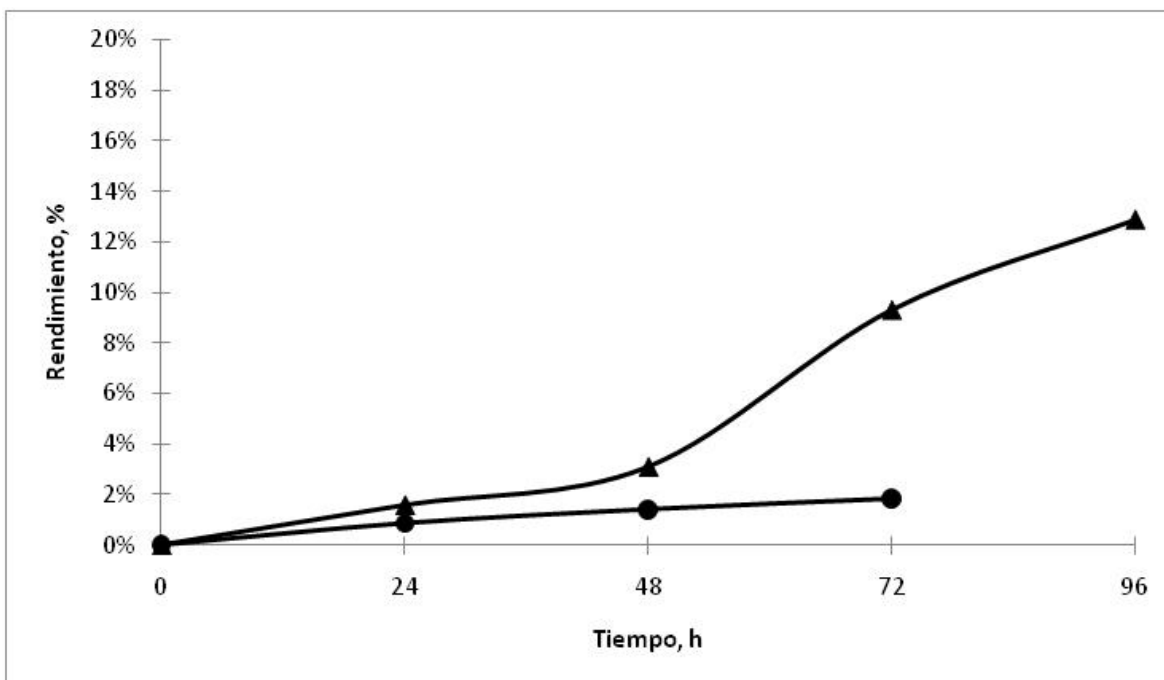
para análisis cromatográficos posteriores ya que los materiales fueron insolubles en disolventes orgánicos.



**Figura 22. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:2 (GA: CL)**

En la relación molar 1:3 se obtienen mejores rendimientos (véase figura 23) en masa que en R134a líquido, alcanzando un máximo de 13% a un tiempo de 96 h, tiempo en el cual se solidificó el sistema de reacción.

Por otro lado, la reacción en medio R134a líquido no supera el 2% de rendimiento. Se puede concluir que por ser la reacción de PAA del GA la predominante y como la cantidad de GA alimentada al reactor es menor (debido a la relación molar 1:3), el rendimiento es menor. Aunado a esto, al ser menor la cantidad de este monómero, posiblemente la reacción en el freón licuado requiere más tiempo para alcanzar mayores rendimientos.



**Figura 23. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar 1:3 (GA: CL) con Novozym 435**

Al analizar la inserción de GA en el copolímero (figura 24), se observa que de igual forma que para la relación molar 1:2, en la relación molar 1:3 predomina la formación de PGA (inserción mayor al 90%), confirmando el hecho de que la enzima Novozym 435 favorece la reacción de PAA de GA. Se debe hacer notar que un incremento en la cantidad de CL no se tradujo en una mayor incorporación de éste.

Finalmente, para la relación molar 1:4, los rendimientos en el medio FC líquido superaron a la reacción en masa solo en el tiempo de 48 h y la diferencia fue de 1%. De igual forma, se observa que se favoreció una vez más la reacción de PAA de GA ya que este corresponde al 80% del copolímero (figura 25 y 26).

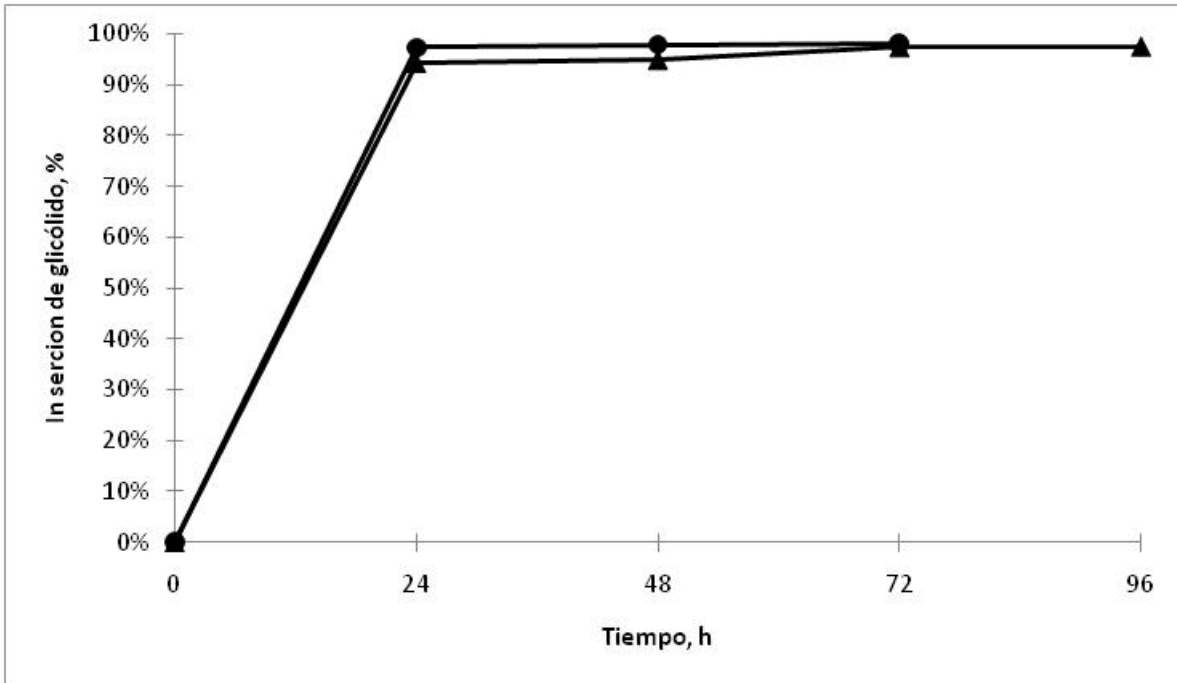


Figura 24. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:3 (GA: CL)

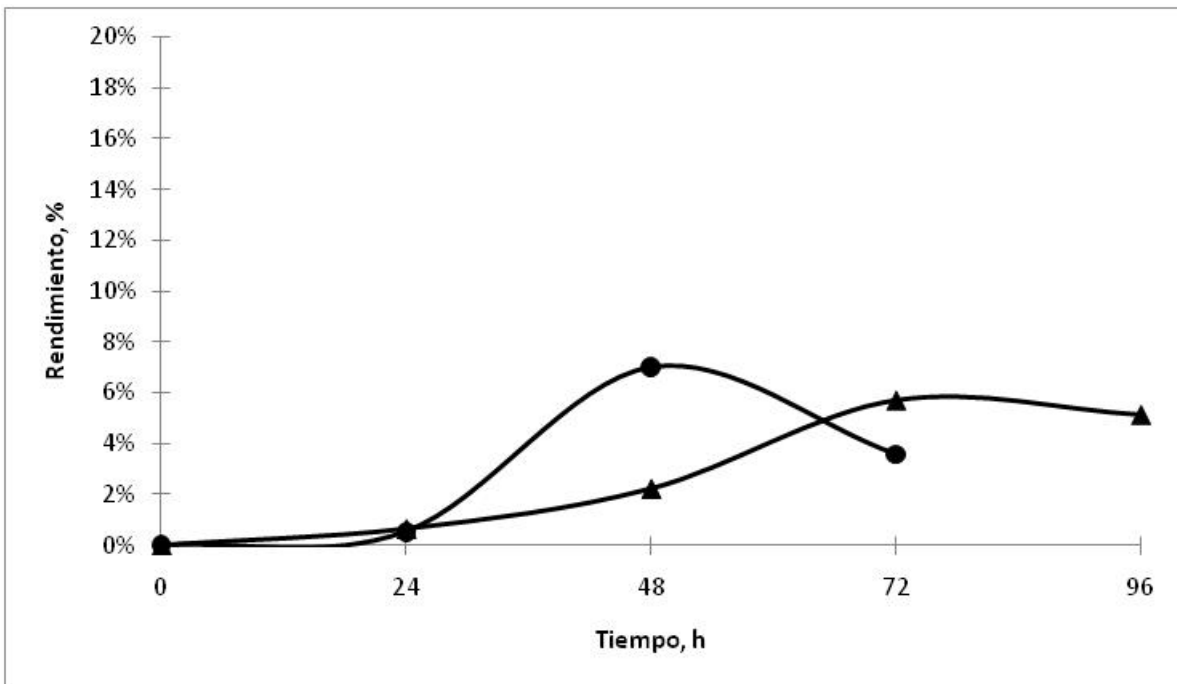
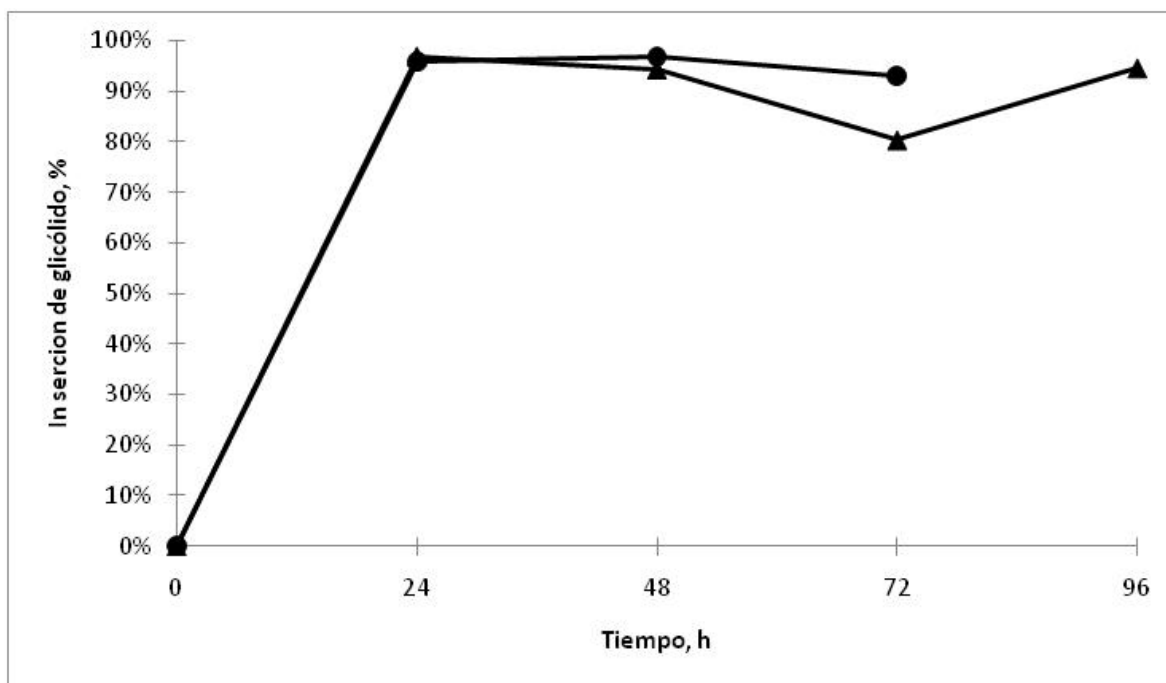


Figura 25. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar 1:4 (GA: CL) con Novozym 435



**Figura 26. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en R134a líquido (●) y en masa (▲) para la relación molar 1:4 (GA: CL) con Novozym 435**

Los resultados presentados indican que la enzima Novozym 435 favorece la reacción para obtener PGA con al menos un 80% de inserción. Además, al incrementar el contenido de CL (con la relación molar) el rendimiento disminuye debido a que hay menos GA disponible para la PAA. En casi todos los casos, la reacción en masa superó los rendimientos de la reacción en el medio R134a líquido. Esto se puede deber a que el copolímero compuesto casi en su totalidad por PGA no sea muy soluble en éste lo que provoque que precipite y la reacción concluya. El mayor rendimiento alcanzado fue menor al 17%.

La posible ventaja del llevar a cabo la reacción en el FC consistiría en pesos moleculares mayores debido a una mejor transferencia de masa y tiempos de reacción mayores, cuando los monómeros se encuentran disueltos en el medio de reacción, ya que la duración de la reacción en masa es limitada. Sin embargo, estos no pudieron ser determinados cromatográficamente por GPC/SEC debido a la insolubilidad de los materiales.

## 5.6 Obtención de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA) con lipasa *Pseudomonas cepacia* (lipasa PS)

Se evaluó la Lipasa PS libre como biocatalizador enzimático en esta reacción de copolimerización en masa y en el medio R134a líquido. En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 8. Resultado de la polimerización catalizada por Lipasa PS en R134a líquido y en masa**

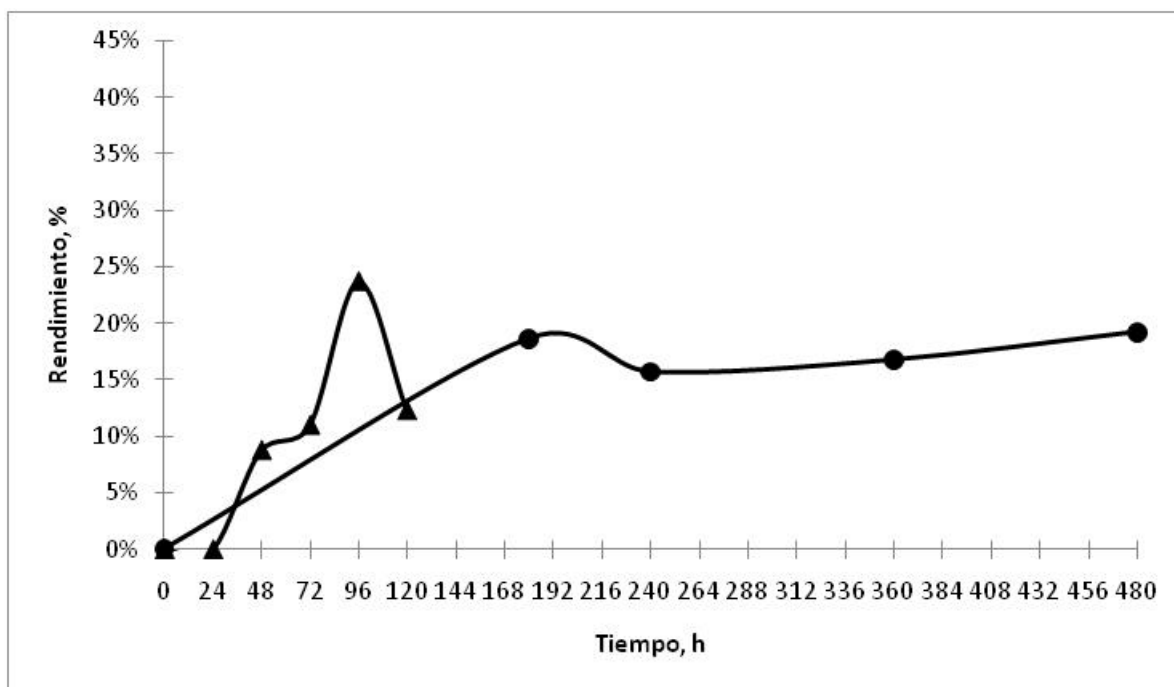
Entrada	Relación molar (GA:CL)	Tiempo	Rendimiento (%)	Inserción de GA (%)	Mn (g/mol)
<b>R134a líquido</b>					
1	1:2	0	0.00%	0.00%	0
2	1:2	180	18.63%	9.70%	5292
3	1:2	240	15.69%	11.07%	4059
4	1:2	360	16.75%	7.85%	4470
5	1:2	480	19.22%	6.29%	5478
6	1:3	0	0.00%	0.00%	0
7	1:3	120	2.00%	0.00%	0
8	1:3	240	19.12%	5.85%	5724
9	1:3	360	20.50%	5.90%	5796
10	1:3	480	35.91%	5.31%	5774
11	1:4	0	0.00%	0.00%	0
12	1:4	120	20.82%	6.98%	4695
13	1:4	240	13.13%	3.25%	6126
14	1:4	360	14.63%	3.11%	6980
15	1:4	480	42.29%	3.59%	6582
<b>Masa</b>					
16	1:2	0	0.00%	0.00%	0
17	1:2	24	0.00%	0.00%	0
18	1:2	48	8.77%	10.98%	4293
19	1:2	72	11.00%	12.41%	4841
20	1:2	96	23.68%	12.67%	4965
21	1:2	120	12.28%	12.51%	7198
22	1:3	0	0.00%	0.00%	0
23	1:3	24	0.00%	0.00%	0
24	1:3	48	12.28%	7.59%	4502
25	1:3	72	12.44%	8.49%	5687
26	1:3	96	19.25%	7.93%	5524
27	1:3	120	15.79%	8.10%	5157
28	1:4	0	0.00%	0.00%	0
29	1:4	24	0.00%	0.00%	0
30	1:4	48	22.05%	4.69%	3358
31	1:4	72	10.43%	6.01%	5871
32	1:4	96	29.82%	5.75%	5167
33	1:4	120	28.95%	5.92%	6406



Al comparar la reacción en masa de la homopolimerización de PCL con la de la síntesis del copolímero, se observan, en la segunda, rendimientos similares en tiempos más cortos lo que posiblemente se deba a la incorporación del GA. La reacción en masa tiene un tiempo máximo de 120 h, ya que para tiempos mayores la agitación magnética se interrumpe debido a que la mezcla de reacción se vuelve muy viscosa y por lo tanto la transferencia de masa lo que provoca que la reacción concluya.

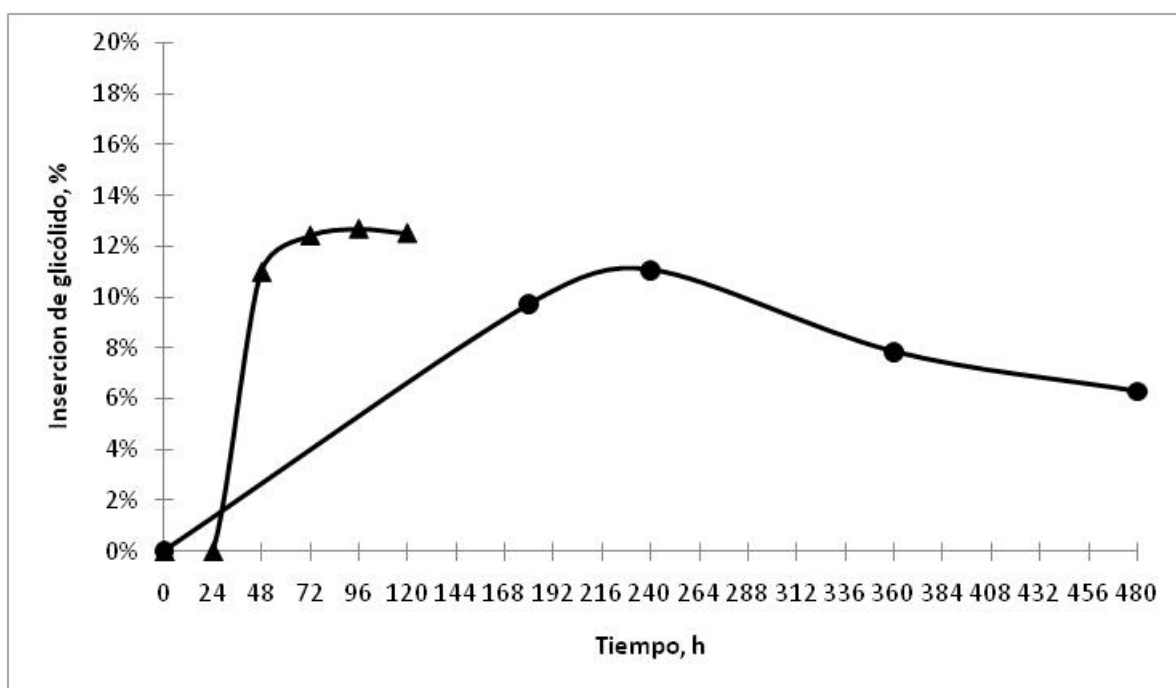
En la figura 27, se muestra el rendimiento de la reacción en masa y en el disolvente fluorado para la relación molar 1:2 (GA: CL). Los mayores rendimientos se alcanzan en la reacción en masa (23%) que además requiere tiempos de reacción menores (96 h). Después de las 96 h el rendimiento disminuye debido a posible hidrólisis (química o enzimática) de las cadenas de polímeros ya formadas

Es posible que la reacción en el FC requiera tiempos mayores a 480 h, para incrementar el rendimiento, sin embargo no se evaluaron por considerarlos poco factibles y porque además no existe una tendencia muy marcada con respecto al tiempo. El mayor rendimiento obtenido usando R134a líquido como medio de reacción fue de 19% a las 180 h mientras que la catálisis química registra tiempos de reacción de hasta 0.5 hasta 150 h.



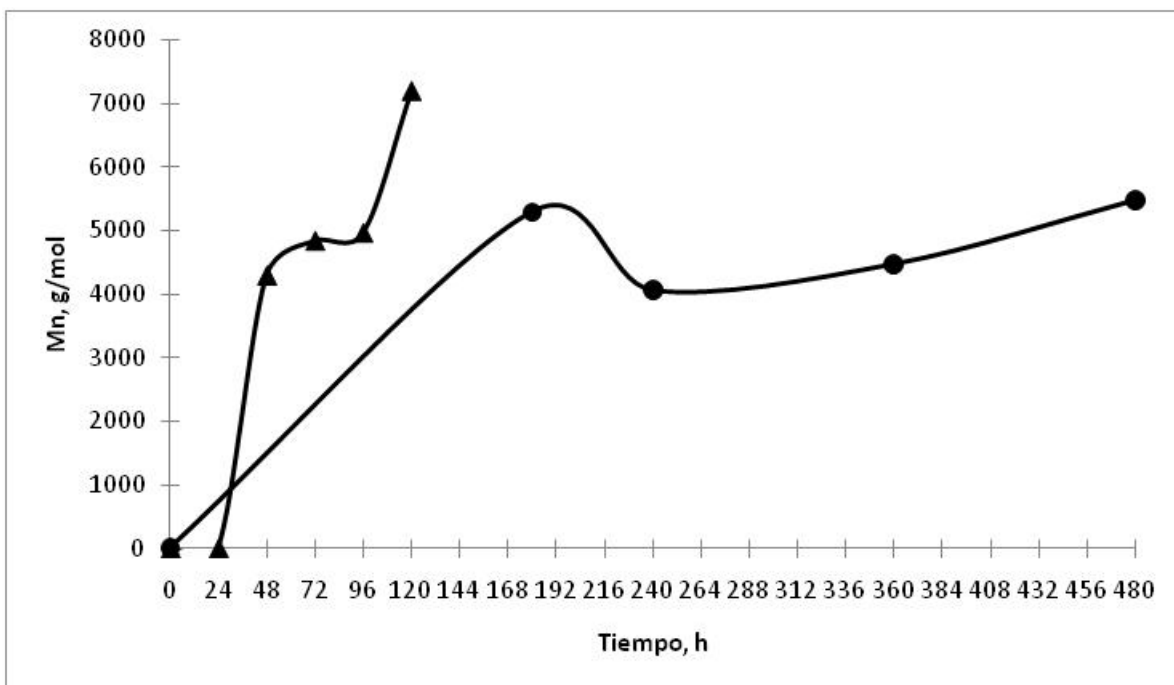
**Figura 27. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar (GA: CL) 1:2 con lipasa PS**

En la figura 28, se hace evidente que la lipasa PS favorece la reacción de la CL tanto en la reacción en masa como en el FC. En la reacción en masa, la incorporación de GA fue de 13% a las 72 h, después de esto, no hubo un incremento considerable mientras que para la reacción en disolución se obtuvo un 11% a las 240 h y posteriormente hubo un decremento. A pesar de que la reacción de GA es más rápida, se vio opacada por la de la CL, ya que el GA no se incorporó en un porcentaje mayor al 13%.



**Figura 28. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:2**

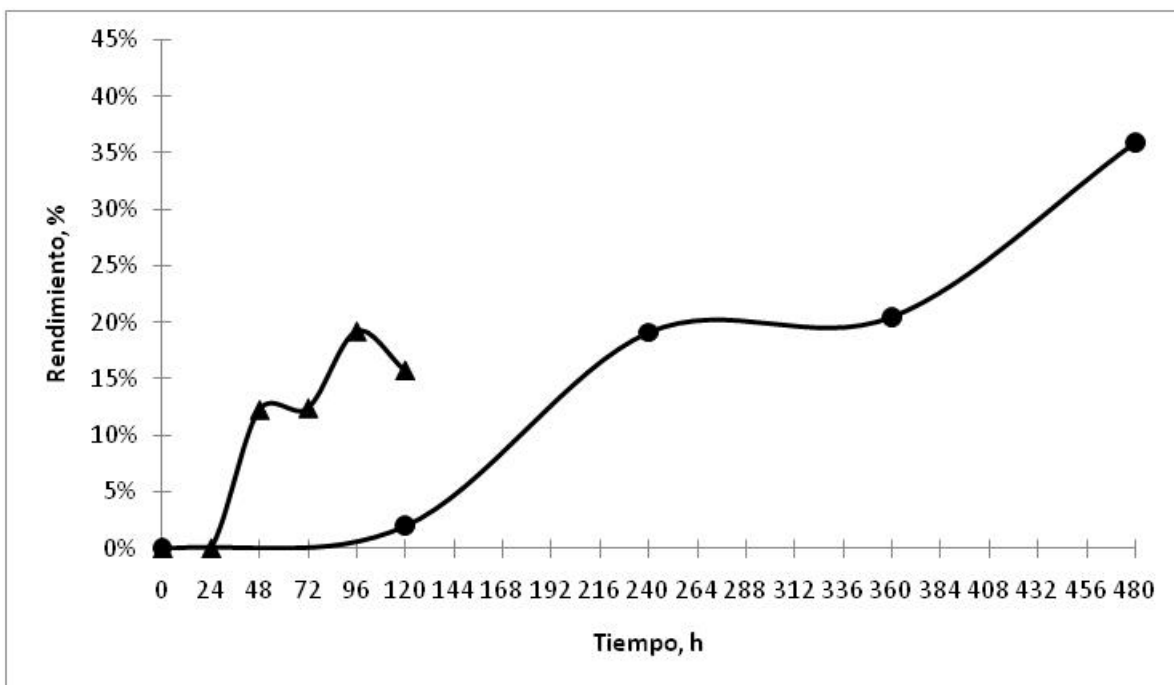
La inserción del GA en un porcentaje menor al 13% permitió que los copolímeros fueran solubles y se pudiera analizar su peso molecular ( $M_n$ ) como se muestra en la figura 29. Los pesos moleculares para la relación molar 1:2 alcanzaron el valor máximo de 7,200 g/mol para la reacción en masa y de 5,500 g/mol para la reacción en disolución.



**Figura 29.** Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:2

Al analizar los resultados obtenidos de la relación molar 1:3 (figura 30) se observó, para la reacción en masa, que el rendimiento fue similar al de la relación molar 1:2, es decir, 20% en 96 h antes de que se bloqueara el medio de reacción por el incremento de la viscosidad. Esto indica que el incremento en la relación molar, no causa un efecto en la reacción en masa.

Por su parte el rendimiento en la reacción en disolución se vio más favorecido ya que se incrementó a 36% en 480 horas, y esto puede ser debido a que hay mayor presencia de CL en el medio.



**Figura 30. Comparación del rendimiento de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar (GA: CL) 1:3 con lipasa PS**

Con respecto a la inserción de GA (figura 31) en el copolímero se observó, en general, una disminución, debida a la relación molar 1:3, que contiene menos GA. Para el caso de la reacción en masa la inserción fue de 8% en 48 h mientras que para la reacción en disolvente fluorado fue de 6% en 240 h, posteriormente, en ambos casos, no se observó un cambio con respecto al tiempo.

Los pesos moleculares, de ambas reacciones, se encontraron alrededor de los 5,800 g/mol en un tiempo de 24 h para la reacción en masa y de 240 h para la reacción en disolución (figura 32). En el caso de la reacción en masa hubo una disminución con respecto al peso molecular de la relación molar 1:2. Como ya se mencionó anteriormente, los rendimientos en las relaciones molares 1:2 y 1:3 son muy similares sin embargo la incorporación de GA disminuyó en este último caso, siendo esta la posible causa de la disminución del peso molecular.

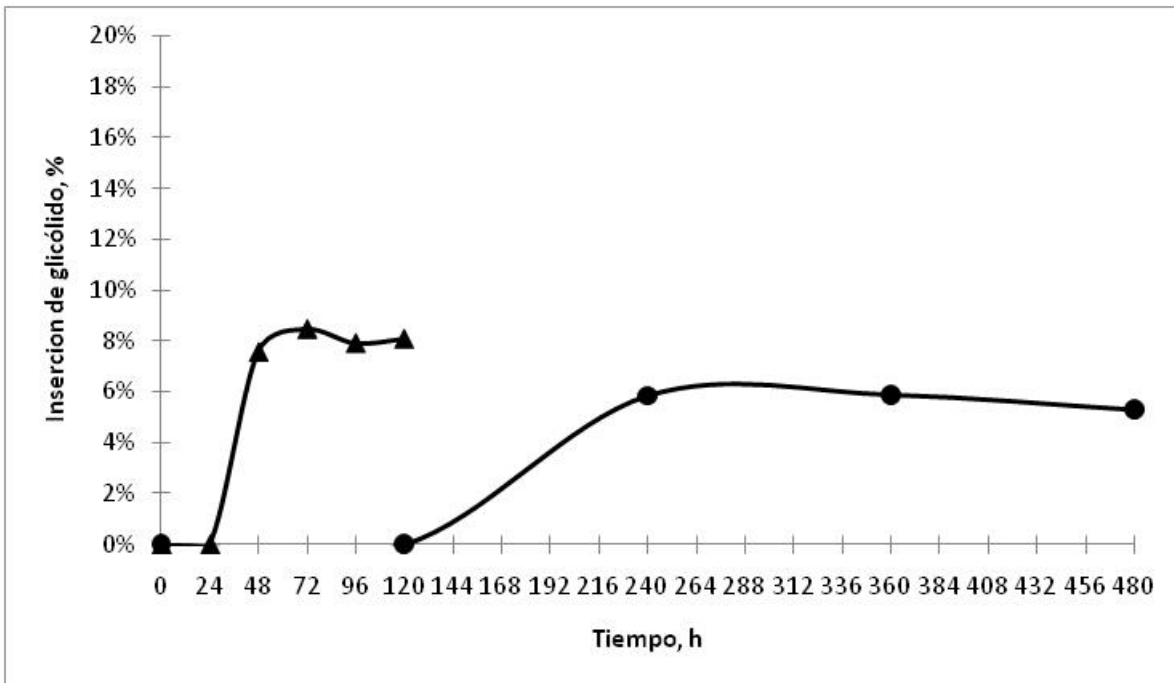


Figura 31. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:3

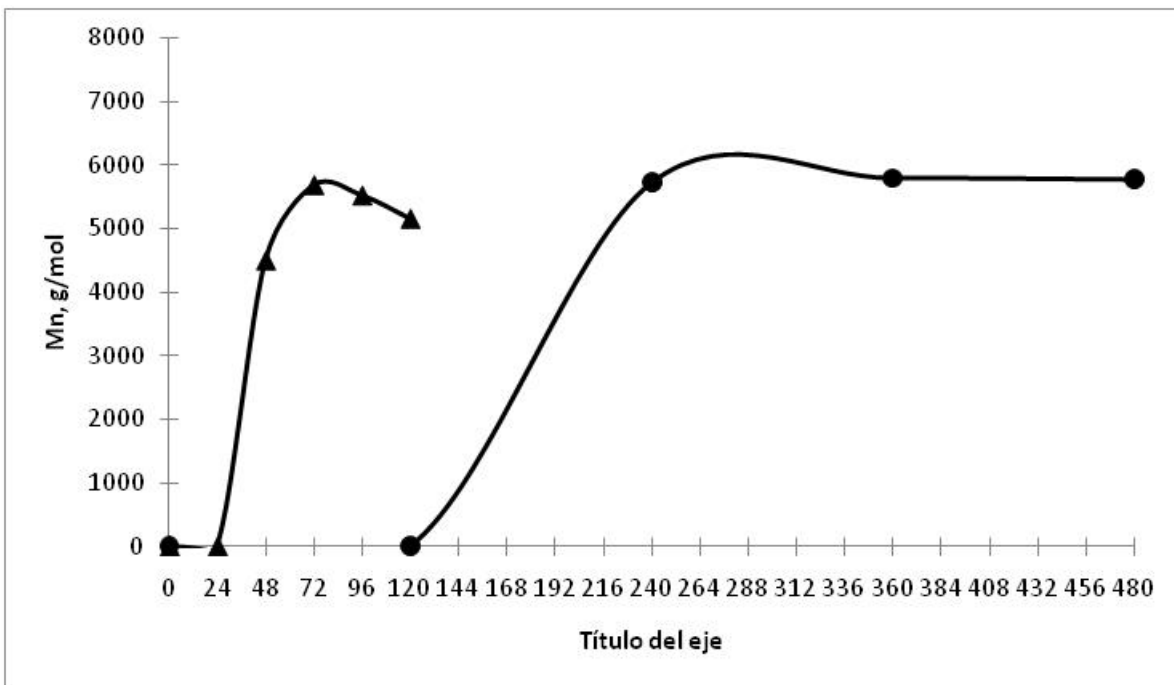
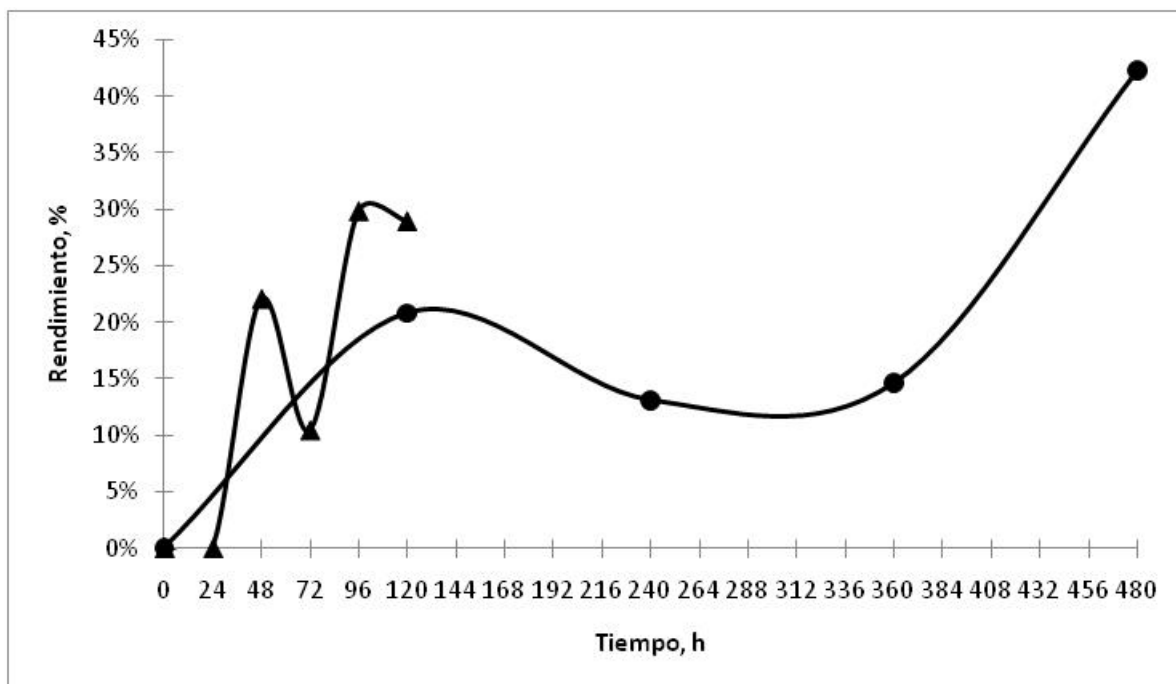


Figura 32. Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:3

En la figura 33, se observa para la reacción en masa un mayor efecto de la relación molar 1:4 en el rendimiento, ya que alcanzó el 30% en 96 h. Por su parte, la reacción en disolución, como en los casos anteriores, aumentó con la relación molar hasta un 43% en 480 h. En el medio R134a líquido se observó que mientras más se aumentó la relación molar, la tendencia a incrementar el rendimiento fue más pronunciada (mayor pendiente).



**Figura 33. Comparación de las reacciones en masa (▲) y en R134a líquido (●) para la relación molar (GA: CL) 1:3 con lipasa PS**

La incorporación de GA continuó disminuyendo como se puede apreciar en la figura 34, esto es debido a la disminución de la cantidad de GA suministrada al reactor. Para la reacción en masa fue de 5% en 48 horas y para la reacción en disolución fue de 4% en 240 h.

Finalmente, el peso molecular obtenido para la reacción en masa fue de 6,400 g/mol en un tiempo de 120 h incrementándose como resultado de que la presencia de CL ya tiene mayor efecto en el rendimiento. Por su parte la reacción en medio FC aumento hasta 7,000 g/mol en 360 h debido a un mayor incremento de CL en el copolímero, sin embargo, se notó a las 480 h una disminución del peso molecular, lo que puede implicar la hidrólisis de las cadenas de polímero, por lo que no sería recomendable tiempos más largos de reacción (figura 35).

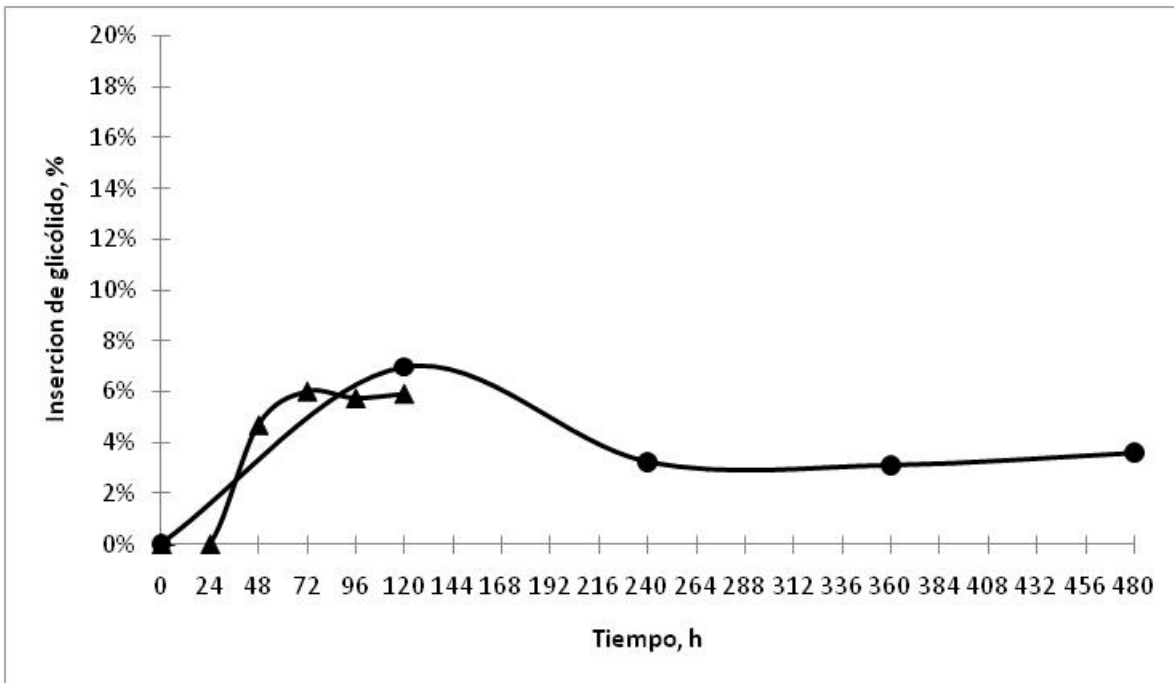


Figura 34. Comparación de la incorporación de GA de la reacción en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada por la lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:4

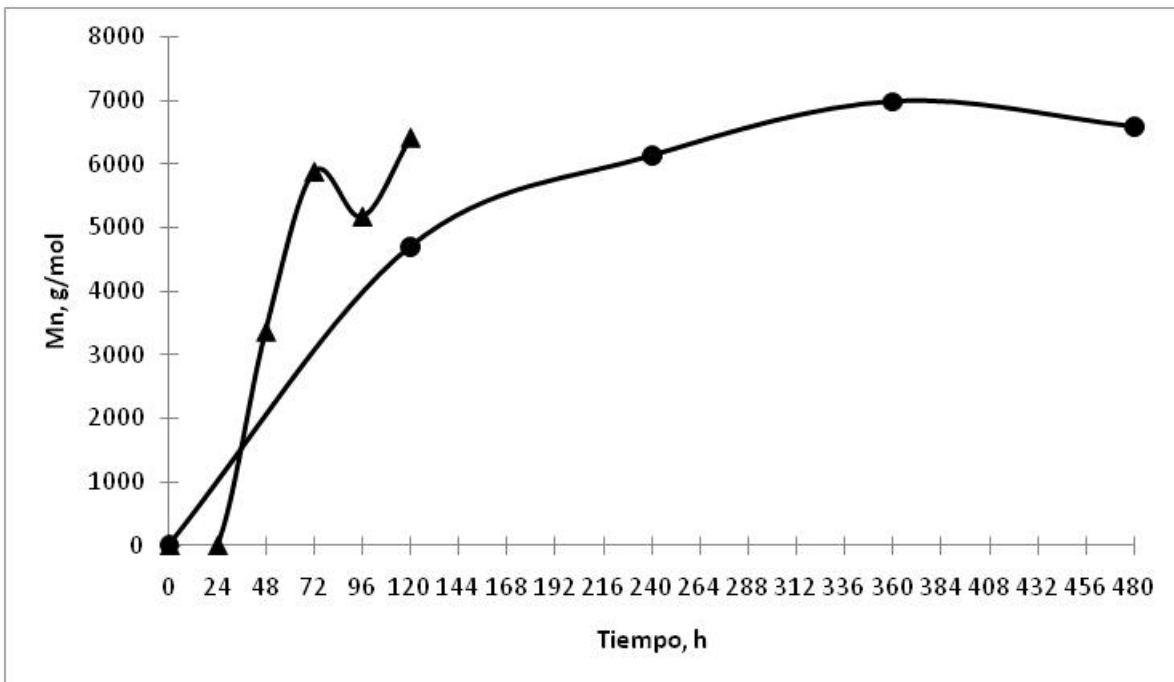


Figura 35. Comparación de los pesos moleculares de la reacción de copolimerización de GA y CL en masa (▲) y en R134a líquido (●) catalizada con lipasa PS para la relación molar (GA: CL) 1:4

Cuando se comparan los rendimientos entre las dos enzimas en reacciones con ausencia de disolvente y a las diferentes relaciones molares de monómeros, se observan rendimientos similares. Sin embargo la incorporación de GA fue muy superior para el caso de CALB.

Con estos datos se puede determinar que, para la reacción en masa, la lipasa PS es mejor ya que al obtener una incorporación de GA menor al 13% el copolímero puede disolverse en disolventes orgánicos y ser posible su tratamiento en las aplicaciones que así lo requieran.

En el caso de las reacciones en disolución, a pesar de que para la lipasa PS se requieren tiempos de reacción más largos se obtuvieron los mayores rendimientos (43%) a la relación molar 1:4 con un tiempo de 480 h, por su parte los resultados obtenidos con la Novozym 435 estuvieron todos por debajo del 12% de rendimiento para cualquier tiempo. Como ya se había mencionado, es importante considerar que el copolímero obtenido debe contener una incorporación baja de GA (cantidades menores a 30%) para que pueda ser soluble en disolventes orgánicos y de esta forma tratable. Con base en esto, se encontró que con la lipasa PS se obtienen menores resultados ya que el mayor porcentaje de incorporación fue de 11% en 240 h, por otra parte con la Novozym 435 solo se pudieron obtener copolímeros con al menos 93% de incorporación de GA en 72 h.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados con catalizadores inorgánicos, se observa que se requieren, en éste último caso, menor cantidad de catalizador y menor tiempos de reacción (en la mayoría de los casos, menores de 48 h). Kircheldorf y colaboradores (1984) utilizaron una relación molar inicial de GA: CL de 1:2 y una relación catalizador: monómero de 1:100. En su estudio identificaron que los catalizadores catiónicos como el cloruro de hierro (III) y Trifluoruro de boro, favorecen la incorporación de CL, pero a temperaturas mayores de 100° C se produce degradación de las cadenas de poliéster mientras que los catalizadores aniónicos (benzoato de tetrametilamonio y cloruro de benciltrifenilfosfonio) solo inician la homopolimerización de PGA. En los resultados que presentan, obtuvieron valores de incorporación de GA (4-15%) y rendimientos similares (15-55%) a los utilizados en este estudio pero en tiempos menores (.5-44 h) y a temperaturas más elevadas (100° C).

Dobrzynski y colaboradores (1999, 2005) utilizaron una relación molar inicial de GA: CL de 1:4 y obtuvieron porcentajes de incorporación de GA de 10-70% utilizando como catalizadores octoato de estaño (II) y acetilacetato de zirconio (IV). Las reacciones se llevaron a cabo a temperaturas más elevadas, de 100° C (donde concluyeron que no se favorecía la transesterificación) y de 150° C (que si favorecía la formación de secuencia CL-GA-CL). Con el octoato de estaño obtuvieron una incorporación de glicólido de 21% con un rendimiento del 94% en un tiempo de reacción de 150 h a



100° C siendo este copolímero interesante por su incorporación de glicólido baja y su alto rendimiento.

### 5.7 Análisis térmico y termogravimétrico para los copolímeros con mayor y menor contenido de glicólido (GA)

La calorimetría diferencial de barrido permite determinar las transiciones térmicas (vidrio-liquido) así como los procesos endotérmicos y exotérmicos. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es la transición térmica que experimenta el polímero en su parte amorfa e implica la transición de un estado estable a un estado metaestable. En otras palabras, es la temperatura a partir de la cual ciertos polímeros amorfos o semicristalinos pasan de rígidos a ser elásticos o elastómeros.

Las transiciones causadas por la presencia de una fase cristalina son la cristalización y la fusión. Para que ocurra la cristalización, la cadena del polímero debe ser lineal con un número limitado de ramificaciones. La cristalización implica el ordenamiento tridimensional de las cadenas. La cristalización de cadenas poliméricas no se lleva a cabo al 100%, es decir, los polímeros son semicristalinos. Se define un grado de cristalinidad como el porcentaje de la muestra que se encuentra en estado cristalino, lo demás se encuentra en estado amorfo.

Dependiendo del método utilizado para lograr la cristalización (enfriamiento de un polímero fundido, evaporación del disolvente de una solución de polímero) será el arreglo tridimensional (tipo de cristal), el grado de cristalinidad y la perfección de los cristales.

El proceso de fusión es inverso al de cristalización, pero a diferencia de una molécula sencilla, el polímero puede presentar temperaturas de fusión y cristalización.

En la siguiente tabla 9 se presentan las propiedades de los homopolímeros (PGA y PCL) reportados (Middleton *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 2007; Bordes *et al.*, 2009).

**Tabla 9. Propiedades térmicas de la PCL y PGA**

Polímero	Temperatura de fusión (° C)	Temperatura de transición vítrea (° C)	Cristalinidad (%)	Tiempo de degradación (meses)
PGA	225-230	35-40	45-55	6 a 12
PCL	58-63	(-65) – (-60)	67	Mayor a 24

Se obtuvieron las curvas de calentamiento de las muestras a una velocidad de calentamiento de 10° C/min y se determinaron la temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión. No se realizó un enfriamiento controlado de las muestras por lo tanto no fue posible en ningún caso observar la temperatura de cristalización ya que al ser rápido el método de enfriamiento no se permite al polímero el acomodo de las cadenas.

Los resultados obtenidos se pueden dividir en 2 grupos: las muestras con bajo contenido de unidades glicolídil y las muestras con alto contenido de éstas. En la tabla 10 se muestran la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de fusión ( $T_f$ ) de las muestras.

**Tabla 10. Resultados del estudio térmico**

Muestras	% de GA	$T_g$ (° C)	$T_f$ (° C)
1. PCL	0	-	67.33
2. PCLGA	3	-	58.07
3. PCLGA	11	-	43.17
4. PCLGA	93	34.26	152.37
5. PCLGA	96	42.0	193.56
6. PCLGA	98	20.33	194.44

La primera muestra corresponde a la PCL, para la cual no fue posible apreciar la  $T_g$  posiblemente debido al método de enfriamiento, la temperatura de fusión se encontró en los 67° C, muy cercano a los datos que se encuentran en la literatura.

Las siguientes muestras (2 y 3) contiene un porcentaje de GA bajo (3 y 11 %) por lo tanto la  $T_f$  detectada se debe a las unidades de CL, sin embargo al compararlo con el homopolímero se observa una disminución en la temperatura. Esto se puede deber a que la copolimerización al azar de CL con ciertas unidades de GA, lo que causa un cambio en la temperatura hacia temperaturas más bajas. La presencia de copolímeros aleatorios se corroboró en los espectros de RMN.

Para el caso de las muestras con alto contenido de GA (93 % ó más) se observa una  $T_g$  en un rango de 20-42° C que coincide con los datos reportados para el PGA de 35-40° C (Middleton *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 2007). Por su parte, la temperatura de fusión se encuentra en un rango de 152-194 ° C mientras que los datos reportados indican temperaturas ligeramente más elevadas (230° C). Esta diferencia se pueden deber a la presencia de unidades provenientes de la CL en el copolímero y que producen esta pequeña variación.

En la tabla 11 se muestra el análisis termogravimétrico de las muestras (temperaturas de degradación). Se puede observar que la mayor presencia de unidades de CL propicia que la temperatura inicial de degradación sea más alta (muestras 1, 2 y 3), mientras que para las muestras que son casi completamente PGA muestran una temperatura de degradación mucho más baja. Todas las muestras se degradaron hasta la temperatura de 450° C en un porcentaje similar (75.4 -98.5%), lo que indica que la muestra a esa temperatura se pierde casi en su totalidad.

**Tabla 11. Resultados del análisis termogravimétrico**

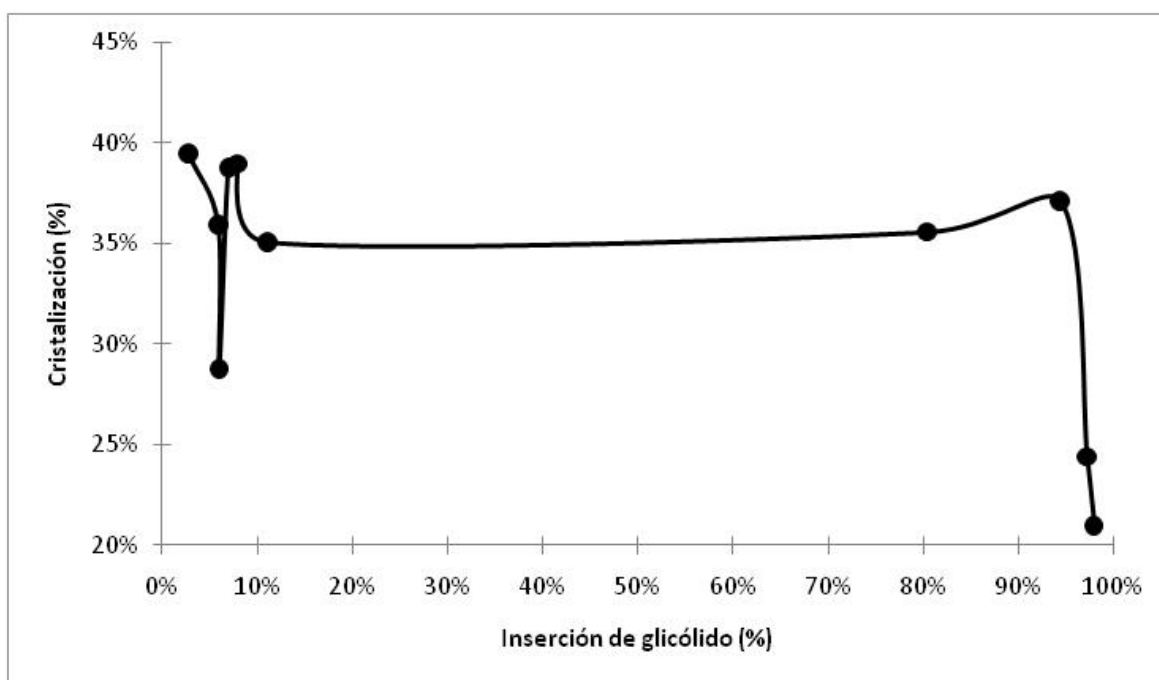
Número	Muestras	% de GA	T de degradación inicial (° C)	T de degradación final (° C)	% de muestra perdido
1.	PCL	0	280	450	98.5
2.	PCLGA	3	230	450	97.7
3.	PCLGA	11	180	450	96.9
4.	PCLGA	93	40	450	75.4
5.	PCLGA	96	70	450	94.9
6.	PCLGA	98	90	450	95.2

### 5.8 Difracción de rayos X de copoli ( $\epsilon$ -caprolactona/glicólido) (PCLGA)

Tanto la PCL como el PGA son polímeros semicristalinos. Como ya se ha observado, la inserción de GA en el copolímero de PCLGA se encuentra en un intervalo de 3.11- 12.67% y de 80.35- 98.07%. Como se muestra en la tabla 12 y en la figura 36, el rango de cristalización de los copolímeros de PCLGA se encuentra principalmente entre 35 y 40 % para la mayoría de los copolímeros PCLGA analizados ya sea con bajo o alto contenido de CL (hasta 94.25%). Solo en el caso de incorporación de GA para valores mayores de 97.18% se observaron valores de cristalización por debajo de 24.4%, lo cual puede indicar PGA de bajo peso molecular bajo como reportó Dechy-Cabaret y colaboradores (2004).

**Tabla 12. Resultados de cristalización para las muestras de PCLGA con diferentes porcentajes de incorporación de GA**

Número	Incorporación de GA (%)	Cristalización (%)
1	3.11	39.5
2	5.92	35.94
3	6.01	28.78
4	6.98	38.75
5	7.93	38.96
6	11.07	35.08
7	80.35	25.57
8	94.25	37.14
9	97.18	24.4
10	97.95	20.96



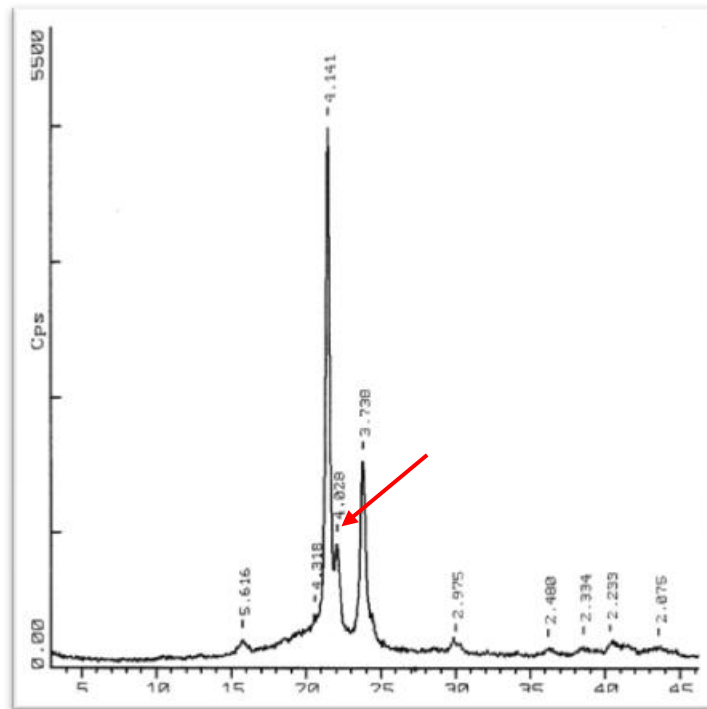
**Figura 36. Variación del % de cristalización con respecto a la incorporación de GA**

El espectro de difracción de rayos X (figura 37) se muestra a modo de ejemplo en donde se pueden observar tres picos localizados a  $2\theta=21$  (pico más alto) y  $2\theta=23$ , y un pequeño pico a  $2\theta=22$ , los cuales son asignados a las regiones cristalinas de la PCL de acuerdo al trabajo presentado por Jiang

y colaboradores (2007), que presentaron un diagrama de rayos x similar. De igual forma se observa una cristalización de casi 40% (el resultado más alto).

En contraste, en la figura 38 se observan los picos antes mencionados,  $2\theta=21$ ,  $2\theta=22$  (ahora el pico más alto),  $2\theta=23$ , y un nuevo pico a  $2\theta=28$  (característico del PGA). Sin embargo el pico que corresponde a  $2\theta=22$  es ahora el más sobresaliente, indicando que una mayor inserción de GA favorece su aparición (este pico esta marcado con una flecha roja en la figura 37, 38 y 39). El porcentaje de cristalinidad disminuye a 25.27%, indicando que un incremento en el contenido de PGA aumenta la parte amorfa del polímero.

Finalmente, en la figura 39, aparecen solo 2 picos a  $2\theta=22$  (el pico más alto) y  $2\theta=28$ . Este diagrama corresponde a un copolímero de PCLGA con una inserción de GA de 97.95%, lo que induce a pensar que el pico de  $2\theta=28$  es característico de PGA ya que no aparece en los diagramas con bajo contenido de GA, como ya se mencionó. El porcentaje de cristalización disminuyó aún más hasta 20.96%.



**Figura 37. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 2.79% y 39.5% de cristalización (polímero obtenido con lipasa PS, relación molar (GA: CL): 1:4, por 15 días)**

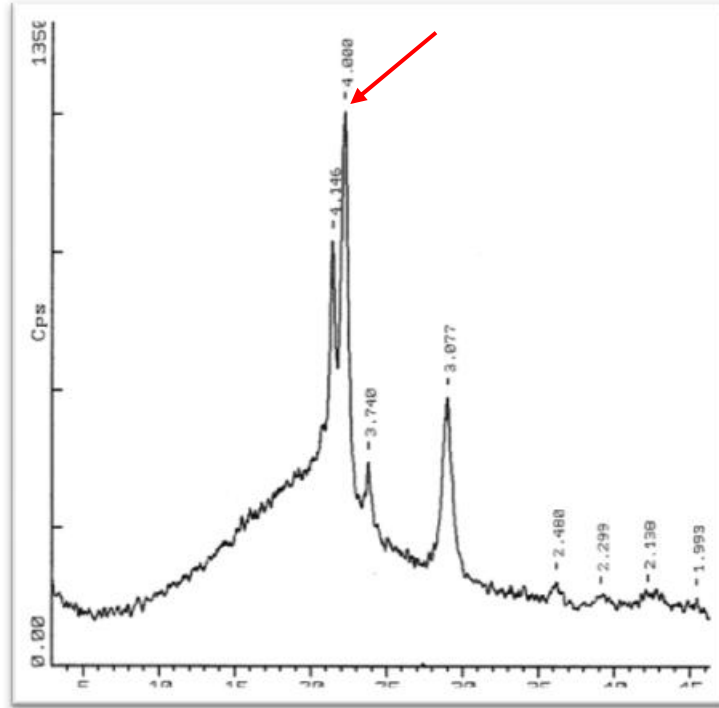


Figura 38. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 80.35% y 25.27% de cristalización (polímero obtenido con Novozym 435, relación molar (GA: CL): 1:4, por 3 días)

vo

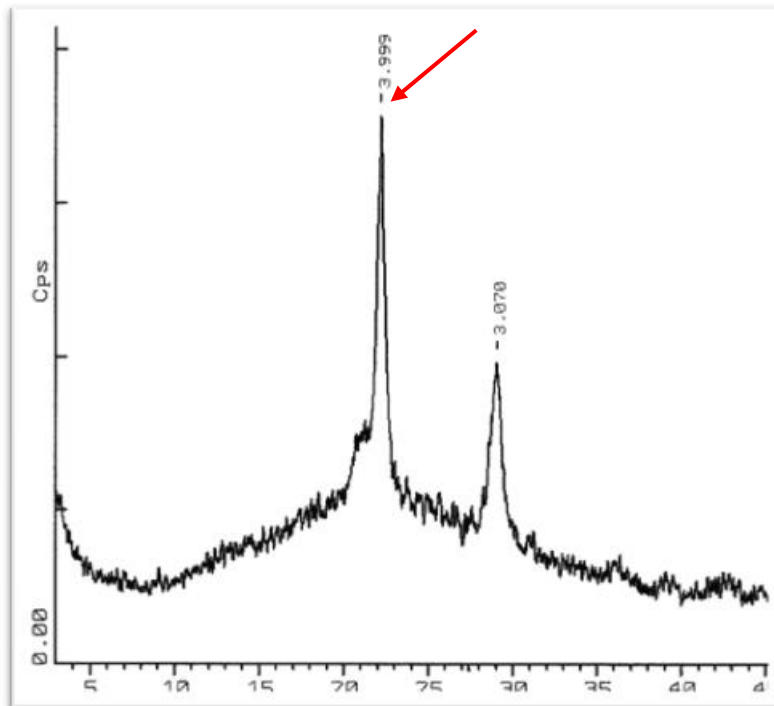


Figura 39. Espectro de difracción de rayos X de PCLGA con incorporación de GA de 97.95% y 20.96% de cristalización (polímero obtenido con Novozym 435, relación molar (GA: CL): 1:3, por 2 días)

## 6. Conclusiones

Las evaluaciones de solubilidad indicaron que el CL es completamente soluble en R-134a líquido, mientras que el GA es insoluble. Para tener unas condiciones iniciales de solubilidad en la mezcla de monómeros se requiere una relación molar mínima de 1:2 (GA: CL) a una concentración de 35% p/v.

La obtención de PCL con Novozym 435 (10% de enzima) a 65° C obtuvo mejores resultados en disolución (R134a líquido a 25 bar) que en masa. El máximo rendimiento fue de 76% en 24 h con un peso molecular de 50,000 g/mol. Para la lipasa PS (43% de enzima) se obtuvieron resultados inferiores (rendimiento: 30% y  $M_n=12,000$  g/mol), para la reacción en masa, y en tiempos más prolongados (240 h), mientras que para la reacción en R134a líquido no se registró ninguna conversión. Los valores y tiempos se tomaron como referencia para la reacción de copolimerización.

Se determinó que es posible obtener un copolímero de PCLGA con Novozym 435, sin embargo la formación de PGA fue favorecida y desde las 24 h se obtuvieron altos porcentajes de GA (más de 80%). Con las reacciones en masa se registraron los más altos rendimientos (17% en 96 h) y el incremento inicial de relación molar de CL no favoreció su incorporación, sino que disminuyó el rendimiento. La reacción en R134a líquido estuvo por debajo de la reacción en masa debido a que posiblemente el PGA es poco soluble y precipita no permitiendo que continuara la reacción, asimismo menores cantidades de GA inicial pueden provocar tiempos más prolongados de reacción.

El alto contenido de unidades de GA (90%) hace imposible su disolución en disolventes orgánicos. El copolímero obtenido consta de PGA en su mayoría con PCL insertada al azar. En el RMN solo se observaron indicios de secuencias CL-GA-CL.

Se determinó que, de igual forma, es posible obtener la PCLGA mediante la reacción de polimerización catalizada con lipasa PS. A pesar de que la cinética de síntesis de PGA es más rápida que la de la PCL, la lipasa PS favoreció a la formación de la segunda. Un aumento en la relación molar incremento el rendimiento en las reacciones en disolución de 20% para la relación molar 1:2 (180 h) hasta un 43% para la relación molar 1:4 (480 h) y con tendencia a aumentar a mayores tiempos de reacción. Por otra parte, la incorporación de GA disminuyó de 12% a 8% al aumentar la relación molar debido a un mayor contenido de CL. Los pesos moleculares fueron mayores de 5,800 g/mol, siendo los mayores de 7,200g/mol (relación molar 1:2, 120 h) en masa y de 7,000 g/mol (relación molar 1:4, 340 h) en R134a líquido.

De igual forma, los espectros de RMN muestran que existe una mayor presencia (aunque en pequeña cantidad) de secuencias de monómeros, siendo así la lipasa PS una enzima que lo favorece. La lipasa PS favorece por tanto la formación de copolímeros solubles en disolventes convencionales.

Los copolímeros que son solubles en disolventes convencionales, con bajo contenido de GA poseen puntos de fusión bajos entre 43 y 58° C, más bajos aún que los de la PCL (67° C). Esto es debido a que con la lipasa PS se obtuvo copolimerización al azar lo que provocó una disminución de esta temperatura. Las muestras con alto contenido de unidades provenientes de la PAA de GA, obtenidas con Novozym 435, presentan temperaturas más elevadas (152-195° C) que coinciden con las del

PGA (230° C). Sin embargo, con respecto a la temperatura de inicio de degradación resultaron mayores las de copolímero con bajo contenido de GA siendo de 180° C comparada con hasta 40° C.

Tanto la PCL como el PGA son polímeros semicristalinos. En la difracción de rayos X, se observó siempre la presencia de la parte cristalina con un porcentaje entre 35 y 40%. En los polímeros con una inserción de GA alta se obtuvieron valores ligeramente más bajos (24.4%) lo que indica que el incremento de GA incrementa la parte amorfa de PCLGA.

Se recomienda continuar con el estudio de la copolimerización de CL y GA con la lipasa PS utilizando menores cantidades de enzima para así determinar si eso contribuye a una mayor incorporación de glicólido. También es recomendable la evaluación de la copolimerización de CL y GA utilizando otras lipasas como lipasa.





## Referencias

1. Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O.; *One Biocatalyst–Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis*, Biocatal. Biotransform. (1998), 16, 181–204.
2. Bero, M.; Czapla, B.; Dobrzyński, P.; Janeczek, H.; Kasperczyk, J.; *Copolymerization of glycolide and  $\epsilon$ -caprolactone, 2<sup>a</sup> Random copolymerization in the presence of tin octoate*, Macromol. Chem. Phys. (1999), 200, 911-916.
3. Bordes, P.; Pollet, E.; Avérous, L.; *Nano-composites: Biodegradable polyester/nanoclay systems*, Elsevier, Prog. Polym. Sci. (2008), 34, 125-155.
4. Cai, Q.; Bei, J.; Wang, S.; *Synthesis and properties of ABA-type triblock copolymers od poly(glycolide-co-caprolactone) (A) and poly(ethylene glycol) (B)*, Polymer (2002), 43, 3585-3591.
5. Carothers, W. H.; Dorough, G. L.; Van Natta, F. J.; *Studies of polymerization and ring formation. X. Reversible polymerization of six-membered cyclic esters*, Journal of American Society (1932), 54, 761-772.
6. Chandra, R.; Rustgi, R.; *Biodegradable polymers*, Pergamon, Prog. Polym. Sci. (1998), 23, 1273-1335.
7. Chen, X.; Zong, M.; Lou, W.; Wu, H.; *Highly efficient regioselective synthesis of 5'-O-lauroryl-5-azacytidine catalyzed by Candida antarctica lipase B*, Appl. Biochem Biotechnol. (2008), 151, 21-28.
8. Córdova, A.; Iversen, T.; Hult, K.; Martinelle, M.; *Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone*, Polymer (1998), 39, 25, 6519-6524.
9. Corr, S.; *1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent*, J. Fluor. Chem. (2002), 118, 55-67.
10. Danieli, B.; Luisetti, M.; Sampognaro, G.; Carrea, G.; Riva, S.; *Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by Candida antarctica lipase B (Novozym 435) in organic solvents*, Journal of molecular catalysis B: enzymatic (1997), 3, 193-201.
11. Dechy-Cabaret O, Martin-Vaca B, Bourissou D *Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide*, Chem. Rev. (2004), 104, 6147-6176
12. Deng, F.; Gross, R. A.; *Ring-opening bulk polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone and trimethylene carbonate catalyzed by lipase Novozym 435*, International Journal of Biological Macromolecules (1999), 25, 153-159.
13. Dobrzynski, P.; Li, S.; Kasperczyk, J.; Ver, M.; Gasc, F.; Vert, M.; *Structure-Property Relationships of Copolymers Obtained by Ring-Opening Polymerization of Glycolide and  $\epsilon$ -caprolactone. Part 1. Synthesis and Characterization*, Biomacromolecules (2005), 6, 483-488.

14. Funabashi, M.; Ninomiya, F.; Kunioka, M.; *Biodegradation of polycaprolactone powder proposed as reference test materials for international standard of biodegradation evaluation method*, J. Polym. Environ. (2007), 15, 7-17.
15. García-Arrazola, R.; Gimeno, M.; Bárzana, E.; *Use of liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane as solvent media for enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of lactones*, Macromolecules (2007), 40, 4119-4120; García-Arrazola, R.; Gimeno, M.; Bárzana, E.; *Effect of the initial water activity on the yields and molecular Weights of the lipase-catalysed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid R-134a*. e-Polym. (2008), 19, 1-4.
16. Jaeger, K-E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; *Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases*, Annu. Rev. Microbiol. (1999), 53, 315-351.
17. Jaeger, K-E.; Eggert, T.; *Lipases for biotechnology*; Curr. Opinion Biotech. (2002), 13, 390-397.
18. Jiang, Z.; You, Y.; Deng, X.; Hao, J.; *Injectable hydrogels of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-glicolide)-poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-glicolide) triblock copolymer aqueous solutions*, Polymer (2007), 48, 4786-4792.
19. Kim, K. k.; H. K.; Shin, D. H.; Hwang, K. Y.; Suh, S. W.; *The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor*, Structure (1997), 5, 2, 173-185.
20. Kobayashi, S.; Takeya, K.; Suda, S.; Uyama, H.; *Lipase-catalyzed ring-opening of medium size lactones to polyesters*; Macromol. Chem. Phys. (1998), 199, 1729-1736.
21. Kobayashi, S.; Uyama, H.; Kimura, S.; *Enzymatic polymerization*, Chem. Rev. (2001), 101, 3793-3818
22. Kricheldorf, H. R.; Mang, T.; Jonté, J. M.; *Poly lactones. I. Copolymerization of glycolide and  $\epsilon$ -caprolactone*, Macromolecules (1984), 17, 2173-2181.
23. Krishna, S. H., *Developments and trends in enzyme catalysis in non-conventional media*, Biotechnol. Adv. (2002), 20, 239-267.
24. Loecker, F. C.; Duxbury, C. J.; Kumar, R.; Gao, W.; Gross, R. A.; Howdle, S. M.; *Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -CL in supercritical carbon dioxide*, Macromolecules (2004); 37: 2450-3.
25. MacDonald, R. T.; Pulapura, S. K.; Svirkin, Y. Y.; Gross, R. A.; *Enzyme-Catalyzed  $\epsilon$ -caprolactone Ring-Opening Polymerization*, Macromolecules (1995), 28, 73-78.
26. Middleton, J. C.; Tipton, A. J.; *Synthetic biodegradable polymers as medical devices*, Medical plastics and biomaterials magazine (1998).
27. Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; *Biodegradable polymers as biomaterials*, Prog. Polym. Sci. (2007), 32, 762-798

28. Persson, M.; Mladenoska, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; *Preparation of lipases for use in organic solvents*, Enzyme microbial technol. (2002), 31, 838-841.
29. Puskas, J. E.; Sen M. Y.; Seo, K. S.; *Green polymer chemistry using nature's catalysts*, Enzymes, J. Polym. Sci. A Polym. Chem. (2009), 47, 2959-2976.
30. Schmid, R. D.; Verger, R.; *Lipases: interfacial enzymes with attractive applications*, Angew. Chem. Int. Ed. (1998), 37, 1608-1633
31. Takamoto, T.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Lipase catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in supercritical carbon dioxide*, e-polym. (2001), 4, 1-6.
32. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T.A.; *The Sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*, Structure (1994), 293-308.
33. Uyama, H.; Kuwabara, M.; Tsujimoto, T.; Kobayashi, S.; *High performance immobilized lipase catalyst for polyester synthesis*, Polymer (2002), 34, 970-972.
34. Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Enzymatic ring-opening polymerization of lactones catalyzed by lipase*, Chem. Lett. (1993), 1149-1150
35. Varma, I. K.; Albertsson, A.; Rajkhowa, R.; Srivastava, R. K.; *Enzyme catalyzed synthesis of polyesters*, Prog. Polym. Sci. (2005), 30, 949-981.
36. Wu, C-S.; *Physical properties and biodegradability of maleated-polycaprolactone/starch composite*, Polymer Degradation and Stability (2003), 80, 127-134.
37. Yu, G.; Xue, Y.; Xu, W.; Zhang, J.; Hu, C.; *Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a)*, J. Ind. Microbial. Biotechnol. (2007), 34, 793-798
38. Zurita, R.; Franco, L.; Puiggali, J.; Rodríguez-Galán, A.; *The hydrolytic degradation of a segmented glycolide-trimethylene carbonate copolymer (Maxon<sup>TM</sup>)*, Polym. Deg. Stability (2007), 92, 975-985.